

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. K. Pantel

Doktorvater: Prof. Dr. med. K. Pantel
Wissenschaftliche Betreuung: Dr. S. Joosse

Zirkulierende Tumorzellen bei Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebspatientinnen in verschiedenen klinischen Stadien

Dissertation

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

vorgelegt von:

Sven-Erik Sönksen

aus Hamburg

Hamburg 2015

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 07.01.2016**

**Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg vom: 14.01.2016**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. K. Pantel

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. V. Müller

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Fragestellung	- 1 -
1.2	Mammakarzinom.....	- 2 -
1.2.1	Epidemiologie.....	- 2 -
1.2.2	Histologische Klassifikation	- 6 -
1.2.3	TNM-Klassifikation	- 9 -
1.2.4	Tumormarker.....	- 12 -
1.2.5	Therapieformen.....	- 13 -
1.2.6	Metastasierung.....	- 15 -
1.2.7	Zirkulierende Tumorzellen	- 18 -
2	Material und Methoden.....	- 22 -
2.1	Material	- 22 -
2.2	Immunfluoreszenz.....	- 24 -
2.2.1	Vorteile der Immunfluoreszenz	- 24 -
2.2.2	Mikroskopie und Bildakquisition	- 27 -
2.3	Methoden	- 27 -
2.3.1	Blutentnahme	- 27 -
2.3.2	Blutfixierung	- 29 -
2.3.3	Probenfärbung	- 30 -
2.3.4	Tumorzellentnahme und Speicherung.....	- 30 -
2.3.5	Statistische Auswertung	- 31 -
3	Ergebnisse	- 32 -
3.1	Gesamtergebnisse	- 32 -
3.2	Ergebnisse der Mikroskopie	- 36 -
3.3	Ergebnisse bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom	- 37 -
3.4	Ergebnisse bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom	- 43 -

4	Diskussion.....	- 54 -
4.1	Grundlage der Diskussion	- 54 -
4.2	Methodischer Aspekt.....	- 54 -
4.3	Vergleich des M_0 Kollektivs	- 56 -
4.4	Vergleich des M_1 Kollektivs	- 58 -
4.5	Ausblick in die Forschung.....	- 62 -
5	Zusammenfassung.....	- 64 -
6	Literaturverzeichnis	III
7	Abkürzungsverzeichnis.....	XVII
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	XIX
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	XIX
8.2	Tabellenverzeichnis.....	XIX
9	Danksagung.....	XXI
10	Lebenslauf	XXII
11	Eidesstattliche Versicherung.....	XXIII

1 Einleitung

1.1 Fragestellung

Die Metastasierung des Mammakarzinoms gilt immer noch als hauptsächliche Todesursache beim fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Entscheidend für Therapie und Verlaufskontrolle ist somit eine adäquate Diagnostik. Zirkulierende Tumorzellen sind aufgrund ihrer Verfügbarkeit und Differenzierung im Blut als „Liquid Biopsie“ vor und im Verlauf einer systemischen Therapie als prädikativer und prognostischer Wert leicht zu gewinnen. Ihre Fähigkeit, sich während der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) strukturell und oberflächenspezifisch zu verändern, ist von großer Bedeutung in der frühen Phase der Metastasierung von Tumorerkrankungen.

Bisher werden für das Auffinden von zirkulierenden Tumorzellen vor allem die Pan-Keratin-Antikörper C11 und A45-B/B3 (93) verwendet. Mittels dieser Identifikations-Methodik wird das Spektrum der Keratine nur lückenhaft abgedeckt. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass die Verwendung von spezifischen Pan-Keratinantikörpern vermehrt CTCs entdecken und somit den klinischen Verlauf und die Prognose der Patienten besser beurteilen können (93). Es sollte zu Beginn und im Verlauf der systemischen Therapie der Patientinnen gezeigt werden, wie sich die Expression und Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen verändert. Zusätzlich wurden computertomographische Untersuchungen und klassische Tumormarker (CA15-3/CEA) als Kontrolluntersuchungen berücksichtigt. Ferner sollte eine Aufteilung und Differenzierung metastasierter und nicht metastasierter Mammakarzinom-Patientinnen erfolgen.

Fragestellungen:

- 1.) Gibt es einen Zusammenhang mit dem Auffinden von zirkulierenden Tumorzellen und klinischen Parametern wie CT-Scan oder klassischen Tumormarkern (CA15-3, CEA)?
- 2.) Gibt es einen Unterschied in Bezug auf zirkulierende Tumorzellen zwischen metastasierten und nicht metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen?
- 3.) Kann mittels der „Liquid Biopsie“ die prognostische Aussage für die Patientinnen verbessert werden?
- 4.) Lassen sich im Verlauf einer Therapie Veränderungen in der Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen festhalten?

1.2 Mammakarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau und macht etwa ein Viertel aller Krebserkrankungen beim weiblichen Geschlecht aus. Im Jahr 2010 sind in Deutschland 70.340 Frauen an Brustkrebs neuerkrankt und 17.466 verstorben. Es wird erwartet, dass sich die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2014 auf 75.000 erhöht. Die Tabelle 2.1 beschreibt die Inzidenz des Mammakarzinoms in der westlichen Welt. Es werden die neuerkrankten Frauen pro 100.000 Frauen in Nordamerika, Nord- und Westeuropa, Australien und Neuseeland altersabhängig für das Jahr 2012 aufgeführt (1).

Tabelle 1.1 Brustkrebsinzidenz pro 100.000 Frauen in Nordamerika, Nord-/Westeuropa, Australien/Neuseeland

<i>Alter</i>	<i>Inzidenz (pro 100.000 Frauen)</i>
0-14	0
15-39	25,1
40-44	118,7
45-49	171,8
50-54	221,3
55-59	269,9
60-64	320,9
65-69	353,6
70-74	345,7
75+	326,2

Brustkrebs ist nicht nur auf die Frau begrenzt, sondern stellt beim Mann, wenn auch eine seltene, maligne Erkrankung dar. Insgesamt ist der Brustkrebs des männlichen Geschlechts eine kleine Sektion, da der Anteil mit 0,9% aller Brustkrebsfälle gering ist. Ferner nimmt der Brustkrebs des Mannes weniger als 1% der malignen Erkrankungen beim männlichen Geschlecht ein (2).

Jede achte bis zehnte Frau entwickelt im Laufe ihres Lebens Brustkrebs (3). Man nimmt an, dass die vermehrte Häufigkeit der Erkrankungen vor allem an der lebenslang höheren Östrogen-Aussetzung und der postmenopausalen Hormonersatztherapie liegt (2).

Für den Brustkrebs gibt es eine Vielzahl an Risikofaktoren:

Reproduktionsfaktoren (Kinderlosigkeit, späte Erstschwangerschaft, junges Alter bei der Menarche), hormonelle Therapien (Antibaby-Pille), anthropogene Faktoren (Körpergröße, BMI), Lifestyle-Faktoren (Diäten, Tabakrauchen) und guter sozialer Status (Anzahl der Schwangerschaften, Einkommen) sind mit Brustkrebs assoziiert (4-10). Ferner gibt es hereditäre Faktoren wie die Mutation im *BRCA1* oder *BRCA2*-Gen, welche das Risiko einer familiären Brustkrebsentwicklung signifikant erhöhen. Die erblichen Risikofaktoren wirken sich mit zirka 5-10% der Neuerkrankungen aus (11-13). Zusammengefasst sind die relativen Wahrscheinlichkeiten der Risikofaktoren in Tabelle 2.2 aufgeführt (14). Diese wurden 2003 von Singletary et al. zusammengetragen (15).

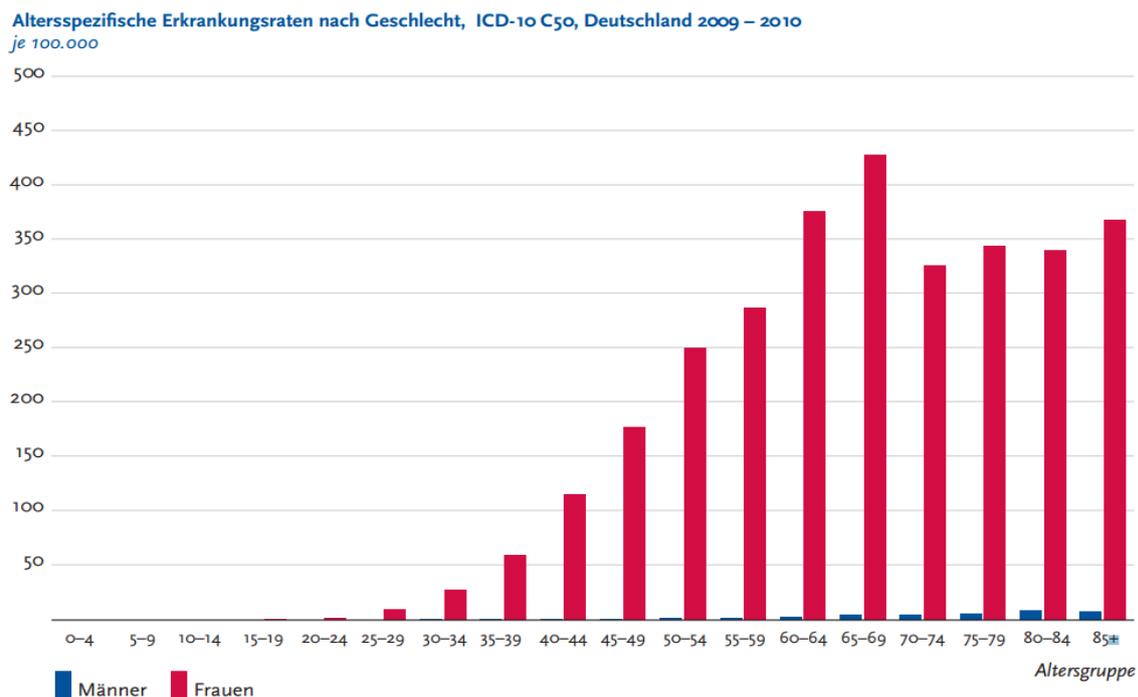
Table 1.2 Relative Risikofaktoren für Brustkrebspatienten

<i>Faktor</i>	<i>Relatives Risiko</i>
<i>Geographie</i>	Regional / weltweit unterschiedlich
<i>Alter > 30 Jahre</i>	Steigend
<i>Familiär</i>	
<i>Brustkrebs im 1. Verwandschaftsgrad</i> <i>Prämenopausal</i>	3,3
<i>Brustkrebs im 1. Verwandschaftsgrad</i> <i>Postmenopausal</i>	1,8
<i>Brustkrebs im 2. Verwandschaftsgrad</i>	1,5
<i>Menstruation</i>	
<i>Menarche <12 Lebensjahr</i>	1,3
<i>Menopause >55 Lebensjahr</i>	1,2 – 1,5
<i>Schwangerschaften</i>	
<i>Erste Geburt ab dem 30. Lebensjahr</i>	1,7 – 1,9
<i>Gutartigen Brusterkrankungen</i>	
<i>Proliferative Erkrankung ohne Atypien</i>	1,9
<i>Proliferative Erkrankung mit atypischer</i> <i>Hyperplasie</i>	5,3
<i>Lobuläres Carzinoma in Situ</i>	16,4
<i>Ductales Carzinoma in Situ</i>	17,3
<i>Weitere Faktoren</i>	
<i>Exogene Östrogene /Orale Kontrazeption</i>	1,3
<i>Übergewicht</i>	1,2
<i>Zigaretten</i>	Keine Angaben
<i>Alkohol</i>	1,2
<i>Bestrahlung</i>	1,6 – 5,29

Dank der Einführung eines adäquaten Früherkennungssystems und Fortschritten in der Therapie während der vergangenen Jahrzehnte konnte die Mortalität sowie Metastasierung des Mammakarzinoms wesentlich gesenkt werden. Der metastasierte Brustkrebs nimmt einen geringen Anteil der Gesamtzahl der Fälle ein. Bei der Erstdiagnosestellung weisen nur etwa 3-7% der Brustkrebspatientinnen eine Fernmetastasierung auf (16). Im Gegensatz zur Mortalität ist die Morbidität durch den demographischen Wandel in Deutschland altersadaptiert steigend (17, 18).

In Deutschland betrug im Jahre 2010 das mittlere Diagnosealter für Brustkrebs bei den Frauen 64 Jahre. Die Diagnose wird im Vergleich zu den Jahren von 2002-2006 drei Jahre später gestellt. Während dieser Zeit betrug das Diagnosealter noch 61 Jahre (2). Während die Wahrscheinlichkeit, vor dem 40. Lebensjahr zu erkranken, gering ist, nimmt sie im höheren Lebensalter zu (Abbildung 2.1). Laut Robert-Koch-Institut beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung im Mittel 86-88% (2), wobei das jeweilige Tumorstadium berücksichtigt werden muss. Die 5 Jahres-Überlebensrate besagt, wie viele Patienten nach 5 Jahren mit der gleichen Diagnose noch leben. Weitere Daten sind im später folgenden Abschnitt „Metastasierung“ (Seite 19 ff.) aufgeführt.

Abbildung 1.1 Brustkrebsinzidenz in Deutschland laut Robert-Koch-Institut



1.2.2 Histologische Klassifikation

Der Brustkrebs der Frau lässt sich hinsichtlich seines histologischen Gewebes in verschiedene Gruppen einteilen. Zum einen kann der Brustkrebs dem Milchdrüsenläppchen (Lobus) ähnlich sein, welches dem Parenchym entspricht. Zum anderen kann die Histologie der der Milchgänge (Ductus) entsprechen.

Karzinome leiten sich von bösartigen Tumoren epithelialen Ursprungs ab. Die Karzinome der Milchgänge entsprechen etwa 85-90% der Mammakarzinom-Fälle (19). Solange der Tumor die Basalmembran nicht durchbrochen hat, spricht man von einem „ductal carcinoma in Situ“ (DCIS), aber sobald er diese invasiv durchbricht, von einem „invasive ductal carcinoma“ (IDC). In etwa 2% der duktaalen Karzinome sind die Mamilla und die umgebende Hautschicht mitbetroffen: Diese sind unter dem Morbus Paget bekannt.

Weitere 10-15% der Mammakarzinom-Fälle entsprechen dem Milchdrüsenläppchen. Bis zum Durchbrechen der Basalmembran ist der Tumor definitionsgemäß ein lobuläres Carzinoma in Situ (LCIS), bei Durchbrechen ein „invasive lobular carcinoma“ (ILC).

In seltenen Fällen, etwa 2%, sind die Tumore Mischformen aus duktaalen und lobulären Komponenten. Die Einteilung erfolgt nach histologischer Beschaffenheit in beispielsweise muzinös, medullär, papillär, tubulär, adenoid-zystisch, sekretorisch und apokrine Karzinome, welche unterschiedliche Prognosen begünstigen (20).

Eine weitere Einteilung des Brustkrebses erfolgt durch die Identifikation der Subtypen mittels des Hormonrezeptorstatus. Dafür werden drei Hauptrezeptoren unterschieden: Der Östrogen-, der Progesteron- und der Humane Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor Typ 2 (Her2/neu; HER2). Der immunhistochemische Hormonrezeptornachweis für den Östrogen- und Progesteronrezeptor wird in den Immunreaktiven Score (IRS) bis 2010 in Tabelle 2.3 eingeteilt und gibt eine prognostische Aussage für das Ansprechen bestimmter Therapien (21). Dieser Score wird seit 2010 nicht mehr von der American Society of Clinical Oncology (ASCO) empfohlen (22). Der aktuelle semiquantitative immunhistologische Score ist unter dem „H-Score“ bekannt und variiert zwischen Werten von 0-300. Die Einteilung erfolgt anteilig der zu findenden Zellen und deren Intensität des Anfärbens; diese Klassifikation ist in der Tabelle 2.4 dargestellt (23-25).

Das Vorhandensein beider Hormonrezeptoren ist mit einem höheren Ansprechen bei einer antihormonellen Therapie (Aromataseinhibitoren, GnRH-Analoga, Tamoxifen) in Zusammenhang zu bringen (26, 27). Der HER2- Rezeptor-Status wird mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bestimmt. Eine Überexpression kann durch eine Gen-Amplifikation bedingt sein und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (28). Jedoch ist mit einer monoklonalen Antikörpertherapie (Herceptin®) eine signifikante Verbesserung der Vorhersage für Her2-positive Patienten nachgewiesen (29, 30).

Tabelle 1.3 Immun Reactive Score (IRS) nach Remmele und Stegner

SI / PP	<i>Keine Färbereaktion = 0 Punkte</i>	<i>Schwache Färbereaktion = 1 Punkt</i>	<i>Mäßige Färbereaktion = 2 Punkte</i>	<i>Starke Färbereaktion = 3 Punkte</i>
<i>keine positiven Zellkerne = 0 Punkte</i>	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
<i>< 10% positive Zellkerne = 1 Punkt</i>	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
<i>10-50% positive Zellkerne =2 Punkte</i>	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
<i>51-60% positive Zellkerne = 3 Punkte</i>	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
<i>> 60% positive Zellkerne = 4 Punkte</i>	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

PP: „percentage of positive cells“; SI: „staining intensity“; Berechnung des IRS Score = PP x SI

Tabelle 1.4 Einteilung des semiquantitativen H- Score nach McCarty

Farbintensität	Multiplikationsfaktor	Anteil der Zellen	der Endergebnis
<i>Keine Färbung</i>	0	0-100	Summe des jeweiligen Anteils multipliziert mit dem Faktor = H-Score
<i>Schwache Färbung</i>	1	0-100	
<i>Mittlere Färbung</i>	2	0-100	
<i>Starke Färbung</i>	3	0-100	

Als Beispielrechnung für den H-Score in einem histologisch gefärbten Brustkrebspräparat gilt:

30% der Zellen nicht gefärbt	$30 \times 0 = 0$
20% der Zellen schwach gefärbt	$20 \times 1 = 20$
30% der Zellen mäßig gefärbt	$30 \times 2 = 60$
20% der Zellen stark gefärbt	$20 \times 3 = 60$
Endergebnis des H-Score:	$0 + 20 + 60 + 60 = 140$

Der H-Score beträgt somit in diesem Beispiel 140 von 300 möglichen Punkten.

1.2.3 TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation (TNM Classification of Malignant Tumours) basiert auf drei wesentlichen Merkmalen: Der Tumorgröße (T), der Anzahl und Lokalisation der befallenen Lymphknoten (N) und dem Auftreten von Fernmetastasen (M) (31). Der daraus entstehende Code ist in Tabelle 2.5 dargestellt (32).

Dieses System ermöglicht die Einteilung in verschiedene Stadien, die für die Therapie und Prognose wichtig sind (33). Eine solche Stadien-Einteilung ist Tabelle 2.6, herausgegeben von der „Union Internationale Contre le Cancer“ (UICC), zu entnehmen.

Tabelle 1.5 TNM-Klassifikation

Primärtumor (T-Status)

<i>T_x</i>	Primärtumor nicht beurteilbar
<i>T₀</i>	Kein Anhalt für einen Primärtumor
<i>T_{is}</i>	(DCIS) duktales Carzinoma in situ (LCIS) lobuläres Carzinoma in situ (Paget) Morbus Paget (Mamille mit beteiligt)
<i>T₁</i>	Tumor von ≤ 2 cm Größe
<i>T_{1 mic}</i>	Mikroinvasiv von ≤ 0,1 cm im größten Durchmesser
<i>T_{1 a}</i>	Tumor > 0,1cm bis 0,5 cm im größten Durchmesser
<i>T_{1 b}</i>	Tumor > 0,5 cm bis 1,0 cm im größten Durchmesser
<i>T_{1c}</i>	Tumor > 1,0 cm bis 2,0 cm im größten Durchmesser
<i>T₂</i>	Tumor > 2,0 cm bis 5.0 cm im größten Durchmesser
<i>T₃</i>	Tumor > 5,0 cm im größten Durchmesser
<i>T₄</i>	Tumor jeder Größe, mit direkter Verbindung zu (a) der Brustwand oder (b) der Haut
<i>T_{4 a}</i>	Extension zur Brustwand ohne Beteiligung des m. pectoralis
<i>T_{4 b}</i>	Ödem der Haut (inklusive Peau d'orange), Ulzeration der Haut oder Satellitenmetastasen der Haut
<i>T_{4 c}</i>	Kombination aus T4a und T4b
<i>T_{4 d}</i>	Inflammatorisches Carzinom

Lymphknoten (N-Status)

<i>Nx</i>	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
<i>N0</i>	Keine Lymphknoten-Metastase
<i>N1</i>	Lymphknotenmetastase in ipsilateraler beweglichen Axilla
<i>N1 mic</i>	Mikrometastasen mit 0,2-2mm in größter Ausdehnung
<i>N1 a</i>	Metastasen in 1-3 axillären Lymphknoten, mindestens eine
<i>N1 b</i>	>2 mm in der Ausdehnung
<i>N1c</i>	Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna mit mikroskopischer Metastase in der Sentinalbiopsie Vorliegen von N1 a und N1 b ipsilateral
<i>N2</i>	Lymphknotenmetastase in ipsilateraler Axilla; untereinander oder an anderen Strukturen fixiert
<i>N2 a</i>	Lymphknotenmetastase in 4-9 Lymphknoten, mindestens eine >2mm in der Ausdehnung
<i>N2 b</i>	Lymphknotenmetastasen Versorgungsgebiet der Arteria mammaria interna bei fehlender axillärer Beteiligung
<i>N3</i>	Lymphknotenmetastase in mindestens 10 Lymphknoten im Versorgungsgebiet der Arteria mammaria interna
<i>N3 a</i>	Lymphknotenmetastase ipsilateral infraclaviculär oder axillär
<i>N3 b</i>	Lymphknotenmetastase ipsilateral infraclaviculär und axillär
<i>N3 c</i>	Lymphknotenmetastase ipsilateral supraclaviculär

Fernmetastasen (M-Status)

<i>Mx</i>	Fernmetastasen nicht klassifiziert
<i>M0</i>	Keine Fernmetastase
<i>M0</i>	Keine klinische oder radiologische Evidenz für Fernmetastasen, aber Nachweis von molekularen oder mikroskopischen Tumorzellen im Blut, Knochenmark oder nicht regionalen Lymphknoten, die nicht größer als 0,2 mm sind. Es bestehen keine Symptome oder Zeichen für Metastasen.
<i>cM0 (i+)</i>	
<i>M1</i>	Fernmetastase

Für die jeweilige weitere T-, N- und/oder M-Einteilung können Präfixe wie beispielsweise „c“ für klinische Betrachtung oder „p“ für pathologische Auswertung verwendet werden.

Tabelle 1.6 Union internationale contre cancer –Klassifikation (UICC)

<i>UICC- Klassifikation</i>			
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage I	T1	N0	M0
Stage II A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stage II B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage III A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
Stage III B	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
	jedes T	N3	M0
Stage III C	jedes T	jedes N	M1
Stage IV			

Über diese Klassifikation und Einteilung in Stadien hinaus erfolgt durch einen Pathologen eine Differenzierungseinstufung (englisch: Grading) des Tumors, welche in Tabelle 2.7 zu finden ist. Grundlage hierfür ist die Einteilung nach Bloom und Richardson (34) beziehungsweise Elston und Ellis (35, 36). Diese erfasst Mitoserate, Tubulusbildung sowie Kernpolymorphie, die in einem prognoseweisenden Score zusammengefasst zu werden. Je undifferenzierter ein Tumor ist, desto schlechter ist die Prognose einzustufen (36).

Tabelle 1.7 Histopathologisches Grading nach Bloom und Richardson / Elston und Ellis

<i>Grading</i>	
G1	Gut differenziert / Malignitätsgrad: gering
G2	Mäßig differenziert / Malignitätsgrad: mäßig
G3	Schlecht differenziert / Malignitätsgrad: hoch

1.2.4 Tumormarker

In der Frühdiagnostik des Brustkrebses gibt es bis heute keine ausreichend sensitiven und sensiblen Marker im Blut. So stehen vor allem klinische Untersuchungen wie Anamnese und körperliche Untersuchung, aber auch apparative Verfahren wie die Sonographie, Mammographie und die Magnetresonanztomographie (MRT) im Vordergrund (37-42). Darüber hinaus gibt es klassische Tumormarker, welche für den Verlauf von Therapien verwendet werden.

Zu den „klassischen“ Tumormarkern gehören das Carcino-Embryogene Antigen (CEA) sowie das Cancer Antigen 15-3 (CA 15-3) (43). Hierbei handelt es sich um transmembranöse Mucine, welche vor allem in den Zellen der Lungenbläschen sowie von Zellen der Milchdrüsengänge der Brustdrüse produziert werden (44, 45). Ferner werden sie mit malignen Zellen assoziiert. Diese Marker können bereits im frühen Krankheitsstadium im Vergleich zum Gesunden erhöht gemessen werden und im Verlauf als Kontrollwert genutzt werden. Eine Problematik hierbei ist allerdings, dass diese Tumormarker nicht brustkrebsspezifisch sind. So können andere Faktoren wie Rauchen und/oder Stress auch im gesunden Probanden erhöhte Werte produzieren (46).

Seit 2008 wird die standardisierte Messung nach Therapieende in der adjuvanten Situation von der American Society of Clinical Oncology nicht mehr empfohlen (47). Die Tumormarker können in der metastasierten Situation als standardisierte Monitoring-Tools verwendet werden (48, 49). Für CA 15-3 gilt als pathologischer Grenzwert ≥ 35 kU/l (50).

1.2.5 Therapieformen

Das therapeutische Regime beim Brustkrebs richtet sich nach dem Stadium der Erkrankung und ist meist eine multimodale Behandlung.

Zur Therapie gehört die operative Entfernung des Tumorgewebes. Diese kann in Kombination mit einer neoadjuvanten oder adjuvanten Behandlung erfolgen. Dabei sind beispielsweise Chemo- und Radiotherapie, Hormontherapie sowie die Gabe von spezifischen Antikörpern vor beziehungsweise nach dem chirurgischen Eingriff beinhaltet. In der palliativen Situation wird der Tumor oft nicht mehr entfernt, wenn bereits eine Metastasierung bei der Diagnosestellung vorliegt. Das Ziel der Operation ist das komplette Entfernen des Tumorgewebes. Dabei kann eine brusterhaltende Therapie (BET), eine Brustteilresektion oder eine Mastektomie (Ablatio) mit oder ohne Wiederaufbau angestrebt werden. Diesen chirurgischen Therapien kann sich eine Bestrahlung zur Rezidivreduktion anschließen (51). Das Tumorgewebe und gegebenenfalls das angrenzende gesunde Gewebe werden von Pathologen untersucht. Dabei werden Differenzierungsgrad der Tumorzellen sowie Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor und HER2 (Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor2) -Status ermittelt (52).

Additiv zur operativen makroskopischen Tumorfreiheit kann eine adjuvante Therapie erfolgen, um das statistische Risiko eines Rezidives oder Tumorprogresses zu minimieren. Die Empfehlung des Behandlungsalgorithmus aus Strahlen-, Chemo-, Hormon- und Antikörpertherapie wurde von internationalen Experten als das 13. Symposium für Early Breast Cancer 2013 herausgegeben (53).

Chemo- und Radiotherapie können auch vor einer operativen Therapie zur Reduktion der Tumormasse verabreicht werden. Hierbei spricht man von einer neoadjuvanten Therapie. In der brusterhaltenden Therapie wird vermehrt die Strahlentherapie (Radiotherapie) appliziert, da gezeigt werden konnte, dass die Ergebnisse und das tumorfreie Überleben analog zur Mastektomie sind (54, 55).

Für die endokrine Therapie ist über den Hormonrezeptorstatus hinaus auch die hormonelle Ausgangssituation der Frau von Bedeutung. Je nach prä- oder postmenopausaler Lage wird eine unterschiedliche Therapie bevorzugt. Selektive Östrogenrezeptormodulatoren wie beispielsweise Tamoxifen werden vor allem im prämenopausalen Stadium eingesetzt (32, 56). Die Affinität von Tamoxifen am Östrogenrezeptor ist 100-1000-mal geringer als die vom Östradiol (32, 56). In postmenopausaler Ausgangssituation werden bevorzugt Aromataseinhibitoren wie

Letrozol verwendet (57, 58). Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. hat in ihren allgemeinen Richtlinien von 2013 für die adjuvante Therapie von postmenopausalen Brustkrebspatientinnen auch die sequentielle Therapie aus der Kombination von Tamoxifen gefolgt von einem Aromataseinhibitor empfohlen (58). Aromataseinhibitoren sind in der Lage die Bildung von Östrogenen aus Testosteron zu verhindern und somit den Östrogenspiegel im Blut zu senken (59).

Im Verlauf der systemischen Therapien beim Mammakarzinom kommt es immer wieder zu Resistenzen einer spezifischen Behandlung beziehungsweise zu einem Progress der Erkrankung. Hierbei spielen mehrere Faktoren mit, die zum Fortschreiten führen können. Bereits 1993 wurden von Wiebe et al. beispielsweise bei der Therapie mit Tamoxifen bei Mammakarzinom-Patientinnen mögliche Mechanismen wie eine veränderte Östrogenrezeptor-Expression beschrieben. Ferner wird von alternativen Östrogen bindenden Stellen („antiestrogen binding sites“) ausgegangen, welche die Wirkung des Tamoxifen abschwächen (60, 61). Des Weiteren können in der Signalkaskade des Östrogenstoffwechsels Nebenkreisläufe wichtig sein, welche eine Resistenz der jeweiligen endokrinen Therapie bewirken (62).

1.2.6 Metastasierung

Unter dem Begriff Metastasierung ist eine Infiltration und Überschreitung des Tumors durch die Basalmembran und hämatogene beziehungsweise lymphogene „Übersiedlung an einen anderen Ort“ (griechisch „μετάσταση“) zu verstehen.

Im Falle des Mammakarzioms ergibt sich ein heterogenes klinisches Bild mit einer Vielfalt unterschiedlicher Szenarien. Zum einen können einzelne solide Metastasen bis hin zu diffusen und multiple Organe betreffende Metastasen entstehen. Die 5-Jahre-Überlebensrate nach Diagnosestellung ist abhängig vom Stadium. So nimmt die Rate vom primären Lymphknoten negativen Brustkrebs mit etwa 98%, über den Lymphknoten positiven Brustkrebs mit 83%, bis zum fernmetastasierten Brustkrebs mit 23% deutlich ab (63).

Die Hauptursache für das geringe Überleben ist somit nicht der Primärtumor, sondern die Entwicklung von Fernmetastasen in anderen Organen (64). Die Inzidenz der Neuerkrankungen mit Fernmetastasen ist mit etwa 3-7% gering (65).

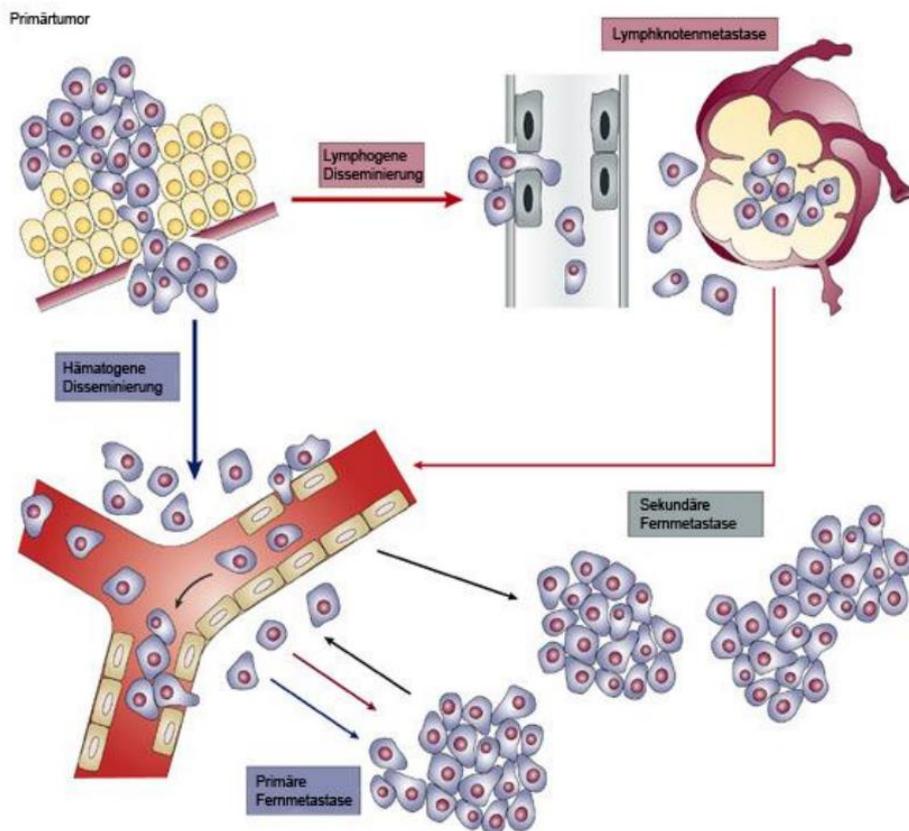
In Autopsie-Studien von an Brustkrebs verstorbenen Patientinnen wurde belegt, dass eine Metastasierung meist in Knochen (70%), Leber (61%), Lunge (66%) sowie Gehirn (10-20%) erfolgt (66).

Seit langem setzen sich Wissenschaft und Medizin mit der Krebsentstehung und dessen Metastasenbildung auseinander. Es wurden immer wieder neue Modelle entwickelt, um eine allgemein gültige Vorstellung der Metastasierung zu bekommen. Bereits 1889 wurde das Prinzip der „Seed and Soil“-Theorie von S. Paget beschrieben, welche eine tumorspezifische Organaffinität beschreibt. Hierfür gibt es für einzelne Organe (Soil) entsprechend metastasierende Zellen (Seed), welche auch über geraume Zeit im Körper verweilen können. Aufgrund dieser These wurde von Fiedler und Kripke et al. 1977 postuliert, dass eine Metastasierung durch wenige Tumorzell-Subpopulationen im späten Tumorstadium ausgeht (67).

Dieser Ansatz stellte anfänglich ein Metastasierungsparadigma dar, da bereits zu frühen Erkrankungszeitpunkten mit kleinen Tumoren Metastasierungen möglich sind. Vor allem in epithelialen Tumoren konnte 2004 von K. Pantel und R.H. Brakenhoff eine Parallelität von systemischer Metastasierung beschrieben und im Verlauf nachgewiesen werden (68). Abbildung 2.2. zeigt schematisch die Parallelität der Metastasierung (58, 68). Es wird davon ausgegangen, dass vom primären Tumorgewebe einzelne Zellen in die Lymphabflusswege gelangen und sich anschließend in Lymphknoten sammeln und dort als Lymphknotenmetastase

persistieren. Zum anderen können Tumorzellen primär hämatogen in die Blutbahn gelangen. Durch ein späteres Austreten der Tumorzellen können im Verlauf primäre Fernmetastasen entstehen. Des Weiteren können von den Lymphknotenmetastasen Tumorzellen in die Blutbahn geraten, welche wie bei der primären Fernmetastasierung nun sekundär eine Fernmetastase im Körper hervorrufen können.

Abbildung 1.2 Metastasierungskaskade nach Pantel und Brankenhoff, 2004, modifiziert nach S.W. Carpenter von 2012. Dargestellt sind zwei Metastasierungswege, lymphogen und hämatogen. Primäre Fernmetastasen können durch erneute Disseminierung sekundäre Fernmetastasen



Im Jahr 2002 wurde von Bernhards und Weinberg ein Modell für die Metastasierung aus den Ergebnissen verschiedener Studien veröffentlicht und im Weiteren aktualisiert und ergänzt. Für eine Metastasierung wurden drei Grundsätze festgehalten (69):

1. Die Metastasierungsfähigkeit eines Tumors wird früh in der Tumorentwicklung durch das tumoreigene Mutationsspektrum festgelegt.
2. Es gibt eine tumorspezifische Kombination aus Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, nicht aber ein eigenständiges mutationsdeterminierendes Gen, welches das Metastasierungspotenzial festlegt.
3. Es reicht bereits eine Zelle aus, um Metastasen bilden zu können.

Ein weiterer wichtiger Punkt in Bezug auf die Metastasierung des Mammakarzinoms stellt die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) dar. Grundlage hierfür ist, dass auch der Brustkrebs epithelialen Ursprungs ist. Die EMT beschreibt den Übergang von Zellen mit epithelialen Eigenschaften zu phänotypisch mesenchymalen und somit invasiven Zellen (70, 71). Im Vordergrund dieser Umwandlung steht der Verlust von Zell-zu-Zelladhäsion und die Veränderung im Zellskelettaufbau. So kommt es beispielsweise zu einer Herunterregulation von E-Cadherin oder Keratin-Filamenten (70, 71) und dem Erwerb von mesenchymalen Intermediärfilamenten wie Vimentin (72). Dieser Effekt wird physiologischer Weise in der embryonalen Entwicklung beobachtet, welcher ein wichtiger Schritt für eine regelrechte Entwicklung ist (73). Es wird ein regelrechtes Wachstum und eine Anordnung der Organe gewährleistet. Ferner ist die EMT bei Erwachsenen während der Wundheilung, Gewebefibrose sowie in der Plazenta zu beobachten (74).

Nachdem die Zellen die EMT durchlaufen und ihr ursprüngliches Gewebe verlassen haben, wird angenommen, dass sie für das Ausbilden von Mikrometastasen in den fernen Organen einen weiteren Prozess durchlaufen müssen. Diese umgekehrte Entwicklung nennt man Mesenchymale-Epitheliale Transition (MET). In diesem Zusammenhang scheinen die Zellen Eigenschaften von Stammzellen zu besitzen, die eine Proliferation in der veränderten Umgebung ermöglicht (75).

1.2.7 Zirkulierende Tumorzellen

Ein wichtiger Schwerpunkt in der Metastasierungskaskade des Mammakarzinoms stellt die Identifikation von frühen metastasierungsfähigen Zellen dar. In diesem Zusammenhang stehen vor allem im Knochenmark (DTC) und Blut (CTC) zirkulierenden Tumorzellen. Seit 2007 wird zur Tumormarker-Empfehlung der American Society of Clinical Oncology (76) der Nachweis dieser Zellen berücksichtigt. Die Unterteilung der registrierbaren Tumorzellen erfolgt nach deren Auffinden zum einen im Knochenmark oder im Blutkreislauf. Disseminierte Tumorzellen („disseminated tumor cells“; DTC) werden definitionsgemäß im Knochenmark und zirkulierende Tumorzellen („circulating tumor cells“, CTCs) im Blutkreislauf detektiert (77). Disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark werden auch als minimale Tumorresiduen bezeichnet („minimal residual disease“, MRD) und gelten als Vorläufer klinisch manifestierter Fernmetastasen. Die MRD ist als Vorhandensein von Krebszellen, die nach Entfernung des Primärtumors mittels Routinediagnostik nicht erfassbar ist, definiert. Mit dem Nachweis dieser Zellen wird ein unabhängiger prognostischer Faktor beim primären Brustkrebs gestellt (78-85).

DTCs und CTCs sind vom Primärtumor, Rezidiv oder Metastasen abgespaltene Zellen. Um metastasieren zu können, müssen migratorische und invasive Eigenschaften bei diesen Zellen vorhanden sein oder erworben werden (86). Für das Ausstreuen über die Basalmembran und um die extrazelluläre Matrix zu zerstören, werden verschiedene Proteasen aktiviert, beziehungsweise sekretiert. Dies ermöglicht eine Streuung ins Blut- oder Lymphsystem (87, 88). Die ersten aus dem Blut detektierten Tumorzellen wurden bereits 1869 von Ashworth gefunden und beschrieben (89).

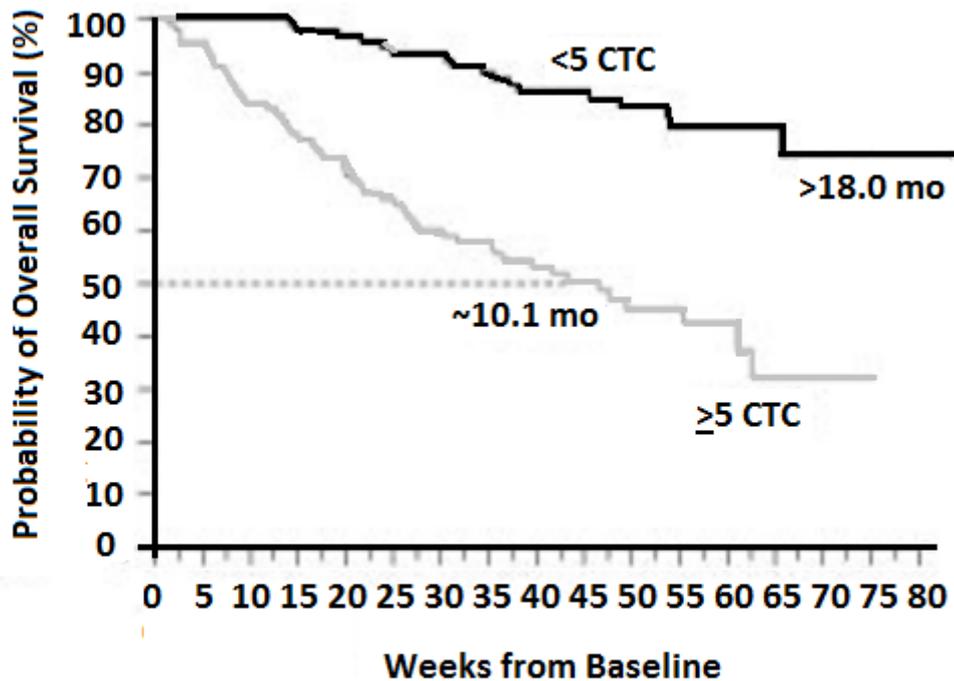
Es hat sich herausgestellt, dass ein Auffinden zirkulierender Tumorzellen im Blut eine weniger invasive Methode zur Prognoseabklärung darstellt als die Aspiration von DTC aus dem Knochenmark (90). Darüber hinaus stellt sich das Problem, dass in vielen Fällen eine Biopsie und Probeentnahme der Metastase(n) ungünstig ist. Ferner ist eine Darstellung von Mikrometastasen mittels hochauflösender Bildgebung nicht möglich (Mammographie, MRT)(91).

In Studien konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Tumorzellen als Bindeglied zwischen Primärtumor und Fernmetastase fungieren (87). Der genaue Mechanismus, auf welche Weise die Tumorzellen in das Blutsystem gelangen, ist nicht vollständig geklärt. Es wird aber angenommen, dass für die Entstehung einer hämatogenen Metastase zirkulierende Tumorzellen vorhanden sein müssen (68). Ferner besteht eine signifikante Assoziation zwischen CTC-Anzahl bei verschiedenen Tumorentitäten (Mamma-, Prostata- und Kolorektales Karzinom) und deren Gesamtüberleben (90, 92, 93). Zusätzlich zum prognostischen Faktor ermöglicht der Nachweis von CTCs eine frühzeitige Beurteilung vom Therapieerfolg sowie einer Tumorneubildung („monitoring“). Somit würde eine Rezidiv-Erkrankung oder Therapieversagen frühzeitig erkannt werden (94, 95). In der folgenden Abbildung 2.3 wurden CTC-positive Brustkrebs-Fälle in zwei Gruppen eingeteilt (96). Die Einteilung in die Gruppen erfolgte in Bezug auf die Anzahl der gefundenen CTCs. Es zeigte sich ein schlechteres Gesamtüberleben bei den Fällen, wo mindestens fünf CTC pro 7,5 ml Blut gefunden wurden, als bei denen mit weniger als fünf CTC pro 7,5 ml Blut. Für die Identifikation der zirkulierenden Tumorzellen bei M₁-Patientinnen wurde die CellSearch-Methodik verwendet, die im Folgenden mit weiteren Identifikationstechniken näher erläutert wird.

Abbildung 1.3 Gesamtüberleben abhängig vom Vorhandensein zirkulierender Tumorzellen

Cristofanilli et al. NEJM, 2004

Breast Cancer



No. at Risk

<5 CTC	90	90	90	87	85	80	80	77	67	59	50	39	28	15	10	4	2
≥5 CTC	87	83	73	68	62	58	52	49	40	33	24	18	9	2	2	1	0

Der Nachweis einer CTC unter etwa einer Million hämatopoetischen Zellen erfordert den Einsatz hoch sensitiver Assays. Hierfür werden hauptsächlich zwei Ansätze verfolgt: Zum einen immunologische Assays mittels Antikörper gegen epithel-spezifische oder intrazelluläre Proteine, zum anderen Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)-basierte Methoden, mit denen gewebsspezifische Transkripte nachgewiesen werden (85).

Um den Nachweis der CTC zu erleichtern, können Anreicherungsverfahren zum Einsatz kommen. Diese Voranreicherungsschritte beruhen vor allem auf einer Dichtegradienten-zentrifugation und/oder einer magnetischen Zellseparation (97). Im erstgenannten Verfahren können CTCs und andere mononukleäre Zellen von Blutzellen aufgrund der unterschiedlichen Dichtegrade aufgetrennt werden. Als Hilfsmedium wird häufig ein Dichtemedium wie *Ficoll-Hypaque* (GE Healthcare) (68)

und *OncoQuick* (Greiner Bio-one) (98) verwendet. Mittels der immunmagnetischen Zellseparation werden CTCs durch spezifische Antikörper, die mit magnetischen Partikeln fusioniert sind, markiert. In einem magnetischen Feld können die Zellen separiert werden. Die „Positiv“-Anreicherung nutzt Antikörper, die gegen tumorspezifische oder epitheliale Antigene gerichtet sind. Beispielsweise werden Anti-EpCAM („epithelial cell adhesion molecule“) behandelte „CTC-Noppen-Chips“ genutzt. Hierfür sind auf den Arrays im Abstand von maximal 50 nm die Antikörper gegen Tumorzellen angeordnet (99). Die „Negativ“-Anreicherung dagegen nutzt Antikörper, die ein Leukozytenantigen CD45 (Cluster of Differentiation 45) binden. Es werden somit CD45-exprimierende Leukozyten von CTCs getrennt (100, 101).

Das derzeit einzig von der FDA (Food and Drug Administration) verifizierte System zum Nachweis von CTC ist das *CellSearchTM* System (Veridex, LLC) (102). Das Prinzip stützt sich auf einer ferrofluidgekoppelten Anti-EpCAM Anreicherung der CTCs. EpCAM wird von normalen sowie malignen Epithelzellen exprimiert, weshalb sich eine weitere Färbung anschließt. Es folgt eine Anti-Keratin-Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern und zusätzlich die CD45-Färbung gegen Leukozyten. Eine hohe Sensitivität und Spezifität wurde bereits in einer Multicenter-Studie bei Brustkrebspatientinnen belegt (103). Ferner werden Antikörper eingesetzt, die beispielsweise an epitheliale Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR) binden (104).

Als zweites sensitives und spezifisches Verfahren wurde die Real-Time- oder Quantitative PCR etabliert, welche vor allem beim Brustkrebs spezifische Tumormarker wie CKs, CEA oder Her2 nutzt (105, 106). Auf diese Weise nachgewiesene CTC sind mit einer erhöhten Mortalitätsrate und einer schlechteren Gesamtprognose vergesellschaftet (107).

Als weiteres Verfahren zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen wird die „Magnetic Activated Cell Separation“ (MACS) vorgestellt. Mittels MACS ist eine Auftrennung bestimmter Zellen aus einem Gemisch mittels bestimmter Oberflächenstrukturen möglich. Die Zellen werden an spezifische magnetische Mikropartikel gekoppelt und anschließend beim Durchfluss an einem Hochgradienten-Magneten isoliert. Dieses Verfahren ermöglicht eine Anreicherung um das 100-fache beziehungsweise eine Abbaurate um das 1000-fache von nicht magnetisierten Partikeln (108).

2 Material und Methoden

2.1 Material

AB-Serum/PBS	Biotest
AE1/AE3-Antikörper	Millipore
C11-Antikörper (Keratin 11)	Abcam
DAPI-Antikörper (4',6-Diamidino-2-Phenylindole)	Sigma, Diesenhofen
Destilliertes Wasser	Eppendorf, Hamburg
Dulbecco's PBS	Gibco BRL, Eggenstein
DMEM	PAA Laboratories
Fetales Rinterserum	PAA Laboratories
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma, Diesenhofen
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Ficoll	GE Healthcare
Hanks salt solution	Biochrom AG
HBSS	Biochrom
H-Lysepuffer	R&D Systems, Minneapolis
PBS-Lösung	Life Technologies
Cell Extraction Buffer	New England Biolabs, (Single Cell WGA-Kit)
TBS-Lösung	DAKO, Hamburg
Dako-Faramount Aqueous Mounting Medium	DAKO, Hamburg
Dako-Pen Fettstift	DAKO, Hamburg
SKBR-3 Zelllinien	American Type Culture Collection
Deckgläser	Roth Karlsruhe
Objektträger	Marienfeld Laboratory, Marienfeld
England Finder	Plano GmbH, Wetzlar
Falcon Röhrchen 50ml	Bacton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Neubauer Zählkammer improved	Marienfeld Laboratory, Marienfeld

Sterile epT.I.P.S 10µl, 20µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Tubes 0,2ml, 0,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg
Zeiss Axiovert 200 Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH
Eppendorf TransferMan NK 2	Eppendorf, Hamburg
Ariol SL-50	Applied Imaging/ A Genetix Company, New Milton, GB
Applied Imaging	Genetix, San Jose, USA
Rotfix 32 Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
Multifuge 3 S-R	Heraeus
ImageJ Version 1.49b	National Institutes of Health
Word2013, Excel2013, Paint	Microsoft Office
IBM SPSS Statistics	IBM Deutschland GmbH
Mathlab R2013a	The MathWorks GmbH
in-silico.net/tools/statistics/fisher_exact_test	Fisher's exact Test (Homepage vom August 2014)
epitools.ausvet.com.au/content.php?page=trend	Chi-Quadrat-Test für Trends (Homepage vom August 2014)

2.2 Immunfluoreszenz

2.2.1 Vorteile der Immunfluoreszenz

Das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion beruht darauf, dass die Oberfläche des Antigens spezifisch von einem Antikörper erkannt wird und anschließend bindet (69, 109, 110). Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen ist durch dieses Prinzip möglich. Die CTCs besitzen keine Eigenfluoreszenz und sind unter dem Mikroskop von den anderen Blutbestandteilen nicht zu unterscheiden. Aus diesem Grund werden Keratin-Antikörper verwendet, welche an Fluorochrome gekoppelt sind. Mit diesem Verfahren gelingt es, bei der Verwendung verschiedener Fluorochromfarben, mehrere Antigene pro Zelle zu markieren und so zu demarkieren (111).

Um den Nachweis mehrerer Antigene pro Zelle zu gewährleisten, wurde die Immunfluoreszenz gewählt. Fluoreszenz beschreibt die Fähigkeit eines Stoffes, bei Bestrahlung durch eine Lichtquelle zu leuchten. Die zugeführte Energie wird von einem Teil der Atome absorbiert und bewirkt eine Anregung in einen energiereicheren Zustand. Diese Energie wird in Form von Wärme, chemischer Energie oder elektromagnetischer Energie (Licht) wieder abgegeben. Stoffe mit dieser Eigenschaft nennt man Fluorochrome. Verschiedene Fluorochrome entsenden Licht spezifischer Wellenlänge, die für das menschliche Auge als Farbe sichtbar sind (112) oder aber im ultravioletten Licht nur durch spezielle Messgeräte oder Filter nachgewiesen werden können. Dadurch ist es möglich, verschiedene Fluorochrome voneinander abzugrenzen.

Der standardisierte Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Nachweis liefert eine höhere Reproduzierbarkeit als beispielsweise epitheliale Antigene (HEA), tumorassoziierte Glykoprotein-Antigene (TAG) oder epitheliale Membranantigene (Anti-EMA) (113, 114).

Für die Identifikation der Tumorzellen wurden Antikörper gegen Keratin verwendet. Dabei handelt es sich um die Pan-Keratin Antikörper C11, AE1 und AE3. Sie gehören zum Expressionsprofil epithelialer Tumorzellen und ihre Existenz wurde mehrfach in CTC nachgewiesen (93). Jedes Antigen besitzt ein spezifisches Verteilungsmuster und eine spezifische Lokalisation, die sie von den anderen Antigenen klar unterscheidet. Dies ermöglicht eine Identifikation und Überprüfung der Immunfluoreszenzmarkierung. Die Korrelation der Keratin-Antikörper ist tabellarisch in Tabelle 3.1 dargestellt und ermöglicht einen Überblick der Bindungsspezifität der vielfältigen Keratine (93).

Tabelle 2.1 Keratin-Antikörper und Charakterisierungsmöglichkeiten

<i>Keratin</i>	<i>Größe [kDa]</i>	<i>C11</i>	<i>AE1</i>	<i>AE3</i>
2	65,5			x
4	59	x		x
5	58	x		x
6	56	x		x
7	54			
8	52,5	x		
9	64		x	x
10	56,5	x	x	
13	53	x		
14	50		x	
15	49		x	
16	48		x	
18	45	x		
19	40		x	

Keratin 2,4-6,8-10,13-19

Die Keratine 2,4-6,8-10,13-19 gehören der Gruppe der Faserproteine an und lassen sich bezüglich ihrer α -Helix- oder β -Faltblatt-Konformität in α - und β - Keratine einteilen. Es sind etwa 20 Keratine bekannt. Unter anderem bilden diese das Zytoskelett der eukariotischen Zellen aus. Die Keratine 1-8 werden zur neutral-basischen Typ-A-Subfamilie, die Keratine 9-20 zur sauren Typ-B-Subfamilie gezählt (115).

DAPI

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA verwendet wird. Es lagert sich vor allem in adenin-/thymineichen Regionen an. Ferner kann sich DAPI an RNA anlagern. Durch ultraviolettes Licht wird es angeregt, besitzt sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358nm und Emissionsmaximum bei 461nm (DNA) und 500nm (RNA). Durch Filter kann man die DNA von der RNA unterscheiden (116).

SKBR-3

Die ER negative Brustkrebstumorzelllinie SKBR-3 wurde als Positivkontrolle für die Abfärbungen der Blutproben genutzt. Sie entstammen aus einem Pleura-Erguss eines metastasierten Adenokarzinoms der Brust. Die Zelllinie wurde vom American Type Culture Collection akquiriert und unter folgenden Bedingungen kultiviert:

SKBR-3 Zellen wurden in DMEM (E15-011, PAA Laboratories) bei 37 °C und 10% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mit 10% fetalem Rinderserum (E15-105, PAA Laboratories) ergänzt. Die Zellen sind in einen 75 cm² Behälter bis zum Zusammenfluss gewachsen. Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA (R001100, Gibco) geerntet, mit PBS (14190-094, Gibco) gewaschen und in 1xPBS für die Positivblutkontrolle resuspendiert.

2.2.2 Mikroskopie und Bildakquisition

Die Verwendung verschiedener Antigene sowie unterschiedlicher Fluorochrome stellte in dieser Arbeit einen besonderen Anspruch an die Mikroskopie und die nachfolgende Bildauswertung.

Ziel der Bildakquisition war der eindeutige Nachweis der Keratine innerhalb der Zellen und der dazugehörigen Kernfärbung. Es sollte die Existenz der Antigene, deren Lokalisation und Verteilungsmuster innerhalb der Zelle nachgewiesen und dokumentiert werden. Des Weiteren konnten die Zellen zur Entnahme eingestellt werden. Zur erweiterten Beurteilung dieser Kriterien kamen computergestützte Methoden zum Einsatz.

Zur Erregung (Exzitation) und Aussendung (Emission) des Fluoreszenzlichtes wurde für jede Fluorochromfarbe Licht einer definierten Wellenlänge benötigt. Um störende Wellenlängen zu blockieren, wurden verschiedene Filter verwendet. Es wurden entweder Einzelfilter, die selektiv für spezifisches Licht eines Fluorochroms/Farbspektrums waren, oder Bandfilter, die für mehrere Fluorochrome/Farbspektren geeignet waren, verwendet.

2.3 Methoden

2.3.1 Blutentnahme

Für die Arbeit wurden insgesamt 50 Patientinnen mit Mammakarzinom im Zeitraum von 2012 bis 2014 untersucht. Es wurden Blutproben von 31 Patientinnen mit neu diagnostizierten nicht metastasiertem Primärtumor und 19 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs entnommen. Insgesamt wurden 73 Blutproben entnommen. Allen metastasierten Patientinnen wurde vorab ein ER-positiver Primärtumor diagnostiziert. Die Blutentnahme erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE, Prof. Dr. Volkmar Müller). Die Patientinnen wurden im UKE nach internationalen Richtlinien therapiert. Die Aufklärung und Einwilligung der Patientinnen erfolgte schriftlich vor dem Beginn ihrer systemischen Therapie und Blutentnahme durch das ärztliche Personal. Die Auswertung der Blutproben erfolgte pseudonymisiert und ist von der Ethikkommission Ärztekammer Hamburg unter der Nummer OB/V/03 genehmigt. Nach der Einwilligung wurden 6 bis 15 ml Vollblut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Innerhalb von 24 Stunden wurde das Blut verarbeitet.

Die mediane Beobachtungszeit der Patientinnen beträgt 8 Monate (von 1-17 Monaten), beginnend nach der ersten Blutentnahme. Patienteninformationen sind in Tabelle 3.2 beschrieben.

Tabelle 2.2 M_0 - und M_1 -Kollektive unterteilt nach Risikofaktoren bei theoretisch nicht metastasierter Situation

Kriterium	niedriges Risiko	n	hohes Risiko	n
Alter	> 35 Jahre	46	≤ 35 Jahre	4
Tumorgröße	Primärtumor im Stadium T1/T2	42	Primärtumor im Stadium T3/T4	8
Nodalstatus	Keine Infiltration (N0)	22	Infiltration (N1-N3)	28
Fernmetastasenstatus	Keine Fernmetastasen (M0)	31	Fernmetastasen (M1)	19
Metastasierungsstatus	Keine Anzeichen (N0+M0)	21	Anzeichen (N1-3+M1)	18
Grading	Gemäß dem exakten Wert			
ER-Status	Negativ	0	Positiv	50
PR-Status	Negativ	8	Positiv	42
Her2-Status	Negativ		Positiv	
CA15-3 (kU/l)	< 35	4	≥ 35	12
CEA (µg/l)	< 5	3	≥ 5	2

Die klinischen Parameter der Patientinnen wurden in der gynäkologischen Tagesklinik des University Medical Center Hamburg-Eppendorf zusammengetragen. Das „n“ entspricht der jeweiligen Anzahl der Patientinnen, wobei einzelne Parameter nicht erhoben wurden, sodass „n“ nicht mit der Größe des Gesamtkollektivs übereinstimmen muss.

2.3.2 Blutfixierung

Die Aufarbeitung der Blutproben erfolgte in dem Institut für Tumorbologie des UKE mittels folgendem Protokoll:

Mononukleare Zellen wurden mit Ficoll Dichte Gradienten isoliert. Das Vollblut ist in einem 50 ml Röhrchen mit HBSS (L2045; Biochrom) auf 30 ml aufgefüllt worden. Die Probe wurde bei 400x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet ist abpipettiert und mit PBS (14190; Life Technologies) zu 30 ml resuspendiert worden. Zu der Suspension sind 20 ml Ficoll (17-1440-03; GE Healthcare) hinzugegeben worden. Die Probe wurde bei 400x g ohne Beschleunigung und Abbremsung 30 Minuten zentrifugiert.

Die Interphase, welche die monoklonalen Zellen beinhaltet (beispielsweise Leukozyten, Tumorzellen), wurde vorsichtig in ein weiteres 50 ml Röhrchen überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 400x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml H-Lysepuffer (WL1000; R&D Systems) lysiert. 30 ml PBS wurden hinzugefügt und 10 Minuten bei 400x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 10 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauer Zellkammer gezählt und ca. 500.000 Zellen wurden mit einer Cytospinzentrifuge in drei Minuten bei 170x g auf den Objektträger gebracht. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur für 24 Stunden getrocknet.

2.3.3 Probenfärbung

Das weitere Anfärben der Objektträger ist im Folgenden aufgeführt:

Die Proben wurden 10 Minuten mit 0.5% PFA fixiert, anschließend 3x3 min mit TBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen für 20 Minuten in einer 10%-AB-Serum-Lösung blockiert. Für die Färbung der Proben wurde ein Anti-Keratin-Cocktail mit folgenden Antikörpern benutzt: AE1/ AE3 (MAB1611, Millipore) (1:700), C11 (ab7753, Abcam) (1:300). Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:1000) angefärbt. Der restliche Cocktail wurde mit 10%-AB-Serum-Lösung aufgefüllt. Die Proben wurden 30 Minuten mit dem Anti-Keratin und der DAPI-Lösung in einer Dunkelkammer inkubiert. Nach der Färbung wurden die Objektträger 3x3 Minuten mit TBS gewaschen und mit Dako aqueous mounting (C0563, DAKO) medium eingedeckelt. Die Objektträger wurden im Verlauf der nächsten 72 Stunden mikroskopiert und ausgewertet.

Zusätzlich zu den Blutproben der Patientinnen wurde zu jeder Färbung eine mit Tumorzellen gespickte Positivkontrolle sowie eine von gesunden Probanden aufgearbeitete Negativkontrolle verwendet. Bei der Positivkontrolle wurden Tumorzellen der Zelllinie SKBR-3 verwendet.

2.3.4 Tumorzellentnahme und Speicherung

Ergänzend zur Mikroskopie erfolgte beim Auffinden einer zirkulierenden Tumorzelle eine einzelne Entnahme und Überführung vom Objektträger in einen 0,2ml Tube. Für das Entnehmen der Tumorzellen wurden die Koordinaten der Tumorzelle auf den Objektträgern mittels „England-Finder“(EF) festgehalten. Der EF ist ein Objektträger, welcher mit einem Koordinatennetz markiert ist und somit eine genaue Lokalisation ermöglicht. Nach dem Wiedereinstellen der Tumorzelle unter dem Zeiss Mikroskop wurde mittels Glaskapillare die Zelle entnommen. Dafür wurde der Eppendorf TransferMan NK2 verwendet. Die Tumorzelle wurde anschließend in den Tube mit einem Cell Extraction Buffer-Tropfen (E2620L, New England Biolabs) überführt.

Die Speicherung der Tumorzelle erfolgt bei einer Lagerung bei minus 80°C um für eine spätere genetische Analyse erhalten zu bleiben.

2.3.5 Statistische Auswertung

Zur Beschreibung des Kollektivs der Patientinnen wurden mehrere Faktoren wie Durchschnittsalter, zirkulierende Tumorzellen pro Milliliter Blut, Patientinnensubgruppierungen nach TNM-Klassifikationskriterien und Grading dokumentiert. Auf Grund der Bildung relativ kleiner Untergruppen erfolgte die Auswertung der Daten mittels Exakter Test nach Fisher (Fisher's exact test). Durch die Verwendung dieser Testung ist ein Häufigkeits-Vergleich bei geringer Beobachtungszahl sehr aussagekräftig. Bei allen Ergebnissen wurde ein zweistelliger p-Wert berechnet und ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Darüber hinaus wurde der Kappa Koeffizient verwendet um eine Korrelation der Verlaufskontrollen zu gewährleisten.

Für die Berechnung der jeweiligen Werte wurden unterschiedliche Programme verwendet. Beim Fisher's exact test wurde die Website (zuletzt im August 2014 überprüft) http://in-silico.net/tools/statistics/fisher_exact_test verwendet. Der Kappa Koeffizient wurde mittels Mathlab R2013a berechnet.

Im Zusammenhang mit dem Trend der Tumorstadien und dem Auffinden der zirkulierenden Tumorzellen wurde der Chi-Quadrat-Test für Trends verwendet. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mittels Online-Rechner (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=trend>; zuletzt im August 2014 überprüft).

3 Ergebnisse

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Blutuntersuchungen von metastasierten und nicht metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen dargestellt. Zuerst erfolgt eine Zusammenstellung der Gesamtergebnisse, die im Verlauf in die jeweiligen Kohorten unterteilt näher betrachtet werden.

3.1 Gesamtergebnisse

Insgesamt wurden 73 Blutproben von 50 pseudonymisierten Patientinnen untersucht. Bei zwölf Patientinnen erfolgte wiederholt über einen längeren Zeitraum die Entnahme von Blutproben. In 21 Proben (30% aller Proben) wurden CTCs mit einem Mittelwert von 4 CTC /7,5ml EDTA Vollblut mittels Anti-Keratin Cocktail gefunden. Bei zwei Blutproben wurde die CellSearch- Methode verwendet, da das EDTA-Blut nicht verarbeitet werden konnte. Die per Ariol-Methode gefunden CTC wurden in der manuellen Mikroskopie anschließend überprüft und einzeln gepickt.

Vergleicht man die Stadien einer Metastasierung mit den primär nicht metastasierten Patientinnen, so waren in der metastasierten Kohorte 13 von 19 (63,2%) und bei den primär nicht metastasierten 4 von 31 (12,9%) Patientinnen CTC-positiv. Das mediane Erkrankungsalter lag bei 64 Jahren und entspricht dem deutschen medianen Erkrankungsalter bei Erstdiagnose. Bei dem überwiegenden Anteil der Patientinnen wurde eine Tumorgroße von T1 (44%) gefunden, bei 56% waren bereits die Lymphknoten befallen. Insgesamt betrug das mittlere Tumorgading (Grade 2) 52% an dem Gesamtkollektiv. Auf Grund der selektiven Auswahl der Patientinnen, wiesen alle Fälle einen ER positivem Status auf. Ferner waren 84% bzw. 22% zusätzlich Progesteronrezeptor bzw. HER2- Status positiv.

Eine Übersicht der genaueren Aufteilung der Kollektive sowie eine Darstellung der gefundenen zirkulierenden Tumorzellen ist Tabelle 4.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1 Zusammenfassung der CTC und allgemeinen Merkmalen der M₀ und M₁ Patientinnen

<i>Merkmal</i>	<i>Anzahl der Patientinnen (Anteil in %)</i>	<i>CTC-positiv (Anteil in %)</i>
<i>Alter Primärdiagnose:</i>		
20-35 Jahre	5 (10%)	3 (6%)
36-50 Jahre	10 (20%)	4 (8%)
51-65 Jahre	13 (26%)	4 (8%)
66-75 Jahre	16 (32%)	4 (8%)
>75 Jahre	6 (12%)	2 (4%)
<i>T-Stadium:</i>		
T1	22 (44%)	4 (8%)
T2	20 (40%)	9 (18%)
T3/4	8 (16%)	5 (10%)
<i>N-Stadium:</i>		
N0	22 (44%)	4 (8%)
N1	21 (42%)	8 (16%)
N2/3	7 (14%)	5 (10%)
<i>M-Stadium:</i>		
M0	31 (62%)	4 (8%)
M1	19 (38%)	13 (26%)
<i>Grading:</i>		
G1	4 (8%)	2 (4%)
G2	26 (52%)	9 (18%)
G3	15 (30%)	4 (8%)
<i>Hormonrezeptorstatus:</i>		
ER positiv	50 (100%)	17 (34%)
PR positiv	42 (84%)	13 (26%)
Her2 positiv	11 (22%)	4 (8%)

Zusätzlich wurden die Patientinnen mit metastasiertem und nicht metastasiertem Mammakarzinom in die Stadien der UICC eingeteilt. Auf diese Weise wurden drei Gruppen gemäß der jeweiligen UICC-Klassifikation abgeleitet. Das Stadium wurde zur jeweiligen Blutentnahme berücksichtigt. Diese Darstellung ist Tabelle 4.2 zu entnehmen. Die Zuteilung des jeweiligen Stadiums in Korrelation mit dem CTC auffinden ist statistisch signifikant mittels Fisher's exact test ($p= 0.0008$). Damit wird impliziert, dass man einen Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und dem Auffinden von zirkulierenden Tumorzellen erwartet.

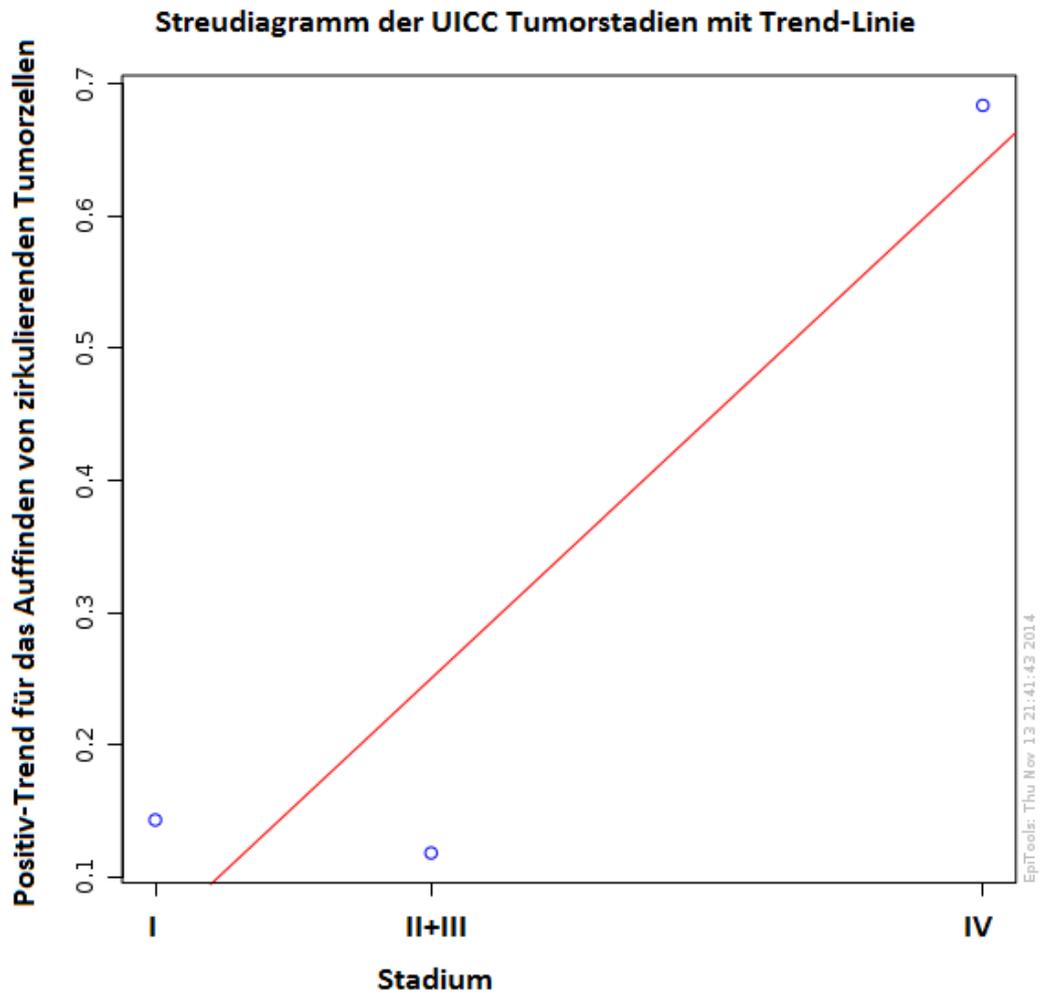
Setzt man den Nachweis von CTC in Bezug zum Staging, kann man mit steigendem Tumorstadium eine zunehmende CTC-Rate festhalten. Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 4.1 verdeutlicht. Der hierfür verwendete Chi-Quadrat-Test für Trends mit einem Konfidenzintervall von 0.95 ergab einen signifikanten linearen Zusammenhang ($p= 0.0002$).

Tabelle 3.2 Zusammenfassung der CTC-Ergebnisse und Stadien der Patientinnen mit primärem und metastasiertem Mammakarzinom

Stadium	CTC-positiv (Anteil in %)	CTC-negativ (Anteil in %)	Patientinnen gesamt (Anteil in %)
I	2 (4%)	12 (24%)	14 (28%)
II+III	2 (4%)	15 (30%)	13 (34%)
IV	13 (26%)	6 (12%)	19 (38%)

p-Wert = 0,0008

Abbildung 3.1 Chi-Quadrat-Test für Trends in Bezug auf Tumorstadium und dem Auffinden von CTC



Chi-Quadrat-Test für Trends

	Chi-Quadrat Statistik	Freiheitsgrade	p-Wert	Steigung
Pearsons' Chi-Quadrat	16,2021	2	0,0003	
Chi-Quadrat für Steigung (Linearer Trend)	14,2472	1	0,0002	0,2018
Chi-Quadrat für nicht linearen Trend	1,9549	1	0,1621	

Datenzusammenfassung für die Berechnung des Chi-Quadrat-Test für Trends

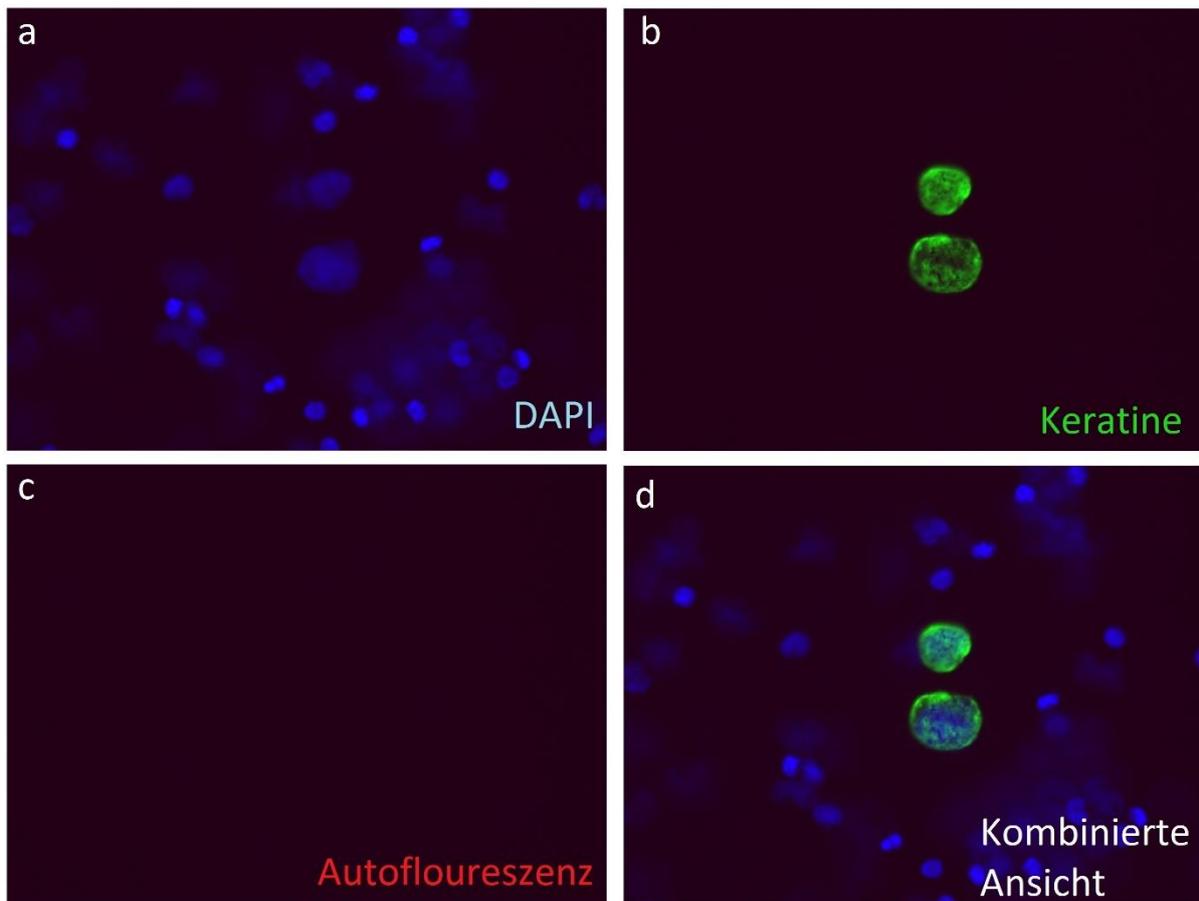
Stadium	CTC pos.	CTC neg.	Gesamt	Positiv-Trend für CTC
I	2	12	14	0,143
II+III	2	15	17	0,118
IV	13	6	19	0,684
Gesamt	17	33	50	0,340

In Anbetracht der gezeigten Ergebnisse erscheint ein grundsätzlicher Zusammenhang zwischen Tumorzellen und Stadium des diagnostizierten Mammakarzinoms zu bestehen. Bereits vorausgehend wurde beispielsweise in einer Studie von Schindlbeck et al. gezeigt, dass das Tumorstadium des diagnostizierten Brustkrebses mit dem Auffinden von CTC in Abhängigkeit gesetzt werden kann (117).

3.2 Ergebnisse der Mikroskopie

In diesem Abschnitt sollen exemplarisch die gefunden zirkulierenden Tumorzellen nach Anfärben mittels Anti-Keratin-Cocktails gezeigt werden. Die Bilder sind in den Einzelfiltern als Foto dokumentiert und wurden anschließend mit Hilfe des Programms „ImageJ“ zusammengefügt. Die nachfolgenden Bilder entstammen der metastasierten Patientinnen-Gruppe. Als Beispiel dient Patientin 34.

Abbildung 3.2 a-d CTC einer metastasierten Patientin unterm Mikroskop



Die Abbildung 4.2.a entspricht der Ansicht für Kernfärbung (DAPI), die Abbildung 4.2.b den Keratinen (AlexaFlour 488). In der Abbildung 4.2.c ist als Kontrolle eine Autofluoreszenz (TexasRed) ausgeschlossen worden. In der letzten Abbildung 4.2.d sieht man die Filter übereinander gelegt. In diesem Beispiel werden zwei der insgesamt fünf gefundenen CTC der Patientin 34 grün dargestellt.

In den nächsten Abschnitten soll weiterführend untersucht werden, inwiefern die Zusammenhänge zwischen zirkulierender Tumorzellen und den klinischen Parametern weiter korrelieren. Hierfür erfolgt eine genauere Betrachtung der zwei Kohorten aus metastasierten und nicht metastasierten Brustkrebspatientinnen. Die Kollektive bestehen zum einen aus 31 primären Mammakarzinom-Patientinnen, vor adjuvanter bzw. neoadjuvanter Therapie. Das andere Kollektiv besteht aus 19 Patientinnen im metastasierten Stadium. Es erfolgte die Untersuchung der Blutproben vor adjuvanter bzw. palliativer Therapie und im Verlauf (englisch = „Follow-up“).

3.3 Ergebnisse bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

Die Gruppe der primären Mammakarzinom-Patientinnen stellt das größte Kollektiv dar. Alle 31 Patientinnen waren Östrogenrezeptor positiv und vor adjuvanter bzw. neoadjuvanter Therapiesituation. Insgesamt wurden bei vier Patientinnen (12,9%) zirkulierende Tumorzellen gefunden. Es zeigten sich in den vier Proben 1-5 CTC pro 15ml untersuchtes EDTA-Blut.

Bei Patientin 23 wurde ein beidseitiges Mammakarzinom diagnostiziert, welches sich histologisch im HER2 Rezeptor unterscheidet.

Die Ergebnisse der Patientinnen mit primärem Brustkrebs sind in Tabelle 4.3 veranschaulicht.

Tabelle 3.3 Zusammenfassung der M₀ - Patientinnen

Patient	Alter	pTNM	Grading	ER	PR	HER2	CTC	Therapie
1	75	cT1b, cN0, M0	G2	pos.	pos.	neg.	5	BET li. RAD., AI + Tam.
2	83	pT2, pN1a, M0	G3	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., AI + Tam.
3	88	rpT2, cN0, M0	-	pos.	neg.	pos.	1	Abl. li., AI
4	74	pT2, pN0, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	Mod. Mast. li, RAD., AI
5	75	pT2, pN1, M0	G3	pos.	pos.	neg.	0	Mod. Mast. li, RAD., AI
6	51	pT1c, pN1a, M0	G3	pos.	pos.	pos.	0	BET li., CHE
7	66	rpT1a, pN0, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	Mod. Mast. li, Abl. Re., RAD., AI
8	58	pT1c, pN0, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	Mod. Mast. li, RAD., AI
9	56	pT1c, pN3a, M0	G3	pos.	pos.	neg.	0	RAD, AI, CHE
10	30	pT1c, pN0, M0	G3	pos.	pos.	pos.	0	BET, CHE
11	77	pT1c, pN0, M0	G3	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., AI + Tam.
12	65	pT2, pN0, M0	G3	pos.	neg.	pos.	0	BET, RAD
13	66	pT1c, pN0, M0	-	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., AI + Tam.
14	71	pT1c, pN0, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., Tam.
15	65	pT1b, pN0, M0	G1	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., Tam.
16	68	pT1c, pN1a, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	Abl, re., AI + Tam.
17	70	pT2, Pn2a, M0	G3	pos.	pos.	neg.	0	BET, RAD, CHE, AI+Tam.
18	64	pT3, pN0, M0	-	pos.	pos.	neg.	0	BET, AI + Tam.

19	42	pT1a, cN0, M0	G1	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., Tam.
20	56	pT1b, pN0, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	BET re. RAD., AI + Tam.
21	73	pT1c, pN0, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	BET re. RAD., AI + Tam.
22	46	pT2, pN0, M0	G1	pos.	pos.	neg.	1	BET re. RAD., Tam.
23	64	Mamma-Ca links: pT2, pN1a, M0	G2	pos.	pos.	pos.	0	BET bds. RAD., AI + Tam.
		Mamma-Ca rechts: pT2, pN2a, M0	G2	pos.	pos.	neg.		
24	80	pT2, pN1a, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	BET re. RAD., AI + Tam.
25	63	pT3, pN1a, M0	G2	pos.	pos.	-	0	Abl. Li., RAD, AI + Tam.
26	47	cT2, cN0, M0	-	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., Tam.
27	50	pT1b, pN0, M0	G3	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., Tam.
28	74	pT2, pN1a, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., Tam.
29	74	pT2, pN0, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., Tam.
30	56	pT1c, pN0, M0	G1	pos.	pos.	neg.	1	BET re. RAD., Tam.
31	72	pT1c, pN0, M0	G2	pos.	pos.	neg.	0	BET li. RAD., Tam.

BET = Brusterhaltende Therapie, RAD = Radiotherapie/ Bestrahlung, AI = Aromatase Inhibitor, Tam = Tamoxifen, li. = links, re. = rechts, bds. = beidseits Mod. Mast. = modifizierte Mastektomie, Abl. = Ablatio, CHE = Chemotherapie

Ferner wurden die primären Mammakarzinom-Patientinnen in die klinischen Parameter eingeteilt. Zum einen wurden sie auf das Grading, den TNM-Status und Rezeptorstatus mittels Fisher's exact test untersucht. Diese Darstellung ist Tabelle 4.4 mit dem jeweiligen p-Wert zu entnehmen.

Setzt man den Nachweis von CTC in Bezug zu diesen Parametern, kann man keinen statistischen Zusammenhang zwischen TumorgroÙe, Lymphknotenstatus und Rezeptorstatus feststellen. Nur in Bezug auf das Grading ist ein Zusammenhang erkennbar.

Tabelle 3.4 Zusammenfassung der CTC in Bezug auf TNM-Status, Grading und Rezeptorstatus bei M_0 -Patientinnen und dazugehörigen p-Werten

<i>T-Status</i>	<i>CTC-positiv</i>	<i>CTC-negativ</i>	<i>Patientinnen gesamt</i>
<i>T1</i>	2	15	17
<i>T2</i>	2	10	12
<i>T3</i>	0	2	2
<i>T4</i>	0	0	0

p-Wert = 0,7147

<i>T-Status</i>	<i>CTC-positiv</i>	<i>CTC-negativ</i>	<i>Patientinnen gesamt</i>
<i>T1-T2</i>	4	25	17
<i>T3-T4</i>	0	2	12

p-Wert >0,9999

<i>N-Status</i>	<i>CTC-positiv</i>	<i>CTC-negativ</i>	<i>Patientinnen gesamt</i>
<i>N0</i>	4	17	21
<i>N1-3</i>	0	10	10

p-Wert = 0,277

<i>Grading</i>	<i>CTC-positiv</i>	<i>CTC-negativ</i>	<i>Patientinnen gesamt</i>
1	2	2	4
2	1	13	14
3	0	9	9
<i>unbekannt</i>	1	3	4

p-Wert = 0,0485

<i>PR</i>	<i>CTC-positiv</i>	<i>CTC-negativ</i>	<i>Patientinnen gesamt</i>
<i>pos</i>	3	26	29
<i>neg</i>	1	1	2

p-Wert = 0,2452

<i>Her2/neu</i>	<i>CTC-positiv</i>	<i>CTC-negativ</i>	<i>Patientinnen gesamt</i>
<i>pos</i>	1	4	5
<i>neg</i>	3	22	25
<i>unbekannt</i>	0	1	1

p-Wert = 0,5384

T-Stadium:

Die Untersuchung der zirkulierenden Tumorzellen im Blut zeigte in Bezug auf das T-Stadium nur bei den Patientinnen mit einem verhältnismäßig frühen Stadium $T \leq 2$ Tumorzellen. Statistisch ausgewertet mittels Fisher's exact test ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ($p = 0,7147$ bzw. $p > 0,9999$).

N-Status:

Vergleicht man nun das Auffinden von CTC mit dem Nodalstatus der Patientinnen, so ergibt sich folgendes Bild: Die zirkulierenden Tumorzellen sind nur bei negativem Lymphknotenbefall des Primärtumors gefunden worden. Alle vier CTC-positiven Proben waren N0. Auch bei diesem konventionellen Parameter konnte statistisch mittels Fisher's exact test kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,277$).

Grading:

Vier Patientinnen mussten hierbei ausgeschlossen werden, da keine Angaben zum Grading vorlagen. Die Ergebnisse für die restlichen Patientinnen ergaben, dass eine schlechtere Differenzierung des Tumors (Grade 3) mit einem selteneren Auffinden von CTC einhergeht. So finden sich die meisten CTC bei einem gut differenzierten Tumor (Grade 1). Statistisch ausgewertet mittels Fisher's exact test ist dieser Unterschied signifikant ($p= 0,0485$).

Hormonrezeptorstatus:

In Bezug auf den Progesteron- und Her2/neu-Rezeptorstatus gibt es gegensätzliche Tendenzen. Das Auffinden von zirkulierenden Tumorzellen ist wahrscheinlicher mit dem Vorhandensein eines Progesteronrezeptors und geht mit der Abwesenheit eines Her2/neu Rezeptors einher. In beiden Fällen sind die Zusammenhänge mittels Fisher's exact test nicht signifikant. Der p-Wert für den Progesteronrezeptor ist $p= 0,2452$ und für den HER2-Rezeptor $p= 0,5384$.

Zusammenfassung

Fasst man die Ergebnisse bezüglich des Nachweises von zirkulierenden Tumorzellen im Blut zusammen, so ergibt sich nur des Grading eine statistisch signifikante Korrelation. Die anderen histologischen Parameter des Primärtumors konnten in keinen statistisch signifikanten Zusammenhang gebracht werden. Trotzdem kann eine Tendenz, wenn auch nicht signifikant, bei diesen Parametern angedeutet werden. In Anbetracht der relativ geringen Patientenzahl (31 Fälle), sollte der Aussagekraft der Ergebnisse kritisch gegenüber gestanden werden. Weitere Zusammenhänge sollten in größeren Studien abgewartet werden.

3.4 Ergebnisse bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom

Die Gruppe der metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen stellt das kleinere Kollektiv dar. Alle 19 Patientinnen wiesen einen Östrogenrezeptor positiven Primärtumor auf. Die erste Blutprobe wurde vor neuer systemischer adjuvanter bzw. palliativer Therapie entnommen. Insgesamt konnten bei 13 Patientinnen (63,2%) zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden. In den untersuchten Blutproben sind zwischen einer und 153 CTC pro 15ml EDTA-Blut isoliert worden. Es wurde in Einzelfällen bis zu vier Blutproben von einer Patientin entnommen. In der Spalte mit den „CTC“ sind die Verlaufskontrollen mit dargestellt, so wurden beispielsweise bei Patientin 41 bei der ersten Blutuntersuchung 31, in der zweiten und dritten Untersuchung keine und in der vierten Blutprobe acht zirkulierende Tumorzellen gefunden. Ferner gab es bei acht Fällen nur die einmalige Möglichkeit, eine Blutentnahme durchzuführen. Die Ergebnisse der Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs sind in Tabelle 4.5 veranschaulicht. Der Rezeptorstatus bezieht sich jeweils auf den Primärtumor der Patientinnen. In der Tabelle ist der Tumormarker CA15-3 jeweils vor der systemischen Therapie der Patientinnen angegeben.

Im gesamten Beobachtungszeitraum ist eine der metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen verstorben.

Tabelle 3.5 Zusammenfassung der M₁ - Patientinnen

Patient	Alter	pTNM	Grading	ER	PR	HER2	CA15-3 [kU/l]	CTC
32	43	pT2, cN1, M1	G3	pos.	pos.	neg.	23,8	4/2/6/0
33	54	pT4, pN2, M1	G3	pos.	pos.	neg.	102,2	153
34	42	pT1, pN1a, M1	G2	pos.	pos.	pos.	39,9	5/0/0/1
35	35	cT2, cN1, M1	G2	pos.	pos.	pos.	31,4	2/136/0
36	73	pT2, pN1b, M1	G2	pos.	neg.	neg.	28,6	1/0
37	33	cT3, cN1, M1	G3	pos.	pos.	pos.	402,3	0/0/0
38	54	cT4c, cN1, M1	G2	pos.	pos.	neg.	548,4	9/0/0/0
39	49	pT1c, pN1mi, M1	G2	pos.	neg.	neg.	35,8	0/0/0
40	68	pT3, pN3a, M1	G2	pos.	pos.	neg.	134,8	10/39

41	34	cT2m, cN1, cM1	G3	pos.	pos.	neg.	36,8	31/0/0/8
42	66	pT1c, N0, M1	G3	pos.	pos.	neg.	91,3	0/0
43	47	pT3, pN2a, M1	G2	pos.	pos.	neg.	-	15/0
44	79	cT2, cN1, M1	-	pos.	pos.	pos.	-	8
45	39	pT1c, pN1a, M1	G2	pos.	neg.	pos.	39,0	0/0
46	32	cT4, cN1, M1	G3	pos.	neg.	neg.	68,9	1
47	66	pT2, pN2a, M1	G2	pos.	neg.	neg.	54,8	3
48	52	pT2, pN2a, M1	G2	pos.	pos.	neg.	22,6	5
49	76	cT2, cN1, M1	G2	pos.	pos.	pos.	40,3	0
50	40	pT1a, pN1b, M1	G2	pos.	neg.	neg.	-	0

Patient

Therapie

32	Paclitaxel + Avastin, Z.n. Abl. + CHE, RAD.
33	Taxol, Herceptin, Pertuzumab
34	Docetaxel + Hereceptin + Pertuzumab Z.n. Abl. Li + CHE, RAD.
35	Paclitaxal + Trastuzumab + Pertuzumab
36	AI+ XGEVA®, Z.n. Abl. li. + Tam., RAD
37	Paclitaxal + Trastuzumab + Pertuzumab
38	AI, Z.n. CHE + AI + Tam., RAD
39	Capecitabine + Avastin + XGEVA®, Z.n. BET + RAD
40	Paclitaxel + Avastin, Z.n. Abl. re.
41	Paclitaxel + Avastin, Z.n. BET + RAD + AI + Tam
42	AI, Z.n. BET + RAD
43	AI, Z.n. Abl. re., RAD
44	AI + XGEVA®
45	Docetaxel + Trastuzumab + Pertuzumab + XGEVA®, Z.n. Abl. re., RAD
46	Paclitaxel + Pertuzumab + Avastin + XGEVA®
47	Paclitaxel+ XGEVA®, Z.n. Abl. re. + BET li., RAD
48	AI + XGEVA®, Z.n. BET + CHE + AI + Tam.
49	AI + XGEVA®
50	AI, Z.n. Mod. Mast. + CHE

Die Spalte mit den CTC gibt die jeweilige Anzahl der gefundenen zirkulierenden Tumorzellen in den einzelnen Blutentnahmen wieder. So wurden beispielsweise bei Patientin 41 bei der ersten Blutentnahme 31 CTCs gefunden, in den zwei darauffolgenden keine und in der vierten Untersuchung acht zirkulierende Tumorzellen.

In der folgenden Tabelle 4.6 sind die Verlaufsentnahmen aufgeführt. Die wiederholten Entnahmen haben zu unterschiedlichen Zeitpunkten der systemischen Therapie stattgefunden. Die zeitlichen Abstände der Blutentnahme variieren logistisch bedingt von 3 bis 225 Tagen stark. Diese Zeiträume sind in Tagen in der Tabelle dargestellt. In vier Verlaufskontrollen wurden keine CTC gefunden, obwohl ein klinischer Progress, wie bei beispielsweise Patientin 39, dokumentiert wurde. Bei Patientin 35 ist der höchste Anstieg von 2 auf 136 CTC zu beobachten, wobei auch ein starker Abfall dieser in der anschließenden Untersuchung folgte. Ein CellSearch-Ergebnis ist bei Patientin 40 beschrieben, wo 39 CTC gefunden wurden. Bemerkenswert ist Patientin 32, wo trotz stark schwankender CA15-3 Werte nur eine geringe CTC Zahl und Veränderung zu beobachten ist. Während die erste Blutentnahme stets vor Beginn der neuen systemischen Therapie stattgefunden hat, sind die weiteren Verlaufskontrollen während der Therapiezyklen der Patientin abgenommen worden.

Tabelle 3.6 Zusammenfassung der Verlaufskontrollen bei den M₁ - Patientinnen

Patient	Blutentnahme	Zeitraum [Tage]	CTC	CA15-3 [kU/l]	CEA [µg/l]	CT-Untersuchung
32	1	-	4	3368	-	ED Metastasen
	2	169	2	168	-	Regress
	3	174	6	2760	-	Progress
	4	48	0	1107	-	-
34	1	-	5	40	-	ED Metastasen
	2	149	0	15	-	Progress
	3	215	0	17	-	Stable Disease
	4	85	1	-	-	Progress
35	1	-	2	31	1	ED Metastasen
	2	225	136	-	-	Stable Disease
	3	136	0	-	-	Stable Disease

36	1	-	1	29	-	ED Metastasen
	2	196	0	37	-	Stable Disease
37	1	-	0	402	553	ED Metastasen
	2	78	0	47	74	Regress
	3	166	0	16	-	Stable Disease
38	1	-	9	548	-	Progress
	2	68	0	-	-	-
	3	84	0	-	-	Stable Disease
	4	28	0	158	-	-
39	1	-	0	xx	-	ED Metastasen
	2	144	0	10	-	Progress
	3	51	0	85	-	Progress
40	1	-	10	135	-	ED Metastasen
	2	20	39	-	-	-
41	1	-	31	39	70	ED Metastasen
	2	82	0	40	-	Stable Disease
	3	3	0	32	7	-
	4	104	8	42	39	Progress
42	1	-	0	91	-	ED Metastasen
	2	85	0	125	-	Progress
43	1	-	15	-	-	ED Metastasen
	2	95	0	-	-	Regress
45	1	-	0	124	-	ED Metastasen
	2	126	0	28	-	-

„-“ = keine Angaben, ED = Erstdiagnose

In der nachfolgenden Tabellen 4.7 sind die metastasierten Mammakarzinom-Fälle hinsichtlich des TNM-Status, Grading, Hormonrezeptorstatus sowie der Anzahl an unterschiedlichen Metastasierungsorten aufgeführt. Die Berechnung der jeweiligen p-Werte erfolgte jeweils mittels Fisher's exact test.

Tabelle 3.7 Zusammenfassung der CTC in Bezug auf TNM-Status, Grading und Rezeptorstatus bei M₁ - Patientinnen und dazugehörigen p-Werten

T-Status	CTC-positiv	CTC-negativ	Patientinnen gesamt
T1	2	3	5
T2	7	1	8
T3	2	1	3
T4	3	0	3

p-Wert = 0,135

N-Status	CTC-positiv	CTC-negativ	Patientinnen gesamt
N0	0	1	1
N1	8	5	13
N2	4	0	4
N3	1	0	1

p-Wert = 0,1567

Grading	CTC-positiv	CTC-negativ	Patientinnen gesamt
1	0	0	0
2	8	4	12
3	4	2	6
unbekannt	1	0	1

p-Wert = 0,6

PR	CTC-positiv	CTC-negativ	Patientinnen gesamt
pos	10	3	13
neg	3	3	6

p-Wert = 0,3201

<i>Her2/neu</i>	<i>CTC-positiv</i>	<i>CTC-negativ</i>	<i>Patientinnen gesamt</i>
<i>pos</i>	3	3	6
<i>neg</i>	10	3	13

p-Wert = 0,3201

<i>Metastasen- Lokalisation</i>	<i>CTC-positiv</i>	<i>CTC-negativ</i>	<i>Patientinnen gesamt</i>
<i>I</i>	5	3	8
<i>II</i>	5	3	8
<i>III</i>	3	0	3

p-Wert = 0,6533

T-Stadium:

Für die Korrelation der zirkulierenden Tumorzellen im Blut zeigten sich in Bezug auf das T-Stadium vor allem bei den Patientinnen mit einem verhältnismäßig frühen Stadium $T \leq 2$ Tumorzellen. Dieser Ansatz wurde bereits bei den primär nicht Metastasierten aufgezeigt. Es fällt allerdings im Gegensatz dazu auf, dass alle T4 und 66% der T3 Patientinnen CTC positiv sind. Statistisch ausgewertet mittels Fisher's exact test ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ($p=0,135$).

N-Status:

Die Untersuchung der zirkulierenden Tumorzellen im Vergleich mit dem Nodalstatus der Patientinnen, ergibt folgendes Bild: Die zirkulierenden Tumorzellen sind nur bei positivem Lymphknotenbefall des Primärtumors gefunden worden. Die Zunahme der metastasierten Lymphknotenregionen erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, dass CTC zu finden sind. Auch bei diesem konventionellen Parameter ist statistisch mittels Fisher's exact test ausgewertet worden. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,1567$).

Grading:

Eine Patientin musste von dieser Klassifikation ausgeschlossen werden, da keine Angaben zum Grading vorlagen. Bei den restlichen 18 Patientinnen konnte mittels der histologischen Differenzierung des Tumors keine Tendenz festgestellt werden. Hierbei ist zu beachten, dass es keine gut differenzierten Tumore (Grade 1) gab. In der Gruppe für die mäßig bis schlecht differenzierten (Grade 2+3) finden sich in jeweils 50% der Fälle CTC. In der statistischen Berechnung durch den Fisher's exact test ist dieser Unterschied nicht signifikant ($p=0,6$).

Hormonrezeptorstatus:

Die Begutachtung des Progesteron- und HER2-Rezeptorstatus gibt hinsichtlich der zirkulierenden Tumorzellen gegensätzliche Ergebnisse. Während die Wahrscheinlichkeit von zirkulierenden Tumorzellen vor allem mit dem Vorhandensein des Progesteronrezeptors einhergeht, ist es wahrscheinlicher CTC zu finden, wenn der HER2-Rezeptorstatus negativ ist. Allerdings ist bei der statistischen Untersuchung der Zusammenhang von Hormonrezeptor und zirkulierenden Tumorzellen nicht signifikant. Der p-Wert, mittels Fisher's exact test berechnet, beträgt für beide Rezeptoramplifikationen jeweils $p=0,3201$.

Metastasen-Lokalisation:

Die Einteilung in die Metastasen-Lokalisation-Gruppen erfolgte mittels der Anzahl der unterschiedlichen, bekannten Metastasierungen. Beispielsweise gehört eine bekannte Metastasierung in Lunge Gruppe I, die Metastasen in den Knochen und Leber der Gruppe II an. Dabei ist es unerheblich, wie viele Metastasen in Lunge, Knochen oder Leber bekannt sind. Die zunehmende Anzahl der Lokalisationen der Metastasen macht das Auffinden zirkulierender Tumorzellen wahrscheinlicher. So sind bei allen drei Patientinnen mit mehr als zwei Metastasierungsstellen auch zirkulierende Tumorzellen gefunden worden. Der Unterschied in der Anzahl der Lokalisationen ist, berechnet mit dem Fisher's exact test, nicht signifikant ($p=0,6553$).

In dem nun folgenden Abschnitt werden die Verlaufskontrollen der CTC positiven metastasierten Patientinnen mit den klassischen Tumormarkern CA15-3 und CEA sowie mit Computertomographie-Untersuchungen (CT-Scan) korreliert. Vier Patientinnen wiesen in ihren Blutentnahmen keine CTC auf und wurden im Folgenden nicht berücksichtigt. Da des Weiteren die Tendenzen der CA15-3 und CEA-Veränderungen identisch waren, wurden sie in den folgenden Tabellen

zusammengefasst und nicht getrennt aufgelistet. Die Veränderungen sind in der Tabelle 4.8 veranschaulicht. Es wurden die Gesamtproben, die Veränderungen von der ersten Blutentnahme zur zweiten Blutentnahme sowie die erste Blutentnahme als eigenständiger Wert dargestellt und untersucht. Dabei erfolgte die Unterteilung in zwei Gruppen, zum einen Patientinnen mit einem Progress im CT-Scan und zum anderen mit einer Remission bzw. unverändertem Zustand (Stable Disease nach RECIST). Eine Einteilung mittels RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) soll eine objektive Beurteilung für das Ansprechen einer Therapie ermöglichen.

Tabelle 3.8 Zusammenfassung der CTC Veränderungen in Abhängigkeit von CT-Untersuchungen bzw. CA15-3 Kontrollen bei CTC positiven Patientinnen

Zusammenfassung der Gesamtproben in Bezug auf die CT-Untersuchung

	<i>CT-Scan Progress</i>	<i>CT-Scan Remission/Stable Disease</i>	<i>Proben gesamt</i>
<i>CTC Anstieg</i>	16	1	17
<i>CTC Abnahme</i>	0	9	9

Kappa (K) = 0,9172, p-Wert < 0,0001

Ergebnisse zwischen erster und zweiter Blutentnahme

	<i>CT-Scan Progress</i>	<i>CT-Scan Remission/Stable Disease</i>	<i>Proben gesamt</i>
<i>CTC Anstieg</i>	0	1	1
<i>CTC Abnahme</i>	0	6	6

p-Wert nicht berechenbar

Ergebnisse der ersten Blutentnahme

	<i>CT-Scan Progress</i>	<i>CT-Scan Remission/Stable Disease</i>	<i>Proben gesamt</i>
<i>CTC Anstieg</i>	13	0	13
<i>CTC Abnahme</i>	0	0	0

p-Wert nicht berechenbar

Zusammenfassung der Gesamtproben abhängig von den CA15-3 Werten

	<i>CA15-3 Anstieg</i>	<i>CA15-3 Abnahme</i>	<i>Proben gesamt</i>
<i>CTC Anstieg</i>	10	3	13
<i>CTC Abnahme</i>	1	7	8

Kappa (K) = 0,6147, p-Wert = 0,0075

Ergebnisse zwischen erster und zweiter Blutentnahme

	<i>CA15-3 Anstieg</i>	<i>CA15-3 Abnahme</i>	<i>Proben gesamt</i>
<i>CTC Anstieg</i>	0	0	0
<i>CTC Abnahme</i>	0	4	4

p-Wert nicht berechenbar

Ergebnisse zur ersten Blutentnahme

	CA15-3 ≥ 35kU/l	CA15-3 < 35kU/l	Proben gesamt
CTC Anstieg	8	3	12
CTC Abnahme	0	0	0

p-Wert nicht berechenbar

CTC in Korrelation mit CT-Scan:

Die Untersuchung der zirkulierenden Tumorzellen im Blut in Abhängigkeit zu den CT-Untersuchungen ergab mehrere Ergebnisse. Erstens konnte in der Gesamtbetrachtung der Blutproben bei den CTC positiven metastasierten Patientinnen ein Zusammenhang mit den Veränderungen der zirkulierenden Tumorzellen und den CT-Scans gestellt werden. Bei einem Anstieg der gefundenen Tumorzellen ist ein Progress im CT-Scan zu beobachten. Darüber hinaus wurde bei einer Remission oder Stable Disease eine Abnahme der CTC beobachtet. Nur in einem Fall ist ein Anstieg der zirkulierenden Tumorzellen trotz Remission/Stable Disease gefunden worden. Die Korrelation der beiden Parameter ist mittels Kappa-Koeffizient = 0,9172 und einem p-Wert < 0,0001 signifikant. Die These, dass sich Veränderungen der CTC Zahl vor Veränderungen im CT-Scan offenbaren, wurde bereits 2009 von Liu et al. dargestellt. In der Studie konnte gezeigt werden, dass bereits drei bis fünf Wochen vor den Veränderungen im CT-Scan die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen beeinflusst werden kann (118). Im zeitlichen Verlauf steigt somit die Anzahl der CTC im Progress bereits vor den bildmorphologischen Veränderungen. Zu der gleichen Erkenntnis kam auch Budd et al. 2013 (119).

Die weitere Beurteilung der CTC Veränderungen in Bezug auf die CT-Untersuchungen ergab bedingt durch die zu geringe Fallzahl keine Ergebnisse. Auf Grund der Tatsache, dass alle Patientinnen bei Diagnosestellung im Progress waren bzw. es sich um die Erstdiagnose handelte, ist es nicht verwunderlich, dass die erste Blutprobe zirkulierende Tumorzellen aufwies. Ferner ist anzumerken, dass im Verlauf der ersten zur zweiten Blutentnahme, wo alle Patientinnen sich in Remission/Stable Disease befanden, keine CTC gefunden wurden.

CTC in Korrelation mit Tumormarkern:

Die Begutachtung der zirkulierenden Tumorzellen in Bezug auf die klassischen Tumormarker CA15-3 und CEA ergaben nur bei den Gesamtproben ein berechenbares Ergebnis. Die Ergebnisse der CTC und klassischen Tumormarker-Veränderungen von der ersten zur zweiten sowie das Ergebnis der ersten Blutentnahme ergaben keine berechenbaren Werte.

Eine Veränderung der CTC-Zahl korreliert mit dem Anstieg und der Abnahme der Tumormarker. So ist eine Steigerung der zirkulierenden Tumorzellen im Blut gleichbedeutend mit der Erhöhung des CA15-3. Umgekehrt ist diese Tendenz ebenfalls zu beobachten. Der statistische Zusammenhang der beiden Parameter ist, mit einem p-Wert = 0,0075 und einem Kappa-Koeffizienten = 0,6147 berechnet, signifikant.

Die Bedeutung der CTC für das krankheitsfreie – sowie Gesamtüberleben konnte von Bidard et al. 2014 hervorgehoben werden. Für die Prognoseabschätzung fungieren die zirkulierenden Tumorzellen als eigenständiger und unabhängiger Wert bereits drei bis fünf Wochen nach dem Beginn einer adäquaten Therapie. Damit fungieren die CTC in Kombination mit klinischen Angaben als bessere prognostische Marker als die klassischen Tumormarker (139).

Wie bereits vorher bei dem Vergleich des CT-Scans mit den zirkulierenden Tumorzellen ist auch bei der Berücksichtigung des Tumormarkers bei der ersten Blutentnahme und im Verlauf der ersten zur zweiten Blutentnahme keine Berechnung möglich gewesen. Grund hierfür ist ebenfalls die zu geringe Fallzahl. Eine Tendenz bei der ersten zur zweiten Blutentnahme ist mit dem Rückgang der CTC-Zahl und Abnahme des Tumormarkers zu beobachten. Ferner macht ein hoher CA15-3 Wert das Vorhandensein von CTC wahrscheinlicher als bei der ersten Blutentnahme.

4 Diskussion

4.1 Grundlage der Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Aspekte untersucht: Zum einen wird ein Vergleich von M_0 und M_1 Patientinnen vor der jeweiligen Therapie gestellt. Zum anderen wird eine Verlaufsentwicklung von zirkulierenden Tumorzellen des metastasierten Patientenkollektivs unter Berücksichtigung klinischer Parameter dargestellt. Im Folgenden soll dies kritisch betrachtet und diskutiert werden.

4.2 Methodischer Aspekt

Das Auffinden und die geringe Anzahl der zu findenden zirkulierenden Tumorzellen im Blut stellt immer noch ein großes Problem dar. Grund hierfür ist, dass die Häufigkeit der CTC mit nur etwa einer Tumorzelle pro 100.000-1.000.000 Blutzellen sehr gering ist (120). Derzeit sind für eine Anreicherung von CTCs mehr als 50 Assays beschrieben, zu denen auch das CellSearch System (Veridex) gehört (121, 122). Dieses sucht allerdings mittels EpCAM und kann zirkulierende Tumorzellen, die während der EMT ihre Oberflächenstruktur verändern, übersehen. Die manuelle Suche mittels Anti-Keratin-Cocktail hat sich in Studien als signifikant sensitivere Detektionsmethode für CTC erwiesen (93, 123). Die Überlegung, dass es zu einer Down-Regulation (verminderten Expression) von EpCAM vor allem bei Patientinnen mit Firstline (erste Therapie-Wahl) Chemotherapie gibt, ist nicht neu und wurde bereits früh von Pantel et al. beschrieben (124-126).

Eine Fehlerquelle bei der Untersuchung von zirkulierenden Tumorzellen kann unter methodischen Aspekten die manuelle Anreicherung und Färbung mittels Immunomagnetabsorption bzw. Keratinen im Vergleich zum CellSearch sein. Die manuelle Durchführung der Aufarbeitung ist nicht nur zeitaufwendig, sondern bietet Platz für systemische Störungen und Fehler. Dahingegen wird bei der CellSearch-Methodik ein automatisiertes System verwendet. Darüber hinaus ist die Auswertung der Objektträger eine subjektive Auswertung, da es im Auge des Betrachters liegt, ob die jeweils gefundene Zelle den Richtlinien der Tumorzellen genügend entspricht. Das Anlegen von streng definierten Auswertungskriterien ist deshalb unerlässlich. Auch

kann die Intensität der Fluoreszenz in den einzelnen Proben variieren. Durch die zweifache Überprüfung der Objektträger durch die Ariol-Methodik und manuelle Mikroskopie, wurde diese Fehlerquelle hier minimiert.

Ferner gibt es eine Problematik, die sich derzeit bei der Untersuchung der CTC im Blut mittels Immunzytochemie stellt. Es gibt derzeit bezüglich des Anfärbens von zirkulierenden Tumorzellen bei einer Blutuntersuchung viele verschiedene Methoden und Assays. Durch diese Vielfalt wird ein Vergleich der jeweiligen Ergebnisse aus unterschiedlichen Forschungsarbeiten erschwert. Dennoch gibt es große Bemühungen in der Forschung, den Vorteil einer Blutentnahme gegenüber der Knochenmarksaspiration voran zu treiben. Die „Liquid Biopsie“ wird somit zukünftig ein potenziell wichtiger Faktor in der Behandlung von Tumorerkrankungen bleiben (127). Als nächstes wird auf ein weiteres wichtiges Verfahren eingegangen, welches sich im Zusammenhang mit zirkulierenden Tumorzellen und der Untersuchung des Mammakarzinoms etabliert hat. Die Methodik der Polymerase Kettenreaktion (PCR) stellt einen molekulargenetischen Ansatz dar. Dieses objektive Verfahren weist eine hohe Sensitivität auf und wurde in mehreren Studien mit anderen Detektionstechniken verglichen. In der Studie von Lasa et al. konnte eine höhere Detektionsrate festgehalten werden (128). Darüber hinaus konnte in anderen Studien mittels der sensitiveren Detektion das Gesamtüberleben der Patientinnen besser wiedergegeben werden (129). Trotz der beschriebenen höheren Sensitivität der PCR-Methode gibt es auch Nachteile. Eine Voraussetzung für die Anwendung ist, dass sich die DNA bzw. RNA der Tumorzellen spezifisch von den umgebenden physiologischen hämatopoetischen Zellen unterscheiden müssen. Ferner ist eine Problematik in der Heterogenität der Tumorzellen und somit Fehlen eines einheitlichen Markers festzuhalten (130). Ein weiterer limitierender Faktor in der PCR-Methodik ist die mögliche verminderte Spezifität von untersuchten Genabschnitten. Viele Gentranskripte können auch bei gesunden Knochenmarks- und/oder Blutzellen nachgewiesen werden (131). Zusätzlich zu diesen Nachteilen kommt die Instabilität des zu untersuchenden Materials hinzu. Im Gegensatz zur CellSearch-Methodik, welche eine Lagerung und Transport binnen 72 Stunden ermöglicht, besteht bei der PCR-Analyse eine deutlich geringere Halbwertszeit der mRNA (messenger Ribonukleinsäure) (132). Abschließend kann man zur PCR-Methodik sagen, dass sie ein großes Potenzial in der Forschung hat.

4.3 Vergleich des M₀ Kollektivs

Der Stellenwert für den Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen bei nicht metastasierten Brustkrebspatientinnen ist noch wenig erforscht. Aus diesem Grund sollte die Multicenter-Studie namens „SUCCESS-Studie“ mit mehr als 2000 Patientinnen, welche bis 2011 rekrutierte, mit den Ergebnissen diese bisher unzureichende Datenlage beseitigen. Dies scheint nun gelungen und wurde von der Arbeitsgruppe um K. Pantel und W. Janni 2014 in „Circulating Tumor Cells Predict Survival in Early Average-to-High Risk Breast Cancer Patients“ beschrieben. Es wurden bei 21,5% (435 von 2026 Patienten) CTC vor Chemotherapie mittels CellSearch System gefunden. Bei der genaueren Begutachtung wurden CTC bei 19,6% der Lymphknoten negativen Patienten und in 22,4% der Lymphknoten positiven Fälle gefunden (127). Bereits 2008 konnte mittels der ersten SUCCESS-Studiendaten von Rack et al. eine Detektionsrate von 10% der Patientinnen mit mehr als einer zirkulierenden Tumorzelle festgehalten werden. Der Nachweis der CTCs war nur mit dem Lymphknotenstatus korreliert. Es gab somit keinen Zusammenhang bezüglich T-Stadium, Grading, Hormonrezeptorstatus oder ERBB2-Status (127, 133).

Einen ähnlichen Zusammenhang kann man auch in den hier gefundenen Ergebnissen nachweisen. Es wurden bei 30% der M₀ Patientinnen zirkulierende Tumorzellen gefunden, berücksichtigt man allerdings nur die Fälle mit mehr als einer CTC, so wird nur ein Fall (4% der Kohorte) mit eingeschlossen. Damit liegt die Auffindungsrate geringer als bei Rack et al. (123, 124). Ferner konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang bezüglich des Auffindens von CTCs und konventionellen Klassifikationskriterien gestellt werden, dies war allerdings auch bei Rack et al. nicht möglich. Die fragliche Tendenz zwischen Grading und dem Auffinden von zirkulierenden Tumorzellen ist mit Vorsicht zu betrachten, da das Patientenkollektiv mit nur 31 Fällen relativ gering ist. Um diese Ergebnisse mit den von Rack et al. besser vergleichen zu können, müssten deutlich mehr Patientinnen untersucht werden.

Darüber hinaus muss im Folgenden die Frage der Metastasierungskaskade (lymphogen versus hämatogen) gestellt werden (68, 134). In der Kohorte der M₀ Patientinnen wurden CTCs nur in Lymphknoten negativen Fällen gefunden. Allerdings lässt auch hier sich kein signifikanter Zusammenhang stellen, weshalb man weitere Ergebnisse nach Erweiterung der Stichprobe abwarten sollte.

Die Betrachtung der absoluten Tumorzellzahlen zeigt, dass nur wenige Zellen bei den nicht metastasierten Patientinnen gefunden wurden (1-5 CTC). Im Vergleich zu den metastasierten Patientinnen ist somit eine deutlich geringere Anzahl der absoluten Tumorzellzahlen festzuhalten. Dies könnte auch auf die geringere Tumormasse zurückzuführen sein. Dennoch bleibt zu berücksichtigen, dass methodische Gründe, wie die Aufarbeitung sowie die nur einmalige Blutentnahme, diese Auswertung beeinflussen. Als Gegenargument lässt sich hierbei aufführen, dass stets eine Positivkontrolle verwendet wurde, um mittels dieser eine Fehlfärbung auszuschließen. Eine wichtige Studie in Bezug auf primäre Brustkrebspatientinnen stellt die Arbeit von Banys et al. dar (135). Für die Ergebnisse wurden 209 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom eingeschlossen und das Blut vor und nach primärer operativer Therapie auf zirkulierende und disseminierte Tumorzellen untersucht. Es wurde bei 21% der Mammakarzinom-Fälle CTC gefunden. Hierbei erfolgte eine genauere Untersuchung der Einteilung der CTC nach dem Phänotyp. Die meisten CTC waren dreifach negativ für Her2/ER und PR. Nur 20% (9 von 43 CTC positiven Patientinnen) haben einen positiven Östrogen und/oder Progesteronrezeptor. Festzuhalten ist dabei allerdings, dass der Rezeptorstatus des Primärtumors in 95% der CTC positiven Fälle ER und PR positiv war. Für die Aufarbeitung des Blutes wurde ein anderes Verfahren verwendet als in dieser Arbeit. Die Bearbeitung der Blutproben erfolgte nach immunmagnetischer Anreicherung mittels „AdnaTestBreastCancerSelect“, gefolgt von einer RNA Isolation und Gen Analyse mit reverser Transkription und Multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction).

Es findet sich somit eine annähernde Übereinstimmung der Ergebnisse bezugnehmend auf den Primärtumor. In der vorliegenden Arbeit wiesen 12,9% der primär nicht metastasierten Mammakarzinom Patientinnen CTC auf, in der Arbeit von Banys wurde in 12% der Fälle präoperativ CTC isoliert. Dieser Zusammenhang besteht trotz unterschiedlicher Untersuchungstechniken. Zu beachten ist hierbei, dass für diese Arbeit eine vorherige Selektion des Patientinnenkollektivs stattgefunden hat. Es wurden nur ER positive Patientinnen eingeschlossen. Bemerkenswert ist hierbei allerdings, dass bei Banys et al. in 95% der CTC positiven Fälle der primäre Brustkrebs ER und PR positiv war. In diesem Zusammenhang ist dementsprechend nur eine geringe Abweichung der Detektionsraten vorhanden.

Der aktuelle Standpunkt der Forschung im Kontext mit zirkulierenden Tumorzellen und M₀ Patientinnen spricht für den prognostischen Wert in der Detektion mit CTC. Es

wurden beispielsweise in zwei weiteren Studien ein schlechteres Gesamtüberleben und Endergebnis bei primären Mammakarzinom Patientinnen mit CTC assoziiert (136, 137). Ob sich das Auffinden der CTCs mit der Prognose des hier dargestellten Patientinnenkollektivs (31 Fälle) korrelieren lässt, bleibt abzuwarten und weiter zu beobachten.

Abschließend ist der mögliche Aspekt der abweichenden Detektionsraten in Bezug in den genannten verschiedenen Studien mit den vorliegenden Ergebnissen zu nennen. Ein möglicher Grund hierfür können regionale beziehungsweise ethnische Unterschiede in den untersuchten Patientinnen-Kohorten sein. In weiterer Hinsicht ist zu beachten, dass verschiedene Assays verwendet wurden.

4.4 Vergleich des M₁ Kollektivs

Der Nachweis von CTCs in metastasierten Kohorten ist in der Forschung und Klinik von stetig zunehmendem Stellenwert. So ist es nicht verwunderlich, dass auch in der vorliegenden Arbeit deutlich mehr Fälle mit CTCs isoliert werden konnten, als im M₀ Kollektiv. Mit 63,2% der metastasierten Mammakarzinom-Fälle, bei denen zirkulierende Tumorzellen im Blut nachgewiesen wurden, liegt diese Rate mehr als doppelt so hoch wie in der M₀ Kohorte. Diese Detektionsrate ist auch wesentlich höher als beispielsweise Wallwiener et al. in einer Studie 2014 nachgewiesen hat (138). In dieser Studie wurden bei 133 von 393 Patientinnen (34%) zirkulierende Tumorzellen vor Therapie isoliert. Für die Detektion der CTCs und der Ergebnisse wurde bei Wallwiener et al. das CellSearch System verwendet und ein positiver Blutstatus ist erst ab ≥ 5 CTC/7,5 ml Blut klassifiziert. Im Vergleich zu Wallwiener et al. ist durch eine zwanzigfach geringe Fallzahl (n=19) und Selektion von ER positiven Patientinnen in den hier aufgezeigten Ergebnisse möglicherweise eine zu hohe Rate beschrieben. Dahingegen könnte die niedrigere Detektionsrate bei Wallwiener et al. auch durch einen falsch-negativ Befund, bedingt durch eine Anreicherung von nur EpCAM positiven Zellen, vereinbart werden. Als weitere bedeutende Studie ist die von Bidard et al. 2014 veröffentlichte Arbeit zu nennen. Für diese Studie wurden 1944 Patienten untersucht und bei 911 Fällen wurden ≥ 5 CTC/7,5 ml Blut mittels CellSearch isoliert (139). Die Detektionsrate für das Gesamtkollektiv beträgt 46,9%, schaut man sich im Weiteren die Subgruppierung der ER positiven Fälle an, so lassen sich in 596 von 1166 Fällen CTC finden, was etwa 51,1% ausmacht. Vergleicht man diese

repräsentativen 51,1% mit den 63,2% der 19 ER positiven M₁ –Fälle, so kann man von einer noch leicht erhöhten Detektionsrate im kleineren Kollektiv ausgehen.

In der hier vorliegenden Studie war der Nachweis von CTCs weder mit der Lokalisation, Anzahl der Metastasen, Tumorgöße sowie Lymphknotenstatus assoziiert. In den Blutproben waren die Zellzahlen der CTC wesentlich höher als bei den primären Mammakarzinom-Fällen. Es wurden bis zu 153 zirkulierende Tumorzellen in einer Blutprobe gefunden, während bei den nicht metastasierten maximal 5 CTCs gefunden wurden. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen dem Tumorprogress und dem Nachweis von CTC sprechen.

Die Korrelation zwischen den Veränderungen bei Tumorprogress und –Remission der zirkulierenden Tumorzellen und CT-Scan/ klassischen Tumormarkern konnte in den oben genannten Ergebnissen festgehalten werden ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0075$). Darüber hinaus bestätigt sich dieser Vergleich unter der Berücksichtigung der Stadien-Einteilung der primären und metastasierten Brustkrebspatientinnen ($p = 0,0001$). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der CTC-Ergebnisse und Stadien der Patientinnen mit primären und metastasierten Mammakarzinom

Stadium	CTC-positiv (Anteil in %)	CTC-negativ (Anteil in %)	Patientinnen gesamt (Anteil in %)
I-III	4 (8%)	27 (54%)	31 (62%)
IV	13 (26%)	6 (12%)	19 (38%)

p-Wert = 0,0001

Der Ansatz des „Monitoringtool“ der CTCs konnte andeutungsweise für das metastasierte Patientenkollektiv gezeigt werden. Im Vergleich zu den CT-Scans und klassischen Tumormarkern (CA15-3, CEA) konnte ein Ansteigen, als auch eine Abnahme, der CTCs im Verlauf der systemischen Therapie festgehalten werden. In einer Studie von Bidard et al. konnte ein erhöhter CTC-Wert bereits nach 3-5 Wochen nachgewiesen werden. Damit ist ein zeitlicher Vorteil der CTCs gegenüber anderer Tumormarker für eine Prognoseabschätzung gegeben (140).

Kritisch bei den oben genannten Ergebnissen ist zu beachten, dass zwischen den Blutentnahmen die zeitlichen Abstände stark variieren (3-225 Tage) und bei sieben Patientinnen noch Verlaufsergebnisse ausstehen. Hierfür sollten weitere Follow-up

Ergebnisse abgewartet werden. Durch die Varianz der Blutentnahmezeiten wiederum kann der klinische Alltag wiedergespiegelt werden. Dies beruht vor allem darauf, dass es unterschiedliche Termine für die jeweiligen Patientinnen gab und einzelne Blutentnahmen individuell abhängig waren.

Bereits 2007 konnte in früheren Studien wie bei Cristofanilli et al. Erkenntnisse bezüglich der Relevanz von zirkulierenden Tumorzellen bei metastasierten Mammakarzinom-Fällen gewonnen werden (141). Mittels dieser Ergebnisse konnte bereits eine schlechtere Prognose für Patientinnen ≥ 5 CTC/ 7,5 ml im Blut nachgewiesen werden. Dieser Grenzwert hat sich in weiteren Studien im späteren Verlauf als bewährt erwiesen. Durch die Einteilung in Gruppen von < 5 bzw. ≥ 5 CTC/ 7,5 ml Blut ist eine Aussage zur günstigeren bzw. schlechteren Prognose möglich. Dies wurde auch bei Wallwiener et al. bestätigt (138).

Berücksichtigt man in der vorliegenden Studie diesen Grenzwert von ≥ 5 CTC/ 7,5 ml Blut, so haben 9 von 19 Patientinnen diesen Wert überschritten. Dies entspricht einer positiven Detektionsrate von 42% und entspricht in etwa anderen Studienergebnissen wie beispielsweise Budd et al. oder Dawood et al. (142, 143). In diesen Studien gab es bei 25% beziehungsweise 38,4% der Fälle ≥ 5 CTC/ 7,5 ml Blut. In der Arbeit von Budd et al. wurden die CTC Ergebnisse mit den Aussagen einer Computertomographie verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen eine bessere Einschätzung bezüglich der Prognose ermöglicht, als die Auswertung der Bilddiagnostik.

Obwohl ähnliche Detektionsraten von CTCs zu beobachten waren, ist zu beachten, dass angesichts der geringen Fallzahl ($n=19$), positiven Selektion (nur ER positive Patientinnen) sowie einer anderen Detektionstechnik in der Studie der Vergleich zu den anderen metastasierten Mammakarzinom-Studien schwierig ist.

Eine Studie von Wiedswang et al. hat 2006 ein ähnliches Detektionsverfahren mittels AE1- und AE3-Antikörper wie in dieser Arbeit verwendet (144). In der Studie wurden bei 10% der Mammakarzinom-Fälle zirkulierende Tumorzellen isoliert. Zu beachten hierbei ist, dass nur 5 ml Blut untersucht wurden. Um eine ausreichende Detektion von CTC zu gewährleisten, ist dieses Volumen möglicherweise zu gering. Bezüglich der Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen und dem Nachweis von CTCs ist eine schlechtere Prognose assoziiert worden.

Nichtsdestotrotz wird der Kontext einer Prognoseabschätzung mittels zirkulierender Tumorzellen im Vergleich zur bildgebenden Diagnostik kontrovers diskutiert. In diesem

Zusammenhang ist Ende 2008 beispielsweise eine Studie von Saad et al. mit deren Ergebnissen erschienen (145). Es wurde 35 Patientinnen mit metastasierten Brustkrebs mittels PET (Positronen-Emissions-Tomographie) oder CT-Scan, einem Tumormarker CA27-29 und der zirkulierenden Tumorzellen untersucht. Eine Korrelation zwischen diesen Parametern konnte zwar gezeigt werden, dennoch ist die Sensitivität der zirkulierenden Tumorzellen sehr gering ausgefallen. Bezüglich der Detektion von Metastasen konnte die Bilddiagnostik die höchste Empfindlichkeit aufweisen. Zu beachten in dieser Studie ist, dass vor allem die Sensitivität zum Nachweis von Metastasen und nicht die Prognoseabschätzung im Fokus stand. Beachtet man die Ergebnisse von Bidard et al. (139), so lässt sich durch die Anzahl der CTCs und deren Veränderungen bereits drei bis fünf Wochen nach Therapiebeginn eine Prognoseaussage treffen. Dabei ist eine steigende, stetig bleibende sowie anfangs ≥ 5 CTC/ 7,5 ml Blut Zahl der zirkulierenden Tumorzellen negativ auf das krankheitsfreie- sowie das Gesamtüberleben. Diese Korrelation ist nicht mittels der klassischen Tumormarkern möglich gewesen (139).

Bereits 2007 wurde von Dawood und Cristofanilli überlegt, ob eine Integration der zirkulierenden Tumorzellbefunde in konventionelle Klassifikationssysteme sinnvoll ist (146). Diese wurde 2010 als Erweiterung der UICC Stadien-Einteilung mit aufgenommen. Mit der Unterteilung in CTC positive und CTC negative Patientinnen-Gruppen kann gemäß der Prognose über eine intensivere und individualisierte Therapie je nach Stadium entschieden werden. Trotz der Fortschritte in der Diagnostik, des Monitorings, der Therapie und Abschätzung der Prognose des metastasierten Mammakarzinoms sollte man nicht vergessen, dass die Behandlung in diesem Stadium der Krankheit eine palliative ist (147).

4.5 Ausblick in die Forschung

Das Potential zirkulierender Tumorzellen ist vielseitig und soll im Folgenden nochmals erläutert werden.

Ein Schwerpunkt ist die Risikobewertung und damit verbundene Prognose-Einschätzung von Mammakarzinom-Patientinnen. Auf Grundlage der derzeitigen Standard-Schemata und Richtlinien in der Therapie von Brustkrebs werden viele Patientinnen gleich therapiert. Die Erkrankung kann im individuellen Fall allerdings sehr heterogen sein. Hierbei entsteht somit die Gefahr der Übertherapie von einzelnen Patientinnen. So erhalten viele Patientinnen systemische adjuvante Therapien, mitsamt der möglichen Nebenwirkungen, obwohl dies im individuellen Fall nicht nötig gewesen wäre (148, 149).

Durch das Brustkrebsscreening der vergangenen Jahre bedingt, werden möglicherweise frühere Stufen des Mammakarzinoms gefunden und therapiert. In diesem Zusammenhang ist auch die Studie von Braun et al. zu nennen. In dieser wird besagt, dass bei Lymphknoten negativen, niedrigem T-Stadium ($T \leq 2$) und fehlen an DTC, die 5-Jahre-Überlebensrate zirka 94% beträgt (150). Diesem Patientinnen-Kollektiv wäre eine systemische Therapie somit weniger zu empfehlen, als Patientinnen mit positivem DTC oder CTC Befund.

Aktuell werden zirkulierende Tumorzellen vor allem im Zusammenhang mit metastasierten Mammakarzinom-Fällen und in Verlaufsuntersuchungen untersucht. Auf Grund der hohen Korrelation zwischen DTC und CTC kann dieser Aspekt für das Screening der Hoch-Risiko-Patientinnen genutzt werden (151, 152). So könnte eine Identifikation von DTC mittels Knochenmarkuntersuchung am Anfang der Therapie stehen und im Verlauf durch die einfacher zu wiederholende Blutentnahme ersetzt werden. Dies wäre für die Rezidiv- und Prognosebewertung von wert. Der Ansatz könnte in einer prospektiven klinischen Studie untersucht und validiert werden.

Über die Risikobewertung hinaus gibt es noch weitere Erkenntnisse die mittels zirkulierender Tumorzellen gewonnen werden können. Man kann mittels CTCs in die frühen Vorgänge und biologischen Abläufe der Metastasierung eingreifen. Studien haben gezeigt, dass bereits vor manifesten Metastasen Veränderungen des Primärtumors und der zirkulierenden Tumorzellen zu beobachten sind (93, 115). Bereits 2004 konnte von Coomes et al. belegt werden, dass ein rechtzeitiger Wechsel in der endokrinen Therapie ein besseres Überleben bedeutet, als die einheitliche Therapie eines Kollektivs (153). Somit ist die Identifikation von aggressiveren

Subgruppierungen auch in der CTC positive Population erstrebenswert. In diesem Zusammenhang ist die Arbeit von Wicha und Hayes aus dem Jahre 2011 von Bedeutung, in welcher die Problematik von Metastasen induzierenden zirkulierenden Tumorzellen aufmerksam gemacht wird (154). Folglich sind Strategien zur Identifizierung und Isolierung von Nutzen, welche auch veränderte Expressionsmuster von Oberflächen- und Strukturproteinen erfassen. Darüber hinaus könnten Ursprungsgewebe der CTC mit Hilfe der Expressionsprofile erkannt werden und weitere Therapien gegen diese möglichen Metastasen schaffen (122).

Über die Schwierigkeit der technischen Aufarbeitung und Abfärbung von zirkulierenden Tumorzellen hinaus wird sich zeigen, in wie weit CTCs Einfluss auf die spezifische Therapie des Brustkrebses nehmen können. Durch das frühzeitige Erkennen und Therapieren von potenziellen Metastasen kann sicherlich die Tumormortalität gesenkt werden (122).

Abgesehen von zirkulierenden Tumorzellen ist in der Forschung auch Tumor-DNA, welche frei außerhalb von Tumorzellen vorkommt, von Bedeutung. Mittels dieses Ansatzes kann parallel zu den CTCs ein Rückschluss gezogen werden, in wieweit beispielsweise eine KRAS Mutation (monomeres G-Protein) den EGFR blockiert. Diese zellfreie Tumor-DNA kann ebenfalls nicht invasiv mittels Blutentnahme gewonnen werden. Die Kombination der Informationen aus CTC und zellfreier Tumor-DNA können eine Erklärung für die Resistenzen des Ursprungstumors in der systemischen Therapie finden (155, 156).

Zusammenfassend gibt es viele Hinweise dafür, dass zirkulierende Tumorzellen die Veränderungen in der Behandlung des Mammakarzinoms in Echtzeit darstellen können. Diese Information ist für systemische Therapie von großer Bedeutung. In Zukunft ist davon auszugehen, dass die zirkulierenden Tumorzellen weiterhin eine wichtige Rolle in der spezifischen und zielgerichteten Therapie spielen werden. Damit erfüllen die CTCs ein Kennzeichen für die immer wichtiger werdende Personalisierte Medizin.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) aufgrund ihrer klinischen Anwendung mittels Blutentnahme bei nicht metastasierten und metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen mittels Immunfluoreszenz analysiert.

Hierfür wurden 31 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom vor palliativer Therapie untersucht. Darüber hinaus wurden 19 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom vor palliativer Therapie, sowie im Verlauf dieser Therapie, auf zirkulierende Tumorzellen getestet. Bei allen Testpersonen wurde histologisch ein Östrogenrezeptor-positiver Primärtumor nachgewiesen. Die Detektion der zirkulierenden Tumorzellen erfolgte mittels Anti-Keratin Cocktail nach einer Blutentnahme.

Die Untersuchungsergebnisse zeigten eine signifikante Korrelation für das Auffinden von CTCs zum Tumorstadium nach UICC-Einteilung. Insgesamt wurden bei 34% der Probandinnen zirkulierende Tumorzellen gefunden. Der Anteil der CTC positiven M₀-Patientinnen betrug 12,9%, während im M₁-Kollektiv 63,2% zirkulierende Tumorzellen aufwiesen. Bei den wiederholt untersuchten metastasierten Patientinnen wurde sowohl ein Anstieg, als auch ein Abfall der Tumorzellzahlen. Diese Veränderungen konnten auch über einen längeren Zeitraum von bis zu 225 Tagen zwischen den jeweiligen Blutentnahmen festgestellt werden. Ein Hinweis für die Verwendung als „Monitoring-Tool“ im Verlauf der Therapie beim Mammakarzinom ist somit gegeben. Es konnte auch eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Anzahl von CTCs und der Höhe der klassischen Tumormarkern wie dem CA15-3 und CEA nachgewiesen werden. In einem Vergleich der absoluten Tumorzellzahlen fanden sich in der Kohorte der metastasierten Patientinnen deutlich mehr zirkulierende Tumorzellen als bei den nicht metastasierten Patientinnen (M₁ bis zu 153 CTCs). Die absolute Tumorzellzahl in der nicht metastasierten Gruppe betrug maximal fünf CTCs. Bezüglich der Tumorgröße, des Lymphknotenstatus oder der histologischen Merkmale konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden.

Der Ansatz des Zusammenhangs zwischen bildmorphologischen Veränderungen, klassischen Tumormarkern und dem Auffinden von CTCs konnte in dieser Studie aufgezeigt werden. Weiterführende prognostische Studien mit größeren Fallzahlen und Beobachtungszeiträumen sind notwendig, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al.: Cancer Incidence and Mortality Worldwide GLOBOCAN 2012, in , 2013
2. Robert Koch Institut, Kaatsch P, Spix C, et al.: Krebs in Deutschland 2009/2010 - Eine Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., in (ed 9.Auflage 2013), 2013
3. Toriola AT, Colditz GA: Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implications for prevention. *Breast Cancer Res Treat* 138:665-673, 2013
4. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 347:1713-1727, 1996
5. Bakken K, Fournier A, Lund E, et al.: Menopausal hormone therapy and breast cancer risk: impact of different treatments. *The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Int J Cancer* 128:144-156, 2011
6. Bergstrom A, Pisani P, Tenet V, et al.: Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer* 91:421-430, 2001
7. Ewertz M, Duffy SW, Adami HO, et al.: Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer* 46:597-603, 1990
8. Key J, Hodgson S, Omar RZ, et al.: Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. *Cancer Causes Control* 17:759-770, 2006
9. Ursin G, Longnecker MP, Haile RW, et al.: A meta-analysis of body mass index and risk of premenopausal breast cancer. *Epidemiology* 6:137-141, 1995
10. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, et al.: Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 152:514-527, 2000

11. Stratton MR, Rahman N: The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet* 40:17-22, 2008
12. Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, et al.: Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol* 4:174-191, 2010
13. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, et al.: Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 71:800-809, 1997
14. Bilimoria MM, Morrow M: The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *CA Cancer J Clin* 45:263-278, 1995
15. Singletary SE: - Rating the risk factors for breast cancer. - *Ann Surg*:82, 2003
16. Pagani O, Senkus E, Wood W, et al.: - International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? - *J Natl Cancer Inst*:63, 2010
17. Lenk C, Biller-Andorno N, Alt-Epping B, et al.: [Ethics and diagnosis related groups]. *Dtsch Med Wochenschr* 130:1653-1655, 2005
18. Weis J, Domann U: [Interventions in the rehabilitation of breast cancer patients--a critical literature review of the state of the art]. *Rehabilitation (Stuttg)* 45:129-145, 2006
19. Hayes DF: *Atlas of Breast Cancer - Second Edition*, in , 2000
20. Bocker W: [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 86:116-9.:116-119, 2002
21. Friedrich K, Dimmer V, Haroske G, et al.: Correlation between p53 status, DNA ploidy, proliferation rate and nuclear morphology in breast cancer. An image cytometric study. *Anal Cell Pathol* 15:85-97, 1997
22. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al.: - American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). - *Arch Pathol Lab Med*:72, 2010
23. Turzynski A, Gocht, Lebeau, et al.: *H-Score*, in , 2014

24. Hodi Z, Chakrabarti J, Lee AH, et al.: - The reliability of assessment of oestrogen receptor expression on needle core biopsy specimens of invasive carcinomas of the breast. - J Clin Pathol:-302, 2007
25. Budwit-Novotny DA, McCarty KS, Cox EB, et al.: - Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. - Cancer Res:-25, 1986
26. Daltoe RD, Madeira KP, de Carvalho AA, et al.: Evaluation of the progesterone receptor status in breast cancer using three different antibodies: a comparison by Allred score system. Int J Clin Exp Pathol 7:331-339, 2013
27. Duffy MJ: Predictive markers in breast and other cancers: a review. Clin Chem 51:494-503, 2005
28. Liu Y, Ma L, Liu D, et al.: Impact of polysomy 17 on HER2 testing of invasive breast cancer patients. Int J Clin Exp Pathol 7:163-173, 2013
29. Gampenrieder SP, Rinnerthaler G, Greil R: Neoadjuvant Chemotherapy and Targeted Therapy in Breast Cancer: Past, Present, and Future. J Oncol 2013:732047. Epub;2013 Aug;20.:732047, 2013
30. Mihaly Z, Gyorffy B: [HER2-positive breast cancer: available targeted agents and biomarkers for therapy response]. Magy Onkol 57:147-156, 2013
31. Grotenhuis BA, Klem TM, Vrijland WW: Treatment outcome in breast cancer patients with ipsilateral supraclavicular lymph node metastasis at time of diagnosis: a review of the literature. Eur J Surg Oncol 39:207-212, 2013
32. Compton CC, Byrd DR, Garcia-Aguilar J, et al.: AJCC Cancer Staging Atlas, 2012
33. Uehiro N, Horii R, Iwase T, et al.: - Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer. - Breast Cancer, 2013
34. Einstien D, Omprakash BO, Ganapathy H, et al.: - Comparison of 3-tier cytological grading systems for breast carcinoma. - Isrn Oncol, 2014
35. BLOOM HJ, RICHARDSON WW: Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. Br J Cancer 11:359-377, 1957

36. Purdom M, Cibull ML, Stratton TD, et al.: Should Histologic Grade Be Incorporated into the TNM Classification System for Small (T1, T2) Node-Negative Breast Adenocarcinomas? *Patholog Res Int* 2011:825627, 2010
37. Thomas DB, Gao DL, Self SG, et al.: - Randomized trial of breast self-examination in Shanghai: methodology and preliminary results. - *J Natl Cancer Inst*:-65, 1997
38. Caines JS, Chantziantoniou K, Wright BA, et al.: - Nova Scotia Breast Screening Program experience: use of needle core biopsy in the diagnosis of screening-detected abnormalities. - *Radiology*:-30, 1996
39. Buchberger W, DeKoekkoek-Doll P, Springer P, et al.: - Incidental findings on sonography of the breast: clinical significance and diagnostic workup. - *AJR Am J Roentgenol*:-7, 1999
40. Potterton AJ, Peakman DJ, Young JR: - Ultrasound demonstration of small breast cancers detected by mammographic screening. - *Clin Radiol*:-13, 1994
41. Naveed N, Jaffar MA, Choi TS: - MRT letter: segmentation and texture-based classification of breast mammogram images. - *Microsc Res Tech*:-7, 2011
42. Bluemke DA, Gatsonis CA, Chen MH, et al.: - Magnetic resonance imaging of the breast prior to biopsy. - *Jama*:-42, 2004
43. Laidi F, Bouziane A, Lakhdar A, et al.: - Significant correlation between salivary and serum Ca 15-3 in healthy women and breast cancer patients. - *Asian Pac J Cancer Prev*:-62, 2014
44. Bahrami A, Mortazavizadeh MR, Yazdi MF, et al.: - Serial tumour markers serum carcinoembryonic antigen and cancer antigen 15-3 assays in detecting symptomatic metastasis in breast cancer patients. - *East Mediterr Health J*:-9, 2012
45. Hanisch FG, Muller S: - MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. - *Glycobiology*:-49, 2000
46. Gara S, Boussen H, Ghanem A, et al.: - Use of common seric tumor markers in patients with solid cancers. - *Tunis Med*:-83, 2008

47. Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, et al.: American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. *J Clin Oncol* 24:5091-5097, 2006
48. Regierer AC, Possinger K: Mammakarzinom - Manual Diagnostik und Therapie, in , Deutscher Ärzteverlag 2005: 19-28, 2005
49. Bahrami A, Mortazavizadeh MR, Yazdi MF, et al.: - Serial tumour markers serum carcinoembryonic antigen and cancer antigen 15-3 assays in detecting symptomatic metastasis in breast cancer patients. - *East Mediterr Health J*: -9, 2012
50. Elfagieh M, Abdalla F, Gliwan A, et al.: - Serum tumour markers as a diagnostic and prognostic tool in Libyan breast cancer. - *Tumour Biol*: -7, 2012
51. Correa C, McGale P, Taylor C, et al.: Overview of the randomized trials of radiotherapy in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2010:162-177, 2010
52. Harries M, Smith I: The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr Relat Cancer* 9:75-85, 2002
53. Curigliano G, Criscitiello C, Andre F, et al.: Highlights from the 13th St Gallen International Breast Cancer Conference 2013. Access to innovation for patients with breast cancer: how to speed it up? *Ecancermedicalscience* 7:299. doi: 10.3332/ecancer.2013.299. Print;%2013.:299, 2013
54. Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al.: Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 347:1233-1241, 2002
55. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, et al.: Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 347:1227-1232, 2002
56. Leidenberger, Strowitzki, Orthmann: *Klinische Endokrinologie für Frauen* (ed 4.Auflage), 2014
57. Ishitobi M, Shiba M, Nakayama T, et al.: - Treatment Sequence of Aromatase Inhibitors and Radiotherapy and Long-term Outcomes of Breast Cancer Patients. - *Anticancer Res*: -4, 2014

58. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.: Guidelines of the AGO Breast Committee, in , 2013
59. Brodie AM, Njar VC: - Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment*. - Steroids:-9, 2000
60. Wiebe VJ, Osborne CK, Fuqua SA, et al.: - Tamoxifen resistance in breast cancer. - Crit Rev Oncol Hematol:-88, 1993
61. Yardley DA: - Adverse Event Management of mTOR Inhibitors During Treatment of Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: Considerations for Oncologists. - Clin Breast Cancer:-6, 2014
62. Zhou Z, Qiao JX, Shetty A, et al.: - Regulation of estrogen receptor signaling in breast carcinogenesis and breast cancer therapy. - Cell Mol Life Sci, 2014
63. Moran MS, Gonsalves L, Goss DM, et al.: Breast cancers in U.S. residing Indian-Pakistani versus non-Hispanic White women: comparative analysis of clinical-pathologic features, treatment, and survival. Breast Cancer Res Treat 128:543-551, 2011
64. Lacroix M: Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. Endocr Relat Cancer 13:1033-1067, 2006
65. Pagani O, Senkus E, Wood W, et al.: International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? J Natl Cancer Inst 102:456-463, 2010
66. Cheng X, Hung MC: Breast cancer brain metastases. Cancer Metastasis Rev 26:635-643, 2007
67. Kripke ML, Budmen MB, Fidler IJ: Production of specific macrophage activating factor by lymphocytes from tumor-bearing mice. Cell Immunol 30:341-352, 1977
68. Pantel K, Brakenhoff RH: Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer 4:448-456, 2004
69. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144:646-674, 2011
70. Nieto MA: - The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. - Annu Rev Cell Dev Biol:-76, 2011

71. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al.: - Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. - *Cell*:90, 2009
72. Davis FM, Stewart TA, Thompson EW, et al.: - Targeting EMT in cancer: opportunities for pharmacological intervention. - *Trends Pharmacol Sci*:6, 2014
73. Hay ED: - An overview of epithelio-mesenchymal transformation. - *Acta Anat (Basel)*:20, 1995
74. Kalluri R, Weinberg RA: - The basics of epithelial-mesenchymal transition. - *J Clin Invest*:8, 2009
75. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K: - Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. - *Cancer Metastasis Rev*:4, 2012
76. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al.: American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:5287-5312, 2007
77. Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S: - Cancer micrometastases. - *Nat Rev Clin Oncol*:51, 2009
78. Yovtchev YP, Minkov GA, Petrov AT, et al.: Epithelial cells expressing cytokeratins-19 and bone marrow micrometastases in patients with breast cancer at the time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *Breast Cancer*, 2012
79. Gangnus R, Langer S, Breit E, et al.: Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 10:3457-3464, 2004
80. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, et al.: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* %20;88:1652-1658, 1996
81. Braun S, Pantel K, Muller P, et al.: Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 342:525-533, 2000
82. Slade MJ, Coombes RC: The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 4:30-41, 2007

83. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, et al.: Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol* 19:496-500, 2008
84. Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G, et al.: Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 106:239-243, 2007
85. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B: Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8:329-340, 2008
86. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al.: - Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. - *Cancer Sci*:9, 2010
87. Maheswaran S, Haber DA: Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev* 20:96-99, 2010
88. Ahmad A, Hart IR: Biology of tumor micrometastasis. *J Hematother* 5:525-535, 1996
89. Ashworth T: A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust. Med J* 1869; 14:146-149, in , 1869
90. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al.: Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14:6302-6309, 2008
91. Alsamarai S, Abu-Khalaf MM, Harris LN: - DTCs/CTCs in breast cancer: five decades later. - *Recent Results Cancer Res*:25, 2012
92. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al.: Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:3213-3221, 2008
93. Joosse SA, Hannemann J, Spotter J, et al.: - Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. - *Clin Cancer Res*:1003, 2012
94. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al.: Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 12:4218-4224, 2006

95. Cristofanilli M, Mendelsohn J: Circulating tumor cells in breast cancer: Advanced tools for "tailored" therapy? *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17073-17074, 2006
96. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al.: - Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. - *N Engl J Med*:91, 2004
97. Pinzani P, Salvadori B, Simi L, et al.: Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection. *Hum Pathol* 37:711-718, 2006
98. Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, et al.: Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res* 162:149-55.:149-155, 2003
99. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al.: Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 450:1235-1239, 2007
100. Aktas B, Kasimir-Bauer S, Heubner M, et al.: Molecular profiling and prognostic relevance of circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients at primary diagnosis and after platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 21:822-830, 2011
101. Wikman H, Vessella R, Pantel K: Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *APMIS* 116:754-770, 2008
102. Cummings J, Morris K, Zhou C, et al.: Method validation of circulating tumour cell enumeration at low cell counts. *BMC Cancer* 13:415. doi: 10.1186/1471-2407-13-415.:415-13, 2013
103. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, et al.: Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 13:920-928, 2007
104. Riethdorf S, Pantel K: Advancing personalized cancer therapy by detection and characterization of circulating carcinoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 1210:66-77. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05779.x.:66-77, 2010
105. Benoy IH, Elst H, Van DP, et al.: Detection of circulating tumour cells in blood by quantitative real-time RT-PCR: effect of pre-analytical time. *Clin Chem Lab Med* 44:1082-1087, 2006

106. Lankiewicz S, Rivero BG, Bocher O: Quantitative real-time RT-PCR of disseminated tumor cells in combination with immunomagnetic cell enrichment. *Mol Biotechnol* 34:15-27, 2006
107. Weigelt B, Bosma AJ, Hart AA, et al.: Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 88:1091-1094, 2003
108. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, et al.: - High gradient magnetic cell separation with MACS. - *Cytometry*:8, 1990
109. Looi LM, Yap SF, Cheah PL: - Correlation between oestrogen receptor protein expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast by immunohistochemistry and cytosol measurements. - *Ann Acad Med Singapore*:3, 1997
110. Blick BR, Pasternak JJ: *Molekulare Biotechnologie*, 1995
111. Koyama S, Fukao K: - [Study of cellular autofluorescence of cultured human cancer cell lines using a fluorescence-activated cell sorter (FACS-IV)]. - *Gan No Rinsho*:2, 1985
112. von WT, Julich WD, Thal S, et al.: Antimicrobial efficacy and potential application of a newly developed plasma-based ultraviolet irradiation facility. *J Hosp Infect* 55:204-211, 2003
113. Pantel K, Otte M: Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells. *Semin Cancer Biol* 11:327-337, 2001
114. Stigbrand T, Andres C, Bellanger L, et al.: Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumour Biol* 19:132-152, 1998
115. Babayan A, Hannemann J, Spotter J, et al.: Heterogeneity of estrogen receptor expression in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *PLoS One* 8:e75038, 2013
116. Lisachov AP: New method for visualization of C-heterochromatin in synaptonemal complex spreads. *Comp Cytogenet* 7:131-138, 2013

117. Schindlbeck C, Andergassen U, Hofmann S, et al.: - Comparison of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and disseminated tumor cells in the bone marrow (DTC-BM) of breast cancer patients. - J Cancer Res Clin Oncol:-62, 2013
118. Liu MC, Shields PG, Warren RD, et al.: - Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. - J Clin Oncol:-9, 2009
119. Smerage JB, Budd GT, Doyle GV, et al.: - Monitoring apoptosis and Bcl-2 on circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. - Mol Oncol:-92, 2013
120. Balic M, Dandachi N, Hofmann G, et al.: - Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. - Cytometry B Clin Cytom:-30, 2005
121. Sun YF, Yang XR, Zhou J, et al.: - Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. - J Cancer Res Clin Oncol:-73, 2011
122. Alix-Panabieres C, Pantel K: - Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. - Clin Chem:-8, 2013
123. Deng G, Herrler M, Burgess D, et al.: - Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. - Breast Cancer Res, 2008
124. Pantel K, Schlimok G, Kutter D, et al.: - Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. - Cancer Res:-5, 1991
125. Thurm H, Ebel S, Kantenich C, et al.: - Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy. - Clin Cancer Res:-604, 2003
126. Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, et al.: - Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. - Clin Cancer Res:-14, 2005

127. Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J, et al.: - Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. - J Natl Cancer Inst, 2014
128. Lasa A, Garcia A, Alonso C, et al.: - Molecular detection of peripheral blood breast cancer mRNA transcripts as a surrogate biomarker for circulating tumor cells. - Plos One, 2013
129. Smith BM, Slade MJ, English J, et al.: - Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. - J Clin Oncol:-9, 2000
130. Riahi R, Gogoi P, Sepehri S, et al.: - A novel microchannel-based device to capture and analyze circulating tumor cells (CTCs) of breast cancer. - Int J Oncol:-8, 2014
131. Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, et al.: - Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. - J Clin Oncol:-40, 1998
132. Edri S, Tuller T: - Quantifying the effect of ribosomal density on mRNA stability. - Plos One, 2014
133. Rack B, Schindlbeck C, Schneeweiss A, et al.: Prognostic relevance of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy: The German SUCCESS-Trial. J Clin Oncol, 2008
134. Alix-Panabieres C, Muller V, Pantel K: - Current status in human breast cancer micrometastasis. - Curr Opin Oncol:-63, 2007
135. Banys M, Krawczyk N, Becker S, et al.: - The influence of removal of primary tumor on incidence and phenotype of circulating tumor cells in primary breast cancer. - Breast Cancer Res Treat:-9, 2012
136. Krawczyk N, Banys M, Hartkopf A, et al.: - Circulating tumour cells in breast cancer. - Ecancermedalscience, 2013
137. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, et al.: - Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. - Clin Cancer Res:-600, 2008

138. Wallwiener M, Riethdorf S, Hartkopf AD, et al.: - Serial enumeration of circulating tumor cells predicts treatment response and prognosis in metastatic breast cancer: a prospective study in 393 patients. - *BMC Cancer*:2407-2414, 2014
139. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al.: - Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. - *Lancet Oncol*:-14, 2014
140. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al.: - Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. - *Lancet Oncol*:-14, 2014
141. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, et al.: - Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. - *Clin Breast Cancer*:-9, 2007
142. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al.: - Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. - *Clin Cancer Res*:-9, 2006
143. Dawood S, Broglio K, Valero V, et al.: - Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? - *Cancer*:-30, 2008
144. Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, et al.: - Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. - *Int J Cancer*:-9, 2006
145. Saad A, Kanate A, Sehbai A, et al.: - Correlation among [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography, cancer antigen 27.29, and circulating tumor cell testing in metastatic breast cancer. - *Clin Breast Cancer*:-61, 2008
146. Dawood S, Cristofanilli M: - Integrating circulating tumor cell assays into the management of breast cancer. - *Curr Treat Options Oncol*:-95, 2007
147. Christopher T, Gradishar WJ, O'Shaughnessy JA, et al.: - Clinical roundtable monograph: effective management of quality of life in metastatic breast cancer. - *Clin Adv Hematol Oncol*:-14, 2014

148. Rea D, Francis A: - Breast screening saves lives: now is the time to address overtreatment. - *J Comp Eff Res*: -3, 2014
149. Drukker CA, Schmidt MK, Rutgers EJ, et al.: - Mammographic screening detects low-risk tumor biology breast cancers. - *Breast Cancer Res Treat*: -11, 2014
150. Braun S, Vogl FD, Naume B, et al.: - A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. - *N Engl J Med*: -802, 2005
151. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K: - Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. - *Int J Cancer*: -2006, 2008
152. Schindlbeck C, Andergassen U, Hofmann S, et al.: - Comparison of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and disseminated tumor cells in the bone marrow (DTC-BM) of breast cancer patients. - *J Cancer Res Clin Oncol*: -62, 2013
153. Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, et al.: - A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. - *N Engl J Med*: -92, 2004
154. Wicha MS, Hayes DF: - Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. - *J Clin Oncol*: -11, 2011
155. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K: - Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. - *Nat Rev Cancer*: -37, 2011
156. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, et al.: - The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. - *Nature*: -40, 2012

7 Abkürzungsverzeichnis

Abl.	-	Ablatio
AB-Serum	-	Antibody-Serum
AI	-	Aromatase Inhibitor
Anti-EMA	-	Anti-epitheliale Membranantigene
APAAP	-	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
bds.	-	beidseits
BET	-	Brusterhaltende Therapie
bzw.	-	beziehungsweise
CA15-3	-	Cancer Antigen 15-3
CEA	-	Carcinoembryonales Antigen
CHE	-	Chemotherapie
CTC (-s)	-	Zirkulierende Tumorzellen/ Circulating tumor cells
CT-Scan	-	Computertomographie-Untersuchung
DNA	-	Desoxynukleinsäure
ED	-	Erstdiagnose
EF	-	England Finder
EGFR	-	epitheliale Wachstumsfaktor-Rezeptoren
EMT	-	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EpCAM	-	Epithelial cell adhesion molecule
ER	-	Östrogenrezeptor
ERRB2	-	Humaner epithelialer Wachstumsfaktor Typ 2 Rezeptor
HEA	-	epitheliale Antigene
Her2/neu	-	Humaner epithelialer Wachstumsfaktor Typ 2 Rezeptor
IRS	-	Immun Reactive Score
li.	-	links
M ₀ –Patientinnen	-	Patientinnen ohne metastasiertem Mammakarzinom
M ₁ –Patientinnen	-	Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom
MACS	-	Magnetic activated cell separation
Mamma-Ca	-	Mammakarzinom
MET	-	Mesenchymale-Epitheliale Transition
Mod. Mast.	-	modifizierte Mastektomie
mRNA	-	messenger-RNA = Boten Ribonukleinsäure
MRT	-	Magnetresonanztomographie

Neg.	-	Negativ
PCR	-	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
Pos.	-	Positiv
PR	-	Progesteronrezeptor
RAD	-	Radiotherapie/ Bestrahlung
re.	-	rechts
RECIST	-	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
TAG	-	tumorassoziierte Gylkoprotein-Antigene
Tam	-	Tamoxifen
UICC	-	Union Internationale Contre le Cancer
Z.n.	-	Zustand nach

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Brustkrebsinzidenz in Deutschland laut Robert-Koch-Institut	- 5 -
Abbildung 2.2 Metastasierungskaskade nach Pantel und Brankenhoff, 2004, modifiziert nach S.W. Carpenter von 2012. Dargestellt sind zwei Metastasierungswerge, lymphogen und hämatogen. Primäre Fernmetastasen können durch erneute Disseminierung sekundäre Fernmetastasen	- 16 -
Abbildung 2.3 Gesamtüberleben abhängig vom Vorhandensein zirkulierender Tumorzellen	- 20 -
Abbildung 4.1 Chi-Quadrat-Test für Trends in Bezug auf Tumorstadium und dem Auffinden von CTC	- 35 -
Abbildung 4.2 a-d CTC einer metastasierten Patientin unterm Mikroskop	- 36 -

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Brustkrebsinzidenz pro 100.000 Frauen in Nordamerika, Nord-/Westeuropa, Australien/Neuseeland	- 2 -
Tabelle 2.2 Relative Risikofaktoren für Brustkrebspatienten	- 4 -
Tabelle 2.3 Immun Reactive Score (IRS) nach Remmele und Stegner	- 7 -
Tabelle 2.4 Einteilung des semiquantitativen H- Score nach McCarty	- 8 -
Tabelle 2.5 TNM-Klassifikation	- 9 -
Tabelle 2.6 Union internationale contre cancer –Klassifikation (UICC)	- 11 -
Tabelle 2.7 Histopathologisches Grading nach Bloom und Richardson / Elston und Ellis	- 11 -
Tabelle 3.1 Keratin-Antikörper und Charakterisierungsmöglichkeiten	- 25 -
Tabelle 3.2 M ₀ - und M ₁ -Kollektive unterteilt nach Risikofaktoren bei theoretisch nicht metastasierter Situation	- 28 -
Tabelle 4.1 Zusammenfassung der CTC und allgemeinen Merkmalen der M ₀ und M ₁ Patientinnen	- 33 -

XIX

Tabelle 4.2 Zusammenfassung der CTC-Ergebnisse und Stadien der Patientinnen mit primärem und metastasiertem Mammakarzinom	- 34 -
Tabelle 4.3 Zusammenfassung der M_0 - Patientinnen	- 38 -
Tabelle 4.4 Zusammenfassung der CTC in Bezug auf TNM-Status, Grading und Rezeptorstatus bei M_0 - Patientinnen und dazugehörigen p-Werten	- 40 -
Tabelle 4.5 Zusammenfassung der M_1 - Patientinnen	- 43 -
Tabelle 4.6 Zusammenfassung der Verlaufskontrollen bei den M_1 - Patientinnen	- 45 -
Tabelle 4.7 Zusammenfassung der CTC in Bezug auf TNM-Status, Grading und Rezeptorstatus bei M_1 - Patientinnen und dazugehörigen p-Werten	- 47 -
Tabelle 4.8 Zusammenfassung der CTC Veränderungen in Abhängigkeit von CT-Untersuchungen bzw. CA15-3 Kontrollen bei CTC positiven Patientinnen	- 50 -
Tabelle 5.1 Zusammenfassung der CTC-Ergebnisse und Stadien der Patientinnen mit primären und metastasierten Mammakarzinom	- 59 -

9 Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Volkmar Müller aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die Möglichkeit mit seinem Team in der Tagesklinik die Patientinnen zu kontaktieren, zu finden und in die Arbeit zu integrieren.

Besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. S. Joesse für die sehr gute Zusammenarbeit und unermüdlige Hilfsbereitschaft bedanken. Durch gezieltes Hinterfragen der Arbeitsschritte und Methoden öffneten sich stets neue Möglichkeiten der Ausarbeitung.

Außerdem danke ich A. Babayan für ihren Rat und die Unterstützung, der Einarbeitung im Labor und der Unterstützung bei der Erstellung einer Datenbank und Auswertung der Proben. Ferner bedanke ich mich für die Hilfestellung bei den Färbungen und Aufarbeitung der Blutproben. Darüber hinaus für die Durchsicht und Ratschläge für die Ausarbeitung dieser Arbeit.

C. Coith, S. Schwentesius und S. Hoppe aus dem Institut für Tumorbiologie danke ich für die vielen Ratschläge, Unterstützung bei der Blutaufarbeitung und das nette Arbeitsklima im Labor.

Dr. J. Strubenhoff, Dr. D. Grimm und Dr. K. Krauß aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf möchte ich für ihren eifrigen und beharrlichen Einsatz und die Bereitstellung der Patientenproben und – daten danken.

Des Weiteren möchte ich den Krankenschwestern der Tagesklinik und Mamma-Sprechstunde der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danken für ihre Unterstützung und Ratschlägen in der Vorbereitung der Blutentnahmen.

Ich möchte mich bei Sarina Klemm, Marius Soyke, Madita Pflügelbauer, Stephanie Müller und Anna Babayan für die Durchsicht und Verbesserungsvorschläge meiner Arbeit bedanken.

10 Lebenslauf

<u>Name</u>		Sven-Erik Sönksen
<u>Geburtsdatum & -ort</u>		22.07.1989 in Hamburg
<u>Wohnort</u>		Hamburg
<u>Schulbildung</u>	2000-2009	Alstergymnasium in Henstedt-Ulzburg Abschluss: Abitur
<u>Hochschulstudium</u>	2009-2011 2011 2011-2013 2013-2015 2014 2015	Vorklinik in Hamburg 1. Staatsexamen Humanmedizin (Physikum) Klinische Blöcke: Reproduktion und Schwangerschaft, Kindheit und Jugend; Der innere Mensch; Der Kopf; Psychosoziale Medizin; Diagnostische Medizin, Wahlfach: Experimentelle Onkologie und Strahlenbiologie Doktorarbeit in der Tumorbiologie Hamburg Eppendorf 2. Staatsexamen Humanmedizin Praktisches Jahr 3. Staatsexamen Humanmedizin Praktisches Jahr
<u>Praktika</u>	2008 2009 2012 2013 2014	Wirtschaftspraktikum bei Ethicon (Norderstedt) Krankenpflegepraktikum im BwKrhs Hamburg MKG-Chirurgie-Famulatur im BwKrhs Hamburg Neurochirurgie-Famulatur im Bwkrhs Berlin Gynäkologie-Famulatur im UK Eppendorf (Hamburg) MKG-Chirurgie-Famulatur im BwZKrhs Koblenz Radiologie-Famulatur in der Radiologischen Allianz (Hamburg)
<u>Sprachkenntnisse</u>		Deutsch, Englisch
<u>Computerkenntnisse</u>		Microsoft Office, Open Office, Soarien

11 Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Hamburg, d. 04.02.15

Unterschrift: _____

Sven-Erik Sönksen