

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Simultane Bestimmung des Östrogen- und HER2-Rezeptorstatus disseminierter
Tumorzellen im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom**

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

vorgelegt von

Charlotte Ulrike Finkenzeller
aus
Schwetzingen

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Harald Sommer

Mitberichterstatter: PD Dr. Oliver J. Stötzer
Prof. Dr. Doris Mayr

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Bernadette Jäger

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

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2019

Aus dem Promotionsprojekt ging folgende Originalarbeit hervor:

Bernadette A.S. Jäger, Charlotte Finkenzeller, Carolin Bock, Leonie Majunke, Julia K. Jueckstock, Ulrich Andergassen, Julia K. Neugebauer, Aurelia Pestka, Thomas W.P. Friedl, Udo Jeschke, Wolfgang Janni, Sophie F. Doisneau-Sixou, Brigitte K. Rack

Estrogen Receptor and HER2 Status on Disseminated Tumor Cells and Primary Tumor in Patients with Early Breast Cancer

Translational Oncology, December 2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Hintergrund Mammakarzinom	1
1.2. Hormon- und HER2-Rezeptorstatus des Mammakarzinoms	3
1.2.1. Östrogenrezeptor-Status	3
1.2.1.1. Bestimmung des Östrogenrezeptor-Status des Primärtumors	3
1.2.1.2. Klinische Relevanz	4
1.2.2. Progesteronrezeptor-Status	5
1.2.3. HER2-Status	6
1.2.3.1. Bestimmung des HER2-Status des PT	7
1.2.3.2. Klinische Relevanz	8
1.2.4. Änderung des Rezeptorstatus im Krankheitsverlauf	10
1.3. Tumorzell dissemination	11
1.3.1. Klinische Bedeutung der Tumorzell dissemination	11
1.3.2. Detektion disseminierter Tumorzellen	14
1.3.2.1. Nachweismethode disseminierter Tumorzellen	14
1.3.2.2. Bewertungskriterien für disseminierte Tumorzellen	16
2. Zielsetzung und Fragestellung	17
3. Patienten, Material und Methoden	19
3.1. Patientenkollektiv	19
3.1.1. Alter	20
3.1.2. Menopausenstatus	21
3.1.3. Tumorstadium	21
3.1.4. Lymphknotenbeteiligung	22
3.1.5. Tumorhistologie	22
3.1.6. Grading	23
3.1.7. Hormonrezeptor- und HER2-Status des Primärtumors	23
3.1.7.1. Östrogenrezeptor-Status	23
3.1.7.2. Progesteronrezeptor-Status	24
3.1.7.3. HER2- Status	24
3.1.7.4. Triple negativer Tumor	24
3.2. Material	25
3.2.1. Laborutensilien	25
3.2.2. Geräte	26
3.2.3. Chemikalien und Pufferlösungen	27
3.2.4. Antikörper	28
3.2.5. Zelllinien	28
3.3. Methoden	29
3.3.1. Knochenmarkpunktion	29
3.3.2. Aufarbeitung des Knochenmarkspirat und Herstellung der Objektträger	29
3.3.3. Herstellung der Positivkontrollen	30
3.3.4. Färbeprotokoll für Patientenkollektiv	31
3.3.5. Analyse	33
3.4. Statistische Auswertung	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Disseminierte Tumorzellen	37

4.1.1.	DTC Häufigkeitsverteilung pro Patientin	37
4.1.2.	Häufigkeit detektierter DTC	38
4.1.3.	ER- und HER2-Status der DTC je Patientin	41
4.2.	Vergleich des ER- und HER2-Status zwischen DTC und PT	42
4.2.1.	ER-Status	42
4.2.2.	HER2-Status	43
4.2.3.	Triple-negativer PT	44
4.3.	Heterogenität des ER- und HER2-Status der DTC	44
4.4.	Assoziation des ER- und HER2-Status der DTC mit klinisch pathologischen Faktoren	46
5.	Diskussion	48
5.1.	Kritische Bewertung der Studie	48
5.1.1.	Detektionsort der MRD	48
5.1.2.	Methode und Patientenkollektiv	49
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	51
5.2.1.	Zusammenfassung unserer Ergebnisse	51
5.2.2.	ER- und HER2-Status der DTC und Korrelation mit PT	52
5.2.2.1.	ER-Status	52
5.2.2.2.	HER2-Status	54
5.2.3.	Heterogenität des ER- und HER2-Status der DTC	56
5.2.4.	ER- und HER2- Status der DTC in Korrelation mit klinisch pathologischen Faktoren und Prognosefaktoren	57
5.2.5.	Hypothese zur Erklärung der Divergenz der ER- und HER2-Expression zwischen PT und DTC und der Heterogenität von DTC	58
5.2.6.	Auswirkung auf die Therapie	61
6.	Schlussfolgerung	64
7.	Zusammenfassung	65
8.	Literaturverzeichnis	67
9.	Abkürzungsverzeichnis	74
10.	Abbildungs- und Diagrammverzeichnis	75
11.	Tabellenverzeichnis	76
12.	Eidesstattliche Versicherung	77
13.	Danksagung	78

1. Einleitung

1.1. Hintergrund Mammakarzinom

Das Mammakarzinom macht in Deutschland ein Drittel aller weiblichen Krebserkrankungen aus. Jährlich erkranken nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts rund 70 000 Frauen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren [1]. Seit der Etablierung des Mammografie-Screening-Programms 2005 in Deutschland ist die Inzidenz des Mammakarzinoms gestiegen, die Brustkrebsmortalität hingegen gesunken [1]. Durch diesen sekundären Präventionsansatz wird die Diagnose Brustkrebs häufiger in einem frühen und somit prognostisch günstigeren Stadium gestellt [2].

Die Ätiologie ist bis dato nicht vollständig geklärt. Es wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen. Zu maßgeblichen Risikofaktoren zählen: ein hohes Lebensalter, das weibliche Geschlecht, Adipositas, eine familiäre Belastung, genetische Faktoren, Mammakarzinom in der Eigenanamnese und hormonelle Einflüsse [3].

Zu den etablierten prognostischen Faktoren des Mammakarzinoms gehören unter anderem das Alter, der Menopausenstatus, das Tumor-Nodus-Metastasen (TNM)-Stadium, das Grading, der histologische Tumortyp und der Hormonrezeptor- und HER2-Status [3]. Daneben wurde auch die prognostische Bedeutung von Tumorzellen im Knochenmark (KM) oder Blut in aktuellen Studien belegt [4-6].

Jedes intraoperativ entnommene Gewebe wird leitliniengerecht histopathologisch untersucht und enthält den histopathologischen Tumortyp, Graduierung, Tumorgröße, Angaben zu Multifokalität und/oder Multizentrität, pTNM-Klassifikation, R-Klassifikation, peritumorale Lymph- und Gefäßeinbrüche, Hormonrezeptorstatus (Östrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PR)) und „Human Epidermal Growth Factor Receptor 2“ (HER2)-Expressionsstatus [7]. Es werden vier Subtypen des Mammakarzinoms anhand des Rezeptorstatus und des Proliferationsmarkers Ki67-Expression unterschieden (Luminal-A-, Luminal-B-, basal-like- und HER2-positive Karzinome) [8].

Die Therapie des Mammakarzinoms richtet sich nach diesen Tumorcharakteristika des Primärtumors (PT). Neben der operativen Therapie und der Strahlentherapie hat die Systemtherapie einen hohen Stellenwert.

Gemäß Empfehlungen der S3-Leitlinie werden (neo-)adjuvante Chemotherapien in kurativer Absicht durchgeführt [7]. Eine Indikation besteht bei triple-negativen Tumoren, HER2-positiven Tumoren, Luminal-B-Tumoren, nodal-positiven Tumoren, Tumoren mit einer aggressiven Tumorbilogie und bei jungen Patientinnen (<35Jahren) [9]. Der Standard ist eine anthrazyklin- und taxanhaltige Kombination.

Die Indikation zu einer endokrinen Therapie ist bei einem hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom gegeben. Bei HER2-positiven Tumoren kommen HER2-zielgerichtete Therapeutika zum Einsatz.

1.2. Hormon- und HER2-Rezeptorstatus des Mammakarzinoms

1.2.1. Östrogenrezeptor-Status

Östrogene sind weibliche steroidale Geschlechtshormone. Es existieren verschiedene Typen von ER: ERalpha und ERbeta [10]. Sie weisen in unterschiedlichen Geweben verschiedene Verteilungen auf und werden vor allem im Brustdrüsengewebe exprimiert - sowohl im gesunden Gewebe als auch beim Mammakarzinom. Durch Aktivierung des ER wird die Expression in bestimmten Genen reguliert. Es wird vermutet, dass der ER bei der Pathogenese des Mammakarzinoms von entscheidender Bedeutung ist [11, 12].

Ein langer hormonell aktiver Zeitraum, d.h. eine lange Einwirkzeit der Östrogene auf die ERen des Brustdrüsengewebes, ist ein bekannter Risikofaktor des Mammakarzinoms. Die ER-Expression ist ein günstiger prognostischer und wichtiger prädiktiver Faktor.

Bis zu 80% der diagnostizierten Mammakarzinome weisen eine ER-Expression auf [13].

1.2.1.1. Bestimmung des Östrogenrezeptor-Status des Primärtumors

Der ER-Status des PT wird, an dem in Paraffin fixierten Operationsgewebe, mittels einer immunhistochemischen Färbung bestimmt. Für die ER-Expression wird der „Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner“ (IRS) angegeben [14].

Punkte	Färbeintensität	Positive Zellkerne in Prozent
0	Keine Reaktion	Keine
1	Schwache Reaktion	weniger als 10 %
2	Mäßige Reaktion	zwischen 10 und 50 %
3	Starke Reaktion	zwischen 51 und 80 %
4	-	mehr als 80 %

Tabelle 1 IRS nach Remmele und Stegner zur Bestimmung des ER-Status des PT [14]

Für die Bestimmung des IRS wird die Intensität der ER-Färbung und die Prozentzahl der Zellen mit nukleärer Reaktivität bewertet (Tabelle 1). Der IRS ergibt sich aus der vorherrschenden Färbeintensität multipliziert mit dem Prozentsatz positiver Zellen und kann Werte zwischen 0 und 12 annehmen.

In der Arbeit von Remmele und Stegner wird kein Wert angegeben, ab welchem IRS ein Tumor als positiv gewertet wird, bzw. bei welchen Werten man von einem ER-negativen Tumor spricht. Laut dem St. Gallen-Konsensus gelten Mammakarzinome als hormonsensitiv, wenn eine Anfärbung von mindestens 1% der Zellkerne nachgewiesen werden kann. Tumore mit 1-10% positiver Zellkerne gelten als schwach, bzw. fraglich positiv [15, 16]. Deshalb wird in dieser Arbeit ein Cut-Off von 10% bzw. ein IRS von 2 angenommen.

1.2.1.2. **Klinische Relevanz**

Der ER-Status wird bestimmt um hormonsensitive Mammakarzinome zu identifizieren, damit dieser mit in die Therapieentscheidung einfließt [17].

Liegen hormonsensitive Mammakarzinome vor, ist eine endokrine Therapie indiziert. Die Art der endokrinen Therapie ist abhängig vom Menopausenstatus der Patientin und sollte sich an eine gegebenenfalls indizierte adjuvante Chemotherapie anschließen. Bei prämenopausalen Patientinnen wird Tamoxifen eingesetzt [18]. Alternativ können bei Kontraindikationen zu Tamoxifen Aromataseinhibitoren in Kombination mit GnRH-Analoga eingesetzt werden [9]. Bei der endokrinen Therapie postmenopausaler Patientinnen kommen insbesondere Aromataseinhibitoren zum Einsatz [9].

1.2.2. Progesteronrezeptor-Status

Progesteron ist ein weibliches steroidales Geschlechtshormon. Es existieren zwei Isoformen des PR, PR-A und PR-B. PReN werden durch Tumorzellen synthetisiert, die durch Östrogene stimuliert werden. Somit ist die Expression des PR an die ER-Expression gekoppelt [19-22].

Meist kommt es durch parakrine Mechanismen mittels Tumornekrosefaktoren wie zum Beispiel RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) , selten Cyclin D1 vermittelt, zu einer Stimulierung der PReN und dadurch zu einer Proliferation der PR-positiven Epithelzellen der Mamma [23].

Beim Mammakarzinom kann Progesteron als proliferatives Hormon die Entstehung triggern [24]. In einer großen Pooled-Analyse konnte gezeigt werden, dass eine PR-Expression bei ca. zwei Drittel der Patientinnen mit einem Mammakarzinom vorliegt [25].

Die Bedeutung der PR-Expression im Hinblick auf Therapie und Prognose beim Mammakarzinom wird kontrovers diskutiert:

Eine bessere Prognose liegt bei Patientinnen mit einem PR-negativen Tumor im Vergleich zu einem PR-positiven vor [26].

Dahingegen hat eine Arbeit gezeigt, dass bei Patientinnen mit einem ER-negativen/PR-negativen Mammakarzinom ein deutlich kürzeres rezidivfreies Überleben vorliegt als bei Patientinnen mit einem ER-negativen/PR-positiven oder ER-positiven/PR-positiven Primärtumor [27].

Kontrovers zeigte eine Studie, dass Patientinnen mit mehr als 20% PR-positiven Tumorzellen bei einem Luminal A Tumor, ein besseres Gesamtüberleben aufweisen [28].

Zudem konnte gezeigt werden, dass PR-positive Tumore einen positiven prädiktiven Einfluss auf das Ansprechen einer antiöstrogenen Therapie haben und damit ein verbessertes Rezidivfreies- und Gesamtüberleben vorliegt [26, 29].

Patientinnen mit einem ER-negativen/ PR-positiven/ HER2-negativen Primärtumor haben eine deutlich bessere Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben und die rezidivfreie Zeit, wenn sie eine endokrine Therapie erhalten haben [30].

Die Höhe der Hormonrezeptorlevel scheint eine Rolle zu spielen. Hohe PR-Level bei Frauen mit einem ER-positivem Mammakarzinom gehen mit einem besseren krankheitsfreien- und Gesamtüberleben einher [31].

1.2.3. HER2-Status

Bis zu 30% aller Mammakarzinome zeigen eine HER2-Überexpression [32, 33]. HER2 ist ein Tyrosinkinase erb-B Rezeptor. Bei Aktivierung des transmembranösen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors werden Information an den Zellkern gesendet (RAS-MAP-Kinase Signalkaskade). Dort führt diese Aktivierung unter anderem zu vermehrten Mitosen und damit zur Zellproliferation, sowie zur Inhibition von Apoptosen [32].

Der HER2-Status gehört, wie der ER-Status, zu den Prognosefaktoren des Mammakarzinoms. Das Vorhandensein eines HER2-positiven Tumors geht mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben einher [34, 35]. Ein positiver HER2-Status des Mammakarzinoms wird als Neigung zu einem aggressiveren Tumorwachstum und als Zeichen einer Chemotherapieresistenz angesehen [33, 36]. Insgesamt hat sich die Prognose jedoch durch die neuen Therapiemöglichkeiten bei HER2-positiven Mammakarzinomen deutlich verbessert (siehe Kapitel 1.2.3.2) [36].

1.2.3.1. Bestimmung des HER2-Status des PT

Der HER2-Status beim Primärtumor der Patientinnen dieser Arbeit wurde immunhistochemisch bestimmt. Dazu wurde der sogenannte Hercep Test® (DAKO, Glostrup, Dänemark) verwendet [17]. Dieser erlaubt einen quantitativen Nachweis der HER2-Expression in Brustkrebsgewebe. Die HER2-Expression wird in einem Score von 0 bis +++ ausgedrückt (Tabelle 2).

0	Keine Färbereaktion oder $\leq 10\%$ der invasiven Tumorzellen mit Markierung der Zellmembran	Negativ
+	$>10\%$ der invasiven Tumorzellen mit schwacher inkompletter Markierung der Zellmembran	Negativ
++	$>10\%$ der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbeintensität gering bis mittelgradig oder stark zirkuläre Markierung der Zellmembran in $<30\%$	Schwach positiv (geringer HER2-Überexpression)
+++	$>30\%$ der invasiven Tumorzellen mit zirkulärer Markierung der Zellmembran; Färbeintensität stark	Stark positiv (starke HER2-Überexpression)

Tabelle 2 Bewertung HER2-Immunhistochemie [17]

In dieser Arbeit wurden Tumore mit einem Score von +++ als HER2-positiv gewertet. Im Falle eines ++ Wertes wurde eine Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) (Pathvysion Kit, Vysis, Downers Grove, IL) durchgeführt um eine HER2-Amplifikation nachzuweisen. Wenn diese vorlag wurden HER2 ++ Werte als positiv gewertet. HER2-Scores von 0, + und ++ mit negativer FISH-Untersuchung wurden als HER2-negative Tumoren gewertet [37].

Seit der Erhebung des HER2-Status des Primärtumors in dieser Arbeit kam es zu einer Veränderung der Bewertung der HER2-Immunhistochemie und für die In-Situ-Hybridisierung. Der Cut-off für den Score 3+ wurde von 30% auf 10% reduziert [38] (Tabelle 3).

0	Keine/schwache inkomplette Membranreaktion $\leq 10\%$ der Tumorzellen	Negativ
---	--	---------

+	Schwache inkomplette Membranreaktion >10% der Tumorzellen	Negativ
++	Schwache/mäßige zirkuläre Membranreaktion >10% der Tumorzellen oder starke zirkuläre Membranreaktion ≤10% der invasiven Tumorzellen	zweifelhaft
+++	Gleichmäßige intensive zirkuläre Membranreaktion ≥10% der Tumorzellen	positiv

Tabelle 3 Aktuell empfohlener HER2-Testalgorithmus für die Immunhistochemie [38]

Auch wurde der Grenzwert für die In-Situ-Hybridisierung angepasst [38].

Die Einteilung in HER2-positiver oder HER2-negativer Primärtumor erfolgte bei Diagnosestellung gemäß den alten Empfehlungen.

1.2.3.2. Klinische Relevanz

Der HER2-Status des Mammakarzinoms wird in der histopathologischen Untersuchung routinemäßig bestimmt, da dieser mit in die Therapieentscheidung einfließt [7].

HER2 bietet einen guten Angriffspunkt für HER2-zielgerichtete Therapien. Entsprechend ist bei diesen Patientinnen eine Therapie mit Antikörpern (AK) wie Trastuzumab und/oder- Pertuzumab indiziert [7, 36, 39, 40]. Durch diese neuen Therapeutika hat sich unter anderem die Prognose metastasierter HER2-positiver Tumoren deutlich verbessert und ist vergleichbar mit HER2-negativen Tumoren [41].

Dabei ist Trastuzumab ein monoklonaler humanisierter AK, der sich gegen die extrazelluläre Domäne (Subdomäne IV) des HER2 richtet [42, 43]. Durch Bindung von Trastuzumab an HER2 kommt es zu einer ligandenunabhängigen Inhibierung der Signalkaskade und dadurch zur Verhinderung der Formation von HER2-Homodimeren [40]. Ein Parameter für das Ansprechen einer Trastuzumabtherapie scheint eine starke Färbung des HER2 in einer immunhistochemischen Untersuchung zu sein [16].

Pertuzumab ist ebenfalls ein monoklonaler humanisierter AK. Dieser greift im Vergleich zu Trastuzumab an einem anderen Epitop der extrazellulären Domäne (Subdomäne II) des HER2 an. Er verhindert die Heterodimerization von HER2 mit anderen Rezeptoren

durch ligandenabhängige Inhibierung der Signalkaskade und führt so zu einem langsameren Tumorwachstum [40].

Eine weitere Alternative wäre Lapatinib. Dabei handelt es sich um einen Tyrosin-Kinasen-Inhibitor, welcher an die intrazelluläre Domäne HER1 und HER2 bindet und damit die Aktivierung der Signalkaskade blockiert [43].

1.2.4. Änderung des Rezeptorstatus im Krankheitsverlauf

Es ist bekannt, dass sich Metastasen bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezüglich ihres Rezeptorstatus vom PT unterscheiden können. Exemplarisch zeigen die in Tabelle 4 aufgeführten Studien, dass sich der ER- und HER2-Status während der Erkrankung verändern kann und sich Metastasen phänotypisch vom PT unterscheiden können [13, 44-46].

Studie	n	Veränderung ER (%)	Veränderung HER2 (%)
Thompson [13]	137	10	3
Amir [44]	94	16	10
Lindström [46]	459	33	14
Jensen [45]	119	12	9

Tabelle 4 Diskrepanz des ER- und HER2-Status zwischen PT und Rezidiv und/oder Metastasen, n= Anzahl Patientinnen

Meist findet dabei ein Wechsel von einem initial positiven Hormonrezeptorstatus des PT zu einem negativen Hormonrezeptorstatus der Metastasen statt. Eine Differenz des ER-Status des PT und eines lokalen Rezidiv und/oder Metastasen liegt in einem Drittel der Fälle vor [46]. Für den HER2-Status wurden seltener, zwischen 3 und 14%, Diskrepanzen zwischen dem PT und einem Rezidiv, respektive Metastasen beschrieben [13, 45, 46].

Nach Empfehlung der American Society of Clinical Oncology werden derzeit histopathologische Eigenschaften des PT und wenn möglich (je nach Lokalisation) auch der Metastasen im Krankheitsverlauf bestimmt und zur Therapieplanung herangezogen. Der Nachweis von Tumorzellen und deren immunhistologischen Eigenschaften in anderen Materialien, zum Beispiel Blut oder KM, ist noch nicht Teil der klinischen Routine, jedoch ein aktives Forschungsfeld, wie die hier vorliegende Arbeit zeigt.

1.3. Tumorzelldisseminierung

1.3.1. Klinische Bedeutung der Tumorzelldisseminierung

Die Streuung einzelner Tumorzellen bei malignen Erkrankungen bezeichnet man als Tumorzelldisseminierung. Im Blutkreislauf werden sie als zirkulierende Tumorzellen (CTC) bezeichnet. Ein Bruchteil dieser Zellen ist in der Lage sich in tumorfernen Körperkompartimenten, unter anderem im KM, anzusiedeln und dort zu persistieren. Diese werden als disseminierte Tumorzellen (DTC) bezeichnet [47, 48]. Der Nachweis von DTC und/oder CTC wird als Surrogatmarker für die Minimal Residual Disease (MRD) angesehen [49].

Bei 15 bis 36% der Patientinnen in einem frühen Brustkrebsstadium (Stadium I-II, keine Fernmetastasierung) konnten DTC im KM nachgewiesen werden [5, 50-54]. Bei Patientinnen in einem lokal fortgeschrittenen Stadium (IIB-III, keine Fernmetastasierung) sogar in bis zu 74% der Fälle [55].

Mehrere Studien, unter anderem eine große Metaanalyse mit 1A-Evidenz, konnten zeigen, dass das Vorhandensein von DTC im KM mit einer Prognoseverschlechterung, einem kürzeren rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben [5, 47, 53-61] sowie erhöhtem Rezidivrisiko assoziiert ist [5, 51, 55, 60, 62-64]. Der immunzytochemische Nachweis von DTC im KM gilt als ein unabhängiger prognostischer Faktor [5, 53, 54, 65].

Obwohl die klinische Relevanz der DTC im KM belegt ist, ist die DTC-Detektion in der Diagnostik des Mammakarzinoms noch nicht Bestandteil der klinischen Routine. Sie hat noch keinen Einzug in die aktuelle Leitlinie bzw. die aktuelle TNM-Klassifikation gefunden und wird nicht allen Patientinnen empfohlen [51, 66, 67]. Anforderung an eine in der klinischen Praxis anwendbare Methode zum Nachweis einer Tumorzelldisseminierung, ob CTCs oder DTCs, ist die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. Dazu ist ein standardisierter Nachweis notwendig. Zudem muss für eine Aufnahme in die Leitlinien eine therapeutische Konsequenz zum Vorteil der Patientinnen nachgewiesen werden können. Derzeit findet die DTC-Detektion und -Charakterisierung nur im Rahmen von Studien statt.

Abzugrenzen sind DTC von Mikrometastasen. DTC gelten als eine Vorstufe von Mikrometastasen, da bei ihnen noch keine Stromainvasion, kein Gefäßkontakt und keine Proliferation stattgefunden hat [68].

DTC im KM lassen jedoch auf eine systemische Erkrankung schließen und geben Einblicke in die kritischen ersten Schritte der Metastasierungskaskade [69, 70]. Trotz der Fortschritte und Individualisierung der Therapie sind Metastasen nach wie vor der Hauptgrund für die meisten Todesfälle bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom [71]. Diese können auch lange nach einer erfolgreichen operativen Entfernung des Tumors und nach adjuvanter Therapie auftreten [71]. Der exakte Mechanismus der Metastasenentstehung ist derzeit Teil der Forschung und nicht komplett verstanden [72]. Es scheint, dass die Ansammlung von DTC ein wichtiger Schritt in der komplexen Entstehung von Metastasen ist [73]. Von vielen Zellen die, vermutlich bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung, vom PT in die Blutbahn abgegeben werden, habe vermutlich nur wenige das Potential im Blut oder KM zu persistieren [63]. Einigen Zellen gelingt es dennoch der Chemotherapie zu entkommen und dort über Jahre hinweg als sog. „Dormant Cells“ zu überleben. Durch noch unklare Mechanismen, eventuell durch die Expression von Stammzellmarkern oder anderen molekularen Eigenschaften, können sich diese Zellen wieder in aktive Zellen umwandeln und sich zu klinisch nachweisbaren Metastasen entwickeln [71, 73]. Somit stellt die MRD einen vielversprechenden Ansatzpunkt der erweiterten zielgerichteten Therapie zur Verhinderung der Bildung manifester Metastasen dar.

Auch ist bekannt, dass sich der ER- und HER2-Status der DTC vom PT unterscheiden kann. Eine Übereinstimmung des ER-Status des PT und der DTC lag in lediglich 28% vor [74]. Bezüglich des HER2-Status wurde eine Diskordanz zwischen PT und DTC in 28% der Fälle beobachtet [66].

Die routinemäßige Detektion und Charakterisierung von DTC im KM von Patientinnen mit Mammakarzinom könnte zur Bestimmung des individuellen Rezidivrisikos nach einer erfolgreichen Operation und zur Indikation einer erweiterten personalisierten Therapie herangezogen werden. Damit könnten DTC nicht nur als Prognosefaktor, sondern auch als Prädiktivfaktor oder Instrument zum Monitoring einer Systemtherapie eingesetzt werden [5, 55-57, 59-61, 75].

Die standardmäßige Detektion und Charakterisierung von DTC, insbesondere die Bestimmung des ER- und HER2- Status, wäre im Hinblick auf mögliche neue Therapieansätze basierend auf der MRD von großem Interesse [76] und könnte Einblicke in wesentliche Schritte der Metastasenentstehung bieten [69, 70, 77].

1.3.2. Detektion disseminierter Tumorzellen

1.3.2.1. Nachweismethode disseminierter Tumorzellen

Da das Vorkommen von DTC ein seltenes Ereignis ist, ca. 1-2 pro 1 Million mononukleärer Zellen im KM, findet eine initiale Anreicherung der Zellen statt [78]. Der Nachweis von DTC erfolgt meist nach einer Dichtegradientenzentrifugation, Filtration oder immunomagnetischen Separation [57, 79].

Zur Detektion der DTC im KM existieren verschiedene Methoden [67]. Die am häufigsten in der Literatur beschriebene Methode ist die immunzytochemische Detektion.

Durch die Färbung von epithelspezifischen Antigenen, wie zum Beispiel Zytokeratinen (CK) oder Oberflächenmolekülen können DTC nachgewiesen und charakterisiert werden. CK sind Strukturen des Zytoskeletts. Sie können als Marker für maligne Zellen und somit für DTC eingesetzt werden, weil sie ausschließlich von epithelialen Zellen gebildet werden und entsprechend in mesenchymalen Geweben (Blut, KM, Lymphknoten) nicht vorkommen [80]. Auf molekularer Ebene konnte der maligne Charakter CK-positiver Zellen bewiesen werden [81, 82]. Tumorspezifische chromosomale Abweichungen bei CK-positiven Zellen im KM sind Hinweis auf das Vorliegen von malignen Tumorzellen [54, 82-84].

Bei CK werden zwei Subtypen unterschieden, die Zuordnung erfolgt je nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht. Zum sauren Subtyp 1 zählen die CK 9-20 (Molekulargewicht 40kD bis 64kD) und zu dem basischen/neutralen Subtyp 2 die CK 1-8 (Molekulargewicht 52kD bis 68kD). Die Grundeinheit des Zytokeratinfilaments, wird aus einem Tetramer aus jeweils zwei neutralen und zwei sauren CK gebildet [80, 85]. Die Zytokeratinexpression in Geweben ist somit recht heterogen, sodass AK gegen CK für den Nachweis von epithelialer Tumorzell dissemination des PT eingesetzt werden können [86]. In humanen Epithelien sind mehr als 20 verschiedene CK bekannt. Beim Mammakarzinom werden vor allem A45-B/B3 monoklonale AK benutzt um spezifisch Tumorzellen zu detektieren. Dieser richtet sich gegen die Heterodimere CK 8/18 und CK 8/19 sowie gegen gemeinsame Epitope verschiedener CK [54, 58, 78].

Bei der sogenannten alkalischen Phosphatase- Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Färbung, werden epithelspezifische Antigene, wie zum Beispiel CK,

Oberflächenmoleküle oder Wachstumsfaktoren nachgewiesen. Dazu bindet an das nachzuweisende Antigen ein AK, an den im Anschluss ein oder mehrere APAAP-Komplexe angekoppelt werden und wodurch eine Verstärkung der Reaktion bewirkt wird.

Eine weitere immunzytochemische Methode zum Nachweis und Charakterisierung von DTC ist die Immunfluoreszenzfärbung. Das Ziel dabei ist es, spezifische Strukturen mithilfe von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten AK sichtbar zu machen. Bei der direkten Methode wird das spezifische Antigen für die zu untersuchende Struktur der Zelle mit einem fluorochrom markierten AK direkt gekoppelt.

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung, welche in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde, wird zuerst das nachzuweisende Epitop auf der Zielstruktur mit einem spezifischen AK versehen (Primärantikörper). Erst durch den zweiten Schritt erfolgt die eigentliche Färbung. Der mit Fluorochrom markierte AK (Sekundärantikörper), der spezifisch an den Primärantikörper bindet, wird auf die Probe gegeben. Diese Methode ist sensitiver als die direkte Immunfluoreszenzfärbung, da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können und es somit zu einer Signalverstärkung kommt.

Auch ist eine Mehrfachfluoreszenzfärbung möglich. Dabei können verschiedene Antigene in einer Färbung nachgewiesen werden, da die einzelnen spezifischen Antigene mit unterschiedlichen fluorochrom markierten AK versehen werden.

Die Analyse einer Immunfluoreszenzfärbung erfolgt mittels eines Fluoreszenzmikroskops. Die Probe wird mit Licht der benötigten Wellenlänge bestrahlt. Die fluorochrom markierten AK absorbieren dieses Licht und anschließend emittieren sie es in einer für sie spezifischen Wellenlänge (kurzwelliges Licht wird absorbiert, langwelliges emittiert). Diese emittierende Strahlung kann im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Des Weiteren gibt es für den Nachweis von DTC molekularbiologische Methoden, wie zum Beispiel die RT-PCR, Fluoreszenz In-situ-Hybridisierung (FISH), die Amplifikationen tumorspezifischer Antigen der Zellen nachweisen [87].

1.3.2.2. **Bewertungskriterien für disseminierte Tumorzellen**

In der Literatur sind Kriterien, die für eine optimale Tumorzelldetektion gegeben sein sollten, beschrieben [78, 88]. Dazu zählt unter anderem die Spezifität, Sensibilität, Reproduzierbarkeit, Robustheit, Objektivierbarkeit, das Potential für eine automatisierte Analyse und die Charakterisierung der Tumorzellen. Borgen et al und Fehm et al beschreiben nach welchen Kriterien immunzytochemisch gefärbte Zellen kategorisiert werden sollen. Eine gefärbte Zelle darf nur als positiv angesehen werden, wenn eine typische Tumorzellmorphologie vorliegt, in Zellklustern vorkommt oder einen vergrößerten oder atypischen Zellkern vorweist und sich somit eindeutig von hämatopoetischen Zellen und Plattenepithelzellen unterscheidet [88].

Guidelines für die Ausführung einer immunzytochemischen Färbung und Analyse wurden von Borgen et al beschrieben [78]. Um eine optimale Analyse zu ermöglichen, sollten mindestens 4 Objektträger mit 10^6 mononukleären Zellen vorliegen, wovon die Hälfte mit einem spezifischen pan-epithelialen monoklonalen AK inkubiert wird und die andere Hälfte der Objektträger mit einem Kontrollantikörper. Eine technisch adäquate immunzytochemische Färbung muss mit Positivkontrollen kontrolliert werden. Um eine Tumorzellkontamination zu vermeiden sollten die Positivkontrollen jeweils separat von den Patientenobjektträgern während der Färbung aufbewahrt werden. Bei der Auswertung sollte sowohl die Zellanzahl als auch die Zellmorphologie bewertet werden [78].

2. Zielsetzung und Fragestellung

Tumorzellen im Blut und KM sind seit einiger Zeit Gegenstand der Brustkrebsforschung. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patientinnen mit der Diagnose Mammakarzinom sowohl in frühen als auch in fortgeschrittenen Stadien DTC im KM nachgewiesen werden können. Das Vorhandensein von DTC ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert [5, 47, 53, 54, 56-61] und als unabhängiger prognostischer Faktor anerkannt [5]. Da der Tumor bei der Operation komplett entfernt wird, könnten DTC im KM als Marker einer MRD dienen.

Der Hormonrezeptor- und HER2-Status des PT gehört neben operativen und weiteren histopathologischen Ergebnissen zu den klassischen Prognosefaktoren des Mammakarzinoms und bietet Angriffspunkte für eine endokrine- oder HER2-zielgerichtete Therapie. Studien konnten zeigen, dass sich der ER- oder HER2-Status eines Rezidivs, von Metastasen oder DTC von dem des PT unterscheiden kann [13, 44-46].

Die Detektion und Charakterisierung von DTC ist eine vielversprechende Möglichkeit um eine zusätzliche Risikoeinschätzung bei Patientinnen mit Mammakarzinom durchzuführen. Der Nachweis und die Charakterisierung dieser Zellen könnten das Verständnis der Tumor- und Metastasenentstehung verbessern und diese als mögliches Ziel einer personalisierten Therapie dienen.

Hinsichtlich neuer individualisierter Therapieoptionen ist der ER- und HER2-Status der DTC ebenfalls von großem Interesse. Die aktuellen Therapieregime richten sich nach dem PT. Die Bestimmung des Phänotyps der DTC, zusätzlich zur Phänotypisierung des korrespondierenden PT, könnte neue Angriffspunkte für die Therapie des Mammakarzinoms bieten. Der Nachweis und die Charakterisierung von DTC könnten auch als Indikator für ein Therapieansprechen, sowie als Echtzeit Kontrollmarker („liquid biopsy“) wichtige Informationen liefern und in der klinischen Routine hilfreich sein.

In dieser retrospektiven Arbeit wurde erstmals eine dreifache indirekte Immunfluoreszenzfärbung an KM von 54 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom durchgeführt. Der ER-Status und die HER2-Expression der DTC im KM wurden simultan mit CK als Marker für Tumorzellen bestimmt.

Die Ziele dieser Arbeit waren:

- 1) Etablierung einer dreifachen Immunfluoreszenzfärbung zur simultanen Bestimmung des ER- und HER2-Status der DTC zusammen mit CK.
- 2) Korrelation des ER- und HER2-Status der DTC mit dem ER- und HER2-Status des PT.
- 3) Bestimmung der Heterogenität der ER- und HER2-Expression der DTC, bei Patienten bei denen mehr als eine DTC im KM detektiert wurde.
- 4) Untersuchung von Zusammenhängen zwischen bekannten etablierten Risikofaktoren und dem ER- und HER2-Status der DTC.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurde das KM von 54 Patientinnen mit der Diagnose primäres Mammakarzinom, die in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU München – Campus Innenstadt behandelt wurden, untersucht. Das Knochenmarkspirat wurde zum Zeitpunkt der primären Operation vor adjuvanter Systemtherapie gewonnen. Alle in dieser Studie eingeschlossenen Patientinnen sind in der Knochenmarkdatenbank der Frauenklinik der LMU München erfasst. Für jede Patientin, die für diese Studie in Frage kam, ist ein Follow-Up in der Dokumentation bis zum Auswertungszeitpunkt erfolgt. So konnte sichergestellt werden, dass für jede Patientin eine klinischpathologische Korrelation des PT mit den DTC möglich war. Konnte keine lückenlose Dokumentation stattfinden, wurde die Patientin von dieser Arbeit ausgeschlossen.

In dieser Arbeit wurden nur Patientinnen eingeschlossen, bei denen in einem Primärscreening DTC in einer APAAP A45 Färbung nachgewiesen werden konnten und ausreichend Material (mindestens vier Objektträger à 10^6 Zellen) für die Immunfluoreszenzfärbung vorhanden war. Patientinnen, bei denen ein Zweitmalignom vorlag oder ein maligner Tumor innerhalb der letzten 5 Jahre vor der Diagnosestellung primäres Mammakarzinom diagnostiziert wurde, wurden nicht berücksichtigt. Eine neoadjuvante Chemotherapie war ein weiteres Ausschlusskriterium, da das KM erst zum Zeitpunkt der Primäroperation entnommen wurde, nicht bereits bei der Diagnosestellung. Die Ein- und Ausschlusskriterien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Invasives Mammakarzinom ED 2006-2009	Zweitmalignom
DTC im APAAP Primärscreening	Maligne Tumorerkrankung innerhalb der letzten 5 Jahre vor Diagnosestellung
>4 Objekträger à 10 ⁶ Zellen	Neoadjuvante Chemotherapie
KMP zum Zeitpunkt Primäroperation in LMU Frauenklinik, Campus Innenstadt	Unvollständige Dokumentation
Schriftliche Einverständniserklärung	

Tabelle 5 Ein- und Ausschlusskriterien des Patientenkollektivs

3.1.1. Alter

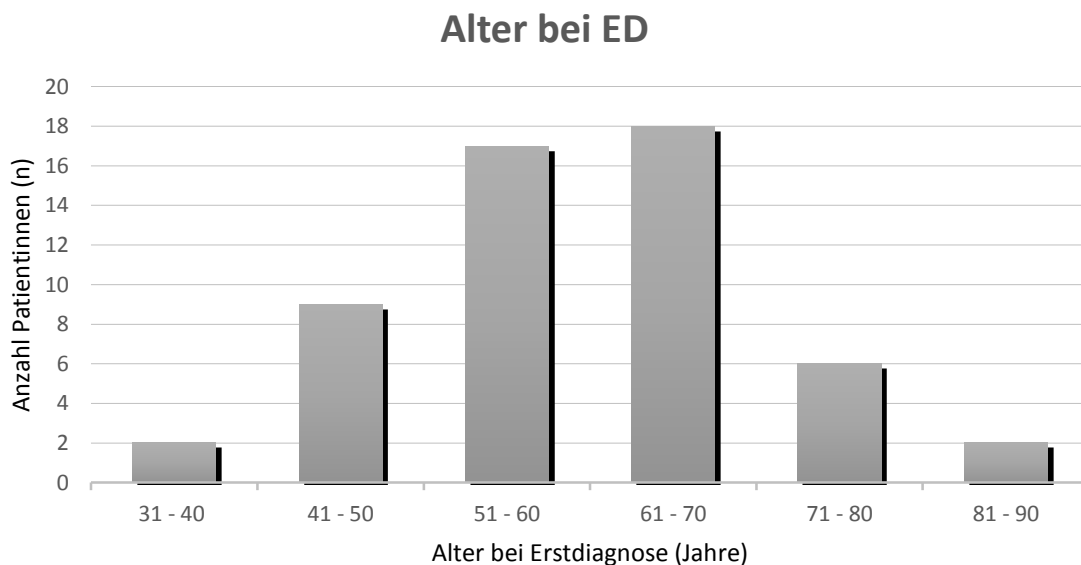


Diagramm 1 Alter bei Erstdiagnose

Das durchschnittliche Alter der Patientinnen war 59 Jahre. Die älteste Patientin bei der DTC in dieser Studie nachgewiesen werden konnte ist 84 Jahre alt, die Jüngste 32 Jahre. Die Mehrheit der untersuchten Patientinnen war zwischen 51 und 70 Jahren alt.

3.1.2. Menopausenstatus

Menopausenstatus	n	%
Prämenopausal	15	28
Postmenopausal	39	72

Tabelle 6 Menopausenstatus; n= Anzahl

Bei Erstdiagnose waren 15 Patientinnen (28%) prämenopausal, 39 Patientinnen (72%), befanden sich bei der Diagnosestellung in der Postmenopause.

3.1.3. Tumorstadium

Bei den in dieser Arbeit eingeschlossenen Patientinnen zeigten sich folgende Verteilung der Tumorstadien:

Tumorstadium	n	%
pT1b	6	11
pT1c	23	43
pT2	18	33
pT3	7	13

Tabelle 7 Tumorstadium; n= Anzahl

Die meisten Tumoren wurden in einem pT1 Stadium diagnostiziert (54%). In 33% der Fälle lag ein pT2 Stadium vor. Lediglich 13% der Tumore, wurden im Stadium pT3 diagnostiziert.

3.1.4. Lymphknotenbeteiligung

Lymphknotenbeteiligung	n	%
pN0	35	65
pN1	10	18
pN2	3	6
pN3	5	9
nicht bekannt	1	2

Tabelle 8 Lymphknotenbeteiligung; n= Anzahl

Knapp zwei Drittel der Fälle (65%) waren nodalnegativ. Ein pN1 Stadium lag in 18%, der Fälle vor. Ein pN2 oder pN3 Stadium konnte lediglich in 6% bzw. 9% der Fälle beobachtet werden.

3.1.5. Tumorhistologie

Tabelle 9 zeigt die Verteilung der histologischen Typen, die bei unserem Patientinnenkollektiv vorlagen.

Histologischer Typ	n	%
Duktal	40	74
Lobulär	10	19
Andere	4	7
· Adenosquamös		
· Medullär		
· Muzinös		
· Papillär		

Tabelle 9 Tumorhistologie; n= Anzahl

In rund dreiviertel der Fälle (74%) lag ein Mammakarzinom vom duktalem Typ vor.

Sei der Probegewinnung und der Durchführung der Experimente wurde die Nomenklatur für das vormals duktales Mammakarzinom geändert, da es keine ausreichende Evidenz dafür gibt, dass diese Karzinome aus duktalem Gewebe entstehen. Diese werden nun als „Invasives Karzinom ohne speziellen Typ“ (no special type=NST) klassifiziert [7].

Mammakarzinome vom lobulären Typ wurden bei knapp einem Fünftel der Patientinnen beobachtet.

3.1.6. Grading

Grading	n	%
G1	5	9
G2	31	58
G3	18	33

Tabelle 10 Grading; n= Anzahl

Bei über der Hälfte der Patientinnen in dieser Arbeit (58%) wiesen die Tumoren einen mittleren Malignitätsgrad (G2) auf. Schlecht differenzierte Tumore (G3) waren in einem Drittel der Fälle nachweisbar. Gut differenzierte Tumoren (G1) konnten lediglich bei 9% der Patientinnen detektiert werden.

3.1.7. Hormonrezeptor- und HER2-Status des Primärtumors

3.1.7.1. Östrogenrezeptor-Status

ER-Status	n	%
negative	12	22
positive	42	78

Tabelle 11 ER-Status; n= Anzahl

Ein ER-positiver PT lag bei 42 (78%) Patientinnen vor. Lediglich 22% der Tumore waren ER negativ.

3.1.7.2. Progesteronrezeptor-Status

PR-Status	n	%
negative	20	37
positive	34	63

Tabelle 12 PR-Status; n= Anzahl

PR konnte bei 63% der PT nachgewiesen werden. 37% der Tumore waren PR negativ.

3.1.7.3. HER2- Status

HER2-Status (Immunhistochemie und FISH-Test)		n	%
negativ	0	25	46,3
	+	12	22,2
positiv	++	FISH negativ	11 20,4
		FISH positiv	2 3,7
	+++	4 7,4	

Tabelle 13 HER2-Status; n= Anzahl

Die meisten Patientinnen hatten einen negativen HER2-Status (n=48). Bei 6 Patientinnen war HER2-positiv, d.h. +++ bzw. ++ mit Amplifikationen in der FISH-Analyse.

3.1.7.4. Triple negativer Tumor

Von den 54 Patientinnen wiesen 10 einen tripel-negativen-PT (ER, PR und HER2-negativ) auf.

3.2. Material

3.2.1. Laborutensilien

Deckgläser 24x40mm, #1	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Falconröhrchen 15ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Falconröhrchen 50ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jearsy, USA
Färbekammer	Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe , München, Deutschland
Gefrierschrank -20°C ComfortNoFrost	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C HeraFreeze	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Kurzzeitmesser	LLG, Meckenheim, Deutschland
Neubauer-Zählkammer improved	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Objektträgerkasten nach Hellendahl mit Erweiterung (76x26mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG "Assistent", Sondheim/Rhön, Deutschland
Pipetten 0,5-10µl, 10-100µl und 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Eppendorf Tubes 0.5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Spannplatte 1662	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Spitzen für Pipetten 0,5-10µl, 100-1000µl und 10-100µl	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland
Thermofrost-Plus Objektträgerglas (25x75x1,0mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Zytokammer 1662 für Spannplatte 1666	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 14 Laborutensilien

3.2.2. Geräte

AxioCam MR	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Axiophot Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Filterset für Axiophot Mikroskop: HC480/17, HC556/20, HC370/36	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Heraeus Multifuge 3SR Plus	Thermo Scientific, Part of Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
LMX Mixer VTX-3000L	LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal, Deutschland
Zentrifuge Rotina 380	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 30F	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 15 Geräte

3.2.3. Chemikalien und Pufferlösungen

Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako North America Inc., Carpinteria, USA
DAKO Pen	Dako Denmark A/S. Glostrup, Dänemark
Ficoll-Paque	Healthcare, München, Deutschland
Fomaldehyd 3,5-3,7% neutral gepuffert mit Methanol stabilisiert	Otto Fischer GmbH&Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Hanks' Salt Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Human Erythrocyt Lysing Kit	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Kaisers Glycerogelatine für Mikroskopie	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland
Large Volume Ultra V Block (ready-to-use)	Lab Vision Corporation, Subsidiary of Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA
Methanol zur Analyse -20°C	MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS (phosphate buffered saline) Dulbeco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypan Blue Sol.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 16 Chemikalien und Pufferlösungen

3.2.4. Antikörper

receptor (clone Sp1), rabbit monoclonal ab	Lab Vision Corporation, Subsidiary of Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA
Goat antimouse IgG (H+L) ML DyLight488, A492, E510	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA
Goat antirabbit IgG (H+L) Fab Fragments Cy3, A550, E570	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA
Goat antirabbit IgG (H+L) ML Coumarin AMCA, A350, E450	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA
Mouse IgG1 A45 B/B8 - Anti Human Cytokeratin 200µg/ml, 500µl in PBS with 0,05% Sodium Azide	Microment AG, München, Deutschland
Poly clonal Rabbit-Anti-Human c-erbB-2-Oncoprotein 0,32g/L	Dako Denmark A/S., Glostrup, Dänemark

Tabelle 17 Antikörper

3.2.5. Zelllinien

MCF-7	ECACC, Porton Down, Großbritannien
Sk-Br-3	ATCC, Wesel, Deutschland

Tabelle 18 Zelllinien

3.3. Methoden

3.3.1. Knochenmarkpunktion

Alle Patientinnen wurden vor der Knochenmarkpunktion (KMP) ausführlichen, schriftlich über den Ablauf des Verfahrens und über Risiken des Eingriffs aufgeklärt. Das Knochenmarkaspirat, ca. 10-20ml, wurde zum Zeitpunkt der primären Brustoperation, nach Einleitung der Intubationsnarkose, aus der Spina iliaca anterior superior, unter sterilen Bedingungen gewonnen. Anschließend, wurde das KM im tumorimmunologischen Labor der Frauenklinik der LMU, Campus Innenstadt, innerhalb von 24 Stunden wie in Kapitel 3.3.2. beschrieben aufgearbeitet.

3.3.2. Aufarbeitung des Knochenmarkaspirat und Herstellung der Objektträger

Das KM der Patientinnen wurde in 50ml Falconröhrchen überführt und mit Hanks'Salt Solution auf 50ml aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation (170g, 10 Minuten bei Raumtemperatur) trennte sich die Fettphase (Fettpartikel, Plasma, Detritus) von der Zellsuspension. Der obere Überstand, die Fettphase, wurde bis auf das Sediment abpipettiert und verworfen. In einem 15ml Röhrchen wurde anschließend 8ml Ficoll vorgegeben, über das das Sediment langsam überschichtet wurde. Es folgt eine Zentrifugation (1105g, 20 Minuten, 4°C), bei der sich die Tumorzellen zusammen mit Knochenmarkzellen, Leukozyten und peripheren Blutbestandteilen im Interphasenring anreicherten. Die durch Zentrifugation entstandene Ober- und die Interphase wurde in ein neues 50ml Falcon Röhrchen gegeben, welches mit PBS auf 50ml aufgefüllt und anschließend erneut zentrifugiert wurde (535g, 10 Minuten, 4°C). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen. Sollten nach diesen Schritten ein zu großer Anteil von Erythrozyten vorhanden sein, wurde durch die Zugabe von 1-2ml Erythrozytenlysepuffer die Lösung 5 Minuten inkubiert und anschließend mit PBS auf 50ml aufgefüllt bevor sich eine Zentrifugation (535g, 10 Minuten, 4°C) anschloss. Nach dem Entfernen des eventuell zu hohen Erythrozytenanteils wurde für alle Knochenmarksproben in gleicher Weise fortgefahren: Das Sediment wurde in 2-5ml PBS resuspendiert. Damit dieselbe Anzahl von Zellen, eine Million, auf jeden Objektträger vorhanden ist, wurde die Suspension mit Trypanblaulösung gemischt um in der

Neubauer-Zählkammer die Gesamtzellzahl und somit das nötige Volumen für die Herstellung der Objektträger zu ermitteln. Folgende Formeln wurden verwendet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Volumen (ml)} \times \text{ermittelte Zellzahl} \times 2 \times 10000$$

Die Formel zur Bestimmung des Volumens lautet:

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

Das errechnet Volumen wurde in 15ml Röhrchen überführt und auf 6ml mit PBS aufgefüllt um 12 Objektträger à 500µl Suspension herzustellen. Die Objektträger wurde mit der Knochenmarknummer und dem Datum der Herstellung beschriftet, mit jeweils 500µl Zelllösung befüllt und anschließend zentrifugiert (500rounds per minute (rpm), 5 Minuten, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abpipettiert und die Objektträger bei Raumtemperatur zwölf bis vierundzwanzig Stunden getrocknet. Anschließend wurden die fertigen Objektträger bei -80°C gelagert.

3.3.3. Herstellung der Positivkontrollen

Um sicherzustellen, dass Patientinnen mit ER- und HER2-negative DTC auch tatsächlich einen negativen Hormon- und HER2-Status der DTC haben und dies nicht durch einen Fehler im Färbevorgang hervorgerufen wurde, wurde bei jeder Färbung Positivkontrollen mitgefärbt. Als Positivkontrollen für den HER2-Status wurden Zellen der Sk-Br-3 Zelllinien verwendet. Für die Positivkontrollen des ER-Status wurden Zellen der Zelllinie MCF-7 verwendet. Alle Positivkontrollen wurden nach dem folgenden Protokoll hergestellt (Abbildung 1 zeigt die Zelllinien nach Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung):

MCF-7 Zellen, bzw. SK-Br3-Zellen, wurden zu Beginn mittels dem Vortexmischer VTX-3000L durchmischt und anschließend zentrifugiert (700g, 10 Minuten, 4°C). Die Anzahl der Zellen auf dem Objektträger sollte, wie bei den Objektträgern der Patientinnen auch, eine Million Zellen betragen. Durch die Zahl der Zellen im Zellmedium und dem Volumen wurde die Zahl der herzustellenden Objektträger bestimmt (siehe Formeln aus Kapitel 3.2.2.).

Nach der Zentrifugation wurde das Zellmedium abgeschüttet und die Zellen mit entsprechenden PBS Volumen resuspendiert, sodass pro 1ml, der auf einen Objektträger pipettiert wurde die Anzahl der Zellen 1 Million beträgt. Die Objektträger wurden beschriftet und mit 1ml der Zellpellet/PBS-Suspension befüllt. Nach einer Zentrifugation der Objektträger (500rpm, 5Minuten, Raumtemperatur) wurde der Überstand abpipettiert und die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie bei -80°C bis zu Ihrer Verwendung gelagert wurden.

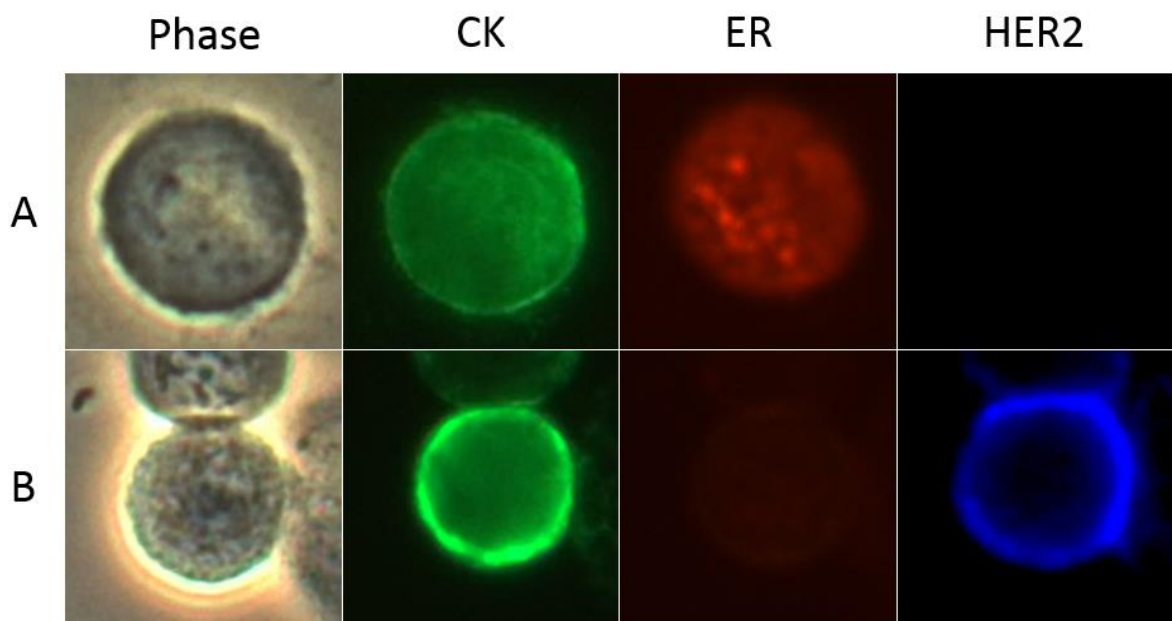


Abbildung 1 Kontrollzelllinien MCF-7 (A) und SkBr3 (B)

3.3.4. Färbeprotokoll für Patientenkollektiv

Die hier angewendete Methode zur DTC-Detektion und zur simultan Bestimmung des ER- und HER2-Status, basiert auf einer CTC-Immunfluoreszenz-Färbung [89].

Die dreifache Fluoreszenzfärbung folgte stets demselben Protokoll. Insgesamt wurde für jede Patientin in dieser Arbeit zwei Objektträger à 10^6 Zellen an unterschiedlichen Tagen gefärbt. Pro Färbevorgang wurden Objektträger von verschiedenen Patientinnen und als Positivkontrolle je ein Objektträger der Zelllinie MCF-7 und SK-Br-3 gefärbt.

Die Objektträger wurden fünf Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und die Zellen mit neutral gepufferten Formalin (15 Minuten) fixiert. Nachdem die Objektträger zwei mal fünf Minuten gewaschen wurden, wurde die Membran der Zellen auf den

Objektträgern durch das einwirken von Methanol (-20°C, zwei Minuten) permeabilisiert. In der sich anschließenden Zeit, in der die Objektträger bei Raumtemperatur 15 Minuten trockneten, wurden die Zellen auf den Objektträger der Patientinnen mit dem Dako-Pen umrundet. Ebenso die Positivkontrollen, die jedoch zusätzlich durch den Dako-Pen in zwei Hälften geteilt wurden. Durch die somit entstandene wasserabweichende Barriere um die Zellen kann gewährleistet werden gleichförmige immunhistochemische Färbeergebnisse zu erzielen und die Menge an Reagenzien zu reduzieren.

Danach wurden alle Proben drei mal fünf Minuten in PBS gewaschen. Um den unspezifischen Hintergrund bei der Färbung zu reduzieren, wurden die Zellen auf dem Objektträger mit dem Ultra V Block 15 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Objektträger mit dem Anti-human-Er α -monoclonal-rabbit-Antibody fünfundvierzig Minuten inkubiert. Dazu wurde der Anti-human-Er α -monoclonal-rabbit-Antibody, gelöst in Dako-Antibody-Diluent, in einer Konzentration von 1/100, und mit einem Volumen von 96 μ l pro Objektträger auf die Knochenmarkzellen gegeben. Bei den beiden Positivkontrollen wurde je eine Hälfte mit einem Volumen von 48 μ l mit dem Anti-human-ER α -monoclonal-rabbit-Antibody / Dako-Antibody-Diluent Gemisch und die andere Hälfte mit isolierten Dako-Antibody-Diluent benetzt. Eine Waschung von zwei mal zehn Minuten wurde anschließend für alle Objektträger durchgeführt. Darauf wurden die Zellen auf dem Objektträger mit dem Goat-antirabbit-IgG (H+L) Fab Fragments -Cy3 / Dako-Antibody-Diluent, in einer Konzentration von 1/500 (96 μ l pro Patientinnenobjektträger, 48 μ l pro Hälfte bei Positivkontrolle) auf die Objektträger aufgetragen. Zwei Waschungen à zehn Minuten schlossen sich an.

Im zweiten Schritt der Färbung wurden die AK Anti-human-erbB2-polyclonal-rabbit-Antibody und Anti-human-cytokeratin-mouse-Antibody in Dako-Antibody-Diluent gelöst und mit dem Volumen von 96 μ l und in einer Konzentration von 1/100 (HER2) und 1/200 (CK) auf die Objektträger aufgetragen. Bei den Positivkontrollen wurde dieselbe Hälfte mit AK benetzt, wie im ersten Schritt und die andere Hälfte, entsprechend Schritt eins, mit Dako-Antibody-Diluent. Nach fünfundvierzig Minuten wurden alle Objektträger zweimal 10 Minuten gewaschen. Entsprechend dem Vorgehen aus dem ersten Schritt wurden nun die Zellen mit einem fluorochrom markierten AK inkubiert.

Goat-antirabbit-IgG (H+L) ML –Coumarin AMCA / Dako-Antibody-Diluent und Goat-antimouse-IgG (H+L) ML –DyeLight488 / Dako-Antibody-Diluent mit einem Volumen von 96µl und in einer Konzentration von jeweils 1/200 gelöst und auf für 30 min auf die Objektträger aufgetragen. Es schloss sich eine Waschung von zwei mal zehn Minuten mit PBS an.

Alle Objektträger wurden 30 Minuten getrocknet und abschließend mit Glycerogelatine und Deckgläschen verdeckelt. In einer dunklen Umgebung wurden sie bis zur Analyse innerhalb der nächsten beiden Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.3.5. Analyse

Die Analyse erfolgte manuell mit dem Axiophot Mikroskop (Carl Zeiss, Deutschland) unter standardisierten Bedingungen innerhalb von maximal achtundvierzig Stunden nach der Färbung. Alle Objektträger wurden von 2 unabhängigen Personen analysiert. In unklaren Fällen wurde eine weitere Person zur Evaluierung der Zellen hinzugezogen.

Für die Identifikation der DTC orientierte man sich an den Empfehlungen von Fehm et al. für die standardisierte Detektion von DTC [67].

Die Proben wurden mäanderförmig in einer zwanzigfachen Vergrößerung auf das Vorhandensein von DTC gescreent. Beim Fund einer grünen zirkulären Erscheinung als Zeichen für CK-Positivität wurde die Zelle in einer 40-fachen Vergrößerung betrachtet. Den Kriterien aus Tabelle 19 und Tabelle 20 entsprechend wurden die Zellen beurteilt.

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

Tabelle 19 Kriterien zur Identifikation von Tumorzellen [67]

Klassifizierung von DTC				
Positiv	CK-positive/immunzytochemisch	positive	Zellen,	Morphologie
	entsprechend einer DTC			
Negativ	Kein Nachweis immunzytochemisch positiver Zellen oder Nachweis von immunzytochemisch-positiven Zellen ohne charakteristische DTC-Morphologie (z.B. hämatopoetische Zellen)			

Tabelle 20 Klassifizierung von DTC [67]

Die weitere Charakterisierung einer DTC wurde mit den anderen Filtern und den charakteristischen Fluoreszenzsignalen durchgeführt (siehe Tabelle 21). Der ER-Status einer DTC wurde als positiv gewertet, wenn eine nukleäre Färbung vorhanden war. Der HER2-Status einer DTC wurde, entsprechend den Kriterien zur HER2-Bestimmung von Solomayer et al [90], als positiv gewertet, wenn eine komplette membranöse Färbung vorhanden war. Sowohl für den ER- als auch den HER2-Status muss die Färbung bei derselben Zelle aufgetreten sein, die als DTC positiv definiert wurde.

	Lokalisation der Färbung	AK	Anregungsspektrum der Fluoreszenzfarbstoffe	Emissionsspektrum der Fluoreszenzfarbstoffe	Filter
CK	membranös	Goat antimouse IgG (H+L) ML DyLight488	492nm	510nm	HC480/17
ER	nukleär	Goat antirabbit IgG (H+L) Fab Fragments Cy3	550nm	570nm	HC556/20
HER2	membranös	Goat antirabbit IgG (H+L) ML Coumarin AMCA	350nm	450nm	HC370/36

Tabelle 21 Lokalisation der Färbung, Anregungs- und Emissionsspektren

Alle CK positive Zellen, sowie deren ER- und HER2-Status wurden dokumentiert. Die Koordinate der CK positiven Zelle wurde zusätzlich mit Hilfe der am Objektisch des Mikroskops vorhandenen Skalierung notiert.

Mit der Kamera AxioCam MR und der AxioVision 4.8.2 Software wurden Fotos in einer vierzigfachen Vergrößerung unter standardisierten Bedingungen aufgenommen. Die Fotoaufnahmen wurden zu Dokumentationszwecken, zur Verifizierung der erhobenen Charakteristika und zur Diskussion bei fraglichen Befunden herangezogen. Für die Fotos wurde für den jeweiligen Filter (Phase, CK, ER, HER2) nach mehrmaligen Färben der Zelllinien SK-Br-3 und MCF-7 eine standardisierte Belichtungszeit festgelegt. Diese betrug entsprechend 700ms (Phase), 500ms (HC370/36), 2500ms (HC480/17) und 3500ms (HC556/20).

3.4. Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen erfolgte mit dem „Statistical Package for the Social Sciences“ (SPSS Version 22, IBM, USA) für Windows.

Korrelationen zwischen dem ER- oder HER2-Status der DTC und den Eigenschaften des PT wurde mittel dem Chi-Quadrat-Test oder dem ‚Exakter Test nach Fisher‘ überprüft. Die Korrelationen zwischen dem ER-Status der DTC und dem IRS des PT wurde mit dem Cochran-Armitage-Test untersucht. Bei p-Werten kleiner als 0,05 wurde ein signifikanter Unterschied angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Disseminierte Tumorzellen

4.1.1. DTC Häufigkeitsverteilung pro Patientin

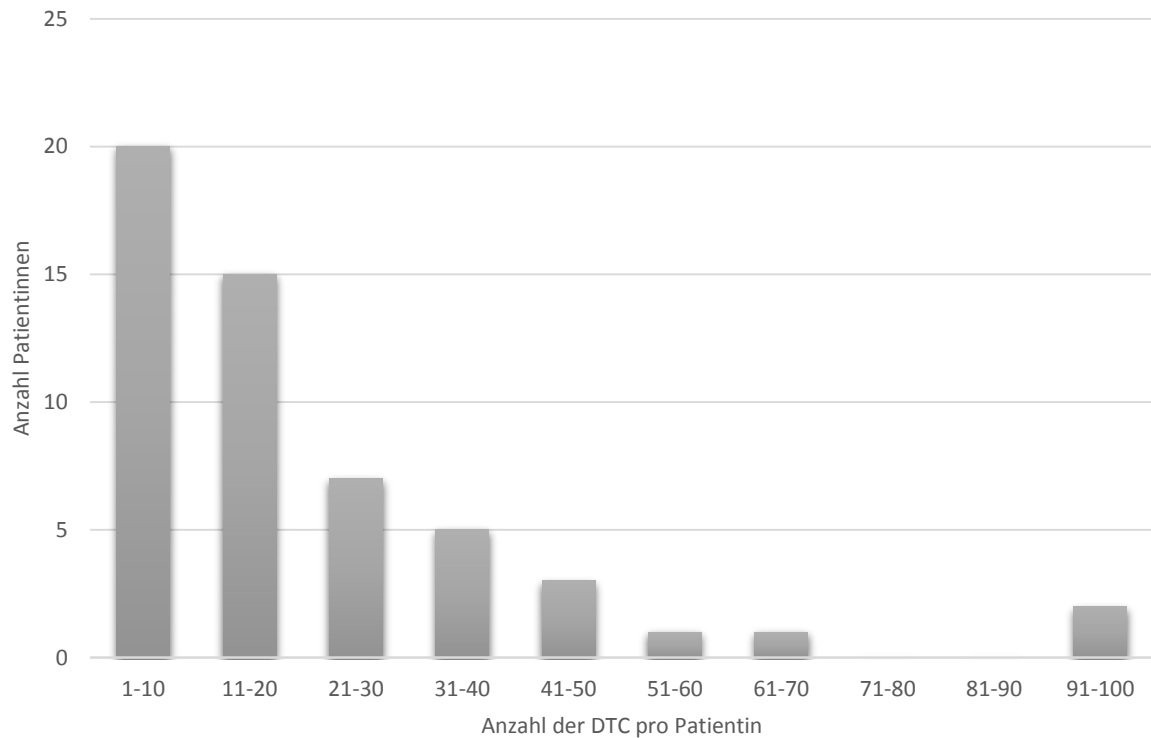


Diagramm 2 Anzahl der DTC pro Patientin

Es wurde zwischen einer und 95 DTC pro Patientin detektiert. Die mediane Anzahl DTC pro Patientin war 13.

Bei den meisten Patientinnen konnten nur wenig DTC in den 2×10^6 pro Patientin gefärbten Zellen detektiert werden. Bei der Mehrzahl der Patientinnen ($n=35$) wurden zwischen einer und 20 DTC detektiert. Lediglich bei 4 Patientinnen konnten mehr als 50 DTC nachgewiesen werden.

4.1.2. Häufigkeit detektierter DTC

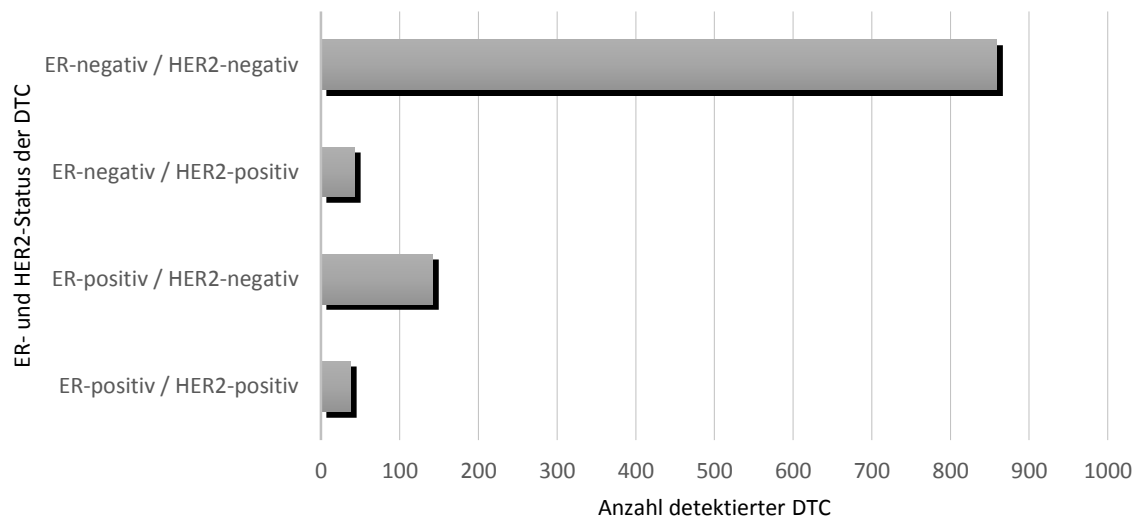


Diagramm 3 ER- und HER2-Status der detektierten DTC

Bei den 54 Patientinnen wurden 1082 DTC detektiert. Insgesamt wurden 180 ER-positive DTC und 81 HER2-positive DTC detektiert. Die meisten DTC (79%) waren ER-negativ / HER2-negativ.

43 (4%) der insgesamt 1082 detektierten DTC waren ER-negativ / HER2-positiv und 142 (13%) der DTC waren ER-positiv / HER2-negativ. Lediglich 38 (4%) aller detektierten DTC waren sowohl ER-positiv / HER2-positiv.

Abbildung 2 bis 5 zeigen exemplarisch DTC aus unserem Patientenkollektiv.

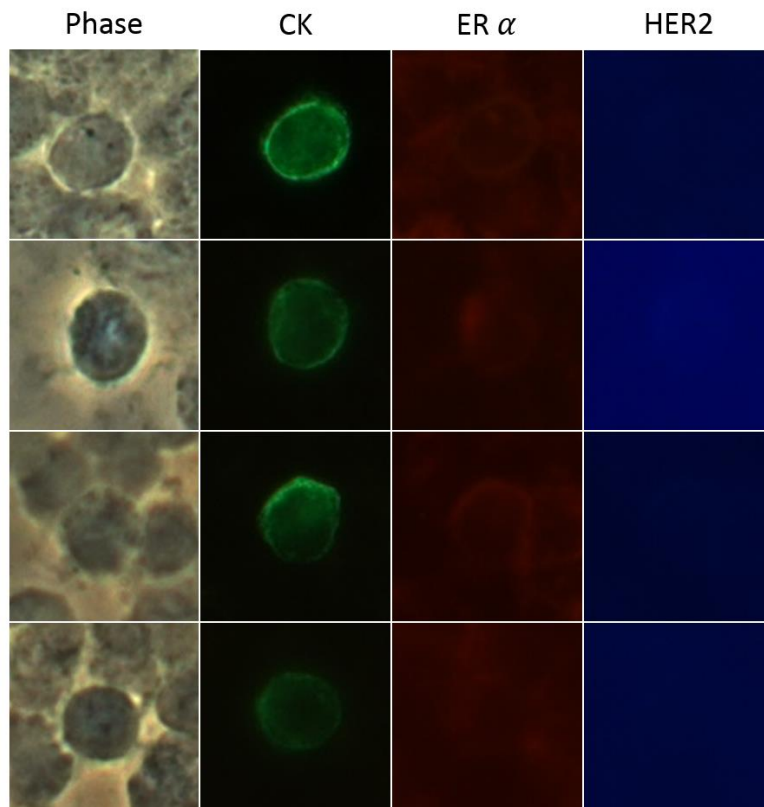


Abbildung 2 Typische CK-positive DTC Beispiele aus dem Patientenkollektiv

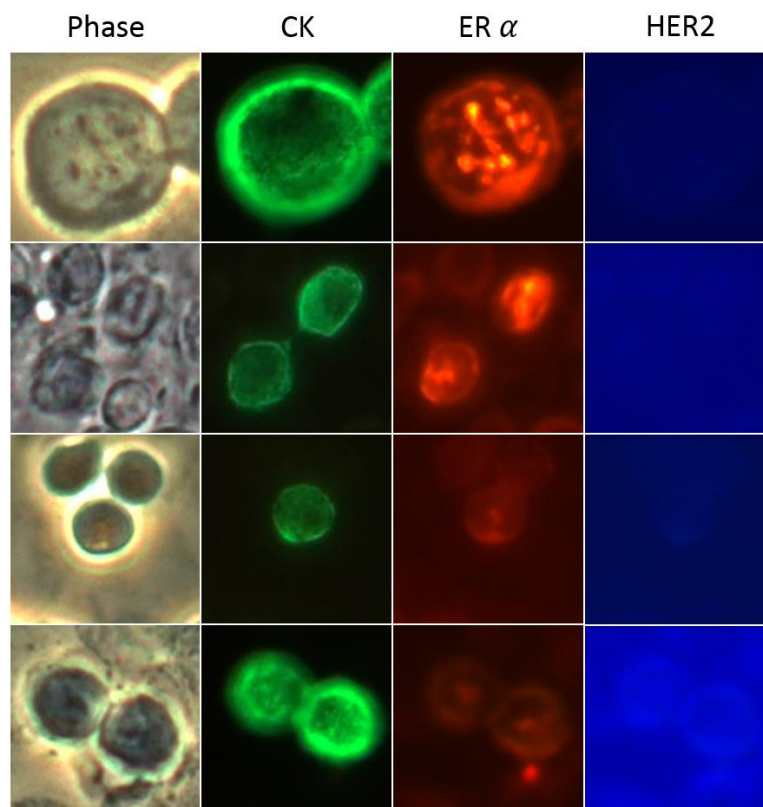


Abbildung 3 Typische CK/ER-positive DTC aus dem Patientenkollektiv, verschiedene Intensitäten der ER-Expression

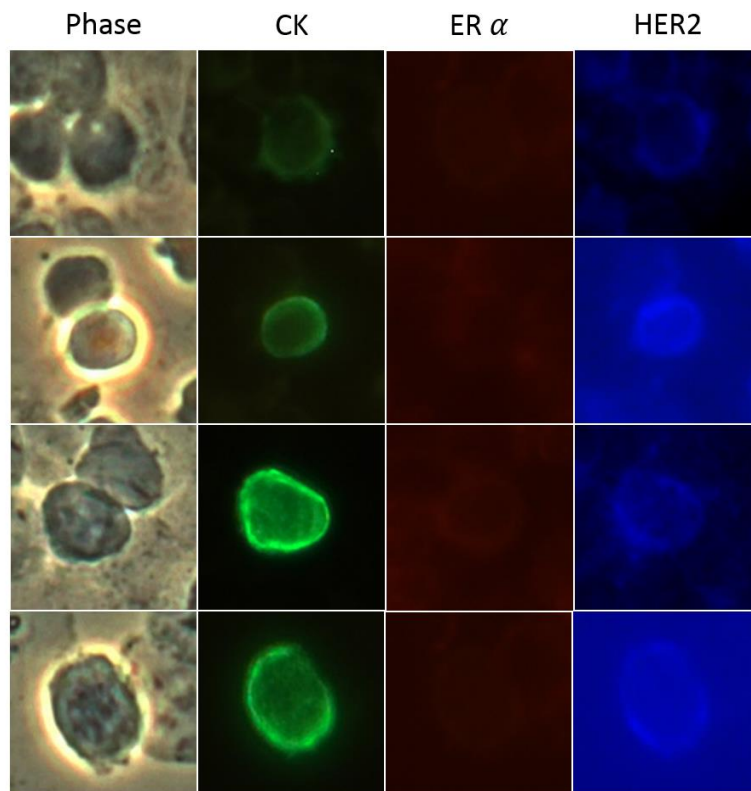


Abbildung 4 Typische CK/HER2-positive DTC aus dem Patientenkollektiv

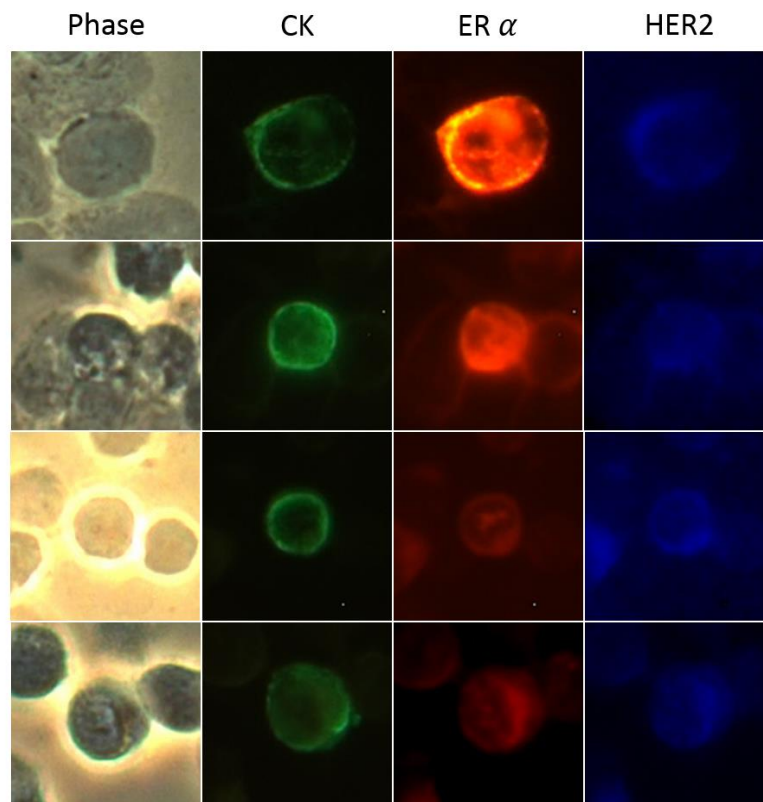


Abbildung 5 Typische CK/ER α /HER2-positive DTC aus dem Patientenkollektiv

4.1.3. ER- und HER2-Status der DTC je Patientin

Eine Patientin wurde als HER2- oder ER-positiv gewertet, wenn mindestens eine HER2-, bzw. ER-positive DTC detektiert wurde.

DTC	n	%
ER-positiv	40	74
HER2-positiv	24	44
ER-negativ	51	94
HER2-negativ	52	96

Tabelle 22 Anzahl der Patientinnen mit ≥ 1 ER- oder HER2-positiver oder negativer DTC

94% der Patientinnen hatten mindestens eine ER-negative DTC und 74% mindestens eine ER-positive DTC. Hinsichtlich des HER2-Status konnte gezeigt werden, dass die meisten Patientinnen mindestens eine HER2-negative DTC hatten (96%). Bei 44% der Patientinnen konnte mindestens eine HER2-positive DTC nachgewiesen werden.

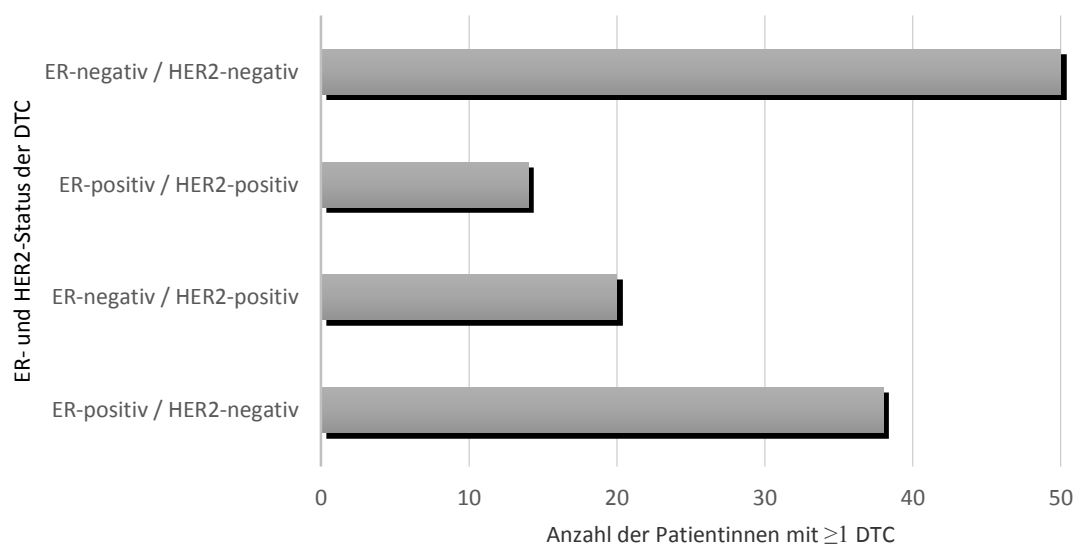


Diagramm 4 Anzahl der Patientinnen mit ≥ 1 DTC

ER-positive / HER2-positive Zellen lagen bei 14 (26%) der Patientinnen vor. DTC die ER-negativ / HER2-negativ waren, konnte bei fast allen Patientinnen (93%, n=50) detektiert werden. Von diesen hatten 10 Patientinnen ausschließlich ER-negative / HER2-negative DTC.

4.2. Vergleich des ER- und HER2-Status zwischen DTC und PT

4.2.1. ER-Status

	ER-Status	DTC		Total (%)
		nur ER-negative DTC (%)	≥1 ER-positive DTC (%)	
Tumor	ER-negativ, n (%)	6 (11)	6 (11)	12 (22)
	ER-positiv, n (%)	8 (15)	34 (63)	42 (78)
	Total, n (%)	14 (26)	40 (74)	54 (100)

Tabelle 23 Korrelation des ER-Status der DTC mit dem ER-Status des PT

Die Korrelationsrate zwischen dem ER- Status des PT und der DTC lag bei 74%.

42 Patientinnen in dieser Arbeit hatten einen ER-positiven PT. 34 von diesen hatten mindestens eine ER-positive DTC. Bei 39 Patientinnen mit einem ER-positiven PT konnte mindestens eine ER-negative DTC nachgewiesen werden. 8 der Patientinnen mit ER-positiven PT hatten ausschließlich ER-negative DTC im KM.

Bei Patientinnen, die einen ER-positiven PT hatten, wurden signifikant häufiger mindestens eine ER-positive DTC im Vergleich zu Patientinnen mit einem ER-negativen PT detektiert (Chi-Quadrat Test, $\chi^2=4,7$, $p=0,031$).

Von den insgesamt 12 Patientinnen mit einem ER-negativen PT hatten alle Patientinnen mindestens eine ER-negative DTC. Ausschließlich ER-negative DTC bei ER-negativen PT konnten in 50% der Fälle beobachtet werden. Bei der anderen Hälfte der Patientinnen mit einem ER-negativen PT konnte mindestens eine ER-positive DTC detektiert werden.

Der ER-Status von DTC (zum Beispiel mindestens eine ER-positive DTC) war nicht mit dem IRS des PT assoziiert (Chochran-Armitage Test for Trend, $p=0,208$).

4.2.2. HER2-Status

	HER2-Status	DTC		Total (%)
		nur HER2-negative DTC (%)	≥1 HER2-positive DTC (%)	
Tumor	HER2-negativ, n (%)	26 (48)	22 (41)	48 (89)
	HER2-positiv, n (%)	4 (7)	2 (4)	6 (11)
	Total, n (%)	30 (55)	24 (45)	54 (100)

Tabelle 24 Korrelation des HER2-Status der DTC mit dem HER2-Status des PT

Die Korrelationsrate zwischen dem HER2-Status des PT und der DTC lag bei 52%.

Sechs Patientinnen in dieser Arbeit hatten einen HER2-positiven PT. Bei zwei dieser konnte mindestens eine HER2-positive DTC detektiert werden. Bei allen Patientinnen mit einem HER2-positiven PT konnte mindestens eine HER2-negative DTC detektiert werden. Bei vier (7%) aller Patientinnen mit einem HER2-positiven PT konnten ausschließlich HER2-negative DTC im KM nachgewiesen werden.

Von den insgesamt 48 Patientinnen mit einem HER2-negativen PT konnten bei 22 mindestens eine HER2-positive DTC detektiert werden. Ausschließlich HER2-negative DTC wurden bei 26 Patientinnen detektiert.

Bei 46 der insgesamt 48 Patientinnen mit einem HER2-negativen PT und bei allen Patientinnen mit einem HER2-positiven PT konnte mindestens eine HER2-negative DTC detektiert werden.

Die Wahrscheinlichkeit mindestens eine HER2-positive DTC zu detektieren war nicht signifikant mit dem HER2-Status des PT assoziiert (Chi-Quadrat Test, $\chi^2=0,34$, $p=0,56$).

4.2.3. Triple-negativer PT

In dieser Studie hatten 10 Patientinnen einen triple-negativen PT. Die Mehrzahl der Patientinnen mit einem triple-negativen PT (70%) hatte mindestens eine ER- oder HER2-positive DTC, bzw. eine ER-positive / HER2-positive DTC. Bei 90% der Patientinnen wurde mindestens eine DTC detektiert die ER-negativ / HER2-negativ war.

4.3. Heterogenität des ER- und HER2-Status der DTC

PT	DTC Status	1 DTC Profil				2 DTC Profile			3 DTC Profile		4 DTC Profile
	ER+/HER2-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
	ER+/HER2+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
	ER-/HER2-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	ER-/HER2+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
ER+/HER2- n= 38	n	2	1	5		13	1	2	2	4	8
	%	5,3	2,6	13,1		34,2	2,6	5,3	5,3	10,5	21,1
ER+/HER2+ n= 4	n			1		2					1
	%			25,0		50					25,0
ER-/HER2- n=10	n			3	1	3		1		1	1
	%			30,0	10,0	30,0		10,0		10,0	10,0
ER-/HER2+ n=2	n			1						1	
	%			50,0						50,0	
Total n= 54	n	2	1	10	1	18	1	3	2	6	10
	%	3,7	1,9	18,5	1,9	33,3	1,9	5,5	3,7	11,1	18,5

Tabelle 25 Kombiniertes ER-/HER2-Status der DTC und Vergleich mit dem ER-/HER2-Status des PT; + = positiv, - = negativ, n = Anzahl der Patientinnen mit mindestens einer ER- oder HER2-positiven/negativen DTC

Die Heterogenität des kombinierten ER- und HER2-Status der DTC und die Assoziation mit dem ER- und HER2-Status des PT werden in Tabelle 25 gezeigt. Der ER-/HER2-Status der DTC einer Patientin wurde als heterogen angesehen, wenn sich die detektierten DTC im KM einer Patientin im Hinblick auf den ER-/HER2-Status des PT unterschieden. Es gibt vier verschiedene ER-/HER2-Profile: ER-positiv/HER2-negativ, ER-positiv/HER2-positiv, ER-negativ/HER2-negativ und ER-negativ/HER2-positiv. Bei 48 Patientinnen aus unserem Patientenkollektiv, wurde mehr als eine DTC detektiert. Bei 40 (83%) dieser konnte eine heterogene ER- und HER2-Expression nachgewiesen werden. 22 (46%) dieser Patientinnen hatten DTC mit zwei verschiedenen ER-/HER2-Profilen. Drei verschiedene ER-/HER2-Profilen konnten bei acht (17%) der Patientinnen nachgewiesen werden. Alle vier verschiedenen Möglichkeiten der ER- und HER2-Expression konnten bei zehn Patientinnen (25%) nachgewiesen werden. Sieben der acht Patientinnen mit

mehr als einer DTC und einer heterogenen ER- und HER2- Expression (zum Beispiel alle DTC mit demselben ER-/HER2-Profil) hatten ausschließlich ER-negative/HER2-negative DTC (Spanne 3-31 DTC). Ausschließlich ER- positive / HER2- positive DTC konnte nur bei einer der 8 Patientinnen, bei denen eine homogene ER-/HER2-Expression vorlag, nachgewiesen werden.

Sieben der 10 Patientinnen mit einem triple-negativen PT hatte mindestens eine DTC welche ER-positiv, HER2-positiv oder ER-positiv/HER2-positiv war. Andererseits konnten bei neun der Patientinnen mit einem triple-negativen PT mindestens eine DTC nachgewiesen werden, die weder ER-positiv noch HER2-positiv war.

In Abbildung 6 sind exemplarisch DTC mit allen vier möglichen ER- und HER2- Expressionsprofilen dargestellt, die bei einer Patientin detektiert wurden.

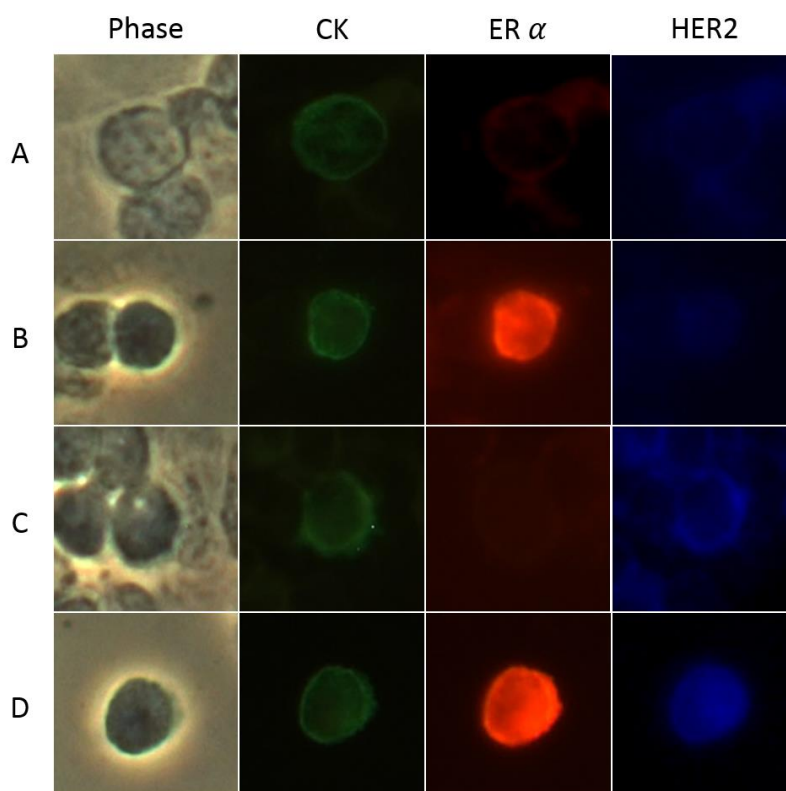


Abbildung 6 Heterogenität der DTC bei einer Patientin mit allen vier möglichen Profilen der DTC (A: CK positive DTC, B: CK und ER-positiv DTC, C: CK und HER2-positiv DTC, D: CK, ER und HER2-positiv DTC)

4.4. Assoziation des ER- und HER2-Status der DTC mit klinisch pathologischen Faktoren

Der ER-Status von DTC war signifikant mit dem ER-Status des PT assoziiert (Chi-Quadrat-Test, p-Werte >0,031). ER-positive DTC waren meist, jedoch nicht statistisch signifikant, bei PR-positiven PT zu finden (Chi-Quadrat-Test, p=0,070) und bei Patientinnen mit einem low-grade Tumor (Chi-Quadrat-Test, p=0,059). Zu weiteren klinischpathologischen Faktoren gab es keine signifikante Assoziation (Chi-Quadrat-Test, alle p-Werte >0,05).

Im Gegensatz dazu gab es keinerlei Assoziationen zwischen dem HER2-Status der DTC (zum Beispiel das Vorhandensein von mindestens einer HER2-positiven DTC) und klinisch pathologischen Faktoren (Chi-Quadrat-Test, alle p-Werte >0,4).

Faktor	n	≥1 ER-positive DTC			≥1 HER2-positive DTC			
		n	%	P	n	%	p	
Menopausenstatus	Prämenopausal	15	11	20,4	0,939	17	31,5	0,839
	Postmenopausal	39	29	53,7		7	13,0	
Stadium	pT1	29	24	44,4	0,433	13	24,1	0,993
	pT2	18	11	20,4		8	14,8	
	pT3	7	5	9,3		3	5,6	
Lymphknotenbeteiligung	pN0	35	28	51,9	0,382	15	27,8	0,522
	pN1	10	7	12,9		5	9,3	
	pN2	3	1	1,9		2	3,8	
	pN3	5	3	5,6		1	1,9	
	nicht bekannt	1						
Grading	G1	5	5	9,3	0,059	1	1,9	0,486
	G2	31	25	46,3		14	25,9	
	G3	18	10	18,5		9	16,7	

Fortsetzung der Tabelle von Seite 46

Faktor		n	≥1 ER-positive DTC			≥1 HER2-positive DTC		
			n	%	P	n	%	p
Histologie	Duktal	40	27	50	0,452	17	31,4	0,348
	Lobulär	10	9	16,7		5	9,3	
	Andere	4	4	7,4		2	3,7	
ER-Status des PT	Negativ	12	6	11,1	0,031	5	9,3	0,826
	Positiv	42	34	63,0		19	35,2	
PR-Status des PT	Negativ	20	12	22,2	0,07	8	14,8	0,614
	Positiv	34	28	51,9		16	29,6	
HER2-Status des PT	Negativ	48	36	66,7	0,661	22	40,7	0,561
	Positiv	6	4	7,4		2	3,7	

Tabelle 26 Korrelation des ER- und HER2-Status der DTC mit klinisch pathologischen Faktoren; n = Anzahl der Patientinnen, % = Prozent des Gesamtkollektivs, p = p-Wert (n.s. = nicht signifikant bei $p > 0,05$, signifikant bei $p < 0,05$)

5. Diskussion

5.1. Kritische Bewertung der Studie

5.1.1. Detektionsort der MRD

Tumorzellen können sowohl im Blut als auch im KM nachgewiesen werden [52]. Bei einer KMP werden selten Komplikationen beschrieben [91]. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass es sich hierbei um einen invasiven und für die Patientinnen teilweise unangenehmen Eingriff handelt. Blut kann leichter und weniger invasiv als KM gewonnen werden. Studien zeigen jedoch, dass CTC seltener detektiert werden als DTC [52, 79, 92-94]. Dies könnte durch das ungünstige Tumorzell/Blut-Verhältnis und die damit im Vergleich zur DTC-Detektion erschwerte CTC-Detektion bedingt sein, Pierga et al. bestätigten dies [58]. Zudem scheint die Prognose des Mammakarzinoms eher vom Vorliegen der DTC als der CTC abzuhängen [92, 94].

Bezüglich des Phänotyps scheint es komplexere Zusammenhänge zwischen DTC und dem PT als zwischen CTC und dem PT zu geben [52]. Eine Divergenz des Phänotyps zwischen DTC und dem PT konnte häufiger beobachtet werden als zwischen CTC und dem PT. Krishnamurthy et al. zeigten, dass HER2 Genamplifikationen sowohl bei CTC als auch bei DTC vorkommen können. Dabei konnten HER2-positive Zellen häufiger im KM als im Blut detektiert werden und eine Diskordanz des HER2-Status von DTC und PT wurde häufiger bei DTC (28,2%) als bei CTC (15%) beobachtet [66].

Entsprechend haben wir die Detektion von DTCs aus KM gewählt und die KMP mit der Narkose der im Rahmen der Behandlung notwendigen Brust-OP kombiniert, um die Belastung für die Patientin so gering als möglich zu halten.

5.1.2. Methode und Patientenkollektiv

DTC sind ein seltenes Ereignis mit ca. 1-2 DTC pro einer Million mononuklärer Zellen im KM [78]. Die geringe Anzahl von Tumorzellen im Blut oder im KM, vor allem bei Patientinnen in frühen Stadien der Erkrankung, stellt eine Herausforderung bei der Detektion dar. Eine initiale Anreicherung der Tumorzellen im Knochenmarkaspirat, zum Beispiel durch Dichtezentrifugation, immunomagnetische Verfahren, kann die Detektionsrate erhöhen [79, 88]. In dieser Arbeit kam die Dichtezentrifugation zum Einsatz. Allerdings gilt es zu beachten, dass es durch diese Verfahren auch zu einem Tumorzellverlust kommen kann. Einen weiteren Einfluss auf die Tumorzellanzahl könnte eine nicht zügige Weiterverarbeitung des gewonnenen Knochenmarkaspirates nach der Entnahme sein. Alle in dieser Arbeit gewonnenen Knochenmarkaspirate wurden innerhalb von 24 Stunden nach Probegewinnung aufgearbeitet und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

In dieser Arbeit verringerte sich das ursprüngliche Patientenkollektiv wegen mangelnder Qualität der Zellen auf den Objektträgern. Patientinnen mit der Diagnose Mammakarzinom im Jahr 2005 oder früher mussten nachträglich ausgeschlossen werden. Eine endgültig zufriedenstellende Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Am wahrscheinlichsten scheint eine nicht adäquate Aufbewahrung der Objektträger, am ehesten durch eine unterbrochene Kühlkette bedingt.

Es existieren verschiedene Arbeiten die sich mit der Detektion von DTC bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom, sowie der Bestimmung des ER-Status oder des HER2-Status der DTC beschäftigen. Eine kombinierte Methode zur ER- und HER2-Charakterisierung der Tumorzellen im KM, wie die von uns durchgeführte, gibt es nach aktueller Datenlage nicht. Diese hat mehrere Vorteile im Anbetracht des klinischen und ökonomischen Nutzens. Die Methode ist einfach durchzuführen und man erhält schnell Aussagen über das Vorliegen von DTC und deren ER- und HER2-Status.

Um Fehler bei der Durchführung und Auswertung der Experimente zu vermeiden wurden alle Arbeitsschritte in einem standardisierten Vorgehen durchgeführt.

Die Subjektivität der Untersucher bei der Analyse der Objektträger stellt jedoch einen Schwachpunkt der Methode dar. Um möglichst alle DTC zu erfassen, wurden in dieser Arbeit die Objektträger in zwanzigfacher Vergrößerung gescreent. Durch die Analyse der

Objektträger durch zwei unabhängige Betrachter und das Hinzuziehen einer weiteren Person in unklaren Fällen sollte die Sensitivität der Analyse gesteigert werden. Anhand der Fotodokumentation der DTC konnten die Zellen bei Unklarheiten, vor allem im Hinblick auf den ER- und HER2-Status, im Nachhinein evaluiert werden, wodurch die Spezifität gesteigert wurde.

Zu beachten ist, dass es bei häufigem und langem Mikroskopieren zu einem Verblässen der Färbung kommen kann. Dies ist insbesondere bei der Fotodokumentation der Zellen durch lange Belichtungszeiten relevant. Deswegen erfolgte die Fotodokumentation durch den zweiten Betrachter, um auch nur schwach fluoreszierende Zellen zu detektieren.

Weitere Limitationen dieser Studie sind die kleine Fallzahl und der retrospektive Charakter. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten, bedarf es gegebenenfalls einer größer angelegten Studie. Auch wäre es im Rahmen einer weiterführenden Studie sinnvoll, alle Patientinnen mit der Diagnose Mammakarzinom einzuschließen, auch wenn kein Primärscreening auf das Vorhandensein von DTC stattgefunden hat. Hiermit könnte auch die Sensitivität der Methode im Vergleich mit anderen, zum Beispiel APAAP, untersucht werden. Zudem wäre ein Follow-Up Untersuchung sinnvoll, um zu zeigen, ob HER2-positive und und/oder ER-positive DTC durch eine systemische Chemotherapie, endokrine oder HER2-zielgerichtete Antikörpertherapie eliminiert werden können.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Zusammenfassung unserer Ergebnisse

Insgesamt wurden bei unserem Kollektiv von 54 Patientinnen 1082 DTC nachgewiesen. Die durchschnittliche Anzahl an detektierten Tumorzellen war 20 (zwischen 1 und 95 DTC pro Patientin).

Die meisten detektierten DTC waren ER-negativ oder HER2-negativ, bzw. ER-negativ / HER2-negativ (79%). 93% der Patientinnen hatte mindestens eine ER-negative / HER2-negative DTC, 74% mindestens eine ER-positive und 44% mindestens eine HER2-positive DTC. Mindestens eine DTC die ER-positiv / HER2-positiv war, konnte bei 26% der Patientinnen detektiert werden.

Die Übereinstimmung des ER-Status der DTC und des PT war 74%. 34 der 42 Patientinnen mit einem ER-positiven PT hatten mindestens eine ER-positive DTC und bei fast allen Patientinnen konnte mindestens eine ER-negative DTC detektiert werden. Lag eine ER-negativer PT vor, hatte die Hälfte der Patientinnen mindestens eine ER-negative DTC.

Die Übereinstimmung des HER2-Status der DTC und des PT war 52%. Bei einem Drittel der Patientinnen mit einem HER2-positiven PT konnte mindestens eine HER2-positive DTC und bei allen Patientinnen mindestens eine HER2-negative DTC detektiert werden. Bei 48 Patientinnen lag ein HER2-negativer PT vor, davon hatten 54% der Patientinnen ausschließlich HER2-negative DTC im KM.

Eine heterogene ER- und HER2-Expression der DTC bei Patientinnen mit mehr als einer DTC lag in 83% der Fälle vor. Es wurden alle möglichen Kombinationen des ER- und HER2-Status der DTC beobachtet, unabhängig von dem Status des entsprechenden PT.

Der ER-Status der DTC war nicht mit dem des PT assoziiert. Die Wahrscheinlichkeit mindestens eine HER2-positive DTC zu detektieren war nicht mit dem HER2-Status des PT assoziiert.

5.2.2. ER- und HER2-Status der DTC und Korrelation mit PT

5.2.2.1. ER-Status

In der Arbeit „ERalpha-status of disseminated tumor cells in bone marrow of primary breast cancer patients“ [74] bestimmten Fehm et al. mittels einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung den ER-Status von DTC im KM und verglichen ihn mit dem des PT. Hier zeigten die meisten DTC einen ER-negativen Status, obwohl der PT meist ER-positiv war. 12 der 88 Patientinnen mit ER-positiven PT hatten ER-positive DTC. Die Übereinstimmung des ER-Status des PT mit dem der DTC betrug 28%. Ditsch et al. untersuchten ebenfalls den ER-Status der DTC und verglichen ihn mit dem des PT. In Einklang mit der Arbeit von Fehm et al. waren die meisten detektierten DTC ER-negativ, trotz einem in der Mehrzahl der Fälle ER-positiven PT. Lediglich 18% der Patientinnen mit einem ER-positiven PT hatten ER-positive DTC im KM. Die Konkordanz zwischen PT und DTC betrug 47% [95].

Studie	n		ER+ PT	ER- PT	ER+ DTC	ER- DTC	Konkordanz PT und DTC
Fehm et al. [74]	107	n	88	19	13	94	28%
		%	82	18	12	88	
Ditsch et al. [95]	17	n	11	6	2	15	47%
		%	65	35	12	88	
Eigene Studie	54	n	42	12	40	14	74%
		%	78	22	74	26	

Tabelle 27 Vergleich des ER-Status des PT mit dem der DTC, n = Anzahl, + = positiv, - = negativ

Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die meisten detektierten DTC ER-negativ (83%) sind, trotz einem in der Mehrzahl der Fälle ER-positiven PT (78%). Eine Übereinstimmung des Hormonrezeptorstatus des PT und der DTC konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Allerdings war diese größer (74%) als in den Arbeiten von Fehm et al. und Ditsch et al. (28% und 47%). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass es nur eine sehr geringe

Übereinstimmung im ER-positiven Setting in der Arbeit von Fehm et al. gab. Bei lediglich 11% der Patientinnen mit einem ER-positiven PT konnten in der Arbeit von Fehm et al. ER-positive DTC detektiert werden (vs. 81% in dieser Arbeit). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass diese Methode sensitiver für die ER-Detektion ist, als die von Fehm et al. beschriebene. Das kleine Patientenkollektiv in der Arbeit von Ditsch et al. (n=17) kann eine weitere Begründung für die größere Konkordanz in dieser Arbeit sein.

Trotz der hohen Konkordanz des ER-Status zwischen PT und DTC bei den meisten Patientinnen in dieser Arbeit unterscheidet sich der ER-Status der DTC von dem des PT bei 26% der Patientinnen (bei Fehm et al. und Ditsch et al. sogar 72% bzw. 53%). Patientinnen mit einem ER-negativen Tumor und ER-positiven DTC (in dieser Arbeit 11% der Patientinnen) könnten möglicherweise von einer endokrinen Therapie profitieren die sich nicht nur nach dem Primarius richtete, sondern auch den Phänotyp der DTC berücksichtigt.

In dieser Arbeit wurde der ER-Status als positiv gewertet, wenn mindestens eine DTC mit entsprechenden Expressionsmuster nachgewiesen werden konnte. Eine Subspezifizierung des ER-Status der DTC simultan zum IRS nach Remmele und Stegner [14] beim Primärtumor in schwache, mäßige und starke Intensität und Prozentsatz der positiven Zellkerne wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Betrachtet man die exemplarisch ausgewählten ER-positiven Zellen dieser Arbeit (Abbildungen 5) lässt sich erkennen, dass es Unterschiede in der Rezeptorexpression gab. Ob dies an der Rezeptorexpression, der Stabilität der Steroidrezeptoren, der Färbung oder der Qualität der Objektträger (Transport, Fixationszeiten, Lagerung der Objektträger, etc.) lag, ist retrospektiv nicht zu beurteilen. Die Klassifizierung in schwache, mäßig und starke ER-Expression sowie die photometrische Bestimmungsmöglichkeiten und eine bildanalytische Objektivierung der Färbereaktion der Hormonrezeptor- und HER2-Expression bei DTC war nicht Teil dieser Arbeit und müsste an anderer Stelle, z.B. im Rahmen einer weiteren Arbeiten untersucht werden.

Die Hormon- und HER2-Rezeptorexpression der DTC wurde in dieser Arbeit mit der Expression in einem Tumorschnitt verglichen. Es gilt zu diskutieren ob einzelne Zellen einen guten Einblick in die Tumorbilologie gegeben

Hypothesen die erklären könnten, warum die meisten detektierten DTC ER-negativ sind und in der Mehrzahl der Fälle eine Divergenz des ER-Status zwischen PT und DTC beobachtet werden kann, werden in Kapitel 5.2.3 ausgeführt.

5.2.2.2. HER2-Status

Bezüglich des HER2-Status gibt es eine relevante Anzahl an Studien, die sich mit dem Vergleich PT und DTC befassen (siehe Tabelle 28).

Studie	n		HER2 + PT	HER2 - PT	HER2 + DTC	HER2 - DTC	Konkordanz HER2 PT und DTC
Krawczyk [50]	31	n	5	26	8	23	64%
		%	16	84	26	74	
Solomayer [90]	45	n	13	32	20	25	62%
		%	29	71	44	56	
Becker [96]	105	n	26	79	22	83	77%
		%	25	75	21	79	
Braun [97]	24	n	7	17*	15	9	58%
		%	29	71*	62,5	37,5	
Hartkopf [63]	151	n	27	124	79	72	51%
		%	18	82	52	48	
Krishnamurthy [66]	78	n	11	67	17	61	72%
		%	14	86	22	78	
Eigene Studie	54	n	6	48	24	30	52%
		%	11	89	45	55	

Tabelle 28 Korrelation HER2-Status DTC mit PT; * HER2+ und ++ wurden als negativ gewertet; n = Anzahl, + = positiv, - = negativ

In den in Tabelle 28 aufgeführten Studien sind die meisten detektierten DTC HER2-negativ (48% bis 79%). Auch in unserer Arbeit waren die meisten aller detektierten DTC HER2-negativ (95%), bei 55% der Patientinnen konnten HER2-negative DTC nachgewiesen werden. Lediglich in der Arbeit von Braun et al. wurden mehr HER2-positive DTC (62,5%) als HER2-negative DTC (37,5%) detektiert. Eine Erklärung hierfür könnte die doppelte Bestimmung des HER2 (intrazelluläre und extrazelluläre Domäne) sein und damit eine Erhöhung der Sensitivität der Färbung.

Wie beim ER-Status konnte in dieser Arbeit auch beim HER2-Status eine Konkordanz zwischen dem PT und der DTC beschrieben werden. Diese war allerdings geringer als beim ER-Status. Die Übereinstimmungsrate des HER2-Status der DTC und des PT lag bei 52%. Sie ist im Vergleich zu anderen Studien eher niedrig (51% bis 77%).

In der Studie von Solomayer et al. konnten bei 60% der Patientinnen mit einem HER2-negativen PT HER2-positive DTC detektiert werden. Auch in der Studie von Hartkopf et al. konnte gezeigt werden, dass DTC häufiger eine HER2-Überexpression zeigen als der korrespondierende PT. In der Studie von Hartkopf et al. wurde zudem bei 51% der Patientinnen mit einem HER2-negativen PT mindestens eine HER2-positive DTC detektiert. In unserer Studie war dies bei 46% der Patientinnen der Fall. Ein noch geringerer Anteil wurde von Becker et al. beschrieben. Bei lediglich 15% bzw. 21% der Patientinnen wurden HER2-positive DTC detektiert (mittels Immunzytochemie bzw. RT-PCR). Becker et al. beschreiben, dass lediglich bei 13% der Patientinnen mit einem HER2-negativen PT HER2-positive DTC im KM nachweisbar sind.

Hypothesen die erklären können, warum die meisten detektierten DTC HER2-negativ sind und warum eine Divergenz des HER2-Status zwischen PT und DTC bei vielen Patientinnen vorliegt, werden in Kapitel 5.2.5 ausgeführt.

Dies ist im Hinblick auf eine sekundäre Systemtherapie von Relevanz. Patientinnen mit HER2-negativen PT, jedoch HER2-positiven DTC könnten möglicherweise von einer HER2-zielgerichteten Antikörpertherapie profitieren. Überlegungen über Konsequenzen unserer Ergebnisse auf die Therapie werden in Kapitel 5.2.6 angestellt.

5.2.3. Heterogenität des ER- und HER2-Status der DTC

Eine Heterogenität der DTC in Hinblick auf den ER- und HER2-Status konnte in unserer Studie gezeigt werden. Dies ist nach unserem Wissensstand bisweilen nur für den ER- oder den HER2-Status untersucht worden und konnte noch nicht simultan in einer Färbung gezeigt werden. Bei 83% der Patientinnen bei denen mehr als eine DTC detektiert wurde, konnte eine heterogene ER- und HER2-Expression nachgewiesen werden. Es wurden alle Kombinationsmöglichkeiten des ER- und HER2-Status beobachtet. Rund die Hälfte der Patientinnen zeigten zwei verschiedene Expressionsprofile.

Betrachtet man die Patientinnen bei denen nur ein DTC Profil detektiert wurde, zeigte sich dass die meisten DTC ER-negativ/HER2-negativ waren unabhängig vom ER-/HER2-Status des Primärtumors. In weniger als der Hälfte der Fälle spiegelten die DTC den ER- bzw. den HER2-Status des Primärtumors wieder. Da DTC in den meisten Fällen in dieser Arbeit eine heterogene Rezeptorexpression zeigen, könnte man bei den Fällen mit nur einer einzelnen Tumorzelle gegeben falls auch die fehlende Korrelation zum Primärtumor erklären.

In der Studie von Fehm et al. wurden bei 38 der 107 Patientinnen mehr als eine DTC im KM detektiert. Eine heterogene ER-Expression lag bei 26% der Patientinnen vor. Bei den meisten (74%) konnten ausschließlich ER-negative DTC detektiert werden und bei keiner der Patientinnen konnten nur ER-positive DTC nachgewiesen werden [74]. Auch für den HER2-Status konnte von Solomayer et al. gezeigt werden, dass in 41% der Fälle eine heterogene HER2-Expression vorlag, wenn mehr als eine DTC detektiert wurde [90]. Ebenfalls konnte in der Arbeit von Krawczyk et al. eine Heterogenität der DTC bzgl. des HER2-Status in 43% der Fälle nachgewiesen werden [50].

DTC haben nicht in allen Fällen eine homogene ER- und HER2-Expression, so können DTC mit unterschiedlichen ER- und HER2-Profilen bei einer Patientin auftreten. Verschiedene Erklärungen werden hierfür in Kapitel 5.2.5. diskutiert.

Diese Ergebnisse könnten für die Therapie des Mammakarzinoms relevant sein. Durch die Heterogenität der DTC und somit unterschiedlichen Rezeptorprofile, könnte erklärt sein, warum nicht alle DTC auf eine endokrine oder HER2-zielgerichtete Therapie ansprechen.

In Kapitel 5.2.6 wird auf die Konsequenzen unserer Ergebnisse auf die Therapie eingegangen.

5.2.4. ER- und HER2- Status der DTC in Korrelation mit klinisch pathologischen Faktoren und Prognosefaktoren

Bezüglich des ER-Status der DTC konnte in der Studie von Fehm et al. keine Korrelation mit den etablierten prognostischen Faktoren einschließlich des ER-Status des PT festgestellt werden [74]. In der Studie von Krawczyk et al. hingegen wurde eine Korrelation zwischen DTC im KM und einem ER-negativen PT festgestellt [50]. In unserer Arbeit konnte eine signifikante Korrelation des ER-Status der DTC mit dem ER-Status des PT nachgewiesen werden ($p=0,031$). Es zeigte sich zudem der Trend, dass ER-positive DTC scheinbar häufiger bei niedrig differenzierten Tumoren zu finden sind ($p=0,059$).

Für den HER2-Status der DTC konnte in dieser Arbeit keine Korrelationen mit klinisch pathologischen Faktoren gefunden werden. In der Arbeit von Hartkopf et al. konnte gezeigt werden, dass eine HER2-Überexpression bei DTC häufiger als beim korrespondierenden PT ist [63]. Zudem zeigte die Arbeit, dass die durchschnittliche krankheitsfreie Zeit bei Patientinnen mit HER2-positiven DTC signifikant kürzer war als bei Patientinnen mit HER2-negativen DTC und dass HER2-positive DTC mit einem aggressiveren Tumorwachstum assoziiert sind [63]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit HER2-positiven DTC häufiger Rezidive und Metastasen entwickeln [97].

Diese Ergebnisse unterstreichen die klinische Bedeutung der Detektion und Phänotypisierung der DTC. Da das Patientenkollektiv in unserer Studie eher klein ist, Therapie und Follow-Up nicht mit untersucht wurden, kann keine Aussagen über die Auswirkung der unterschiedlichen ER- und HER2-Status der DTC hinsichtlich des Outcomes getroffen werden. Dies müssten weitere Auswertungen zeigen.

5.2.5. Hypothese zur Erklärung der Divergenz der ER- und HER2-Expression zwischen PT und DTC und der Heterogenität von DTC

Unsere Ergebnisse lassen folgern, dass DTC nicht zwangsläufig den ER- und HER2-Status des PT reflektieren. Wenn bei einer Patientin mehr als eine DTC detektiert wurde, lag meist eine heterogene Expression des ER- und HER2-Status vor. Bezüglich dieser Ergebnisse gilt es verschiedene Hypothesen zu diskutieren.

Eine Erklärung der Heterogenität des Hormon- und HER2-Status von DTC könnte die intratumorale, klonale Heterogenität des PT sein [74, 90, 96, 98]. Tumore bestehen aus einer Vielzahl von Zellen, die unterschiedliche biologische Charakteristika und Differenzierungsgrade aufweisen können [99]. Eine Subpopulation von beispielsweise HER2-positiven Zellen des PT, bei welchem nicht das Cut-Off-level erreicht wird (<10% aller Zellen sind HER2-positiv), könnte der Ursprung von HER2-positiven DTC sein [100]. Dies würde erklären warum HER2-positive und -negative DTC bei einer Patientin auftreten können. Diese Überlegung gilt gleichermaßen für den ER-Status. Die Hypothese der intratumoralen Heterogenität könnte auch die Heterogenität der ER- und HER2-Expression erklären, ebenso die Differenz des ER- oder HER2-Status zwischen PT und DTC.

Die Tumorzell dissemination zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung könnte eine weitere Erklärung dafür sein, weshalb der Hormonrezeptor- und HER2-Status von DTC und PT nicht korrelieren [96, 97, 101]. Es ist bekannt, dass Tumorzellen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Erkrankung in das KM disseminieren können [48, 102]. Sie könnten sich somit eventuell unabhängig von PT entwickeln [84]. Je früher die Disseminierung stattfindet, desto unterschiedlicher können sich die Zellen entwickeln.

Auch eine Veränderung des ER-Status oder der HER2-Überexpression im Krankheitsverlauf ist denkbar und wurde bereits für den HER2-Status beschrieben [68, 96, 100, 101, 103].

Die Veränderungen der Histopathologie und Genetik im Krankheitsverlauf, wie zum Beispiel genetische Aberrationen [104] oder Veränderung des Hormonrezeptor- und HER2-Status, könnte Begründung dafür sein, dass auch bei Patientinnen mit einem HER2-negativen PT HER2-positive DTC detektiert werden. Dass sich der HER2-Status von

DTC im Krankheitsverlauf (innerhalb eines Follow-Ups von 6 bis 30 Monate) verändern kann wurde von Krawczyk et al. in einer Studie beschrieben. Bei einer erneuten Untersuchung des KM nach adjuvanter Chemotherapie war eine erhöhte Prävalenz HER2-positiver DTC im Vergleich zur initialen Untersuchung bei der Diagnosestellung zu beobachten [50]. Dies könnte durch die Aneignung eines aggressiveren Phänotyps im Lauf der Zeit bedingt sein oder ein geringeres Ansprechen der DTC auf die adjuvante Chemotherapie oder endokrine Therapie [101].

Ferner könnte eine Erklärung für die Diskrepanz des ER- und HER2-Status zwischen PT und DTC sein, dass ER-negative und HER2-negativ DTC einen Wachstums- und/oder Überlebensvorteil haben [90, 101, 105]. Durch ihre Fähigkeit im KM zu persistieren, könnte die vermehrte Detektion ER- und HER2-negativer DTC begründet sein, unabhängig des ER- und HER2-Status des korrespondierenden PT.

Eine weitere Hypothese formuliert, dass verschiedene Zellen des PT ein unterschiedliches malignes Potential und eine unterschiedliche Tendenz zu disseminieren haben [95, 100, 106, 107]. DTC sind häufig mit Faktoren assoziiert, die mit einem schlechteren klinischen Outcome vergesellschaftet sind, wie z.B. ein negativer Hormonrezeptorstatus [74]. Dass häufiger ER-negative als ER-positive DTC detektiert wurden, könnte durch eine Down-Regulation im Laufe des Disseminierungsprozesses bedingt sein oder durch eine selektive Disseminierung der ER-negativen DTC [95]. Dies könnte die hohe Rate an ER-negativen DTC in der vorliegenden Arbeit erklären, trotz überwiegend ER-positiven PT. Die HER2-Expression beim PT wird als Zeichen einer Progression zu einem aggressiven Tumorwachstum und damit als Zeichen einer höheren Malignität angesehen [34]. Da in unserer Arbeit bei knapp der Hälfte der Patientinnen mit einem HER2-negativem PT HER2-positive DTC gefunden wurden, lässt vermuten, dass DTC von einem ursprünglich aggressiveren PT abstammen und somit auch öfter HER2 exprimieren [74, 97]. Unsere Ergebnisse bezüglich des ER- und HER2-Status sind im Einklang mit dieser Hypothese.

Eine weitere interessante Hypothese besagt, dass DTC tatsächlich Tumorstammzellen seien [71, 74, 105, 108]. Das Vorhandensein von dieser Subpopulation von Zellen und deren Eigenschaft sekundäre Tumoren zu bilden, wurde bereits in der Literatur beschrieben [108]. Diese Zellen werden als potentieller Ursprung von Metastasen

angesehen [109, 110]. Tumorstammzellen haben das Potential zur Selbsterneuerung und zur pluripotenten Ausdifferenzierung. Durch diese Hypothese könnte sowohl die Divergenz des ER- und HER2-Status von DTC und PT sowie das heterogene Expressionsmuster bei Patientinnen, bei denen mehr als eine DTC detektiert wurden, erklärt werden. Mammakarzinom-Stammzellen scheinen grundsätzlich ER-negativ zu sein. Eine fehlende Expression von ER des PT wird mit der Stammzelltheorie in Verbindung gebracht [74]. Treten ER-negative DTC bei Patientinnen mit einem ER-positiven PT auf, würde die Theorie bestätigen, dass es sich bei DTC um Krebsstammzellen oder Abkömmlingen von diesen handelt [111]. DTC, und folglich auch Metastasen, könnten somit auf eine kleine Anzahl von Zellen, den Tumorstammzellen zurückgeführt werden [108]. Zudem würde diese Hypothese unterstreichen, dass nicht alle DTC, ähnlich den Tumorzellen des Primarius, auf eine systemische Chemotherapie ansprechen. Dies ist dadurch bedingt, dass sie sich lange in einem nicht proliferativen Zustand befinden, auch „dormant state“ oder „tumor-cell-dormancy“ genannt [105, 112]. Ihre metabolische Aktivität ist in diesem Zustand herabgesetzt und es findet keine Zellteilung statt (niedriger Proliferationsindex) [113]. Sie können somit über Jahre im KM persistieren und sind nicht chemosensitiv [105, 114]. In neueren Arbeiten zeigt sich, dass die Mikroumgebung der DTC eine entscheidende Rolle spielt, insbesondere was die „Dormancy“ und die therapeutische Resistenz betrifft [48, 112].

Manche Zellen verlassen, durch noch unbekannte Mechanismen dieses „inaktive Stadium“ und bilden vermutlich Metastasen [48, 115]. Allerdings sind diese Hypothesen und das Stammzellpotential wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es verdeutlicht aber die Wichtigkeit weiterer Studien zu DTC, deren Charakterisierung und Metastasierungspotential, um diese Zusammenhänge besser verstehen zu können.

5.2.6. Auswirkung auf die Therapie

Ziel einer Systemtherapie ist es, einzelne Tumorzellen zu eradizieren, die vom PT abgeschilfert werden, bevor sie sich zu klinisch manifesten Metastasen entwickeln. Die aktuellen Therapien (Chemo-, endokrine oder HER2-zielgerichtete Therapie) richten sich vor allem gegen den Phänotyp des Primarius, obwohl in diversen Studien gezeigt werden konnte, dass sich die Therapieangriffspunkte im Rahmen des Krankheitsverlaufs verändern können (vergleiche Tabelle 4).

Es existieren Studien die sich mit dem Effekt von Systemtherapien auf DTC beschäftigen. Die Datenlage zur Elimination von DTC durch eine Chemotherapie ist uneinheitlich. Einige Arbeiten konnten zeigen, dass nach einer abgeschlossen adjuvanten Chemotherapie keine DTC im KM mehr nachweisbar waren und sich die Prognose bei diesen Patientinnen verbesserte [116, 117]. Andere Arbeiten zeigten jedoch, dass DTC nach einer (neo-)adjuvanten Chemotherapie im KM persistieren [50, 56, 61, 64]: Ein insuffizienter Effekt einer adjuvanten Chemotherapie auf DTC wurde durch Braun et al. beschrieben. In deren Arbeit konnte eine Tumorzellpersistenz im KM nach einer aggressiven Chemotherapie bei 44% der Patientinnen nachgewiesen werden [61]. Janni et al. zeigten, dass bei ca. 15% der Patientinnen bei einer Reevaluierung des KM nach adjuvanter Chemotherapie nach wie vor HER2-positive DTC nachweisbar waren [56]. Auch Krawczyk et al. konnten zeigen, dass es in 16% der Fälle eine Persistenz der HER2-positiven DTC nach einer abgeschlossenen adjuvanten Chemotherapie gab und die Häufigkeit der HER2-positiver DTC im 5 Jahres Follow-up höher war als beim Primärscreening (36% vs. 26%) [50].

Patientinnen mit einer Tumorzellpersistenz nach einer adjuvanten Chemotherapie hatten eine schlechtere Prognose und ein höheres Rezidivrisiko als Patientinnen bei denen keine DTC mehr nachgewiesen werden können [56, 60, 61, 64, 65, 67, 90].

Erklärung für die Persistenz der DTC, auch nach vollständiger Entfernung des PT und einer abgeschlossenen adjuvanten Chemotherapie, und somit der möglicherweise Entstehung von Rezidiven oder Metastasen, werden im Folgenden diskutiert.

Geht man von der Theorie der intratumoralen, klonalen Heterogenität des PT aus, können DTC von einem heterogenen PT abgeschilfert werden und somit ein heterogenes ER- und HER2-Expressionsprofil aufweisen [74, 90, 96], was eine Resistenz

gegenüber Chemotherapien bedingen kann. Zum anderen können sich Veränderungen des therapeutischen Angriffspunktes (beispielsweise des ER- oder HER2-Status der DTC) erst während der Tumorprogression entwickeln. Eine weitere plausible Erklärung für ein insuffizientes Ansprechen der Therapie auf eine MRD könnte sein, dass sich die Zellen in einem „Dormant State“ befinden. Durch dass sie sich lange in einem nicht proliferativen Zustand befinden, ist ihre metabolische Aktivität herabgesetzt und es findet keine Zellteilung statt (niedriger Proliferationsindex) [113]. Sie können somit über Jahre im KM persistieren und sind nicht chemosensitiv [61, 114].

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen, dass für die Therapie des Mammakarzinoms teils neue Strategien entwickelt werden müssen mit Therapien, die sich nicht nur am Primarius orientieren und nicht nur gegen proliferative Zellen gerichtet sind, sondern sich beispielsweise auch gegen Oberflächenstrukturen der DTC richten. Eine herkömmliche Systemtherapie scheint nicht in jedem Fall in der Lage zu sein, DTC vollständig aus dem KM zu eliminieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch Bisphosphonate und Trastuzumab vor allem HER2-positive DTC eliminiert werden konnten, die im KM nach einer Chemotherapie persistierten [118-120]. Die Effizienz der HER2-zielgerichteten Antikörpertherapie konnte in einer klinischen Studie bei einer sequenziellen Detektion HER2-positiver DTC vor und nach einer Therapie erhoben werden [121]. Die Elimination von DTC aus dem KM bei Patienten mit primären Mammakarzinom, unabhängig von Hormon- oder HER2-Rezeptorstatus der DTC, konnte in weiteren Studien belegt werden [122-124]. Bisphosphonate haben einen therapeutischen Effekt bezüglich der Persistenz der disseminierten Tumorzellen und somit auch einen Einfluss auf die Inzidenz von sekundären Knochenmetastasen [124]. Der positive Einfluss auf das Überleben in einem adjuvanten Setting könnte eventuell durch den Effekt von Bisphosphonate auf DTC erklärt werden [124, 125].

Bisher wurde jedoch kein Bisphosphonat für die Indikation zur adjuvanten Therapie beim Nachweis von DTC zugelassen, sodass eine Behandlung nur als Off-label-Use durchgeführt werden kann [7]. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studien, gilt es zu diskutieren ob alle Patienten mit dem Nachweis von DTC im KM von einer Bisphosphonattherapie profitieren würden im Sinne einer protektiven Abschirmung.

Durch die Detektion und Phänotypisierung von DTC kann ein Patientenkollektiv identifiziert werden, dass für eine adjuvante oder sekundäre endokrine- oder HER2-zielgerichtete Antikörpertherapie in Frage kommen könnte. Vor allem Patientinnen mit einem Triple-Negativen-Tumor könnten profitieren, da sie derzeit weder eine endokrine noch eine HER2-zielgerichtete Therapie erhalten. Patientinnen mit einem HER2-negativen PT und HER2-positiven DTC würde evtl. von einer adjuvanten HER2-zielgerichteten Therapie profitieren. Ebenso könnte eine adjuvante endokrine Therapie bei Patientinnen trotz eines ER-negativen PT, aber mit ER-positiven DTC, erfolgreich sein. Individualisierte Therapieschemata könnten mit Hilfe der DTC-Detektion und -Phänotypisierung geschaffen werden. Ob es durch die Elimination der DTC im KM durch eine systemische sekundär adjuvante Therapie zu einem längeren Gesamtüberleben oder krankheitsfreien Überleben kommt, muss weiter untersucht werden. Ebenso ob sich dann daraus eine Empfehlung zur adjuvanten endokrinen oder HER2-zielgerichteten Therapie bei Patientinnen mit ER- oder HER2-positiven DTC, unabhängig vom Status des PT, ergibt und diese in der klinischen Routine zum Einsatz kommen soll, ist Gegenstand aktueller Forschungsaktivitäten.

6. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der ER- und HER2-Status der DTC von dem des PT unterscheiden kann. Bei Patientinnen bei denen mehr als eine DTC im KM detektiert wurde, konnte eine heterogene Expression des ER- und HER2-Status nachgewiesen werden. Die meisten detektierten DTC waren ER-negativ und HER2-negativ.

Diese phänotypische Vielseitigkeit der DTC bei Patientinnen mit Mammakarzinom kann unterschiedliche Ursachen haben. Die Hypothesen der klonalen Heterogenität des PT und dass DTC eigentlich Tumorstammzellen sind, die sich vom PT abgesondert haben, erscheinen dabei am naheliegendsten.

Die Systemtherapie des Mammakarzinoms richtet sich derzeit nach der Histologie des Primarius. Die Diskrepanz des ER- und HER2-Status zwischen PT und DTC und die Heterogenität der DTC könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb manche Patientinnen nicht von einer endokrinen- oder HER2-zielgerichtete Antikörpertherapie profitieren, obwohl sie einen ER- oder HER2-positiven PT haben.

Durch eine Phänotypisierung der DTC der jeweiligen Patientin könnte eine optimierte und individualisierte Therapie ermöglicht werden. Entsprechend könnten Patientinnen mit ER-positiven DTC trotz ER-negativen Primarius von einer endokrinen Therapie und Patientinnen mit HER2 positiven DTC von einer HER2 zielgerichteten Therapie profitieren. Ob somit ein Progress der Krankheit vermieden und die Prognose verbessert werden kann, muss in weiterführenden Forschungsprojekten gezeigt werden. Auch die Eignung der DTC als Biomarker zum Überwachen der Erkrankung und von Therapien sollte in weiteren Studien untersucht werden.

7. Zusammenfassung

DTC gelten als Vorläuferzellen von Metastasen. Sie können bei bis zu 36% der Patientinnen mit der Diagnose eines primären Mammakarzinoms nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von DTC zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und/oder nach einer abgeschlossenen adjuvanten Therapie, ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Die Persistenz von DTC nach adjuvanter Chemotherapie legt die Vermutung nahe, dass DTC gegenüber den gängigen Chemotherapeutika resistent sein können.

DTC, und im Krankheitsverlauf auch Metastasen, können im Vergleich zum PT einen anderen Phänotyp aufweisen. Dennoch wird derzeit die Indikation zur endokrinen- oder HER2-zielgerichteten Antikörpertherapie rein aufgrund des ER- und HER2-Status des PT gestellt. Die Detektion und Phänotypisierung der DTC könnte neue Ansatzpunkte für die Therapie des Mammakarzinoms bieten.

Die Ziele dieser Arbeit waren die simultane Bestimmung des ER- und HER2-Status der DTC im KM, der Vergleich des ER- und HER2-Status der DTC mit dem des korrespondierenden PT und bei Patientinnen bei denen mehr als eine DTC detektiert wurde, die Bestimmung der Heterogenität des ER- und HER2-Status.

Von 54 Patientinnen wurde KM, welches zum Zeitpunkt der Primäroperation gewonnen wurde, mittels einer dreifachen Immunfluoreszenzfärbung auf CK-positive Zellen und deren ER- und HER2-Status untersucht. Dabei wurden direkte AK gegen CK, ER und HER2 verwendet. Die manuelle Analyse wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Kriterien für CK- und HER2-positive Zellen war eine zirkuläre Färbung, entsprechend der Membran der Zelle. Eine DTC wurde als ER-positiv gewertet, wenn eine nukleäre Färbung vorlag.

Insgesamt wurden 1082 DTC detektiert. Die Zahl der DTC pro Patientin lag bei durchschnittlich 20 (1-95). Die meisten DTC waren ER-negativ und/oder HER2-negativ. ER-positive DTC wurden bei 74% und HER2-positive DTC bei 44% der Patientinnen detektiert. Ein ER- bzw. HER2-positiver PT lag in 78%, bzw. 11% der Fälle vor. Die Übereinstimmung zwischen dem ER-Status der DTC und dem PT lag bei 74%, wohingegen die Übereinstimmung der HER2-Expression nur 52% betrug. Bei 83% der

Patientinnen, bei denen mehr als einer DTC im KM detektiert wurde, lag eine heterogene ER- und HER2-Expression vor.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich der ER- und der HER2-Status der DTC von dem des PT unterscheiden kann und die meisten DTC ER-negativ und HER2-negativ sind. Dies könnte erklären, warum manche Patientinnen nicht gänzlich von einer adjuvanten endokrinen oder HER2-zielgerichteten Therapie profitieren. Auch bei Patientinnen mit heterogenen DTC würde nur ein Teil dieser von einer Therapie eliminiert werden. Dies macht deutlich, dass weitere sekundär adjuvante Therapieoptionen sinnvoll sein können und etabliert werden müssten.

Die Detektion und Phänotypisierung von DTC im KM könnte für die Optimierung der Therapie des Mammakarzinoms sinnvoll sein. Bei einer Diskordanz von DTC und PT würden vor allem Patientinnen mit einem initial ER-negativen oder HER2-negativen PT, und insbesondere Patientinnen mit einem Triple-negativen PT und ER und/oder HER2-positiven DTC von einer endokrinen oder HER2-zielgerichteten Therapie profitieren können.

Die Differenz des ER- und HER2-Status zwischen DTC und PT kann auf verschiedene Art erklärt werden. Die intratumorale Heterogenität des PT und die Stammzelltheorie scheinen hier am naheliegendsten.

8. Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut, *Brustkrebs (Mammakarzinom) ICD-10 C50*. 2013.
2. McCarthy, E.P., et al., *Mammography use, breast cancer stage at diagnosis, and survival among older women*. J Am Geriatr Soc, 2000. **48**(10): p. 1226-33.
3. K. Goerke, J.S., A.Valet, *Klinikleitfaden Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2013: p. 410 ff.
4. van Dalum, G., et al., *Circulating tumor cells before and during follow-up after breast cancer surgery*. Int J Oncol, 2015. **46**(1): p. 407-13.
5. Braun, S., et al., *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 793-802.
6. Hartkopf, A.D., et al., *Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients - results from a large single-centre analysis*. Eur J Cancer, 2014. **50**(15): p. 2550-9.
7. Onkologie, L., *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion , Version 4.1*. AWMF-Registernummer: 032-045OL 2018.
8. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
9. Harbeck, N., Aivazova-Fuchs, V., Anthuber, C., Braun, M., Hamann, M., Michl, G., Salat, C., Sattler, D., Schworer, M., Wolf, C., *Adjuvante Systemtherapie*. TZM Manual Mammakarzinome, 2013(14. Auflage): p. S. 158ff.
10. Warner, M., S. Nilsson, and J.A. Gustafsson, *The estrogen receptor family*. Curr Opin Obstet Gynecol, 1999. **11**(3): p. 249-54.
11. Schiff, R., et al., *Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(1 Pt 2): p. 447S-54S.
12. Platet, N., et al., *Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **51**(1): p. 55-67.
13. Thompson, A.M., et al., *Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the Breast Recurrence In Tissues Study (BRITS)*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(6): p. R92.
14. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
15. Harbeck, N., C. Thomssen, and M. Gnant, *St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion*. Breast Care (Basel), 2013. **8**(2): p. 102-9.
16. Goldhirsch, A., et al., *Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007*. Ann Oncol, 2007. **18**(7): p. 1133-44.
17. Mayr, D., *Pathologie der Mammakarzinome und der interepithelialen Proliferationen der Mamma*. Manual Mammakarzinome, 2013. **14**: p. 57-85.
18. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., 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.
19. Cui, X., et al., *Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy*. J Clin Oncol, 2005. **23**(30): p. 7721-35.
20. Arafah, B.M., et al., *Hormone dependency in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors*. Endocrinology, 1982. **111**(2): p. 584-8.
21. Arendt, L.M. and C. Kuperwasser, *Form and function: how estrogen and progesterone regulate the mammary epithelial hierarchy*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2015. **20**(1-2): p. 9-25.

22. Mohammed, H., et al., *Progesterone receptor modulates ERalpha action in breast cancer*. Nature, 2015. **523**(7560): p. 313-7.
23. Beleut, M., et al., *Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 2989-94.
24. Obr, A.E. and D.P. Edwards, *The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **357**(1-2): p. 4-17.
25. Salmen, J., et al., *Pooled analysis of the prognostic relevance of progesterone receptor status in five German cohort studies*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **148**(1): p. 143-51.
26. Stendahl, M., et al., *High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(15): p. 4614-8.
27. Chan, M., et al., *Outcomes of Estrogen Receptor Negative and Progesterone Receptor Positive Breast Cancer*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132449.
28. Prat, A., et al., *Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer*. J Clin Oncol, 2013. **31**(2): p. 203-9.
29. Arima, N., et al., *Ki-67 index value and progesterone receptor status can predict prognosis and suitable treatment in node-negative breast cancer patients with estrogen receptor-positive and HER2-negative tumors*. Oncol Lett, 2019. **17**(1): p. 616-622.
30. Fan, Y., et al., *Prognostic Significance of Single Progesterone Receptor Positivity: A Comparison Study of Estrogen Receptor Negative/Progesterone Receptor Positive/Her2 Negative Primary Breast Cancer With Triple Negative Breast Cancer*. Medicine (Baltimore), 2015. **94**(46): p. e2066.
31. Lamy, P.J., et al., *Progesterone receptor quantification as a strong prognostic determinant in postmenopausal breast cancer women under tamoxifen therapy*. Breast Cancer Res Treat, 2002. **76**(1): p. 65-71.
32. 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.
33. Slamon, D.J., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer*. Cancer Invest, 1990. **8**(2): p. 253.
34. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
35. Chia, S., et al., *Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5697-704.
36. Zhu, X. and A.A. Joy, *Targeting HER2 in Advanced Breast Cancer*. Methods Mol Biol, 2017. **1652**: p. 63-77.
37. Wolff, A.C., et al., *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(1): p. 18-43.
38. Wolff, A.C., et al., *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update*. J Clin Oncol, 2018. **36**(20): p. 2105-2122.
39. Jackisch, C., P. Lammers, and I. Jacobs, *Evolving landscape of human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer treatment and the future of biosimilars*. Breast, 2017. **32**: p. 199-216.
40. Jiang, H. and H.S. Rugo, *Human epidermal growth factor receptor 2 positive (HER2+) metastatic breast cancer: how the latest results are improving therapeutic options*. Ther Adv Med Oncol, 2015. **7**(6): p. 321-39.
41. Kast, K., et al., *Trastuzumab and survival of patients with metastatic breast cancer*. Arch Gynecol Obstet, 2017. **296**(2): p. 303-312.

42. Slamon, D., et al., *Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2011. **365**(14): p. 1273-83.
43. Burnett, J.P., et al., *Trastuzumab resistance induces EMT to transform HER2(+) PTEN(-) to a triple negative breast cancer that requires unique treatment options*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 15821.
44. Amir, E., et al., *Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(6): p. 587-92.
45. Jensen, J.D., et al., *ER, HER2, and TOP2A expression in primary tumor, synchronous axillary nodes, and asynchronous metastases in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **132**(2): p. 511-21.
46. Lindstrom, L.S., et al., *Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression*. J Clin Oncol, 2012. **30**(21): p. 2601-8.
47. Schlimok, G., et al., *Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(23): p. 8672-6.
48. Dasgupta, A., A.R. Lim, and C.M. Ghajar, *Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis?* Mol Oncol, 2017. **11**(1): p. 40-61.
49. Klein, C.A., *Parallel progression of primary tumours and metastases*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 302-12.
50. Krawczyk, N., et al., *HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor*. Anticancer Res, 2009. **29**(10): p. 4019-24.
51. Bidard, F.C., et al., *Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(11): p. 3306-11.
52. Fehm, T., et al., *Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(4): p. R59.
53. Diel, I.J., et al., *Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(22): p. 1652-8.
54. Braun, S., et al., *Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer*. N Engl J Med, 2000. **342**(8): p. 525-33.
55. Sola, M., et al., *Detection of disseminated tumor cells in locally advanced breast cancer patients before primary systemic therapy*. Breast, 2013. **22**(5): p. 908-13.
56. 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*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(9): p. 2967-76.
57. Wiedswang, G., et al., *Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(18): p. 3469-78.
58. Pierga, J.Y., et al., *Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(4): p. 1392-400.
59. Wiedswang, G., et al., *Detection of isolated tumor cells in BM from breast-cancer patients: significance of anterior and posterior iliac crest aspirations and the number of mononuclear cells analyzed*. Cytotherapy, 2003. **5**(1): p. 40-5.
60. Wiedswang, G., et al., *Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5342-8.

61. Braun, S., et al., *Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients*. J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 80-6.
62. Mathiesen, R.R., et al., *Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(4): p. R117.
63. Hartkopf, A.D., et al., *The HER2 status of disseminated tumor cells in the bone marrow of early breast cancer patients is independent from primary tumor and predicts higher risk of relapse*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **138**(2): p. 509-17.
64. Janni, W., et al., *The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence*. Cancer, 2005. **103**(5): p. 884-91.
65. Janni, W., et al., *The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence*. Cancer, 2001. **92**(1): p. 46-53.
66. Krishnamurthy, S., et al., *Discordance in HER2 gene amplification in circulating and disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer*. Cancer Med, 2013. **2**(2): p. 226-33.
67. Fehm, T., et al., *A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation*. Cancer, 2006. **107**(5): p. 885-92.
68. Hermanek, P., et al., *International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis*. Cancer, 1999. **86**(12): p. 2668-73.
69. Wolfle, U., V. Muller, and K. Pantel, *Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance*. Future Oncol, 2006. **2**(4): p. 553-61.
70. Slade, M.J. and R.C. Coombes, *The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2007. **4**(1): p. 30-41.
71. Filipova, A., et al., *Breast cancer and cancer stem cells: a mini-review*. Tumori, 2014. **100**(4): p. 363-9.
72. Pantel, K. and U. Woelfle, *Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors*. J Biol Regul Homeost Agents, 2004. **18**(2): p. 120-5.
73. Chiang, A.C. and J. Massague, *Molecular basis of metastasis*. N Engl J Med, 2008. **359**(26): p. 2814-23.
74. Fehm, T., et al., *ERalpha-status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(5): p. R76.
75. Muller, V., C. Alix-Panabieres, and K. Pantel, *Insights into minimal residual disease in cancer patients: implications for anti-cancer therapies*. Eur J Cancer, 2010. **46**(7): p. 1189-97.
76. Pestrin, M., et al., *Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **118**(3): p. 523-30.
77. 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.
78. Borgen, E., et al., *Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells*. Cytotherapy, 1999. **1**(5): p. 377-88.
79. Schindlbeck, C., et al., *Comparison of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and disseminated tumor cells in the bone marrow (DTC-BM) of breast cancer patients*. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. **139**(6): p. 1055-62.
80. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. Cell, 1982. **31**(1): p. 11-24.

81. Klein, C.A., et al., *Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer*. Lancet, 2002. **360**(9334): p. 683-9.
82. Gangnus, R., et al., *Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3457-64.
83. Fehm, T., et al., *Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(7): p. 2073-84.
84. Schmidt-Kittler, O., et al., *From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7737-42.
85. Bannasch, P., H. Zerban, and D. Mayer, *The cytoskeleton in tumor cells*. Pathol Res Pract, 1982. **175**(2-3): p. 196-211.
86. Woelfle, U., et al., *Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(8): p. 2670-4.
87. Gilje, B., et al., *Comparison of molecular and immunocytochemical methods for detection of disseminated tumor cells in bone marrow from early breast cancer patients*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 514.
88. Fehm, T., *Konsensusempfehlungen zu methodischen Aspekten und zur klinischen Relevanz des Nachweises disseminierter Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark (KM) von Patientinnen mit primären Mammakarzinom*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2005. **67**: p. 1-7.
89. Bock, C., et al., *Heterogeneity of ERalpha and ErbB2 Status in Cell Lines and Circulating Tumor Cells of Metastatic Breast Cancer Patients*. Transl Oncol, 2012. **5**(6): p. 475-85.
90. Solomayer, E.F., et al., *Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **98**(2): p. 179-84.
91. Solomayer, E.F., et al., *Results of iliac crest biopsies taken from 1465 patients with primary breast cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 1998. **124**(1): p. 44-8.
92. Wiedswang, G., et al., *Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer*. Int J Cancer, 2006. **118**(8): p. 2013-9.
93. 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.
94. Molloy, T.J., et al., *The prognostic significance of tumour cell detection in the peripheral blood versus the bone marrow in 733 early-stage breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(3): p. R61.
95. Ditsch, N., et al., *Estrogen receptor expression profile of disseminated epithelial tumor cells in bone marrow of breast cancer patients*. Recent Results Cancer Res, 2003. **162**: p. 141-7.
96. Becker, S., et al., *Her2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients*. Anticancer Res, 2005. **25**(3B): p. 2171-5.
97. Braun, S., et al., *ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 1890-5.
98. Ellsworth, R.E., et al., *Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care*. Semin Cell Dev Biol, 2017. **64**: p. 65-72.
99. Welch, D.R., *Tumor Heterogeneity--A 'Contemporary Concept' Founded on Historical Insights and Predictions*. Cancer Res, 2016. **76**(1): p. 4-6.
100. Meng, S., et al., *HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9393-8.
101. Rack, B., et al., *Comparison of HER2 Expression in Primary Tumor and Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Breast Cancer Patients*. Oncology, 2016. **90**(4): p. 232-8.

102. Rocken, M., *Early tumor dissemination, but late metastasis: insights into tumor dormancy*. J Clin Invest, 2010. **120**(6): p. 1800-3.
103. Fehm, T., et al., *Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(5): p. R74.
104. Magbanua, M.J.M., et al., *Genomic and expression profiling reveal molecular heterogeneity of disseminated tumor cells in bone marrow of early breast cancer*. NPJ Breast Cancer, 2018. **4**: p. 31.
105. Kang, Y. and K. Pantel, *Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients*. Cancer Cell, 2013. **23**(5): p. 573-81.
106. Sai, B. and J. Xiang, *Disseminated tumour cells in bone marrow are the source of cancer relapse after therapy*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(12): p. 5776-5786.
107. Fehm, T., et al., *HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **124**(2): p. 403-12.
108. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
109. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-15.
110. Tachtsidis, A., et al., *Minimal residual disease in breast cancer: an overview of circulating and disseminated tumour cells*. Clin Exp Metastasis, 2016. **33**(6): p. 521-50.
111. Dontu, G., D. El-Ashry, and M.S. Wicha, *Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(5): p. 193-7.
112. Ghajar, C.M., *Metastasis prevention by targeting the dormant niche*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(4): p. 238-47.
113. Meng, S., et al., *Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8152-62.
114. Fehm, T., et al., *Tumor cell dormancy: implications for the biology and treatment of breast cancer*. APMIS, 2008. **116**(7-8): p. 742-53.
115. Uhr, J.W. and K. Pantel, *Controversies in clinical cancer dormancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(30): p. 12396-400.
116. Braun, S., et al., *Evaluation of bone marrow in breast cancer patients: prediction of clinical outcome and response to therapy*. Breast, 2003. **12**(6): p. 397-404.
117. Synnestvedt, M., et al., *Disseminated tumor cells as selection marker and monitoring tool for secondary adjuvant treatment in early breast cancer. Descriptive results from an intervention study*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 616.
118. Rack, B., et al., *Trastuzumab clears HER2/neu-positive isolated tumor cells from bone marrow in primary breast cancer patients*. Arch Gynecol Obstet, 2012. **285**(2): p. 485-92.
119. Rack, B., et al., *Effect of zoledronate on persisting isolated tumour cells in patients with early breast cancer*. Anticancer Res, 2010. **30**(5): p. 1807-13.
120. Bozionellou, V., et al., *Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8185-94.
121. Vincent-Salomon, A., et al., *HER2 status of bone marrow micrometastasis and their corresponding primary tumours in a pilot study of 27 cases: a possible tool for anti-HER2 therapy management?* Br J Cancer, 2007. **96**(4): p. 654-9.
122. Hoffmann, O., et al., *Effect of ibandronate on disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer: a pilot study*. Anticancer Res, 2011. **31**(10): p. 3623-8.

123. Hoffmann, O., et al., *Evaluation of the prognostic significance of disseminated tumor cells in the bone marrow of primary, non-metastatic breast cancer patients after a 7-year follow-up*. Arch Gynecol Obstet, 2015. **292**(5): p. 1117-25.
124. Banys, M., et al., *Influence of zoledronic acid on disseminated tumor cells in bone marrow and survival: results of a prospective clinical trial*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 480.
125. Kasimir-Bauer, S., et al., *Different prognostic value of circulating and disseminated tumor cells in primary breast cancer: Influence of bisphosphonate intake?* Sci Rep, 2016. **6**: p. 26355.

9. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase
CISH	Chromogene In-situ-Hybridisierung
CK	Zytokeratin
CTC	Circulating Tumor Cells, zirkulierende Tumorzellen
DTC	Disseminated Tumor Cells, disseminierte Tumorzellen
ER	Östrogenrezeptor
FISH	Fluoreszenz In-situ- Hybridisierung
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IRS	Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner
KM	Knochenmark
KMP	Knochenmarkpunktion
MRD	Minimal Residual Disease
PR	Progesteronrezeptor
PT	Primärtumor
RANKL	receptor activator of nuclear factor k B ligand
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen- Klassifikation

10. Abbildungs- und Diagrammverzeichnis

Abbildung 1 Kontrollzelllinien MCF-7 (A) und SkBr3 (B).....	31
Abbildung 2 Typische CK-positive DTC Beispiele aus dem Patientenkollektiv	39
Abbildung 3 Typische CK/ER-positive DTC aus dem Patientenkollektiv, verschiedene Intensitäten der ER-Expression	39
Abbildung 4 Typische CK/HER2-positive DTC aus dem Patientenkollektiv	40
Abbildung 5 Typische CK/ER α /HER2-positive DTC aus dem Patientenkollektiv.....	40
Abbildung 6 Heterogenität der DTC bei einer Patientin mit allen vier möglichen Profilen der DTC.....	45
Diagramm 1 Alter bei Erstdiagnose	20
Diagramm 2 Anzahl der DTC pro Patientin	37
Diagramm 3 ER- und HER2-Status der detektierten DTC.....	38
Diagramm 4 Anzahl der Patientinnen mit ≥ 1 DTC	41

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 IRS nach Remmele und Stegner zur Bestimmung des ER-Status des PT [14] ..	3
Tabelle 2 Bewertung HER2-Immunhistochemie [17].....	7
Tabelle 3 Aktuell empfohlener HER2-Testalgorithmus für die Immunhistochemie [38]	8
Tabelle 4 Diskrepanz des ER- und HER2-Status zwischen PT und Rezidiv und/oder Metastasen, n= Anzahl Patientinnen	10
Tabelle 5 Ein- und Ausschlusskriterien des Patientenkollektivs	20
Tabelle 6 Menopausenstatus; n= Anzahl	21
Tabelle 7 Tumorstadium; n= Anzahl	21
Tabelle 8 Lymphknotenbeteiligung; n= Anzahl	22
Tabelle 9 Tumorhistologie; n= Anzahl.....	22
Tabelle 10 Grading; n= Anzahl	23
Tabelle 11 ER-Status; n= Anzahl.....	23
Tabelle 12 PR-Status; n= Anzahl.....	24
Tabelle 13 HER2-Status; n= Anzahl	24
Tabelle 14 Laborutensilien	25
Tabelle 15 Geräte	26
Tabelle 16 Chemikalien und Pufferlösungen	27
Tabelle 17 Antikörper.....	28
Tabelle 18 Zelllinien.....	28
Tabelle 19 Kriterien zur Identifikation von Tumorzellen [67]	34
Tabelle 20 Klassifizierung von DTC [67]	34
Tabelle 21 Lokalisation der Färbung, Anregungs- und Emissionsspektren	35
Tabelle 22 Anzahl der Patientinnen mit ≥ 1 ER- oder HER2-positiver oder negativer DTC	41
Tabelle 23 Korrelation des ER-Status der DTC mit dem ER-Status des PT.....	42
Tabelle 24 Korrelation des HER2-Status der DTC mit dem HER2-Status des PT.....	43
Tabelle 25 Kombiniertes ER-/HER2-Status der DTC und Vergleich mit dem ER-/HER2-Status des PT.....	44
Tabelle 26 Korrelation des ER- und HER2-Status der DTC mit klinisch pathologischen Faktoren.....	47
Tabelle 27 Vergleich des ER-Status des PT mit dem der DTC	52
Tabelle 28 Korrelation HER2-Status DTC mit PT	54

12. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Finkenzeller, Charlotte Ulrike

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Simultane Bestimmung des Östrogen- und HER2-Rezeptorstatus disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

selbständig 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.

Basel, 06.06.2019

Ort, Datum

Charlotte U. Finkenzeller

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

13. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Harald Sommer für die unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken und die große Unterstützung beim Abschluss dieser Arbeit.

Insbesondere was die wissenschaftliche Betreuung und schriftliche Gestaltung dieser Arbeit angeht, erhielt ich von meiner Betreuerin Frau Dr. med. Bernadette Jäger zahlreiche Anregungen. Durch ihre konstante Begleitung, trotz mehrerer Standortwechsel, trug Sie Massgeblich zur Förderung der Arbeit bei.

Gleichermassen bedanke ich mich bei Frau Prof. Sophie Doisneau-Sixou für die exzellente wissenschaftliche Betreuung und Ausbildung im Rahmen sämtlicher experimenteller Arbeiten. Durch Ihre motivierende Art gab sie immer wieder An- und Auftrieb.

Dem Team des Labors, insbesondere Leonie Majunke, danke ich für die hilfreichen Ratschläge bei der Durchführung der Versuche und die durchwegs positive und stimulierende Arbeitsatmosphäre, sowie das Durchhaltevermögen am Mikroskop.

Meinem Freund Maurice verdanke ich den finalen Motivationsschub zum Abschluss dieser Arbeit. Zudem haben seine konstruktiven Ermutigungen massgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinen Brüdern für die stets motivierende Unterstützung. Ihr habt mich auf meinem bisherigen Lebensweg begleitet und mir stets geholfen die richtigen Türen zu öffnen und gute Entscheidungen zu treffen.