

**Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen**

**Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. mult. D. Wallwiener**

**Bestimmung des ER $\alpha$ -Status von disseminierten Tumorzellen  
im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem  
Mammakarzinom**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Eberhard Karls Universität**

**zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Natalia Krawczyk**

**aus**

**Wroclaw**

**2010**



Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Frau Professor Dr. T. Fehm

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Möhle



## **Teile dieser Arbeit wurden bisher veröffentlicht in:**

Fehm TN, Krawczyk N, Solomayer EF, Becker-Pergola G, Dürr-Störzer S, Neubauer H, et al. ER alpha-status of disseminated tumor cells in bone marrow of primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2008; 10(5): R76.

Krawczyk N, Banys M, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Expression of Estrogen Receptor (ER) in disseminated tumor cells of breast cancer patients. *Onkologie* 2008; 31(suppl 1):Page 45

Fehm T, Krawczyk N, Banys M, Wallwiener D, Solomayer EF. Expression of estrogen receptor (ER) in disseminated tumor cells of breast cancer patients. *European Journal of Cancer Supplements Volume 6, No. 7, April 2008, page 114*

Krawczyk N, Banys M, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Estrogenrezeptor-(ER-)Expression auf disseminierten Tumorzellen von Mammakarzinompatientinnen. 57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Hamburg 2008

Fehm TN, Krawczyk N, Wallwiener D, Becker S, Solomayer EF. Estrogen receptor (ER) status of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 21013*

Krawczyk N, Banys M, Becker S, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Evaluierung des Östrogenrezeptorstatus auf disseminierten Tumorzellen beim Mammakarzinom – Erklärungsmodell für endokrine Therapieversager? 27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, Lübeck 2007

Krawczyk N, Banys M, Wallwiener M, Solomayer EF, Fehm T. Expression of estrogen receptor (ER) in disseminated tumor cells of breast cancer patients. 6<sup>th</sup> International Symposium on Minimal Residual Cancer, Hamburg 2007



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Das Mammakarzinom.....	1
1.1.1. Epidemiologie.....	1
1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren.....	2
1.2. Tumorzelldissemination.....	3
1.2.1. Inzidenz.....	4
1.2.2. Klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen.....	4
1.2.3. Charakterisierung disseminierter Tumorzellen.....	5
1.3. Östrogene und Östrogenrezeptoren.....	7
1.4. Therapie des Mammakarzinoms.....	9
1.4.1. Adjuvante Systemtherapie.....	9
1.5. Problemstellung.....	13
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1. Material.....	15
2.1.1. Patientenkollektiv.....	15
2.1.2. Geräte.....	15
2.1.3. Chemikalien/Kits.....	16
2.1.4. Antikörper, Antikörperkonjugate und Normalsera.....	16
2.1.5. Allgemeines Laborequipment.....	17
2.1.6. Pufferlösungen.....	17
2.1.7. Zelllinien.....	18
2.2. Methoden.....	19

2.2.1. Knochenmarkaspiration.....	19
2.2.2. Aufbereitung des Zellmaterials .....	19
2.2.3. Herstellung der Zytospins.....	20
2.2.4. Nachweisprinzip .....	23
2.2.5. Immunfluoreszenz-Färbung.....	24
2.2.6. Antikörpermarkierung .....	27
2.2.7. Etablierung der Immunfluoreszenz-basierten Methode .....	28
2.2.8. Optimales Färbungsprotokoll.....	32
2.2.9. Auswertung der Präparate.....	33
2.2.10. Auswertungskriterien .....	35
2.2.11. Immunhistochemie des Primärtumors.....	39
2.2.12. Statistik .....	41
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
3.1. Etablierung eines Färbeprotokolls zum Nachweis ER $\alpha$ -positiver DTZ.....	42
3.2. Patientenkollektiv .....	44
3.2.1. Altersverteilung.....	44
3.2.2. Klinisch-pathologische Daten der primär operierten Patientinnen ..	45
3.3. Detektion disseminierter Tumorzellen.....	47
3.3.1. Korrelation des KM-Status mit klinisch-pathologischen Faktoren...	49
3.4. ER $\alpha$ -Status disseminierter Tumorzellen .....	51
3.5. Der Vergleich des ER $\alpha$ -Status zwischen disseminierten Tumorzellen und dem Primärtumor .....	53
3.6. Heterogenität der ER $\alpha$ -Expression von disseminierten Tumorzellen.....	54
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>57</b>

4.1. Tumorzelldissemination .....	57
4.2. Östrogenrezeptorstatus .....	58
4.3. Fragestellungen zur Methodik .....	59
4.3.1. Knochenmark als Ort der Tumorzelldissemination .....	59
4.3.2. Nachweismethoden der disseminierten Tumorzellen .....	60
4.4. Diskussion der Ergebnisse .....	65
4.4.1. ER $\alpha$ -Status der DTZ und die Korrelation mit dem Primärtumor.....	65
4.4.2. ER $\alpha$ -Status metastatischer Läsionen bei Mammakarzinompatientinnen .....	66
4.4.3. Weitere phänotypische Merkmale der DTZ .....	68
4.4.4. Hypothesen zur Erklärung der Phänotypunterschiede .....	72
4.4.5. Konsequenzen für die Therapie .....	75
4.5. Schlussfolgerungen.....	78
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>98</b>
<b>10. Lebenslauf .....</b>	<b>100</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
BET	Brusterhaltende Therapie
CK	Zytokeratin
DTZ	Disseminierte Tumorzellen
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EMA	Epitheliales Membranantigen
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloprotease inducer
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ER	Östrogenrezeptor
FisH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FM	Fernmetastase
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HR	Hormonrezeptor
Her2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
ICC	Immunzytochemie
ISHAGE	International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNC	Mononukleäre Zellen (mononuclear cells)
MRD	Minimal residual disease
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	Progesteronrezeptor

RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
TGF	Transforming Growth Factor
TTP	Time to progression of disease
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
UpM	Umdrehungen pro Minute
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp
uPA-R	Rezeptor des Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp
ZTZ	Zirkulierende Tumorzellen



# **1. Einleitung**

## **1.1. Das Mammakarzinom**

### **1.1.1. Epidemiologie**

Im Jahr 2004 wurden weltweit ca. 1,2 Millionen Brustkrebserkrankungen diagnostiziert <sup>(40)</sup>. Statistisch gesehen muss jede zehnte Frau damit rechnen, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken. In den industriell fortgeschrittenen Ländern stellt Brustkrebs die häufigste maligne Neubildung bei Frauen dar <sup>(153)</sup>. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes in Berlin erkranken allein in Deutschland jährlich ca. 55.000 Frauen an Brustkrebs, was einem Anteil von 27% an allen Krebsneuerkrankungen bei Frauen entspricht <sup>(153)</sup>. Auch hinsichtlich der Krebssterblichkeit bei Frauen ist Brustkrebs mit 17% die am häufigsten zum Tode führende Krebsart. Dem statistischen Bundesamt zufolge starben in Deutschland im Jahre 2006 17.286 Frauen an Brustkrebs, was 4% aller Todesfälle bei Frauen entsprach.

Obwohl die Inzidenz des Mammakarzinoms in den Industrieländern seit mehreren Jahren stetig wächst, beobachtet man heute in den meisten westlichen Ländern eine rückläufige Mortalität an Brustkrebs <sup>(18)</sup>. Diese Entwicklung lässt sich in erster Linie durch Therapiefortschritte erklären, wenngleich auch die Vorsorge- und Früherkennungsprogramme dabei eine Rolle spielen. <sup>(116, 8, 14)</sup>.

### **1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren**

Das Mammakarzinom stellt ein histologisch heterogenes Krankheitsbild dar, dessen Ätiologie bis heute nicht vollständig geklärt werden kann. Es wird heutzutage von einer multifaktoriellen Genese dieser Erkrankung ausgegangen. Die wesentlichen Risikofaktoren sind: Weibliches Geschlecht, hohes Alter, genetische Disposition und hormoneller Status.

So ist das Brustkrebsrisiko bei Frauen 400mal höher als bei Männern <sup>(21)</sup>. Weiter steigt es stetig mit dem Alter, wobei der Erkrankungsgipfel zwischen dem 50. und dem 70. Lebensjahr liegt <sup>(151)</sup>.

Bei etwa 5% der Frauen ist die Entwicklung der Krankheit genetisch bedingt. Verantwortlich hierfür sind dominante, hoch penetrante Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA-1 und/oder BRCA-2. Die Mutation dieser beiden Gene erhöht das kumulative Erkrankungsrisiko bis zur Vollendung des 70. Lebensjahres um bis zu 85% <sup>(63)</sup>. Bei alleiniger Mutation von BRCA-1, die für ca. 80% der familiär bedingten Mammakarzinome verantwortlich ist, beträgt das kumulative Risiko 82% <sup>(53)</sup>.

Zusätzlich spielen in der Ätiologie des Mammakarzinoms die hormonellen Faktoren eine wesentliche Rolle. Eine verlängerte bzw. erhöhte Konzentration der endogenen Östrogene dient als Erklärung des Risikoanstiegs bei früher Menarche, später Menopause, später ersten Schwangerschaft, geringer Anzahl von Schwangerschaften sowie bei Kinderlosigkeit oder kurzer Stillphase <sup>(151)</sup>.

Schließlich werden auch Umwelt- und Ernährungseinflüsse sowie Rauchen und Alkoholkonsum als Risikofaktoren bei Brustkrebs diskutiert.

### **1.1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren**

Zu den Faktoren mit prognostischer Relevanz bei Mammakarzinom gehören Alter, Tumorgroße, Lymphknotenbefall, histologischer Typ, Grading, Hormonrezeptorstatus des Tumors sowie Lymphgefäßinvasion und perinoduläre Infiltration <sup>(6)</sup>. Nach Empfehlungen der Konsensus-Konferenz von St-Gallen 2007 werden für Therapieentscheidungen jedoch nur Alter, Tumorgroße, Lymphknotenbefall, Grading und Hormonrezeptorstatus benötigt <sup>(74)</sup>. Die Bestimmung dieser Parameter ist für eine vollständige Krankheitsdiagnose obligat. Zu den prädiktiven Faktoren für ein Therapieansprechen hingegen gehören der Hormonrezeptorstatus, der Menopausenstatus und der Her2/neu-Status.

In der Literatur werden zusätzlich zahlreiche biochemische Marker (Kathepsin D, B und L, uPA, PAI-1), Wachstumsfaktoren (EGF, TGF $\alpha$ ) oder proliferationskinetische Marker (S-Phase-Fraktion, MIB1, Ki-67) als potentielle prognostische Faktoren für Mammakarzinom diskutiert. Unter diesen „neuen“ Prognosefaktoren sind die tumorassoziierten Proteolysefaktoren, der Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) und der Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ1 (PAI-1) besonders vielversprechend (<sup>100</sup>). Auch der immunzytochemische Nachweis disseminierter Tumorzellen im KM gehört zu den Faktoren mit unabhängiger prognostischer Relevanz. In zahlreichen Studien sowie in einer Poolanalyse konnte mit Level-I-Evidenz gezeigt werden, dass der positive Knochenmarkstatus bei Mammakarzinom-Patientinnen mit einer verschlechterten Prognose einhergeht (<sup>28, 69, 104, 70, 26, 88, 165, 47</sup>).

### **1.2. Tumorzelldissemination**

Unter dem Begriff der Tumorzelldissemination versteht man eine schon in Frühstadien der neoplastischen Erkrankung stattfindende, hämatogene Streuung einzelner Zellen bzw. Zellcluster des Primärtumors in das Knochenmark. Dieses Phänomen wird nicht nur bei Mammakarzinom, sondern auch bei anderen gynäkologischen Malignomen beobachtet (<sup>11</sup>). Da sich dies noch vor einer Stromainvasion ereignet, gelten die DTZ als Vorstufe einer potenziellen Mikrometastasierung. Damit stellt die Tumorzelldissemination ein reversibles, kurativ therapierbares Krankheitsstadium dar, während es sich bei Mikrometastasen zumeist um eine palliative Situation handelt (Tab. 1). Isolierte Tumorzellen können auch im peripheren Blut nachgewiesen werden, wobei die prognostische Bedeutung epithelialer Zellen im Blut nach wie vor unklar bleibt (<sup>169, 177, 130, 178, 168</sup>).

**Tab. 1** Unterschiede zwischen isolierten Tumorzellen und Mikrometastasen nach Hermanek et al (81)

	Isolierte Tumorzellen (DTZ/ZTZ)	Mikrometastasen
Größe	Einzelne Zellen oder Zell-Cluster	Größter Durchschnitt $\geq 0,2\text{cm}$
Gefäßwandkontakt oder LK-Sinuswandkontakt	Nein	Ja
Extravasation (Invasion und Penetration des Gefäßes oder der LK-Sinuswand)	Nein	Ja
Extravaskuläre (extrasinusoidale) Stromareaktion	Nein	Meistens Ja
Extravaskuläre (extrasinusoidale) Tumorzellproliferation	Nein	Ja

DTZ-disseminierte Tumorzellen, ZTZ- zirkulierende Tumorzellen; LK-Lymphknoten

### 1.2.1. Inzidenz

Disseminierte Tumorzellen im KM können verschiedenen Studien zufolge bei 10-43% aller Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden. Die Häufigkeit ihrer Detektion im Blut beträgt 25-71% (3, 13, 130, 67, 82, 175, 23, 92, 54, 170). Die Diskrepanz der Positivitätsraten ergibt sich aus der unterschiedlichen Nachweismethodik, sowie dem heterogenen Patientenkollektiv.

### 1.2.2. Klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen

Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Nachweis der DTZ im KM bei Mammakarzinompatientinnen mit einer schlechten Prognose sowohl hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens, als auch der Gesamtüberlebensdauer einhergeht. Eine von Braun et al. 2005 durchgeführte große Metaanalyse der bisher publizierten Studien belegte mit Level-1-Evidenz, dass der DTZ-

Nachweis im KM die Prognose beeinträchtigt und als unabhängiger Risikofaktor betrachtet werden sollte <sup>(28)</sup>.

Obwohl die Tumorzell dissemination auf eine beginnende hämatogene Generalisierung der Krankheit hinweisen kann, muss nicht jede Patientin mit DTZ mit der Entwicklung einer Metastase rechnen. Bereits in 1970er Jahren wurde bewiesen, dass epitheliale Tumore sehr frühzeitig Einzelzellen in die Blutzirkulation abgeben. Basierend auf Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass täglich tausende epithelialer Zellen vom Primärtumor in die Blutbahn gelangen. Das weitere Schicksal dieser Zellen ist jedoch sehr unterschiedlich. Ein großer Teil wird aus dem Blut und Knochenmark eliminiert bzw. stirbt ab <sup>(60)</sup>. Möglicherweise handelt es sich in diesen Fällen um benigne Zellen, die auch bei Patientinnen mit gutartigen Erkrankungen beschrieben wurden <sup>(134)</sup>. Bei einem weiteren Teil der Patientinnen persistieren die DTZ jedoch mehrere Jahre im KM, wo sie sich zunächst in einem Ruhestadium befinden. Dieses Phänomen wird als „tumor cell dormancy“ bezeichnet <sup>(105, 122)</sup>. Ein Teil der disseminierten Tumorzellen kann auch zu Metastasierung führen <sup>(103, 58)</sup>.

In der aktuellsten TNM-Klassifikation wird der immunzytochemische DTZ Nachweis als pM0(i+) klassifiziert <sup>(81, 157, 158)</sup>. Bei molekularbiologischen Detektionsmethoden wird der Befund als pM0 (mol+) erfasst.

### **1.2.3. Charakterisierung disseminierter Tumorzellen**

#### 1.2.3.1. Phänotypisierung

Die Charakterisierung des Phänotyps disseminierter Tumorzellen erfolgt durch die Untersuchung der Expressionsmuster verschiedener Antigene. Auf diese Weise konnte bereits in vielen Studien gezeigt werden, dass diese Zellen diverse Proliferationsmarker, Adhäsionsmoleküle oder Wachstumsfaktoren im

unterschiedlichen Ausmaße exprimieren. Eine geringe Expression von Proliferationsantigenen wie Ki-67 oder p120 (<sup>122</sup>) könnte der inkompletten Eliminierung von DTZ durch antiproliferativ gerichtete Chemotherapieschemata zugrunde liegen (<sup>17, 25</sup>). Dieses Phänomen könnte zudem eine sehr lange Latenzzeit bis zur klinischen Manifestation einer eventuellen Metastasierung erklären. Es bleibt jedoch unklar, ob sich die DTZ über diese Zeitspanne hinweg in einem Ruhezustand befinden oder ob sich im KM ein kontinuierlicher, äußerst langsamer Proliferationsprozess abspielt. Zusätzlich wurde auf DTZ eine verminderte Expression von MHC Klasse I Antigenen festgestellt, wodurch sich ihre mangelnde Eliminierung durch das Immunsystem erklären ließe (<sup>123</sup>). Verschiedene Arbeitsgruppen haben ferner die Expressionsmuster von Invasivitäts-Markern wie Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) mit seinem membranständigen Rezeptor (uPA-R), EMMPRIN (Extracellular matrix metalloprotease inducer) oder Kathepsin D auf DTZ hin analysiert. Diese Untersuchungen konnten eine hohe Proteaseaktivität in DTZ nachweisen, welche ihnen eine Degradation von Matrixproteinen und Basalmembranstrukturen ermöglicht (<sup>164, 166, 137, 172</sup>). Des Weiteren konnte die Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin auf DTZ von Mammakarzinompatientinnen festgestellt werden, was im Prozess der Metastasierung nicht ohne Bedeutung bleibt (<sup>66</sup>). Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Studien waren auch die Expressionsmuster des Adhäsionsmoleküls EpCAM oder des Wachstumsfaktor-Rezeptors Her2/neu auf DTZ. Es konnte eine Überexpression von bis zu 87% bei Her2/neu und bis zu 78% bei EpCAM der DTZ bei Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden (<sup>122, 27, 163, 24</sup>). Diese beiden Marker sind von großer Bedeutung, da sie als Angriffspunkte in antikörperbasierten Therapien dienen. So können Trastuzumab (Herceptin®) oder Edrecolomab (Panorex®) zur zielgerichteten Behandlung von Mammakarzinom eingesetzt werden (<sup>79</sup>). Die Phänotypisierung der DTZ wird in Tab. 18 (Diskussion) zusammengefasst.

### 1.2.3.2. Genotypisierung

Die Assoziation zwischen spezifischen genetischen Defekten und der Tumorentstehung lässt sich durch das Modell der Mehrschrittkarzinogenese erklären. Dieses besagt, dass sich genetische Veränderungen sukzessiv in einer normalen Epithelzelle kumulieren, was, bedingt durch die Änderung der Zellregulationsmechanismen, zu Zellproliferation und Entwicklung eines invasiven Karzinoms führt. Durch erhöhte Zellmobilität oder die Fähigkeit, die Angiogenese zu induzieren, kommt es zunächst zur Zelldissemination und schließlich gegebenenfalls zur Fernmetastasierung (<sup>33, 154, 20, 141, 19, 43, 152</sup>).

Basierend auf diesem Modell haben verschiedene Arbeitsgruppen begonnen, DTZ mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zu genotypisieren. Dazu werden zur Visualisierung bestimmter DNA-Fragmente (z.B. bekannte Protoonkogene) spezifische Sonden angewendet. Zur Detektion der numerischen Aberrationen kommen spezielle  $\alpha$ -Satelliten-Sonden zum Einsatz. Bis dato wurde in verschiedenen Studien insbesondere das Chromosom 17 untersucht, auf welchem viele für das Mammakarzinom wichtige Gene (z.B. Her2/neu, p53, BRCA1) lokalisiert sind (<sup>107, 85, 159</sup>). So konnten DTZ hinsichtlich Aberrationen im Bereich verschiedener Protoonkogene charakterisiert werden, wobei bisherigen Analysen aufgrund der kleinen Patientenzahlen keine prognostische Bedeutung gegeben werden konnte (<sup>64, 112</sup>). Darüber hinaus wurde mit Hilfe weitergehender Genotypisierung der maligne Charakter von DTZ bewiesen (<sup>58</sup>).

## 1.3. Östrogene und Östrogenrezeptoren

Östrogene sind die wichtigsten Geschlechtshormone der Frau. Sie werden hauptsächlich im Graafschen Follikel produziert, daneben jedoch auch im Corpus Luteum, sowie während der Schwangerschaft in der Plazenta. Die Hormonproduktion wird von der Hypophyse über das follikelstimulierende

Hormon (FSH) hervorgerufen, welche wiederum über GnRH-Impulse (Gonadotropin Releasing Hormone) des Hypothalamus gesteuert wird. Drei Typen natürlicher Östrogene sind bekannt: Östron, Östradiol und Östriol. Östradiol stellt dabei das wirksamste Östrogen dar.

Die Dauer der Östrogen-Einwirkung auf das Brustdrüsengewebe ist einer der bekannten Risikofaktoren für die Entwicklung und Progression der Mammakarzinomkrankung. Die Wirkung dieser Hormone erfolgt über die Aktivierung von Östrogenrezeptoren (ER) <sup>(146)</sup>. ER sind Steroidrezeptoren, die zu der Superfamilie der nukleären Rezeptoren NR3I zählen <sup>(71)</sup>. Sie gehören zu den Transkriptionsfaktoren und regulieren mittels DNA-Bindung die Expression bestimmter Zielgene.

Bis dato konnten zwei humane Östrogenrezeptorsubtypen identifiziert werden: Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) und Östrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ). Die beiden ER werden von unterschiedlichen Genen kodiert. Das ER $\alpha$ -Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert, während sich der Locus des ER $\beta$ -Gens auf Chromosom 14 befindet <sup>(75, 55)</sup>. Beide Rezeptoren werden in Funktionsdomäne von A bis F aufgeteilt, die in die DNA- und Liganden-Bindung involviert sind. ER $\alpha$  und ER $\beta$  besitzen die gleiche Grundstruktur und können mit ähnlicher Affinität Östradiol binden sowie durch ein Antiöstrogen inhibiert werden <sup>(44, 94)</sup>.

Interessanterweise weisen beide ER-Formen eine unterschiedliche Verteilung im Körper auf, was auf ihre Gewebespezifität hinweist. ER $\beta$  wird vor allem in den Ovarien und in der Prostata exprimiert, ist aber auch im Hoden, Uterus, Brust und Colon aufzufinden <sup>(94, 95, 62)</sup>. ER $\alpha$  stellt den dominanten ER-Typ in Uterus, Brust und Leber dar <sup>(38)</sup>.

Beide Östrogenrezeptoren werden nicht nur im gesunden Brustgewebe, sondern auch im Mammakarzinom exprimiert <sup>(55, 118)</sup>. Ihr Wirkungsmechanismus bei der Entwicklung und Progression von Tumoren bleibt weiterhin unklar. Es wird jedoch angenommen, dass der ER $\alpha$  eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielt <sup>(146)</sup>. Der ER $\beta$

scheint einigen Studien zufolge in die Proliferationskontrolle von Mammakarzinomzellen involviert zu sein<sup>(97)</sup>. Etwa 70% der diagnostizierten Mammakarzinome weisen eine ER-Expression auf, wodurch ihr Wachstum durch Östrogen stimuliert werden kann. Ein ER-positiver Status des Mammakarzinoms stellt die Indikation für eine endokrine Therapie dar.

### **1.4. Therapie des Mammakarzinoms**

Die Behandlung des Mammakarzinoms erfolgt heutzutage durch ein individuelles, nach dem Risikoprofil der Patientin erarbeitetes Vorgehen. Neben dem operativen Eingriff gehören zur Behandlung eine Chemo-, Hormon-, bzw. Antikörper/basierte Therapie, sowie eine eventuelle Bestrahlung. Die operative Standardbehandlung des primären Mammakarzinoms ist ein brusterhaltender Eingriff<sup>(61)</sup>. Die Kombination von Tumorexzision mit Sentinel-Lymphknoten-Biopsie oder Axilladisektion und Bestrahlung des Restparenchyms ist hierbei die Norm<sup>(173)</sup>. Bei Multizentrität, positiven Resektionsrändern trotz Nachresektion, kontraindizierter Restbrustbestrahlung oder inflammatorischen Karzinomen besteht eine Indikation für Mastektomie. Verglichen mit der Mastektomie erreicht die brusterhaltende Therapie (BET) zahlreichen Studien zufolge bei angemessener Indikation gleichzusetzende Ergebnisse sowohl hinsichtlich der Rezidivfreiheit, als auch des Gesamtüberlebens<sup>(76)</sup>.

#### **1.4.1. Adjuvante Systemtherapie**

Die Bedeutung der postoperativen Systemtherapie für die Senkung der Rezidivraten und Todesfälle wird von verschiedenen Metaanalysen unterstrichen<sup>(77)</sup>. Aufgrund der Ergebnisse der Konsensus-Konferenz von St. Gallen 2007 zur Therapie des frühen Brustkrebs<sup>(74)</sup> und der Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie<sup>(6)</sup> werden hierfür aktuell Chemo- und Hormontherapie empfohlen. Darüber hinaus hat sich der monoklonale humanisierte Antikörper Trastuzumab bei Her2/neu-positiver Brustkrebserkrankung bewährt und wird entsprechend der publizierten Phase-

III-Studien angewandt (<sup>156</sup>, <sup>162</sup>). Eine weitere Therapieoption in adjuvanter Situation stellen Bisphosphonate dar (<sup>132</sup>, <sup>48</sup>, <sup>126</sup>).

### 1.4.1.1. Endokrine Therapie

Gegenwärtig existieren drei maßgebliche Möglichkeiten zur endokrinen Therapie des hormonrezeptor(HR)-positiven Mammakarzinoms: GnRH-Analoga bzw. andere Formen der Ovarsuppression (prämenopausal), Tamoxifen (prä- und postmenopausal) und schließlich Aromataseinhibitoren (postmenopausal). Grundvoraussetzung für die Anwendung der endokrinen Therapie ist ein hormonsensitiver Primärtumor, der sich durch eine immunhistochemische Färbung definiert (Tab. 6)

#### *Vor der Menopause:*

Primäres Ziel der endokrinen Therapie bei prämenopausalen Mammakarzinompatientinnen ist die Supprimierung der Hormonproduktion der Ovarien. Dies kann zum einen durch eine Ovariectomie bzw. Bestrahlung der Ovarien erfolgen und zum anderen durch die Anwendung von GnRH-Analoga, welche die ovarielle Produktion von Östrogen und Progesteron unterdrücken. Da die Anwendung von GnRH-Analoga eine temporäre Suppression der Ovarialfunktion erlaubt und verschiedenen Studien zufolge den beiden irreversiblen Verfahren gleichzusetzen ist, ist diese Behandlung bei prämenopausalen Patientinnen zu einer interessanten Therapieoption geworden.

Des Weiteren besteht bei prämenopausalen Patientinnen die Möglichkeit einer Therapie mit Tamoxifen. Dieser ER-Modulator verhindert die Bindung des körpereigenen Östrogens an die Östrogenrezeptoren des Tumors bzw. der residualen Tumormasse. Damit stellt er die am besten evidenzbasierte systemische Therapieoption des hormonpositiven Mammakarzinoms dar (<sup>77</sup>). Für einen optimalen Therapieeffekt sollte eine kombinierte Therapie erfolgen:

Die Verabreichung von GnRH-Analoga über zwei bis drei Jahre und eine fünf Jahre andauernde Verabreichung von Tamoxifen.

### *Nach der Menopause:*

Die bisherige Standardbehandlung der postmenopausalen, HR-positiven Mammakarzinompatientinnen bestand aus der täglichen Gabe von 20 mg Tamoxifen über fünf Jahre hinweg. Allerdings weisen neuere Studien mit Blick auf rezidivfreies Überleben auf einen Vorteil des Einsatzes von Aromatasehemmern anstatt oder in Sequenz zu Tamoxifen hin. Diese Substanzen unterbinden durch eine Enzymblockade die Östrogenbildung im Muskel- und Fettgewebe. Eine Aromatasehemmer-Behandlung kann auf drei Arten erfolgen: Zunächst im Anschluss an eine Operation und gegebenenfalls eine Chemotherapie über fünf Jahre hinweg (upfront). Alternativ erfolgt dieser Schritt erst nach zwei- bis dreijähriger Vergabe von Tamoxifen (switch). Schließlich kann diese Behandlung als verlängerte endokrine Therapie nach fünfjähriger Vorbehandlung mit Tamoxifen angewandt werden (extended) <sup>(6)</sup>. Aromatasehemmern sind derzeit nur bei postmenopausalen Frauen indiziert.

### 1.4.1.2. Bisphosphonate

Eine interessante Option in der Therapie des Mammakarzinoms stellen die Bisphosphonate dar. Klassischerweise werden diese Substanzen in der metastasierten Situation angewandt, wobei sich den neusten Studien zufolge auch im adjuvanten Setting ein Profit für die Patientinnen ergibt.

Nach aktuellen Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie werden Bisphosphonate bei metastasierten Mammakarzinompatientinnen zur Behandlung einer Hyperkalzämie, bei Knochenmetastasen sowie einer Tumortherapie-induzierten Osteoporose verabreicht. Des Weiteren sollte bei akut auftretenden Knochenschmerzen mit einer intravenösen Intervalltherapie begonnen werden. Die präventive Wirkung der Bisphosphonate auf Knochenmetastasen in adjuvanter Situation bleibt bei

der heterogenen Datenlage unklar. Aus diesem Grund wird die Teilnahme in aktuellen Studien empfohlen <sup>(6)</sup>. Die Ergebnisse der neusten ACSBG-12 Untersuchung von Gnant et al. zeigten jedoch im Vergleich zur alleinigen Hormontherapie eine signifikante Reduktion der krankheitsbezogenen Ereignisse bei prämenopausalen Mammakarzinompatientinnen, die in adjuvanter Situation eine zusätzliche Gabe von Bisphosphonaten erhielten. Interessanterweise verhinderten die Bisphosphonate sowohl die Inzidenz von Fernmetastasen als auch von lokoregionären und kontralateralen Rezidiven <sup>(73)</sup>.

### 1.4.1.3. Zielgerichtete Therapie

Einen neuen Ansatz bei Behandlung des Mammakarzinoms stellt die gezielte Therapie dar (targeted therapy). Mit Hilfe neuer spezifischer Wirkstoffe können die Tumorzellen zielgenau angegriffen werden, wobei ihre charakteristischen Eigenschaften als Angriffspunkte der Therapie dienen. Es existieren heute drei Möglichkeiten der zielgerichteten Therapie des Mammakarzinoms: Rezeptorblockade (Her2/neu-Antikörper), Störung der Signalübertragung (Tyrosinkinase-Hemmer) und Hemmung der Gefäßneubildung (Angiogenese-Inhibitoren).

#### *Her2/neu Antikörper*

Der Her2/neu ist ein Wachstumsfaktor-Rezeptor, dessen Blockade durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin) die Tumorprogression hemmen kann. Die Behandlung mit Trastuzumab bei metastasiertem, Her2/neu-positivem Mammakarzinom führt sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombination mit Chemotherapie zur Verlängerung der Überlebenszeit der Patientinnen. Nach Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie stellt die Überexpression von Her2/neu-Rezeptor (IHC Score 2+/3+ und/oder FISH-positiv) bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom eine Indikation für Trastuzumab-

Therapien dar. Die Behandlung sollte möglichst früh begonnen und bis zur Krankheitsprogression fortgeführt werden.

Zusätzlich konnte bereits in mehreren Studien belegt werden, dass die Behandlung mit Trastuzumab bei Her2/neu-positiven Mammakarzinomen auch in adjuvanter Situation Mortalität und Rezidivrate reduzieren kann (<sup>90, 129, 143, 160</sup>). Den Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie zufolge ist bei Patientinnen mit Her2/neu-positiven Tumoren (IHC Score 2+/3+ und/oder FISH-positiv) eine Therapie mit Trastuzumab über ein Jahr hinweg indiziert. Dies kann simultan oder sequentiell zu einer Chemotherapie erfolgen.

### **1.5. Problemstellung**

Der Hormonrezeptorstatus des Primärtumors gehört neben der TNM-Klassifikation, dem histologischen Typ und dem histologischen Grading zu den klassischen Prognosefaktoren bei Mammakarzinom. Des Weiteren ist er ein prädiktiver Faktor hinsichtlich der hormonellen Therapie. Nichtsdestotrotz bleiben ca. 20-40% Prozent der Patientinnen mit HR-positivem Primärtumor resistent gegenüber einer Hormontherapie, während 10% der Patientinnen mit HR-negativen Primärtumor auf eine endokrine Therapie ansprechen (<sup>127, 117</sup>).

Die Detektion disseminierter Tumorzellen im KM ist bei primären Mammakarzinompatientinnen mittlerweile als unabhängiger Prognosefaktor anerkannt (<sup>28</sup>). Darüber hinaus ist die Prognose für Frauen mit persistierenden Tumorzellen nach abgeschlossener adjuvanter Therapie wesentlich schlechter als für Patientinnen ohne Tumorzellnachweis im KM (<sup>174, 89</sup>). Damit gelten DTZ als Surrogatmarker einer minimalen residualen Tumorerkrankung. Da der Primärtumor im Rahmen eines operativen Verfahrens komplett entfernt werden kann, wird die Eliminierung disseminierter Tumorzellen zu einem idealen Ziel zukünftiger adjuvanter Therapieansätze. Aus diesem Grund ist ihre weitere Geno- und Phänotypisierung für den klinischen Einsatz entscheidend. Eine

genaue Charakterisierung könnte die patientenspezifische Ausrichtung der systemischen Therapie anhand des individuell erstellten Risikoprofils ermöglichen. Unterschiede im ER $\alpha$ -Expressionsmuster zwischen Primärtumor und DTZ im KM könnten für das inadäquate Ansprechen auf eine endokrine Therapie des Mammakarzinoms verantwortlich sein.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit wurden folgendermaßen definiert:

- (1) die Etablierung eines neuen Immunfluoreszenz-basierten Verfahrens zur Bestimmung des ER $\alpha$ -Status von disseminierten Tumorzellen
- (2) die Evaluation des Östrogenrezeptorstatus der disseminierten Tumorzellen bei primären Mammakarzinompatientinnen
- (3) die Bestimmung der Korrelation des ER $\alpha$ -Status der disseminierten Tumorzellen mit dem ER $\alpha$ -Status des Primärtumors
- (4) die Beurteilung der Heterogenität der disseminierten Tumorzellen hinsichtlich des ER $\alpha$ -Status bei Patientinnen, bei denen mehrere DTZ detektiert wurden

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Patientenkollektiv

275 primäre Mammakarzinompatientinnen, die sich im Zeitraum von Januar 2005 bis August 2007 in Behandlung an der Universitätsfrauenklinik Tübingen befanden, konnten in die Analyse aufgenommen werden. Bei allen Patientinnen wurde routinemässig präoperativ eine Knochenmarkpunktion nach der Jamshidi-Technik durchgeführt <sup>(86)</sup>. Die gewonnenen Knochenmarkaspirate wurden auf hämatogene Tumorzell dissemination hin untersucht und die detektierten epithelialen Zellen weiter nach ER $\alpha$ -Expression charakterisiert. Gleichzeitig wurde der ER $\alpha$ -Status des operativ entfernten Primärtumors beurteilt. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patientinnen und ihre Einwilligung zur Knochenmarkpunktion vor.

#### 2.1.2. Geräte

Zytozentrifuge Universal 16A	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE
Zentrifuge Biofuge primo	Heraeus Instruments, Hamburg, DE
Färbeautomat „DakoAutostainer“	DAKO GmbH, Hamburg, DE
Fluoreszenzmikroskop „Axioplan 2“	Zeiss, Jena, DE

### 2.1.3. Chemikalien/Kits

Ficoll-Hypaque	Biochrom KG, Berlin, DE
Tris HCl (pH 7.5)	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, Hannover, DE
Vectashield Mounting Media (DAPI)	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, DE
ABC-Kit	Vectastain, Vector Laboratories, CA, USA
AK-Verdünnungsmedium S2022	Dako GmbH, Hamburg, DE

### 2.1.4. Antikörper, Antikörperkonjugate und Normalsera

C11-FITC; No F3418	Sigma, MO, USA
ER $\alpha$ -AK (Rabbit) Klon SP1	Lab Vision, USA
Goat -Anti-Rabbit-AK-Alexa Fluor594	Molecular Probes, (Invitrogen, USA)
Goat Normalserum	Dako GmbH, Hamburg, DE
Horse–Anti–Mouse-AK- Tex Red	Vector Laboratories, Inc., CA
Goat-Anti-Rabbit-AK Tex Red Klon CB 11	Biogenex, CA, USA
Er $\alpha$ - Mouse-AK Klon NCL-L-ER-6F11	Novocastra Laboratories, UK
Er $\alpha$ Rabbit-AK Klon H-184	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA

### 2.1.5. Allgemeines Laborequipment

Pipetten, 25 ml, 10 ml	Eppendorf Corning Costar, USA
Falcon-Röhrchen, 50ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
H2O (Ampuwa)	Fresenius AG, Bad Homburg, DE
SuperFrost Plus-Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen, DE
Filterkarten	Hettich, Tuttlingen, DE
Safeskin Handschuhe	Kimberly Clark, USA
Neubauerkammer	SIGMA Aldrich GmbH, Hannover, DE

### 2.1.6. Pufferlösungen

PBS-Puffer (Sigma)	150 mM NaCl 3.0 mM KCl 8.0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH: 7,4
Erythrozyten-Lyse-Puffer	155.0 mM NH <sub>4</sub> Cl 10.0 mM KHCO <sub>3</sub> 0.1 mM EDTA pH: 7,2
Waschpuffer (DAKO)	PBS - 0.1% Tween20
Blocking reagent (DAKO)	5% BSA in PBS - 0.1% Tween20

### 2.1.7. Zelllinien

SKBr-3 ATCC®-Nr. HTB-30	American type culture collection (ATCC)
MCF-7 ATCC®-Nr. HTB-2	American type culture collection (ATCC)

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Knochenmarkaspiration**

Alle Knochenmarkpunktionen wurden präoperativ unter streng aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Aspiration erfolgte aus der spina iliaca anterior superior nach der Jamshidi-Technik<sup>(86)</sup>. Direkt vor der Beckenkammpunktion wurde die Haut über der Aspirationsstelle mit einem Skalpell inzidiert, um eine Kontamination mit Hautepithelzellen zu vermeiden. Es wurden jeweils 10-20 ml Knochenmark mit einer 20ml Spritze entnommen, die mit 1000IE Heparin versetzt war. Anschließend wurde das Zellmaterial in das Labor der Frauenklinik transportiert und dort sofort aufgearbeitet.

### **2.2.2. Aufbereitung des Zellmaterials**

Die gewonnene Zellsuspension wird mittels Dichtegradient-Zentrifugation in einzelne Zellfraktionen getrennt. Die Methode basiert auf der unterschiedlichen Dichte der festen Bestandteile des Blutes und des Blutplasmas.

Nach Übertragung in ein 50 ml Falcon-Röhrchen wird das Knochenmarkaspirat mit PBS (PBS phosphate buffered saline, SIGMA Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover) auf 30 ml aufgefüllt und auf ein Separiermedium aufgetragen. Dafür werden 15ml Ficoll (Dichte 1,077g/cm<sup>3</sup>, Biochrom, Deutschland) verwendet. Anschließend wird das Zellmaterial bei 1600 Umdrehungen pro Minute und ausgestellter Bremse 30 Minuten lang zentrifugiert.

Da die Dichte des Mediums größer ist als die der Monozyten und Lymphozyten, kleiner jedoch als jene der Granulozyten und Erythrozyten, wird das Knochenmark nach der Zentrifugation in folgende Phasen aufgetrennt (Abb. 1) Plasma, mononukleäre Zellen (Monozyten, Lymphozyten, eventuelle DTZ), Ficoll, Granulozyten und Erythrozyten. Der Überstand wird abgehoben und verworfen. Die Interphase der mononukleären Zellfraktion (MNC) wird

abgenommen und in einem neuen Röhrchen mit PBS resuspendiert. Anschließend werden die Zellen durch erneute Zentrifugation (7 min., 1600 UpM) gewaschen. Nach vorsichtigem Abkippen des Überstandes werden die mononukleären Zellen durch Lysierung in 5-10ml Erythrozyten-Lysepuffer von den Erythrozyten getrennt. Die Suspension wird 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert und anschließend zentrifugiert (7min., 1600UpM). Der Überstand wird abgekippt und das Sediment, in dem sich nun MNC-Zellen befinden, mit 5-10ml PBS Lösung resuspendiert.



**Abb. 1** Schematische und fotografische Darstellung des aufgearbeiteten Knochenmarks mittels Dichtegradientenzentrifugation

### 2.2.3. Herstellung der Zytospins

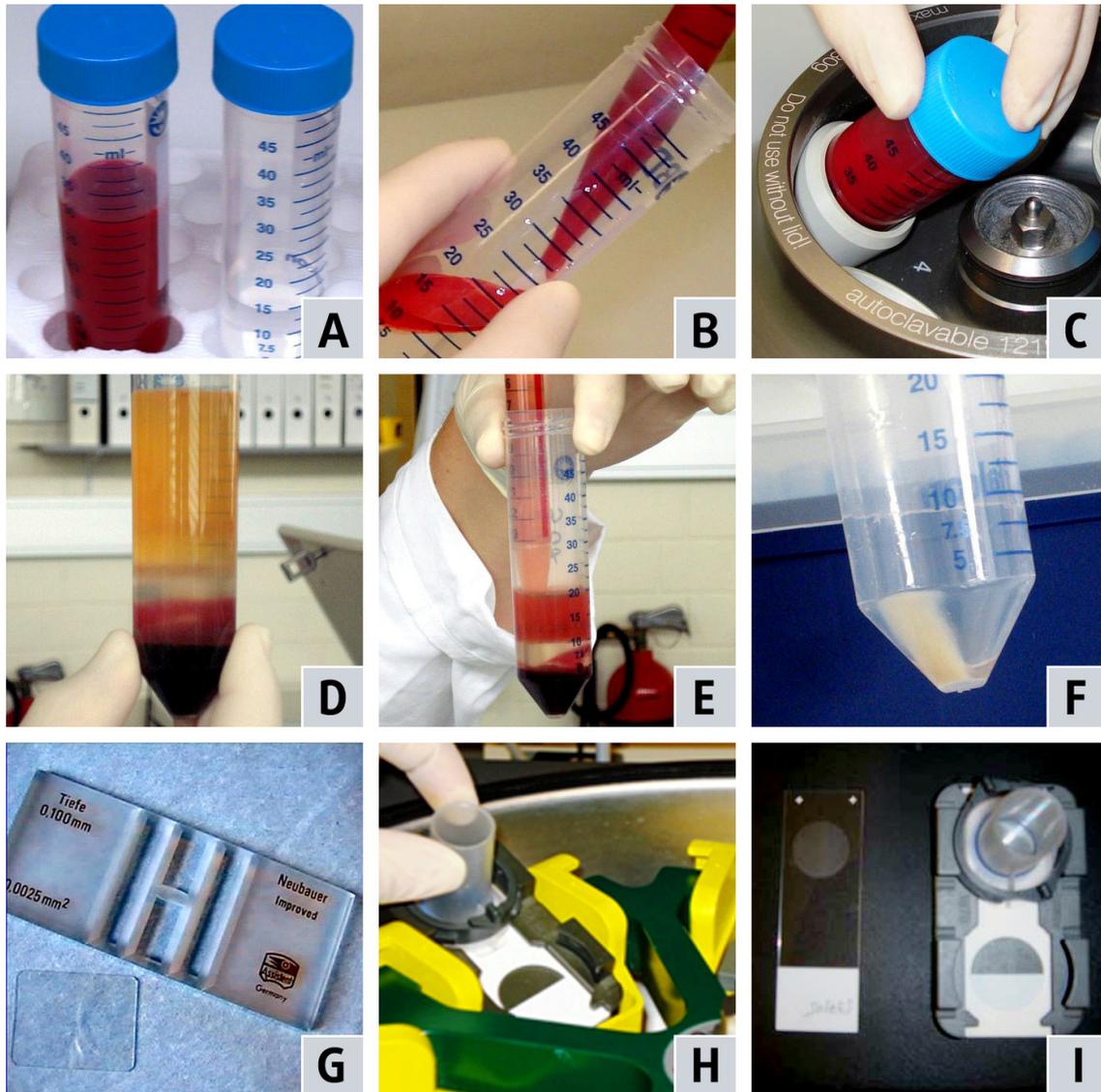
50µl der Zellsuspension werden mit 50µl Trypanblaulösung in einer Mikrotiterplatte vermischt und 1µl der so entstandenen Verdünnung in eine Neubauerzählkammer gefüllt. Mit Hilfe der Kammer kann die Gesamtzahl der

mononukleären Zellen in der Suspension bestimmt werden. Unter dem Lichtmikroskop werden hierzu jeweils vier Eckquadranten ausgezählt. Anschließend wird die Zellzahl nach folgender Formel ausgerechnet:

$$\text{Anzahl der MNC-Zellen pro Milliliter} = \text{Mittelwert der Zellzahl aus 4 Eckquadranten} \times V \times 10^4$$

Der Faktor V entspricht der Verdünnung der Suspension. Der Faktor  $10^4$  ergibt sich aus dem Volumen der Eckquadranten der Neubauer Kammer. Um die Gesamtzahl der Zellen zu bestimmen, muss die Zellzahl pro Milliliter mal 10 multipliziert werden, da das gesamte Volumen der Zellsuspension 10ml beträgt. Wenn die Gesamtzahl der MNC-Zellen bekannt ist, erfolgt eine erneute Zentrifugation (7 min, 1600 UpM). Nach vorsichtigem Abkippen des Überstandes werden die Zellen auf  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml mit PBS verdünnt.

Mit jeweils 1ml der erhaltenen Zellsuspension wird ein Zytospin angefertigt. Dies entspricht  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Probe. Die Suspension wird auf SuperFrost/Plus Objektträger (Langenbrinck, Deutschland) aufgebracht, welche entsprechend der Herstellervorschriften der Zentrifuge (Universal 16A; Hettich, Deutschland) mit Filterkarten und speziellen Halterungen bestückt werden. Anschließend findet bei Raumtemperatur eine Zentrifugation mit 1600 UpM über 2 Minuten statt. Schließlich wird der Überstand vorsichtig abgezogen und die Zytospinhalterung entfernt. Erst nach einer erneuten Zentrifugation (1 min, 1600 UpM), dürfen die Filterkarten entfernt werden. Die Objektträger werden über Nacht luftgetrocknet. zeigt schrittweise die Aufbereitung des Knochenmarkspirates.



**Abb. 2** Einzelne Schritte der Dichtegradientenzentrifugation und der Zytospin-Anfertigung.

- (A) Vorbereitung des mit PBS verdünnten Knochenmarkspirates und der Ficoll-Lösung
- (B) Überschichtung der Ficoll-Lösung mit KM
- (C) Zentrifugation ohne Bremse (30 min, 1600 UpM)
- (D) Trennung der einzelnen Fraktionen entsprechend ihrer Dichte
- (E) Vorsichtige Abnahme der Interphase mononukleärer Zellen (MNC); Resuspendieren mit PBS in neuem Röhrchen; Erneute Zentrifugation (7 min, 1600 UpM)

- (F) *Abnahme des Überstandes; Waschen mit Erythrozyten Lysepuffer, Resuspendieren mit PBS*
- (G) *Auszählung der MNC im Neubauerzählkammer und Verdünnung auf 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml*
- (H) *Aufbringen der Suspension auf SuperFrost Objektträger, Zentrifugation (2 min, 1600 UpM)*
- (I) *Fertige Objektträger*

### **2.2.4. Nachweisprinzip**

#### 2.2.4.1. Zytokeratine

Zytokeratine sind zytoplasmatisch lokalisierte Strukturen des Zytoskeletts, deren Nachweis auf eine epitheliale Herkunft der Zelle hinweist. Sie werden physiologisch von epithelialen Zellen gebildet und kommen in mesenchymalen Geweben wie Blut, Knochenmark und Lymphknoten nicht vor. Aus diesem Grund werden sie als Marker für disseminierte Tumorzellen eingesetzt (<sup>109</sup>). Eine Zytokeratin-positive Zelle im Blut bzw. im Knochenmark wird bei Malignitäten epithelialer Genese als Hinweis auf Tumorzell dissemination des Primärtumors oder, in metastasierter Situation, der Metastase betrachtet. Der maligne Charakter CK-positiver Zellen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen auf molekularer Ebene bewiesen (<sup>68, 91, 150</sup>). Somit ist der positive KM-Status hinsichtlich einer beginnenden Metastasierung von kritischer Bedeutung.

Über 20 unterschiedliche Zytokeratine in humanen Epithelien sind bekannt. Je nach Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt werden sie dem sauren Subtyp I oder dem neutralen/basischen Subtyp II zugeordnet (<sup>10, 109</sup>). Subtypfamilie I besteht aus den CK 9 bis 20 (Molekulargewicht von 40 kD bis 64 kD), Subtypfamilie II aus CK 1 bis 8 (Molekulargewicht von 52 kD bis 68 kD). Ein Tetramer aus jeweils zwei neutralen/basischen und zwei sauren Zytokeratinen bildet die Grundeinheit des Zytokeratinfilaments. Die CK-Expression in den Epithelzellen ist also sehr heterogen (<sup>176</sup>), sodass für ihren

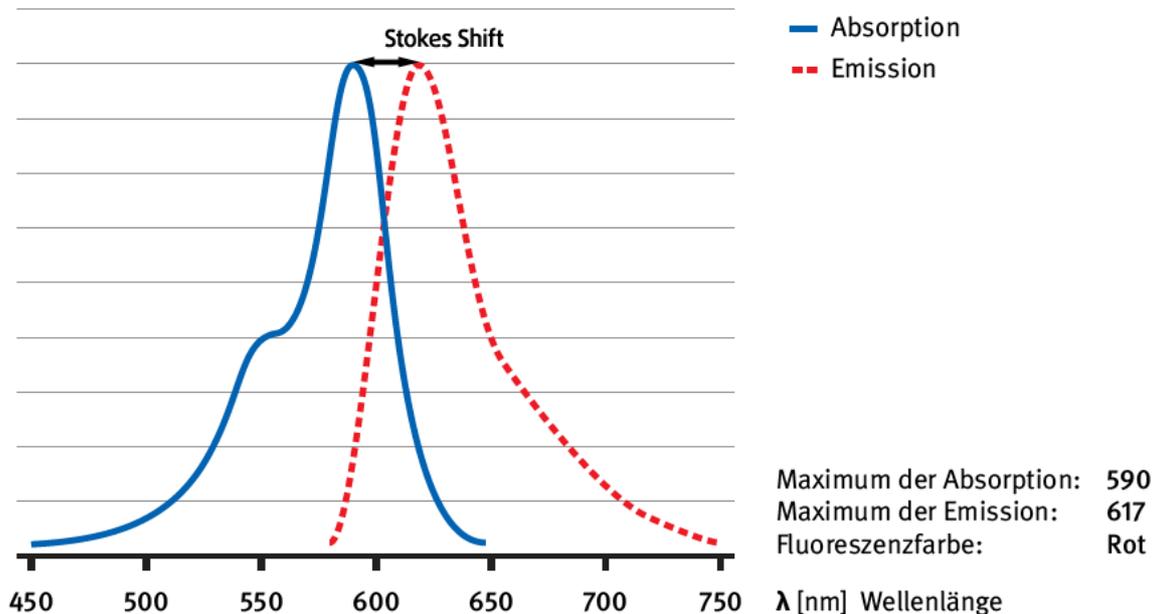
Nachweis meist klassenspezifische AK bzw. mehrere CK identifizierende Gemische von AK eingesetzt werden.

## 2.2.5. Immunfluoreszenz-Färbung

### 2.2.5.1. Physikalische Grundlagen

Fluoreszenz wird physikalisch als spontane Lichtemission eines durch Photonen angeregten Stoffes definiert. Dieses Phänomen kennzeichnet sich dadurch, dass das spontane Leuchten nur während der Anregung stattfindet und danach rasch endet. Des Weiteren gilt für Fluoreszenz die Stokessche Regel, welche besagt, dass das von fluoreszierenden Stoffen emittierte Licht eine größere elektromagnetische Wellenlänge hat, als das vom Stoff absorbierte (Stokes Shift). Dieses Phänomen wird in Abb. 3 und Abb. 4 anhand der Fluorophore FITC und Alexa Fluor 594 verdeutlicht.

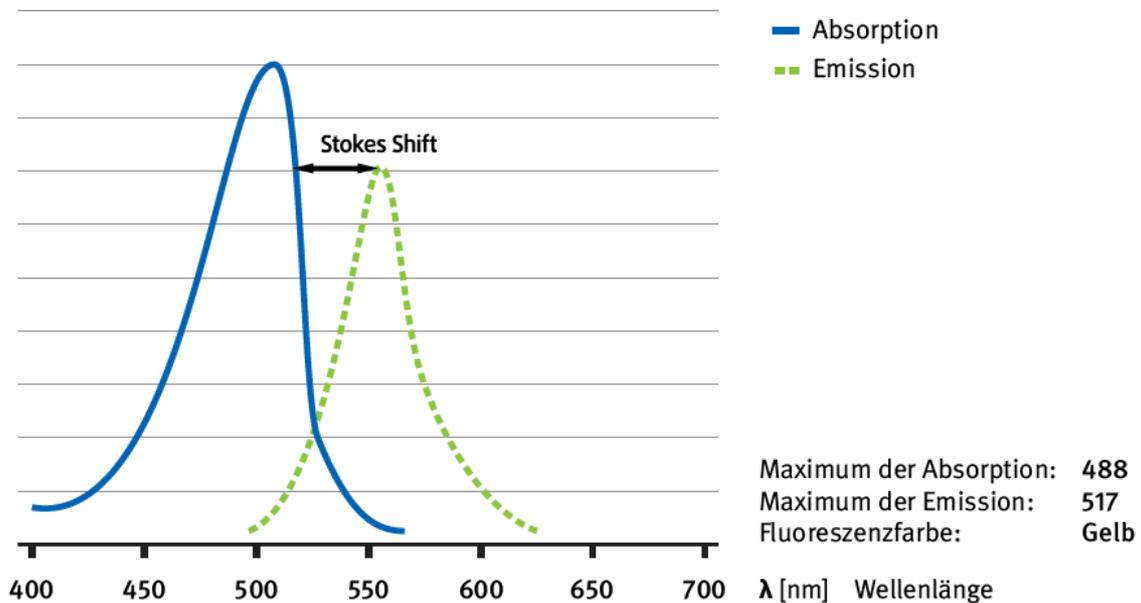
#### ALEXA Fluor 594



**Abb. 3** Fluoreszenzspektren des Alexa Fluor 594 Fluorophors.

Die durchgezogene Linie zeigt die Anregungswellenlänge, die gepunktete Linie die emittierte Wellenlänge des angeregten Fluorophors. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist größer als die des absorbierten (Stokes Shift).

## Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)



**Abb. 4** Fluoreszenzspektren des FITC Fluorophors.

Die durchgezogene Linie zeigt die Anregungswellenlänge, die gepunktete Linie die emittierte Wellenlänge des angeregten Fluorophors. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist größer als die des absorbierten (Stokes Shift).

### 2.2.5.2. Prinzip der Färbung

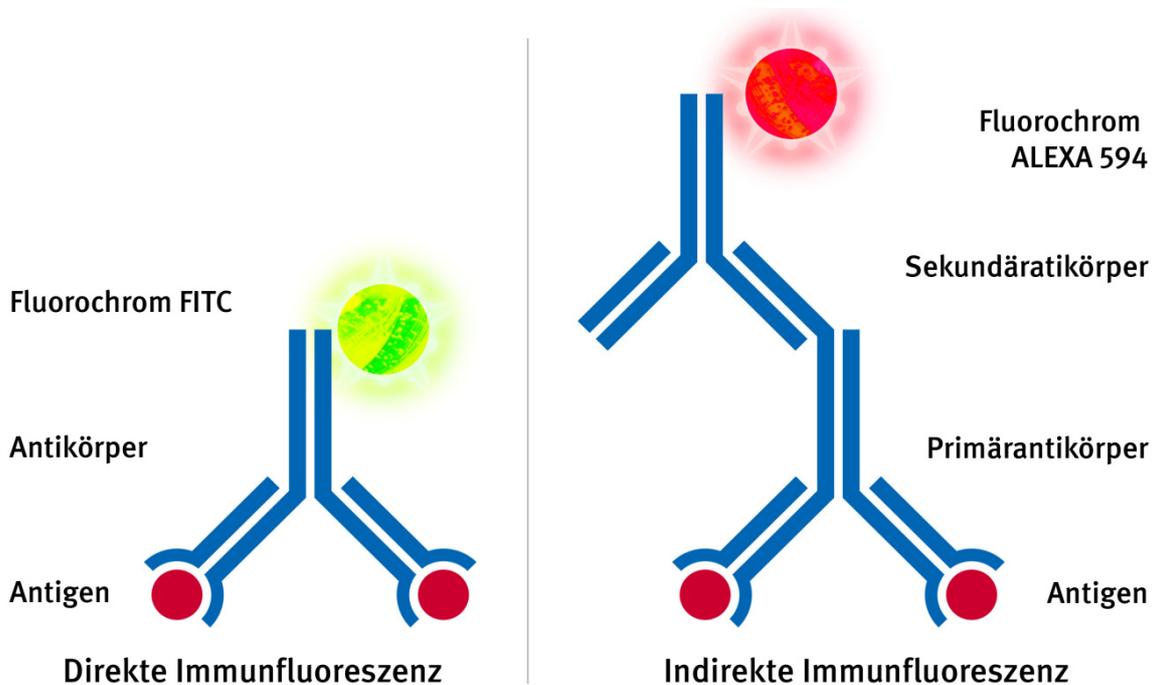
In der Immunfluoreszenz werden verschiedene Antigene mit Hilfe Fluorophormarkierter Antikörper dargestellt. Die erste Detektion spezifischer biologischer Strukturen mittels Immunfluoreszenz gelang dem Mikrobiologen Albert Coons in den 1940er Jahren. Damit wurde eine sehr spezifische Nachweismethode entdeckt, welche den Nachweis von Antikörpern, Antigenen und allen zellulären Bestandteilen, die eine antigene Wirkung besitzen, ermöglicht.

In der Immunfluoreszenz werden zwei Arten von Antikörpern angewendet:

Primärantikörper, die spezifisch mit einem nachzuweisenden Zellantigen reagieren.

Sekundärantikörper, die zum Nachweis der Primärantikörper oder zur Verstärkung der primären Nachweisreaktion verwendet werden.

Daraus ergeben sich zwei Formen der Immunfluoreszenz (Abb. 5).



**Abb. 5** Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips von Immunfluoreszenzfärbung

Bei der direkten Reaktion ist der direkt bindende (Primär-) Antikörper mit Fluorophor markiert, bei der indirekten Reaktion hingegen der Sekundärantikörper.

#### Direkte Immunfluoreszenz

Bei dieser Methode wird der Fluorophor direkt an den Primärantikörper gekoppelt. Nach bestimmter Einwirkungszeit erfolgt eine spezifische Antigen-Antikörper Bindung, die aufgrund der Markierung unter dem Fluoreszenzmikroskop gesehen werden kann. Fluoreszierende Antikörper, die nicht an das Antigen gebunden sind, werden zuvor durch einen Waschschritt entfernt. So wird das gesuchte Antigen in einem Einschritt-Verfahren detektiert.

### *Indirekte Immunfluoreszenz*

Bei dieser Methode erfolgt die Detektion des gesuchten Antigens in mindestens zwei Schritten. In der ersten Etappe werden unmarkierte Antikörper (Primärantikörper) eingesetzt, die spezifisch an das entsprechende Antigen binden. Erst dann wird ein markierter (sekundärer) Antikörper verwendet, welcher gegen den primären gerichtet ist (ein Anti-Antikörper). Da AK Immunglobuline sind, werden als Sekundärantikörper Antiglobuline benutzt. Dieses Verfahren ermöglicht die Anwendung von gleich markierten Antiglobulinen in mehreren Einsätzen und garantiert durch die Bindungsfähigkeit mehrerer Sekundär-AK an einen Primär-AK eine höhere Sensitivität.

### *Mehrfachimmunfluoreszenz*

Diese Methode ermöglicht den Nachweis mehrerer verschiedener Antigene in einer Färbung. Die einzelnen Antikörper werden mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert, sodass sie unter dem Fluoreszenzmikroskop problemlos differenziert werden können.

### **2.2.6. Antikörpermarkierung**

Die Antikörpermarkierung in der Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgt durch ihre chemische Bindung an fluoreszierende Farbstoffe. Die dazu verwendeten Fluorophore zeigen nach Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge eine charakteristische Fluoreszenz-Emission. So kann eine Antigen-Antikörper Bindung als Fluoreszenz-Signal detektiert werden. Um mehrere Fluorophore nebeneinander detektieren zu können, müssen die Emissions-Signale spektral getrennt werden, sodass keine Überlagerung stattfindet. Klassischerweise werden als Fluorophore Fluoreszeinsderivate angewendet, hauptsächlich Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), dessen Emissionsspektrum im grünen Bereich liegt. Andere oft angesetzte Farbstoffe, sind Derivate von Rhodamin, Kumarin und Cyanin z.B. Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat (TRITC), Texas

Red (TRSC) bzw. Cy3 mit Emissionsspektrum im roten Bereich. Eine neue Generation von Fluorophoren stellt die Alexa Fluor Familie dar. Diese wurde durch Sulfonierung klassischer Farbstoffe synthetisiert und deckt mit ihrer breiten Palette nicht nur das gesamte sichtbare, sondern auch das infrarote Spektrum ab. Des Weiteren sind diese Fluorophore lichtstabiler, heller und weniger PH-empfindlich als gebräuchliche Fluorophore mit vergleichbarem Emissionsspektrum.

Darüber hinaus wird in der Fluoreszenzmikroskopie weitgehend 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) eingesetzt. Dieser organische Farbstoff bindet selektiv an DNA und bildet mit hoher Spezifität stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe. DAPI wird von Zellen durch eine intakte Zellmembran aufgenommen und kann damit zur Zellkernfärbung vitaler Zellen und fixierter Präparate eingesetzt werden. Sein Emissionsspektrum liegt im blau-violetten Bereich, weshalb dieser Fluorochrom ideal für Mehrfachimmunfluoreszenzeinsätze in Kombination mit Fluoreszein- und Rhodaminderivaten geeignet ist.

### **2.2.7. Etablierung der Immunfluoreszenz-basierten Methode**

Da bis dato keine Immunfluoreszenz-basierte Methode zur Bestimmung des ER $\alpha$ -Status disseminierter Tumorzellen beschrieben wurde, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, eine solche zu etablieren. In mehreren Vorversuchen wurden drei verschiedene primäre ER $\alpha$ -Antikörper angesetzt:

monoklonale Maus-AK (NCL-L-ER-6F11, Novocastra Laboratories, UK)

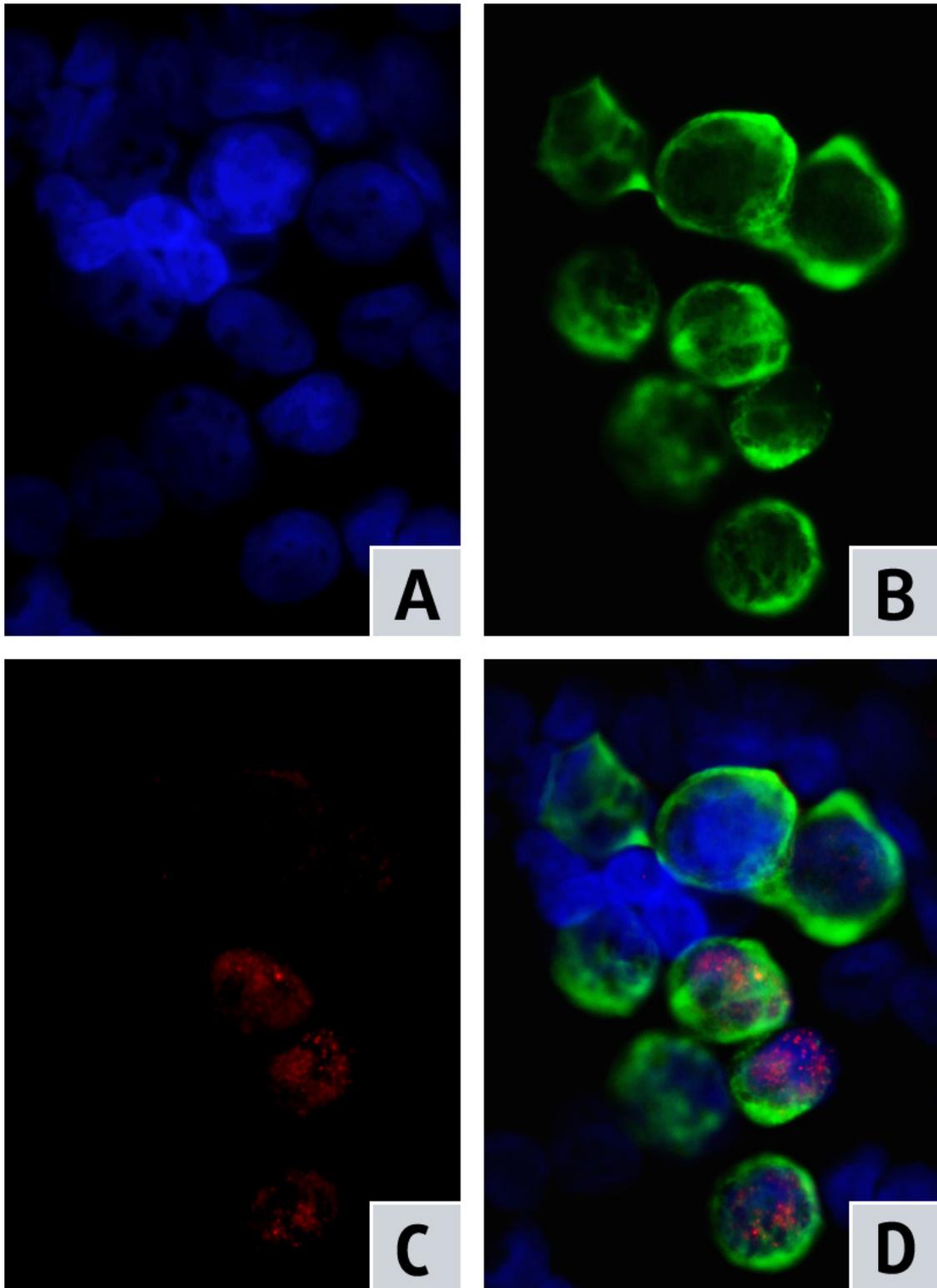
polyklonale Kaninchen-AK (H-184, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA)

monoklonale Kaninchen-AK (SP1, Lab Vision, CA).

Als Sekundärantikörper wurde ein Tex Red konjugierter Pferd-anti-Maus-AK (Vector Laboratories, Inc., CA) bzw. Ziege-anti-Kaninchen-AK (CB 11, Biogenex, CA) sowie Alexa Fluor 594 konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-AK

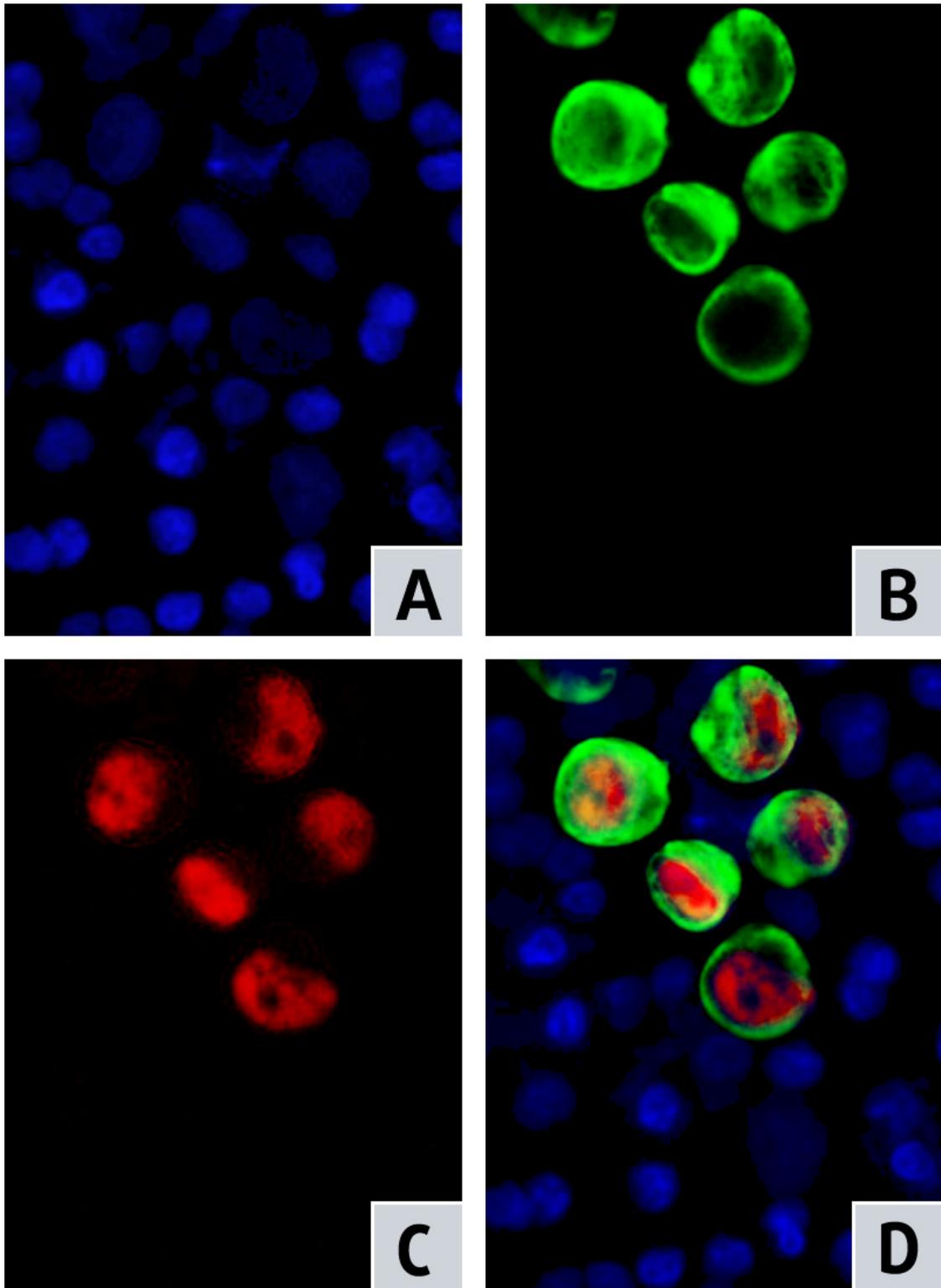
(Molecular Probes, Invitrogen, CA) verwendet. Unterschiedliche Inkubationszeiten (30min, 45min, 60min) sowie Konzentrationen der entsprechenden Antikörper (Verdünnungen: 1:200, 1:100, 1:50, 1:25) wurden ausgetestet. Die Verdünnung erfolgte mit dem Antikörper Diluent von DAKO (1% BSA in PBS-0,1% Tween 20). Auch zur Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Zellmembran wurden verschiedene Methoden überprüft (Triton X-100, Ethanol, Formaldehyd). Letztendlich haben sich der monoklonale ER $\alpha$  Kaninchen-AK (Klon SP1, Lab Vision, CA) und ein sekundärer mit Alexa 594 konjugierter (Molecular Probes, Invitrogen, CA) Ziege-anti-Kaninchen-AK als geeignet für die Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus erwiesen. Tab. 8 (Ergebnisteil) erfasst die bei der Etablierung der Methode getesteten Parameter.

Zum Nachweis disseminierter Tumorzellen wurde ein von Maus stammender monoklonaler Anti-Zytokerantinantikörper eingesetzt, der die Zellstrukturen epithelialer Herkunft detektiert. Hierbei handelt es sich um einen FITC-konjugierter Panzytokeratin-Antikörper C11 (Sigma, MO), der sich gegen die humanen Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18 richtet. In Vorversuchen wurde die Inkubationszeit (30min, 45min, 60min) sowie die Konzentration des AK (Verdünnungsreihe: 1:50, 1:100, 1:200, 1:500) optimiert. Zur gleichzeitigen Detektion beider Strukturen (Zytokeratin, Östrogenrezeptor) wurde ein Doppelimmunfluoreszenzverfahren gewählt. Durch eine Hintergrundfärbung mit DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) wurden die Zellkerne dargestellt. Abb. 6 und Abb. 7 zeigen Ergebnisse unterschiedlicher Färbungen.



**Abb. 6** ER $\alpha$  Immunfluoreszenz Doppelfärbung (MCF7 Zelllinie).

ER $\alpha$  monoklonaler Maus AK (Klon NF11); sekundärer Ziege-anti-Maus-AK konjugiert mit Tex Red; FITC-konjugierter Panzytokeratin-Antikörper C11. (A) Hintergrundfärbung mit DAPI (B) Panzytokeratin-positive Zellen mit FITC markiert, (C) Schwach angefärbte ER $\alpha$ -positive Zellkerne mit Tex Red markiert, (D) Doppelfärbung ER $\alpha$ /C11



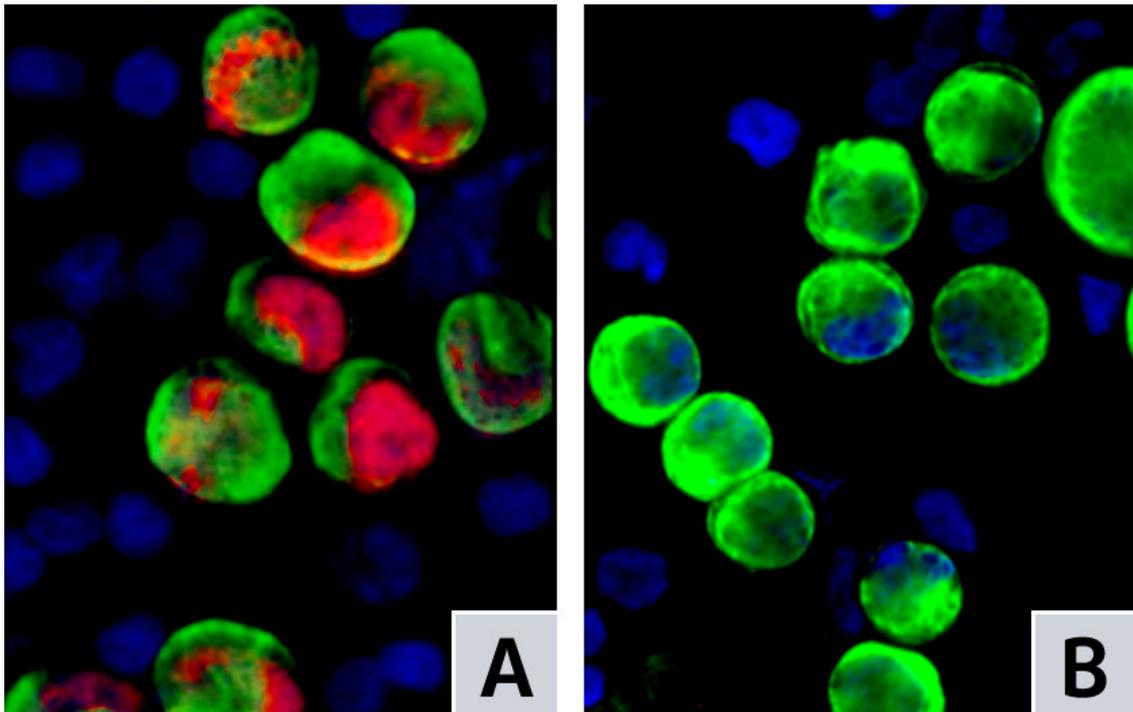
**Abb. 7** Optimierte ER $\alpha$  Immunfluoreszenz Doppelfärbung (MCF7 Zelllinie).

ER $\alpha$  monoklonaler Kaninchen AK; sekundärer Ziege-anti-Kaninchen-AK konjugiert mit ALEXA Fluor 594; FITC-konjugierter Panzytokeratin-Antikörper C11. (A) Hintergrundfärbung mit DAPI (B) Panzytokeratin-positive Zellen mit FITC markiert, (C) Intensiv angefärbte ER $\alpha$ -positive Zellkerne mit Alexa Fluor 594 markiert, (D) Optimierte ER $\alpha$ /C11 Doppelfärbung

### 2.2.8. Optimales Färbungsprotokoll

Alle Arbeitsschritte erfolgten mit Hilfe eines Färbeautomaten „Dakoautostainer“ (DAKO, Hamburg) nach folgendem, neu etabliertem Protokoll: Nach dem Auftauen und der Adaptation an Raumtemperatur werden die Objektträger mit PBS angefeuchtet, um den pH-Wert für die Färbung zu optimieren. Sodann findet eine 10 Minuten andauernde Fixierung des Zellmaterials auf den Objektträgern, sowie eine gleichzeitige Permeabilisierung der Zellmembran mittels 0,5%-igem Formaldehyd statt. Anschließend werden die Objektträger mit PBS 5 Minuten lang gewaschen. Als nächster Schritt erfolgt eine 30-minütige Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hilfe eines Ziegen-Normalserums (DAKO, Hamburg) verdünnt im 1:10 Verhältnis mit dem Antikörper-Diluent (5%-BSA in PBS-0,1%-igem Tween-20). Hierauf erfolgt kein Waschvorgang. Danach findet eine 60-minütige Inkubation mit den Primärantikörpern statt. Die Verdünnungen betragen 1:200 für C11-FITC bzw. 1:25 für Rabbit-ER $\alpha$ . Nach 5-minütiger Behandlung mit PBS erfolgt eine 30-minütige Inkubation mit 200 $\mu$ l Alexa Fluor 594-markiertem Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100. Anschließend werden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen und der Überstand vorsichtig abgetupft. Die Gegenfärbung des Hintergrundes erfolgt durch Einbetten in das Vectashield Mounting Medium, welches mit DAPI versetzt ist. Dieser Vorgang schonert zusätzlich die Fluorophor-markierten Antikörper vor dem Ausbleichen. Schließlich wird auf die Objektträger ein Deckglass (60 mm x 24 mm) aufgebracht und die Präparate bis zur Auswertung im Kühlschrank gelagert. Abb. 12 (Ergebnisteil) zeigt schematisch die einzelnen Färbungsschritte.

Zur Überprüfung des Verfahrens wurde bei jedem Lauf eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten MCF-7- Zellen, eine ER $\alpha$ -positive Brustkrebszelllinie, und SKBR-3-Zellen, eine ER $\alpha$ -negative Brustkrebszelllinie. Als Negativkontrolle wurden die Objektträger mit Leukozyten eines gesunden Probanden eingesetzt. In Abb. 8 sind Beispiele gefärbter Kontrollzelllinien dargestellt.



**Abb. 8** Kontrollzelllinien

(A) MCF-7 Zellen: Zytokeratin-positiv, ER $\alpha$ -positiv (B) SKBR-3 Zellen: Zytokeratin-positiv, ER $\alpha$ -negativ

### 2.2.9. Auswertung der Präparate

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 von Zeiss (Abb. 9) Das Mikroskop verfügt über ein Triple-Bandpass-Filter (FITC/ TRITC/ DAPI) sowie die Single-Bandpass-Filter für FITC, TRITC oder DAPI. Die Anregungs- und Emissionsspektren der eingesetzten Fluoreszenzstoffe sowie der angewendeten Filter werden in Tab.2 und Tab. 3 dargestellt

**Tab.2** Fluoreszenzspektren der verwendeten Filter

Filter	Anregungsfilter (nm.)	Farbteiler (nm.)	Emissionsfilter (nm.)
DAPI	365	395	397
FITC	450-490	510	515
TRITC	546	580	590

**Tab. 3** Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorophor	Anregungsspektrum (nm.)	Emissionsspektrum (nm.)
DAPI	358	461
FITC	488	517
ALEXA Fluor 594	590	617

Zur Dokumentation wurden die Bilder mit einer angeschlossenen CCD-Kamera (TM Photometrics, AZ) aufgenommen und mit Hilfe der ISIS-Software (Version 5.1, Meta Systems) nachbearbeitet.



**Abb. 9** Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 der Firma Zeiss

#### **2.2.10. Auswertungskriterien**

Nach entsprechender Bearbeitung des Zellmaterials befanden sich auf einem Zytospin  $1,5 \times 10^6$  Zellen. Es wurden von jeder Patientin zwei gefärbte Objektträger beurteilt, also jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen. Die Präparate wurden bei einer 40x Vergrößerung mäanderförmig im Triple-Bandpass-Filter untersucht. Zellen mit Anreicherungen von FITC- oder Alexa Fluor 594-markierten Antigenen wurden unter den einzelnen Single-Bandpass-Filter (FITC-, TRITC, DAPI) nochmals hinsichtlich ihrer Antikörperanreicherungsmuster und Morphologie beurteilt. Anschließend wurden Fotos von jeder immunphänotypisch-positiven Zelle aufgenommen, welche von einem zweiten,

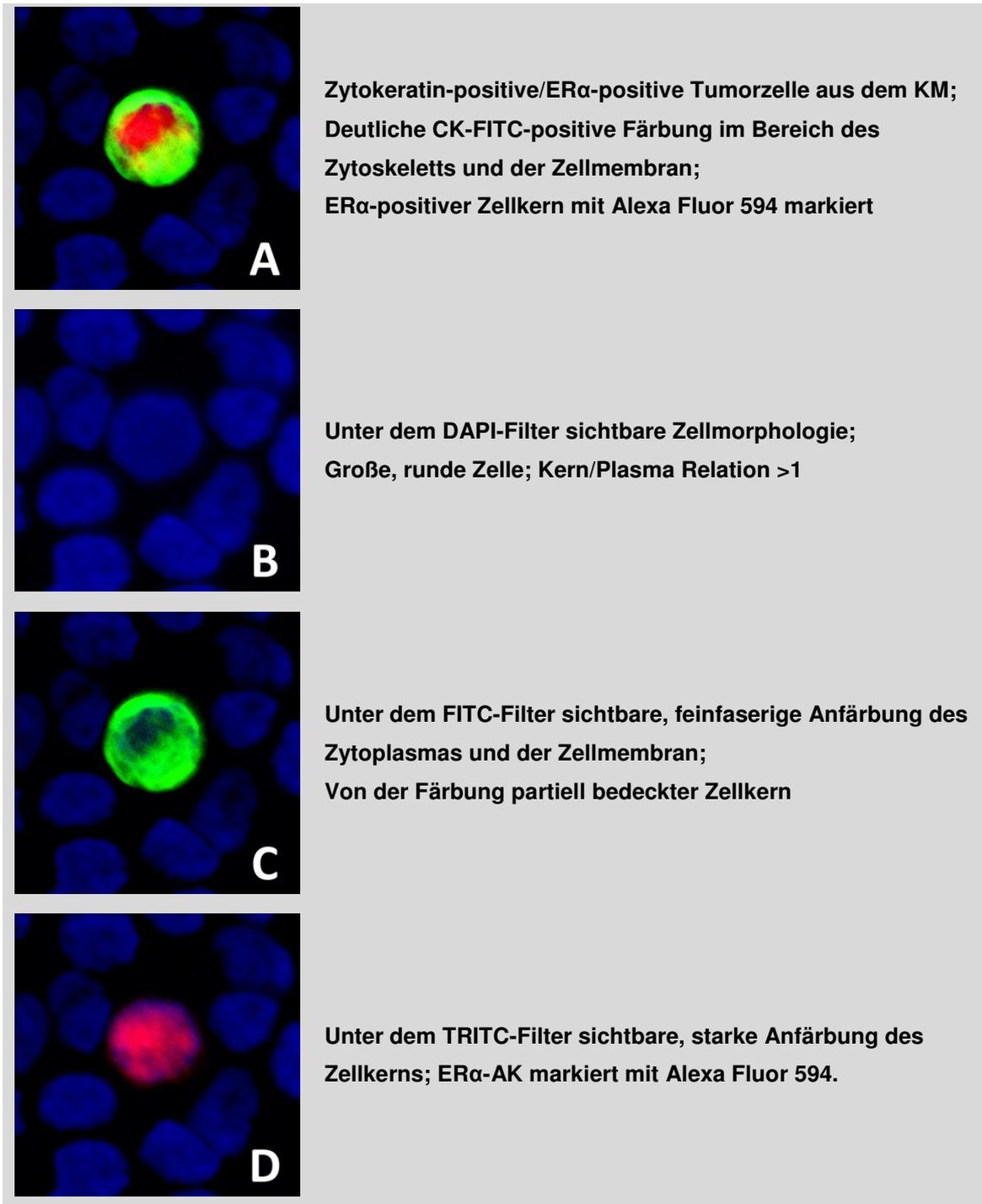
unabhängigen Betrachter analysiert wurden. Die Auswertungskriterien richteten sich nach den Empfehlungen der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection (Tab. 4) und des internationalen Konsensus für den standardisierten Nachweis und die klinische Implementierung disseminierter Tumorzellen (Tab. 5) <sup>(22, 57)</sup>

**Tab. 4** Einteilung der disseminierten Tumorzellen nach der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection <sup>(22)</sup>

Gruppe	Klassifikation	Definition
1	Tumorzellen	Typische Tumorzellmorphologie: Deutliche Zellkernvergrößerung Atypischer Zellkern Zellcluster
2	Wahrscheinliche Tumorzellen	Keine eindeutige Abgrenzung von hämatopoetischer Zellen möglich  Negative Kontrollfärbung mit einem für hämatopoetische Zellen isotypspezifischen Antikörper erforderlich
3	Keine Tumorzellen	Zellen hämatopoetischer Herkunft Hautepithelzellen, Falsch-positive Signale

Diesen Kriterien entsprechend erfolgte die Beurteilung der morphologischen Merkmale wie Zellgröße, Größe und Form des Zellkerns, bzw. Kern-Plasma Verhältnis. Des Weiteren fand eine Abschätzung hinsichtlich der Ausprägung und der Spezifität der Antikörperanreicherung sowie Fluoreszenzintensität statt. Die Spezifität der AK-Anreicherung charakterisierte sich durch eine dem gesuchten Antigen entsprechende Lokalisation sowie spezifische Form des Fluoreszenzsignals. Zytokeratin als Element des Zytoskeletts tritt beispielweise in Form einer feinfaserigen, wolkigen Struktur in unterschiedlicher Ausprägung im Bereich des Zytoplasmas auf. ER $\alpha$  dagegen gehört zu den nukleären Rezeptoren, sodass im Fall einer ER $\alpha$ -positiven Zelle eine typische Zellkern-Färbung erschien. Ausprägung und Intensität der Fluoreszenz können

unterschiedlich sein. Als positiv wurden jedoch nur jene Zellen bewertet, bei denen sich ein mittelmäßiges bis starkes Signal zeigte (Abb. 10).

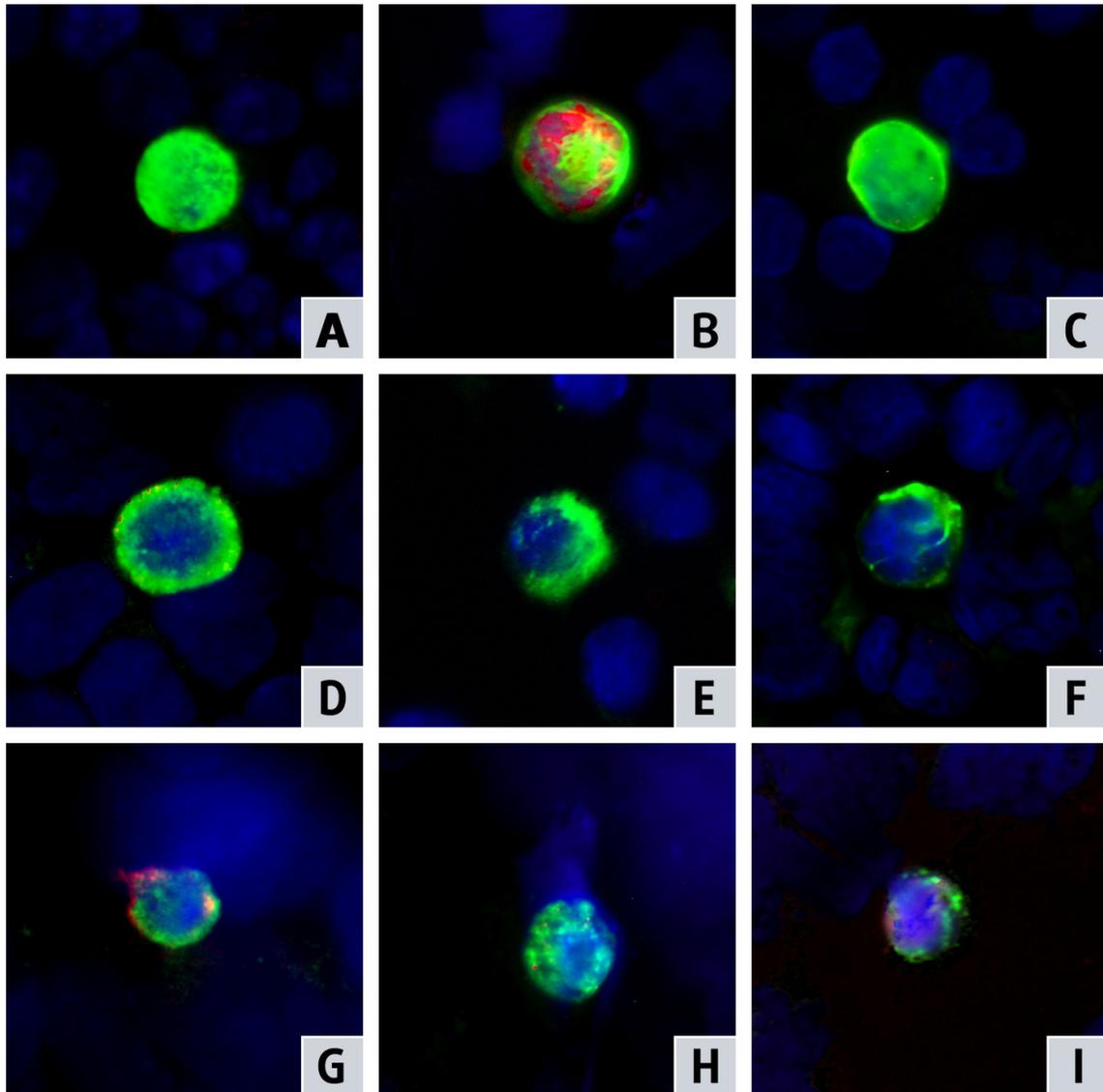


**Abb. 10** Auswertungskriterien einer ER $\alpha$ /C11-positiven Tumorzelle

Kleine Zellkerne oder kleine Zellen, bei denen eine hämatopoetische Herkunft nicht auszuschließen war, wurden auch bei positivem Rezeptorfärbung als falsch-positiv klassifiziert. Besonders große Kerne können auf Zellapoptose oder Beeinträchtigung der Zelle im Laufe der Verarbeitung sowie auf epidermale Kontamination bei Materialentnahme hinweisen. Als falsch-positiv wurden auch solche unspezifisch angefärbte Zellen klassifiziert, bei denen die Fluoreszenz nicht auf entsprechende Strukturen begrenzt werden konnte oder ähnliche Bereiche mit beiden Antikörpern markiert wurden, sodass eine Überlappung der Fluoreszenzsignale stattfand. Es wurden ausschließlich jene Patientinnen als positiv bewertet, bei denen Zellen der Kategorie I der ISHAGE Klassifikation gefunden werden konnten bzw. deren Zellen den Kriterien des Konsensus für den standardisierten Nachweis und die klinische Implementierung disseminierter Tumorzellen entsprachen (Tab. 5). Beispiele von Zellen, die den entsprechenden ISHAGE Kategorien zugeteilt werden zeigt Abb. 11.

**Tab. 5** Kriterien zur Identifikation von Tumorzellen (mod. nach Fehm et al.,<sup>57</sup>)

Zytomorphologie und Phänotyp disseminierter Tumorzellen
Vergrößerter Zellkern
Verhältnis Zellkern/Zytoplasma > 1
Granulierter Zellkern (unregelmäßige Struktur des Zellkerns)
Große Nukleoli
Zellkluster
Starkes und/oder unregelmäßig gefärbtes Zytoplasma
Immunzytologische Färbung bedeckt zumindest partiell Zellkern
Evtl. perinukläere Farbverdichtung
Einzelne Zytokeratinfilamente sind erkennbar (netzartige Struktur)
Tumorzellen größer als hämatopoetische Zellen



**Abb. 11** Positive KM-Befunde eingeteilt nach ISHAGE Kategorien (<sup>22</sup>)

A-C) Zellen der Kategorie I. Morphologisch große, runde Zellen mit schmaler, ringförmiger zytoplasmatischer Färbung für CK und ggf. nukleärer Färbung für ER $\alpha$ . A) und C) zeigen CK-positive Zellen, B) eine ER $\alpha$ /CK-positive Zelle.

D-F) Zellen der Kategorie II. E) und F) zeigen teilweise unvollständigen ringförmigen Randsaum

G-I) Zellen der Kategorie III. Kleine Zellen mit unspezifischem Färbemuster, wahrscheinlich falsch-positiv angefärbte Zellen hämatopoetischer Herkunft.

### 2.2.11. Immunhistochemie des Primärtumors

Der Östrogenrezeptorstatus des Primärtumors wird mittels immunhistochemischer Färbung bestimmt. Die Analysen werden mit bioptisch oder chirurgisch entferntem Untersuchungsmaterial durchgeführt. Das Gewebe

wird mit 4.5%-iger Formalinlösung (pH 7.0) fixiert und in Paraffin eingebettet. Die immunhistochemische Färbung wird an 3 bis 5 µm dünnen Schnitten durchgeführt, wobei ein kommerziell erhältliches ABC-kit (Vectastain, Vector Laboratories, CA, USA) verwendet wird. Der monoklonale ERα Rabbit Antikörper (Klon SP1) wird im Verhältnis 1:200 mit Tris-HCl (pH 7.5) verdünnt und entsprechend der Anweisung des Herstellers (DCS, Deutschland) aufgebracht. DAB (3,3' diamino-benzidine) wird dabei als Chromogen verwendet. Die Objektträger werden mit Hämatoxylin gefärbt und für die Untersuchung fixiert. Die ERα-Expression wird semi-quantitativ nach dem Remmele-Score (auch immunreaktive Score, IRS) klassifiziert (Tab. 6).

**Tab. 6** Score nach Remmele (<sup>138</sup>) zur Bestimmung des ERα-Status des Primärtumors

Punkte	Färbeintensität	Anteil positiver Zellkerne
0	keine Anfärbung	0 %
1	Schwach	< 10 %
2	Mäßig	11 % - 50 %
3	Stark	51 % - 80 %
4	-	81 % - 100 %

Aus der Summe der Punkte der Färbeintensität und des Anteils positiver Kerne resultiert eine Score von 0 bis 12. Remmele gibt in seiner Originalarbeit keinen Cut-off an, sodass es nicht möglich ist, einen negativen Rezeptorstatus aus der IRS abzuleiten. Nach Definition der AGO besteht jedoch eine Indikation zur antihormonellen Behandlung wenn mehr als 10% der Tumorzellen den Östrogenrezeptor exprimieren. Den in St. Gallen 2007 neu festgelegten Therapiestandards zufolge gelten Tumoren mit 1 bis 10% positiven Tumorzellen als fraglich positiv. Aus klinischer Sicht wird also ein Cut-off von 10 % bzw. ein IRS von zwei angenommen. Der Hormonrezeptorstatus eines Präparates wird

als insgesamt negativ, schwach, mäßig oder stark immunhistochemisch positiv bezeichnet (Tab. 7).

**Tab. 7** Klinische Modifizierung des Remmele Scores

HR-Status des Primärtumors	IRS
Negativ	Keine oder insgesamt unter 10% der Zellen mit angefärbten Zellkernen unabhängig von Farbintensität
Schwach positiv	Gesamtscore von 2
Mäßig positiv	Gesamtscore von 3, 4 oder 6
Stark positiv	Gesamtscore von 8,9 oder 12

### 2.2.12. Statistik

Statistische Analyse der Patientendaten wurde mit SPSS 15.0 für Windows XP vorgenommen.

Die Korrelation zwischen immunfluoreszenter Detektion der DTZ im KM und anderen klinisch-pathologischen Faktoren sowie dem ER $\alpha$ -Status der DTZ und des Primärtumors wurden mittels Chi-Square-Test evaluiert. Als signifikant wurden p-values < 0.05 berücksichtigt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Etablierung eines Färbeprotokolls zum Nachweis ER $\alpha$ -positiver DTZ

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Immunfluoreszenz-basierte Methode zum Nachweis ER $\alpha$ -positiver DTZ etabliert. In mehreren Färbeversuchen zur Optimierung des Färbungsprotokolls wurden verschiedene Reagenzien und Parameter angesetzt, die in Tab. 8 zusammengefasst werden.

**Tab. 8** Tabellarische Erfassung der bei der Etablierung der Färbung getesteten Parameter

Primär-AK	Sekundär-AK	Zellfixation/ Permeabilisierung	Inkubationszeit	AK- Konzentration
Monoklonal Maus	Tex Red Pferd- anti-Maus	Formaldehyd 0,5%	30min	1:200
Polyklonal Kaninchen	Tex Red Ziege-anti- Kaninchen	Ethanol 10%	45min	1:100
		Triton X-100 0,1%	60min	1:50
Monoklonal Kaninchen	Alexa Fluor 594 Ziege-anti- Kaninchen			1:25

Der monoklonale ER $\alpha$  Kaninchen-AK 1:25 (Klon SP1, Lab Vision, CA) und der sekundäre mit Alexa 594 konjugierte (Molecular Probes, Invitrogen, CA) Ziege-anti-Kaninchen-AK 1:200 zeigten sich für die Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus der DTZ als optimal geeignet. Abb. 12 stellt schematisch das optimale neuetablierte Färbeprotokoll dar. Die einzelnen Färbeversuche wurden detailliert im Methodenteil beschrieben (siehe 2.2.7).

## Ergebnisse

<b>Anfeuchten mit PBS für 1 min</b>
Absaugen
<b>Fixation mit 0,5% Formaldehyd für 10 min</b>
Absaugen
<b>Waschen mit PBS für 5 min.</b>
Absaugen
<b>Block mit Ziegen-Normalserum 1:10 für 30 min</b>
Absaugen, NICHT WASCHEN
<b>Primär-AK: SP1 ER<math>\alpha</math>-AK 1:25; C11-FITC-AK 1:200 für 60 min</b>
Absaugen
<b>Waschen mit PBS für 5 min</b>
Absaugen
<b>Sekundär-AK Alexa Fluor 594 konjugiert Ziege-anti-Kaninchen 1:100 für 30 min</b>
Absaugen
<b>2x Waschen mit PBS für 5min</b>
Absaugen
<b>Einbetten in Vectashield Mounting Medium</b>
<b>Eindecken mit Deckglass</b>

**Abb. 12** Schematische Darstellung der einzelnen Färbungsschritte im zeitlichen Ablauf

### 3.2. Patientenkollektiv

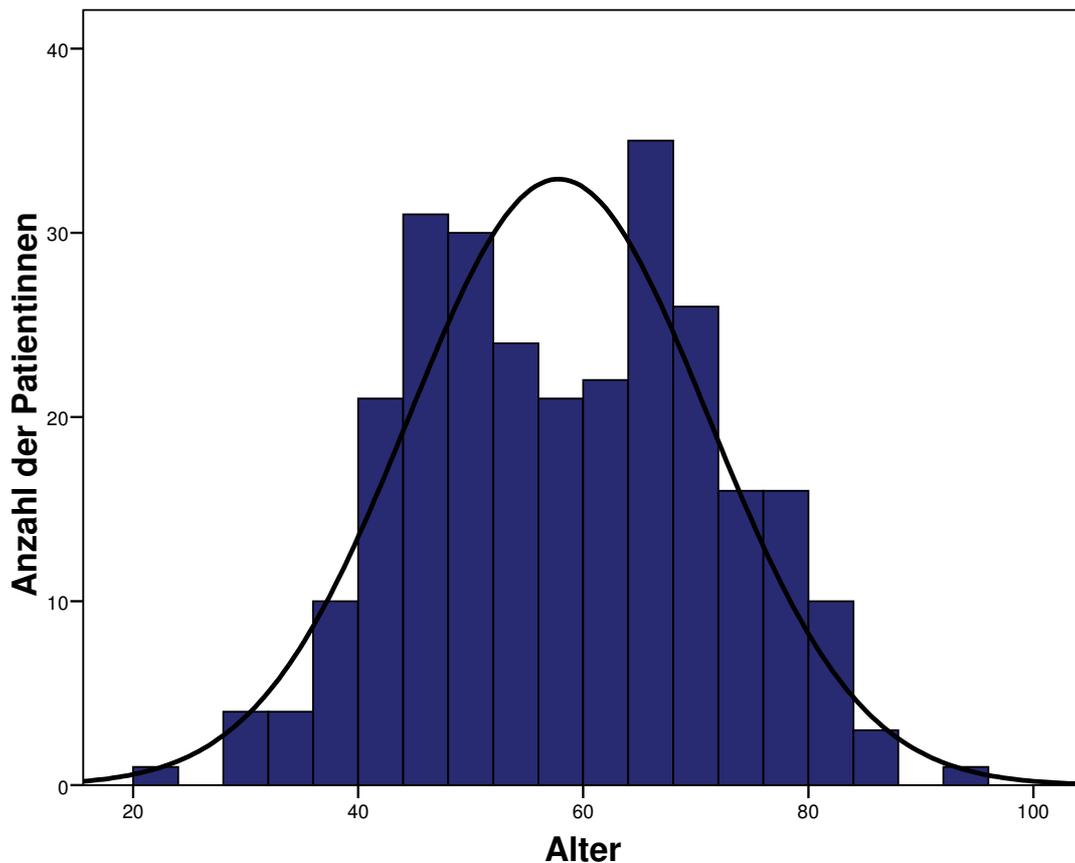
Insgesamt konnten KM-Aspirate von 275 Mammakarzinompatientinnen in die Analyse aufgenommen werden. Bei allen Patientinnen erfolgte die Punktion zum Zeitpunkt des operativen Eingriffes. 241 Patientinnen wurden primär operativ behandelt, bei 34 wurde vor der Operation eine neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt. Die Verteilung der Stadien des Patientenkollektivs wird in Tab. 9 dargestellt.

**Tab. 9** Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Anzahl der Patientinnen	N
Primär operative Therapie	241
Stadium 0 (pTis)	19
Stadium I	102
Stadium II	85
Stadium III	28
Stadium IV	7
Operation nach der neoadjuvanten Therapie	34
Gesamt	275

#### 3.2.1. Altersverteilung

Das Alter der Patientinnen variierte zwischen 23 und 92 Jahren. Das mediane Alter betrug 57 Jahre und das Durchschnittsalter lag bei 58 Jahren (SD +/- 13) (Abb. 13).



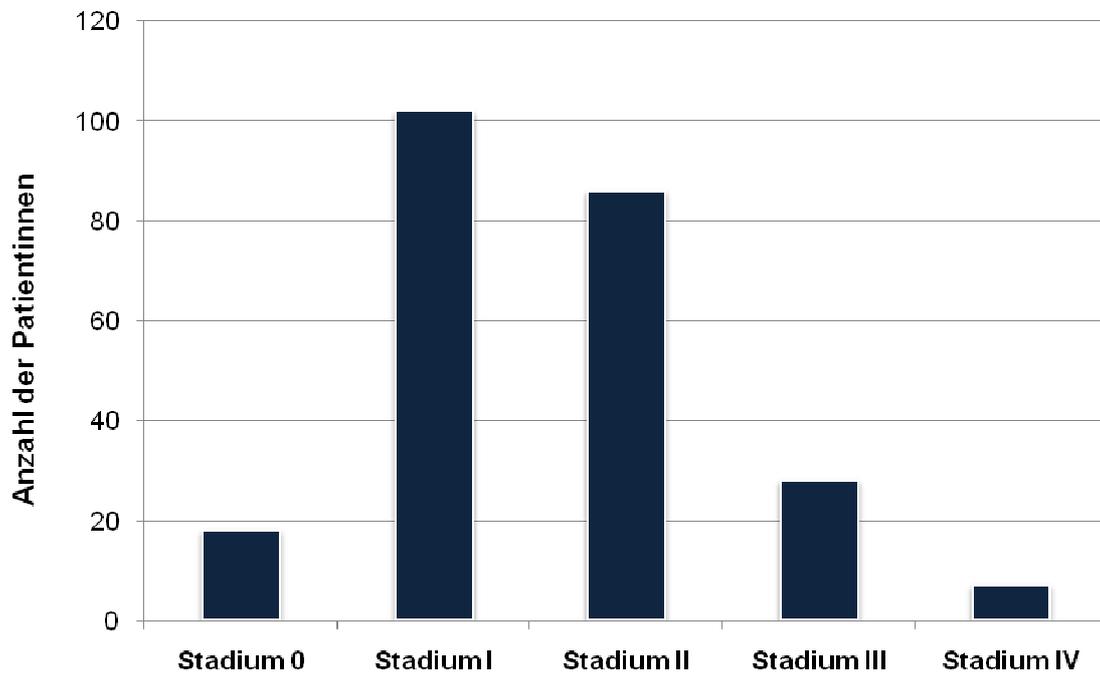
**Abb. 13** Altersverteilung des Patientenkollektivs

### 3.2.2. Klinisch-pathologische Daten der primär operierten Patientinnen

241 von 275 Patientinnen wurden primär operativ behandelt. Klinisch-pathologische Daten dieser Subgruppe stellt Tab. 10 dar. Die Patientinnen befanden sich überwiegend in der Postmenopause (72%). 102 Patientinnen (42%) befanden sich zur Zeit der Operation in Stadium I der Erkrankung, 85 (35%) in Stadium II, 28 (12%) Patientinnen in Stadium III und lediglich 7 (3%) Patientinnen in Stadium IV. In die Analyse wurden zusätzlich 19 (7%) Patientinnen aufgenommen, die sich zur Zeit der Diagnose im Stadium 0 (pTis) der Erkrankung befanden. Die Verteilung der Stadien bei primär operierten Patientinnen wird in Abb. 14 dargestellt.

**Tab. 10** Klinisch-pathologische Daten der primär operierten Patientinnen

Faktor	Anzahl der Patientinnen N=241	
	N	(%)
Menopausenstatus		
Prämenopausal	68	(28)
Postmenopausal	173	(72)
Stadium		
0 (pTis)	19	(8)
I	102	(42)
II	85	(35)
III	28	(12)
IV	7	(3)
Tumorgröße		
Tis	19	(8)
T1	135	(56)
T2-T4	84	(35)
Lymphknotenstatus		
Neg	157	(66)
Pos	81	(34)
Metastasierung		
M0	234	(97)
M1	7	(3)
Grading		
G1	16	(7)
G2	176	(80)
G3	28	(13)
Histologie		
Duktal invasiv	152	(63)
Lobulär invasiv	50	(21)
DCIS	19	(8)
Anderer Typ	17	(7)
Lymphangiosis carcinomatosa		
L0	222	(92)
L1	19	(8)
ER Status		
Neg	39	(17)
Pos	198	(83)
PR Status		
Neg	70	(29)
Pos	167	(70)
Her2/neu Status		
Neg	194	(84)
Pos	37	(16)

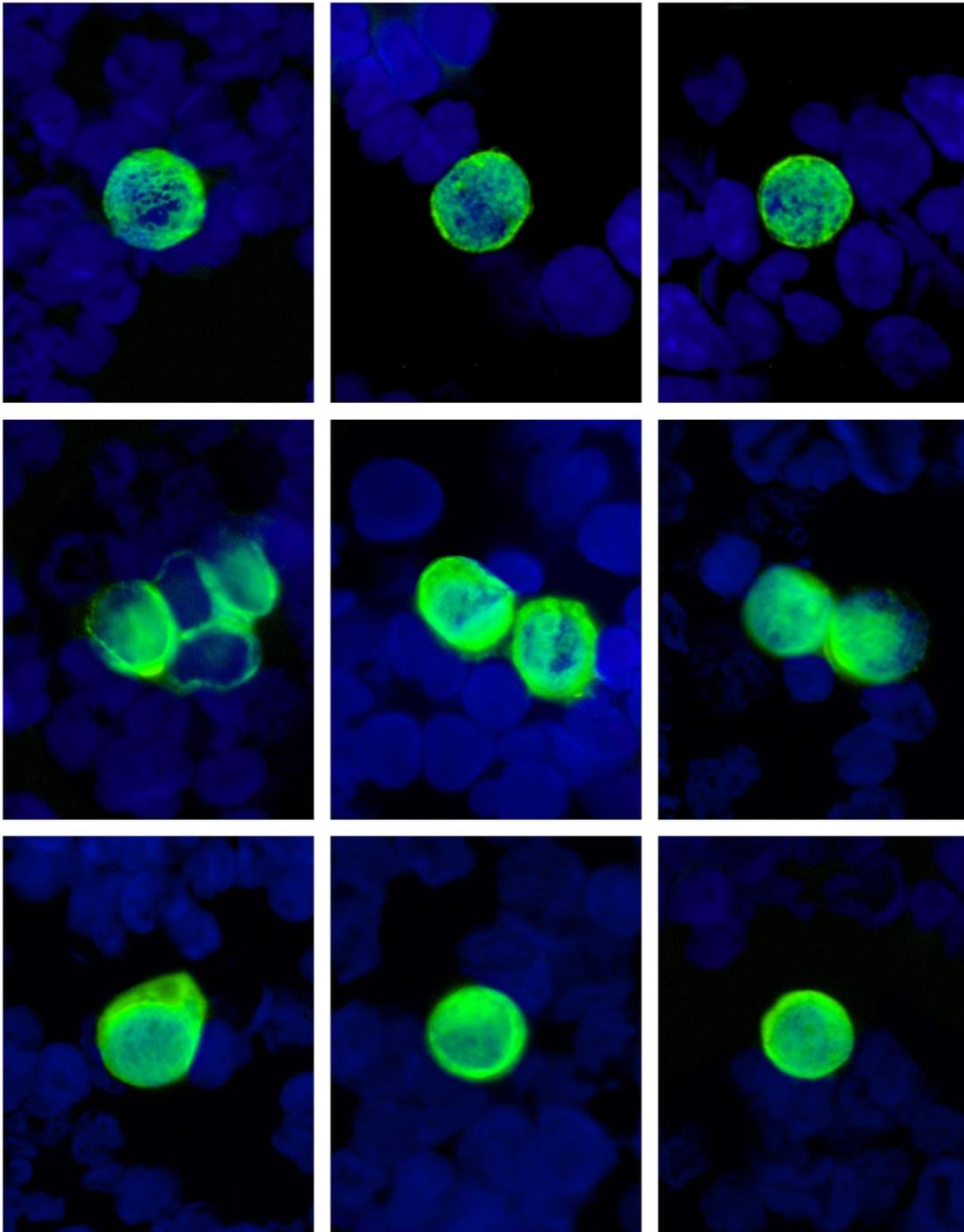


**Abb. 14** Verteilung der Stadien nach AJCC bei primär operierten Patientinnen

### 3.3. Detektion disseminierter Tumorzellen

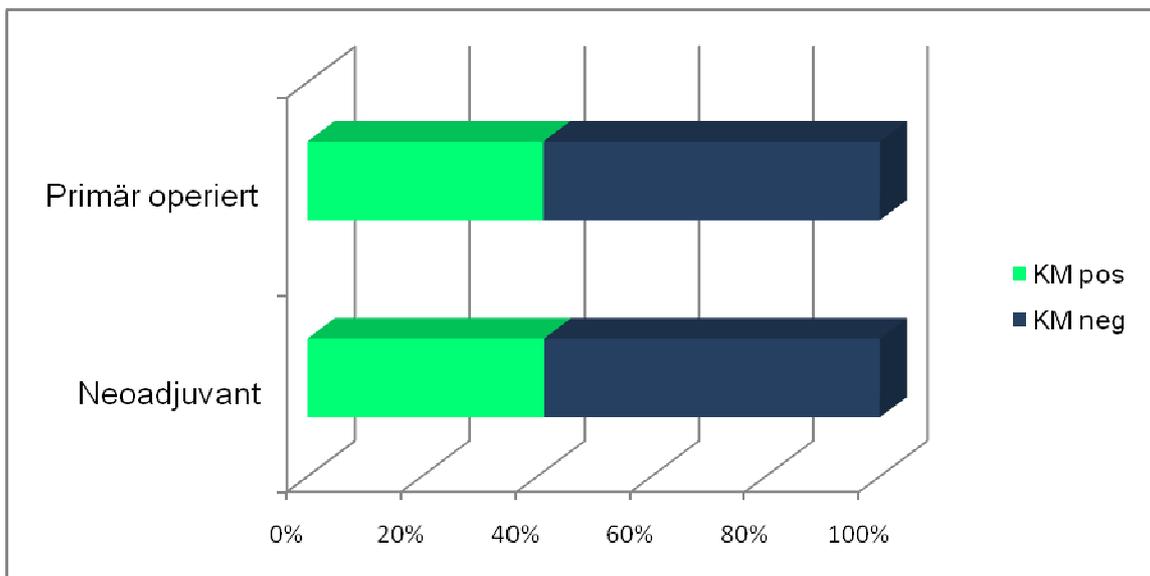
Bei 113 von 275 (41%) Patientinnen konnten Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Die Anzahl der Zellen variierte zwischen 1 und 55 mit dem Mittelwert von 2,67 und einem Standardfehler des Mittelwerts von 0,58 (Abb. 15).

## Ergebnisse



**Abb. 15** Typische Zytokeratin-positive Zellen aus dem Patientenmaterial

Das Patientenkollektiv wurde in zwei Gruppen unterteilt: primär operierte Patientinnen und Patientinnen, die vor der Operation eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten (Tab. 9). Bei 14 von 34 (41%) der neoadjuvant behandelten Patientinnen und 99 von 241 (41%) primär operierten Patientinnen konnten DTZ im KM nachgewiesen werden. In Abb. 16 wird gezeigt, dass sich der prozentuale Anteil positiver Knochenmarkbefunde in den beiden Subgruppen nicht unterscheidet.



**Abb. 16** Prozentualer Anteil der positiven Knochenmarkbefunde in verschiedenen Patientengruppen.

### 3.3.1. Korrelation des KM-Status mit klinisch-pathologischen Faktoren

Die Korrelation eines positiven KM-Befundes mit klinisch-pathologischen Faktoren wurde in der Gruppe der primär operierten Patientinnen mittels Chi-Square Test untersucht. Es konnte keine Korrelation zwischen einem positiven KM-Befund und dem Menopausenstatus, dem Stadium, der Tumorgroße, dem Lymphknotenstatus, dem M-Stadium, der Histologie oder dem Grading des Tumors erkannt werden. Auch hinsichtlich der Korrelation zwischen dem Her2/neu-Status, sowie dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus des Primärtumors mit DTZ-Nachweis im KM zeigte sich keine Signifikanz (Tab. 11).

## Ergebnisse

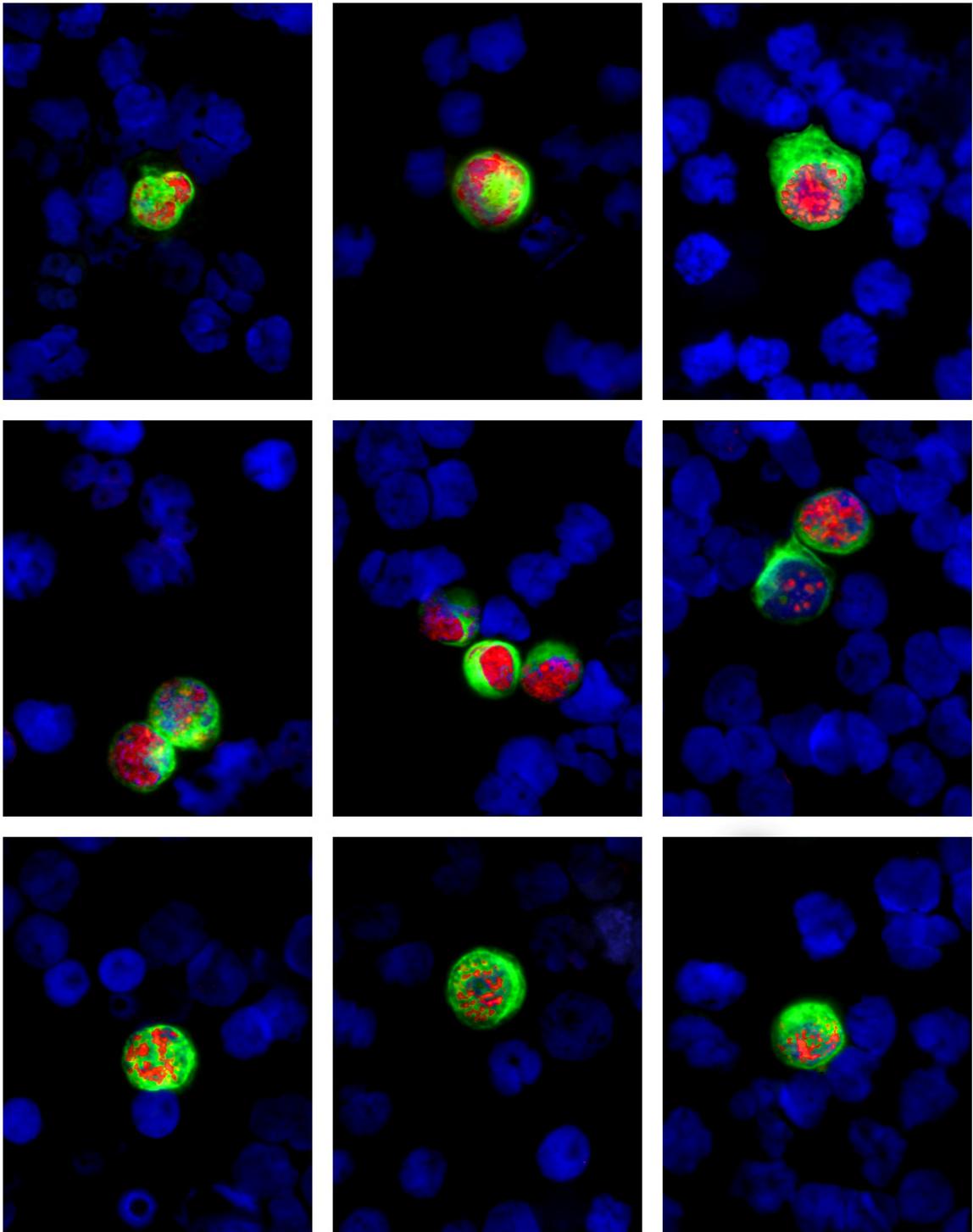
**Tab. 11** Korrelation der Knochenmarkbefunde mit klinisch-pathologischen Daten der primär operierten Patientinnen

Faktor	Anzahl der Patientinnen N=241	n	DTZ Positiv (%)	p-value
Menopausenstatus				n.s.
Prämenopausal	68	29	(43)	
Postmenopausal	173	70	(40)	
Stadium				n.s.
0	19	4	(22)	
I	102	44	(43)	
II	85	33	(38)	
III	28	13	(46)	
IV	7	5	(71)	
Tumorgröße				n.s.
Tis	20	6	(30)	
T1	134	55	(41)	
T2-T4	84	37	(44)	
Lymphknotenstatus				n.s.
Neg	157	63	(40)	
Pos	81	35	(43)	
Metastasierung				n.s.
M0	234	94	(40)	
M1	7	5	(71)	
Grading				n.s.
G1	16	8	(50)	
G2	176	73	(41)	
G3	28	10	(36)	
Histologie				n.s.
Duktal invasiv	152	63	(42)	
Lobulär invasiv	50	18	(36)	
DCIS	19	6	(30)	
Anderer Typ	17	11	(65)	
Lymphangiosis carcinomatosa				n.s.
L0	222	91	(41)	
L1	19	8	(42)	
ER Status				n.s.
Neg	39	15	(38)	
Pos	198	82	(41)	
PR Status				n.s.
Neg	70	26	(37)	
Pos	167	71	(42)	
Her2/neu Status				n.s.
Neg	194	83	(43)	
Pos	37	12	(32)	

### **3.4. ER $\alpha$ -Status disseminierter Tumorzellen**

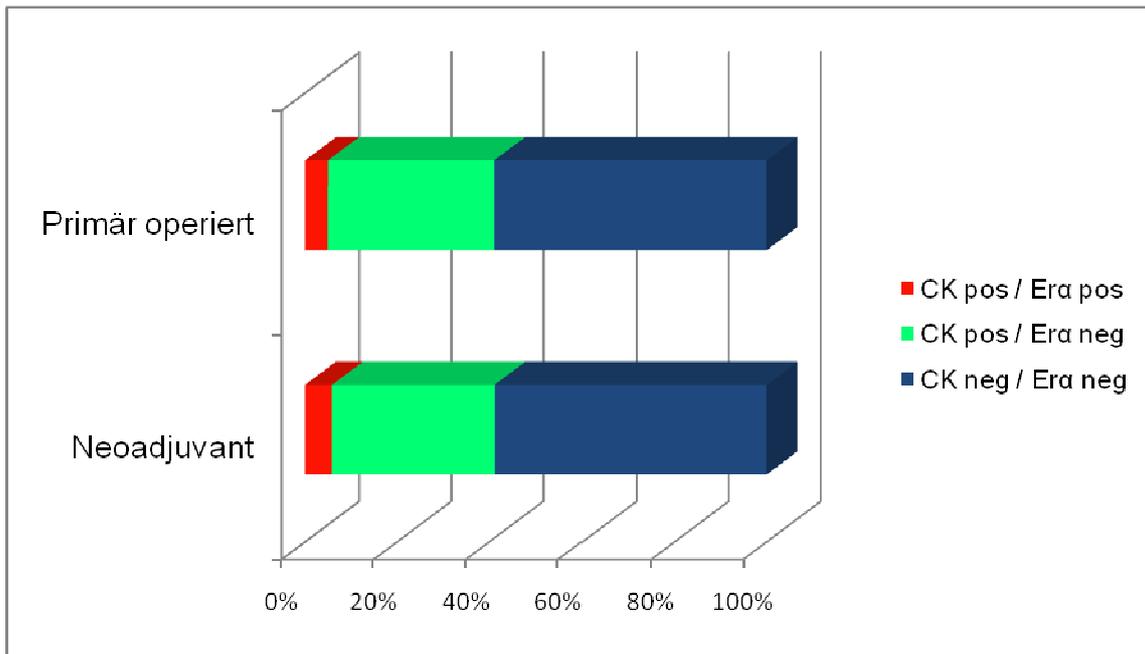
Bei 14 von 113 (12%) Patientinnen mit positivem Knochenmarkbefund konnten Östrogenrezeptor/Zytokeratin-positive Zellen nachgewiesen werden. Die Anzahl der doppelpositiven Zellen variierte zwischen 1 und 15 Zellen/  $3 \times 10^6$  MNC. Bei den übrigen 99 Patientinnen (88%) waren die disseminierten Tumorzellen ER $\alpha$ -negativ (Abb. 17).

## Ergebnisse



**Abb. 17** Typische Zytokeratin/Östrogenrezeptor-positive Zellen aus dem Patientenmaterial

Der ER $\alpha$ -Status der DTZ der Patientinnen beider Subgruppen wurde verglichen. Bei 2 von 14 (14%) KM-positiven, neoadjuvant behandelten Patientinnen und 12 von 99 (12%) primär operierten Patientinnen konnten ER $\alpha$ -positive DTZ nachgewiesen werden. Es zeigten sich also keine wesentlichen Unterschiede im prozentualen Anteil der bestimmten Knochenmarkbefunde (Abb. 18).



**Abb. 18** Der prozentuale Anteil bestimmter Knochenmarkbefunde in den verschiedenen Patientengruppen.

### 3.5. Der Vergleich des ER $\alpha$ -Status zwischen disseminierten Tumorzellen und dem Primärtumor

Bei 113 Patientinnen mit positivem Knochenmarkbefund wurde der ER $\alpha$ -Status des Primärtumors und jener der DTZ verglichen. Die ER $\alpha$ -Positivrate des Primärtumors betrug in dieser Gruppe 83% (94 Patientinnen). Allerdings wurden nur bei 13 dieser 94 Patientinnen (14%) ER $\alpha$ -positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen. Die übrigen 81 Patientinnen (86%) hatten trotz positiven ER $\alpha$ -Status des Primärtumors ER $\alpha$ -negative Tumorzellen im Knochenmark. Von den 19 Patientinnen mit negativem ER $\alpha$ -Status des

Primärtumors wiesen 18 (95%) ER $\alpha$ -negative und eine (5%) ER $\alpha$ -positive Tumorzellen im Knochenmark auf. Die Konkordanzrate zwischen dem ER $\alpha$ -Status der DTZ und dem des Primärtumors lag bei 27% (Tab. 12). Das Ausmaß der ER $\alpha$ -Expression des Primärtumors (negativ, schwach, mäßig, stark) korrelierte nicht mit dem ER $\alpha$ -Status der disseminierten Tumorzellen (Tab. 13).

**Tab. 12** Korrelation zwischen ER $\alpha$ -Status des Primärtumors und disseminierten Tumorzellen (DTZ)

	DTZ ER $\alpha$ -positiv n (%)	DTZ ER $\alpha$ -negativ n (%)	Gesamt
<b>Tumor ER<math>\alpha</math>-negativ</b>	1 (1)	18 (16)	19 (17)
<b>Tumor ER<math>\alpha</math>-positiv</b>	13 (11)	81 (72)	94 (83)
<b>Total</b>	14 (12)	99 (87)	113 (100)

**Tab. 13** Korrelation des ER $\alpha$ -Expression-Ausmaßes des Primärtumors mit dem ER $\alpha$ -Status der DTZ

		DTZ	
		ER $\alpha$ -negativ n (%)	ER $\alpha$ -positiv n (%)
<b>ER<math>\alpha</math>-Status Primärtumor</b>	<b>Negativ</b>	18(18)	1(7)
	<b>schwach positiv</b>	8(8)	2 (14)
	<b>mäßig positiv</b>	13(13)	2(14)
	<b>stark positiv</b>	60(61)	9 (64)

### 3.6. Heterogenität der ER $\alpha$ -Expression von disseminierten Tumorzellen

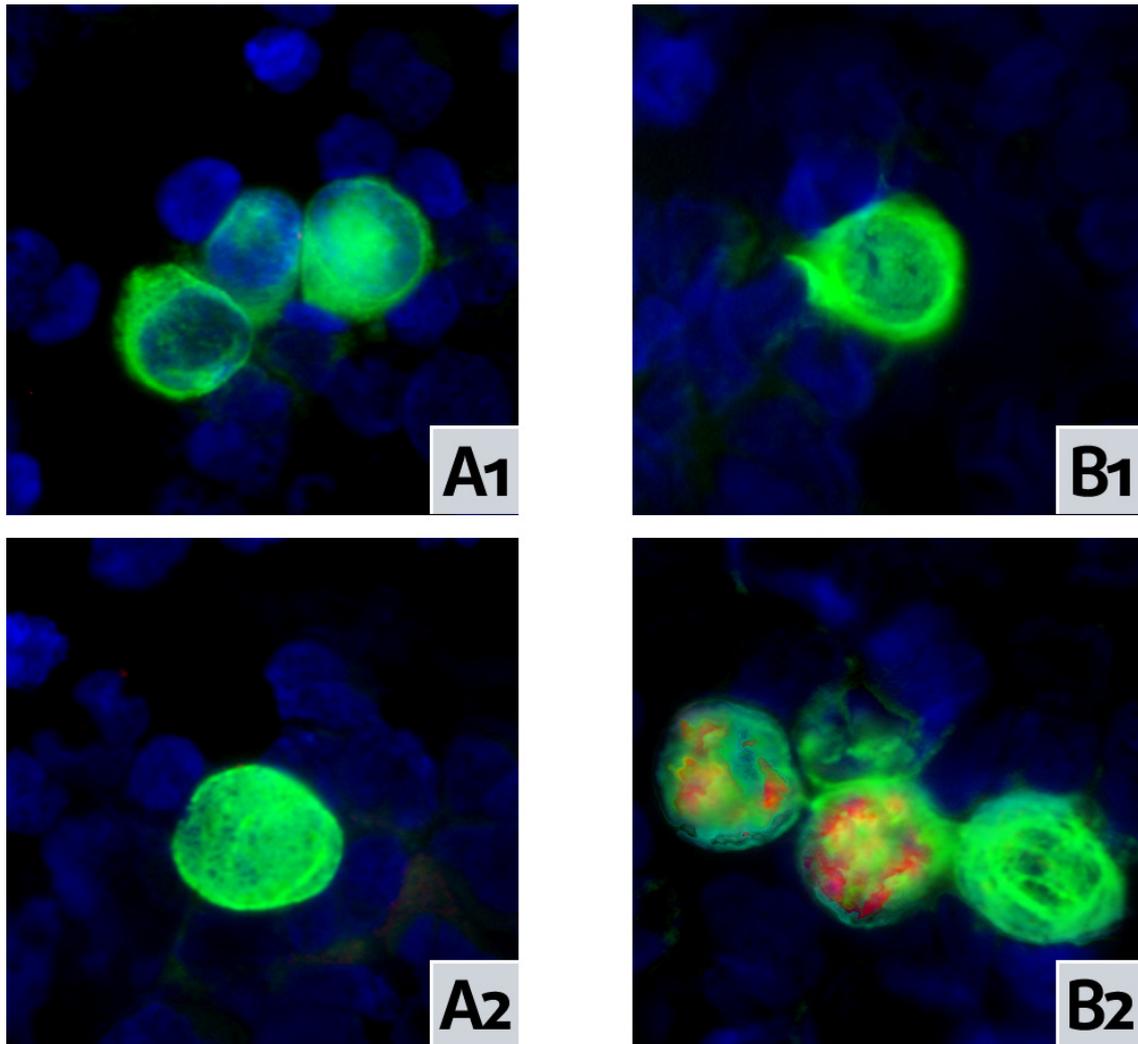
Bei 41 (36%) von 113 KM-positiven Patientinnen wurden mehr als eine disseminierte Tumorzelle nachgewiesen. In dieser Subgruppe konnte zusätzlich die Heterogenität der Antigenexpression der disseminierten Tumorzellen

## Ergebnisse

beurteilt werden. Bei 30 (73%) dieser Patientinnen konnten nur ER $\alpha$ -negative Tumorzellen nachgewiesen werden. Bei keiner Patientin wurden ausschließlich ER $\alpha$ -positive Tumorzellen gefunden. 11 (27%) Patientinnen haben eine heterogene Expression des Östrogenrezeptors aufgewiesen. Bei diesen Patientinnen konnten sowohl ER $\alpha$ -negative als auch ER $\alpha$ -positive Zellen im Knochenmark detektiert werden konnten. Bezogen auf alle Patientinnen, die ER $\alpha$ -positive DTZ aufwiesen, konnte bei 11 von 14 (79%) Patientinnen heterogene ER $\alpha$ -Expression nachgewiesen werden. (Tab. 14, Abb. 19).

**Tab. 14** Heterogenität der ER $\alpha$ -Expression von DTZ

	DTZ			
	nur ER $\alpha$ -positiv	nur ER $\alpha$ -negativ	ER $\alpha$ -positiv / ER $\alpha$ -negativ	Total
<b>Tumor ER<math>\alpha</math>-negativ</b>	0 (0%)	8 (19%)	0 (0%)	8 (19%)
<b>Tumor ER<math>\alpha</math>-positiv</b>	0 (0%)	22 (54%)	11 (27%)	33 (81%)
<b>Total</b>	0 (0%)	30 (73%)	11 (27%)	41 (100%)



**Abb. 19** Heterogenität der ER $\alpha$ -Expression disseminierter Tumorzellen bei Patientinnen mit mehreren DTZ im KM

A) Gruppe der Patientinnen mit ausschließlich ER $\alpha$ -negativen DTZ im KM (73%); A1) Cluster von C11-positiven DTZ, A2) einzelne C11-positve DTZ B). Gruppe der Patientinnen mit ER $\alpha$ -negativen und ER $\alpha$ -positiven DTZ im KM (27%); B1) einzelne C11-positve DTZ; B2) Cluster von ER $\alpha$ -positiven und ER $\alpha$ -negativen DTZ

## 4. Diskussion

### 4.1. Tumorzeldissemination

Trotz erheblicher Fortschritte der onkologischen Therapie in den letzten Jahren, scheint die Disseminierung einzelner, durch konventionelle histopathologische Stagingmethoden nicht nachzuweisender Tumorzellen ein limitierender Faktor für das rezidivfreie Überleben zu sein <sup>(148)</sup>. Etwa 25 bis 30% der Brustkrebspatientinnen erleben trotz der R0-Resektion des Primärtumors und negativen Lymphknotenstatus ein lokales Rezidiv oder eine Fernmetastase <sup>(77, 37)</sup>. Eine genaue Beurteilung der Prognose bei Mammakarzinom ist anhand der klassischen, klinisch-pathologischen Faktoren nicht ausreichend möglich.

Die hämatogene Streuung disseminierter Tumorzellen (DTZ) hat im komplexen Prozess der Metastasierung entscheidende Bedeutung. Der Nachweis von DTZ im Knochenmark primärer Mammakarzinompatientinnen ist mittlerweile als unabhängiger Prognosefaktor anerkannt <sup>(28)</sup>. Des Weiteren ist die Prognose von Frauen mit persistierenden Tumorzellen nach abgeschlossener adjuvanter Therapie im Vergleich zu Patientinnen ohne Tumorzellnachweis im Knochenmark wesentlich schlechter <sup>(174, 89)</sup>. Damit gelten disseminierte Tumorzellen als Surrogatmarker für eine minimale residuale Tumorerkrankung.

Auch die reine Detektion von DTZ scheint nicht ausreichend zu sein, um den Verlauf der Mammakarzinomerkrankung vorherzusagen. In verschiedenen Langzeitstudien wurde bereits gezeigt, dass 40% bis 60% der Brustkrebspatientinnen trotz positiven Knochenmarkbefundes kein Rezidiv entwickeln <sup>(104, 103)</sup>. Es müssen also Unterschiede im metastatischen Potential der DTZ existieren, die das individuelle Schicksal dieser Zellen bestimmen <sup>(58)</sup>. Allerdings sind die Faktoren, die für den Übergang von der Tumorzellpersistenz in die klinische Manifestation einer Metastase ausschlaggebend sind, noch unbekannt <sup>(122)</sup>. Daher ist es von großer Bedeutung, die einzelne Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark weitergehend zu charakterisieren <sup>(25, 89)</sup>. Dies

könnte zum einen die Identifizierung von Patientinnen mit erhöhtem Rezidiv/Fernmetastase Risiko und zum anderen die Anwendung einer zielgerichteten adjuvanten Therapie bei Patientinnen, die DTZ mit entsprechenden Zielantigenen aufweisen, ermöglichen.

### **4.2. Östrogenrezeptorstatus**

Der Östrogenrezeptorstatus des primären Mammakarzinoms gehört zu den routinemäßig bestimmten klinischen Merkmalen. Etwa 70 bis 80% der Mammakarzinome weisen einen positiven ER $\alpha$ -Status auf <sup>(5)</sup>. Die Expression von Östrogenrezeptoren spielt eine entscheidende Rolle sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie von Brustkrebs und gilt als einer der wichtigsten prognostischen und prädiktiven Faktoren dieser Erkrankung <sup>(127)</sup>. Bei Tumoren mit positivem Hormonrezeptorstatus ist eine systemische hormonelle Behandlung die Therapie der Wahl. Ziel der endokrinen Systemtherapie ist die Elimination einer hormonrezeptorpositiven minimalen Resterkrankung (MRD). Der Hormonrezeptorstatus der DTZ, die als Surrogatmarker einer MRD gelten, bleibt dabei jedoch weiterhin unberücksichtigt, obgleich klassischerweise davon ausgegangen wird, dass der Hormonstatus des Primärtumors und jener der MRD bzw. der DTZ übereinstimmen. Zahlreiche Studien weisen jedoch auf einen komplexeren Zusammenhang zwischen dem Primärtumor und disseminierten Tumorzellen hin, der sich in erheblichen Unterschieden auf dem genetischen Niveau manifestiert <sup>(91, 150)</sup>. Untersuchungen, welche auf Diskrepanzen des Her2/neu Status zwischen dem Primärtumor und isolierten DTZ hinweisen, unterstützen diese Theorie auf phänotypischer Ebene <sup>(163, 15, 106)</sup>.

Des Weiteren bleiben ca. 20-40% Prozent der Mammakarzinompatientinnen resistent gegenüber endokriner Therapie, obwohl der Primärtumor einen positiven Hormonrezeptorstatus aufweist, während 10% der hormonrezeptornegativen Patientinnen auf eine antihormonelle Behandlung ansprechen <sup>(117)</sup>. Da der ER $\alpha$ -Status von disseminierten Tumorzellen bis dato kaum untersucht wurde, war das Ziel dieser Dissertation die Beantwortung der

Frage, ob Unterschiede im Östrogenrezeptor-Expressionsmuster zwischen dem Primärtumor und den DTZ im Knochenmark existieren, die für das inadäquate Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie des Mammakarzinoms verantwortlich werden können.

### **4.3. Fragestellungen zur Methodik**

#### **4.3.1. Knochenmark als Ort der Tumorzell dissemination**

Bekanntermaßen stellt das Skelettsystem einen Prädilektionsort der Fernmetastasierung beim Mammakarzinom dar (<sup>125</sup>, <sup>46</sup>). Diese Erkenntnis führte zu der Überlegung, ob sich schon in früheren Stadien der Erkrankung okkulte Tumorzellen im Knochenmark finden ließen. Bemerkenswerterweise war der Nachweis von einzelnen Tumorzellen in KM auch bei malignen Tumoren, die ein anderes Metastasierungsmuster aufweisen, möglich. So konnten beispielweise bei gastrointestinalen Tumoren, die primär in die Leber und nur zu einem geringen Prozentteil in das Skelett metastasieren, DTZ im KM detektiert werden (<sup>147</sup>, <sup>149</sup>). Es ließe sich also vermuten, dass einzelne Tumorzellen im KM auf eine Generalisation der Erkrankung hinweisen. Mittlerweile gilt der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im KM bei primären Mammakarzinompatientinnen als unabhängiger Prognosefaktor mit Level-I-Evidenz (<sup>28</sup>).

Das Knochenmark bietet sich als ein relativ leicht zugängliches Kompartiment für die Untersuchung an. Die Knochenmarkpunktion ist eine gut etablierte Methode und die in dieser Studie verwendete Jamshidi-Technik wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen angewandt (<sup>86</sup>). Der Eingriff wurde intraoperativ durchgeführt und war damit für die Patientinnen wenig belastend. Erfahrungsgemäß geht die Knochenmarkpunktion mit einer sehr geringen Komplikationsrate einher. So berichteten Diel et al. bei 2052 Punktionen lediglich über eine stärkere Nachblutung aus dem Stichkanal, die mit einer Ligatur versorgt werden musste (<sup>47</sup>, <sup>45</sup>). Eine besser zugreifbare und einfachere Methode der Materialgewinnung für Tumorzellnachweis stellt die Blutentnahme

dar. Allerdings gibt es derzeit nur wenige Studien die darauf hinweisen, dass zirkulierende Tumorzellen im Blut mit verkürzter Überlebenszeit assoziiert sein können. Darüber hinaus gilt diese Beobachtung nur für ein metastasiertes Kollektiv <sup>(39)</sup>. Somit bleibt unklar, welche prognostische Bedeutung dem Nachweis zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut von nicht-metastasierten Patientinnen zukommt <sup>(130, 169, 177, 178, 168)</sup>.

### **4.3.2. Nachweismethoden der disseminierten Tumorzellen**

Unter den Detektionsmethoden der disseminierten Tumorzellen werden zum einen molekularbiologische Verfahren (PCR, RT-PCR, FISH) und zum anderen Antikörper-basierte Methoden eingesetzt (Immunzytochemie, Immunfluoreszenz; Flowzytometrie). Da derzeit kein Karzinom-spezifischer Marker für disseminierte Tumorzellen zur Verfügung steht, erfolgt der Nachweis der DTZ über antiepitheliale Antigene. Physiologisch kommen keine Zellen epithelialer Herkunft in mesenchymalen Geweben wie Blut oder Knochenmark vor <sup>(109)</sup>. Somit wird ihre Detektion bei Malignitäten epithelialer Genese als Hinweis auf Tumorzell-dissemination des Primärtumors oder in metastasierter Situation der Metastase betrachtet. Der maligne Charakter dieser Zellen wurde bereits in verschiedenen Studien mittels Genotypisierung auf molekularer Ebene bewiesen <sup>(68, 91, 150)</sup>.

#### **4.3.2.1. Immunfluoreszenz**

Die mit Abstand wichtigste und derzeit als Standardmethode geltende Detektionsmethode der DTZ ist die Immunzytochemie <sup>(57)</sup>. Hierfür hat sich der in dieser Arbeit angewendete fluoreszenzbasierte Nachweis etabliert. Durch Anwendung dieses Antikörper-basierten Verfahrens konnten die falsch-positiven Ergebnisse durch eine morphologische Beurteilung der Tumorzellen minimalisiert werden. Die Morphologie der Tumorzellen wurde in vorliegender Studie nach Empfehlungen der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection (Tab. 4) und des Internationalen Konsensus für den standardisierten Nachweis und die klinische

Implementierung disseminierter Tumorzellen ausgewertet (Tab. 5) (<sup>22, 57</sup>). Ausschließlich die Patientinnen mit Zellen der ISHAGE-Kategorie I im Knochenmark wurden als KM-positiv bewertet (Abb. 11).

Um die Tumorzellen auf ER $\alpha$ -Expression hin zu charakterisieren wurde eine Immunfluoreszenz-Mehrfachfärbung etabliert. Diese Methode eignet sich besonders gut für eine simultane Detektion mehrerer Antigene und wurde bereits in zahlreichen Studien angesetzt (<sup>163, 120</sup>). Mittels der Anwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen für weit auseinanderliegende Spektren (DAPI-blau, FITC-grün, Alexa Fluor 594-rot) konnte die Anzahl der falsch-positiven Ergebnisse weiter reduziert werden. Auch die Lokalisation der Antigene war für die Qualität der Färbung von entscheidender Bedeutung. Da der Östrogenrezeptor eine nukleäre und die Zytokeratin eine zytoplasmatische Lokalisation aufweisen, konnten auch durch eine eventuelle Farbenüberlagerung falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden.

### 4.3.2.2. Antikörper

Eine der ersten Arbeitsgruppen, die sich mit dem Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark auseinandersetzte, waren Sloane et al. Zum Nachweis der malignen Zellen diente in ihrer Untersuchung von 1980 ein gegen epitheliale muzinöse Oberflächenantigene gerichteter Antikörper (EMA). Die Detektion erfolgte mittels Immunzytochemie (<sup>161</sup>). Das anfangs von vielen Arbeitsgruppen als Tumorzellmarker verwendete EMA hat sich jedoch als nicht ausreichend spezifisch erwiesen, da es auch auf Zellen nicht-epithelialer Herkunft nachgewiesen wurde und Kreuzreaktionen mit hämatopoetischen Zellen im KM aufwies. (<sup>42</sup>). Mit der Entwicklung von Antikörpern, die gegen zytoplasmatisch lokalisierte Strukturen des Zytoskeletts, Zytokeratine, gerichtet sind, kam es zu einem großen Fortschritt auf diesem Gebiet. Zuerst wurde als epithelialer Marker Zytokeratin 18 angesetzt (<sup>41</sup>). Dieses wird bekanntermaßen nur in einfachen Epithelien und Tumoren ihrer Herkunft exprimiert und ist in mehrschichtigen, squamösen Epithelien nicht nachweisbar (<sup>109</sup>). Dadurch wird die Verfälschung der Ergebnisse durch Kontamination des

Knochenmarkaspirates mit Hautpartikeln ausgeschlossen, welche bei der Punktion ins Untersuchungsmaterial gelangen können. Zytokeratin 18 weist zusätzlich eine deutlich höhere Spezifität auf als die muzinöse Antigene. Allerdings haben einige Untersuchungen auf eine eventuelle Herunterregulierung von CK18-Expression auf den Tumorzellen hingewiesen, sodass es sich wiederum als ein nicht genügend sensitiver Marker gezeigt hat (<sup>121, 145</sup>). In der Arbeit von Pantel et al. ist die KM-Positivrate von 26% bei der Anwendung des Anti-CK18 Antikörpers auf 43% bei Einsatz eines sogenannten Panzytokeratin-Antikörpers gestiegen (<sup>121</sup>). Diese gegen mehrere Zytokeratine gerichteten Antikörper berücksichtigen wegen ihres breiten Spektrums die antigene Heterogenität der einzelnen Tumorzellen und erreichen damit die höchste Sensitivität. Aus diesem Grund werden sie in zahlreichen Studien zur Detektion maligner Tumorzellen angewandt (<sup>26, 88, 66, 24, 119, 87, 56</sup>). Es wird zwar auch hier über die Eventualität unspezifischer Reaktionen berichtet, diese treten jedoch im Vergleich mit den bekannten Kreuzreaktionen der EMA-Antikörper deutlich seltener auf (<sup>26, 113</sup>). Damit hat sich die Anwendung von Panzytokeratin-Antikörpern als Standardmethode für den Nachweis von DTZ durchgesetzt (<sup>22, 57</sup>). Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte monoklonale C11 Antikörper gehört zu den klassischen Panzytokeratin-AK. Er richtet sich gegen die Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18 und wird standardmäßig zur Detektion von DTZ im Knochenmark mittels Immunfluoreszenz angewandt (<sup>92, 58, 163, 106, 110, 35, 36</sup>). Die Studie von Bartek et al., welche eine umfangreiche Analyse verschiedener, in der Diagnostik verwendeter Zytokeratinantikörper enthält, weist auf die große Bedeutung des C11-Antikörper in der diagnostischen Onkopathologie hin (<sup>12</sup>).

Zur Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus sowohl der disseminierten Tumorzellen als auch des Primärtumors diente in der vorliegenden Studie der monoklonale Kaninchen ER $\alpha$ -Antikörper Klon SP1. Monoklonale Östrogenrezeptor Kaninchen AK werden erst seit kurzer Zeit in der Labordiagnostik angewandt, zeigen jedoch bereits viele Vorteile gegenüber den klassischen Maus AK. In der Untersuchung von Cheang et al. 2006 wiesen sie

bei gleicher Spezifität und gleichem positiven prädiktiven Wert eine 8% höhere Sensitivität als die Maus AK auf (<sup>34</sup>). Die Studie von Rocha et al. 2008 kam in diesem Zusammenhang ebenfalls auf eine höhere Sensitivität der Kaninchen AK. Auf Grund der höheren verwendeten Arbeitsverdünnungen ergäben sich zudem niedrigere Untersuchungskosten (<sup>142</sup>). Huang et al. zeigten in ihrer Studie eine stärkere Reaktivität und 8-mal größere Rezeptor-Affinität des neuen SP1 Antikörpers im Vergleich mit dem Standard-Maus AK Klon ID5 (<sup>83</sup>). Der Untersuchung von Cano et al zufolge, welche den Kaninchen AK Klon SP1 und den Maus AK Klon NF11 miteinander verglichen hat, weißt der monoklonale Rabbit AK eine höhere Sensivität, eine höhere Spezifität sowie eine stärkere Intensität der Färbung auf. Darüber hinaus erlaubt die Anwendung des SP1 Antikörpers eine Verkürzung der Prozedurdauer und benötigt keine Antigen Retrieval-Behandlung von Formalin-fixiertem und paraffineingebettetem Gewebe (<sup>32</sup>).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Etablierung eines neuen Immunfluoreszenz-basierten Färbeprotokolls zur Bestimmung des ER $\alpha$ -Status der DTZ. Für die Optimierung der Methode wurde auch im Rahmen dieser Studie ein direkter Vergleich der ER $\alpha$ -Antikörper verschiedener Spezies durchgeführt. Abb. 6 und Abb. 7 zeigen, dass sich unter Anwendung von monoklonalen Kaninchen AK eine deutlich bessere Qualität der Färbung erzielen lässt als unter Anwendung der klassischen Maus AK. Die Anwendung von monoklonalen Kaninchen Antikörpern scheint also heutzutage ein verbesserter Standard zur ER $\alpha$ -Status Bestimmung mittels AK-basierten Verfahrens zu sein (Tab. 15).

**Tab. 15** Vergleich des monoklonalen ER $\alpha$  Kaninchen Antikörpers (Klon SP1) mit den klassischen monoklonalen ER $\alpha$  Maus Antikörpern

Studie	Probe	Vergleich-Antikörper	Vorteile des SP1 Antikörpers
Cheang et al. 2006 <sup>34</sup>	FFPE <sup>1</sup> -Gewebe	Maus Klon ID5	Höhere Sensivität
Rocha et al. 2008 <sup>142</sup>	FFPE-Gewebe	Maus Klon ID5	Höhere Sensivität Stärkere Färbungsintensität Niedrigere Untersuchungskosten
Rocha et al. 2008 <sup>142</sup>	FFPE-Gewebe	Maus Klon NF11	Höhere Sensivität Niedrigere Untersuchungskosten
Huang et al 2005 <sup>83</sup>	FFPE-Gewebe	Maus Klon ID5	Stärkere Färbungsintensität Höhere Rezeptor-Affinität Keine Antigen-Retrieval Behandlung
Cano et al. 2003 <sup>32</sup>	FFPE-Gewebe, FNA <sup>2</sup>	Maus Klon NF11	Höhere Sensivität Höhere Spezifität Stärkere Färbungsintensität Kürzere Prozedurdauer Keine Antigen-Retrieval Behandlug

<sup>1</sup> Formalin-fixiertes, Paraffineingebettetes

<sup>2</sup> Feinnadelaspirate

## 4.4. Diskussion der Ergebnisse

### 4.4.1. ER $\alpha$ -Status der DTZ und die Korrelation mit dem Primärtumor

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Knochenmarkaspiraten von insgesamt 275 primären Mammakarzinompatientinnen untersucht. Mit Hilfe eines neu entwickelten Protokolls für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde der Östrogenrezeptorstatus der DTZ im Knochenmark bestimmt und mit dem ER $\alpha$ -Status des Primärtumors verglichen. Obwohl 83% der Primärtumoren einen positiven Hormonstatus aufwiesen, waren nur 12% der untersuchten disseminierten Tumorzellen ER $\alpha$ -positiv. Die Korrelationsrate zwischen dem ER $\alpha$ -Status der DTZ und dem ER $\alpha$ -Status des Primärtumors lag bei 27%.

Autoren kleinerer Studien konnten ebenfalls zeigen, dass der ER $\alpha$ -Status disseminierter Tumorzellen zum einen eher negativ ist und zum anderen meistens nicht mit dem Hormonstatus des Primärtumors übereinstimmt. In der Pilot-Studie von Ditsch et al. wurde der ER $\alpha$  Status von DTZ im Knochenmark bei 17 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom bestimmt. Nur bei zwei von 11 Patientinnen mit ER $\alpha$ -positiven Primärtumoren (18%) konnten ER $\alpha$ -positive DTZ nachgewiesen werden. Alle Patientinnen mit ER $\alpha$ -negativem Primärtumor hatten ER $\alpha$ -negative Zellen im Knochenmark (<sup>49</sup>). Reuben et al. haben den ER $\alpha$ -Status von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von metastasierten Mammakarzinompatientinnen untersucht und mit dem ER $\alpha$ -Status des Primärtumors verglichen. Der Östrogenrezeptorstatus von Primärtumoren war bei 14 von 16 Patientinnen (88%) positiv. Nur bei 3 von 16 Patientinnen (19%) waren Östrogen-positive Tumorzellen jedoch im Blut nachweisbar (<sup>139</sup>).

Die Ergebnisse unserer Untersuchung entsprechen also den Resultaten früherer Studien, die sich mit dem ER $\alpha$ -Status einer minimalen residualen Tumorerkrankung bei Mammakarzinom auseinander gesetzt haben (Tab. 16) und führen zu zwei Schlussfolgerungen: (1) DTZ reflektieren nicht den ER $\alpha$ -Status des korrespondierenden Primärtumors und (2) der ER $\alpha$ -Status von DTZ ist meistens negativ.

**Tab. 16** Vergleich des ER $\alpha$ -Status des Primärtumors und der isolierten Tumorzellen bei Mammakarzinompatientinnen

Studie	N	Material	Methode	ITZ <sup>1</sup> ER $\alpha$ - Positivrate	ER $\alpha$ -Status Kondanzrate N (%)
Ditch et al. 2003	17	KM	Immunogold	12%	47%
Reuben et al. 2007	16	PB	RT-PCR	19%	-
Unsere Studie	113	KM	Immunfluoreszenz	12%	27%

<sup>1</sup> isolierte Tumorzellen

#### 4.4.2. ER $\alpha$ -Status metastatischer Läsionen bei Mammakarzinompatientinnen

Es gibt in der Literatur sehr wenige Daten zur Östrogenrezeptorexpression disseminierter epithelialer Tumorzellen bei Mammakarzinompatientinnen (s.o.). Gleichzeitig gelten diese Zellen als Surrogatmarker der minimalen residualen Tumorerkrankung und können als Vorstufen von Mikrometastasen angesehen werden, die letztendlich Fernmetastasen bilden. Der ER $\alpha$ -Status der metastatischen Läsionen steht also im direkten Zusammenhang mit dem ER $\alpha$ -Status disseminierter Tumorzellen.

Viele Forschungsgruppen haben sich bis dato mit dem ER $\alpha$ -Status der metastatischen Läsionen bei Brustkrebspatientinnen auseinandergesetzt. In der Studie von Nedergaard et al. wurde bei 101 LK-positiven Mammakarzinompatientinnen der Östrogenrezeptorstatus des Primärtumors mit dem ER $\alpha$ -Status der Lymphknotenmetastasen verglichen. Es konnte eine Diskordanz von 21% nachgewiesen werden. 18 Patientinnen (18%) wiesen einen negativen Östrogenrezeptorstatus der LK-Metastase bei positivem Östrogenrezeptorstatus des Primärtumors auf, während in 3 Fällen (3%) eine ER $\alpha$ -positive LK-Metastase bei ER $\alpha$ -negativem Primarius nachgewiesen wurde

(<sup>114</sup>). Andere, kleinere Studien zeigten einen diskrepananten ER $\alpha$ -Status zwischen Primärtumor und entsprechenden Lymphknotenmetastasen in 10 bis 24% der Fälle (<sup>84, 179, 59</sup>).

Remaekers et al. haben bei 75 Mammakarzinompatientinnen den Hormonrezeptorstatus des primären Tumors, des Lokalrezidivs sowie der Lymphknotenmetastasen miteinander verglichen. Die Übereinstimmung des ER $\alpha$ -Status zwischen den Läsionen betrug 81%. Allerdings hat sich der ER $\alpha$ -Status der sekundären Läsion bei 14 Patientinnen (19%) im Vergleich zum Primärtumor geändert (<sup>136</sup>). In einer ähnlichen Untersuchung von Nomura et al. hat sich der ER $\alpha$ -Status des Lokalrezidivs bei 10 Patientinnen (24%) vom ER $\alpha$ -Status des Primärtumors unterschieden (<sup>115</sup>).

In einer großen Studie von Lower et al. wurde bei 200 metastasierten Mammakarzinompatientinnen retrospektiv der ER $\alpha$ -Status des Primärtumors und der Fernmetastase evaluiert. In 30% der Fälle ließ sich eine Änderung des Östrogenrezeptorstatus beobachten. 39 Patientinnen (19,5%) haben trotz ER $\alpha$ -positiven Primarius eine ER $\alpha$ -negative Metastase entwickelt, während bei 21 Patientinnen (10,5%) ein positiver ER $\alpha$ -Status der Metastase bei negativem ER $\alpha$ -Status des Primärtumors nachgewiesen wurde (<sup>101</sup>).

All diese Studien weisen also darauf hin, dass sich der Östrogenrezeptorstatus während des komplizierten Metastasierungsprozesses ändern kann. Dabei tendieren die Tumorzellen dazu, den Östrogenrezeptor zu verlieren. Allerdings zeigen die metastatischen Läsionen bei Östrogenrezeptor-positiven Primarius viel häufiger einen positiven ER $\alpha$ -Status als isolierte Tumorzellen im Blut oder im Knochenmark (<sup>139</sup>). Möglicherweise ist die ER $\alpha$ -Expression während der Zirkulation und Dissemination besonders stark herunterreguliert. Tab.17 fasst den Vergleich des ER $\alpha$ -Status des Primärtumors und der metastatischen Läsionen bei Mammakarzinompatientinnen zusammen.

**Tab.17** Vergleich des ER $\alpha$ -Status des Primärtumors und der metastatischen Läsion<sup>1</sup> bei Mammakarzinompatientinnen

Studie	N	ER $\alpha$ Positivrate	ER $\alpha$ -Status Diskordanzrate n (%)	Lokalisation der Metastase	Switch ER+/ER- n (%)	Switch ER-/ER+ n (%)
Nedergaard et al., 1995 <sup>114</sup>	101	-	21 (21)	LK	18 (18)	3 (3)
Iguchi et al., 2003 <sup>84</sup>	87	40%	21 (24)	LK	15 (17)	6(7)
Zheng et al 2001 <sup>179</sup>	52	54%	(10)	LK	(10)	0
Fernandez et al., 1982 <sup>59</sup>	26	65%	6 (23)	LK	6(23)	0
Raemaekers et al.,1984 <sup>136</sup>	75	57%	14 (19)	LR,LK	8 (11)	6 (8)
Nomura et al.,1985 <sup>115</sup>	42	64%	10 (24)	LR	10 (24)	0
Li et al., 1994 <sup>98</sup>	83	76%	24 (29)	LR,FM	13(16)	11(13)
<i>Kuukasjarvi</i> et al.1996 <sup>96</sup>	50	70%	12 (24)	LR,FM	12 (24)	0
Lower et al.,2005 <sup>101</sup>	200	58%	60 (30)	FM	39 (19,5)	21 (10,5)
Broom et al 2007 <sup>30</sup>	62	18%	(18)	KM,LK, FM	(10)	(8)

<sup>1</sup> Fernmetastase, Lokalrezidiv, Lymphknoten

LR- Lokalrezidiv, FM- Fernmetastase, LK-Lymphknoten, KM-Knochenmark

#### 4.4.3. Weitere phänotypische Merkmale der DTZ

Wie bereits erwähnt, sind die Diskrepanzen zwischen Primärtumor und disseminierten Tumorzellen nicht nur auf die ER $\alpha$  Expression begrenzt. Zahlreiche Forschungsgruppen haben bereits am Beispiel von verschiedenen Proliferationsmarkern, Adhäsionsmolekülen oder Wachstumsfaktoren gezeigt,

dass DTZ im Knochenmark von Patienten mit malignen epithelialen Tumoren nicht immer die gleichen Eigenschaften wie Tumorzellen im Primärgewebe aufweisen. Pantel et al. haben in ihrer Untersuchung von 1993 auf eine geringe Expression von Proliferationsantigenen wie p120 oder Ki-67 auf DTZ hingedeutet (<sup>122</sup>). Dies könnte die Ursache dafür darstellen, dass DTZ durch antiproliferativ gerichtete Chemotherapieschemata nur teilweise eliminierbar sind. (<sup>17, 25, 89, 16, 124</sup>). Dieses sogenannte „cell dormancy“ Phänomen könnte gleichzeitig die lange Latenzzeit bis zur klinischen Manifestation der eventuellen Metastase erklären. Ein weiteres phänotypisches Merkmal, das die Tumorzellpersistenz im Knochenmark erklären könnte, wurde von Pantel et al. 1991 und Zia et al. 2001 beobachtet. Diese beiden Studien wiesen darauf hin, dass die disseminierten Tumorzellen im KM bei bis zu 75% der Fälle durch einen kompletten Verlust des MHC Klasse I Antigens charakterisiert sind (<sup>123, 180</sup>). Aus diesem Grund können DTZ auch durch das Immunsystem nicht komplett eliminiert werden. Des Weiteren analysierten verschiedene Arbeitsgruppen die Expressionsmuster von Invasivitäts-Markern wie den Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) mit seinem membranständigen Rezeptor (uPA-R), Kathepsin D oder EMMPRIN (Extracellular matrix metalloprotease inducer) auf DTZ (<sup>164, 166, 137, 80, 4, 172</sup>). Die Studien von Solomayer et al., Tögel et al. sowie Reimers et al. konnten eindeutig eine hohe Proteaseaktivität der disseminierten Tumorzellen bestätigen. Dies würde ihnen die Degradation von Matrixproteinen und Basalmembranstrukturen ermöglichen und damit auch die Disseminierung ins Knochenmark (<sup>164, 166, 137</sup>). In weiteren Untersuchungen wiesen DTZ eine starke Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin oder EpCAM auf, die im Metastasierungsprozess nicht ohne Bedeutung bleiben (<sup>66, 24</sup>). Zusätzlich stellt der EpCAM einen Marker von großer Bedeutung dar, indem er bereits in der antikörperbasierten zielgerichteten Therapie des Mammakarzinoms mit Edrecolomab (Panorex®) als Angriffspunkt dient (<sup>79</sup>).

### 4.4.3.1. Her2/neu

Die Überexpression von Her2/neu, die sich bei 15-30% der invasiven Mammakarzinome beobachtet lässt, wird mit einer schlechten Prognose assoziiert (<sup>78, 128</sup>). Gleichzeitig gilt dieser Rezeptor als ein prädiktiver Faktor bezüglich einer antikörperbasierten Therapie mit Trastuzumab (Herceptin®) oder Lapatinib (<sup>79</sup>) und ist als potentielles Therapie-Target von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurde der Her2/neu-Status der DTZ schon im Rahmen zahlreicher Studien untersucht. Solomayer et al. haben bei 137 primären Mammakarzinompatientinnen den Her2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen und des Primärtumors verglichen (<sup>163</sup>). Her2/neu Protein war auf DTZ häufiger als im Primärtumor exprimiert. Die Studien von Pantel et al und Braun et al. berichten von Her2/neu Positivitäten auf DTZ von bis zu 87% (<sup>122, 27</sup>). Meng et al. haben über Her2/neu-positive zirkulierende Tumorzellen mit Her2/neu-negativem Primärtumor bei 9 von 24 Patientinnen (38%) mit Krankheitsrezidiv berichtet (<sup>106</sup>). Die neusten Studien zeigen, dass persistierende DTZ auch nach abgeschlossener adjuvanter Therapie ihr Her2/neu Profil im Vergleich zum Primärtumor ändern können (<sup>93</sup>).

Allen diesen Untersuchungen zufolge scheinen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark eine besonders aggressive Subpopulation der Tumorzellen zu repräsentieren. Sie weisen Eigenschaften auf, die trotz der systemischen Therapie sowohl eine Dissemination in das Knochenmark als auch ihre dortige Persistenz ermöglichen. Auch die hohe Her2/neu Positivität der DTZ wird als Ausdruck ihres aggressiveren Phänotyps angesehen (<sup>15</sup>). Da sich diese Zellen so häufig vom Primärtumor unterscheiden, kann das eigentliche Ziel vieler klassischer, nach dem Primärtumor ausgerichteter Therapien nicht erreicht werden. Tab. 18 fasst die verschiedenen Studien zusammen, die sich mit der Phänotypisierung der DTZ bei Mammakarzinompatientinnen auseinandergesetzt haben.

**Tab. 18** Phänotypisierung der DTZ im KM bei Mammakarzinompatientinnen

Studie	N	KM Positivrate	Methode	Phänotyp	Phänotypisch positive Zellen	Diskordanz mit Primärtumor
Solomayer et al.,2006 <sup>163</sup>	137	34%	IFC	Her2/neu	43%	38%
Braun al.,2001 <sup>27</sup>	52	-	ICC	Her2/neu	60%	66%
Braun al.,1999 <sup>24</sup>	15	-	ICC	Her2/neu	87%	n. u.
Pantel al.,1993 <sup>122</sup>	71	36%	ICC	Her2/neu	68%	n. u.
Braun al.,1999 <sup>24</sup>	18	-	ICC	EpCAM	78%	n. u.
Solomayer et al.,1997 <sup>166</sup>	280	47%	ICC	uPA-R	74%	n. u.
Tögel al.,2001 <sup>172</sup>	15	-	ICC	uPA-R	67%	n. u.
Solomayer et al.,1998 <sup>164</sup>	290	51%	ICC	Kathepsin D	17%	n. u.
Pantel al.,1993 <sup>122</sup>	12	36%	ICC	Ki-67	8%	n. u.
Pantel al.,1993 <sup>122</sup>	11	36%	ICC	P120	9%	n. u.
Pantel al.,1991 <sup>123</sup>	26	-	ICC	MHC I	35%	n. u.
Reimers al.,2004 <sup>137</sup>	31	35%	ICC	EMMPRIN	89%	n. u.
Funke al.,1996 <sup>66</sup>	234	38%	ICC	E Cadherin	71%	n. u.

n.u.- nicht untersucht

#### 4.4.4. Hypothesen zur Erklärung der Phänotypunterschiede

##### 4.4.4.1. Tumorheterogenität

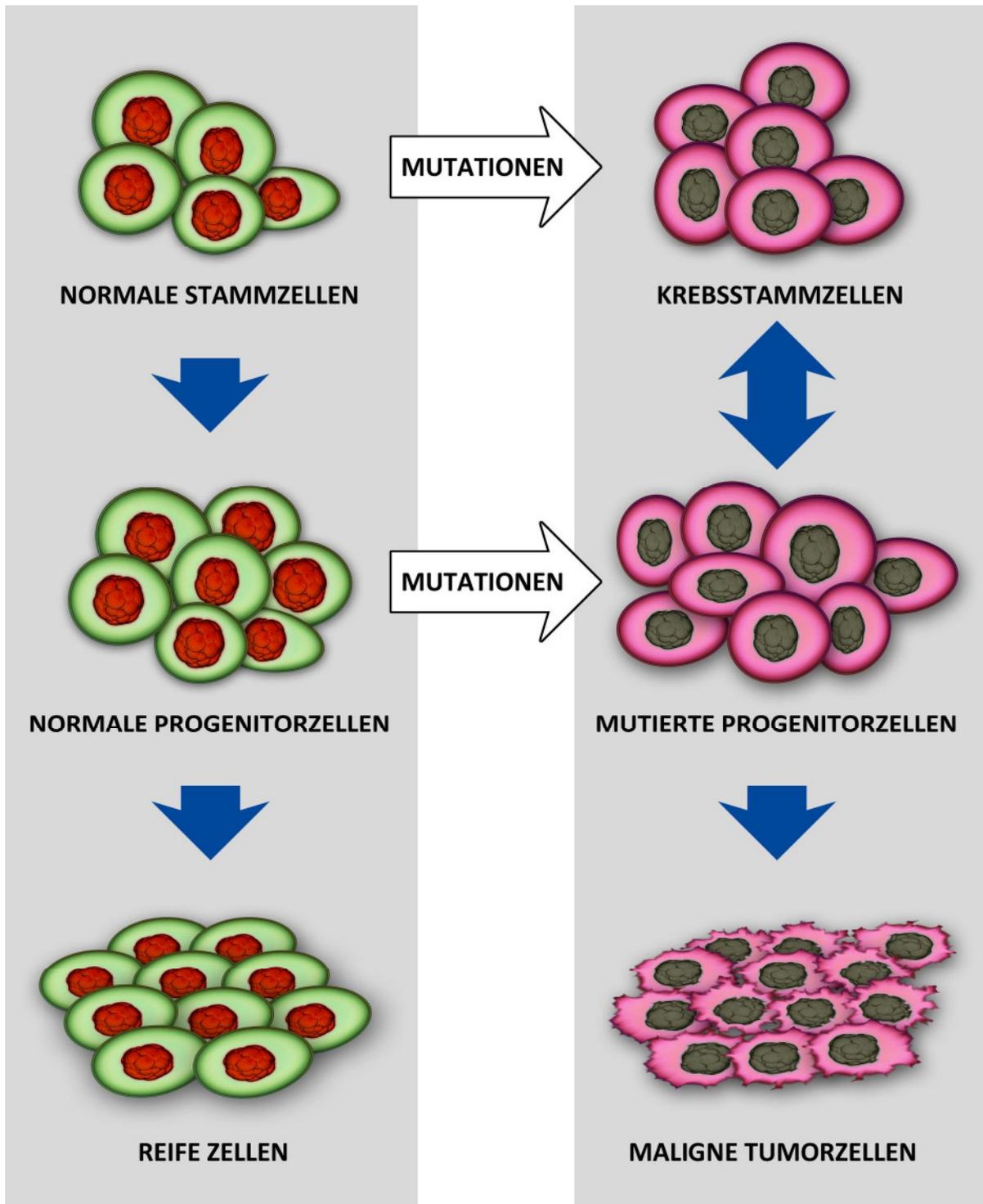
Mit Blick auf die vorliegenden Ergebnisse gilt es verschiedene Hypothesen zu diskutieren. Als eine der Erklärungen kann die klonale Heterogenität des Primärtumors dienen. Ein Tumor stellt eine Mischpopulation von Zellen dar, die einerseits einen unterschiedlichen Differenzierungsgrad besitzen und andererseits einen unterschiedlichen biologischen Charakter aufweisen können. Bezogen auf die vorliegende Arbeit bedeutet dies, dass ein ER $\alpha$ -positives Mammakarzinom auch ER $\alpha$ -negative Zellen aufweist (vgl. Tab. 6). Einzelne Zellen oder Zellpopulationen des Primarius verfügen also über ein individuelles Proliferations- und Metastasierungspotential. Anerkanntermaßen gehen ER $\alpha$ -positive Mammakarzinome mit einer günstigen Prognose einher. Diese Tumore zeigen eine geringe Invasivität und neigen selten zur Metastasierung. Gleichzeitig stellt ein negativer ER $\alpha$ -Status des Mammakarzinoms einen ungünstigen Prognosefaktor dar. Daraus ließe sich also schlussfolgern, dass ER $\alpha$ -negative Zellen, als aggressive und weniger differenzierte Population, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zur Dissemination tendieren (<sup>171, 131</sup>).

Diese Theorie wird durch experimentelle Untersuchungen unterstützt. MCF7 Zellen, die erstmals 1970 aus dem Pleuraerguss einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom isoliert wurden, exprimieren den Östrogenrezeptor und repräsentieren eine hormonabhängige Mammakarzinomzelllinie (<sup>167, 29</sup>). In der Studie von Schafie et al. konnte anhand von Tierversuchen gezeigt werden, dass diese Zellen nur unter Supplementierung mit Östrogenen Metastasen formen(<sup>155</sup>). Die ER $\alpha$ -negativen MDA-MB-231 und MDA-MB-435 Zelllinien hingegen zeichneten sich durch eine sehr hohe Invasivität und ein großes Metastasierungspotential aus (<sup>31, 111, 65</sup>). In der Untersuchung von Price et al. ließ sich nach intravenöser Injektion von MDA-MB-231 bzw. MDA-MB-435 Zellen in die Schwanzvene von nackten Mäusen die Bildung eines Tumors beobachten. Des Weiteren entwickelten 80-100% der Mäuse Fernmetastasen (<sup>133</sup>). Die Theorie der Tumorheterogenität

wird zudem durch die Tatsache unterstützt, dass etwa 20-30% der Patientinnen mit ER $\alpha$ -positivem Mammakarzinom ER $\alpha$ -negative Metastasen entwickeln (vgl. Tab.17) (<sup>179</sup>, <sup>59</sup>, <sup>96</sup>, <sup>30</sup>).

### 4.4.4.2. Stammzelltheorie

Die fehlende Expression von Hormonrezeptoren von disseminierten Tumorzellen wird in letzter Zeit auch mit der Stammzelltheorie in Kontext gebracht. Das Auftreten von Stammzellen in soliden Tumoren, darunter auch im Mammakarzinom, wird zuletzt immer häufiger postuliert. Da die weibliche Brustdrüse ein sehr aktives Organ darstellt, welches im Rahmen der Pubertät, Schwangerschaft und Stillzeit vielen dynamischen Strukturveränderungen unterliegt, ist das Konzept der Mamastammzelle als Dreh- und Angelpunkt spezifischer physiologischer und pathophysiologischer Veränderungen sehr naheliegend. Tatsächlich haben viele Untersuchungen bereits gezeigt, dass Stammzellmarker-positive Zellen im gesunden Brustgewebe nachgewiesen werden können (<sup>52</sup>, <sup>50</sup>). Möglicherweise sind sie für die Entstehung, Differenzierung und normale Funktion der Brustdrüse verantwortlich. Es wird angenommen, dass in Stammzellen oder frühen Progenitorzellen stattfindende Mutationen zu Funktionsstörungen führen und in Karzinogenese resultieren (<sup>51</sup>, <sup>144</sup>) (s. Abb. 20). Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass sich die Fähigkeit der Stammzellen zur Selbsterneuerung und pluripotenter Ausdifferenzierung zum einen in der hohen Proliferationsaktivität, zum anderen in der phänotypischen Diversität maligner Tumorzellen reflektiert. Gleichzeitig können sich diese Zellen jahrelang in einem schlafenden Zustand (tumor-cell-dormancy) befinden und sich so den herkömmlichen, antiproliferativ ausgerichteten Therapieregimen entziehen.



**Abb. 20** Karzinogenese als Resultat von Mutationen, die in Stammzellen und Progenitorzellen stattfinden (<sup>144</sup>).

Eine interessante, aktuell diskutierte Hypothese besagt, dass auch DTZ als Vorläufer-Zellen systemischer Metastasierung in Wirklichkeit Krebsstammzellen repräsentieren. Nach neuesten Veröffentlichungen ist die kleine Subpopulation der Krebsstammzellen nicht nur für das Tumorwachstum sondern auch für die Formation von Sekundärtumoren verantwortlich (<sup>140</sup>, <sup>2</sup>). Der putative Charakter von DTZ wurde in der Studie von Balic et al. bestätigt (<sup>9</sup>). Abraham et al haben gezeigt, dass die Mehrheit von DTZ, die im KM von Mammakarzinompatientinnen mit einem CD44+/CD24 Phänotyp des Tumors detektiert werden, mit einer höheren Prävalenz von Knochenmetastasen korreliert (<sup>1</sup>). Aufgrund der Tatsache, dass Brustkrebsstammzellen generell ER $\alpha$ -negativ sind, würden DTZ mit ER $\alpha$ -negativem Phänotyp trotz ER $\alpha$ -positiven Primärtumors mit der Krebsstammzell-Theorie übereinstimmen (<sup>52</sup>, <sup>7</sup>).

#### **4.4.5. Konsequenzen für die Therapie**

Die gegenwärtig in der Krebsbehandlung angesetzten Therapiestrategien konzentrieren sich auf das Ausbreitungspotential der Karzinome und deren Fähigkeit zu metastasieren. Derzeitige Mamakarzinomtherapieregime richten sich daher größtenteils gegen schnell proliferierende Zellen und molekulare Zielantigene, die dem phänotypischen Profil des Primärtumors entsprechen. Zahlreiche Studien sowie die vorliegende Arbeit weisen allerdings darauf hin, dass sich die Expression therapierrelevanter Tumormarker im Rahmen der Krankheitsprogression verändert (vgl. Tab.17). Dadurch ließe sich die Erfolglosigkeit der konventionellen Therapien hinsichtlich der Eradikation minimaler residualer Tumorerkrankung und der Verhinderung des Krankheitsrezidivs erklären. Eine Ausweitung der Therapieansätze scheint daher ratsam. Durch Identifizierung neuer Therapie-Targets könnten vor allem Patientinnen mit Triple-negativen Tumoren (ER-, PR-, Her2/neu-negativ) profitieren, da diese weder hormonal noch Antikörper-basiert behandelt werden können.

### 4.4.5.1. Zielgerichtete Stammzelltherapie

Die Stammzell-Theorie stellt einen Schlüssel zum Verständnis der Pathogenese einer Krebserkrankung dar. Zum einen können normale Stammzellen oder Progenitorzellen der Brustdrüse zu Krebsstammzellen mutieren und damit zur Entwicklung des Primärtumors führen. Weiter gilt, dass während der Chemotherapie nicht alle Tumorzellen zerstört werden. Krebsstammzellen zeigen sich auf Grund geringer Zellteilungsrate und ausgeprägter Transportmechanismen als Therapie-refraktär und können somit zum lokalen Krankheitsrezidiv führen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Krebsstammzellen in die Blutbahn gelangen und Fernmetastasen verursachen.

Ausgehend von der Stammzell-Theorie ergeben sich neue therapeutische Implikationen. Die Identifikation und Charakterisierung der Krebsstammzellen könnte die Entwicklung von Behandlungsformen ermöglichen, die nicht antiproliferativ wirken, sondern gezielt gegen stammzellspezifische Oberflächenantigene ausgerichtet sind. Auch die spezifischen Transportwege der Krebsstammzellen stellen einen potentiellen Angriffspunkt für neue Therapien dar. Spezifische, die Selbsterneuerung von Brustkrebsstammzellen hemmende Signalinhibitoren könnten zu deren Elimination eingesetzt werden. Des Weiteren zeigen neueste Studien, dass bereits angewendete Target-Therapien zur Reduzierung der tumorigenen Brustkrebsstammzellen beitragen. So wurden in der Untersuchung von Li et al. <sup>(99)</sup> primäre Her2/neu-positive Mammakarzinompatientinnen neoadjuvant mit Lapatinib behandelt. Nach sechs Wochen zeigte sich bei 60,8% der Patientinnen eine deutliche Tumorrückbildung. Zusätzlich nahm der bioptische Anteil der Brustkrebsstammzellen von 10,6% auf 4,7% ab. Gleichzeitig zeigte sich eine Zunahme der Brustkrebsstammzellzahl bei der Gruppe von Patientinnen, die eine konventionelle neoadjuvante Therapie erhielten. Her2/neu Überexpression scheint also mit einer vermehrten Stammzellaktivität assoziiert zu sein.

### 4.4.5.2. Bisphosphonate

Bei Zugrundelegung der Stammzelltheorie stellt die Beeinflussung des Tumormilieus durch Verabreichung von Bisphosphonaten eine weitere mögliche Therapiestrategie dar. Erste Untersuchungen weisen darauf hin, dass ihre Anwendung im adjuvanten Setting positive Ergebnisse zeigt. So wurden in der Pilot-Studie von Rack et al. 31 Mammakarzinompatientinnen nach abgeschlossener operativer und adjuvanter Therapie auf persistierende Tumorzellen im KM hin untersucht. Der KM-Status wurde nach sechsmonatiger Therapie mit Zolendronat reevaluiert. 27 von 31 Patientinnen (87%), die bei der ersten Punktion persistierende Tumorzellen im KM aufwiesen, zeigten 6 Monate nach Abschluss der Zolendronat-Therapie einen negativen KM-Status (<sup>135</sup>). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Bisphosphonate eine antineoplastische, Zellzyklus-unabhängige Wirkung haben und persistierende isolierte Tumorzellen aus dem Knochenmark eliminieren können. Dabei handelt es sich genau um jene Zellen, welche sich im „cell dormancy“ Zustand befinden und die möglicherweise stammzellartige Eigenschaften aufweisen.

#### 4.5. Schlussfolgerungen

Der Hormonrezeptorstatus des Primärtumors von Mammakarzinompatientinnen kann sich von jenem der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark unterscheiden. Dabei ist der ER $\alpha$ -Status der DTZ meist negativ. Diese Diskrepanz erklärt möglicherweise die Rate von Non-Respondern auf eine adjuvante endokrine Therapie trotz Nachweis eines ER $\alpha$ -positiven Tumors.

Das Ziel einer adjuvanten Therapie ist die Eradikation einer minimal residualen Tumorerkrankung. Zur Optimierung der Behandlungsstrategien sollten daher, zusätzlich zur Charakterisierung des Primärtumors die phänotypischen Eigenschaften der DTZ, als Surrogat-Marker der minimalen residualen Tumorerkrankung, mit in Erwägung gezogen werden. Dies würde individualisierte, über die gängige Adjuvanz hinausgehende Behandlungsformen erlauben.

Die ER $\alpha$ -Negativität der DTZ bei positivem ER $\alpha$ -Status des Primärtumors könnte einerseits durch die klonale Heterogenität des Primarius erklärt werden. Andererseits ließe sich der negative ER $\alpha$ -Status der DTZ durch die Hypothese begründen, dass diese einen stammzellartigen Charakter besitzen. Weitere Phänotypisierungen disseminierter Tumorzellen mit Stammzellmarkern sind daher notwendig (<sup>102</sup>).

## 5. Zusammenfassung

Hämatogene Tumorzell dissemination stellt einen wichtigen Schritt in der komplexen Kaskade der Metastasierung dar. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark primärer Mammakarzinompatientinnen korreliert mit einer ungünstigen Prognose (Level I Evidenz). Darüber hinaus ist die Detektion persistierender Tumorzellen im KM von Mammakarzinompatientinnen nach abgeschlossener adjuvanter Therapie mit einer schlechten Prognose assoziiert (<sup>174</sup>, <sup>89</sup>). Damit gelten DTZ als Surrogat-Marker einer minimal residualen Tumorerkrankung und als potenzielle Ziele zukünftiger adjuvanter Therapieansätze.

Die Indikation zur endokrinen Therapie des Mammakarzinoms wird aufgrund des positiven Hormonrezeptorstatus des Primärtumors gestellt. Der ER $\alpha$ -Status der DTZ könnte sich allerdings von dem des Primarius unterscheiden. Zahlreiche Studien zeigen, dass ca. 20-40% der Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom resistent gegenüber einer Hormontherapie bleiben. Gleichzeitig sprechen etwa 10% der Patientinnen mit hormonrezeptornegativem Primärtumor auf eine endokrine Therapie an (<sup>127</sup>, <sup>117</sup>). Das inadäquate Ansprechen des Mammakarzinoms auf eine antihormonelle Therapie könnte durch Unterschiede im ER $\alpha$ -Expressionsmuster des Primärtumors und der DTZ erklärt werden.

Die Ziele dieser Studie waren: die Etablierung eines neuen Immunfluoreszenz-basierten Verfahrens zur Bestimmung des ER $\alpha$ -Status der DTZ, die Bestimmung des ER $\alpha$ -Status der disseminierten Tumorzellen im KM und der Vergleich mit dem des Primärtumors und schließlich die Untersuchung der Heterogenität der ER $\alpha$ -Expression bei Patientinnen mit mehreren DTZ.

KM-Aspirate von 275 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom wurden im Rahmen dieser Arbeit erfasst. Eine neue Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde etabliert und die KM-Aspirate auf Zytokeratin-positive und/oder ER $\alpha$ -

positive Tumorzellen hin untersucht. Der ER $\alpha$ -Status des Primärtumorgewebes wurde immunhistochemisch unter Verwendung desselben ER $\alpha$ -Antikörpers bestimmt.

Bei 113 von 275 (41%) Mammakarzinompatientinnen konnten CK-positive Tumorzellen im KM nachgewiesen werden. Die Zahl der DTZ variierte zwischen 1 und 55 /  $3 \cdot 10^6$  mononukleäre Zellen. ER $\alpha$ -positive DTZ wurden bei nur 14 von 113 Patientinnen (12%) gefunden, während 94 dieser Patientinnen (83%) einen ER $\alpha$ -positiven Primärtumor aufwiesen. Die Konkordanzrate zwischen Primärtumor und DTZ lag bei 27%. Nur 13 von 94 (14%) Patientinnen mit ER $\alpha$ -positivem Tumor hatten nachweisbare ER $\alpha$ -positive DTZ im KM. Bei 11 von 14 Patientinnen (79%) mit ER $\alpha$ -positiven DTZ in KM war die ER $\alpha$ -Expression heterogen.

Der Hormonrezeptorstatus des Primärtumors kann sich von jenem der DTZ unterscheiden. Dabei tendiert der ER $\alpha$ -Status der DTZ meist dazu, negativ zu sein. Diese Erkenntnis könnte die Rate der Non-Responders adjuvanter endokriner Therapie trotz Nachweis eines ER $\alpha$ -positiven Tumors erklären. Des Weiteren kann die ER $\alpha$ -Expression von DTZ bei Mammakarzinompatientinnen mit mehreren DTZ heterogen sein. Auch in diesem Kollektiv ist also gegebenenfalls nur eine partielle Eliminierung der DTZ durch endokrine adjuvante Therapie möglich. Der negative ER $\alpha$ -Status der DTZ trotz positiven ER $\alpha$ -Status des Primärtumors ließe sich einerseits durch die klonale Heterogenität des Primarius, andererseits durch die Hypothese, dass DTZ einen stammzellartigen Charakter aufweisen, erklären.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es sinnvoll sein könnte, die Antigenstruktur der DTZ bei der Therapieplanung des Mammakarzinoms mit in Erwägung zu ziehen. Falls die disseminierten Tumorzellen nicht die Zielantigene des Primärtumors aufweisen, könnten diese Patientinnen von zusätzlichen Behandlungsformen wie Bisphosphonaten oder Antikörper-basierten, den Phänotyp der DTZ berücksichtigenden Therapiestrategien profitieren.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b> Schematische und fotografische Darstellung des aufgearbeiteten Knochenmarks mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	20
<b>Abb. 2</b> Einzelne Schritte der Dichtegradientenzentrifugation und der Zytospin-Anfertigung. ....	22
<b>Abb. 3</b> Fluoreszenzspektren des Alexa Fluor 594 Fluorophors. ....	24
<b>Abb. 4</b> Fluoreszenzspektren des FITC Fluorophors. ....	25
<b>Abb. 5</b> Schematische Darstellung des Wirkungsprinzips von Immunfluoreszenzfärbung .....	26
<b>Abb. 6</b> ER $\alpha$ Immunfluoreszenz Doppelfärbung (MCF7 Zelllinie).....	30
<b>Abb. 7</b> Optimierte ER $\alpha$ Immunfluoreszenz Doppelfärbung (MCF7 Zelllinie). ...	31
<b>Abb. 8</b> Kontrollzelllinien .....	33
<b>Abb. 9</b> Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 der Firma Zeiss .....	35
<b>Abb. 10</b> Auswertungskriterien einer ER $\alpha$ /C11-positiven Tumorzelle.....	37
<b>Abb. 11</b> Positive KM-Befunde eingeteilt nach ISHAGE Kategorien ( <sup>22</sup> ) .....	39
<b>Abb. 12</b> Schematische Darstellung der einzelnen Färbungsschritte im zeitlichen Ablauf .....	43
<b>Abb. 13</b> Altersverteilung des Patientenkollektivs .....	45
<b>Abb. 14</b> Verteilung der Stadien nach AJCC bei primär operierten Patientinnen .....	47
<b>Abb. 15</b> Typische Zytokeratin-positive Zellen aus dem Patientenmaterial.....	48

<b>Abb. 16</b> Prozentualer Anteil der positiven Knochenmarkbefunde in verschiedenen Patientengruppen.....	49
<b>Abb. 17</b> Typische Zytokeratin/Östrogenrezeptor-positive Zellen aus dem Patientenmaterial .....	52
<b>Abb. 18</b> Der prozentuale Anteil bestimmter Knochenmarkbefunde in den verschiedenen Patientengruppen.....	53
<b>Abb. 19</b> Heterogenität der ER $\alpha$ -Expression disseminierter Tumorzellen bei Patientinnen mit mehreren DTZ im KM .....	56
<b>Abb. 20</b> Karzinogenese als Resultat von Mutationen, die in Stammzellen und Progenitorzellen stattfinden ( <sup>144</sup> ).....	74

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b> Unterschiede zwischen isolierten Tumorzellen und Mikrometastasen nach Hermanek et al ( <sup>81</sup> ) .....	4
<b>Tab.2</b> Fluoreszenzspektren der verwendeten Filter .....	34
<b>Tab. 3</b> Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	34
<b>Tab. 4</b> Einteilung der disseminierten Tumorzellen nach der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection ( <sup>22</sup> ) .....	36
<b>Tab. 5</b> Kriterien zur Identifikation von Tumorzellen (mod. nach Fehm et al., <sup>57</sup> ) .....	38
<b>Tab. 6</b> Score nach Remmele ( <sup>138</sup> ) zur Bestimmung des ER $\alpha$ -Status des Primärtumors.....	40
<b>Tab. 7</b> Klinische Modifizierung des Remmele Scores .....	41
<b>Tab. 8</b> Tabellarische Erfassung der bei der Etablierung der Färbung getesteten Parameter .....	42
<b>Tab. 9</b> Zusammensetzung des Patientenkollektivs .....	44
<b>Tab. 10</b> Klinisch-pathologische Daten der primär operierten Patientinnen.....	46
<b>Tab. 11</b> Korrelation der Knochenmarkbefunde mit klinisch-pathologischen Daten der primär operierten Patientinnen .....	50
<b>Tab. 12</b> Korrelation zwischen ER $\alpha$ -Status des Primärtumors und disseminierten Tumorzellen (DTZ) .....	54
<b>Tab. 13</b> Korrelation des ER $\alpha$ -Expression-Ausmaßes des Primärtumors mit dem ER $\alpha$ -Status der DTZ.....	54
<b>Tab. 14</b> Heterogenität der ER $\alpha$ -Expression von DTZ.....	55

<b>Tab. 15</b> Vergleich des monoklonelen ER $\alpha$ Kaninchen Antikörpers (Klon SP1) mit den klassischen monoklonalen ER $\alpha$ Maus Antikörpern.....	64
<b>Tab. 16</b> Vergleich des ER $\alpha$ -Status des Primärtumors und der isolierten Tumorzellen bei Mammakarzinompatientinnen .....	66
<b>Tab.17</b> Vergleich des ER $\alpha$ -Status des Primärtumors und der metastatischen Läsion <sup>1</sup> bei Mammakarzinompatientinnen.....	68
<b>Tab. 18</b> Phänotypisierung der DTZ im KM bei Mammakarzinompatientinnen .	71

## 8. Literaturverzeichnis

1. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res* **2005**; 11(3): 1154-9.
2. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100(7): 3983-8.
3. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(20): 6897-904.
4. Allgayer H, Heiss MM, Riesenberger R, Grutzner KU, Tarabichi A, Babic R, et al. Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R): one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease. *Cancer Res* **1997**; 57(7): 1394-9.
5. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat* **2002**; 76(1): 27-36.
6. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Kommission MAMMA. Aktuelle Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome der Kommission MAMMA in der AGO e.V., 2006.
7. Asselin-Labat ML, Shackleton M, Stingl J, Vaillant F, Forrest NC, Eaves CJ, et al. Steroid hormone receptor status of mouse mammary stem cells. *J Natl Cancer Inst* **2006**; 98(14): 1011-4.
8. Baines CJ. The Canadian National Breast Screening Study: a perspective on criticisms. *Ann Intern Med* **1994**; 120(4): 326-34.
9. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* **2006**; 12(19): 5615-21.
10. Bannasch P, Zerban H, Mayer D. The cytoskeleton in tumor cells. *Pathol Res Pract* **1982**; 175(2-3): 196-211.
11. Banys M, Solomayer EF, Becker S, Krawczyk N, Gardanis K, Staebler A, et al. Disseminated tumor cells in bone marrow may affect prognosis of patients with gynecologic malignancies. *Int J Gynecol Cancer* **2009**; 19(5): 948-52.
12. Bartek J, Vojtesek B, Staskova Z, Bartkova J, Kerekes Z, Rejthar A, et al. A series of 14 new monoclonal antibodies to keratins: characterization and value in diagnostic histopathology. *J Pathol* **1991**; 164(3): 215-24.
13. Bauernhofer T, Zenahlik S, Hofmann G, Balic M, Resel M, Pirchmoser R, et al. Association of disease progression and poor overall survival with detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer. *Oncol Rep* **2005**; 13(2): 179-84.

14. Becker N. [Development of the incidence and mortality of breast cancer]. *Radiologe* **2001**; 41(4): 337-43.
15. Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D, Solomayer EF. Her2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients. *Anticancer Res* **2005**; 25(3B): 2171-5.
16. Becker S, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* **2006**; 97(1): 91-6.
17. Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Fehm T. Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **2007**.
18. Beckmann MW, Fasching PA, Weiss JM, Ortmann O. Update Primäres Mammakarzinom. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **2003**; 63(24): 65-92.
19. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* **1997**; 75(6): 429-39.
20. Bieche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **1995**; 14(4): 227-51.
21. Birnbaum D EF, Jacquemier J, Longy M, Sobol H, Theillet C. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology., January 1999 .
22. Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy* **1999**; 5: 377-88.
23. Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G, et al. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* **1998**; 76(6): 824-8.
24. Braun S, Hepp F, Sommer HL, Pantel K. Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease. *Int J Cancer* **1999**; 84(1): 1-5.
25. Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* **2000**; 18(1): 80-6.
26. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, 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* **2000**; 342(8): 525-33.
27. Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G, et al. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* **2001**; 61(5): 1890-5.
28. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* **2005**; 353(8): 793-802.

29. Brooks SC, Locke ER, Soule HD. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* **1973**; 248(17): 6251-3.
30. Broom RJ, Tang P, Simmons C, Bordeleau L, O'Malley FP, Miller N, et al. Changes in estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and HER2/neu status with time: Discordance rates between primary and metastatic breast pathology samples. *Journal of Clinical Oncology* **2007**; 25: 1024.
31. Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* **1978**; 14(11): 911-5.
32. Cano G, Milanezi F, Leitao D, Ricardo S, Brito MJ, Schmitt FC. Estimation of hormone receptor status in fine-needle aspirates and paraffin-embedded sections from breast cancer using the novel rabbit monoclonal antibodies SP1 and SP2. *Diagn Cytopathol* **2003**; 29(4): 207-11.
33. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2002**; 2(8): 563-72.
34. Cheang MC, Treaba DO, Speers CH, Olivotto IA, Bajdik CD, Chia SK, et al. Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody SP1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. *J Clin Oncol* **2006**; 24(36): 5637-44.
35. Chen D, Xia J, Tanaka Y, Chen H, Koido S, Wernet O, et al. Immunotherapy of spontaneous mammary carcinoma with fusions of dendritic cells and mucin 1-positive carcinoma cells. *Immunology* **2003**; 109(2): 300-7.
36. Chen W-tSB, NY, US). 2005.
37. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **2005**; 366(9503): 2087-106.
38. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* **1997**; 138(11): 4613-21.
39. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* **2004**; 351(8): 781-91.
40. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, et al. *Cancer Incidence in Five Continents: IARC Sci Publ*, **2007**.
41. Debus E, Weber K, Osborn M. Monoclonal cytokeratin antibodies that distinguish simple from stratified squamous epithelia: characterization on human tissues. *EMBO J* **1982**; 1(12): 1641-7.
42. Delsol G, Gatter KC, Stein H, Erber WN, Pulford KA, Zinne K, et al. Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. Implications for diagnosis of human neoplasms. *Lancet* **1984**; 2(8412): 1124-9.

43. Devilee P, Cornelisse CJ. Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochim Biophys Acta* **1994**; 1198(2-3): 113-30.
44. Dickson RB, Stancel GM. Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst Monogr* **2000**; (27): 135-45.
45. Diel IJ, Cote RJ. Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer. *Cancer Treat Rev* **2000**; 26(1): 53-65.
46. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Bastert G. Monoclonal antibodies to detect breast cancer cells in bone marrow. *Important Adv Oncol* **1994**: 143-64.
47. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* **1996**; 88(22): 1652-8.
48. Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* **1998**; 339(6): 357-63.
49. Ditsch N, Mayer B, Rolle M, Untch M, Schildberg FW, Funke I. Estrogen receptor expression profile of disseminated epithelial tumor cells in bone marrow of breast cancer patients. *Recent Results Cancer Res* **2003**; 162: 141-7.
50. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* **2003**; 17(10): 1253-70.
51. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* **2003**; 36 Suppl 1: 59-72.
52. Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab* **2004**; 15(5): 193-7.
53. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* **1993**; 52(4): 678-701.
54. Engel H, Kleespies C, Friedrich J, Breidenbach M, Kallenborn A, Schondorf T, et al. Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics. *Br J Cancer* **1999**; 81(7): 1165-73.
55. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* **1997**; 82(12): 4258-65.
56. Fehm T, Becker S, Bachmann C, Beck V, Gebauer G, Banys M, et al. Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecol Oncol* **2006**; 103(3): 942-7.
57. Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* **2006**; 107(5): 885-92.

58. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* **2002**; 8(7): 2073-84.
59. Fernandez D, Sauven P, Alaghband-Zadeh J, Burn JI. Variability of oestrogen and progesterone receptor status between primary breast cancer and nodal metastases: preliminary communication. *J R Soc Med* **1982**; 75(9): 719-22.
60. Fidler IJ. Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with <sup>125</sup>I-5-Iodo-2'-desoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* **1970**; 45: 773-82.
61. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, 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* **2002**; 347(16): 1233-41.
62. Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* **2000**; 60(2): 245-8.
63. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* **1998**; 62(3): 676-89.
64. Forus A, Hoifodt HK, Overli GE, Myklebost O, Fodstad O. Sensitive fluorescent in situ hybridisation method for the characterisation of breast cancer cells in bone marrow aspirates. *Mol Pathol* **1999**; 52(2): 68-74.
65. Fraker LD, Halter SA, Forbes JT. Growth inhibition by retinol of a human breast carcinoma cell line in vitro and in athymic mice. *Cancer Res* **1984**; 44(12 Pt 1): 5757-63.
66. Funke I, Fries S, Rolle M, Heiss MM, Untch M, Bohmert H, et al. Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. *Int J Cancer* **1996**; 65(6): 755-61.
67. Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer* **2003**; 107(6): 984-90.
68. Gangnus R, Langer S, Breit E, Pantel K, Speicher MR. Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(10): 3457-64.
69. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* **2001**; 19(16): 3669-74.
70. Gebauer G, Merkle E, Bauer M, Lang N. Bone marrow micrometastases in breast cancer patients at the time of primary surgery: indicators of a beginning metastatic disease? *Eur J Gynecol Oncol* **1999**; 20: 99-100.
71. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* **2006**; 58(4): 685-704.

72. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* **2006**; 355(26): 2733-43.
73. Gnant M, Mlineritsch B, Luschin-Ebengreuth G, Kainberger F, Kasmann H, Pischwanger-Solkner JC, et al. Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 5-year follow-up of the ABCSG-12 bone-mineral density substudy. *Lancet Oncol* **2008**; 9(9): 840-9.
74. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* **2007**; 18(7): 1133-44.
75. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **1986**; 320(6058): 134-9.
76. Group EBCTC. Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* **2000**; 355(9217): 1757-70.
77. Group EBCTC. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **2005**; 365(9472): 1687-717.
78. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* **1992**; 10(7): 1049-56.
79. Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol* **2004**; 5(5): 292-302.
80. Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch KW, et al. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat Med* **1995**; 1(10): 1035-9.
81. Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* **1999**; 86(12): 2668-73.
82. Hu XC, Wang Y, Shi DR, Loo TY, Chow LW. Immunomagnetic tumor cell enrichment is promising in detecting circulating breast cancer cells. *Oncology* **2003**; 64(2): 160-5.
83. Huang Z, Zhu W, Szekeres G, Xia H. Development of new rabbit monoclonal antibody to estrogen receptor: immunohistochemical assessment on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2005**; 13(1): 91-5.
84. Iguchi C, Nio Y, Itakura M. Heterogeneous expression of estrogen receptor between the primary tumor and the corresponding involved lymph nodes in patients with node-positive breast cancer and its implications in patient outcome. *J Surg Oncol* **2003**; 83(2): 85-93.
85. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* **1986**; 320(6057): 84-5.

86. Jamshidi K, Swaim WR. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. *J Lab Clin Med* **1971**; 77(2): 335-42.
87. Janni W, Gastroph S, Hepp F, Kentenich C, Rjosk D, Schindlbeck C, et al. Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma. *Cancer* **2000**; 88(10): 2252-9.
88. Janni W, Hepp F, Rjosk D, Kentenich C, Strobl B, Schindlbeck C, et al. The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer* **2001**; 92(1): 46-53.
89. Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* **2005**; 103(5): 884-91.
90. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* **2006**; 354(8): 809-20.
91. Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* **2002**; 360(9334): 683-9.
92. Kraeft SK, Ladanyi A, Galiger K, Herlitz A, Sher AC, Bergsrud DE, et al. Reliable and sensitive identification of occult tumor cells using the improved rare event imaging system. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(9): 3020-8.
93. Krawczyk N, Banys M, Neubauer H, Solomayer EF, Gall C, Hahn M, et al. HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor. *Anticancer Res* **2009**; 29(10): 4019-24.
94. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **1997**; 138(3): 863-70.
95. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**; 93(12): 5925-30.
96. Kuukasjarvi T, Kononen J, Helin H, Holli K, Isola J. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J Clin Oncol* **1996**; 14(9): 2584-9.
97. Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* **2001**; 142(9): 4120-30.
98. Li BD, Byskosh A, Molteni A, Duda RB. Estrogen and progesterone receptor concordance between primary and recurrent breast cancer. *J Surg Oncol* **1994**; 57(2): 71-7.
99. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* **2008**; 100(9): 672-9.

100. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* **2002**; 94(2): 116-28.
101. Lower EE, Glass EL, Bradley DA, Blau R, Heffelfinger S. Impact of metastatic estrogen receptor and progesterone receptor status on survival. *Breast Cancer Res Treat* **2005**; 90(1): 65-70.
102. Lynch MD, Cariati M, Purushotham AD. Breast cancer, stem cells and prospects for therapy. *Breast Cancer Res* **2006**; 8(3): 211.
103. Mansi JL, Berger U, McDonnell T, Pople A, Rayter Z, Gazet JC, et al. The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. *J Clin Oncol* **1989**; 7(4): 445-9.
104. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* **1999**; 354(9174): 197-202.
105. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(24): 8152-62.
106. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, et al. uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**; 103(46): 17361-5.
107. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **1994**; 266(5182): 66-71.
108. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* **2007**; 357(26): 2666-76.
109. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **1982**; 31(1): 11-24.
110. Mukherjee P, Madsen CS, Ginardi AR, Tinder TL, Jacobs F, Parker J, et al. Mucin 1-specific immunotherapy in a mouse model of spontaneous breast cancer. *J Immunother* **2003**; 26(1): 47-62.
111. Mukhopadhyay R, Theriault RL, Price JE. Increased levels of alpha6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* **1999**; 17(4): 325-32.
112. Muller P, Weckermann D, Riethmuller G, Schlimok G. Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **1996**; 88(1): 8-16.
113. Muller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* **2005**; 11(10): 3678-85.
114. Nedergaard L, Haerslev T, Jacobsen GK. Immunohistochemical study of estrogen receptors in primary breast carcinomas and their lymph node metastases including comparison of two monoclonal antibodies. *APMIS* **1995**; 103(1): 20-4.

115. Nomura Y, Tashiro H, Shinozuka K. Changes of steroid hormone receptor content by chemotherapy and/or endocrine therapy in advanced breast cancer. *Cancer* **1985**; 55(3): 546-51.
116. Olsen O, Gotzsche PC. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev* **2001**; (4): CD001877.
117. Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* **1998**; 51(3): 227-38.
118. Palmieri C, Lam EW, Mansi J, MacDonald C, Shousha S, Madden P, et al. The expression of ER beta cx in human breast cancer and the relationship to endocrine therapy and survival. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(7): 2421-8.
119. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* **1999**; 91(13): 1113-24.
120. Pantel K, Otte M. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, and phenotyping. *Recent Results Cancer Res* **2001**; 158: 14-24.
121. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* **1994**; 3(3): 165-73.
122. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* **1993**; 85(17): 1419-24.
123. Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, et al. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res* **1991**; 51(17): 4712-5.
124. Pantel K, von Knebel Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmuller G. [Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies]. *Chirurg* **1997**; 68(12): 1241-50.
125. Papac RJ. Bone marrow metastases. A review. *Cancer* **1994**; 74(9): 2403-13.
126. Pavlakis N, Schmidt R, Stockler M. Bisphosphonates for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **2005**; (3): CD003474.
127. Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer--the present. *Histopathology* **2008**; 52(1): 82-90.
128. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2000**; 406(6797): 747-52.
129. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **2005**; 353(16): 1659-72.
130. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(4): 1392-400.

131. Platet N, Prevostel C, Derocq D, Joubert D, Rochefort H, Garcia M. Breast cancer cell invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells. *Int J Cancer* **1998**; 75(5): 750-6.
132. Powles T, Paterson S, Kanis JA, McCloskey E, Ashley S, Tidy A, et al. Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol* **2002**; 20(15): 3219-24.
133. Price JE, Polyzos A, Zhang RD, Daniels LM. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res* **1990**; 50(3): 717-21.
134. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**; 95(8): 4589-94.
135. Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Sommer H, Friese K, Janni W. [Efficacy of zoledronate in treating persisting isolated tumor cells in bone marrow in patients with breast cancer. A phase II pilot study]. *Dtsch Med Wochenschr* **2008**; 133(7): 285-9.
136. Raemaekers JM, Beex LV, Koenders AJ, Pieters GF, Smals AG, Benraad TJ, et al. Concordance and discordance of estrogen and progesterone receptor content in sequential biopsies of patients with advanced breast cancer: relation to survival. *Eur J Cancer Clin Oncol* **1984**; 20(8): 1011-8.
137. Reimers N, Zafrakas K, Assmann V, Egen C, Riethdorf L, Riethdorf S, et al. Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(10): 3422-8.
138. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* **1987**; 8(3): 138-40.
139. Reuben JM LB, Li C, Broglio KR, Valero V, Jackson S, Ueno NT, Krishnamurthy S, Hortobagyi GN, Cristofanilli M. Genomic of circulating tumor cells in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* **2007**; 25((18S)): 1002.
140. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **2001**; 414(6859): 105-11.
141. Ried T, Heselmeyer-Haddad K, Blegen H, Schrock E, Auer G. Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* **1999**; 25(3): 195-204.
142. Rocha R, Nunes C, Rocha G, Oliveira F, Sanches F, Gobbi H. Rabbit monoclonal antibodies show higher sensitivity than mouse monoclonals for estrogen and progesterone receptor evaluation in breast cancer by immunohistochemistry. *Pathol Res Pract* **2008**; 204(9): 655-62.
143. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **2005**; 353(16): 1673-84.

144. Sagar J, Chaib B, Sales K, Winslet M, Seifalian A. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell Int* **2007**; 7: 9.
145. Schaller G, Fuchs I, Pritze W, Ebert A, Herbst H, Pantel K, et al. Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* **1996**; 2(11): 1879-85.
146. Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK. Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res* **2003**; 9(1 Pt 2): 447S-54S.
147. Schlimok G, Funke I, Bock B, Schweiberer B, Witte J, Riethmuller G. Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance. *J Clin Oncol* **1990**; 8(5): 831-7.
148. Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H, et al. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**; 84(23): 8672-6.
149. Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J, et al. Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer* **1991**; 27(11): 1461-5.
150. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100(13): 7737-42.
151. Schmidt-Mattiesen, Bastert, Wallwiener. *Gynäkologische Onkologie: Schattauer- Verlag*, **2000**.
152. Schnürch HG LA, Diedrich K. Mehrschrittkarzinogenese als Modell der Tumorentwicklung. *Gynäkologe* **1998**; 31: 1033-38.
153. Schön D, Bertz J, Görsch B, Haberland J, Ziegler H, Stegmaier C, et al. Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland: Gesundheitsberichterstattung für Deutschland. Berlin: Robert Koch-Institut, 2002.
154. Shackney SE, Shankey TV. Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. *Cytometry* **1997**; 29(1): 1-27.
155. Shafie SM, Liotta LA. Formation of metastasis by human breast carcinoma cells (MCF-7) in nude mice. *Cancer Lett* **1980**; 11(2): 81-7.
156. Simonds HM, Miles D. Adjuvant treatment of breast cancer: impact of monoclonal antibody therapy directed against the HER2 receptor. *Expert Opin Biol Ther* **2007**; 7(4): 487-91.
157. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* **2002**; 20(17): 3628-36.
158. Singletary SE, Greene FL, Sobin LH. Classification of isolated tumor cells: clarification of the 6th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual. *Cancer* **2003**; 98(12): 2740-1.

159. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **1989**; 244(4905): 707-12.
160. Slamon DJ, Romond EH, Perez EA. Advances in adjuvant therapy for breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* **2006**; 4(3): suppl 1, 4-9; discussion suppl 10; quiz 2 p following suppl 10.
161. Sloane JP, Ormerod MG, Imrie SF, Coombes RC. The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections. *Br J Cancer* **1980**; 42(3): 392-8.
162. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* **2007**; 369(9555): 29-36.
163. Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G, Bachmann R, Kramer B, Vogel U, et al. Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **2006**; 98(2): 179-84.
164. Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bode S, Wallwiener D, et al. Prognostic relevance of cathepsin D detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **1998**; 49(2): 145-54.
165. Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schutz F, et al. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2001**; 7(12): 4102-8.
166. Solomayer EF, Diel IJ, Wallwiener D, Bode S, Meyberg G, Sillem M, et al. Prognostic relevance of urokinase plasminogen activator detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Br J Cancer* **1997**; 76(6): 812-8.
167. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **1973**; 51(5): 1409-16.
168. Stathopoulos EN, Sanidas E, Kafousi M, Mavroudis D, Askoxylakis J, Bozionelou V, et al. Detection of CK-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients with histologically and immunohistochemically negative axillary lymph nodes. *Ann Oncol* **2005**; 16(2): 240-6.
169. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* **2002**; 20(16): 3404-12.
170. Taubert H, Blumke K, Bilkenroth U, Meye A, Kutz A, Bartel F, et al. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gynecol Oncol* **2004**; 92(1): 256-61.
171. Thompson EW, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, et al. Association of increased basement membrane invasiveness with

- absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* **1992**; 150(3): 534-44.
172. Togel F, Datta C, Badbaran A, Kroger N, Renges H, Gieseck F, et al. Urokinase-like plasminogen activator receptor expression on disseminated breast cancer cells. *J Hematother Stem Cell Res* **2001**; 10(1): 141-5.
173. Tumorzentrum München. Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. München Wien New York: W. Zuckschwerdt Verlag, 2005.
174. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, et al. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(16): 5342-8.
175. Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, Roche PC, Ingle JN, Grant C, et al. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res* **2002**; 8(5): 1085-91.
176. Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K. Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(8): 2670-4.
177. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* **2006**; 24(23): 3756-62.
178. Xenidis N, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Stathopoulou A, Malamos N, et al. Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann Oncol* **2003**; 14(6): 849-55.
179. Zheng WQ, Lu J, Zheng JM, Hu FX, Ni CR. Variation of ER status between primary and metastatic breast cancer and relationship to p53 expression\*. *Steroids* **2001**; 66(12): 905-10.
180. Zia A, Schildberg FW, Funke I. MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in R0M0 breast cancer patients. *Int J Cancer* **2001**; 93(4): 566-70.

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich auf vielfältige Weise beim erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. med. Tanja Fehm. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung, ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft, ihre stets wertvollen Ratschläge und ihre konstruktive Kritik wäre diese Arbeit nicht zu bewältigen gewesen. Sie war zu jedem Zeitpunkt für alle meine Fragen ansprechbar und hat eine Betreuung geleistet, wie ich sie mir besser nicht vorstellen kann. Frau Professor Fehm ist mir sowohl professionell als auch menschlich ein großes Vorbild. Den engen Kontakt zu ihr möchte ich auch in Zukunft nicht missen!

Weiter bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. med. Diethelm Walwiener, dem Direktor der Universitäts-Frauenklinik Tübingen. Seinem Einsatz und seinem Glauben an mich verdanke ich meinen Universitätswechsel und damit auch meine Promotion in Tübingen.

Herrn Professor Dr. med. Erich-Franz Solomeyer und Herrn PD Dr. med. Sven Becker sei für ihr großes Interesse an der Forschung über Tumorzell dissemination gedankt. Herrn Doktor Neubauer danke ich für die gewissenhafte Durchsicht meiner Arbeit und die daraus folgenden, wertvollen Anregungen.

Diese Arbeit verdankt ihr Gelingen außerdem der Arbeitsgruppe um Frau Doktor Tina Neuburger, Frau Ute Hilcher, Frau Beate Kootz und Frau Silke Dürr-Störzer die mich mit dem gebotenen Fachwissen, aber auch mit der notwendigen moralischen Unterstützung und nicht zuletzt mit manch einer Aufheiterung in verzweifelten Momenten unterstützten.

Ganz herzlich danke ich Herrn Lucian Plostinaru, der sich in mit viel Mühe der Bearbeitung meiner Bilder und Graphiken angenommen hat und Herrn Dr.

## Danksagung

Karim-Maximilian Niyazi für seine wertvolle Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Meiner Freundin und Kommilitonin Malgorzata Banyś danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit in zahlreichen Projekten und für die unzähligen heiteren Stunden innerhalb und außerhalb der Klinik. Zuzanna und Gosia danke ich für ihre wunderbare Freundschaft, dafür, dass sie in fröhlichen Zeiten mit mir lachen und in schweren Zeiten zu mir halten.

Bei meinem Freund Christian möchte ich mich dafür bedanken, dass er mich mit viel Liebe, Geduld und Kraft in vielfältiger Weise unterstützt und mir damit den erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation sehr erleichtert hat.

Zuletzt danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung und Begleitung in allen Lebenslagen und für die Ermöglichung meines Bildungsweges.

## 10. Lebenslauf

Name: Natalia Helena Krawczyk  
Geburtsdatum und -ort: 17.02.1981, Wroclaw (Breslau)  
Staatsangehörigkeit: Polnisch

### Universitärer Werdegang

26.06.2009 Staatsexamen, Note: sehr gut  
02`2008–01`2009 Praktisches Jahr:  
Universität Tübingen (Chirurgie, Gynäkologie und Geburtshilfe)  
Universidad Autónoma de Madrid (Innere Medizin)  
10`2005–06`2009 Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
10`2000–06`2005 Medizinische Universität Breslau, Polen.

### Famulaturen und berufsrelevante Erfahrungen

07`2006 Chirurgie, Universitätsklinik Breslau/Polen  
12`2005 ACLS-Zertifikat (Advanced Cardiovascular Life Support)  
American Heart Association, Krakau / Polen  
Seit 09/2005 Wissenschaftliche Hilfskraft in den Arbeitsgruppen  
Tumorprogression, Tumordissemination, Universitäts-  
Frauenklinik Tübingen  
06`2005 Gynäkologie Universitätsfrauenklinik Tübingen  
09`2004 Notfallmedizin, Universitätsklinik Breslau/ Polen

### Auszeichnungen

05`2007 Top Ten Poster auf dem 2. Wissenschaftlichen Symposium  
der Kommission Translationale Forschung der AG  
Gynäkologische Onkologie, Bergisch Gladbach  
2005/2006 Stipendiatin der Stiftung Rotary Deutschland  
04`2005 I. Preis für den freien Vortrag auf der III. wissenschaftlichen  
Nationalkonferenz der Rettungsmedizin für Medizinstudenten  
und Ärzte, Breslau/Polen