

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut für Tumorbiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pantel

Potential und Grenzen der Analyse von zirkulierender Mikrosatelliten-DNA im
Serum von Mammakarzinompatientinnen

Dissertation

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

vorgelegt von:
Cord Beeger
aus Hamburg

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.08.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. Heidi Schwarzenbach

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Müller

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Das Mammakarzinom	5
1.1.1	Epidemiologie	5
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese	5
1.1.3	Lokalisation und Ausbreitung	6
1.1.4	Diagnostik	6
1.1.5	Histopathologische Einteilung	7
1.1.6	Staging, Grading	8
1.1.7	Metastasierung, disseminierte Tumorzellen	9
1.1.8	Weitere prognostische und prädiktive Faktoren	9
1.1.9	Vorsorgeuntersuchung	10
1.1.10	Therapie	11
1.2	Frei zirkulierende DNA im Blutplasma	12
1.3	Freie DNA im Knochenmarkplasma	13
1.4	Mikrosatelliten	14
1.5	Allelische Imbalanz	14
1.6	Tumorsuppressorgene	15
2	FRAGESTELLUNG	18
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	Material.....	18
3.1.1	Blut-, Knochenmark- und Tumorproben	18
3.1.2	Reagenzien	18
3.1.3	Puffer und Lösungen	19
3.1.4	Kits	19
3.1.5	DNA-Polymerasen	20
3.1.6	DNA-Marker	20
3.1.7	Software	20
3.1.8	Geräte	20
3.1.9	Verbrauchsmaterialien und Sonstiges	21
3.1.10	Primer	21
3.2	Methoden	22
3.2.1	Patientenkollektiv	22
3.2.2	Gewinnung von Untersuchungsmaterial	22
3.2.3	Isolierung genomischer DNA	24
3.2.4	Reinigung und Konzentration von DNA-Proben aus Blutplasma	26
3.2.5	Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren	26
3.2.6	Fluoreszenzmarkierte PCR	27
3.2.7	Denaturierung der PCR-Produkte	28
3.2.8	Kapillarelektrophorese der PCR-Produkte im „Genetic Analyzer“	28
3.2.9	Auswertung der Analysedaten	29
3.2.10	Verdünnungsexperimente von Tumor- bzw. Plasma-DNA mit Vergleichs-DNA aus Leukozyten 31	
3.2.11	Statistische Auswertung	32
4	ERGEBNISSE.....	32

4.1	DNA-Gehalt im Blutplasma von Mammakarzinompatientinnen	32
4.2	Identifizierung der Allele.....	33
4.3	Festlegung der Grenzen zur Detektion von AI	35
4.4	Charakterisierung der Primer und Mikrosatelliten-Marker	36
4.5	Allelische Imbalanz in Tumorgewebe, Blut- und Knochenmarkplasma von Mammakarzinompatientinnen.....	36
4.5.1	Allelische Imbalanz im Tumorgewebe.....	36
4.5.2	Allelische Imbalanz im Blutplasma.....	41
4.5.3	Allelische Imbalanz im Knochenmarkplasma	48
4.5.4	Vergleich der Ereignisse in Tumor, Blut- und Knochenmarkplasma	49
4.6	Ergebnisse der Verdünnungsexperimente	51
4.7	DNA-Gehalt nach Reinigung und Konzentration der DNA-Proben	53
5	DISKUSSION.....	53
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	64
7	ABKÜRZUNGEN UND FREMDWÖRTER.....	66
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	67
9	DANKSAGUNG	77
10	LEBENS LAUF	78
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	79

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Im folgenden Abschnitt soll eine kurze Einführung in die Klinik des Mammakarzinoms gegeben werden. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Themen gelegt, die für die Diskussion dieser Arbeit von Bedeutung sind.

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist in Deutschland mit einem Anteil von 26 % eines der häufigsten Malignome der Frau. Bei den durch Neubildungen verursachten Todesfällen der Frau nimmt es mit 17 % noch vor dem Bronchialkarzinom den ersten Platz ein und ist für 4 % aller Todesfälle bei Frauen in 2011 in Deutschland verantwortlich. Der Altersgipfel liegt zwischen 50 und 70 Jahren. Das durchschnittliche Erkrankungsrisiko einer Frau in Deutschland für Brustkrebs beträgt etwa 7 % - 9 %. Die Erkrankungshäufigkeit nimmt in der westlichen Welt zu (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2012; Schmidt-Matthiesen *et al.*, 2002).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Ein gesicherter Risikofaktor für die Entstehung des Mammakarzinoms ist das Alter der Patienten. Vor allem nach dem sechzigsten Lebensjahr steigt das individuelle Erkrankungsrisiko an. Der zweite wichtige Risikofaktor ist die familiäre Disposition, die für etwa 5-10 % der Fälle verantwortlich ist (Runnebaum *and* Emmerich, 2002). Sie zeigt sich anamnestisch und wird durch Mutationsanalysen entdeckt. Bei Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA1 oder BRCA2 liegt das Erkrankungsrisiko bei 50 % - 85 %, wobei Mutationen in BRCA1 häufiger sind. Weitere genetische Merkmale sind z.B. Mutationen in den Genen TP53, PTEN und ATM. Die betroffenen Familien fallen u.a. dadurch auf, dass Mammakarzinome in der Familie gehäuft auftreten, häufig im jüngeren Lebensalter, als bilaterale Erkrankung, oder kombiniert mit Ovarialtumoren. Auch das Auftreten von Mammakarzinomen bei Männern ist hochverdächtig auf eine familiäre Disposition (Straub *et al.*, 2004). Hormonelle Faktoren wie frühe Menarche, späte Menopause und späte Schwangerschaft sind ungünstig, eine frühe Schwangerschaft und eine lange Stillperiode hingegen vermindern das Risiko, in jungen Jahren an Brustkrebs zu erkranken (Colditz *and* Rosner, 2000).

Neben Alter, Genetik und hormonellem Status gibt es eine Reihe von zivilisatorischen Faktoren, die mit einer erhöhten Erkrankungsrate einhergehen. Unter anderem werden Bewegungsarmut, Gewichtszunahme und Übergewicht, fettreiche und ballaststoffarme Ernährung genannt. Hormonelle Therapien wie Verhütung mit der „Pille“ bereits vor dem sechzehnten Lebensjahr sowie Östrogensubstitution mehr als fünf Jahre nach dem Klimakterium erhöhen das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken (Colditz *and* Rosner, 2000).

1.1.3 Lokalisation und Ausbreitung

Das Mammakarzinom tritt am häufigsten im oberen, äußeren Quadranten der Brust auf (ca. 50-60 %), gefolgt vom oberen inneren Quadranten und dem Mamillenzentrum (jeweils ca. 15 %). Karzinome in den unteren Quadranten sind am seltensten. Besonders zu beachten ist die Multifokalität und die Multizentrität des Mammakarzinoms. Von Multifokalität spricht man, wenn innerhalb desselben Quadranten mehrere Karzinomherde gefunden werden, häufig in einem Abstand von weniger als 2 cm. Als Multizentrität bezeichnet man das Auftreten mehrerer Karzinomherde in verschiedenen Quadranten der Brust, auch in der kontralateralen Brust. Sie entsteht teils durch primäre Disseminierung, teils durch kontinuierliche oder diskontinuierliche Ausbreitung. In aufgrund eines Primärtumors entnommenen Ablationspräparaten fand man bei 13 % der Patientinnen Zweitkarzinome, die mammographisch unauffällig waren. Das multizentrische Auftreten ist u.a. abhängig von Größe, *Grading* und Histologie des Primärtumors (Schmidt-Matthiesen *et al.*, 2002).

1.1.4 Diagnostik

Erste Verdachtshinweise auf Veränderungen der Mamma werden in 60-70 % von den Patientinnen selbst geäußert. Die verbleibenden Fälle werden aufgrund des Verdachts des Arztes oder ausschließlich durch Mammographie-*Screening* aufgedeckt. In der Anamnese können Schmerzen und unspezifische Symptome angegeben werden. In der klinischen Untersuchung fallen u.a. Größenunterschiede, tastbare Knoten, Mamillenabsonderungen und Hautveränderungen auf. Die Bildgebung mit Mammographie und Sonographie wird regelmäßig angewendet, bei unklaren Befunden kann sie durch MR-Mammographie und Galaktographie ergänzt werden. Bei verdächtigen Befunden in wenigstens einer der genannten Untersuchungen sollte eine endgültige Abklärung durch Gewebentnahme und Histologie angestrebt werden. Besteht ein lokal fortgeschrittenes Karzinom oder der klinische

der Verdacht auf eine Fernmetastasierung, so sollte ein Staging mit Röntgen-Thorax, Ultraschall der Leber und Skelettszintigraphie durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2012). Unter den im Serum messbaren Tumormarkern sind das *cancer antigen 15-3* (CA15-3) und das *carcino-embryonal antigen* (CEA) relevant, bei muzinösen Karzinomen auch das *mucin-like carcinoma associated antigen* (MCA). Sie sollten bereits vor der Primäroperation bestimmt werden und können zur Verlaufskontrolle verwendet werden (Esserman *et al.*, 2000).

1.1.5 Histopathologische Einteilung

Der Begriff Mammakarzinom beschreibt zusammenfassend eine heterogene Gruppe von malignen Neubildungen der Brustdrüse. Diese können als präinvasive Veränderung oder als invasives Karzinom vorliegen.

Als Präkanzerose des Mammakarzinoms gilt das *Carcinoma lobulare in situ* (LCIS), das in über 60 % der Fälle multizentrisch, auch bilateral, auftritt. In ca. 20 % der Fälle geht es nach einer Latenzzeit von 10 bis 25 Jahren in ein invasives Karzinom über. Es wird meist nur zufällig entdeckt. Das *Carcinoma ductale in situ* (DCIS) hingegen ist als kurz vor der Invasion stehende Veränderung anzusehen. Bei kleineren Veränderungen mit einem Durchmesser von unter 2,5 cm sind weder Multizentrität noch Mikroinvasion zu erwarten. Größere DCIS-Herde mit einem Durchmesser von über 5 cm weisen bei genaueren Untersuchungen allerdings schon zu über 60 % invasive Bereiche auf, die Bezeichnung als *Carcinoma in situ* ist also mit Vorsicht zu verstehen.

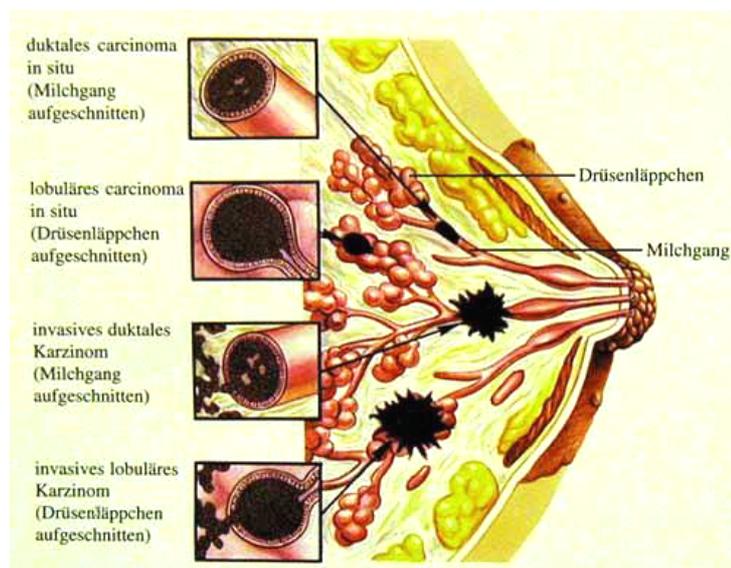


Abb. 1: Schematische Darstellung der beiden häufigsten Formen des Mammakarzinoms und deren *in-situ*-Vorstufen (Rüdiger-Anatomie-Gesellschaft, 2006)

Die invasiven Karzinome lassen sich morphologisch aufteilen. Am häufigsten tritt in 75 % der Fälle das duktales Karzinom auf, gefolgt vom lobulären Karzinom in 15 % der Fälle (Abb. 1). Es folgen das medulläre, tubuläre und kribriforme Karzinom (jeweils 2 %) und eine Reihe von seltenen Erscheinungsformen (Li *et al.*, 2005; Sabel, 2010).

1.1.6 Staging, Grading

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation, in der die Größe und Ausbreitung des Primärtumors, Anzahl der befallenen Lymphknoten und das Vorhandensein von Fernmetastasen berücksichtigt werden. Die hier vorliegende Arbeit basiert auf der 7. Auflage der UICC (Tab. I) (Edge *and* Byrd, 2010).

Tabelle I: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms nach der 7. Auflage der UICC

pT	Primärtumor
pTX	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	kein Anhalt für Malignität
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT2	Tumor >2 cm, aber nicht >5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor >5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeglicher Größe mit Infiltration der Haut oder der Brustwand
pN	Regionäre Lymphknoten
pNX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
pN0	kein Anhalt für Befall der regionären Lymphknoten
pN1	Metastasen in ipsilateralen beweglichen axillären Lymphknoten
pN2	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an anderen Strukturen fixiert
pN3	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
pM	Fernmetastasen
pMX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
pM0	kein Anhalt für Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen vorhanden

Die Dignität wird nach der in dieser Studie verwendeten Klassifikation in drei Grade eingeteilt (Elston *and* Ellis, 1991) (Tab.II). Dagegen weist die heute verwendete neue Klassifikation vier Grade auf. Weitere histologische Prognosefaktoren sind u.a. die entzündliche Umgebungsreaktion, das Auftreten von zentralen Nekrosen und der Einbruch ins Blut- oder Lymphsystem (Fitzgibbons *et al.*, 2000).

Tabelle II: Grading

Differenzierungsgrad	Malignitätsgrad	G-Gruppe
Gut differenziert	gering	G1
Mäßig differenziert	mäßig	G2
Schlecht differenziert	hoch	G3

1.1.7 Metastasierung, disseminierte Tumorzellen

Die Metastasierung des Mammakarzinoms kann lymphogen und hämatogen erfolgen. Die lymphogene Ausbreitung erfolgt am häufigsten in die axillären Lymphknoten. Fernmetastasen finden sich zumeist im Skelett, in der Lunge, der Leber und im Gehirn (Böcker *and* Kunze, 2001). Die hämatogene Aussaat von Tumorzellen ist unabhängig von der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen, die metastasierten Zellen unterscheiden sich in ihrer molekularen Ausstattung (Wölfle *et al.*, 2003). Von den Mammakarzinompatientinnen ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen entwickeln 20-30 % im Verlauf Fernmetastasen (Braun *et al.*, 2000). Die hämatogene Disseminierung von Tumorzellen ist ein frühes Ereignis in der Entwicklung des Mammakarzinoms. Metastasierte Tumorzellen können jahrelang in einer Art Latenzzeit (*tumor dormancy*) überdauern, bevor sie als Spätrezidiv klinisch manifest werden können (Pantel *and* Brakenhoff, 2004; Pantel *et al.*, 2008). Da das Mammakarzinom bevorzugt in das Skelettsystem metastasiert, ist das Knochenmark ein geeignetes Indikatororgan zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen (DTC) (Pantel *et al.*, 1999). In etwa 30 % der Fälle lassen sich in Knochenmarkaspiraten von nodalnegativen Mammakarzinompatienten mit immunhistochemischer Färbung kleinste Zellverbände oder einzelne Tumorzellen nachweisen. Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark korrelieren mit einer schlechten Prognose (Braun *et al.*, 2000 und 2005). Zum Nachweis der epithelialen Herkunft dieser disseminierten Tumorzellen wird der mit dem Farbstoff Cy3 markierte monoklonale Antikörper A45-B/B3 verwendet. Er ist spezifisch für die Zytokeratine CK8, 18 und 19.

1.1.8 Weitere prognostische und prädiktive Faktoren

Prognosefaktoren ermöglichen eine Einschätzung des weiteren Krankheitsverlaufs, während prädiktive Faktoren das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorhersagen. Einige Faktoren können sowohl prognostisch und prädiktiv zugleich sein (Thomssen *and* Harbeck, 2004; Harris *et al.*, 2007).

Durch Immunhistochemie und Radio-Immun-Assays lässt sich der Rezeptorstatus des Tumors feststellen. Er gibt Auskunft über die Prognose der Erkrankung und über adjuvante Therapiemöglichkeiten. Das Vorkommen der Östrogen- und Progesteronrezeptoren korreliert

mit dem *Grading* des Tumors. G1-Tumoren sind zu 85 % rezeptorpositiv, G3-Tumoren hingegen sind zu ca. 85 % rezeptornegativ. Das Expressionsniveau der Östrogen- und Progesteronrezeptoren korreliert mit der Effizienz der endokrinen Therapie (Jänicke, 2002).

Die Proliferationsrate des Tumors kann u.a. durch das Antigen Ki-67 bestimmt werden (Harbeck *et al.*, 1995). Dieses ist ein nukleäres Protein, das während der aktiven Phase des Zellzyklus (G1, S, G2, M), nicht jedoch in ruhenden Zellen (G0) exprimiert wird. Sein Auftreten korreliert mit dem *Grading* des Tumors und kann somit prognostische Informationen liefern (Dettmar *et al.*, 1997).

Das Protoonkogen HER2/neu kodiert ein transmembranes Protein, das zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren gehört. Der Nachweis einer Überexpression von HER2/neu wird als prädiktiver Faktor für die Wirksamkeit einer Therapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab verwendet. 18–20 % der invasiven Mammakarzinome zeigen eine Überexpression von HER2/neu, die Patientinnen können somit von einer Antikörpertherapie profitieren (Slamon *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2007). Die prädiktive Potenz handelsüblicher Tests zur Genexpressionsanalyse mit 21 bzw. 70 untersuchten Gensignaturen wird von Experten unterschiedlich beurteilt und hat noch keinen Eingang in den klinischen Alltag gefunden (Paik *et al.*, 2006; Knauer *et al.*, 2010; Dabbs *et al.*, 2011; AGO-Leitlinien Mammakarzinom 2012)

Die Tabelle III zeigt die hohen Ansprüche bei der Einführung neuer Prognosefaktoren in die Klinik.

Tabelle III: Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren (Harbeck *et al.*, 2003)

Biologische Hypothese
Einfache und standardisierte Nachweismethode mit Qualitätssicherung
Biostatistische Planung der Evaluierungsstudien
Überprüfung der Korrelation zu etablierten Faktoren
Optimierte Schwellenwerte zur Unterscheidung in Niedrig- und Hochrisikogruppe
Univariate und multivariate Analyse (Unabhängigkeit und Gewichtung der Faktoren)
Unabhängige Validierung (anderes Patientenkollektiv, andere Untersucher)
Klinische (Therapie-)Studie, Metaanalyse
Überführung in die klinische Praxis

1.1.9 Vorsorgeuntersuchung

Bezüglich des Mammakarzinoms werden, unabhängig von anamnestischen oder klinischen Verdachtsmomenten, regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen empfohlen. Dazu gehören ab dem 25. Lebensjahr die Abtastung der Mammæ und deren Lymphabflusswege. Zusätzlich werden

die Patientinnen zur Selbstuntersuchung angeleitet. Die Mammographie wird bei erhöhtem individuellem Erkrankungsrisiko, erschwerter Palpation und sehr ängstlichen Patientinnen angewandt. Ein regelmäßiger Einsatz der Mammographie ist wünschenswert, da das Screening die Sterblichkeit an Brustkrebs senken kann (Warren-Burhenne, 2004). Basierend auf den Leitlinien des *Europe Against Cancer*-Programms (aktuell: Perry *et al.*, 2008) wurde seit Ende 2005 in Deutschland in 89 Screening-Regionen mit einem solchen Mammographie-Screening begonnen. Anspruchsberechtigt sind Frauen zwischen dem 50. und dem 70. Lebensjahr, diskutiert wird eine Ausweitung des Anspruchs für Frauen zwischen dem 40. und dem 49. Lebensjahr (Heywang *et al.*, 2008). Erste Ergebnisse zeigen einen Anstieg der Neuerkrankungsraten in Deutschland seit Einführung des Screenings 2005 (IACR Conference, 2012).

1.1.10 Therapie

In den letzten Jahren hat ein Umdenken in der Therapie des Mammakarzinoms stattgefunden. Das häufige multizentrische oder bilaterale Auftreten, die frühe Metastasierung, der Nachweis von disseminierten Tumorzellen auch in N0- und M0-Tumoren führten dazu, den Brustkrebs mehr und mehr als systemische Erkrankung anzusehen. In der lokalen operativen Therapie und Strahlentherapie wird zunehmend auf radikale Mastektomien zugunsten der brusterhaltenden Techniken verzichtet – mit ähnlichen Ergebnissen in vergleichenden Untersuchungen (Fisher *et al.*, 2002; Veronesi *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 2005). Mit der Biopsie der *Sentinel*-Lymphknoten ist eine Technik entwickelt worden, mit der in nodalnegativen Fällen auf eine radikale Lymphonodektomie verzichtet werden kann (McMasters *et al.*, 2000; Mabry *et al.*, 2007). Bisher wurde der Mehrzahl der Patientinnen nach der Operation eine zusätzliche endokrine oder zytostatische Therapie empfohlen. Für nodal-negative Patientinnen, die zu 70 % durch die lokoregionäre Operation allein geheilt werden können, stellte dieses Vorgehen in den meisten Fällen eine Übertherapie dar (McGuire and Clark, 1992; Goldhirsch *et al.*, 2007; Greil 2008). Nach den Empfehlungen der 12. St. Gallen Konsensuskonferenz zur Primärtherapie früher Stadien des Mammakarzinoms kommt der genauen Subklassifizierung des Tumors eine besondere Bedeutung zu (Goldhirsch *et al.*, 2011). Mit Hilfe der neuen prognostischen und prädiktiven Faktoren versucht man, insbesondere die Prognose der nodal-negativen Patientinnen genauer einzuschätzen und die adjuvante systemische Therapie individueller abzustimmen (Thomssen and Jänicke 2000; Jänicke 2002; Harbeck *et al.*, 2003; Pantel *et al.*, 2003).

1.2 Frei zirkulierende DNA im Blutplasma

Im Jahr 1948 wiesen französische Wissenschaftler nach, dass DNA nicht nur im Zellkern und in den Mitochondrien menschlicher Zellen vorkommt, sondern auch zellfrei im Blutplasma zirkuliert (Mandel *and* Métais, 1948). 1975 wurde eine Methode zum Nachweis von zirkulierender DNA im Nanogrammbereich entwickelt (Leon *et al.*, 1975). Bei gesunden Probanden sind geringe Mengen frei zirkulierender Nukleinsäuren (zwischen 10 µg/ml und 30 µg/ml) nachweisbar. Bereits in den 70er Jahren wurden erhöhte Spiegel frei zirkulierender DNA in Tumorpatienten festgestellt. Patienten im metastasierten Stadium wiesen signifikant höhere Plasmaspiegel auf als solche ohne Metastasen (Leon *et al.*, 1977). Diese Beobachtungen wurden in den folgenden Jahren von weiteren Studien bestätigt (Stroun *et al.*, 1987). Nach operativer Entfernung des Tumors können sich die DNA-Spiegel im Plasma wieder normalisieren (Catarino *et al.*, 2008). Überdies wurden erhöhte Spiegel an zellfreier DNA auch bei verschiedenen anderen Krankheitsbildern und physiologischen Zuständen festgestellt, darunter Entzündungsreaktionen, Traumen, Herzinfarkt, Schwangerschaft und Wachstum (Swaminathan *and* Butt, 2006). Die Herkunft der frei zirkulierenden DNA ist somit wahrscheinlich multifaktorieller Genese.

Messungen der DNA-Fragmente im Blut ergaben einerseits Fragmentlängen von 180 bp oder einem Vielfachen davon, die bei der Apoptose entstehen und auf die Windung der DNA um die Histone zurückzuführen ist. Andererseits finden sich auch Fragmente, die mit einer Länge von 10.000 bp für eine Freisetzung aus nekrotischen Zellen sprechen (Jahr *et al.*, 2001). Des Weiteren wird auch eine aktive Freisetzung von DNA aus Tumorzellen diskutiert (Stroun *et al.*, 2001). Bei Tumorpatienten entdeckten verschiedene Studien in der frei zirkulierenden DNA Alterationen im Blut, die auch in den korrespondierenden Tumorgeweben zu finden waren. Als Beispiele sind hier zu nennen: Punktmutationen im K-ras-Onkogen in Pankreaskarzinompatienten (Sorenson *et al.*, 1994), Promotorhypermethylierungen des Tumorsuppressorgens p16 in Patienten mit Nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (Esteller *et al.*, 1999), Mikrosatellitenalterationen wie LOH und MSI in Patienten mit Kopf- und Hals-Tumoren, Brustkrebs und Prostatakrebs (Nawroz *et al.*, 1996, Mayall *et al.*, 1999; Schwarzenbach *et al.*, 2007a). Dagegen wurde in anderen Publikationen über eine geringe Übereinstimmung von tumorspezifischen Veränderungen der DNA zwischen Tumor und Plasma berichtet (Coulet *et al.*, 2000, de Vos *et al.*, 1995, Fleischhacker *and* Schmidt, 2006). Gründe hierfür können die multifokale Heterogenität des Primärtumors sein, bei der nicht jedes Areal des Tumors untersucht wird und nicht jeder Zellklon gleichmäßig an der

Freisetzung von DNA ins Plasma beteiligt ist (Lichy *et al.*, 2003). Des Weiteren kann es zu einer Verdeckung von tumorassoziierten Veränderungen durch Dilution mit Wildtyp-DNA aus normalen Zellen kommen (Wang *et al.*, 2003; Schwarzenbach *et al.*, 2011). Für Tumorpatienten wird neben dem Primärtumor auch die Herkunft zellfreier DNA aus zirkulierenden Tumorzellen und mikrometastatischen Depots diskutiert. Ebenfalls wird eine Freisetzung von DNA sowohl aus Entzündungszellen als auch aus entzündetem Gewebe angenommen (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Mehrere Labore konnten zeigen, dass für einige Tumorentitäten bereits die erhöhten DNA-Level im Blut mit den etablierten Prognosefaktoren der Patienten korrelieren können und dass die Bestimmung der DNA-Konzentration als ein zusätzlicher Tumormarker dienen könnte. Für andere Tumorentitäten gelang bisher noch kein Nachweis eines Zusammenhangs zwischen DNA-Konzentration und Größe, *Staging* oder Sitz des Tumors (Jahr *et al.*, 2001; Chun *et al.*, 2006; Fleischhacker *and* Schmidt, 2007). Ein wichtiger Faktor bei der Beurteilung der absoluten DNA-Konzentrationen ist die Technik der DNA-Gewinnung und -Isolierung. Es wurden starke Schwankungen in den DNA-Konzentrationen derselben Probanden an unterschiedlichen Tagen beobachtet. Ebenso spielt die Dauer der Lagerung der Blutprobe vor der Bearbeitung eine Rolle. Ursache für die Erhöhung der DNA in der Blutprobe können unter anderem auch die Zerstörung weißer Blutkörperchen sowie enzymatische Abbauprozesse sein. In einzelnen Studien wurden Unterschiede zwischen den DNA-Spiegeln in Serum und Plasma beschrieben. Gewöhnlich weist Serum etwas höhere DNA-Konzentrationen auf als Plasma (Umetani *et al.*, 2006). Des Weiteren erschwert die Verwendung von Säulen verschiedener Hersteller zur DNA-Isolierung die Vergleichbarkeit der absoluten DNA-Konzentrationen in unterschiedlichen Studien. (Stroun *et al.*, 1989; Anker *et al.*, 1999; Umetani *et al.*, 2006)

1.3 Freie DNA im Knochenmarkplasma

Bisher wurde das Vorkommen zellfreier DNA im Knochenmark nur in wenigen Publikationen beschrieben (Taback *et al.*, 2003, Schwarzenbach *et al.*, 2007a, Schwarzenbach *et al.*, 2009). Auch die Herkunft dieser DNA ist nicht vollständig geklärt. Denkbar ist einerseits der Übertritt von frei zirkulierender DNA aus dem Blut in das Knochenmarkplasma. Für das Mammakarzinom gibt es Hinweise auf den Zusammenhang von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und den DNA-Gehalt im Knochenmarkplasma (Schwarzenbach *et al.*,

2009). Auch die Freisetzung aus nekrotischen oder apoptotischen Zellen in manifesten Knochenmetastasen erscheint möglich. Ebenso muss eine traumatische, artifizielle Freisetzung von DNA aus normalen Zellen des Knochenmarks im Zuge der Punktion in Betracht gezogen werden, denn auch gesunde Probanden weisen in Knochenmarkplasma zellfreie DNA auf (Taback *et al.*, 2003).

1.4 Mikrosatelliten

Genetische Veränderungen können an Mikrosatelliten-DNA untersucht werden. Mikrosatelliten sind DNA-Abschnitte mit Wiederholungen von kurzen Nukleotidsequenzen (*Repeats*) aus Di-, Tri- oder Tetranukleotiden. Der häufigste Mikrosatellit (CA)_n kommt ca. 50.000-100.000 Mal im menschlichen Genom vor, wobei n=10-60 ist (Hamada *and* Kakunaga 1982; Litt *and* Luty, 1989). Mikrosatelliten liegen meist in nicht-kodierenden DNA-Abschnitten. Ihre Funktion ist unbekannt, man nimmt aber an, dass sie wie Sollbruchstellen bei Rekombinationsvorgängen wirken (Slightom *et al.*, 1980). Innerhalb unterschiedlicher humaner Individuen treten Längenpolymorphismen der Mikrosatelliten im gleichen Locus auf, so dass sich das väterliche und das mütterliche Allel unterscheiden können (Weber *et al.*, 1989). Die Längenveränderungen der Mikrosatelliten von einem oder mehreren *Repeats* entstehen durch das Verrutschen (*slippage*) der DNA-Polymerase auf der hochrepetitiven Mikrosatelliten-DNA (Mao *et al.*, 1994). Sie sind damit potente genetische Marker und werden zum Beispiel zum *gene-mapping* (Weissenbach *et al.*, 1992) oder in der forensischen Medizin genutzt.

1.5 Allelische Imbalanz

Allelische Imbalanz (*allelic imbalance*, AI; *copy number variations*, CNV) entsteht in einem krankhaft veränderten Gewebe, in dem im Vergleich zum normalen Vergleichsgewebe die Anzahl der Allele verändert ist. Beispiele für AI sind Allel-Gewinn (Amplifikation, Mikrosatelliteninstabilität) und Allel-Verlust (*loss of heterozygosity*, LOH). Treten diese Veränderungen in maligne entarteten Zellen mit einem defekten DNA-Reparatursystem auf, so vermehren sie sich klonal und können als spezifischer Marker für den Tumor verwendet werden.

Für die Untersuchung von LOH und MSI werden Loci verwendet, die im Allgemeinen einen hohen Polymorphismus aufweisen. Die ersten Analysen benutzten Polymorphismen in den Zielsequenzen von Restriktionsenzymen. Einzelne veränderte Nukleotide (SNPs) in diesen

Sequenzen bewirkten, ob das Restriktionsenzym schneiden kann oder nicht. Die Entdeckung der Längenpolymorphismen in Mikrosatelliten vereinfachte und beschleunigte die Untersuchungen erheblich. Unterscheiden sich das mütterliche und das väterliche Allel in der Länge der Mikrosatelliten, so liegt Heterozygotie vor und die beiden Allele können nach der PCR-Amplifikation aufgrund ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Der Proband ist also für diesen Locus informativ. Ist im Tumor eines der Allele deletiert, und nur eines ist noch detektierbar, so spricht man von LOH (Abb. 2). Sind in der Gelelektrophorese zusätzliche Banden oder in der Kapillarelektrophorese zusätzliche *peaks* detektierbar, so spricht man von MSI. Die halbautomatische Fluoreszenz-basierte DNA-Typisierung verbesserte die nicht-markierte PCR, indem sie eine einfache, schnelle, objektive und Beobachter-unabhängige Untersuchung von LOH und MSI erlaubt (Canzian *et al.*, 1996).

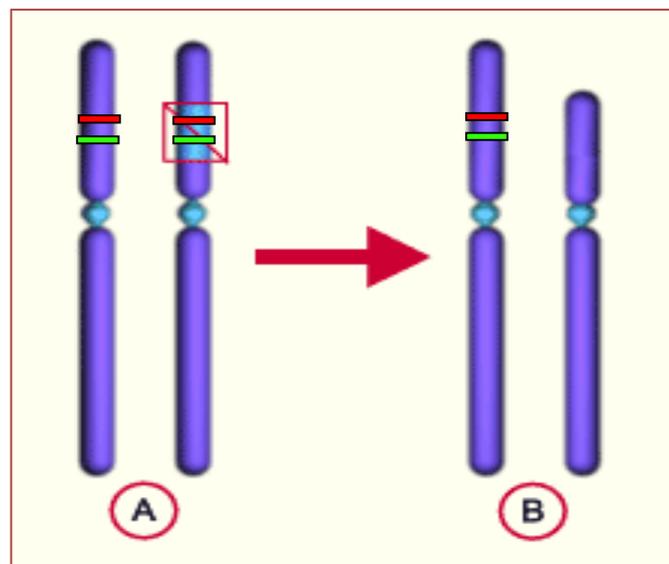


Abb. 2: Schematische Darstellung der Deletion eines Chromosomenabschnitts

A Auf beiden Chromosomen liegt ein Tumorsuppressorgen (rot), in unmittelbarer Nähe befindet sich ein Mikrosatellit (grün)

B Auf einem der beiden Chromosomen ist der Abschnitt mit dem Tumorsuppressorgen und dem Mikrosatelliten deletiert.

1.6 Tumorsuppressorgene

Als Tumorsuppressorgene bezeichnet man eine Gruppe von Genen, deren Aufgabe die Aufrechterhaltung der Integrität des Erbgutes eines Individuums ist. Die Genprodukte sind u.a. für die DNA-Reparatur, die Regulation des Zellzyklus und die Einleitung der Apoptose verantwortlich. Kommt es zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens, z.B. durch Deletion, Punktmutation oder DNA-Methylierung der Promotorsequenz, so wird die betroffene Zelle anfälliger für Mutationen und dadurch für maligne Entartungen. In der Regel sind mehrere

Tumorsuppressorgene funktionell hintereinander geschaltet, so dass mehrere Mutationen in derselben Zelle auftreten müssen, um zu einer malignen Entartung zu führen (*multistep pathway*).

Für die AI-Analysen wurden Mikrosatelliten ausgesucht, die in der Nachbarschaft von Tumorsuppressorgen liegen und für diese als Marker verwendet werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe von sieben verschiedenen Mikrosatellitenmarkern untersucht. Die angrenzenden Tumorsuppressorgene dieser Marker werden im Folgenden beschrieben.

Der Marker D3S1255 ist auf dem langen Arm des Chromosoms 3 (3p24.2-25) lokalisiert und liegt in der Region des *programmed cell death 6 interacting protein* (PDCD6IP). Dieses Protein spielt eine Rolle bei der Einleitung der Apoptose, indem es mit ALG-2 (*apoptosis linked 2 gen*) interagiert. Erstmals wurde dieser Marker zur AI-Analyse am Ösophaguskarzinom verwendet (Ogasawara *et al.*, 1995).

Der Marker D9S171 liegt in der Region 9p21 in der Nähe des Tumorsuppressorgens p16 (INK4A). P16 ist ein Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinase 2 (CDKN2), welche durch Phosphorylierung des *retinoblastoma tumor suppressor gene product* (pRb) den Übergang von der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase aktiviert (Chin *et al.*, 1998). Erstmals 1995 verwendet (Takeuchi *et al.*, 1995), wurde der Marker D9S171 in den letzten Jahren in zahlreichen Studien zur LOH-Analyse beschrieben (z.B. An *et al.*, 1996; Schwarzenbach *et al.*, 2007b; Müller *et al.*, 2008). Für Mammakarzinompatientinnen wurde ein Zusammenhang von AI an diesem Marker und Tumorrezidiven beschrieben (Schwarzenbach *et al.*, 2009).

Das Tumorsuppressorgen PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) liegt am Genlocus 10q23.3 und ist eine Lipidphosphatase, die eine Komponente der IP3-Signalkaskade darstellt. PTEN antagonisiert die Phosphatidylinositol-3-Kinase und reguliert dadurch negativ die Zellproliferation (Maehama *et al.*, 2007). Der Mikrosatellitenmarker D10S1765 liegt innerhalb dieses Gens und wurde erstmals 1998 in der AI-Analyse des Prostatakarzinoms verwendet (Pesche *et al.*, 1998). Für das Mammakarzinom ist eine Assoziation von Allelverlusten in der PTEN-Region mit prognostisch ungünstigen histologischen Eigenschaften bekannt (Garcia *et al.*, 1999).

In der Region des BRCA-2-Gens ist der Marker D13S218 lokalisiert (13q12-13). Das BRCA-2-Protein interagiert mit dem Rad51-Protein und nimmt so an der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Transkription teil (Yoshida *et al.*, 2004). Ein statistischer

Zusammenhang zwischen hereditären Mammakarzinomen und Mutationen in diesem Gen wurde beschrieben. In sporadischen Mammakarzinomen konnte in zehn von vierzehn informativen Fällen Allelverluste nachgewiesen werden (Deng *et al.* 1996). Markerspezifische AI in zirkulierender DNA in Mammakarzinompatientinnen korreliert mit dem Tumorstadium (Schwarzenbach *et al.*, 2012).

Der Marker D16S421 liegt in der Nähe des Gens E-Cadherin (16q22-23), das als ein Adhäsionsmolekül in normalen, gesunden Epithelien den Zell-Zell-Kontakt aufrechterhält. Es spielt eine Rolle bei der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) (Andrews *et al.*, 2012). Bei Defekt oder Verlust dieses Gens wird eine Loslösung vom Zellverband und invasives Wachstum mit Metastasierung begünstigt. An diesem Locus wurde schon häufig AI im Gewebe von Mammakarzinompatientinnen beobachtet (z.B. Skirnisdottir *et al.*, 1995; Dorion-Bonnet *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1999a).

Der Marker D17S250 ist ein Nachbar des Tumorsuppressorgens BCPR (*breast cancer suppressor gene*), welches an der Regulation von p53 beteiligt ist (O'Connell 2003). P53 ist in der Lage, in einer geschädigten Zelle entweder einen Zellarrest in der G1-Phase für die Durchführung der DNA-Reparatur herbeizuführen, oder die Apoptose einzuleiten (Moll *et al.*, 1995). Der Marker D17S250 wurde bereits 1992 zur Untersuchung von Brustkrebsgewebe verwendet (Futreal *et al.*, 1992), wo AI in 50 % der Fälle nachgewiesen werden konnten. In einer weiteren Studie wurden an diesem Marker in *In-Situ*-Karzinomen nur ca. 8 % AI gefunden, so dass ein Zusammenhang mit der Invasivität des Tumors wahrscheinlich ist (Radford *et al.*, 1995). Der Marker D17S250 liegt in der Region 17q11.2-12 und somit zentrometrisch zum Tumorsuppressorgen BRCA1.

In der Region 17q21 liegt BRCA1, ein Tumorsuppressorgen, das in über 50 % der hereditären Mammakarzinome verändert vorliegt. Ein intragenetischer Mikrosatellitenmarker ist D17S855. An diesem Marker wurden in einer ägyptischen Studie in 50 % der Brustkrebspatientinnen AI gefunden (Zekri *et al.*, 1999). Ähnlich wie bei BRCA2 sind auch bei BRCA1 nicht alle Funktionen vollständig verstanden. In Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungsgrad aktiviert BRCA1 die DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Des Weiteren aktiviert BRCA1 zusammen mit anderen Molekülen den Tumorsuppressor p53 und kann somit am Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus einen Zellarrest herbeiführen (Yoshida *and* Miki, 2004).

2 Fragestellung

Karzinompatienten weisen im Vergleich mit gesunden Probanden erhöhte Spiegel an kernloser, zellfrei im Plasma zirkulierender DNA auf. Die Herkunft und das Ausmaß der klinischen Bedeutung dieser DNA sind noch weitgehend unklar. Ziel dieses Projektes ist es, die Häufigkeit von genetischen Alterationen in der zirkulierenden Mikrosatelliten-DNA von Mammakarzinompatientinnen zu bestimmen. Untersucht werden sieben spezifische Tumorsuppressorgene, die in Regionen von Mikrosatelliten-DNA liegen und die eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Mammakarzinomen spielen. Aus tumorbiologischer Sicht sollen durch vergleichende Analysen von allelischer Imbalanz (*allelic imbalance*, AI) in Primärtumor, Blutplasma und Knochenmark weitere Hinweise über die Herkunft der zirkulierenden DNA beim Mammakarzinom gewonnen werden. Darüber hinaus soll gezeigt werden, ob das Auftreten von AI in den ausgewählten Tumorsuppressorgenen zusätzliche Informationen über die Prognoseabschätzung und die Therapiebedürftigkeit der Patientinnen liefern kann. Hierzu wird das Muster der AI in den einzelnen Proben mit den bekannten Prognosefaktoren der jeweiligen Patientinnen korreliert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Im Folgenden Abschnitt werden tabellarisch die verwendeten Patientenproben, Labormaterialien, Geräte und Computerprogramme aufgelistet.

3.1.1 Blut-, Knochenmark- und Tumorproben

10-20 ml Vollblut	EDTA-Monovetten, Sarstedt GmbH, Nürnbrecht
Knochenmark	Heparin-Tubes, Gibco, Eggenstein
Tumorgewebe	Formalin-fixiert, eingebettet in Paraffin

3.1.2 Reagenzien

Aqua ad iniectabilia	Baxter SA, Lessines
Desoxynucleoside Triphosphate Set (PCR grade)	Roche, Mannheim

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Taufkirchen
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure (100 %, zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Ethanol (absolute, zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Freiburg
HPLC-H ₂ O	Merck, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Promega, Mannheim

3.1.3 Puffer und Lösungen

10x PBS pH 7,4
90 g NaCl
14,33 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
2,67 g KH₂PO₄
H₂O ad 1 l

3.1.4 Kits

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Proteinase K-Lösung	
Buffer AL – Lysepuffer	
Buffer AT-Gewebepuffer	
Buffer AW1 – Waschpuffer 1	
Buffer AW2 – Waschpuffer 2	
Buffer AE – Elutionspuffer	

DNA Clean & Concentrator-5	Zymo Research, Orange, USA
DNA-Bindungspuffer	
DNA-Waschpuffer	
Zymo Spin-Säulen	
Collelction Tubes	

3.1.5 DNA-Polymerasen

AmpliTaq Gold (200 µl, 1000 U, 5 U/µl)
mit GeneAmp 10x PCR Gold Puffer
und 25 mM MgCl₂-Lösung (1,5 ml)

Applied Biosystems,
Mannheim

iProof-Polymerase (20 U, 2 U/µl)
mit iProof-HF 5x PCR Puffer
und 25 mM MgCl₂-Lösung (1,5 ml)

Bio-Rad, Hercules, USA

3.1.6 DNA-Marker

GeneScan ROX Size 500 Standard

Applied Biosystems,
Mannheim

3.1.7 Software

GeneScan

Applied Biosystems,
Mannheim

MS Excel

Microsoft, Redmond, USA

MS Word

Microsoft, Redmond, USA

Photoshop 7.0

Adobe, San Jose, USA

SPSS 14.0 for PC

SPSS Inc., Chicago, USA

3.1.8 Geräte

Biofuge fresco

Heraeus, Hanau

BioPhotometer

Eppendorf, Hamburg

Genetic Analyzer 310

Applied Biosystems,
Mannheim

Hera guard Sterilbench

Heraeus, Hanau

MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler

Biozym, Oldendorf

ND-1000 Spectrophotometer

NanoDrop, Wilmington,
USA

Thermomixer kompakt

Eppendorf, Hamburg

Vortex Genie 2

Scientific Industries

3.1.9 Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Cryo-Röhrchen	Nalgene, Rochester
Eppendorf Reaktionsgefäße (Tubes)	Eppendorf, Hamburg
UVette	Eppendorf, Hamburg
Klarsichtfolie	Krups, Stuttgart

3.1.10 Primer

Sigma, Taufkirchen

D3S1255	Forward CTCACTCATGAACACAGATGC Reverse AACCCATCTTGTATTCTTGCAG Farbmarkierung: 5'TAMRA
D9S171	Forward AGCTAAGTGAACCTCCATCTCTGTCT Reverse ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT Farbmarkierung: 5'TAMRA
D10S1765	Forward ACACTTACATAGTGCTTTCTGCG Reverse CAGCCTCCCAAAGTTGC Farbmarkierung: 5'6-FAM
D13S218	Forward GATTTGAAAATGAGCAGTCC Reverse GTCGGGCACTACGTTTATCT Farbmarkierung: 5'HEX
D16S421	Forward ACATGAACCGATTGGACTGA Reverse CCGTTCCTATATTTCCCTGG Farbmarkierung: 5'6-FAM
D17S250	Forward GGAAGAATCAAATAGACAAT Reverse GCTGGCCATATATATTTAAACC Farbmarkierung: 5'HEX
D17S855	Forward GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG

Reverse ACACAGACTTGTCTACTGCC

Farbmarkierung: 5'6-FAM

Alle Primer wurden in 20mM-Lösungen verwendet.

3.2 Methoden

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Methoden beschrieben, die zum Teil bereits in der Arbeitsgruppe etabliert waren und schon in vorangegangenen Forschungsarbeiten erfolgreich eingesetzt wurden (Chun *et al.*, 2006; Schwarzenbach *et al.*, 2007b und 2009).

3.2.1 Patientenkollektiv

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenkollektiv besteht aus 120 anonymisierten Patientinnen mit der gesicherten Diagnose Brustkrebs. 59 von ihnen wurden in der gynäkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Essen (Direktor: Prof. Dr. Kimmig) untersucht und behandelt, 61 in der Gynäkologie im Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. Jänicke). Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug zum Zeitpunkt der Behandlung 57 Jahre (29-83 Jahre). Für dieses Patientenkollektiv sind die klinischen und pathologischen Parameter wie histologischer Typ, *Staging*, *Grading*, Rezeptorstatus, Knochenmarkstatus (DTC), Histologie, Ki-67 und Her2/neu-Expression bekannt.

Von allen 120 Patientinnen wurde Blut zur Gewinnung von Blutplasma für die Untersuchung der frei zirkulierenden DNA entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten bei Erstdiagnose unmittelbar vor der Operation. In 36 Fällen stand eine Gewebeprobe des Primärtumors aus dem Operationspräparat zur Verfügung. Von 21 der Patientinnen wurde durch (meist beidseitige) Punktion der Beckenkämme unter Allgemeinanästhesie Knochenmark gewonnen. Alle Patientinnen stimmten der Verwendung ihrer Gewebeproben und der klinischen Daten zu.

3.2.2 Gewinnung von Untersuchungsmaterial

3.2.2.1 Gewinnung von Tumorzellen

Zur Gewinnung von Tumorgewebe standen mit Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Operationsresektate zur Verfügung. Von diesen Gewebeblöcken wurden mit einem Mikrotom 5µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Einige dieser Präparate wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H/E) nach Angaben des Herstellers eingefärbt, so dass

mikroskopisch entartete Bereiche von normalem Umgebungsgewebe abgegrenzt werden konnten. In relativ soliden Tumorarealen konnten nun direkt vom H/E-gefärbten Präparat Tumorzellen abgekratzt und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt werden. Bei Operationsresektaten mit multifokalen Tumornestern wurde die Computer-assistierte Mikrodissektion des Tumorgewebes angewendet (Emmert-Buck *et al.*, 1996), um hier eine Kontamination mit normalem Umgebungsgewebe zu vermeiden. Bei dieser Prozedur wurde mittels eines Lasers aus einem ungefärbtem Gewebeschnitt das gewünschte Areal herausgetrennt und durch Druck in ein Auffanggefäß katapultiert, wo es an einem Tropfen Mineralöl haften blieb. Ein H/E-gefärbtes Präparat aus einem angrenzenden Schnitt diente dabei als Leitschiene.

Im Allgemeinen wurden von jeder Patientin Tumorzellen aus drei Gewebeschnitten gewonnen.

3.2.2.2 Gewinnung von Knochenmarkplasma

Von 21 der Patientinnen wurde direkt nach der Operation, noch unter Allgemeinanästhesie, Knochenmark entnommen. Nach Möglichkeit wurden aus beiden Beckenkämmen jeweils 10 ml Knochenmark aspiriert und in Heparinröhrchen überführt. Das Aspirat wurde sofort für 5 min. bei 400 g zentrifugiert. Die untere Phase enthielt die zelluläre Komponente und wurde auf CK-positive Zellen untersucht (Braun *et al.*, 2000). Der Überstand enthielt das zellfreie Knochenmarkplasma und wurde bis zur Isolierung der DNA bei -20°C gelagert.

3.2.2.3 Gewinnung von Blutplasma und Leukozyten

Aus den jeweils 20 ml EDTA-Vollblut der Patientinnen wurden sowohl Plasma als auch Leukozyten gewonnen. Zunächst wurde das Blut für 10 min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Die so entstandene obere Phase enthielt das Blutplasma, von dem 3-4 ml entnommen und bis zur Analyse von LOH bei -20°C gelagert wurden. Von den Leukozyten wurden Cytospins hergestellt, indem sie mittels eines Trichters auf „Super Frost“ Objektträger zentrifugiert wurden. Diese Präparate wurden über Nacht getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung in Alufolie gewickelt und bei -20°C gelagert.

3.2.3 Isolierung genomischer DNA

3.2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Blut- und Knochenmarkplasma

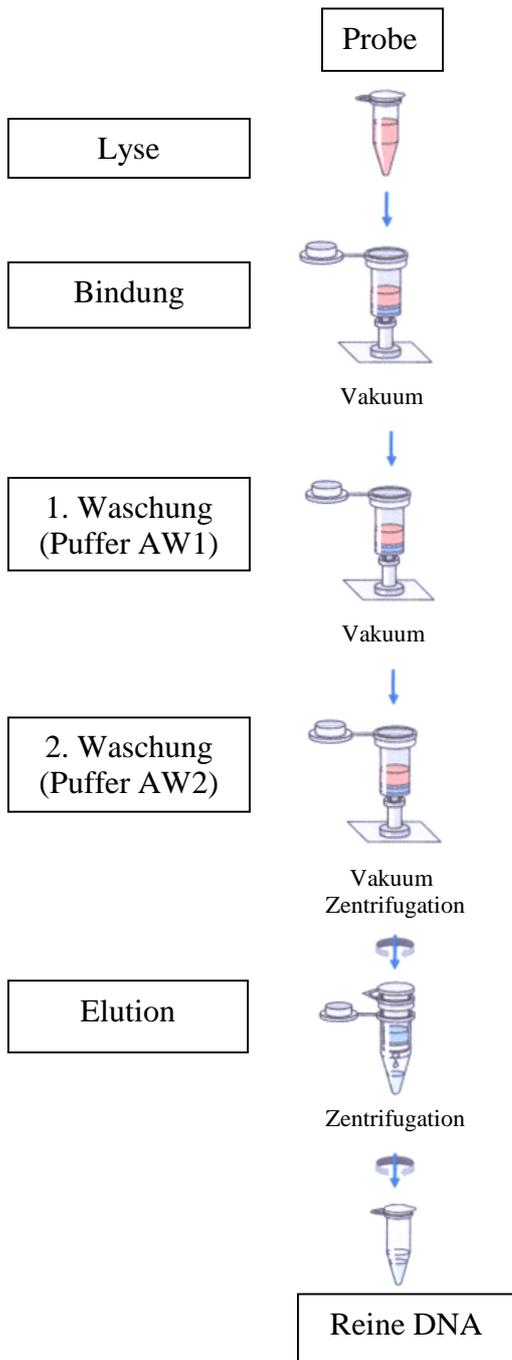


Abb. 3: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Isolierung zellfreier DNA aus Blutplasma mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (abgeändert nach Handbuch)

Die Isolierung der genomischen DNA aus Blut- und Knochenmarkplasma erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits nach Anleitung des Herstellers (Abb. 3).

Für jeden Patienten wurde das Volumen des vorhandenen Blutplasmas gemessen. Jeweils 1/10 des Plasmavolumens Proteinase K und ein Volumen Lysepuffer AL wurden dem Plasma hinzugefügt und vermischt. Verteilt in 2 ml-Eppendorf-Tubes wurde das Gemisch für 10 min. auf einem Thermomixer bei 56°C inkubiert, um DNA-bindende und im Plasma vorhandene Proteine abzubauen. Im nächsten Schritt wurde die DNA mit jeweils einem Volumen 100 % Ethanol gefällt. Die gefällte DNA wurde an eine Qiagen-Säule gebunden. Hierfür wurde die Säule mit einem VacConnector auf eine Vakuumkammer montiert, in der mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe Vakuum angelegt wurde. Die Säule, mit einem Säulenaufsatz versehen, wurde mit dem Lysat/Ethanolgemisch beschickt. Während die DNA an der Säulenmatrix gebunden wurde, wurde der Rest des Gemischs durch die Säule gesogen und später verworfen. Durch zwei folgende Waschschritte mit jeweils 700 µl der Puffer AW1 und

AW2 wurde ungebundenes Material entfernt. Die Säule wurde daraufhin von der Vakuumkammer entfernt, in ein Tube gestellt und für 1 min. bei 13000 rpm zentrifugiert, um die restliche Waschlösung von der Säule zu entfernen. Um die gebundene DNA nun von der Säule zu lösen, wurde die Säule in ein neues Tube gestellt, mit 100 µl Elutionspuffer AE beschickt und für 1 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde sie für 1 min. bei 5000 rpm und anschließend für einige Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert (Abb. 3). Das Tube mit dem DNA-Eluat wurde bis zur Quantitäts- und Qualitätsbestimmung bei 4°C gelagert.

3.2.3.2 Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten

Auch die DNA aus den Leukozyten wurde mit dem QIAmp Mini Kit extrahiert, allerdings nach einem etwas veränderten Protokoll.

Zunächst wurden die trockenen, als Zytospin auf einem Objektträger haftenden Leukozyten mit einem Skalpell vom Objektträger gelöst und in ein Tube mit 200 µl PBS überführt. Auch zu diesem Tube wurden 1/10 Volumen Proteinase K und ein Volumen Lysepuffer AL zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 2-3 Stunden bei 56°C, während der die Proben mehrmals geschüttelt wurden. Durch diese Behandlung wurden die Zellen lysiert und die DNA von DNA-bindenden Proteinen befreit. Die gelöste DNA wurde durch Zugabe von einem Volumen 100 %igem Ethanol gefällt. Eine Qiagen-Säule wurde in ein Tube gestellt und mit dem Lysat/Ethanol-Gemisch beschickt, woraufhin die Säule bei 5000 rpm für 1 min. zentrifugiert wurde. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl der Waschlösungen AW1 und AW2 und einem jeweiligen Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde die DNA von der Säule, wie unter 3.2.3.1 beschrieben, eluiert. Das Eluat wurde bis zur Konzentrationsmessung bei 4°C gelagert.

3.2.3.3 Isolierung genomischer DNA aus Tumorgewebe

Auch die Isolierung der DNA aus dem Tumorgewebe erfolgte mittels des QIAmp Mini Kits. Das Tumorgewebe wurde zunächst mit 180 µl Gewebepuffer ATL versetzt. Bei lasermikrodisseziertem Gewebe folgte nun eine Zentrifugation, nach der das in der oberen Phase befindliche Mineralöl entfernt wurde. Danach wurde die Probe mit jeweils 20 µl Proteinase K versetzt und unter Schütteln für 2-3 Stunden bei 56°C auf einem Thermomixer inkubiert. Zur Lyse der Zellen wurden 200 µl Lysepuffer AL hinzugefügt und die Lösung für weitere 10 min. bei 70°C inkubiert. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von

einem Volumen (200 µl) 100 %igem Ethanol. Die Bindung der DNA an die Säule erfolgte wie unter 4.3.2 beschrieben. Die DNA wurde von der Säulenmatrix durch zwei Schritte mit jeweils 50 µl Elutionsbuffer AE eluiert. Dabei wurde die Säule jedes Mal in ein neues Tube gestellt und mit dem Puffer AE beschickt. Die beiden Schritte schlossen eine Inkubationszeit von 1 min. und eine Zentrifugation bei 5000 rpm ein. Das Eluat hatte schließlich ein Volumen von annähernd 100 µl. Es wurde bis zur Quantitäts- und Qualitätsbestimmung bei 4°C gelagert.

3.2.4 Reinigung und Konzentration von DNA-Proben aus Blutplasma

Sechs ausgewählte extrahierte DNA-Proben aus Blutplasma wurden mit dem Zymo Research Clean & Concentrator-5-Kit weiter aufgereinigt, um kurze DNA-Fragmente zu entfernen und die langkettige DNA zu konzentrieren. Laut Angaben des Herstellers werden DNA-Fragmente unter 75 bp aus der Probe entfernt. Fragmente von 75 bp bis 10 kb werden zu 70 bis 90 %, Fragmente von 11 kb bis 23 kb zu 50 bis 70 % wiedererlangt.

Der DNA-Gehalt der 6 Plasmaproben wurde mit dem NanoDrop bestimmt. Zwischen 20 und 50 µl der Proben wurden für die Reinigung und Konzentration eingesetzt. Die Probe wurde zunächst in ein 1,5 ml Tube gegeben, mit der zweifachen Menge an DNA-Bindungspuffer versetzt und gemischt. Eine Zymo-Spin-Säule in einem 2 ml Collection Tube wurde mit dieser Mischung beschickt und für 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Daraufhin folgten zwei Waschschrte mit jeweils 200 µl Waschpuffer und anschließender Zentrifugation. Die Säule wurde nun in ein 1,5 ml Tube gestellt, mit 10 µl Nuklease-freiem Wasser beschickt und die gebundene DNA durch Zentrifugation bei 10000 rpm eluiert. Um eventuell noch gebundene DNA aus der Säule zu gewinnen, wurde der Elutionsschritt mit weiteren 10 µl nuklease-freiem Wasser in einem neuen 1,5 ml Tube wiederholt. Der DNA-Gehalt der jeweils zwei Eluate wurde mit dem NanoDrop gemessen.

3.2.5 Quantitäts- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten genomischen DNA wurden durch Messung der optischen Dichte (OD) in einem UV-Spektrometer bestimmt. Vor jeder neuen Messreihe wurde das UV-Meter zunächst mit 50 µl Elutionspuffer AE in einer DNase-freien Plastikkuvette geeicht. Anschließend wurden jeweils 50 µl der eluierten DNA in einer ebensolchen Kuvette bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen, um die optische Dichte zu bestimmen. Die Nukleinsäurenkonzentration lässt sich nach folgender Formel bestimmen:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times 50 (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{Verdünnung}$$

Für die Qualitätsbestimmung wurde zusätzlich die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Der Reinheitsgrad der untersuchten Proben lässt sich durch die Ermittlung des Quotienten 260/280 beurteilen. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 entspricht reiner DNA. Werte unter 1,6 weisen auf Proteinverunreinigungen hin.

3.2.6 Fluoreszenzmarkierte PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur *in vitro* Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Der Abschnitt wird festgelegt durch die Auswahl des Primersets (5' oder "Sense"- und 3' oder "Antisense"-Primer). Nach der Auftrennung der DNA in die beiden Einzelstränge durch Erwärmungärme (Denaturierung) kommt es temperaturabhängig zur Anlagerung der Primer (*annealing*). An diese werden nun von einer hitzestabilen DNA-Polymerase Nukleotide angelagert (Elongation). Dadurch kommt es zur Neubildung eines DNA-Stranges, für den der komplementäre Strang als Matrize dient. Nach der so erfolgten Verdoppelung des DNA-Abschnittes kann der Zyklus wiederholt werden (Saiki *et al.*, 1988).

Die PCR wurde in 10 μl -Ansätzen durchgeführt. Eingesetzt wurden jeweils 10-15 ng DNA als *Template*. Eine Leerprobe, in der statt DNA H₂O hinzugefügt wurde, diente als Negativkontrolle, um Kontaminationen auszuschließen. Die Standard-PCR-Reaktion wurde nach dem in der Tabelle IV angegebenen Schema pipettiert.

Tabelle IV: Pipettierschema für die PCR

	Eingesetzte Menge	Finale Konzentration
gDNA-Template	10-15 ng	
Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,1 μl	0,5 U
5' Sense-Primer (fluoreszenzmarkiert)	0,2 μl	10 pM
3' Antisense-Primer	0,2 μl	10 pM
dNTP (2 mM)	1 μl	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1 μl	2,5 mM
PCR-Puffer	1 μl	1x
H ₂ O	Ad 10 μl	

Die PCR wurde in einem „Thermocycler“ durchgeführt. Zunächst wurde die inaktive Taq-Polymerase für 5 min. bei einer Temperatur von 95°C aktiviert. Daraufhin wurde die DNA in 40 Zyklen amplifiziert. Jeder einzelne Zyklus beinhaltete die Denaturierung der Doppelhelix

bei 95°C für 25 s, das *Annealing* der Primer bei der für sie optimalen Temperatur (Kap. 4.4) für 30 s und die Elongation bei 72°C für 30 s. Nach Ablauf der 40 Zyklen folgte noch eine 7-minütige Elongationsphase bei 72°C, um unvollständig replizierte DNA-Abschnitte fertig zu synthetisieren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die PCR-Produkte auf 4°C heruntergekühlt. Während des gesamten Vorgangs wurde darauf geachtet, die fluoreszenzmarkierten Primer bzw. die fluoreszierenden Reaktionen vor Licht zu schützen.

3.2.7 Denaturierung der PCR-Produkte

Zur Evaluierung des PCR-Produktes in einem ABI-Prism 310 „Genetic Analyzer“ wurde das PCR-Produkt denaturiert, d.h., die DNA-Doppelstränge wurden in Einzelstränge aufgetrennt. Für die Denaturierung wurden jeweils 0,5 µl des PCR-Produktes in 40 µl HiDi-Formamid vermischt. Das Formamid verhindert das Zusammenlagern von getrennten DNA-Strängen. Des Weiteren wurden jeder Probe 0,2 µl des geeichten „Rox Size“ Standards zugefügt, um eine spätere Längenbestimmung der PCR-Fragmente zu ermöglichen. Die Denaturierung wurde im Thermocycler für 2 min. bei einer Temperatur von 94°C durchgeführt und die Proben bei -20°C gelagert.

3.2.8 Kapillarelektrophorese der PCR-Produkte im „Genetic Analyzer“

Das System ABI-Prism 310 „Genetic Analyzer“ trennt fluoreszenzmarkierte DNA automatisch nach der Fragmentlänge auf. Durch die Fragmentanalyse-Software wird die Fragmentlänge bestimmt und die einzelnen Fraktionen quantifiziert.

Hauptbestandteile des durch einen Mikroprozessor gesteuerten Gerätes sind ein Kapillarelektrophoresesystem und eine Detektionseinheit für Fluoreszenz. Die Kapillarelektrophorese der Proben findet unter Temperaturkontrolle bei 60°C statt. Dabei füllt sich die Kapillare mit einer Gelmatrix und taucht dann zusammen mit einer Elektrode in das Probengefäß. Die Probe wird für 5 s angesogen und die Elektrophorese wird für 24 min. bei einer Stromstärke von 0,9 mA unter einer Spannung von 15 kV durchgeführt. Während des Vorgangs ist ein Argonlaser (Hauptemissionen bei 488 nm und 514,5 nm, Energie bei 9,9 mW) auf das Detektionsfenster der Kapillare gerichtet. Erreicht ein fluoreszenzmarkiertes DNA-Fragment dieses Fenster, so wird das Fluorochrom zur Emission angeregt. Im optischen System wird diese Fluoreszenz mit einer Linse fokussiert, nach Wellenlängen durch einen Hohlspiegel prismatisch aufgespalten und mit einer CCD-Kamera quantitativ erfasst. Nach einem Reinigungsschritt wird die nächste Probe analysiert (Abb 4).

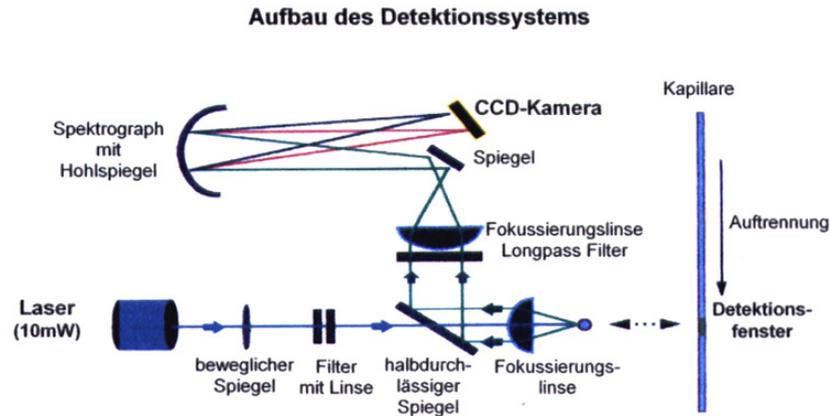


Abb. 4: Detektionssystem des ABI-Prism 310 Genetic Analyzer

Die Fragmentlänge kann anhand des Größenstandards und des Detektionszeitpunktes bestimmt werden. Mithilfe der ABI Prism 310 „Collection Software“ können die gesammelten Daten zweidimensional nach Fluoreszenzstärke und Anzahl der Basenpaare in einem Graphen als *Peaks* dargestellt werden.

3.2.9 Auswertung der Analysedaten

Für die Bestimmung von AI in Tumor, Blut und Knochenmark wurde die amplifizierte genomische DNA aus Leukozyten als normales (Wildtyp-) Vergleichsgewebe genutzt. Mithilfe einer Formel wurde der AI-Score berechnet.

3.2.9.1 Aussagefähigkeit der Messdaten

Zunächst wurde festgestellt, ob die Analysedaten aussagefähig waren. Dazu wurde untersucht, ob die Leerprobe, die bei jeder PCR mit angesetzt wurde, tatsächlich leer war, d. h., sie durfte keine Verunreinigungen aufweisen. Des Weiteren durften die Höhen der *Peaks* bestimmte Grenzen nicht überschreiten. Um sie sicher von dem Grundsignal unterscheiden zu können, wurde eine Mindesthöhe der *Peaks* von 200 Fluoreszenzeinheiten (FE) verlangt. Da die CCD-Kamera ab einer gewissen Signalintensität nicht mehr genau messen konnte, wurden nur Messungen ausgewertet, deren höchster *Peak* eine Höhe von weniger als 7000 FE aufwies.

3.2.9.2 Identifizierung der Allele

In dem von der Software abgebildeten Diagramm wurden nun die gesuchten unterschiedlich langen Allele, dargestellt als *Peaks*, identifiziert und von PCR-Artefakten wie Stotterbanden (*Slippage-Peaks*) und Adeninanhängen (*A-Tails*) unterschieden. Stotterbanden repräsentieren PCR-Produkte, die sich vom gewünschten PCR-Produkt um die Länge eines oder mehrerer *Repeats* unterscheiden. Sie entstehen durch Verrutschen der DNA-Polymerase auf dem Mikrosatelliten (Kap 1.4). Adeninanhänge am PCR-Produkt entstehen durch die substratunabhängige Aktivität der Taq DNA-Polymerase, die ein Adenin am Ende der Amplifikation hinzufügt. Adeninanhänge führen in der optischen Darstellung zum Auftreten eines zusätzlichen kleineren *Peaks*, welcher um ein Basenpaar länger ist als das erwünschte PCR-Produkt.

Um das eigentliche Allel zweifelsfrei von Adeninanhängen unterscheiden zu können, wurde zum Vergleich statt der „AmpliTaq Gold“ DNA-Polymerase die „I-Proof“-Polymerase in einer PCR eingesetzt. Diese sogenannte *Proofreading*-Polymerase verfügt über eine Exonukleaseaktivität, die Adeninanhänge vom PCR-Produkt entfernt und so die optische Darstellung optimiert.

Mithilfe der „GeneScan“-Software können die Allele farblich markiert und ihre Höhe und Fläche angezeigt werden. Ist eine Probe für einen Locus homozygot, so kann kein Unterschied in der Fragmentlänge festgestellt werden und es wird nur ein Allel dargestellt. Die Probe ist also für diesen Marker nicht informativ.

3.2.9.3 Berechnung des AI-Scores

In der Praxis finden wir selten einen kompletten Verlust eines Allels im untersuchten Gewebe. Häufiger ist eine relative Verkürzung der *Peak*-Höhe im Vergleich zum korrespondierenden Allel zu beobachten. Zur Berechnung des *AI-Scores* wurde die zu untersuchende DNA mit normaler DNA aus Leukozyten (Referenz) des jeweiligen Probanden verglichen. Die *Peak*-Höhe des jeweils kürzeren Allels der Leukozyten (hL1) wurde mit der Höhe des jeweils längeren (hL2) ins Verhältnis gesetzt, analog dazu wurde eine Ratio aus den Höhen der entsprechenden *Peaks* (hZ1 und hZ2) des Tumorgewebe, Blut oder Knochenmark berechnet. Diese beiden Ratios wurden wiederum zueinander ins Verhältnis gesetzt und ergaben so den *AI-Score*. Diese Art der Berechnung entspricht der von Canzian veröffentlichten Formel (Canzian *et al.*, 1996):

$$\text{AI-Score} = (\text{hL1} \times \text{hZ2}) / (\text{hL2} \times \text{hZ1})$$

Die Werte der *Peak*-Höhen wurden in eine Microsoft Excel-Tabelle übertragen und der *AI-Score* nach der oben gezeigten Formel berechnet. Für homozygote Fälle ist die Berechnung des *AI-Scores* nicht möglich. Diese Fälle gelten in Bezug auf unsere Fragestellung als nicht informativ (n.i.). Ebenso wurden Fälle, in denen auch in mehrmaligen Versuchen kein PCR-Produkt detektiert werden konnten, als nicht informativ gewertet.

3.2.10 Verdünnungsexperimente von Tumor- bzw. Plasma-DNA mit Vergleichs-DNA aus Leukozyten

In einer Verdünnungsreihe wurde die Qualität der Tumor- bzw. Plasma-DNA im Vergleich zur Leukozyten-DNA bestimmt. Es sollte geklärt werden, welcher Anteil an amplifizierbarer DNA in den Plasma- und Tumor-DNA-Proben im Verhältnis zur Leukozyten-DNA enthalten ist. Dazu wurden 2 bzw. 3 Patienten ausgesucht, in deren Plasma- bzw. Tumor-DNA mit bestimmten Primern jeweils mehrfach reproduzierbare AI detektiert wurden (Tab. V).

Tabelle V: Ausgewählte Proben für die Verdünnungsreihe

Patient	Marker
68 (Plasma)	D9S171
89 (Plasma)	D10S1765
14 (Tumor)	D17S250)
16 (Tumor)	D9S171
18 (Tumor)	D17S855

Der DNA-Gehalt in den ausgewählten Proben (Leukozyten, Plasma, Tumor) wurde mit dem NanoDrop photometrisch bestimmt. Daraufhin wurde der Proben-DNA in verschiedenen Verhältnissen die dazugehörige Leukozyten-DNA beigemischt, so dass jede Mischung schließlich insgesamt 10 ng DNA enthielt (Tab. VI).

Tabelle VI: Pipettierschema für den Verdünnungsversuch

Nummer	Leukozyten-DNA (ng)	Plasma- bzw. Tumor-DNA (ng)	Anteil Plasma- bzw. Tumor-DNA (%)
1	10,0	0	0
2	8,0	2,0	20
3	6,0	4,0	40
4	4,0	6,0	60
5	2,0	8,0	80
6	1,5	8,5	85
7	1,0	9,0	90
8	0,5	9,5	95
9	0	10	100

Diese DNA-Mischungen dienten als *Templates* für die Amplifikation mit den oben angegebenen Primern. Die Ergebnisse wurden ausgewertet und es wurde geprüft, ab welchem Mischungsverhältnis die AI nach den oben beschriebenen Kriterien bestimmt werden kann.

3.2.11 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung wurde mit Hilfe der SPSS Software durchgeführt. Mit dem Fisher-Exakt-Test wurde eine Merkmalsabhängigkeit der Ergebnisse von den klinischen Parametern getestet. Bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5 Prozent ($p < 0,05$) wurde das Ergebnis als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 DNA-Gehalt im Blutplasma von Mammakarzinompatientinnen

Die DNA-Konzentration im Blutplasma der Patientinnen wurde, wie in Kap. 3.2.4 beschrieben, gemessen. Sie betrug durchschnittlich 984 ng/ml und hatte ein breites Verteilungsspektrum von 58-5317 ng/ml. Patientinnen mit der histologischen Diagnose eines lobulären Karzinoms hatten mehr DNA im Blut als solche mit einem duktalem Karzinom, allerdings konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden ($p=0,17$) (Abb. 5). Des Weiteren ist die DNA-Konzentration in Patientinnen mit positivem Her2/neu-Status stark erhöht, auch hier wurde, aufgrund der wenigen Fälle mit bekanntem Status, das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p=0,12$) (Abb. 6).

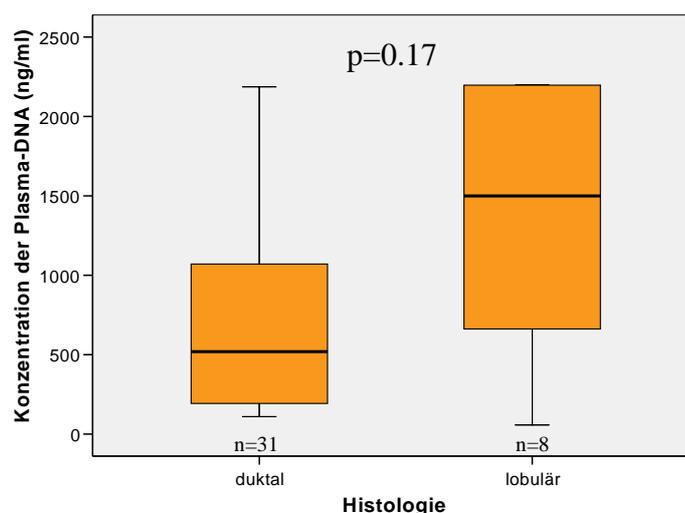


Abb. 5: Boxplot zur Darstellung der DNA-Konzentration im Blutplasma von Patientinnen mit der histologischen Diagnose eines duktalem oder lobulärem Mammakarzinoms

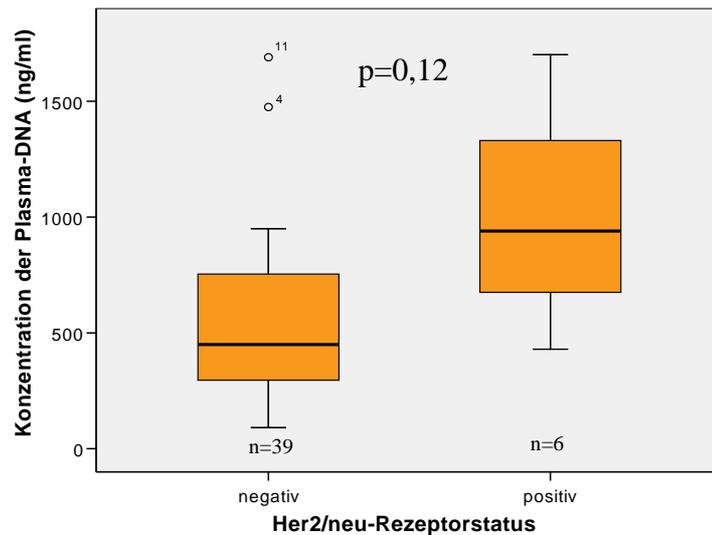


Abb. 6: Boxplot zur Darstellung der DNA-Konzentration im Blutplasma von Patientinnen mit negativem oder positivem Her2/neu-Rezeptorstatus

Kein Zusammenhang bestand indes zwischen der Plasma-DNA-Konzentration und *Staging* oder *Grading* des Tumors, disseminierten Tumorzellen oder Alter der Patientin.

4.2 Identifizierung der Allele

Die zweifelsfreie Identifizierung der Allele gelingt, wenn PCR-Artefakte wie Stotterbanden (*Slippage-Peaks*) und Adeninanhänge (*A-Tails*) sicher erkannt und unterschieden werden können (Abb. 7).

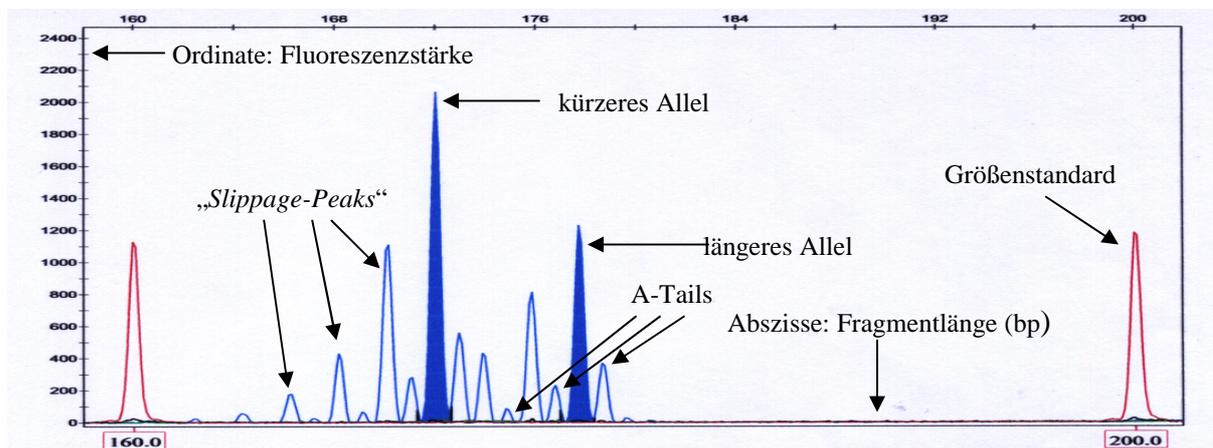


Abb. 7: Darstellung der Rohdaten eines Mikrosatelliten-basierten PCR-Produkts mit Hilfe der „GeneScan“ Software des „Genetic Analyzers“

Rote Linie: der mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff markierte Größenstandard „ROX Size 500“.

Blaue Linie: das mit dem blauen Farbstoff „FAM“ markierte PCR-Produkt

Ordinate: Fluoreszenzstärke (Fluoreszenz-Einheiten)

Abszisse: Fragmentlänge (bp)

Alle in dieser Arbeit untersuchten Mikrosatelliten enthalten das Dinukleotid-Repeat (CA)_n. In der graphischen Darstellung ergeben sich so für informative Fälle charakteristische Muster von *Peaks*, die sich um die Länge von 2 Basenpaaren oder einem Vielfachen davon unterscheiden (Abb. 8).

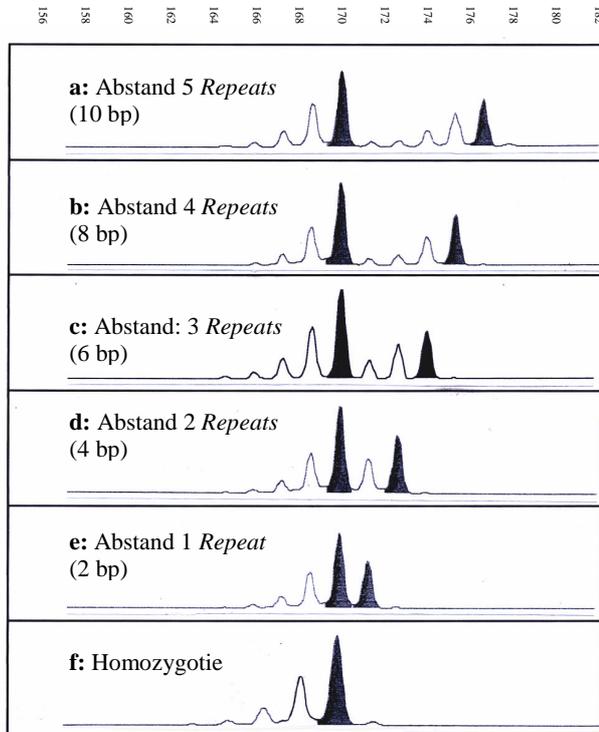


Abb. 8: Schematische Darstellung verschiedener Abstände zweier Allele

Die Allele sind markiert. Sie unterscheiden sich in ihrer Länge um ein oder mehrere Dinukleotid-*Repeats* (a bis e). In f ist ein homozygoter Fall abgebildet. Ist der Abstand der Allele nur gering, so kommt es zu Überlappungen mit den Stotterbanden.

In einigen Fällen, vor allem mit dem Marker D13S218, waren die Adeninanhänge an den *Peaks* besonders deutlich zu sehen. Diese zusätzlichen *Peaks* können die Auswertung der Graphen erschweren. Die Verwendung einer I-Proof-Polymerase kann in diesen Fällen Klarheit bringen: Durch die Exonuklease-Aktivität des Enzyms werden die terminalen Adenosylreste entfernt (Abb. 9).

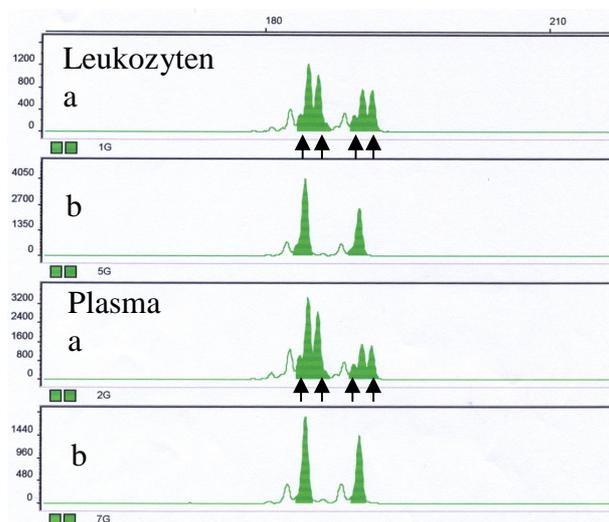


Abb. 9: Vergleich der beiden DNA-Polymerasen: „AmpliTaq Gold“ und „I-Proof“

In der Leukozyten- und Plasma-DNA, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert wurde, sind deutlich die Adeninanhänge zu sehen. Sie treten im Abstand von einem Basenpaar zum Allel und den Stotterbanden auf (a). In der Leukozyten- und Plasma-DNA, die mit der „Proofreading“-Polymerase amplifiziert wurde, sind die Adeninanhänge verschwunden (b). Die Adeninanhänge sind durch Pfeile gekennzeichnet.

4.3 Festlegung der Grenzen zur Detektion von AI

Die Grenze des AI-Scores, ab der die Daten als Ereignis gewertet werden können, wurde nach den Kriterien der Sensitivität der Methoden und der Vergleichbarkeit mit der Literatur festgelegt.

Um die Sensitivität der Methoden zu bestimmen, wurden aus 3 Leukozytenproben mit unterschiedlichen Primern jeweils zehn PCRs durchgeführt. Mit den gemessenen Daten wurden jeweils die beiden Allele zueinander ins Verhältnis gesetzt. Aus diesen Ratios wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung errechnet. Die doppelte Standardabweichung ergibt das 95 %-Konfidenzintervall. Ihr Verhältnis zum Mittelwert in Prozent zeigt die Schwankungsbreite der Methode an, außerhalb der sich die AI signifikant vom normalen Vergleichsgewebe unterscheidet. Daraus ergab sich eine Messgenauigkeit, nach welcher die Abweichungen der Allel-Ratio im Zielgewebe um 28 % von der Ratio im Normalgewebe als Ereignis erkannt werden können.

Für die hier vorliegenden Untersuchungen gilt der relative Verlust eines Allels von 40 % als Ereignis (Farrand *et al.*, 2002, Schwarzenbach *et al.*, 2007b). Für den AI-Score gilt also:

$$AI = AI\text{-Score} < 0,6 \text{ oder } > 1,67$$

In den Abbildungen 10 und 11 sind jeweils Beispiele für relative Verluste des kürzeren bzw. des längeren Allels dargestellt. Jedes Ereignis wurde zur Bestätigung mindestens einmal wiederholt.

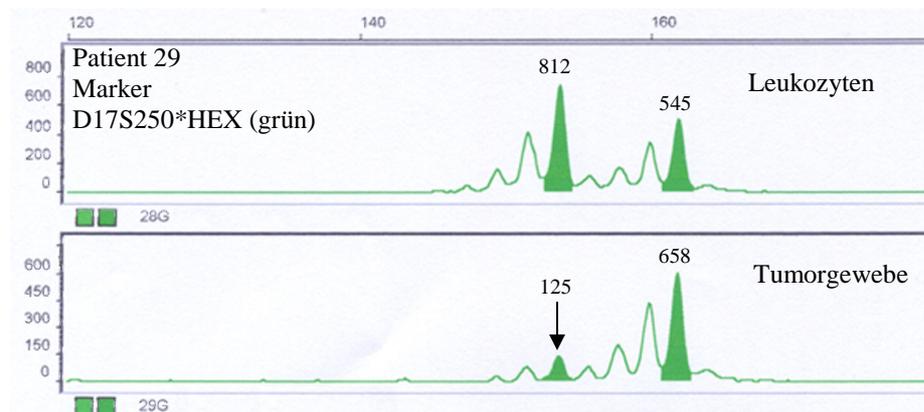


Abb. 10: AI, relative Intensitätsminderung des kürzeren Allels

Das kürzere Allel der DNA aus dem Primärtumor zeigt einen deutlich niedrigeren „Peak“ als die entsprechende Referenz- (Leukozyten-) DNA. Es liegt eine AI vor, die durch die obige Formel bestätigt wurde. AI ist durch einen Pfeil markiert.

$$AI - Score = (812 \times 658) / (545 \times 125) = 7,8 > 1,67 \quad \hat{=} \quad AI$$

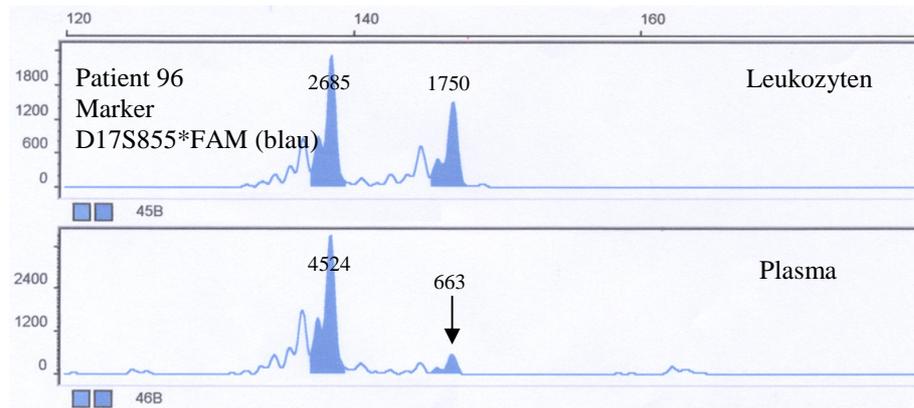


Abb. 11: AI, relative Intensitätsminderung des längeren Allels

Das längere Allel der Plasma-DNA zeigt einen deutlich niedrigeren „Peak“ als die entsprechende Referenz- (Leukozyten-) DNA. Es liegt eine AI vor, die durch die obige Formel bestätigt wurde. AI ist durch einen Pfeil markiert.

$$AI - Score = (2685 \times 663) / (1750 \times 4524) = 0,22 < 0,6 \rightarrow AI$$

4.4 Charakterisierung der Primer und Mikrosatelliten-Marker

In der Tabelle VII sind die verwendeten Primer beschrieben. Die Heterozygotenrate beschreibt den Anteil der informativen Fälle pro Marker im untersuchten Kollektiv. Alle Mikrosatelliten bestehen aus dem Dinukleotid-Repeat (CA)_n (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabelle VII: Eigenschaften der verwendeten Primer bzw. untersuchten Marker

Marker	Annealing-Temperatur (°C)	Fragmentlänge (bp)	Heterozygotenrate (%)
D3S1255	57	150-162	77
D9S171	55	160-178	80
D10S1765	56	164-178	81
D13S218	56	184-192	71
D16S421	52	201-215	60
D17S250	47	143-163	83
D17S855	54	140-152	81

4.5 Allelische Imbalanz in Tumorgewebe, Blut- und Knochenmarkplasma von Mammakarzinompatientinnen

4.5.1 Allelische Imbalanz im Tumorgewebe

Von 36 der 120 Patientinnen stand Tumorgewebe zur Verfügung. In 26 dieser 36 Tumorproben (72 %) wurde AI an mindestens einem der 7 Marker gefunden. In 13 Proben wurde jeweils eine AI entdeckt, während in 13 weiteren Proben mehr als eine AI auftrat. In einer Probe (Pat. Nr. 16) zeigten sogar alle 6 informativen Loci eine AI (Abb. 12). Von 252

Untersuchungen (36 Tumورproben x 7 Marker) waren 185 Fälle informativ. In diesen 185 Fällen konnten 59 AI entdeckt werden (32 %).

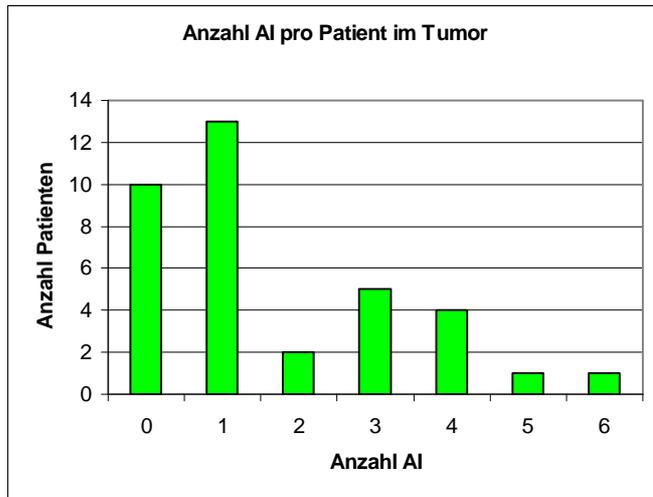


Abb. 12: Anzahl AI im Tumorgewebe pro Patientin
Heterozygotie und ein AI traten in den untersuchten Tumorgeweben am häufigsten auf.

Die meisten Ereignisse wurden am Marker D16S421 gefunden (47 % der informativen Fälle), gefolgt von den Markern D17S250 und D17S855 (jeweils 44 %). Der Marker D9S171 zeigte mit 17 % der informativen Fälle die wenigsten AI (Tab. VIII, Abb. 13)

Tabelle VIII: Anzahl AI pro Marker im Tumorgewebe von 36 Patientinnen

Marker	D3S1255	D9S171	D10S1765	D13S218	D16S421	D17S250	D17S855	Gesamt
Informative Fälle	29	29	31	25	19	27	25	185
Anzahl AI	6	5	6	10	9	12	11	59
AI (%)	21	17	19	40	47	44	44	32

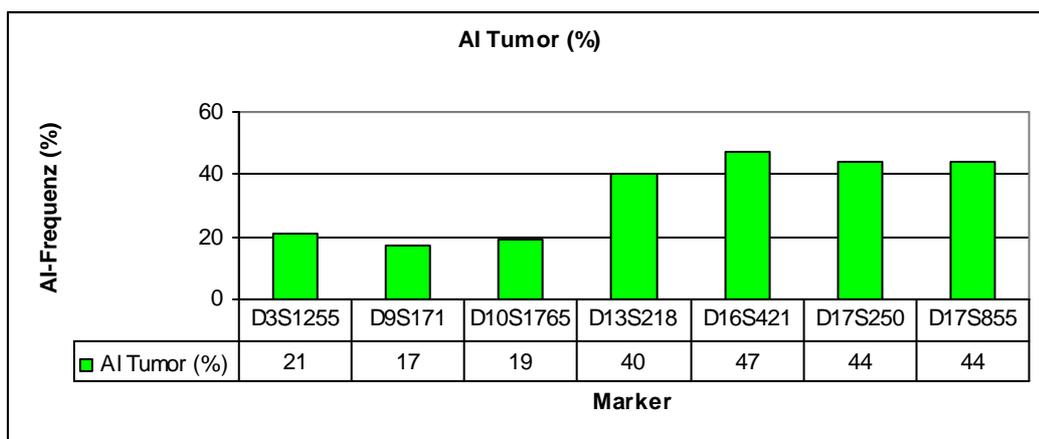


Abb. 13: Frequenz von AI im Tumorgewebe an den einzelnen Markern

Die Frequenz der entdeckten AI pro Patientin wurde mit den korrespondierenden klinischen Parametern verglichen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen ohne AI-Nachweis im Tumorgewebe und solchen mit AI-Nachweis ergab sich nicht.

Der Vergleich der Frequenz von AI an den einzelnen Markern mit den klinischen Parametern der Patientinnen erbrachte aufgrund des nur kleinen Kollektivs nur selten signifikante Zusammenhänge. Die Frequenz von AI an den Markern D9S171 ($p=0,055$) und D17S855 ($p=0,024$) korrelierte mit einem hohen *Grading* des Tumors (Tab. IX). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen AI am Marker D17S250 und der Expression des Ki-67-Antigens wurde beobachtet ($p=0,008$). AI am Marker D10S1765 war grenzwertig mit einer TumorgroÙe $\geq T2$ ($p=0,060$) und einem positiven Lymphknotenstatus ($p=0,054$) assoziiert. Patientinnen mit Allelverlusten an den Markern D17S250 und D17S855 zeigten häufig einen negativen Status für den Östrogen- ($p=0,060$) und Progesteronrezeptor ($p=0,066$) (Tab. IX).

Tabelle IX: Korrelationen zwischen dem Vorkommen von AI an den einzelnen Markern im Tumorgewebe und den klinischen Parametern der Patientinnen

	Keine AI	AI	p-Wert
Grading	D9S171		
G1+G2 (n=16)	93,8 % (15)	6,3 % (1)	0,055
G3 (n=10)	60,0 % (6)	40,0 % (4)	
	D17S855		
G1+G2 (n=13)	69,2 % (9)	30,8 % (4)	0,024
G3 (n=8)	12,5 % (1)	87,5 % (7)	
Ki-67 Antigen	D17S250		
negativ (n=11)	90,9 % (10)	9,1 % (1)	0,008
positiv (n=10)	30 % (3)	70 % (7)	
T-Stadium	D10S1765		
T1 (n=15)	93,3 % (14)	6,7 % (1)	0,060
T2-T4 (n=12)	58,3 % (7)	41,7 % (5)	
Lymphknotenstatus	D10S1765		
N0 (n=15)	93,35 % (14)	6,7 % (1)	0,054
N1 (n=11)	54,5 % (6)	45,5 % (5)	
Östrogenrezeptor	D17S250 oder D17S855		
negativ (n=11)	27,3 % (3)	72,7 % (8)	0,060
positiv (n=18)	66,7 % (12)	33,3 % (6)	
Progesteronrezeptor	D17S250 oder D17S855		
negativ (n=15)	33,3 % (5)	66,7 % (10)	0,066
positiv (n=14)	71,4 % (10)	28,6 % (4)	

Tabelle X: Vorkommen von AI an den 7 polymorphen Mikrosatellitenmarkern im Tumorgewebe und die klinischen Parameter der Patientinnen

NR	DNA-Konz	D3S1255	D9S171	D10S1765	D13S218	D16S421	D17S250	D17S855	Alter	KM-Status	T	N	M	G	ER	PR	HER2	Ki-67
		Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor										
1	408	+	n.i.	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	60	0	1	1	0	2	1	1	0	0
2	525	+	+	+	+	+	+	+	52	0	1	0	0	2	1	1	0	0
3	802,5	+	+	+	n.i.	AI	+	+	63	0	1	0	0	2	1	1	0	0
4	1475	AI	+	AI	n.i.	+	n.i.	AI	71	0	2	1	0	3	1	0	0	0
5	560	+	+	n.i.	+	AI	+	n.i.	45	k.A.	1	1	0	2	1	1	0	0
6	k.A.	+	+	+	n.i.	AI	AI	AI	29	0	2	1	0	3	0	0	1	1
9	158	+	+	+	n.i.	AI	+	+	65	0	2	0	0	2	1	0	0	0
11	1690	+	AI	AI	+	AI	AI	AI	63	0	2	1	0	3	0	0	0	k.A.
12	950	n.i.	n.i.	+	+	n.i.	AI	AI	41	0	1	0	0	3	0	0	0	1
13	960	AI	AI	+	AI	n.i.	+	n.i.	70	0	1	0	0	3	1	1	1	1
14	317	+	+	+	+	n.i.	AI	n.i.	68	k.A.	1	0	0	2	0	0	0	1
16	471	AI	AI	AI	AI	n.i.	AI	AI	57	0	4	1	0	3	0	0	0	1
18	440	AI	AI	+	n.i.	+	AI	AI	62	0	1	0	0	2	1	1	0	1
19	275	n.i.	+	+	+	AI	+	+	50	0	1	0	0	1	1	1	0	0
20	450	+	+	+	AI	n.i.	n.i.	AI	48	0	2	0	0	3	1	1	0	1
21	k.A.	n.i.	AI	+	n.i.	AI	AI	n.i.	52	k.A.	1	1	0	3	0	0	0	1
22	225	+	+	AI	n.i.	+	+	+	41	0	2	1	0	2	1	1	0	0
23	483	+	n.i.	+	AI	n.i.	n.i.	n.i.	65	0	1	0	0	2	1	1	0	0
24	760	+	+	AI	+	AI	AI	AI	62	0	2	1	0	2	0	1	0	0
27	585	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	+	n.i.	60	0	1	0	0	2	1	1	0	0
28	343	+	+	+	+	+	n.i.	+	61	0	1	0	0	3	0	0	0	1
29	91	+	+	AI	AI	+	AI	AI	55	0	1	0	0	2	1	0	0	1
30	392	+	n.i.	+	+	n.i.	+	AI	59	0	1	0	0	3	0	0	0	0
33	18377	+	+	+	+	n.i.	+	+	58	k.A.	2	1	0	2	1	1	0	1
34	408	+	+	+	+	n.i.	+	+	60	1	2	0	0	2	0	0	0	0
36	2020	+	+	+	AI	n.i.	+	n.i.	60	0	4	1	0	3	1	0	0	0
38	247	AI	n.i.	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	77	0	2	1	0	3	1	1	0	0
39	2040	n.i.	+	n.i.	AI	n.i.	+	+	54	0	1	0	0	2	1	1	0	1
43	139	+	+	n.i.	AI	+	AI	AI	64	0	4	1	1	2	1	1	0	k.A.
44	3640	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	80	0	k.A.							

Tabelle X (Fortsetzung): Vorkommen von AI an den 7 polymorphen Mikrosatellitenmarkern im Tumorgewebe und die klinischen Parameter der Patientinnen

NR	DNA-Konz	D3S1255	D9S171	D10S1765	D13S218	D16S421	D17S250	D17S855	Alter	KM-Status	T	N	M	G	ER	PR	HER2	Ki-67
		Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor	Tumor										
49	130	+	n.i.	+	+	+	n.i.	+	48	0	k.A.							
51	394	+	+	+	+	n.i.	AI	+	47	0	k.A.							
53	545	n.i.	+	+	AI	n.i.	+	+	63	0	1	0	0	2	1	1	k.A.	k.A.
55	267	n.i.	+	+	n.i.	+	+	n.i.	34	k.A.	2	k.A.	1	3	0	0	0	k.A.
58	1140	+	+	+	n.i.	+	n.i.	+	83	0	k.A.							
59	920	AI	n.i.	+	AI	AI	AI	+	40	0	1	1	0	k.A.	1	0	1	k.A.

Legende:

NR: Nummer der Patientin

DNA-Konz: Konzentration der frei zirkulierenden DNA im Blutplasma in ng/ml

KM-Status: 0 = keine disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, 1 = mindestens eine DTC im Knochenmark

T, N, M: Tumorstadien nach TNM-Klassifikation (5. Auflage der UICC)

G: Grading des Tumors

ER: Östrogenrezeptorstatus, ermittelt durch immunhistochemische Untersuchungen; 0 = negativ, 1 = positiv

PR: Progesteronrezeptorstatus, ermittelt durch immunhistochemische Untersuchungen; 0 = negativ, 1 = positiv

Her2: Her2/neu-Antigen-Expression, ermittelt durch immunhistochemische Untersuchungen; 0 = negativ, 1 = positiv

KI-67: KI-67-Proliferationsantigen-Expression, ermittelt durch immunhistochemische Untersuchungen; 0 = negativ, 1 = positiv

±: Heterozygotie, keine AI

AI: Allelische Imbalanz, bestätigtes Ereignis

n.i.: nicht informativ; Homozygotie, widersprüchliche Ergebnisse oder kein PCR-Produkt

k.A.: keine Angaben, Daten lagen nicht vor

Kein Zusammenhang konnte zwischen der Frequenz von AI im Tumor und Tumorgroße, disseminierten Tumorzellen, Vorkommen von CA15-3 und Expression von Her2/neu nachgewiesen werden. In Tabelle X sind die Ergebnisse der Analysen von AI an den einzelnen Markern im Tumorgewebe mit den klinischen Parametern der Patientinnen zusammengefasst.

4.5.2 Allelische Imbalanz im Blutplasma

Die Plasma-DNA von 120 Mammakarzinompatientinnen wurde in einer PCR mit den 7 Primern amplifiziert. Von diesen 120 Plasmaproben wiesen 23 (19 %) mindestens eine AI auf. Davon hatten 17 Patientinnen genau eine AI, 5 Patientinnen 2 und eine Patientin 3 AI (Patientin Nr. 88) (Abb. 14). Von insgesamt 840 Analysen (120 Patientinnen x 7 Marker) waren 539 Fälle informativ. In diesen 539 Fällen konnten 30 AI entdeckt werden (5,6 %).

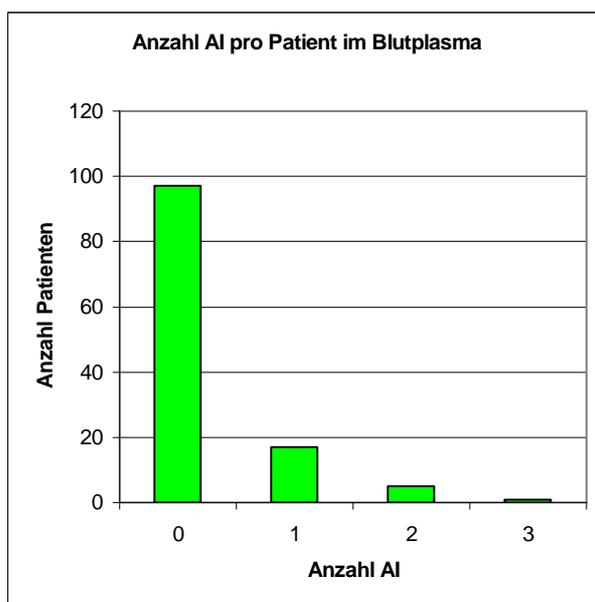


Abb. 14: Anzahl AI pro Patientin im Blutplasma

Am häufigsten trat in der Plasma-DNA Heterozygotie auf. Das Vorkommen von mehreren AI im Blutplasma derselben Patientin war selten.

Der Marker D13S1255 zeigte in 13 % der informativen Fälle am häufigsten AI, gefolgt von den Markern D9S171 (7 %) und D17S250 (6 %). Am Marker D16S421 wurde, im Gegensatz zu der hohen Frequenz von 47 % im Tumorgewebe, keine AI entdeckt (Tab. XI).

Tabelle XI: Frequenz von AI an den polymorphen Mikrosatellitenmarkern in Blutplasma

Marker	D3S1255	D9S171	D10S1765	D13S218	D16S421	D17S250	D17S855	Gesamt
Informative Fälle	64	81	87	73	62	89	83	539
Anzahl AI	8	6	4	3	0	5	4	30
AI (%)	13	7	5	4	0	6	5	5,6

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Tumorgewebes war die Frequenz von AI im Plasma zu niedrig, um in der statistischen Evaluation der Daten eine signifikante Abhängigkeit von den klinischen Parametern der Patientinnen zu zeigen. Eine graphische Aufstellung ist in Abb. 15 gezeigt.

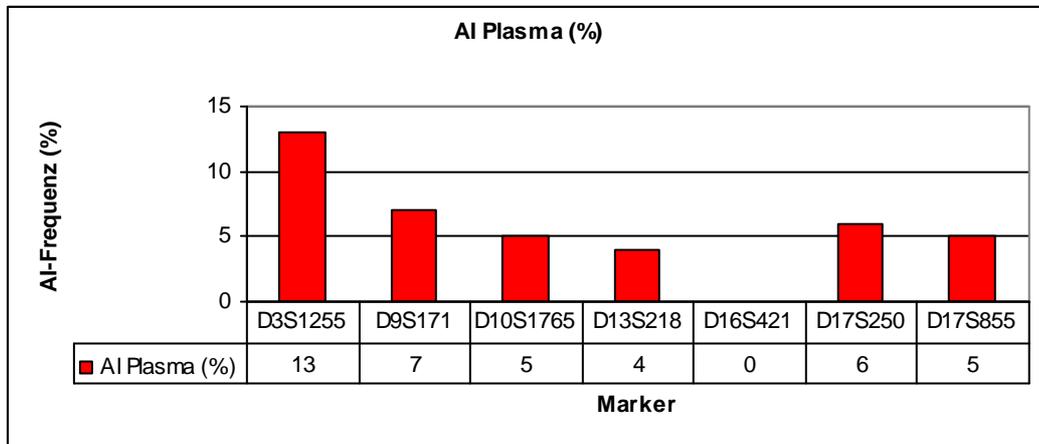


Abb. 15: Frequenz von AI im Blutplasma an den einzelnen Markern

In der Einzelbetrachtung wurde einzig für das Vorkommen von AI am Marker D9S171 ein tendenzieller Zusammenhang mit einem negativen Knochenmarkstatus der Patientinnen gefunden ($p=0,075$; Tab. XII).

Tabelle XII: Korrelation der Frequenz von AI am Marker D9S171 und dem Vorkommen von DTC im Knochenmark

	Keine AI	AI	p-Wert
Knochenmarkstatus	D9S171		
negativ (n=43)	86 % (37)	14 % (6)	0,075
positiv (n=28)	100 % (28)	0 % (0)	

Für das Vorkommen von AI konnte für keinen anderen Marker eine statistische Abhängigkeit bezüglich der Merkmale *Staging*, *Grading*, DTC, Rezeptorstatus, CA15-3, Her2/neu oder Ki-67 festgestellt werden.

Die Tabelle XIII fasst die Ergebnisse der AI-Untersuchungen im Blutplasma und die klinischen Parameter der Patientinnen zusammen.

Tabelle XIII: Vorkommen von AI an den 7 polymorphen Mikrosatellitenmarkern im Blutplasma und die klinischen Parameter der Patientinnen

NR	DNA-Konz	D3S1255	D9S171	D10S1765	D13S218	D16S421	D17S250	D17S855	Alter	KM-Status	T	N	M	G	Histo	ER	PR	HER2	Ki-67	Ca 15-3
		Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma												
1	408	n.i.	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	60	k.A.	1	1	0	2	k.A.	1	1	0	0	k.A.
2	525	+	+	+	+	+	+	+	52	0	1	0	0	2	k.A.	1	1	0	0	k.A.
3	802,5	+	+	+	n.i.	+	+	+	63	0	1	0	0	2	k.A.	1	1	0	0	k.A.
4	1475	n.i.	+	+	n.i.	+	n.i.	+	71	0	2	1	0	3	k.A.	1	0	0	0	k.A.
5	560	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	n.i.	45	k.A.	1	1	0	2	k.A.	1	1	0	0	k.A.
6	k.A.	+	+	+	n.i.	+	+	+	29	0	2	1	0	3	k.A.	0	0	1	1	k.A.
7	758	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	n.i.	49	0	1	0	0	3	k.A.	1	1	0	0	k.A.
8	910	n.i.	AI	n.i.	n.i.	n.i.	+	AI	57	0	1	0	0	2	k.A.	1	1	0	0	k.A.
9	158	+	+	+	n.i.	n.i.	+	+	65	0	2	0	0	2	k.A.	1	0	0	0	k.A.
10	k.A.	+	+	+	+	+	+	+	71	k.A.	1	1	0	2	k.A.	1	1	k.A.	0	k.A.
11	1690	AI	AI	+	+	n.i.	n.i.	+	63	0	2	1	0	3	k.A.	0	0	0	k.A.	k.A.
12	950	n.i.	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	41	0	1	0	0	3	k.A.	0	0	0	1	k.A.
13	960	+	+	+	+	n.i.	+	n.i.	70	0	1	0	0	3	k.A.	1	1	1	1	k.A.
14	317	n.i.	n.i.	+	n.i.	n.i.	AI	n.i.	68	k.A.	1	0	0	2	k.A.	0	0	0	1	k.A.
15	464	+	+	+	n.i.	+	+	+	47	0	2	1	0	3	k.A.	1	1	0	k.A.	k.A.
16	471	+	+	+	+	n.i.	+	+	57	0	4	1	0	3	k.A.	0	0	0	1	k.A.
17	k.A.	AI	n.i.	+	+	n.i.	+	n.i.	68	0	3	1	1	2	k.A.	0	0	0	0	k.A.
18	440	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	62	0	1	0	0	2	k.A.	1	1	0	1	k.A.
19	275	n.i.	+	+	+	+	+	+	50	0	1	0	0	1	k.A.	1	1	0	0	k.A.
20	450	+	+	+	+	n.i.	n.i.	+	48	0	2	0	0	3	k.A.	1	1	0	1	35
21	k.A.	n.i.	+	+	n.i.	+	+	n.i.	52	k.A.	1	1	0	3	k.A.	0	0	0	1	k.A.
22	225	AI	n.i.	+	n.i.	+	+	AI	41	0	2	1	0	2	k.A.	1	1	0	0	k.A.
23	483	+	n.i.	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	65	0	1	0	0	2	k.A.	1	1	0	0	k.A.
24	760	n.i.	+	+	+	+	+	+	62	0	2	1	0	2	k.A.	0	1	0	0	15
25	260	n.i.	n.i.	+	+	n.i.	+	+	63	k.A.	2	0	0	1	k.A.	1	1	0	k.A.	k.A.
26	k.A.	+	+	n.i.	+	n.i.	+	+	66	k.A.	1	1	0	1	k.A.	1	1	0	0	k.A.
27	585	+	+	n.i.	+	n.i.	+	+	60	0	1	0	0	2	k.A.	1	1	0	0	k.A.
28	343	n.i.	+	+	+	+	n.i.	+	61	0	1	0	0	3	k.A.	0	0	0	1	k.A.
29	91	+	+	+	+	+	+	+	55	0	1	0	0	2	k.A.	1	0	0	1	k.A.
30	392	n.i.	n.i.	+	+	n.i.	+	n.i.	59	0	1	0	0	3	k.A.	0	0	0	0	k.A.

Tabelle XIII (Fortsetzung): Vorkommen von AI an den 7 polymorphischen Mikrosatellitenmarkern im Blutplasma und die klinischen Parameter der Patientinnen

NR	DNA-Konz	D3S1255	D9S171	D10S1765	D13S218	D16S421	D17S250	D17S855	Alter	KM-Status	T	N	M	G	Histo	ER	PR	HER2	Ki-67	Ca 15-3
		Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma												
31	420	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	n.i.	61	0	1	1	0	2	k.A.	0	0	0	0	17
32	750	+	+	+	+	n.i.	+	+	59	0	1	0	0	k.A.	k.A.	0	0	0	0	k.A.
33	18377	+	+	AI	+	n.i.	+	+	58	k.A.	2	1	0	2	k.A.	1	1	0	1	k.A.
34	408	+	+	+	+	n.i.	+	+	60	1	2	0	0	2	k.A.	0	0	0	0	k.A.
35	420	n.i.	+	+	+	+	+	n.i.	42	0	1	0	0	2	k.A.	1	1	0	0	k.A.
36	2020	+	+	n.i.	+	n.i.	AI	n.i.	60	0	4	1	0	3	k.A.	1	0	0	0	k.A.
37	1701	+	n.i.	+	+	+	+	n.i.	53	0	2	1	0	3	k.A.	0	0	1	1	22
38	247	+	+	n.i.	+	+	+	+	77	0	2	1	0	3	k.A.	1	1	0	0	k.A.
39	2040	n.i.	AI	n.i.	n.i.	n.i.	AI	+	54	0	1	0	0	2	k.A.	1	1	0	1	k.A.
40	650	+	n.i.	+	+	+	n.i.	n.i.	73	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
41	k.A.	n.i.	+	+	+	n.i.	+	+	42	k.A.	1	1	0	3	k.A.	1	1	1	k.A.	k.A.
42	4180	+	+	+	+	n.i.	+	+	50	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
43	139	AI	+	n.i.	+	+	n.i.	+	64	0	4	1	1	2	k.A.	1	1	0	k.A.	72
44	3640	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	80	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
45	413	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	n.i.	+	70	1	2	1	0	k.A.	k.A.	1	1	k.A.	k.A.	179
46	430	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	+	n.i.	31	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1	0	1	k.A.	31
47	760	n.i.	+	+	+	+	+	+	46	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
48	690	n.i.	+	+	+	+	+	+	58	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
49	130	+	n.i.	+	+	+	n.i.	+	48	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
50	260	+	+	+	+	+	+	n.i.	59	1	4	1	1	k.A.	k.A.	1	1	0	k.A.	66
51	394	+	n.i.	n.i.	+	n.i.	+	+	47	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	68
52	675	+	+	+	n.i.	n.i.	+	n.i.	73	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1	1	0	k.A.	k.A.
53	545	n.i.	+	+	+	n.i.	+	+	63	0	1	0	0	2	k.A.	1	1	k.A.	k.A.	10
54	1860	+	+	n.i.	+	n.i.	n.i.	+	57	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
55	267	n.i.	+	+	n.i.	+	+	n.i.	34	k.A.	2	k.A.	1	3	k.A.	0	0	0	k.A.	k.A.
56	2057	+	+	+	+	n.i.	+	+	55	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
57	2370	n.i.	+	n.i.	+	+	n.i.	+	64	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1	1	k.A.	k.A.	272
58	1140	n.i.	AI	+	n.i.	+	n.i.	+	83	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
59	920	n.i.	n.i.	+	+	+	+	+	40	0	1	1	0	k.A.	k.A.	1	0	1	k.A.	27
60	k.A.	+	n.i.	+	+	+	+	+	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

Tabelle XIII (Fortsetzung): Vorkommen von AI an den 7 polymorphischen Mikrosatellitenmarkern im Blutplasma und die klinischen Parameter der Patientinnen

NR	DNA-Konz	D3S1255	D9S171	D10S1765	D13S218	D16S421	D17S250	D17S855	Alter	KM-Status	T	N	M	G	Histo	ER	PR	HER2	Ki-67	Ca 15-3
		Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma												
61	k.A.	+	n.i.	+	n.i.	+	n.i.	n.i.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
62	k.A.	+	+	+	n.i.	n.i.	+	+	60	0	1	1	0	2	1	1	0	k.A.	k.A.	11,6
63	k.A.	+	+	+	n.i.	+	+	n.i.	34	0	2	0	0	1	1	1	1	k.A.	k.A.	23,3
64	k.A.	n.i.	n.i.	+	+	n.i.	n.i.	+	55	0	2	1	0	3	k.A.	1	1	k.A.	k.A.	31,2
65	k.A.	n.i.	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	43	0	2	0	1	3	k.A.	0	0	k.A.	k.A.	k.A.
66	k.A.	n.i.	n.i.	+	n.i.	+	n.i.	+	38	0	4	x	0	3	k.A.	0	0	k.A.	k.A.	k.A.
67	k.A.	+	+	+	+	+	+	+	55	0	1	0	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	9,36
68	k.A.	+	AI	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	73	0	2	0	0	1	4	1	1	k.A.	k.A.	k.A.
69	k.A.	AI	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	+	54	0	1	0	0	3	1	0	0	k.A.	k.A.	20
70	k.A.	+	+	n.i.	+	+	+	+	35	0	2	0	0	3	1	1	0	k.A.	k.A.	19
71	k.A.	+	+	+	AI	+	n.i.	+	40	0	1	0	0	3	1	1	0	k.A.	k.A.	31,3
72	k.A.	n.i.	+	+	n.i.	+	+	+	62	1	1	0	0	2	k.A.	1	0	k.A.	k.A.	k.A.
73	k.A.	+	+	n.i.	+	+	+	n.i.	53	1	2	0	0	2	2	0	1	k.A.	k.A.	k.A.
74	k.A.	+	+	n.i.	+	+	+	+	45	1	2	1	0	3	2	0	1	k.A.	k.A.	27,7
75	k.A.	AI	n.i.	n.i.	+	+	+	+	68	1	1	0	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	9,39
76	k.A.	n.i.	+	+	n.i.	n.i.	+	+	60	1	4	1	1	3	1	1	1	k.A.	k.A.	44,4
77	k.A.	n.i.	+	+	n.i.	+	+	+	76	1	1	0	0	3	1	1	1	k.A.	k.A.	10,2
78	k.A.	n.i.	+	n.i.	n.i.	+	+	+	53	1	1	0	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	18,6
79	k.A.	+	+	+	+	n.i.	+	+	39	1	1	1	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	11
80	k.A.	n.i.	+	+	+	n.i.	+	+	48	1	2	0	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	27,1
81	k.A.	+	n.i.	+	+	+	+	+	50	1	1	0	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	12,1
82	339	n.i.	+	n.i.	+	+	+	+	58	0	1	0	0	3	1	1	0	k.A.	k.A.	27,3
83	1563	n.i.	n.i.	+	n.i.	+	+	+	63	0	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	1	1	k.A.	k.A.	k.A.
84	100	+	n.i.	+	n.i.	+	+	+	38	0	2	0	0	2	1	0	0	k.A.	k.A.	26,2
85	179	n.i.	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	46	0	2	0	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	17,6
86	1243	n.i.	AI	+	+	+	+	+	61	0	2	1	0	1	1	1	1	k.A.	k.A.	7,73
87	969	n.i.	+	+	+	+	+	n.i.	48	0	1	1	0	2	1	0	0	k.A.	k.A.	13
88	3888	AI	n.i.	n.i.	AI	n.i.	AI	n.i.	60	0	1	0	0	2	1	0	0	k.A.	k.A.	12,8
89	5317	n.i.	+	AI	n.i.	n.i.	+	+	75	0	1	0	0	2	2	0	1	k.A.	k.A.	21,9
90	1189	n.i.	n.i.	+	+	+	n.i.	n.i.	65	0	4	1	0	3	2	1	1	k.A.	k.A.	15,1

Tabelle XIII (Fortsetzung): Vorkommen von AI an den 7 polymorphischen Mikrosatellitenmarkern im Blutplasma und die klinischen Parameter der Patientinnen

NR	DNA-Konz	D3S1255	D9S171	D10S1765	D13S218	D16S421	D17S250	D17S855	Alter	KM-Status	T	N	M	G	Histo	ER	PR	HER2	Ki-67	Ca 15-3
		Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma												
91	2792	+	+	+	+	+	+	+	74	1	4	0	1	2	5	1	1	k.A.	k.A.	16,9
92	58	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	64	0	1	1	0	2	2	1	1	k.A.	k.A.	21,5
93	367	+	n.i.	+	+	+	+	+	55	0	1	1	0	k.A.	k.A.	0	0	k.A.	k.A.	k.A.
94	2142	+	n.i.	n.i.	+	n.i.	+	+	55	1	2	0	0	k.A.	k.A.	0	0	k.A.	k.A.	k.A.
95	2234	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	32	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
96	2197	+	+	+	+	+	+	AI	75	1	1	0	0	2	2	1	1	k.A.	k.A.	25,2
97	915	+	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	+	81	0	1	0	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	30
98	1088	n.i.	+	+	+	n.i.	+	+	56	0	2	2	1	k.A.	k.A.	1	1	k.A.	k.A.	k.A.
99	2187	n.i.	+	+	+	+	n.i.	+	47	1	2	0	1	2	1	1	1	k.A.	k.A.	k.A.
100	1125	+	+	+	n.i.	n.i.	+	+	39	0	1	2	0	k.A.	k.A.	0	0	k.A.	k.A.	k.A.
101	1627	n.i.	+	+	+	+	+	+	63	1	2	0	0	2	5	1	1	k.A.	k.A.	15,4
102	171	+	+	+	+	+	+	+	63	1	2	1	0	1	1	0	1	k.A.	k.A.	14
103	520	+	+	+	n.i.	+	+	n.i.	60	1	2	0	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	k.A.
104	1227	+	+	+	+	+	+	+	38	0	2	1	0	2	5	1	1	k.A.	k.A.	10,6
105	100	n.i.	n.i.	+	+	+	+	+	71	1	2	0	0	3	9	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	14,9
106	626	n.i.	+	n.i.	+	+	+	+	64	1	2	0	0	2	5	1	1	k.A.	k.A.	14,7
107	1390	n.i.	+	+	+	n.i.	n.i.	+	79	1	2	0	0	2	4	1	1	k.A.	k.A.	26,3
108	363	+	n.i.	AI	n.i.	n.i.	+	+	48	1	1	0	0	2	1	1	0	k.A.	k.A.	19,6
109	662	n.i.	+	+	n.i.	+	+	+	64	1	1	0	0	1	2	1	1	k.A.	k.A.	17,2
110	469	n.i.	+	n.i.	+	n.i.	+	n.i.	66	1	4	x	x	k.A.	k.A.	0	0	k.A.	k.A.	k.A.
111	931	+	+	+	+	n.i.	+	+	59	1	1	x	x	k.A.	k.A.	1	1	k.A.	k.A.	k.A.
112	1071	n.i.	+	+	n.i.	n.i.	+	+	71	0	2	1	0	1	1	1	0	k.A.	k.A.	7,99
113	1810	+	+	AI	n.i.	n.i.	AI	n.i.	42	1	1	1	0	3	2	0	0	k.A.	k.A.	14,4
114	1783	n.i.	+	n.i.	AI	n.i.	n.i.	n.i.	69	1	2	x	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	21,9
115	193	+	n.i.	n.i.	+	+	+	+	62	0	2	1	0	3	1	0	0	k.A.	k.A.	71,6
116	136	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	AI	66	0	2	0	0	2	1	1	1	k.A.	k.A.	6,82
117	519	n.i.	+	+	n.i.	n.i.	+	+	50	1	2	0	0	3	1	0	0	k.A.	k.A.	16,4
118	2828	AI	n.i.	n.i.	+	+	+	n.i.	42	1	2	2	0	k.A.	k.A.	1	1	k.A.	k.A.	k.A.
119	485	+	n.i.	+	+	n.i.	+	+	49	1	2	0	0	2	1	0	0	k.A.	k.A.	22,6
120	110	n.i.	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	46	0	2	0	0	3	1	0	0	k.A.	k.A.	22,8

Legende:

NR: Nummer der Patientin

DNA-Konz: Konzentration der frei zirkulierenden DNA im Blutplasma in ng/ml

KM-Status: 0 = keine disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, 1 = mindestens eine DTC im Knochenmark

T, N, M: Tumorstadien nach TNM-Klassifikation (5. Auflage der UICC)

G: *Grading* des Tumors

Histo: Histologie des Tumors. 1 = duktal, 2 = lobulär, 3 = medullär, 4 = muzinös, 5 = duktal und lobulär, 9 = andere

ER: Östrogenrezeptorstatus, ermittelt durch immunhistochemische Untersuchungen; 0 = negativ, 1 = positiv

PR: Progesteronrezeptorstatus, ermittelt durch immunhistochemische Untersuchungen; 0 = negativ, 1 = positiv

Her2: Her2/neu-Antigen-Expression, ermittelt durch immunhistochemische Untersuchungen; 0 = negativ, 1 = positiv

KI-67: KI-67-Proliferationsantigen-Expression, ermittelt durch immunhistochemische Untersuchungen; 0 = negativ, 1 = positiv

CA 15-3: Konzentration des Tumormarkers im Blutplasma in U/ml

±: Heterozygotie, keine AI

AI: Allelische Imbalanz, bestätigtes Ereignis

n.i.: nicht informativ; Homozygotie, widersprüchliche Ergebnisse oder kein PCR-Produkt

k.A.: keine Angaben, Daten lagen nicht vor

4.5.3 Allelische Imbalanz im Knochenmarkplasma

Von 21 Patientinnen standen Knochenmarkaspirate zur Verfügung, bei 17 von ihnen wurde aus beiden Beckenkämmen punktiert und das Aspirat seitengetreunt aufgearbeitet und untersucht. Die Knochenmark-DNA wurde mit den 7 Primern in einer PCR amplifiziert. Vier der Patientinnen wiesen AI auf (19 %). Von 266 Analysen (17 Pat. x 7 Marker x 2 + 4 Pat. x 7 Marker x 1) waren 199 Fälle informativ. Insgesamt wurden 5 AI gefunden (2,5 %), davon 3 an dem Marker D3S1255 (12 %), jeweils 1 AI an den Markern D10S1765 (3,5 %) und D16S421 (5,3 %) (Tab. XIV). Vier der 5 AI wurden in Proben entdeckt, von denen eine korrespondierende Probe des anderen Beckenkamms zur Verfügung stand. In keinem der Fälle trat die AI beidseitig auf.

Aufgrund der geringen Häufigkeit von AI im Knochenmarkplasma wurde keine statistische Auswertung der Ereignisse im Zusammenhang mit den klinischen Parametern durchgeführt. Auffälligkeiten werden im Folgenden dargestellt.

Drei der 4 Patientinnen mit AI im Knochenmarkplasma wiesen das ungünstigste Tumor-Grading G3 auf, während in der Gesamtheit der untersuchten Fälle das Verhältnis von G2 zu G3 ausgeglichen war. Des Weiteren wurde in 3 der Patientinnen ein positiver Lymphknotenstatus gefunden, obwohl im Gesamtkollektiv die nodalnegative Fälle mit 58 % vorherrschten. Bei keiner der Patientinnen konnten im Knochenmarkaspirat CK-positive Zellen nachgewiesen werden.

Tabelle XIV: Verteilung von AI an den 3 betroffenen polymorphischen Mikrosatellitenmarkern im Knochenmark und die klinischen Parameter der Patientinnen

NR	DNA-Konz	D3S1255		D10S1765		D16S421		Alter	KM-Status	T	N	M	G	ER	PR	HER2	Ki-67
		KM re	KM li	KM re	KM li	KM re	KM li										
2	525	+	+	+	+	+	+	52	0	1	0	0	2	1	1	0	0
4	1475	+	k.M.	+	k.M.	n.i.	k.M.	71	0	2	1	0	3	1	0	0	0
5	560	AI	+	n.i.	n.i.	AI	+	45	k.A.	1	1	0	2	1	1	0	0
7	758	+	n.i.	+	+	n.i.	n.i.	49	0	1	0	0	3	1	1	0	0
9	158	+	+	+	+	+	+	65	0	2	0	0	2	1	0	0	0
11	1690	k.M.	AI	k.M.	+	k.M.	+	63	0	2	1	0	3	0	0	0	k.A.
12	950	n.i.	n.i.	AI	+	n.i.	n.i.	41	0	1	0	0	3	0	0	0	1
13	960	k.M.	n.i.	k.M.	+	k.M.	n.i.	70	0	1	0	0	3	1	1	1	1
18	440	+	+	+	+	+	+	62	0	1	0	0	2	1	1	0	1
21	k.A.	n.i.	n.i.	+	+	+	+	52	k.A.	1	1	0	3	0	0	0	1
23	483	+	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	65	0	1	0	0	2	1	1	0	0
24	760	n.i.	+	n.i.	+	n.i.	+	62	0	2	1	0	2	0	1	0	0
27	585	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	60	0	1	0	0	2	1	1	0	0
28	343	+	+	+	+	+	+	61	0	1	0	0	3	0	0	0	1
30	392	+	+	+	+	n.i.	n.i.	59	0	1	0	0	3	0	0	0	0
31	420	n.i.	n.i.	+	+	+	+	61	0	1	1	0	2	0	0	0	0
34	408	+	+	+	+	n.i.	n.i.	60	1	2	0	0	2	0	0	0	0
35	420	n.i.	k.M.	+	k.M.	+	k.M.	42	0	1	0	0	2	1	1	0	0
36	2020	+	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	60	0	4	1	0	3	1	0	0	0
37	1701	n.i.	+	+	+	n.i.	+	53	0	2	1	0	3	0	0	1	1
38	247	+	AI	n.i.	n.i.	n.i.	+	77	0	2	1	0	3	1	1	0	0

Legende zu Tabelle XIV:

NR: Nummer der Patientin

DNA-Konz: Konzentration der frei zirkulierenden DNA im Blutplasma in ng/ml

KM-Status: 0 = keine disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, 1 = mindestens eine DTC im Knochenmark

T, N, M: Tumorstadien nach TNM-Klassifikation (5. Auflage der UICC)

G: *Grading* des Tumors

ER: Östrogenrezeptorstatus (Immunhistochemie); 0 = negativ, 1 = positiv

PR: Progesteronrezeptorstatus (Immunhistochemie); 0 = negativ, 1 = positiv

Her2: Her2/neu-Antigen-Expression (Immunhistochemie); 0 = negativ, 1 = positiv

KI-67: KI-67-Proliferationsantigen-Expression (Immunhistochemie); 0 = negativ, 1 = positiv

±: Heterozygotie, keine AI

AI: Allelische Imbalanz, bestätigtes Ereignis

n.i.: nicht informativ; Homozygotie, widersprüchliche Ergebnisse oder kein PCR-Produkt

k.A.: keine Angaben, Daten lagen nicht vor

k.M.: kein Material, z.B. bei punctio sicca

4.5.4 Vergleich der Ereignisse in Tumor, Blut- und Knochenmarkplasma

Insgesamt wurden im Tumorgewebe 59 AI (32 %) gefunden. In zwei dieser Fälle (3 %) konnte die gleiche Alteration im Blutplasma gefunden werden (Pat. 11, D9S171; Pat. 14, D17S250). In einem Fall konnte einseitig im Knochenmarkplasma eine gleichsinnige AI wie im Tumor entdeckt werden (Pat. 5, D16S421). In einem weiteren Fall konnte im Knochenmarkplasma eine gegensinnige AI zu der im Tumor entdeckt werden, d.h., in Tumor und Knochenmark waren jeweils unterschiedliche Allele relativ vermindert (Pat. 38, D3S1255). In allen anderen Fällen konnten die im Tumor entdeckten AI nicht im korrespondierenden Blut oder Knochenmark nachgewiesen werden. Bei einer Patientin traten in Blut- und Knochenmarkplasma die gleiche AI auf, ohne dass sie im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte (Pat. 11, D3S1255). Bei 9 von 11 Patientinnen (82 %) mit AI im Blutplasma war im korrespondierenden Tumorgewebe keine AI nachweisbar.

In der Tabelle XV sind zusammenfassend alle Ereignisse der Patientinnen dargestellt, von denen gleichzeitig Tumorgewebe und Blutplasma, in einigen Fällen auch Knochenmark, vorhanden waren.

Die genetische Verteilung zwischen Tumorgewebe, Blutplasma und Knochenmark war sehr heterogen. Zusammenfassend war die Frequenz von AI an allen Markern im Tumorgewebe mit 32 % am höchsten. Die Frequenz im Blutplasma lag bei 5,6 %, im Knochenmark lag sie mit 2,5 % am niedrigsten. Gerade die Marker, die im Tumorgewebe häufig positiv für AI waren, waren im Blutplasma relativ selten betroffen. Auffällig ist hier vor allem der Marker D16S421, der im Tumor in fast der Hälfte der Fälle (47 %) AI zeigte, während er im Blutplasma ereignislos war. Auch die Marker D17S250 und D17S855, die im Tumorgewebe

mit jeweils 44 % häufig AI zeigten, waren im Blutplasma mit 6 % bzw. 5 % selten betroffen. Der im Blutplasma mit Abstand am häufigsten (13 %) veränderte Marker war D3S1255, der im Tumorgewebe im Vergleich zu den anderen Markern in meinem Kollektiv eine mit 21 % eher geringe Frequenz zeigte (Abb. 16).

Tabelle XV: Vergleich der Ereignisse in Tumor, Blut und Knochenmark

Bei Patientin Nr. 38 zeigen sich am Marker D3S1255 in T und KM links gegensinnige AI.

NR	D3S1255				D9S171				D10S1765				D13S218				D16S421				D17S250				D17S855			
	P	T	KM r	KM l	P	T	KM r	KM l	P	T	KM r	KM l	P	T	KM r	KM l	P	T	KM r	KM l	P	T	KM r	KM l	P	T	KM r	KM l
3	+	+			+	+			+	+			n.i.	n.i.			+	AI			+	+			+	+		
4	n.i.	AI	+		+	+	+		+	AI	+		n.i.	n.i.	n.i.		+	+	n.i.		n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	AI	+
5	n.i.	+	AI	+	n.i.	+	n.i.	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	n.i.	AI	AI	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
6	+	+			+	+			+	+			n.i.	n.i.			+	AI			+	AI			+	AI		
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	AI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	AI	+		AI	AI	AI			+	+	AI		+	+	+	+	n.i.	AI		+	n.i.	AI		+	+	+	AI	+
12	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	AI	+	n.i.	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	AI	n.i.	+	n.i.	AI	n.i.	+
13	+	AI		n.i.	+	AI			+	+			+	+	AI		n.i.	n.i.	n.i.		n.i.	+	+	n.i.	n.i.	n.i.		n.i.
14	n.i.	+			n.i.	+			+	+			n.i.	+			n.i.	n.i.			AI	AI			n.i.	n.i.		
16	+	AI			+	AI			+	AI			+	AI			n.i.	n.i.			+	AI			+	AI		
18	n.i.	AI	+	+	n.i.	AI	+	+	n.i.	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	+	n.i.	AI	+	+	n.i.	AI	+	+
19	n.i.	n.i.			+	+			+	+			+	+			+	AI			+	+			+	+		
20	+	+			+	+			+	+			+	AI			n.i.	n.i.			n.i.	n.i.			+	AI		
21	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	AI	+	+	+	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	AI	+	+	+	AI	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
22	AI	+			n.i.	+			+	AI			n.i.	n.i.			+	+			+	+			AI	+		
23	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	+	n.i.	+	AI		n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
24	n.i.	+	n.i.	+	+	+	n.i.	+	+	AI	n.i.	+	+	+	n.i.	+	+	AI		+	AI	n.i.	+	+	AI	n.i.	+	+
29	+	+			+	+			+	AI			+	AI			+	+			+	AI			+	AI		
30	n.i.	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	+	+	+	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	AI	+	+	+
33	+	+			+	+			AI	+			+	+			n.i.	n.i.			+	+			+	+		
36	+	+	+	n.i.	+	+	+	n.i.	n.i.	+	+	n.i.	+	AI	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	AI	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
38	+	AI	+	AI	+	n.i.	+	+	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	+	+	+	+	+	n.i.	n.i.	+	+	n.i.	+	+	+	n.i.	+	+
39	n.i.	n.i.			AI	+			n.i.	n.i.			n.i.	AI			n.i.	n.i.			AI	+			+	+		
43	AI	+			+	+			n.i.	n.i.			+	AI			+	+			n.i.	AI			+	AI		
51	+	+			n.i.	+			n.i.	+			+	+			n.i.	n.i.			+	AI			+	+		
53	n.i.	n.i.			+	+			+	+			+	AI			n.i.	n.i.			+	+			+	+		
58	n.i.	+			AI	+			+	+			n.i.	n.i.			+	+			n.i.	n.i.			+	+		
59	n.i.	AI			n.i.	n.i.			+	+			+	AI			+	AI			+	AI			+	+		

P: Plasma

KM r: Knochenmark aus dem rechten Beckenkamm

T: Tumor

KM l: Knochenmark aus dem linken Beckenkamm

Leeres Rechteck: kein Knochenmark vorhanden

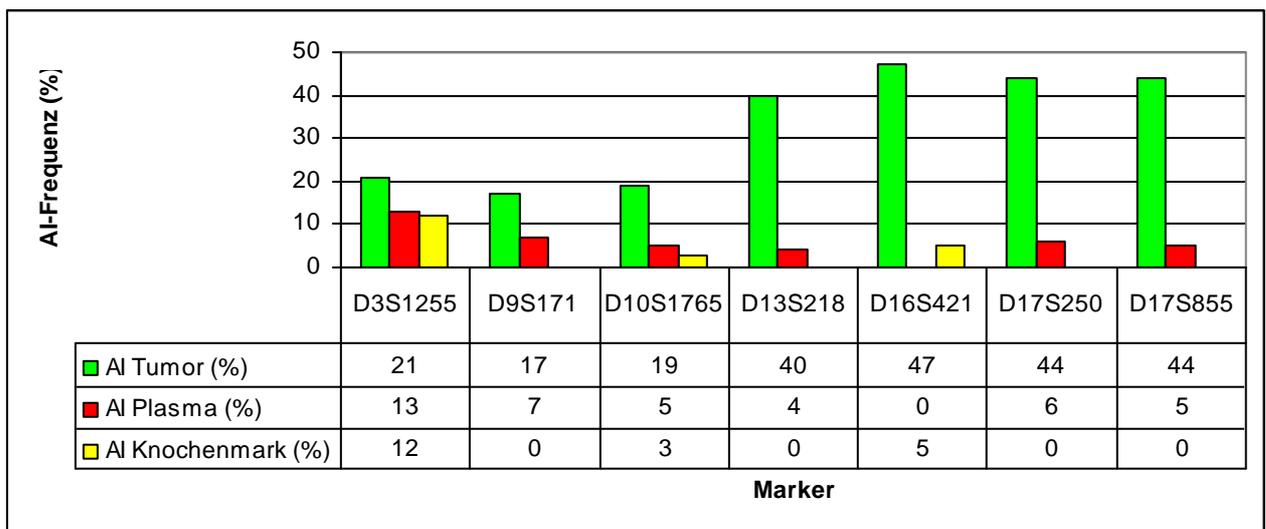


Abb. 16: Darstellung der Unterschiede in der Häufigkeit von AI in Tumor (n=36), Blutplasma (n=120) und Knochenmark (n=21)

4.6 Ergebnisse der Verdünnungsexperimente

Um den relativen Anteil an amplifizierbarer DNA in Plasma bzw. Tumorgewebe zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen angelegt. Proben mit bestätigter AI wurden in absteigender Menge (10; 9,5; 9; 8,5; 8; 6; 4; 2; 0 ng) mit ansteigendem Anteil an Leukozyten-(Wildtyp-)DNA versetzt bis zu einer Gesamtmenge von jeweils 10 ng DNA. Mit den Verdünnungen wurden PCRs durchgeführt und die *AI-Scores* in Graphen eingetragen. Auf der Halbierenden zwischen den beiden Extremen „100 % Leukozyten-DNA“ und „0 % Leukozyten-DNA“ liegt der Punkt, an dem genau gleiche Anteile von amplifizierbarer DNA aus Leukozyten und Primärtumor bzw. Plasma im PCR-Ansatz vorliegen (Abb. 17 und 18). Beispielhaft sind im Folgenden die Ergebnisse von jeweils einer Tumor- bzw. Plasma-Probe dargestellt.

Tumor

Tabelle XVI: Messwerte aus der Verdünnungsreihe der Tumor-DNA von Pat. 16 am Marker D9S171

Anteil Tumor-DNA (%)	AI-Score
0	1,00
20	1,27
40	1,04
60	0,84
80	0,64
85	0,56
90	0,32
95	0,41
100	0,18

An den errechneten *AI-Scores* wird ersichtlich, dass bereits bei einem Anteil von 15-20 % Leukozyten-DNA der Grenzwert von 0,6 nicht mehr erreicht wird und die AI somit verdeckt wird. Die Halbierende schneidet den Graphen bei einem Anteil von ca. 83 % Tumor-DNA im PCR-Ansatz. Es ist somit anzunehmen, dass im Verhältnis zur Leukozyten-DNA ein geringerer Teil der DNA aus Tumorgewebe in der PCR amplifizierbar ist.

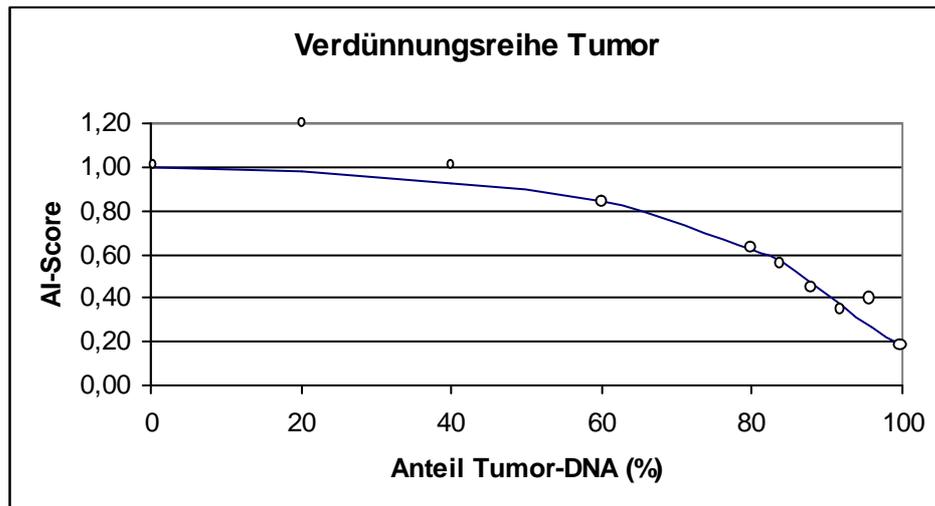


Abb. 17: Darstellung der Messwerte aus der Verdünnungsreihe der Tumor-DNA von Patient 16 am Marker D9S171

Plasma

Tabelle XVII: Messwerte aus der Verdünnungsreihe der Plasma-DNA von Pat. 68 am Marker D9S171

Anteil Plasma-DNA (%)	AI-Score
0	1
20	1,07
40	0,92
60	1,05
80	0,89
85	0,89
90	0,71
95	0,72
100	0,36

In diesem Beispiel liegt die Halbierende zwischen reiner Leukozyten-DNA (1,00) und reiner Plasma-DNA (0,36) bei einem AI-Score von 0,68. In Abb. 18 schneidet die gestrichelte rote Linie den Graphen bei einem Anteil an Plasma-DNA von 95 %. In diesem Fall reichen also 5 % (Wildtyp-) Leukozyten-DNA aus, um das AI im Plasma-Template zu verdecken.

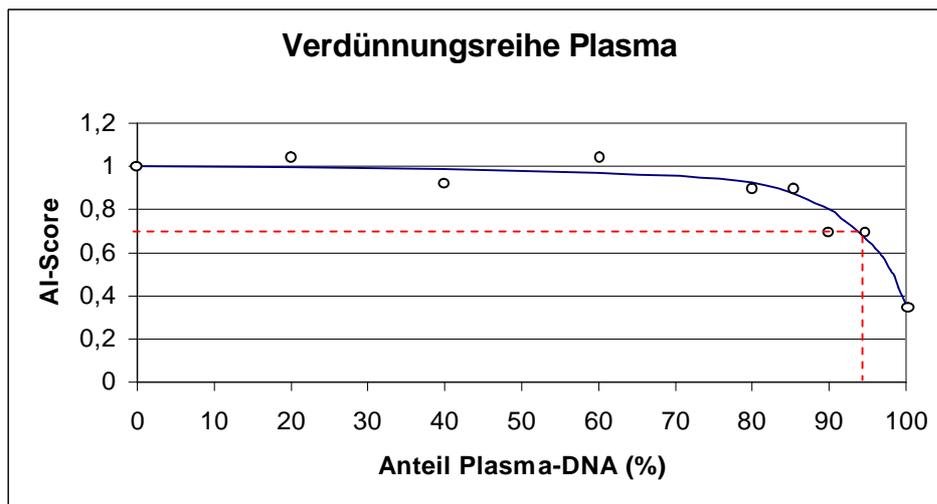


Abb. 18: Darstellung der Messwerte aus der Verdünnungsreihe der Plasma-DNA von Patient 68 am Marker D9S171

4.7 DNA-Gehalt nach Reinigung und Konzentration der DNA-Proben

Nach der Aufarbeitung der DNA-Proben von sechs Patientinnen mit dem Zymo Research Clean & Concentrator-Kit wurde der DNA-Gehalt mit dem NanoDrop bestimmt (Tab. XVIII:). Es wurden zwischen 15 und 68 % (Mittelwert: 33 %) der ursprünglich eingesetzten DNA wieder eluiert. Kurze Fragmente unter 75 bp wurden aus der Probe entfernt.

Tab. XVIII: DNA-Gehalt vor und nach der Entfernung kurzer DNA-Fragmente

NR / Probe	eingesetzte DNA-Menge (ng)	DNA-Menge nach Reinigung (ng)			Anteil (%)
		1. Elution	2. Elution	Gesamt	
2122Q Plasma	892	112	172	284	32
2934Q Plasma	3385	1619	675	2294	68
824Q Plasma	3280	329	364	693	21
148Q Plasma	2344	613	757	977	42
2237P2 Plasma	1278	227	67	294	23
488P2 Plasma	570	72	13	85	15

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen experimentellen Ansatz zur Analyse von tumorassoziierten DNA-Alterationen im Blut von Mammakarzinompatientinnen zu etablieren und auf seine Eignung zur Früherkennung und Prognoseabschätzung des Mammakarzinoms zu untersuchen. Aus tumorbiologischer Sicht wurden vergleichende Analysen der verschiedenen Gewebe der Patientinnen durchgeführt, um Erkenntnisse über die Herkunft der

freien DNA zu erlangen. An klinischem Material standen neben Blut auch Proben aus dem Primärtumor und Knochenmarkplasma zur Verfügung. Die extrahierte DNA von Primärtumor, Blut und Knochenmark wurde in einer Mikrosatelliten-basierten PCR auf allelische Imbalanz, wie *Loss of Heterozygosity* (LOH) und Mikrosatelliteninstabilität (MSI), untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den klinischen Parametern der Patientinnen verglichen und auf ihre klinische Relevanz hin geprüft.

Das Erkennen von Mammakarzinomen in früheren Stadien kann die Sterblichkeit senken (Warren-Burhenne, 2004). Die derzeit in Deutschland gängige Praxis zur Früherkennung des Mammakarzinoms bezieht vor allem die körperliche Untersuchung und die Mammographie, gegebenenfalls ergänzt durch weitere bildgebende Verfahren und Biopsieentnahme, ein. Dennoch ist das Mammakarzinom in Deutschland nach Chronisch ischämischer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und akutem Myokardinfarkt noch immer die vierthäufigste Todesursache der Frau (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2012). Einerseits wird die Möglichkeit zur Vorsorgeuntersuchung nicht von allen in Frage kommenden Frauen in Deutschland wahrgenommen. Andererseits ist aufgrund der hohen Inzidenz des Mammakarzinoms auch die absolute Zahl der in der Vorsorge nicht erkannten Fällen hoch. Trotz einer im Vergleich mit anderen Vorsorgeuntersuchungen befriedigenden relativen Sensitivität und Spezifität ist eine Ergänzung der Untersuchung wünschenswert. Mit der relativ einfachen Probengewinnung durch venöse Punktion könnte eine Analyse von genetischen Alterationen an Mikrosatelliten-DNA, die in der Blutbahn frei zirkulieren, eine solche Ergänzung sein. Eine Blutentnahme wird im Allgemeinen von den Patientinnen gut akzeptiert. Sie ist im Gegensatz zur Biopsieentnahme oder Knochenmarkspunktion komplikationsarm und lässt sich ambulant durchführen. Sie lässt sich im Krankheitsverlauf mehrfach wiederholen und ist somit auch zur Verlaufsbeobachtung geeignet.

Mit dem zunehmenden Verständnis des Mammakarzinoms als systemische Erkrankung und der Entwicklung neuer Operationstechniken wird immer mehr auf radikale Mastektomien und Lymphonodektomien verzichtet. Nach der 8. St.Gallener Konsensuskonferenz erhalten hingegen immer mehr Patientinnen eine adjuvante endokrine oder zytostatische Chemotherapie (Goldhirsch *et al.*, 2003). Gerade bei den nodal-negativen Patientinnen, die in 70 % der Fälle allein durch die lokoregionäre Operation allein geheilt werden, stellt diese Vorgehensweise in den meisten Fällen eine Übertherapie dar (McGuire & Clark, 1992). Mit Hilfe der neuen prognostischen und prädiktiven Faktoren versucht man, insbesondere die

Prognose der nodal-negativen Patientinnen genauer einzuschätzen und die adjuvante systemische Therapie individueller abzustimmen. Zurzeit liegt jedoch nur für wenige Faktoren eine durch klinische Studien wissenschaftlich basierte Evidenz vor (Harris *et al.*, 2007; Pantel *et al.*, 2008; de Boer *et al.*, 2010). Tumorasoziierte Alterationen der zellfreien zirkulierenden DNA im Blutplasma könnten möglicherweise einen solchen Prognosefaktor darstellen.

Erhöhter DNA-Gehalt im Blutplasma

In der vorliegenden Arbeit wurde der DNA-Gehalt im Plasma von Mammakarzinompatientinnen bestimmt und die gemessenen Daten publiziert (Schwarzenbach *et al.*, 2009). Im Vergleich mit gesunden Probandinnen mit einem mittleren DNA-Gehalt von 60 ng/ml ist der DNA-Gehalt im Blut von Mammakarzinompatientinnen mit durchschnittlich 984 ng/ml deutlich erhöht. Es zeigte sich eine Tendenz zu höheren DNA-Spiegeln bei Patientinnen mit nachgewiesener Expression des Her2/neu-Rezeptors; das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Auffällig ist des Weiteren der höhere DNA-Spiegel in Patientinnen mit der Diagnose eines lobulären Karzinoms im Gegensatz zu solchen mit duktalem Karzinom, möglicherweise findet hier ein erhöhter Zellumsatz statt. Ein Unterschied in der Prognose der beiden histologischen Typen besteht nicht (Mersin *et al.*, 2003).

Entsprechend der Beobachtung von Zanetti-Dallenbach (Zanetti-Dallenbach *et al.*, 2007) konnte in der hier vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied der DNA-Konzentration zwischen Patientinnen ohne und solchen mit Metastasen festgestellt werden. Jedoch ist die Anzahl der Patientinnen mit Fernmetastasen in dem hier untersuchten Kollektiv mit 9 im Verhältnis zum Gesamtkollektiv sehr klein. Auch die weiteren zur Verfügung stehenden klinischen Daten ergaben keinen Hinweis auf eine Abhängigkeit mit dem DNA-Spiegel. An einem größeren Kollektiv könnte getestet werden, ob nach der Unterscheidung der Histologie (duktal vs. lobulär) in einem der beiden Teilkollektive ein signifikanter Zusammenhang des DNA-Gehalts mit anderen Prognosefaktoren deutlich wird.

AI in Tumorgewebe und Blutplasma

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Mikrosatelliten-basierte Studien zu allelischer Imbalanz (AI) durchgeführt. Es wurde nach chromosomalen Regionen gesucht, die Tumorsuppressorgene enthalten, deren Verluste für einen bestimmten Tumortypen charakteristisch sind (Dahiya *and* Deng, 1998). Da allelische Imbalanz ein regelmäßiges und

frühes Ereignis in der Entstehung von Tumoren ist, ist es von Interesse, nach solchen Alterationen von Tumorpatienten zu suchen und sie mit den klinischen Parametern zu vergleichen.

In der vorliegenden Arbeit diente Tumorgewebe als Kontrolle für die Auffindung der genetischen Alterationen im Blut. In 72 % der untersuchten Tumorproben wurde an mindestens einem der sieben polymorphischen Marker AI gefunden. Bereits 1999 wurde ein Zusammenhang der Aggressivität des metastasierten Mammakarzinoms mit dem vermehrten Auftreten von LOH im Primärtumor durch selektives Wachstum beschrieben (HAMPL *et al.*, 1999).

Der Marker D16S421 zeigte im Tumorgewebe mit 47 % die höchste Rate an AI im untersuchten Marker-Set, während im Blutplasma keine AI nachzuweisen ist. Der Marker liegt in der chromosomalen Region 16q22-23 in der Nähe des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin (Matsumura *et al.*, 2001), welches eine Rolle in der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) spielt (Andrews *et al.*, 2012). Bei Defekt oder Verlust dieses Gens werden eine Loslösung vom Zellverband und invasives Wachstum mit Metastasierung begünstigt. Der Verlust von E-Cadherin sollte also in fortgeschrittenen Tumoren auftreten. Ein statistischer Zusammenhang von AI in diesem Marker mit bekannten Prognosefaktoren konnte in der hier vorliegenden Arbeit jedoch nicht festgestellt werden. Der Marker D16S421 ist in der Literatur am häufigsten beschrieben worden. Mehrere Labore beschrieben eine hohe Rate von AI an diesem Locus im Tumorgewebe von Brustkrebspatientinnen (Skirnisdottir *et al.*, 1995; Dorion-Bonnet *et al.*, 1995), während im Patientenserum keine einzige AI nachgewiesen werden konnte (Chen *et al.*, 1999b). Auch konnten diese Autoren keine statistischen Abhängigkeiten von AI an diesem Marker mit den klinischen Parametern feststellen. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zum Auftreten von AI am Marker D16S421 wurden also in der hier vorliegenden Untersuchung ergänzt und bestätigt. Es könnte somit sein, dass der Verlust des Markers D16S421 den Genbereich von E-Cadherin nicht tangiert. Aufgrund der hohen AI-Frequenz an diesem Marker könnte die Deletion ein häufiges Brustkrebspezifisches Ereignis sein, das an für Brustkrebs spezifischen fragilen chromosomalen Regionen vorkommt. Im Gegensatz zum Tumorgewebe ist dieser Marker für Untersuchungen in Blutplasma ungeeignet. In der Betrachtung der Heterozygotenrate von nur 60 % fällt auf, dass bei einem großen Teil von Patientinnen zu diesem Marker keine Aussage möglich ist.

Am Marker D3S1255 wurde im untersuchten Kollektiv sowohl im Blut- als auch im Knochenmarkplasma die höchste Rate von AI entdeckt. Im Primärtumor hingegen gehört er zu den weniger betroffenen Loci. In der chromosomalen Region 3p22-25 wird ein Tumorsuppressorgen vermutet, das in der malignen Transformation und der frühen Progression von Mammakarzinomen eine wichtige Rolle spielt (Deng *et al.*, 1996). Der Marker D3S1255 in dieser Region ist meinem Wissen nach noch nicht in der Untersuchung von Mammakarzinompatientinnen angewandt worden. Im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus jedoch steht AI an diesem Marker im Zusammenhang mit lymphogener Streuung (Ogasawara *et al.*, 1995). Eine Korrelation mit klinischen Parametern, insbesondere mit dem Lymphknotenstatus, wurde in der hier vorliegenden Untersuchung nicht festgestellt.

Die chromosomale Region 9p21 weist in 43 % der sporadischen Mammakarzinome AI auf (An *et al.*, 1996). In der hier vorliegenden Studie wurde am Marker D9S171 im Tumorgewebe AI mit 17 % am seltensten entdeckt. Viel versprechend erscheint jedoch der grenzwertig signifikante Zusammenhang von AI an diesem Locus mit einem hohen *Grading* des Primärtumors. Im Blutplasma wurde zwar relativ häufig AI an diesem Marker nachgewiesen, die Korrelation mit dem *Grading* besteht hingegen nicht. Diese Unterschiede zwischen Tumor und Blutplasma entsprechen den bisherigen Studien (An *et al.*, 1996; Schwarzenbach *et al.*, 2007b). Der Marker D9S171 liegt in der Nähe des Tumorsuppressorgenes p16 (INK4A), das für einen Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinase kodiert. Die Inaktivierung dieses Inhibitors führt zu einer erhöhten Zellzyklusrate (Chin *et al.*, 1998), was die Korrelation der Daten aus dem Primärtumor mit dem *Grading* erklären könnte. Überraschender Weise zeigten Patientinnen mit negativem Knochenmarkstatus am Marker D9S171 tendenziell mehr Ereignisse als Patientinnen mit positivem CK-Nachweis.

Der Marker D10S1765, der in der Region des PTEN-Gens (10q23.3) liegt, wurde bisher noch nicht zur Analyse von AI bei Mammatumoren angewendet. In dieser Arbeit wurde also erstmals ein grenzwertig signifikanter Zusammenhang von AI an diesem Locus im Primärtumor mit dem TNM-Stadium gezeigt. Sowohl Patientinnen mit größerem Primärtumor (T2-T4 gegenüber T1) als auch solche mit befallenen Lymphknoten zeigten häufiger Allelverluste in der Region des PTEN-Gens. Sollten sich diese Daten in einem größeren Kollektiv bestätigen, so könnten sie, in Ergänzung zur *Sentinel*-Lymphknotenbiopsie, eine Entscheidungshilfe in der Frage zur Durchführung einer Lymphonodektomie sein. Es wurde

gezeigt, dass das Cowden-Syndrom mit Stammzellmutationen des PTEN-Gens einhergeht (Liaw *et al.*, 1997). Patientinnen und Patienten mit diesem Syndrom haben ein erhöhtes Risiko, im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom zu entwickeln. In sporadischen Mammakarzinomen wurden häufige Allelverluste in der Region des PTEN-Gens beschrieben (Singh *et al.*, 1998), besonders in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung (Bose *et al.*, 1998). Andere Autoren hingegen berichteten, dass Deletionen und Mutationen von PTEN nicht an der Entwicklung des Mammakarzinoms beteiligt sind (Freihoff *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999a). Es wird vermutet, dass ein weiteres, bisher nicht identifiziertes Tumorsuppressorgen in der Region des PTEN-Gens lokalisiert ist (Feilotter *et al.*, 1999).

Das Tumorsuppressorgen BRCA-2, das in der Nähe des Markers D13S218 liegt, gehört zu den Hochrisikogenen für das hereditäre Mammakarzinom. Bei einer funktionseinschränkenden Mutation in der Keimbahn besteht ein ca. fünffach höheres Lebenszeitrisiko, an Brustkrebs zu erkranken. Doch auch in sporadisch auftretenden Fällen von Brustkrebs sind Mutationen an diesem Locus nachweisbar. Allelverluste von BRCA-2 gehen häufig einher mit Allelverlusten von BRCA-1 und p53 und stehen in Beziehung mit einem höheren *Grading* des Tumors (Hanby *et al.*, 2000). Des Weiteren besteht ein signifikanter Zusammenhang mit einer verkürzten Überlebensrate und einer verkürzten metastasenfremen Zeit (Hampl *et al.*, 2004). Mit dem Marker D13S218 wurde in der hier vorliegenden Untersuchung im Primärtumor in 40 % der Fälle AI entdeckt, im Blut jedoch nur in 4 % der Fälle. Eine Korrelation mit den klinischen Parametern der Patientinnen konnte nicht nachgewiesen werden. Dies spiegelt die Ergebnisse einer weiteren Studie wider (Rio *et al.*, 1998). Der Marker D13S218 wurde erstmals 1996 zur Analyse von AI in Mammatumoren verwendet, wo er in zehn von vierzehn informativen Fällen AI anzeigte (Deng *et al.*, 1996). Bei einer Rate von immerhin 29 % homozygoter Fälle könnte eine Ergänzung des Markersets um einen weiteren Marker in dieser chromosomalen Region sinnvoll sein, um über eine größere Anzahl von Patientinnen informative Aussagen zu erhalten.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Zusammenhang von AI am Marker D17S250 im Primärtumor und dem Nachweis des Proliferationsantigens Ki-67 festgestellt. Das nukleäre Molekül KI-67 wird nur in den aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert und kann somit zur Bestimmung der Proliferationsrate des Tumors herangezogen werden (Harbeck *et al.*, 1995). Diese Daten ergänzen die Beobachtung einer Studie, die eine Korrelation von AI an D17S250 und einem hohen Mitoseindex beschrieben (Nagai *et al.*,

1995). Der Marker D17S250 liegt in der Region 17q11.2-12 in der Nähe des Tumorsuppressorgens *Breast Cancer Suppressor Gene* (BCPR), einem Regulator von p53 (O'Connell, 2003). Er wurde bereits 1992 zur Untersuchung von Brustkrebsgewebe verwendet, wo AI in 50 % der Fälle nachgewiesen werden konnte (Futreal *et al.*, 1992). In einer weiteren Studie fanden sich in *In-Situ*-Karzinomen AI an diesem Marker in nur ca. 8 %, so dass ein Zusammenhang mit der Invasivität des Tumors wahrscheinlich sein könnte (Radford *et al.*, 1995).

Seit der Lokalisierung des Gens BRCA1 im Jahre 1994 wurden mehrere Mutationen beschrieben, die in hereditären Mammakarzinomen entdeckt wurden. In der sporadischen Form des Mammakarzinoms scheinen strukturelle Veränderungen des Gens keine Rolle zu spielen, während Allelverluste häufig beschrieben wurden (Yang *and* Lippman, 1999). Zur AI am Marker D17S855 beim Mammakarzinom wurden zahlreiche Untersuchungen veröffentlicht. Die Rate an AI lag zwischen 30 und 50 % in Populationen in westlichen Ländern (Rio *et al.*, 1998; Zekri *et al.*, 1999) während für ein japanisches Kollektiv AI in nur 14 % der Tumoren angegeben wurden (Yamashita *et al.*, 1996). In duktalem *In-Situ*-Karzinomen wurden nur ca. halb so viele Ereignisse wie in invasiven duktalem Karzinomen entdeckt (23 % vs. 42 %), so dass AI an diesem Marker ein eher spätes Ereignis in der Tumorgenese zu sein scheint (Ando *et al.*, 2000). In der hier vorliegenden Arbeit wurde im Tumorgewebe in 44 % und im Blutplasma in 5 % AI festgestellt. Es konnte ein Zusammenhang zwischen AI an diesem Marker im Tumorgewebe und dem *Grading* des Primärtumors entdeckt werden. Die hier dargestellten Daten stützen die Studie von Beckmann (Beckmann *et al.*, 1996), die bereits eine solche Korrelation zeigte. Ein dort ebenfalls entdeckter Zusammenhang mit der Tumorgroße fand sich hier hingegen nicht.

Ein Zusammenhang zwischen AI in der Region 17q12-21 und dem Steroidrezeptor-Status wurde mehrmals beschrieben (Beckmann *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1999b; Nowacka-Zawisza *et al.*, 2006). Im hier untersuchten Kollektiv zeigte die Kombination von AI in den Markern D17S250 und D17S855 eine grenzwertig signifikante Korrelation mit dem Rezeptorstatus. Die Kombination anderer Marker aus dem in dieser Arbeit untersuchten Set ergab keine weiteren Aufschlüsse im Zusammenhang mit den klinischen Parametern der Patientinnen.

An keinem der verwendeten Marker konnte eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich mit der Auswahl der Marker zu erklären: DNA-

Amplifikation, also MSI, treten signifikant häufiger in größeren (tri-, tetra-) Nukleotid-*Repeats* als in Dinukleotid-*Repeats* auf (Mao *et al.*, 1994).

Für die Unterschiede in den Ergebnissen der verschiedenen Studien über AI im Mammakarzinom gibt es verschiedene Erklärungen. Die Patientenkollektive unterschiedlicher geographischer und ethnischer Herkunft sind nicht ohne weiteres zu vergleichen. Präanalytische Faktoren wie Zeitpunkt und Technik der Blutentnahme, Lagerung, Versand und Verarbeitung des Probenmaterials sind nicht einheitlich definiert (Sturgeon *et al.*, 2008). Die verwendeten Techniken zur Isolierung von DNA unterscheiden sich von Labor zu Labor (Fleischhacker *and* Schmidt, 2007). Mit der Verwendung der Kapillarelektrophorese und der fluoreszenzbasierten Detektion der Fragmente ist eine exaktere Bestimmung möglich als mit der herkömmlichen Gelelektrophorese (Canzian *et al.*, 1996). In der Literatur wurden von unterschiedlichen Autoren unterschiedliche Grenzwerte für den AI-Score festgelegt. Sie schwanken von 21 % relativem Allelverlust (Buerger *et al.*, 2000) bis zu 50 % (Dahiya *et al.*, 1997). In einigen Fällen wurde sogar zwischen *High-* und *Low-Level-LOH* unterschieden (Vauhkonen *et al.*, 2005). Für die Berechnung des AI-Scores wurde in einigen Laboren die *Peak-Fläche (area under the curve)* herangezogen, die die relative Menge der DNA-Fragmente repräsentiert (Canzian *et al.*, 1996; Goessl *et al.*, 1998; Buerger *et al.*, 2000), andere Arbeitsgruppen verwenden die *Peak-Höhe* (Farrand *et al.*, 2002, Schwarzenbach *et al.*, 2007b). Und schließlich gelten auch unterschiedliche Bewertungsmaßstäbe: Während viele Autoren Mehrfachmessungen nicht erwähnten, schrieben einige, die Ergebnisse wurden in Kontrollmessungen bestätigt. Andere Autoren ließen bereits ein Ereignis gelten, wenn nur eine von drei Messungen die Grenzen überschritt (Allen *et al.*, 1999). In der hier vorliegenden Untersuchung wurde jedes gefundene Ereignis durch eine unabhängige Zweitmessung bestätigt oder, bei negativem Befund, verworfen. Eine methodenabhängige Schwankungsbreite wurde dabei akzeptiert (siehe Kap. 4.3).

AI im Knochenmarkplasma

Bisher wurde das Vorkommen von zellfreier DNA im Knochenmarkplasma erst in wenigen Veröffentlichungen erwähnt (Taback *et al.*, 2003, Schwarzenbach *et al.*, 2007a; Schwarzenbach *et al.*, 2009). Es wurden jeweils Mikrosatelliten-basierte PCRs durchgeführt. In meinen Untersuchungen wurden nur 5 AI in 199 informativen Fällen im Knochenmark gefunden. Diese Rate von 2,5 % ist geringer als die Rate im Blutplasma (5,6 %). Diese geringe Inzidenz steht im Gegensatz zu den beiden bisher veröffentlichten Studien, die in

Mammakarzinompatientinnen (Taback *et al.*, 2003) und Prostatakarzinompatienten (Schwarzenbach *et al.*, 2007a) jeweils mehr AI im Knochenmark als im Blut gefunden haben. Ebenso konnte die beschriebene Konkordanz von Ereignissen im KM und dem zugehörigen Primärtumor nicht bestätigt werden.

Aufgrund der geringen Rate an AI im Knochenmarkplasma wurde keine Statistik mit den klinischen Parametern durchgeführt. Allerdings gab es die Tendenz, wie schon von Taback (Taback *et al.*, 2003) beobachtet wurde, dass Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus häufiger AI im Knochenmark haben. Sollten sich diese Daten bei der Untersuchung eines größeren Kollektivs bestätigen, so könnten sich daraus Hilfestellungen in der Frage nach der Notwendigkeit einer Erweiterung der lokoregionären Behandlung ergeben. In keinem der Fälle mit AI im Knochenmark wurden disseminierte Tumorzellen im Knochenmark gefunden, ebenso gab es wenig Konkordanz zwischen den Ereignissen des Knochenmarkplasmas und denen des Primärtumors oder Blutplasmas der gleichen Patientin. Hinweise auf die Herkunft der frei zirkulierenden DNA ergaben sich somit nicht.

Geringe Rate an Ereignissen in Blut und Knochenmark

In der hier dargestellten Arbeit konnten, im Gegensatz zum Tumorgewebe mit 72 %, im Blutplasma von nur 19 % der Patientinnen AI gefunden werden. Auch die Zahl der Ereignisse pro Patientin ist geringer als im Tumor. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Angaben in der Literatur: Allelische Imbalanz wird im Blutplasma verschiedener Tumorentitäten im Allgemeinen seltener als im korrespondierenden Tumorgewebe entdeckt (Chen *et al.*, 1999; Coulet *et al.*, 2000; von Knobloch *et al.*, 2002; Schwarzenbach *et al.*, 2007b). Eine statistische Abhängigkeit der AI-Frequenz im Blut von anderen klinischen Parametern wurde in der hier vorliegenden Studie nicht festgestellt, da die Anzahl der entdeckten AI zu niedrig war.

In der hier vorliegenden Arbeit gibt es nur eine geringe Konkordanz der Ereignisse zwischen den verschiedenen Gewebeproben. Ereignisse im Tumorgewebe ließen sich nur selten im Blutplasma nachweisen (3 %). Patientinnen mit AI im Blutplasma wiesen nur in 27 % der Fälle die gleiche Alteration im Primärtumor auf. Über die Konkordanz der genetischen Alterationen in verschiedenen Gewebeproben von Karzinompatienten gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Eine weitgehende Übereinstimmung von AI in Plasma mit AI im Primärtumor wurde z.B. für Kopf- und Hals-Tumoren (Nawroz *et al.*, 1996), das Nicht-

kleinzellige Bronchiolalkarzinom (Bruhn *et al.*, 2000) und Plattenepithelkarzinome des Mund- und Rachenraumes (Hamana *et al.*, 2005) beschrieben. Für das Mammakarzinom gibt es unterschiedliche Beobachtungen: Einige Arbeitsgruppen beschreiben eine hohe Übereinstimmung zwischen AI in Tumor und Plasma (Shaw *et al.*, 2000), während in anderen Studien in 50-100 % der Fälle keine Konkordanz gefunden wurde (Chen *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Eine Erklärung für die geringe Konkordanz zwischen AI in Primärtumor und Plasma kann die Heterogenität des Primärtumors sein (Garcia *et al.*, 2001). Während frühe genetische Alterationen in der Tumorgenese in allen Zellen des Tumors nachweisbar sind, betreffen späte Alterationen nur eine klonale Untergruppe. So kann ein bestimmter Zellklon innerhalb des Primärtumors, der einen Allelverlust an einem bestimmten Marker aufweist, hauptsächlich für die Freisetzung von DNA in die Blutzirkulation verantwortlich sein. Hat dieser Zellklon an der gesamten Tumormasse nur einen geringen Anteil, so ist seine AI im Blutplasma, nicht aber im Tumorgewebe nachweisbar.

Fragmentierter Charakter der zirkulierenden DNA erschwert die Detektion von AI

Die Identifizierung von AI ist oft durch geringe DNA-Qualität und -Quantität eingeschränkt (Müller *et al.*, 2008). So können bereits geringe Mengen Wildtyp-DNA eine tumorassoziierte AI überdecken, andererseits können bei geringen Mengen eingesetzter DNA artifizielle Ereignisse entstehen. Im Folgenden werden Ansätze diskutiert, die Detektionsrate an AI zu erhöhen und somit Abhängigkeiten von klinischen Parametern genauer zu bestimmen.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Verdünnungsreihe zeigt, dass bereits ein Anteil von nur ca. 5 % Wildtyp-DNA im Analyseansatz eine zuvor gesicherte AI im Blutplasma überdecken kann. Die Herkunft der frei zirkulierenden DNA ist heterogen, so dass auch in Tumorpatienten Anteile von Wildtyp-DNA im Plasma vorkommen können und somit die Tumor-assoziierten Alterationen verdecken können (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Es wurde gezeigt, dass der Anteil an Tumor-DNA in der frei zirkulierenden DNA in verschiedenen Tumorentitäten von unter 3 % bis über 90 % variieren kann (Jahr *et al.*, 2001). In kolorektalen Tumoren wurde der Anteil auf nur 8-11 % geschätzt (Diehl *et al.*, 2005). In der Literatur ist der fragmentierte Charakter der frei zirkulierenden DNA beschrieben worden. Es finden sich sowohl Fragmente einer Länge von 180 bp oder einem Vielfachen davon, die bei der Apoptose entstehen, als auch Fragmente, die mit einer Länge von 10.000 bp für eine Freisetzung aus nekrotischen Zellen sprechen (Jahr *et al.*, 2001; Stroun *et al.*, 2001). Die freigesetzte DNA wird von Makrophagen weiter degradiert und über Leber und Nieren

ausgeschieden, so dass ihre Halbwertszeit im Serum auf 15 min. bis mehrere Stunden angegeben wird (Lo *et al.*, 1999; Fleischhacker *and* Schmidt, 2007). Für verschiedene Tumorentitäten wurde ein Längenunterschied der Fragmente aus normalen und tumorös entarteten Zellen beschrieben (Giacona *et al.*, 1998; Diehl *et al.*, 2005). Die DNA aus Tumorzellen ist in der Regel stärker degradiert und liegt somit in kürzeren Fragmenten vor. Neueste Veröffentlichungen zeigen eine höhere Rate an detektierten AI in den kürzeren DNA-Anteilen nach Fraktionierung der Plasma-DNA in lange und kurze Fragmente (Schwarzenbach *et al.*, 2012). Insofern sollten auch die verwendeten Primer darauf abgestimmt werden, möglichst kurze PCR-Amplicons zu produzieren. In einer Studie wird eine Länge von 120 bp für die PCR-Produkte vorgeschlagen (Mayall *et al.*, 1999), in einer weiteren Arbeitsgruppe wurden Primer für ca. 100 bp-Amplicons verwendet (Diehl *et al.*, 2005). Die aufwändigere Untersuchung von SNPs könnte hier gegenüber den längeren Mikrosatelliten Vorteile haben (Shaw *et al.*, 2012).

In der Vorliegenden Studie traten in der Analyse von Plasma-DNA gegenüber Leukozyten- oder Tumor-DNA Schwankungen auf, die gelegentlich zu uneindeutigen Ergebnissen und somit zur Verwerfung des Ergebnisses als „nicht informativ“ führten. In der Literatur ist das Auftreten von Fehlmessungen beim Einsatz von geringen *Template*-Mengen beschrieben (Chen *et al.*, 1999b; Coulet *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2001; Farrand *et al.*, 2002). In der Studie von Farrand (Farrand *et al.*, 2002) wird beschrieben, dass bei einem Einsatz von unter 600 pg amplifizierbarer Wildtyp-DNA artifizielle AI auftreten können. In der klassischen Gelelektrophorese wurde das Auftreten artifizieller Allelverluste bereits bei einer eingesetzten DNA-Menge von 5 ng Wildtyp-DNA gezeigt (Chen *et al.*, 1999b). In der hier vorliegenden Studie wurde die im PCR-Ansatz eingesetzte Menge an DNA photometrisch bestimmt, jedoch finden sich hier im *Template* auch kurze DNA-Fragmente, die nicht in der PCR amplifiziert werden können. Exemplarisch wurden in sechs Plasmaproben in einem weiteren Reinigungsschritt die längeren DNA-Fragmente aufkonzentriert, Fragmente kleiner als 75 bp wurden aus der Probe entfernt. Von der eingesetzten DNA-Menge wurden durchschnittlich lediglich 33 % zurückerhalten. Um in Zukunft die Schwankungsbreite durch zu wenig *Template* zu verringern, ist also die Feststellung der Menge an tatsächlich amplifizierbarer DNA sinnvoll. Neben der Entfernung zu kurzer DNA-Fragmente wäre auch die Durchführung einer quantitativen PCR möglich (Zanetti-Dallenbach *et al.*, 2007).

Zusammenfassend zeigen die hier vorliegenden Daten, dass es grundsätzlich möglich ist, im Blut und Knochenmark AI zu detektieren. Jedoch sollte die Extraktionsmethode verbessert werden, um die Frequenz an detektierbaren AI zu erhöhen sowie ihre Qualität zu verbessern.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es zu testen, ob ein Zusammenhang von AI im Blut von Mammakarzinompatientinnen mit etablierten Prognosefaktoren besteht und ob frei zirkulierende DNA als unabhängiger Prognosefaktor dienen kann. Durch Vergleich tumorspezifischer Alterationen dieser DNA mit dem Primärtumor sollten nähere Informationen über ihre Herkunft gewonnen werden.

Untersucht wurde das Blutplasma von 120 Patientinnen mit Mammakarzinom. In 36 Fällen stand zusätzlich korrespondierendes Tumorgewebe, in 21 Fällen auch Knochenmark (KM) zur Verfügung. Nach Extraktion und Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgten PCR-basierte Mikrosatellitenanalysen zum Nachweis von AI in 7 polymorphen Markern (D3S1255, D9S171, D10S1765, D13S218, D16S421, D17S250, D17S855). Die gewonnenen Daten wurden mit den bekannten klinischen Parametern (Alter, Histologie, *Staging*, *Grading*, disseminierte Tumorzellen, Hormonrezepterstatus, Expression von Her2/neu und Ki-67) verglichen. Zur Feststellung der Qualität der frei zirkulierenden DNA wurden bei ausgewählten Proben ein Verdünnungsversuch sowie ein zusätzlicher Reinigungsschritt durchgeführt.

Der DNA-Gehalt im Blutplasma der Patientinnen ist mit durchschnittlich 984 ng/ml gegenüber gesunden Probanden deutlich erhöht. Die Rate an AI aller Analysen liegt im Tumorgewebe bei 32 %, im Blutplasma bei 5,6 %, im KM-Plasma bei 2,5 %. Im Tumorgewebe ist der Marker D16S421, der in der Nähe des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin liegt, mit 47 % am häufigsten betroffen, im Blutplasma hingegen der Marker D3S1255 (13 %). Es besteht keine Konkordanz zwischen AI im Blutplasma, KM-Plasma und dem Primärtumor der Patientin. In 72 % der Tumorproben findet sich AI an mindestens einem Marker. Für DNA aus dem Primärtumor zeigten sich signifikante Zusammenhänge von AI am Marker D17S855 (chromosomale Region BRCA1) mit einem hohen *Grading* bzw. AI am Marker D17S250 (BRCA1 und BCPR) mit der KI-67-Expression. Zwischen dem Auftreten von AI im Blut- oder KM-Plasma und den klinischen Parametern findet sich kein signifikanter Zusammenhang.

Die hier vorliegende Studie zeigt die grundsätzliche Möglichkeit der Entdeckung von AI in der frei zirkulierenden DNA im Blut von Mammakarzinompatientinnen. Grenzen finden sich

in der niedrigen Detektionsrate an Alterationen, die mit dem fragmentierten Charakter der zellfreien DNA zusammenhängen könnte. Verbesserte und erweiterte Methoden, wie z.B. die Fraktionierung der Plasma-DNA in kurze und lange Moleküle, werden derzeit etabliert und geprüft.

7 Abkürzungen und Fremdwörter

Abb.	Abbildung
AI	<i>allelic imbalance</i> , allelische Imbalanz
ALG	<i>apoptosis linked gene</i>
<i>annealing</i>	Bindung von Primern an das <i>template</i>
b.p.	Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer susceptibility gene</i>
Bzw.	beziehungsweise
CA 15-3	Tumormarker des Mammakarzinoms
CEA	Karzino-Embryonales Antigen, Tumormarker
CK	<i>cytokeratine</i> , Zytokeratin
Cy3	Indocarbocyanin, oranger Fluoreszenzfarbstoff
DCIS	duktales Carcinoma in situ
Denaturierung	Auftrennung der DNA-Doppelhelix in die Einzelstränge
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTC	<i>disseminated tumor cell</i> , disseminierte Tumorzelle
FE	Fluoreszenzeinheit
gDNA	genomische DNA
Gen	Abschnitt auf der DNA, der für ein Protein kodiert
H/E	Hämatoxylin/Eosin, Farbstoffe zur Färbung histologischer Präparate
KM	Knochenmark
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LOH	<i>loss of heterozygosity</i> , Allelverlust
µg	Mikrogramm
ml	Mililiter
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
M.W.	Mittelwert
n.i.	nicht informativ
o.g.	oben genannt
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
Primer	Oligonukleotid, das bei einer PCR spezifisch an die zu amplifizierende Sequenz bindet
rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
sek.	Sekunde
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
s.o.	siehe oben
<i>template</i>	DNA, die bei einer PCR als Vorlage zur Amplifikation dient
TSG	Tumorsuppressorgen
Tube	Eppendorf-Reaktionsgefäß
u.a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

8 Literaturverzeichnis

- An, H. X., D. Niederacher, et al. (1996). "Frequent allele loss on 9p21-22 defines a smallest common region in the vicinity of the CDKN2 gene in sporadic breast cancer." Genes Chromosomes Cancer **17**(1): 14-20.
- Ando, Y., H. Iwase, et al. (2000). "Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast." Cancer Lett **156**(2): 207-14.
- Andrews JL, AC Kim, et al. (2012). "The role and function of cadherins in the mammary gland." Breas Cancer Res. 14(1): 203.
- Anker, P., H. Mulcahy, et al. (1999). "Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients." Cancer Metastasis Rev **18**(1): 65-73.
- Beckmann, M. W., F. Picard, et al. (1996). "Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer." Br J Cancer **73**(10): 1220-6.
- Böcker, W. and K.-D. Kunze (2001). Mamma. München, Jena, Urban und Fischer.
- De Boer, M, J.A. van Dijck, et al. (2010). "Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastasis." J Natl cancer Inst **102**(6): 410-25.
- Bose, S., S. I. Wang, et al. (1998). "Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas." Oncogene **17**(1): 123-7.
- Braun, S., K. Pantel, et al. (2000). "Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer." N Engl J Med **342**(8): 525-33.
- Braun, S., F. D. Vogl, et al. (2005). "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer." N Engl J Med **353**(8): 793-802.
- Bruhn, N., T. Beinert, et al. (2000). "Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer." Ann N Y Acad Sci **906**: 72-82.
- Buerger, H., F. Gebhardt, et al. (2000). "Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression." Cancer Res **60**(4): 854-7.
- Canzian, F., R. Salovaara, et al. (1996). "Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors." Cancer Res **56**(14): 3331-7.
- Catarino, R, MM Ferreira et al. (2008). "Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer." DNA Cell Biol 27(8): 415-421
- Chen, S. T., S. Y. Yu, et al. (1999a). "Mutation analysis of the putative tumor suppression gene PTEN/MMAC1 in sporadic breast cancer." Breast Cancer Res Treat **55**(1): 85-9.

- Chen, X., H. Bonnefoi, et al. (1999b). "Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer." Clin Cancer Res **5**(9): 2297-303.
- Chin, L., G. Merlino, et al. (1998). "Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box." Genes Dev **12**(22): 3467-81.
- Chun, F. K., I. Muller, et al. (2006). "Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer." BJU Int **98**(3): 544-8.
- Clarke, M., R. Collins et al. (2005). "Effect of radiotherapie and of differences in the extend of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." Lancet **366**(9503): 2087-106.
- Colditz, G.A., B. Rosner (2000). "Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses Health´ Study." Am J Epidemiol. **152**(10): 950-64
- Coulet, F., H. Blons, et al. (2000). "Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis." Cancer Res **60**(3): 707-11.
- Dabbs, DJ, Klein ME et al., 2011. "High false-negative rate of Her2 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the Oncotype DX test: an independent quality assurance study." J Clin Oncology **29**(32): 4279-85.
- Dahiya, R. and G. Deng (1998). "Molecular prognostic markers in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **52**(1-3): 185-200.
- Dahiya, R., J. McCarville, et al. (1997). "Chromosome 3p24-26 and 3p22-12 loss in human prostatic adenocarcinoma." Int J Cancer **71**(1): 20-5.
- Deng, G., Y. Lu, et al. (1996). "Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas." Science **274**(5295): 2057-9.
- Dettmar, P., N. Harbeck, et al. (1997). "Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB1 (Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer." Br J Cancer **75**(10): 1525-33.
- de Vos, S., C. W. Miller, et al. (1995). "Alterations of CDKN2 (p16) in non-small cell lung cancer." Genes Chromosomes Cancer **14**(3): 164-70.
- Diehl, F., M. Li, et al. (2005). "Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16368-73.
- Dorion-Bonnet, F., S. Mautalen, et al. (1995). "Allelic imbalance study of 16q in human primary breast carcinomas using microsatellite markers." Genes Chromosomes Cancer **14**(3): 171-81.
- Edge, S.B., D.R. Byrd (2010). Cancer staging manual 7. Auflage. Springer-Verlag, New York: 347-377.

- Elston, C. W. and I. O. Ellis (1991). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." Histopathology **19**(5): 403-10.
- Emmert-Buck, M. R., R. F. Bonner, et al. (1996). "Laser capture microdissection." Science **274**(5289): 998-1001.
- Esteller, M., M. Sanchez-Cespedes, et al. (1999). "Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients." Cancer Res **59**(1): 67-70.
- Farrand, K., L. Jovanovic, et al. (2002). "Loss of heterozygosity studies revisited: prior quantification of the amplifiable DNA content of archival samples improves efficiency and reliability." J Mol Diagn **4**(3): 150-8.
- Feilotter, H. E., V. Coulon, et al. (1999). "Analysis of the 10q23 chromosomal region and the PTEN gene in human sporadic breast carcinoma." Br J Cancer **79**(5-6): 718-23.
- Fisher, B., J. H. Jeong, et al. (2002). "Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation." N Engl J Med **347**(8): 567-75.
- Fitzgibbons, P.L., D.L. Page et al. (2000). "Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999." Arch Pathol Lab Med **174**(7): 966-78.
- Fleischhacker, M. and B. Schmidt (2007). "Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey." Biochim Biophys Acta **1775**(1): 181-232.
- Freihoff, D., A. Kempe, et al. (1999). "Exclusion of a major role for the PTEN tumour-suppressor gene in breast carcinomas." Br J Cancer **79**(5-6): 754-8.
- Futreal, P. A., P. Soderkvist, et al. (1992). "Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms." Cancer Res **52**(9): 2624-7.
- Garcia, J. M., J. M. Silva, et al. (1999). "Allelic loss of the PTEN region (10q23) in breast cancers of poor pathophenotype." Breast cancer res treat **57**(3): 237-43.
- Garcia, J. M., J. M. Silva, et al. (2001). "Heterogeneous tumor clones as an explanation of discordance between plasma DNA and tumor DNA alterations." Genes Chromosomes Cancer **31**(3): 300-1.
- Giacona, M. B., G. C. Ruben, et al. (1998). "Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls." Pancreas **17**(1): 89-97.
- Goessl, C., R. Heicappell, et al. (1998). "Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma." Cancer Res **58**(20): 4728-32.
- Goldhirsch, A., W. C. Wood, et al. (2003). "Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer." J Clin Oncol **21**(17): 3357-65.

- Goldhirsch, A., W. C. Wood, et al. (2007). "Progress and promise: Highlights of the international experts consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007." Ann Oncol 18(7): 1133-44.
- Goldhirsch, A., W. C. Wood, et al. (2011). "Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the international experts consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007." Ann Oncol 22(8): 1736-47.
- Greil R (2008). "Is chemoendocrine treatment without alternative?" Breast Care 3(4) 231-235.
- Hamada, H. and T. Kakunaga (1982). "Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome." Nature 298(5872): 396-8.
- Hamana, K., K. Uzawa, et al. (2005). "Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma." Br J Cancer 92(12): 2181-4.
- Hampl, J. A., M. Hampl, et al. (1999). "Loss of heterozygosity accumulation in primary breast carcinomas and additionally in corresponding distant metastases is associated with poor outcome." Clin. Cancer Res. 5: 1417-25
- Hampl, J. A., M. Hampl, et al. (2004). "Loss of BRCA2 correlates with reduced long-term survival of sporadic breast cancer patients." Anticancer Res 24(1): 281-90.
- Hanby, A. M., D. P. Kelsell, et al. (2000). "Association between loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 and morphological attributes of sporadic breast cancer." Int J Cancer 88(2): 204-8.
- Harbeck, N., P. Dettmar, et al. (1995). "[Prognostic significance of the S-phase and MIB1 (Ki-67) proliferation parameters in node-negative breast carcinoma]." Gynakol Geburtshilfliche Rundsch 35 Suppl 1: 142-7.
- Harbeck N, Eiermann W, et al. (2003). "Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom. In: Manual Mammakarzinome, München T (ed) pp. 67-71. Zuckerschwerdt Verlag: München
- Harris, L., H. Fritsche 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(33): 5287-312.
- Heywang-Köbrunner, S.H., J. Nährig et al. (2008). "Mammographie-Screening." Der Pathologe 29(2): 163-167.
- Jahr, S., H. Hentze, et al. (2001). "DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells." Cancer Res 61(4): 1659-65.
- Jänicke F. 2002. Prognostische und prädiktive Faktoren bei Patientinnen mit Mammakarzinom. In: Management des Mammakarzinoms, Kreienberg R, Volm T, Möbius V & Alt D (eds), 2. Auflage. pp. 144-159. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York

Knauer, M., S. Mook et al. (2010). "The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer." Breast Cancer Res Treat 120: 655-661.

Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. (2012). "Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms." Berlin [Online im Internet.] URL: www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OL_I_Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf.

Leon, S. A., A. Green, et al. (1975). "Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA." J Immunol Methods 9(2): 157-64.

Leon, S. A., B. Shapiro, et al. (1977). "Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy." Cancer Res 37(3): 646-50.

Li, C.L., D.J. Uribe et al. (2005). "Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer." Br J Cancer 93(9): 1046-52.

Liaw, D., D. J. Marsh, et al. (1997). "Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome." Nat Genet 16(1): 64-7.

Lichy, JH., Dalbague, F., et al. (2000) "Genetic heterogeneity in ductal carcinoma of the breast." Lab Invest 80: 291-301.

Litt, M. and J. A. Luty (1989). "A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene." Am J Hum Genet 44(3): 397-401.

Lo, Y. M., J. Zhang, et al. (1999). "Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma." Am J Hum Genet 64(1): 218-24.

Mabry, H. and A.E. Giuliano (2007). "Sentinel node mapping for breast cancer: progress to date and prospects for the future." Surg Oncol Clin N Am. 16(1): 55-70.

Maehama, T. (2007). "PTEN: its deregulation and tumorigenesis." Biol Pharm Bull 30(9): 1624-7.

Mandel, P., P. Metais (1948). "Les acides nucléiques du plasma sanguine chez l'homme." C R Seances Soc Biol Fil 142(3-4): 241-3.

Mao, L., D. J. Lee, et al. (1994). "Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer." Proc Natl Acad Sci U S A 91(21): 9871-5.

Matsumura t, R Makine et al. (2001). "Frequent down-regulation of E-cadherin by genetic and epigenetic changes in the malignant progression of hepatocellular carcinomas." Clin Cancer Res. 7(3): 594-9.

Mayall, F., S. Fairweather, et al. (1999). "Microsatellite abnormalities in plasma of patients with breast carcinoma: concordance with the primary tumour." J Clin Pathol 52(5): 363-6.

- McGuire, W. L. and G. M. Clark (1992). "Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer." N Engl J Med **326**(26): 1756-61.
- McMasters, K. M., T. M. Tuttle, et al. (2000). "Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: a suitable alternative to routine axillary dissection in multi-institutional practice when optimal technique is used." J Clin Oncol **18**(13): 2560-6.
- Mersin, H., E. Yildirim, et al. (2003). "Is invasive lobular carcinoma different from invasive ductal carcinoma?" Eur J Surg. Oncol. **29**(4): 390-5.
- Moll, U. M., A. G. Ostermeyer, et al. (1995). "p53 mediated tumor cell response to chemotherapeutic DNA damage: a preliminary study in matched pairs of breast cancer biopsies." Hum Pathol **26**(12): 1293-301.
- Muller, I., C. Beeger, et al. (2008). "Identification of loss of heterozygosity on circulating free DNA in peripheral blood of prostate cancer patients: potential and technical improvements." Clin Chem **54**(4): 688-96.
- Nagai, M. A., A. C. Medeiros, et al. (1995). "Five distinct deleted regions on chromosome 17 defining different subsets of human primary breast tumors." Oncology **52**(6): 448-53.
- Nawroz, H., W. Koch, et al. (1996). "Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients." Nat Med **2**(9): 1035-7.
- Nowacka-Zawisza, M., M. Brys, et al. (2007). "Genetic instability in the RAD51 and BRCA1 regions in breast cancer." Cell Mol Biol Lett **12**(2): 192-205.
- O'Connell, P. (2003). "Genetic and cytogenetic analyses of breast cancer yield different perspectives of a complex disease." Breast Cancer Res Treat **78**(3): 347-57.
- Ogasawara, S., C. Maesawa, et al. (1995). "Frequent microsatellite alterations on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma." Cancer Res **55**(4): 891-4.
- Paik, S., G. Tang et al. (2006). « Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer." J Clin Oncol **24**: 3726-3734.
- Pantel, K., R. J. Cote, et al. (1999). "Detection and clinical importance of micrometastatic disease." J Natl Cancer Inst **91**(13): 1113-24.
- Pantel, K., V. Muller, et al. (2003). "Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer." Clin Cancer Res **9**(17): 6326-34.
- Pantel, K. and R. H. Brakenhoff (2004). "Dissecting the metastatic cascade." Nat Rev Cancer **4**(6): 448-56.
- Pantel, K. R. H. Brakenhoff et al. (2008). "Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells." Nat Rev Cancer **8**(5): 329-40.
- Perry, N. M. Broeders et al. (2008). "European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition – summary document." Ann Oncol. **19**(4): 614-22.

Pesche, S., A. Latil, et al. (1998). "PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers." Oncogene **16**(22): 2879-83.

Radford, D. M., K. L. Fair, et al. (1995a). "Allelotyping of ductal carcinoma in situ of the breast: deletion of loci on 8p, 13q, 16q, 17p and 17q." Cancer Res **55**(15): 3399-405.

Radford, D. M., N. J. Phillips, et al. (1995b). "Allelic loss and the progression of breast cancer." Cancer Res **55**(22): 5180-3.

Rio, P. G., D. Pernin, et al. (1998). "Loss of heterozygosity of BRCA1, BRCA2 and ATM genes in sporadic invasive ductal breast carcinoma." Int J Oncol **13**(4): 849-53.

Runnebaum, ID and D. Emmerich (2002). Familiäres Mammakarzinom - Beratung und Betreuung betroffener Familien. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.

Sabel, M.S. (2010). "Lobular carcinoma in situ." Up To Date online 18.1, <http://www.uptodate.com>, 01/2010.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.

Schmidt-Matthiesen H, Bastert G., Wallwiener D (2002). Vorsorgeuntersuchung. Stuttgart, New York, Schattauer.

Schwarzenbach, H., F. K. Chun, et al. (2007a). "Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer." Int J Cancer **120**(7): 1465-71.

Schwarzenbach, H., V. Muller, et al. (2007b). "A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer." Breast Cancer Res **9**(5): R66.

Schwarzenbach, H., K. Pantel, et al. (2009). "Comparative evaluation of cell-free tumor DNA in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer." Breast Cancer Res **11**: R71.

Schwarzenbach, H., DS Hoon, et al. (2011). "Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients." Nat Rev Cancer **11**(6): 426-37.

Schwarzenbach, C. Eichelsner et al. (2012). "Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression" Clin Cancer Res **18**(20): 5719-30.

Shaw, J. A., B. M. Smith, et al. (2000). "Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients." Clin Cancer Res **6**(3): 1119-24

Shaw, J. A., K. Page, et al. (2012). "Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy." Genome Res **22**(2): 220-31.

Silva, J. M., G. Dominguez, et al. (1999a). "Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations." Cancer Res **59**(13): 3251-6.

- Silva, J. M., R. Gonzalez, et al. (1999b). "Loss of heterozygosity in BRCA1 and BRCA2 markers and high-grade malignancy in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **53**(1): 9-17.
- Silva, J. M., J. Silva, et al. (2002). "Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival." Clin Cancer Res **8**(12): 3761-6.
- Singh, B., M. M. Ittmann, et al. (1998). "Sporadic breast cancers exhibit loss of heterozygosity on chromosome segment 10q23 close to the Cowden disease locus." Genes Chromosomes Cancer **21**(2): 166-71.
- Skirnisdottir, S., G. Eiriksdottir, et al. (1995). "High frequency of allelic imbalance at chromosome region 16q22-23 in human breast cancer: correlation with high PgR and low S phase." Int J Cancer **64**(2): 112-6.
- Slamon, D. and M. Pegram (2001). "Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials." Semin Oncol **28**(1 Suppl 3): 13-9.
- Slightom, J. L., A. E. Blechl, et al. (1980). "Human fetal G gamma- and A gamma-globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes." Cell **21**(3): 627-38.
- Sorenson, G. D., D. M. Pribish, et al. (1994). "Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **3**(1): 67-71.
- Statistisches Bundesamt Deutschland (2012) "Todesursachen in Deutschland 2011"
- Straub, J., I. Rühl, et al. (2004). Hereditäres Mammakarzinom. München, Wien, New York, Zuckschwerdt Verlag.
- Stroun, M., P. Anker, et al. (1987). "Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients." Eur J Cancer Clin Oncol **23**(6): 707-12.
- Stroun, M., P. Anker, et al. (1989). "Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients." Oncology **46**(5): 318-22.
- Stroun, M., J. Lyautey, et al. (2001). "About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release." Clin Chem Acta **313**: 139-42
- Sturgeon, CM., BR Hoffman et al. (2008). "Use of tumor markers in clinical practice: quality requirements." Clin Chem. **54**(8): e1-e10
- Swaminathan, R, and Butt, AN (2006). "Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments." Ann N Y Acad. Sci **1075**: 1-9
- Taback, B., A. E. Giuliano, et al. (2003). "Detection of tumor-specific genetic alterations in bone marrow from early-stage breast cancer patients." Cancer Res **63**(8): 1884-7.
- Takeuchi, S., C. R. Bartram, et al. (1995). "Analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 genes in acute lymphoblastic leukemia of childhood." Blood **86**(2): 755-60.

Thomssen, C. and N. Harbeck (2004). Praxisrelevante und Evidenz-basierte prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom. München, Wien, New York, Zuckschwerdt Verlag.

Thomssen, C. and F. Janicke (2000). "Do we need better prognostic factors in node-negative breast cancer? Pro." Eur J Cancer **36**(3): 293-8.

Umetani, N., S. Hiramatsu, et al. (2006). "Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation." Ann N Y Acad Sci **1075**: 299-307.

Vauhkonen, M., H. Vauhkonen, et al. (2005). "Differences in genomic instability between intestinal- and diffuse-type gastric cancer." Gastric Cancer **8**(4): 238-44.

Veronesi, U., N. Cascinelli, et al. (2002). "Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer." N Engl J Med **347**(16): 1227-32.

von Knobloch, R., A. Hegele, et al. (2002). "High frequency of serum DNA alterations in renal cell carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis." Int J Cancer **98**(6): 889-94.

Wang, Q., P. S. Larson, et al. (2003). "Loss of heterozygosity in serial plasma DNA samples during follow-up of women with breast cancer." Int J Cancer **106**(6): 923-9.

Warren-Burhenne, L. (2004). Mammographie-Screening - Internationaler Standard. München, Zuckschwerdt Verlag.

Weber, J. L. and P. E. May (1989). "Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction." Am J Hum Genet **44**(3): 388-96.

Weissenbach, J., G. Gyapay, et al. (1992). "A second-generation linkage map of the human genome." Nature **359**(6398): 794-801.

Woelfle, U., J. Cloos et al. (2003). "Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer." Cancer Res. **63**(18): 5679-84.

Yamashita, T., H. Iwase, et al. (1996). "Low Frequency Loss of Heterozygosity in the BRCA1 Region in Japanese Sporadic Breast Cancer." Breast Cancer **3**(3): 167-172.

Yang, X. and M. E. Lippman (1999). "BRCA1 and BRCA2 in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **54**(1): 1-10.

Yoshida, K. and Y. Miki (2004). "Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage." Cancer Sci **95**(11): 866-71.

Zanetti-Dallenbach, R. A., S. Schmid, et al. (2007). "Levels of circulating cell-free serum DNA in benign and malignant breast lesions." Int J Biol Markers **22**(2): 95-9.

Zekri, A. R., A. A. Bahnassi, et al. (1999). "Allelic instability as a predictor of survival in Egyptian breast cancer patients." Int J Oncol **15**(4): 757-67.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei Frau PD Dr. phil. II Heidi Schwarzenbach für ihre exzellente Betreuung bedanken. Sie überließ mir das interessante Thema dieser Arbeit und unterstützte mich uneingeschränkt in dessen Bearbeitung.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pantel möchte ich danken für die Möglichkeit, an seinem Institut diese Arbeit durchzuführen, sowie für die ständige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Kasimir-Bauer (Universitätsklinikum Essen) sowie Herrn Prof. Dr. med. Volkmar Müller (Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf) danke ich für das Überlassen der Blutproben und der klinischen Patientendaten.

Ein großer Dank geht des Weiteren an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Tumorbiologie für deren ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Insbesondere danke ich hier Frau Antje Andreas für die geduldige Anleitung in meinen Anfangstagen der Laborarbeit.

Mein letzter großer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die uneingeschränkte Unterstützung und Aufmunterung während der gesamten Zeit meiner Promotion.

10 Lebenslauf

Vornamen, Name: Cord Wilhelm Beeger
Geburtsdatum: 03.12.1978
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet

Beruflicher Werdegang:

Seit 04/2011 Assistenzarzt im AK Altona (Hamburg), II.
Medizinische Abteilung (Hämatologie und
Onkologie
01/2008 bis 03/2011 Assistenzarzt im Städtischen Klinikum
Braunschweig, Medizinische Klinik I
(Gastroenterologie, Diabetologie, Endokrinologie)
Rotationen in die Hämatologie und Onkologie,
interdisziplinäre Notaufnahmestation,
Medizinisch-Neurologische Intensivstation

Hochschulausbildung

28. April 2007 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/1999 Beginn des Studiums der Medizin an der
Universität Hamburg

Veröffentlichungen als Co-Autor

Schwarzenbach, H. et al., 2009. „Comparative evaluation of cell-free tumor DNA in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer.“ (Breast Cancer Res.)
Müller, I. et al., 2008. „Identification of loss of heterozygosity on circulating free DNA in peripheral blood of prostate cancer patients: Potential and technical improvements.“ (Clin. Chem.)
Schwarzenbach, H. 2007. „A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer.“ (Breast Cancer Res.)

Zivildienst

10/1998 – 10/1999: Tagesförderung für Behinderte, evangelische
Stiftung „Das Rauhe Haus“ in Hamburg

Schulausbildung

08/1988 – 05/1998 Corvey-Gymnasium Hamburg
07/1984 - 06/1988 Grundschule Vizelinstraße Hamburg

11 Eidesstattliche Erklärung

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: