

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Detektion und Charakterisierung disseminierter  
Tumorzellen aus Knochenmarkspräparaten von  
Mammakarzinompatientinnen mittels  
Oberflächenglykosilierung**

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

vorgelegt von

Anja Vogl  
aus Weilheim i. OB  
2019



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph Mocikat

PD Dr. Jens Neumann

Prof. Dr. Anne Krug

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Dr. med. Ulrich Andergassen,  
Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>2</b>
1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms .....	2
1.2. Klassifizierung des Mammakarzinoms, histologische Gruppen und Staging .....	4
1.3. Diagnostik, Therapie und Prävention des Mammakarzinoms .....	7
1.3.1. Therapie der lokal begrenzten Primärerkrankung des Mammakarzinoms .	9
1.3.2. Therapie des rezidivierten oder metastasierten Mammakarzinoms .....	11
1.4. Prognostische und prädiktive Faktoren .....	13
1.5. Metastasierung des Mammakarzinoms.....	16
1.6. Fokus und Zielsetzung dieser Promotionsarbeit .....	17
1.6.1. Zirkulierende Tumorzellen und disseminierte Tumorzellen .....	18
1.6.2. Etablierte Methoden zur Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen.....	19
1.6.3. Glykosilierungsmuster maligner Zellen .....	21
1.6.3.1. Thomsen-Nouvelle Antigen .....	23
1.6.3.2. 9-O-Acetyl-GD3.....	24
1.6.4. Cytokeratin 8,18,19 .....	25
1.7. Hypothese der vorliegenden Promotionsarbeit .....	26
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.1. Durchführung und Ablauf der Methoden .....	29
2.1.1. Testung der Antikörper und Bestimmung der einzusetzenden Antikörperkonzentrationen .....	29
2.1.2. Kultivierung der Tumorzelllinien .....	31
2.1.3. Gewinnung der Knochenmarksproben .....	32
2.1.4. Aufbereitung der Knochenmarksproben und Herstellung der Knochenmarkspräparate .....	32
2.1.5. Doppelte Immunfluoreszenzfärbung der Präparate.....	33
2.1.5.1. Primärantikörper .....	35
2.1.5.2. Sekundärantikörper .....	36
2.1.5.3. Färbung der Zellkerne mit DAPI .....	36
2.1.6. Auswertung der gefärbten Objektträger am Fluoreszenzmikroskop.....	37
2.1.7. Statistische Analyse der Daten mittels SPSS.....	37
2.2. Materialien.....	38

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
3.1. Testung der Methodik und Antikörper anhand von Positiv- und Negativkontrollen .....	43
3.2. Färbung der Knochenmarksproben der Patientinnen.....	50
3.3. Klinische Datenverteilungen der teilnehmenden Patientinnen .....	55
3.4. Ergebnisse der Doppelfärbungen.....	59
3.5. Statistische Analyse der Ergebnisse der Färbungen mit den vorliegenden Patientendaten.....	62
3.5.1. Menopausenstatus .....	62
3.5.2. T-Stadium .....	64
3.5.3. N-Stadium.....	65
3.5.4. M-Stadium .....	67
3.5.5. Grading .....	67
3.5.6. Hormonrezeptoren und Her2/neu-Status.....	69
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>74</b>
4.1. Immunfluoreszenzfärbungen mittels Cytokeratin 8,18 und 19 als etablierter Marker – eine kritische Beurteilung der Methode.....	74
4.2. Knochenmarksaspirate bei Mammakarzinompatientinnen – eine sinnvolle Untersuchung? .....	77
4.3. Tn-Antigen und 9-O-Acetyl-GD3 – neue Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen?.....	77
4.4. Tn-Antigen und 9-O-Acetyl-GD3 – Marker für eine spezielle Tumorbiologie? .....	79
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>84</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>87</b>
<b>7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>90</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>95</b>
<b>9. Ethikvotum</b> .....	<b>105</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>107</b>
<b>11. Danksagung</b> .....	<b>110</b>



**Kapitel 1:**  
**Einleitung**

## 1. Einleitung

### 1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Brustkrebs, eine Diagnose, die rund 70.000 Frauen pro Jahr in Deutschland ereilt, ist mit Abstand die häufigste Krebserkrankung bei Frauen weltweit. Im Schnitt erkrankt jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs [1]. Im Jahr 2012 erkrankten weltweit 1,67 Millionen Patientinnen an einer Form des Mammakarzinoms. Hierbei lässt sich ein leicht gehäuftes Auftreten in hoch entwickelten Ländern, wie Nordamerika, Australien und Europa feststellen [2]. Die weltweiten, geographischen Unterschiede erklärt man sich durch das gehäufte Auftreten von bestimmten Risikofaktoren in den industrialisierten Ländern. Zu diesen Risikofaktoren zählen zum Beispiel eine frühe Menarche und späte Menopause, bedingt durch eine durchweg ausreichende Ernährungssituation des Körpers, weniger Geburtenzahlen und Schwangerschaften, höheres Alter der Erstgebärenden und ein geringerer Prozentsatz an stillenden Müttern. Weitere, vor allem in industrialisierten Ländern vorkommende Risikofaktoren, sind: Ein höherer Alkoholkonsum, sowohl ein zu geringer, als auch ein zu hoher Body-Maß-Index (BMI <18,5 und >25 und besonders >40), verminderte körperliche Aktivität, fleisch- und fettreiche Nahrung, Diabetes Mellitus Typ II und prämenopausales Rauchen [3-5].

Ein weiterer, wichtiger Risikofaktor, ist die genetische Komponente und somit das hereditäre Mammakarzinom. Hierbei liegt ein besonderes Augenmerk auf *BRCA1-* bzw. *BRCA2*-Mutationen (Abkürzung für „breast cancer gene“). Liegt eine *BRCA1*-Mutation bei einer Patientin vor, so geht man von einem Lebenszeitrisko von bis zu 80% für eine Brustkrebserkrankung aus. Das durchschnittliche Alter der Erstdiagnose dieser Patientinnen liegt deutlich unter dem mittleren Manifestationsalter sporadischer Brustkrebserkrankungen [6]. Bei einer vorliegenden *BRCA2*-Mutation liegt das Lebenszeitrisko mit etwa 60-70% etwas niedriger. Frauen mit *BRCA2*-Mutation erkranken in der Regel etwas später als *BRCA1* mutierte Patientinnen [7]. Wann und unter welchen Voraussetzungen, einer Patientin oder Angehörigen Betroffener, eine Gentestung empfohlen werden sollte, unterliegt klaren Vorgaben, welche vor einer Testung zwingend geprüft werden müssen [8].

Die Inzidenz des Mammakarzinoms stieg seit Beginn der statistischen Aufzeichnungen und kulminierte in Deutschland 2008, wenige Jahre nach Einführung des



Mammographiescreenings. In Bayern startete das flächendeckende, nationale Mammographiescreening-Programm im Jahr 2003, für Frauen im Alter von 50 bis 69 Jahren. Dies ging mit einem sprunghaften Anstieg der Diagnosen, nichtinvasiver Tumoren und kleinerer Tumoren bis 10 mm Größe einher. Seit 2009 zeigt sich der Zuwachs an Neuerkrankungen jedoch ein wenig rückläufig [1, 9]. Diese Tatsache lässt sich höchstwahrscheinlich damit erklären, dass durch die Einführung des Screening-Programms Tumoren früher entdeckt wurden. Ohne Screening wären diese Frühstadien des Mammakarzinoms erst in den darauffolgenden Jahren auffällig geworden. Im Zeitraum von 1999 bis 2007 zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Fallzahlen Hormonrezeptor positiver Tumoren. Dies wird mit der geringeren Verordnung von postmenopausalen Östrogenpräparaten in Verbindung gebracht [10]. Brustkrebs steht nach wie vor an erster Stelle der Krebs bedingten Sterbefälle bei Frauen weltweit. Bei einer Zahl von 70.340 Neuerkrankungen im Jahr 2010, in Deutschland, lag die Anzahl der Sterbefälle bei 17.466. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug 87% [1].

Dennoch wird im Gesamten ein leichter Rückgang der Sterblichkeit beobachtet. Dies lässt sich einerseits auf das bereits beschriebene, intensiviertere Screening und das hiermit verbundene Detektieren früher Tumorstadien, andererseits auf eine generell immer besser werdende Therapie zurückführen [1, 3, 9].

Ein weiteres Charakteristikum des Mammakarzinoms ist, dass es im Gegensatz zu anderen Krebsarten wesentlich früher und bei jüngeren Patientinnen auftritt. Etwa jede vierte, erkrankte Frau ist bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre [1].

## 1.2. Klassifizierung des Mammakarzinoms, histologische Gruppen und Staging

Das Mammakarzinom ist eine heterogene Tumorerkrankung mit vielen verschiedenen Entitäten. Die einzelnen Subgruppen zeigen eine große Variabilität, hinsichtlich ihrer Aggressivität, dem Krankheitsverlauf, der Prognose und dem Ansprechen auf geeignete Therapien.

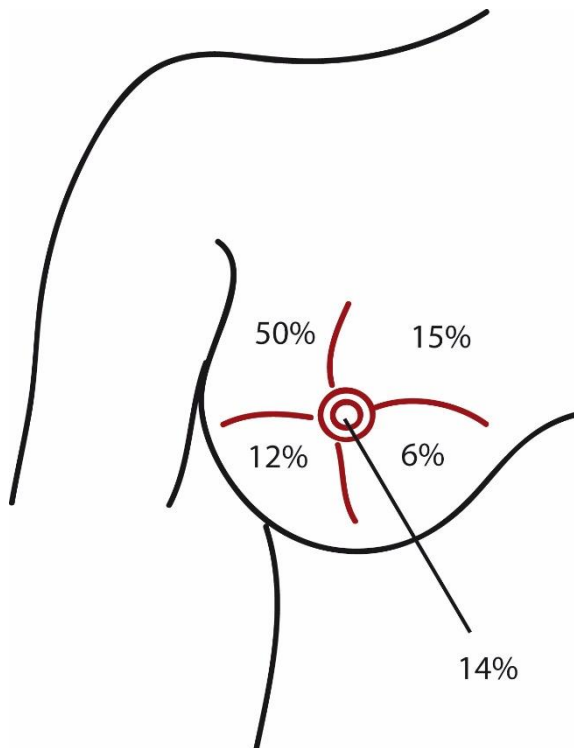


Abbildung 1: Mamma rechts, Häufigkeitsverteilung Mammakarzinome; modifiziert nach Janni et al. [12]

Der überwiegende Teil der malignen Tumoren, der weiblichen Brust, sind Adenokarzinome. Etwa die Hälfte aller In-Situ-Karzinome und invasiven Mammakarzinome entstehen im äußeren, oberen Quadranten der Brust (Abbildung 1) [11, 12].

Vorläuferläsionen des invasiven Mammakarzinoms sind intraepitheliale Proliferationen und Neoplasien. Anhand der unterschiedlichen Wachstumsmuster unterscheidet man duktale, intraepitheliale Neoplasien, wie zum Beispiel das duktale Carcinoma in Situ (DCIS), von lobulären Neoplasien, wie beispielsweise das lobuläre

Carcinoma in Situ (LCIS). Diese Vorläuferläsionen gehen überwiegend von der terminalen dukto-lobulären Einheit (TDLE) aus. Sie sind durch eine intakte Basalmembran vom umliegenden Gewebe abgegrenzt und zeigen unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten zur Bildung eines invasiven Karzinoms [13, 14]. Das DCIS beispielsweise, ist als fakultative Präkanzerose eines invasiven Mammakarzinoms zu bewerten [15].

Die invasiv wachsenden Tumoren der Brust untergliedern sich in duktale Karzinome (in etwa 60% aller Mammakarzinome umfassend), die weniger häufigen, lobulären Karzinome (circa 10-15%) und die selteneren Formen, das medulläre, das tubuläre, das papilläre und das muzinöse Karzinom, sowie weitere Sonderformen. Der weitaus häufigste Subtyp, das duktale Karzinom, wird auch als "infiltrating Carcinoma of no

special type" (NST) oder auch "infiltrating Carcinoma not otherwise specified" (NOS), bezeichnet [11, 14].

Eine histologische und zytologische Einteilung der invasiven Mammakarzinome, hinsichtlich der „Aggressivität“ des Tumors, erfolgt durch das Grading nach Elston und Ellis, als Modifikation des Bloom und Richardson Gradings [16, 17]. Hierbei werden Gewebeproben des Tumors hinsichtlich Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate beurteilt und schließlich in drei Gruppen unterschiedlicher Differenzierung und Malignität eingeteilt. G1 Tumoren sind gut differenziert, G2 mäßig und G3 Tumoren schlecht differenziert [16].

Tabelle 1: Kriterien des Gradings für das Mammakarzinom [16]

Merkmale	Kriterien		Scorewerte
Tubulusausbildung	>75%		1
	10-75%		2
	<10%		3
Kernpolymorphie	Gering		1
	Mittelgradig		2
	stark		3
Mitoserate	0-5/10 HPF		1
	6-11/10 HPF		2
	>12/10 HPF		3
Summenscore:			3-9
Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3, 4, 5	Gering	G1	Gut differenziert
6, 7	Mäßig	G2	Mäßig differenziert
8, 9	hoch	G3	Schlecht differenziert
HPF = high power field; Berücksichtigung der individuellen Gesichtsfeldgröße für die Zuordnung der Scorewerte entsprechend Elston und Ellis (Elston, CW et al. 1991). Die hier dargestellten Kriterien gelten für einen Gesichtsfelddurchmesser von 0,45 mm entsprechend einem einfachen Lichtmikroskop mit Sehfeldzahl 18 ohne Grosfeldtubus.			

Die Stadieneinteilung der Brustkrebserkrankung erfolgt nach dem TNM-System der UICC. Hierzu werden die lokale Ausbreitung des Primärtumors (T), der regionäre Lymphknotenbefall (N) und die Fernmetastasierung (M) betrachtet. Präoperativ werden Patientinnen in ein klinisches TNM-Stadium eingeteilt (cTNM), postoperativ

erfolgt die Einteilung anhand der Ergebnisse der histopathologischen Gewebsuntersuchung (pTNM). Wurde die Patientin bereits neoadjuvant therapiert, so wird das endgültige Ergebnis zusätzlich mit einem y gekennzeichnet (ypTNM). Rezidive erhalten die Vorsilbe r (rpTNM) [4, 11].

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms [18]

Primärtumor		Regionäre Lymphknotenmetastasen		Fernmetastasen	
T0	Kein Anhalt für Primärtumor	N0	Keine LK-Met.	M0	Keine Fernmetastasen
TiS	Carcinoma in situ	N1 mic	Mikrometastase (< 2mm)	M1	Fernmetastasen
T1 mic	Mikroinvasion von ≤ 0,1 cm	N1	1 – 3 LK-Met ipsilat. axillär		
T1a	> 0,1 – 0,5 cm	N2	4 – 9 LK-Met ipsilat. axillär		
T1b	> 0,5 – 1 cm	N3	≥ 10 LK-Met ipsilat. axillär / ipsilat. claviculär		
T1c	> 1 – 2 cm				
T2	> 2 – 5 cm				
T3	> 5cm				
T4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, inflammatorisches Mamma-CA				

Postoperativ wird die pTNM-Klassifikation, durch den Pathologen, um die Residualtumor(R)-Klassifikation erweitert. Hierbei wird der Resektionsrand des Präparates beurteilt. R0 bedeutet tumorfreie Resektionsränder, R1: mikroskopischer Tumorbefall der Resektionsränder und R2 steht für einen makroskopisch sichtbaren Befall der Resektionsränder [19].

Eine überaus wichtige Rolle bei der histopathologischen Klassifikation der Mammakarzinome, spielt außerdem der Hormonrezeptor- sowie der Her2/neu-Status des Tumors. Hierauf soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen werden.

### 1.3. Diagnostik, Therapie und Prävention des Mammakarzinoms

In einem hoch entwickelten Land wie Deutschland, wird ein Großteil der Tumoren der weiblichen Brust, im Rahmen einer routinemäßig geplanten Mammographie-Vorsorgeuntersuchung diagnostiziert. Die Sensitivität der Mammographie ist bei klinisch okkulten Tumoren beeindruckend und beträgt rund 85-90%. Insbesondere bei geringer Dichte, sprich einem fettreichen Brustgewebe, ist eine hervorragende Sensitivität der Mammographie zu verzeichnen [20, 21]. Die Dichte des Drüsengewebes und somit die mammographische Beurteilbarkeit, wird entsprechend dem *American College of Radiology* in vier Dichtegrade, die sogenannten ACR-Gruppen, eingeteilt. Grad 1 beschreibt eine fast ausschließlich aus Fettgewebe bestehende Brust und somit eine sehr transparente Brust, mit hoher Sensitivität der Mammographie. Grad 4 beschreibt eine Brust mit extrem dichtem Brustdrüsengewebe und demzufolge einer geringen mammographischen Sensitivität [22].

Die radiologischen Befunde werden dann, anhand der BI-RADS® (Breast Imaging – Reporting and Data System) Klassifikation, wie folgt klassifiziert [23]:

Tabelle 3: BIRADS® Klassifikation [22]

BIRADS® Kategorie	Befundbewertung	Handlungsempfehlung	Wahrscheinlichkeit eines malignen Befundes
0	Keine eindeutige Beurteilung möglich	Weitere bildgebende Diagnostik notwendig	Nicht beurteilbar
1	Normalbefund	Routine-Screening	0%
2	Benigner Befund	Routine Screening	0%
3	Wahrscheinlich benigner Befund	Verlaufskontrolle in 6 Monaten	< 2%
4	Suspekter Befund	Empfehlung zur Biopsie	2% - 95%
5	Hochgradig suspekter Befund	Empfehlung zur Biopsie	≥ 95%
6	Histologisch gesichertes Karzinom	Empfehlung zur Exzision	100%

Haben Frauen keinen Zugang zu Vorsorgeuntersuchungen oder sind sie noch zu jung, oder zu alt, um Teil der Routineuntersuchungen zu sein, so sind in der Tat meist ein tastbarer Tumor der Brust, vergrößerte axilläre Lymphknoten, Hauterscheinungen oder Sekretion aus der Mamille Anzeichen für ein Mammakarzinom [4].

Besteht nun, entweder aufgrund einer auffälligen Screening Untersuchung oder einem klinischen Befund, der Verdacht auf ein Mammakarzinom, so sollte jede weitere Abklärung beim Gynäkologen in etwa dem gleichen standardisierten Vorgehen entsprechen. Den ersten Schritt der Diagnostik stellt immer die Anamnese und körperliche Untersuchung der Patientin dar. Hierbei wird selbstverständlich auf eventuelle Vorwölbungen oder Hauteinziehungen (Plateauphänomen) der Brust geachtet. Der Jackson-Test liefert hierzu nähere Informationen: Verstärkung der Hauteinziehung bei Elevation der Arme oder durch Verschieben der Haut durch den Untersucher. Als weitere Zeichen sollten das Apfelsinenschalenphänomen, Mamillenretraktionen, ekzematös veränderte Mamillen und eine Sekretion der Brustdrüse untersucht werden [21]. Der Inspektion folgt die Palpation der Brust. Diese sollte selbstverständlich stets beidseits und nach einem immer gleichen Schema erfolgen, damit möglichst keine Bereiche übersehen werden.

Unerlässlich ist im Anschluss daran die Bildgebung. Falls noch nicht durchgeführt, da das suspekte Areal zum Beispiel mittels Tastuntersuchung aufgefallen ist, ist selbstverständlich die beidseitige mammographische Untersuchung essentiell. Des Weiteren spielt die sonographische Untersuchung der Brust eine zentrale Rolle in der Diagnostik. In erster Linie lassen sich palpable Knoten im Ultraschall im Hinblick auf ihre Ausdehnung und Lokalisation beurteilen. Überdies gelingt damit die sichere Unterscheidung zwischen Zysten und soliden Tumoren [24]. Ein weiteres, zur Diagnostik herangezogenes Mittel, ist das kontrastmittelverstärkte MRT. Bei geringer Spezifität und hoher Sensitivität (95-97%), lässt sich ein maligner Tumor bei fehlender Kontrastmittelanreicherung fast sicher ausschließen [21, 24].

Liegt ein auffälliger Befund, in den hier genannten, bildgebenden Verfahren vor, so schließt sich daran eine Stanz- oder Vakuumbiopsie, zur histologischen Charakterisierung des verdächtigen Gewebes an. Standardmäßig wird die Entnahme der Biopsie unter Ultraschall-Kontrolle durchgeführt. Hierbei ist die Gewinnung von mindestens 5 Stanzzyllindern verpflichtend. Eine weitere Methode, zur Gewinnung von Gewebeproben, ist die stereotaktisch geführte Biopsie anhand von Mammographie-

Bildern. Die primäre, offene Exzisionsbiopsie, wird nur in Ausnahmefällen durchgeführt, wenn eine biopsische Probengewinnung unter Bildgebung nicht möglich ist [21, 25].

Mittels Röntgen-Thorax-Untersuchungen, Leber-sonographie oder CT-Hals-Thorax-Abdomen-Aufnahmen und Skelettszintigraphie, wird ein Staging der Tumorerkrankung anhand der TNM-Klassifikation bei lokal fortgeschrittenen Stadien oder klinischem Verdacht auf Metastasierung vorgenommen [25].

### **1.3.1. Therapie der lokal begrenzten Primärerkrankung des Mammakarzinoms**

Wird das Malignom in einem frühen Erkrankungsstadium diagnostiziert, so ist in den überwiegenden Fällen das primäre Therapieziel die chirurgische Entfernung des Primärtumors im Gesunden (R0-Resektion). Die Brust erhaltende Therapie (BET) oder auch Mamma-Tumor-Exstirpation (MTE), mit nachfolgender Bestrahlung der gesamten Brust, zeigt hierbei gleichwertige Überlebenszahlen, wie die alleinige, modifiziert radikale Mastektomie [26]. Von einer brusterhaltenden Therapie ist in folgenden Situationen abzuraten: Vorliegen eines multizentrischen Karzinoms mit diffusen Herden, ausgedehnten, intraduktalen Anteilen und schwerer Beurteilbarkeit der Brust. Auch bei inflammatorischen Mammakarzinomen, keine R0-Resektion auch nach Nachresektion möglich, ungünstigem Verhältnis der Tumorgroße zum Volumen der Brust oder falls eine Nachbestrahlung nicht möglich oder von der Patientin nicht gewünscht ist, sollte eine primäre Mastektomie, mit anschließend möglicher Brustrekonstruktion, erfolgen [26].

Weisen Patientinnen einen klinisch negativen Lymphknotenstatus auf, so ist eine intraoperative Biopsie des Sentinel-Lymphknotens, nach vorangegangener Markierung, zur Erfassung des Nodalstatus indiziert. Hierbei handelt es sich um eines der wichtigsten, prognostischen Kriterien des Mammakarzinoms. Lässt sich ein Befall, in Form einer makroskopischen Metastase, des Sentinel-Lymphknotens nachweisen, so sollte eine axilläre Dissektion von mindestens 10 Lymphknoten diskutiert werden. Liegt kein oder ein rein mikroskopischer Befall des Sentinel-Lymphknotens vor, so besteht keine Indikation zur Axilladissektion [25].

Kam ein brusterhaltendes Therapieverfahren bei einer Mammakarzinompatientin zum Einsatz, so ist die anschließende Bestrahlung des übrigen Brustgewebes von immenser Bedeutung. Die postoperative Strahlenbehandlung führt zu einer wesentlich besseren Vorbeugung rezidivierenden Tumorwachstums und zu einem deutlich längeren Gesamtüberleben [27].

Liegt ein triple-negatives Mammakarzinom, ein lokal fortgeschrittener, inoperabler Primärtumor oder ein inflammatorisches Mammakarzinom vor, so besteht, gemäß den Leitlinien, die dringende Empfehlung zur primär systemischen Therapie und erst im zweiten Therapieschritt, sollte eine operative Entfernung des Tumors angestrebt werden. Im Anschluss an die Operation sollte wiederum eine Strahlentherapie erfolgen [28].

Jeder Frau, mit invasivem Mammakarzinom, sollten die Möglichkeiten der adjuvanten, systemischen Chemotherapie ausführlich geschildert werden. Mehrere Studien belegen, dass ein signifikanter Überlebensvorteil für Patientinnen besteht, die sich postoperativ einer Polychemotherapie (meist ein Anthrazyklin basiertes Schema in Kombination mit Taxanen) oder einer Behandlung mit endokrinen Substanzen (z.B. Tamoxifen) unterzogen haben. Unabhängig vom Nodalstatus der Patientinnen, wurde ein längeres, rezidivfreies und längeres Gesamtüberleben festgestellt [29, 30].

Tumoren mit HER2/neu-Amplifikation zeigen ein ausgesprochen gutes Ansprechen auf eine adjuvante Antikörpertherapie mit Trastuzumab. Die Prognose dieser Patientinnen wird dadurch immens verbessert [31, 32].

Generell jedoch sollte eine adjuvante Chemotherapie in folgenden Situationen durchgeführt werden: bei HER2/neu positiven Primärtumoren im Zusammenhang mit Trastuzumab, bei endokrin unsensitiven Tumoren (Östrogen- und Progesteronrezeptor negativ), bei nodal positiven Tumoren, bei aggressiven Tumoren des Malignitätsgrades G3 oder hohem Ki-67 und generell bei jungen Patientinnen unter 35 Jahre [33].

Wie bereits erwähnt, sollten Tumoren mit positivem Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor positiv) antihormonell mit Tamoxifen und / oder Aromataseinhibitoren behandelt werden [25].



### **1.3.2. Therapie des rezidierten oder metastasierten Mammakarzinoms**

Von einem lokalen oder lokoregionalen Rezidiv eines Mammakarzinoms ist die Rede, wenn erneut Tumorgewebe in der bereits befallenen Brust, der ipsilateralen Thoraxwand oder der Haut nachweisbar ist, oder wenn regionale Lymphknoten wiederholt befallen sind. Frühe Lokalrezidive (<2 Jahre nach Erstdiagnose) haben eine schlechtere Prognose und eine höhere Wahrscheinlichkeit für Zweitrezidive und Fernmetastasen, als spät auftretende Rezidive (>2 Jahre) [25, 34].

Bei Operabilität des Rezidivtumors ist die vollständige, chirurgische Entfernung anzustreben. Hierbei werden durch sekundäre Mastektomie, nach primär brusterhaltender Therapie, tendenziell die besten Langzeitergebnisse erzielt [35].

Eine Bestrahlung der Brust nach Rezidivoperation ist sinnvoll, insbesondere, wenn keine Bestrahlung voran ging oder das Rezidiv nicht R0 reseziert werden konnte [36]. Nach Entfernung des Lokalrezidivs ist die Verbesserung des Gesamtüberlebens durch aggressive Systemtherapie nicht gänzlich belegt. Man geht jedoch davon aus, dass das krankheitsfreie Intervall, durch entsprechende endokrine oder chemotherapeutische Medikamente zunimmt [25].

Die Prognose eines Mammakarzinoms, mit nachgewiesenen Fernmetastasen, ist nach wie vor infaust. Eine Heilung ist nur in den seltensten Fällen erreichbar. Handelt es sich jedoch um solitär auftretende Metastasen, mit einem guten Differenzierungsgrad (G1/G2), positivem Hormonrezeptorstatus, fehlender HER2/neu-Überexpression und einem langen, tumorfreien Zeitraum seit Erstdiagnose, so kann ein vergleichsweise günstiger Krankheitsverlauf erwartet werden [37, 38]. Aus diesem Grund ist stets die histologische Probengewinnung, zur genauen Klassifikation der Tumorbiologie der Metastasen, anzustreben.

Der weiter geplante Verlauf der Therapie sollte, vor allem in diesen Stadien der Erkrankung, individuell auf die vorliegende Situation und auf die Bedürfnisse und Wünsche der Patientinnen abgestimmt sein. Ziel einer palliativen Behandlung ist, wenn möglich, das unausweichliche Fortschreiten einer Krankheit zu verzögern und den bestmöglichen Erhalt der Lebensqualität zu garantieren [39].

In jedem Fall sollte beim metastasierten Mammakarzinom eine systemische Therapie ins Auge gefasst werden. Liegt Hormonrezeptor-Positivität vor, so gilt die endokrine

Systemtherapie aufgrund ihrer geringeren Toxizität und guten Ansprechraten als Mittel der Wahl [38].

Die zytostatische Therapie der metastasierten Stadien gestaltet sich, angesichts der ausgesprochenen Heterogenität der Fernmetastasen und der unterschiedlichen körperlichen und auch psychischen Verfassung der Patientinnen, als schwierig und muss deswegen individuell geplant und durchgeführt werden. Durch die Anwendung einer Polychemotherapie ist eine gering höhere Rate an Remissionen gegenüber einer Monotherapie beschrieben [40]. Ein Überlebensvorteil ist durch eine Kombination mehrerer Chemotherapeutika jedoch nicht zu verzeichnen [41]. Diese geht mit einer höheren Toxizität und ausgeprägten Nebenwirkungen einher und sollte daher nur bei schnell und äußerst aggressiv wachsenden Metastasen, zur raschen Induktion einer Remission, eingesetzt werden. Mit das beste Ansprechen und eine der höchsten Remissionsraten, werden bei einem Taxan in Kombination mit einem Anthrazyklin oder Antimetaboliten beobachtet [25, 42]. Tendenziell wird jedoch einer sequentiellen Monotherapie, gegenüber einer Kombination mehrerer Präparate, aufgrund der geringeren Toxizität, der Vorzug gegeben [38]. Während der Therapie muss zwingend, regelmäßig der Allgemeinzustand der Patientin, das Therapieansprechen, sowie die Nebenwirkungen und die Toxizität der Therapie überwacht und gegebenenfalls das Therapieschema reevaluiert werden.

Liegt eine Überexpression von HER2/neu vor, so sollte auch hier die Chemotherapie mit Anti-HER2/neu-Wirkstoffen kombiniert werden [38].

Operative Therapien können zum einen aus pflegerischer Indikation oder zur Linderung von Symptomen, zum Beispiel zur Schmerzbehandlung bei Skelettmetastasen, in Betracht gezogen werden [43].

Jede Brustkrebspatientin sollte permanent Zugang zu supportiven Maßnahmen haben, um die durchaus starken Nebenwirkungen der einzelnen Behandlungen so gering wie möglich zu halten. Aufgrund der immensen, psychischen Belastung ist eine psychoonkologische Begleitung empfohlen [44].

Um langfristige Funktionsschäden durch die Erkrankung selbst oder durch die entsprechende Therapie zu vermeiden, werden, für hierfür geeignete Patientinnen, ein Rehaaufenthalt und Rehamassnahmen empfohlen [45].

Sobald die primäre Therapie zum Abschluss gekommen ist, wird jede Mammakarzinompatientin dazu angehalten, sich einem engmaschigen System von Nachsorgeuntersuchungen zu unterziehen. Die Zielsetzung hierbei ist ein frühzeitiges

Erkennen von lokalen Rezidiven, einem neu aufgetretenen kontralateralen Mammakarzinom, das regelmäßige Screening auf Fernmetastasen und die Betreuung von möglichen Nebenwirkungen und Folgeschäden der vorangegangenen Therapie, wie zum Beispiel das Auftreten von Zweitmalignomen [25].

#### **1.4. Prognostische und prädiktive Faktoren**

Prognostische Faktoren helfen eine Aussage bezüglich des weiteren Verlaufs einer bestimmten Krankheit zu treffen. Ein prognostischer Faktor ist unabhängig von möglichen Therapieansätzen und kann Informationen bezüglich dem Wachstumsverhalten eines Tumors, der Wahrscheinlichkeit für Rezidive oder Metastasen oder der generellen Überlebensrate geben.

Prädiktive Faktoren zeigen an, wie wahrscheinlich ein Ansprechen des Tumors, auf eine bestimmte Behandlung ist und wie hoch der Therapieerfolg voraussichtlich sein wird [46].

Ein erster, wichtiger, prognostischer Faktor, im Hinblick auf das Mammakarzinom, ist das Alter der Patientinnen bei Erstmanifestation des Tumorleidens. Mehrere Studien zeigen, dass Patientinnen unter 35 Jahre eine schlechtere 5-Jahres-Überlebens-Wahrscheinlichkeit zeigen als Patientinnen zwischen 35 und 65 Jahre. Grund hierfür, ist das Auftreten von aggressiveren Tumorguppen in dieser Altersklasse [47, 48]. Frauen, die bei Diagnosestellung älter als 65 sind, haben auch eine eher schlechte Prognose, da hier meist Mammakarzinome in späteren Stadien vorliegen und die Patientinnen in vielen Fällen an weiteren Erkrankungen leiden, welche den Körper und vor allem das Immunsystem zusätzlich schwächen. Man spricht von multimorbiden Patientinnen [46].

Ein zusätzlicher Aspekt, welcher Informationen zum wahrscheinlichen, weiteren Verlauf der Erkrankung bringt, ist, auf welche Art der Primärtumor entdeckt wurde. Patientinnen, deren Tumor im Rahmen einer Mammographie-Screening-Untersuchung diagnostiziert wurde, haben ein besseres Outcome, als jene, deren Krankheit im Rahmen einer klinischen Untersuchung aufgefallen ist. Bei bildgebenden Vorsorgeuntersuchungen erkannte Tumoren, sind in der Regel kleiner als palpable Tumoren und weisen seltener eine lokale Streuung in Lymphknoten auf [49, 50].

Die anhand der TNM-Klassifikation eingeteilte Ausbreitung der Erkrankung ist einer der wichtigsten Faktoren für die Prognose und Therapieentscheidung der Krankheit.

Mit zunehmender Tumorgöße sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) immens. Größere Primärtumoren gehen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit der regionalen Lymphknotenmetastasierung einher. Beide Parameter, die Größe und der Lymphknotenstatus, sind additive, aber dennoch unabhängige Prognosekriterien. Eine groß angelegte Studie mit 24.740 Patientinnen, des SEER-Programms des National Cancer Institute der USA, liefert hierzu folgende Daten: Patientinnen, mit Primärtumoren kleiner 2cm im Durchmesser, haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 91%, mit 2-5 cm großen Tumoren 80% und jene Patientinnen, mit Tumoren größer 5cm, haben lediglich eine 5-JÜR von 63%. Patientinnen, im Stadium N0 (ohne Lymphknotenbefall), hatten eine 5-JÜR von 96%, waren 1-3 Lymphknoten befallen, verschlechterte sich die 5-JÜR auf 86% und Frauen, mit mehr als vier befallenen Lymphknoten, hatten lediglich eine 5-JÜR von 66% [51].

Sobald Fernmetastasen vorliegen, verschlechtert sich die Überlebensrate drastisch. Ein weiterer Prognosepunkt, zu dem die Pathologie des Tumors Informationen liefert, ist der Malignitätsgrad, welcher durch das Grading nach Elston und Ellis bezeichnet wird. Schlecht differenzierte Tumoren, mit höheren Malignitätsgraden, sind mit einer höheren Rezidiv- und Metastasierungsrate und somit mit einem schlechteren Überleben verbunden. Sind am Rand des Tumors Lymph- oder Gefäßeinbrüche zu finden, so spricht man von einer Lymphangiosis oder Hämangiosis carcinomatosa. Dies ist ebenso mit einer ungünstigen Prognose verbunden [11].

Jede histologische Untergruppe des Mammakarzinoms ist mit einer unterschiedlichen 10-Jahres-Überlebensrate assoziiert. Diese liegt bei den beiden häufigsten Karzinomen, dem invasiv-duktalem Karzinom (NST) und dem invasiv-lobulären Karzinom deutlich niedriger als bei seltenen Untergruppen, wie dem medullären, papillären und gallertartigen Karzinom. Tubuläre Karzinome haben die beste Prognose [11].

Ein, im klinischen Alltag äußerst relevanter, sowohl prognostischer, als auch prädiktiver Faktor, ist der Rezeptorstatus des Tumors. Die entscheidende Rolle hierbei spielen der Östrogen- und Progesteronrezeptor. Der Rezeptorstatus wird, anhand von Gewebeproben, immunhistochemisch, durch Antikörper, gegen die gewünschten Rezeptoren, bestimmt. Eine Probe wird bereits als hormonsensitiv bewertet, wenn mindestens 1% der Tumorzellen eine nukleäre Rezeptorpositivität aufweisen [52]. Etwa 70% aller Mammakarzinome erfüllen diese Kriterien [11]. Die Bestimmung erfolgt heutzutage routinemäßig bei jeder Brustkrebspatientin.

Sowohl für die Expression von Östrogen- als auch von Progesteronrezeptoren, ist ein positiver, prognostischer Einfluss auf das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben der Patientinnen belegt [53-55]. Die entscheidendere Rolle spielt der Rezeptorstatus jedoch im Hinblick auf die Therapie. Die Expressionsrate des Hormonrezeptors zeigt an, ob die Patientin von einer speziellen, antihormonellen Therapie profitieren wird oder nicht. Bei Hormonrezeptor positiven Tumoren kommt in der Prämenopause Tamoxifen, ein selektiver Östrogenrezeptor-Modulator (SERM), zum Einsatz. Kommt eine Therapie mit Tamoxifen in Frage, so wird dadurch, in einer Zeitspanne von 15 Jahren, das Rezidivrisiko um etwa 39% und das krankheitsspezifische Risiko zu versterben um circa 30% verringert [56]. Postmenopausal kann direkt mit Aromataseinhibitoren *up front* begonnen werden oder jedoch auch Tamoxifen, gefolgt von Aromataseinhibitoren, zur Blockade der Hormonrezeptoren, verwendet werden [33].

Jedes primäre Mammakarzinom wird außerdem standardmäßig auf die Überexpression von Human-Epidermal-Growth-Factor-2-Rezeptor (HER2/neu) untersucht. Die gesteigerte Expression dieses Wachstumsfaktor-Rezeptors, lässt sich entweder immunhistochemisch nachweisen oder mit Hilfe von Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH), was die Genkopienzahl des HER2/neu-Onkogens ermittelt. In 18-20% der invasiven Mammakarzinome kann eine HER2/neu-Genamplifikation und Proteinüberexpression festgestellt werden [57]. Diese Tumoren können sehr erfolgreich mit einer gezielten Therapie gegen HER2/neu behandelt werden. Das bekannteste Therapeutikum ist der Anti-Her2-Antikörper Trastuzumab (Herceptin®). Außerdem wird zunehmend der Her1-/Her2-Tyrosinkinase-Hemmer Lapatinib (Tyverb®), der Her2-/Her3-Dimerisationshemmer Pertuzumab (Perjeta®) oder das Trastuzumab-Emtansine-Konjugat T-DM1 (Kadcyla®) verwendet [58]. Ohne entsprechende Therapie, steht die Amplifikation von HER2/neu, für eine schlechte Prognose im weiteren Krankheitsverlauf. Diese Tumoren neigen zu erhöhter Invasivität, Metastasierungstendenz und Chemoresistenz und weisen somit unbehandelt eine geringere Überlebensrate auf [59, 60].

Ein weiterer Marker, der im Hinblick auf die Prognose relevant ist, ist Ki-67. Hierbei handelt es sich um ein nukleäres Antigen. Hohe Ki-67 Spiegel sprechen für eine gesteigerte, proliferative Aktivität des Tumors und stehen somit mit einem erhöhten Rezidivrisiko und schlechteren Überlebensraten in Verbindung [61].

Anhand der genannten tumorbiologischen Marker, wurden letztendlich vier intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms etabliert. Die erste Gruppe bilden die sogenannten Luminal-A-Karzinome, welche sich durch Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptor-Positivität und eine niedrige Proliferationsrate (geringer Ki-67, G1) auszeichnen. Luminal-B-Karzinome sind ebenfalls Hormonrezeptor positiv, jedoch mit einer geringeren Expressionsrate der Hormonrezeptoren. Sie sind Her2/neu positiv oder negativ und gehören einer aggressiveren Tumorentität (G2/G3) an. Den dritten Subtyp bilden basal-like-Karzinome. Diese sind Hormonrezeptor negativ und Her2/neu negativ (triple negative Karzinome). Schließlich, die vierte Entität, die Her2/neu positiven und Hormonrezeptor negativen Karzinome [62].

Diese Gruppierungen dienen im Allgemeinen zur Prognoseabschätzung, sowie als Hilfestellung zur Therapieentscheidung [63].

Zunehmend gewinnen Genexpressionsanalysen an Bedeutung. Kommerzielle Tests, wie beispielsweise Oncotype DX® oder Prosigna®, untersuchen Gewebeproben von Mammakarzinompräparaten auf Expressionsmuster bestimmter Gene und ermitteln mittels Risikoscores Überlebens- und Rezidiv-Wahrscheinlichkeiten. Diese sollen als Entscheidungshilfen, über die ideale Therapie dienen [64, 65].

Ein weiterer, wichtiger Faktor, im Hinblick auf die Prognose und den weiteren Krankheitsverlauf des Tumorleidens, ist der Nachweis zirkulierender (Circulating tumor cells – CTCs) und disseminierter Tumorzellen (disseminated tumor cells – DTCs).

Auf die entscheidende Rolle der CTCs und im speziellen der DTCs wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausführlich eingegangen werden.

## **1.5. Metastasierung des Mammakarzinoms**

Trotz mannigfaltiger Screening Programme, hoch technisierter Diagnostik und immer weiter entwickelter Therapiemaßnahmen, spielt, die im Verlauf der Krankheit hohe Metastasierungsrate des Mammakarzinoms, eine zentrale Rolle für die Überlebensrate an Brustkrebs erkrankter Frauen. Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, besteht bei metastasierten Tumoren kaum eine Aussicht auf Heilung und die Prognose des Krankheitsverlaufs verschlechtert sich enorm.

Zum einen findet eine lymphogene Metastasierung der Tumorzellen statt. Hierbei werden vor allem regionäre Lymphknoten der Axilla, der betroffenen Seite befallen. Weitere mögliche Lokalisationen für eine regionäre, lymphogene Metastasierung

liegen parasternal, sowie supra- oder infraclaviculär. Zu den Fernmetastasen wird ein Befall von zervikalen und kontralateralen Lymphknoten gezählt [36].

Von Fernmetastasen sind in erster Linie das Skelettsystem (ca. 70%), die Lunge und die Pleura (ca. 60%), die Leber (ca. 50%) oder das Gehirn betroffen [11, 21]. Als Grund hierfür werden neben einer hervorragenden Durchblutung dieser Organe, was eine Ansiedelung der losgelösten Tumorzellen extrem erleichtert, chemotaktische Signalstoffe der betroffenen Epithelien als Ursachen angenommen [66].

Da klinische Symptome bei beginnender Absiedelung der Tumorzellen in entfernte Organe zunächst ausbleiben - sogenannte Mikrometastasen bleiben oft über Jahre klinisch stumm -, liegt ein besonderes Augenmerk der aktuellen Forschung auf der frühen Detektion einer beginnenden Metastasierung. Eine wichtige Säule, zur Darstellung einer Metastase, stellt natürlich die bildgebende Untersuchung an Brustkrebs erkrankter Patientinnen mit Hilfe von Röntgenaufnahmen, Knochenszintigraphien und computertomographischen Untersuchungen dar. Da im Rahmen dieser Untersuchungen jedoch fast ausschließlich größere Läsionen entdeckt werden können, haben aktuelle Forschungsprojekte die Entwicklung von Methoden zur frühzeitigen Feststellung potentieller Metastasen zum Ziel [67].

### **1.6. Fokus und Zielsetzung dieser Promotionsarbeit**

Zielsetzung der hier vorliegenden Promotionsarbeit, ist zunächst die Detektion disseminierter Tumorzellen aus Knochenmarksproben von Mammakarzinompatientinnen, anhand von Immunfluoreszenzfärbungen. Mit Hilfe von Doppelfärbungen soll eine nähere Untersuchung, der auf den detektierten Tumorzellen exprimierten Antigene möglich gemacht werden. Hiermit kann eine Charakterisierung und Typisierung disseminierter Mammakarzinomzellen erfolgen.

### 1.6.1. Zirkulierende Tumorzellen und disseminierte Tumorzellen

Maligne, entartete Zellen besitzen die Fähigkeit sich vom Primärtumor loszulösen und sich an anderen Stellen im menschlichen Körper, in Form von Fernmetastasen, anzusiedeln. Diese systemische Aussiedelung geschieht über die Lymphe und das Blutgefäßsystem.

Im lymphatischen System oder im Blutkreislauf befindliche, maligne Zellen, werden als zirkulierende Tumorzellen (Circulating tumor cells – CTCs) bezeichnet (Abbildung 2) [68]. Bereits 1869 gelang Thomas Ashworth der Nachweis von Tumorresiduen im Blut eines, an einem metastasierten Tumorleiden, verstorbenen Patienten [69]. Der Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Vollblut von Mammakarzinompatientinnen

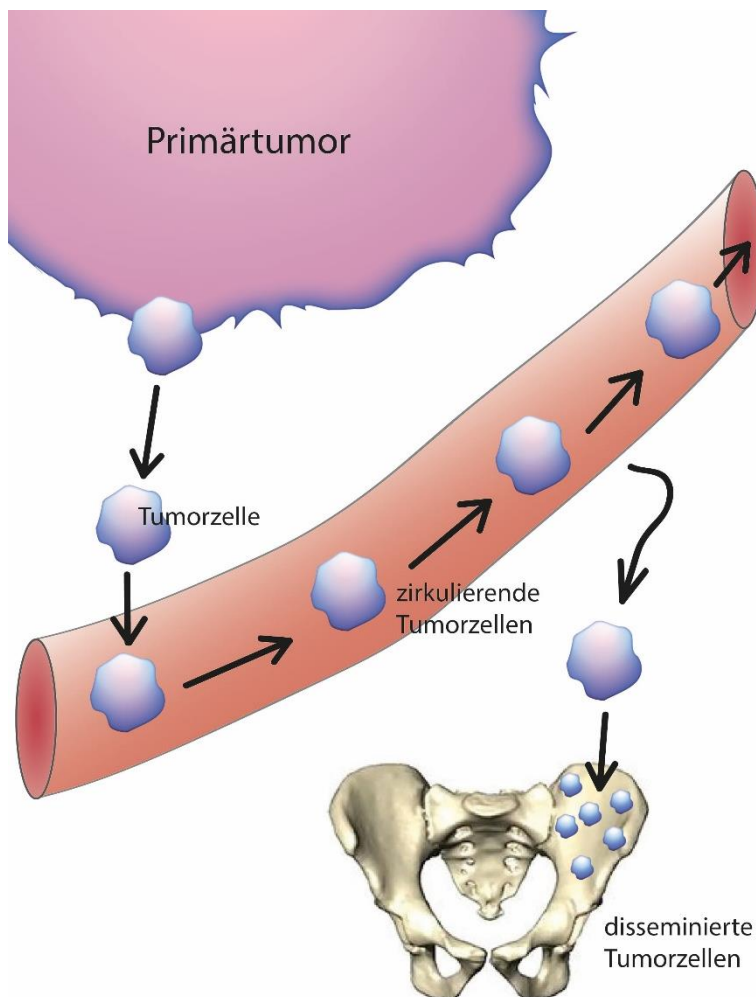


Abbildung 2: Schema zirkulierender und disseminierter Tumorzellen; basierend auf Franken et al., Riethdorf et al., Braun et al. [68, 74, 79]

wird mit einer schlechten Prognose und einem aggressiven Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht. Multiple Studien belegen den negativ-prognostischen Effekt vorhandener CTCs, sowohl auf das krankheitsfreie, als auch das Gesamtüberleben betroffener Frauen [70, 71]. In Zusammenschau aller klinisch-pathologischen Prognosekriterien und mit dem Nachweis zirkulierender Tumorzellen, lassen sich exaktere Aussagen im Hinblick auf eine zu erwartende Metastasierung treffen [72, 73].

Gelingt zirkulierenden Tumorzellen der Übertritt ins



Knochenmark, so spricht man von disseminierten Tumorzellen (disseminated tumor cells – DTCs) (Abbildung 2) [74-79].

Disseminierte Tumorzellen können im Knochenmark lange Zeit verweilen und bilden potentiell die Basis für eine, im weiteren Verlauf der Erkrankung entstehende, Metastasierung im Körper [80, 81]. Mehrere Studien belegen die Assoziation disseminierter Tumorzellen mit einer deutlich schlechteren Gesamtüberlebenszeit [82-86]. Die routinemäßige Untersuchung von Knochenmarksproben, auf das Vorhandensein von DTCs, hat jedoch bisher keine Relevanz im klinischen Alltag [87].

Eine Theorie zur Entstehung zirkulierender und disseminierter Tumorzellen, basiert auf der Annahme einer stattfindenden epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT). Hierbei verlieren Zellen epithelialen Ursprungs zunehmend ihre epithelialen Eigenschaften, beispielsweise ihre Polarisierung, und entwickeln mesenchymale Merkmale. Diese mesenchymalen Charakteristika erlauben epithelialen Zellen eine Migration weg vom ursprünglichen Entstehungsort, erhöhen die Invasivität dieser Zellen und verleihen eine gewisse Resistenz gegenüber Apoptose [88].

### **1.6.2. Etablierte Methoden zur Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen**

Sowohl zirkulierende als auch disseminierte Tumorzellen können, zum einen über antikörperbasierte, zum anderen über molekularbiologische Nachweismethoden detektiert und näher charakterisiert werden [89]. Zu den antikörperbasierten Methoden zählen beispielsweise, die in dieser Studie angewandte, Immunfluoreszenzmikroskopie oder die Fluoreszenz-Druckflusszytometrie. Molekularbiologische Methoden sind, zum Beispiel, die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (real-time PCR), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder Array-CGH (Array-based Comparative Genomic Hybridization) [90, 91].

Im Gegensatz zur Detektion disseminierter Tumorzellen, existieren zur Analyse und Untersuchung zirkulierender Tumorzellen, bereits einige, kommerziell vertriebene Methoden.

An erster Stelle sei hier zunächst eine, durch die amerikanische *Food and Drug Administration (FDA)* – die amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde –, in der metastasierten Situation zertifizierte Methode zu nennen: Das CellSearch® System

der Firma Veridex LLC ®, Warren, USA. Hierbei werden, aus den zu untersuchenden Proben, epitheliale Zellen zunächst mittels einer immunomagnetischen Selektionsmethode über einen Antikörper gegen das Epithelial Cellular Adhesion Molecule (EpCAM), von den übrigen Blutzellen separiert und anschließend, anhand der Oberflächenantigene Cytokeratin 8,18,19 und CD45 weiter unterteilt und maschinell ausgewertet [92, 93]. Der Adna-Test ®, eine weitere kommerzielle Detektionsmethode, nutzt ebenso als ersten Anreicherungsschritt der Tumorzellen, an Magnetpartikel gekoppelte Antikörper gegen EpCAM und führt dann, mittels reverser Transkription und PCR, den Nachweis mit Brustkrebs assoziierter Genmutationen durch [94]. Ein zusätzliches Beispiel, einer CTC-Detektionsmethode, ist die CTC Chip Technologie ®. Auch hier werden unter zu Hilfenahme von Antikörpern gegen EpCAM Tumorzellen aus peripheren Blutproben herausgefiltert [95]. Außerdem können noch das auto MACS ® - magnetic activated cell sorting und das Dynabeads ® - Epithelial Enrichment System als ähnlich funktionierende, kommerzielle Systeme genannt werden [77].

Ein zentrales Problem, EpCAM-basierter Anreicherungsverfahren, ist die Tatsache, dass während der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) ein Verlust der EpCAM-Expression beobachtet wird. Dies resultiert in einer möglicherweise falsch niedrigen Detektionsrate zirkulierender Tumorzellen und ist in der Bewertung dieser Systeme zu berücksichtigen [96].

Die Dynabeads ® CD45-technique oder auch das Rosette Sep-Applied Imaging Rare Event (RARE) ® System sind Methoden, welche eine Markierung von Leukozyten mittels Anti-CD45 Antikörpern durchführen und diese somit, aus den zu untersuchenden Tumorzellen, filtern [97].

Andere Methoden basieren auf der Tatsache, dass Tumorzellen in der Größe von gesunden Zellen differieren. Diese Tatsache kann durch spezielle Filter, in welchen Zellen einer bestimmten Größe herausgefiltert werden, genutzt werden [97, 98].

### 1.6.3. Glykosilierungsmuster maligner Zellen

Genetische Mutationen erlauben Tumorzellen ungehindertes Wachstum. Sie ermöglichen Resistenzen gegenüber negativen Wachstumsfaktoren und Apoptose-induzierenden Signalstoffen und geben den malignen Zellen die Fähigkeit zur Invasion, in umliegendes Gewebe und Gefäße. Sie fördern eine Aussiedelung der Tumorzellen vom Primärherd, in Form von Fernmetastasen [99, 100].

Maligne, entartete Zellen haben aufgrund dieser genetischen Mutationen Wege gefunden, sich dem Angriff des eigenen Immunsystems zu entziehen. Die Oberflächenstruktur der Tumorzellen hat sich dahingehend verändert, dass diese nicht von der körpereigenen Abwehr erkannt werden. Dies geschieht, unter anderem, durch speziell veränderte, tumorspezifische Antigene maligner Zellen. Tumorspezifische, oder tumorassoziierte Antigene, können an der Zelloberfläche, im Zytosol, im Zellkern exprimiert sein oder mittels Sekretion aus einer Tumorzelle ausgeschieden werden (Abbildung 3) [101].

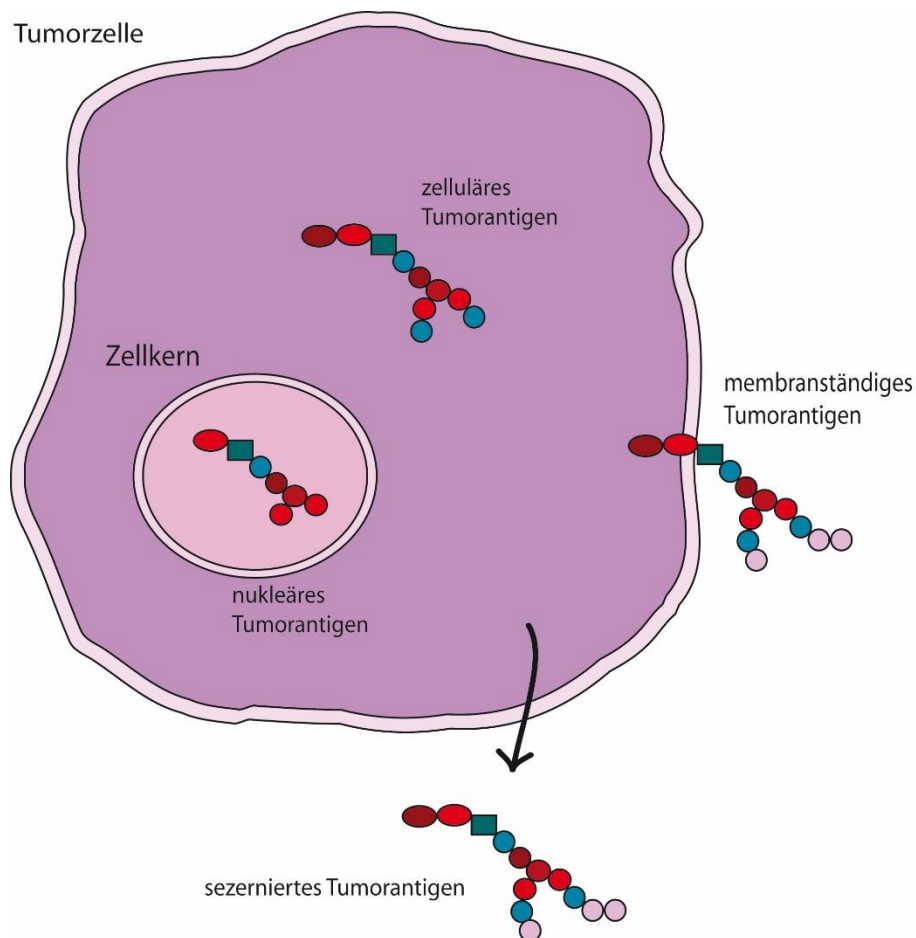


Abbildung 3: Tumorantigene; modifiziert nach Zarour et al. [101]

Die enorme Vielfalt an, auf Tumorzellen veränderten Antigenen, wird, unter anderem, durch aberrant glykosilierte Proteine dieser Zellen ermöglicht [102].

Glykosilierung bezeichnet den Vorgang in einer Zelle, indem ein Zucker auf eine Aminosäure eines Proteins übertragen und mit dieser verknüpft wird. Hier gilt es die N-Glykosilierung von der O-Glykosilierung zu unterscheiden. Bei der N-Glykosilierung werden Zucker cotranslational im rauen Endoplasmatischen Retikulum auf einen Asparaginrest übertragen (Abbildung 4). Die O-Glykosilierung findet im Golgi-Apparat statt, hierbei werden Zucker an die Aminosäuren Serin oder Threonin angefügt [103].

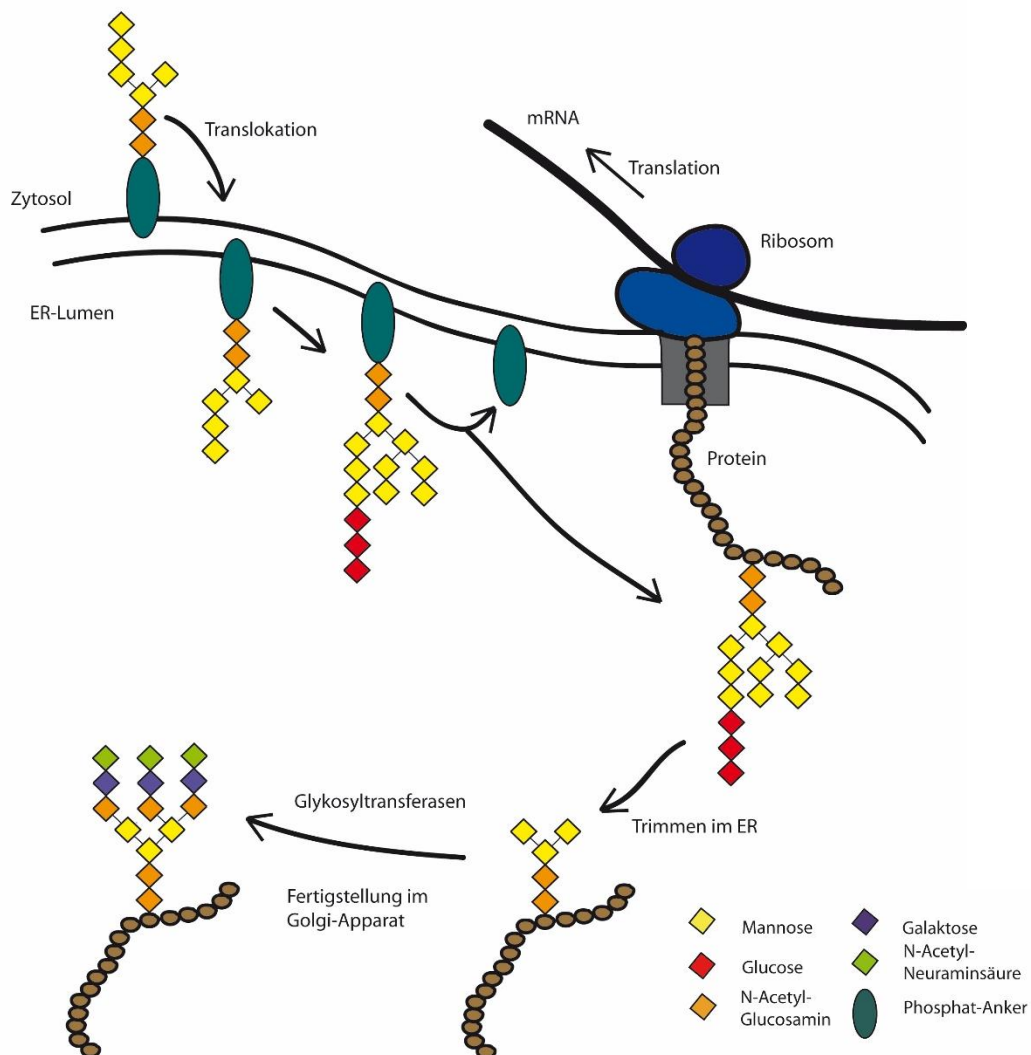


Abbildung 4: N-Glykosilierung; modifiziert nach Boujard et al., Rassow et al. [103, 104]

Erst durch unterschiedliche Glykosilierung eines Proteins, entsteht die enorme Vielfalt und somit die spezifische Funktion eines Proteins. Proteine, die im Zellinneren verweilen, sind selten mit einer Glykosilierung versehen. Jene Proteine, die Teil der

Zelloberfläche sind, oder von der Zelle sezerniert werden, sind jedoch fast ausschließlich glykosiliert [104, 105].

Glykosilierungsmuster variieren somit von Zelle zu Zelle und sind in spezieller Weise auf Tumorzellen verändert. Die modifizierte Glykosilierung maligner Zellen betrifft in erster Linie die äußeren Endteile der Glykane und führt somit zu einer speziellen, tumorassoziierten Expression von bestimmten Zuckern an der Zelloberfläche (tumor-associated carbohydrate antigens) [106].

Diese spezifisch veränderten Oberflächenantigene verleihen einerseits, wie in diesem Abschnitt ausgeführt, dem Tumor einen Selektionsvorteil gegenüber gesunden, nicht entarteten Zellen des menschlichen Körpers, andererseits stellen sie potentielle Biomarker, zur selektiven Detektion maligner Zellen, in einem Pool gesunder Körperzellen dar.

#### **1.6.3.1. Thomsen-Nouvelle Antigen**

Das Thomsen-Nouvelle Antigen (Tn-Antigen) gehört zu jenen Glykoproteinen, welche in gesundem Gewebe und benignen Läsionen nicht an der Oberfläche exprimiert werden. Insgesamt tragen jedoch rund 70-90% aller Adenokarzinome das Tn-Antigen auf der Zelloberfläche. Hierunter fällt auch das Mammakarzinom [106, 107].

Beim Thomsen-Nouvelle Antigen handelt es sich um ein Vorläufermolekül der MN-Blutgruppen Antigene [108, 109]. In malignen, entarteten Zellen kommt es gehäuft zu einer verminderten Bildung von zellspezifischen Glykosilierungsmustern der gesunden Zelle. Bestimmte Glykosyltransferasen werden vermindert exprimiert und somit werden verstärkt kürzere Glykane und Vorläufer von Mehrfachzuckern produziert. Im Falle des Thomsen-Nouvelle Antigens, handelt es sich um ein, normalerweise verborgenes, Vorläufermolekül des Thomsen-Friedenreich Antigens. Thomsen-Friedenreich Antigen wird als Core1 bezeichnet, eine immer wiederkehrende Grundstruktur, welche Teil normaler Glykosilierungen komplexer Kohlenhydratketten in gesunden Zellen ist. Tn-Antigen positive Zellen haben die Fähigkeit zur Bildung von Core1 Strukturelementen verloren [106, 110].

Einige Studien zeigen eine Verbindung der erhöhten Expression von Tn-Antigen vor allem in duktalem Carcinomata in Situ und schlecht differenzierten, invasiv-duktalem Mammakarzinomen. Des Weiteren wird eine Assoziation mit einem schlechteren Gesamtüberleben und erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit vermutet [111]. Bezüglich

der weit fortgeschrittenen Tumorstadien finden sich widersprüchliche Angaben in der Literatur. Eine Studie beschreibt eine Abnahme an Tn-Positivität in den sehr weit fortgeschrittenen Stadien invasiver Karzinome [112]. Eine andere Quelle belegt jedoch eine Zunahme an Tn positiven Tumorzellen mit höheren pTNM-Stadien [111]. Eine besonders hohe Expressionsrate von Tn-Antigen konnte in Tumorzellen von Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden [106, 112]. Hier besteht die Theorie, eine Tn-Expression könnte somit generell mit dem Entstehungsmechanismus von Lymphknotenmetastasen in Zusammenhang stehen [113]. Dies wird dadurch weiter unterstrichen, dass durch einen Anti-Tn-Antikörper, Interaktionen zwischen MCF-7-Brustkrebszellen, einer Ziellinie und lymphatischem Endothel im Tierversuch unterdrückt werden konnten [109, 114].

### **1.6.3.2. 9-O-Acetyl-GD3**

Das Molekül 9-O-Acetyl-GD3 ist ein Derivat des Gangliosids GD3. Die circa 60 Mitglieder umfassende Gruppe der Ganglioside gehört zur Familie der Sphingolipide. Ganglioside sind wichtige Bestandteile der Zellmembran [115].

Die jeweils zellspezifischen Expressionsmuster der einzelnen Ganglioside, verändern sich stark während der malignen Transformation einer Zelle. So auch bei der Entstehung von Mammakarzinomzellen [116, 117]. Das dabei neu entstandene Zelloberflächenmuster, spielt eine wichtige Rolle beim unkontrollierten Wachstum einzelner Tumorzellen, durch Modulation bestimmter Wachstumsrezeptoren [118].

Maligne, entartete Zellen der weiblichen Brust, weisen, im Gegensatz zu gesundem Drüsengewebe der Mamma, ein stark unterschiedliches Muster von Gangliosiden auf. Vor allem bei den Gangliosiden GM3, GD3, 9-O-Acetyl-GT3 und 9-O-Acetyl-GD3, handelt es sich um Antigene, deren Nachweis im gesunden Gewebe kaum gelingt. Maligne, transformierte Zellen zeigen eine starke Überexpression dieser Moleküle [106, 119].

Bei 9-O-Acetyl-GD3 und 9-O-Acetyl-GT3 liegen, ursprünglich fetale Ganglioside vor, die sich im Gehirn von Föten regulär nachweisen lassen [119].

9-O-Acetyl-GD3 wurde bereits als mögliches Zielantigen für eine potentielle Impfung gegen entstehende Tumoren in Betracht gezogen [120].

Ein, in der Literatur beschriebener, wichtiger Aspekt, ist eine beobachtete Verringerung der 9-O-Acetyl-GD3 Expression in stark entdifferenzierten Karzinomen. Mäßig

entdifferenzierte Tumoren scheinen 9-O-Acetyl-GD3 in stärkerem Maße zu exprimieren, als stark entdifferenzierte Tumorzellen. Demzufolge könnte eine Herabregulation von 9-O-Acetyl-GD3 mit einer schlechten Krankheitsprognose in Verbindung gebracht werden [116].

#### **1.6.4. Cytokeratin 8,18,19**

Cytokeratine (CK) sind ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts von Zellen epithelialen Ursprungs. Es handelt sich dabei um Proteinbestandteile der Intermediärfilamente von Epithelzellen. Anhand der unterschiedlich exprimierten Cytokeratine, lässt sich zum einen die epitheliale Herkunft einer Zelle nachweisen, es ist jedoch auch möglich, anhand dieser Proteinbestandteile, den momentanen Wachstumsstand einer Zelle zu beurteilen und Aussagen über den Grad der Differenzierung zu treffen [121].

Bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit, sind mehr als 20 verschiedene Cytokeratin-Proteine bekannt. Eine Vielzahl an Cytokeratinen lassen sich auch in der gesunden Brustdrüse nachweisen. Die gängigen Cytokeratine der weiblichen Brust sind zum einen die basalen Keratine CK 5/6 und CK 14 und zum anderen die eher luminal gelegenen CKs 7/8, 18 und 19 [121-123].

Entartet eine Zelle maligne, behält sie in aller Regel ihre Cytokeratin-Struktur bei, was Keratine zu zuverlässigen Tumormarkern macht und ihre zentrale Rolle in der modernen Krebsdiagnostik rechtfertigt [124].

Bei der Auswahl eines, für das Thema der vorliegenden Arbeit am besten geeigneten, etablierten Antigens, fiel die Entscheidung auf die Cytokeratine 8, 18 und 19. Die Cytokeratine 8, 18 und 19 werden von maligne, entarteten Brustkrebszellen, epithelialen Ursprungs exprimiert, jedoch normalerweise nicht von Zellen, die im gesunden Knochenmarksgewebe oder im Blut vorkommen [125].

In wenigen Studien wird der Nachweis von Cytokeratinen jedoch auch in Blut- oder Knochenmarksproben gesunder Patienten beschrieben. Braun et al. beispielsweise beschreiben in ihrer Studie den Nachweis Cytokeratin positiver Zellen im Knochenmark gesunder Patientinnen, in circa einem Prozent der untersuchten Fälle (2 von 191 Patientinnen). Eine der beiden Patientinnen litt jedoch an einer chronischen Brustentzündung, die zweite hatte ein benignes Zystadenom des Ovars nachgewiesen [125]. Diese benignen Erkrankungen könnten potentielle Erklärungen für den

Nachweis Cytokeratin positiver Zellen im Knochenmark dieser Patientinnen liefern. Zwei weitere Studien beschreiben folgende Gründe für den geringfügigen Nachweis von Cytokeratin-mRNA in PCR-Studien im Blut gesunder Probanden oder Patienten mit hämatologischen Erkrankungen. Zum einen könnte die Amplifikation von sogenannten Keratin-Pseudogenen verantwortlich sein. Zum anderen beschreiben die Autoren die Annahme, dass hämatopoetische Stammzellen eine Expression von Keratinen verursachen könnten. Ein weiterer Erklärungspunkt ist eine potentielle Kontamination des Blutes während der Hautpunktion zur Probeentnahme [91, 126]. Die Verwendung eines Antikörpers, gegen eine Kombination an Keratinen zur Detektion von Mammakarzinomzellen, ist entscheidend. Es wurde beispielsweise bewiesen, dass der alleinige Nachweis von CK 18 nicht ausreichend ist, da in vielen Fällen eine isolierte Down-Regulation in Tumorzellen von Cytokeratin 18 beobachtet werden konnte [125, 127]. Aus diesem Grund wurde ein Pan-Cytokeratin Marker (Pan-CK) gegen CK 8,18 und 19 verwendet. Mehrere Literaturangaben belegen, dass die Sensitivität der Cytokeratin-Antikörper deutlich steigt, je mehr Cytokeratine mit einem Antikörper gleichzeitig detektiert werden [124, 128]. Der verwendete Pan-Cytokeratin Antikörper kommt bereits routinemäßig im oben beschriebenen CellSearch® System zur Detektion von Tumorzellen zum Einsatz [92].

### **1.7. Hypothese der vorliegenden Promotionsarbeit**

Zirkulierende und disseminierte Tumorzellen sind ein vielversprechender Ansatz, um einerseits die Prognose einer Mammakarzinompatientin näher abschätzen zu können und andererseits eine möglicherweise entstehende Metastasierung frühzeitig zu erfassen. Es existieren zwar kommerziell vertriebene Methoden zur Detektion zirkulierender Tumorzellen, jedoch bisher nicht im gewünschten Ausmaß zur Untersuchung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. An diese Tatsache soll diese Arbeit anknüpfen, um ein weiteres, mögliches Verfahren, zur Detektion und weiter zur Charakterisierung disseminierter Tumorzellen, aufzuzeigen.

Als methodischer Ansatz wurde die doppelte Immunfluoreszenzfärbung von Knochenmarksproben gewählt. Zur primären Detektion der DTCs wurde der etablierte Marker gegen Cytokeratin 8, 18 und 19 (Pan-CK) herangezogen. Ein Ziel dieser Forschungsarbeit ist, nach Detektion der DTCs mittels CK 8,18,19 zu eruieren, ob Tn-



Antigen beziehungsweise 9-O-Acetyl-GD3 im Vergleich, zum bereits etablierten Marker, als potentiell neue Marker-Antigene zur Detektion disseminierter Tumorzellen in Frage kommen. Nach Detektion der DTCs mittels Pan-CK und deren Untersuchung auf eine Positivität von Tn-Antigen oder 9-O-Acetyl-GD3, wurden im Anschluss die ermittelten Ergebnisse der Färbungen mit den klinischen Daten der teilnehmenden Patientinnen verglichen und auf einen Zusammenhang zwischen den einzelnen Tumorentitäten, den Stadien der Erkrankung und der Expression der angefärbten Antigene auf disseminierten Tumorzellen hin analysiert.

Wie bereits im Kapitel Thomsen-Nouvelle Antigen erwähnt, wird eine Assoziation der Expression von Tn-Antigen zum Vorkommen von Lymphknotenmetastasen und in G3-Tumoren vermutet [106, 111, 112]. Widersprüchliche Angaben existieren bezüglich der Expression in weit fortgeschrittenen T-Stadien [111, 112].

Bezüglich 9-O-Acetyl-GD3 besteht die Vermutung, einer verminderten Expression des Antigens in gering differenzierten (G3) Tumoren und einer vermehrten Expression in mäßig differenzierten (G2) Mammakarzinomen [116].

Basierend auf diesen Angaben ergeben sich folgende Hypothesen für die vorliegende Promotionsarbeit:

- Tn-Antigen bzw. 9-O-Acetyl liefern als potentielle Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen vergleichbare Ergebnisse, wie der etablierte Marker Cytokeratin 8,18,19.
- Die Expression von Tn-Antigen auf DTCs ist signifikant höher beim Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und gering differenzierten Mammakarzinomen.
- Die Expression von 9-O-Acetyl-GD3 ist signifikant höher bei mäßig differenzierten Tumoren. Es besteht eine Herabregulation von 9-O-Acetyl-GD3 bei gering differenzierten Mammakarzinomen.

**Kapitel 2:**  
**Material und Methoden**

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Durchführung und Ablauf der Methoden**

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Querschnittsstudie. Zum Zeitpunkt ihrer Mammakarzinom-Erstdiagnose wurden 27 Patientinnen über den Ablauf der geplanten Studie informiert und nach deren Einverständniserklärung ins Studienkollektiv aufgenommen. Es wurden lediglich Patientinnen eingeschlossen, die eine primär operative Therapie erhielten. Eine weitere Selektion hat im Vorfeld nicht stattgefunden.

Die Methodik dieser Arbeit umfasst Doppelfärbungen von Zellen, gewonnen aus Knochenmarksaspiraten von Mammakarzinompatientinnen, mittels indirekter Immunfluoreszenz. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Methodikteile in ihren detaillierten Abläufen und jeder Arbeitsschritt mit exakten Angaben zur Art der Durchführung dargestellt.

#### **2.1.1. Testung der Antikörper und Bestimmung der einzusetzenden Antikörperkonzentrationen**

Es wurden Färbungen mit dem, in der Einleitung vorgestellten, Anti-Pan-CK Antikörper und jeweils dem Anti-Tn-Antigen oder Anti-9-O-Acetyl-GD3 Antikörper erstellt.

Um die Methodik zu validieren und um die ausgewählten Antikörper in ihrer Funktion und dem am besten geeigneten Verdünnungsverhältnis mit DAKO S 3022, einem Antikörperversdünnungsmedium, zu evaluieren, wurden zunächst Test-Objektträger, also Positiv- und Negativ-Kontrollen, hergestellt. Dazu wurden zum einen drei Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7, ZR-75-1 und CAMA-1 angezüchtet und aus einem Gemisch dieser drei Zelllinien Positiv-Kontrollen erstellt. Als Negativ-Kontrollen dienten Objektträger mit Leukozyten ausschließlich gesunder Spenderinnen.

Um die Negativ-Kontrollen zu erstellen, erfolgte die Blutabnahme an gesunden Spenderinnen in 10 ml EDTA-Röhrchen. Die Blutröhrchen wurden mit EDTA versehen, um eine vorzeitige Gerinnung der Proben zu verhindern. Um die Leukozyten vom gespendeten Vollblut zu separieren, wurde das Histopaque Zell-Separations System

entsprechend den Herstelleranweisungen verwendet. Das Vollblut wurde sehr vorsichtig, um eine Vermischung der beiden Phasen zu vermeiden, auf 20ml Histopaque gegeben und anschließend für 30 Minuten bei 400 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurden die separierten Leukozyten, der sogenannte Buffy Coat, abpipettiert und in ein neues 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gründlich gewaschen und es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 250 g und 4°C. Der dabei entstehende Überstand wurde dann abgegossen und das zurückbleibende Zellpellet erneut in circa 2 ml PBS gelöst. Im Anschluss daran, wurden die mit 0,4%-igem Trypan Blau angefärbten Leukozyten in den einzelnen Proben mit der Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach Auszählen der weißen Blutkörperchen der gesunden Spenderinnen und Zählung der für Positiv-Kontrollen verwendeten Mammakarzinomzellen (eine Mischung zu gleichen Teilen aus CAMA-1, MCF7 und ZR-75-1), wurden zum einen Objektträger mit circa 500.000 Leukozyten und zum anderen Präparate mit circa 100.000, aus Zellkulturen stammenden Mammakarzinomzellen, hergestellt. Die Zellen wurden via Cytospin für 5 Minuten bei 500 g und Raumtemperatur auf die Objektträger zentrifugiert, anschließend wurde das überstehende PBS vorsichtig abpipettiert und die fertigen Objektträger über Nacht luftgetrocknet.

Es wurden mehrere Objektträger der Positiv-Kontrollen, in jeweils unterschiedlichen Verdünnungsverhältnissen der einzelnen Antikörper, angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt, um das am besten geeignete Mischungsverhältnis, sowohl der Primärantikörper als auch der Sekundärantikörper, mit DAKO-Antibody Diluent zu ermitteln. Hierunter versteht man die Ermittlung des optimalen Verdünnungsverhältnisses der einzelnen Antikörper mit DAKO, um entweder ein zu starkes Hintergrundsignal oder ein zu geringes Signal zu vermeiden. Wird ein zu geringes Verdünnungsverhältnis der Antikörper gewählt, sprich der Antikörper ist zu stark konzentriert, so sind alle Antigene bereits durch Bindung besetzt und überzählige Antikörper „schwimmen“ im Hintergrund und führen so zu einer fälschlichen Erhöhung des Signals. Liegt eine zu starke Verdünnung der einzelnen Antikörper vor, so werden nicht alle Zellantigene besetzt und ein zu geringes Signal resultiert. Die einzelnen Verdünnungsverhältnisse wurden durch optische Beurteilung der jeweiligen Färbungen ermittelt. Die hierbei für am besten empfundenen und bei den durchgeführten Färbungen verwendeten Verdünnungen lauteten wie folgt (Tabelle 4).

*Tabelle 4: Verdünnungsverhältnisse der Antikörper*

<b>Name des Antikörpers</b>	<b>Verdünnungsverhältnis</b>
Pierce Tn Antigen Antibody (Tn218)	1:100
Anti-Ganglioside GD3, O- Acetyl Antibody	1:500
Mouse IgG 1 Antibody, Anti Human Cytokeratin	1:100
Goat Anti-Mouse IgG Antibody, Cy3 conjugate	1:400
Goat Anti-Mouse IgM Antibody, FITC	1:20

Sämtliche Färbungen erfolgten anhand der weiter unten im Text beschriebenen, indirekten Immunfluoreszenz-Färbemethode.

### **2.1.2. Kultivierung der Tumorzelllinien**

Zur Testung der Antikörper wurden Mammakarzinomzellen von etablierten Tumorzelllinien benutzt. Die Kultivierung der Tumorzelllinien wurde nach den Vorgaben des Lieferanten durchgeführt.

Sämtliche Arbeiten an den verwendeten Zelllinien wurden unter streng sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Anzucht der Zelllinien MCF-7, ZR-75-1 und CAMA-1 erfolgte in entsprechenden Zellkulturflaschen mit Dulbecco`s MEM Nährmedium, versetzt mit 10% fetalem Kälberserum und zum antibiotischen Schutz 1% Penicillin plus Streptomycin. Die Bebrütung der Kulturflaschen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator, jeweils für 3-4 Tage. Nach Ablauf des Bebrütungszeitraumes, wurde zunächst der Überstand des Kulturmediums verworfen und die Kulturflaschen mit PBS gründlich gespült. Die kultivierten Tumorzellen wurden danach mittels Trypsin/EDTA aus der Kulturflasche herausgelöst. Hierfür wurden 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Kulturflasche gegeben und diese erneut für wenige Minuten im Inkubator bebrütet. Danach wurden 8 ml des Kulturmediums hinzugegeben, gespült und die Flüssigkeit im

Anschluss bis auf einen kleinen, in der Kulturflasche verbleibenden Rest, in frische Falcon Röhren überführt. Anschließend erfolgte die Auszählung der, mittels Zellkultur angezüchteten Zellen, in der Neubauer-Zählkammer.

Um einen neuen Zyklus der Zellkultur zu starten, wurde der in den Kulturflaschen verbliebene Rest erneut mit 10 ml Kulturmedium aufgefüllt.

### **2.1.3. Gewinnung der Knochenmarksproben**

Bei 27 Patientinnen wurde im Rahmen der Primäroperation eine Knochenmarksaspiration vorgenommen. An diesen Proben erfolgte die wissenschaftliche Untersuchung. Für die Entnahme und Untersuchung der Knochenmarksproben liegt ein positiver Bescheid der Ethikkommission vor (Ethikvotum: LMU 148-12).

Aus der rechten oder linken Spina iliaca anterior superior wurden pro Patientin im Schnitt 2-3 ml Knochenmarkspunktat entnommen und durch Zugabe von 1 ml Heparin antikoaguliert.

Direkt nach der intraoperativen Gewinnung der Knochenmarkspunktate wurden die Proben im Labor weiterverarbeitet. Ziel war es, die Leukozyten und eventuelle disseminierte Tumorzellen aus den Proben zu gewinnen und entsprechend zu präparieren, um anschließend die Immunfluoreszenzfärbung durchführen zu können.

### **2.1.4. Aufbereitung der Knochenmarksproben und Herstellung der Knochenmarkspräparate**

Als erster Schritt der Aufbereitung der Knochenmarksproben wurde, um Fette aus den Proben zu entfernen, 25 ml Hank's Salt Solution zu den Aspiraten gegeben und diese bei 170 g für 10 Minuten bei 9°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Lipidphase vorsichtig bis zum Sediment entfernt und die, die Knochenmarkszellen enthaltende Schicht, wurde in ein neues 15 ml Falcon Röhren vorsichtig auf 8 ml Ficoll-Paque Plus Lösung gegeben. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1105 g, 20 Min, RT). Die durch diesen Schritt entstandene, die Leukozyten und eventuelle Tumorzellen enthaltende Phase, der Buffy Coat, wie bereits zuvor beschrieben, wurde vorsichtig aus dem Röhren entnommen und zusammen mit

PBS in ein neues Falcon Röhrchen überführt. Nach einer letzten Zentrifugation (535 g, 10 Min, RT), wurde der Überstand abgegossen und die im Sediment enthaltenen Knochenmarkszellen noch einmal mit 5 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die darin gelösten Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Zum Auszählen der Zellen wurde wiederum 0,4%-iges Trypan Blau verwendet, um intakte Zellen von kaputten Zellen zu unterscheiden. Nach Bestimmung der Zellzahl, wurden je circa 1 Million Knochenmarkszellen via Cytospin auf Objektträger zentrifugiert (500 rpm, 5 MIN, RT). Der Überstand aus PBS wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und die fertigen Objektträger nach sorgfältiger Beschriftung über Nacht getrocknet.

### **2.1.5. Doppelte Immunfluoreszenzfärbung der Präparate**

Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung basiert auf dem Einsatz von Antikörpern gegen das zu untersuchende Antigen. Antikörper sind Proteine, bestehend jeweils aus zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten, welche über Disulfidbrücken zu einer Y-förmigen Struktur miteinander verbunden sind. An einem Ende des Antikörpers befindet sich die so genannte variable Domäne, hierüber bindet der Antikörper spezifisch an das jeweilige Zielantigen [104]. Bei indirekten Immunfluoreszenzfärbungen kommen stets zwei Antikörper zum Einsatz, ein Primär- und ein Sekundärantikörper. Die Aufgabe des Primärantikörpers ist es an das gesuchte Zellantigen zu binden. Der mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Sekundärantikörper bindet daraufhin an den bereits am Antigen fixierten Primärantikörper und sorgt so für ein entsprechendes Farbsignal im Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 5) [129].

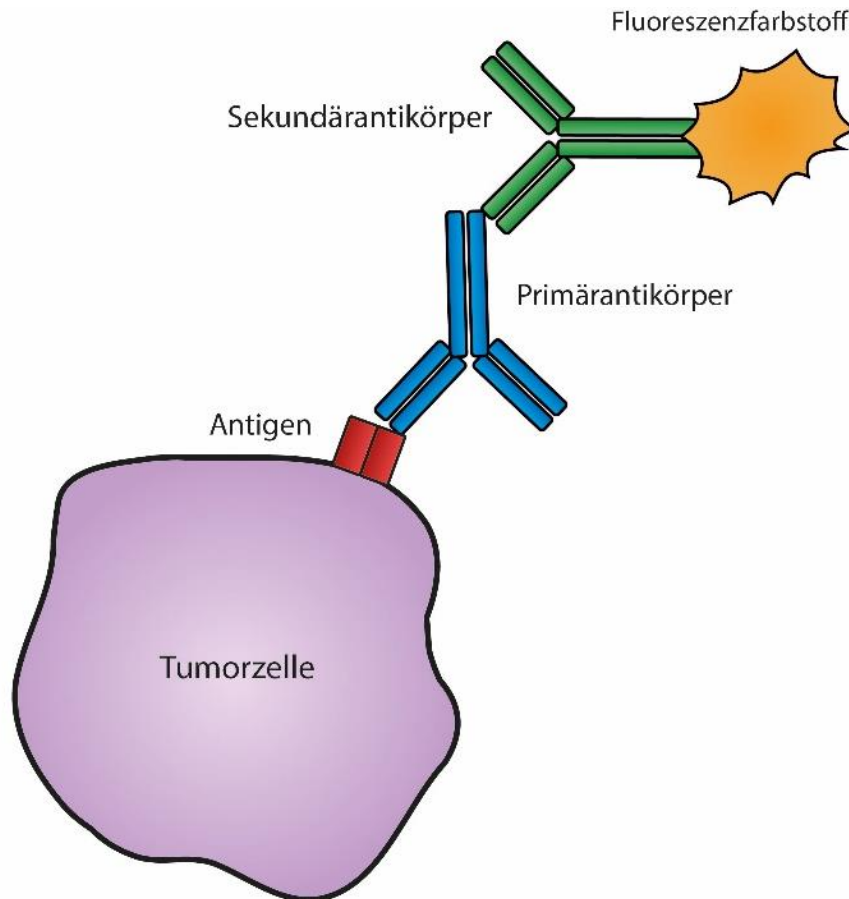


Abbildung 5: Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung; basierend auf Volgger et al. [129]

Um eine Doppelfärbung handelt es sich, wenn zwei verschiedene Antigene in einer Färbung, jeweils mit einem Antikörperpaar aus primärem und sekundärem Antikörper, untersucht werden. Hierbei ist strikt darauf zu achten, dass die in einer Färbung verwendeten Antikörper unterschiedlichen Antikörpergruppen angehören, um somit eine eindeutige Bindung der entsprechenden Sekundärantikörper zu gewährleisten. So kann beispielsweise einer der Primärantikörper ein IgG Antikörper sein und der zweite ein IgM Antikörper. Einer der Sekundärantikörper bindet dann an IgM Antikörper (Anti-IgM) und der andere an IgG (Anti-IgG).

Wie bereits erläutert, ist die Aufgabe des Primärantikörpers direkt an das zu untersuchende Antigen zu binden und dieses damit für den entsprechenden Sekundärantikörper zu markieren. In den hier durchgeführten Färbungen kamen drei Primärantikörper zum Einsatz. Als etablierter Tumormarker und somit als Referenz wurden die Cytokeratine 8, 18 und 19 angefärbt. Hierfür wurde ein Maus IgG Pan-Cytokeratin Antikörper gegen diese drei Cytokeratine verwendet. Für das Thomsen-



Nouvelle-Antigen wurde ein Maus IgM Antikörper und für das Antigen 9-O-Acetyl-GD3 wurde ebenso ein Maus IgM Antikörper verwendet.

Nach der Bindung des Primärantikörpers an das zu untersuchende Antigen wird im darauffolgenden Schritt der Sekundärantikörper appliziert. Jeder Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und sorgt somit für ein entsprechendes Farbsignal bei der Auswertung der Färbungen im Mikroskop. In dieser Arbeit wurden zwei sekundäre Antikörper verwendet. Zur Darstellung des Anti-Cytokeratin 8,18,19 Antikörpers wurde ein „Goat Anti-Mouse“ IgG Antikörper, konjugiert mit Cyanine 3 (Cy3), verwendet. Bei Cy3 handelt es sich um einen Cyaninfarbstoff, welcher bei einem Emissionsmaximum von 570 nm im orangen Farbkanal des Fluoreszenzmikroskops sichtbar wird. Die durch den Primärantikörper gebundenen Antigene Thomsen-Nouvell-Antigen und O-Acetyl-GD3, wurden mit einem „Goat Anti-Mouse“ IgM Antikörper, konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) dargestellt. Bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm leuchtet FITC im Fluoreszenzmikroskop grün.

Um positive Fluoreszenzsignale sicher als Zellen einstufen zu können, folgt jeder Antikörperfärbung die Gegenfärbung der Zellkerne mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Bei DAPI handelt es sich um einen Farbstoff zur Markierung von Zellkern DNA. In Verbindung mit doppelsträngiger DNA liegt das Emissionsmaximum bei 461 nm. DAPI sorgt im Fluoreszenzmikroskop für ein blaues Farbsignal.

#### **2.1.5.1. Primärantikörper**

Die so vorbereiteten Objektträger wurden nun, nach sorgfältiger Lufttrocknung mit Aceton fixiert und ein weiteres Mal luftgetrocknet. Nach dem ersten Schritt, der Fixierung der Zellen mit Aceton, folgte ein mehrmaliges Waschen der Objektträger in PBS und anschließend wurden sie mit 5%igem Bovinem Serum Albumin (BSA) in PBS-Lösung für 15 Min bei Raumtemperatur geblockt. BSA verhindert ein unspezifisches Binden der Antikörper an Membranen oder Fettgewebe während der Immunfluoreszenzfärbungen, indem elektrostatische Ladungen gesättigt werden. Aqua ad iniectabilia wurde in die Färbekammer gegeben um die Luftfeuchtigkeit in der Kammer hochzuhalten. Nach dem Blocken mit BSA wurde der Primärantikörper gegen

das gewünschte Antigen, entsprechend oben genannter Verdünnungsverhältnisse, mit DAKO S 3022 verdünnt und auf die Objektträger gegeben.

Der Primärantikörper wurde für 45 Min auf den Präparaten belassen und anschließend sorgfältig mit PBS abgespült.

### **2.1.5.2. Sekundärantikörper**

Zur farblichen Detektion des Primärantikörpers wurden nun die entsprechenden Sekundärantikörper, versehen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 oder FITC, im korrekten Verdünnungsverhältnis mit DAKO S 3022 im Dunklen, um vorzeitiges Verblässen der Farbstoffe zu verhindern, aufgetragen. Wiederum wurde eine Inkubationszeit von 30 Min bei Raumtemperatur abgewartet.

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Objektträger mehrmals mit PBS gewaschen und ein zweites Mal geblockt. Das zweite Blockieren erfolgte mit Ultra V Block für 15 Min.

Nach dem zweiten Blockierungsschritt folgte eine erneute Färbung, jeweils mit dem zweiten Antikörperpaar, bestehend aus primärem und sekundärem Antikörper, entsprechend der aufgeführten Schritte.

### **2.1.5.3. Färbung der Zellkerne mit DAPI**

Nach sorgsamer Lufttrocknung der angefärbten Objektträger, folgte im letzten Schritt die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI Vectashield Mounting Medium. Hierfür wurde ein Tropfen der Lösung auf ein Deckgläschen gegeben und dieses dann vorsichtig auf die Färbungen gelegt. Hierbei ist streng darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den Deckgläschen und dem Objektträger bilden, da diese die Betrachtung der Färbung unter dem Mikroskop erheblich stören würden. Die Deckgläschen wurden auf den Objektträgern mit durchsichtigem Nagellack vorsichtig fixiert und versiegelt.

### **2.1.6. Auswertung der gefärbten Objektträger am Fluoreszenzmikroskop**

Die Auswertung der Färbungen erfolgte an einem Zeiss Axioskop Epifluoreszenz Mikroskop. Hierbei wurden PH2 Plan Neofluar 20x/0,50 und 40x/0,75 Objektive verwendet sowie ein 10x/20 Okular. Anhand von drei unterschiedlichen Farbfiltern wurden die jeweiligen Färbungen betrachtet.

Von jeder Patientenprobe wurden mindestens zwei Objektträger, jeweils mit den Doppelfärbungen Pan-Cytokeratin plus Tn-Antigen oder Pan-Cytokeratin plus 9-O-Acetyl-GD3, angefertigt. Es wurden alle Zellen eines Präparates inspiziert und positive Zellen ausgezählt. Als Suchkanal wurde stets die bereits etablierte Pan-Cytokeratin Färbung verwendet. Wurde ein positives Leuchtsignal in der Pan-CK-Färbung detektiert, so wurde zunächst anhand der DAPI-Zellkernfärbung überprüft, ob es sich tatsächlich um eine angefärbte Zelle handelt. Somit kann eine potentiell artifizielle Leuchtreaktion der Pan-CK-Färbung ausgeschlossen werden. Anschließend wurde die Pan-CK positive Zelle im Fluoreszenzkanal der jeweiligen Tn-Antigen- oder 9-O-Acetyl-GD3-Färbung betrachtet und auf ein positives Leuchtsignal hin untersucht. Die jeweils einfach Pan-CK positiven oder doppelt Pan-CK und Tn-Antigen oder Pan-CK und 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen, wurden anschließend fotografiert und ausgezählt. Fotos wurden mittels einer Axio Cam MRm, hochauflösenden Mikroskopkamera gemacht und anhand der Software Axio Vision Release 4.8.2 (06-2010) am Computer verarbeitet.

Jedes Präparat wurde von zwei unabhängigen Betrachtern beurteilt und bewertet. Von, als positiv gewerteten Zellen, wurden Fotos gemacht und schließlich beide Ergebnisse verglichen und ein gemeinsamer Konsens über Positivität oder Negativität einer Zelle diskutiert und festgestellt.

### **2.1.7. Statistische Analyse der Daten mittels SPSS**

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS Statistics Version 23. Hierbei wurden Mittelwerte und Verteilung der Daten berechnet und auf Signifikanz untersucht. Die Untersuchung der nicht-parametrischen, ordinalen Daten wurde mittels Mann Whitney U-Tests auf einem Signifikanzniveau von 5% durchgeführt.

## 2.2. Materialien

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz
Aceton CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> 2,5L	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma Life Science	St. Louis, Missouri, USA
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare Bio- Sciences AB	Uppsala, Schweden
Aqua ad iniectabilia	B Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Hanks` Salt Solution ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Pierce Tn-Antigen Antibody (Tn218), 500 µl	Thermo Scientific	Rockford, Illinois, USA
Anti-Ganglioside GD3, O- Acetyl Antibody, 100 µg	Antibodies-Online GmbH	Aachen, Deutschland
Mouse IgG 1 Antibody, Anti Human Cytokeratin, 200 µg/ml, 500 µl	Amgen Research Munich GmbH	München, Deutschland
Goat Anti-Mouse IgG Antibody, Cy3 conjugate	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Goat Anti-Mouse IgM Antibody, FITC	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific	Carlsbad, Kalifornien, USA
DAKO S3022 Antibody Diluent with Background Reducing Components	DAKO North America, Inc	Carpinteria, Kalifornien, USA
Makrcrophage, CD68 – Clone KP1 Mouse Anti-Human	DAKO A/S	Dänemark
Protein Block DPB-125	Spring Bioscience	Pleasanton, Kalifornien, USA
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Inc	Burlingame, Kalifornien, USA

Albumin from Bovine Serum	Sigma Life Science	St. Louis, Missouri, USA
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG	Darmstadt, Deutschland
Nagellack, transparent	Rossmann	Deutschland
ZR-75-1	ATCC	Wesel, Deutschland
MCF7	ATCC	Wesel, Deutschland
CAMA-1	ATCC	Wesel, Deutschland
Trypsin / EDTA-Lösung	Biochrom AG	Darmstadt, Deutschland
Nährmedium - Dulbecco's MEM	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum- FETAL BOVINE SERUM	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Firmensitz
Deckgläser/Cover Slip 24x24 mm	Menzel Gläser	Braunschweig, Deutschland
Objektträger, Menzel Gläser Superfrost Plus	Thermo Scientific	Braunschweig, Deutschland
Butterfly Vacutainer® Safety Lok™	Becton Dickinson and Company AG	Franklin Lakes, New Jersey, USA
EDTA-Röhrchen Vacutainer Blood Collection Tubes EDTA (K2) 18,0mg	Becton Dickinson and Company AG	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Eppendorf-Tubes	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, Deutschland

Multi Safe Seal Tubes, 1,5/1,7ml		
Falcon-Röhrchen, 50ml, 15ml	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Oberösterreich
Pipettenspitzen, -10µl, - 100µl, -1000µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Glaspipetten, 10ml	Starsted AG u Co	Nümbrecht- Rommelsdorf, Deutschland
Zellkulturflaschen	TPP AG	Trasadingen, Schweiz

Tabelle 7: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Gefrierschrank - 20°C	Bosch Cooler	Robert Bosch GmbH	Gerlingen, Deutschland
Gefrierschrank - 80°C	Hera Freeze	Thermo Electron Corporation	Waltham, Massachusetts, USA
Tischzentrifuge	Rotina 380	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
Cytospin-System		Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
Glasküvetten		Glaswerk Wertheim	Wertheim, Deutschland
Pipetten	Finnpipette F2;  Volumina:  1-10µl,  10-100µl,  100-1000µl	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Färbekammer, schwarz		Neolab	Heidelberg, Deutschland

Material und Methoden

Zählkammer	Zählkammer Improved	Neubauer	Deutschland
Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss Axioskop Durchlichtmikroskop	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
40x Objektiv	EC Plan-Neofluar 40x/0,75 Ph2	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
20x Objektiv	EC Plan-Neofluar 20x/0,50 Ph2	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenz Filter	Filter Set 20 BP 546/12, FT 560, BP 575-640	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenz Filter	Filter Set 38 BP 470/40, FT 495, BP 525/50	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenz Filter	Filter Set 02 G 365, FT 395, LP 420	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenz- und Farb-Imaging Kamera	AxioCam Mrm	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Software	AxioVision Release 4.8.2	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Tischzentrifuge	Multifuge 3SR+/3L-R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Abzug Zellkultur	Herasafe	Heraeus	Hanau, Deutschland
Inkubator Zellkultur	Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Pipettierhilfe	Accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland

**Kapitel 3:  
Ergebnisse**



### **3. Ergebnisse**

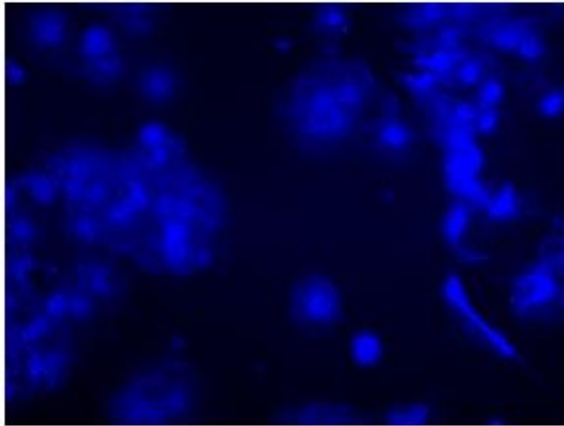
#### **3.1. Testung der Methodik und Antikörper anhand von Positiv- und Negativkontrollen**

Jede Immunfluoreszenzfärbung beginnt, wie im Methodenteil ausführlich beschrieben, mit der allgemeinen Testung der angewandten Methodik.

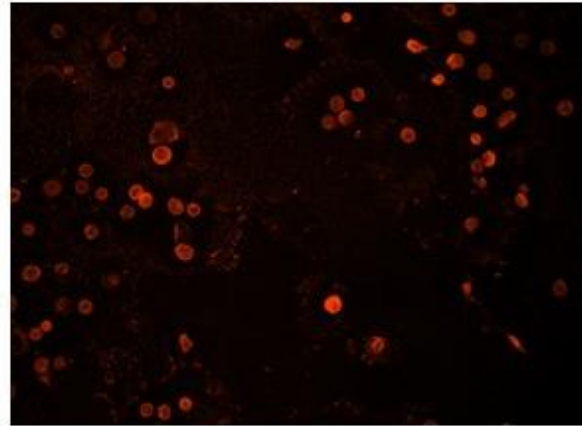
Um die Sensitivität und Spezifität der hier angewandten Methode zu verifizieren, wurden sowohl Positivkontrollen als auch Negativkontrollen hergestellt und untersucht. Hierzu dienten zum einen Färbungen von Objektträgern, welche ausschließlich mit den drei verschiedenen Mammakarzinom-Zellreihen CAMA-1, MCF-7, ZR-75-1 bestückt wurden. Als Negativkontrollen wurden Blutproben mit Leukozyten gesunder Probandinnen angefärbt.

Die rein mit Tumorzellen versetzten Positivkontrollen zeigten, sowohl für Pan-Cytokeratin (Abbildung 6) als auch für Tn-Antigen (Abbildung 7) und 9-O-Acetyl-GD3 (Abbildung 8) ein durchgehend positives Leuchtsignal. Auf Negativkontrollen wurde für den Anti Tn-Antigen Antikörper (Abbildung 9) und den Anti-Pan-CK Antikörper (Ergebnisse nicht dargestellt) kein falsch-positives Signal registriert. Der Anti 9-O-Acetyl-GD3 Antikörper (Abbildung 10) zeigte zusätzlich zu den Tumorzellen eine positive Bindung auf CD68 positiven Zelllinien (Abbildung 11), also überwiegend Zellen der Makrophagenzelllinie [130].

## Positiv-Kontrolle: panCytokeratin

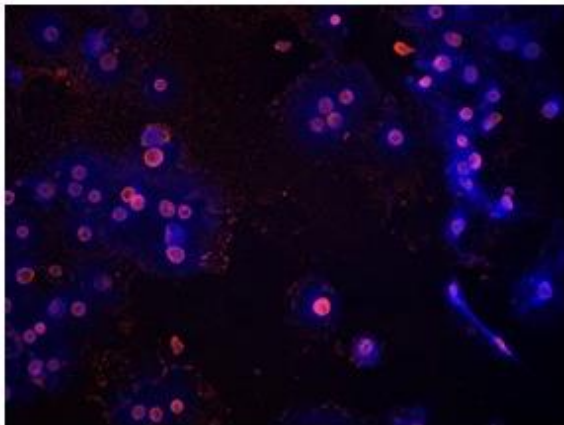


DAPI Zellkern Färbung



panCK in Cy3

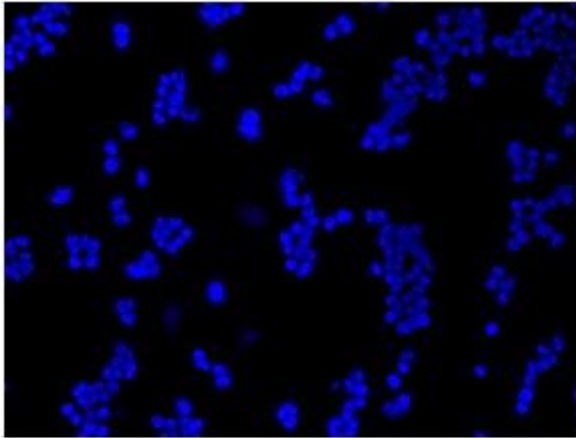
80  $\mu$ m



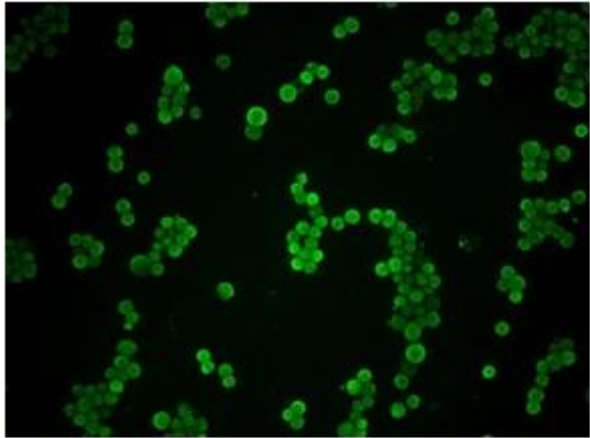
Fusion beider Kanäle

Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung, Positiv-Kontrolle des panCytokeratin Antikörpers anhand von MCF-7, ZR-75-1, CAMA-1 Zellen; DAPI blau, panCK orange; Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20

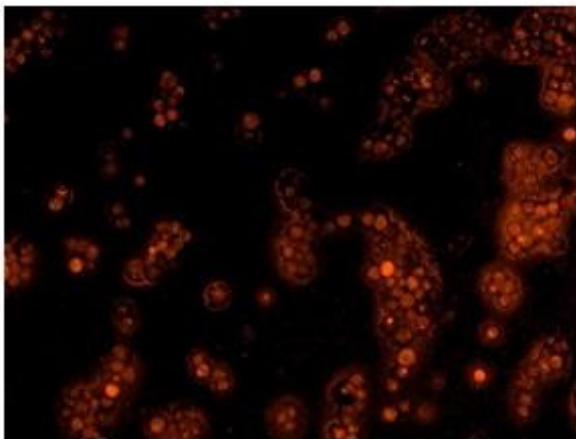
## Positiv-Kontrolle: Tn-Antigen



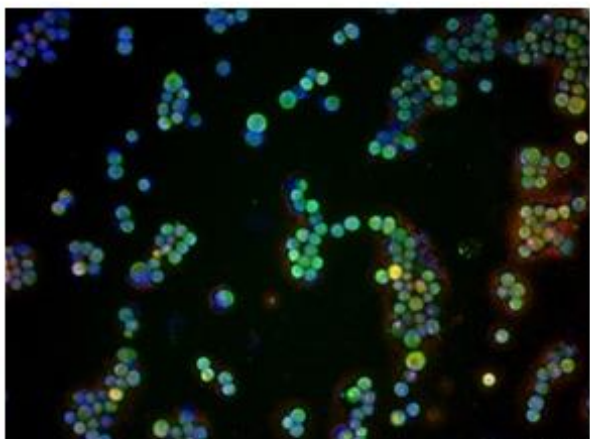
DAPI Zellkern Färbung



panCK in FITC



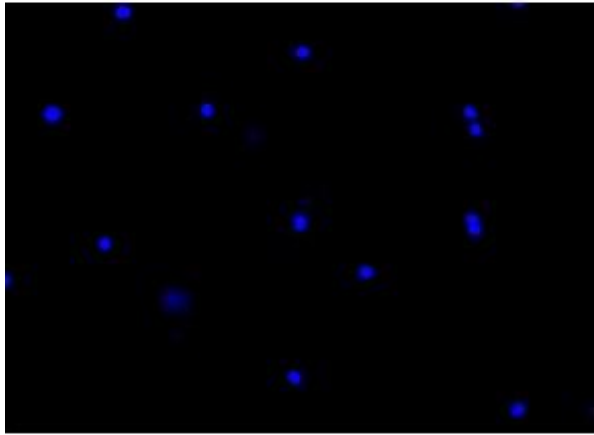
Tn-Antigen in Cy3



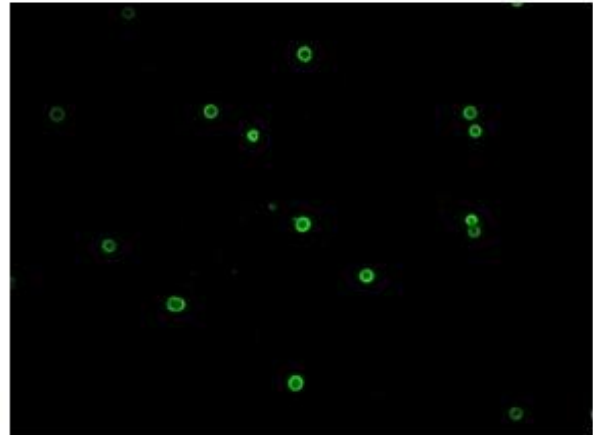
Fusion aller 3 Kanäle

Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung; Positiv-Kontrolle des Tn-Antigen Antikörpers anhand von MCF-7, ZR-75-1, CAMA-1 Zellen; DAPI blau, panCK grün, Tn-Antigen orange; Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20

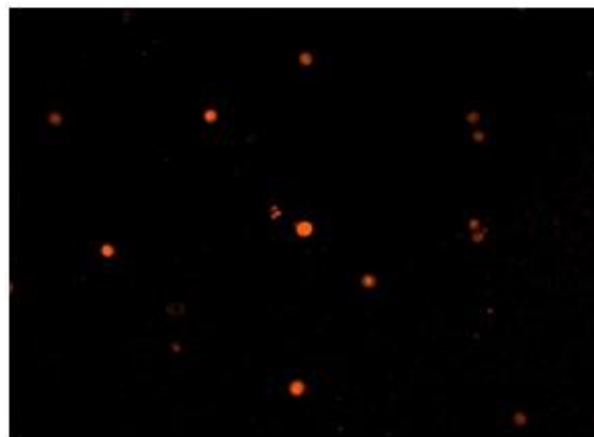
## Positiv-Kontrolle: 9-O-Acetyl-GD3



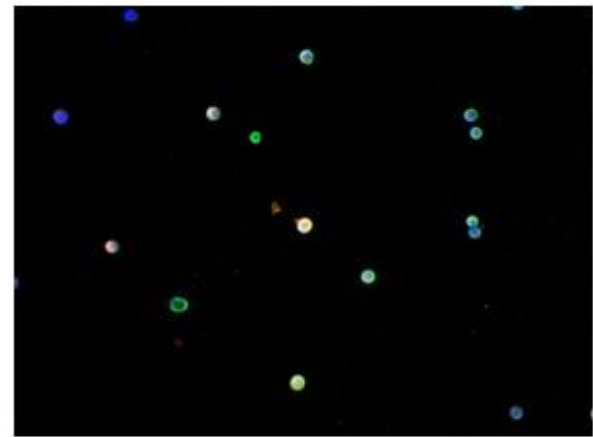
DAPI Zellkern Färbung



panCK in FITC



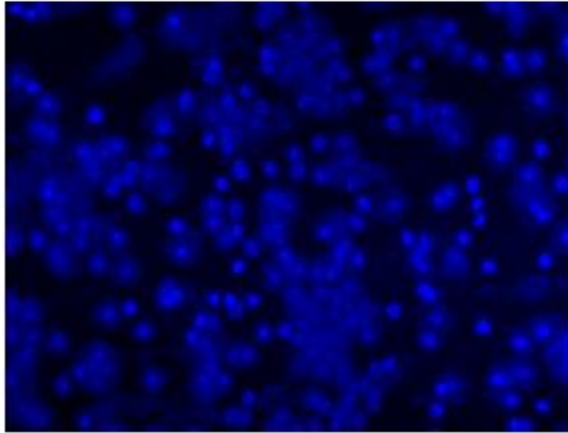
9-O-Acetyl-GD3 in Cy3



Fusion aller 3 Kanäle

Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung; Positiv-Kontrolle des 9-O-Acetyl-GD3 Antikörpers anhand von MCF-7, ZR-75-1, CAMA-1 Zellen; DAPI blau, panCK grün, 9-O-Acetyl-GD3 orange; Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20

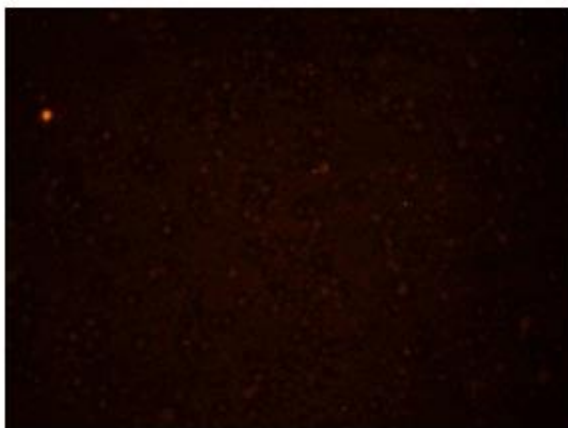
## Negativ-Kontrolle: Tn-Antigen



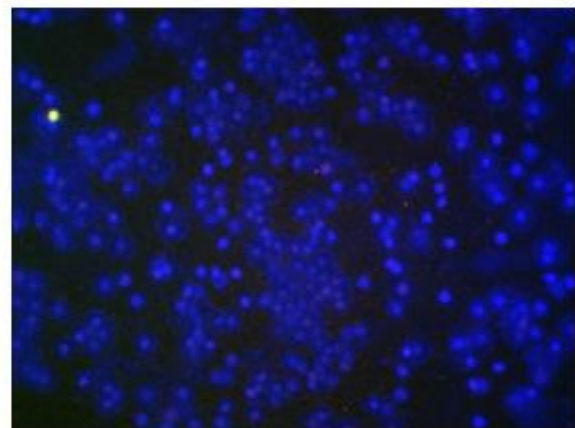
DAPI Zellkern Färbung



panCK in FITC



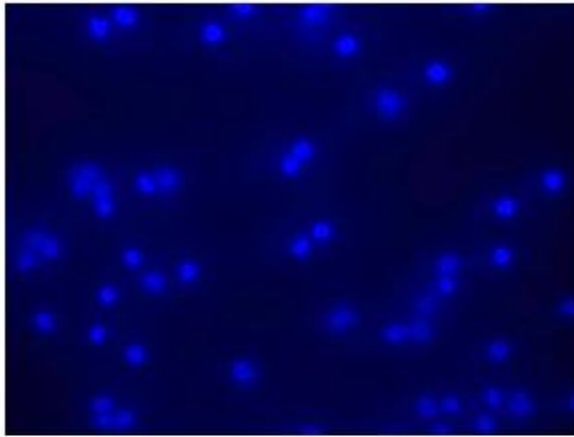
Tn-Antigen in Cy3



Fusion aller 3 Kanäle

Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung; Negativ-Kontrolle des Tn-Antigen Antikörpers anhand von Leukozyten; leuchtendes Artefakt im FITC und Cy3 Kanal; DAPI blau, panCK grün, Tn-Antigen orange; Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20

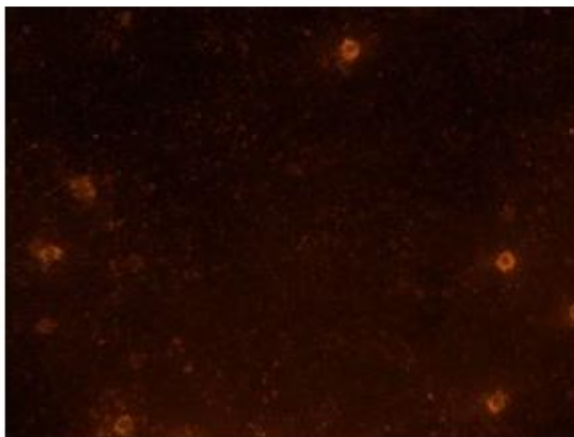
## Negativ-Kontrolle: 9-O-Acetyl-GD3



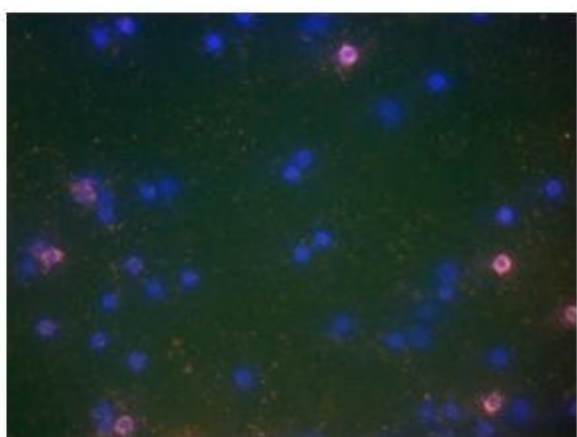
DAPI Zellkern Färbung



panCK in FITC



9-O-Acetyl-GD3 in Cy3

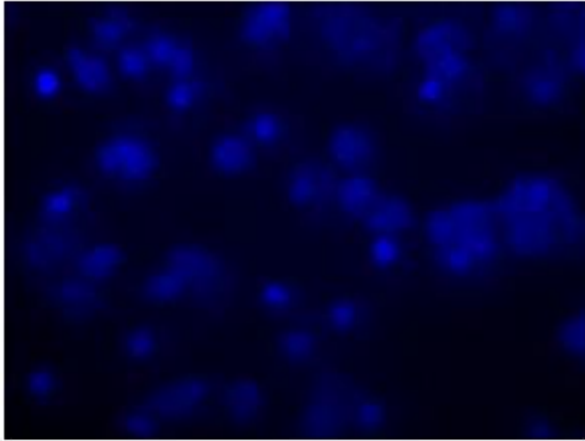


Fusion aller 3 Kanäle

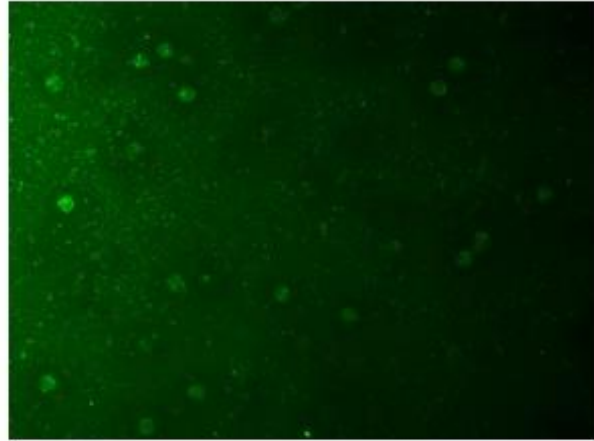
Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung; Negativ-Kontrolle des 9-O-Acetyl-GD3 Antikörpers anhand von Leukozyten; DAPI blau, panCK grün, 9-O-Acetyl-GD3 orange; Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20



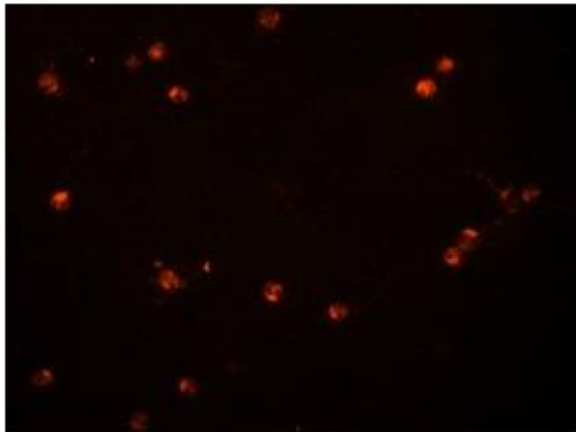
## Leukozytenfärbung – CD68 und 9-O-Acetyl-GD3



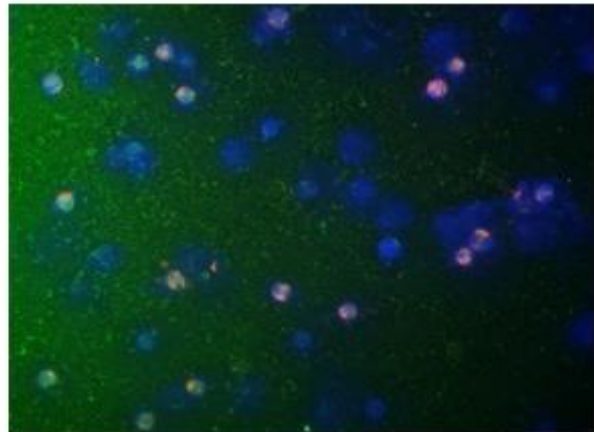
DAPI Zellkern Färbung



9-O-Acetyl-GD3 in FITC



CD-68 in Cy3



Fusion aller 3 Kanäle

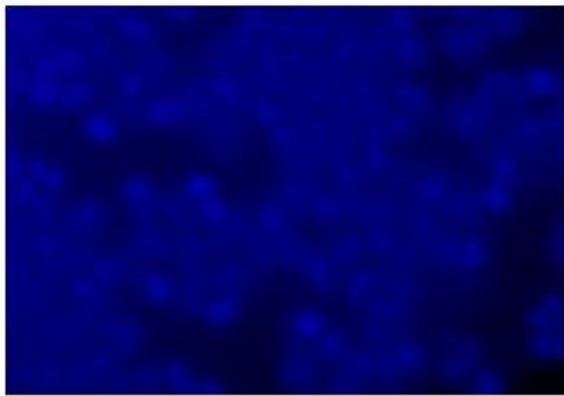
Abbildung 11: Leukozytenfärbung mit CD68 und 9-O-Acetyl-GD3 Antikörpern; leichte Verunreinigung durch Hintergrundsignal; DAPI blau, 9-O-Acetyl-GD3 grün, CD-68 orange; Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20

### **3.2. Färbung der Knochenmarksproben der Patientinnen**

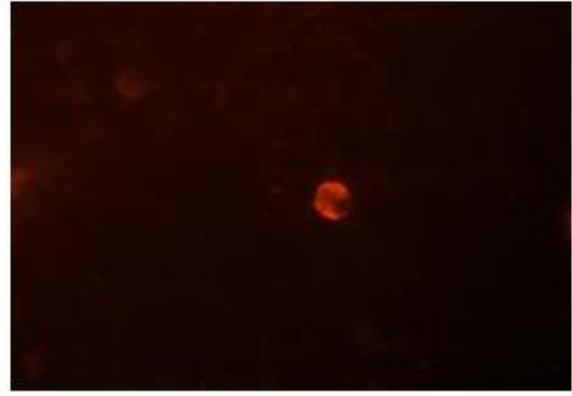
Nach erfolgreicher Testung und Verifizierung der Methodik, wurden im darauffolgenden Schritt Knochenmarksaspirate von 27 Patientinnen gewonnen. Diese wurden wie im Methodenteil beschrieben aufbereitet und angefärbt. Die gefärbten Proben wurden nach einem immer gleich bleibendem Schema durchsucht und beurteilt und jede Zelle mit positivem Signal ausgezählt. Zu Dokumentationszwecken wurden Fotos mittels Axio Vision Release 4.8.2 (06-2010) aufgenommen. Die Zellen wurden hinsichtlich der Doppelfärbungen Pan-Cytokeratin/Tn-Antigen und Pan-Cytokeratin/9-O-Acetyl-GD3 beurteilt. Zeigten die mittels Pan-Cytokeratin detektierten Tumorzellen jeweils kein positives Leuchtsignal in den Tn-Antigen (Abbildung 12) und 9-O-Acetyl-GD3 Färbungen (Abbildung 14), so wurden diese nur als rein Pan-CK positiv gewertet. Pan-CK positive Zellen plus Tn-Antigen (Abbildung 13) oder 9-O-Acetyl-GD3 (Abbildung 15) positive Zellen wurden als doppelt positiv ausgezählt.



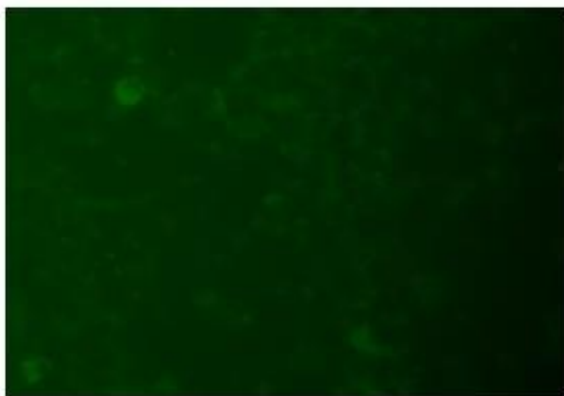
## Beispiel Tumorzelle: panCK positiv; Tn-Antigen negativ



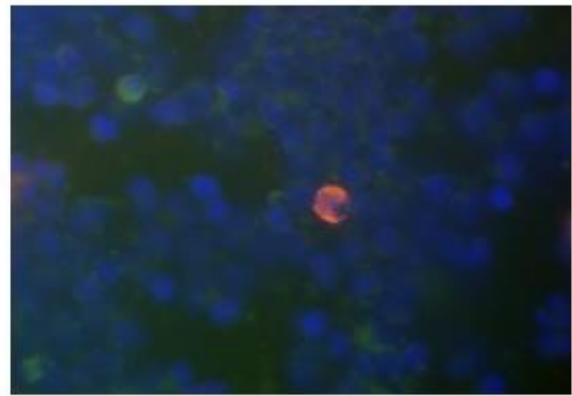
DAPI Zellkern Färbung



panCK in Cy3



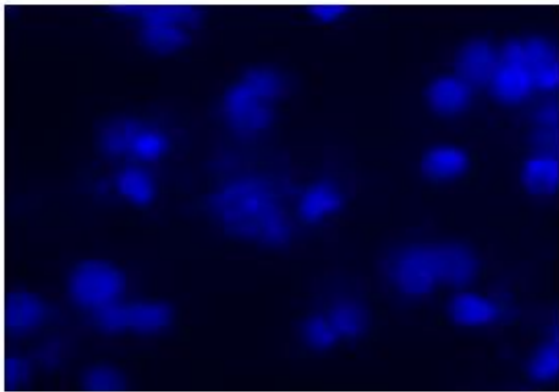
Tn-Antigen in FITC



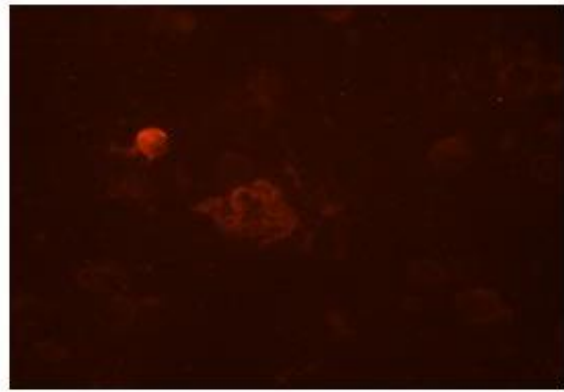
Fusion aller 3 Kanäle

Abbildung 12: Beispiel Tumorzelle in Knochenmarksaspirat; panCK positiv, Tn-Antigen negativ; DAPI blau, panCK orange, Tn-Antigen grün; Objektiv: PH2 Plan Neofluar 40x/0,75, Okular: 10x/20

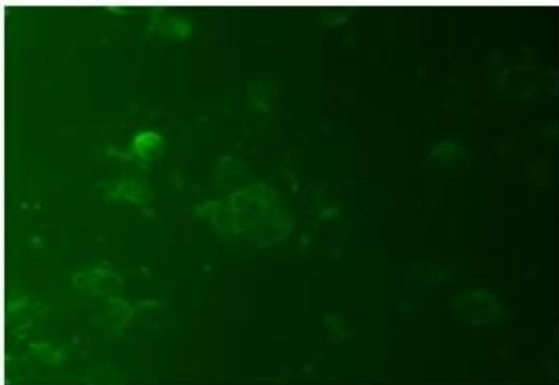
## Beispiel Tumorzelle: panCK positiv; Tn-Antigen positiv



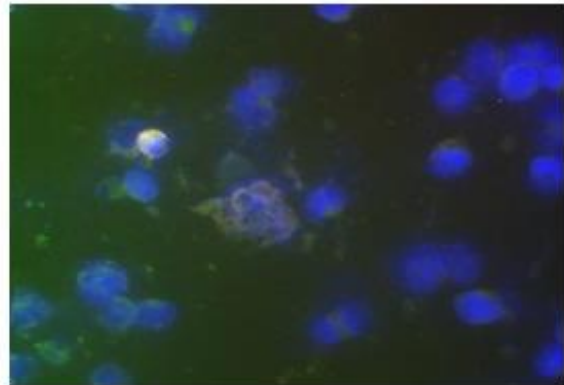
DAPI Zellkern Färbung



panCK in Cy3



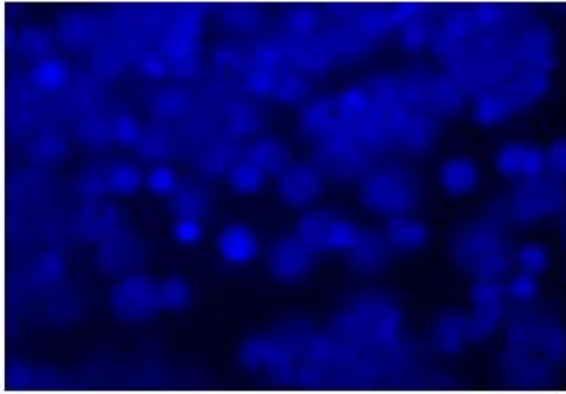
Tn-Antigen in FITC



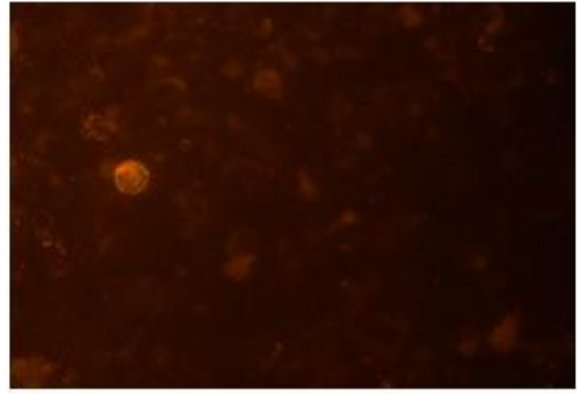
Fusion aller 3 Kanäle

Abbildung 13: Beispiel Tumorzelle in Knochenmarksaspirat; panCK positiv, Tn-Antigen positiv; zentral Artefakt durch Verunreinigung; DAPI blau, panCK orange, Tn-Antigen grün; Objektiv: PH2 Plan Neofluar 40x/0,75, Okular: 10x/20

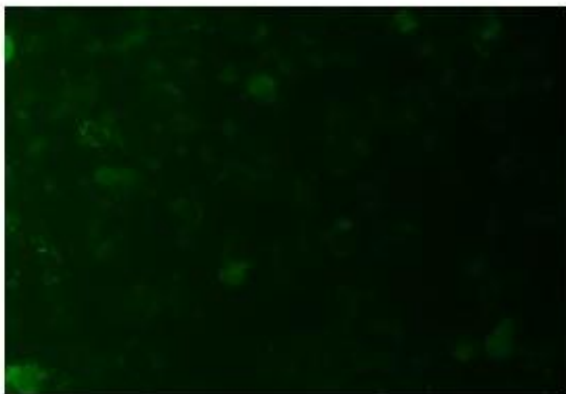
## Beispiel Tumorzelle: panCK positiv; 9-O-Acetyl-GD3 negativ



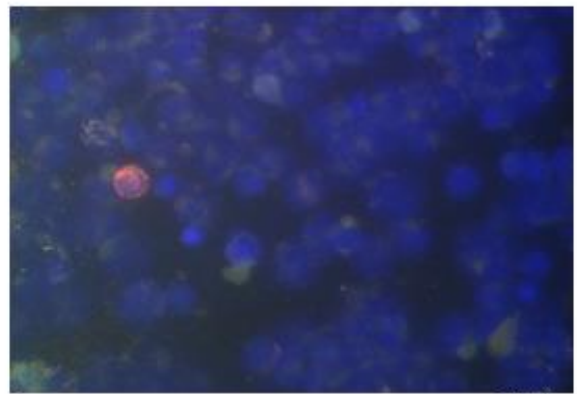
DAPI Zellkern Färbung



panCK in Cy3



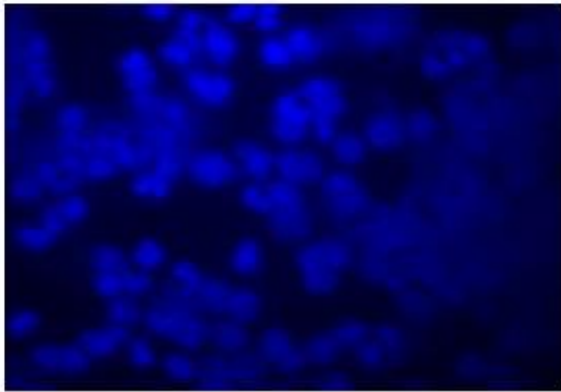
9-O-Acetyl-GD3 in FITC



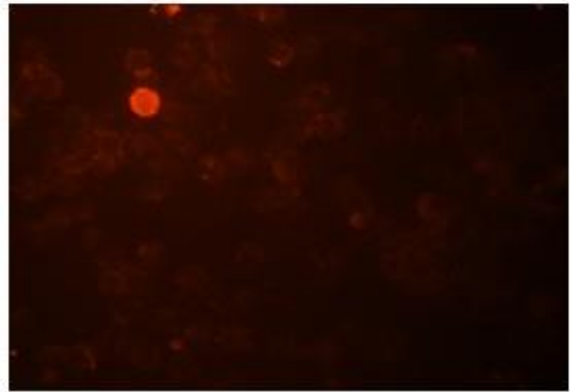
Fusion aller 3 Kanäle

Abbildung 14: Beispiel Tumorzelle in Knochenmarksaspirat; panCK positiv, 9-O-Acetyl-GD3 negativ; DAPI blau, panCK orange, 9-O-Acetyl-GD3 grün; Objektiv: PH2 Plan Neofluar 40x/0,75, Okular: 10x/20

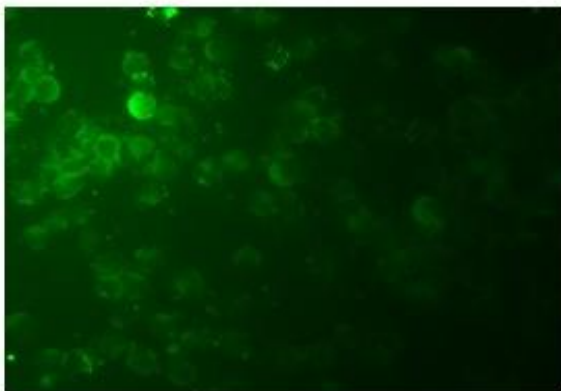
## Beispiel Tumorzelle: panCK positiv; 9-O-Acetyl-GD3 positiv



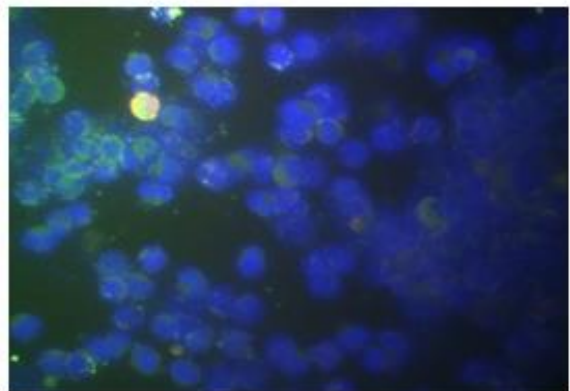
DAPI Zellkern Färbung



panCK in Cy3



9-O-Acetyl-GD3 in FITC



Fusion aller 3 Kanäle

Abbildung 15: Beispiel Tumorzelle in Knochenmarksaspirat; panCK positiv, 9-O-Acetyl-GD3 positiv; DAPI blau, panCK orange, 9-O-Acetyl-GD3 grün; Objektiv: PH2 Plan Neofluar 40x/0,75, Okular: 10x/20

### 3.3. Klinische Datenverteilungen der teilnehmenden Patientinnen

Untersucht wurden 27 Proben von Brustkrebspatientinnen in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung.

Zum Zeitpunkt der Knochenmarkspunktion waren 4 Patientinnen  $\leq 40$  Jahre, 3 Patientinnen  $> 40$  und  $\leq 45$  Jahre, 6 Patientinnen  $> 45$  und  $\leq 55$  Jahre und 14 Patientinnen  $> 55$  Jahre alt (Abbildung 16). Das Durchschnittsalter betrug 58 Jahre und der Altersmedian lag bei 57 Jahren. Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Probengewinnung 37 Jahre, die Älteste 77 Jahre alt.

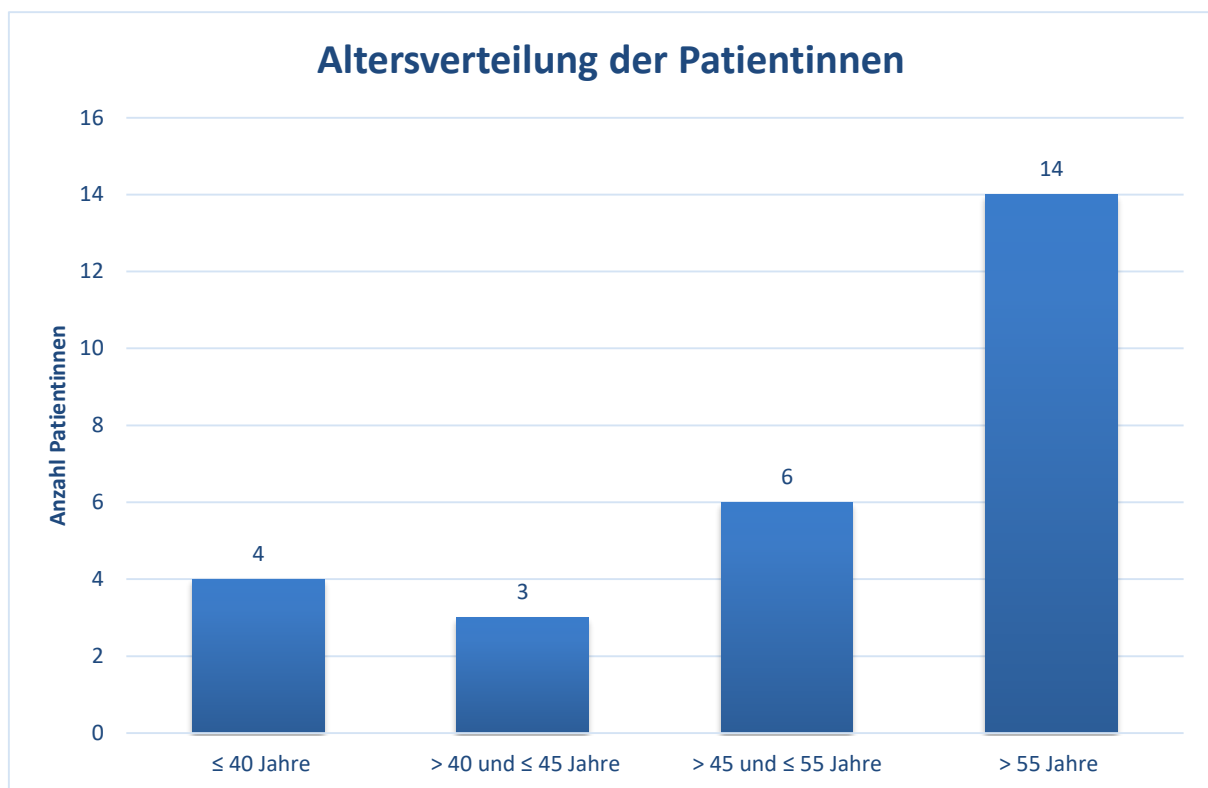


Abbildung 16: Altersverteilung der teilnehmenden Patientinnen

Hinsichtlich des Menopausenstatus, waren acht Frauen prämenopausal, eine Frau perimenopausal und sechzehn Frauen postmenopausal.

Der überwiegende Anteil der Primärtumoren (14 Stück) entsprach den Kriterien des T2 Tumorstadiums, zehn waren in die Kategorie T1 einzuordnen und jeweils nur ein Tumor war den Untergruppen T3 und T4 zuzuordnen (Abbildung 17).

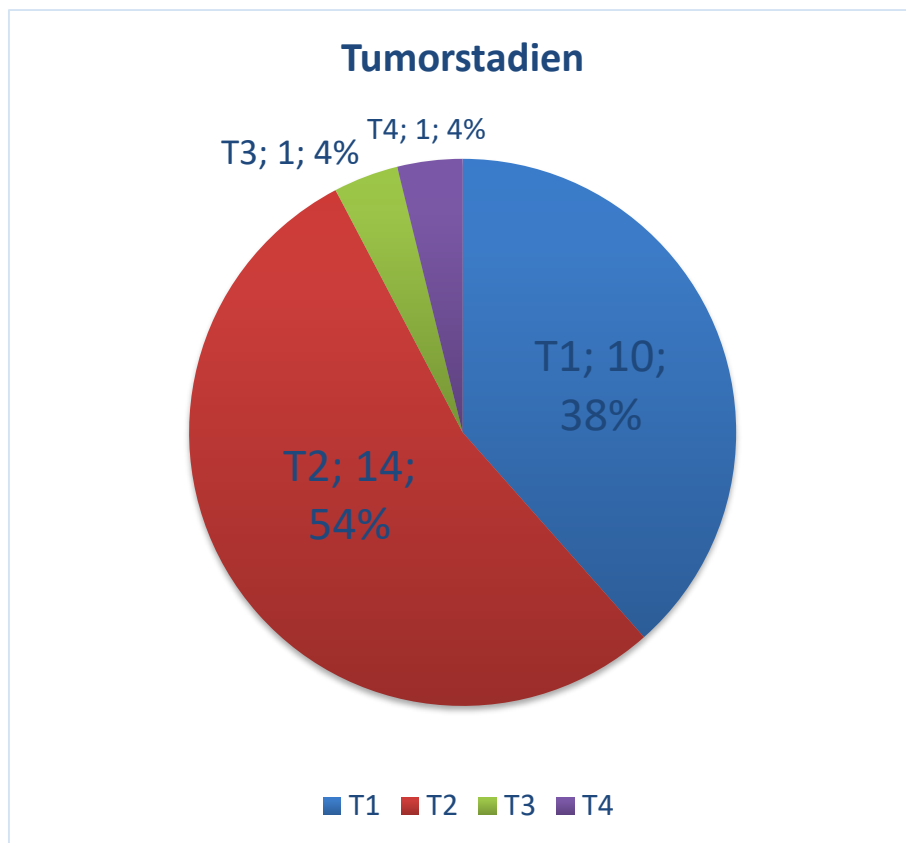


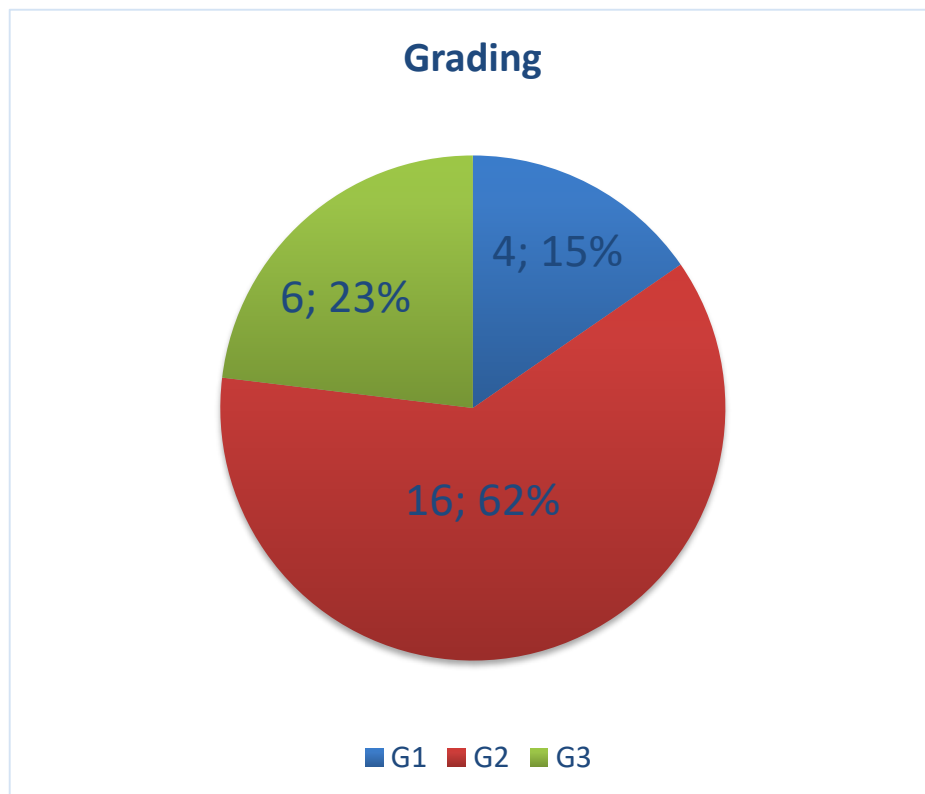
Abbildung 17: Tumorstadien der Tumoren der teilnehmenden Patientinnen

Die Größe der Primärtumoren betrug im Mittel 23,48 mm. Der kleinste Tumor maß 6 mm, der größte 55 mm.

Bei acht Patientinnen konnten befallene Lymphknoten nachgewiesen werden und bei lediglich einer Patientin lag nachweislich eine Fernmetastase (M1) vor.

Bei fast allen, der untersuchten 27 Patientinnen, wurde ein invasiv-duktales Mammakarzinom histologisch diagnostiziert. Eine Patientin hatte ein tubulo-lobuläres Mammakarzinom.

Die histologische Untersuchung stufte 16 der 27 untersuchten Tumoren als G2 und somit als einen mittleren Malignitätsgrad ein. Vier Patientinnen hatten einen G1 Tumor und sechs Mammakarzinome wurden als G3 Tumoren klassifiziert (Abbildung 18).



*Abbildung 18: Grading der Tumoren der teilnehmenden Patientinnen*

In Tabelle 8 sind die Daten, der in die Studie eingeschlossenen Brustkrebspatientinnen, im Detail hinsichtlich Alter, menopausalem Status, TNM-Klassifikation, Histologie, Hormonrezeptorstatus und Grading dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 8: Daten der teilnehmenden Patientinnen (k.A. = keine Angabe)

Nr	Alter in Jahre	Meno- pausen- status	TNM - Stadium			Histo- logie	Ki67	Gradi- ng	Hormon- rezeptoren		Her2/ neu
			T	N	M				ER	PR	
1	76	post	pT1c (11mm)	pNx	Mx	NST	k.A.	G1	90%	90%	neg
2	60	post	pT2 (37mm)	pN0	Mx	NST	k.A.	G2	67%	50%	neg
3	55	peri	pT1c (12mm)	pN0	Mx	NST	k.A.	G1	99%	99%	neg
4	69	post	pT1b (6mm)	pN0	Mx	NST	k.A.	G2	100%	100%	neg
5	60	post	pT1c (11mm)	pN0	Mx	NST	k.A.	G2	100%	67%	pos
6	40	prä	pT1b (7mm)	pN0	M0	NST	k.A.	G2	90%	90%	neg
7	57	post	pT2 (26mm)	pN2a (6/15)	Mx	NST	40%	G3	67%	0%	pos
8	52	post	pT4 (55mm)	pN0	M1	NST	k.A.	G3	90%	99%	neg
9	42	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
10	74	post	pT2 (35mm)	pN0	M0	NST	k.A.	G3	60%	8%	pos
11	74	post	pT2 (25mm)	N0	Mx	NST	k.A.	G2	100%	100%	pos
12	43	prä	pT3 (55mm)	pN1 (1/2)	Mx	NST	15%	G2	80%	90%	neg
13	48	prä	pT1b (8mm)	pN0 (0/4)	Mx	NST	10%	G2	95%	95%	neg
14	38	prä	pT1c (14mm)	pN0 (0/4)	Mx	NST	k.A.	G3	80%	90%	neg
15	48	prä	pT2 (21mm)	pN1 (1/2)	Mx	NST	k.A.	G2	100%	100%	neg
16	73	post	pT2 (40mm)	pN0 (0/4)	Mx	NST	5%	G2	90%	70%	neg
17	77	post	pT1b (9mm)	pN1a (1/2)	Mx	NST	20%	G2	80%	80%	neg
18	48	prä	cT2	pN0 (0/2)	Mx	NST	k.A.	G3	neg	neg	neg
19	45	prä	cT2 (23mm)	k.A.	k.A.	NST	10%	G2	95%	90%	neg
20	71	post	pT2 (25mm)	pN0 (0/4)	Mx	NST	10%	G1	75%	100%	neg
21	39	prä	cT2 (20mm)	k.A.	Mx	NST	20%	G2	90%	20%	n.d.
22	52	post	pT1c (15mm)	pN1 (1/2)	Mx	NST & DCIS	k.A.	G2	90%	70%	neg
23	77	post	pT 2 (32mm)	pN1a (1/2)	M0	NST	20%	G2	80%	5%	pos
24	37	prä	pT 2 (25mm)	pN0 (0/3)	Mx	NST	k.A.	G3	neg	neg	neg
25	76	post	pT 2 (29mm)	pN1a (2/10)	Mx	NST	15%	G2	95%	2%	pos
26	73	post	pT2 (30mm)	pN1a (1/6)	Mx	NST	5%	G2	95%	85%	neg
27	64	post	pT1c (16mm)	pN0 (0/5)	Mx	Tubulo- lobulär	k.A.	G1	100%	100%	neg



### 3.4. Ergebnisse der Doppelfärbungen

Nach den, im Methodenteil beschriebenen Färbeschritten, wurden die einzelnen Proben der Patientinnen, bzw. die gefärbten Objektträger, unter dem Fluoreszenzmikroskop in stets gleichbleibender, systematischer Vorgehensweise von zwei Personen betrachtet und ausgewertet.

Wie bereits beschrieben, diente als Suchkanal stets der etablierte Marker, die Pan-Cytokeratin Färbung. Im zweiten Schritt, wurden die Pan-Cytokeratin positiven Zellen auf ein Tn-Antigen oder 9-O-Acetyl-GD3 positives Leuchtsignal hin untersucht.

*Tabelle 9: Ergebnisse der Doppelfärbungen im Detail*

Patientin Nr	Tn:		O-Acetyl GD3:	
	Pan-CK positiv	Pan-CK +Tn positiv	Pan-CK positiv	Pan-Ck +GD3 positiv
1	1	0	5	5
2	9	9	9	8
3	17	6	8	6
4	12	6	14	10
5	13	7	9	7
6	11	4	15	5
7	19	12	21	17
8	35	21	37	12
9	20	10	19	8
10	38	21	15	5
11	5	4	1	1
12	1	0	0	0
13	2	2	0	0
14	7	7	6	6
15	4	0	12	4
16	8	5	0	0
17	8	3	6	3
18	3	1	6	4
19	27	17	17	12
20	33	13	21	7
21	7	3	3	3
22	30	7	24	10
23	19	6	29	13
24	24	7	18	9
25	17	3	17	8
26	2	1	3	2
27	4	3	12	7

Tabelle 9 zeigt die Anzahl der detektierten Zellen im Detail. Auffällig ist, dass bei allen 27 Patientinnen minimal eine Pan-Cytokeratin positive Zelle nachgewiesen werden konnte. Die Maximalzahl Pan-Cytokeratin positiver Zellen konnte mit 38 positiven Zellen bei Patientin Nr. 10 ausgezählt werden.

Bei den Doppelfärbungen mit Tn-Antigen, zeigten in den 27 Knochenmarksproben insgesamt 376 Zellen eine positive Reaktion des Pan-Cytokeratin Antikörpers. Davon waren 178 Zellen doppelt, also Pan-Cytokeratin und Tn-Antigen positiv. Dies entspricht einem Anteil von 47,3% an doppelt positiven Zellen (Abbildung 19). Bei den Färbungen mit 9-O-Acetyl-GD3, zeigten insgesamt 327 Zellen eine positive Pan-Cytokeratin Reaktion und 172 waren zudem 9-O-Acetyl-GD3 positiv. Damit stellten sich 52,6% als doppelt positiv dar (Abbildung 20).

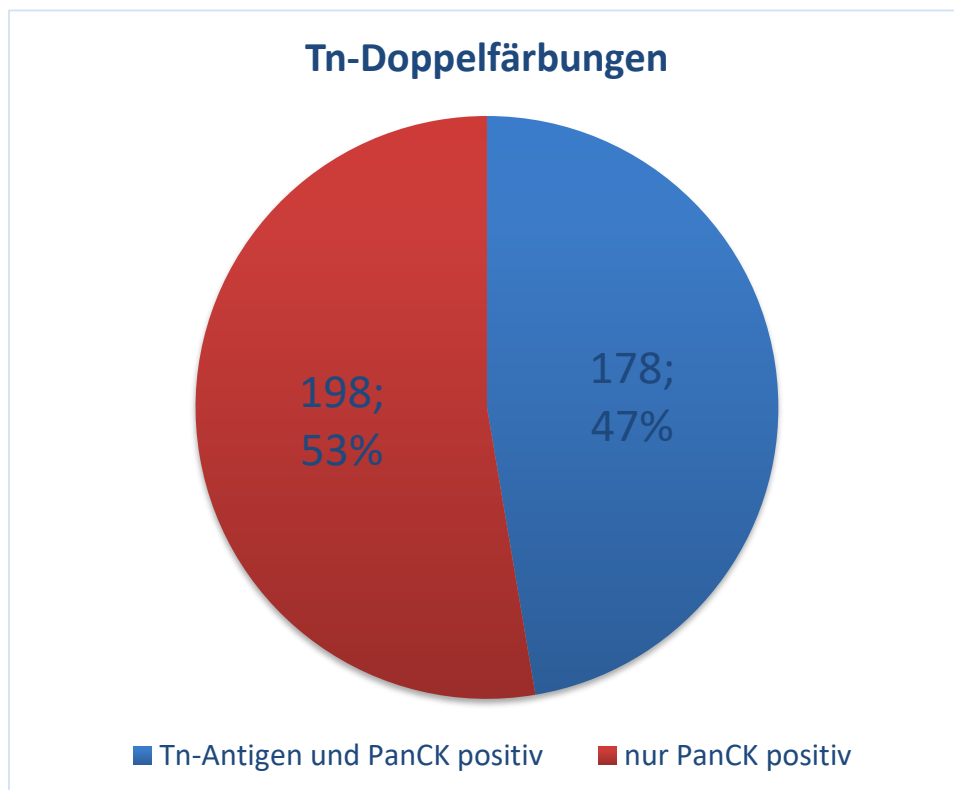


Abbildung 19: Anteil Tn-Antigen positiver Zellen

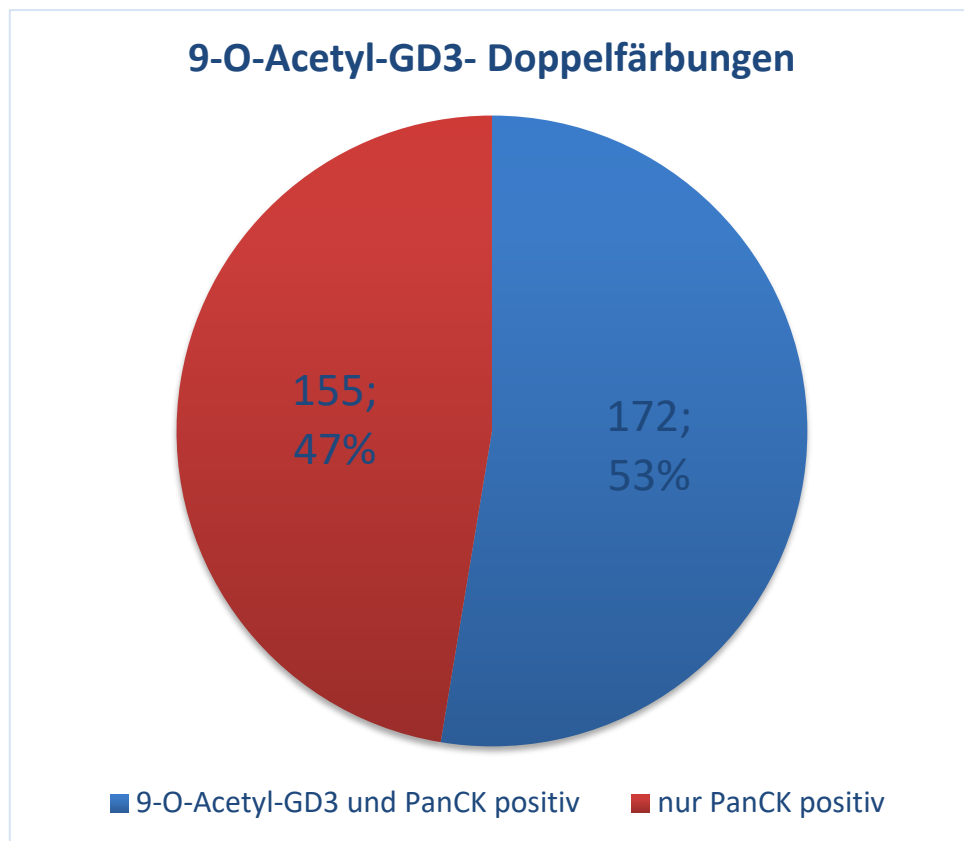


Abbildung 20: Anteil 9-O-Acetyl-GD3 positiver Zellen

### **3.5. Statistische Analyse der Ergebnisse der Färbungen mit den vorliegenden Patientendaten**

Die Ergebnisse der Färbungen, die pro Objektträger ausgezählten Tumorzellen, wurden mittels SPSS mit den vorliegenden Patientendaten nach Unterteilung in sinnvolle Gruppierungen statistisch analysiert. Es wurden stets alle Pan-CK positiven Tumorzellen und im Anschluss daran jeweils der durchschnittliche Anteil, der doppelt Tn-Antigen- und Pan-CK bzw. 9-O-Acetyl-GD3 und Pan-CK positiven Zellen, ins Verhältnis zu den jeweiligen Gruppierungen gestellt. Da nur nicht-parametrisch verteilte Daten vorlagen, wurden alle Gruppen mittels Mann-Whitney-U Test auf Signifikanz untersucht. Bei allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% angewandt.

#### **3.5.1. Menopausenstatus**

Als ersten Analysepunkt wurde der Menopausenstatus im Zusammenhang mit den jeweils angefärbten Tumorzellen näher betrachtet.

Es wurden zwei Gruppen gebildet. Hierbei wurden die prä- und perimenopausalen den postmenopausalen Patientinnen gegenübergestellt.

Bei den prä- und perimenopausalen Probandinnen wiesen im Schnitt 9,4 Zellen ein positives Signal für Pan-CK auf. Postmenopausal betrug der Durchschnitt an Pan-CK positiven Zellen 14,9. Im nicht-parametrischen Test ergab sich bei einem p-Wert von 0,220 kein signifikanter Unterschied.

Der durchschnittliche Anteil Tn-Antigen positiver Zellen an den Pan-CK positiven Zellen betrug bei den prä-/perimenopausalen Patientinnen 42,50%. Bei den postmenopausalen Patientinnen belief sich dies im Schnitt auf 49,11%. Mittels Mann-Whitney U Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen detektiert werden (p-Wert: 0,452).

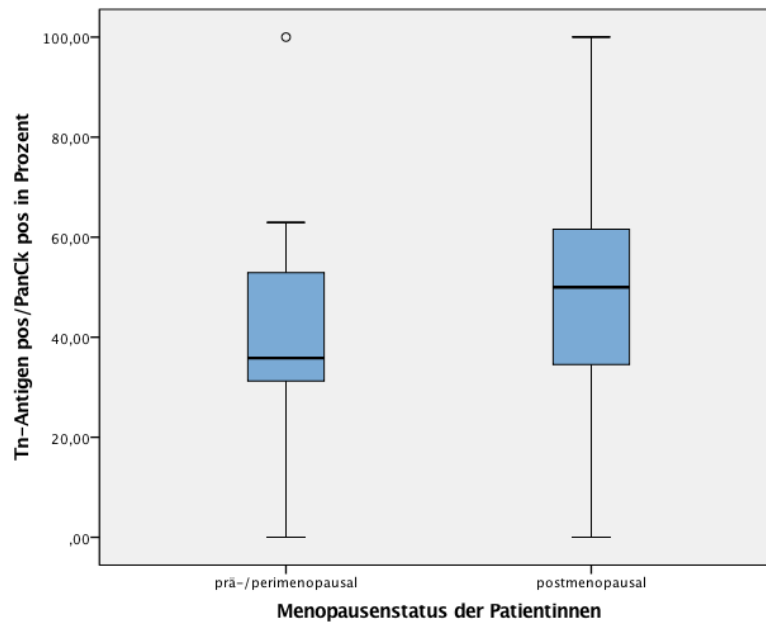


Abbildung 21: Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der prä-/perimenopausalen vs. postmenopausalen Patientinnen; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; prä-/perimenopausal: n = 10 Patientinnen; postmenopausal: n = 16 Patientinnen

Der durchschnittlich ermittelte Anteil der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen betrug bei den prä-/perimenopausalen Patientinnen 66,12%. Bei den postmenopausalen 61,78%. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (p-Wert: 0,728).

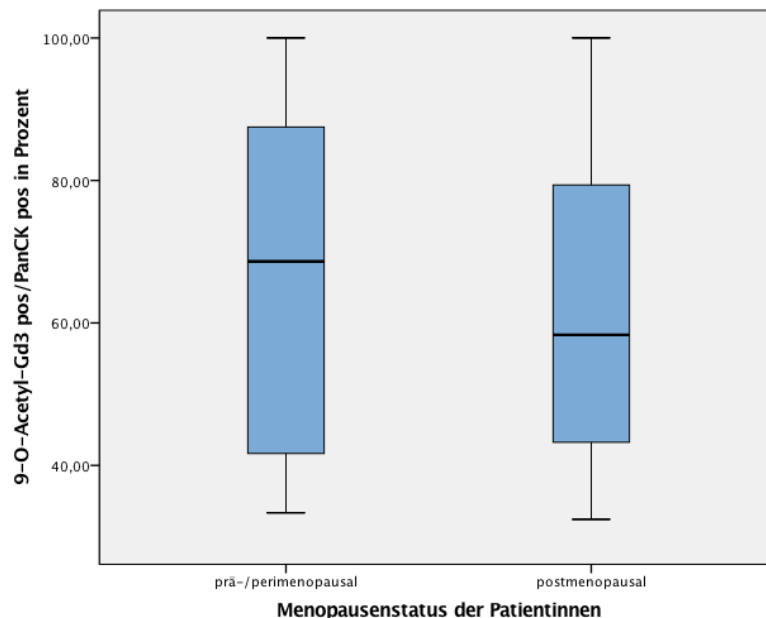


Abbildung 22: Darstellung des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der prä-/perimenopausalen vs. postmenopausalen Patientinnen; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; prä-/perimenopausal: n = 10 Patientinnen; postmenopausal: n = 16 Patientinnen

### 3.5.2. T-Stadium

Bezüglich der Größe des Primärtumors, des T-Stadiums, wurde ein Vergleich zwischen sehr kleinen und prognostisch günstigen Tumoren, T1 Tumoren, gegenüber T2-T4 Tumoren angestellt.

Bei den T1 Tumoren betrug der Mittelwert der Pan-CK positiven Zellen 10,2 versus 14,4 positiven Zellen bei den T2-T4 Tumoren. Bei einem p-Wert von 0,551 konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden.

In der Gruppe der T1 Tumoren betrug der durchschnittliche Anteil der Tn-Antigen positiven Zellen an Pan-CK 45,7%, bei den T2-T4 Tumorstadien 47,52%. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte bei einem p-Wert von 0,816 nicht ermittelt werden.

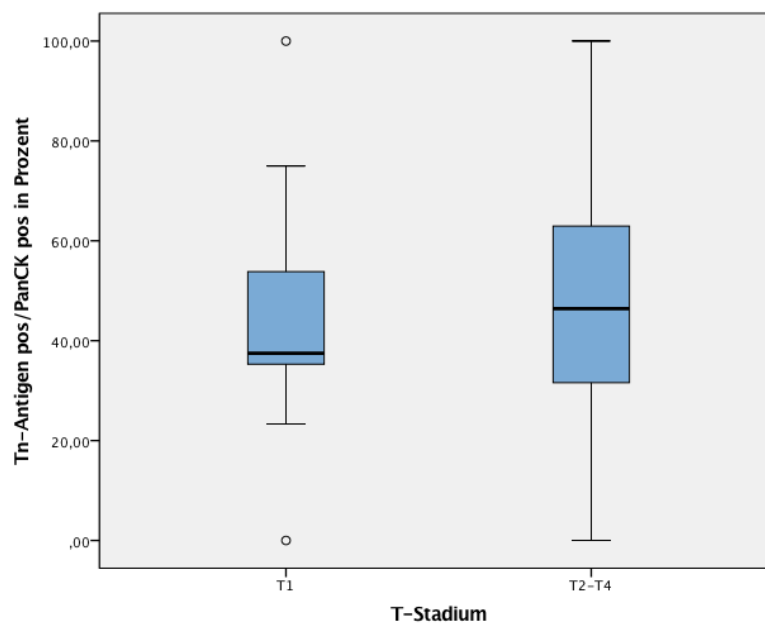


Abbildung 23: Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der T1 Tumoren vs. T2-T4 Tumoren; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; T1: n = 10 Patientinnen; T2-T4: n = 16 Patientinnen

Die Analyse des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3-positiven Zellen bezüglich geringe versus hohe T-Stadien ergab folgende Ergebnisse: In der Gruppe der T1 Tumoren belief sich der gemittelte Anteil 9-O-Acetyl-GD3 positiver Zellen an allen Pan-CK positiven Zellen auf 67,5%. Bei den T2-T4 Tumoren 60,58%. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied beider Gruppen errechnet werden (p-Wert: 0,439).

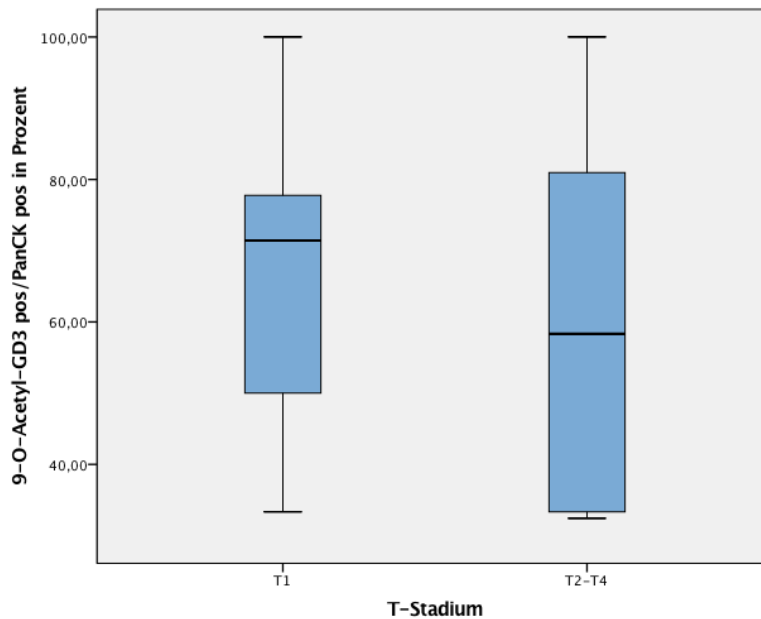


Abbildung 24: Darstellung des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der T1 Tumoren vs. T2-T4 Tumoren; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; T1: n = 10 Patientinnen; T2-T4: n = 16 Patientinnen

### 3.5.3. N-Stadium

Bezüglich der Nodalstadien wurden nodal negative Patientinnen (N0) mit nodal positiven (N1-N2) Erkrankungsstadien verglichen.

In der Gruppe der N0-Patientinnen färbten sich durchschnittlich 13,1 Zellen Pan-CK positiv und bei den nodal positiven Tumoren im Schnitt 13,3 Zellen. Bei einem p-Wert von 0,975 zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Der mittlere Anteil Tn-Antigen positiver Zellen an den Pan-CK positiven Zellen in der Gruppe der N0 Tumorstadien beträgt 57,51%. Bei den N1/N2 Stadien lediglich 31,89%. Im nicht-parametrischen Test besteht ein hoch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (p-Wert: 0,008).

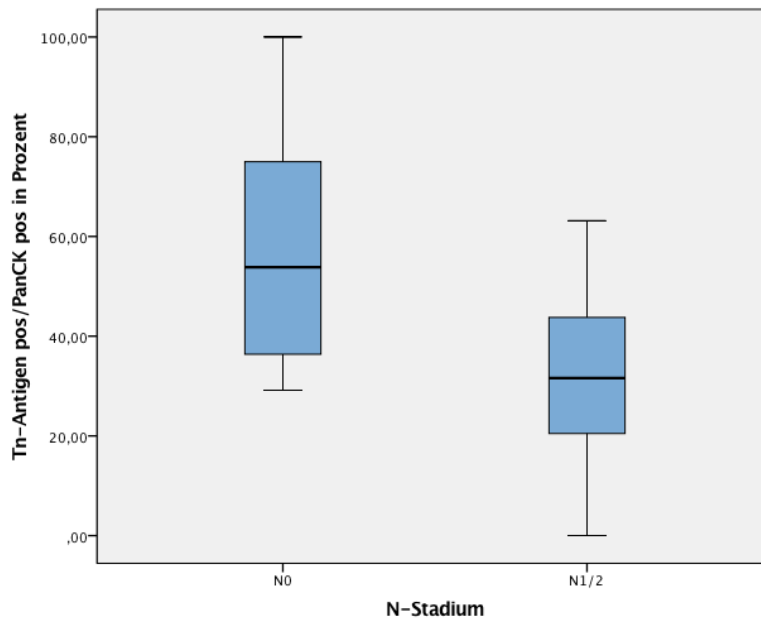


Abbildung 25: Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der N0 Stadien vs. N1/N2 Tumorstadien; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; N0: n = 15 Patientinnen; N1/2: n = 8 Patientinnen

Bei Betrachtung der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen betrug der durchschnittliche Anteil der doppelt 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Zellen in der Gruppe der N0 Stadien 63,12%. In der Gruppe der N1/N2 Stadien belief sich dieser Anteil auf 52,07%. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte nicht ermittelt werden (p-Wert: 0,438).

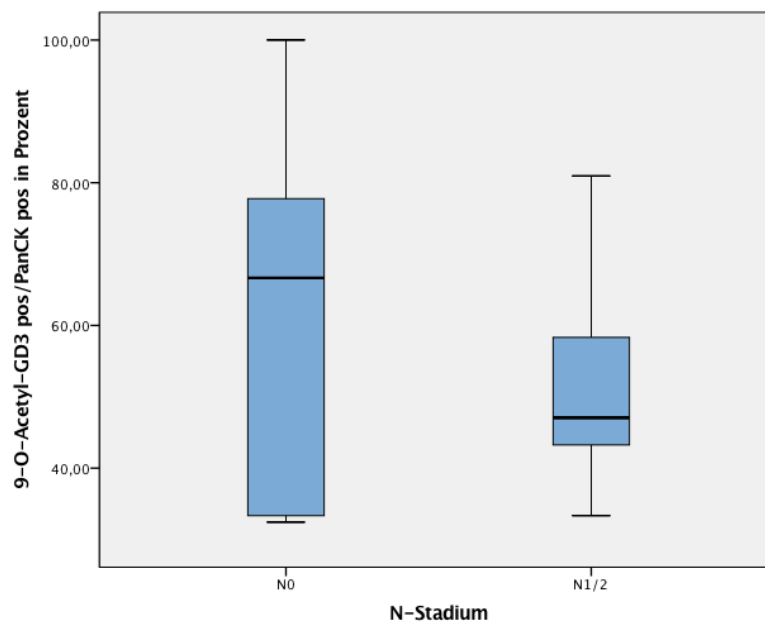


Abbildung 26: Darstellung des Anteils der doppelt 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der N0 Stadien vs. N1/N2 Tumorstadien; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; N0: n = 15 Patientinnen; N1/2: n = 8 Patientinnen



### **3.5.4. M-Stadium**

Bei einer großen Anzahl an Mx Stadien und lediglich einer sicher metastasierten Patientin ließ sich keine statistische Analyse durchführen. Auffällig ist, dass die einzige M1-Tumorpatientin viele DTCs im Knochenmark aufzuweisen hatte. Im den beiden durchgeführten Färbungen konnten im Schnitt 36 Pan-CK positive Tumorzellen detektiert werden. Hiervon konnten 21 doppelt Tn-Antigen positive und 12 doppelt 9-O-Acetyl-GD3 positive Zellen ermittelt werden.

### **3.5.5. Grading**

Um die Ergebnisse der Färbungen im Hinblick auf die Aggressivität der Tumoren näher untersuchen zu können, wurden die gut bis mäßig differenzierten G1/2 Tumoren, den gering differenzierten Entitäten, der Gruppe der aggressiveren G3 Tumoren gegenübergestellt.

Bei den G1/G2 Tumoren konnten durchschnittlich 10,9 Pan-CK positive Zellen ermittelt werden, versus 19,1 Pan-CK positive Zellen bei den aggressiveren (G3) Tumoren. Im nicht-parametrischen Test zeigte sich bei einem p-Wert von 0,071 ein grenzwertig signifikanter Unterschied.

Im Mittel betrug der Anteil der Tn-Antigen positiven Zellen an den Pan-CK positiven Zellen in der Gruppierung der G1/G2 Tumoren 43,28%. In der Untergruppe der G3 Tumoren 56,82%. Der Mann-Whitney U Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (p-Wert: 0,421).

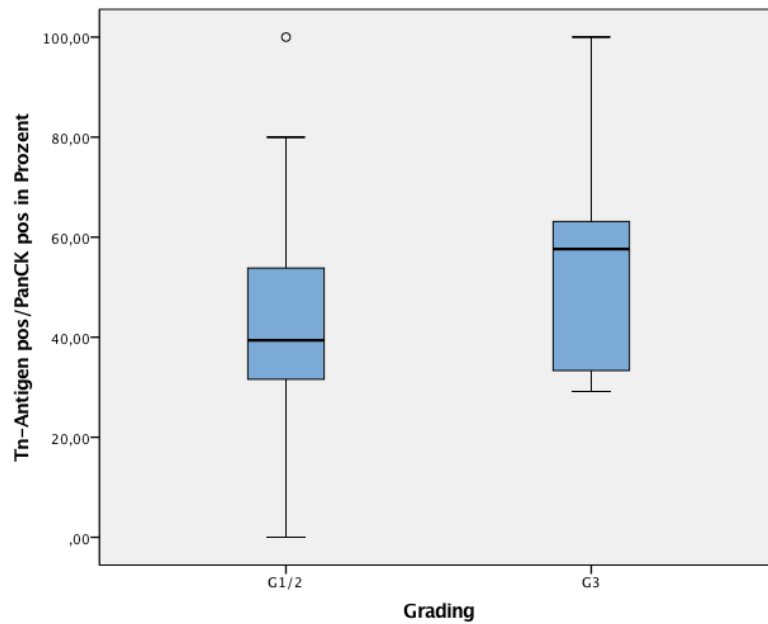


Abbildung 27: Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der G1/2 Stadien vs. G3 Tumorentitäten; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; G1/2: n = 20 Patientinnen; G3: n = 6 Patientinnen

Bei den 9-O-Acetyl-GD3 Färbungen betrug der durchschnittliche Anteil der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den Pan-CK positiven Zellen in der G1/2 Gruppe 64,25%. In der Gruppe der G3 Tumoren 60,56%. Es zeigte sich wiederum kein signifikanter Unterschied (p-Wert: 0,708).

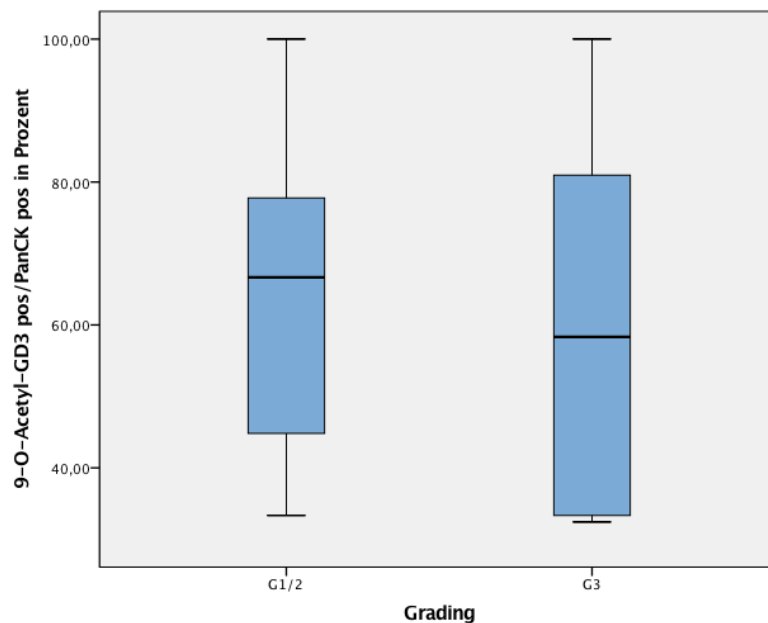


Abbildung 28: Darstellung des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der G1/2 Stadien vs. G3 Tumorentitäten; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; G1/2: n = 20 Patientinnen; G3: n = 6 Patientinnen

### 3.5.6. Hormonrezeptoren und Her2/neu-Status

Das Patientinnenkollektiv zeigte, bis auf zwei Patientinnen, eine durchwegs eindeutige Positivität der Östrogenrezeptoren, so dass hier keine statistische Analyse sinnvoll gewesen wäre. Bezüglich des Progesteronrezeptor Status wurde in zwei Gruppen unterteilt. Es wurden die Ergebnisse von stark positiven Tumoren (PR: >10%) im Vergleich zu geringer Progesteronrezeptor Positivität (PR: ≤10%) statistisch analysiert. In der Gruppe der niedrig-Progesteronrezeptor-positiven Tumoren (≤10%) waren durchschnittlich 18,9 Zellen Pan-CK positiv und 11,0 in der Untergruppe mit einem Progesteron Rezeptor Anteil von > 10%. Ein signifikanter Unterschied besteht bei einem p-Wert von 0,095 nicht.

Der im Schnitt ermittelte Anteil Tn-Antigen positiver Zellen an den Pan-CK positiven Zellen beträgt in der Gruppe der PR≤10% 38,36%. In der Gruppe der Tumoren mit einem PR>10% 49,79%. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht nicht (p-Wert: 0,295).

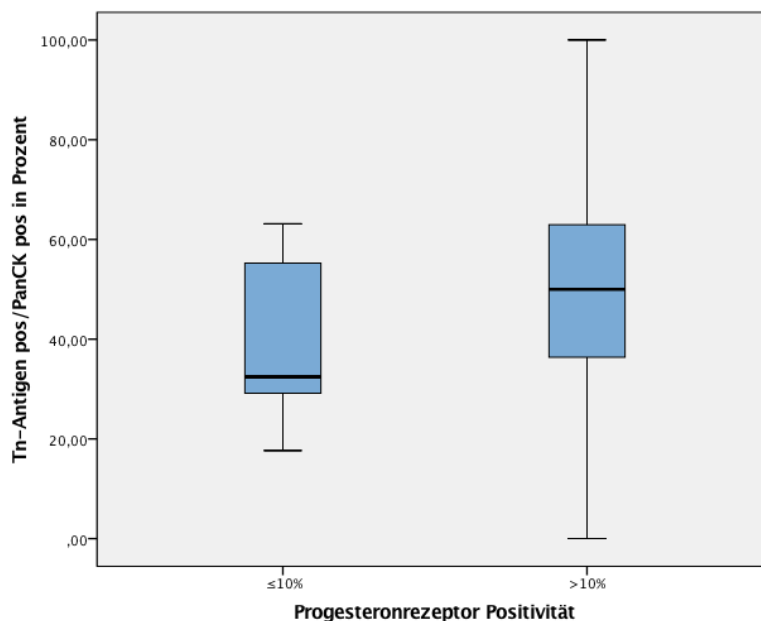


Abbildung 29: Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der Tumoren mit PR≤10% vs. PR >10% ; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; PR ≤10%: n = 6 Patientinnen; PR>10%: n = 20 Patientinnen

Durchschnittlich beträgt der Anteil der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den Pan-CK positiven Zellen in der Gruppe der ≤10% PR positiven Tumoren 53,81%. In der Gruppe der >10%PR positiven Tumoren beträgt dieser Anteil 66,63%. Ein signifikanter Unterschied besteht auch hier nicht (p-Wert: 0,354).

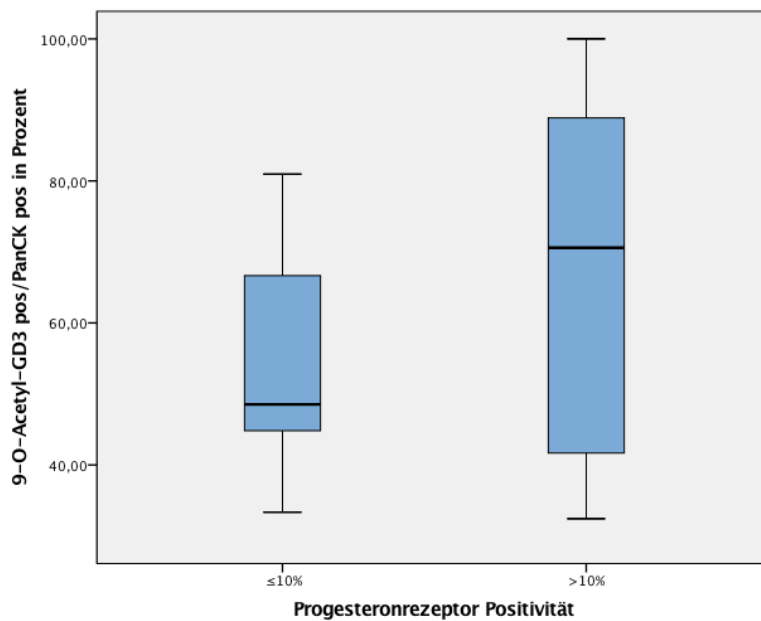


Abbildung 30: Darstellung des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der Tumoren mit PR≤10% vs. PR >10% ; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; PR ≤10%: n = 6 Patientinnen; PR>10%: n = 20 Patientinnen

Auch die Daten des Her2/neu-Status wurden mittels SPSS analysiert.

Durchschnittlich 16,7 Zellen wiesen ein Pan-CK positives Signal bei den Her2/neu positiven Proben auf. Im Schnitt wurden 11,9 Pan-CK positive Zellen bei den Her2/neu negativen Tumoren ermittelt. Bei einem p-Wert von 0,274 ein nicht signifikanter Unterschied.

Der im Durchschnitt ermittelte Anteil Tn-Antigen positiver Tumorzellen, an den Pan-CK positiven Tumorzellen in der Gruppe der Her2/neu positiven Tumoren, beträgt 50,23%. In der Gruppe der Her2/neu negativen Entitäten 45,77%. Im nicht-parametrischen Test besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (p-Wert: 0,733).

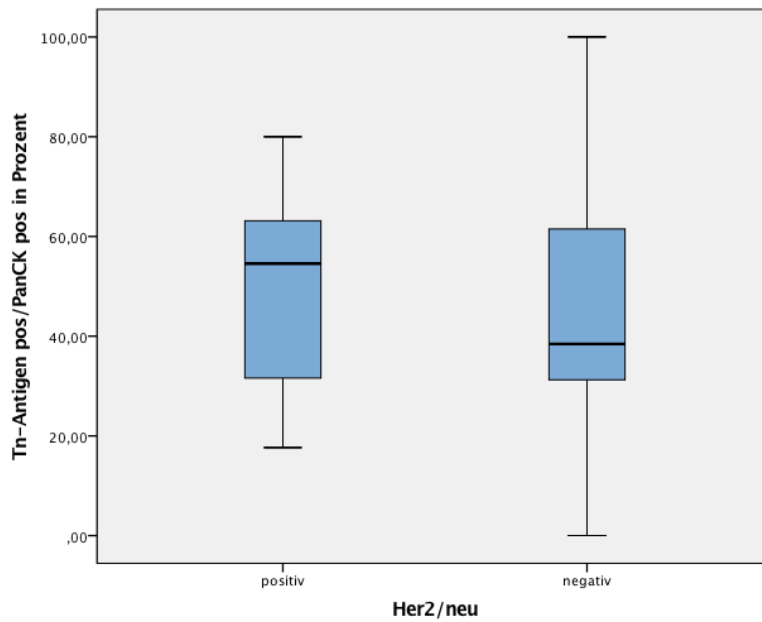


Abbildung 31: Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der Tumoren mit Her2/neu positiven vs. Her2/neu negativen Tumoren; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; Her2/neu positiv: n = 6 Patientinnen; Her2/neu negativ: n = 19 Patientinnen

In den 9-O-Acetyl-GD3 Färbungen waren in der Gruppe der Her2/neu positiven Tumoren im Durchschnitt 63,99% der Tumorzellen 9-O-Acetyl-GD3 positiv. In der Gruppe der Her2/neu negativen Tumoren lediglich 48,41%. Es zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert: 0,693).

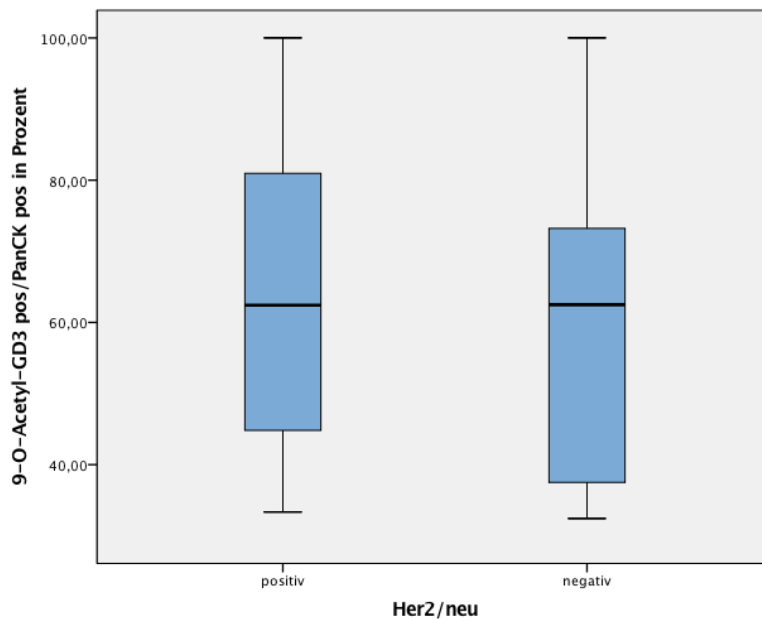


Abbildung 32: Darstellung des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels Pan-CK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der Tumoren mit Her2/neu positiven vs. Her2/neu negativen Tumoren; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median; Her2/neu positiv: n = 6 Patientinnen; Her2/neu negativ: n = 19 Patientinnen

Insgesamt waren nur zwei triple negative Patientinnen Teil der Studie. Bei einer der beiden Patientinnen wurden durchschnittlich 4,5 Pan-CK positive Zellen detektiert. Bei der zweiten Patientin zeigten im Schnitt 21 Pan-CK Zellen ein positives Leuchtsignal. Beide Patientinnen wiesen T2 Tumoren und pN0 Befunde auf.

**Kapitel 4:**  
**Diskussion**

## 4. Diskussion

### 4.1. Immunfluoreszenzfärbungen mittels Cytokeratin 8,18 und 19 als etablierter Marker – eine kritische Beurteilung der Methode

Bei Immunfluoreszenzfärbungen handelt es sich um eine seit langem praktizierte und bewährte Methode zum gezielten Nachweis bestimmter Zellantigene. Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts gelang erstmalig die Darstellung von Bakterien durch, mit Fluoreszenzfarbstoffen versehene, Antikörper [131, 132]. In der Regel werden Antigene an der Zelloberfläche untersucht. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit durch entsprechende Vorbehandlung des zu untersuchenden Gewebes, intrazelluläre Antigene darzustellen [133].

Die Herstellung qualitativ hochwertiger Immunfluoreszenzfärbungen erfordert akkurat abgestimmte Handlungsabläufe. Wie bereits in den einzelnen Handlungsschritten des Methodenteils beschrieben, muss zu Beginn jeder Immunfluoreszenzfärbung, die umfangreiche und exakt passende Bestimmung der erforderlichen Verdünnungsverhältnisse der einzelnen Antikörper stehen. Hiermit sollen einerseits unspezifische Leuchtreaktionen, bei zu hoch konzentrierten Antikörpermengen und andererseits fehlende Positiv-Signale, bei zu geringen Antikörperverhältnissen vermieden werden. Die Ermittlung der passenden Verdünnungsverhältnisse geschieht über mehrere Färbezyklen hinweg. Dabei muss nach jeder Färbung das Ergebnis unter dem Fluoreszenzmikroskop optisch ausgewertet werden und unter Umständen ein besser passendes Mischungsverhältnis ermittelt werden. Dies ist zum einen eine relativ aufwändige Art das richtige Verhältnis zu ermitteln, zum anderen unterliegt die Beurteilung, ob ein richtiges Verdünnungsverhältnis gewählt wurde, der subjektiven Beurteilung des Betrachters und stellt somit eine potentielle Fehlerquelle dar.

Die Färbung an sich und, im Detail die einzelnen Färbeschritte, erfordern relativ kurze Einwirkzeiten und bieten somit die Möglichkeit in verhältnismäßig kurzen Zeitintervallen durchgeführt zu werden. Ein weiterer, positiver Aspekt ist die Tatsache, dass es sich um ein kostengünstiges Verfahren handelt. Die benötigten Materialien, Instrumente und Geräte sind im Hinblick auf die benötigte Menge und Vielfalt überschaubar. Sie liegen im Vergleich zu anderen Methoden in einer vertretbaren Preiskategorie und sind in den meisten Laboratorien vorhanden. In Anbetracht dieser



überaus positiven Aspekte, ließe sich ein Einsatz dieser Methodik im streng kosten- und zeiteffizienten Klinikalltag, nach einmalig etwas aufwändigerer Ermittlung des idealen Verdünnungsverhältnisses des Antikörpers, hervorragend integrieren.

Die mikroskopische Auswertung der angefärbten Proben erfolgte durch optische Auszählung positiver Zellen unter dem Mikroskop. Obwohl jedes Präparat von zwei, unabhängigen Betrachtern beurteilt wurde, von positiv gewerteten Zellen Fotos gemacht und schließlich beide Ergebnisse verglichen und ein gemeinsamer Konsens über Positivität oder Negativität einer Zelle gefasst wurde, unterliegt diese Methode einer nicht zu vernachlässigenden Subjektivität der Beurteilung und ist somit auf diese Weise nicht eindeutig standardisiert und jederzeit valide reproduzierbar. Abhilfe hierfür könnten computergestützte Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Systeme wie zum Beispiel das EURO-pattern System® der Firma EUROIMMUN schaffen. Hierbei werden Immunfluoreszenzfärbungen vollautomatisiert analysiert und ausgewertet, was zu einer deutlichen Verbesserung der Validität eines Befundes führt [134].

Neben computergestützten Mikroskopie-Systemen, hätte, beispielsweise eine synchrone Analyse der Proben mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, die Aussagekraft der Studie deutlich erhöht. Mithilfe Fluoreszenz basierter Durchflusszytometrie, werden Zellantigene anhand von fluoreszierenden Antikörpern vollautomatisiert, mittels Laser, zur Emission von spezifischen Lichtsignalen angeregt und somit detektiert und analysiert [135].

Molekularbiologische Nachweismethoden, basierend auf der Darstellung von bestimmten DNA- oder RNA-Sequenzen einer Zelle, wie quantitative PCR oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wären weitere, potentielle Vergleichsmethoden zur hier durchgeführten Untersuchung. Die quantitative Real-Time-PCR beispielsweise, beruht auf dem Nachweis einer Amplifizierung bestimmter Genexpressionsmuster, sogenannter Markergene, in abgesiedelten Brustkrebszellen. Ein Nachteil molekularer Nachweismethoden wie der quantitativen PCR ist, dass sich hiermit nur eine Amplifizierung bestimmter Gensequenzen nachweisen lässt. Eine Aussage über die tatsächlich stattfindende Translation und die damit entstehenden Proteine in einer Zelle kann jedoch nicht getroffen werden [136, 137].

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, existiert das, in der metastasierten Situation, zur Detektion von CTCs FDA-zertifizierte und kommerziell vertriebene CellSearch® System. Hierbei werden Tumorzellen zunächst über einen Antikörper gegen das Epithelial Cellular Adhesion Molecule (EpCAM) immunomagnetisch von den übrigen

Zellen des Blutes separiert. Im Anschluss werden eine Zellkernfärbung mittels DAPI und Immunfluoreszenzfärbungen gegen CK 8,18,19 und CD 45 durchgeführt. Durch den CellTracks Analyzer II® werden schließlich DAPI positive, CK 8,18,19 positive und CD 45 negative Zellen automatisiert detektiert und als Tumorzellen eingeordnet [92, 138]. Eine synchrone Analyse der Proben mit diesem, industriell vertriebenen System, wäre ein höchst interessanter Ansatz, um die hier erhobenen Daten zu verifizieren.

Ein weiterer, möglicher Aspekt um die Aussagekraft dieser Arbeit zu erhöhen, wären zusätzliche Schritte zur Anreicherung potentieller DTCs gewesen. Mittels Dichtegradienten-Separation (Ficoll-Paque Plus Lösung) wurden in dieser Studie die kernhaltigen Zellen der Knochenmarksaspirate von den restlichen Blutbestandteilen separiert. Dies entspricht einem ersten Anreicherungsschritt, jedoch hätte beispielsweise über eine magnetische Zellseparation oder Filterungssysteme entsprechend der Zellgröße, zur weiteren Vorselektion der Zellen nachgedacht werden können [91, 137].

Die aufgeführten Ergebnisse belegen, dass bei jeder, der 27 untersuchten Mammakarzinompatientinnen, Cytokeratin positive Zellen im Knochenmark nachweisbar waren. Literaturangaben beschreiben jedoch lediglich im Schnitt in ca. 30% aller Brustkrebsfälle den Nachweis von Tumorzellen in Knochenmarksproben [139]. Diese auffällige Abweichung erklärt sich unter Umständen durch Detektion und Wertung falsch positiver Zellen. Wie in der Einleitung dargestellt, werden auch in einschlägiger Literatur, immer wieder falsch positive Ergebnisse durch Expression von Cytokeratinen im Blut oder Knochenmark gesunder Probanden beschrieben. Als mögliche Ursachen werden benigne Erkrankungen der Mamma oder der Ovarien, hämatologische Erkrankungen, die Amplifikation von Pseudogenen in PCR Studien oder Kontamination der Proben bei der Hautpunktion genannt [91, 125, 126]. Dieser Kritikpunkt der Studie, sollte in einem möglichen Folgeprojekt dieser Arbeit, mit zusätzlichen Antikörperfärbungen oder durch Ausweitung der Studie auf ein größeres und damit vielfältigeres Patientenkollektiv näher untersucht werden.

#### **4.2. Knochenmarksaspirate bei Mammakarzinompatientinnen – eine sinnvolle Untersuchung?**

Anlass zur kritischen Betrachtung gibt sicherlich die durchaus aufwändige und für die Patientinnen sehr schmerzhaft gewinnung von Knochenmarksaspiraten zur Detektion und Untersuchung der DTCs.

Es handelt sich zwar hierbei nicht um eine für die Patientin ausgesprochen gefährliche Prozedur. Routinemäßige Knochenmarkspunktionen werden bei allen hämatoonkologisch erkrankten Patienten durchgeführt. Dennoch ist es ein invasiver Eingriff, verbunden mit gewissen Risiken, der von den Patientinnen als unangenehm empfunden wird, falls die Punktion nicht unter Narkose erfolgt. Die Punktion unter Vollnarkose ließ sich im Falle dieser Studie während des Primäreingriffes gut realisieren, wäre jedoch ohne gleichzeitigen operativen Eingriff nicht zu rechtfertigen gewesen. Bain B. J. verfolgte über einen Zeitraum von drei Jahren das Auftreten von Komplikationen nach Knochenmarkspunktionen und Knochenmarksstanzen in Großbritannien. Seinen Ergebnissen zufolge, ist die Wahrscheinlichkeit von Komplikationen relativ gering. Dennoch sind seiner Einschätzung nach potenzielle Komplikationen nicht zu unterschätzen. Die am häufigsten beobachtete Komplikation sind Nachblutungen. Außerdem kann es vereinzelt zu Infektionen und persistierenden Schmerzen im Anschluss an den Eingriff kommen [140].

Deutlich leichter zugänglich ist dagegen das periphere Blut und die hier mögliche Detektion von CTCs. Hierbei genügt die Entnahme von je 20 ml Blut in EDTA Röhren aus einer peripheren Vene zur weiteren Aufbereitung und Untersuchung [141].

Es handelt sich hierbei sicherlich nicht um den ausschlaggebenden Aspekt, dennoch sollte auch dieser Gesichtspunkt in die Gesamtbewertung der Studie mit einfließen.

#### **4.3. Tn-Antigen und 9-O-Acetyl-GD3 – neue Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen?**

Ein etablierter Tumormarker oder auch ein aussagekräftiger Prognosefaktor, zeichnet sich stets durch eine hohe Sensitivität und eine hohe Spezifität aus [142]. Im Idealfall sollte ein im Alltag gut verwertbarer Marker leicht zugänglich und stets verlässlich bestimmbar sein. Ein zum Ziel dieser Arbeit gesetzter Endpunkt war die Fragestellung ob Tn-Antigen oder 9-O-Acetyl-GD3 als neue Marker zur Detektion und

Charakterisierung disseminierter Tumorzellen in Frage kommen. Wie viele Quellen belegen, ist Tn-Antigen eine Oberflächenglykosilierung, welche in gesunden Zellen des Körpers nicht exprimiert wird [106, 107]. Diese Tatsache konnte durch ein fehlendes Leuchtsignal auf ausschließlich mit Leukozyten versetzten Negativproben bestätigt werden. 9-O-Acetyl-GD3 wies eine etwas geringere Spezifität auf. Es wurde eine positive Leuchtreaktion auf CD68 positiven Zelllinien detektiert. CD68 positive Zellen gehören zur Familie der Leukozyten, genauer zur Zelllinie der Makrophagen [143]. Die exakte Spezifität beider Antigene kann auf diese Weise natürlich nur bedingt bestimmt werden, da mit Negativproben - bestehend aus Leukozyten - selbstverständlich nicht annähernd das gesamte Spektrum an Gewebe und Zellarten des Körpers abgedeckt werden kann.

Nach Auswertung der Färbungen der Knochenmarksaspirate der Mammakarzinompatientinnen, konnte bei 47,3 % aller Tumorzellen eine positive Antikörperreaktion für das Tn-Antigen detektiert werden. In den 9-O-Acetyl-GD3 Färbungen wiesen 52,6% der Tumorzellen eine CK und 9-O-Acetyl-GD3 Positivität auf. Dies entspricht im Falle der Tn-Färbung einer Sensitivität von weniger als der Hälfte und im Hinblick auf 9-O-Acetyl-GD3 knapp der Hälfte aller insgesamt detektierten Tumorzellen. Dies beweist, dass sowohl Tn-Antigen, als auch 9-O-Acetyl-GD3 eine deutlich geringere Sensitivität zur Detektion von DTCs als Pan-CK aufweisen. Die Sensitivität von Pan-CK kann jedoch mittels der hier durchgeführten Methodik nur bedingt überprüft und bestätigt werden. Objektträger, versehen mit ausschließlich Tumorzellen der Zelllinien MCF-7, ZR-75-1 und CAMA-1, zeigten zwar ein fast durchgehend positives Leuchtsignal für Pan-CK, dennoch kann die Sensitivität des Markers in den durchgeführten Färbungen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark hier nicht sicher validiert werden. Basierend auf Literaturangaben werden Cytokeratine als sehr verlässliche Tumormarker eingeordnet [125]. Dennoch spielt auch im Hinblick auf die Expression von Cytokeratinen das Modell der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) und damit gegebenenfalls ein Verlust von epithelialen Merkmalen eine zentrale Rolle. Noch ist nicht gänzlich geklärt, ob bei der Verwendung von Cytokeratinen als Tumormarker eine gewisse Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen übersehen werden könnte. Einigkeit herrscht jedoch in einschlägiger Fachliteratur über die Tatsache, dass die Sensitivität des Markers umso höher ist, je mehr Cytokertine gleichzeitig mit einem Antikörper untersucht werden [124, 128].

Aufgrund der in dieser Studie gemachten Beobachtungen, kann die Hypothese, Tn-Antigen bzw. 9-O-Acetyl wären als Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen dem etablierten Marker Cytokeratin 8,18,19 gleichzusetzen, nicht bestätigt werden. Die Aspekte der leichten Probengewinnung und der verlässlichen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden bereits oben diskutiert.

#### **4.4. Tn-Antigen und 9-O-Acetyl-GD3 – Marker für eine spezielle Tumorbilogie?**

Von besonderem Interesse ist die Frage, ob vermehrte Tn-Antigen- oder 9-O-Acetyl-GD3-Positivität mit einer bestimmten Entität von Tumoren assoziiert ist. Hierzu wurden statistische Analysen durchgeführt und folgende Beobachtungen gemacht.

Als erster Aspekt wurde der Menopausenstatus näher untersucht. Die Ergebnisse zeigten bei der absoluten Anzahl aller Pan-CK positiven Zellen mehr Tumorzellen bei den postmenopausalen als bei den prämenopausalen Patientinnen. Durchweg findet sich in der Literatur keine definitive Aussage bezüglich der Prognose prä-/perimenopausaler gegenüber postmenopausaler Mammakarzinomfälle. Selbstverständlich weisen ältere, postmenopausale Patientinnen mit höherer Wahrscheinlichkeit Komorbiditäten und somit eine Schwäche der immunen Abwehr auf, was als Erklärungsansatz für die insgesamt leicht höhere Zahl an Tumorzellen in der Gruppe der postmenopausalen Tumorpatientinnen dienen könnte [46]. Der durchschnittliche Anteil der Tn-Antigen positiven Zellen an den Pan-CK positiven Zellen war postmenopausal höher als prämenopausal. Dies spricht für eine vermehrte Expression von Tn-Antigen in der Postmenopause. Schenkt man der Expression von 9-O-Acetyl-GD3 nähere Betrachtung, so verhält sich der Anteil der 9-O-Acetyl-GD3 positiven an den Pan-CK positiven Tumorzellen genau anders herum. Hier findet eine angedeutete Herabregulation in der Postmenopause statt. Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht ermittelt werden.

Im Hinblick auf das T-Stadium gibt es unterschiedliche Angaben in der Literatur, bezüglich der Expression von Tn-Antigen auf Mammakarzinomzellen. Eine Studie berichtet von einer beobachteten Herabregulation der Expression in den fortgeschrittenen T-Stadien [112]. Eine andere Quelle beschreibt jedoch eine vermehrte Expression von Tn-Antigen in den größeren Tumorstadien [111]. Die Ergebnisse des Anteils der detektierten Tn-Antigen positiven Zellen in der hier

durchgeführten Studie entsprechen der Annahme einer vermehrten Expression in höheren T-Stadien. Der durchschnittliche Anteil an Tn-Antigen positiven Zellen in den T1 Präparaten war leicht geringer als in den T2-T4 Tumoren, was eine erhöhte Expression von Tn-Antigen in höheren Tumorstadien anzeigt. Leider wird dieser Unterschied nicht durch eine statistische Signifikanz unterstrichen.

Nach Analyse der 9-O-Acetyl-GD3 Färbungen stellte sich im Durchschnitt ein höherer Anteil der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen in der Gruppe der T1 Stadien, als in der Gruppe der T2-T4 Stadien dar. Auch dieser Unterschied zeigte sich nicht signifikant. Zusätzlich zeigen die Daten in beiden Gruppen eine enorm hohe Standardabweichung und somit eine große Streubreite. Zum Zusammenhang zwischen der Expression von 9-O-Acetyl-GD3 und der Tumorgroße finden sich keine Angaben in der Literatur, welche diesbezüglich zum Vergleich herangezogen werden könnten.

Ein zweifellos wichtiger Prognosefaktor des Mammakarzinoms ist der Nodalstatus der Patientinnen [51]. Nach bisherigem Stand der Forschung ist ein hohes Maß an Tn-Antigen positiven Zellen mit einer Lymphknoten Metastasierung des Mammakarzinoms assoziiert [113, 114]. Wider Erwarten zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse jedoch im Schnitt einen deutlich höheren Anteil an Tn-Antigen positiven Tumorzellen in der Gruppe der N0 Tumorstadien, als in der N1/N2 Gruppe. Diese Aussage konnte durch eine hohe statistische Signifikanz im nicht-parametrischen Test unterstrichen werden.

In gleicher Weise verhielt sich der Anteil an 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen. Auch hier war ein höherer Anteil an doppelt positiven Zellen in der Gruppe der nodal negativen (N0) Tumoren zu finden. Es lag jedoch keine statistische Signifikanz vor.

Die überwiegende Mehrheit der Probandinnen zeigte ein M0 oder Mx Stadium und lediglich eine Patientin wies, zum Zeitpunkt der Probengewinnung, eine Fernmetastasierung auf. Auffällig ist, dass bei der einzig sicher metastasierten Patientin extrem viele Tumorzellen im Knochenmark detektiert werden konnten. Hier ist es jedoch unerlässlich die Studie erneut mit einem größeren Kollektiv an Patientinnen im M1-Stadium durchzuführen. Um die Wertigkeit der Expression von Tn-Antigen oder 9-O-Acetyl-GD3 als prognostischen Marker in Bezug auf eine im weiteren Krankheitsverlauf auftretende Metastasierung zu beurteilen, wäre eine Langzeitstudie oder eine Follow-up Studie von zentraler Bedeutung.

In vorangegangenen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Tn-Positivität und gering differenzierten Tumorentitäten (G3) dargestellt [111]. Diese Tatsache ließ sich

auch in den hier ermittelten Ergebnissen bestätigen. Es konnten, anteilig an den Pan-CK positiven Zellen, mehr Tn-Antigen positive Zellen in jenen Knochenmarksaspiraten mit einem G3 Primärtumor, als in den G1/G2 Proben nachgewiesen werden. Der Unterschied war nicht signifikant. Dies bestätigt im Ansatz die Theorie, dass eine vermehrte Expression von Tn-Antigen im Zusammenhang mit ausgesprochen schnell und aggressiv wachsenden Tumoren vorkommt.

Gocht et al. berichten von einer Herabregulation der 9-O-Acetyl-GD3 Expression in stark entdifferenzierten Mammakarzinomen (G3 Karzinome) [116]. Diese These konnte auch hier weiter gefestigt werden. In den durchgeführten Färbungen war im Schnitt der Anteil an doppelt 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen in der Gruppe der G3 Tumoren geringer als in der G1/G2 Tumor Untergruppe. Jedoch zeigte sich auch hier keine statistische Signifikanz.

Nach Einteilung der untersuchten Proben in deutlich Progesteronrezeptor positive (>10%) und jene mit geringfügigerer Expression des Progesteronrezeptors, zeigte sowohl Tn-Antigen, als auch 9-O-Acetyl-GD3 eine höhere Expression in den deutlich Hormonrezeptor positiven Proben. Da bereits seit vielen Jahren eine antihormonelle Therapie eingesetzt wird, lässt sich der alleinige prognostische Wert der Expression von Hormonrezeptoren, anhand von neueren Daten, nur noch schwer bestimmen. Dennoch weisen Hormonrezeptor positive Tumoren, rein basierend auf der Tumorbilogie, ohne hierbei den Einfluss der antihormonellen Therapie auf den Krankheitsverlauf zu betrachten, ein etwas besseres Outcome auf, als Hormonrezeptor negative Mammakarzinome [54, 58]. Bezüglich der Expression von Tn-Antigen und 9-O-Acetyl-GD3 auf Hormonrezeptor positiven oder negativen Tumoren, finden sich keine Angaben in der Literatur. Die hier vorliegenden Daten deuten jedoch auf eine vermehrte Expression beider Antigene auf Hormonrezeptor positiven Tumoren und somit eher weniger aggressiv verlaufenden Mammakarzinomen hin.

Sowohl bei den Tn-Färbungen, als auch bei den 9-O-Acetyl-GD3-Präparaten, wurden bei Her2/neu positiven Proben ein höherer Anteil von Tn-Antigen, bzw. 9-O-Acetyl-GD3 an Pan-CK positiven Tumorzellen gefunden, als bei Her2/neu negativen Knochenmarksaspiraten. Ein signifikanter Unterschied besteht nicht. Her2/neu positive Mammakarzinome gelten als besonders aggressiv und schnell progressiv verlaufende Tumorentitäten [60].

Aufgrund der hier dargelegten Endpunkte, kann die in der Literatur beschriebene Aussage, die Expression von Tn-Antigen sei signifikant höher beim Vorliegen von Lymphknotenmetastasen nicht bestätigt werden. Die hier durchgeführte Studie zeigte, dass hoch signifikant weniger Tn-Antigen positive Zellen in den Proben mit positivem Lymphknotenbefall, als in den pN0 Proben zu detektieren waren.

Die Hypothese, die Tn-Antigen Expression sei signifikant höher bei gering differenzierten (G3) Karzinomen, kann so nicht eindeutig verifiziert werden. Absolut ist der Anteil an Tn-Antigen positiven Zellen in der Gruppe der G3 Karzinome versus der G1/G2 Karzinome zwar höher, jedoch kann das Ergebnis nicht durch eine statistische Signifikanz unterstrichen werden.

Die Hypothese, es gäbe eine relevante Herabregulation der Expression von 9-O-Acetyl-GD3 in stark entdifferenzierten (G3) Karzinomen, kann leider nicht durch ein signifikantes Ergebnis belegt werden. Auch hier konnte eine Tendenz mittels eines geringeren Anteils an 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen in der Gruppe der gering differenzierten Karzinome ermittelt werden, jedoch war auch dieses Ergebnis nicht statistisch signifikant.



**Kapitel 5:**  
**Zusammenfassung**

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie thematisiert ein Feld der Onkologie von enormer Brisanz und gesellschaftlicher Bedeutung. Das Mammakarzinom, das häufigste Malignom der Frau, spielt eine herausragende Rolle unter den gynäkologischen Tumoren. Angefangen von Screening, Diagnostik, Prognosekriterien über Therapie bis hin zur Nachsorge. Jeder Aspekt dieser Erkrankung unterliegt einem steten wissenschaftlichen und klinischen Wandel und Fortschritt. Das Ziel dieser Bestrebungen ist, die stetige Verbesserung der individuellen Prognose und Überlebenschancen aller Mammakarzinompatientinnen zu erreichen.

Der Ansatz und der Grundgedanke der näheren Charakterisierung und somit Individualisierung einzelner Tumorerkrankungen, ist von immenser aktueller Bedeutung, in weitestgehend jedem Fachbereich der Onkologie [144]. Die moderne Krebstherapie wird sich immer weiter von pauschalen Chemotherapeutika und allgemein angewandten Therapiemaßnahmen entfernen und sich hin zu, auf den einzelnen Patienten bezogenen Therapieansätzen, entwickeln - zugeschnitten auf seine ganz individuelle Tumorbilologie. Hiervon erhofft man sich deutlich höhere Ansprechraten und somit höhere Heilungschancen, sowie signifikant geringere Nebenwirkungen [145].

In der Therapie des Mammakarzinoms haben sich bereits zahlreiche Charakterisierungen der einzelnen Tumorentitäten, wie zum Beispiel die routinemäßige Bestimmung der Hormonrezeptoren oder des Her2/neu Status, über Jahre bewährt und etabliert. Hierdurch kann nicht nur eine konkrete Aussage bezüglich der Prognose einer Mammakarzinomkrankung gemacht werden, sondern es lässt sich eine, ideal auf die Patientin zugeschnittene, Therapie ableiten.

Die hier vorliegende Studie hatte zum Ziel neue potentielle Marker und somit Charakteristika disseminierter Tumorzellen zu detektieren und auf ihre Relevanz zu überprüfen.

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit hat sowohl Stärken als auch Schwächen aufzuweisen. Als Stärke ist die kostengünstige und schnell durchführbare Methode der Immunfluoreszenzfärbung anzubringen, die jedoch auch einer gewissen Subjektivität der Beurteilung unterliegt und somit die vorliegenden Ergebnisse nur eingeschränkt valide reproduzierbar macht. Leider liegt mit 27 angefärbten Proben nur ein sehr

geringes Kollektiv an Proben vor, was die Bedeutung der statistischen Auswertung und die Wahrscheinlichkeit statistisch signifikanter Ergebnisse erheblich schmälert.

Als standardisierte Marker haben sowohl Tn-Antigen als auch 9-O-Acetyl-GD3, mit einer im Gesamten doch relativ geringen Sensitivität, gewisse Lücken aufzuweisen. Vielversprechende Aspekte liefert hingegen eine, durch beide Antigene mögliche, detailliertere Charakterisierung detektierter Tumorzellen im Hinblick auf den Krankheitsverlauf, die Aggressivität und die Prognose einer Tumorerkrankung.

Beispielsweise konnten sowohl in den Tn-Antigen- als auch in den 9-O-Acetyl-GD3-Färbungen, die in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster, bei unterschiedlich gut differenzierten Tumoren im Ansatz bestätigt werden. Hier wurden keine signifikanten Ergebnisse erzielt, dennoch konnte eine Tendenz der Expression abgebildet werden. Die Tatsache, dass die Expression von Tn-Antigen signifikant geringer ist in den N1/2 Stadien als in den N0 Tumorstadien, deckt sich nicht mit den in Quellen beschriebenen Beobachtungen und belegt somit den Bedarf an weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

Hier wurden im kleineren Ausmaß Untersuchungen angestellt. Im nächsten Ansatz sollte die Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs, ein Vergleich der Ergebnisse mit unterschiedlichen Detektionsmethoden und die Ausweitung auf weitere potentielle Oberflächenmarker im Fokus stehen.

Wie anhand dieser Arbeit deutlich wird, bietet dieses Feld der Krebsforschung enormes Potential für eine immer spezialisiertere und genau auf jede Tumorentität angepasste Diagnostik und Therapie. Das langfristige Ziel dieser Forschungsbestrebungen ist, die Therapie von Mammakarzinomerkrankungen zu revolutionieren und somit die Lebenserwartung von, an dieser folgenschweren Tumorerkrankung leidenden Frauen, erheblich zu verbessern.

**Kapitel 6:**  
**Abkürzungsverzeichnis**

## 6. Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Radiology
BET	Brusterhaltende Therapie
BIRADS	Breast Imaging Reporting and Data System
BMI	Body Mass Index
BRCA	BReast Cancer gene
BSA	Bovine serum albumin
CAMA-1	
CD45/68	Cluster of Differentiation 45/68
CK	Cytokeratin
CT	Computertomographie
CTC	Circulating tumor cells
Cy3	Cyanine 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCIS	Duktales Carcinoma In Situ
DTC	Disseminated tumor cells
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EpCam	Epithelial Cellular Adhesion Molecule
ER	Estrogenreceptor
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GD3	Ganglioside precursor disialohematoside
Her2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HPF	High Power Field
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Ipsilat.	ipsilateral
k.A.	Keine Angabe
LCIS	Lobular Carcinoma In Situ
LK-Met.	Lymphknotenmetastasen

## Abkürzungsverzeichnis

---

LMU	Ludwig Maximilians Universität
Mamma-CA	Mammakarzinom
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7 (Brustkrebszelllinie)
MTE	Mamma-Tumor Exstirpation
NOS	Infiltrating Carcinoma Not Otherwise Specified
NST	Infiltrating Carcinoma of No Special Type
Pan-CK	Pan-Cytokeratine (Cytokeratin 8,18,19)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PR	Progesteronrezeptor
RT(Zentrifugation)	Room Temperature
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
TDLE	Terminale dukto-lobuläre Einheit
Tn	Thomsen nouvelle
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
ZR-75-1	
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate

**Kapitel 7:**  
**Tabellen- und Abbildungsverzeichnis**

## 7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Mamma rechts, Häufigkeitsverteilung Mammakarzinome

Zeichnung hergestellt mit Adobe Illustrator CC 2017

Vorlage: Janni, W.R., D.; Rack, B., Facharzt Gynäkologie - Mammaerkrankungen. Vol. 1. Auflage 2008, Elsevier, Urban & Fischer.

Seite 4

**Tabelle 1:** Kriterien des Gradings für das Mammakarzinom

Quelle: Elston, C. W. & Ellis, I. O. *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.* *Histopathology* 19, 403-410 (1991).

Seite 5

**Tabelle 2:** TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

Quelle: Wittekind, C. M., HJ. . *TNM Klassifikation maligner Tumoren -UICC.* Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 7. Auflage, S169-179 (2010).

Seite 6

**Tabelle 3:** BIRADS ® Klassifikation

Quelle: Sickles, E., D'Orsi CJ, Bassett LW, et al.. *ACR BI-RADS® Mammography.* In: *ACR BI-RADS® Atlas, Breast Imaging Reporting and Data System.* Reston, VA, American College of Radiology; 2013.

Seite 7

**Abbildung 2:** Schema zirkulierender und disseminierter Tumorzellen

Zeichnung hergestellt mit Adobe Illustrator CC 2017

Vorlagen: - Franken, B., et al., *Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer.* *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(5): p. R133.;

- Riethdorf, S. and K. Pantel, *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**(2): p. 140-8.;

- Braun, S. and B. Naume, *Circulating and Disseminated Tumor Cells.* *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(8): p. 1623-1626

Seite 18

**Abbildung 3:** Tumorantigene

Zeichnung hergestellt mit Adobe Illustrator CC 2017

Vorlage: Zarour HM, D.A., Finn OJ, et al. , *Categories of Tumor Antigens.* In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine.* Hamilton (ON): BC Decker, 2003. 6th edition.

Seite 21

**Abbildung 4:** N-Glykosylierung

Zeichnung hergestellt mit Adobe Illustrator CC 2017

Vorlagen: - Boujard, D., et al., *Zellkompartimente und Proteintargeting, in Zell- und Molekularbiologie im Überblick.* 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 189-212.

- Rassow, J.H., K.; Netzker, R.; Deutzmann, R., *Biochemie - Duale Reihe* Vol. 2. Auflage. 2008.

Seite 22



**Tabelle 4:** Verdünnungsverhältnisse der Antikörper  
Seite 31

**Abbildung 5:** Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung  
*Zeichnung hergestellt mit Adobe Illustrator CC 2017*  
*Vorlage: Volgger, M.M., Lichtmikroskopie Theorie und Anwendung - Universität Wien*  
*Einrichtung Cell Imaging und Ultrastrukturforschung Arbeitsgruppe Zellphysiologie und*  
*wissenschaftlicher Film. 2008.*  
Seite 34

**Tabelle 5:** Chemikalien  
Seite 38 - 39

**Tabelle 6:** Verbrauchsmaterialien  
Seite 39 - 40

**Tabelle 7:** Geräte  
Seite 40 - 41

**Abbildung 6:** Immunfluoreszenzfärbung, Positiv-Kontrolle des panCytokeratin Antikörpers anhand von MCF-7, ZR-75-1, CAMA-1 Zellen; DAPI blau, panCK orange; *Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20*  
Seite 44

**Abbildung 7:** Immunfluoreszenzfärbung; Positiv-Kontrolle des Tn-Antigen Antikörpers anhand von MCF-7, ZR-75-1, CAMA-1 Zellen; DAPI blau, panCK grün, Tn-Antigen orange; *Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20*  
Seite 45

**Abbildung 8:** Immunfluoreszenzfärbung; Positiv-Kontrolle des 9-O-Acetyl-GD3 Antikörpers anhand von MCF-7, ZR-75-1, CAMA-1 Zellen; DAPI blau, panCK grün, 9-O-Acetyl-GD3 orange; *Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20*  
Seite 46

**Abbildung 9:** Immunfluoreszenzfärbung; Negativ-Kontrolle des Tn-Antigen Antikörpers anhand von Leukozyten; leuchtendes Artefakt im FITC und Cy3 Kanal; DAPI blau, panCK grün, Tn-Antigen orange; *Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20*  
Seite 47

**Abbildung 10:** Immunfluoreszenzfärbung; Negativ-Kontrolle des 9-O-Acetyl-GD3 Antikörpers anhand von Leukozyten; DAPI blau, panCK grün, 9-O-Acetyl-GD3 orange; *Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20*  
Seite 48

**Abbildung 11:** Leukozytenfärbung mit CD68 und 9-O-Acetyl-GD3 Antikörpern; leichte Verunreinigung durch Hintergrundsignal; DAPI blau, 9-O-Acetyl-GD3 grün, CD-68 orange; *Objektiv: PH2 Plan Neofluar 20x/0,50, Okular: 10x/20*  
Seite 49

**Abbildung 12:** Beispiel Tumorzelle in Knochenmarksaspirat; panCK positiv, Tn-Antigen negativ; DAPI blau, panCK orange, Tn-Antigen grün; *Objektiv: PH2 Plan Neofluar 40x/0,75, Okular: 10x/20*  
Seite 51

**Abbildung 13:** Beispiel Tumorzelle in Knochenmarksaspirat; panCK positiv, Tn-Antigen positiv; zentral Artefakt durch Verunreinigung; DAPI blau, panCK orange, Tn-Antigen grün; *Objektiv: PH2 Plan Neofluar 40x/0,75, Okular: 10x/20*  
Seite 52

**Abbildung 14:** Beispiel Tumorzelle in Knochenmarksaspirat; panCK positiv, 9-O-Acetyl-GD3 negativ; DAPI blau, panCK orange, 9-O-Acetyl-GD3 grün; *Objektiv: PH2 Plan Neofluar 40x/0,75, Okular: 10x/20*  
Seite 53

**Abbildung 15:** Beispiel Tumorzelle in Knochenmarksaspirat; panCK positiv, 9-O-Acetyl-GD3 positiv; DAPI blau, panCK orange, 9-O-Acetyl-GD3 grün; *Objektiv: PH2 Plan Neofluar 40x/0,75, Okular: 10x/20*  
Seite 54

**Abbildung 16:** Altersverteilung der teilnehmenden Patientinnen  
Seite 55

**Abbildung 17:** Tumorstadien der Tumoren der teilnehmenden Patientinnen  
Seite 56

**Abbildung 18:** Grading der Tumoren der teilnehmenden Patientinnen  
Seite 57

**Tabelle 8:** Daten der teilnehmenden Patientinnen (k.A. = keine Angabe)  
Seite 58

**Tabelle 9:** Ergebnisse der Doppelfärbungen im Detail  
Seite 59

**Abbildung 19:** Anteil Tn-Antigen positiver Zellen  
Seite 60

**Abbildung 20:** Anteil 9-O-Acetyl-GD3 positiver Zellen  
Seite 61

**Abbildung 21:** Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der prä-/perimenopausalen vs. postmenopausalen Patientinnen; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 63

**Abbildung 22:** Darstellung des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der prä-/perimenopausalen vs. postmenopausalen Patientinnen; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 63

**Abbildung 23:** Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der T1 Tumoren vs. T2-T4 Tumoren; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 64

**Abbildung 24:** Darstellung des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der T1 Tumoren vs. T2-T4 Tumoren; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 65

**Abbildung 25:** Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der N0 Stadien vs. N1/N2 Tumorstadien; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 66

**Abbildung 26:** Darstellung des Anteils der doppelt 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der N0 Stadien vs. N1/N2 Tumorstadien; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 66

**Abbildung 27:** Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der G1/2 Stadien vs. G3 Tumorentitäten; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 68

**Abbildung 28:** Darstellung des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der G1/2 Stadien vs. G3 Tumorentitäten; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 68

**Abbildung 29:** Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der Tumoren mit  $PR \leq 10\%$  vs.  $PR > 10\%$ ; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 69

**Abbildung 30:** Darstellung des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der Tumoren mit  $PR \leq 10\%$  vs.  $PR > 10\%$ ; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 70

**Abbildung 31:** Darstellung des Anteils der Tn-Antigen positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der Tumoren mit Her2/neu positiven vs. Her2/neu negativen Tumoren; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 71

**Abbildung 32:** Darstellung des Anteils der 9-O-Acetyl-GD3 positiven Zellen an den mittels panCK detektierten Tumorzellen in der Gruppe der Tumoren mit Her2/neu positiven vs. Her2/neu negativen Tumoren; Darstellung von Minimum, Maximum, unteres Quartil, oberes Quartil und Median  
Seite 71

**Kapitel 8:**  
**Literaturverzeichnis**

## 8. Literaturverzeichnis

1. (Hrsg)., R.K.-I.H.u.d.G.d.e.K.i.D.e.V., *Krebs in Deutschland 2011/2012*. Berlin, 2015. **10. Ausgabe**.
2. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
3. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011. **61**(2): p. 69-90.
4. Esserman L, J.B., Gralow J, *Clinical features, diagnosis, and staging of newly diagnosed breast cancer*. UpToDate.
5. AGO. *Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer - Breast Committee, 2015*.
6. Antoniou, A.C., et al., *Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies*. J Med Genet, 2005. **42**(7): p. 602-3.
7. Brekelmans, C.T.M., et al., *Tumour characteristics, survival and prognostic factors of hereditary breast cancer from BRCA2-, BRCA1- and non-BRCA1/2 families as compared to sporadic breast cancer cases*. European Journal of Cancer. **43**(5): p. 867-876.
8. *Deutsches Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs - Indikatoren für einen Gentest; [www.konsortium-familiaerer-brustkrebs.de/informationen/gentest-einschlusskriterien](http://www.konsortium-familiaerer-brustkrebs.de/informationen/gentest-einschlusskriterien)*. [web page] 2017.
9. Meyer, M., et al., *Jahresbericht - Bevölkerungsbezogenes Krebsregister Bayern 2012*.
10. Glass, A.G., et al., *Breast Cancer Incidence, 1980–2006: Combined Roles of Menopausal Hormone Therapy, Screening Mammography, and Estrogen Receptor Status*. Journal of the National Cancer Institute, 2007. **99**(15): p. 1152-1161.
11. Böcker W, D.H., Heitz Ph, Höfler G, Kreipe H, Moch H, *Pathologie* Vol. 5. Auflage. Urban u Fischer, Elsevier.
12. Janni, W.R., D.; Rack, B. , *Facharzt Gynäkologie - Mammaerkrankungen*. Vol. 1. Auflage 2008, Elsevier, Urban & Fischer.
13. Bleiweiss I, C.A., *Pathology of breast cancer*. 2014 UpToDate.
14. Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M.J., *WHO Classification of Tumours*. Vol. 4. 2012.
15. Page, D.L., et al., *Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study*. Cancer, 1985. **55**(11): p. 2698-708.
16. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. **19**(5): p. 403-10.

17. Bloom, H.J. and W.W. Richardson, *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**(3): p. 359-77.
18. Wittekind, C.M., HJ. , *TNM Klassifikation maligner Tumoren -UICC*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim,, 2010. **7. Auflage**: p. S169-179.
19. Harris, G.C., et al., *Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2003. **27**(1): p. 11-5.
20. Rjosk-Dendorfer, D.D., O.; de Waal, J.C.; Heywang-Köbrunner, S.H.; Perlet, C., *Bildgebende und interventionelle Diagnostik*. Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 2015. **15. Auflage**
21. Weyerstahl T, S.M., *Gynäkologie und Geburtshilfe Thieme Verlag-Duale Reihe Vol. 4.Auflage*.
22. Sickles, E., D'Orsi CJ, Bassett LW, et al. , *ACR BI-RADS® Mammography. In: ACR BI-RADS® Atlas, Breast Imaging Reporting and Data System*. Reston, VA, American College of Radiology; 2013.
23. Venkataraman S, S.P., *Breast imaging for cancer screening: Mammography and ultrasonography*. UptoDate, 2014.
24. Esserman L, J.B., *Diagnostic evaluation of women with suspected breast cancer*. UptoDate, 2014.
25. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, D.K.e.V.u.D.K.e.V., *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Langversion 3.0, Aktualisierung 2012*.
26. Dian, D.A., C.; Bauerfeind, V.; von Bodungen, V. Fink, C et all, *Operative Therapie und Rekonstruktionsverfahren bei primärem Mammakarzinom Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 2015. 15. Auflage*.
27. Clarke, M., et al., *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2087-106.
28. Wolf, C.E., W; Rack, B.; Salat, C; Würstlein, R, *Primär systemische Therapie*. Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 2015. **15. Auflage**
29. *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
30. *Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials*. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Lancet, 1998. **352**(9132): p. 930-42.
31. Perez, E.A., et al., *Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31*. J Clin Oncol, 2011. **29**(25): p. 3366-73.

32. Gianni, L., et al., *Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2011. **12**(3): p. 236-44.
33. Harbeck, N.A.-F., V. ;Anthuber, C.; Braun, M.; Hasmülller, S. et all, *Adjuvante Systemtherapie*. Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 2015.
34. Clark, G.M., et al., *Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients*. J Clin Oncol, 1987. **5**(1): p. 55-61.
35. Galper, S., et al., *Prognosis after local recurrence after conservative surgery and radiation for early-stage breast cancer*. International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics. **61**(2): p. 348-357.
36. Schaffer, P.C., St.; Dian, D.; Himsl I.; Kolben, Th.; Perabo, M.; Riepl, M.; von Spiegel, F.; Winkler, C., *Behandlung des lokalen und regionären Tumorrezidivs*. Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 2015. **15. Auflage**.
37. D, H., *Systemic treatment for metastatic breast cancer: General principles*. UptoDate, 2014.
38. Ettl, J.A.-F., V; Vraun, M.; Harbeck, N.;Heinemann, V. et all, *Systemische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms* Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 2015.
39. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), D.K.e.V.D.u.D.K.D., *S3-Leitlinie Palliativmedizin für Patienten mit einer nicht heilbaren Krebserkrankung*. Kurzversion 1.0 – Mai 2015.
40. Hayes, D.F., I.C. Henderson, and C.L. Shapiro, *Treatment of metastatic breast cancer: present and future prospects*. Semin Oncol, 1995. **22**(2 Suppl 5): p. 5-19; discussion 19-21.
41. Butters, D.J., et al., *Addition of drug/s to a chemotherapy regimen for metastatic breast cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(11): p. Cd003368.
42. Carrick, S., et al., *Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(2): p. Cd003372.
43. Sommer H., E.J., Kolben T.,Wypior H., *Lokoregionäre Therapieoptionen bei Fernmetastasen*. Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 2015. **15. Auflage**.
44. S3-Leitlinie, *Psychoonkologische Diagnostik, Beratung und Behandlung von erwachsenen Krebspatienten*. Januar 2014 **Version 1.0**
45. Riedel, H.-H.G., K.; Jakob-Ertel, Ch.; Haidinger R., *Physikalisch-therapeutische Maßnahmen und Rehabilitation nach Brustkrebs inklusive Behandlung von Lymphödemen mit Rezeptierungshinweisn für Heil-und Hilfsmittel*. Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 2015. **15. Auflage**
46. Foukakis Th, B.J., *Prognostic and predictive factors in early, non-metastatic breast cancer*. 2014 UpToDate.
47. Fredholm, H., et al., *Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7695.

48. Anders, C.K., et al., *Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression*. J Clin Oncol, 2008. **26**(20): p. 3324-30.
49. Joensuu, H., et al., *Risk for distant recurrence of breast cancer detected by mammography screening or other methods*. Jama, 2004. **292**(9): p. 1064-73.
50. Shen, Y., et al., *Role of detection method in predicting breast cancer survival: analysis of randomized screening trials*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(16): p. 1195-203.
51. Carter, C.L., C. Allen, and D.E. Henson, *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases*. Cancer, 1989. **63**(1): p. 181-7.
52. Goldhirsch, A., et al., *Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005*. Ann Oncol, 2005. **16**(10): p. 1569-83.
53. Purdie, C.A., et al., *Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study*. Br J Cancer, 2014. **110**(3): p. 565-72.
54. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
55. Hammond, E.H., *Hormone receptors in breast cancer: Clinical utility and guideline recommendations to improve test accuracy*. UpToDate, 2014.
56. Davies, C., et al., *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 771-84.
57. Yamauchi H, H.D., *HER2 and predicting response to therapy in breast cancer*. UptoDate, 2014.
58. Rack, B.E., W.; Harbeck, S. et all, *Prognostische und prädiktive Faktoren*. Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 2015.
59. Saxena, R. and A. Dwivedi, *ErbB family receptor inhibitors as therapeutic agents in breast cancer: current status and future clinical perspective*. Med Res Rev, 2012. **32**(1): p. 166-215.
60. Holbro, T., G. Civenni, and N.E. Hynes, *The ErbB receptors and their role in cancer progression*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 99-110.
61. de Azambuja, E., et al., *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients*. Br J Cancer, 2007. **96**(10): p. 1504-13.
62. Badve, S., et al., *Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists*. Mod Pathol, 2011. **24**(2): p. 157-167.
63. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. Ann Oncol, 2011. **22**(8): p. 1736-47.



64. Martin, M., et al., *PAM50 proliferation score as a predictor of weekly paclitaxel benefit in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **138**(2): p. 457-66.
65. Paik, S., et al., *A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(27): p. 2817-2826.
66. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
67. Bednarz-Knoll, N., C. Alix-Panabieres, and K. Pantel, *Clinical relevance and biology of circulating tumor cells*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(6): p. 228.
68. Franken, B., et al., *Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(5): p. R133.
69. Ashworth, T., *A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death*. Aust Med J, 1869. **14**(3): p. 146-149.
70. Rack, B., et al., *Circulating Tumor Cells Predict Survival in Early Average-to-High Risk Breast Cancer Patients*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2014. **106**(5): p. dju066-dju066.
71. Lucci, A., et al., *Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study*. Lancet Oncol, 2012. **13**(7): p. 688-95.
72. Graves, H. and B.J. Czerniecki, *Circulating tumor cells in breast cancer patients: an evolving role in patient prognosis and disease progression*. Patholog Res Int, 2011. **2011**: p. 621090.
73. Bidard, F.C., et al., *Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data*. Lancet Oncol, 2014. **15**(4): p. 406-14.
74. Riethdorf, S. and K. Pantel, *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**(2): p. 140-8.
75. Bragado, P., et al., *Microenvironments dictating tumor cell dormancy*. Recent Results Cancer Res, 2012. **195**: p. 25-39.
76. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 448-56.
77. Andergassen, U., et al., *Detection of Circulating Tumour Cells from Blood of Breast Cancer Patients via RT-qPCR*. Cancers (Basel), 2013. **5**(4): p. 1212-20.
78. Ring, A., I.E. Smith, and M. Dowsett, *Circulating tumour cells in breast cancer*. Lancet Oncol, 2004. **5**(2): p. 79-88.
79. Braun, S. and B. Naume, *Circulating and Disseminated Tumor Cells*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(8): p. 1623-1626.
80. Pantel, K. and U. Woelfle, *Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors*. J Biol Regul Homeost Agents, 2004. **18**(2): p. 120-5.

81. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
82. Cabinakova, M., et al., *Predictive factors for the presence of tumor cells in bone marrow and peripheral blood in breast cancer patients*. Neoplasma, 2015. **62**(2): p. 259-68.
83. Janni, W., et al., *Persistence of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Breast Cancer Patients Predicts Increased Risk for Relapse—A European Pooled Analysis*. Clinical Cancer Research, 2011. **17**(9): p. 2967-2976.
84. Hartkopf, A.D., et al., *Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients &#x2013; Results from a large single-centre analysis*. European Journal of Cancer. **50**(15): p. 2550-2559.
85. Braun, S., et al., *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 793-802.
86. Tjensvoll, K., et al., *Persistent tumor cells in bone marrow of non-metastatic breast cancer patients after primary surgery are associated with inferior outcome*. BMC Cancer, 2012. **12**(1): p. 190.
87. Harris, L., et al., *American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(33): p. 5287-312.
88. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(5): p. 1786-1786.
89. Riethdorf, S.P., 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.
90. Magbanua, M.J.M., et al., *Approaches to isolation and molecular characterization of disseminated tumor cells*. Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 30715-29.
91. Lacroix, M., *Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(4): p. 1033-67.
92. *Veridex LLC Cell Search*. <http://www.cellsearchctc.com/>.
93. Swennenhuis, J.F., et al., *Improving the CellSearch® system*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2016. **16**(12): p. 1291-1305.
94. *AdnaTest - Detection of Circulating Tumor Cells; <http://www.adnagen.com>. 03-2017*].
95. Sequist, L.V., et al., *The CTC-Chip: An Exciting New Tool to Detect Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(3): p. 281-3.
96. Hyun, K.A., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(17): p. 24677-87.
97. Gerges, N., J. Rak, and N. Jabado, *New technologies for the detection of circulating tumour cells*. British Medical Bulletin, 2010. **94**(1): p. 49-64.

98. Parkinson, D.R., et al., *Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use*. Journal of Translational Medicine, 2012. **10**(1): p. 138.
99. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
100. Sledge, G.W., Jr. and K.D. Miller, *Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer*. Eur J Cancer, 2003. **39**(12): p. 1668-75.
101. Zarour HM, D.A., Finn OJ, et al. , *Categories of Tumor Antigens*. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. Hamilton (ON): BC Decker, 2003. **6th edition**. .
102. Hollingsworth, M.A. and B.J. Swanson, *Mucins in cancer: protection and control of the cell surface*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 45-60.
103. Boujard, D., et al., *Zellkompartimente und Proteintargeting*, in *Zell- und Molekularbiologie im Überblick*. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 189-212.
104. Rassow, J.H., K.; Netzker, R.; Deutzmann, R., *Biochemie - Duale Reihe* Vol. 2. Auflage. 2008.
105. Plattner, H.H., J., *Zellbiologie*. Thieme Verlag, 2011. **4. Auflage**.
106. Cazet, A., et al., *Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(3): p. 204.
107. Springer, G.F., *Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy*. J Mol Med (Berl), 1997. **75**(8): p. 594-602.
108. Springer, G.F., P.R. Desai, and E.F. Scanlon, *Blood group MN precursors as human breast carcinoma-associated antigens and "naturally" occurring human cytotoxins against them*. Cancer, 1976. **37**(1): p. 169-76.
109. Kolbl, A.C., et al., *The role of TF- and Tn-antigens in breast cancer metastasis*. Histol Histopathol, 2016. **31**(6): p. 613-21.
110. Springer, G.F., *T and Tn, general carcinoma autoantigens*. Science, 1984. **224**(4654): p. 1198-206.
111. Wang, B.-L., G.F. Springer, and S.C. Carlstedt, *Quantitative Computerized Image Analysis of Tn and T (Thomsen–Friedenreich) Epitopes in Prognostication of Human Breast Carcinoma*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1997. **45**(10): p. 1393-1400.
112. Kanska, G., et al., *Study of the expression of Tn antigen in different types of human breast cancer cells using VVA-B4 lectin*. Oncol Rep, 2006. **15**(2): p. 305-10.
113. Kawaguchi, T., et al., *Expression of Vicia villosa agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA?* Breast Cancer Res Treat, 2006. **98**(1): p. 31-43.
114. Danussi, C., et al., *A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction*. Glycobiology, 2009. **19**(10): p. 1056-67.

115. Löffler G., P.P., Heinrich P., *Biochemie und Pathobiochemie* Vol. 8. Auflage. 2007: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
116. Gocht, A., G. Rutter, and B. Kniep, *Changed expression of 9-O-acetyl GD3 (CDw60) in benign and atypical proliferative lesions and carcinomas of the human breast.* Histochem Cell Biol, 1998. **110**(3): p. 217-29.
117. Hakomori, S., *Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives.* Cancer Res, 1985. **45**(6): p. 2405-14.
118. Hakomori, S. and Y. Igarashi, *Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling.* J Biochem, 1995. **118**(6): p. 1091-103.
119. Marquina, G., et al., *Gangliosides Expressed in Human Breast Cancer.* Cancer Research, 1996. **56**(22): p. 5165-5171.
120. Buonaguro, L., et al., *Translating tumor antigens into cancer vaccines.* Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(1): p. 23-34.
121. Abd El-Rehim, D.M., et al., *Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma.* The Journal of Pathology, 2004. **203**(2): p. 661-671.
122. Barak, V., et al., *Clinical utility of cytokeratins as tumor markers.* Clinical Biochemistry, 2004. **37**(7): p. 529-540.
123. Bocker, W., *Preneoplasia of the breast.* Verh Dtsch Ges Pathol, 1997. **81**: p. 502-13.
124. Chu, P.G. and L.M. Weiss, *Keratin expression in human tissues and neoplasms.* Histopathology, 2002. **40**(5): p. 403-39.
125. Braun, S., et al., *Cytokeratin-Positive Cells in the Bone Marrow and Survival of Patients with Stage I, II, or III Breast Cancer.* New England Journal of Medicine, 2000. **342**(8): p. 525-533.
126. Zieglschmid, V., C. Hollmann, and O. Bocher, *Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood.* Crit Rev Clin Lab Sci, 2005. **42**(2): p. 155-96.
127. Braun, S., et al., *Re: Micrometastatic Breast Cancer Cells in Bone Marrow at Primary Surgery: Prognostic Value in Comparison With Nodal Status.* Journal of the National Cancer Institute, 1998. **90**(14): p. 1099-1100.
128. Joosse, S.A., et al., *Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells.* Clin Cancer Res, 2012. **18**.
129. Volgger, M.M., *Lichtmikroskopie Theorie und Anwendung - Universität Wien Einrichtung Cell Imaging und Ultrastrukturforschung Arbeitsgruppe Zellphysiologie und wissenschaftlicher Film.* 2008.
130. Pulford, K.A., et al., *Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen.* Int Immunol, 1990. **2**(10): p. 973-80.
131. Coons, A.H. and M.H. Kaplan, *Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.* J Exp Med, 1950. **91**(1): p. 1-13.

132. Coons, A.H., H.J. Creech, and R.N. Jones, *Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1941. **47**(2): p. 200-202.
133. Heesemann, J. and R. Laufs, *Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture*. Journal of Clinical Microbiology, 1985. **22**(2): p. 168-175.
134. EUROIMMUNBlog. <http://www.euroimmunblog.de/das-europattern-system-zur-computer-gestuetzten-immunfluoreszenz-mikroskopie/>. Juni 2017.
135. Herzenberg, L.A., R.G. Sweet, and L.A. Herzenberg, *Fluorescence-activated cell sorting*. Sci Am, 1976. **234**(3): p. 108-17.
136. Maier, T., M. Guell, and L. Serrano, *Correlation of mRNA and protein in complex biological samples*. FEBS Lett, 2009. **583**(24): p. 3966-73.
137. Schindlbeck, C., et al., *Disseminated and circulating tumor cells in bone marrow and blood of breast cancer patients: properties, enrichment, and potential targets*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(9): p. 1883-95.
138. NEUMAN, M.H.D.D.R.N., *Isolation und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen beim Mammakarzinom*. mgo-fachverlage, 2016. **03**.
139. Choessel, V., et al., *Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(5): p. R556-70.
140. Bain, B.J., *Bone marrow biopsy morbidity: review of 2003*. J Clin Pathol, 2005. **58**(4): p. 406-8.
141. Pantel, K. and C. Alix-Panabieres, *Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives*. Trends Mol Med, 2010. **16**(9): p. 398-406.
142. Motoo, Y., H. Watanabe, and N. Sawabu, *[Sensitivity and specificity of tumor markers in cancer diagnosis]*. Nihon Rinsho, 1996. **54**(6): p. 1587-91.
143. Micklem, K., et al., *A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies*. Br J Haematol, 1989. **73**(1): p. 6-11.
144. Nadal, R., et al., *Relevance of molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer in the era of targeted therapies*. Expert Rev Mol Diagn, 2013. **13**(3): p. 295-307.
145. Lehmann-Che, J., et al., *Cancer genomics guide clinical practice in personalized medicine*. Therapie, 2017.

**Kapitel 9:**  
**Ethikvotum**

## 9. Ethikvotum

17.Sep.2012 09:26 +089 5160 5192

Ethikkommission der LMU

#2467 P.001 /001



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission -Pettenkoferstr. 8 - 80336 München

Herrn  
Prof. Dr. Udo Jeschke  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde  
Maistr. 11  
80337 München

Vorsitzender:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Telefon+49 (0)89 5160 - 5191  
Telefax+49 (0)89 5160 - 5192  
Ethikkommission@  
med.uni-muenchen.de

[www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de](http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de)

Postanschrift:  
Pettenkoferstr. 8a  
D-80336 München

Hausanschrift:  
Pettenkoferstr. 8  
D-80336 München  
München, 10.05.2012 EM /sc

<b>Titel:</b>	<b>Krebsfrüherkennung bei gynäkologischen Tumoren</b>
<b>Antragsteller:</b>	<b>Prof. Dr. U. Jeschke, Dr. U. Andergassen</b>
<b>Projekt- Nr.</b>	<b>148-12</b>

Sehr geehrter Herr Kollege Jeschke,  
sehr geehrter Herr Kollege Andergassen,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 06.05.2012 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (EK- Antrag, Patienten- Information u. – Einverständniserklärung).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Vorsitzender der Ethikkommission

N/ Mitglieder der Ethikkommission

P.S.: Bitte beachten Sie die aktuellen Richtlinien für Anträge an die Ethikkommission.  
Internetadresse: [www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de](http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de)

Mitglieder der Kommission:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. G. Paumgartner (stellv. Vorsitzender), PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zach

**Kapitel 10:**  
**Eidesstattliche Versicherung**



## **10. Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Anja Vogl, erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Detektion und Charakterisierung disseminierter Tumorzellen aus  
Knochenmarkspräparaten von Mammakarzinompatientinnen mittels  
Oberflächenglykosilierung**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 25.02.2019

Anja Vogl

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2013 bis April 2014 an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München am Campus Innenstadt durchgeführt. Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke, Herrn PD. Dr. Dr. med. Ulrich Andergassen und Frau Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl.

**Aus dem Promotionsprojekt ging folgende Originalarbeit hervor:**

Andergassen U, **Vogl A**, Mumm JN, Kölbl AC, Hutter S, Rack B, Friese K und Jeschke U

Immunocytochemical Characterization of Disseminated Tumour Cells from Bone Marrow of Breast Cancer Patients. *Anticancer Research* (2016)

**Kapitel 11:**  
**Danksagung**

## 11. Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke danken.

Als tragende Säule des Labors stand Prof. Jeschke jederzeit für Fragen, Wünsche und Anregungen mit seiner ruhigen, erfahrenen und stets freundlichen Art zur Verfügung. Er bildete als „Rückgrat“ der Forschungsgruppe die Basis für diese Dissertationsarbeit. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Ulrich Andergassen. Ich danke ihm als Leiter der AG für die Aufnahme in sein sehr kollegiales und stets professionelles Forschungsteam. Er hat es mir ermöglicht dieses Projekt umzusetzen. Basierend auf seinem immensen klinischen Wissen und herausragenden Erfahrungen auf dem Gebiet der gynäkologischen Onkologie, konnte er stets neue Impulse und wegweisende Anregungen geben.

Ich bedanke mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Alexandra Kölbl. Sie wusste als erfahrene Biologin auf jede Frage im Labor eine rettende Antwort. Egal wann oder wo, sie stand mir jederzeit bei allen großen und kleinen Problemen mit Rat und Tat zur Seite. Für diese exzellente Betreuung und Unterstützung meinen herzlichsten Dank.

Des Weiteren möchte ich mich bei den technischen Assistentinnen des Labors, Frau Alvera Rengel-Puertas, Frau Beate Zill und Frau Leonie Majunke ganz herzlich bedanken. Vielen Dank für eure tatkräftige Unterstützung und die freundliche Aufnahme ins Team.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinen beiden Laborkollegen Rebekka und Dominik. Ihr habt die Zeit im Labor unvergesslich gemacht und gute Freundschaften sind entstanden.

Schließlich möchte ich Roman von ganzem Herzen danken. Er hat mich nicht nur während dieser Dissertation stets unterstützt, sondern war die ganzen Jahre des Studiums stets für mich da.

Widmen möchte ich diese Dissertation meinen Eltern. Sie haben mir diesen Lebensweg ermöglicht, alle Höhen und Tiefen des Studiums mit mir durchlebt und mir dabei stets den richtigen Weg aufgezeigt.