Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener

Der Nachweis apoptotischer und vitaler disseminierter Tumorzellen bei Mammakarzinompatientinnen nach neoadjuvanter systemischer Therapie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Priska Maria Tappeser
aus
Sigmaringen

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Wallwiener

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Souchon

Ich widme diese Arbeit dem Fortschritt im Bereich der Brustkrebstherapie und all denen, die von diesem Fortschritt profitieren werden.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1. EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK 1

1.1.1. Das Mammakarzinom 1

1.1.2. Risikofaktoren und Prognostik 1

1.1.3. Therapiemöglichkeiten 2

1.2. DIE BEDEUTUNG DER NEOADJUVANTEN SYSTEMISCHEN THERAPIE 5

1.2.1. Indikation der NST 6

1.2.2. Therapiemonitoring 7

1.3. DIE KLINISCHE BEDEUTUNG DER TUMORZELLDISSEMINATION 8

1.3.1. Methoden zum Nachweis disseminierter und apoptotischer Tumorzellen 9

1.4. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG 11

2. METHODEN 13

2.1. PATIENTENKOLLEKTIV 13

2.2. KNOCHENMARKPUNKTION 13

2.3. AUFBEREITUNG DES KNOCHENMARKS 13

2.3.1. Anreicherung der mononukleären Zellfraktion 14

2.3.2. Anfertigung von Zytospins 16

2.4. IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG 16

2.4.1. Färbung mit Hilfe von Panzytokeratin A45B-B3 / APAAP Detektion 17

2.4.2. Detektion apoptotischer Zellen unter Verwendung des M30-Antikörpers 18

2.5. DIE MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG 19

2.5.1. Fokussierung 20

2.5.2. Scannen 21

2.5.3. Report-Erstellung 21

2.6. KRITERIEN ZUR IDENTIFIKATION DISSEMINIERTER TUMORZELLEN 22

2.7. KONTROLLEN 22

2.8. STATISTISCHE ANALYSE 23

3. ERGEBNISSE 24

3.1. BESCHREIBUNG DES GESAMTKOLLEKTIVS 24

3.2. PATHOLOGISCHES ANSPRECHEN AUF DIE NST 26

3.3. INZIDENZ DER DTZ NACH NST 26

3.4. Korrelation des KM-Status mit klinisch-histologischen Faktoren und Therapieansprechen 28
3.5. Der Nachweis apoptotischer Tumorzellen 29

4. DISKUSSION 32

4.1. Neoadjuvante Chemotherapie 33
4.2. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen nach NST 34
4.3. Korrelation zwischen Nachweis einer Tumorzelldissemination und Therapieansprechen 35
4.4. Korrelation der DTZ-Detektion mit klinisch-histologischen Faktoren 35
4.5. Die Bedeutung apoptotischer DTZ 37
4.6. Die klinische Relevanz der DTZ bei Patientinnen mit kompletter Remission 38

5. SCHLUSSFOLGERUNGEN 42

6. ZUSAMMENFASSUNG 44

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 46

8. TABELLENVERZEICHNIS 47

9. APPENDIX – VERWENDETE MATERIALIEN 48

9.1. Herstellung von Lösungen 48
9.2. Geräte 48
9.3. Zelllinien 48
9.4. Reagenzien 49
9.5. Allgemeine Laborausstattung 49

10. LITERATURVERZEICHNIS 50

11. DANKSAGUNG 56

12. LEBENSLAUF 58

Abkürzungsverzeichnis

ACIS	Automated Cell Imaging System
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase – Anti Alkalische Phosphatase
BET	Brusterhaltende Therapie
CK	Zytokeratin
DTZ	Disseminierte Tumorzelle
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2, erb-B2, c-erbB2
KM	Knochenmark
KR	Komplette Remission
Min	Minute
MNC	Mononukleäre Zellen
MRD	Minimale resterkrankung (minimal residual disease)
NST	Neoadjuvante systemische Therapie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PK	Progressiver Krankheitsverlauf
PR	Partielle Remission
U/min	Umdrehungen pro Minute
SK	Stabiler Krankheitsverlauf
TBS	Tris Buffered Saline

1. Einleitung

1.1. Einführung in die Thematik

1.1.1. Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist, nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, epidemiologisch die häufigste Todesursache bei Frauen ([70]). Das mittlere Lebenszeitrisiko einer Frau an Brustkrebs zu erkranken beträgt, dem Robert Koch Institut zufolge, 9.2%; somit erkrankt in Deutschland durchschnittlich jede 11. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs.

Trotz des großen medizinischen Fortschrittes erliegen immer noch ca. 30% aller Mammakarzinompatientinnen der Erkrankung. Laut Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes starben im Jahr 2005 17.455 Frauen an Brustkrebs ([1]). Allerdings ist die Mortalität ungeachtet der steigenden Inzidenz seit den 90er Jahren rückläufig. Grund dafür ist in erster Linie der therapeutische und diagnostische Fortschritt. Hinzu kommen Veränderungen der Prävalenz von Risikofaktoren und vor allem die Vorsorgeuntersuchungen bzw. das Mammographiescreening ([11]).

1.1.2. Risikofaktoren und Prognostik

Die genaue Ätiologie des Mammakarzinoms bleibt weitgehend unbekannt. Es gibt jedoch nachweislich eine Reihe von Faktoren, die das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, erhöhen. Zu diesen Risikofaktoren gehören das steigende Lebensalter, der hormonelle Status und auch die genetische Disposition ([6]). Für letztere sind die verantwortlichen Gene BRCA-1 und BRCA-2 zu erwähnen ([21],[76]), auf deren Mutation 5 bis 10% der Mammakarzinom-erkrankungen zurückzuführen sind ([55]). Darüber hinaus zählen Lebensstil und

Umweltfaktoren (Alkoholkonsum, Rauchen, geringe körperliche Aktivität, Strahlenbelastung usw.) zu den Risiken für die Entwicklung eines Mammakarzinoms ([2],[4]).

Etablierte prognostische und prädiktive Faktoren werden eingesetzt, um den Verlauf der Erkrankung bzw. das Therapieansprechen individuell abschätzen zu können. Zu den klassischen Prognosefaktoren zählen das Ausbreitungsstadium (TNM-Status), das Alter der Patientin, der Menopausenstatus, die Tumormorphologie (Grading, Histologischer Typ etc.) und der Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor) ([75]). Mittlerweile gilt auch der Nachweis disseminierter Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark (KM) als gesicherter prognostischer Faktor (Level I Evidenz, [20]).
Nach heutigem Kenntnisstand werden folgende Faktoren als Evidenz-basierte prädiktive Faktoren betrachtet: Hormonrezeptorstatus, Menopausenstatus und HER-2/neu-Status.

1.1.3. Therapiemöglichkeiten

Die Brustkrebstherapie stützt sich auf drei Säulen: Die Operation, die Bestrahlung und die medikamentöse Therapie. Letztere besteht, je nach Risikoprofil und Expression prädiktiver Marker, aus einer Chemotherapie, einer Hormontherapie, sowie ggf. einer Antikörpertherapie.

Die Operation ist die zentrale Säule der Behandlung. Sie ist meist der erste Therapieschritt nach der Diagnose eines Mammakarzinoms. Der Brusterhalt ist heutzutage mit Hilfe neuer Operationstechniken in über 75% der Fälle möglich, ohne die langfristigen Heilungschancen negativ zu beeinflussen. Standard der brusterhaltenden Behandlung ist die Kombination von Tumorexzision mit Sentinel-Lymphknoten-Biopsie bzw. Axilladissektion und Bestrahlung des Restparenchyms ([75]). Die Indikationen für eine brusterhaltende Therapie (BET)

oder eine Mastektomie sind den beiden folgenden Tabellen (Tab. 1, Tab. 2) zu entnehmen.

Tab. 1. *Indikationen für eine Mastektomie ([3])*

Indikationen
Non in sano Tumorentfernung trotz Nachresektion
Multizentrisches Tumorwachstum
Ausgedehntes assoziiertes intraduktales Karzinom > 4 cm
Diffuse ausgedehnte Kalzifikationen vom malignen Typ
Ablehnung der Strahlentherapie durch die Patientin
Unzureichende technische Durchführbarkeit der Strahlentherapie durch Begleiterkrankungen der Patientin
Wunsch der Patientin

Tab. 2. *Indikationen für eine BET ([3])*

Indikationen
Nicht-invasive, lokal begrenzte Karzinome (Duktales und lobuläres Carcinoma *in situ*);
Invasive Karzinome mit günstiger Relation zwischen Tumorgröße und Brustvolumen
Invasive Karzinome mit begleitendem intraduktalem Karzinom, wenn die Resektionsränder im Gesunden liegen

Die postoperative lokoregionäre Nachbestrahlung ist nach einer BET zwingend erforderlich. Die Indikationsleitlinien zur Radiotherapie wurden von den Deutschen Gesellschaften für Senologie, Gynäkologie und Geburtshilfe sowie Radioonkologie festgelegt ([69]).

Die systemische Chemotherapie kann adjuvant oder neoadjuvant durchgeführt werden. Die neoadjuvante Behandlung findet vor der Operation statt, wohingegen die adjuvante Therapie nach operativer Sanierung erfolgt.

Das Ziel der adjuvanten systemischen Therapie ist die Eradikation der minimalen Resterkrankung. Auf diese Weise beeinflusst sie positiv sowohl das krankheitsfreie, als auch das Gesamtüberleben ([30]). Die aktuellen Empfehlungen richten sich nach den Ergebnissen der Konsensus-Konferenz zur Therapie des frühen Mammakarzinoms von St. Gallen ([41]) und den Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie ([3]). Patientinnen werden entsprechend ihres Risikos, ihrer Hormonempfindlichkeit und ihres Menopausenstatus in verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt, die in Tabelle 3 geschildert werden.

Tab. 3. *Behandlungsgruppen zur adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms entsprechend der Hormonempfindlichkeit (Konsensusempfehlungen St. Gallen 2009; [41])*

Behandlungsgruppe	**Kriterien**
Hormon-empfindlich	ER Expression und / oder PR Expression (>/= 10% positive Zellen) und hohe Wahrscheinlichkeit eines deutlichen Nutzens einer endokrinen Therapie
Ungewisse Hormonempfindlichkeit	ER Expression und / oder PR Expression positiv aber ungewisser Nutzen einer endokrinen Therapie z. B. aufgrund eines oder mehrerer der folgenden Eigenschaften: - Niedrige Expression von ER und PR - Fehlende Expression des PR - HER2/neu Überexpression oder Gen- Amplifikation - hohes Ausmaß mikrometastastischen Befalls - Expression von Plasminogenaktivator vom Urokinase-typ und Plasminogen activator inhibitor-1 - hohe proliferative Aktivität des Tumors
Hormon-unempfindlich	Fehlende Expression von ER und PR

Alle HER2-positiven Patientinnen erhalten bei Tumoren ab einer Größe von 1 cm unabhängig vom Nodalstatus und bei Tumoren unter 1 cm mit zusätzlichen

Risikofaktoren zusätzlich für ein Jahr eine Therapie mit einem monoklonalen humanisierten Antikörper (Trastuzumab), der sich gegen das HER2-Antigen richtet ([71]). Der Einsatz von Bisphosphonaten wird derzeit in der Adjuvanz noch intensiv diskutiert. In der metastasierten Situation ist die Bisphosphonat-Therapie Standard.

Mammakarzinompatientinnen mit inoperablen fortgeschrittenen Tumorstadien oder mit einem inflammatorischen Mammakarzinom erhalten in der Regel zunächst eine neoadjuvante systemische Therapie (NST) gefolgt von der Operation. Während Patientinnen mit inflammatorischem Mammakarzinom immer eine Ablatio erhalten, ermöglicht die NST bei Patientinnen mit größeren Tumoren eine BET.

1.2. Die Bedeutung der neoadjuvanten systemischen Therapie

Die NST wurde in den frühen 1970er Jahren als Teil einer integrierten therapeutischen Vorgehensweise zur Behandlung von inoperablen, lokal invasiven Mammakarzinomen eingeführt. Während zuvor die sehr ausgedehnte Halsted-Operation als Standardtherapie galt und keine wesentlichen systemischen Therapieoptionen verfügbar waren, kann man heute die Radikalität des Eingriffs durch neue Verfahren ersetzen.

Das Hauptziel der NST ist die lokale Tumormasse in Brust und Axilla zu reduzieren, damit die Brust erhalten bzw. ein gutes kosmetisches Ergebnis bei Brusterhalt erzielt werden kann. Seit ihrer Einführung wurde die NST jedoch nicht nur bei inoperablen, sondern zunehmend auch bei operablen Tumoren angewandt. Mehreren Studien zufolge ist die Wirksamkeit der systemischen Therapie von dem Zeitpunkt ihrer Verabreichung unabhängig ([37]). Allerdings, ermöglicht die NST eine *in vivo* Beurteilung des Therapieansprechens (*In-vivo*-Sensibilitätstestung).

Zu den neoadjuvanten Therapieansätzen gehören zytostatische und endokrine Therapie. Viel versprechend ist die Immuntherapie mit dem Anti-HER2/neu-Antikörper Trastuzumab bei Frauen mit HER2/neu-überexprimierenden Tumoren ([53]). Das in Abbildung 1 dargestellte Schema, das sich auf die Geparquattro-Studie stützt, soll den neoadjuvanten Therapieablauf beispielhaft verdeutlichen.

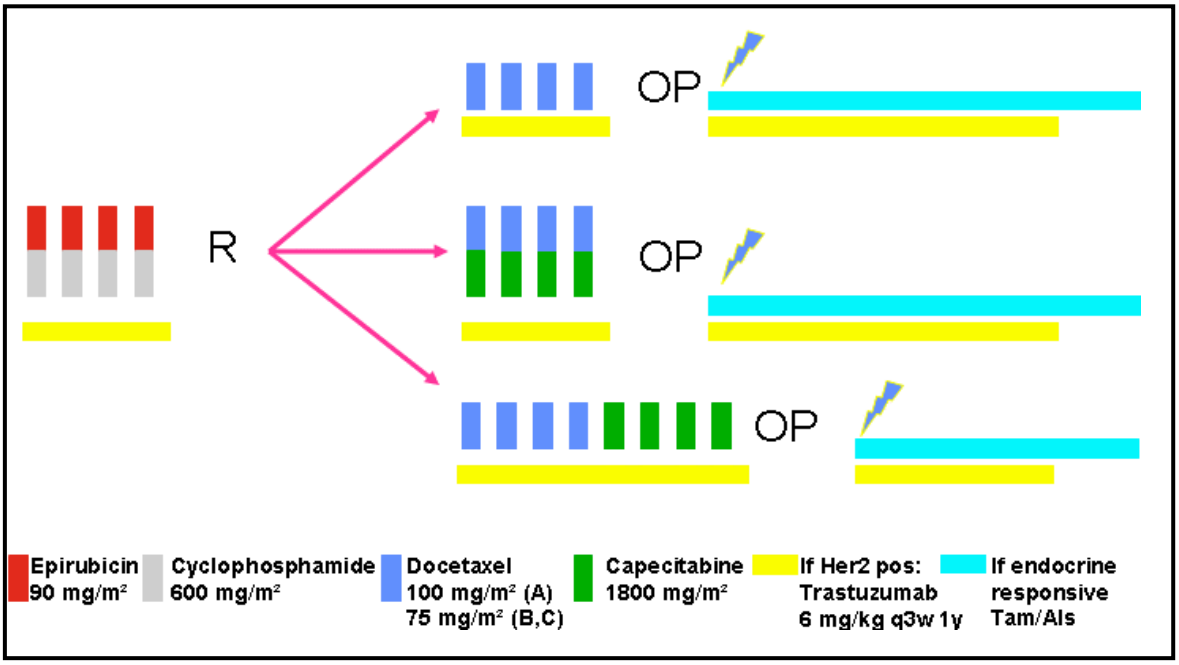


Abb. 1. *Schema der GeparQuattro - Studie: mögliche Therapiekombinationen einer neoadjuvanten Therapie (von: Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, www.ago-online.de)*

1.2.1. Indikation der NST

Nach den aktuellen Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO) ist eine absolute Indikation der NST derzeit bei primär inoperablen und inflammatorischen Mammakarzinomen gegeben. Allerdings besteht optional die Indikation für eine NST bei chirurgischer Notwendigkeit der Mastektomie und Wunsch nach Brusterhalt ([3]). Nach neuesten Empfehlungen können zusätzlich alle Patientinnen mit klarer Indikation für eine adjuvante

zytotoxische Therapie auch eine NST erhalten ([48]). In Tabelle 4 sind die Indikationen für eine NST aufgeführt.

Tab. 4. *Indikationen zur NST*

Indikation
Primär inoperables Mammakarzinom
Inflammatorisches Mammakarzinom
Wunsch nach Brusterhalt bei bestehender Indikation zur Mastektomie aufgrund der Tumorgröße
Bei Indikation einer ähnlich effektiven adjuvanten Chemotherapie

1.2.2. Therapiemonitoring

Während einer NST erfolgen stets engmaschige Kontrollen. Diese bestehen in der Regel aus Palpation bei jedem Zyklus, sowie Sonographie nach jedem zweiten Zyklus. Vorwiegend werden die Mammographie und das MRT am Therapieanfang und -ende durchgeführt. Das Therapieansprechen wird zunächst klinisch (c) und nach erfolgter Operation pathologisch (p) angegeben:

- Komplette Remission (KR) - histologisch kein Nachweis vitaler Tumorreste;
- Partielle Remission (PR) - Reduktion des Tumoranteils um mindestens 50%;
- Stabiler Krankheitsverlauf (SK) - unveränderter Tumor (Verkleinerung bis zu 50% und Vergrößerung bis 25% gelten als nicht signifikant);
- Progressiver Krankheitsverlauf (PK) - Entwicklung neuer, zuvor nicht auffindbarer Gewebsläsionen, oder ein weiteres Wachstum des Primärtumors von mindestens 25%.

Die KR ist mit einer sehr günstigen Prognose assoziiert. Allerdings entwickeln 13-25% der Patientinnen trotz einer KR innerhalb der nächsten fünf Jahre einen Rückfall ([82]). Dies zeigt, dass der lokale Therapieerfolg nicht unbedingt eine Aussage über die systemische Therapiekontrolle erlaubt. Die herkömmlichen bildgebenden Verfahren, sowie die klinische Palpation lassen nicht erkennen, ob eine Patientin mit einer KR auch systemisch geheilt ist. Um eine Aussage über den systemischen Krankheitsverlauf treffen zu können, hat sich der Nachweis von disseminierten Tumorzellen (DTZ) als prognostischer Marker bewährt.

DTZ werden bei 30-40% aller Mammakarzinompatientinnen im KM detektiert und können den Beginn einer systemischen Erkrankung anzeigen ([34]). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass der immunzytochemische Nachweis von DTZ mit einer schlechten Prognose assoziiert ist ([20],[15],[19],[23],[27],[39],[42],[72]). Die Bestimmung des Knochenmarkstatus nach NST könnte daher den bis *dato* nicht bestimmbaren Effekt auf die systemische Therapie miterfassen ([52],[37]). Der Nachweis eines DTZ-freien KM bzw. der Nachweis apoptotischer DTZ im KM würde einen Therapieeffekt auf die systemische Komponente anzeigen.

1.3. Die klinische Bedeutung der Tumorzelldissemination

Das Auftreten einer Fernmetastasierung ist die Haupttodesursache bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom ([45]). Bereits 1889 beschrieb Paget einen Zusammenhang von Mammakarzinomerkrankung und Knochenmetastasen ([62]).

Definitionsgemäß versteht man unter hämatogener Tumorzelldissemination das Vorhandensein isolierter Tumorzellen in tumorfernen Körperkompartimenten ([28]). Bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lassen sich DTZ in Mammakarzinompatientinnen mit einem negativem Lymphknotenstatus

nachweisen ([13]). Bei etwa einem Drittel dieser Patientinnen kommt es im Verlauf der Erkrankung zur Fernmetastasierung ([25]). Diese wird vermutlich von einer frühzeitigen hämatogenen Streuung von Tumorzellen verursacht. Von der Tumorzelldissemination abzugrenzen ist die Mikrometastasierung, die als Zellkomplex größer 0,2 mm definiert ist und bereits eine Stromainvasion zeigt.

Die große Variabilität des biologischen Verhaltens des Mammakarzinoms führt zu erheblichen Schwierigkeiten bei der individuellen Einschätzung des Krankheitsverlaufs und des Therapieansprechens. Der hämatogenen Tumorzelldissemination wird eine entscheidende Rolle in der Metastasierungskaskade beigemessen. Disseminierte Tumorzellen werden als Surrogatmarker einer minimalen Resterkrankung angesehen. Ihre Detektion im KM bietet die Möglichkeit, Patientinnen mit einem hohen Rezidivrisiko zum Zeitpunkt der Primärdiagnose zu identifizieren. Desweiteren können Veränderungen der Tumorzelllast im KM den Behandlungserfolg reflektieren und somit zum Therapiemonitoring beitragen.

1.3.1. Methoden zum Nachweis disseminierter und apoptotischer Tumorzellen

Zum Nachweis von DTZ wird meist intraoperativ eine Knochenmarkaspiration durchgeführt. Anschließend werden die Tumorzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und Zytospins angefertigt. Diese Nachweismethode wird in Kapitel 2.4 genauer erläutert.

1.3.1.1. Zytokeratine

Für den Nachweis von DTZ werden Antikörper gegen Zytokeratinproteine eingesetzt. Zytokeratine (CK) sind Intermediärfilamente, die von epithelialen Zellen und Neoplasien epithelialer Herkunft gebildet werden ([58],[59]). Epitheliale und damit CK-positive Zellen kommen im mesenchymalen Gewebe wie KM, Blut und Lymphknoten nicht vor. Das Vorhandensein CK-positiver Zellen in

diesem Gewebe ist somit hinsichtlich einer beginnenden Metastasierung bedeutsam.

Um eine hohe Sensitivität der Nachweismethode erreichen zu können, werden in der Routinediagnostik Pan-Zytokeratin-Antikörper verwendet, die gegen mehrere CKs gerichtet sind. Die Anwendung der Pan-Zytokeratin-Antikörper wird vom internationalen Konsensus für den standardisierten Nachweis und die klinische Implementierung von DTZ empfohlen ([31]).

1.3.1.2. Immunhistochemie

Der Goldstandard zur Detektion von DTZ, also CK-positiver Zellen, ist die Immunhistochemie. Ihr Mechanismus beruht auf der Affinität von Antikörpern (AK) gegenüber bestimmten Epitopen ([36]). In diesem Fall sind diese Epitope Zytokeratin-Antigene, an die Anti-Zytokeratin-Antikörper binden. Durch diese Antigen-Antikörper-Reaktion und ein daran gekoppeltes Detektionssystem, das die Bindung sichtbar macht, werden DTZ detektiert. Eine andere Antikörper-basierte Detektionsmethode für DTZ stellt die Immunfluoreszenz dar. In diesem Verfahren werden CK-Antigene mit Hilfe Fluorochrom-markierter Aks sichtbar gemacht. Im Vergleich zu den molekularbiologischen Verfahren, bei denen mit Hilfe der PCR gewebsspezifische mRNAs amplifiziert werden ([7],[17]), liegt der Vorteil der Antikörper-basierten Detektionsmethoden darin, dass die Zellen zusätzlich morphologisch beurteilt werden können. Die Verwendung mehrerer AKs und die Anwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe (Immunfluoreszenz) ermöglicht Doppel- und Mehrfachfärbungen, die nicht nur dem Nachweis von DTZ, sondern auch ihrer weiteren Phänotypisierung dienen ([64]).

1.3.1.3. Apoptotische DTZ

Die Detektion apoptotischer Tumorzellen kann ebenfalls mittels Immun-zytochemie erfolgen. In der frühen Phase der Apoptose exprimiert die Zelle eine Reihe gespaltener CK18 Epitope. Um diese detektieren zu können, wird der spezifisch gegen CK18 gerichtete M30-Antikörper verwendet.

Die Apoptose ist ein physiologisch programmierter Zelltod, der zur enzymatischen Fraktionierung der Desoxyribonukleinsäure, des Kerns und Zellleibes führt, die dann von Makrophagen phagozytiert werden. Diese Zellen sind histologisch durch zelluläre Schrumpfung, Bläschenbildung der Membran („Blebbing“), Kondensation und Fragmentierung charakterisiert ([56]). Zunächst sind jedoch die Veränderungen im Zytoskelett zu erkennen, bei denen das intermediäre Filament-Netzwerk durch CK-einschlüsse ersetzt wird ([38]). Der Goldstandard zur Detektion apoptotischer Zellen ist die morphologische Beurteilung mit dem Elektronen- oder dem Lichtmikroskop. Abbildung 2 zeigt vier Momentaufnahmen einer Zelle in ihren Apoptosestadien ([74]).

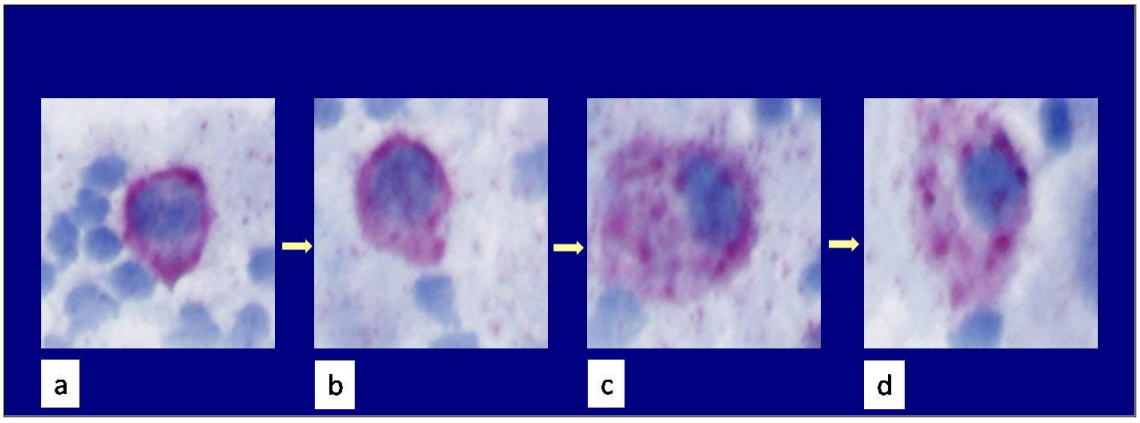


Abb. 2. *Stadien einer apoptierenden Zelle (Detektion mittels Immunzytochemie)*
a. Beginn der Apoptose
b. Zelluläre Schrumpfung
c. Membran-Blebbing (Die Auffaltung der Proteine des Zytoskeletts führt zur Blasenbildung)
d. Verdichtung des Chromatins und darauf folgend die Fragmentation der Zelle in Vesikel

1.4. Problemstellung und Zielsetzung

Die NST ist eine etablierte Strategie, um die Tumorgröße zu reduzieren und somit eine BET zu ermöglichen. Derzeit werden Palpation und bildgebende Verfahren eingesetzt, um das Therapieansprechen zu kontrollieren. Die anschließende histologische Untersuchung des ehemaligen Tumorgewebes

erlaubt die endgültige Beurteilung des lokalen Therapieeffektes. Da DTZ als Surrogatmarker für die minimale residuale Tumorerkrankung (MRD) gelten, könnte der DTZ-Nachweis zur Evaluation des systemischen Therapieerfolges beitragen. Bis dato ist die Auswirkung der NST auf die Tumorzelldissemination nicht ausreichend untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Knochenmarkaspirate von Patientinnen nach einer NST auf apoptotische und vitale Tumorzellen hin untersucht. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Wie hoch ist die Positivitätsrate apoptotischer und nicht apoptotischer DTZ im KM nach abgeschlossener NST?

2. Besteht eine Korrelation des KM-Status mit den klassischen klinisch-histologischen Prognosefaktoren?

3. Existiert eine Korrelation des KM-Status (Präsenz apoptotischer und nicht apoptotischer Tumorzellen) mit dem Therapieansprechen des Primärtumos auf NST?

2. Methoden

2.1. Patientenkollektiv

157 Patientinnen mit einem primärem, nicht metastasiertem Mammakarzinom, die in den Jahren 2002-2005 in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen behandelt wurden, wurden in diese Studie aufgenommen. Dabei galten ein stanzbioptisch histologisch gesicherter Befund eines primären Mammakarzinoms, die Durchführung einer NST und die anschließende operative Behandlung in der Universitäts-Frauenklinik als Auswahlkriterium für deren Rekrutierung. Ausschlusskriterien waren eine bereits vorausgegangene Krebserkrankung bzw. ein Zweitkarzinom. Die klinische Beurteilung des Therapieerfolgs beinhaltete die physikalische Untersuchung, Ultraschall, Mammographie und ggf. MRT. Die Operation und die intraoperative Knochenmarkaspiration wurden drei bis vier Wochen nach Abschluss des letzten Zyklus der systemischen Therapie durchgeführt.

2.2. Knochenmarkpunktion

Während des primären operativen Eingriffes wurden den Patientinnen 15 bis 20 ml KM entnommen. Unter Verwendung der Jamshidi Technik, wurde der vordere Beckenkamm punktiert. Das Knochenmarkaspirat wurde heparinisiert und innerhalb von 24 Stunden im Labor verarbeitet. Knochenmarkpunktate, die weniger als 10 ml Volumen ergaben, wurden verworfen. Diese Patientinnen wurden aus der Studie ausgeschlossen.

2.3. Aufbereitung des Knochenmarks

Die Detektion von DTZ erfolgte im immunzytologischen Labor der Universitäts-Frauenklinik Tübingen nach den Konsensus-Empfehlungen zur

Tumorzelldetektion, sowie Empfehlungen der *International Society for Cellular Therapie* ([18],[31]). Das Protokoll ist im nachfolgenden detailliert beschrieben. Abbildung 3 demonstriert den Weg von der Knochenmarkaspiration bis zum gefärbten histologischen Ergebnis.

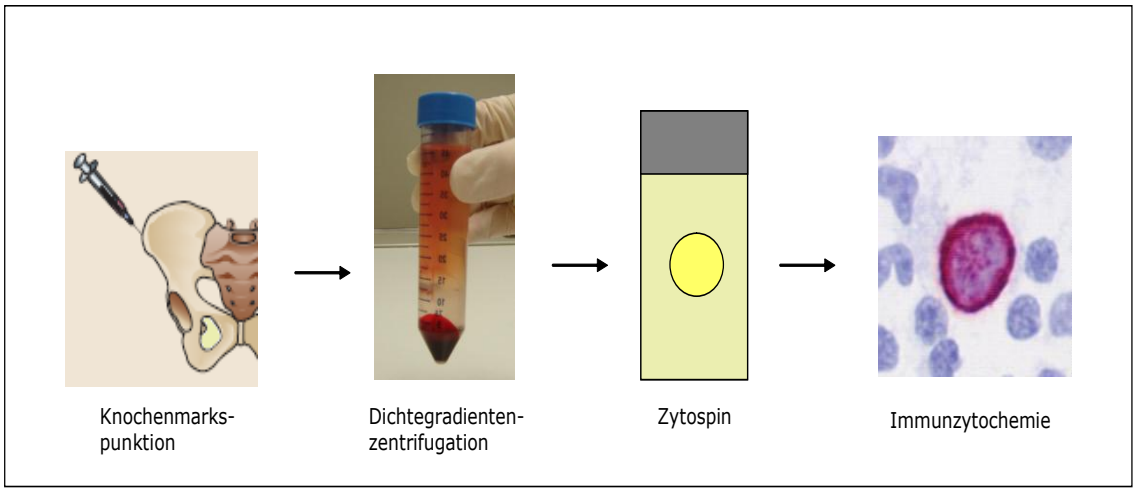


Abb. 3. *Einzelne Schritte der Knochenmarkaufarbeitung*

2.3.1. Anreicherung der mononukleären Zellfraktion

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde Ficoll-Hypaque (Biochrom Deutschland), eine synthetische Polysaccharidlösung deren Dichte durch Zugabe von Natriumdiatrizoat auf einen Wert von 1.077 g/cm³ eingestellt wurde, verwendet.

Das heparinisierte KM wurde in 50 ml-Falconröhrchen überführt und mit HANKS-Lösung auf 30 ml aufgefüllt. Im Anschluss wurde ein zusätzliches Falconröhrchen mit 15 ml Ficoll vorbereitet, das mit dem verdünnten KM überschichtet wurde. Bei 1600 U/min und Raumtemperatur wurde das Röhrchen für 20 Min. zentrifugiert. Bei der Zentrifugation bildeten sich die in Abbildung 4 dargestellten Phasen.

Im Anschluss wurde die Interphase, in der sich die mononukleären Zellen befinden, mitsamt der oberen Röhrchenfraktion in ein neues Röhrchen pipettiert

und die Suspension mit PBS (Phosphate Buffered Saline) auf 30 ml aufgefüllt. Daraufhin erfolgte erneut eine Zentrifugation für 7 Min bei 1600 U/min. Nach vorsichtigem Abkippen des Überstandes wurden die mononukleären Zellen (MNC) in 5-10 ml Erythrozyten-Lysepuffer von den Erythrozyten getrennt. Die Suspension wurde 10 Min im Kühlschrank inkubiert und anschließend zentrifugiert (7 Min, 1600 U/min). Der Überstand wurde abgekippt und das Sediment, in dem sich nun MNCs befinden, mit 5-10ml PBS resuspendiert.

Anschließend wurde die Zellzahl der gewonnenen Zellsuspension mit einem vollautomatischen hämatologischen Zellzählgerät bestimmt und die Zellkonzentration auf 1,5 x 10^6 Zellen/ml eingestellt.

Abbildung 4 zeigt die Auftrennung der Knochenmarkbestandteile in Folge der Dichtegradientenzentrifugation.

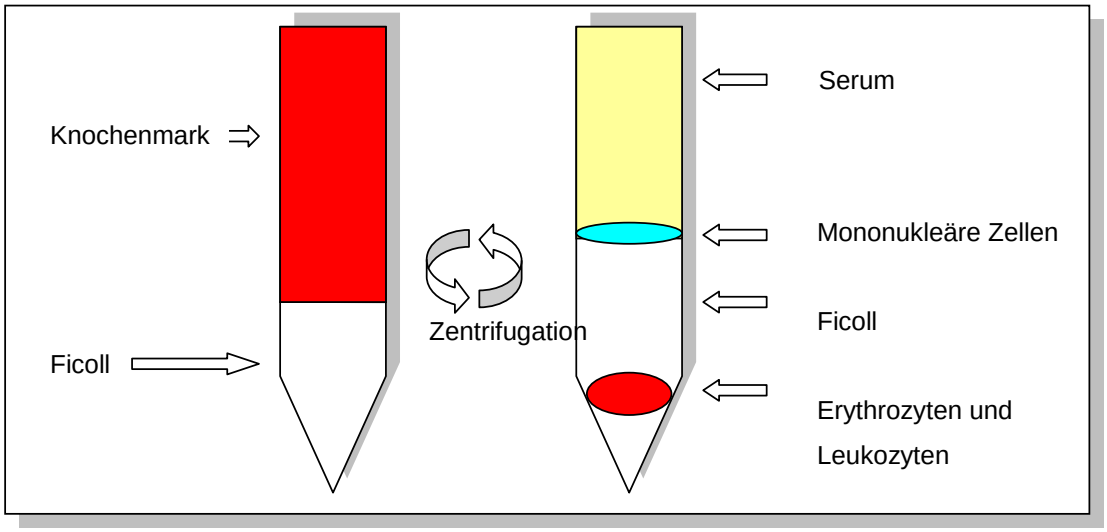


Abb. 4. *Die Auftrennung der Knochenmarkbestandteile nach der Dichtegradientenzentrifugation*

2.3.2. Anfertigung von Zytospins

Sechs unbeschichtete Objektträger wurden für die Anfertigung der Zytospins mit Filterkarten bestückt und gemäß der Vorschrift des Herstellers in die Zytospinhalterungen gespannt. In die Aussparung wurde 1 ml der Zellsuspension (entsprechend 1,5 x 10^6 Zellen) gegeben und die Oblektträger für 5 Min bei 1600 U/Min. Der sich gebildete flüssige Überstand wurde verworfen. Die Halterung wurde entfernt. Die Zytospins wurden weitere 30 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurden die Filterkarten entfernt und die Zytospins über Nacht getrocknet.

2.4. Immunzytochemische Färbung

Die Immunzytochemie ist die Methode der Wahl zum Nachweis von DTZ. Sie beruht auf der Antigen-Antikörper-Reaktion. Mit Hilfe der Affinität eines AKs zum passenden Epitop (spezifisches Zell-Oberflächen-Antigen) kann ein bestimmtes Antigen einer Zelle gebunden werden. Der AK ist an ein Detektionssystem gekoppelt, das im Falle einer Bindung an das Antigen eine enzymatische Reaktion auslöst, welche die Zelle zytochemisch farblich sichtbar macht. Diese Methode wird direkte immunzytochemische Färbung genannt. In dieser Arbeit wurde die indirekte Methode verwandt, bei der zusätzlich ein Brückenantikörper zum Einsatz kommt. Erst der an ein Enzym gekoppelte Tertiärantikörper macht die Zelle über eine signalverstärkende Farbreaktion sichtbar.

Hier bestand dieser mit Enzym konjugierte Tertiärantikörper aus dem so genannten APAAP-Komplex (Alkalische Phosphatase – Anti-Alkalische-Phosphatase). Es handelt sich um einen löslichen Immunkomplex, der aus anti-Alkalische Phosphatase AK mit Alkalische Phosphatase-Proteinen besteht. Abbildung 5 soll das Prinzip der Färbung veranschaulichen.

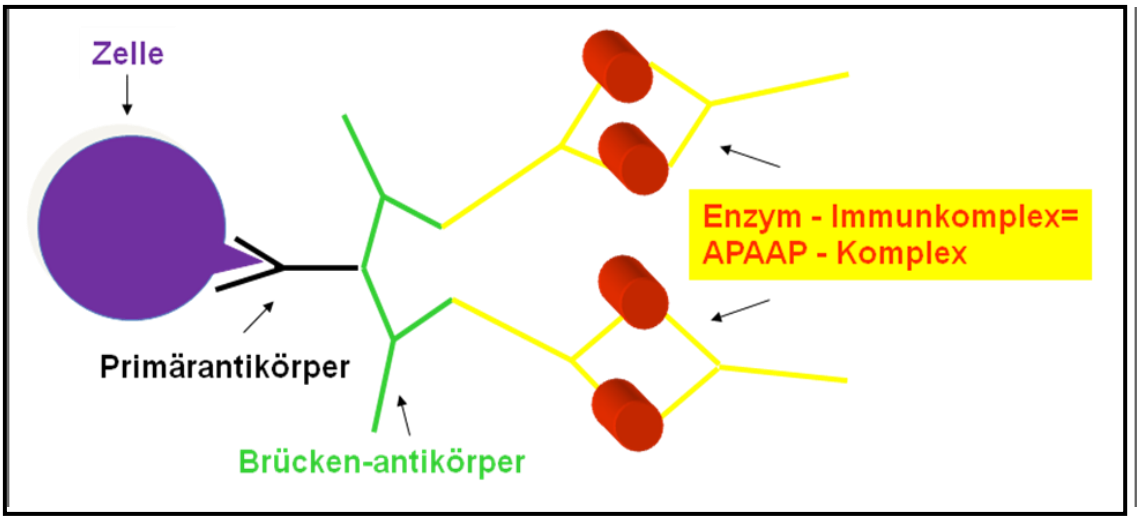


Abb. 5. *Das APAAP-Prinzip der Immunzytochemie*
Die Tumorzelle wird mit einem epithelialen Primärantikörper markiert. Anschließend wird ein Brückenantikörper verwandt, an den wiederum der Komplex Alkalische Phosphatase mit Anti-Alkalischer Phosphataseantikörpern (APAAP) binden kann. Dieser Schritt löst eine enzymatische Farbreaktion aus, die die Tumorzelle mit ihren epithelialen Anteilen sichtbar macht.

2.4.1. Färbung mit Hilfe von Panzytokeratin A45B-B3 / APAAP Detektion

Die immunzytochemische Färbung der Präparate erfolgte automatisiert am Dako Autostainer (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Der Autostainer ist ein Pipettierroboter, der eine bestimmte Menge Reagenz (200 µl) auf ein zuvor definiertes Probenareal gibt. Sämtliche Inkubationsschritte finden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer statt.

Die Zytospins wurden mit 1x TBS gewaschen und mit 0,5% Formalin für 10 Min fixiert. Nach einem Waschschritt erfolgte die Demaskierung der Zytokeratin-Antigene mit *Antibody Diluent* für 10 Min. Direkt im Anschluss wurde der Panzytokeratin A45B-B3 Antikörper (1:400), der gegen die Zytokeratin 8, 18 und 19 - Antigene gerichtet ist, aufgetragen und für 15 Min. inkubiert. Nach einem Waschschritt mit TBS wurden die Zellen für 15 Min. mit dem Sekundärantikörper (ChemMate Kit Bottle A) behandelt. Ungebundene Immunkomplexe wurden mit TBS entfernt, bevor die APAAP Komplex Suspension (ChemMate Kit Bottle B) für 15 Min. aufgetragen wurde. Nach dem

Waschen mit TBS erfolgte die zweimalige Inkubation mit dem Substrat Neufuchsin (ChemMate Kit Mix Bottle C, D, E, F nach Packungsvorschrift) für jeweils 6 Minuten. Die Substratreaktion wurde mit Puffer abgestoppt.

Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxilin (1:3 Verdünnung) für 1 Minute. Abschließend wurden die Zytospins mit *Aqua dest*. gewaschen und zur Trocknung bei Raumtemperatur belassen. Eingedeckt wurden die Objektträger mit dem wasserlöslichen Eindeckmedium Aquatex (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) zur anschließenden mikroskopischen Auswertung.

2.4.2. Detektion apoptotischer Zellen unter Verwendung des M30-Antikörpers

M30 ist ein monoklonaler AK aus der Maus, der spezifisch gegen eine Reihe gespaltener Epitope des Zytokeratin 18 gerichtet ist. Er wird im weiteren Verlauf von menschlichen IgG-Anti-Maus-Antikörpern erfasst und komplexiert. Die Färbung mit dem Apoptosemarker M30 verlief nach dem im Punkt 2.4.1. genannten APAAP-Prinzip, mit der Verdünnung 1:100 für 30 Minuten. Die Färbung wurde am ACIS (Automated Cell Imaging System; s.u.) ausgewertet.
Die Abbildungen 6 und 7 illustrieren einige Beispiele apoptotischer DTZ und im Vergleich dazu eine vitale DTZ.

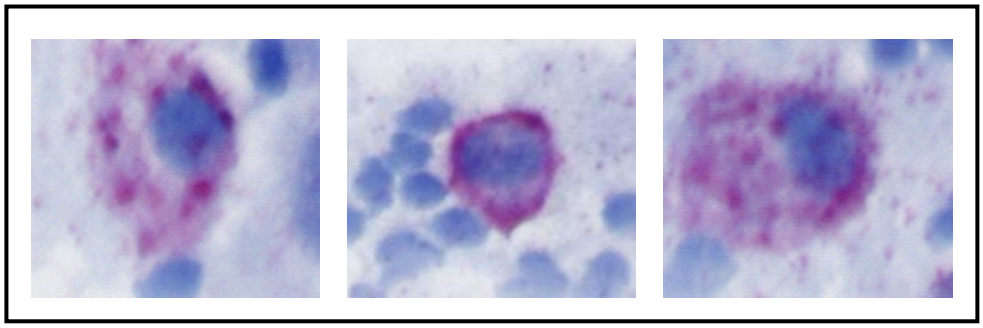


Abb. 6. *DTZ in unterschiedlichen Apoptosestadien*

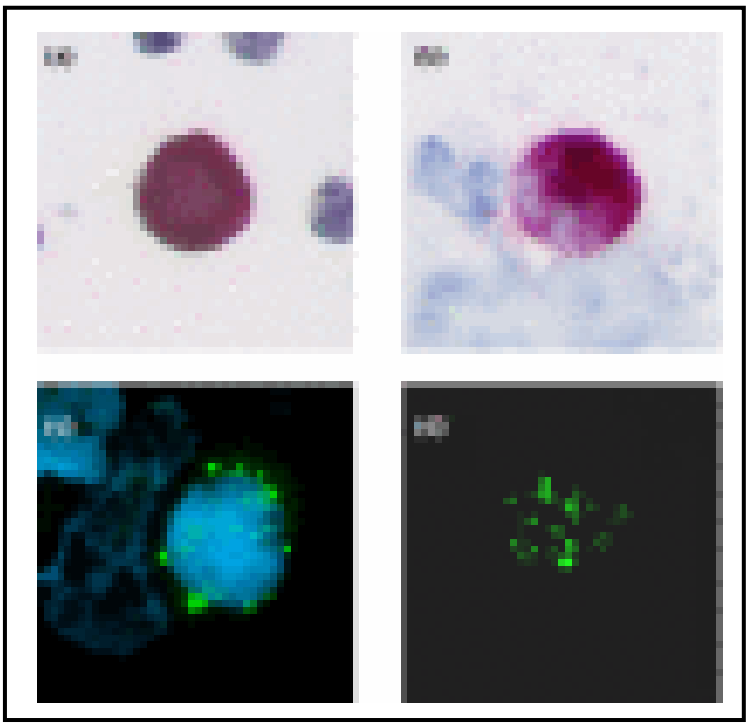


Abb. 7. *Vitale DTZ, detektiert mit Hilfe der APAAP-Komplex-Methode (oben links); apoptotische Tumorzelle, identifiziert durch typische Morphologie und Färbung mit Hilfe des M30-Antikörpers (oben rechts); apoptotische Tumorzelle, identifiziert durch Morphologie, Färbung mit Hilfe des Fluoreszein-5-Isothiocyanat-markierter Anti-Zytokeratin Antikörpers (unten links); apoptotische Tumorzelle ohne nachweisbares Chromatin (unten rechts)*

2.5. Die mikroskopische Auswertung

Automatisierte Mikroskopie ist manuellen Auswertmethoden bezüglich Detektionsrate, Qualitätssicherung und Reproduzierbarkeit deutlich überlegen (50,49,12). Das System automatisiert die Aufgaben des Zytologen und verbessert damit Genauigkeit und Zuverlässigkeit der bildbasierenden Untersuchungen. Aus diesem Grund erfolgte die Detektion von DTZ unter Verwendung des Automated Cell Imaging System, ACIS (Clarient Inc., Aliso Valley, CA, USA; Abbildung 8). Das ACIS-Mikroskop ist über eine Kamera an einen Computer gekoppelt, welcher mit einer Image Processing Software, Version 2.4.4.7 ausgestattet ist. Etwa 100 Zytospins wurden pro Lauf mit diesem Gerät analysiert. Die Analyse besteht aus drei Schritten. Zuerst fokussiert das Gerät, dann detektiert es die DTZ und erstellt anschließend einen Report.

Abb. 8. *Das ACIS: (links) der Bildschirm, der über eine Kamera mit dem ACIS-Mikroskop (rechts) verbunden ist, das ca. 100 Zytospins erfassen kann*

2.5.1. Fokussierung

Bei einer geringen Vergrößerung (10X) sucht das ACIS initial nach drei zufällig selektierten Fokuspunkten, und speichert diese Bilder. Nur bei erfolgreicher Fokussierung erfolgt das Scannen der Zellen. Die Fokuspunkte dienen zum Ausschluss ungeeigneter Objektträger, beispielsweise mit eingeschlossenen Luftbläschen oder insgesamt schlechtem Zellbild, z.B. durch zu altes Probenmaterial oder fehlerhafte Aufbereitung. Die Abbildung 9 zeigt drei Fokuspunkte und eine ideale Zelldichte bei gutem Zustand der Zellen und des Präparates.

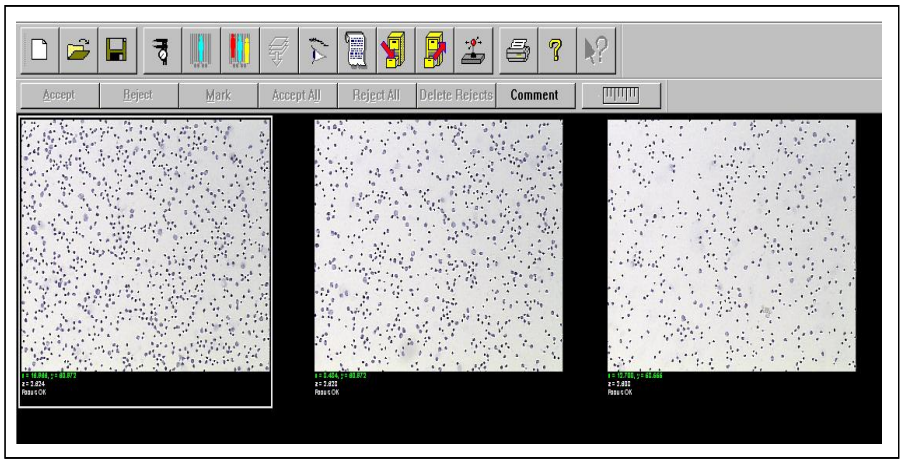


Abb. 9. *Drei Fokuspunkte eines Präparats*
Die Farbintensität, die Zelldichte und der Zustand der Zellen insgesamt werden beurteilt. Artefakte werden ausgeschlossen.

2.5.2. Scannen

Als zweiter Schritt werden die Objektträger bei geringer Vergrößerung gescannt und die verdächtigen Tumorzellen selektiert. Zuvor wird eine individuelle MRD Applikation, welche Morphologie und Farbgebung der Tumorzelle definiert, erstellt. Auf diese Weise können die Tumorzellen von Artefakten, Luftbläschen oder anderen atypischen Zellen abgetrennt werden. Die Zellen werden dann mit einer 40- oder 60-fachen Vergrößerung dargestellt und gespeichert.

2.5.3. Report-Erstellung

Die gespeicherten Bilder werden im Anschluss in einem *Slide Report* (siehe Abbildung 10) angezeigt und können hier nochmals beurteilt werden. Für jede Probe wird ein Analyseprotokoll mit Bildern der detektierten Tumorzellen erstellt, das von einem Zytologen beurteilt wird ([10]).

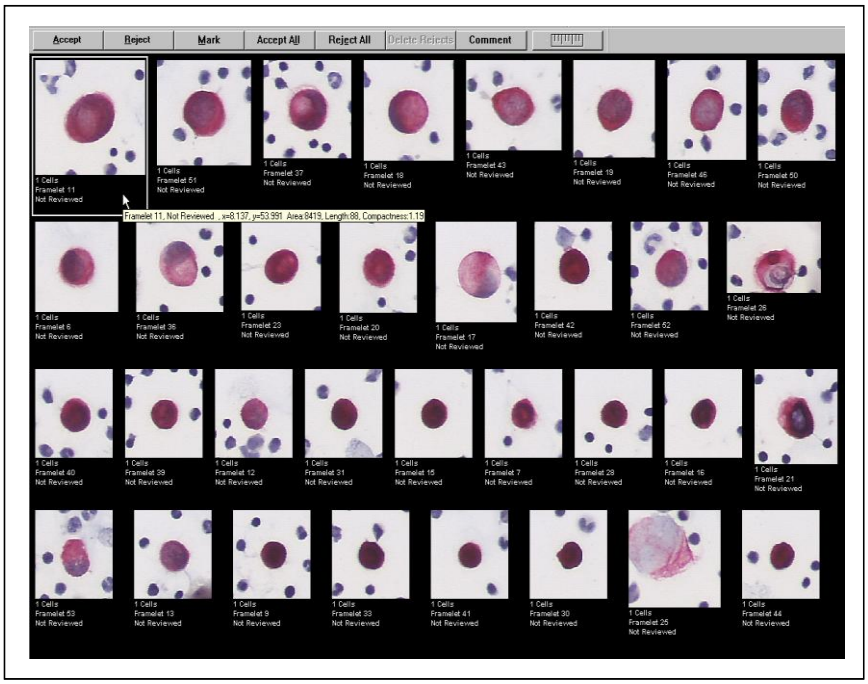
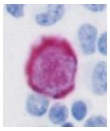
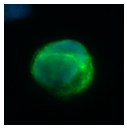
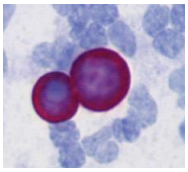
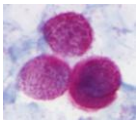
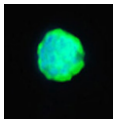


Abb. 10. *Darstellung des Slide Reports am ACIS*
Die Zellen müssen einzeln evaluiert und anschließend in drei Kategorien eingeteilt werden: *1. → Accepted: eindeutige Zuordnung Tumorzelle*
2. → Rejected: Artefakt oder epitheliale Zellen benignen Ursprungs
3. → Marked: Keine sichere Zuordnung möglich.

2.6. Kriterien zur Identifikation disseminierter Tumorzellen

Folgende, sich nach den Konsensus-Empfehlungen sowie Empfehlungen der *International Society of Cell Therapy* richtende Kriterien dienten der Identifikation von DTZ. In Tabelle 5 sind morphologische Kriterien gelistet. In der rechten Spalte sind Beispielbilder von DTZ zu sehen. Dabei sind die grünen Zellen ebenfalls DTZ, die zusätzlich mit einem mit Fluoreszenz-5-Isothiocyanate konjugierten Antizytokeratin-Antikörper detektiert wurden.

Tab. 5. *Kriterien zur Identifikation von DTZ ([35]).*

Zellgröße	Tumorzellen > hämatopoetische Zellen	    
Zellkern	Zellkern vergrößert	
	Unregelmäßige Chromatinstruktur	
	Nukleoli	
	Zellkern / Zytoplasma Relation >1	
Zytokeratin	Anfärbung unregelmäßig stark	
	Evtl. perinukleäre Farbverdichtung	
	Zytokeratinfärbung überdeckt Zellkern	
	Eventuelle Darstellung von Zytokeratinfilamenten	
Zellbild	Zellcluster	

2.7. Kontrollen

Um die Nachweisgrenze dieses Testverfahrens zu bestimmen, wurden im Vorfeld Verdünnungsreihen mit MCF-7 Mammakarzinom-Zellen (10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 Zellen) in jeweils 10 ml Blut durchgeführt. Jeder Färbelauf beinhaltete ein Set von Kontrollobjektträgern zur Sicherung von Sensitivität und Spezifität.

(A) Positivkontrollen zur Überprüfung der Sensitivität bestanden aus Zytospins von peripheren MNC mit einer Zellkonzentration von [c] 1.5 x 10^6 Zellen/ml, die

mit 10% MCF-7 Zellen gespiked wurden. Nach Ernten der Zellkultur zur Herstellung der Kontrollen wurde diese mehrfach mit PBS gewaschen, in 10 ml PBS resuspendiert und die Zellkonzentration nach manueller Messung auf 1,5 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. Im Anschluss wurden die gewaschenen MCF-7 Zellen zu der MNC Suspension zugefügt, um eine Endkonzentration von 1,5 x 10^5 MCF-7 Zellen/ml zu erhalten. Zytospins wurden hergestellt, bei -20^0C konserviert und unmittelbar vor jedem Lauf einzeln aufgetaut.

(B) Negativkontrollen enthielten ausschließlich MNC von gesunden Probanden und keine MCF-7 Zellen. Sie wurden ebenfalls bei jedem Färbelauf mitgeführt und wie Patientenproben behandelt.

(C) Eine Isotypenkontrolle durch Klon MOPC21 (#555746, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) diente zur Sicherung der Spezifität und beinhaltete die Färbung einer MCF-7 Kontrolle (s.o.) mit einer Abwandlung des Färbeprotokolls. Anstelle des Sekundärantikörpers wurde der Objektträger mit dem Anti-Maus-Immunglobulin IgG1(κ) inkubiert.

(D) Positivkontrollen M30: Positivkontrollen zur Überprüfung der Apoptose bestanden aus Zytospins mit peripheren MNC in einer Konzentration [c] 1,5 x 10^6 Z/ml, die mit 10% apoptotischen MCF-7 Zellen gespiked wurden. Die Herstellung orientierte sich an o.g. Protokoll, jedoch wurden die aus der Zellkultur gewonnenen Tumorzellen vor dem *Spiking* einem mit einer 10 mg/ml Natriumazid-Lösung für 4 Stunden bei 37^0C inkubiert. Die beginnende Apoptose wurde lichtmikroskopisch mittels Anfärbung durch Trypanblau kontrolliert.

2.8. Statistische Analyse

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde der Zusammenhang zwischen dem DTZ-Nachweis und den klinisch-pathologischen Faktoren untersucht. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der SPSS-Software (Version 11.5) durchgeführt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Beschreibung des Gesamtkollektivs

157 Patientinnen wurden in unsere Analyse aufgenommen. Dabei handelte es sich um Patientinnen mit einem primären, nicht-metastasierten Mammakarzinom, die an der Universitätsfrauenklinik Tübingen eine NST erhalten hatten. Im Rahmen des operativen Eingriffs wurde bei allen Patientinnen KM aus der *Spina iliaca anterior superior* entnommen. Dieses Aspirat wurde immunzytochemisch auf eine hämatogene Tumorzell-dissemination hin untersucht. In Tabelle 6 sind die Charakteristika des Patientenkollektives zusammengefasst.

Der Altersmedian der Patientinnen betrug 53 Jahre. Dabei reichte das Alter von 24 bis 85 Jahre. Die meisten Patientinnen wiesen nach der NST Tumoren mit den Stadien T2 bis T4 auf. 52% der Patientinnen waren nodal-positiv. Alle Patientinnen waren bei Diagnosestellung und Zellentnahme metastasenfrei. Zum Ausschluss einer Filialisierung wurde bei allen Patientinnen eine bildgebende Diagnostik, bestehend aus Oberbauchsonographie, Röntgen-Thorax und Knochenszintigraphie, durchgeführt.

Das invasiv duktale Karzinom war der vorherrschende Tumortyp (61%). Desweiteren wurden vor allem invasiv lobuläre Tumoren diagnostiziert (21%). Von den 157 Patientinnen waren 46% prämenopausal. Bei 75% der Patientinnen war der Tumor ER-positiv, 49% der Tumoren waren ebenfalls PR-positiv. Die Überexpression des HER2-Rezeptors, die mit dem ER- und PR-Status für die Prädiktion einer Therapie eine Rolle spielt, konnte bei 25% der Patientinnen nachgewiesen werden.

Tab. 6. *Basisinformationen zum Gesamtkollektiv*

	N	Anteil aller Patientinnen
Gesamt	157	100%
Tumorgröße		
ypT0	24	15%
ypT1	61	38%
ypT2-T4	72	46%
Lymphknotenstatus		
Negativ	75	47%
Positiv	81	51%
Histologie		
Duktal	96	44%
Lobulär	33	21%
Andere	26	16%
ER-Rezeptorstatus		
Negativ	39	25%
Positiv	117	75%
PR-Status		
Negativ	68	43%
Positiv	89	57%
HER2-Status		
Negativ	115	73%
Positiv	39	25%
Menopausenstatus		
Prä	72	46%
Post	85	54%
Grading		
I-II	106	67%
III	41	26%
NST		
Chemotherapie	142	90%
Hormontherapie	15	10%

3.2. Pathologisches Ansprechen auf die NST

Von den 157 Patientinnen erhielten 142 eine Chemotherapie als NST. Die übrigen Patientinnen wurden mit einer endokrinen Therapie behandelt. In Bezug auf das Ansprechen zeigten 24 der 157 Patientinnen (15%) eine pathologische KR. Eine PR wurde bei 87 Patientinnen (56%) erreicht. Bei 41 Patientinnen (26%) blieb das Tumorstadium unverändert (SK), bei 5 Patientinnen (3%) war der Krankheitsverlauf progressiv (PK). In Abbildung 11 und in Tabelle 7 sind die klinischen Response Daten aufgeführt.

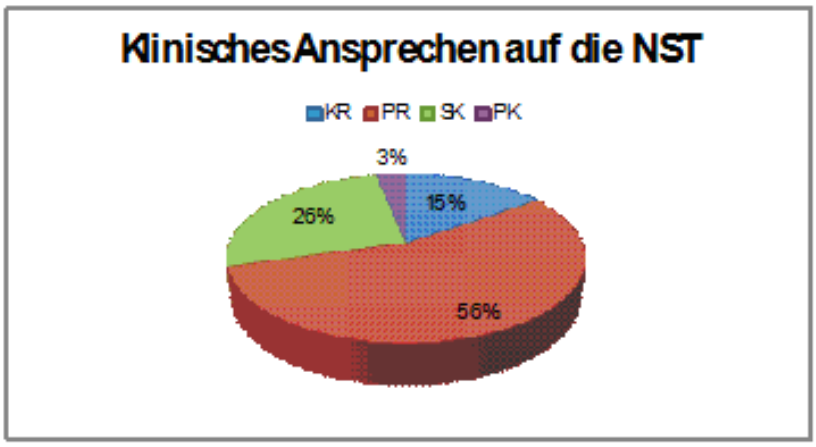


Abb. 11. *Die Verteilung der klinischen Response nach der NST*
Abkürzungen: KR – Komplette Remission, PR – partielle Remission, SK – Stabiler Krankheitsverlauf, PK – progressiver Krankheitsverlauf

3.3. Inzidenz der DTZ nach NST

157 KM-Aspirate wurden immunzytochemisch untersucht. Nach Beendigung der NST konnten bei 101 der 157 Patientinnen (64%) DTZ (apoptotisch oder vital) detektiert werden. Vitale DTZ wurden bei 84 der 157 Patientinnen (53%) nachgewiesen. Die restlichen Patientinnen besaßen ausschließlich apoptotische DTZ. In Abbildung 12 ist eine vitale DTZ einer Patientin mit primärem Mammakarzinom abgebildet.

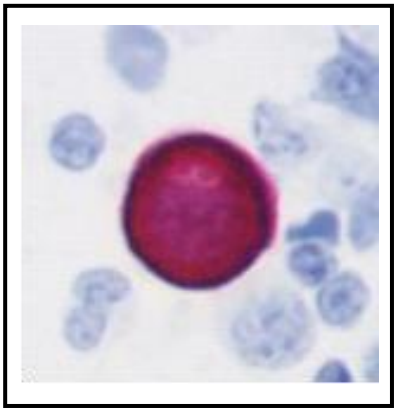


Abb. 12. Zytokeratin-positive DTZ
Die DTZ ist rot dargestellt. Die blauen Zellen im Hintergrund sind MNCs..

Vitale DTZ wurden bei 80% der Patientinnen mit einem PK und 68% der Patientinnen mit SK detektiert. Hingegen waren in 48% der Patientinnen mit einer PR und in 42% der Patientinnen mit einer KR vitale DTZ nachweisbar ($p < 0,05$). Trotz des hervorragenden Ansprechens des Primärtumors, konnten also persistierende Tumorzellen im KM detektiert werden. Dieses Verhältnis veranschaulichen Abbildung 13 und Tabelle 7.

Tab. 7. *Vitale DTZ im KM von Mammakarzinompatientinnen nach NST*

	N	**KM positiv[1] N / %**
Total	157	84 / 53%
Ansprechen auf NST		
KR	24	10 / 42%
PR	87	42 / 48%
SK	41	28 / 68%
PK	5	4 / 80%

[1] vitale DTZ nachweisbar,

Abkürzungen: KR – Komplette Remission, PR – partielle Remission, SK – Stabiler Krankheitsverlauf, PK – progressiver Krankheitsverlauf

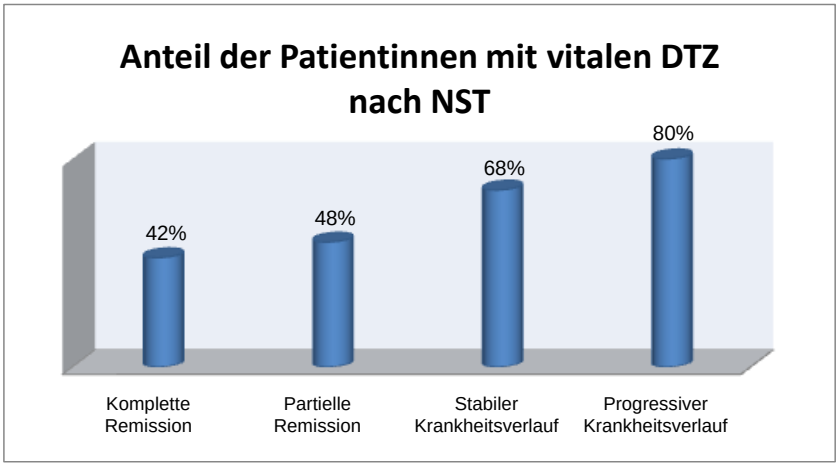


Abb. 13. *Der prozentuale Anteil KM-positiver Patientinnen mit kompletter / partieller Remission und stabilem / progressiven Krankheitsverlauf nach neoadjuvanter systemischer Therapie*

3.4. Korrelation des KM-Status mit klinisch-histologischen Faktoren und Therapieansprechen

Eine multivariate statistische Auswertung der etablierten prognostischen Faktoren wie des Lymphknotenstatus, des Hormonrezeptorstatus oder des Gradings mit dem Knochenmarkstatus erbrachte keine signifikante Assoziation ($p \geq 0,05$; siehe Tabelle 8).

Tab. 8. *Korrelation der DTZ-Detektion mit klinisch-histologischen Faktoren und Therapieansprechen (KM-positiv = Patientinnen mit vitalen Tumorzellen im KM)*

	N	KM-positiv [1]	%	p-Wert
Total	157	84 (17) [2]	53 (11) [3]	-
Ansprechen auf die NST				
KR	24	10 (4) [2]	42 (17) [3]	
PR	87	42 (11) [2]	48 (13) [3]	< 0,05
SK	41	28 (2) [2]	68 (5) [3]	
PK	5	4 (0) [2]	80 (0) [3]	
Tumorgröße				
ypT0	24	10	44	
ypT1	61	33	54	n.s.
yp T2-4	73	41	56	
Lymphknotenstatus				
yN neg	75	38	51	n.s.
yN pos	81	45	55	

Histologie				
duktal	96	47	49	n.s.
lobulär	33	17	52	
andere	26	18	69	
ER-Status				
neg	39	21	54	n.s.
pos	117	62	53	
PR-Status				
neg	68	35	52	n.s.
pos	89	49	55	
HER2-Status				
neg	115	62	54	n.s.
pos	39	20	51	
Grading				
I-II	106	55	52	n.s.
III	41	21	51	
Menopausenstatus				
Prä	72	42	58	n.s.
Post	85	42	49	
Neoadjuvante Therapie				
Chemotherapie	142	78	55	n.s.
Hormontherapie	15	6	40	

[1] Vitale DTZ nachgewiesen [2] Anzahl / [3] prozentualer Anteil der Patientinnen mit ausschließlich apoptotischen Zellen

Abkürzungen: KR – Komplette Remission, PR – partielle Remission, SK – Stabiler Krankheitsverlauf, PK – progressiver Krankheitsverlauf

3.5. Der Nachweis apoptotischer Tumorzellen

Apoptotische DTZ wurden bei 36 der 157 (23%) Brustkrebspatientinnen gefunden. In Tab. 9, Abb. 14 und 15 sind die Ergebnisse hinsichtlich der Präsenz apoptotischer DTZ dargestellt.

17 Patientinnen (11%) hatten ausschließlich apoptotische DTZ, wohingegen bei 19 Patientinnen (12%) sowohl apoptotische, als auch vitale Zellen nachgewiesen werden konnten. Bei 65 Patientinnen (41%) wurden ausschließlich vitale DTZ gefunden. Bei den restlichen 56 Patientinnen war der KM-Status negativ.

In Verbindung mit der klinischen Response wurden ausschließlich apoptotische Zellen bei Patientinnen mit einer PR oder KR (14%) signifikant häufiger identifiziert als bei Patientinnen mit einer SK (5%; $p < 0.05$). Bei Patientinnen mit einer PK (n = 5) konnten keine apoptotischen Zellen nachgewiesen werden.

Tab. 9. *Knochenmarkstatus und Ansprechen auf die systemische Therapie*

KM-Status	**Schlechtes Ansprechen n = 46**			**Gutes Ansprechen n = 111**		
	PK	SK	PK + SK	PR	KR	PR + KR
	n = 5	n = 41	n = 46	n = 87	n = 24	n = 111
Keine DTZ	1	11	12	34	10	44
n = 56	(20%)	(27%)	(26%)	(39%)	(42%)	(40%)
Ausschließlich apoptotische DTZ	0	2	2	11	4	15
n = 17	(0%)	(5%)	(4%)	(13%)	(17%)	(14%)
Apoptotische und vitale DTZ	0	7	7	10	2	12
n = 19	(0%)	(17%)	(15%)	(11%)	(8%)	(11%)
Ausschließlich vitale DTZ	4	21	25	32	8	40
n = 65	(80%)	(51%)	(54%)	(37%)	(33%)	(36%)

In der Gruppe der Patientinnen mit KR war der Anteil der ausschließlich apoptotischen KM-Befunde mit 17% am größten (Tabelle 9, Abbildung 14). Bezogen auf DTZ-positive Befunde in diesem Subkollektiv haben 4 von 14 Patientinnen (29%) mit einer KR ausschließlich apoptotische DTZ aufgewiesen. Der Anteil der Patientinnen mit ausschließlich apoptotischen Zellen war umso geringer, je schlechter das klinische Ansprechen war. In 11 von 87 Patientinnen (13%) mit einer PR waren apoptierende DTZ nachweisbar. Das entspricht 21% der Patientinnen mit einem PR und nachweisbaren DTZ. Bei einem SK beträgt der Anteil der Patientinnen mit apoptotischen DTZ 5% (7% aller DTZ-positiven

Patientinnen mit SK) und bei Patientinnen mit PK waren keine apoptotischen DTZ zu detektieren.

In Abbildung 14, 15 und 16 wird der immunzytochemische Befund hinsichtlich apoptotischer DTZ in Abhängigkeit von der klinischen Situation der Patientin dargestellt.

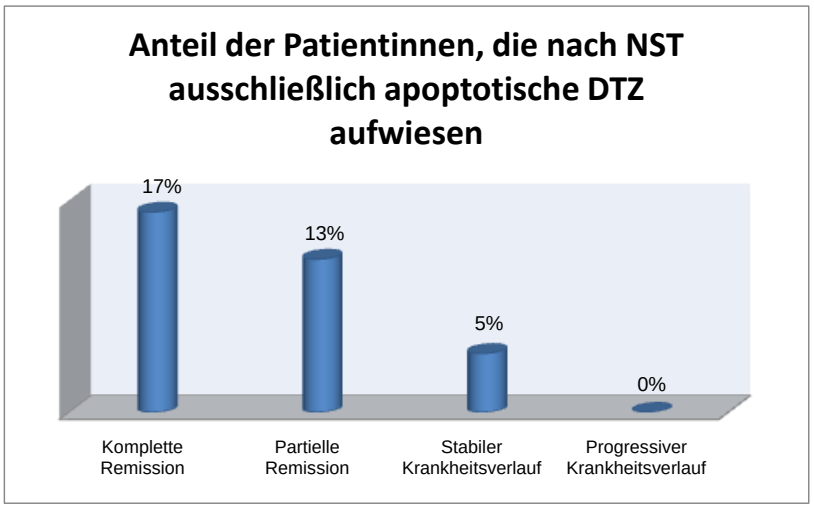


Abb. 14. *Der prozentuale Anteil aller Patientinnen nach NST mit ausschließlich apoptotischen DTZ*

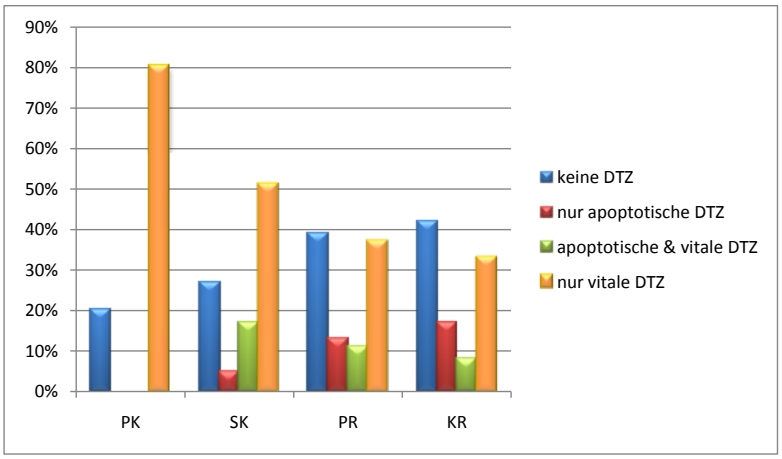


Abb. 15. *Prozentuelle Verteilung der Knochenmarkbefunde in Abhängigkeit vom pathologischen Ansprechen des Primärtumors auf die NST*

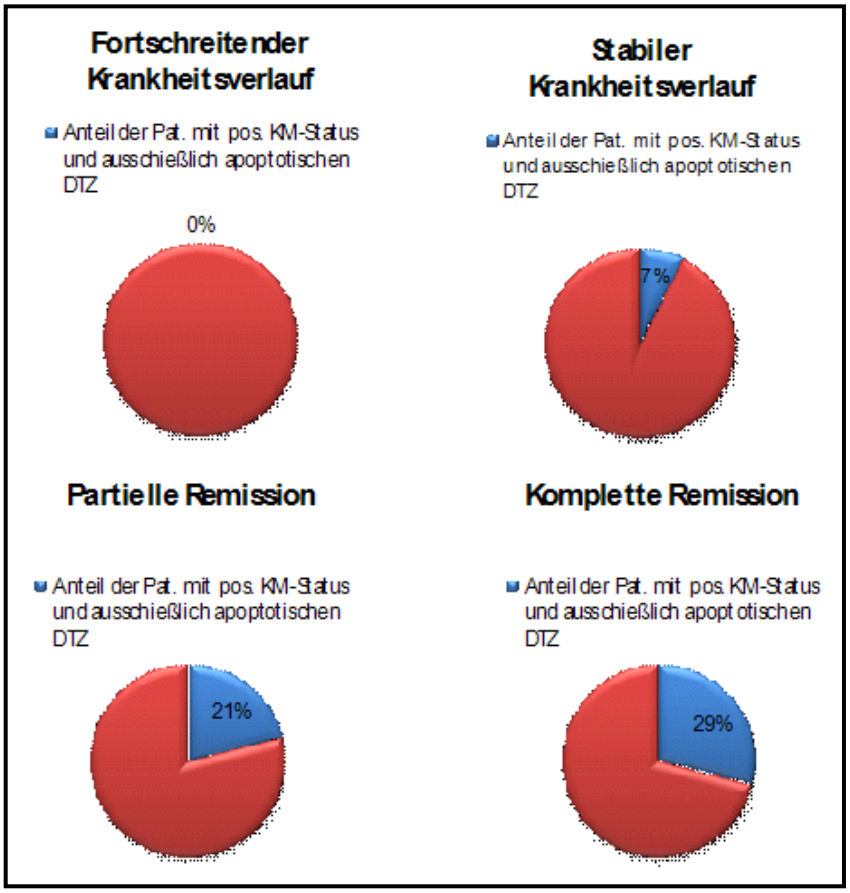


Abb. 16. *Anteil der Patientinnen mit ausschließlich apoptotischen DTZ innerhalb der Patientinnen mit DTZ und des jeweiligen klinischen Bildes*
Rot eingezeichnet ist der Anteil der Patientinnen mit vitalen DTZ, blau – mit ausschließlich apoptotischen DTZ

4. Diskussion

Die hämatogene Tumorzelldissemination repräsentiert den ersten Schritt einer subklinischen Tumorzellausbreitung ([63]). DTZ können nicht nur beim Mammakarzinom, sondern auch bei anderen soliden Tumoren nachgewiesen werden ([16],[5],[29],[24],[9]). Zur Suche nach einer Generalisierung der Erkrankung wird der Nachweis von Tumorzellen im KM verwendet.

Aus diesem Grund war ein Ziel dieser Studie, den Knochenmarkstatus bei Mammakarzinompatientinnen nach abgeschlossener NST zu evaluieren. Des Weiteren sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTZ und dem Therapieansprechen bzw. der Expression klassischer

Prognosefaktoren untersucht werden. Der Nachweis apoptotischer Tumorzellen mit Hilfe des M30-Antikörpers wurde zusätzlich mit dem klinischen und pathologischen Ansprechen des Primärtumors verglichen.

Zur Diagnose einer Generalisierung der Erkrankung kann heute der Nachweis von DTZ verwendet werden. Hierfür stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung, wobei aufgrund der gesicherten prognostischen Relevanz die immunzytochemische Detektion als Goldstandardmethode gilt ([20]). Die Empfehlungen des Internationalen Konsensus für den standardisierten Nachweis von DTZ und deren klinische Implementierung definieren das Vorgehen der DTZ-Detektion und deren Relevanz bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ([31]). Durch diese definierte Vorgehensweise konnte das Verfahren standardisiert werden.

4.1. Neoadjuvante Chemotherapie

Während der letzten Jahre hat die NST auch bei kleineren Tumoren einen immer größeren Stellenwert erlangt. Sie wird heute als Standardstrategie beim lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom angesehen. Die neoadjuvante Therapie erhöht nicht nur die Rate der brusterhaltenden Operationen, sondern erlaubt außerdem das Testen der Chemosensitivität *in vivo* ([48]). Das Ansprechen auf die NST ist mit dem krankheitsfreien und gesamten Überleben assoziiert ([82],[52]). Trotzdem entwickeln ca. 15 bis 25% der Patientinnen trotz einer KR innerhalb der nächsten fünf Jahre Metastasen. Ursache hierfür ist eine subklinische Tumorzellpersistenz ([37], [22]).

Als Konsequenz besteht die Notwendigkeit, diejenigen Patientinnen zu identifizieren, die auf Grund einer therapieresistenten und persistierenden residualen Minimalerkrankung von zusätzlichen bzw. intensivierten Therapiestrategien profitieren können. Der Nachweis einer Tumorzell-dissemination ins KM nach abgeschlossener Therapie kann dazu beitragen.

4.2. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen nach NST

Zur Beurteilung des Erfolgs der NST wurde im Rahmen dieser Studie die Anwesenheit von DTZ bestimmt. Die Positivitätsrate an vitalen DTZ lag nach abgeschlossener NST bei 53%. Trotz systemischer Behandlung besaßen also über die Hälfte aller Patientinnen DTZ. Die DTZ-Inzidenz nach NST scheint signifikant höher zu sein als die von primär operierten Patientinnen (Tabelle 10). Eine Erklärung dieses Phänomens ergibt sich aus der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kollektive. Während bei über 50% der Frauen das Mammakarzinom im Stadium T1 diagnostiziert wird ([20]), befinden sich Patientinnen, die eine NST erhalten, hauptsächlich in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung (T2 bis T4). Die folgende Tabelle (Tab. 10) soll diese Unterschiede verdeutlichen.

Tab. 10. *DTZ-Inzidenz bei primär operierten Mammakarzinom-Patientinnen*

Studien	**Anzahl der Patientinnen n**	**Vorwiegende Tumorgröße (T1 < 2 cm)**	**Inzidenz der KM-Positivität (%)**
Wiedswang *et al.* ([79])	817	T1 (bei 61%)	13%
Harbeck *et al.* ([42])	100	T1-2 (bei 79%)	43%
Solomayer *et al.* ([72])	727	T4 (bei 64%)	38%
Gerber *et al.* ([68])	554	T1 (bei 64%)	31%
Diel *et al.* ([27])	727	T1-2 (bei 80%)	43%
Gebauer *et al.* ([39])	393	T1 (bei 57%)	42%
Braun *et al.* ([19])	552	T1 (bei 58%)	36%
Braun *et al.* ([20])	4073	T1 (bei 58%)	31%

4.3. Korrelation zwischen Nachweis einer Tumorzell-dissemination und Therapieansprechen

Nach Komplettierung der NST konnten bei 53% der Patientinnen vitale DTZ detektiert werden. Patientinnen mit PK wiesen die höchste Positivrate auf (80%), gefolgt von Patientinnen mit SK (68%) und PR (48%). Diese Zahlen legen nahe, dass die Präsenz von das Therapieansprechen des Primärtumors reflektieren können.

Bekanntermaßen werden 15-25% der Patientinnen mit einer pathologischen KR nach NST im weiteren Krankheitsverlauf Metastasen entwickeln ([82]). In unserer Studie wiesen zehn der 24 Patientinnen (42%) aus dieser Gruppe vitale DTZ auf. Die NST konnte somit bei beinahe der Hälfte der KR-Patientinnen keine komplette Eradikation der minimalen Resterkrankung erreichen. Ähnliche Ergebnisse beschrieben Becker *et al.* und Pierga *et al.* ([14], [66]). Möglicherweise handelt es sich bei den persistierenden Tumorzellen um einen Subtyp, der sich hinsichtlich biologischer Eigenschaften vom korrespondierenden Primärtumor unterscheidet und aus diesem Grund nicht auf die NST reagiert. Verschiedene Arbeitsgruppen deuteten bereits auf diese Unterschiede hin. Einige Studien zeigten beispielsweise, dass DTZ tendenziell eher Hormonrezeptor-negativ sind, jedoch häufiger HER2 exprimieren als die entsprechenden Primärtumoren ([60], [32], [33], [51]).

Da die Frage nach der optimalen Strategie zur Eradikation der DTZ offen bleibt, müssen zur individuelleren Gestaltung der Mammakarzinom-Therapie weitere Erkenntnisse über die Unterschiede zwischen DTZ und ihrem korrespondierendem Primärtumor gewonnen werden. Die Tumorzellen, die nicht auf die bisherigen Therapieschemata ansprechen, müssen weiter identifiziert und charakterisiert werden.

4.4. Korrelation der DTZ-Detektion mit klinisch-histologischen Faktoren

Die Dissemination von Tumorzellen in das KM primärer Mammakarzinom-patientinnen ist ein unabhängiger Prognosefaktor ([20]). Unsere Studie zeigte

keine Korrelation zwischen dem Auftreten von DTZ und den klassischen Prognosefaktoren. Die beiden bereits angesprochenen Studien von Pierga *et al.* und Mueller *et al.* gelangten zu demselben Ergebnis ([60],[66]). Etablierte Prognosefaktoren wie Tumorgröße, Grading, histologischer Typ und Rezeptorstatus definieren vor allem den proliferativen Charakter und den Differenzierungsgrad eines Tumors, liefern jedoch nur indirekt Informationen über das metastatische Potential und über sein Disseminationsverhalten. Im Gegensatz zu unserer Studie berichteten einige Arbeitsgruppen über eine Korrelation zwischen den klassischen Prognosefaktoren und dem DTZ-Status. In Tabelle 11 werden diese Studien und ihre Ergebnisse hinsichtlich etablierter Prognosefaktoren miteinander verglichen.

Tab. 11. *Korrelation der DTZ-Detektion mit klinisch-histologischen Faktoren in der Literatur*

	Korrelation des Knochenmarkstatus mit klassischen Prognosefaktoren				
	Tumorgröße	**Nodalstatus**	**ER/PR-Status**	**Grading**	**Menopausen-status**
Wiedswang [79] T ≤ 2 cm (61%) n=920	+ T1 – 11% T2 – 15% T3–4 – 23%	+ N0 – 10% N1 – 20%	- [1]	-	-
Gebauer [39] T < 2 cm (57%) n=393	*p*-Wert nicht ersichtlich	+ N0 – 16% N1 – 52%	*p*-Wert nicht ersichtlich	*p*-Wert nicht ersichtlich	*p*-Wert nicht ersichtlich
Gerber [40] T < 2 cm (64%) n=554	+ T < 2cm – 11% T > 2 cm – 49%	+ N0 – 32% N1 – 49%	-	+ G1 – 38% G2 – 43% G3 – 18%	-
Braun [19] T < 2 cm (58%) n=552	+ T < 2 cm – 29% T > 2 cm – 42%	+ N0 – 33% N1 – 56%	-	+ G1 – 29% G2 – 31% G3 – 43%	-
Diel [27] T1-2 = 80% n=727	+ T1 – 30% T2 – 42% T3 – 62% T4 – 75%	+ N0 – 31% N1 – 55%	-	+ G1-2 – 39% G3 – 52%	+ Postmenopausal – 47% Prämenopausal – 38%
Braun [20] T < 2cm (58%) n=4703	+ T < 2 cm – 25% T = 2–5 cm – 33% T > 5 cm – 38%	+ N0 – 26% N1 – 36%	+ ER/PR neg – 35% ER/PR pos – 29%	+ G1 – 23% G2 – 30% G3 – 35%	+ Postmenopausal – 30% Prämenopausal – 33%

[1] p-Wert ist > 0,05 oder keine Daten

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen, die einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen DTZ-Nachweis und Tumorgröße, Grading, Lymphknotenbefall, Hormonrezeptor- und Menopausenstatus festgestellt haben. Dabei wird der Metaanalyse von Braun *et al.* besondere Bedeutung zugesprochen, da sie über das größte Patientenkollektiv verfügt. Insgesamt scheint sich bei den meisten Studien vor allem der Nodalstatus ähnlich wie der DTZ-Status zu verhalten. Auch bei der Tumorgröße und dem Differenzierungsgrad deutet sich ein Zusammenhang an. Allerdings muss auch hier darauf hingewiesen werden, dass sich die Verteilung der etablierten Prognosefaktoren in den angesprochenen Studien von unserem Kollektiv zum Teil deutlich unterscheidet. Besonders die Tumorgröße, die im Vergleich zu unserer Studie vor allem < 2 cm war, könnte diesen Unterschied bedingen.

Der axilläre Nodalstatus zum Zeitpunkt der Primäroperation ist bisher als bester Prognosefaktor anerkannt. Es wird angenommen, dass tumorzellpositive Lymphknoten den Beginn einer systemischen Krebserkrankung bedeuten. Allerdings wird in epidemiologischen Studien beobachtet, dass 30% der bei der Primäroperation nodal-negativen Patientinnen nach zehn Jahren einen Rückfall erleiden ([68],[54]). Diese Patientinnen hatten interessanter Weise zum selben Zeitpunkt schon detektierbare DTZ. Die Lymphknotenentnahme ist mit relativ häufigen Komplikationen assoziiert. So können Infektionen, Blutungen, Hautmissempfindungen und Lymphödeme auftreten ([73]). Die Tatsache, dass sich noch vor dem Befall der Lymphknoten Tumorzellen im KM zeigten, lässt auf eine sehr frühe hämatogene Tumorzellausbreitung schließen. Heute wird spekuliert, dass man mit Hilfe des DTZ-Status, früher als mit dem Nodalstatus eine zuverlässige Aussage über die Krebsdynamik treffen kann ([27]).

4.5. Die Bedeutung apoptotischer DTZ

Die Apoptoseinduktion ist der Hauptwirkmechanismus der Chemotherapie ([43]). Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel dieser Studie zu evaluieren, welche Auswirkung die NST auf DTZ hat. Das Rezidiv-freie Überleben nach der

Therapie wird durch den fehlenden Nachweis vitaler DTZ günstig beeinflusst. Daher wurde das KM auf das Vorhandensein apoptotischer Tumorzellen analysiert. Leider war es im Rahmen dieser Studie nicht möglich, eine KM-Aspiration vor und nach Therapie durchzuführen, da die meisten Patientinnen erhebliche Vorbehalte hinsichtlich einer KM-Punktion hatten. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der apoptotischen Zellen schon vor Therapie vorhanden war. Apoptose kann nicht nur durch Systemtherapie hervorgerufen werden, sondern tritt beispielsweise auch beim Herauslösen der Zellen aus ihrem Zellverbund auf. Dies muss bei der Diskussion der Ergebnisse bedacht werden. Die Frage bleibt also, ob die Therapie, die den Primärtumor erfolgreich angreift, auch gegen die DTZ wirkungsvoll ist.

In dieser Studie wurden bei Patientinnen mit einer PK keine apoptotischen, sondern ausschließlich vitale Tumorzellen nachgewiesen. Die Therapie-resistenz des Primärtumors spiegelte sich somit in der Detektion vitaler Tumorzellen wieder. Auch bei Patientinnen mit SK konnten nur in 4% der Fälle apoptotische Tumorzellen detektiert werden. Allerdings wiesen 18% dieser Patientengruppe sowohl apoptotische, als auch vitale DTZ auf. Dieses Mischbild apoptotischer und vitaler Zellen war auch in den beiden anderen Gruppen (PR bzw. KR) zu beobachten. Dies zeigt, dass DTZ - wie auch der Primärtumor - eine heterogene Zellpopulation darstellen, die unterschiedlich auf die NST reagiert ([65],[47]). Bei 14% der Patientinnen mit PR oder KR waren ausschließlich apoptotische DTZ nachweisbar. Diese DTZ zeigten dieselbe Chemosensitivität auf wie der Primärtumor.

4.6. Die klinische Relevanz der DTZ bei Patientinnen mit kompletter Remission

Die interessanteste Gruppe dieser Studie bilden jene Patientinnen mit KR, die nicht ausschließlich apoptotische DTZ besitzen. Bei 33% dieser Patientinnen wurden ausschließlich vitale DTZ detektiert. Mit den bisherigen Diagnoseverfahren gelten diese Patientinnen als geheilt. Ihr Risiko aufgrund

des positiven DTZ-Status in den nächsten acht bis 20 Jahren Metastasen zu entwickeln, ist jedoch mit einer Inzidenz von 1% pro Jahr signifikant erhöht ([57],[26], [47]). Möglicherweise würden diese Patientinnen von einer weiteren oder intensivierten (sekundär-) adjuvanten Therapie profitieren.

Ziel der (neo)adjuvanten Chemotherapie ist die Verkleinerung des Primärtumors und die Eliminierung der Mikrometastasen, um das krankheitsfreie und das Gesamtüberleben zu verbessern. Falls eine KR eine komplette Eradikation der Mikrometastasen bedeutete, dürften solche Patientinnen keine DTZ aufweisen und keine Metastasen im weiteren Krankheitsverlauf entwickeln. Mehrere Studien haben jedoch gezeigt, dass diese Patientinnen zu 15 bis 25% einen systemischen Rückfall erleiden ([37],[22]). Disseminierte Tumorzellen können *ergo* als potentielle Quelle der systemischen Metastasierung interpretiert werden.

In dieser Studie konnten bei zehn der 24 Patientinnen (42%) mit KR vitale DTZ gefunden werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Mammakarzinompatientinnen nach Operation und vollständiger adjuvanter Therapie beobachtet ([80],[46],[13]). Diese Tumorzellen bleiben gegenüber der Chemotherapie resistent und besitzen die Fähigkeit trotzt des Verlustes ihrer Zellmatrix im Blutkreislauf zu überleben. Damit haben diese Zellen bereits wesentliche Hürden in der Metastasenkaskade überwunden ([63]). Es muss jedoch bedacht werden, dass nicht alle Patientinnen mit DTZ das Potential haben, Metastasen zu bilden. Dies zeigt die Positivrate, die mit 42% höher ist als die erwartete Rückfallquote für Patientinnen mit KR (13 bis 25%). Meng *et al.* zeigten, dass zirkulierende Tumorzellen im Blut von Mammakarzinompatientinnen noch länger als 20 Jahre nach der Primärdiagnose detektiert werden konnten. In diesem Fall lieferten diese Zellen jedoch keinen Anhalt für ein Wiederaufleben der Erkrankung ([57]). Diese Beobachtungen unterstützen die Theorie des lebenslangen Schlafens (*Tumor cell dormancy*) der DTZ. Es wird angenommen, dass sich Tumorzellen im KM bis zu mehreren Jahrzehnten „schlafend“ aufhalten können. Sie disseminieren in der Frühphase der Krankheit ins KM und persistieren dort,

ohne sich in ihrem Zyklusstadium zu verändern. Die Chemotherapie, die gegen sich schnell teilende Zellen gerichtet ist, kann somit nicht wirken. Zwar haben Patienten mit DTZ ein höheres Wiedererkrankungsrisiko, jedoch werden nicht alle Patientinnen im Follow-up einen Rückfall erleiden ([46]). Es muss also eine Untergruppe von Tumorzellen geben, die auch noch nach Jahrzehnten reaktiviert werden kann. Verschiedene Studien belegen, dass mehrere Faktoren zu diesem Wachstumssignal beitragen. Allerdings sind diese noch nicht komplett verstanden ([44],[61]). Es sollen jedoch vor allem genetische, immunologische und angiogenetische Einflüsse im Umfeld einer Tumorzelle für die Wachstumsimpulse verantwortlich sein ([34]).

Als weitere Theorie zur Erklärung der Metastasierung und Persistenz der DTZ im KM ist die Stammzelltheorie. Disseminierte Tumorzellen könnten demnach als Krebsstammzellen betrachtet werden, da sie nach einem anderen Regelmechanismus als eine normale Tumorzelle arbeiten und sich auch den therapeutischen Maßnahmen für deren Elimination entziehen. Sie halten sich über einen langen Zeitraum „ruhend“ im KM auf, besitzen aber dennoch die Fähigkeit, nach der Behandlung wieder zu proliferieren. Der Beweis dieser Hypothese hätte fundamentale Auswirkungen auf die Einschätzung des Krebsrisikos, dessen frühe Diagnostizierung, Prognostizierung und Prävention ([78]). Auch die Studie von Waterworth *et al.* bestätigt die Ähnlichkeit mancher Tumorzellen mit Stammzellen und unterteilt die DTZ in eine karzinogene (*tumorigenic*) und eine nicht-karzinogene (*non-tumorigenic*) Population. Klinische Bedeutung wird ausschließlich den karzinogenen DTZ beigemessen ([77]). Disseminierte Tumorzellen sollen nach Balic *et al.* Stammzellmarker wie die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) exprimieren ([8]).

Diese sehr provokante Theorie der Krebsstammzelle wird ebenfalls Teil künftiger Forschung sein. Abbildung 17 schematisiert die möglichen Schicksale einer Tumorzelle.

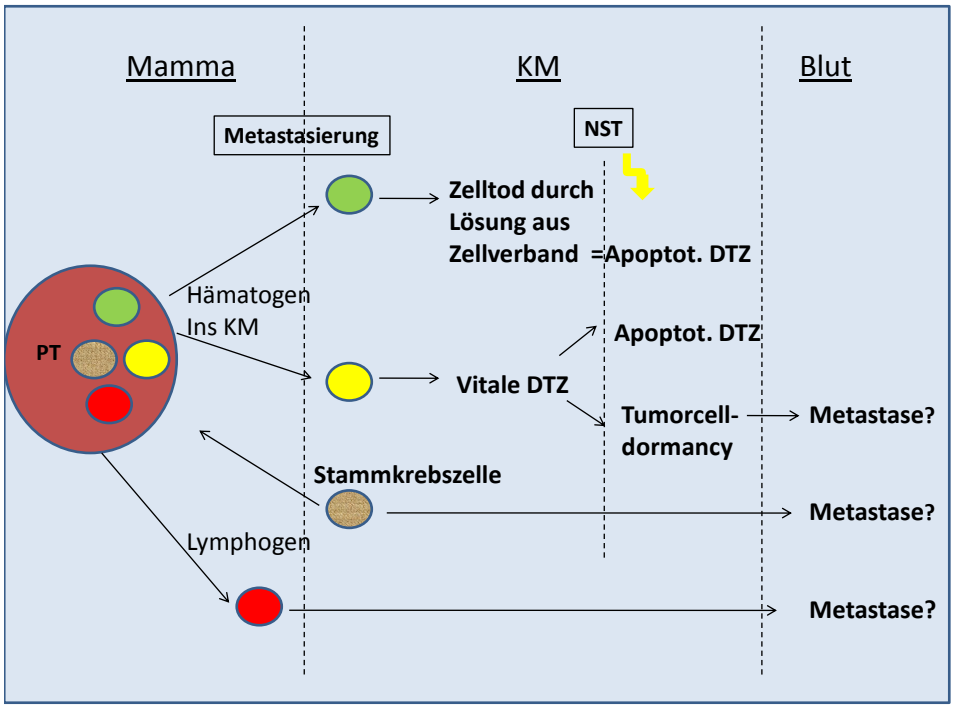


Abb. 17. *Mögliche Schicksale einer Tumorzelle.*

5. Schlussfolgerungen

Die Detektion apoptotischer und vitaler DTZ stellt möglicherweise ein geeignetes Verfahren dar, den Therapieverlauf einer Mammakarzinompatientin zu kontrollieren. Das Therapiemonitoring des systemischen Krankheitsverlaufs kann zu einer präzisen Einschätzung der Prognose und der Wahrscheinlichkeit einer eventuellen Wiedererkrankung beitragen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass bisherige Therapieformen DTZ nicht vollständig eliminieren können. Es wird vermutet, dass Patientinnen mit nachweisbaren vitalen DTZ nach abgeschlossener Behandlung von weiteren Therapieoptionen profitieren könnten. Um die an einem Mammakarzinom erkrankten Frauen in Zukunft zusätzlich von DTZ befreien zu können, muss der Phänotyp dieser Zellen noch genauer erforscht werden.

Es gibt jedoch schon therapeutische Ansätze, die Erfolge im Bereich der primären DTZ-Prophylaxe zeigen. Bisphosphonate, die bisher hauptsächlich beim ossär metastasierten Mammakarzinom verwendet werden, sollen nicht nur die Aktivität der Osteoklasten im KM unterdrücken, sondern ebenfalls die Tumorzelladhäsion vermindern, Apoptose induzieren und das Tumormicroenvironment verändern ([81]). Somit schaffen sie für die DTZ die erwünschten ungünstigen Lebensbedingungen im KM. Erfolgversprechende Ergebnisse liefert eine Studie von Rack *et al.*, bei der 27 von 31 DTZ-positiven Patientinnen nach adjuvanter Therapie mit einem Bisphosphonat-Derivat DTZ-frei waren ([67]). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Bisphosphonate eine wichtige Säule bei der Elimination der Tumorzellen sein könnten. Desweiteren eignen sich monoklonale Antikörper zur Elimination von DTZ. So kann Herceptin zur Immunotherapie gegen HER2-positive DTZ eingesetzt werden. Folgende Abbildung beschreibt die neueren Therapiemöglichkeiten.

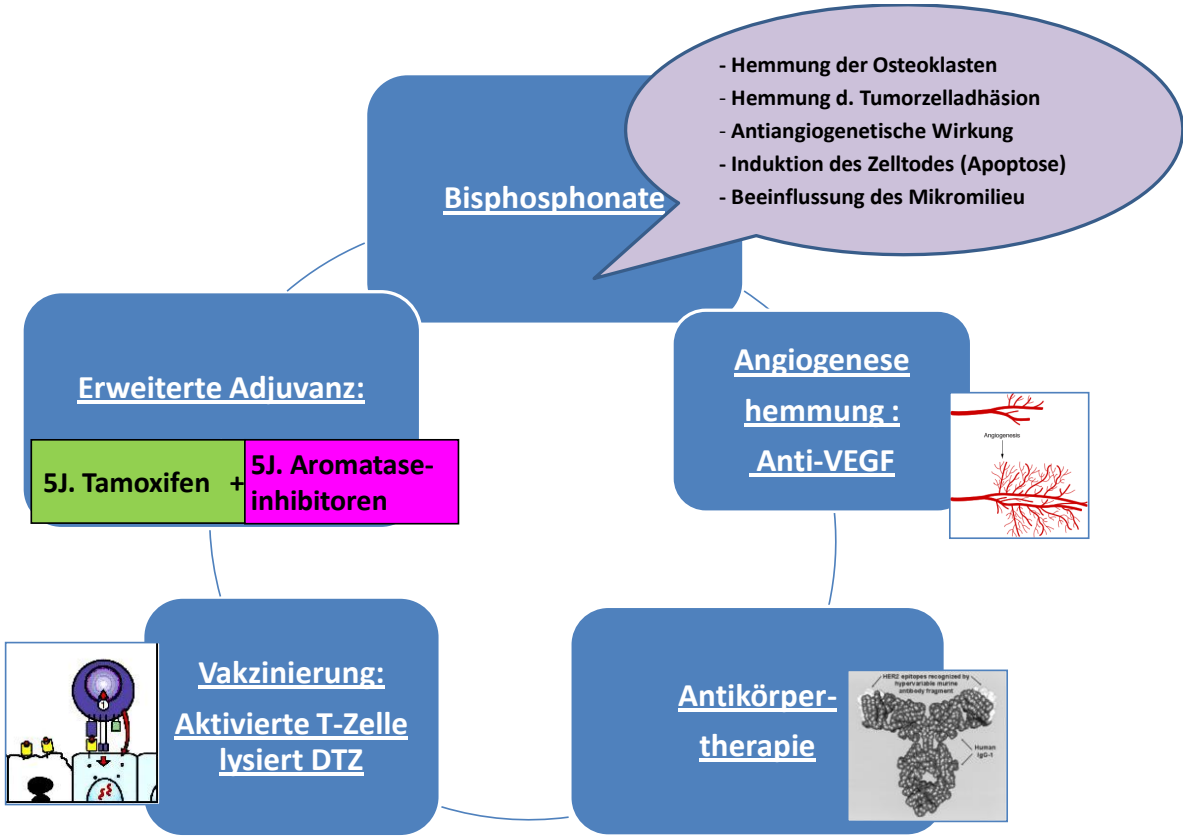


Abb. 18. *Neuere Möglichkeiten der Therapie des Mammakarzinoms*

6. Zusammenfassung

Die Tumorzelldissemination ist ein unabhängiger prognostischer Marker, der auf den Beginn einer systemischen Erkrankung hinweist. Um diese aufzuhalten oder hinauszuzögern, werden adjuvante und neoadjuvante Therapiestrategien eingesetzt.

Die NST gilt heute als Methode der Wahl beim lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom. Sie erhöht nicht nur die Rate der brusterhaltenden Operationen, sondern ermöglicht zusätzlich eine Chemosensitivitätstestung *in vivo*. Zur Kontrolle des systemischen Therapieerfolgs eignet sich gemäß zahlreicher aktueller Studien das Therapiemonitoring mittels Detektion zirkulierender und disseminierter Tumorzellen.

Aus diesem Grund war Ziel dieser Studie die Positivitätsrate apoptotischer und vitaler DTZ nach komplettierter NST zu evaluieren und mit dem pathologischen Therapieansprechen des Primärtumors zu assoziieren. Des Weiteren wurde untersucht, ob der KM-Status mit den klassischen klinisch-histologischen Prognosefaktoren korreliert und ob die Inzidenz apoptotischer DTZ mit dem Therapieansprechen korreliert.

Bei 157 Patientinnen mit stanzbioptisch gesichertem, nicht metastasiertem Mammakarzinom nach abgeschlossener NST wurde KM entnommen und auf apoptotische und vitale DTZ hin untersucht. Zur Detektion der DTZ wurde eine standardisierte immunzytochemische Färbung verwendet (Panzytokeratin A45B-B3-AK). Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde zusätzlich der gegen Epitope des Zytokeratins 18 gerichtete M30 Antikörper eingesetzt.

Nach erfolgter NST wiesen 53% der Patientinnen vitale DTZ auf. Die Dissemination zeigte sich häufiger bei Patientinnen mit einem stabilen und progressiven Krankheitsverlauf (70%) als bei Patientinnen mit partieller und

vollständiger Remission (47%). Hierbei ließ sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Ansprechen des Primärtumors und dem Auftreten von DTZ erkennen. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen den etablierten Prognosefaktoren, wie Lymphknotenstatus, Tumorgröße, Hormonrezeptorstatus oder Grading, und dem Knochenmarkstatus festgestellt werden.

Auch das Auftreten apoptotischer DTZ korrelierte mit dem Therapieansprechen. So war die Präsenz apoptotischer DTZ in KM-positiven Patientinnen mit partieller oder kompletter Remission (14%) deutlich höher, als bei Patientinnen mit stabilem oder fortschreitendem Krankheitsverlauf (4%). Apoptotische DTZ konnten bei keiner Patientin mit Tumorprogression nachgewiesen werden. Hingegen wurden bei zehn der 24 Patientinnen mit kompletter Remission vitale DTZ detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass DTZ anders als die Zellen des Primärtumors auf die NST reagieren können. Bei beinahe der Hälfte der Patientinnen mit hervorragendem Ansprechen des Primärtumors konnte die NST nicht alle DTZ elliminieren. Da Patientinnen mit persistierenden DTZ eine deutlich schlechtere Prognose haben, ist ihre Identifikation von kritischer Bedeutung. Andererseits haben Patientinnen mit kompletter Remission des Primärtumors und einem negativen KM-Status oder ausschließlichem Auftreten apoptotischer DTZ im KM eine sehr gute Prognose.

Das Ziel zukünftiger Forschung wird es sein, neue, zielgerichtete Therapieformen zur Eradizierung von DTZ zu entwickeln. Dafür müssen die phänotypischen Unterschiede zwischen den Zellen des Primärtumors und der DTZ weiter charakterisiert werden. Diese neuen Behandlungsstrategien könnten auf der vielversprechenden Bisphosphonat- oder der Antikörpertherapie basieren.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Schema der GeparQuattro - Studie: mögliche Therapiekombinationen einer neoadjuvanten Therapie ..6
Abb. 2. Stadien einer apoptierenden Zelle (Detektion mittels Immunzytochemie) ..11
Abb. 3. Einzelne Schritte der Knochenmarkaufarbeitung ..14
Abb. 4. Die Auftrennung der Knochenmarkbestandteile nach der Dichtegradientenzentrifugation ..15
Abb. 5. Das APAAP-Prinzip der Immunzytochemie ..17
Abb. 6. DTZ in unterschiedlichen Apoptosestadien; aus dem Labor der Frauenklinik Tübingen ..18
Abb. 7. Vitale DTZ, detektiert mit Hilfe der APAAP-Komplex-Methode) ..19
Abb. 8. Das ACIS ..20
Abb. 9. Drei Fokuspunkte eines Präparats ..20
Abb. 10. Darstellung des Slide Reports am ACIS ..21
Abb. 11. Die Verteilung der klinischen Response nach der NST ..26
Abb. 12. Zytokeratin-positive DTZ ..27
Abb. 13. Der prozentuale Anteil KM-positiver Patientinnen mit kompletter / partieller Remission und stabilem / progressiven Krankheitsverlauf nach neoadjuvanter systemischer Therapie ..28
Abb. 14. Der prozentuale Anteil aller Patientinnen nach NST mit ausschließlich apoptotischen DTZ ..31
Abb. 15. Prozentuelle Verteilung der Knochenmarkbefunde in Abhängigkeit vom pathologischen Ansprechen des Primärtumors auf die NST ..31
Abb. 16. Anteil der Patientinnen mit ausschließlich apoptotischen DTZ innerhalb der Patientinnen mit DTZ und des jeweiligen klinischen Bildes ..32
Abb. 17. Mögliche Schicksale einer Tumorzelle. ..41
Abb. 18. Neuere Möglichkeiten der Therapie des Mammakarzinoms ..43

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Indikationen für eine Mastektomie 3
Tab. 2. Indikationen für eine BET 3
Tab. 3. Behandlungsgruppen zur adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms entsprechend der Hormonempfindlichkeit 4
Tab. 4. Indikationen zur NST 7
Tab. 5. Kriterien zur Identifikation von DTZ 22
Tab. 6. Basisinformationen zum Gesamtkollektiv 25
Tab. 7. Vitale DTZ im KM von Mammakarzinompatientinnen nach NST 27
Tab. 8. Korrelation der DTZ-Detektion mit klinisch-histologischen Faktoren und Therapieansprechen 28
Tab. 9. Knochenmarkstatus und Ansprechen auf die systemische Therapie 30
Tab. 10. DTZ-Inzidenz bei primär operierten Mammakarzinom-Patientinnen 34
Tab. 11. Korrelation der DTZ-Detektion mit klinisch-histologischen Faktoren in der Literatur 36

9. Appendix – Verwendete Materialien

9.1. Herstellung von Lösungen

(A) TBS pH7,6 (Tris Buffered Saline)
Gebrauchslösung 1 x TBS:
1:10 Verdünnung
100 ml Stocklsg [10 X TBS] in 900 ml A.dest in 1 Liter-Flasche mischen

(B) Erythrozyten-Lyse-Puffer
1,0 g $KHCO_3$
8,3 g NH_4CL
0,037 g EDTA
in 800 ml A.dest lösen.
Ph Wert mit KOH auf Ph7,5 einstellen und dann das Volumen auf 1 L auffüllen
Im Kühlschrank lagern

(C) PBS (Phosphate Buffered Saline)
Gebrauchslösung 1 x PBS (SIGMA Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover, Deutschland)
5 Tabletten in 1L Ampuwa H_2O lösen, bei Raumtemperatur lagern

(D) Formalin 0,5%
1,35 ml Formalin (37%ig, #1.03999, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
Auf 100ml mit PBS auffüllen.

9.2. Geräte

(A) Biofuge primo (Hereaus, Hamburg, Deutschland)

(B) Zytozentrifuge Universal16A (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

(C) Dako Autostainer (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland)

(D) ACIS (Clarient Inc., Aliso Valley, CA, USA).

9.3. Zelllinien

MCF- 7 ATCC – Nr. HTB-22 von American type culture collection (ATCC)

SKBr-3 ATCC – Nr. HTB-30 von American type culture collection (ATCC)

9.4. Reagenzien

Reagenz	Firma	Spezifikation
Pancytokeratin Antibody, mouse monoclonal, [c]0,2mg/ml	Mikromet AG, München, Deutschland	Clone A45BB3
Anti-C-erbB-2 (Her2/neu), “ready to use”	Biogenex, San Ramon, CA, USA	Clone CB11
Mouse IgG1,k Monoclonal Ig Control, 0,1mg	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	Clone MOPC21
ChemMate APAAP Neufuchsin Kit	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland	K5000
Antikörper-Verdünnungsmedium	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland	S2022
TBS Waschpuffer (10x)	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland	S3006
Hämatoxilin	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland	S2020
Phosphate Buffered Saline	SIGMA Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover, Deutschland	P0485

9.5. Allgemeine Laborausstattung

über: Schubert and Weiss GmbH, München, Deutschland

Artikelbezeichnung	Art.-No.	Firma
Pipetten, 25ml	03002721	Corning Costar, USA
Pipetten, 10ml	03000236	Corning Costar, USA
Falcon-Röhrchen, 50ml	352070	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Biocoll	L6113	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ampuwa	A1000	Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland
Objektträger Superfrost	61303802	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Filterkarten 100St.	0001001691	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Safeskin Handschuhe	SP2220E	Kimberly Clark, USA

10. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland. **2005**; Fachserie 12(Reihe 4).
2. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 4. überarbeitete und aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken **2004**.
3. Organkommission „Mamma“ der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO); Evidenz-basierte Behandlung primärer Mammakarzinome. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. **2008**.
4. Adzersen KH, Jess P, Freivogel KW, Gerhard I, Bastert G. Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a case-control study in Germany. *Nutr Cancer* **2003**; 46(2): 131-7.
5. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(20): 6897-904.
6. Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med* **2000**; 342(8): 564-71.
7. Austrup F, Uciechowski P, Eder C, Bockmann B, Suchy B, Driesel G, et al. Prognostic value of genomic alterations in minimal residual cancer cells purified from the blood of breast cancer patients. *Br J Cancer* **2000**; 83(12): 1664-73.
8. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* **2006**; 12(19): 5615-21.
9. Banys M, Solomayer EF, Becker S, Krawczyk N, Gardanis K, Staebler A, et al. Disseminated tumor cells in bone marrow may affect prognosis of patients with gynecologic malignancies. *Int J Gynecol Cancer* **2009**; 19(5): 948-52.
10. Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ, Hawes D, Decker WJ, Priddy C, et al. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res* **2000**; 6(9): 3552-9.
11. Becker N. [Development of the incidence and mortality of breast cancer]. *Radiologe* **2001**; 41(4): 337-43.
12. Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Emig R, Wallwiener D, Solomayer EF. Image analysis systems for the detection of disseminated breast cancer cells on bone-marrow cytospins. *J Clin Lab Anal* **2005**; 19(3): 115-9.
13. Becker S, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* **2006**; 97(1): 91-6.

14. Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Fehm T. Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **2007**.
15. Berger U, Bettelheim R, Mansi JL, Easton D, Coombes RC, Neville AM. The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis. *Am J Clin Pathol* **1988**; 90(1): 1-6.
16. Bilkenroth U, Taubert H, Riemann D, Rebmann U, Heynemann H, Meye A. Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation. *Int J Cancer* **2001**; 92(4): 577-82.
17. Bockmann B, Grill HJ, Giesing M. Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors. *Biomol Eng* **2001**; 17(3): 95-111.
18. Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy* **1999**; 5: 377-88.
19. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* **2000**; 342(8): 525-33.
20. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* **2005**; 353(8): 793-802.
21. Chang-Claude J. Schwerpunktthema Frauen, Leben und Krebs. *Omnimed Verlagsgesellschaft* **1997**.
22. Chollet P, Amat S, Cure H, de Latour M, Le Bouedec G, Mouret-Reynier MA, et al. Prognostic significance of a complete pathological response after induction chemotherapy in operable breast cancer. *Br J Cancer* **2002**; 86(7): 1041-6.
23. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* **1991**; 9(10): 1749-56.
24. Dandachi N, Balic M, Stanzer S, Halm M, Resel M, Hinterleitner TA, et al. Critical evaluation of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA in colorectal cancer patients. *J Mol Diagn* **2005**; 7(5): 631-7.
25. De Vita VT, Jr. Breast cancer therapy: exercising all our options. *N Engl J Med* **1989**; 320(8): 527-9.
26. Demicheli R, Abbattista A, Miceli R, Valagussa P, Bonadonna G. Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res Treat* **1996**; 41(2): 177-85.
27. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* **1996**; 88(22): 1652-8.

28. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Kaul S, Krempien B, Goerner R, et al. [The prognostic significance of tumor cell detection in bone marrow of patients with breast cancer]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* **1990**; 50(12): 923-8.
29. Dingemans AM, Brakenhoff RH, Postmus PE, Giaccone G. Detection of cytokeratin-19 transcripts by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in lung cancer cell lines and blood of lung cancer patients. *Lab Invest* **1997**; 77(3): 213-20.
30. Early. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **2005**; 365(9472): 1687-717.
31. Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* **2006**; 107(5): 885-92.
32. Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, 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): R59.
33. Fehm T, Krawczyk N, Solomayer EF, Becker-Pergola G, Durr-Storzer S, Neubauer H, et al. ERalpha-status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res* **2008**; 10(5): R76.
34. Fehm T, Mueller V, Marches R, Klein G, Gueckel B, Neubauer H, et al. Tumor cell dormancy: implications for the biology and treatment of breast cancer. *APMIS* **2008**; 116(7-8): 742-53.
35. Fehm T, Müller V, Janni W, Braun S, Gebauer S, Marth C, et al. Konsensusempfehlungen zu methodischen Aspekten und zur klinischen elevanz des Nachweises disseminierter Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark (KM) von patientinnen mit primärem Mammakarzinom. Ergebnisse des Konsensustrefffens im Rahmen der Dreiländertagung Senologie, Stuttgart, Sept. 2005. *Geburtsh Frauenheilk* **2007**; 67: 1-7.
36. Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J, et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy* **2005**; 7(2): 171-85.
37. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* **1998**; 16(8): 2672-85.
38. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **1994**; 124(4): 619-26.
39. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* **2001**; 19(16): 3669-74.
40. Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, et al. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* **2001**; 19(4): 960-71.

41. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* **2009**; 20(8): 1319-29.
42. Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* **1994**; 69(3): 566-71.
43. Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* **1992**; 11(2): 121-39.
44. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* **1995**; 1(2): 149-53.
45. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* **2008**; 13(1): 58-68.
46. Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* **2005**; 103(5): 884-91.
47. Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* **1999**; 91(1): 80-5.
48. Kaufmann M, von Minckwitz G, Bear HD, Buzdar A, McGale P, Bonnefoi H, et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. *Ann Oncol* **2007**; 18(12): 1927-34.
49. Kraeft SK, Ladanyi A, Galiger K, Herlitz A, Sher AC, Bergsrud DE, et al. Reliable and sensitive identification of occult tumor cells using the improved rare event imaging system. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(9): 3020-8.
50. Kraeft SK, Sutherland R, Gravelin L, Hu GH, Ferland LH, Richardson P, et al. Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system. *Clin Cancer Res* **2000**; 6(2): 434-42.
51. Krawczyk N, Banys M, Neubauer H, Solomayer EF, Gall C, Hahn M, et al. HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor. *Anticancer Res* **2009**; 29(10): 4019-24.
52. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* **1999**; 17(2): 460-9.
53. Lemieux J, Clemons M, Provencher L, Dent S, Latreille J, Mackey J, et al. The role of neoadjuvant her2-targeted therapies in her2-overexpressing breast cancers. *Curr Oncol* **2009**; 16(5): 48-57.
54. Leone BA, Romero A, Rabinovich MG, Vallejo CT, Bianco A, Perez JE, et al. Stage IV breast cancer: clinical course and survival of patients with osseous versus extraosseous metastases at initial diagnosis. The GOCS (Grupo Oncologico Cooperativo del Sur) experience. *Am J Clin Oncol* **1988**; 11(6): 618-22.

55. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer--epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ* **1994**; 309(6960): 1003-6.
56. Mehes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol* **2001**; 159(1): 17-20.
57. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(24): 8152-62.
58. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **1982**; 31(1): 11-24.
59. Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, Keith M, Laufer J, Kasper M, et al. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* **1993**; 53(2): 75-93.
60. Mueller V, Reithdorf S, Loibl S, Komor M, Huober J, Schrader I, et al. Prospective monitoring of circulating tumor cells in bresat cancer patients treated with primary systemic therapy-A translational project of the German Breast Group study GeparQuattro. *J Clin Oncol* **2007**; 25(18S): 735 (ASCO 2007, Nr.21085).
61. Murray C. Tumour dormancy: not so sleepy after all. *Nat Med* **1995**; 1(2): 117-8.
62. Paget S. Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* **1889**; 1: 571.
63. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* **2004**; 4(6): 448-56.
64. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* **1994**; 3(3): 165-73.
65. Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ* **2001**; 322(7301): 1528-32.
66. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giachetti S, et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res* **2008**; 14(21): 7004-10.
67. Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Sommer H, Friese K, Janni W. [Efficacy of zoledronate in treating persisting isolated tumor cells in bone marrow in patients with breast cancer. A phase II pilot study]. *Dtsch Med Wochenschr* **2008**; 133(7): 285-9.
68. Rosen PR, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* **1989**; 7(3): 355-66.
69. Sauer R, Schulz KD, Hellriegel KP. [Radiation therapy after mastectomy--interdisciplinary consensus puts and end to a controversy. German Society of Senology]. *Strahlenther Onkol* **2001**; 177(1): 1-9.
70. Schön D, Bertz J, Görsch B, Haberland J, Ziegler H, Stegmaier C, et al. Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland:

Gesundheitsberichterstattung für Deutschland. Berlin: Robert Koch-Institut, 2002.
71. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* **2007**; 369(9555): 29-36.
72. Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schutz F, et al. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2001**; 7(12): 4102-8.
73. Stanton AW, Modi S, Mellor RH, Levick JR, Mortimer PS. Recent advances in breast cancer-related lymphedema of the arm: lymphatic pump failure and predisposing factors. *Lymphat Res Biol* **2009**; 7(1): 29-45.
74. Tamm I, Schriever F, Dorken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol* **2001**; 2(1): 33-42.
75. Tumorzentrum München. Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. München Wien New York: W. Zuckschwerdt Verlag, 2005.
76. Tyczynski JE. Breast cancer in Europe. Fact Sheet. *European Network of Cancer Registries* **2002**.
77. Waterworth A. Introducing the concept of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res* **2004**; 6(1): 53-4.
78. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* **2006**; 66(4): 1883-90; discussion 95-6.
79. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* **2003**; 21(18): 3469-78.
80. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, et al. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(16): 5342-8.
81. Winter MC, Coleman RE. Bisphosphonates in breast cancer: teaching an old dog new tricks. *Curr Opin Oncol* **2009**; 21(6): 499-506.
82. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr* **2001**; (30): 96-102.

11. Danksagung

Vielen Menschen gebührt für das Gelingen dieser Arbeit herzlichen Dank:

An erster Stelle danke ich dem Direktor der Universitäts-Frauenklinik Tübingen, Herrn Professor Dr. med. Diethelm Wallwiener, der mir die Bearbeitung dieses interessantes Themas ermöglichte. Er bot mir bei Problemen immer sein offenes Ohr an, unterstützte mich zu jeder Zeit tatkräftig bei der Fertigstellung dieser Arbeit und half mir so ziemlich jedes Hindernis aus dem Weg zu räumen. Ohne ihn hätte ich das nicht so geschafft. Herzlichen Dank!

Besonderer Dank gilt auch Frau Professor Dr. med. Tanja Fehm, die mich sachkundig und erfahren bei meiner ersten wissenschaftlichen Arbeit leitete. Sie half mir den langen Prozess einer solchen Arbeit zu verstehen und ihn für mich zu nutzen und schenkte mir viele kostbare Stunden.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch an Maggie Banys richten, die immer Zeit für mich hatte, sich oftmals über die Ferne nach dem Prozess meiner Arbeit erkundigte und mir von Anfang an mit Rat und Tat zur Seite stand.
Ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft ist faszinierend und ich schätze mich glücklich, dass ich sie als Mentorin und Freundin für mich beanspruchen durfte.

Desweiteren möchte ich Herrn Professor Dr. med. Erich Solomayer danken. Er erleichterte mir den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten durch wichtige Hinweise.

Danken möchte ich auch Frau Graziella Pergola-Becker, die mich in die Laborwelt einwies.

Letztendlich gilt meiner Familie und meinem Freund großer Dank, die all meine Höhen und Tiefen dieser Zeit mit mir durchgestanden haben und mich auf mentale Weise erfolgreich unterstützten.

12. Lebenslauf

Priska Maria Tappeser

Geburtsdatum und -ort: 03.02.1985, Sigmaringen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

Schule:

1995 - 2004	Gymnasium in Rottenburg am Neckar, Deutschland (Eugen Bolz Gymnasium) Abitur

Universität:

Seit Oktober 2004	Universität zu Köln Köln, Deutschland Fach: Medizin
Juli 2005	Physikum
21. Oktober 2010	Staatsexamen (2.Abschnitt)

Arbeitserfahrung

Pflegepraktika:	
28.08.04 – 30.09.04	
und	
21.02.05 – 24.03.05	Winghofer Klinik Rottenburg; Orthopädie Rottenburg
27.07.05 – 28.08.05	Eberhard-Karls-Universität; Frauenklinik Tübingen
Famulaturen:	
05.03.07 – 05.04.07	Eberhard-Karls-Universität; Gynäkologische Station und Kreißsaal Tübingen
16.07.07 – 15.08.07	Prof. Dr. med. B. Jakober; Internist, Gastroenterologe und Endokrinologe Tübingen
15.08.08 – 15.9.08	Pädiatrische Klinik, Kreißsaal und Neonatologie, Tübingen
Praktisches Jahr:	
31.08.09 – 20.12.09	St. Elisabeth-Krankenhaus; Gynäkologie und Geburtshilfe, Köln
21.12.09 – 11.04.10	Zieglerspital des Spitalnetz; Chirurgie, Bern
12.04.10 – 31.07.10	Universitätsklinik Köln; Innere Medizin, Köln

Fremdsprachenkenntnisse

Deutsch:	Muttersprache
Englisch:	fließend
Französisch:	mehr als Grundkenntnisse (Leistungkurs)