

**Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Klaus Friese

**Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark und zirkulierende Tumorzellen im
peripheren Blut von Mammakarzinom-Patientinnen: ein Vergleich**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julie Roesch

aus Moka (Mauritius)

- 2011 -

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Christian Schindlbeck

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karl Sotlar
 Prof. Dr. Eva-Maria Grischke**

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2011

Meiner Familie

Es ist besser ein Lichtlein anzuzünden

als über die Dunkelheit zu schimpfen

ein chinesisches Sprichwort

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
2. Material und Methoden	10
2.1. Patientinnenkollektiv	10
2.2. Untersuchte Merkmale	11
2.2.1 TNM-Klassifikation	11
2.2.2 Histologisches Grading	14
2.2.3 Hormon-Rezeptor	15
2.3. Gewinnung und Aufarbeitung der Knochenmarksaspirate	16
2.3.1 Gewinnung von Knochenmark	16
2.3.2 Herstellung der Zytospin- Präparate	16
2.3.3 Immunzytochemische Aufarbeitung	17
2.4. Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im Blut	19
2.4.1 Probenentnahme	19
2.4.2 Verarbeitung mit dem CellTrack AutoPrep System	20
2.4.3 Analyse der Zellbilder mit dem CellTrack Analyzer	21
3. Ergebnisse	23
3.1. Stadienübergreifende Ergebnisse	23
3.2. Ergebnisse bei Patientinnen mit primären Mammakarzinom	26
3.3. Ergebnisse bei Patientinnen im Follow-up	32
3.4. Ergebnisse beim metastasierten Mammakarzinom	33
4. Diskussion	35
4. 1. Methodischer Aspekt	35
4.1.1 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark	35
4.1.2 Zirkulierende Tumorzellen im Blut	40
4.2. Vergleich der Knochenmarks- und Blutbefunde	45
4.2.1. Vergleich und Schlussfolgerungen bei Patientinnen mit primären Mammakarzinom	47
4.2.2. Vergleich und Schlussfolgerungen bei Patientinnen im Follow-up	51
4.2.3. Vergleich und Schlussfolgerungen bei Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom	55
4.3. Vergleich mit anderen Methoden	58
4.4. Potentiale der Tumorzell-Forschung	64
5. Zusammenfassung	69
6. Abbildungsverzeichnis	72
7. Tabellenverzeichnis	73
8. Literaturverzeichnis	75
Danksagung	82

1. Einleitung

Schon seit Jahrzehnten ist die Suche nach zirkulierenden Tumorzellen im Blut (CTC) sowie die Frage nach ihrer Aussagekraft Gegenstand der onkologischen Forschung. Bereits 1869 versuchten Ashworth et al Tumorzellen im Leichenblut nachzuweisen [1]. Immer wieder wurden neue Methoden entwickelt, welche eine zuverlässigere Isolierung von Tumorzellen ermöglichen sollten. Auf diese Weise erfolgte die Entwicklung von der „histologischen Methode“, bei der nach Hämolyse der Blutproben das formalinfixierte Sediment mit Hilfe von Paraffinschnitten untersucht wurde, bis zur „hämatologischen Methode“, bei welcher die Leukozyten und Tumorzellen aufgrund ihres unterschiedlichen Gewichts durch Zentrifugation getrennt wurden [2]. Letztere ähnelt vom Prinzip schon den heutigen Vorgängen der Tumorzell-Isolierung.

Auch die Suche nach disseminierten Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark geht weit zurück. Schon Mitte der 30er Jahre stellten Rohr und Hegglin die Hypothese auf, dass eine Untersuchung des Knochenmarks auf metastatische Zellen hin ein „wertvolles Hilfsmittel in der Diagnostik maligner Neoplasmen“ sein könnte [3]. Jedoch „schienen die zur Verfügung stehenden Isolierungsmethoden die morphologischen Eigenschaften der Zellen so zu verändern, dass eine zuverlässige Beurteilung unmöglich wurde“ [4]. Dementsprechend kam es häufig zu falsch positiven oder negativen Ergebnissen, und die Aussagekraft von disseminierten Tumorzellen wurde kontrovers diskutiert. Auch war man sich bewusst, dass selbst wenn die morphologischen Eigenschaften der Zellen erhalten werden konnten, diese nicht sicher ausreichen würden, um Krebszellen von normalen Zellen zu unterscheiden [5]. Erst die Entdeckung von immunzytochemischen Färbemethoden ermöglichte eine bessere Identifizierung der Tumorzellen. Dabei werden die Tumorzellen mittels Antikörper markiert, welche gegen Antigene gerichtet sind, die nur von den Tumorzellen, jedoch nicht von den gewöhnlichen Knochenmarkszellen exprimiert werden.

Der heutige Stand der Forschung gewährleistet eine hohe Detektionsrate der Tumorzellen in Blut und Knochenmark, wodurch eine genauere Untersuchung ihres Potentials möglich ist. So konnte erörtert werden, dass die Prävalenz und der Phänotyp dieser Zellen Rückschlüsse auf die Biologie des Tumors und dessen

Prognose zulassen können. Solche Parameter, die eine gute Einschätzung der Ausbreitung und der spezifischen Eigenschaften des Karzinoms ermöglichen, sind in der Onkologie von großer Bedeutung. Denn sie sichern die Qualität der Krebsdiagnose und seiner Behandlung. Je sensitiver sie sind, desto früher können Rezidive erfasst werden. Außerdem kann der behandelnde Arzt anhand der Beurteilung der Progredienz beziehungsweise der Aggressivität des Tumors die erforderliche Radikalität seiner Therapie ermessen. Dadurch kann eine effektive Behandlung garantiert und zugleich die Lebensqualität der Patienten einschränkenden Nebenwirkungen minimalisiert werden. Je genauer die Parameter sind, die der Arzt zur Beurteilung der histologischen Struktur des Tumors und der gegebenenfalls bereits erfolgten systemischen Streuung heranzieht, desto effektiver und zugleich nebenwirkungsärmer kann die daraus resultierende Therapie sein.

Gerade beim Mammakarzinom besteht von Seiten der Patientin der Wunsch sowohl die chirurgische Intervention als auch die medikamentöse Therapie möglichst nebenwirkungsarm zu gestalten. Die Therapie und die Diagnostik des Mammakarzinoms sind über die letzten Jahre hinweg kontinuierlich optimiert worden. Dies zeigt sich auch daran, dass beim Brustkrebs trotz steigender Inzidenz die Mortalität gesunken ist. Jedoch sind häufig Rezidive, auch nach langer Latenzzeit, für den Brustkrebs charakteristisch [6]. Da der durch das Mammakarzinom bedingte Tod fast immer eine Folge der Metastasierung ist [7], ist eine gute Evaluation der systemischen Streuung sowohl für die Ermittlung der Prognose als auch der Therapie besonders von Bedeutung. Diese ist jedoch mittels der heutzutage verfügbaren Parameter nur schwer zu beurteilen. Vor allem beim Mammakarzinom sind die Metastasierungsvorgänge schwer einzuschätzen. Ergebnisse von Tierexperimenten Ende der 1960er Jahre [8] sowie immunzytochemische [9, 10] und molekulare [11, 12] Untersuchungen deuten darauf hin, dass unabhängig von der lymphogenen Disseminierung von Tumorzellen auch eine hämatogene Ausbreitung erfolgt. In der Tat metastasiert bei etwa einem Drittel nodalnegativer Mammakarzinom-Patientinnen der Tumor im Verlauf, obwohl zum Zeitpunkt der Primärdiagnose keine Tumorzell-disseminierung in die axillären Lymphknoten nachgewiesen werden konnte. Andererseits leben bis zu 40% der nodal-positiven Patientinnen nach 10 Jahren ohne manifeste Fernmetastasen [13, 14].

In diesem Kontext ist die Suche nach Tumorzellen im Knochenmark oder im Blut von großer Bedeutung. Denn disseminierte Tumorzellen im Knochenmark, auch als

minimale Tumorresiduen bezeichnet („minimal residual disease“, MRD), gelten als Vorläufer klinisch manifester Fernmetastasen, und ihr Nachweis wird zwischenzeitlich als unabhängiger prognostischer Faktor beim primären Mammakarzinom anerkannt [15-21]. Allerdings ist eine Knochenmarksaspiration für die Patientinnen unangenehm und der Vorgang nicht willkürlich oft wiederholbar. Dies ist jedoch eine Voraussetzung um ein regelmäßiges Monitoring der Krankheit zu ermöglichen. Dadurch gewinnen die im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen als prognostische Marker immer mehr an Bedeutung. Die Blutentnahme ist eine wenig schmerzhaft und gewissermaßen unbegrenzt wiederholbare Prozedur. So könnte eine regelmäßige Überwachung des Tumors möglich werden. Leider war eine ausreichende Anreicherung und Isolierung der seltenen zirkulierenden Tumorzellen bis vor einiger Zeit nicht realisierbar, wodurch die Untersuchung in ihrer Aussagekraft deutlich eingeschränkt war. Erst seit wenigen Jahren sind Methoden bekannt die eine zufriedenstellende Detektion der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) ermöglichen, wie zum Beispiel die immunomagnetische Anreicherung oder die PCR. Ein Ersatz der Knochenmarksaspiration durch eine simple Blutentnahme wäre natürlich erstrebenswert. Doch zuerst muss erörtert werden, inwiefern sich der Nachweis von CTCs mit der Aussagekraft von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (DTZ) messen kann. Kann der Blutbefund den informativen Gehalt vom Knochenmarksstatus ergänzen oder gar ersetzen? Sind die aktuellen Nachweismethoden für Tumorzellen überhaupt ausreichend, um ihre Potentiale gut erörtern zu können?

Diesen Fragen soll in der folgenden Arbeit nachgegangen werden. Dazu wurden 97 Mammakarzinom-Patientinnen zeitgleich Blut- und Knochenmarksproben entnommen. Die DTZ im Knochenmark wurden mittels einer immunzytochemischen Methode nachgewiesen, während die Blutproben mit dem CellSearch-System analysiert wurden. Bei letzterem werden die CTCs immunomagnetisch angereichert und mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Anschließend haben wir die Knochenmarks- und Blutbefunde mit der TNM-Klassifikation des Tumors und untereinander verglichen. Des Weiteren haben wir unsere Ergebnisse auch in Bezug auf Kollektive mit primären oder metastasierten Mammakarzinom und Patientinnen in der Nachsorge ausgewertet. Dadurch konnten wir erörtern, inwiefern die Aussagekraft von CTCs und DTZ vom Tumorstadium beeinflusst wird und in welcher Situation die Blutentnahme vielleicht eine Knochenmarkspunktion ersetzen kann.

Außerdem haben wir untersucht, welche Konsequenzen diese Befunde haben könnten.

In unserem Versuch haben wir nur zwei Techniken zur Detektion der Tumorzellen angewendet. Es stehen inzwischen aber noch viele weitere Methoden zum Nachweis von disseminierten oder zirkulierenden Tumorzellen zur Verfügung. Um abzuwägen welche die geeignetste Methode ist, haben wir unsere Ergebnisse mit denen von Studien verglichen, welche andere Methoden angewendet haben und die Vor- und Nachteile der verschiedenen Verfahren ermittelt.

Der Nachweis von Tumorzellen bietet jedoch wesentlich mehr Möglichkeiten als die Beobachtung des Krankheitsverlaufes und der Ansprache auf die Therapie. Diese Alternativen wollen wir zum Abschluss noch genauer erörtern.

2. Material und Methoden

2.1. Patientinnenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurde 97 Patientinnen mit Mammakarzinom von 2005 bis 2008 Knochenmark und Blut abgenommen.

Hierbei handelte es sich um 73 Patientinnen (75 %) mit primären Mammakarzinom, 14 (14 %) im Rezidiv-freien Follow-up und 10 (10%) im metastasierten Stadium. Die pTNM-Klassifikation erfolgte postoperativ anhand des histopathologischen Befundes gemäß der Einteilung der TNM-Klassifikation der UICC. Die genaueren Merkmale der Patientinnen können der Tabelle 1 entnommen werden. Bei der Einteilung gemäß der konventionellen Klassifikationskriterien wurden nur die Patientinnen mit primären und metastasierten Mammakarzinom einbezogen.

Die Patientinnen wurden in der I. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität betreut. Sie wurden ärztlich über die Knochenmarkspunktion entweder im Rahmen der präoperativen Aufklärung oder vor der Knochenmarkspunktion in Lokalanästhesie aufgeklärt und nur in der Studie aufgenommen, wenn sie den Aufklärungs- und Einverständnisbogen unterschrieben hatten. Die Patientinnen mit Blutentnahmen mussten sich außerdem zur Untersuchung auf CTCs bereit erklären.

Merkmal	Anzahl (und %)	DTZ-positiv	CTC-positiv
Alter:			
20-35 J	2 (2%)	2	1
36-50 J	17 (17%)	9	6
51-65 J	42 (43%)	16	7
> 65 J	36 (37%)	8	11
T-Stadium:			
T1	27 (43%)	7	3
T2	37 (59%)	11	8
T3/4	9 (14%)	4	6
Nodalstatus:			
N –	43 (61%)	8	7

N +	27 (39%)	13	10
Grading:			
G1	2 (3%)	0	0
G2	39 (52%)	15	6
G3	34 (45%)	8	11
Hormonrezeptor- Status			
Positiv	61 (80%)	19	14
Negativ	15 (20%)	5	4

Tabelle 1: Übersicht der Patientinnenmerkmale

2.2. Untersuchte Merkmale

Zunächst ist es wichtig zu betonen, dass es sich bei diesem Versuch um eine reine Querschnittsstudie handelt. Während dieser Studie fand keine Untersuchung der Merkmale über die Zeit hinweg statt und es können folglich auch keine Aussagen über den prognostischen Wert von DTZ und CTCs gemacht werden. In diesem Zusammenhang wird auch nicht näher auf die Therapien der Patientinnen eingegangen, da letztere bei dieser „Momentaufnahme“ nicht von Bedeutung sind.

Die Knochenmarks- und Blutbefunde der Patientinnen mit primären Mammakarzinom wurden mit den Kriterien der TNM-Klassifikation, dem Tumorigradung und dem Hormonrezeptor-Status verglichen. Diese werden im folgenden Abschnitt kurz vorgestellt.

2.2.1 TNM-Klassifikation

In den 50er Jahren legte die UICC (Union internationale contre le cancer) die Kriterien für die TNM-Klassifikation fest, welche maligne Tumoren hinsichtlich ihrer anatomischen Ausbreitung klassifizieren und verschiedenen Stadien zuordnen soll. Seitdem ist sie mehrfach ergänzt und aktualisiert worden.

Die TNM-Klassifikation ist dementsprechend eine seit Jahrzehnten etablierte und bewährte Einteilung und gehört inzwischen auch zu den konventionellen Stagingmethoden. Die Abkürzung "TNM" steht für die Kriterien, anhand derer sich die lokale Ausbreitung der Krebserkrankung und die eventuelle Ausdehnung auf weitere

2. Material und Methoden

Körperregionen beschreiben lässt. T (Tumor) beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors, N (Nodus) die regionären Lymphknoten und M (Metastasen) das Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen.

Zur genauen Beschreibung der Befunderhebung wird den Kategorien ein Präfix vorangestellt. Unterschieden wird hauptsächlich die klinische Klassifikation (cTNM oder prätherapeutische Klassifikation) - welche durch klinische Untersuchungen und bildgebende Verfahren ermittelt wird - von der pathologischen Klassifikation (pTNM oder post-therapeutische bzw. -chirurgische Klassifikation). Weitere Präfixe wären y (Diagnose nach präoperativer Chemotherapie), r (Rezidiv) und a (Befunderhebung bei Autopsie).

Um die Ausdehnung der Erkrankung genauer einzugrenzen, sind den Kürzeln dieser Komponenten jeweils Ziffern beigelegt (T0–T4, N0–N3, M0–M1).

Hier soll nur ein kurzer Überblick gegeben werden. Die genaue Klassifikation kann Standardlehrbüchern entnommen werden, z.B. im Lehrbuch „TNM Klassifikation maligner Tumoren“ von Wittekind, Meyer und Bootz (2003).

T-Klassifikation:

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Duktales Carcinoma in situ
Tis (LCIS)	Lobuläres Carcinoma in situ
Tis (Paget)	M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor (M. Paget kombiniert mit nachweisbarem Tumor wird entsprechend der Größe des Tumors klassifiziert)
T1	Tumor mit 2 cm oder weniger im größten Durchmesser - pT1 mic: Mikroinvasion (Eindringen von Karzinomzellen über die Basalmembran hinaus in das angrenzende Gewebe) von 0,1cm oder weniger im größten Durchmesser - T1a: größer 0,1 mm bis maximal 0,5 mm im größten Durchmesser - T1b: größer 0,5 mm bis maximal 1 cm im größten Durchmesser - T1c: größer 1 cm bis maximal 2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor größer als 2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser

2. Material und Methoden

T3	Tumor größer als 5 cm im größten Durchmesser
T4	<p>Tumor jeder Größe mit Befall der Thoraxwand oder der Haut, wie beschrieben T4a– T4d</p> <ul style="list-style-type: none">- T4a: Befall der Thoraxwand (Rippen, Interkostalmuskulatur, vorderer Serratusmuskel, jedoch nicht die Pektoralismuskulatur)- T4b: Ödem (einschließlich „peau d’ orange“), Ulzeration der Haut oder Satellitenmetastasen der Haut- T4c: Vorliegen von T4a und T4b- T4d: inflammatorisches Karzinom

N-Klassifikation:

Im Rahmen der N-Klassifikation werden allein die regionären Lymphknoten beurteilt. Diese entsprechen den ipsilateralen axillären (einschließlich intramammären und interpektoralen „Rotter-Lymphknoten“), infraklavikulären, supraklavikulären Lymphknoten sowie an der A. mammaria interna liegende Lymphknoten. Alle anderen befallenen Lymphknoten werden als Fernmetastasen klassifiziert.

Nx	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden / wurden nicht untersucht
N0	Keine befallenen Lymphknoten
N1	<ul style="list-style-type: none">- N1mic: Mikrometastasen 0,2-2 mm in größter Ausdehnung- N1a: Metastasen in 1-3 axillären Lymphknoten, zumindest eine größer als 2 mm in größter Ausdehnung- N1b: Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer / -n Metastase(n) bei Sentinelbiopsie, klinisch nicht evident- N1c: Vorliegen von N1a und N1b ipsilateral
N2	<ul style="list-style-type: none">- N2a: Metastasen in 4-9 axillären Lymphknoten, zumindest eine größer als 2 mm im größtem Durchmesser- N2b: Metastasen in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei fehlenden axillären Metastasierung

2. Material und Methoden

N3	- N3a: Metastasen in 10 oder mehr axillären Lymphknoten oder in ipsilateralen infraklavikulären LK - N3b: Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mindestens einem positiven axillären Lymphknoten oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Sentinelbiopsie ohne klinisch evidente Metastasen - N3c: Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
----	--

M-Klassifikation:

Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden / wurden nicht untersucht
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Weitere Buchstaben charakterisieren ergänzende Eigenschaften des Tumors. Nennenswert sind hier noch:

R = Resttumorgewebe

L = Befall des Lymphgefäßsystem (Lymphangiosis)

V = Einbruch in die Blutgefäße (Hämangiosis)

2.2.2 Histologisches Grading

Als weiteres Merkmal wurde das histologische Grading (G) herangezogen, welches dem Differenzierungsgrad des Tumorgewebes entspricht. Dieser beschreibt den Umfang der Veränderung der Zellen im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Gewebe und gibt Hinweise auf die biologischen Eigenschaften und die Aggressivität des Tumors. Dazu werden histo- und zytomorphologische Merkmale wie die Tubulusausbildung, die Kernpolymorphie oder die Mitoserate beurteilt und einem Score-Wert zugeordnet. Nach Zuordnung der Scorewerte werden drei Tumordifferenzierungsgrade (G1-G3) unterschieden. (siehe Tabelle 2)

Grading 1 (G1)	gut differenziertes Karzinom mit geringer Malignität
Grading 2 (G2)	mäßig differenziertes Karzinom mit mittelgradiger Malignität

Grading 3 (G3)	Schlecht differenziertes Karzinom mit hoher Malignität
----------------	--

Tabelle 2: Malignitätseinteilung nach Bloom und Richardson

2.2.3 Hormon-Rezeptor-Status

Neben den aufgezählten Konstanten wurden noch der Östrogen- und Progesteronrezeptor-Status der Proben ermittelt. Nach Anfärbung mit hormonspezifischen Antikörpern wurde die immunhistochemisch fassbare „Genexpression“ dieser Rezeptoren bestimmt. Hierzu wurde der Immun Reactive Score (IRS) nach Remmele und Stegner angewendet [22]. Dieser errechnet sich aus dem Produkt von Färbeintensität („staining intensity“, SI) und Prozentsatz der positiven Zellen („percentage of positive cells“, PP).

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

Berechnung: IRS = PP (Anteil positiver Zellen) x SI (Färbeintensität)

Der anhand der beiden Parameter berechnete IRS nimmt einen Wert zwischen 0 und 12 an und wird wie folgt interpretiert:

IRS	Interpretation
0	Rezeptor-negativ
1 bis 3	Rezeptor-positiv, schwache Expression (siehe Anmerkung)
4 bis 8	Rezeptor-positiv, mäßig starke Expression
9 bis 12	Rezeptor-positiv, starke Expression

2.3. Gewinnung und Aufarbeitung der Knochenmarksaspirate

2.3.1 Gewinnung von Knochenmark

Unter sterilen Bedingungen wurden beide Spinae iliacae anteriores superiores mit einer Sternalpunktionskanüle punktiert und anschließend mit einer heparinisierten Spritze in der Regel 5-10ml Knochenmark auf jeder Seite aspiriert. Um das Risiko einer epithelialen Kontamination zu vermindern, wurde die Haut vor der Knochenmarks-Aspiration inzidiert.

Dieser Vorgang erfolgte entweder in Vollnarkose vor Beginn der eigentlichen Operation oder in Lokal-Anästhesie.

Die Aspirate wurden als Gesamtprobe in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und mit Hank'scher Lösung (Firma Biochrom, Berlin) bis auf 20 mL aufgefüllt.

2.3.2 Herstellung der Zytospin- Präparate

Die Knochenmarksaspirate wurden innerhalb der nächsten 24-48 Stunden nach einer standardisierten Methode aufgearbeitet, da sonst möglicherweise Tumorzellen absterben und nicht mehr nachweisbar sein würden. Bis zur Aufarbeitung konnten sie bei 4°C oder Raumtemperatur gelagert werden.

Als erstes erfolgte eine Anreicherung der mononukleären Zellen mittels einer Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll'scher Lösung. Während einer ersten 10-minütigen Zentrifugation bei 900 rpm in einer Heraeus-Zentrifuge (Heraeus

Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) wurden Plasma, Fettpartikel und Detritus getrennt und entfernt. Das nach Abnahme des Überstandes verbliebene Sediment wurde in einem Verhältnis von 1 zu 5 mit Percoll 10% (Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Dichte: 1,01762 g/ml) vermischt, und daraufhin mit Percoll 50% (Dichte: 1,065 g/ml) bis auf ein Endvolumen von 15 mL überschichtet. In der anschließenden 20-minütigen Zentrifugation bei 2300 rpm wurden die Knochenmarks- und Tumorzellen in der Interphase angereichert und abpipettiert.

In der Interphase verbliebene Erythrozyten wurden mit Erythrozyten-Lysepuffer (300mM NH₄Cl, 20MM KHCO₃, 0,2mM EDTA Triplex III, pH 7,4) lysiert. Anschließend wurde die Probe mit PBS (phosphate-buffered-saline: 150 mM NaCl, 10 mM NA₂HPO₄, 1,96mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen.

Mit Hilfe einer Zytozentrifuge (Hettich universal 30 F, Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen) wurden daraufhin bei 100 rpm über 3 Minuten auf 4 Glasobjektträger je 2x10⁶ Zellen aufgebracht.

Die Zytospins wurden über Nacht zum Trocknen liegen gelassen und am folgenden Tag bearbeitet oder bei -80°C aufbewahrt

2.3.3 Immunzytochemische Aufarbeitung

Zur Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurde der monoklonale Antikörper A45-B/B3 der IgG-Klasse IgG1 eingesetzt (Firma Micromet, München). Dieser ist gegen Heterodimere aus CK 8/18 und CK 8/19 gerichtet. Diese Komponenten des epithelialen Zytoskeletts werden von normalen und veränderten Epithelzellen exprimiert – dementsprechend auch von Zellen von Tumoren epithelialen Ursprungs – nicht jedoch von Knochenmarkszellen. Da dieser Antikörper gegen ein breites Spektrum von Zytokeratinen gerichtet ist, ermöglicht er auch eine Identifikation von solchen Zellen als Tumorzellen, welche ihre Expression von individuelleren Zytokeratinen im Laufe der epithelial-mesenchymalen Transition herunterreguliert haben [23]. In umfangreichen Studien wurde belegt, dass normale Knochenmarkszellen in 99% nicht mit dem Antikörper A45-B/B3 reagieren. Demgegenüber handelte es sich bei fast allen A45-B/B3-positiven Zellen im Knochenmark um Tumorzellen. Dies konnte durch molekulare Charakterisierungsmethoden belegt werden [18, 20]. In mehreren Studien wurden außerdem an den isolierten Zytokeratin-positiven Zellen ähnliche phänotypische

Eigenschaften beschrieben, wie sie für maligne Zellen solider Tumore charakteristisch sind, z.B. die Expression von HER2/neu [24, 25]. Darüber hinaus bestätigt die Tatsache, dass in den detektierten Zellen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und genomischer Einzelzellhybridisierung tumor-spezifische chromosomale Aberrationen gefunden werden, ihre maligne Natur [12, 18, 26, 27]. Außerdem können durch eine zusätzliche morphologische Beurteilung unter Umständen noch bestehende falsch-positive Befunde hämatopoetischer Zellen weiter reduziert werden [28, 29].

Nach Blockade der unspezifischen Bindungen mittels zahlreicher Waschschriffe in PBS wurden die Zellen mit dem Antikörper A45-B/B3 in einer Konzentration von 2 µg/mL inkubiert. Schließlich wurde die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion mit Hilfe der APAAP-Methode in Kombination mit der Neofuchsin-Färbung sichtbar gemacht.

Von jeder Patientin wurden 2×10^6 Zellen mit einem Lichtmikroskop untersucht. Die zwei weiteren Objektträger wurden für Kontrollzwecke zur immunologischen Isotypisierung verwendet. Als Negativkontrolle (Isotypkontrolle) wurden Maus-Myeloma-Antikörper verwendet, denen die Fähigkeit an spezifische humane Antigen-Strukturen zu binden fehlt. Als Positiv-Kontrolle dienten Zellen der Brustkrebszelllinie BT-20, die bekanntermaßen CK18 exprimieren.

Die mikroskopische Auswertung der zytologischen Präparate erfolgte geblindet durch zwei unabhängige, zytologisch erfahrene Personen. Aufgrund des sauberen Hintergrundes konnten positive Zellen eindeutig identifiziert werden. Neben der immunhistochemischen Anfärbung wurden zusätzlich zytomorphologische Kriterien einbezogen, welche den malignen Charakter der detektierten Zelle unterstützen. Die Kriterien, nach welchen eine Zelle als disseminierte Tumorzelle eingeordnet wird [30], sind in Form von Empfehlungen von der „International Society for Cellular Therapy“ herausgegeben worden und in Tabelle 3 zusammengefasst.

Zytomorphologie:	Große Zelle mit eindeutig vergrößertem Zellekern und hohem Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis Zelleinschlüsse (presence of cell clusters)
Zytokeratinfärbung:	Deutliche Färbung, heterogenes Färbemuster Zellkern von Zytokeratin-Färbung bedeckt Sichtbare Zytokeratin-Filamente

Tabelle 3: Identifikation von disseminierten Tumorzellen mittels Zytomorphologie und Immunhistochemie

Sämtliche Proben wurden von 2 Untersuchern analysiert. In 95% der Fälle kam es zu übereinstimmenden Ergebnissen. Auch in den weiteren 5% kam es nach einer kritischen Reevaluation zu einer Übereinstimmung.

2.4. Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im Blut

2.4.1 Probenentnahme

Zu Beginn wurde den Patientinnen durch Venenpunktion oder über einen Venenport aseptisch 7,5 mL Vollblut abgenommen. Es wird empfohlen die ersten Milliliter zu verwerfen um eine eventuelle Kontamination mit Epithelzellen der Haut zu vermeiden. Das Blut wird in speziellen Vakuum-CellSave Preservativ Tubes aufbewahrt, welche EDTA und ein Zellkonservierungsmittel enthalten und durch mehrmaliges Umwenden gut vermischt. Das darin enthaltene Konservierungsmittel ist zur genauen Analyse der empfindlichen zirkulierenden Tumorzellen notwendig. Ein aseptisches Vorgehen war wichtig, denn eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien hätte verfälschte Ergebnisse verursachen können. Die Proben mussten innerhalb von 72 Stunden nach Abnahme verarbeitet werden. Bis dahin konnten sie bei Raumtemperatur aufbewahrt werden [31]. Vor der Verarbeitung wurden die Röhrchen visuell untersucht und geronnene Proben verworfen.

2.4.2 Verarbeitung mit dem CellTrack AutoPrep System

Da zirkulierende Tumorzellen nur in einer sehr niedrigen Frequenz im Blut aufzufinden sind, ist eine Anreicherung vor der eigentlichen Identifikation unentbehrlich. Beim CellSearch-Gerät wird eine Anreicherung mittels Immunomagnetismus durchgeführt.

Nach der Blutentnahme wurden von den Proben 7,5 mL Blut in ein 15-mL-Röhrchen aus dem CellSearch-Kit übertragen und 6,5 mL Verdünnungspuffer hinzugemischt. Diese Probe wurde dann bei 800 g 10 Minuten lang bei abgeschalteter Bremse zentrifugiert. Nach ihrer Vorbereitung sollte die Probe innerhalb einer Stunde mit dem CellTrack AutoPrep System verarbeitet werden.

Im CellTrack AutoPrep System werden die Proben mit Hilfe des CellSearch Circulating Tumor Cell Kitt verarbeitet. Dieses enthält ein Ferrofluidreagenz um die CTCs anzureichern sowie eine Lösung mit immunofluoreszenten Partikeln, welche diese dann sichtbar macht. Das Capture-Reagenz auf Ferrofluidbasis besteht aus Nanopartikeln mit einem magnetischen Kern. Um die CTCs zu binden, ist dieser von einer polymeren Schicht von Antikörpern mit Bindungskapazität für das Epithelzellen-Adhäsionsmolekül-Antigen (Epithelial Cell Adhesion Molecule - EpCAM) umgeben. Zur Bestimmung und Zählung der CTCs werden nach dieser immunomagnetischen Bindung und Anreicherung die fluoreszenten Partikel zugegeben. Hierzu werden mehrere Reagenzien verwendet: Anti-CK-Phycoerythrin (CK-PE), für das (für Epithelzellen charakteristische) intrazelluläre Protein Zytokeratin (v.a. die Zytokeratin-Typen 8, 18 und 19) spezifisches Reagenz; DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol), welches den Zellkern sichtbar macht; Anti-CD45-Allophycocyanin (APC), welches Leukozyten spezifisch hervorhebt, sowie einen Puffer, um die Zellwände der Epithelzellen für die Zytokeratin-Antikörper permeabel zu machen.

Im CellTrack Auto Prep System erfolgen automatisch die verbleibenden Etappen des schrittweisen Hinzufügens der Reagenzien, des Mischens, der Inkubation und des Abpipettierens. Nach dem Abpipettieren der Plasmaphase sowie Schicht des Verdünnungs-Puffers werden die mit anti-EpCAM-Antikörper besetzten Ferrofluid-Partikel sowie ein Bindungs-förderndes Reagenz addiert. Nach Inkubation und magnetischer Entfernung der Zellen, die von den Ferrofluid-Partikeln markiert worden sind, werden die unbesetzten Zellen verworfen. Die Ferrofluid-markierten Zellen werden in Puffer suspendiert und mittels der immunfluoreszierenden Partikel

markiert. Nach einer weiteren Inkubation und magnetischen Teilung werden ungebundene Zellen und Reagenzien entfernt und ein Zell-Fixation hinzugefügt. Während dieser Verarbeitung werden die Proben von 7,5 mL Blut auf ein Volumen von ca. 300 μ L reduziert, welches die angereicherten CTCs enthält.

2.4.3 Analyse der Zellbilder

Die verarbeiteten Proben werden vom CellTracks AutoPrep System in eine Kartusche pipettiert, welche dann in ein MagNest eingesetzt wird. Das starke magnetische Feld dieses Zellpräsentationsgeräts zieht die magnetisch markierten Epithelzellen an die Oberfläche der Kartusche. Deshalb sollte die gefüllte Kartusche im MagNest Gerät mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert werden, bevor das MagNest innerhalb der nächsten 24 Stunden in den CellTracks Analyzer eingesetzt wird. Der CellTracks Analyzer II, ein halbautomatisches Fluoreszenzmikroskop, scannt automatisch viermal die gesamte Oberfläche der Kartusche mit wechselnden Fluoreszenz-Filtern, erstellt Bildaufnahmen und zeigt dem Begutachter jede Zelle mit CK-PE-, DAPI-, und CD45-Fluoreszenz. Die Bilder werden zur endgültigen Klassifizierung in einer Galerie angezeigt. Auch hier erfolgte die Auswertung geblindet durch zwei unabhängige, zytologisch erfahrene Personen. Eine Zelle wird als Tumorzelle klassifiziert, wenn die morphologischen Merkmale mit denen einer Epithelzelle übereinstimmen (annähernd runde Zellform mit einem deutlich sichtbaren Kern im Zytoplasma bei einer Mindestgröße von 4 μ m) und der Phänotyp EpCAM+, CK+ (Zytokeratine 8, 18 und/oder 19), DAPI+ und CD45-negativ vorliegt.

Zur Kontrolle des Gerätes, der Reagenzien sowie der Bearbeitung wurde parallel zu jeder Runde der Proben-Verarbeitung eine Kontrolle des CellSearch Circulating Tumor Cell Control Kit eingesetzt. In einer Studie von Cristofanilli et al [32] wurden bei nur 1% von 345 gesunden Kontrollpersonen Zytokeratin-positive Zellen isoliert (mit einem Maximum von 3 Zytokeratin-positive Zellen in 7,5 mL Blut). Auch in dem Versuch von Allard et al konnten nur bei einer von 344 Kontrollpersonen (0,3%) mehr als 2 CTC nachgewiesen werden [33].

2. Material und Methoden

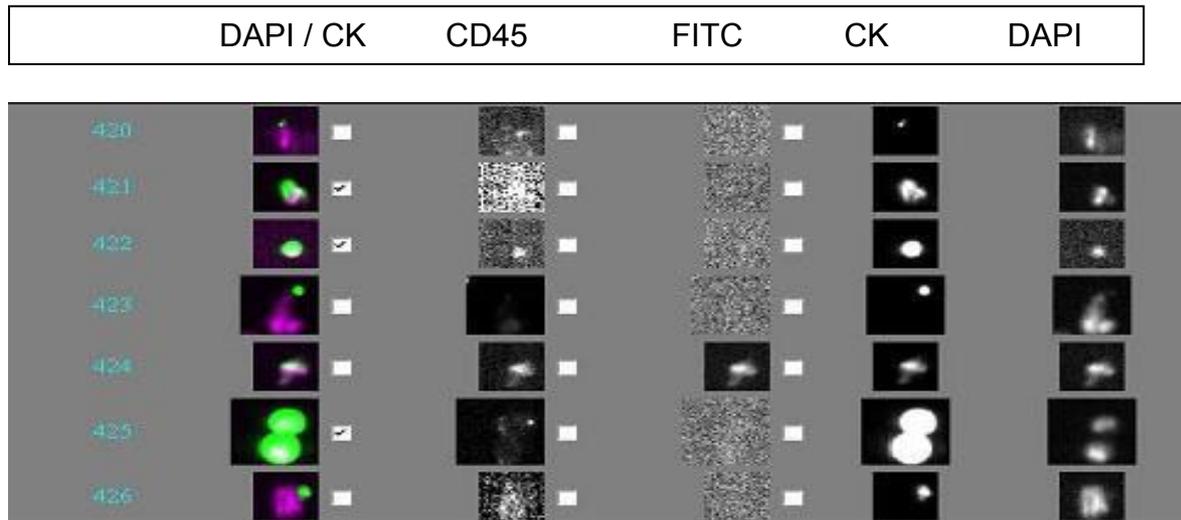


Abbildung 1: Immunzytochemischer Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut mit dem CellSearch System (Veridex LLC, Warren/NJ)

3. Ergebnisse

3.1. Stadienübergreifende Ergebnisse

Insgesamt konnten in 37 von 97 (38 %) Knochenmarksproben DTZ mit im Median 2 Zellen pro 2 Millionen analysierter mononukleärer Zellen (von 1 bis zu über 1000 DTZ) nachgewiesen werden. Im Blut fanden sich zirkulierende Tumorzellen bei 28 von 97 Patientinnen (29 %) mit im Median 2 Zellen pro 7,5 ml Blut (von 1 bis zu über 1000 Zellen). Unabhängig von den Tumorstadien betrachtet war die Inzidenz von CTCs im Blut dementsprechend etwas geringer als die von DTZ im Knochenmark.

Vergleicht man die jeweiligen Ergebnisse, so waren 48 Patientinnen (49 %) in beiden Kompartimenten negativ und 16 Proben (17 %) jeweils positiv. Demzufolge stimmten die Ergebnisse bei 64 von 97 Proben überein, was eine Konkordanz von 66 % ergibt. In 21 Fällen (22 %) fanden sich DTZ bei negativem Befund im Blut, andererseits hatten 12 Patientinnen (12 %) CTCs im Blut ohne dass DTZ im Knochenmark nachgewiesen werden konnten. Mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet zeigt sich stadienunabhängig ein statistisch relevanter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Tumorzellen im Knochenmark und im Blut ($p=0,026$).

Diese Ergebnisse werden in Tabelle 4 und Abbildung 2 dargestellt.

	CTC +	CTC -
DTZ +	16 (17 %)	21 (22 %)
DTZ -	12 (12 %)	48 (49 %)

Tabelle 4: Gesamtvergleich von DTZ und CTCs, n Gesamt = 97

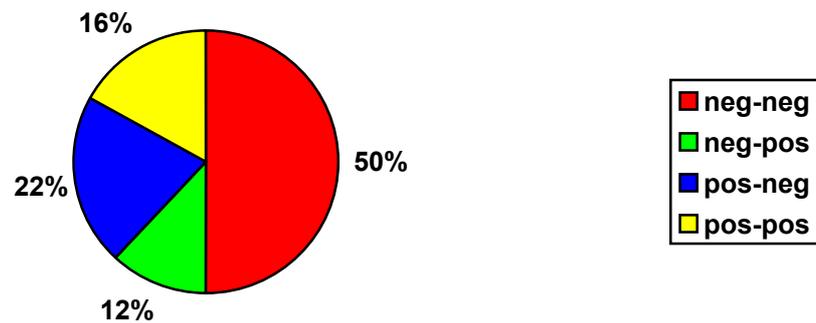


Abbildung 2: Zusammenhang zwischen DTZ im Knochenmark und CTCs im Blut

Zusätzlich haben wir die Patientinnen mit primären (n=73) und metastasierten (n=10) Mammakarzinom gemäß der Stadieneinteilung der UICC eingeteilt. Diese leitet sich von der TNM-Klassifikation ab und gruppiert die Patientinnen in 4 Stadien. Dadurch kann diese Einteilung einen besseren Überblick vermitteln, welcher in den Tabellen 5 und 6 dargestellt wird.

Wenn man den Nachweis von DTZ in Bezug auf diese Einteilung betrachtet, kann man mit zunehmendem Tumorstadium steigende Detektionsraten von DTZ im Knochenmark feststellen. Auch statistisch gesehen kann man einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von DTZ und dem Tumorstaging feststellen ($p = 0.0225$).

Staging	DTZ -	DTZ +	n Patientinnen
I	19 (68)	9 (32)	28
II	26 (72)	10 (28)	36
III	3 (60)	2 (40)	5
IV	2 (20)	8 (80)	10

Tabelle 5: Zusammenhang zwischen DTZ und Staging bei Patientinnen mit primärem und metastasierten Mammakarzinom

Ebenfalls in Bezug auf die zirkulierenden Tumorzellen können mit steigendem Tumorstadium mehr positive Befunde im Blut festgestellt werden. Die Anwesenheit von zirkulierenden Tumorzellen scheint dementsprechend mit einem

3. Ergebnisse

fortgeschritteneren Tumorstadium zu korrelieren, was durch einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen CTCs und Tumorstaging bestätigt wird (p-Wert < 0,0001).

Staging	CTC -	CTC+	n Patientinnen
I	25 (89)	3 (11)	28
II	28 (78)	8 (22)	36
III	3 (60)	2 (40)	5
IV	1 (10)	9 (90)	10

Tabelle 6: Zusammenhang zwischen CTCs und Staging bei Patientinnen mit primären und metastasierten Mammakarzinom

Gemäß der eben genannten Ergebnisse scheint ein grundsätzlicher Zusammenhang zwischen den Tumorzellen im Knochenmark und Blut zu bestehen. In den nächsten Abschnitten wollen wir jedoch untersuchen, inwiefern diese Zusammenhänge von den verschiedenen Tumorstadien abhängen. Es hat sich nämlich in vielen Studien gezeigt, dass die Anwesenheit von disseminierten oder zirkulierenden Tumorzellen vom Stadium des diagnostizierten Mammakarzinoms abhängt. Demzufolge ist es von Bedeutung, die Ergebnisse auch in Bezug auf die jeweiligen Stadien zu betrachten. Bildet man dementsprechend verschiedene Untergruppen, gibt es 73 Patientinnen mit primären Mammakarzinom, welche sich in adjuvanter bzw. neoadjuvanter Therapie befanden, 14 Patientinnen im Rezidiv-freien Follow-up bzw. mit der Diagnose eines Lokalrezidivs (n=3) und 10 Patientinnen im metastasierten Stadium. Da wir nach der Bildung der Untergruppen „Primärdiagnose“, „Follow-up“ und „metastasiertes Mammakarzinom“ zum Teil über relativ kleine Stichproben verfügen, haben wir zur Auswertung der Daten den Fisher-exact-Test ausgewählt. Letzterer liefert bei Häufigkeits-Vergleichen mit kleinen Beobachtungszahlen zuverlässigere Ergebnisse als der Chi-Quadrat Test. Bei allen Ergebnissen wurde immer der zweiseitige p-Wert berechnet. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt.

3.2. Ergebnisse bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

Diese Gruppe stellt das größte Kollektiv dar. Wir konnten das Blut und Knochenmark von 73 Patientinnen mit primären Mammakarzinom untersuchen. Davon befanden sich 8 Patientinnen in einer neoadjuvanten und 65 in einer adjuvanten Therapiesituation. Insgesamt zeigten 21 dieser Patientinnen (28%) einen positiven KM-Befund mit 1 bis 11 DTZ-KM pro 2 Millionen untersuchter Zellen, und 14 von ihnen (19%) einen positiven Blutbefund mit 1 bis 123 CTCs pro 7,5 ml Blut.

Übereinstimmend negative Befunde von Blut und KM fanden sich bei 42 Patientinnen (58%), und gleichartig positive Ergebnisse bei 4 Patientinnen (5,5%). Dies ergibt lediglich eine Konkordanz von 63 %. Im Vergleich zu Patientinnen ohne DTZ im Knochenmark hatten die Patientinnen mit einem positiven Knochenmarks-Befund auch keinen höheren prozentualen Anteil an CTCs im Blut (14% DTZ-/CTC+ und nur 5% DTZ+/CTC+). Dies wird vom Chi-Quadrat-Test bestätigt, welcher keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von DTZ und CTCs darlegt ($p = 0,986$). Demgegenüber zeigten sich bei 17 Patientinnen (23 %) mit positivem Knochenmarksbefund keine CTCs im Blut. Weiterhin konnten bei 10 Patientinnen (14 %) CTCs im peripheren Blut nachgewiesen werden, obwohl keine DTZ im Knochenmark isoliert werden konnten.

Die Ergebnisse bei den Patientinnen mit primärem Mammakarzinom werden in Tabelle 4 und Abbildung 3 veranschaulicht.

	CTC +	CTC -
DTZ +	4 (5 %)	17 (23 %)
DTZ -	10 (14 %)	42 (58 %)

Tabelle 7: Vergleich von Knochenmarks- und Blutbefunden bei Primärdiagnose (n=73)

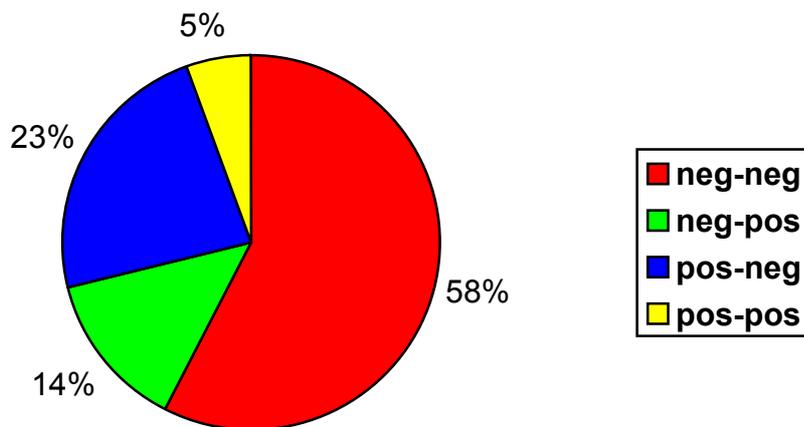


Abbildung 3: Zusammenhang DTZ-KM und CTCs (CellSearch) bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

Wenn man die Abbildungen 4 und 5 betrachtet, kann man erkennen dass sich im Vergleich zu den Patientinnen mit CTCs im Blut die Mehrheit der Patientinnen mit positiven Knochenmarksbefunden in früheren Stadien befinden. Auffallend ist außerdem der Gipfel positiver Knochenmarks- und Blutbefunde bei den Patientinnen mit Brustkrebs im pT2pN1-Stadium. Angesichts der geringen Fallzahl kann man den Wert dieser Feststellung jedoch nicht beurteilen.

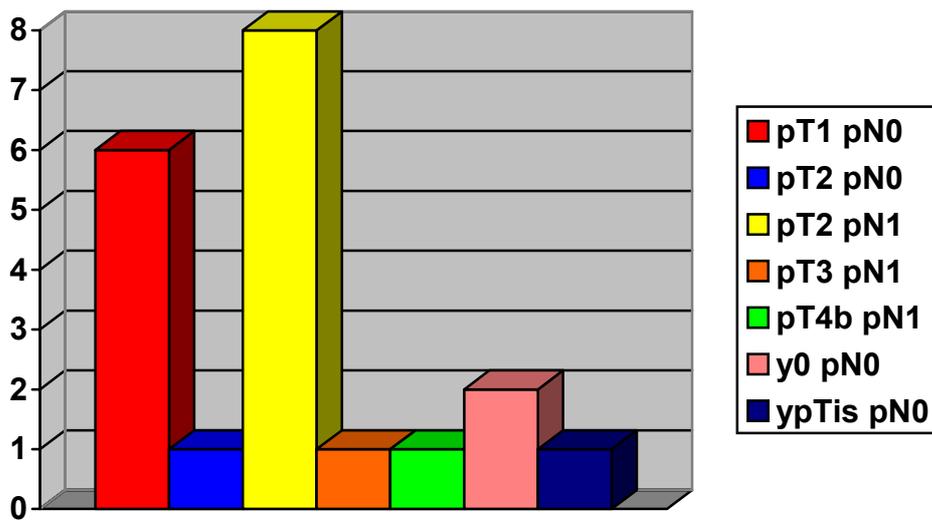


Abbildung 4: Differenzierung des Mammakarzinoms bei Primärdiagnose anhand der TNM-Klassifikation bei Patientinnen mit positiven Knochenmarksbefunden, n=20

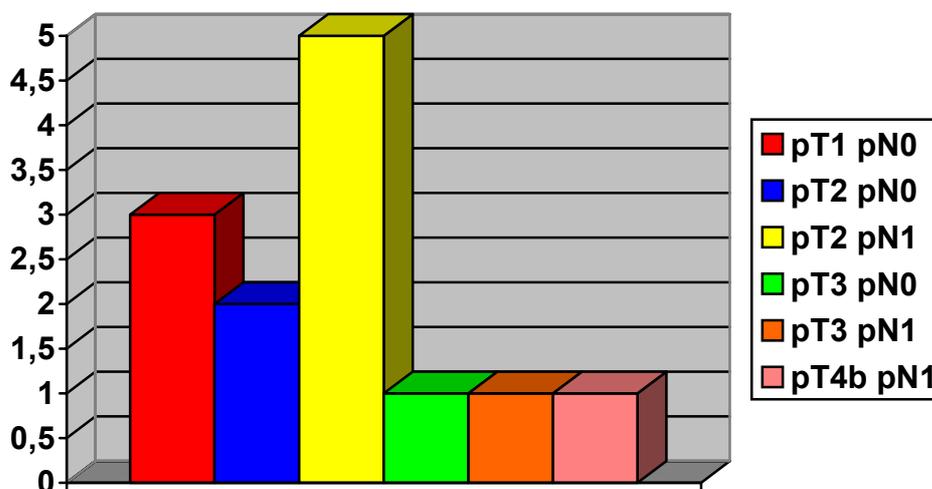


Abbildung 5: Differenzierung des Mammakarzinoms bei Primärdiagnose anhand der TNM-Klassifikation bei Patientinnen mit CTCs im peripheren Blut, n=13

In den folgenden Absätzen werden diese Ergebnisse nun in Bezug auf die in Abschnitt 2.2 erwähnten konventionellen Staging-Kriterien in Kreuztabellen dargestellt und ein etwaiger Zusammenhang zwischen DTZ oder CTCs und den Kriterien der TNM-Klassifikation untersucht.

T-Stadium

Bei der Untersuchung des Knochenmarks findet man in Bezug auf das T-Stadium annähernd gleiche Verteilungen der positiven (ca. 30 %) und negativen (ca. 70 %) Befunde unabhängig von der Höhe des T-Stadiums. Die Abwesenheit eines Zusammenhangs von klinischer Signifikanz wird vom zweiseitigen Fisher-exact-Test bestätigt ($p = 0,795$). Diese Ergebnisse werden in Tabelle 8 dargestellt.

pT	DTZ -	DTZ +	n Patientinnen
< 2	21 (70 %)	9 (30 %)	30
≥ 2	30 (73%)	11 (27 %)	41

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen DTZ und T-Stadium

Wenn man die Ergebnisse der Blutuntersuchung in Bezug auf das T-Stadium betrachtet, haben doppelt so viele Patientinnen in fortgeschrittenen Stadien ($pT > 2$) CTCs im Blut wie in weniger fortgeschrittenen Stadien. Nach dem Fisher-exact-Test ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (zweiseitiger p-Wert = 0,213).

pT	CTC -	CTC +	n Patientinnen
< 2	27 (90 %)	3 (10 %)	30
≥ 2	31 (76 %)	10 (24 %)	41

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen CTCs und T-Stadium

Nodalstatus

3. Ergebnisse

Vergleicht man den Knochenmarkstatus mit dem Nodalstatus, zeigen sich bei den Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus häufiger positive Knochenmarksbefunde als bei Patientinnen mit negativem Nodalstatus. Dieser Zusammenhang ist jedoch gemäß dem Fisher-exact-Test nicht signifikant (zweiseitiger p-Wert = 0,283).

PN	DTZ -	DTZ +	n Patientinnen
-	32 (76 %)	10 (24 %)	42
+	17 (63 %)	10 (37 %)	27

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen DTZ und Nodalstatus

Ähnlich wie bei der Untersuchung der Knochenmarksbefunde in Bezug auf den Nodalstatus findet man bei Patientinnen mit einem positivem Lymphknotenstatus häufiger CTCs im Blut als bei Patientinnen mit negativem Nodalstatus. Aber auch in diesem Fall besteht entsprechend dem Fisher-exact-Test kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen (zweiseitiger p-Wert = 0,344).

PN	CTC -	CTC +	n Patientinnen
-	36 (86 %)	6 (14 %)	42
+	20 (74 %)	7 (26 %)	27

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen CTCs und Nodalstatus

Tumorgrading

Während DTZ im Knochenmark bei ca. einem Drittel der Patientinnen im G1 oder G2 Stadium nachgewiesen werden konnten, zeigte nur knapp ein Viertel der Patientinnen im G3 Stadium einen positiven Knochenmarksbefund. Ein positiver Knochenmarks-Befund scheint dementsprechend nicht unbedingt mit einem höheren Tumorgrading assoziiert zu sein. Dies wird durch den Fisher-exact-Test bestätigt (zweiseitiger p-Wert = 0,431). Keine der beiden Patientinnen im G1 Stadium zeigten

3. Ergebnisse

DTZ im Knochenmark, was jedoch angesichts der geringen Fallzahl keine Aussagekraft hat.

G	DTZ -	DTZ +	n Patientinnen
1 / 2	27 (67,5 %)	13 (32,5 %)	40
3	24 (77 %)	7 (23 %)	31

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen DTZ und Tumorgrading

Aus der Tabelle 13 wird ersichtlich, dass nur 12,5 % der Patientinnen im G1 oder G2 Stadium CTCs im Blut haben, während bei doppelt so vielen Patientinnen im G3 Stadium CTCs nachgewiesen werden konnten (26 %). Ein positiver Blutbefund scheint also mit einem höherem Tumorgrading einherzugehen. Die Tatsache, dass bei den beiden Patientinnen im G1 Stadium keine CTCs isoliert werden konnten, würde auch für diese Hypothese sprechen. Leider besteht laut dem zweiseitigen Fisher-exact-Test mit einem P-Wert von $p=0,217$ kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

G	CTC -	CTC +	n Patientinnen
1 / 2	35 (87,5 %)	5 (12,5 %)	40
3	23 (74 %)	8 (26 %)	31

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen CTCs und Tumorgrading

Hormonrezeptorstatus

In Bezug auf den Hormon-Rezeptor-Status konnten nur bei einem geringfügig höheren Prozentteil der Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus DTZ im Knochenmark isoliert werden (33%) als bei den Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus (27%). Auch der Fisher-exact-Test spricht gegen einen signifikanten Zusammenhang (zweiseitiger p-Wert = 0,748).

3. Ergebnisse

ER/PR	DTZ -	DTZ +	N Patientinnen
+	41 (73 %)	15 (27 %)	56
-	10 (67 %)	5 (33 %)	15

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen DTZ und Hormonrezeptor-Status

Im Gegensatz dazu konnten bei einem verhältnismäßig höheren Anteil an Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus CTCs im Blut nachgewiesen werden (27%) als bei Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus (16%). Der zweiseitige Fisher-exact-Test zeigt jedoch keinen Zusammenhang zwischen diesen Parametern an ($p = 0,452$).

ER/PR	CTC -	CTC +	n Patientinnen
+	47 (84 %)	9 (16 %)	56
-	11 (73 %)	4 (27 %)	15

Tabelle 15: Zusammenhang zwischen CTCs und Hormonrezeptor-Status

Zusammenfassend zeigte sich demgemäss weder zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark noch dem Nachweis von Tumorzellen im Blut eine statistisch signifikante Korrelation mit den histologischen Parametern des Primärtumors, auch wenn z.T. die prozentualen Verteilungen auf einen Zusammenhang gedeutet haben. Angesichts der relativ geringen Fallzahl ($n=73$) sollte man jedoch der Aussagekraft dieser Ergebnisse kritisch gegenüber stehen und beobachten, wie sich diese Zusammenhänge in größeren Studien verhalten haben.

3.3. Ergebnisse bei Patientinnen im Follow-up

3. Ergebnisse

Von den 14 Patientinnen in der Nachsorge ohne Hinweis auf manifeste Metastasierung zeigten 5 (36%) einen positiven Befund im Knochenmark (mit 1 bis 1000 DTZ pro untersuchten 2 Millionen Zellen) und im Blut (mit 1 bis 411 CTCs pro 7,5 ml Blut). Dafür konnten bei 6 Patientinnen (43%) weder im Knochenmark noch im Blut Tumorzellen nachgewiesen werden. Daraus folgt eine Konkordanz von 79 %. Der FET deutet mit einem p-Wert von 0,028 darauf hin, dass bei Patientinnen im Follow-up ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im KM und im Blut besteht.

Nur bei 3 Patientinnen fanden sich keine übereinstimmenden Ergebnisse mit einer Abwesenheit von CTCs bei einem positivem Knochenmarksbefund. Bemerkenswert hierbei ist weiterhin, dass beim Follow-up bei keiner Patientin mit negativem Knochenmarksbefund zirkulierende Tumorzellen im Blut gefunden werden konnten.

Tabelle 5 veranschaulicht diese Ergebnisse.

	CTC +	CTC -
DTZ +	5 (36 %)	3 (21 %)
DTZ -	0 (0 %)	6 (43 %)

Tabelle 16: Vergleich der Knochenmarks- und Blutbefunde bei Patientinnen in der Nachsorge

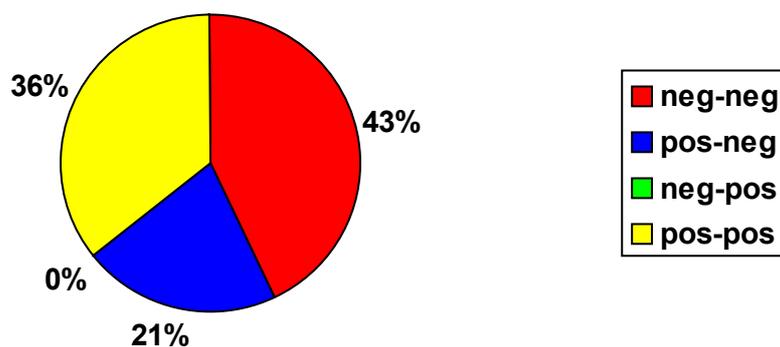


Abbildung 6: Zusammenhang DTZ und CTCs bei Patientinnen im Follow-up

3.4. Ergebnisse beim metastasierten Mammakarzinom

3. Ergebnisse

Von den 10 Patientinnen im metastasierten Stadium hatten 8 DTZ im Knochenmark (von 1 bis über 1000 DTZ pro 2 Millionen untersuchten Zellen, Median 1 Zelle / 2 Millionen analysierte Zellen mononukleärer Zellen) und 9 CTCs im Blut (1-77 CTC mit im Median 2,5 Zellen pro 7,5 ml untersuchtem Blut). Bei 70 % der Patientinnen kam es zu übereinstimmenden Ergebnissen zwischen Knochenmark und Blut.

Interessanterweise wiesen alle Patientinnen mindestens in einem Kompartiment Tumorzellen auf. Weiterhin konnte bei allen Patientinnen mit viszerale Metastasen zirkulierende Tumorzellen im Blut nachgewiesen werden.

Zwei Patientinnen zeigten einen positiven Blutbefund bei einem negativen Knochenmarksbefund. Eine dieser Patientinnen hatte nur pulmonale Metastasen und die zweite rein ossäre Metastasen. Bei der zweiten Patientin konnten überraschenderweise trotz rein ossärer Metastasierung keine DTZ im Knochenmark nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu konnten bei einer weiteren Patientin mit einer massiven ossären Metastasierung (>1000 DTZ / 2 Mio MNZ) keine CTCs im Blut isoliert werden. Diese Ergebnisse werden in Abschnitt 4.2.3. diskutiert.

KM	Blut	Met-Lok	N	%
Neg	neg	/	0	0
Neg	pos	1 x oss., 1 x pulm	2	20
Pos	neg	oss.,	1	10
Pos	pos	Gemischt (ossär, viszeral)	7	70

Tabelle 17: Vergleich der Knochenmarks- und Blutbefunde bei Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom

4. Diskussion

4. 1. Methodischer Aspekt

4.1.1 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark

4.1.1.1 Die Immunzytochemie - ein lang etabliertes und standardisiertes Verfahren

Die Immunzytochemie wird seit Jahrzehnten zur Verarbeitung des Knochenmarks angewendet. Unter den soliden Tumoren ist diese Methode am besten beim Mammakarzinom untersucht worden. Sowohl die Anreicherungs-methode an sich als auch die Nutzung des Antikörpers A45-B/B3 haben sich beim Nachweis von DTZ im Knochenmark bewährt. Zahlreiche Zentren arbeiten mit der Immunzytochemie. Sie ist augenblicklich das einzige Verfahren, bei welchem eine ausreichende methodische Validierung vorliegt.

Dies hat mitunter dazu geführt, dass die Immunzytochemie mit genauer Beschreibung des Vorgehens als standardisiertes Verfahren zur Isolierung von DTZ im Knochenmark definiert worden ist. Ein internationales Expertenteam aus Deutschland, der Schweiz und Österreich evaluierte während der Konsensuskonferenz zur Tumorzell-dissemination beim Mammakarzinom im September 2006 die bestehenden Methoden zum Tumorzellnachweis im Knochenmark und legte einen Konsensus für den standardisierten Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom fest. Die sieben Konsensusstatements beinhalten Richtlinien zur Methodik und zur Auswertung der Knochenmarksaspirate sowie Aspekte der klinischen Implementierung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit primären Mammakarzinom [23]. Die Festlegung eines standardisierten Verfahrens ist von großer Bedeutung, denn nur auf diese Weise können Ergebnisse mehrerer Zentren und das Erstellen großer Multicenter Studien mit dementsprechend stark aussagekräftigen Ergebnissen gemacht werden. Dies ist auch die Grundvoraussetzung, um den Tumorzellnachweis im Knochenmark als Stratifizierungsparameter in klinische Studien aufnehmen zu können.

Die Wahl des Antikörpers zur Detektion der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurde in den Konsensempfehlungen nicht festgelegt. Wir setzten den monoklonalen Antikörper A45-B/B3 ein. Dieser Antikörper, welcher gegen ein Epitop gerichtet ist, das auf mehreren Zytokeratin-Proteinen vorhanden ist, ermöglicht eine bessere Detektion als Antikörper, die nur gegen ein einzelnes Zytokeratin-Protein gerichtet sind [18, 34, 35]. Dadurch wird die bekannte Heterogenität der Tumorzellen berücksichtigt. Studien haben ergeben, dass die Wahrscheinlichkeit der Detektion mittels Immunzytochemie bei einer DTZ von 2 Millionen untersuchten Zellen bei 95% liegt. Diese Detektionsrate ist ausreichend, um eine gute Einschätzung des Knochenmarks-Status zu ermöglichen. Für eine nachfolgende Charakterisierung der Tumorzellen ist die Konzentration der isolierten Tumorzellen allerdings zu gering [36]. In diesem Zusammenhang wäre eine höhere Ausbeute in der Tat wünschenswert. Andererseits muss man sich überlegen, ob bei der Fragestellung bezüglich des prognostischen Wertes der Aufwand einer zusätzlichen immunomagnetischen Anreicherung beispielsweise - der die Detektion der DTZ eventuell weiter optimieren könnte - notwendig ist. Es hat sich gezeigt, dass eine immunomagnetische Anreicherung zwar die Detektionsfrequenz DTZ erhöht, dadurch aber ihren prognostischen Wert nicht unbedingt verbessert. Eine möglichst große Ausbeute an Tumorzellen ist natürlich erstrebenswert. Andererseits sollte man sich überlegen wann die Möglichkeiten der Immunzytochemie ausgeschöpft sind und ob es für weitere Zielsetzungen nicht ergiebiger Methoden gibt.

Augenblicklich ist die Immunzytochemie jedoch die geeignetste Methode um das Knochenmark zu befunden. Sie verfügt in der Tat sowohl über eine gute Sensitivität als auch Spezifität und ermöglicht zusätzlich als seit langem etabliertes und standardisiertes Verfahren einen guten Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien. Dies ist unentbehrlich um weiterhin den prognostischen Wert von DTZ im Knochenmark korrekt zu untersuchen.

Bis zum heutigen Standpunkt hat der Nachweis von DTZ in zahlreichen Studien eine hohe Aussagekraft bewiesen, die allerdings vom Tumorstadium abzuhängen scheint. Dieser Hypothese wollen auch wir in unserem Versuch nachgehen. In diesem Zusammenhang wollen wir nun die Ergebnisse der Knochenmarksuntersuchungen in Bezug auf die verschiedenen Tumor-Stadien sowie im Falle des primären Mammakarzinoms auch in Bezug auf die konventionellen Stagingparameter erörtern und mit anderen Studienergebnissen vergleichen.

4.1.1.2 Detektion von DTZ beim primären Mammakarzinom

Bereits 1983 publizierten Redding et al die erste Arbeit über die prognostische Relevanz von DTZ im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen [37]. Bis zum heutigen Standpunkt haben zahlreiche Studien bestätigt, dass ihr Nachweis gut mit der Entwicklung des Tumors korreliert. Dort wo etablierte Stagingmethoden wie die radiologische Diagnostik an die Grenzen ihrer Nachweisbarkeit stoßen, könnte die Anwesenheit disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bereits anzeigen, ob eine Frühmetastasierung stattgefunden hat.

Eine der wichtigsten Studien zur Aussagekraft von DTZ beim primären Mammakarzinom ist die „pooled Analysis“ von Braun [38]. In dieser Studie wurden die Überlebensdaten von 4.703 Mammakarzinompatientinnen im Stadium I, II oder III aus neun verschiedenen Zentren hinsichtlich des Knochenmarkstatus ausgewertet. Dabei wurde die Immunzytochemie mit dem gleichen Antikörper A45-B/B3 wie in unserer Studie angewendet. Die Positivitätsrate der Knochenmarksanalyse betrug insgesamt 31% mit im Median 3 Zytokeratin-positiven Zellen (von 1 bis 1223) von 2×10^6 analysierten Knochenmarkszellen. In dieser bedeutenden Studie hat sich herausgestellt, dass der positive Knochenmarkstatus ein unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben sowie für das Mammakarzinom-spezifische Überleben ist.

Weiterhin untersuchten Bidard et al [39] das Knochenmark von 621 Brustkrebs-Patientinnen im Stadium I bis III. Das Verfahren zur Knochenmarksauswertung stimmte ebenfalls mit dem unserem überein. Im Vergleich zu dieser Studie haben in unserem Versuch doppelt so viele Patientinnen einen positiven Knochenmarksbefund. Hierbei muss man aber anführen, dass in der Studie von Bidard et al zwischen Zellen differenziert wird, welche vollständig den Kriterien von DTZ entsprechen und Zellen, die nur teilweise der Definition von DTZ entsprechen, aber Zytokeratin-positiv sind („non-DTC/CK+“). Dieser Einteilung entsprechend sind bei 33,5% der Patientinnen non-DTC/CK+ Zellen nachgewiesen worden. Trotz geringerer Detektionsraten von „richtigen“ DTZ hat sich ihr prognostischer Wert auch in der Studie von Bidard et al bestätigt.

Dass unsere Studie trotz aktueller Definition von DTZ verhältnismäßig hohe Nachweisfrequenzen aufweist, kann einerseits an der geringeren Fallzahl (n=73)

liegen, oder an einer unterschiedlichen Zusammenstellung des Patientinnenkollektivs. Zum Beispiel könnten in unserem Patientinnenkollektiv mehr Fälle mit fortgeschrittenerem primären Mammakarzinom sein als in den anderen Studien und daher zu vermehrt positiven Knochenmarksbefunden führen. Die prozentuale Verteilung unserer Patientinnen mit primären Mammakarzinom in Bezug auf verschiedene Kriterien wird in der Tabelle 1 dargestellt.

In Bezug auf den Zusammenhang mit den konventionellen Stagingparametern hat sich in der „pooled analysis“ gezeigt dass Patientinnen mit einem positiven Knochenmarksbefund häufig größere Tumore mit einem höherem Grading hatten. Auch waren sie häufiger Hormonrezeptor-negativ. Diese Zusammenhänge konnten in unserer Studie nur zum Teil bestätigt werden. Wenn man die prozentuale Verteilungen betrachtet kann man zwar erkennen dass geringfügig mehr Patientinnen mit einem positiven Knochenmarksbefund auch größere, Hormonrezeptor-negative Tumoren oder einen positiven Nodalstatus haben. Statistisch gesehen zeigte der Nachweis von DTZ im Knochenmark jedoch weder mit der Tumorgroße noch mit dem Grading oder dem Hormonrezeptor-Status eine signifikante Korrelation. Dieser fehlende Zusammenhang wird von Bidard et al und weiteren Studien bestätigt [40-43].

4.1.1.3 Ergebnisse der Knochenmarks-Analysen beim Follow-up

Da in Bezug auf das Follow-up in unserem Versuch hauptsächlich der Zusammenhang zwischen DTZ und CTCs untersucht worden ist, werden wir uns in diesem Abschnitt auf einen kurzen Vergleich der Detektionsraten mit denen anderer Studien beschränken. Die Aussagekraft von DTZ im Knochenmark bei der Nachsorge wird dann im Abschnitt 4.2.2. genauer erörtert.

Im Vergleich zum primären Mammakarzinom ist die Detektionsrate von DTZ während des Follow-up mit 57 % in etwa genau so hoch wie beim primären Mammakarzinom. Die mediane Zellzahl der positiven Befunde ist mit 3,5 Zellen etwas höher. Diese Detektionsfrequenz ist jedoch wesentlich höher als in dem Versuch von Naume et al, bei welchem das Knochenmark von 817 Patientinnen in der Nachsorge untersucht worden ist [44]. Die Methodik unterschied sich von der unseren nur in Bezug auf die eingesetzten Antikörper. Naume et al setzten die Antikörper AE1 und AE3 ein, während wir den Antikörper A45-B/B3 verwendet haben. In diesem Versuch konnten

nur bei 23% der Patientinnen DTZ im Knochenmark nachgewiesen werden. Dies kann an der Wahl des Antikörpers liegen. Auch in späteren Studien bei welchen dieser Antikörper angewendet worden ist kam es zu deutlich niedrigeren Detektionsraten als mit dem Antikörper A45-B/B3 [45]. Andererseits können unsere Ergebnisse aufgrund der sehr geringen Fallzahl (n=14) zu hoch sein. Dies scheint angesichts der Ergebnisse von der Studie von Janni et al wahrscheinlicher [46]. In diesem Versuch wurde das Knochenmark von 228 Patientinnen im Rezidiv-freien Follow-up analysiert. Als Antikörper wurde der monoklonale Antikörper A45-B/B3 verwendet. Insgesamt konnten bei 12,7% der Patientinnen DTZ isoliert werden. Man muss aber bedenken dass auch der Begriff „Follow-up“ sehr viele verschiedene Stadien umfasst. Folglich kann es sein, dass in unserem Kollektiv mehr Fälle mit fortgeschritteneren Tumoren waren als in den Studien von Bidard und Janni et al, und wir aus diesem Grunde eine höhere Detektionsrate von DTZ hatten.

In allen Studien, welche den Nachweis von DTZ während der Nachsorge untersucht haben, war ein negativer Knochenmarksbefund mit einer signifikant längeren Rezidiv-freien- sowie Gesamt-Überlebens-Zeit assoziiert, während die Persistenz von Tumorzellen im Knochenmark auf ein erhöhtes Rezidiv-Risiko hingewiesen hat. Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse muss in zukünftigen prospektiven Studien noch geklärt werden ob Patientinnen mit persistierenden Tumorzellen im Knochenmark von einer sekundären adjuvanten Therapie profitieren würden.

4.1.1.4 Nachweis von DTZ beim metastasierten Mammakarzinom

In unserem Versuch konnten bei 8 von 10 Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom DTZ im Knochenmark nachgewiesen werden. Sechs dieser 8 Patientinnen mit DTZ im Knochenmark zeigten erwartungsgemäß auch eine ossäre Metastasierung. Die meisten Studien bestätigen den Zusammenhang von DTZ und einer ossären Metastasierung [38, 39, 43, 47, 48]. Zum Teil wird auch ein Zusammenhang mit einer hepatogenen Metastasierung erwähnt [39, 47]. Dieser konnte aber in unserem Versuch angesichts der geringen Fallzahl nicht untersucht werden.

Auffällig sind die zwei Fälle bei welchen trotz eines positiven Knochenmarks-Befund keine ossäre Metastasierung nachgewiesen werden konnte. Vielleicht war in diesem

Kontext zwar eine ossäre Metastasierung bereits vorhanden, konnte aber mit den gängigen diagnostischen Methoden nicht erfasst werden.

	DTZ +	DTZ -
Stage I – III	21 (29 %)	52 (71 %)
Stage IV	8 (80 %)	0

Tabelle 18: Zusammenhang zwischen DTZ und primärem oder metastasierten Mammakarzinom

Im Vergleich zum primären Mammakarzinom zeigt der Fisher-exact-Test mit einem P-Wert von $p < 0,0001$ eine signifikant höhere Inzidenz von DTZ beim metastasierten Mammakarzinom. Diese Gegenüberstellung ist aber angesichts der geringen Zahl von Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom schwierig und sollte kritisch beurteilt werden. In verschiedenen Studien hat sich nämlich gezeigt dass der prognostische Wert der Präsenz von DTZ im Knochenmark seine Aussagekraft verliert, wenn der Brustkrebs sich im metastasierten Stadium befindet [49]. Dafür weisen neuere Studien darauf hin, dass in diesem Kontext der Nachweis von CTCs im peripheren Blut eine große Aussagekraft hat. Da eine Blutentnahme wesentlich einfacher durchführbar und standardisierbar ist und von den Patienten besser akzeptiert wird als eine Knochenmarksaspiration, wäre es natürlich erfreulich wenn sich diese Vermutung bewahrheiten würde. Dieser Hypothese soll in den folgenden Abschnitten nachgegangen werden.

4.1.2 Zirkulierende Tumorzellen im Blut

4.1.2.1 Das CellSearch-System - eine geeignete Methode für den Nachweis von CTCs im Blut

Obwohl der Versuch zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut nachzuweisen fast parallel zur Suche nach DTZ im Knochenmark begann, scheiterte dies meistens an den sehr aufwendigen Verfahren und einer mangelnder Anreicherung der seltenen

Zellen. In der Tat tritt im peripheren Blut eine Tumorzelle im Verhältnis zu circa 10^{5-7} mononukleären Zellen auf [50].

Erst die Technik der Immunomagnetabsorption ermöglicht eine bessere Anreicherung. Jedoch war das Verfahren der manuellen Immunomagnetabsorption zeitaufwändig und stör anfällig. Das CellSearch System der Fa. Veridex stellt das erste in sich geschlossene System der automatisierten Anreicherung, Immunfluoreszenz-Färbung und Auswertung dar. Zusätzlich zur zeitsparenden Determinante zeigt sich im Vergleich zur manuellen Wiederfindung mit OncoQuick eine signifikant bessere Detektionsrate von CTCs im Blut [51]. In zahlreichen Studien bezüglich „Intra“- und „Inter-Assay“- Variabilität sowie Spiking-Versuchen hat sich dieses Verfahren als Methode zur Anreicherung und Detektion von CTCs im peripheren Blut bewährt [31]. Zudem sind sowohl die Blutentnahme per se als auch die Untersuchung des Blutes mit dem CellSearch System bei sehr großen Kollektiven durchführbar und oft reproduzierbar.

Allerdings ist das Verfahren relativ neu und noch nicht so erprobt wie die Auswertung des Knochenmarks mit der Immunzytochemie. Außerdem hat man bezüglich der Blutanalyse noch keinen internationalen Konsens gefunden. Letzteres ist aber unabdingbar, um Studien vergleichen zu können und die klinische Bedeutung von CTCs im Blut zu untersuchen. Die Forschung in diesem Bereich ist intensiv. Denn die Blutentnahme bietet im Gegensatz zur Knochenmarks-Aspiration viele Vorteile. Außerdem ist der Nachweis von CTCs mit dem CellSearch-System vergleichsweise einfach geworden. Augenblicklich laufen mehrere Studien, welche das Potential von zirkulierenden Tumorzellen im Blut mit dem CellSearch-System untersuchen.

4.1.2.2 Detektion von CTCs beim primärem Mammakarzinom

Im Gegensatz zu den DTZ stellen die CTCs im Blut einen Parameter dar, dessen Potential aufgrund einer bis vor kurzem mangelhaften und schwer durchführbaren Methodik noch nicht so eingehend untersucht werden konnte. Dennoch hat sich in verschiedenen Studien gezeigt, dass der Nachweis von CTCs beim metastasierten Mammakarzinom einen hohen prädikativen Wert hat [16, 49]. In Bezug auf das primäre Mammakarzinom ist der Stellenwert der zirkulierenden Tumorzellen jedoch noch unklar.

Die SUCCESS-Studie ist eine große multicenter Studie, welche die unzureichende Datenlage im Kontext des primären Mammakarzinoms zu beseitigen versucht. Bis jetzt wurde die Aussagekraft von CTCs bei 1500 Patientinnen durch wiederholte Blutentnahmen untersucht [52, 53]. Hierbei wurden je Patientin 23ml Blut mit dem CellSearch-System ausgewertet. Bei 10% der Patientinnen (n=143) konnte mehr als eine CTC isoliert werden (von 2 bis 827 Zellen). Weiterhin hat der Nachweis von CTCs nur mit dem Lymphknotenstatus korreliert. Mit dem T-Stadium, dem Grading, dem Hormonrezeptorstatus oder dem HER2/neu-Status des Primärtumors konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Wenn man die Fälle ausschließt bei welchen nur eine Tumorzelle im Blut isoliert werden konnte, sinkt auch unsere Detektionsrate von 19 % auf 7%. Auch wir konnten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit den konventionellen Klassifikationskriterien finden. Nur prozentual gesehen waren die CTC-positiven Befunde bei fortgeschritteneren T-Stadien oder positiven Lymphknotenstatus häufiger.

Der fragliche Zusammenhang zwischen dem Nodalstatus und der Anwesenheit von disseminierten oder auch zirkulierenden Tumorzellen lässt vermuten dass der Tumor sich über verschiedene (lymphogene, hämatogene) und vermutlich voneinander unabhängigen Wege ausbreitet [7, 54]. Eine Erforschung dieser verschiedenen Metastasierungswege könnte weitere Informationen bezüglich des Rezidivrisikos und einer adäquaten Therapiestaltung liefern. Auch in diesem Hinblick ist eine weitere Untersuchung von disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen erstrebenswert. Dieser Punkt wird in Abschnitt 4.4 noch detaillierter diskutiert.

In einer weiteren Studie mit 245 Patientinnen im neoadjuvanten Setting konnten Müller et al bei 22% der Patientinnen mindestens eine zirkulierende Tumorzelle isolieren [55]. Dabei wurden jeweils 7,5ml Blut mit dem CellSearch-Gerät ausgewertet. Nach der neoadjuvanten Chemotherapie konnten noch bei 10,4% der Patientinnen zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden.

Um die definitive klinische Bedeutung von CTCs beim primären Mammakarzinom zu klären wäre aber vermutlich eine Methode mit einer höheren Sensitivität erforderlich.

4.1.2.3. Ergebnisse der Blutanalyse beim Patientinnen im Follow-up

Auch in Bezug auf die Brustkrebs-Nachsorge hält sich die Zahl der Studien welche den Stellenwert von CTCs untersuchen in Grenzen.

In diesem Kontext stammen die wichtigsten Resultate ebenfalls von der laufenden SUCCESS-Studie. Beim letzten Stand von 2008 wiesen 10% der Patientinnen im Follow-up mehr als eine zirkulierende Tumorzelle im Blut vor (Median 14 Zellen, von 2 bis 827 Zellen) [52]. In unserem Versuch hatten alle Patientinnen in der Nachsorge mehr als eine CTC im Blut.

Auch Müller et al haben in der im vorherigen Abschnitt erwähnten Studie Daten zum Follow-up erhoben. Im Vergleich zum primären Mammakarzinom konnten hier jedoch nur bei 7 von 67 Patientinnen (10,4%) CTCs nachgewiesen werden.

Slade et al haben in ihrem kürzlich erschienenen Versuch das Blut von 51 Patientinnen im Follow-up mit dem CellSearch-System verarbeitet. Bei 59% dieser Patientinnen konnten CTCs nachgewiesen werden. Da es bei dieser Studie auch um einen Vergleich von Knochenmarks- und Blutbefunden geht, erfolgt ihre genaue Beschreibung in Abschnitt 4.2.3.

4.1.2.4. Nachweis von CTCs bei metastasierten Mammakarzinom

In unserem Versuch konnten bei 90% der Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom CTCs im Blut nachgewiesen werden. Das entspricht einer wesentlich höheren Detektionsrate als in der Studie von Müller et al [41], in welcher es nur bei 25 von 63 Patientinnen (40%) mit metastasierten Mammakarzinom zu einem positiven Blutbefund kam. Jedoch sind unsere Ergebnisse aufgrund der sehr geringen Fallzahl möglicherweise zu hoch (n=10). Die niedrige Detektionsrate in der Studie von Müller et al könnte aber auch an falsch-negativen Befunden liegen, da das Blut mit der weniger sensitiven OncoQuick-Detektionsmethode verarbeitet worden ist. In dieser Studie war der Nachweis von CTCs weder mit der Zahl noch der Lokalisation der Metastasen assoziiert. Der Vergleich mit der Detektionsrate von CTCs bei Patientinnen im Follow-up zeigte außerdem dass die Inzidenz von CTCs beim metastasierten Mammakarzinom statistisch signifikant erhöht ist. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von CTCs und der Tumorprogression weisen. Bei unserem Versuch konnte beim Vergleich der Patientinnen aus der Nachsorge und denen mit metastasierten Mammakarzinom ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Tumorprogression (FU und met) und dem Nachweis von CTCs festgestellt werden ($p = 0,013$). Wenn man aber

die Patientinnen mit primären und metastasierten Mammakarzinom vergleicht, bestätigt sich dieser Zusammenhang leider nicht ($p = 0,342$).

	CTC+	CTC -
Stage I – III	56 (81 %)	13 (19 %)
Stage IV	9 (90 %)	0

Tabelle 19: Zusammenhang zwischen CTCs und primärem oder metastasierten Mammakarzinom

Die ersten bedeutenden Erkenntnisse bezüglich der Relevanz von CTCs beim metastasierten Mammakarzinom wurden 2005 von Cristofanilli et al gemacht. Im Zeitraum von 2000 bis 2005 wurde in dieser Studie 7,5ml Blut von 151 Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom auf CTCs hin untersucht [56]. Dabei stellte sich heraus dass die Prognose von Patientinnen bei welchen mehr als 5 CTCs im Blut nachgewiesen werden konnten (44%) deutlich schlechter war als bei Patientinnen mit weniger als 5 CTCs im Blut. Dieser Grenzwert hat sich in mehreren Studien erprobt um Patientinnen mit einer günstigen Prognose von denen mit einer ungünstigen Prognose zu unterscheiden [32]. Derselbe Cutoff hat sich übrigens auch bei anderen Krebsarten wie zum Beispiel dem Prostata-Karzinom bewährt [57].

Budd et al haben das Blut von 138 Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom mit dem CellSearch System ausgewertet. Bei 43% der Patientinnen konnten mehr als 5 CTCs nachgewiesen werden. Bei einer zweiten Blutentnahme einen Monat später hatten nur mehr 25 % der Patientinnen diesen Cutoff überschritten.

In einer 2008 erschienenen Studie von Dawood et al wurde das Blut von 185 Patientinnen mit neu diagnostiziertem metastasierten Mammakarzinom mit dem CellSearch System auf CTCs untersucht [58]. Dabei konnten bei 71 Patientinnen (38,4%) mehr als 5 CTCs im Blut.

Wenn man nur Patientinnen mit mehr als 5 CTCs im Blut einbezieht, haben in unserem Versuch 4 von 10 Patientinnen (40%) den Cutoff überschritten, was in etwa den Ergebnissen der eben aufgezählten Studien entspricht.

In einer weiteren prospektiven Multicenter-Studie von Cristofanilli et al von 2006 konnten bei 61% von 177 Patientinnen mindestens 2 CTCs mit dem CellSearch System isoliert werden, und bei 49% der Patientinnen wurde ein positiver Blutbefund

mit mindestens 5 CTCs festgestellt [32]. Im Vergleich dazu zeigten in unserer Studie 60% der Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom mindestens 2 zirkulierende Tumorzellen.

Trotz ähnlicher Detektionsraten muss jedoch beachtet werden dass Vergleiche mit anderen Studien angesichts unserer sehr geringen Fallzahl von 10 Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom schwierig sind.

4.2. Vergleich der Knochenmarks- und Blutbefunde

Bis zum heutigen Tag gibt es nur wenige vergleichende Untersuchungen zwischen DTZ und CTCs. In den meisten Studien werden die zwei Parameter unabhängig voneinander untersucht. Häufig beziehen sich die Vergleiche außerdem nur auf ein Tumorstadium. Dementsprechend wollen auch wir nach einem kurzen allgemeinen Vergleich erneut auf die einzelnen Tumorstadien eingehen.

Bei unseren Untersuchungen ergab sich eine stadienübergreifende Konkordanz der positiven und negativen Befunde von 66%. Anhand der Tabelle 4 kann man feststellen dass die Nachweisfrequenz von CTCs geringer ist als die von DTZ. Betrachtet man weiterhin die Nachweisfrequenzen in Bezug auf die Tumorstadien, zeigen sich mit zunehmendem Tumorstadium in beiden Kompartimenten ansteigende Detektionsraten. Auch bezüglich der mittleren Zellzahl kann ein leichter Anstieg mit zunehmenden Tumorstadium festgestellt werden, wie die Tabellen 20 und 21 sowie die Abbildung 7 veranschaulichen. Im Stadium III konnte kein Medianwert ausgerechnet werden da nur in jeweils 2 Blut- und Knochenmarksproben Tumorzellen nachgewiesen werden konnten. Wenn man die Zellzahlen der beiden Kompartimente betrachtet zeigt sich in unserem Versuch kein großer Unterschied zwischen der Zahl der detektierten Tumorzellen im Knochenmark und im Blut. Dies entspricht nicht den Ergebnissen anderer Studien, bei welchen im Knochenmark meistens mehr Tumorzellen isoliert werden konnten als im Blut.

4. Diskussion

Staging (69 Patientinnen)	DTZ im Knochenmark (%)	CTCs im Blut (%)	n Patientinnen
I	9 (32)	3 (11)	28
II	10 (28)	8 (22)	36
III	2 (40)	2 (40)	5
IV	8 (80)	9 (90)	5

Tabelle 20: Korrelation der Stadien mit disseminierten oder zirkulierenden Tumorzellen

Staging	Anzahl DTZ	Anzahl CTCs
I	1 (Median)	1 (Median)
II	2 (Median)	2 (Median)
III	2; 123	1; 4
IV	7,5 (Median)	3 (Median)

Tabelle 21: Tumorzellzahl in Bezug auf das Tumorstadium

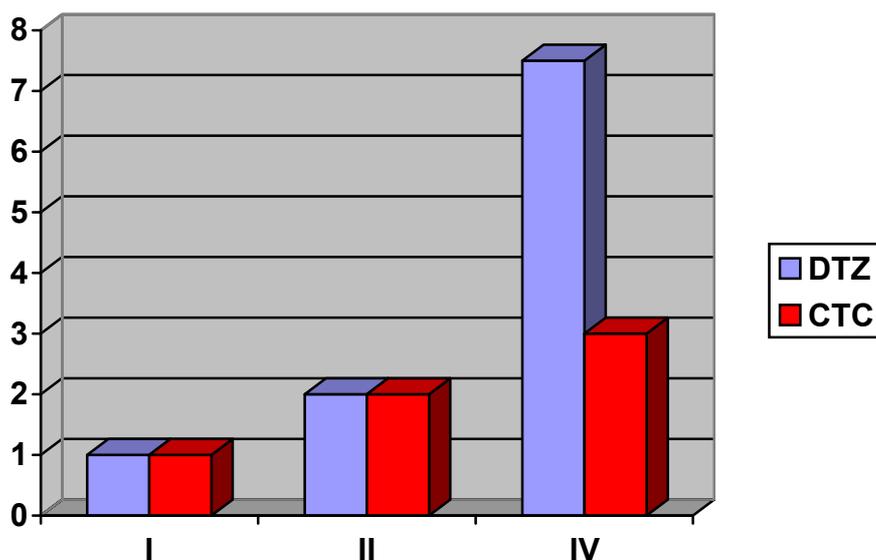


Abbildung 7: Medianwert der Tumorzellzahlen in Bezug auf die Tumorstadien

4.2.1. Vergleich und Schlussfolgerungen bei Patientinnen mit primären Mammakarzinom

Eine wichtige Studie in diesem Kontext stellt die Arbeit von Pierga et al dar [42]. Hierbei wurde 75 Patientinnen mit primären Mammakarzinom vor Beginn der neoadjuvanten oder adjuvanten Chemotherapie Blut und Knochenmark entnommen und der Nachweis von disseminierten oder zirkulierenden Tumorzellen mit den klassischen Tumorklassifikationen verglichen. Zusätzlich wurden die Blut- und Knochenmarks-Befunde von 39 Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom miteinander verglichen. Diese Ergebnisse werden im Abschnitt 4.2.3. besprochen. Beim primären Mammakarzinom konnten bei 49% der Patientinnen DTZ und bei 16% der Patientinnen CTCs isoliert werden. Die Aufarbeitung des Knochenmarks stimmte mit unserer Methode überein. Das Blut jedoch wurde mit demselben Verfahren wie das Knochenmark verarbeitet und danach mit einem computergesteuertem Mikroskop ausgewertet. Überraschenderweise war trotz gleicher Methode und Tumorstadium die Detektionsrate von DTZ im Knochenmark doppelt so hoch wie in unserem Versuch (29%). Im Gegensatz dazu kam es bei uns zu einer geringfügig höheren Detektionsfrequenz von CTCs im Blut. Dies liegt wahrscheinlich an der optimierten Detektionsmethode mit dem CellSearch-System. In Bezug auf die Stagingparameter konnten Pierga et al eine Korrelation der Knochenmarks-Befunde mit dem T-Stadium und dem Hormonzeptorstatus feststellen. Zu übereinstimmenden Ergebnissen kam es in 62% der Fälle, wobei auch die Ergebnisse der Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom in diese Zahl einfließen. Die Konkordanz bei Patientinnen mit primären Mammakarzinom dürfte folglich in der Studie von Pierga et al etwas niedriger sein als bei uns. Trotz dieser relativ hohen Zahl an übereinstimmenden Ergebnissen stellte sich bei den Verlaufsbeobachtungen heraus, dass nur der Nachweis von DTZ im Knochenmark beim primären Mammakarzinom einen prognostischen Wert hatte, nicht jedoch der Nachweis von CTCs im Blut.

Weiterhin führten Müller et al einen vergleichenden Versuch von Blut und Knochenmark durch [41]. Bei diesem konnten bei 17% der 53 Patientinnen DTZ und bei 9% der Patientinnen CTCs nachgewiesen werden. In dieser Studie sind die Detektionsraten wesentlich geringer als die unseren (bei 28% der Patientinnen wurden DTZ und bei 19% CTCs nachgewiesen), obwohl auch hier die Verarbeitung vom Knochenmark mit der unseren übereinstimmte. Die geringeren

Nachweisfrequenzen von CTCs könnte man sich dadurch erklären, dass die Anreicherung der Zellen mit OncoQuick erfolgte. Es kam außerdem nur in 3 Fällen zu übereinstimmend positiven, aber in 42 Fällen zu übereinstimmend negativen Ergebnissen. Dies ergibt zwar eine Konkordanz von 85 %, wobei der Teil der negativ-übereinstimmenden Ergebnisse überwiegt. Wahrscheinlich ist es in dieser Studie zu vermehrt falsch-negativen Ergebnissen gekommen. Auch der Autor räumt diese Möglichkeit ein. Die unterschiedlichen Detektionsraten können aber ebenso an unserer kleinen Fallzahl oder falsch-positiven Befunden unsererseits liegen.

Vielleicht ist die niedrigere Detektionsrate von DTZ in aktuelleren Studien auch durch die vermehrte Durchführung des empfohlenen Mammographie-Screenings bedingt. Durch diese Vorsorge könnte ein Trend zu niedrigeren Tumorstadien mit dementsprechend seltenerem Vorkommen von DTZ im Knochenmark erfolgt sein. Außerdem ist auch die im Rahmen der Standardisierung der Verarbeitung des Knochenmarks vorgegebene Definition der DTZ strenger, wodurch es in den neueren Studien zu weniger positiven Befunden kommt [30].

Analog zu unseren Ergebnissen konnten Müller et al beim primären Mammakarzinom auch keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen DTZ und CTCs feststellen.

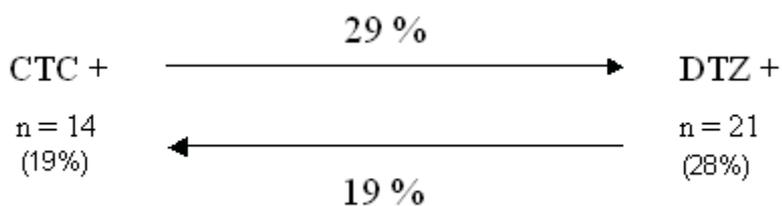


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen CTCs und DTZ bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

Bei den Patientinnen mit primärem Mammakarzinom war in unserem Versuch der größte Anteil diskordanter Befunde zu verzeichnen. Sowohl beim primären Mammakarzinom als auch stadienübergreifend fanden sich häufiger positive Knochenmarks- wie Blutbefunde. Diese Ergebnisse werden von anderen Studien

bestätigt, auch wenn andere Methoden wie die PCR zur Probenauswertung angewendet wurden [59]. Dies würde die Hypothese bestätigen, dass das Blut zunächst eher als „Durchgangsorgan“ zu betrachten ist, aus dem die CTCs auch relativ rasch wieder eliminiert werden können. Die Präsenz von Tumorzellen im Blut könnte demnach ein vorübergehendes Phänomen darstellen, von welchem die tatsächliche Tumorzellpersistenz zu unterscheiden wäre. Das Knochenmark hingegen scheint tatsächlich ein „homing organ“ für Tumorzellen darzustellen. Es könnte als eine Art „Reservoir“ agieren, in welchem Tumorzellen günstige Bedingungen zum Überleben finden und aus dem über den guten Anschluss an den Blutkreislauf immer wieder Tumorzellen ins Blut entlassen werden können. Für die Theorie des „homing organ“ sprechen auch die Ergebnisse anderer Studien, bei welchen im Knochenmark meistens eine höhere Tumorzellzahl gefunden wird als im Blut. Das Blut wäre nur ein vorübergehender Aufenthaltsort für Tumorzellen, in welchem lediglich ein kleiner Prozentteil von letzteren überlebensfähig wäre. Wenn diese überlebenden Zellen dann auf „fruchtbaren“ Boden stießen, könnten sie Metastasen bilden [60, 61]. Diese Hypothese wurde bereits 1889 von Steven Paget in der „Seed and soil“-Theorie beschrieben [62]. Angesichts der großen Fortschritte im Bereich der Tumorzell-Forschung ist sie wieder aufgegriffen worden. Dies wird unter anderem in der Studie von Kaplan et al und weitere Publikationen gut veranschaulicht [63-65]. Wie schon Paget folgerte, ist es nun eine wichtige Aufgabe die genauen Eigenschaften der „seeds“, also der Tumorzellen, zu untersuchen und zu erörtern, wie man ihr „Festsetzen“ unterbinden könnte. Dies wird ausführlicher im Abschnitt 4.4 erörtert.

Die Theorie vom „homing organ“ wird außerdem von der Beobachtung bestätigt, dass bei wiederholten Blut-Analysen bei initial negativen Blutproben während einer zweiten Analyse doch noch CTCs nachgewiesen werden können [66]. Das erschwert natürlich den Einsatz von CTCs beim Monitoring. Auch die kurze Halbwertszeit von CTCs von 1-2,4 Stunden sowie der ruhende und nicht-proliferative Status der CTCs begünstigen die diskrepanten Ergebnisse zwischen dem Nachweis von DTZ und CTCs [41, 67]. Zudem wird ein kleiner Anteil der CTCs von der Therapie eliminiert. Die im Blut zirkulierenden Tumorzellen müssten demzufolge immer wieder von einem anderen Organ aus „aufgefüllt werden“.

In unserem Versuch haben wir keine Daten über die Zeit hinweg erhoben, sondern nur den einmaligen Nachweis von DTZ und CTCs mit den konventionellen

Stagingparametern verglichen. Hierbei zeigte sich jedoch weder mit den DTZ noch mit den CTCs und diesen Parametern ein signifikanter Zusammenhang. Allerdings hat sich in den meisten Studien gezeigt dass beim primären Mammakarzinom die Aussagekraft von DTZ im Knochenmark der von CTCs im Blut überlegen ist. Vielleicht muss aber beim primären Mammakarzinom, bei welchem eine geringere Gesamtzellzahl an CTCs zu erwarten ist, ein größeres Blutvolumen ausgewertet werden als die 7,5ml beim metastasierten Mammakarzinom, um eine sinnvolle Aussage über die Rolle von CTCs zu treffen. Dies wird augenblicklich unter anderem in der SUCCESS-Studie geprüft, bei welcher 23ml Blut pro Patientin mit primären Mammakarzinoms untersucht werden [53]. Auch Slade et al haben in ihrer Studie bei den Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom 7,5ml Blut und bei den Patientinnen in der Rezidiv-freien Nachsorge 3*7,5 mL Blut untersucht [68].

Der augenblickliche Standpunkt im Kontext des primären Mammakarzinoms spricht aber eindeutig für eine prognostische Überlegenheit der DTZ. Zum Beispiel hat sich erwiesen, dass der Knochenmarksbefund bei Lymphknoten-negativen Patientinnen verlässliche Informationen bezüglich der Prognose liefert [38, 69]. Eine Abwesenheit von DTZ könnte deshalb als zusätzlicher Marker fungieren, um diejenigen Lymphknoten-negativen Patientinnen zu identifizieren, welche allein durch den chirurgischen Eingriff „geheilt“ sind und dementsprechend keine weitere adjuvante Therapie benötigen. Das würde den Patientinnen die Unannehmlichkeiten und Nebenwirkungen einer Chemotherapie ersparen und außerdem die Kosten reduzieren. Im Gegensatz dazu wären persistierende Tumorzellen im Knochenmark nach einer Therapie ein Indikator für ein Nicht-Ansprechen auf letztere. Patientinnen mit dieser Konstellation tragen ein höheres Risiko für ein Rezidiv [36, 70]. Diese Gruppe würde im Gegensatz zur vorherigen von einer zusätzlichen Therapie profitieren.

Trotz des prädikativen Wertes von DTZ im Knochenmark sollte aufgrund der unzureichenden Datenlage nach Meinung der Autoren die nach den Leitlinien vorgeschlagenen Therapie bei fehlendem Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark bei Primärdiagnose nicht unterlassen werden. Die Einleitung einer adjuvanten, vor allem endokrinen Therapie, ist bei einem positiven Knochenmarksbefund aber durchaus gerechtfertigt. Vorläufig sollte derartige therapeutische Entscheidungen nur im Rahmen von prospektiven klinischen Studien erfolgen. Es stellt sich aber in diesem Kontext die Frage, ob angesichts der niedrigen

Prävalenz positiver Knochenmarks-Befunde in dieser Gruppe (28%) und der dementsprechend wenigen Fälle, bei welchen Konsequenzen folgen würden, dieser diagnostische Aufwand gerechtfertigt ist.

4.2.2. Vergleich und Schlussfolgerungen bei Patientinnen im Follow-up

Erstaunlicherweise fand sich bei 11 unserer 14 Patientinnen, deren Blut und Knochenmark im Follow-up untersucht wurde, ein übereinstimmendes Ergebnis zwischen den beiden „Kompartimenten“. Das entspricht mit einer Konkordanz von 79% einer wesentlich höheren Übereinstimmung als bei den Patientinnen mit primären oder auch metastasierten Mammakarzinom. Angesichts der geringen Fallzahl kann die Aussagekraft dieser Ergebnisse aber in Frage gestellt werden.

Wenn sich der Knochenmarks-Befund im Follow-up als unabhängiger prognostischer Marker bewähren und sich die Korrelation mit dem Blutbefund auch in prospektiven Studien mit größeren Fallzahlen bestätigen sollte, könnte ein Ersatz der Knochenmarks-Auswertung durch die Blutanalyse denkbar sein. In der Tat hat sich auch bezüglich der Nachsorge in vielen Studien gezeigt, dass der Nachweis von persistierenden Tumorzellen im Knochenmark nach Abschluss der Chemotherapie oder während der onkologischen Nachsorge einen hohen anerkannten prädikativen Wert hat [23]. Vor allem Patientinnen mit einem positivem Knochenmarks-Befund nach Beendigung der Chemotherapie haben eine sehr ungünstige Prognose [70].

In einer kürzlich erschienenen Studie von Slade et al zum Beispiel wurden die Ergebnisse der Blut- und Knochenmarks-Untersuchungen verglichen [68]. Hierbei wurden 3*7,5 ml Blut von 51 Patientinnen im Follow-up mit dem CellSearch System analysiert. Bei 40 Patientinnen dieses Kollektivs wurde auch eine Knochenmarks-Aspiration durchgeführt. Das Knochenmark wurde anschließend mittels Immunzytochemie und RT-PCR verarbeitet. Insgesamt fand sich bei 59% der Patientinnen ein positiver Blut- und bei 50% der Patientinnen ein positiver Knochenmarks-Befund. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass das Knochenmark zum Teil mehrmalig entnommen und analysiert worden ist. Überdies wurden die Knochenmarksaspiration und die Blutentnahme nicht zeitgleich durchgeführt, was die Aussagekraft dieses Vergleiches etwas vermindert. Bezüglich des Zusammenhangs zwischen DTZ und CTCs konnte bei den Patientinnen mit DTZ im Knochenmark häufiger ein positiver Blutbefund festgestellt als bei Patientinnen mit

einem negativen Knochenmarksbefund. Allerdings waren die Fallzahlen insgesamt zu gering, um daraus einen statistisch signifikanten Zusammenhang ableiten zu können. Des Weiteren wurde in der Studie zwischen einer "low risk"- (T1N0), und einer "high risk"-Gruppe (mehr als 3 befallene Lymphknoten) unterschieden. In Bezug auf diese Gruppen konnten prozentual gesehen mehr positive Blut- und KM-Befunde in der high-risk Gruppe festgestellt werden. Auch in dieser Studie hat sich dementsprechend bestätigt, dass die Detektion von DTZ und CTCs bei Patientinnen mit erhöhtem Rückfall-Risiko wahrscheinlicher ist. In diesem Zusammenhang sollten auch die Patientinnen aus der high-risk-Gruppe erwähnt werden bei welchen der Knochenmarks-Befund beständig negativ war. Aufgrund ihrer histologischen Klassifikation sollten sie eigentlich eine schlechte Prognose haben. Es kam jedoch bei keiner dieser Patientinnen mit negativem Knochenmarksbefund zu einem Rezidiv. Des Weiteren konnte dank wiederholter Analysen von Blut und Knochenmark über den Zeitraum von 2 Jahren hinweg beobachtet werden, wie sich der Zusammenhang zwischen DTZ und CTCs über einen längeren Verlauf hinweg verhält. In den meisten Fällen wurde ein positiver Knochenmarks-Befund von der Blut-Analyse bestätigt. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse aus diesem Artikel darauf hin, dass bei der Nachsorge die umständliche und schmerzhaftes Knochenmarks-Aspiration vielleicht durch eine Blutentnahme ersetzt werden kann. Letzteres wäre vor allem bei wiederholten Messungen, zum Beispiel zum Therapie-Monitoring, wünschenswert.

Auch Wiedswang et al untersuchten in einer großen Studie den Zusammenhang von DTZ und CTCs, indem 341 Patientinnen im Follow-up im Median 40 Monate nach der Primäroperation Blut und Knochenmark entnommen und analysiert wurde [45]. Die angewendeten Methoden zur Bluts- und Knochenmarksanalyse waren mit Ausnahme von einem anderen Antikörper (AE1 und AE3) mit den unseren vergleichbar. Es konnten in 14% der Fälle DTZ und in 10% der Fälle CTCs nachgewiesen werden. Dies stellt im Vergleich mit unserem Versuch eine signifikant niedrigere Detektionsrate dar, sowohl bei der Knochenmarks- als auch bei der Blutanalyse. Auch die Detektionsraten von Pierga et al waren höher, obwohl sie Patientinnen mit Brustkrebs bei Primärdiagnose untersucht haben, bei welchem die Detektionsrate niedriger sein dürfte als beim Follow-up. Außerdem haben sie eine weniger sensitive Methode ohne vorherige Negativanreicherung angewendet. Diese Unterschiede können zum Beispiel an der Wahl des Antikörpers liegen. Anders als bei Pierga et al

und unserem Versuch haben Wiedswang et al in ihrer Studie die Antikörper AE1 und AE3 benutzt, die eventuell weniger sensitiv sind. Zudem wurden nur 5ml Blut untersucht. Dieses Volumen ist jedoch zu gering, um eine ausreichende Detektion von zirkulierenden Tumorzellen zu gewährleisten. Weiterhin könnten bei der Negativ-Anreicherung der CTCs zu viele Zellen eliminiert worden sein. Demzufolge konnten bei 78% der Patientinnen weder DTZ noch CTCs isoliert werden und es kam nur in 2% zu übereinstimmend positiven Ergebnissen. Bezüglich der Prognose waren der Nachweis von DTZ allein sowie dessen Assoziation mit CTCs im Blut mit dem Rezidiv-Risiko verbunden. Vor allem die simultane Anwesenheit von DTZ und CTCs wies auf eine deutlich schlechtere Prognose hin. Nur im Fall von Lymphknoten-negativen Patientinnen hatte allein der Knochenmarksbefund einen prognostischen Wert. Mittels der Blutanalyse könnten folglich diejenigen DTZ-positiven Patientinnen identifiziert werden, welche mit einem besonders hohem Rezidiv-Risiko von weiteren Therapien oder einem Therapie-Wechsel profitieren würden.

Ein sofortiger Ersatz der Knochenmarks-Aspiration durch eine einfache Blutentnahme wird jedoch im Kontext der Nachsorge von der augenblicklichen Studienlage nicht befürwortet. Auch unsere Ergebnisse unterstützen diesen Wechsel nicht ausnahmslos. Zwar fanden sich in 79% der Fälle übereinstimmende Ergebnisse und es konnten bei keinem der Patientinnen mit negativem Knochenmarksbefund CTCs nachgewiesen werden. Wie die Abbildung 9 darstellt, war ein positiver Blutbefund auch immer mit dem Nachweis von DTZ im Knochenmark assoziiert. Dafür konnten aber nur bei 60% der Patientinnen mit einem positiven Knochenmarksbefund CTCs im Blut nachgewiesen werden. Ein negativer Blutbefund im Monitoring könnte demnach nicht dafür garantieren, dass sich doch Tumorzellen im Knochenmark befinden.

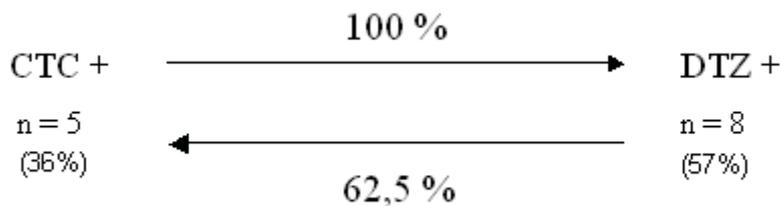


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen CTCs und DTZ bei Patientinnen im Follow-up

Ein ähnliches Verhältnis wird auch in der Studie von Pierga et al beobachtet [42]. Diese Verteilung würde die Theorie des „homing organ“ bestätigen, bei der Tumorzellen z.B. im Knochenmark immer anwesend sind, dafür aber zirkulierende Tumorzellen nur passager ins Blut entlassen werden. Es ist folglich wahrscheinlicher, bei einer stattgefundenen Dissemination von Tumorzellen DTZ im Knochenmark zu finden als CTCs im Blut. Dementsprechend bliebe der Knochenmarksbefund zuverlässiger als die Blutuntersuchung. Ob sensitivere Detektionsmethoden an dieser Gegebenheit noch etwas ändern können, ist fraglich. Es wäre empfehlenswert, ein erstes „sicheres“ Staging mit einer Knochenmarks-Aspiration durchzuführen. Im Anschluss daran könnte mit der Suche nach CTCs im Blut ein wahrscheinlich zuverlässiges und einfach durchführbares Monitoring erfolgen.

Zusammenfassend könnte der Nachweis von persistierenden Tumorzellen im Knochenmark und im Blut als Surrogatmarker für die Indikation und die Auswahl einer sekundär adjuvanten Therapie, der Verlängerung einer bereits eingeleiteten Therapie oder dem Wechsel von Wirkstoffen dienen. Aktuelle Ergebnisse zeigen in der Tat, dass viele Patientinnen von einer Verlängerung oder dem Wechsel einer Therapie profitieren [71, 72]. Der Nutzen eines solchen Therapiewechsels aufgrund der Knochenmarks- oder Blutbefunde ohne evidente klinische oder radiologische Zeichen einer Krankheitsprogression muss jedoch in prospektiven klinischen Studien noch genauer untersucht werden.

4.2.3. Vergleich und Schlussfolgerungen bei Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom

Bei allen Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom konnten Tumorzellen im Blut oder im Knochenmark nachgewiesen werden. Weiterhin kam es im Vergleich zum primären Mammakarzinom im metastasierten Stadium erwartungsgemäß zu höheren Detektionsraten von Tumorzellen in Blut und Knochenmark. Dies wird in der stadienübergreifenden Tabelle 20 veranschaulicht. Zusätzlich kann man anhand des Diagramms bei Abbildung 7 erkennen, dass auch die mediane Zellzahl beim metastasierten Mammakarzinom höher ist als bei den früheren Krebsstadien.

Zu übereinstimmenden Ergebnissen kam es in 70 % der Fälle. Der FET zeigt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den beiden Parametern an. Auch die Abbildung 9 zeigt, dass weder ein positiver Knochenmarks- noch ein positiver Blutbefund zu 100% mit dem Nachweis von Tumorzellen im anderen Kompartiment assoziiert waren.

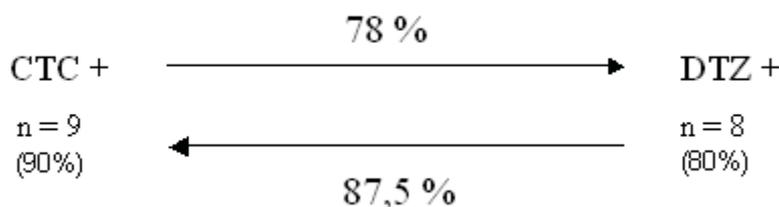


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen CTCs und DTZ bei Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom

Bei zwei Patientinnen fanden sich im Gegensatz zur Follow-up Situation zirkulierende Tumorzellen im Blut ohne dass disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden konnten. Dabei handelte es sich im ersten Fall um eine rein viszerale Metastasierung. Bei einer viszeralen Metastasierung scheint der Nachweis von CTCs sensitiver zu sein als der Nachweis von DTZ. Ein negativer Knochenmarksbefund könnte in diesem Fall noch plausibel sein. Überraschenderweise handelte es sich aber bei der zweiten Patientin mit negativem Knochenmarksbefund um eine rein ossäre Metastasierung. Ob es sich hierbei um einen methodischen Fehler handelt bleibt unklar.

Im Gegensatz dazu fand sich nur bei einer Patientin ein positiver Knochenmarksbefund, ohne dass zirkulierende Tumorzellen im Blut nachgewiesen werden konnten. Dies könnte man sich vielleicht dadurch erklären, dass es sich um eine Patientin mit einer rein ossären Metastasierung handelt. Wenn man die Theorie vom Knochenmark als „homing organ“ heranzieht, könnte es sein, dass zum Zeitpunkt dieser Blutentnahme keine Tumorzellen in den Blutkreislauf entlassen worden sind. Erstaunlich ist jedoch die Tatsache dass eben in dieser Knochenmarks-Probe extrem viele DTZ nachgewiesen werden konnten (> 1000 Zellen).

Allgemein ist in unserem Versuch ebenso wie in weiteren Studien aufgefallen, dass die Knochenmarks- und Blutbefunde beim metastasierten Mammakarzinom nicht immer miteinander korrelieren. Zu einer ähnlichen Feststellung war es bereits beim primären Mammakarzinom gekommen. Lässt sich die fehlende Korrelation der Knochenmarks- und Blutbefunde im Kontext des primären und metastasierten Mammakarzinoms vielleicht dadurch erklären, dass je nach Tumorstadium entweder der Nachweis von DTZ oder der von CTCs einen prädikativen Wert hat? Wie bereits diskutiert scheint beim primären Mammakarzinom der Knochenmarks-Befund eine höhere Aussagekraft zu haben. Ob beim metastasierten Mammakarzinom zirkulierende oder disseminierte Tumorzellen einen höheren prognostischen Wert haben, wird weiterhin kontrovers diskutiert. Die prognostische Bedeutung von DTZ beim metastasierten Mammakarzinom konnte unter anderem in Studien von Janni et al bestätigt werden [46]. Viele Studien belegen aber auch die hohe Aussagekraft von CTCs beim metastasierten Mammakarzinom. Eine elementare Studie diesbezüglich stellt die bereits in Abschnitt 4.1.2.4. beschriebene Untersuchung von Cristofanilli et al dar [49]. Sie legten den „Grundstein“ für die Relevanz von CTCs beim metastasierten Brustkrebs, deren Aussagekraft sich auch in ihren weiteren Untersuchungen bestätigte [32, 56]. In der Studie von Bidard et al hat sich gezeigt dass der Nachweis von CTCs im Blut mit dem Outcome und der Therapie-Antwort assoziiert ist [16]. Weiterhin konnten Hayes et al in ihrer Studie feststellen, dass der Nachweis von CTCs auch beim Follow-up von Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom einen hohen prädikativen Wert hat. In ihrem Versuch werteten sie innerhalb von 4 Monaten wiederholt das Blut von 177 Patientinnen aus. In der Tat war eine erhöhte Frequenz von CTCs zu jedem Zeitpunkt des Follow-up mit einer rapiden Krankheitsprogression assoziiert [73].

In einigen Studien hat sich zusätzlich gezeigt, dass der Nachweis von CTCs beim metastasierten Mammakarzinom den meisten konventionellen Stagingmethoden überlegen ist. Letztere sind oft nicht sensitiv genug, erfassen die frühe Tumordissemination in Form des minimal residual disease nicht oder geben eine eventuelle Therapie-Antwort nur zeitverzögert wieder. Der Nachweis von CTCs im Blut scheint diese Anforderungen zu erfüllen. In der Untersuchung von Budd et al beispielsweise wurde das Blut von 138 Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom mit dem CellSearch System ausgewertet und mit den Aussagen einer Computertomographie (CT) verglichen [74]. Dabei war die interreader-Variabilität bei der Auswertung der Blutbefunde geringer als bei der Auswertung der Bilddiagnostik. Weiterhin hat der Nachweis von CTCs eine zuverlässigere Evaluation der Therapie-Antwort und eine bessere Schätzung der Prognose ermöglicht als die Bilddiagnostik. In diesem Kontext kommt es jedoch häufig zu kontroversen Ergebnissen. Die Ende 2008 erschienene Studie von Saad et al beispielsweise ist zu anderen Schlussfolgerungen gekommen [75]. In dieser Untersuchung wurde bei 35 Patientinnen die Ergebnisse einer PET (Positronen-Emissions-Tomographie) oder CT, dem Tumormarker CA27.29 und dem Nachweis von CTCs im Blut verglichen. Zwar korrelierten die verschiedenen Parameter gut miteinander, aber bezüglich der Detektion der Metastasen zeigte die Bilddiagnostik mittels PET oder CT die höchste Sensitivität. In dieser Studie wurde jedoch die Sensitivität der Detektion von Metastasen und nicht die Variabilität zwischen den Auswertungen von zwei Begutachtern oder die Schätzung der Prognose bewertet. Ein Vergleich der beiden Studien ist dementsprechend schwierig. Nichtsdestotrotz bietet der Nachweis von CTCs beim metastasierten Mammakarzinom eine ernstzunehmende Alternative zu den konventionellen Stagingmethoden.

In diesem Kontext würde sich folglich der Nachweis von CTCs zum Monitoring eignen. Die relativ einfache Durchführung der Blutanalysen mit dem CellSearch-Gerät bringt den Vorteil mit sich, serielle Bestimmungen im Laufe der Erkrankungen oder auch im Rahmen der Nachsorge vorzunehmen. Zusätzlich ist ein Monitoring mittels Blutanalysen wegen der leichteren Erreichbarkeit und der besseren Akzeptanz der Patientinnen wesentlich vorteilhafter als eines mittels wiederholter Knochenmarksuntersuchungen. Dadurch wäre ein effektives und einfaches Therapie-Monitoring möglich. Vor allem wenn die Krankheit das metastasierte Stadium erreicht hat, wäre es wünschenswert, den Patientinnen die schmerzhaften

Knochenmarksaspirationen zu ersparen. In den USA wurde das CellSearch-System inzwischen von der Food and Drug Administration für das Monitoring von metastasierten Mamma- und Magenkarzinom anerkannt [76].

In diesem Zusammenhang kann auch überlegt werden, ob eine Einfügung der Blutbefunde in die TNM-Klassifikation sinnvoll ist [56, 58, 77]. Den Studienergebnissen von Cristofanilli et al und S. Dawood et al zufolge ist die klinische Bedeutung von CTCs beim metastasierten Mammakarzinom ausreichend belegt worden, um in die TNM-Klassifikation integriert zu werden. Zum Beispiel könnte in der metastasierten Situation zur weiteren Risikostratifizierung zwischen einer IV-A- (Patientinnen ohne CTCs im Blut) und einer IV-B-Gruppe (Patientinnen mit CTCs im Blut und dementsprechend schlechterer Prognose und intensiverem Therapie-Bedürfnis) unterschieden werden. Die Patientinnen aus der IV-B-Gruppe könnten im Hinblick auf individualisierte Therapien in aktuelle Studien eingegliedert und die Potentiale von CTCs genauer untersucht werden. Dadurch kann eruiert werden, inwiefern der Nachweis und die Untersuchung von Tumorzellen eine zielgerichtetere Therapie ermöglichen und wie ihre Auswirkung auf die Prognose ist.

Der eben aufgeführten Studien zufolge könnte die Isolierung von CTCs im Blut zu einer wesentlichen Verbesserung der Diagnostik, des Monitorings und dadurch auch der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms führen. Man darf jedoch nicht vergessen, dass bisher trotz großer Fortschritte im Management vom metastasierten Mammakarzinom die Behandlung noch immer palliativ ist [78]. Aber zumindest könnte das erzielte mittlere Überleben von ca. 24 Monaten signifikant verlängert werden.

4.3. Vergleich mit anderen Methoden

In unserem Versuch haben wir zwei Methoden verwendet, die schon in zahlreichen Studien zum Nachweis von disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen erprobt worden sind. Die Immunzytochemie hat sich als Methode zur Detektion von isolierten DTZ im Knochenmark bewährt und ist als Standardverfahren definiert worden. Ebenso erfüllt das CellSearch System augenblicklich alle Anforderungen, die für einen effektiven und routinemäßigen Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen erforderlich sind. Dennoch müssen immer wieder neue Methoden in Betracht

gezogen werden, die sich progressiv etablieren und weitere Vorteile mit sich bringen, wie zum Beispiel eine höhere Sensitivität oder Spezifität oder eine zeitsparende Komponente. Im folgenden Abschnitt wollen wir die wichtigsten konkurrierenden Verfahren anführen und ihre Vor- und Nachteile erörtern.

Die wichtigste konkurrierende Methode stellt die PCR (Polymerase Chain Reaction) mit einem molekulargenetischen Ansatz dar. Der Hauptvorteil dieses Verfahrens ist seine hohe Sensitivität. Fast alle Studien, welche die PCR mit der Immunzytochemie oder dem CellSearch System vergleichen, weisen höhere Detektionsraten von Tumorzellen mit der PCR auf. Weiter unten werden zwei Beispiele angeführt. Durch die sensitivere Detektion korrelieren die Ergebnisse der PCR besser mit dem Outcome als zum Beispiel die der Immunzytochemie [68, 79]. Außerdem sind die Ergebnisse der PCR im Gegensatz zur Immunzytochemie und dem CellSearch System, bei welchen die detektierten Zellen noch begutachtet werden müssen, Untersucher-unabhängig.

Der prädikative Wert der Tumorzellen hat sich in den Studien, welche die PCR anwenden, weiterhin bestätigt. Trotz der sensitiveren Detektion kam es jedoch zu keinen neuen Schlussfolgerungen. Die prognostischen Überlegenheit von DTZ über CTCs beim primären Mammakarzinom blieb bestehen. Viele Studien deuten auf eine klinische Relevanz der CTCs beim primären Mammakarzinom, ohne diese jedoch konkretisieren zu können oder einen Ersatz der Knochenmarksuntersuchung durch die Blutentnahme zu empfehlen [80, 81]. Auch beim metastasierten Mammakarzinom scheint der Nachweis von CTCs weiterhin mehr Potential zu haben, selbst wenn sowohl das Blut als auch das Knochenmark mittels PCR ausgewertet werden [77].

Wegen ihrer erhöhten Sensitivität könnte die PCR der Immunzytochemie weitaus überlegen sein. Jedoch schränken einige Nachteile ihren Einsatz ein. Voraussetzung für die Anwendung der PCR ist nämlich, dass die Tumorzellen in ihrer DNA Aberrationen haben müssen, welche sie von den umgebenden hämatopoetischen Zellen unterscheiden. Leider ist die DNA von Tumorzellen sehr heterogen [12], was es annähernd unmöglich macht einen einheitlichen Marker zu finden. Zum Teil kommt es aber auch zu einer „nicht-Expression“ der Gene durch die Tumorzellen, was wiederum zu falsch-negativen Ergebnissen führt. Letzteres würde aber auch bei der Immunzytochemie zu falsch-negativen Ergebnisse führen, wenn zum Beispiel die Expression vom Zytokeratin dadurch vermindert wäre. Auf der Ebene RT-PCR

(reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion), welche die mRNA als Ausgangspunkt für die Amplifikation verwendet, sind bereits mehr einheitliche Übereinstimmungen ausfindig zu machen. Um die genetische Evolution der Tumorzellen als Reaktion auf die Umgebung und die Therapie zu berücksichtigen, wird außerdem versucht - ähnlich wie mit dem in unserer Studie verwendeten Antikörper A45-B/B3, welcher mehrere Epitope der Zytokeratine erkennt - eine Zusammensetzung von mehreren Tumor-spezifischen mRNA Markern zu benutzen [82]. Diese Variante der PCR wird inzwischen häufiger zum Nachweis von Tumorzellen eingesetzt. Nakagawa et al konnten zum Beispiel bei 43% von 90 Stage I-III Brustkrebspatientinnen mittels multimarker real-time-RT-PCR zirkulierende Tumorzellen im Blut nachweisen, dafür aber nicht bei gesunden Probandinnen [83]. Im Gegensatz dazu konnten wir nur bei 19% der Patientinnen bei Primärdiagnose beziehungsweise bei 39% der Patientinnen im Follow-up CTCs isolieren. In Bezug auf die Knochenmarksanalyse haben Benoy et al bei 170 Patientinnen im Stadium I bis IV die Ergebnisse der Immunzytochemie mit der PCR verglichen [80]. Als Markergene wurden das Zytokeratin19 und das Mammaglobin-Gen verwendet. Im Vergleich zur Immunzytochemie konnten mit der PCR mehr positive Knochenmarksbefunde detektiert werden. Sie scheint demnach sowohl bei der Auswertung des Blutes als auch der des Knochenmarks eine sensitivere Methode zu sein als die Immunzytochemie.

Das Problem sowohl der PCR als auch der RT-PCR ist jedoch, dass die untersuchten Gentranskripte auch in vielen normalen Knochenmarks- oder Blutzellen nachgewiesen werden konnten, was zu Einbußungen bezüglich der Spezifität führt [84-86]. Zum Teil kann auch eine Expression von Markergenen wie die Gene vom Zytokeratin 19 oder vom CEA von Leukozyten, welche durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren angeregt wurden, beobachtet werden [87]. Auch die Gene für den EGF-Rezeptor, das Mammaglobin oder das epitheliales Muzin werden häufig von anderen Zellen als den Tumorzellen exprimiert. Diese illegitime Expression sowie die dadurch mangelnde Spezifität sind momentan eine der wesentlichen Limitationen beim Einsatz dieser hochempfindlichen Methoden. Denn im Gegensatz zur Immunzytochemie hat man bei der PCR keine Möglichkeit, die morphologischen Eigenschaften in die Beurteilung der Zellen mit einzubeziehen, um unklare Fälle ausschließen. Außerdem können bei der Immunzytochemie auch weiterhin einzelne

Zellen nach ihrer Detektion durch zusätzliche Antikörper, Fluoreszenz in situ Hybridisierung, molekulare oder genetische Verfahren charakterisiert werden.

In diesem Kontext bietet die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) eine Alternative. Diese ermöglicht neben dem Nachweis der Tumorzellen auch eine visuelle Bewertung der Zellen unter dem Mikroskop oder durch einen automatisierten „Cellsorter“ [88]. Bis jetzt hat sich diese Methode zum Nachweis von Tumorzellen jedoch nicht weiterhin behaupten können.

Eine Möglichkeit die Spezifität der PCR zu steigern, wäre vor der genetischen Verarbeitung der Proben eine Abreicherung der störenden normalen Zellfraktion durchzuführen. In der Studie von Fersis et al zum Beispiel erfolgte vor der Auswertung des Blutes mittels RT-PCR eine Aufreinigung der Proben mittels Immunomagnetismus. Dies macht aber den Vorgang noch wesentlich aufwändiger. Die Auswertung der Proben mittels Immunzytochemie oder dem CellSearch System ist augenblicklich verhältnismäßig schnell. Man könnte die Immunzytochemie optimieren, indem man die Zytospins wie beim CellSearch System von einem automatisiertem Mikroskop auswerten lässt. Dies würde sowohl die Objektivität der Methode erhöhen und als auch viel Zeit sparen [29, 89].

Einen weiteren Lösungsansatz im molekularbiologischen Ansatz bietet die quantitative PCR [90]. Bei dieser Variante werden von malignen Zellen aktivierte und hochregulierte Gensequenzen identifiziert und deren mRNA-Transskripte von der „Hintergrund“-DNA und -RNA unterschieden. Anhand einer Schätzung der Anzahl der Referenz-Gentranskripte in Knochenmarksproben im Hinblick auf das Markergen kann ein Grenzwert ermittelt werden, mittels dem dann die Gen-Expression in Tumorzellen von der ektopen Expression der umgebenden hämatopoetischen Zellen differenziert werden kann. Dies kann sich jedoch schwierig gestalten, da die Expressionsraten sehr verschieden sein können und es dementsprechend problematisch sein kann, zwischen einem Wechsel im Expressionslevel oder in der Zellzahl zu differenzieren. Dieses Problem wird umso komplizierter, wenn die Analysen während einer Therapie gemacht werden, da sich dann die Frage stellt, ob die Zahl der Tumorzellen selbst oder nur die Expression des Markergens reduziert ist. Es ist in diesem Kontext folglich ebenso wichtig wie bei der Immunzytochemie, mehrere Marker zu benutzen. Dadurch kann eine Detektion gewährleistet werden, auch wenn die Expression eines einzelnen Gens herunterreguliert wird. In Bezug auf das immer wiederkehrende Problem der illegitimen Expression der Markergene,

welches sich bei allen Varianten der PCR stellt, müssten in großen Studien geeignete Cutoff-Werte ermittelt und validiert werden. Die Immunzytochemie hat dementsprechend vielleicht eine etwas niedrigere Sensitivität, aber eine äußerst hohe Spezifität. Diese kann aufgrund des Einbeziehens der morphologischen Kriterien, der direkten Quantifizierung der Tumorzellen und der Möglichkeit, die Zellen im Anschluss an ihre Detektion weiter zu charakterisieren, wahrscheinlich kaum noch übertroffen werden.

Zusätzlich zu den eben erläuterten Nachteilen der unterschiedlichen PCR-Klassen muss noch die Instabilität der zu untersuchenden mRNA erwähnt werden. Im Gegensatz zum CellSearch-System, bei dem die Blutproben auch bis zu 72 Stunden gelagert bzw. transportiert werden können, ist man derzeit bei der Untersuchung der mRNA auf frische Blutproben bzw. kryokonserviertes Material angewiesen [31]. Die zwischenzeitlich industriell angebotene RNA-Isolierungs- und Stabilisierungsmedien sind zwar ein großer Fortschritt, ermöglichen aber noch nicht eine so lange Wartezeit bis zur Verarbeitung wie beim CellSearch System. Dies schränkt besonders die Zusammenarbeit mehrerer Zentren bzw. die Zusammenarbeit mit kleineren Zentren oder Praxen ein. Letztere können die Proben aufgrund der mangelnden Ausstattung ihrer Labore nicht verarbeiten und müssen sie in größere Labore, wie sie zum Beispiel in Unikliniken vorhanden sind, schicken. Der Vorteil, die Proben so gut und verhältnismäßig lang transportieren zu können wie die für das CellSearch System bestimmte Blutproben, ermöglicht dann die Umsetzung einer so umfangreichen Studie wie die SUCCESS-Studie. Bei dieser stammen unzählige Proben von kooperierenden Praxen, welche die Forschungsgruppe sonst gar nicht oder nur unter erschwerten Bedingungen erhalten hätte.

Zusammenfassend sind sowohl die Vielfalt an genetischen Markern als auch die aufgrund der Instabilität der RNA sehr kurzen Lagerungszeiten ein Hindernis für große Validierungsstudien für die verschiedenen PCR-Varianten [91]. So gibt es bis heute zwar unzählige kleine Studien, welche die prognostische Relevanz von Tumorzellen beim Brustkrebs untersucht haben, aber große multicenter Studien fehlen noch. Und nur durch letztere kann sich der weitläufige Einsatz dieses molekularen Ansatzes gegenüber der Immunzytochemie bewähren.

Bei anderen Tumorarten wie den Lymphomen oder Leukämien hat sich die Durchflusszytometrie etabliert. Die Anwendung dieser „Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung“ hat jedoch beim Brustkrebs bis jetzt noch keinen Vorteil mit sich

gebracht. Insbesondere die häufig niedrige Zahl der im Knochenmark oder Blut auftretenden Tumorzellen kann ein großes Hindernis für den Einsatz dieser Methode sein. Oft kommt es zwischen den Studien welche diese Methode getestet haben, zu divergierenden Ergebnissen [92-94].

Sowohl die Immunzytochemie als auch die anderen eben aufgezählten Methoden ermöglichen keine Differenzierung zwischen lebensfähigen und apoptotischen Zellen. Diesen Vorteil bietet der von Alix-Panabière et al vorgestellte Epispot-Assay (epithelial immunospot), welcher „lebende“ Zellen mittels ihrer Sekretion von Proteinen detektiert [95]. Letzterer besteht aus einer mit monoklonalen anti-MUC1-Antikörpern bestückten Membran, welche die Tumorzellen bindet. Nachdem diese kultiviert worden sind, können ihre Sekretionsprodukte wie zum Beispiel das Mucin Muc-1 oder das Zytokeratin19 anhand von ihnen gebildeten Spots analysiert werden. Durch Auszählen der Spots kann mit einer hohen Sensitivität auf die Tumorzellzahl zurückgeschlossen werden. Mit dieser Methode konnten bei 54% der 37 Patientinnen mit primären Mammakarzinom und bei 90% der Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom aktive Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Voraussetzung für das Gelingen dieser Methode ist jedoch, dass die Tumorzellen die Ziel-Proteine aktiv sezernieren. Wie bei den anderen Techniken stellt sich dementsprechend unter anderem das Problem, dass die Tumorzellen ungenügend oder nicht nachgewiesen werden, wenn die Synthese und Sekretion der Proteine herunter- beziehungsweise abgeschaltet wird. Außerdem können die detektierten Zellen bei dieser Methode leider ebenso wenig wie bei der PCR visualisiert und weiter untersucht werden.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die vorgestellten Methoden auch attraktive Verfahren zur Anreicherung und Detektion von DTZ darstellen. Jedoch ist bis jetzt die illegitime oder variierende Expression der Marker-Transkripte sowie die genetische Heterogenität der Tumorzellen ein großes Hindernis für diese molekularen Techniken, für das bisher nur unzureichende Lösungen gefunden werden konnten. Außerdem wären bei diesen Methoden dann noch umfangreiche Kontrollen sowie eine Standardisierung der Verfahren notwendig, um dieselbe Relevanz wie die Immunzytochemie zu erlangen.

Bis zum heutigen Standpunkt kann ferner nicht garantiert werden, dass diese neueren Anreicherungs- und Detektionsmethoden mehr klinisch relevante Informationen liefern als die Immunzytochemie. Nur dies würde den Ersatz einer

Technik, welche so viele Forschungsgruppen an tausenden von Patienten, an Knochenmark, Blut oder Lymphknoten erprobt haben, mit welcher seit Jahrzehnten gearbeitet wird und man dementsprechend schon viel Erfahrung hat [38], von neueren Methoden rechtfertigen. Immerhin müssen auch der technische Aufwand und die Kosten berücksichtigt werden, die aufwändigere Vorgehensweisen mit sich ziehen würden. Und wenn zum Beispiel die Suche nach DTZ im Knochenmark beim primären Mammakarzinom nur bei ca. 5% der Patientinnen klinisch relevante Informationen erbringen, dann sollte der Test, falls eine routinemäßige Einführung geplant ist, weder zu aufwändig sein noch zu hohe Kosten verursachen. Dementsprechend sind diese Methoden aufgrund ihrer Sensitivität derzeit vornehmlich in Bezug auf die Detektion der seltenen zirkulierenden Tumorzellen mit dem CellSearch-System eine ernstzunehmende Konkurrenz.

4.4. Potentiale der Tumorzell-Forschung

In den bisherigen Abschnitten sind wir primär auf die Nachweisverfahren der Tumorzellen sowie auf den Zusammenhang der Knochenmarks- und Blutbefunde eingegangen. Daher sollen nun noch kurz die verschiedenen Potentiale der Tumorzellen erläutert werden. In der Tat bieten sie sehr viele Möglichkeiten.

Einer der Hauptpunkte ist die bereits erwähnte Risikostratifizierung. Diese ist beim Brustkrebs von besonderer Bedeutung. Patientinnen werden häufig nach Standard-Schemen therapiert, zum Teil auch wenn sie gar keine Therapie benötigen. Dem Konsens von internationalen Brustkrebs-Experten zufolge bekommen annähernd 80% der Patientinnen mit primären Mammakarzinom eine systemische adjuvante Therapie, mitsamt ihrer Nebenwirkungen, und die Aussicht auf eine individualisierte Therapie ist gegenwärtig noch sehr gering.

Beim primären Mammakarzinom hat sich aber der Nachweis von DTZ im Knochenmark als guter prognostischer Parameter erwiesen. Mittlerweile haben verschiedene Studien gezeigt, dass nicht nur der präoperative Nachweis von DTZ, sondern auch die Tumorzellpersistenz im Knochenmark nach Abschluss der adjuvanten Therapie mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [23]. Auch im schwer einschätzbaren Fall von Lymphknoten-negativen Patientinnen kann das

Rezidiv-Risiko mittels DTZ gut eingeschätzt werden [18]. Gemäß aktueller Studienergebnisse hat sich weiterhin gezeigt, dass nur ein kleiner Teil der Patientinnen einer Chemotherapie bedürften, wenn man den Knochenmark-Status mit in die Entscheidung einbeziehen würde. In diesem Sinne stellte sich zum Beispiel bereits in der „pooled analysis“ von Braun heraus, dass Patientinnen mit negativem Lymphknoten-Status und einem niedrigen T-Stadium ($T \leq 2$), bei welchen keine DTZ im Knochenmark nachgewiesen werden konnten, eine 5-Jahres-Überlebensrate von 94 % zeigten und dementsprechend als geheilt betrachtet werden konnten [38]. Diesem Kollektiv würde eine Chemotherapie mehr Schaden als Nutzen bringen. Mit dem Knochenmarkstatus könnte man diejenigen 20 % der Patientinnen identifizieren, welche ein sehr hohes Rezidiv-Risiko haben und ca. 60 % der voraussichtlich unnötigen, nebenwirkungsbehafteten und kostspieligen Behandlungen vermeiden. Noch sind aber dringend weitere prospektive klinische Studien notwendig um anhand des Knochenmarkstatus solche Therapie-Entscheidungen zu begründen.

Im Gegensatz zu disseminierten Tumorzellen haben sich zirkulierende Tumorzellen bezüglich der Risikostratifizierung hauptsächlich beim metastasierten Mammakarzinom bewährt. Beim Follow-up haben sie aber eine Einsatzfähigkeit gezeigt, welche den DTZ aufgrund der verhältnismäßig umständlichen und schmerzhaften Knochenmarksaspiration verschlossen bleibt: die Verlaufsbeobachtung durch wiederholte Messung. In der Tat hat sich erwiesen, dass der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen in der Nachsorge gut mit dem von disseminierten Tumorzellen korreliert und auch einen hohen prognostischen Wert hat. Dementsprechend könnten Patientinnen mit hohem Rezidiv-Risiko zum Zeitpunkt der Primärdiagnose zunächst durch den Nachweis von DTZ im Knochenmark identifiziert werden. Der Verlauf der Erkrankung kann anschließend durch regelmäßige Untersuchungen des Blutes erfasst werden. Anhand dieses Monitoring können weiterhin Hoch-Risiko-Patientinnen oder Patientinnen, welche auf die eingeschlagene Therapie nicht ansprechen, identifiziert werden und möglicherweise neue Therapieentscheidungen getroffen werden [36, 96-98]. Aber auch in diesem Punkt sollten vorerst Entscheidungen nur im Rahmen prospektiver klinischer Studien erfolgen.

Erstrebenswert wäre natürlich, dass DTZ und CTCs eine ähnliche Rolle in der Therapigestaltung spielen können wie zum Beispiel die der Hormonrezeptoren. Letztere haben sich als anerkannte Prognosefaktoren etabliert, und es ist inzwischen

belegt worden, dass Patientinnen mit Rezeptor-positiven Mammakarzinom von einer Therapie-Verlängerung sowie von einem Therapie-Wechsel profitieren. Hormonelle Therapien oder ein Wechsel von Chemotherapeutika werden bei diesen Patientinnen mittlerweile standardmäßig durchgeführt [71].

Aber Tumorzellen sind nicht nur zur Risikostratifizierung und zum Monitoring der Krankheit und ihrer Therapie geeignet. Mit ihnen können auch neue Kenntnisse bezüglich der Vorgänge und Biologie der Metastasierung erworben werden. Wie mehrere Studien belegen, stellt die Dissemination isolierter Tumorzellen ins Knochenmark oder ins Blut eine Vorstufe auf dem Weg zur klinisch manifesten Metastasierung dar [18, 19, 21]. Weiterhin ist in vielen Studien aber auch festgestellt worden, dass isolierte Tumorzellen häufig andere Merkmale aufweisen als diejenigen, die ursprünglich beim Primärtumor bestimmt worden sind [12, 20, 99]. Dies kann dadurch bedingt sein, dass die Tumorzellen sich früh vom Primärtumor abgesiedelt haben und sich unabhängig von diesem in Bezug auf ihre neue Umgebung oder durch den Selektionsdruck verschiedene Therapien entwickelt haben [100, 101]. Diese Unterschiede beziehen sich zum Beispiel auf für die Prognose und Therapie-Wahl relevante Faktoren, wie der Hormonrezeptor- oder HER2-Status [67, 102]. So können dann zum Beispiel HER2-positive Tumorzellen bei Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor nachgewiesen werden [67, 102, 103]. Es besteht jedoch die Vermutung dass HER2-positive Tumorzellen im weiteren Krankheitsverlauf selektioniert werden und HER2-positive Metastasen bilden.

Wenn die Tumorzellen tatsächlich die Vorläufer von Metastasen sein sollten, könnte man mittels ihrer molekularen Charakterisierung zu einer sogenannten „Real-time-biopsie“ gelangen und wichtige Schlüsse bezüglich ihrer Angriffspunkte ziehen [36, 97]. In diesem Zusammenhang wird häufig von „Targeting“ gesprochen, da äußerst zielgerichtete und dementsprechend effektive Therapien ausgewählt werden können. Dadurch könnte eine Biopsie der zum Teil schwer zugänglichen Metastasen umgangen werden. Im Gegensatz zu letzterer ist die Untersuchung von zirkulierenden Tumorzellen auch beliebig oft durchführbar. Da die Haupttodesursache für ein tumorabhängiges Sterben beim Brustkrebs die Metastasierung ist, haben diese Erkenntnisse vermutlich einen höheren Nutzen als die Charakterisierung des Primärtumors und könnten demzufolge in Zukunft eine äußerst bedeutende Basis für individualisierte und zielgerichtete Therapie-Entscheidungen bilden. Voraussetzung für dieses Targeting ist jedoch dass die

Metastasen auch die Eigenschaften der Tumorzellen beibehalten. Die Ergebnisse einer aktuellen Studie von Reuben et al vermindern allerdings diese Aussichten, indem sie beim Primärtumor und den Metastasen andere Eigenschaften festgestellt haben, als bei den zirkulierenden Tumorzellen [104]. Diese neue Feststellung muss jedoch erst weiter nachgeprüft werden. In diesem Kontext untersucht die DETECT-Studie bei metastasierten Mammakarzinompatientinnen den HER2-Status an zirkulierenden Tumorzellen im Blut. Dabei soll erörtert werden, ob der Tumorzellnachweis im Blut das Therapieansprechen reflektiert.

Zusätzlich zu Erkenntnissen bezüglich der Metastasenbiologie bieten uns Tumorzellen auch Einblicke in die Metastasierungsvorgänge selber. Anhand der Unterschiede zwischen dem Primärtumor und den isolierten Tumorzellen könnte sich außerdem zeigen, welche tumorbiologischen Faktoren das Homing der Tumorzellen oder ihre hämatogene Dissemination begünstigen [105, 106]. Insgesamt ist es aber schwierig, einen singulären Zusammenhang zwischen einzelnen tumorbiologischen Faktoren und dem Nachweis hämatogener Tumorzell dissemination herzustellen. Vermutlich ist dies das Ergebnis eines multifaktoriellen Geschehens. Dennoch darf auch dieser Ansatzpunkt nicht außer Acht gelassen werden.

Im vorherigen Absatz gehen wir von der Hypothese aus, dass Metastasen im Krankheitsverlauf durch eine okkulte hämatogene Aussaat der Tumorzellen verursacht werden. Dies würde der bereits in Abschnitt 4.2.1. herangeführten „Seed and Soil“-Theorie von Paget entsprechen. Allerdings hat sich in vielen Studien gezeigt, dass es sich bei diesen Tumorzellen um ruhende, nicht proliferierende Zellen mit niedriger Expression des Proliferationsmarker KI-67 handelt [24, 41]. Diese Charakteristik würde auch die extrem langen Latenzzeiten zwischen Primärdiagnose der Krebserkrankung und einem Rezidiv oder einer Metastasierung, wie man sie vor allem beim Mammakarzinom findet, erklären. Das würde aber weiterhin bedeuten, dass die Tumorzellen im Knochenmark oder im Blut wenig bis gar nicht durch proliferationshemmende Chemotherapeutika angegriffen werden können [15]. Zusätzlich reduziert die Chemotherapie die Zahl der immunkompetenten Zellen im Knochenmark, was auch eine körpereigene Elimination der Tumorzellen unwahrscheinlicher macht. Ein wichtiger Ansatzpunkt sind hier die durch die Phänotypisierung der Tumorzellen ermittelten Therapien. Da diese auf die Eigenschaften der Tumorzellen abgestimmt sind, müssten sie auch eine bessere Elimination letzterer ermöglichen.

Aber es gibt noch einen weiteren Ansatzpunkt: um aus dem ruhenden Zustand heraus aktiv zu werden, bedarf es schließlich einer Reaktivierung oder der Entwicklung von klonogenem Potential. Diese könnten beispielsweise durch günstigere Umfeldbedingungen, einer reduzierten Aktivität des Immunsystems oder organspezifische Faktoren wie z.B. Adhäsionsmoleküle, chemotaktische Signale und Zytokine gefördert werden [107, 108]. Aber auch eine Aktivierung bereits bestehender jedoch nicht genutzter oder durch eine Mutation neu entstandener Fähigkeiten könnten die Zellen aus ihrem „Schlaf“ holen. So kann es zum Beispiel zu einer Synthese autologer Wachstumsfaktoren oder anderer Proteine bzw. Rezeptoren kommen. In diesem Kontext wurde zum Beispiel gezeigt, dass ein positiver Her2-Status auf Tumorzellen mit einem erhöhten Rezidiv-Risiko assoziiert ist [102].

Man könnte versuchen, diese Mechanismen zu erörtern und anschließend zu unterbinden [109]. Leider ist zum heutigen Standpunkt nur wenig über diese Mechanismen bekannt und es wird wohl einige Zeit in Anspruch nehmen, bis die genauen tumorbiologischen Mechanismen der Aktivierung von ruhenden disseminierten Tumorzellen geklärt sind und sich in diesem Bereich therapeutische Ansätze bieten [110].

Dennoch kann man zusammenfassend sagen, dass das neue Verständnis des Metastasierungsprozesses und der Metastasen-Biologie, zu welchem wir durch die Untersuchung von Tumorzellen und ihres genauen Zusammenhang mit der Metastasierung gelangen, vollkommen neue Therapie-Ansätze verschaffen kann und vielleicht ein effektiveres Vorgehen gegen die Haupttodesursache vom Mammakarzinom, der Metastasierung, ermöglichen könnte.

5. Zusammenfassung

Seit über einem Jahrhundert wird versucht, die Rolle von Tumorzellen im Metastasierungsprozess und ihre Aussagekraft zu ergründen. Doch erst seit einigen Jahren stehen Methoden zur Verfügung, die eine ausreichende Detektionsrate und somit eine genaue Untersuchung ihres prognostischen Werts ermöglichen. Seitdem hat sich der Nachweis von disseminierten Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark von Patientinnen mit primären Mammakarzinom als sehr guter prognostischer Parameter erwiesen. Inzwischen wird die Forschung jedoch mit dem Problem konfrontiert, dass sich sehr viele Methoden zum Nachweis von Tumorzellen anbieten. Außerdem haben diese Techniken eine Sensitivität erreicht, welche auch eine zufriedenstellende Detektion der selteneren zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) im Blut ermöglicht. Dadurch stellt sich natürlich die Frage, ob man die invasive, teilweise schmerzhaft und schwer standardisierbare Knochenmarks-Aspiration durch eine einfache Blutentnahme ersetzen kann.

In der vorliegenden Arbeit haben wir versucht, die Nachweisbarkeit von DTZ und CTCs und deren Aussagekraft beim Mammakarzinom untereinander und in Bezug auf zwei spezifische Detektionsmethoden zu vergleichen. Dafür haben wir das Blut und Knochenmark von 97 Patientinnen ausgewertet und die Ergebnisse mit konventionellen Klassifikationskriterien verglichen. Zur Darstellung von DTZ im Knochenmark wurde die lang erprobte und standardisierte Methode der Immunzytochemie mit dem Antikörper A45-B/B3 verwendet. Die Zytospins wurden mit einem manuellen Lichtmikroskop ausgewertet. Das Blut hingegen wurde mit dem relativ neuem, aber vielversprechenden CellSearch-System analysiert, welches die immunomagnetische Anreicherung mit einer immunfluoreszierenden Färbung kombiniert und die Proben mit einem halbautomatisierten Fluoreszenzmikroskop scannt.

Insgesamt konnten bei 38% der Patientinnen DTZ und bei 29% CTCs nachgewiesen. Die Blut- und Knochenmarksbefunde stimmten in 66% der Fälle überein. Dieser Zusammenhang war statistisch signifikant ($p=0,026$). Weiterhin konnten wir beobachten, dass die Tumorzellzahl mit zunehmendem Tumorstadium ansteigt.

Da sich erwiesen hat, dass der Nachweis der disseminierten oder zirkulierenden Tumorzellen vom Stadium des Mammakarzinoms abhängig ist, haben wir die Ergebnisse auch in Bezug auf die verschiedenen Tumorstadien betrachtet. Bei den Patientinnen mit primären Mammakarzinom stellten wir eine nicht signifikante Konkordanz der Knochenmarks- und Blutbefunde von 63% fest. Positive Blutbefunde (19%) waren seltener als positive Knochenmarksbefunde (28%). Zusätzlich haben wir bei diesem Kollektiv die Detektion von DTZ und CTCs mit der TNM-Klassifikation, dem Tumorgrading und dem Hormonrezeptorstatus verglichen. Doch weder der Knochenmarks- noch der Blutstatus korrelierte mit diesen Parametern. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Patientinnen im Follow-up eine höhere Übereinstimmung zwischen den Knochenmarks- und Blutbefunden ($p=0,028$).

Bei den Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom fand sich die höchste Konkordanz zwischen den Knochenmarks- und Blutbefunden. In dieser Gruppe konnten im Gegensatz zu den anderen Tumorstadien häufiger CTCs (90%) als DTZ (80%) nachgewiesen werden. Angesichts der niedrigen Fallzahlen in der Nachsorge und im metastasierten Stadium ist die Aussagekraft unserer Ergebnisse begrenzt. Studien mit höheren Fallzahlen sind jedoch zu ähnlichen Resultaten gekommen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unsere Ergebnisse den Ersatz der Knochenmarks- durch eine Blutanalyse bei der Diagnostik des primären Mammakarzinoms nicht unterstützen. In der Nachsorge jedoch könnte man angesichts der guten Korrelation der Knochenmarks- und Blutbefunde (nach einem ersten Staging mit der Knochenmarksanalyse) den Nachweis von CTCs zur Vervollständigung der Diagnostik und zum Therapie-Monitoring einsetzen. Beim metastasierten Mammakarzinom scheint der Nachweis von CTCs ebenfalls ein hohes Potential zu haben.

Vom methodischen Aspekt her gesehen haben sich in unserem Versuch die Immunzytochemie und das CellSearch-System für den Nachweis von disseminierten beziehungsweise zirkulierenden Tumorzellen bewährt. Andere Methoden wie die PCR optimieren zwar durch ihre höhere Sensitivität die Detektionsraten, dies aber auf Kosten einer unzureichenden Spezifität, welche zu vermehrt falsch-positiven Ergebnissen führt. Schlussfolgernd kann man sagen, dass die von uns verwendeten Methoden die notwendige Sensitivität mit einer guten Spezifität verbinden und

dementsprechend zum Nachweis von Tumorzellen im Blut und Knochenmark geeignet sind.

Eine Fortsetzung der Tumorzellforschung ist von hoher Wichtigkeit. Leider konnten wir in dieser Arbeit nur ansatzweise das Potential dieser Zellen erörtern. Neben ihrem prognostischen Wert und ihrer Eignung zum Monitoring ermöglicht die Phänotypisierung der Tumorzellen das Erstellen von „targeted therapies“, welche sowohl den präzisen Eigenschaften des Tumors beziehungsweise seiner Metastasen als auch dem individuellen Rückfall-Risiko der Patientinnen angepasst sind. Außerdem verschafft uns die Untersuchung der Tumorzellen Einblicke in die Vorgänge der Metastastisierung und dadurch eine wichtige Basis für zukünftige Therapieansätze.

Dennoch ist die augenblickliche Studienlage nicht klar genug, und Knochenmarks- oder Blutbefunde sollten nur im Rahmen von prospektiven klinischen Studien als Parameter für therapeutische Entscheidungen fungieren. Demzufolge wird der Nachweis von disseminierten oder zirkulierenden Tumorzellen vorerst noch im Bereich der translationalen Medizin bleiben.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunzytochemischer Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut mit dem CellSearch System (Veridex LLC, Warren/NJ).....	22
Abbildung 2: Zusammenhang zwischen DTZ im Knochenmark und CTCs im Blut ..	24
Abbildung 3: Zusammenhang DTZ-KM und CTCs (CellSearch) bei Patientinnen mit primären Mammakarzinom.....	27
Abbildung 4: Differenzierung des Mammakarzinoms bei Primärdiagnose anhand der TNM-Klassifikation bei Patientinnen positiven Knochenmarksbefunden, n=20, eine nicht klassifizierte Patientin (Nummer 96).....	28
Abbildung 5: Differenzierung des Mammakarzinoms bei Primärdiagnose anhand der TNM-Klassifikation bei Patientinnen mit CTCs im peripheren Blut, n=13, eine nicht klassifizierte Patientin (Nummer 96)	28
Abbildung 6: Zusammenhang DTZ und CTCs bei Patientinnen im Follow-up.....	33
Abbildung 7: Medianwert der Tumorzellzahlen in Bezug auf die Tumorstadien	46
Abbildung 8: Zusammenhang zwischen CTCs und DTZ bei Patientinnen mit primären Mammakarzinom	48
Abbildung 9: Zusammenhang zwischen CTCs und DTZ bei Patientinnen im Follow-up	54
Abbildung 10: Zusammenhang zwischen CTCs und DTZ bei Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom	55

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Patientinnenmerkmale.....	11
Tabelle 2: Malignitätseinteilung nach Bloom und Richardson.....	15
Tabelle 3: Identifikation von disseminierten Tumorzellen mittels Zytomorphologie und Immunhistochemie	19
Tabelle 4: Gesamtvergleich von DTZ und CTCs, n Gesamt = 97	23
Tabelle 5: Zusammenhang zwischen DTZ und Staging bei Patientinnen mit primärem und metastasierten Mammakarzinom	24
Tabelle 6: Zusammenhang zwischen CTCs und Staging bei Patientinnen mit primären und metastasierten Mammakarzinom	25
Tabelle 7: Vergleich von Knochenmarks- und Blutbefunden bei Primärdiagnose (n=73).....	26
Tabelle 8: Zusammenhang zwischen DTZ und T-Stadium.....	29
Tabelle 9: Zusammenhang zwischen CTCs und T-Stadium	29
Tabelle 10: Zusammenhang zwischen DTZ und Nodalstatus.....	30
Tabelle 11: Zusammenhang zwischen CTCs und Nodalstatus	30
Tabelle 12: Zusammenhang zwischen DTZ und Tumorgrading.....	31
Tabelle 13: Zusammenhang zwischen CTCs und Tumorgrading	31
Tabelle 14: Zusammenhang zwischen DTZ und Hormonrezeptor-Status	32
Tabelle 15: Zusammenhang zwischen CTCs und Hormonrezeptor-Status.....	32
Tabelle 16: Vergleich der Knochenmarks- und Blutbefunde bei Patientinnen in der Nachsorge.....	33
Tabelle 17: Vergleich der Knochenmarks- und Blutbefunde bei Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom	34
Tabelle 18: Zusammenhang zwischen DTZ und primärem oder metastasierten Mammakarzinom	40
Tabelle 19: Zusammenhang zwischen CTCs und primärem oder metastasierten Mammakarzinom	44

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 20: Korrelation der Stadien mit disseminierten oder zirkulierenden Tumorzellen.....	46
Tabelle 21: Tumorzellzahl in Bezug auf das Tumorstadium.....	46

8. Literaturverzeichnis

1. Ashworth, T., *A case of cancer in which cells similar to those in tumors were seen in blood after death*. Aust Med, 1869. **14**: p. 146-149.
2. Sandberg, A.A. and G.E. Moore, *Examination of blood for tumor cells*. J Natl Cancer Inst, 1957. **19**(1): p. 1-11.
3. Rohr K., H.R., *Tumorzellen im Sternalpunktat*. Deutsch. Arch. Klin. Med., 1936. **179**: p. 61-79.
4. Baldus, F., *Über den Nachweis von Tunorzellen im strömenden Blut*. Journal of molecular Medicine, 1960. **Vol 38**(17): p. 845-846.
5. Bauer, K., *Das Krebsproblem*. Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1946.
6. Pantel, K., R.J. Cote, and O. Fodstad, *Detection and clinical importance of micrometastatic disease*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(13): p. 1113-24.
7. Alix-Panabieres, C., V. Muller, and K. Pantel, *Current status in human breast cancer micrometastasis*. Curr Opin Oncol, 2007. **19**(6): p. 558-63.
8. Fisher, B., et al., *The dissemination of subcutaneously inoculated tumor cell suspensions*. Arch Surg, 1969. **98**(3): p. 347-51.
9. Braun, S., et al., *Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy*. J Clin Oncol, 2001. **19**(5): p. 1468-75.
10. Gerber, B., et al., *Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors*. J Clin Oncol, 2001. **19**(4): p. 960-71.
11. Woelfle, U., et al., *Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5679-84.
12. Klein, C.A., et al., *Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer*. Lancet, 2002. **360**(9334): p. 683-9.
13. Abdul-Karim, F., *Bone metastasis from gynecologic carcinomas: a clinicopathological study*. Gynecological oncology, 1990. **39**.
14. Rosner, D. and W.W. Lane, *Predicting recurrence in axillary-node negative breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 1993. **25**(2): p. 127-39.
15. Becker, S., et al., *Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **106**(2): p. 239-43.
16. Bidard, F.C., et al., *Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells*. 2008. p. mdm507.
17. Slade, M.J. and R.C. Coombes, *The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2007. **4**(1): p. 30-41.
18. Braun, S., 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): p. 525-33.
19. Diel, I.J., 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): p. 1652-8.

20. Gangnus, R., et al., *Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3457-64.
21. Gebauer, G., et al., *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): p. 3669-74.
22. Remmele, S., *Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue*. Pathologe, 1987 May. **8**(3): p. 138-40.
23. Fehm, T., 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): p. 885-92.
24. Pantel, K., et al., *Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(17): p. 1419-24.
25. Putz, E., et al., *Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases*. Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 241-8.
26. Schmidt-Kittler, O., 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): p. 7737-42.
27. Symmans, W.F., et al., *Breast cancer heterogeneity: evaluation of clonality in primary and metastatic lesions*. Hum Pathol, 1995. **26**(2): p. 210-6.
28. Borgen, E., et al., *Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase*. J Pathol, 1998. **185**(4): p. 427-34.
29. Borgen, E., et al., *Use of automated microscopy for the detection of disseminated tumor cells in bone marrow samples*. Cytometry, 2001. **46**(4): p. 215-21.
30. Borgen E, N.B., Nesland JM, 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. **1**: p. 377-388.
31. Riethdorf, S., et al., *Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(3): p. 920-8.
32. Cristofanilli, M., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. Semin Oncol, 2006. **33**(3 Suppl 9): p. S9-14.
33. Allard, W.J., 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): p. 6897-904.
34. Pantel, K., E. Felber, and G. Schlimok, *Detection and characterization of residual disease in breast cancer*. J Hematother, 1994. **3**(4): p. 315-22.
35. Woelfle, U., et al., *Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(8): p. 2670-4.
36. Janni, W., Pantel, K., Rack, B., Schindlbeck C., Sommer, H., Gerber ., Friese K., *Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von*

- Brustkrebspatientinnen*. Deutsches Ärzteblatt, 2004. **101**(51-52): p. 3496-3502.
37. Redding, W.H., et al., *Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer*. Lancet, 1983. **2**(8362): p. 1271-4.
38. Braun, S., et al., *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 793-802.
39. Bidard, F.C., et al., *Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(11): p. 3306-11.
40. Witzig, T.E., 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): p. 1085-91.
41. Muller, V., et al., *Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Correlation to Bone Marrow Micrometastases, Heterogeneous Response to Systemic Therapy and Low Proliferative Activity*. 2005. p. 3678-3685.
42. Pierga, J.Y., 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): p. 1392-400.
43. Vincent-Salomon, A., F.C. Bidard, and J.Y. Pierga, *Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues*. J Clin Pathol, 2007.
44. Naume, B., et al., *The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(9): p. 3091-7.
45. Wiedswang, G., et al., *Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer*. Int J Cancer, 2006. **118**(8): p. 2013-9.
46. Janni, W., 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): p. 884-91.
47. Wiedswang, G., et al., *Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(18): p. 3469-78.
48. Naume, B., et al., *Clinical significance of isolated tumor cell detection in peripheral blood in breast cancer patients three years after diagnosis. Comparison between analysis of peripheral blood and bone marrow*. 2004. p. 9554-.
49. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(7): p. 1420-30.
50. Ross, A.A., et al., *Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques*. Blood, 1993. **82**(9): p. 2605-10.
51. Balic, M., et al., *Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients*. Cytometry B Clin Cytom, 2005. **68**(1): p. 25-30.
52. Rack, B.K., et al., *Prognostic relevance of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy: The German SUCCESS-Trial*. 2008. p. 503-.
53. Rack, B.K., et al., *Circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of primary breast cancer patients*. 2007. p. 10595-.

54. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 448-56.
55. Müller V, R.S., Loibl S, et al, *Prospective monitoring of circulating tumor cells in breast cancer patients treated with primary systemic therapy - a translational project of the German Breast Group study GeparQuattro*. Proc Am Soc Clin Oncol, 2007. **25**.
56. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden*. Clin Breast Cancer, 2007. **7**(6): p. 471-9.
57. J. Moreno, J.S.D.a.D.S.e.a., *Multi-center study evaluating circulating tumor cells (CTCs) as a surrogate for survival in men treated for castration refractory prostate cancer (CRPC)*. Annual Meeting Proceedings. **25**.
58. Dawood, S., et al., *Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system?* Cancer, 2008. **113**(9): p. 2422-30.
59. Benoy, I.H., et al., *Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer*. Br J Cancer, 2006. **94**(5): p. 672-80.
60. Andre, F., et al., *Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer*. Ann Oncol, 2006. **17**(6): p. 945-51.
61. Minn, A.J., et al., *Genes that mediate breast cancer metastasis to lung*. Nature, 2005. **436**(7050): p. 518-24.
62. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. 1889. Cancer Metastasis Rev, 1989. **8**(2): p. 98-101.
63. Sleeman, J.P. and N. Cremers, *New concepts in breast cancer metastasis: tumor initiating cells and the microenvironment*. Clin Exp Metastasis, 2007. **24**(8): p. 707-15.
64. Kaplan, R.N., B. Psaila, and D. Lyden, *Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(4): p. 521-9.
65. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-8.
66. Muller, V. and K. Pantel, *Bone marrow micrometastases and circulating tumor cells: current aspects and future perspectives*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(6): p. 258-61.
67. Meng, S., et al., *Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8152-62.
68. Slade, M.J., et al., *Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment*. Br J Cancer, 2009. **100**(1): p. 160-6.
69. Cote, R.J., *Occult metastases: real harm or false alarm?* J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **126**(2): p. 332-3.
70. Wiedswang, 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): p. 5342-8.
71. Coombes, R.C., et al., *A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(11): p. 1081-92.

72. Coombes, R.C., et al., *Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2007. **369**(9561): p. 559-70.
73. Hayes, D.F., et al., *Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival*. 2006. p. 4218-4224.
74. Budd, G.T., et al., *Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(21): p. 6403-9.
75. Saad, A., et al., *Correlation among [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography, cancer antigen 27.29, and circulating tumor cell testing in metastatic breast cancer*. *Clin Breast Cancer*, 2008. **8**(4): p. 357-61.
76. Alix-Panabieres, C., S. Riethdorf, and K. Pantel, *Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(16): p. 5013-21.
77. Dawood, S. and M. Cristofanilli, *Integrating circulating tumor cell assays into the management of breast cancer*. *Curr Treat Options Oncol*, 2007. **8**(1): p. 89-95.
78. Ellis M, H.D., Lippman ME. , *Treatment of metastatic breast cancer*. Harris J, Lippman M, Morrow M, Osborne CK, editors; Lippincott Williams & Wilkins;. **Diseases of the breast**: p. p. 1101-62.
79. Smith, B.M., et al., *Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(7): p. 1432-9.
80. Benoy, I.H., et al., *Prognostic significance of disseminated tumor cells as detected by quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction in patients with breast cancer*. *Clin Breast Cancer*, 2006. **7**(2): p. 146-52.
81. Farnen, R.K., et al., *Bone marrow cytokeratin 19 mRNA level is an independent predictor of relapse-free survival in operable breast cancer patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **108**(2): p. 251-8.
82. Braun, S., et al., *Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease*. *Int J Cancer*, 1999. **84**(1): p. 1-5.
83. Nakagawa, T., et al., *Detection of Circulating Tumor Cells in Early-Stage Breast Cancer Metastasis to Axillary Lymph Nodes*. 2007. p. 4105-4110.
84. Zippelius, A., et al., *Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow*. *J Clin Oncol*, 1997. **15**(7): p. 2701-8.
85. Bostick, P.J., et al., *Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients*. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(8): p. 2632-40.
86. Ring, A.E., et al., *Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(5): p. 906-12.
87. Goeminne, J.C., et al., *Unreliability of carcinoembryonic antigen (CEA) reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in detecting contaminating breast cancer cells in peripheral blood stem cells due to induction of CEA by growth factors*. *Bone Marrow Transplant*, 1999. **24**(7): p. 769-75.

88. Sleijfer, S., et al., *Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation?* Eur J Cancer, 2007. **43**(18): p. 2645-50.
89. Kraeft, S.K., et al., *Reliable and sensitive identification of occult tumor cells using the improved rare event imaging system.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(9): p. 3020-8.
90. Iakovlev, V.V., et al., *Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR.* Breast Cancer Res Treat, 2008. **107**(1): p. 145-54.
91. Zach, O. and D. Lutz, *Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow.* Curr Opin Oncol, 2006. **18**(1): p. 48-56.
92. Wingren, S., et al., *Loss of cytokeratins in breast cancer cells using multiparameter DNA flow cytometry is related to both cellular factors and preparation procedure.* Anal Cell Pathol, 1995. **9**(3): p. 229-33.
93. Vredenburg, J.J., et al., *A comparison of immunohistochemistry, two-color immunofluorescence, and flow cytometry with cell sorting for the detection of micrometastatic breast cancer in the bone marrow.* J Hematother, 1996. **5**(1): p. 57-62.
94. Molino, A., et al., *Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis.* Breast Cancer Res Treat, 1997. **42**(1): p. 23-30.
95. Panabieres, C., et al., *Identification of biologically active cancer cells in blood and bone marrow of cancer patients.* 2007. p. 1001-.
96. Riethdorf, S., H. Wikman, and K. Pantel, *Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients.* Int J Cancer, 2008. **123**(9): p. 1991-2006.
97. Braun, S., et al., *Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow.* Clin Cancer Res, 1999. **5**(12): p. 3999-4004.
98. Rack, B., et al., *[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): p. 285-9.
99. Cardoso, F., et al., *Evaluation of HER2, p53, bcl-2, topoisomerase II-alpha, heat shock proteins 27 and 70 in primary breast cancer and metastatic ipsilateral axillary lymph nodes.* Ann Oncol, 2001. **12**(5): p. 615-20.
100. Pantel, K., et al., *Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6326-34.
101. Schardt, J.A., et al., *Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer.* Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 227-39.
102. Wulfing, P., et al., *HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(6): p. 1715-20.
103. Solomayer, E.F., 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): p. 179-84.
104. Reuben, J.M., et al., *Genomic of circulating tumor cells in metastatic breast cancer.* 2007. p. 1002-.
105. Wicha, M.S., *Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(19): p. 5606-7.
106. Naumov, G.N., et al., *Tumor-vascular interactions and tumor dormancy.* Apmis, 2008. **116**(7-8): p. 569-85.

107. Naumov, G.N., et al., *A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(5): p. 316-25.
108. Marches, R., R. Scheuermann, and J. Uhr, *Cancer dormancy: from mice to man*. Cell Cycle, 2006. **5**(16): p. 1772-8.
109. Aguirre-Ghiso, J.A., *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(11): p. 834-46.
110. Vessella, R.L., K. Pantel, and S. Mohla, *Tumor cell dormancy: an NCI workshop report*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(9): p. 1496-504.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt vor allem meinem Betreuer PD. Dr. med. Ch. Schindlbeck für die Überlassung des Themas, die Hilfe bei der Datenerfassung und die Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation.

Weiterhin möchte ich mich bei dem Team der medizinisch-technischen Assistentinnen bedanken. Dank ihrer guten Laune hat die Arbeit im Labor immer viel Spaß gemacht.

Herzlicher Dank gebührt meinen Eltern. Vielen Dank für Euren Rückhalt sowie die mentale und materielle Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung. Merci pour tout.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund David bedanken. Erst durch seinen geduldigen Beistand und sein mühevollles Korrekturlesen konnte diese Arbeit vollendet werden.