

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese)

**Charakterisierung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von
Mammakarzinompatientinnen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ewa Zombirt

aus

Warschau

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. habil. H. L. Sommer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Doris Mayr

Prof. Dr. Björn Lampe

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Brigitte Rack

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

12.05.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	6
2	Zielsetzung.....	13
3	Material und Methodik.....	15
3.1	Material	15
3.2	Methoden	15
3.2.1	Durchführung einer Knochenmarkaspiration.....	15
3.2.2	Aufbereitung des Knochenmarkspirates	16
3.2.3	Bestimmung des HER-2/neu Status der Tumorzellen.....	26
3.3	Klinische Auswertung.....	33
3.3.1	Tumorhistologie	33
3.3.2	Tumorgröße	34
3.3.3	Stadieneinteilung	34
3.3.4	Grading	39
3.3.5	Hormonrezeptorstatus	39
3.3.6	HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor	39
3.3.7	Nachbeobachtung.....	41
3.4	Statistische Auswertung.....	43
3.4.1	Datenerfassung.....	43
3.4.2	Statistische Methoden.....	44
4	Ergebnisse	46
4.1	Übersichtsdaten des Gesamtkollektivs	46
4.1.1	Altersverteilung	46

4.1.2	Menopausenstatus.....	47
4.1.3	Tumorstadium	47
4.1.4	Tumorlokalisation	48
4.1.5	Tumorhistologie	49
4.1.6	Grading	50
4.1.7	Hormonrezeptorstatus	51
4.1.8	HER-2/neu-Status.....	51
4.1.9	Lymphknotenstatus.....	53
4.1.10	Lymphogene und hämatogene Streuung.....	54
4.1.11	Operatives Vorgehen	55
4.1.12	Strahlentherapie.....	55
4.1.13	Adjuvante systemische Therapie	56
4.1.14	Nachbeobachtungszeit	57
4.1.15	Rezidiv	57
4.1.16	Fernmetastasen	57
4.2	Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark.....	58
4.2.1	Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark bei Erstdiagnose	58
4.2.2	Vergleich der Daten bei Primärpunktion und unmittelbar nach abgeschlossener Chemotherapie.....	63
4.2.3	Vergleich der Daten bei Primärpunktion und in der rezidivfreien Nachsorge (außer unmittelbar nach Chemotherapie).	65
4.2.4	Vergleich des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor und den DTC bei gesichertem Rezidiv	67
4.2.5	Vergleich des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor und den DTC bei Metastasierung.....	68

4.2.6	Heterogenität des HER-2/neu-Status auf den disseminierten Tumorzellen	68
5	Diskussion.....	69
5.1	Aktueller Stand der Literatur	70
5.2	Vergleich unserer Ergebnisse mit denen in der Literatur	73
5.2.1	HER-2/neu-Status des Primärtumors in veröffentlichten Studien	73
5.2.2	HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen (DTC) in veröffentlichten Studien	74
5.2.3	Heterogenität des HER-2/neu-Status unter den DTC einer Punktion in veröffentlichten Studien	75
5.2.4	HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen vs. andere Prognosefaktoren	76
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	77
5.4	Ausblick.....	80
5.5	Schlussfolgerung.....	84
6	Zusammenfassung.....	85
7	Anhang.....	87
8	Literaturverzeichnis	91
9	Abbildungsverzeichnis.....	98
10	Tabellenverzeichnis	99
11	Abkürzungsverzeichnis.....	101
12	Danksagung	102

1 Einführung

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor der Frau. In Deutschland erkranken jährlich ca. 57000 Frauen an Brustkrebs. Für das Jahr 2007 wird von 16780 Sterbefällen bei Frauen aufgrund des Mammakarzinoms berichtet.¹ Etwa jede zehnte Frau wird im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkranken (Lebenszeitrisiko 12%). Das Mammakarzinom bildet mit 27,8 % den größten Anteil an Krebserkrankungen bei Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt derzeit bei 63 Jahren. Generell stieg die Brustkrebsinzidenz in Deutschland seit 1980 stetig an, während die Mortalität seit Mitte der 1990er Jahre leicht sinkt.²

Beim primären Mammakarzinom ist man durch Bestimmung der etablierten Prognosefaktoren bemüht, möglichst genaue individuelle Aussagen über den prospektiven Krankheitsverlauf vorzunehmen. Hierzu gehören das TNM-Stadium, das histopathologische Grading, Steroidhormonrezeptorstatus, Expressionsmuster des HER-2/neu-Onkoproteins auf dem Primärtumor und weitere tumorbiologische Faktoren. Evidenzbegründet sind noch weitere Risikofaktoren (wie Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, tumorassoziierte Proteolysefaktoren uPA und PAI-1 oder Tumormarker CA 15-3), die allerdings bisher nicht Eingang in die Leitlinien gefunden haben.

Die Entscheidung über die Therapie des Mammakarzinoms beruht neben dem operativen Verfahren vor allem auf evidenzbasierten prädiktiven Faktoren, die das Ansprechen der jeweiligen Therapie vorhersagen können. Zu diesen Faktoren gehören der Menopausenstatus der Frau, der Steroidhormonrezeptorstatus des Primärtumors und der Expressionsgrad des HER-2/neu-Onkoproteins auf dem

Primärtumor. Mit Kenntnis dieser Faktoren ist mit Optimierung der Therapie für jede Frau individuell zu rechnen.

Früherkennungsuntersuchungen beim niedergelassenen Gynäkologen und Mammographie-Screening erlauben heutzutage die Diagnose von Mammakarzinomen häufig in einem sehr frühen und somit prognostisch günstigeren Stadium. Die Statistiken, die das Mammakarzinomrezidiv beschreiben, offenbaren jedoch, dass 25-30% der Patientinnen ohne Lymphknotenbefall (N0), also mit einer guten Prognose, ein Rezidiv erleiden. Unter den Patientinnen mit LK Metastasen (N1) sind es 60%.³⁻⁶ Das aktuelle Model der Metastasierung beim Mammakarzinom geht daher von einer systemischen Streuung von Tumoreinzellen aus. Diese Zellen können mit konventionellen histopathologischen sowie bildgebenden diagnostischen Standardverfahren nicht erfasst werden. Mehrere internationale Studien haben gezeigt, dass sich bei vielen Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose disseminierte Tumorzellen (DTC) im Knochenmark nachweisen lassen.⁷⁻¹⁰ Diese DTC werden auch als Minimal Residual Disease (MRD) bezeichnet. Es wird vermutet, dass diese hämatogene Disseminierung von Tumorzellen ausschlaggebend für die Karzinogenese und darauffolgenden Metastasierung sein kann. Es wurden deshalb sensitive immunzytochemische und molekularbiologische Methoden entwickelt, die den spezifischen Nachweis von einzelnen Tumorzellen in den regionalen Lymphknoten, im Knochenmark und im Blut erlauben, noch bevor es zu Manifestation der Metastasen kommt. Ein Nachweis von DTC zum Zeitpunkt der Erstdiagnose könnte somit dazu beitragen, Patientinnen zu identifizieren, die ein

erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen und von einer adjuvanten systemischen Therapie profitieren könnten.

Diese einzelnen Tumorzellen entstammen ursprünglich dem epithelialen Gewebe. Im Knochenmark können sie mit Hilfe von Antikörpern, die gegen Zytokeratine gerichtet sind, immunzytochemisch erfasst werden. In Studien wurde der monoklonale Antikörper A45-B/B3 eingesetzt, mit dem 99% der normalen Knochenmarkszellen nicht reagieren. 20-45% aller Patientinnen mit primärem Mammakarzinom zeigen nach den Studien bei Erstdiagnose isolierte Tumorzellen im Knochenmark. Bei metastasierten Patientinnen steigt dieser Anteil bis 70%.¹¹ Ihre Häufigkeit unter den isolierten mononukleären Zellen liegt in der Größenordnung 1:10⁶. Es wurden deswegen Anreicherungsmethoden entwickelt, die eine höhere Sensitivität und weitere Charakterisierung dieser Zellen ermöglichen. Dazu gehören die heute am häufigsten genutzten Verfahren der Gradientenzentrifugierung, wie das Ficoll-basierte oder Onco Quick-Verfahren, sowie Methoden, die die Zellen nach ihrer Größe oder Ladung aufzutrennen vermögen, z.B. die immunomagnetische Anreicherung.^{12;13}

Der Nachweis von DTC stellte sich in vielen Studien als wichtiger prognostischer Faktor in Hinblick auf das Gesamt- und rezidivfreie Überleben heraus.¹⁴⁻¹⁷ Die unabhängige prognostische Relevanz konnte ebenso durch einige Arbeitsgruppen bestätigt werden.¹⁸⁻²³

Auch das periphere Blut von Brustkrebspatientinnen wird aktuell für das Screening auf DTC, hier zirkulierende Tumorzellen (CTC) genannt, verwendet. Im Vergleich zu DTC sind CTC allerdings nur relativ selten nachweisbar. Derzeit befinden sich deshalb innovative Nachweismethoden der CTC in Erprobung. Cristofanilli et al. zeigte, dass im Stadium der Metastasierung die Zahl der CTC vor einer weiteren

Behandlung einen unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben darstellt.²⁴ Ihre Bedeutung bei Erstdiagnose und in rezidivfreier Nachsorge ist jedoch noch nicht bewiesen. Trotz des Vorteils, dass CTCs nicht invasiv aus dem peripheren Blut zu gewinnen wären, ist die klinische Datenlage bezüglich der CTC im Blut bisher der von DTC im Knochenmark unterlegen.²⁵⁻²⁸ Bisher konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der CTC im Blut der Brustkrebspatientinnen vom Primärtumor stammt.²⁹

Werden DTC nachgewiesen, ist deren weitere Charakterisierung notwendig. Die biologischen Eigenschaften der DTC sind derzeit weiterhin Gegenstand zahlreicher Studien, wodurch die Einsicht in die kritischen ersten Schritte der Metastasierungskaskade ermöglicht wird.^{10;20;30-35} Durch Analyse der genetischen Zusammensetzung dieser Zellen (Phänotypisierung), z.B. in Bezug auf die HER-2/neu-Überexpression, wird ihre metastatische und prognostische Relevanz eingestuft.^{36;37} Das Genom dieser Zellen stellt sich jedoch instabil dar, weshalb sich oft im Einzelzellvergleich ein heterogenes Bild ergibt.³³ Es wird auch vermutet, dass die DTC im Knochenmark in einem frühen, noch nicht ausgereiften Stadium ihrer Entwicklung metastasieren und ihre Veränderungen im Genom erst später erlangen.³⁸

Man geht zudem davon aus, dass die DTC in der G0-Phase des mitotischen Zellzyklus verbleiben, d.h. dass sie im Gegensatz zu den Zellen des Primärtumors nicht proliferieren. Man nennt sie deshalb ruhende oder schlafende Zellen, sog. dormant cells. Studien zeigten, dass sie durch diese Eigenschaft den herkömmlichen Chemotherapieregimes nicht zugänglich sind, da diese auf sich schnell teilende Zellen wirken. Die Chemotherapeutika waren nicht in der Lage, DTC vollständig zu eliminieren.^{39;40}

In der Adjuvanz bedarf es deshalb zusätzlich zielgerichteter Agenzien, die die verbliebenen DTC eliminieren oder ihre weitere Ausbreitung verhindern.

Das HER-2/neu-Onkoprotein (Human Epidermal Growth Factor Receptor – 2, c-erbB2) ist ein vielversprechendes Target für zielgerichtete Immuntherapeutika. HER-2/neu gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR). Es stimuliert die Zellproliferation über den RAS-MAP-Kinase-Weg und hemmt den programmierten Zelltod (Apoptose). Kodiert wird das HER-2/neu durch ein Protoonkogen auf dem Chromosom 17. Die Überexprimierung des Proteins, die in ca. 20 – 30% aller Mammakarzinome vorkommt, wird mit Aggressivität sowie Widerstand gegen Chemotherapieregime in Verbindung gebracht.⁴¹⁻⁴³ HER-2/neu-positive Tumoren sind von einem schlechteren Ansprechen auf endokrine Therapie, alkylierende Zytostatika und Radiotherapie gekennzeichnet.⁴⁴ HER-2/neu-Status ist somit ein prädiktiver Faktor für den Therapieerfolg. Patientinnen mit HER-2/neu-überexprimierenden Tumoren haben ein höheres Rezidivrisiko und eine geringere Lebenserwartung. Ein Zusammenhang zwischen der HER-2/neu-Genamplifikation und dem Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark konnte jedoch bis dato lediglich in einer Arbeit gezeigt werden.⁴⁵ Die Therapie mit Herceptin® (Trastuzumab) wird bei Patienten mit einer nachgewiesenen Amplifikation bzw. Überexpression des HER-2/neu angewandt. Trastuzumab ist ein therapeutischer humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER-2/neu auf der Tumorzelloberfläche. Trastuzumab hemmt die neoplastische Zellproliferation *in vitro* und *in vivo* und erhöht die Tumor-Chemosensitivität.^{46;47} In Deutschland ist Trastuzumab seit dem Jahr 2000 zum Einsatz bei metastasiertem HER-2/neu positivem Mammakarzinom zugelassen. Die Anwendung des Antikörpers zur

Verhinderung von Rezidiven nach erfolgter Operation wurde 2006 basierend auf Datenlage aus großen internationalen Studien: HERceptin Adjuvant (HERA) - Studie, North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) - Studie N9831, National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) - 31 und Breast Cancer International Research Group 006, auch bei nicht metastasierten Patientinnen zugelassen und ergänzt nun die Möglichkeiten der adjuvanten Therapie.⁴⁸⁻⁵⁰

Nach dem heutigen Standard wird der HER-2/neu Status des Primärtumors, gegebenenfalls auch der Metastasen, wenn eine Histologie gewonnen werden kann, zur Therapieentscheidung herangezogen. Der Nachweis von DTC im Knochenmark oder Blut wird dabei nicht berücksichtigt. Studien beweisen jedoch, dass der Phänotyp der DTC in Bezug auf den HER-2/neu-Status von dem des Primarius abweichen kann.⁵¹ Zwischen den Fernmetastasen und dem Primärtumor konnte eine Diskrepanz von 5 bis 20% nachgewiesen werden.^{30;52;53} Patientinnen mit einem HER-2/neu-negativen Primärtumor und gleichzeitig HER-2/neu-positiven DTC im Knochenmark könnten möglicherweise von einer Trastuzumabtherapie profitieren, die sie aber nach den heutigen Leitlinien aufgrund der HER-2/neu-Negativität des Primarius nicht erhalten würden.⁵³ Es zeigt sich auch keine signifikante Korrelation zwischen positivem Knochenmarkbefund (Nachweis von DTC) und HER-2-Status des Primärtumors. Darüber hinaus ist die HER-2/neu-Überexpression auf den DTC auch zwischen zwei Zellen eines einzelnen Patienten oft heterogen, was die intratumorale Heterogenität der HER-2/neu-Expression widerspiegeln könnte.³³ Bei diesen Patienten könnte eine Therapie mit Trastuzumab nicht ausreichen, um die Minimal Residual Disease vollständig zu eliminieren. In dem Fall wäre die Effizienz einer nur gegen das HER-2/neu-Antigen gerichteten Immuntherapie möglicherweise

herabgesetzt und müsste durch weitere Therapieregimes ergänzt werden. Vielversprechende Kandidaten für zielgerichtete sekundäre Immuntherapien, die derzeit in klinischen Studien untersucht werden, sind u.a. tumorassoziierte Glykoproteine oder Rezeptoren für andere Wachstumsfaktoren.

2 Zielsetzung

Nach dem heutigen Wissensstand werden in der Behandlung von Mammakarzinompatientinnen Prognosefaktoren, wie die Tumorgröße, der axilläre Lymphknotenstatus und das histopathologische Grading als grobe Risikoeinschätzung für das Auftreten eines Rezidivs genutzt. Diese lassen aber keine sicheren Rückschlüsse auf den individuellen Therapieerfolg zu, da sie nur zum Zeitpunkt der Primärdiagnose verfügbar sind. Es besteht also ein hoher Bedarf für einen jederzeit verfügbaren Marker zur Risikoeinschätzung im weiteren Verlauf der Erkrankung und zum Therapiemonitoring. Der Nachweis von Tumorresiduen im Knochenmark und Blut sowie Charakterisierung deren HER-2/neu-Profiles könnte dafür geeignet sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Nachweis der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und anschließend eine Charakterisierung der HER-2/neu-Expression dieser Zellen mittels Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) durchgeführt.

Damit sollte ermittelt werden:

- der Zusammenhang zwischen bekannten Prognosefaktoren (TNM-Klassifikation, Grading, Hormonrezeptorstatus) und einer HER-2/neu-Expression disseminierter Tumorzellen,
- der Unterschied zwischen den Zellen des Primärtumors und den disseminierten Tumorzellen hinsichtlich des HER-2/neu-Status,
- Unterschiede im HER-2/neu-Expressionsmuster zwischen den einzelnen Tumorzellen bei Patientinnen mit mehreren Tumorzellen im Knochenmark,

- die Rolle von HER-2/neu-überexprimierenden disseminierten Tumorzellen als Marker für den Therapieerfolg,
- Eignung der HER-2/neu-positiven DTC als Therapieziel.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll daher überprüft werden, ob das Vorhandensein von Tumorresiduen in Form von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, sowie deren tumorbiologischer Phänotyp hinsichtlich der HER-2/neu-Expression, einen relevanten Einfluss auf die Optimierung der zukünftigen Therapieansätze bei Brustkrebspatientinnen haben könnten.

3 Material und Methodik

3.1 Material

Für die vorliegende Arbeit wurde das Knochenmark von Patientinnen mit histopathologisch nachgewiesenem Mammakarzinom verwendet. In die Studie wurden nur solche Patientinnen eingeschlossen, bei denen im Verlauf der Erkrankung disseminierte Tumorzellen (DTC) im Knochenmark nachgewiesen wurden. Das Untersuchungsmaterial wurde dabei mit der Knochenmarkaspiration aus den Beckenkämmen gewonnen.

Die Untersuchungsgruppe setzt sich aus insgesamt 156 Patientinnen zusammen, die im Zeitraum von Mai 1995 bis Dezember 2007 an der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt oder am Klinikum Bayreuth bei Erstdiagnose Mammakarzinom behandelt wurden.

Im Verlauf wurde bei einigen Patientinnen zur Nachsorge mehrfach das Knochenmark entnommen und im Labor für Tumorimmunologie der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt untersucht.

3.2 Methoden

3.2.1 Durchführung einer Knochenmarkaspiration

Von allen Patientinnen wird vor der Knochenmarkspunktion in der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt die schriftliche Einwilligung zum Eingriff sowie zur wissenschaftlichen Auswertung der aus dem Punktionsmaterial gewonnenen Erkenntnisse eingeholt. Zur Aufklärung über die möglichen Zwischenfälle dient das im Anhang beigefügte Merkblatt.

Die Patientinnen wurden über die allgemeinen Risiken einer Knochenmarkspunktion wie Blutung, Infektion und Störung der Wundheilung, sowie Verletzung der Iliakalgefäße (aufgrund von der gewählten Punktionsstelle an der Spina iliaca anterior superior) aufgeklärt. Zu den seltenen, aber gefährlichen Komplikation gehört auch die Osteomyelitis.

Die Knochenmarkspunktion wird an der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt im Bereich der Spina iliaca anterior superior vorgenommen. Nach sorgfältiger Desinfektion der Punktionsstelle und einer kleinen Schnittinzision der Haut, um eine Kontamination mit Epithelzellen der Haut zu vermeiden, werden 3 – 5 ml aus den Beckenkämmen entnommen und mit 0,5 – 1ml Heparin versetzt.

Der Eingriff wird bei Verdacht auf Mammakarzinom vor Beginn der Primäroperation in Vollnarkose durchgeführt. Zur Verlaufskontrolle oder Nachsorge wird er jedoch ambulant in Lokalanästhesie vorgenommen.

Das gewonnene Untersuchungsmaterial wird unmittelbar nach der Punktion im tumorimmunologischen Labor nach dem in Kapitel 3.2.2 geschilderten Verfahren verarbeitet.

3.2.2 **Aufbereitung des Knochenmarkspirates**

Die hier beschriebene Aufbereitung des Knochenmarkspirates umfasst zwei Arbeitsschritte: Herstellung von knochenmarktragenden Objektträgern (sog. Zytospins) und Detektion von zytokeratin-positiven Zellen mittels Immunzytologie. Im tumorimmunologischen Labor der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt wird die Verarbeitung des gewonnenen Knochenmarkspirates sowie die nachfolgende Detektion und Darstellung von

zytokeratin-positiven Zellen gemäß dem vom Pantel et al. 1994 erstellten Protokoll durchgeführt⁵⁴. 2006 haben die Experten der Gesellschaften für Senologie aus Deutschland, Österreich und der Schweiz die bestehenden Nachweismethoden von DTC evaluiert und einen Konsensus für deren standardisierten Nachweis und die klinische Implementierung festgelegt.⁸

3.2.2.1 Herstellung von Zytospins

Das Knochenmark wird unter sterilen Bedingungen direkt aus der Kanüle in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit steriler Hankscher Lösung auf 50ml aufgefüllt und 10 min. bei 900 rpm (Umdrehungen pro Minute) bei $r = 16$ (entspricht 160g) bei 9°C in einer Hettich Zentrifuge Universal 30F zentrifugiert (Auslauf ohne Bremse). Dadurch trennt sich die Fettphase (oberer Überstand), in der Fettpartikel, Plasma und Detritus enthalten sind, von der Zellsuspension (Sediment). Den zu verwerfenden oberen Überstand mit Fettphase pipettiert man vorsichtig ab und die verbleibende Zellsuspension (Pellet) wird unter sterilen Bedingungen in einem 15ml Zentrifugenröhrchen langsam mit 8ml des Dichtegradienten Ficoll-Hypaque überschichtet. Das Röhrchen wird sofort bei 2300 rpm bei $r = 16$ (bzw. 950 – 1000g) bei 9°C 20 min. lang zentrifugiert (Auslauf ungebremst), wodurch sich die in der Suspension enthaltenen Tumorzellen, Knochenmarkzellen und Leukozyten aus der peripheren Blutbeimengung in einem Interphasenring anreichern. Die Interphase sowie die obere Phase werden dann mit einer 5ml Pipette abgenommen und in ein neues 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei ist es darauf zu achten das Aufnehmen von Ficoll möglichst zu vermeiden. Das Röhrchen wird mit Phosphatpuffer PBS (pH = 7,4) auf 50ml aufgefüllt und zum Vermischen geschüttelt. Es folgt eine Zentrifugation bei 1600

rpm bei $r = 21$ (bzw. 540g) bei 9°C für 10min (Auslauf mit Bremse). Der Überstand wird abgegossen und das Sediment in 2-3 ml PBS resuspendiert. Das Gesamtvolumen wird dann mit Hilfe einer Pipette genau bestimmt.

Folglich werden 10 μl Suspension und 10 μl Trypanblau-Lösung auf einer Mikrotiterplatte mit einer Eppendorfpipette gemischt, was die anschließende Bestimmung der Zelldichte sowie der Vitalität der Zellen ermöglicht. Es folgt die Auszählung von Zellen in der Neubauer-Zählkammer. Es werden mononukleäre Zellen in 25 Gruppen-Quadraten im Thoma-Netz gezählt (eventuelle Erythrozyten werden nicht mitgezählt), wobei als Sollwert 50 – 300 Zellen/Groß-Quadrat angenommen wird. Zur späteren Herstellung von Zytospins wird die Gesamtzellzahl nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Volumen (ml)} \times \text{ermittelte Zellzahl je Quadrat} \times 2 \times 10^4$$

Nachfolgend wird gemäß der folgenden Formel das nötige Aspiratvolumen ermittelt:

$$\text{Volumen(ml)} = \frac{10^6 \times \text{Gesamtvolumen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

Durch diese Berechnung wird sichergestellt, dass jedes hergestellte Zytospin die geschätzten 10^6 Zellen enthält.

Folglich wird das errechnete Volumen in ein 15ml Tube überführt und mit PBS auf 6ml aufgefüllt (6ml PBS-Volumen errechnet sich: 12 Objektträger a 500 μl Suspension). Nach Fertigstellung der Träger werden die Becher mit einer Eppendorfpipette mit jeweils 500 μl Suspension befüllt und die Träger in einer Zytospinzentrifuge bei 500rpm bei Raumtemperatur 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und die fertigen Zytospins 12 – 24 Stunden bei Raumtemperatur zum Trocknen belassen.

Die fertigen Zytospins werden entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

3.2.2.2 Immunzytologie mit der APAAP – Methode

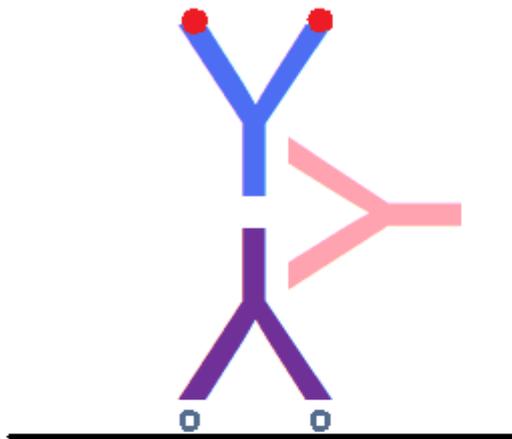
3.2.2.2.1 APAAP – Methode

Die APAAP – Methode (Alkalische Phosphatase – Anti-Alkalische Phosphatase) zählt zu den indirekten immunzytochemischen Komplexmethoden. Mit Hilfe von Immunhistochemie / Immunzytochemie lassen sich in Geweben oder auf einzelnen Zellen eine Vielzahl von Antigenen spezifisch nachweisen.

Zunächst bindet ein spezifischer Primärantikörper an das im Gewebe vorhandene Antigen. Je nachdem, aus welchem Tier dieser Primärantikörper gewonnen wurde, muss folglich ein entsprechender Brückenantikörper eingesetzt werden, an den der APAAP-Komplex anschließend angekoppelt werden kann.

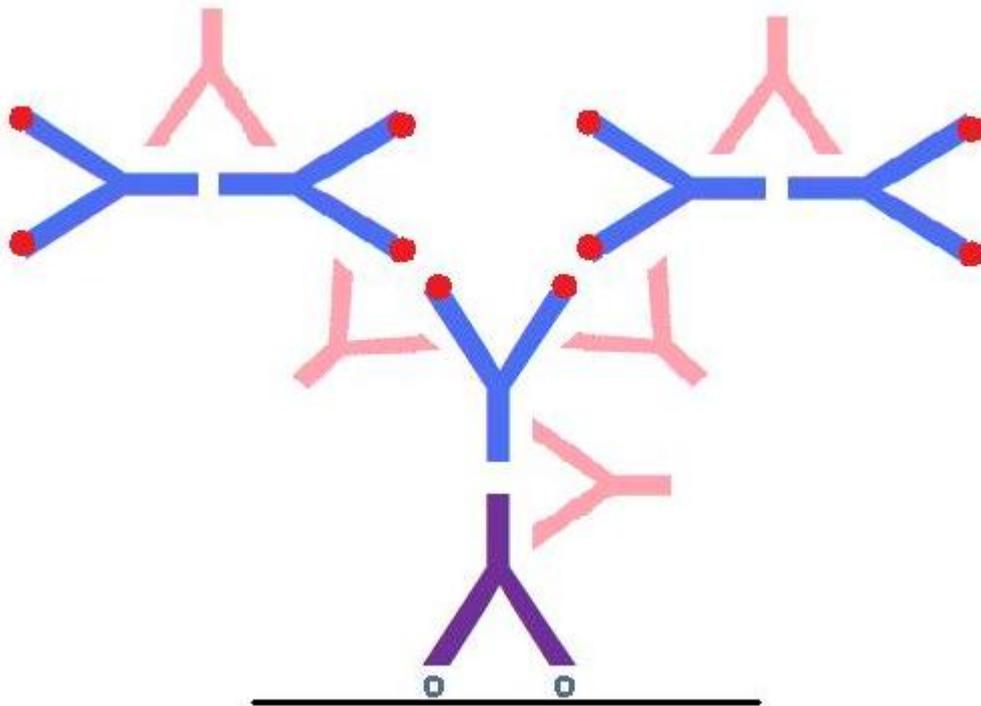
Im Labor der Tumorummunologie der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt werden als Primärantikörper monoklonale Antikörper aus der Maus verwendet, an die Kaninchen-anti-Mausantikörper (Rabbit-Anti-Mouse-Antibody) als Zwischenschritt gebunden werden. Danach wird der APAAP-Komplex hinzugegeben. Er besteht aus Maus-IgG-Antikörpern gegen alkalische Phosphatase, welche spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert sind. Es handelt sich hier also um ein Enzym-anti-Enzym-Komplex.

Durch den APAAP-Komplex ist es möglich eine Verstärkung der Reaktion zu erzielen, indem man die Schritte Brückenantikörper und APAAP-Komplex bis zu zweimal hintereinander wiederholt.



- alkalische Phosphatase
- Y monoklonale Maus-IgG-Antikörper gegen die alkalische Phosphatase
- > Kaninchen-anti-Maus-Antikörper
- ∧ primärer monoklonaler Mausantikörper
- Antigen

Abbildung 1: Schema der APAAP-Methode mit Darstellung des Primär-, Brückenantikörpers und des APAAP-Komplexes



- alkalische Phosphatase
- Y monoklonale Maus-IgG-Antikörper gegen die alkalische Phosphatase
- > Kaninchen-anti-Maus-Antikörper
- λ primärer monoklonaler Mausentkörper
- Antigen

Abbildung 2: Schematische Darstellung der amplifizierten APAAP-Methode

Die APAAP-Methode hat auch ihre Nachteile. Es kann nämlich zu unspezifischen Anfärbungen kommen, da es nicht immer gelingt, die endogene alkalische Phosphatase in den Proben vollständig zu unterdrücken. Durch wiederholte Färbungen werden auch unspezifische Hintergrundfärbungen provoziert.

3.2.2.2.2 Durchführung der APAAP-Färbung an der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt

Die immunzytologische Färbung wird an der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer vorgenommen. Sie geschieht pro Patientin (pro Punktionsstelle) an mindestens 4 Präparaten, wobei 2 davon mit dem Antikörper gegen das A45-B/B3-Antigen inkubiert werden und 2 als Negativkontrolle dienen. Pro Färbeansatz wird zusätzlich ein Mischpräparat mit CK18-positiven Karzinomzellen als Positivkontrolle mit A45-B/B3 inkubiert.

Der murine monoklonale Antikörper A45-B/B3, Isotyp IgG1 (Firma Micromet, Martinsried) dient spezifisch dem Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark, da er ein gemeinsames Epitop der Keratinkomponenten CK8, CK18 und CK19 erkennt. Der Rabbit-Anti-Mouse-Brückenantikörper, Isotyp IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 (Z 0259, Firma DAKO, Dänemark) wird als Zwischenschritt eingefügt. Das APAAP-System (Firma DAKO, Dänemark), Isotyp: IgG1 (kappa) ist das erwähnte Enzym-Anti-Enzym-Komplex. Als Negativkontrolle wird MOPC (Mineral Oil-Induced Plasmocytoma), ein Immunoglobulin aus der Maus verwendet.

Die eingefrorenen Zytospins werden zunächst 30 min aufgetaut und die Objektträger danach entsprechend beschriftet: A45 für Präparate, die mit dem A45-B/B3 inkubiert werden oder MOPC für Negativkontrolle.

Während des Auftauens der Präparate werden die Antikörper-Lösungen in bestimmten Verdünnungen hergestellt:

- A45-B/B3: (1:100)
- MOPC: (1:500)
- Z 0259: (1:20)
- APAAP: (1:100)

Die Lösungen werden mit 10% AB-Serum/tris verdünnt.

Vor dem eigentlichen Färbevorgang werden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen 20 min. mit je 200µl 10% AB-Serum/PBS pro Auftragsstelle blockiert. Dieser Schritt dient zur Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine und damit zur Verhinderung von unspezifischen Anfärbungen. Danach wird das Serum abgeklopft (nicht abgewaschen, da sonst der Ausgangszustand wieder hergestellt wird und mögliche unspezifische Anfärbungen wieder stattfinden könnten) und am Rand des Objektträgers abgewischt. Es ist darauf zu achten, dass die Präparate nicht austrocknen.

Nun werden die Antikörperseren auf 1:10 in PBS verdünnt. Es folgt die Applikation von entsprechenden Primärantikörpern auf Objektträger A45 und MOPC, die 45 min. dauert. Es schließt sich ein dreifacher Waschvorgang zu je 3 min. mit PBS an und darauf hin die 30-minütige Inkubation mit dem auf 1:10 in PBS verdünnten Z0259-Brückenantikörper-Serum. Wieder werden die Zytospins dreifach zu je 3 min. mit PBS gewaschen und danach mit dem auf 1:10 in PBS verdünnten APAAP-Komplex-Serum inkubiert. Nach 30 min. werden die Objektträger dreimal jeweils 3 min. lang mit PBS gewaschen.

Die Substrat-Chromogen-Lösung, die zur Entwicklung des Immuno-Enzym-Komplexes verwendet wird, besteht aus 3 direkt vor Gebrauch hergestellten Lösungen.

Lösung I wird aus 90mg Levamisol [L-2,3,5,6-Tetrahydro-6-phneylimidazo 2,1-b thiazole], 62,5ml 0,2-molarer Trislösung (Firma Sigma, Deisenhofen) in 250ml destilliertem H₂O angesetzt. Zur fertigen Lösung I wird Lösung II bestehend aus 50mg NaNO₃ (Natriumnitrit, Firma Merck, Darmstadt) in 1250 µl Aqua dest. und

500 µl 5% Neufuchsin (Firma Serva, Heidelberg) in 2-molarer HCL-Säure (Firma Merck, Darmstadt) hinzugegeben und beide Lösungen in einem Erlenmeyerkolben gut gemischt.

Lösung III: 125mg Naphtol-ASBI-Phosphat (Firma Sigma, Deisenhofen) gelöst in 1500µl DMF (NN-Dimethyl-Formamide, Firma Sigma, Deisenhofen) wird zu dem Gemisch aus Lösung I und II hinzugefügt und die fertige Substrat-Chromogen-Lösung noch 5 min. gerührt und anschließend filtriert.

Der Färbvorgang dauert 20 min. und muss unter dem Abzug erfolgen. Danach werden die Objektträger dreifach zu je 3 min. mit PBS gewaschen und feucht mit dem wässrigen Eindeckmittel Aquatex (Firma Merck, Darmstadt) mit Deckgläschen bedeckt.

3.2.2.2.3 **Detektion von zytokeratin-positiven Zellen**

Die Detektion der nach dem geschilderten Protokoll angefärbten zytokeratin-positiven Zellen erfolgt durch ein systematisches, manuelles Screening unter einem Lichtmikroskop.

Um eine mikroskopisch gefundene Zelle als zytokeratin-positiv (und damit isolierte Tumorzelle) klassifizieren zu können, müssen alle der folgenden Kriterien erfüllt sein:

- Vitalität der Zellen kann nachgewiesen werden (intakte Zellmembran, Zellkern abgrenzbar)
- Mindestens 75% der Zellmembran färbt sich an
- Zellen sind gleichmäßig angefärbt (intrazelluläre Granula dürfen vorhanden sein)

- im Phasenkontrast kann die Bestätigung der Färbung erfolgen und der Zellkern ist gut erkennbar
- Positivfärbung liegt in gleicher Ebene wie die umgebenden Zellen

Weitere pathomorphologische Kriterien wie etwa das Zellkern/Zytoplasmaverhältnis werden hier jedoch nicht angewandt.



Abbildung 3: Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle im Knochenmarkaspirat

Die o.g. Kriterien gelten sowohl für einzelne isolierte Tumorzellen, als auch für mind. zwei, meistens jedoch mehrere zusammenhängende zytokeratin-positive Zellen (sog. Zellcluster).

Folglich werden alle Präparate, in denen ein positives Färbeereignis festgestellt wurde, von zwei unabhängigen Gutachtern, die keine Kenntnis über die Tumorentität und das Tumorstadium besitzen, analysiert. Nur bei Übereinstimmung der Meinungen der beiden Gutachter wird das positive Färbeereignis als isolierte Tumorzelle klassifiziert.

Positive Färbeereignisse, die die oben genannten Kriterien jedoch nicht erfüllen, werden als Artefakte eingestuft. Für Artefakte, im Gegensatz zu Tumorzellen, sprechen vor allem folgende Kriterien:

- es gibt starke Größenschwankungen im Färbeereignis

- die Oberfläche des Färbeereignisses ist unregelmäßig oder bizarr
- Positivfärbung liegt nicht in der gleichen Ebene wie die umgebenden Zellen

3.2.3 **Bestimmung des HER-2/neu Status der Tumorzellen**

Die Bestimmung des HER-2/neu (Human epidermal growth factor receptor-2) Status des Primärtumors ist eine Standardmaßnahme bei Patientinnen mit diagnostiziertem Mammakarzinom. Diese Bestimmung ist ein anerkannter Prognosefaktor und ausschlaggebend für die adjuvante Therapie.

Für diese Arbeit erfolgte die Bestimmung des HER-2/neu Status der isolierten Tumorzellen mittels CISH-Methode (Chromogenic in-situ hybridization).

3.2.3.1 **CISH (Chromogenic in-situ hybridization)**

Die CISH-Methode ist ein relativ neues Verfahren, mit dem man Genamplifikationen, chromosomale Translokationen und numerische Chromosomenaberrationen analysieren kann. Dies geschieht mit Hilfe einer konventionellen Peroxidasereaktion. Die gefärbten DNA-Abschnitte können dann in der Standardlichtmikroskopie dargestellt werden. CISH setzt voraus, dass speziell markierte Nukleinsäureabschnitte mit den in den Proben vorhandenen spezifischen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren (sich an sie *in situ* binden). Die so entstandenen Hybride können dann sichtbar gemacht werden ohne die Gewebemorphologie dabei zu zerstören. Dadurch können gleichzeitig sowohl die genetischen Aberrationen (Anzahl der Signale = Genkopien pro Zellkern) als auch die Histologie der Probe beurteilt werden.

Die Resultate einer CISH-Färbung können mit einem Standardlichtmikroskop bereits bei 40-facher Vergrößerung betrachtet werden. Die gefärbten Objektträger können eine lange Zeit aufbewahrt werden, da das Färbesignal dauerhaft ist.

Tumorzellen mit HER-2/neu-Genamplifikation enthalten typischerweise große Peroxidase-positive intranukleäre Konglomerate (clusters) von Genkopien, eine Vielzahl von einzelnen kleinen Peroxidase-positiven Signalen oder eine Mischung aus Genkopien-clusters und einzelnen Genkopien. Tumoren mit einer schwachen HER-2/neu-Überexprimierung zeigen häufig >5 bis 10 Signale pro Kern. In Tumoren mit normalem HER-2/neu Status (2 Genkopien pro Zellkern) finden sich typischerweise 2 Signale pro Zellkern. Gelegentlich kann man in manchen Tumorzellen lediglich ein Signal feststellen, wofür die Schnittlegung verantwortlich gemacht wird. Tumoren mit Polysomie von Chromosom 17 zeigen 3 bis 5 Signale pro Zellkern.

CISH ist eine hoch spezifische, sensitive und einfach anwendbare Methode für die Detektion von HER-2/neu-Genamplifikationen. Zusammen mit der Immunhistochemie dient sie der Evaluation des Tumorgewebes und der disseminierten Tumorzellen bei Patientinnen mit Mammakarzinom.

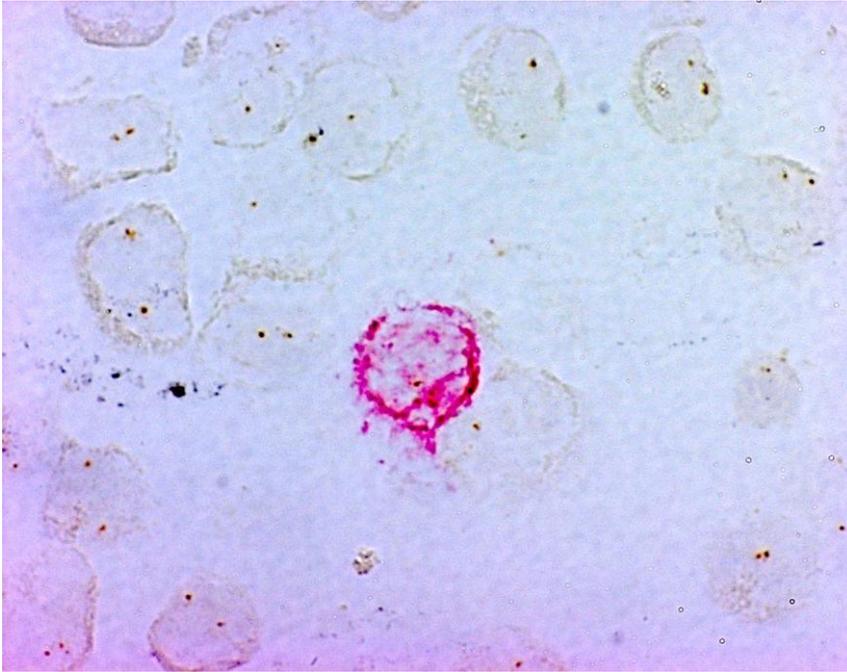


Abbildung 4: CISH – eine Tumorzelle mit einer Überexprimierung des HER-2/neu-Gens (mehrere Signale im Zellkern) umgeben von Zellen mit jeweils 2 HER-2/neu-Genkopien (2 Signale im Zellkern)

3.2.3.2 Durchführung von CISH an der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt

Im Labor der Tumorimmunologie der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt wird der Zymed SPoT-Light® HER-2 CISH™ Kit (84-0146) der Firma Zymed® Laboratories, USA als standardisierte Reagenzienreihe zur Durchführung von CISH verwendet. Dieser Reagenziensatz besteht aus allen für eine CISH-Färbung benötigten Lösungen und Puffersystemen:

Reagenz A: 1 L Lösung zur Wärmeverbehandlung, pH 7.0 (Ready-to-Use)

Reagenz B: 5 mL Reagenz zur enzymatischen Vorbehandlung (Ready-to-Use)

Reagenz C: 0,4 mL Digoxigenin-markierte SPoT-Light ® HER-2 Probe (Ready-To-Use)

Reagenz D: 500 mL SSC (Saline Sodium Citrat) Puffer (Ready-To-Use)

Reagenz E1: 1 Packung PBS Pulver (für 1L PBS)

Reagenz E2: 1 mL 50% Tween 20-Lösung

Reagenz F: 3 mL CAS-Block™ (Ready-To-Use)

Reagenz G: 3 mL Maus anti-Digoxigenin Antikörper (Ready-To-Use)

Reagenz H: 3 mL Anti-Maus HRP Polymerkonjugat (Ready-To-Use)

Reagenz I1: 1 mL konzentrierter DAB Substratpuffer (20x)

Reagenz I2: 1 mL konzentrierte DAB- Lösung (20x)

Reagenz I3: 1 mL 0,6% Wasserstoffperoxid (20x)

Reagenz J: 100 mL Mayer's Hematoxylin (Ready-To-Use)

Reagenz K: 4 mL Histomount™ befestigende Lösung (Ready-To-Use)

Reagenz L: 2 Kontroll-Objektträger, Formalin-fixiert, in Paraffin eingebettet, jeder mit sowohl nicht amplifizierten und amplifizierten HER-2 Zelllinien

Auch geliefert: 4-farbige HER-2 CISH™ Befundungsanleitung

Die Reagenzien A, D, E2 und J werden bei Raumtemperatur, Reagenz C bei -20°C, und die Reagenzien B, E1, F-I, K und L bei 2-8°C gelagert.

Es werden außer den oben aufgeführten Reagenzien, die im Rahmen des Zymed's SPoT-Light® HER-2 CISH™ Kit geliefert werden, auch folgende Lösungen und Ausrüstung erforderlich oder wahlweise benötigt:

- SuperFrost Plus Objektträger
- (optional) positive Gewebekontrolle: FFPE Gewebsabschnitt mit HER-2-Amplifikation
- (optional) negative Gewebekontrolle: FFPE Gewebeabschnitt ohne HER-2-Amplifikation
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser (dH₂O)

- Xylen
- 70%, 85%, 95% und 100% Ethanol (EtOH)
- Deckgläser, Gummibindesubstanz, 18G ½'' Nadel und 5mL Spritze
- 30% Wasserstoffperoxid (H₂O₂)
- 100% Methanol

Geräte, die benötigt werden:

- Stoppuhr
- Pipette (p20, p1000)
- Pipettenspitzen
- Ständer für Objektträger
- Heiße Platte, Alufolie und 1L Becher
- Objektträgerwärmer
- 37°C – Inkubator
- Wärmeblock mit einem digitalen Temperaturdisplay und Feuchtigkeitskammer
- Wasserbad (imstande den Temperaturbereich 75-80°C aufrechtzuerhalten)
- Hellendahl-Küvetten
- Lichtfeldmikroskop

Reagenzienaufbereitung:

- SSC (Saline Sodium Citrate)
- PBS (Phosphate Buffered Saline): 1 Packung PBS-Pulver (Reagenz E1) werden in 1L dH₂O aufgelöst und gut durchmischt

- PBS/Tween 20 (0,01%) Puffer: 10 Tropfen 50% Tween 20 (Reagenz E2) werden in 1L PBS aufgelöst und durchmischt
- Chromogensubstrat-Lösung (DAB): diese Lösung wird erst unmittelbar vor Verwendung zubereitet. Jeweils 1 Tropfen von Reagenzien I1, I2 und I3 wird in 1 mL dH₂O aufgelöst und gut durchmischt
- Alkoholreihe: es werden 70%, 96% und 100%-Ethanollösungen hergestellt
- 3% H₂O₂ in Absolutmethanol: 30%-H₂O₂ wird mit Methanol im Verhältnis 1:9 gemischt

Die eingedeckten Präparate mit Nachweis von zytokeratin-positiven Zellen werden für 10 Min. bei 65°C in 2x SSC (Saline Sodium Citrate) inkubiert und das Deckglas wird anschließend abgelöst. Als nächstes werden die Proben für 5 Min. bei 37°C zur Permeabilisierung in Pepsin in 0,2 M HCl eingetaucht und anschließend 2 mal für je 4 Minuten mit PBS gewaschen. Die Objektträger werden danach für 2 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (pH 7,2) fixiert und danach wieder 2 mal für je 4 Min. mit PBS gewaschen. Folgend werden die Proben in aufsteigender Alkoholreihe: 70%, 96%, 100% dehydriert und hiernach getrocknet.

Die trockenen Präparate werden für 90 Sekunden bei 68°C in 70% Formamid/2% SSC + 10 Tropfen 0,2 M HCl denaturiert und anschließend wieder in aufsteigender Alkoholreihe: 70%, 96%, 100% dehydriert und danach getrocknet.

In ein Eppendorf-Röhrchen werden je 10 µl Spot-Light HER-2 DNA-Sonde pro Objektträger pipettiert und bei 95°C für 5 Min. denaturiert. Die so vorbereitete Sonde wird dann auf jedem Präparat verteilt, die Probe vorsichtig mit einem Deckglas abgedeckt und die Ränder mit einem Abdichtungsmittel (Fixogum) verschlossen.

Die auf diese Art aufbereiteten Objektträger werden in einen Hybridofen eingelegt und 20 Stunden bei gleichbleibender Temperatur von 37°C inkubiert, um eine Hybridisierung der Sonde mit dem Zell-DNA zu ermöglichen.

Am nächsten Tag wird das Fixogum vorsichtig entfernt und es folgen die Post-Hybridisierungs-Waschschritte: zunächst werden die Proben für 5 Min. bei 72°C in 0,5 x SSC eingetaucht und danach die Deckgläser vorsichtig abgelöst. Es folgt das 3-fache Waschen für je 2 Min. bei Raumtemperatur mit Tween-PBS und anschließend werden die Proben 3 mal mit Aqua dest. für je 2 Min. bei Raumtemperatur gewaschen.

Als nächstes findet die Immundetektion mit Hilfe von den Reagenzien aus dem Zymed CISH-Kit statt. Auf die Proben werden 2-3 Tropfen von Reagenz F (CAS-Block) gegeben und 10 Min. inkubiert. Das Reagenz wird nach dieser Zeit vorsichtig abgeklopft. Danach werden auf jedes Präparat 2-3 Tropfen Reagenz G (Anti-Dig-Antikörper von Maus) gegeben und für 30 Min. bei Raumtemperatur belassen. Die Objektträger werden anschließend 3 mal für jeweils 2 Min. mit PBS-Tween 20 gewaschen.

Folgend gibt man 2-3 Tropfen Reagenz H (Polymerisierte HRP-Anti-Maus-Antikörper) und lässt für 30 Min. bei Raumtemperatur einwirken. Das Reagenz wird 3 mal für je 2 Min. mit PBS-Tween 20 ausgewaschen.

Dann wird 1ml Aqua dest. mit je 1 Tropfen von Reagenz I1-I2-I3 zum DAB (Substat-Chromogen-Lösung)-Ansatz vermischt und es werden davon auf jeden Objektträger 2-3 Tropfen gegeben. Die Inkubationszeit beträgt 30 Min. bei Raumtemperatur.

Die Proben werden anschließend 2 Min. mit laufendem Leitungswasser gewaschen und danach für 6 Sekunden mit Reagenz J (Hämatoxylin)

gegengefärbt. Die Objektträger werden dann wieder für 2 Min. unter laufendes Leitungswasser gehalten. Die gewaschenen Präparate werden feucht mit einem wässrigen Eindeckmittel (Aquatex) mit Deckgläschen bedeckt.

Die eingedeckten Präparate werden folglich von zwei unabhängigen Gutachtern unter einem Lichtmikroskop untersucht. Die nach der APAAP-Färbung als Tumorzellen klassifizierten Färbereignisse werden nun erneut begutachtet und ihr HER-2/neu Status dabei erhoben. Als HER-2/neu-positiv gelten dabei Zellen, die mindestens 4 intranukleäre Färbereignisse aufweisen.

3.3 Klinische Auswertung

3.3.1 Tumorhistologie

Die pathomorphologische Klassifikation der Tumoren erfolgte nach der WHO-Definition und in Anlehnung an die von Bässler vorgeschlagene Einteilung^{55, 56}:

I. Duktale Karzinome

A. Duktales invasives (nicht differenziertes) Karzinom

1. solides, szirrüses und medulläres Karzinom
2. adenomatöses (adenoides) Karzinom

B. Intraduktales Karzinom

1. Nicht-invasives Karzinom
2. Komedokarzinom
3. Solides und kribriiformes Karzinom
4. Papilläres und intrazystisches Karzinom
5. Morbus Paget

C. Invasives Karzinom mit spezieller Differenzierung

1. Muzinöses (gelatinöses) Karzinom
2. Medulläres Karzinom mit lymphoidem Stroma
3. Adenoid-zystisches Karzinom
4. Tubuläres Karzinom
5. Apokrines Karzinom
6. Plattenepithelkarzinom
7. Karzinosarkom

II. Lobuläre Karzinome

- A. Carcinoma lobulare in situ
- B. Infiltrierendes lobuläres Karzinom

III. Sarkome

3.3.2 **Tumorgröße**

Die anatomische Tumorgröße wurde anhand des makroskopischen Befundberichtes und der histopathologischen Schnitte bestimmt.

3.3.3 **Stadieneinteilung**

Die Stadieneinteilung (das sog. Staging) der Tumoren erfolgte nach dem von der "Union Internationale Contre le Cancer" (UICC) vorgeschlagenen TNM-System. Dieses beinhaltet vier Klassifikationen: eine klinische und eine pathologische Klassifikation des Primärtumors, eine Klassifikation der Rezidivs und eine Klassifikation der Autopsiepräparate.⁵⁷

Die klinische Klassifikation (cTNM) wird für lokale/regionäre Therapievorschlage verwendet. Sie basiert auf Befunden, die vor der Initialtherapie gesammelt

wurden: bei der körperlichen Untersuchung, bei der diagnostischen Bildgebung (z.B. Mammographie oder Ultraschall), sowie auf dem pathologischen Befund eines Biopsiepräparates der Mamma oder anderen Gewebes, auf dessen Basis die Diagnose „Mammakarzinom“ gestellt wurde.

Die pathologische Klassifikation (pTNM) wird als prognostischer Faktor für adjuvante Therapievorschläge herangezogen. Sie basiert auf den Erkenntnissen vom klinischen Staging sowie dem Operationsergebnis und einer detaillierten pathologischen Befundung des Primärtumors, der Lymphknoten und eventuellen Fernmetastasen.

Die Klassifikation der Rezidive (rTNM) wird im Falle eines erneuten Auftretens vom Tumor, wenn weitere Therapie nach einem krankheitsfreien Intervall nötig ist, verwendet.

Zusätzliche Bezeichnungen werden bei Besonderheiten von der cTNM oder pTNM Klassifikationen, z.B. "m" Prefix bei multiplen Tumoren und "y" Prefix bei bereits begonnener oder nach einer erfolgten Therapie (z.B. nach einer neoadjuvanten Chemotherapie, oder Radiationstherapie).

Das TNM-System erfasst die Tumorausbreitung anhand von der klinischen (**c**) und pathologischen (**p**) Größe des Tumors (T), dem Lymphknotenbefall (N) und einer eventuellen Fernmetastasierung (M).

Die 6. Auflage von „AJCC Cancer Staging Manual“ schlug im Januar 2003 eine neu überarbeitete TNM-Klassifikation vor, was den Fortschritt in der Diagnostik, v.a. den zunehmenden Einsatz von molekularen und immunohistochemischen Methoden sowie die Veränderungen im klinischen Standard gemäß den Ergebnissen der großen Studien der letzten Jahre widerspiegelt.

Pathologische TNM-Klassifikation (pTNM) nach ⁵⁷:

pT Primärtumor

pTX Primärtumor kann nicht beurteilt werden

pT0 kein Anhalt für Primärtumor

pTis Carcinoma in situ

pTis (DCIS) duktales Carcinoma in situ

pTis (LCIS) lobuläres Carcinoma in situ

pTis (Paget) Paget-Erkrankung der Brustwarze ohne nachweisbaren Tumor

pT1 Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung

pT1mic Mikroinvasion $\leq 0,1$ cm in größter Ausdehnung

pT1a Tumor $> 0,1 \leq 0,5$ cm

pT1b Tumor $> 0,5 \leq 1$ cm

pT1c Tumor $> 1 \leq 2$ cm

pT2 Tumor > 2 cm ≤ 5 cm in größter Ausdehnung

pT3 Tumor > 5 cm in größter Ausdehnung

pT4 Tumor jeder Größe mit Infiltration von Brustwand oder Haut

Anmerkung: Die Brustwand schließt die Rippen, die interkostalen Muskeln und den vorderen Serratusmuskel mit ein, nicht aber die Pectoralis-Muskulatur

pT4a mit Ausdehnung auf Brustwand

pT4b mit Ödem (einschließlich Peau d'Orange), Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust

pT4c Kriterien 4a und 4b gemeinsam

pT4d inflammatorisches Karzinom

pN Regionäre Lymphknoten

pNX regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

- pN0 keine regionären Lymphknotenmetastasen
- pN1mi nur Mikrometastasen (> 0,2 mm aber keine > 0,2 cm)
- pN1 Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren.
- pN1a Metastasen in 1 – 3 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine >0,2cm in max. Ausdehnung
- pN1b Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren.
- pN1c Metastasen in 1 – 3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren.
- pN2 Metastasen in 4 – 9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch manifesten ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen.
- pN2a Metastasen in 4 – 9 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine >0,2cm in max. Ausdehnung
- pN2b Metastasen in klinisch manifesten ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
- pN3 Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten; oder in klinisch manifesten Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer

- axillären Lymphknotenmetastase; oder mehr als 3 axilläre Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht manifesten, mikroskopisch nachweisbaren Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder Metastasen in ipsilateralen supraclaviculären Lymphknoten
- pN3a Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest eine >0,2cm in max. Ausdehnung) oder in ipsilateralen infraclaviculären Lymphknoten
- pN3b Metastasen in klinisch manifesten Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Sentinellymphknoten-Dissektion, aber nicht klinisch manifest.
- pN3c Metastasen in ipsilateralen supraclaviculären Lymphknoten

pM Fernmetastasierung

- pMX Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
- pM0 keine Fernmetastasen nachweisbar
- pM1 Fernmetastasen

Es können nur histologisch nachgewiesene Karzinome klassifiziert werden. Treten multiple Tumoren in einer Brust auf, wird der Tumor mit der höchsten T-Kategorie klassifiziert. Simultan bilateral auftretende Mammakarzinome werden getrennt klassifiziert. Dies gilt auch für das gleichzeitige Auftreten multipler Tumoren in anderen Organen (außerhalb der Brust).

3.3.4 Grading

Ein weiterer prognostischer Faktor ist das sog. Grading, das die zelluläre Differenzierung des invasiven Mammakarzinoms angibt und der Abschätzung des pathomorphologischen Malignitätsgrades dient:

Gx Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden

G1 gut differenziertes Karzinom

G2 mäßig differenziertes Karzinom

G3 schlecht differenziertes Karzinom

G4 undifferenziertes Karzinom

3.3.5 Hormonrezeptorstatus

Nachweis von Steroidhormonrezeptoren, wobei zwischen Östrogen- und Progesteronrezeptoren unterschieden wurde, wurde auf dem Tumorgewebe mit biochemischen und histochemischen Methoden durchgeführt.

3.3.6 HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor

Eine Bestimmung des HER-2/neu-Status ist Routinestandard bei jedem neudiagnostizierten Mammakarzinom. Er wird immunhistochemisch (IHC) sowie mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an in Paraffin eingebetteten Tumorböcken bestimmt. An der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt steht ein kommerzieller Test für die immunhistochemische Bestimmung des HER-2/neu-Status zur Verfügung, der HercepTest® (DAKO). Der „DAKO-Score“ mit dem entsprechenden Reaktionsmuster sowie dazugehörigen Bewertung des Ergebnisses sind wie folgt:

0 : keine Färbereaktion oder 10% der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran – negativ;

1+ : >10% der invasiven Tumorzellen mit schwacher inkompletter Markierung der Zellmembran – negativ;

2+ : >10% der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbeintensität gering bis mittelgradig – schwach positiv, geringe HER-2-Überexpression;

3+ : >10% der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbeintensität stark – stark positiv, starke HER-2-Überexpression.

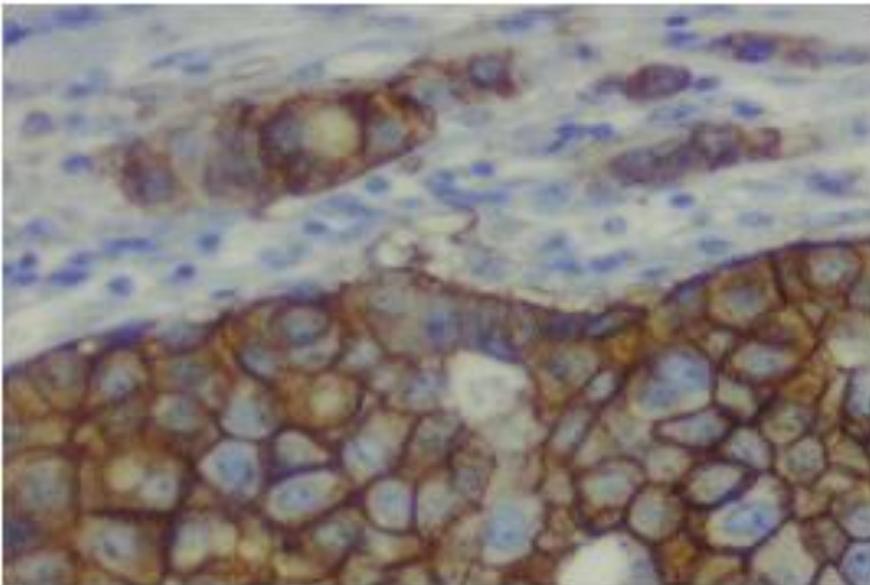


Abbildung 5: Knochenmark-Immunhistochemie zur Bestimmung des HER-2/neu-Status des Primärtumors (hier stark positiv, 3+)

Bei einem schwach positiven immunhistochemischen Test, entsprechend DAKO-Score „2+“, besteht immer die Indikation zur FISH. Alle als „2+“ eingestuft Tumorblöcke wurden folgend mittels FISH untersucht, um ein eindeutig positives bzw. negatives Ergebnis bzgl. des HER-2/neu-Status zu erzielen. In der FISH-Analyse mit dem HER-2-Sondenkit gelten als positiv (Genamplifikation) mehr als

6 Gensignale pro Tumorzellkern (Inform[®] HER-2) oder Quotient Gensignale/Chromosomensignale ≥ 2 (PathVysion[®] HER-2).

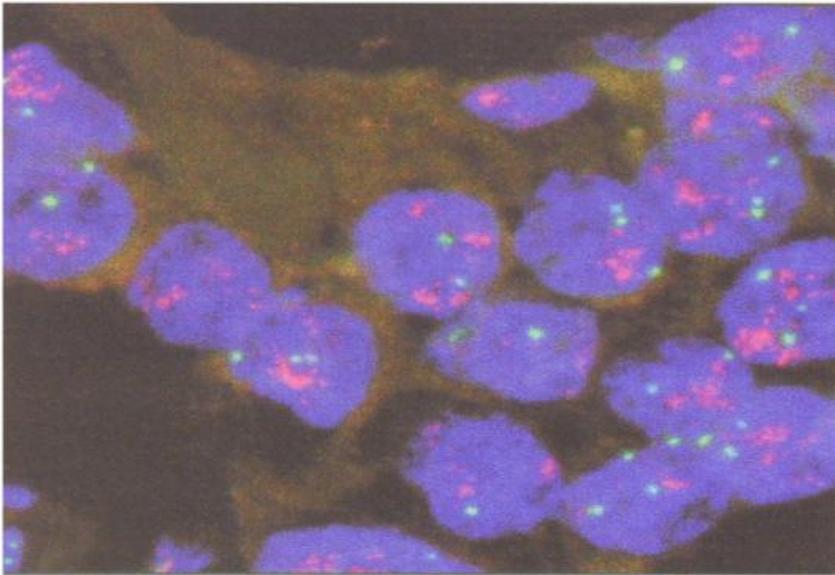


Abbildung 6: FISH-Test zur Bestimmung des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor (hier mehr als 6 Signale pro Zellkern, positiv).

3.3.7 Nachbeobachtung

Während der ersten drei Jahre nach Primärdiagnose oder Rezidivdiagnose erfolgten die Nachsorgetermine in einem 3-monatigen Intervall, während der nächsten zwei Jahre im 6-monatigen Intervall und anschließend jährlich. Jede Nachsorgeuntersuchung bestand aus Nachsorgeanamnese, körperlicher Untersuchung und apparativer Diagnostik.

Gemäß den „Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Mammakarzinome“ des Tumorzentrums München wurde im Rahmen der Nachsorge folgende Anamnese erhoben:

- Getastete Veränderungen oder Knoten im Bereich des Operationsgebietes, der Restbrust, der Achseln oder der kontralateralen Brust
- Beschwerden des Skelettsystems
- Veränderung des Bauchumfangs
- Veränderungen des Gewichts
- Neu aufgetretene Atemprobleme
- Müdigkeit, Leistungsschwäche

Die körperliche Untersuchung umfasste die Gewichtskontrolle, eine komplette Brustuntersuchung, eine jährliche gynäkologische Untersuchung, Perkussion und Auskultation der Lunge, die Prüfung der Klopfschmerzhaftigkeit des Rumpfskeletts, die neurologische Orientierungsuntersuchung und die Beurteilung des Leistungsvermögens.

Zur routinemäßigen apparativen Diagnostik zählte die regelmäßige Mammographie der Restbrust und/oder der kontralateralen Brust. Ausschließlich bei klinischem oder laborchemischem Rezidivverdacht wurde weiterführende bildgebende Diagnostik wie Skelettszintigraphie, Leber-sonographie oder Röntgenthorax durchgeführt.

Als Lokalrezidiv wurde jedes Wiederauftreten des Malignoms im Operationsgebiet der Mastektomie zwischen Mitte des Sternums und vorderer Axillarlinie sowie unterhalb der Fossa infraclavicularis und der 7. Rippe definiert. Weiterhin wurden Wiedererkrankungen an der Pektoralismuskulatur sowie an den Faszien von M. serratus lateralis und M. obliquus externus den Lokalrezidiven zugerechnet. Als regionales Rezidiv wurde das Wiederauftreten des Malignoms in der Haut und/oder in den Lymphknoten der Axilla oder der metastatische Befall allein der Lymphknoten in Infraclavivulargrube verstanden. Alle Tumorabsiedelungen

außerhalb dieser definierten Grenzen wurden als generalisiertes Rezidiv oder Fernmetastase bezeichnet.

Die Nachbeobachtungszeit der Patientinnen endete mit jenem Zeitpunkt, an dem die Patientin nicht mehr in der onkologischen Sprechstunde erschien oder verstarb.

3.3.8 **Rezidiv**

Unter einem Lokalrezidiv versteht man den erneuten Befall der Brust nach einer brusterhaltenden Therapie, sowie den Befall von Brustwand oder Narbe nach ablativer Therapie.

Als regionäres Rezidiv wird der nach Primärbehandlung erneute Befall von ipsilateralen Lymphknoten (axillär, supra- oder infraklavikulär oder entlang der Arteria mammaria) bezeichnet.

Als generalisiertes Rezidiv (auch Fernmetastasen) bezeichnet man den nach erfolgter Primärtherapie auftretenden Tumor, der sich außerhalb der oben genannten Grenzen befindet. Zu den häufigen Lokalisationen gehören Skelettsystem, Lunge, Pleura, Leber und Gehirn.

3.4 **Statistische Auswertung**

3.4.1 **Datenerfassung**

Die Daten für die vorliegende Arbeit wurden in der Knochenmarksdatenbank der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt gespeichert. Für jede an der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität

München, Klinikum Innenstadt sowie Klinikum Bayreuth primär an Mammakarzinom operierte Frau wurde ein Profil erstellt, in dem sämtliche Aufzeichnungen ambulanter präoperativer Untersuchungen, Krankengeschichten des stationären Aufenthalts (u.a. mit Operationsberichten, Histologiebefunden und Ergebnissen der Nachsorge) sowie auch Berichte der ambulanten und stationären Nachbehandlung ausgewertet wurden. Die Patientinnen wurden überwiegend in der onkologischen Ambulanz der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt sowie Klinikum Bayreuth nachbeobachtet. Im Falle einer externen onkologischen Nachsorge wurden in regelmäßigen Abständen die niedergelassenen Kollegen kontaktiert, um den Gesundheitszustand der Patientinnen zu erheben. (s. Screenshot der Datenbank im Anhang)

Der eigene Beitrag zur Fortführung der longitudinalen Studie bestand darin, die komplette Dokumentation von bereits behandelten sowie neuen Patientinnen bereitzustellen und in der Datenbank zu erfassen, die Knochenmarksdatenbank entsprechend der sich im Lauf der Zeit ändernden Bedürfnissen in regelmäßigen Abständen anzupassen bzw. zu erweitern. Waren Unterlagen unvollständig, so wurden die behandelnden Frauen- bzw. Hausärzte und andere Krankenanstalten angeschrieben und mittels eines Fragebogens um eine Verlaufsbeschreibung der Krankheit gebeten.

Bezüglich der im Klinikum Bayreuth behandelten Patientinnen wurden die Daten durch das dortige Sekretariat erfasst und uns zur Verfügung gestellt.

3.4.2 **Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware 'Statistical Package for the Social Sciences 15.0 for Windows' (SPSS Inc., Chicago, USA). Die

Tumorstadien wurden gemäß der TNM-Einteilung der Union International Contre le Cancer (UICC) eingeteilt. Die Berechnung der Überlebenskurven geschah nach der Kaplan-Meier-Methode, deren Vergleich nach dem Log-Rank-Test. Die multivariate Analyse erfolgte nach dem Cox-Regressions Modell. Die Signifikanzprüfung zwischen kategorialen Variablen wurde mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson durchgeführt, der Vergleich von Mittelwerten kontinuierlicher Größen mit dem zweiseitigen T-Test. Korrelationskoeffizienten wurden 2-seitig nach Pearson berechnet. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen.

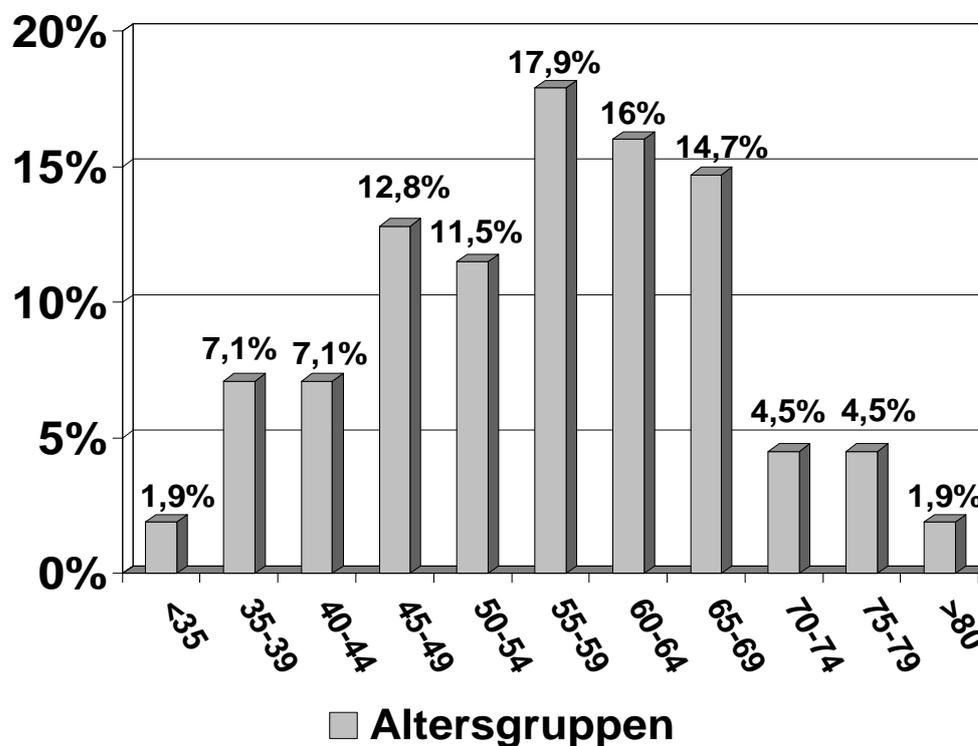
4 Ergebnisse

4.1 Übersichtsdaten des Gesamtkollektivs

4.1.1 Altersverteilung

Das Alter bei Erstdiagnose wurde mit dem Zeitpunkt der Operation gleichgesetzt.

Daraus ergab sich folgende Verteilung:



Mittelwert: 56,73

Standardabweichung: 11,187

Abbildung 7: Altersverteilung der Patientinnen (nach Altersgruppen, in Jahren)

Die jüngste Patientin, bei der disseminierte Tumorzellen nachgewiesen wurden, erkrankte im Alter von 33 Jahren, die älteste im Alter von 80 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 56,73 Jahren. Zwischen dem 55 und 64 Lebensjahr traten die meisten Mammakarzinomerkrankungen auf (33,9%), bei denen

disseminierte Tumorzellen im Knochenmark gefunden wurden (bezogen auf ein Lebensjahrzehnt), gefolgt von dem Intervall 45-54 Jahre mit 24,3%. 19,2% fand man im Alter von 65-74 Jahren, wohingegen nur noch 6,4% unter den Patientinnen über 75 Jahre. Die 35-44 – Jährigen machten 14,2% aus und im Alter unter 35 Jahren befanden sich lediglich 1,9%.

4.1.2 **Menopausenstatus**

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose befanden sich 41 Patientinnen (26,3%) in der Prämenopause. Die größte Fraktion wurde mit 71,8% durch Patientinnen in der Postmenopause, nämlich 112 gebildet. 3 Frauen befanden sich in der Perimenopause.

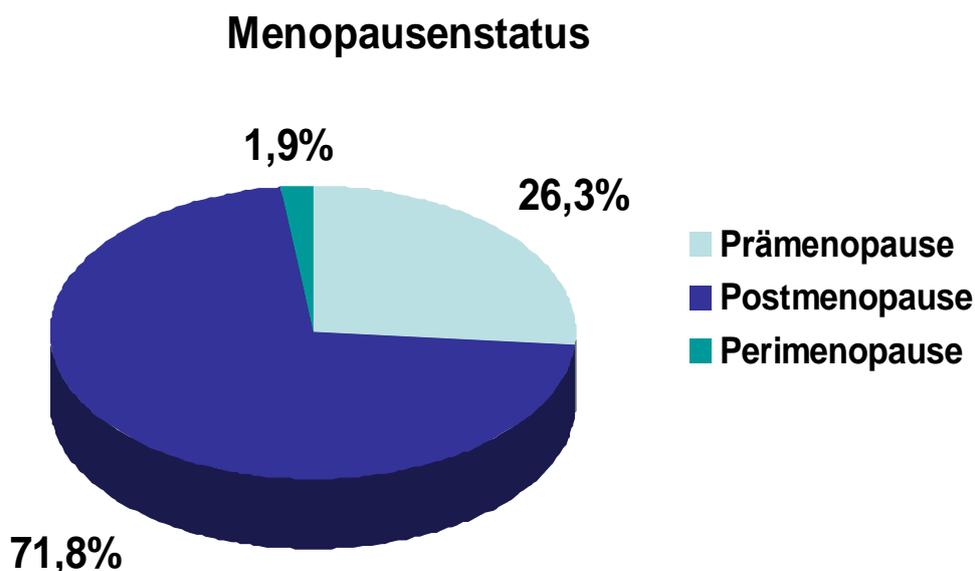


Abbildung 8: Menopausenstatus bei Diagnosestellung (n=156)

4.1.3 **Tumorstadium**

In unserem Kollektiv zeigte sich folgende Verteilung der histologisch bestimmten Tumorgröße (pT):

Tumorstadium	Anzahl der Frauen	Prozent
pT1	92	59%
pT1a	9	5,8%
pT1b	22	14,1%
pT1c	61	39,1%
pT2	45	28,8%
pT3	10	6,4%
pT4	6	3,8%
pTx	3	1,9%
Gesamt	156	

Tabelle 1: Pathologisches Tumorstadium (pT)

Den bei Weitem größten Anteil (59%) machten Tumoren der Größe bis 2cm (pT1) aus, darunter dominierte wiederum das Stadium pT1c mit 39,1%. Einen Durchmesser zwischen 2 und 5cm (pT2) wiesen 28,8% der Fälle auf. Als niedrig (6,4%) erwies sich die Anzahl von Tumoren größer 5cm (pT3), ähnlich wenige (3,8%) erreichten das Stadium pT4. Bei 1,9% konnte die Tumorgöße nicht ermittelt werden (pTx).

4.1.4 Tumorlokalisierung

Bei 101 Frauen (58,3%) standen die Daten zur Tumorlokalisierung zur Verfügung. Bei 45 (44,6%) dieser Patientinnen befand sich der maligne Knoten in der linken

Brust, bei 44 Frauen (43,6%) hatte er sich rechts entwickelt. 2 Patientinnen (2%) innerhalb dieser beiden Gruppen waren beidseitig an Brustkrebs erkrankt.

Die genaue Lokalisation des Tumors, angegeben bei 74 Patientinnen, lässt sich der Tabelle entnehmen. Es wurde die gängige Einteilung in Quadranten angewandt. Am häufigsten (62,2%) befand sich die Neoplasie im oberen äußeren Quadranten.

Quadrant	Häufigkeit	Prozent
außen oben	46	62,2%
außen unten	10	13,5%
innen oben	8	10,8%
innen unten	8	10,8%
multipel	2	2,7%
Gesamt	74	

Tabelle 2: Tumorlokalisierung nach Quadranten (n=74)

4.1.5 Tumorhistologie

Histologie	Häufigkeit	Prozent
Paget-Karzinom	1	0,6%
duktal-invasiv	105	67,3%
duktal-invasiv mit intraduktalem Anteil	22	14,1%
duktal-invasiv mit intralobulären Anteil	1	0,6%
gemischt duktal-lobulär	3	1,9%
lobulär-invasiv	15	9,6%

lobulär-invasiv mit intraduktalem Anteil	2	1,3%
medullär	2	1,3%
muzinös	1	0,6%
nicht klassifizierbares Karzinom	4	2,5%
Gesamt	156	

Tabelle 3: Tumorhistologie (n=156)

4.1.6 Grading

Die Karzinome wurden entsprechend der von Bloom und Richardson entwickelten Methode wie folgt zugeordnet ⁵⁸:

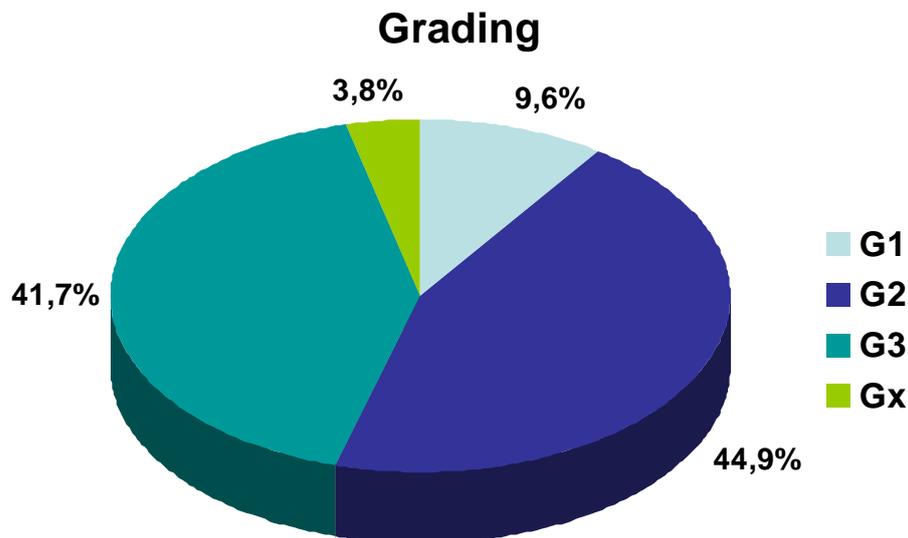


Abbildung 9: Grading (n=156)

44,9% aller epithelialen Neoplasien entsprachen dem mittleren Malignitätsgrad (G2), d.h. sie waren mäßig differenziert. Gut differenzierte Tumore (G1) gab es in 9,6% der Fälle, bei 41,7% der Patientinnen fanden sich Geschwülste mit schlechter Differenzierung, also einem hohen Malignitätsgrad (G3). In 6 Fällen (3,8%) konnte das Grading nicht ermittelt werden.

4.1.7 Hormonrezeptorstatus

Wie aus der Tabelle erkennbar, konnte man bei 75,1% der Tumorproben Östrogenrezeptoren nachweisen. Positive Progesteronrezeptoren fanden sich bei 63,8%.

Hormonrezeptoren		Anzahl	Prozent
Östrogenrezeptor	positiv	114	75,5%
	negativ	37	24,5%
Progesteronrezeptor	positiv	96	63,6%
	negativ	55	36,4%

Tabelle 4: Hormonrezeptorstatus auf dem Primärtumor (n=151)

4.1.8 HER-2/neu-Status

Auf dem Primärtumor wurde mittels Immunhistochemie getestet, ob das Gen HER-2/neu amplifiziert und überexprimiert ist. Daraus ergaben sich folgende Ergebnisse bzgl. des HER-2/neu-Status:

HER-2/neu	Häufigkeit	Prozent
0	62	39,7%
1+	30	19,2%
2+	28	17,9%
3+	34	21,8%
nicht bekannt	2	1,3%
Gesamt	156	

Tabelle 5: HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor (n=156)

„0“ = In 62 Fällen (39,7%) ergab die Immunhistochemie keine Färbereaktion oder 10% der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran und somit ein negatives Ergebnis.

„1+“ = Auf 30 (19,2%) der Tumorblöcke war die Zellmembran mehr als 10% der invasiven Tumorzellen schwach inkomplett markiert und somit auch negativ in Bezug auf den HER-2/neu-Status (1+).

„2+“ = In 28 Fällen (17,9%) war das Färbereignis als schwach positiv einzustufen und das HER-2/neu-Gen somit gering überexprimiert.

„3+“ = Eine eindeutig stark positive Reaktion, im Sinne von einer starken HER-2/neu-Überexpression war in 34 Fällen (21,8%) zu sehen.

Von 28 als „2+“ in Bezug auf den HER-2-Status eingestuften Tumorblöcke wurden anschließend 23 mittels FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung)-Analyse untersucht und dann als „positiv“ oder „negativ“ in Bezug auf die Überexpression des HER-2/neu-Gens ausgewertet. Als „positiv“ werden Tumorzellen gewertet, die mehr als 6 Gensignale (mehr als 6 Genkopien des HER-2/neu-Gens) pro Zellkern aufweisen.

FISH-Ergebnis	Häufigkeit	Prozent
neg	21	91,3
pos	2	8,7
Gesamt	23	

Tabelle 6: HER-2-Status der „2+“-Tumorblöcke nach der FISH-Analyse.

In 21 Fällen (91,3%) ergab die FISH-Analyse keine Überexprimierung des HER-2/neu-Gens, in 2 Fällen (8,7%) waren in den Tumorzellen mehr als 6 Gensignale pro Tumorzellkern und somit eine Genamplifikation zu sehen.

Zusammenfassend war in den Präparaten, in den der HER-2/neu-Status ermittelt werden konnte, eine Überexprimierung des HER-2/neu-Gens in 113 Fällen

(72,4%) zu sehen. In 36 Fällen (23,1%) war das Ergebnis des HER-2/neu-Status negativ.

4.1.9 Lymphknotenstatus

Bei den Patientinnen unseres Kollektivs wurden durchschnittlich 12 (minimal 1, maximal 53) Lymphknoten intraoperativ entnommen und anschließend untersucht. In folgender Tabelle lässt sich das Ergebnis der pathomorphologischen Untersuchung der intraoperativ entnommenen Lymphknoten ablesen.

Lymphknotenstatus	Häufigkeit	Prozent
pN0	86	55,1%
pN1	41	23,1%
pN1a	26	16,7%
pN1b	5	3,2%
pN1c	5	3,2%
pN2	11	7,1%
pN3	11	7,1%
pNx	12	7,7%
Gesamt	156	

Tabelle 7: Pathologisches Nodalstatus pN (n=156)

In 55,1% der Fälle waren die axillären Lymphknoten frei von Tumoraussaat. Metastasen in 1–3 Lymphknoten (pN1) konnte man bei 23,1% der Frauen nachweisen. Metastasierung in 4-9 axillären Lymphknoten fand sich in 7,1% der Fälle (pN2). 10 oder mehr Lymphknoten waren bei 7,1% aller Patientinnen befallen. Bei 7,7% der operierten Frauen war der Nodalstatus (pNx) wegen neoadjuvanter Chemotherapie oder fehlender Daten nicht bestimmbar.

4.1.10 Lymphogene und hämatogene Streuung

In der pathologischen Begutachtung der Tumorblöcke konnte bestimmt werden, ob es zu einer Invasion der Tumorzellen in die Lymph- bzw. Blutgefäße gekommen ist.

Lymphangiosis	Häufigkeit	Prozent
Ja	24	15,4%
Nein	132	84,6%
Gesamt	156	

Tabelle 8: Lymphangiosis carcinomatosa (n=156)

In 24 (15,4%) Fällen waren die Pathologen in der Lage eine Aussaat der Tumorzellen in den Lymphgefäßen festzustellen. Bei 132 (84,6%) wurde keine Lymphangiosis carcinomatosa nachgewiesen.

Hämangiosis	Häufigkeit	Prozent
Ja	1	0,6%
Nein	155	99,4%
Gesamt	156	

Tabelle 9: Hämangiosis carcinomatosa (n=156).

Tumorzellen in den Blutgefäßen waren nur in einem Fall (0,6%) sicher zu sehen.

In 155 Fällen (99,4%) konnte eine hämatogene Aussaat ausgeschlossen werden.

4.1.11 Operatives Vorgehen

Operationsverfahren	Häufigkeit	Prozent
Ablatio Mammae	28	17,9%
BET	102	65,4%
BET mit sek. Ablatio	5	3,2%
BET mit sek. Nachresektion	21	13,5%
Gesamt	156	

Table 10: Operative Therapy of Breast Cancer in our Patient Population (n=156).

Bei allen Patientinnen dieses Kollektivs wurde ein brusterhaltendes Vorgehen angestrebt. Aufgrund von klinischer Notwendigkeit bzw. auf Wunsch der Patientin wurde bei 28 (17,9%) Frauen eine Mastektomie als Primäroperation durchgeführt. Bei 102 Frauen (65,4%) blieb die in einer Sitzung durchgeführte brusterhaltende Therapie (BET) die alleinige Operation. Jedoch musste in Einzelfällen nach Erhalt des histologischen Befundes dieses Vorgehen modifiziert werden, in der Regel, weil der maligne Tumor nahe an oder über die Schnittränder hinaus reichte: So erfolgte in 21 Fällen (13,5%) eine Nachresektion, bei 5 Patientinnen (3,2%) wurde eine sekundäre Mastektomie durchgeführt.

4.1.12 Strahlentherapie

Im Anschluss an die Operation war ggf. eine Bestrahlung der Brust (-wand) und/oder der Lymphabflusswege notwendig. Das Zielvolumen der Mamma beträgt im Allgemeinen 50 Gy (46-56 Gy), auf Einzeldosen á 1,8-2 Gy fraktioniert. In der Regel wird fünfmal wöchentlich bestrahlt. Im Bereich des ehemaligen Tumorbettes kann eine lokale Dosiserhöhung (sog. Boostdosis) von 10-16 Gy mit täglichen

Einzelfractionen á 1,8-2 Gy erreicht werden, nachdem die gesamte Mamma im Allgemeinen mit 50 Gy bestrahlt worden ist.

Das Zielvolumen der Lymphabflusswege sollte eine Dosis von 45-50 Gy bei Einzelfractionen von 1,8-2 Gy enthalten.

Strahlentherapie	Häufigkeit	Prozent
Ja	134	85,9%
Nein	22	14,1%
Gesamt	156	

Tabelle 11: Strahlentherapie nach der Primäroperation (n=156).

Nach der Primäroperation unterzogen sich 134 Patientinnen (85,9%) einer radioonkologischen Behandlung. In 22 Fällen (14,1%) wurde eine solche Behandlung nicht durchgeführt.

4.1.13 Adjuvante systemische Therapie

Adjuvante Therapie	Häufigkeit	Prozent
nur Chemotherapie	51	32,7%
nur Antihormontherapie	66	42,3%
Chemo- und Antihormontherapie	22	14,1%
Keine adjuvante Therapie	17	10,9%
Gesamt	156	

Tabelle 12: Adjuvante systemische Therapie (n=156).

In unserem Kollektiv erhielten adjuvant 51 Patientinnen (32,7%) ausschließlich eine Chemotherapie. Nur mit einer antihormonellen Therapie wurden 66 Patientinnen (42,3%) behandelt. In 22 Fällen (14,1%) wurde mit einer antihormonellen Therapie im Anschluss an die Chemotherapie begonnen. Keine Therapie war in 17 Fällen (10,9%) indiziert bzw. gewünscht.

4.1.14 Nachbeobachtungszeit

Bezüglich der Nachbeobachtungszeit ergab sich folgende Verteilung:

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median	SD
Nachbeobachtungszeit	156	6	327	31,24	20,0	38,89

Tabelle 13: Nachbeobachtungszeit in Monaten (n=156).

Die mittlere Beobachtungszeit betrug 31,24 Monate nach Erstdiagnose. Der Median lag bei 20,0 Monaten. Am längsten wurde eine Patientin 327 Monate, am kürzesten 6 Monate beobachtet.

4.1.15 Rezidiv

Rezidiv	Häufigkeit	Prozent
Ja	9	5,8%
Nein	147	94,2%
Gesamt	156	

Tabelle 14: Rezidivhäufigkeit (n=156).

In 9 Fällen (5,8%) kam es zu einem Rezidiv. 94,2% der Fälle blieben die Patientinnen während der Beobachtungszeit rezidivfrei.

4.1.16 Fernmetastasen

Fernmetastasen	Häufigkeit	Prozent
Ja	8	5,1%
Nein	148	94,9%
Gesamt	156	

Tabelle 15: Häufigkeit der Fernmetastasen (n=156).

In 8 Fällen (5,1%) wurden bei Erstdiagnose Fernmetastasen festgestellt. Bei 94,9% der Patientinnen wurden sowohl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als auch während der Beobachtungszeit keine Fernmetastasen nachgewiesen.

4.2 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark

4.2.1 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark bei Erstdiagnose

Es lagen 89 Knochenmarkaspirate vor, in denen bei der Erstdiagnose disseminierte Tumorzellen nachgewiesen wurden. Sie wurden bzgl. des HER-2/neu-Status der gefundenen Zellen charakterisiert und das Ergebnis mit sämtlichen Prognoseparametern verglichen.

4.2.1.1 HER-2/neu-Status der DTC bei Erstdiagnose

HER-2/neu	Häufigkeit	Prozent
positiv	31	34,8%
negativ	58	65,2%
Gesamt	89	

Tabelle 16: HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen (DTC) im Knochenmark bei Erstdiagnose (n=89).

Von 89 Proben war der Status der HER-2/neu-Überexpression in 31 Fällen (34,8%) positiv und in 58 der Fälle (65,2%) negativ.

4.2.1.2 HER-2/neu-Status des Primärtumors der Patientinnen mit DTC im Knochenmark bei Erstdiagnose

HER-2/neu	Häufigkeit	Prozent
positiv	17	19,1%
negativ	72	80,9%
Gesamt	89	

Table 17: HER-2/neu-Status des Primärtumors von Patientinnen mit DTC bei Erstdiagnose

In 17 Fällen (19,1%) war das HER-2/neu-Gen auf dem Primärtumor überexprimiert. Auf 72 Tumorproben (80,9%) war keine Überexpression nachweisbar.

4.2.1.3 HER-2/neu-Status der DTC vs. auf dem Primärtumor bei Erstdiagnose

Es erfolgte eine Korrelation des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor mit dem auf den disseminierten Tumorzellen der gleichen Patientin mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson.

		HER-2/neu auf dem Primärtumor		gesamt (n)
		positiv (n)	negativ (n)	
HER-2/neu auf den DTC	positiv (n)	10	21	31
	negativ (n)	7	51	58
gesamt (n)		17	72	89

Table 18: Korrelation des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor mit dem HER-2/neu-Status der DTC im Knochenmark bei Erstdiagnose (n= Anzahl der Patientinnen).

Bei 21 (29%) Patientinnen mit einem negativen HER-2/neu-Status des Primärtumors wurden HER-2/neu-positive Tumorzellen im Knochenmark gefunden. Unter den Patientinnen mit einem positiven HER-2/neu-Status des Primärtumors fanden sich bei 7 (41%) Patientinnen negative DTC im Knochenmark.

Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson korrelierte der HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor mit dem HER-2/neu-Status auf den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark signifikant (Wert: 5,329; $p=0,021$).

4.2.1.4 HER-2/neu-Status der DTC vs. TumorgroÙe

		TumorgroÙe		gesamt (n)
		pT1 (n)	pT2-4 (n)	
HER-2/neu auf den DTC	positiv (n)	21	10	31
	negativ (n)	34	24	58
gesamt (n)		55	34	89

Tabelle 19: Korrelation des HER-2/neu-Status auf DTC bei Erstdiagnose mit der TumorgroÙe (n= Anzahl der Patientinnen).

Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson korrelierte der HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen nicht mit der TumorgroÙe (Wert: 0,71; $p=0,39$).

4.2.1.5 HER-2/neu-Status der DTC vs. Nodalstatus

		Nodalstatus		gesamt (n)
		pN0 (negativ, n)	pN1-4 (positiv, n)	
HER-2/neu auf den DTC	positiv (n)	18	10	28
	negativ (n)	33	20	53
gesamt (n)		51	30	81

Tabelle 20: Korrelation des HER-2/neu-Status auf DTC bei Erstdiagnose mit dem Nodalstatus (n= Anzahl der Patientinnen).

Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson korrelierte der HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen nicht mit dem Nodalstatus (Wert: 0,06; p=0,97).

4.2.1.6 HER-2/neu-Status der DTC vs. Grading

		Grading		gesamt (n)
		G1	G2-3	
HER-2/neu auf den DTC	positiv (n)	4	27	31
	negativ (n)	9	49	58
gesamt (n)		13	76	89

Tabelle 21: Korrelation des HER-2/neu-Status auf DTC mit dem Tumor-Grading (n= Anzahl der Patientinnen).

Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson korrelierte der HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen nicht mit dem Tumor-Grading (Wert: 0,11; p=0,74).

4.2.1.7 HER-2/neu-Status der DTC vs. Menopausenstatus

		Menopausenstatus		gesamt (n)
		prämenopausal (n)	postmenopausal (n)	
HER-2/neu auf den DTC	positiv (n)	9	22	31
	negativ (n)	12	45	57
gesamt (n)		21	67	88

Tabelle 22: Korrelation des HER-2/neu-Status auf DTC mit dem Menopausenstatus der Patientinnen bei Erstdiagnose (n= Anzahl der Patientinnen).

Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson korrelierte der HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen nicht mit dem Menopausenstatus (Wert: 0,70; $p=0,40$).

4.2.1.8 HER-2/neu-Status der DTC vs. Hormonrezeptorstatus

		Östrogenrezeptorstatus		gesamt (n)
		positiv (n)	negativ (n)	
HER-2/neu auf den DTC	positiv (n)	22	8	30
	negativ (n)	47	9	56
gesamt (n)		69	17	86

Tabelle 23: Korrelation des HER-2/neu-Status auf DTC mit dem Östrogenrezeptorstatus (n= Anzahl der Patientinnen).

Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson korrelierte der HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen nicht mit dem Östrogenrezeptorstatus auf dem Primärtumor (Wert: 1,38; $p=0,24$).

		Progesteronrezeptorstatus		gesamt (n)
		positiv (n)	negativ (n)	
HER-2/neu auf den DTC	positiv (n)	20	10	30
	negativ (n)	39	17	56
gesamt (n)		59	27	86

Tabelle 24: Korrelation des HER-2/neu-Status auf DTC mit dem Progesteronrezeptorstatus (n= Anzahl der Patientinnen).

Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson korrelierte der HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen nicht mit dem Progesteronrezeptorstatus auf dem Primärtumor (Wert: 0,08; $p=0,78$).

4.2.2 Vergleich der Daten bei Primärpunktion und unmittelbar nach abgeschlossener Chemotherapie

Von 8 Patientinnen standen uns Daten zur Primärpunktion (nach Erstdiagnose) sowie zu einer Punktion unmittelbar nach der Chemotherapie zur Verfügung. Diese Daten wurden in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

„+“ = DTC im Knochenmark nachweisbar

„-“ = DTC im Knochenmark nicht nachweisbar

„pos“ = HER-2/neu-Status auf den DTC/Primärtumor positiv

„neg“ = HER-2/neu-Status auf den DTC/Primärtumor negativ

„n.a.“ = HER-2/neu-Status auf den DTC/Primärtumor nicht auswertbar

Pat.	DTC im KM bei Primärdiagnose	HER-2/neu der DTC im KM	DTC im KM nach CTX	HER-2/neu der DTC nach CTX	HER-2/neu des Primärtumors
1	+	n.a.	+	neg	neg
2	-	-	+	pos	pos
3	+	pos	-	-	neg
4	-	-	+	neg	neg
5	+	neg	-	-	neg
6	+	neg	-	-	pos
7	+	pos	+	pos	pos
8	+	neg	+	neg	pos

Tabelle 25: Vergleich der Knochenmarkbefunde zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und unmittelbar nach abgeschlossener Chemotherapie.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren bei 6 von den 8 Patientinnen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisbar. Bei 5 von ihnen konnte man den HER-2/neu-Status ermitteln (40% positiv, 60% negativ). Unmittelbar nach der Chemotherapie konnte man bei 3 Patientinnen mit primär positivem Knochenmarkbefund keine Tumorzellen im Knochenmark mehr feststellen. Bei zwei Patientinnen, bei denen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose keine Tumorzellen im Knochenmark vorlagen, konnte man dagegen nach der Chemotherapie DTC nachweisen. Insgesamt wurden bei 5 von 8 Patientinnen Tumorzellen im Knochenmark gefunden (62,5%). Der HER-2/neu-Status der vor und nach der Chemotherapie gefundenen Zellen änderte sich dabei nicht.

Der HER-2/neu-Status der nach der Chemotherapie nachgewiesenen Tumorzellen im Knochenmark korrelierte nicht mit dem HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor (Chi-Quadrat-Test nach Pearson, Wert: 2,22; p=0,136).

4.2.3 Vergleich der Daten bei Primärpunktion und in der rezidivfreien Nachsorge (außer unmittelbar nach Chemotherapie).

18 Patientinnen unterzogen sich einer Knochenmarkspunktion zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie in der rezidivfreien Nachsorge (durchschnittlich 14,9 Monate nach der Erstpunktion), wovon uns die in der Tabelle zusammengefassten Daten zur Verfügung standen.

„+“ = DTC im Knochenmark nachweisbar

„-“ = DTC im Knochenmark nicht nachweisbar

„pos“ = HER-2/neu-Status auf den DTC positiv

„neg“ = HER-2/neu-Status auf den DTC negativ

„n.a.“ = HER-2/neu-Status auf den DTC nicht auswertbar

Pat.	DTC im KM bei Primärpunktion	HER-2/neu der DTC im KM	DTC im KM i.d. rezidivfreien Nachsorge (außer nach CTX)	HER-2/neu der DTC in der rezidivfreien Nachsorge (außer nach CTX)	HER-2/neu des Primärtumors
1	-	-	-	-	neg
2	-	-	-	-	neg
3	-	-	-	-	neg

4	+	neg	-	-	pos
5	-	-	+	neg	neg
6	+	n.a.	+	pos	pos
7	+	neg	-	-	neg
8	+	n.a.	+	pos	neg
9	+	pos	+	pos	pos
10	+	neg	-	-	pos
11	+	pos	-	-	neg
12	+	pos	+	neg	pos
13	-	-	+	pos	pos
14	+	neg	-	-	neg
15	+	neg	-	-	neg
16	+	neg	-	-	pos
17	+	n.a.	-	-	pos
18	+	neg	-	-	neg

Tabelle 26: Vergleich der Knochenmarkbefunde zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und in der rezidivfreien Nachsorge (außer unmittelbar nach der Chemotherapie).

Bei 13 von 18 Patientinnen (72,2%) lagen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose DTC im Knochenmark vor. In 10 Fällen ließ sich der HER-2/neu-Status dieser Zellen bestimmen (30% positiv, 70% negativ). Die Punktion in der rezidivfreien Nachsorge (durchschnittlich 11,3 Monate nach der Primärpunktion), ergab 6 positive Knochenmarkbefunde (33,3%). Der ermittelte HER-2/neu-Status der DTC in der rezidivfreien Nachsorge: 66,7% positiv, 33,3% negativ. Der HER-2/neu-Status der gefundenen Tumorzellen änderte sich bei einer Patientin. Zum

Zeitpunkt der Erstdiagnose war der Befund positiv, in der rezidivfreien Nachsorge jedoch negativ.

In diesem Kollektiv korrelierte der HER-2/neu-Status der bei Primärdiagnose sowie in der rezidivfreien Nachsorge gefundenen disseminierten Tumorzellen nicht mit dem Primärtumor (nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson, Wert bei Erstdiagnose: 0,476; $p=0,49$; Wert in der rezidivfreien Nachsorge: 0,375; $p=0,54$).

4.2.4 Vergleich des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor und den DTC bei gesichertem Rezidiv

		HER-2/neu auf dem Primärtumor		gesamt (n)
		positiv (n)	negativ (n)	
HER-2/neu auf den DTC	positiv (n)	1	0	1
	negativ (n)	2	3	5
gesamt (n)		3	3	6

Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson korrelierte der HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor nicht mit dem HER-2/neu-Status auf den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (Wert: 1,2; $p=0,27$).

Uns lagen Daten von 2 weiteren Patientinnen mit gesichertem Rezidiv vor, bei denen allerdings die Bestimmung des HER-2/neu-Status auf DTC aufgrund des Tumorzellverlustes bei der Knochenmarkaufarbeitung nicht möglich war.

4.2.5 Vergleich des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor und den DTC bei Metastasierung

		HER-2/neu auf dem Primärtumor		gesamt (n)
		positiv (n)	negativ (n)	
HER-2/neu auf den DTC	positiv (n)	4	0	4
	negativ (n)	1	1	2
gesamt (n)		5	1	6

Tabelle 27: Korrelation des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor mit dem HER-2/neu-Status der DTC im Knochenmark bei Metastasierung (n= Anzahl der Patientinnen).

Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson korrelierte der HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor nicht mit dem HER-2/neu-Status auf den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (Wert: 2,434; p=0,118).

Uns lagen Daten von 2 weiteren Patientinnen mit gesicherten Metastasen vor, bei denen allerdings die Bestimmung des HER-2/neu-Status auf DTC aufgrund des Tumorzellverlustes bei der Knochenmarkaufarbeitung nicht möglich war.

4.2.6 Heterogenität des HER-2/neu-Status auf den disseminierten Tumorzellen

In 71 Punktionen wurde mehr als nur 1 disseminierte Tumorzelle nachgewiesen. Jede Zelle wurde einzeln auf ihren HER-2/neu-Status hin untersucht. Dabei ließen sich in 14 Fällen (19,7%) Unterschiede (Heterogenität) bezüglich des HER-2/neu-Status unter den Zellen einer Punktion feststellen.

5 Diskussion

Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mittels immunzytochemischer Verfahren sowie Charakterisierung deren HER-2/neu-Profils stellt sich in der aktuellen Literatur als ein wichtiger Prognoseparameter für den Verlauf der systemischen Erkrankung Mammakarzinom heraus.

Verschiedene immunzytochemische und molekulare Methoden erlauben schnellen und sicheren Nachweis von DTC im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen, so dass sie auch in der Nachsorge zum Erfolgsmonitoring der Eradikation von DTC nach adjuvanter systemischer Therapie angewandt werden können.

In dieser Arbeit wurde solche Bestimmung der HER-2/neu-Expression auf den disseminierten Tumorzellen mittels CISH untersucht. Besonderes Augenmerk lag auf der Korrelation des HER-2/neu-Status mit bekannten Prognosefaktoren (TNM-Klassifikation, Grading, Hormonrezeptorstatus) und somit auf seiner potenziellen Brauchbarkeit als unabhängigen prognostischen Markers, was der Optimierung der zukünftigen Therapieansätze dienen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Prävalenz von HER-2/neu-positiven und -negativen disseminierten Tumorzellen bestimmt und mit dem HER-2/neu-Status des Primärtumors bei Erstdiagnose und in rezidivfreier Nachsorge verglichen. In der onkologischen Praxis wird lediglich der HER-2/neu-Status des Primärtumors zur Therapieentscheidung herangezogen. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen jedoch, dass sich der HER-2/neu-Status der DTC und des Primärtumors häufig unterscheiden.

Diese Ergebnisse mögen dazu beitragen, den Prozess der hämatogenen Mikrometastasierung besser zu verstehen und den zukünftigen Therapieerfolg bei Mammakarzinompatientinnen zu optimieren.

5.1 **Aktueller Stand der Literatur**

Aus der Vielzahl von Veröffentlichungen zum Thema Mammakarzinom und insbesondere disseminierte Tumorzellen im Knochenmark sollen die wichtigsten und aktuelleren Arbeiten kurz vorgestellt werden.

2001 konnte **Braun et al.** mit der Pilotstudie „erbB2 Overexpression in Occult Metastatic Cells in Bone Marrow Predicts Poor Clinical Outcome of Stage I-III Breast Cancer Patients“ beweisen, dass der Nachweis von HER-2/neu-positiven Tumorzellen im Knochenmark einen unabhängigen prognostischen Faktor, der mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, darstellt ⁵⁹. Es wurden immunhistochemisch nachgewiesene Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark von 52 Patientinnen mit lokoregional begrenztem Primärtumor zum Zeitpunkt der Primärdiagnose auf den HER-2/neu-Status hin untersucht. In 31 von 52 Fällen (60%) konnte eine Überexpression von HER-2/neu auf den Zellen nachgewiesen werden und zwar unabhängig von den anderen prognostischen Faktoren, wie Lymphknotenbefall, Größe, Grading oder HER-2/neu-Status des Primärtumors. Eine HER-2/neu-Überexpression zeigte sich hingegen in lediglich 7 der 24 (29%) verfügbaren Primärtumorproben. Diese Diskrepanz bedarf aufgrund der kleinen Stichprobe vorsichtiger Interpretation, lässt jedoch vermuten, dass während der Tumorprogression HER-2/neu-positive DTC einer positiven Selektion unterliegen. In unserer Studie lag die HER-2/neu-Positivitätsrate bei 19,1% für den Primärtumor und 34,8% für DTC, was diese Aussage ebenfalls bestätigt. Der

hohen Positivitätsrate in Brauns Studie könnte aber eine unterschiedliche Bestimmungsmethode des HER-2/neu-Status zugrunde liegen. Es wurden die extrazellulären HER-2/neu-Domänen angefärbt, in unserer Studie hingegen (wie auch in allen später erwähnten Arbeiten) wurden jeweils die intrazellulären Domänen nachgewiesen.

In der Arbeit von Braun hatten 11 von 17 (65%) Patientinnen mit einem HER-2/neu-negativen Primärtumor, sowie 4 von 7 (57%) Patientinnen mit einem HER-2/neu-positiven Primärtumor HER-2/neu-positiv DTC im Knochenmark. Dieses Ergebnis zeigt eine sehr hohe Diskrepanz für den HER-2/neu-negativen Primärtumor. In unserer Studie wurde dieses Phänomen auch beobachtet, die Häufigkeit lag bei 29%.

Nach einem 64 monatigen Follow-up, hatten Patientinnen mit HER-2/neu-positiven DTC signifikant häufiger Metastasen entwickelt als Patientinnen mit HER-2/neu-negativen DTC (21 vs. 7 Fälle, $p=0,032$). Becker diskutierte, dass dieses Ergebnis eventuell durch schlechteres Ansprechen von HER-2/neu-positiven Tumoren auf alkylierende Zytostatika beeinflusst sein könnte.

In der retrospektiven Arbeit „HER-2 Expression on Disseminated Tumor Cells from Bone Marrow of Breast Cancer Patients“ aus dem Jahre 2005 untersuchte **Becker et al.** 105 Knochenmark-Präparate mit nachgewiesenen Zytokeratin-positiven Zellen von Patientinnen mit Erstdiagnose Mammakarzinom und verglich die Eigenschaften dieser disseminierten Tumorzellen mit dem Primärtumor.⁵² Die Bestimmung von HER-2/neu-Status der DTC wurde mittels HER-2/neu-Antikörpern CB11 und zusätzlich bei 27 Patientinnen mittels RT-PCR vorgenommen und mit dem HER-2/neu-Status des Primärtumors korreliert. In 22

von 105 (21%) Fällen war der HER-2/neu-Status der DTC mittels Immunzytochemie positiv, im Falle von RT-PCR in 15% der Proben. Dagegen wurde die Überexpression des HER-2/neu-Gens auf dem Primärtumor in 26 von 105 Präparaten (25%) gesichert. Es konnte eine positive Korrelation für den HER-2/neu-Status zwischen den DTC und dem Primärtumor nachgewiesen werden. Trotzdem konnten bei 12,6% der Patientinnen mit einem HER-2/neu-negativen Primärtumor HER-2/neu-positive DTC im Knochenmark nachgewiesen werden. Die gezeigte Diskrepanz deckt sich auch mit den Beobachtungen in unserer Studie.

Im Rahmen einer präklinischen Studie zum Thema „Comparison of HER-2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer“ wurden 2006 unter der Leitung von **Solomayer et al.** 137 Knochenmarkaspirate von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom zum Zeitpunkt der Erstdiagnose untersucht.⁵¹ In 46 Fällen konnten Zytokeratin-positive Zellen nachgewiesen werden. Anschließend wurde der HER-2/neu-Status des Primärtumors mittels HERCEP-Test™ bestimmt und mit dem HER-2/neu-Status auf den disseminierten Tumorzellen verglichen. Disseminierte Tumorzellen mit positivem HER-2/neu-Status fanden sich in 20 von 46 Fällen (43% aller DTC bzw. 14,5% aller Patientinnen). Bei 12 von 32 (37,5%) Patientinnen mit HER-2/neu-negativem Primärtumor konnten HER-2/neu-positive DTC nachgewiesen werden. Bei 17 Patientinnen konnte mehr als eine DTC im Knochenmark nachgewiesen werden und bei 7 von diesen Patientinnen (41%) war die HER-2/neu-Expression auf den DTC heterogen, was auch in unserer Studie beobachtet werden konnte (mit der Häufigkeit 19,7%).

Im Gegensatz zu unserer Arbeit konnte hier keine Korrelation zwischen dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und dem HER-2/neu-Status des Primärtumors ($p=0,14$) gefunden werden. Analog zu unseren Ergebnissen wurde keine Korrelation mit den anerkannten prognostischen Faktoren gesichert.

5.2 Vergleich unserer Ergebnisse mit denen in der Literatur

5.2.1 HER-2/neu-Status des Primärtumors in veröffentlichten Studien

Studie/Author	n	HER-2/neu positiv	HER-2/neu schwach positiv	HER-2/neu negativ
Braun et al.	24	29%	42%	29%
Becker et al.	105	25%		75%
Solomayer et al.	45	29%		72%
Eigene Studie	156	25,9%		74,1%

Tabelle 28: Vergleich des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor in unserer Arbeit mit den Daten in veröffentlichten Studien.

Die Verteilung des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor in unserer Studie stimmt gut mit den Ergebnissen der erwähnten Studien überein.

In der Studie von Braun et al. wurde die Beurteilung der HER-2/neu-Expression nach der Färbeintensität vorgenommen: negativ, schwach positiv, stark positiv.

5.2.2 HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen (DTC) in veröffentlichten Studien

Studie/Author	n	HER-2/neu positiv	HER-2/neu negativ
Braun et al.	24	60%	40%
Becker et al.	105	21%	79%
Solomayer et al.	45	43%	57%
Eigene Studie	89	34,8%	65,2%

Tabelle 29: Vergleich des HER-2/neu-Status auf den DTC in unserer Arbeit mit den Daten in veröffentlichten Studien (n= Anzahl der Patientinnen)

Die Ergebnisse der Studie von Braun et al. unterschieden sich stark von den in den Studien von Becker et al. oder Solomayer et al. gelieferten Daten. Unsere Ergebnisse liegen im Bereich der von Solomayer et al. und Becker et al. veröffentlichten Studien. Die höhere Rate an HER-2/positiven DTC in der Arbeit von Braun et al. beruht auf der anderen Nachweismethode von HER-2/neu auf disseminierten Tumorzellen im Vergleich zu den neueren Studien. Braun et al. bediente sich der Färbung von extrazellulären Domänen des HER-2/neu-Rezeptors. In den anderen Studien wurden dagegen Methoden angewandt, die das HER-2/neu-Gen auf dem Chromosom 17 nachweisen. Die hohe Positivitätsrate könnte aber auch durch Selektion von Patientinnen mit vielen DTC verursacht sein.

5.2.3 Heterogenität des HER-2/neu-Status unter den DTC einer Punktion in veröffentlichten Studien

Studie/Author	Heterogenität
Braun et al.	-
Becker et al.	-
Solomayer et al.	41%
Eigene Studie	19,7%

Tabelle 30: Vergleich der in unserer Arbeit nachgewiesener Häufigkeit der Heterogenität des HER-2/neu-Status unter den DTC, die aus einer Punktion stammen, mit den Daten in veröffentlichten Studien.

Im Vergleich zu unserer Studie, fanden sich in der Arbeit von Solomayer et al. mehr als doppelt so häufig Unterschiede in der Expressivität des HER-2/neu-Status auf den disseminierten Tumorzellen, die im Rahmen einer Punktion gewonnen wurden 19,7% vs. 41%. Diese Diskrepanz könnte durch die kleinere Probenanzahl mit mehreren DTC in der Arbeit von Solomayer erklärt werden (7 von 17 Proben vs. 14 von 71 Proben in unserer Studie).

5.2.4 **HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen vs. andere Prognosefaktoren**

Patientenkollektiv	Braun et al.		Becker et al.		Solomayer et al.		Eigene Studie (Erstdiagnose)	
	N (%)	N mit HER2+ DTC (%)	N	N mit HER2+ DTC (%)	N (%)	N mit HER2+ DTC (%)	N (%)	N mit HER2+ DTC (%)
N	52	31 (60)	105	22 (21)	46	20 (43)	89	31 (35)
Ø Alter bei ED			58,9 J.					56,73J.
Menopause								
Prämenopause			19 (21)		14 (30)	8 (57)	21 (24)	9 (43)
Postmenopause			70 (79)		32 (70)	13 (41)	67 (76)	22 (33)
Tumorgröße								
pT1	42 (81)*	26 (62)	55 (52)		29 (64)	16 (55)	55 (62)	21 (38)
pT2-4	10 (19)*	5 (50)	50 (48)		16 (36)	4 (25)	34 (38)	10 (29)
Nodalstatus								
N0	26 (50)	16 (62)	86 (85)		27 (59)	14 (52)	51 (63)	18 (35)
N1-4	26 (50)	15 (58)	15 (15)		19 (41)	7 (37)	30 (37)	10 (33)
Grading								
G1	39 (75)*	22 (56)	1 (1)				13 (15)	4 (31)
G2-3	13 (25)*	9 (69)	100 (99)				76 (85)	27 (36)
ER Status								
positiv			84 (80)		34 (77)	15 (44)	69 (80)	22 (32)
negativ			21 (20)		10 (23)	4 (40)	17 (20)	8 (47)
PR Status								
positiv			65 (62)		30 (68)	13 (43)	59 (69)	20 (34)
negativ			40 (38)		14 (32)	6 (43)	27 (31)	10 (37)
HER-2/neu								
positiv	7 (29)	4 (57)	26 (25)	12 (46)	13 (29)	8 (62)	17 (19)	10 (59)
negativ	17 (71)	11 (65)	79 (75)	10 (13)	32 (71)	12 (38)	72 (81)	21 (29)

* Braun et al. gruppierte die Tumorstadien wie folgt: T1-2, T3-4; G1-2, G3.

Tabelle 31: Vergleich der Korrelation des HER-2/neu-Status auf den DTC mit den etablierten Prognosefaktoren in unserer Arbeit mit den Daten in veröffentlichten Studien.

In den Arbeiten von Braun und Solomayer war der HER-2/neu-Status der DTC von allen bekannten Prognosefaktoren unabhängig.

Becker hingegen konnte eine Korrelation zwischen dem HER-2/neu-Status der DTC mit dem negativen Hormonrezeptorstatus ($p=0,006$) feststellen, was die klinische Beobachtung bestätigt, dass HER-2/neu-positive Tumoren auch häufiger hormonunabhängig wachsen.

Im Gegensatz dazu wurde in unserer Arbeit nur eine Korrelation zwischen dem HER-2/neu des Primärtumors und der DTC bei Erstdiagnose gefunden ($p=0,021$).

5.3 **Diskussion der Ergebnisse**

Ultrasensitive immunzytochemische Verfahren erlauben den Nachweis früher hämatogener Metastasierung in Form von disseminierten Tumorzellen bei Brustkrebspatientinnen, bei denen selbst mit hochauflösenden apparativen Untersuchungen noch keine Zeichen einer Fernmetastasierung gezeigt werden können. Diese okkulten Tumorzellen können bereits im Einzellstadium in den Lymphknoten, im Knochenmark als disseminierte Tumorzellen (DTC) und mittlerweile im Blut, als zirkulierende Tumorzellen (CTC) nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass diese verborgenen Tumorzellen ausschlaggebend für die Entwicklung von Fernmetastasen sein könnten.

DTC können im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen in 20-45% bei Erstdiagnose und bis zu 70% bei Metastasierung nachgewiesen werden.¹¹ In unserer Studie zeigten die DTC eine HER-2/neu-Positivitätsrate von 34,8%. Allerdings hatten nur 22,7% von diesen Patientinnen auch tatsächlich einen HER-2/neu- positiven Primärtumor. Diese Diskrepanz ließ sich auch in den zitierten

Studien beobachten. Trotzdem korrelierte der HER-2/neu-Status des Primärtumors mit dem der DTC in unserer Arbeit und in der Arbeit von Becker et al. Es werden mehrere Hypothesen diskutiert, die die Diskrepanz zwischen dem HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor und auf den DTC erklären sollten. Eine der vorgeschlagenen Theorien besagt, dass die HER-2/neu-positiven DTC einen Wachstums- und Überlebensvorteil haben und deshalb häufiger im Knochenmark und Blut nachgewiesen werden können.⁶⁰ Meng zeigte auch, dass HER-2/neu-Überexpression der DTC auch während der Tumorprogression erworben werden kann.⁶¹ Andererseits gibt es auf den als HER-2/neu-negativ eingestuften Primärtumoren auch HER-2/neu-positiv eingestufte Zellsubklone, deren Anzahl jedoch die nötigen 10% cut-off für eine HER-2/neu-Positivität nicht überschreitet. Diese Zellen können sich auch vom Primärtumor lösen und als DTC im Knochenmark nachgewiesen werden. Solche intratumorale Heterogenität würde auch die beobachteten Unterschiede hinsichtlich des HER-2/neu-Status der DTC, die aus einer Punktion stammen, erklären.

Studien zeigen, dass einzelne Tumorzellen bereits sehr früh vom Primärtumor in die Blutbahn abgegeben werden können. Im Knochenmark können sie durch Herabsetzen ihrer metabolischen Aktivität in den sog. *dormant state* („Ruhe-“ oder „Schlafzustand“) übergehen und einer systemischen Therapie somit entgehen.³⁶ Somit lässt die Beobachtung aus unserer Studie erklären, dass nach abgeschlossener systemischer Therapie weiterhin DTC gefunden werden konnten und dass ihr HER-2/neu-Status sich in wenigen Fällen „geändert“ hat. Janni et al zeigten, dass sich nach der Primäroperation und abgeschlossener adjuvanter Chemotherapie in 15% der Fälle DTC weiterhin nachweisen ließen.⁴⁰ In der Arbeit von Braun waren es sogar 44%. Diese höhere Rate ist jedoch durch Selektion

von Patientinnen mit inflammatorischem und fortgeschrittenem (Befall von mehr als 4 axillären Lymphknoten) Mammakarzinom in Brauns Studie bedingt.³⁹

Molekulare Analysen bestätigen ebenfalls die Theorie, dass sich die DTC bereits früh in der Tumorprogression vom Primärtumor trennen, da sie genetisch nicht dem fortgeschrittenen Zellklon des Primärtumors entstammen.³⁸ Ihre frühe Freisetzung in die Blutbahn könnte auch erklären, dass die DTC mit den Zeichen einer Tumorprogression, z.B. dem Tumorwachstum, Tumorgrading oder Lymphknotenbefall nicht korrelieren.

Die inhomogenen Ergebnisse unter den zitierten Studien sind möglicherweise durch kleine Patientenzahlen und niedrige Ausbeute an DTC im Aufarbeitungsprozess des Knochenmarkes bedingt. Zur Isolierung der Tumorzellen wurden in unserer Arbeit die Knochenmarkproben mit Hilfe der Dichtezentrifugation (auf Ficoll) aufgearbeitet. Durch die mehrstufige Abtrennung der Erythrozyten und Granulozyten besteht die Gefahr des Tumorzellverlustes. Zusätzliche Bearbeitungsschritte der Knochenmarksproben im Rahmen der CISH kann den Verlust von weiteren Tumorzellen begünstigen. Das Alter der Proben kann ebenso zur Erniedrigung der Tumorzellausbeute beitragen. Aufgrund von längeren Transportwegen bei Knochenmarksproben der Patientinnen aus dem Klinikum Bayreuth war es nicht immer möglich die Proben innerhalb von empfohlenen 24 Stunden aufzuarbeiten. Inwieweit das Alter der Proben allerdings tatsächlich die Detektionsrate der DTC beeinflusst, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht evaluiert werden.

Weitere Probleme der Tumorzelldetektion beinhalten darüber hinaus die Subjektivität des Untersuchers bei manueller Identifikation der Zellen. Dies wurde an der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum

Innenstadt durch Einführung der automatisierten mikroskopischen Screeninguntersuchung gelöst. Dadurch kann das Verfahren zusätzlich beschleunigt und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhöht werden.

Darüber hinaus muss man hinsichtlich der dargestellten Ergebnisse auch bedenken, dass sich der Beobachtungszeitraum für das Patientenkollektiv von 1995 bis 2007 erstreckt. In diesem langen Zeitraum haben sich sowohl die primär operative als auch die systemische Therapie des Mammakarzinoms verändert, was nicht ohne Einfluss auf diese Studie bleibt.

Uns ist ebenfalls bewusst, dass die Patientinnenanzahl eher niedrig ist und die unterschiedlichen Tumorstadien, Grading und die Therapie die Daten beeinflussen könnten.

5.4 **Ausblick**

Präoperativ lassen sich DTC bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom in 20-45% der Fälle nachweisen. Nach einer Operation sowie Chemotherapie verbleiben sie im Knochenmark von bis zu 15% dieser Patientinnen. Ihre Persistenz im Knochenmark wird mit einem erhöhten Risiko für ein Frührezidiv sowie mit verkürztem Gesamtüberleben in Verbindung gebracht.^{40;62} Es konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass nur wenige dieser Zellen proliferieren und somit einer konventionellen antiproliferativen Therapie zugänglich sind.³⁶ Der Großteil dieser Zellen ruht im Knochenmark und kann möglicherweise erst durch zielgerichtete Therapieansätze eliminiert werden.

Ein viel versprechendes Target (Angriffspunkt) für eine solche Therapie stellt der HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen dar. Trastuzumab, ein

monoklonaler Antikörper gegen die überexprimierten Rezeptoren des HER-2/neu auf der Oberfläche der Tumorzellen, führte in Studien zu Reduktion der Tumormasse bei metastasierten Patientinnen.⁶³ Neuere Studien zeigen darüber hinaus, dass auch Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, der das HER-2/neu-Gen überexprimiert, von Trastuzumab-Immuntherapie profitieren könnten. Dies wurde im Rahmen der HERA- und NSABP-B31/NCCTG N9831-Studien bewiesen.^{48;49;61}

Es bleibt jedoch zu beachten, dass der HER-2/neu-Status des Primärtumors nicht immer mit dem HER-2/neu-Status auf den DTC übereinstimmt.^{30;52;59;61;64} Auch in unserer Arbeit zeigte sich diese Diskrepanz: bei 21 (29%) Patientinnen mit einem negativen HER-2/neu-Status des Primärtumors wurden HER-2/neu-positive Tumorzellen im Knochenmark gefunden. Da jedoch nach den aktuellen Leitlinien der HER-2/neu-Status des Primärtumors zur Therapieentscheidung herangezogen wird, würde diesen 21 Patientinnen eine Trastuzumabtherapie vorenthalten bleiben, von der sie möglicherweise profitieren würden. Klinische Prüfungen zur Untersuchung dieses Sachverhaltes befinden sich derzeit in Vorbereitung.

In unserer Studie nicht untersuchten, aber interessanten Aspekt stellt der HER-2/neu-Status der Fernmetastasen dar. In der veröffentlichten Literatur finden sich Diskrepanzen zwischen dem HER-2/neu-Status des Primärtumors und der Metastasen in 7-20% der Fälle.^{30;65-67} Bei Therapieversagern mit HER-2/neu-negativem Primärtumor, könnte deshalb eine CT-gesteuerte Punktion der zugänglichen Fernmetastasen in Erwägung gezogen werden, um eine HER-2/neu-Positivität der Herde auszuschließen. Bei Positivität kann eine nachfolgende Trastuzumab-Therapie zur Tumorregression führen. Möglicherweise könnte auch eine gesteigerte Freisetzung dieses Antigens mit erhöhten Serumwerten für HER-

2/neu erste Hinweise geben.⁶⁸ Große prospektive Studien mit dieser Fragestellung wären wünschenswert.

Auch innerhalb einer Punction, wenn mehr als eine DTC gewonnen wird, zeigt sich nicht selten eine Heterogenität in Hinblick auf den HER-2/neu-Status der DTC. In unserer Arbeit war es bei Erstdiagnose in 14 Punctionen (19,7%) der Fall. Da es sich hier um eine intratumorale Heterogenität des HER-2/neu-Status handeln könnte, wäre eine alleinige Therapie mit Trastuzumab möglicherweise nicht ausreichend.

Für Patientinnen mit nachgewiesenen DTC könnten auch andere zielgerichtete Therapieansätze zum Einsatz kommen. Zur therapierrelevanter Antigene auf DTC könnte das Thomsen-Friedenreich-Antigen gehören, das in den letzten Jahren immer mehr an Interesse gewinnt. Dieses tumorassoziierte Antigen beeinflusst die endotheliale Adhäsion der Tumorzellen und deren Stromainvasion und kann somit als Marker für Tumoraggressivität angesehen werden. Mit zunehmender Tumorgöße und steigender Zahl der befallenen axillären Lymphknoten nimmt die Expressions des Thomsen-Friedenreich-Antigens auf dem Primärtumor entsprechend zu.⁶⁹

Schindlbeck et al. untersuchte die Expression des Thomsen-Friedenreich-Antigens auf DTC bei Mammakarzinompatientinnen. Obwohl nur ca. 40-70% aller primären Mammakarzinome eine Positivität für dieses Antigen aufweisen, konnte in dieser Studie eine Koexpression des Thomsen-Friedenreich-Antigens auf 98% aller DTC nachgewiesen werden.⁷⁰ Somit könnte künftig das Thomsen-Friedenreich-Antigen als spezifisches Target für Antikörpertherapie gegen die DTC in Betracht gezogen werden.

Als vielversprechend gilt derzeit auch der humanisierter monoklonaler Antikörper Bevacizumab (Avastin®), der an den zirkulierenden *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) bindet und somit die Angiogenese hemmt. Als Monosubstanz zeigte Bevacizumab nur begrenzte Aktivität, in Kombination mit taxanhaltiger Chemotherapie wurde bei rezidivierendem oder metastasiertem Mammakarzinom eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens verzeichnet.⁷¹

Ein neues Therapieprinzip stellen die PARP-Inhibitoren dar. Das Enzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) ist an der DNA-Reparatur beteiligt (Basenexzisionsreparatur). Seine Inhibition führt folglich zur Kumulation von Einzelstrang- und Doppelstrangschäden, was besonders in Zellen mit mutierten BRCA-Genen, die für die Reparatur durch homologe Rekombination verantwortlich sind, den selektiven Zelltod auslösen kann. Darüber hinaus sprechen die geschädigten Zellen besser auf Chemo- und Radiotherapie an, was insbesondere bei triple-negativen Tumoren, die erhöhte PARP-Aktivität aufweisen, von Bedeutung sein kann.^{72;73}

Dem Adhäsionsprotein Ep-CAM (*epithelial cell adhesion molecule*) wird ebenso besondere Aufmerksamkeit gewidmet, da es sich zum unabhängigen Prognosefaktor in nodalnegativem, nicht therapiertem Mammakarzinom herausstellt.⁷⁴

Da die Methoden der Gewinnung von Knochenmark ein aufwendiges und für die Patientin unangenehmes Prozedere darstellen, wird das besondere Augenmerk zunehmend auf die im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen geworfen. Auch die Ergebnisse von unlängst veröffentlichten Studien weisen darauf hin, dass die CTC, die mit automatisierten Verfahren gewonnen werden können, sich als zusätzlicher Verlaufsparemeter bei Patientinnen mit metastasiertem

Mammakarzinom eignen.²⁴ Eine Überwachung des Therapieerfolges und des langfristigen Follow-up dieser Patientinnen wäre somit möglicherweise erleichtert. Entscheidend für effektives Monitoring der Minimal Residual Disease ist die Standardisierung der Nachweismethoden, z.B. durch Einführung automatisierter Screeningapparatur.

5.5 **Schlussfolgerung**

In unserer Arbeit stellt sich der HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark der Patientinnen mit primärem Mammakarzinom als ein therapierelevanter Parameter heraus. Bei Patientinnen, die einen negativen HER-2/neu-Status des Primärtumors aufweisen, finden sich regelmäßig HER-2/neu-positive Tumorzellen. Diese Patientinnen würden möglicherweise von einer adjuvanten Trastuzumabtherapie profitieren. Unter DTC in einer und derselben Punktion kann sich jedoch eine Heterogenität in Hinblick auf den HER-2/neu-Status zeigen, was den Erfolg einer alleinigen Trastuzumabtherapie herabsetzen könnte.

Um die Minimal Residual Disease überwachen und zielgerichtet therapieren zu können, müssten weitere Targetmoleküle auf den DTC identifiziert werden. Somit wäre eine individuelle Therapie jeder Patientin möglich, abhängig von dem Phänotyp ihres Tumors und der DTC.

6 Zusammenfassung

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark ist sowohl zum Zeitpunkt der Primärdiagnose als auch während der rezidivfreien Nachsorge mit einer schlechteren Prognose assoziiert und stellt einen unabhängigen Prognosefaktor dar. Diese Tumorzellen sind in 10-40% der Knochenmarkaspirate bei Erstdiagnose nachweisbar. Es wird angenommen, dass diese Tumorzellen dem Primärtumor entstammen und zur Ausbildung von Fernmetastasen fähig sind. Zudem ist eine Änderung des Tumorphänotyps im Verlauf der Erkrankung ein bekanntes Phänomen. Diese einzelnen Tumorzellen können im Knochenmark und im Blut mithilfe von Antikörpern, die gegen Zytokeratine (Marker epithelialer Zellen) gerichtet sind, nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war ein Vergleich des HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor und auf disseminierten Tumorzellen im Verlauf der Erkrankung.

An der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt wurden 156 Knochenmarkaspirate von Patientinnen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom, in denen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose oder während der rezidivfreien Nachsorge disseminierte Tumorzellen gefunden worden waren, untersucht. Von 156 Knochenmarkaspiraten wurden 89 bei Erstdiagnose, 50 in der rezidivfreien Nachsorge, 9 bei Rezidiv und 8 bei Fernmetastasierung gewonnen.

Das Knochenmarkmaterial wurde im tumorimmunologischen Labor der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Innenstadt in mehreren Schritten nach den standardisierten Protokollen sorgfältig aufbereitet.

Während in 25,9% aller Primärtumoren einen positiven HER-2/neu-Status aufwiesen, war es unter den disseminierten Tumorzellen bei Erstdiagnose in 34,8% der Fall. In der rezidivfreien Nachsorge, durchschnittlich 11,3 Monate nach der Erstdiagnose, war der HER-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen sogar in 66,7% positiv.

Nach dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson korrelierte bei Erstdiagnose der HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor mit dem HER-2/neu-Status auf den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark signifikant (Wert: 5,329; $p=0,021$). Er korrelierte jedoch nicht mit der Tumorgroße ($p=0,39$), Grading ($p=0,74$), Hormonrezeptorstatus ($p=0,24$ für den Östrogenrezeptor, bzw. $p=0,78$ für den Progesteronrezeptor) oder Lymphknotenmetastasen ($p=0,97$).

In der rezidivfreien Nachsorge korrelierte der HER-2/neu-Status der DTC nicht mit dem HER-2/neu-Status des Primärtumors ($p=0,107$) und war von sämtlichen etablierten Prognosefaktoren unabhängig. Somit stellt sich der HER-2/neu-Status der DTC als ein unabhängiger Parameter heraus, der möglicherweise eine Therapierelevanz besitzt. Dies sollte Gegenstand zukünftiger randomisierter Studien werden.

7 Anhang

Mamma-Datenbank

Bearbeitung Suchen Sortierung Datenauswahl Ausgabe Sonstiges Studie (Dr. Rjosk) Ende

NEUER SATZ

BASISDOKUMENTATION

Name Vorname
 Geburtsdatum Alter (in Jahren)
 Histo-Nr. 2. Histo-Nr.
 Journal-Nr.
 Tumorpaß-Nr.
 Erstdatum Seite

VERLAUF

letztes Datum
 Rezidiv
 Nachsorge ausgeschieden Beobachtungszeit in Monaten
 Ursache
 Bemerkung

Datensatz: 1 von 1

Formularansicht

Seite 1/5

Neue Patientin
 Suche Patientin
 Patientin löschen

Mamma-Datenbank

Bearbeitung Suchen Sortierung Datenauswahl Ausgabe Sonstiges Studie (Dr. Rjosk) Ende

NEUER SATZ

ANAMNESE

Periodendauer Mammographie zusätzl. Mammadiagnostik
 Familienanamnese Zytologie
 Klinische Diagnose Sonographie
 Lokalisation Operabilität
 Klinik Primärtherapie

OPERATION

Schnellschnitt OP-Art
 Kontralaterale PE

HISTOLOGIE

Tumorgroße (in mm) TYP:
 Ca in situ als/um Primärtum.

BEGLEITREAKTION

Tumorfront Tumorverteilung
 Lymphangiosis Infiltration
 Blutgefäßeinbruch Absetzungsrand
 Lymphozytäre Reaktion Grading
 Tumornekrose Grading (Summe)

Datensatz: 1 von 1

Formularansicht

Seite 2/5

Mamma-Datenbank Bearbeitung Suchen Sortierung Datenauswahl Ausgabe Sonstiges Studie (Dr. Rjosk) Ende

NEUER SATZ

LYMPHKNOTEN Seite 3/5

Gesamtanzahl Gesamtmetastasen

Level I Level II Level III

Anzahl

Metastasen

Zusatz

pTNM-Klassifikation pT pN pM

Fernmetastasen (Op-Zeit)

REZEPTOREN

Östrogen Progesteron

KI 67 CERB

EGF P-53

Stammhalter 1 Stammhalter 2

KNOCHENMARKSPUNKTION

Datum	ck-pos	Anzahl
1. <input type="text"/>	<input type="text"/>	0
2. <input type="text"/>	<input type="text"/>	0
3. <input type="text"/>	<input type="text"/>	0
4. <input type="text"/>	<input type="text"/>	0
5. <input type="text"/>	<input type="text"/>	0
6. <input type="text"/>	<input type="text"/>	0

Datensatz: 1 von 1

Formularansicht NF

Mamma-Datenbank Bearbeitung Suchen Sortierung Datenauswahl Ausgabe Sonstiges Studie (Dr. Rjosk) Ende

NEUER SATZ

NACHBEHANDLUNG Seite 4/5

Nachbehandlung Chemotherapie

Strahlentherapie Hormontherapie

KOMPLIKATIONEN

post-op. Komplikationen Beginn

Arnödem Ende

Dauer (in Monaten)

Strahlenfolgen

Extramammäre

REZIDIVERFASSUNG

Rezidiv	Auftreten	Rezidiv-Lokalisation	Kombinationen	Rezidiv-Therapie	Rezidiv-Verlauf	Remissionsdauer (Mon)
<input type="text"/>						

Datensatz: 1 von 1

Formularansicht NF

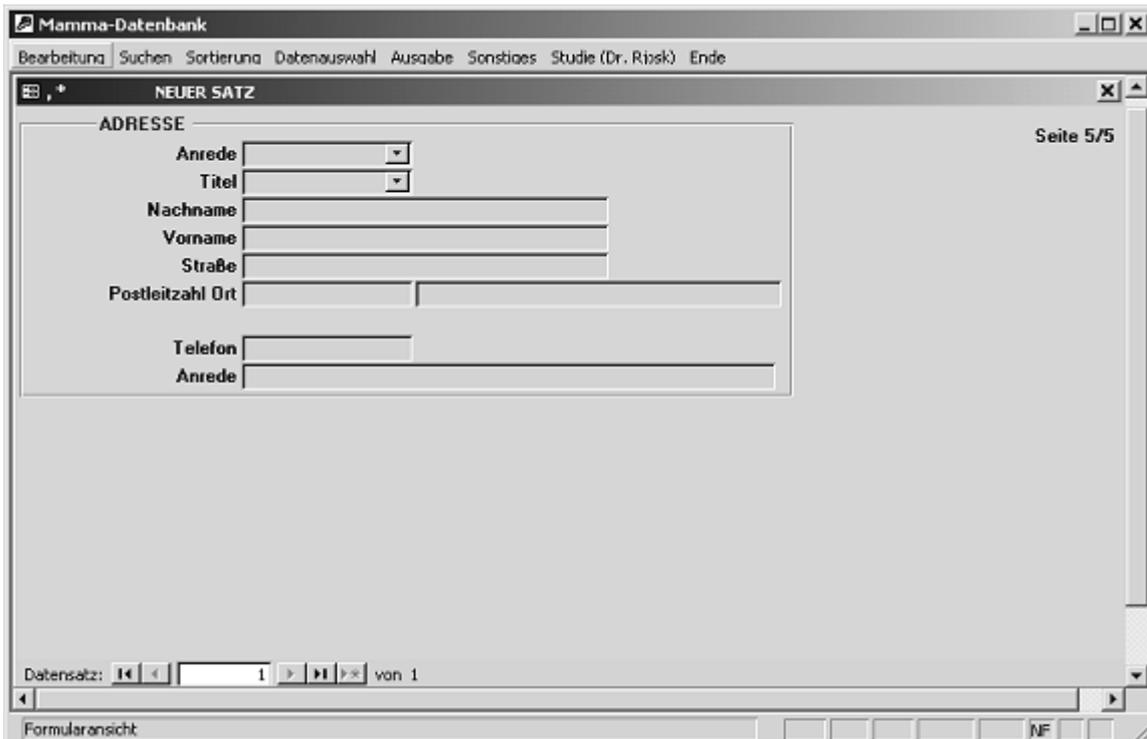


Abbildung 10: Mammadatenbank - Datenerhebungsbögen

EINWILLIGUNG ZUR KNOCHENMARKPUNKTION
IMMUNZYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Liebe Patientin,
die Untersuchung des Knochenmarks wird in der Krebsdiagnostik eingesetzt, um wertvolle Informationen über den Ausbreitungsgrad der Krankheit zu erhalten. Dieses Verfahren ist momentan noch Gegenstand wissenschaftlicher Forschung, um neue Therapiemöglichkeiten und Chancen der Früherkennung zu entwickeln. Zu diesem Zweck, bitten wir Sie, liebe Patientin, um die Einwilligung zu einer Knochenmarkpunktion. Die Untersuchung ist kostenlos.

Untersuchungsverfahren

Mit einer Spezialnadel wird vom Beckenkammknochen der linken und rechten Seite jeweils eine Knochenmarkprobe entnommen. Die Punktion des Knochenmarks erfolgt in örtlicher Betäubung. Anhaltende Schmerzen im Bereich der Punktionsstelle nach der Operation sind nicht zu erwarten. Wird die Punktion in örtlicher Betäubung durchgeführt, so kann das Ansaugen des Knochenmarks einen heftigen, aber sehr kurzen Schmerz verursachen.

Mögliche Komplikationen

Die Risiken des Eingriffs, wie z.B. das Infektionsrisiko, sind außerordentlich gering. Eventuelle Nachblutungen aus Hautvenen sind selten und lassen sich durch einfachen Druck auf die Punktionsstelle leicht beherrschen.

Die Beantwortung der folgenden Fragen hilft uns, die Risiken zusätzlich möglichst gering zu halten:

1. Besteht eine vermehrte Blutungsneigung?
 nein ja
2. Besteht eine Allergie? (z.B. gegen Medikamente, Pflaster, örtliche Betäubungsmittel ?)
 nein ja, welche:

Verhalten nach der Untersuchung

Zur Blutstillung genügt in der Regel ein Druck von wenigen Minuten auf die Einstichstelle. Die Punktionsstelle braucht in der Regel vom Arzt nicht mehr kontrolliert zu werden, falls nicht eine Nachblutung aus dem Punktionskanal oder länger andauernde Schmerzen auftreten. Nach einer Knochenmarkpunktion, die in örtlicher Betäubung durchgeführt wurde, sollten Sie mindestens eine halbe Stunde ruhen.

Herr/Frau Dr.

hat mit mir heute anhand dieses Informationsblattes ein Aufklärungsgespräch geführt, bei dem ich alle mich interessierenden Fragen stellen konnte. Ich stimme zu, dass das entnommene Knochenmark und die Untersuchungsergebnisse wissenschaftlich ausgewertet und weiterverwendet werden.

- Ich habe keine weiteren Fragen und benötige keine zusätzliche Überlegungsfrist.
- Ich willige hiermit in die vorgeschlagene Untersuchung ein.

ODER

- Ich versage meine Zustimmung.

Ort, Datum

Unterschrift der Patientin

Ort, Datum

Unterschrift des Arztes/der Ärztin

Abbildung 11: Patienteneinwilligung zur Durchführung einer Knochenmarkspunktion und immunzytologischen Aufarbeitung

8 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (2009) Todesursachen in Deutschland 2007 (Fachserie 12 - Reihe 4) <http://www.destatis.de>. 2009.
2. Robert-Koch-Institut (RKI): Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie (2009) Dachdokumentation Krebs: Interaktive Datenbankabfragen. <http://www.rki.de>. 2009.
3. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 1998;352:930-42.
4. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 1998;351:1451-67.
5. De VV, Jr. Breast cancer therapy: exercising all our options. *N.Engl.J.Med*. 1989;320:527-29.
6. Galea MH, Blamey RW. Comment on 'Predicting recurrence in axillary node negative breast cancer patients', by Rosner and Lane. *Breast Cancer Res.Treat*. 1993;28:299-300.
7. Braun S, Vogl FD, Janni W, Marth C, Schlimok G, Pantel K. Evaluation of bone marrow in breast cancer patients: prediction of clinical outcome and response to therapy. *Breast*. 2003;12:397-404.
8. Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer*. 2006;107:885-92.
9. Fehm T, Becker S, Bachmann C, Beck V, Gebauer G, Banys M et al. Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecol.Oncol*. 2006;103:942-47.
10. Wolfle U, Muller V, Pantel K. Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance. *Future.Oncol*. 2006;2:553-61.
11. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnott HD 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;18:1432-39.

12. Alix-Panabieres C, Muller V, Pantel K. Current status in human breast cancer micrometastasis. *Curr.Opin.Oncol.* 2007;19:558-63.
13. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr.Relat Cancer.* 2006;13:1033-67.
14. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J.Clin.Oncol.* 1991;9:1749-56.
15. Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J.Clin.Oncol.* 1992;10:1534-39.
16. Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br.J.Cancer.* 1994;69:566-71.
17. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 2003;21:3469-78.
18. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Gomme S, Nos C, de Rycke Y, Thiery JP et al. Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse. *Clin.Cancer Res.* 2008;14:3306-11.
19. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Kaul S, Krempien B, Goerner R et al. [The prognostic significance of tumor cell detection in bone marrow of patients with breast cancer]. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1990;50:923-28.
20. Slade MJ, Coombes RC. The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Nat.Clin.Pract.Oncol.* 2007;4:30-41.
21. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastases in breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 2005;353:793-802.
22. Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Rack B, Gerber B, Schmitt M et al. Comparative analysis between the HER-2 status in primary breast cancer tissue and the detection of isolated tumor cells in the bone marrow. *Breast Cancer Res.Treat.* 2004;87:65-74.
23. Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schutz F et al. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2001;7:4102-08.
24. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 2004;351:781-91.

25. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J.Oncol.* 2010;2010:617421. Epub;2009 Dec 9.:617421.
26. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B 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;13:920-28.
27. Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology.* 2008;75:140-48.
28. Slade MJ, Payne R, Riethdorf S, Ward B, Zaidi SA, Stebbing 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;100:160-66.
29. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin.Cancer Res.* 2002;8:2073-84.
30. Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G, Pedrocchi M, Paesmans M et al. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann.Oncol.* 2002;13:1036-43.
31. Hosch SB, Braun S, Pantel K. Characterization of disseminated tumor cells. *Semin.Surg.Oncol.* 2001;20:265-71.
32. Janni, W., Pantel, K., Rack, B., Schindlbeck, C., Sommer, H., Gerber, B., and Friese, K. Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen. *Deutsches Ärzteblatt* 51-52, A3496-A3502. 12-20-2004.
33. Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet.* 2002;360:683-89.
34. Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology.* 2008;75:140-48.
35. Stojadinovic A, Mittendorf EA, Holmes JP, Amin A, Hueman MT, Ponniah S et al. Quantification and phenotypic characterization of circulating tumor cells for monitoring response to a preventive HER-2/neu vaccine-based immunotherapy for breast cancer: a pilot study. *Ann.Surg.Oncol.* 2007;14:3359-68.

36. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J.Natl.Cancer Inst.* 1993;85:1419-24.
37. Putz E, Witter K, Offner S, Stosiek P, Zippelius A, Johnson J 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;59:241-48.
38. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2003;100:7737-42.
39. Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J.Clin.Oncol.* 2000;18:80-86.
40. Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer.* 2005;103:884-91.
41. Slamon DJ. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer. *Cancer Invest.* 1990;8:253.
42. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 2003;95:142-53.
43. Moliterni A, Menard S, Valagussa P, Biganzoli E, Boracchi P, Balsari A et al. HER-2 overexpression and doxorubicin in adjuvant chemotherapy for resectable breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 2003;21:458-62.
44. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist.* 1998;3:237-52.
45. Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Sauer T et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin.Cancer Res.* 2001;7:4122-29.
46. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 1994;330:1260-66.

47. Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene*. 1999;18:2241-51.
48. Piccart-Gebhart MJ. Adjuvant trastuzumab therapy for HER-2-overexpressing breast cancer: what we know and what we still need to learn. *Eur.J.Cancer*. 2006;42:1715-19.
49. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2-positive breast cancer. *N.Engl.J.Med*. 2005;353:1673-84.
50. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC.Cancer*. 2007;7:153.:153.
51. Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G, Bachmann R, Kramer B, Vogel U et al. Comparison of HER-2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res.Treat*. 2006;98:179-84.
52. Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D, Solomayer EF. HER-2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2005;25:2171-75.
53. Fehm T, Becker S, Duerr-Stoerzer S, Sotlar K, Mueller V, Wallwiener D et al. Determination of HER-2 status using both serum HER-2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER-2 negative or of unknown HER-2 status. *Breast Cancer Res*. 2007;9:R74.
54. Pantel K, Felber E, Schlimok G. Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J.Hematother*. 1994;3:315-22.
55. Bässler, R. Pathologie der Brustdrüse. In: Doerr W, Seifert G Uehlinger E editors. *Spezielle pathologische Anatomie*. 1978. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag.
56. World Health Organization. [Histological typing of breast tumors. Second edition. World Health Organization. Geneva, 1981]. *Ann.Pathol*. 1982;2:91-105.
57. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J.Clin.Oncol*. 2002;20:3628-36.
58. BLOOM HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br.J.Cancer*. 1957;11:359-77.

59. Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G et al. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res.* 2001;61:1890-95.
60. Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G et al. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int.J.Cancer.* 1998;76:824-28.
61. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2004;101:9393-98.
62. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G et al. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin.Cancer Res.* 2004;10:5342-48.
63. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 2002;20:719-26.
64. Tanner M, Jarvinen P, Isola J. Amplification of HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61:5345-48.
65. Edgerton SM, Moore D, Merkel D, Thor AD. erbB-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 2003;11:214-21.
66. Regitnig P, Schippinger W, Lindbauer M, Samonigg H, Lax SF. Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas. *J.Pathol.* 2004;203:918-26.
67. Zidan J, Dashkovsky I, Stayerman C, Basher W, Cozacov C, Hadary A. Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. *Br.J.Cancer.* 2005;93:552-56.
68. Stemmler HJ, Stieber P, Lassig D, Heinemann V. Re-evaluation of HER-2 status in metastatic breast cancer and tumor-marker guided therapy with vinorelbine and trastuzumab. *Onkologie.* 2005;28:95-97.
69. Khaldoyanidi SK, Glinsky VV, Sikora L, Glinskii AB, Mossine VV, Quinn TP et al. MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions. *J.Biol.Chem.* 2003;278:4127-34.

70. Schindlbeck C, Jeschke U, Schulze S, Karsten U, Janni W, Rack B et al. Characterisation of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich tumor antigen. *Histochem.Cell Biol.* 2005;123:631-37.
71. Miles DW, Chan A, Dirix LY, Cortes J, Pivot X, Tomczak P et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 2010;28:3239-47.
72. Annunziata CM, O'Shaughnessy J. Poly (adp-ribose) polymerase as a novel therapeutic target in cancer. *Clin.Cancer Res.* 2010;16:4517-26.
73. Comen EA, Robson M. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in triple-negative breast cancer. *Cancer J.* 2010;16:48-52.
74. Schmidt M, Petry IB, Bohm D, Lebrecht A, von Torne C, Gebhard S et al. Ep-CAM RNA expression predicts metastasis-free survival in three cohorts of untreated node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* 2010.

9 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schema der APAAP-Methode	20
Abbildung 2: Schematische Darstellung der amplifizierten APAAP-Methode	21
Abbildung 3: Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle im Knochenmarkaspirat	25
Abbildung 4: CISH	28
Abbildung 5: Knochenmark-Immunhistochemie	40
Abbildung 6: FISH-Test	41
Abbildung 7: Altersverteilung der Patientinnen	46
Abbildung 8: Menopausenstatus	47
Abbildung 9: Grading	50
Abbildung 10: Mammadatenbank - Datenerhebungsbögen	89
Abbildung 11: Patienteneinwilligung zur KMP	90

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pathologisches Tumorstadium (pT)	48
Tabelle 2: Tumorlokalisation	49
Tabelle 3: Tumorhistologie	50
Tabelle 4: Hormonrezeptorstatus auf dem Primärtumor	51
Tabelle 5: HER-2/neu-Status auf dem Primärtumor	51
Tabelle 6: HER-2-Status der „2+“-Tumorblöcke nach der FISH-Analyse.	52
Tabelle 7: Pathologisches Nodalstatus pN	53
Tabelle 8: Lymphangiosis carcinomatosa	54
Tabelle 9: Hämangiosis carcinomatosa	54
Tabelle 10: Operative Therapie	55
Tabelle 11: Strahlentherapie	56
Tabelle 12: Adjuvante systemische Therapie	56
Tabelle 13: Nachbeobachtungszeit	57
Tabelle 14: Rezidivhäufigkeit	57
Tabelle 15: Häufigkeit der Fernmetastasen	57
Tabelle 16: HER-2/neu-Status der DTC bei Erstdiagnose	58
Tabelle 17: HER-2/neu-Status des Primärtumors mit DTC bei Erstdiagnose	59
Tabelle 18: Korrelation HER-2/neu Primärtumor vs. DTC bei Erstdiagnose	59
Tabelle 19: Korrelation HER-2/neu auf DTC bei Erstdiagnose vs. Tumorgröße	60
Tabelle 20: Korrelation HER-2/neu auf DTC bei Erstdiagnose vs. Nodalstatus	61
Tabelle 21: Korrelation HER-2/neu auf DTC vs, Tumor-Grading	61
Tabelle 22: Korrelation HER-2/neu auf DTC vs. Menopausenstatus	62
Tabelle 23: Korrelation HER-2/neu-Status auf DTC vs. ER-Status	62

Tabelle 24: Korrelation HER-2/neu-Status auf DTC vs. PR-Status	63
Tabelle 25: Knochenmarkbefunde bei ED und nach CTx	64
Tabelle 26: Knochenmarkbefund bei ED und in der rezidivfreien Nachsorge	66
Tabelle 27: Korrelation HER-2/neu Primärtumor vs. DTC bei Metastasierung	68
Tabelle 28: HER-2/neu auf dem Primärtumor vs. veröffentlichte Studien.	73
Tabelle 29: HER-2/neu auf DTC vs. veröffentlichte Studien	74
Tabelle 30: HER-2-Heterogenität der DTC vs. veröffentlichte Studien.	75
Tabelle 31: HER-2/neu DTC vs. Prognosefaktoren vs. veröffentlichte Studien.	76

11 **Abkürzungsverzeichnis**

APAAP	alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
AJCC	American Joint Committee on Cancer
CISH	Chromogene In situ Hybridisierung
CK	Zytokeratine
CTC	Circulating Tumor Cells, zirkulierende Tumorzellen
CTx	Chemotherapie
DTC	Disseminated Tumor Cells, disseminierte Tumorzellen
ED	Erstdiagnose
FISH	Fluoreszenz In situ Hybridisierung
HER-2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor – 2, c-erbB2
KM	Knochenmark
KMP	Knochenmarkspunktion
MRD	Minimal Residual Disease
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. H. Sommer für die Überlassung des interessanten Themas danken.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. B. Rack für Ihre engagierte Betreuung der Dissertation und hilfreichen Verbesserungsvorschläge bei der Korrektur.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Tumorbologischen Labors: Beate Zill, Vera Rengel, Simone Hofmann, Isabel Plonner und Karin Frunzete für die kompetente Einführung in die Immunhistochemie und stets hilfsbereite Unterstützung bei den Höhen und Tiefen der Knochenmarksaufarbeitung.

Danken möchte ich auch den Ärzten der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München – Innenstadt und Klinikum Bayreuth für die zuverlässige Bereitstellung der Knochenmarksproben.

Ich danke Frau Dr. J. Jückstock für die kompetente Einführung in die Datenerfassung der Knochenmarksdatenbank.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Kriner vom Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München für ihre Hilfe bei Fragen zur statistischen Auswertung.

Abschließend danke ich natürlich auch meiner Familie und meinen Freunden für Ihre liebevolle Unterstützung und Motivation, und schließlich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.