

Aus dem Institut für Pathologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



Direktor: Prof. Dr. med. habil. Steffen Hauptmann

**Immunomagnetische Anreicherung und Nachweis zirkulierender  
Tumorzellen im peripheren Blut bei Patientinnen mit Mammakarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andreas Odparlik (geb. Kutz)  
geboren am 14. Februar 1973 in Halle/Saale

Gutachter: Prof. Dr. med. F.W. Rath  
Prof. Dr. med. Ch. Thommsen  
PD Dr. med. P. Würll (Ulm)

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 20. April 2004

Datum der Verteidigung: 12. Oktober 2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007379**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007379>]

Meiner Großmutter gewidmet.

## **Referat und bibliographische Beschreibung**

Die Früherkennung von malignen Tumorerkrankungen im Allgemeinen und im Rahmen dieser Arbeit für das Mammakarzinom im Speziellen gehört zu den wichtigen Aufgaben der klinischen Medizin. In der Regel bestimmt der zeitlich oftmals sehr früh einsetzende Prozess der Tumorzell dissemination den Verlauf und die Prognose der Erkrankung. Diese Arbeit versucht einerseits einen Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle von disseminierten Tumorzellen, einem wesentlichen Bindeglied zwischen Primärtumor und Tochtergeschwülsten, zu leisten. Andererseits soll mit dieser Studie ein mögliches Screeningverfahren dargestellt werden, welches es gestattet, relativ frühzeitig einen Hinweis auf eine maligne Erkrankung zu bekommen.

In dieser prospektiven Studie wurden 125 Blutproben von 83 Patientinnen mit histologisch gesicherten Mammakarzinomen auf das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen in Blutproben untersucht. Dafür wurden die Proben durch immunomagnetische Markierung um Teile der im Blut physiologisch vorhandenen Zellen mittels MACS-Technologie abgereichert und anschließend mittels Zentrifugation zur zytopathologischen Beurteilung auf Objektträger aufgebracht und immunzytochemisch gefärbt. Uns gelang es bei 35% der Patientinnen (29 von 83) insgesamt 261 Tumorzellen in den 16ml Blutproben zu finden. Erstmals konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Detektionsraten, dem Lymphknotenstatus und dem Vorhandensein von Fernmetastasen beschrieben werden. Die Resultate unterstützen die wichtige Rolle disseminierter Tumorzellen für den malignen Prozess und belegen die potentielle Leistungsfähigkeit der MACS-Methode für additive Tumordiagnostik und die Krankheitsverlaufskontrolle.

Kutz, Andreas: Immunomagnetische Anreicherung und Nachweis zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut bei Patientinnen mit Mammakarzinom. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2004

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumorbiologie.....	1
1.2	Das Mammakarzinom.....	2
1.2.1	Epidemiologie.....	4
1.2.2	Ätiologie .....	5
1.2.3	Lokalisation, Klinik und Prognose .....	6
1.2.4	Diagnostik.....	8
1.2.5	Therapie.....	9
1.3	Metastasierung.....	10
1.4	DTZ (Disseminierte Tumorzellen) und deren klinische Bedeutung.....	12
1.4.1	Molekularbiologische Eigenschaften DTZ.....	14
1.4.2	Allgemeines zur AK-Markierung.....	15
1.4.3	Detektionsverfahren von DTZ.....	15
2	Zielstellung.....	19
3	Materialien.....	20
3.1	Zellreihen.....	20
3.2	Patientengut und Blutproben.....	20
3.3	Chemikalien und Reagenzien.....	21
3.4	Kits und AK.....	22
3.5	Puffer und Lösungen.....	22
3.6	Geräte.....	23
3.7	Verbrauchsmaterialien.....	23
4	Methoden.....	24
4.1	Blutprobengewinnung.....	24
4.2	Zellkultivierung und Zellgewinnung.....	24
4.3	Zellzählung.....	24
4.4	Zeit- und Konzentrationsexperiment.....	25
4.5	Ficolllichtgradientenzentrifugation.....	25
4.6	Markierung der Leukozyten mit CD45-MicroBeads.....	27
4.7	Zellseparation mit AutoMACS.....	27
4.8	Immunzytochemische Färbung.....	28
4.9	Auswertung der Präparate.....	29
4.10	Estrogen- und Progesteronrezeptorbestimmung.....	30
5	Ergebnisse.....	31
5.1	Weiterführende Testreihen zur Optimierung des AutoMACS.....	32
5.2	Detektion von DTZ in den Patientenproben.....	33
5.3	Detektionsraten in Abhängigkeit vom Therapiestadium.....	37
5.4	Detektionsraten in Abhängigkeit von der Primärtumorgröße.....	38
5.5	Detektionsraten in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus.....	40
5.6	Detektionsraten in Abhängigkeit vom Fernmetastasenstatus.....	41
5.7	Detektionsraten in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad.....	43
5.8	Detektionsraten in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus.....	44
5.9	Kontrollstudie an gesunden Patienten .....	46
6	Diskussion.....	47
6.1	Auswahl, Optimierung und Effizienz der Detektionsmethode.....	48
6.2	Detektion von DTZ in den untersuchten Patientenblutproben .....	51
6.3	Klinische Relevanz .....	58

---

6.4	Schlüsse und Ausblick.....	59
7	Zusammenfassung.....	61
8	Literaturverzeichnis.....	64
9	Anlagen.....	76
10	Thesen.....	77

**Abkürzungen**

ADMS	engl.: „automated digital microscopy system“
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase – Antialkalische Phosphatase
bFGF	engl.: „fibroblast growth factor“
bidest.	Bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: „bovine serum albumin“)
CEA	engl.: „carcinoembryonic Antigen“
CK <sup>+/-</sup>	Cytokeratin positiv/negativ
DCIS	Duktales „ <i>Carcinoma in situ</i> “
DFZ	Durchflußzytometrie
DNA	engl. „desoxyribonucleic acid“
DTZ	Disseminierte Tumorzellen
ER <sup>+/-</sup>	Estrogenrezeptorstatus positiv / negativ
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	engl.: „epidermal growth factor receptor“
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FKS	Fötales Kälberserum
IHC	Immunhistochemie
ICC	Immuncytochemie
IME	engl.: „immunomagnetic enrichment“
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Knochenmark
MACS	Magnetische Zellsortierung (engl.: „magnetic activated cell sorting“)
MHC	engl.: „major histocompatibility complex“
MNC	engl.: „mononuclear cells“
mRNA	Boten Ribonukleinsäure engl.: „messenger ribonucleic acid“
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
nMASA	engl.: „nested mutant allele-specific amplification“
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: „phosphate buffered saline“)

---

PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: „polymerase chain reaction“)
PR <sup>+/-</sup>	Progesteronrezeptorstatus positiv / negativ
PVB	Peripher-venöse Blutprobe
RT – PCR	engl.: „reverse transkriptase polymerase chain reaction“
Tris/	
TrisHCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethan / -HCl
TSG	Tumorsuppressorgen
TZ	Tumorzellen
ÜLZ	Überlebenszeit
U/min	Umdrehungen pro Minute

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorbiologie

Der Begriff Tumor bezeichnet im weiteren Sinn eine umschriebene Volumenzunahme unabhängig von deren Genese. Im engeren Sinne wird im heutigen Sprachgebrauch Tumor mit Geschwulst gleichgesetzt und meint eine abnorme Gewebszunahme, die auf eine überschüssige Proliferation körpereigener Zellen zurückgeht, sich weder funktionell noch strukturell in das Normalgewebe eingliedert und auch beim Ausbleiben des auslösenden Reizes weiterwächst. Bezüglich der Dignität unterscheidet man maligne, semimaligne und benigne Tumoren. Diese Unterscheidung wird in der Regel klinisch getroffen, so dass Tumoren als benigne bezeichnet werden, wenn sie sich durch ein langsames, nicht infiltrierendes und nicht metastasierendes Wachstum auszeichnen und nach chirurgischer Entfernung in aller Regel nicht wieder auftreten. Als semimaligne Tumoren werden Geschwülste bezeichnet die zwar nicht metastasieren, aber am Ort ihrer Entstehung infiltrativ wachsen. Maligne Tumoren zeichnen sich durch ein schnelles Wachstum, Infiltration und Destruktion der Umgebung, Invasion in Lymph- oder Blutgefäße und durch das Setzen von Metastasen aus. Je nach dem Ursprungsgewebe werden unter anderem folgende Tumorkategorien der Malignome unterschieden: (Riede U.-N., Schaefer H.-E., 1999)

Bezeichnung	Erläuterung
Karzinome	maligne epitheliale Tumoren
Sarkome	maligne mesenchymale Tumoren
Mischtumoren	kombinierte Karzinome und Sarkome
Teratome	enthalten die Differenzierungsprodukte aller drei Keimblätter
Blastome	entdifferenzierte Geschwülste, die frühe Organanlagen imitieren

*Tabelle 1: Beispiele für maligne Tumoren*

Tumoren entwickeln sich durch eine Entgleisung der sonst exakt regulierten Entwicklung und Vermehrung von Zellen. Dieses Entgleisen ist Resultat eines in mehreren Schritten verlaufenden Prozesses, der sowohl durch verschiedenste chemische, physikalische und virale Noxen als auch durch erbliche, endokrine und ernährungsbedingte Faktoren oder Lebensalter ausgelöst werden kann. In diesem Prozess spielen die unkontrollierte Aktivierung von wachstumsinduzierenden Genen (Onkogene) und der Verlust bzw. die Inaktivierung

wachstumshemmender Gene (Tumorsuppressorgene) eine entscheidende Rolle. Es können bei der Tumorinduktion die Phasen Initiation und Promotion bzw. Progression unterschieden werden. Die normale Zelle wird in der Initiationsphase in eine neoplastische Zelle umgewandelt und aus ihr entstehen in der Promotions- und Progressionsphase Tumorzellklone. Grundlage dieser Ereignisse sind oft zufällige genetische Ereignisse basierend auf einem mathematisch-chaotischen System.

Zytologisch und histologisch können Malignome durch folgende Merkmale definiert und damit erkannt werden (Riede UN, 1999):

Zellveränderung	Erläuterung
Zellpolymorphie und Kernpolymorphie	unterschiedliche Größen der Zellen und der Zellkerne durch fehlerhafte Zellteilung (Endomitosen)
Kernpolychromasie	wechselnde Quantität der Anfärbarkeit des Zellkernes infolge unterschiedlichen DNA (engl.: „desoxy ribonucleic acid“) -Gehaltes und Vervielfachung des Chromosomensatzes
Verschiebung der Kern-Plasma-Relation	Infolge der Herabsetzung des Funktionsstoffwechsels und der ausgeprägten Dedifferenzierung
Nukleolenvergrößerung	infolge abnormalen Proliferationsstoffwechsels

Tabelle 2: Zellveränderung bei malignen Tumoren

Die morphologische Erscheinungsform des entarteten Zellverbandes wird in einem für jeden Tumor spezifisch beobachteten und klassifizierten System beschrieben. Hierbei werden Tumorgroße, regional-metastatisches und fern-metastatisches Verhalten nebst der histologischen (Ent-) Differenzierung definiert. Dieses TNM-System (Tab. 21) dient vor allem der klinischen Charakterisierbarkeit und hilft bei Prognoseabschätzung, Therapieindikation und -art.

## 1.2 Das Mammakarzinom

Der Begriff Mammakarzinom wird als Oberbegriff für diejenigen malignen Tumoren verwandt, die von den Epithelien der Milchgänge oder von lobulären Drüsenendstücken ausgehen.

Gruppe	Beispiele
<b>1. Nichtinvasive Karzinome</b>	a) <u>D</u> uktales <u>C</u> arcinoma <u>i</u> n <u>s</u> itu (DCIS) b) <u>L</u> obuläres <u>C</u> arcinoma <u>i</u> n <u>s</u> itu (LCIS)
<b>2. Invasive Karzinome</b>	a) Invasives duktales Karzinom b) Bilaterales Karzinom c) Invasives lobuläres Karzinom d) Muzinöses Karzinom e) Medulläres Karzinom f) Papilläres Karzinom g) Tubuläres Karzinom h) Adenoid-zystisches Karzinom i) Sekretorisches (juveniles) Karzinom j) Apokrines Karzinom k) Karzinome mit Metaplasie l) Invasives cribriformes Karzinom m) Endokrine Karzinome n) Inflammatorische Karzinome o) Metaplastische Karzinome p) Lipidreiche Karzinome q) Glycogenreiche, klarzellige Karzinome r) Karzinome mit osteoklastischen Riesenzellen s) Choriokarzinomatöse Karzinome t) Onkozytische Karzinome u) Melanozytische Tumoren v) Mikropapilliäre Karzinome w) Mukoepidermoidale Karzinome x) Metastasen bei extramammillären Primärtumoren
<b>3. Pagetkarzinom der Mamille</b>	

*Tabelle 3: Aktuelle WHO-Klassifikation der Mammakarzinome*

Das invasive duktales Karzinom nimmt mit ca. 80% aller Mammakarzinome den führenden Platz ein. Das physiologische Drüsengewebe enthält Estrogen- und Progesteronrezeptoren

(ER/PR), welche die endokrine Stimulation der Brustdrüse vermitteln und auch bei benignen und malignen Entartungen gefunden werden können. Therapeutisch sind sie ein Ansatzpunkt für eine antihormonale Beeinflussung, der sowohl kausal kurativ als auch sekundärprophylaktisch sein kann (Barret-Connor et al., 2002).

### 1.2.1 Epidemiologie

In den westlichen Industrieländern ist das Mammakarzinom mit einem Anteil von 22% an allen Malignomen (Chang-Claude, 1997) die häufigste Krebstodesursache bei Frauen (Berg, 1995), wobei das kumulative Risiko mit 11% angegeben wird. Das Risiko in einer bestimmten Lebensdekade zu erkranken beträgt hingegen 3%. Im Alter zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr stellt das Mammakarzinom die häufigste Todesursache überhaupt dar (Beckmann et al., 1997). Die Morbidität in Deutschland nahm in den letzten 20 Jahren um ca. 1% jährlich kontinuierlich zu, wobei die Mortalitätsraten weitestgehend konstant blieben, was vermutlich auf eine verbesserte Früherkennung und Therapiemöglichkeiten zurückzuführen ist. Insgesamt liegt die Inzidenz für Brustkrebs in den asiatischen Ländern hinter denen Europas oder der USA. Diese ist aber im Steigen begriffen, wobei verschiedene Ursachen insbesondere sozioökonomische diskutiert werden, welche aber insgesamt noch nicht hinreichend erklärt sind.

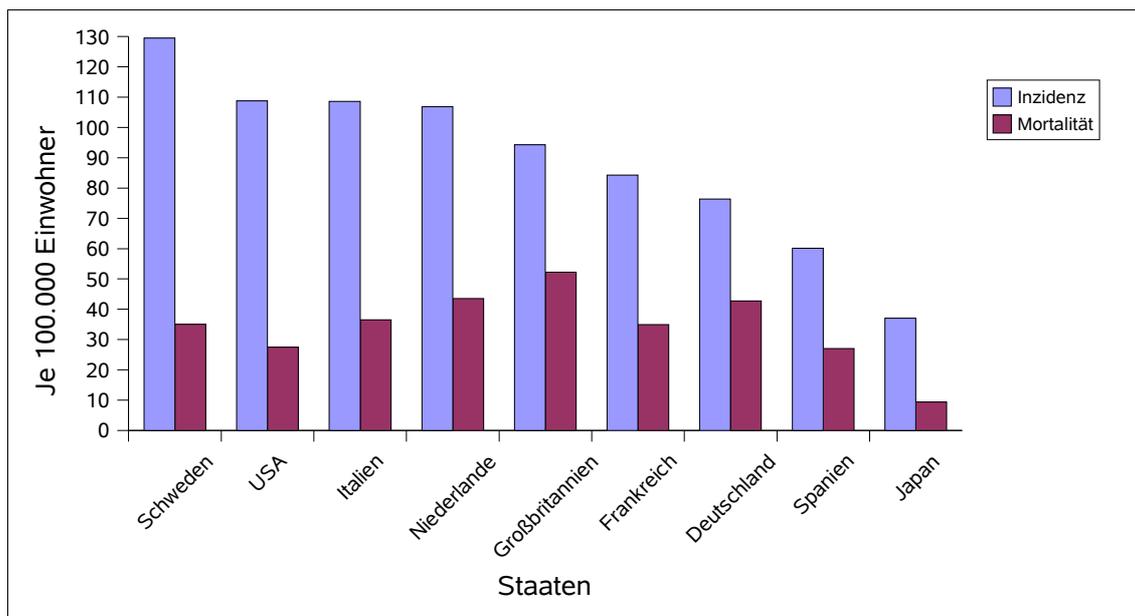


Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms (Dietrich et al., 2000)

### 1.2.2 Ätiologie

Eine der gängigen Theorien zur Brustkrebsentstehung beschreibt monoklonale Veränderungen des genetischen Materials wobei neben Mutationen, die in jedem Zellzyklus zu einem Funktionsverlust führen können, auch eine vermehrte Expression einzelner Gene bekannt ist. Störungen auf Ebene der DNA sind in aller Regel multifaktoriell (Beckmann et al., 1997).

Man unterscheidet verschiedene Tumorklassen, die in die Tumorgenese involviert sind.

Tumorklassen	Beispiele
Proto-Onkogene	c-ras, c-myc, c-erb-B2
Tumorsuppressorgene (TSG)	BRCA-1, BRCA-2, p53-TSG
Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren	Ink4a, p21, p27, TP53
Angiogenese Faktoren	bFGF

Tabelle 4: Beispiele für Tumorklassen

HER-2/neu ist ein relativ neu beschriebener transmembranöser Wachstumsfaktor vom Tyrosinkinase-Typ. 25% aller invasiven Mammakarzinome zeigen eine Überexpression dieses Onkogens. In all diesen Genklassen können somatische und genomische Mutationen auftreten, wobei der Anteil der genomischen Mutationen ca. 5% beträgt (Chang-Claude, 1997). Somit sind vor allem die epigenetischen Faktoren wie Umwelteinflüsse und Toxine, aber auch endogene Einflüsse wie hormonelle Beeinflussungen zum Gegenstand wissenschaftlichen Interesses geworden.

Wie in Studien gezeigt werden konnte, kommen in hohem Maße die Dauer, die Gleichmäßigkeit und die Häufigkeit der erlebten Menstruationszyklen als kausale Genese für das Mammakarzinom in Frage (Parazzini et al., 1993; Whelan et al., 1997). Es hat sich auch gezeigt, dass Frauen die in jungen Jahren oophorektomiert wurden ein bis zu 30% reduziertes Risiko und solche mit einem unregelmäßigen Menstruationszyklus ebenfalls ein signifikant erniedrigtes Risiko hatten ein Mammakarzinom zu entwickeln (Trichopoulos et al., 1972; den Tonkelaar et al., 1996).

Mehrere Studien (Bland, 1987; Garland et al., 1998) wiesen nach, dass Frauen mit einer geringeren Anzahl an Menstruationszyklen, bedingt durch eine spät einsetzende Menarche oder mehrere Geburten und Stillzeiten, weniger gefährdet sind an einem Brustkrebs zu erkranken.

Neben toxischen Einflüssen durch Substanzen wie z.B. Herbizide, Endosulfan, Bisphenol und aromatischen Kohlenwasserstoffe, werden auch soziokulturelle und strahlungsbedingte Ursachen diskutiert, letztendlich scheint aber der Häufigkeit und Regelmäßigkeit der in einem Lebenszeitraum einer Frau erfahrenen Menstruationszyklen eine der entscheidenden Rollen zuzukommen (Tab. 5).

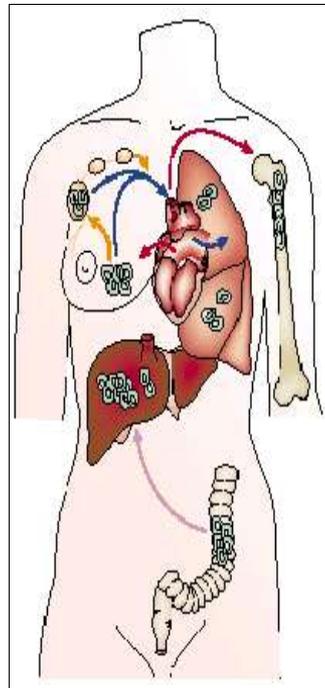
Faktoren	Beispiele
Genetische Faktoren	Positive Familienanamnese, BRCA-1, BRCA-2, Alter
Faktoren der Reproduktion	Frühe Menarche, Späte Schwangerschaft und Menopause, Nulliparität
Körperfaktoren	Body Mass Index
Brustspezifika	Gutartige Brusterkrankungen, Mammographische Gewebsdichte, Kontralateraler Brustkrebs
Exogene Faktoren	Diethylstilböstrol, Strahlung, Alkohol, Nikotin, Herbizide

Tabelle 5: Übersicht der bekannten Risikofaktoren zur Mammakarzinogenese

### 1.2.3 Lokalisation, Klinik und Prognose

Das Mammakarzinom ist meist einseitig unter Bevorzugung des oberen äußeren Quadranten und am zweithäufigsten im Bereich der Mamille (zentral oder retromamillär) lokalisiert. Die Ursache hierfür ist wohl darin zu suchen, dass in diesen Bereichen der quantitativ größte Teil an Drüsengewebe existiert und damit, gegenüber Regionen mit quantitativ geringeren hochproliferativen Zellverbänden, ein statistisch höheres Risiko zur Entartung verbunden ist. Eine Mastodynie und prämenstruelle Schmerzen werden zumeist hier angegeben. Gelegentlich wird ein multifokales und auch beidseitiges Auftreten des Karzinoms beobachtet. Das makroskopische Bild ist vielfältig, meist imponiert dieses als unscharf begrenzter harter Knoten, mit häufigen Nekrosen und Mikroverkalkungen (Wittekind, 1996). Die Tumorzellen des Mammakarzinoms breiten sich vor allem lokal-segmental in den Milchgängen und Bindegewebssepten aus, wobei die weitere Streuung lympho- oder hämatogen erfolgt und von entscheidender prognostischer und therapeutischer Wichtigkeit ist. In den überwiegenden Fällen (ca. 60-70%) wird ein Tumorknoten primär von den Patientinnen und erst sekundär durch den Arzt (15-30%) oder gar durch die bildgebende Diagnostik (ca. 8%) festgestellt. Symptome sind selten und meist auf Schmerzen oder

Schwellungen in Brust oder Arm beschränkt. Morphologische Veränderungen der Mammae wie vergrößerte Lymphknoten, Mamillensekretion, Plateau- oder Jackson-Phänomene zwingen zu intensiver apparativer Diagnostik (Jonat, 1999).



*Abbildung 2: Typische Metastasierungswege beim Mammakarzinom*

Die größte prognostische Wertigkeit bezüglich Rezidiv und Überleben besitzt der axilläre Lymphknotenstatus, wobei die Anzahl der betroffenen Lymphknoten direkt mit dem Risiko des Rezidivs und der Mortalität korreliert. Die Größe des Primärtumors spielt prognostisch eine wichtige Rolle bei nodal-negativen Karzinomen, während diese bei nodal-positiven Fällen in den Hintergrund gerät. Auch histomorphologische Kriterien sind von hoher prognostischer Bedeutung. So haben tubuläre, papilläre und muzinöse Karzinome eine signifikant bessere Prognose als duktale Karzinome. Ein Tumoreinbruch in die Lymph- oder Blutgefäße weist auf eine schlechte Prognose hin, weiterhin besteht eine eindeutige Abhängigkeit zwischen dem histologischen Grading und dem rezidivfreien Überleben. Die Bestimmung der Steroidhormonrezeptoren hat eine breite klinische Bedeutung erlangt. Bei Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus (N0) scheint dem ER-Status, bei Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus (N1) dem Progesteronrezeptorstatus die größere prognostische Bedeutung zuzukommen, wengleich die prognostische Vorhersagekraft mit der Dauer der Nachbeobachtungszeit abnimmt (Harbeck et al., 2001).

Aktuelle Studien haben einige neue Prognosefaktoren beschrieben, deren klinischer Nutzen durch entsprechende Publikationen evident ist. Von den bisher beschriebenen Faktoren genügen nur zwei dem höchsten LOE I (engl.: „Level of Evidence“, Hayes et al., 1991). Diese sind tumorassoziierte Proteolysefaktoren ( $\mu$ PA Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp, PAI-1 Plasminogenaktivator-Inhibitortyp 1), die am Abbau der Basalmembran beteiligt sind und zur Invasions- und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen beitragen (Andreasen et al., 1997). Der immunzytochemische Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark (Knochenmarkstatus) hat als fakultativer Faktor bereits Eingang in die TMN-Klassifikation gefunden (Wittekind et al., 1997) und kann ebenfalls zu prognostischen Aussagen herangezogen werden, da sich in mehreren Studien eine positive Korrelation zwischen dem Knochenmarkstatus und dem axillären Lymphknotenstatus (Funke et al., 1998) finden ließ.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 5-Jahresüberlebenschance ohne axillären Befall ca. 70% beträgt, wohingegen diese bei positivem Lymphknotenstatus auf 30% sinkt.

#### 1.2.4 Diagnostik

Die für die Diagnostik entscheidenden Untersuchungen sollen hier kurz Erwähnung finden. Dies sind im Augenblick neben der Klinik vor allem die bildgebenden Verfahren, allen voran die Mammographie, wobei hier Sensitivität und Spezifität überwiegend vom Zeitpunkt der Untersuchung, dem Alter der Patientin und ihrer korrekten Durchführung abhängen. Daneben kommen noch die Galaktographie, Pneumozystographie, Sonographie, Kernspintomographie und die Punktionsdiagnostik in Frage. Der Einsatz des Positronenemissionstomogramms wird gegenwärtig diskutiert.

Aktuelle Studien (Bilkenroth et al., 2001; Witzig et al., 2002; Taubert et al., 2003) zeigen möglicherweise neue Verfahren auf, bei denen versucht wird, im Blut zirkulierende oder sich im Rückenmark befindliche einzelne Tumorzellen nachzuweisen. In einem ausgereiften Stadium könnten hiermit neue Screeningverfahren zur Verfügung stehen, welche eine Früherkennung betroffener Frauen in einem sehr frühen Stadium erlauben. Die Nachweisgrenze in den bildgebenden Verfahren liegt bei einer Tumorgröße von etwa einem Kubikzentimeter (Kap. 1.4)

### 1.2.5 Therapie

Die therapeutischen Maßnahmen bei Mammakarzinomen sind vielfältig und richten sich primär nach dem TNM-Stadium des Malignoms. Zur Verfügung stehen die operative, die zytostatische, die hormonelle und die radioonkologische Therapie, wobei diese nicht als isolierte sondern vielmehr als zu kombinierende Möglichkeiten anzusehen sind.

Die operative Therapie des Mammakarzinoms ist heute gekennzeichnet durch die Individualisierung des Vorgehens. Das Ausmaß des Eingriffs wird in erster Linie vom klinischen und histopathologischen Befund bestimmt. Die brusterhaltende Therapie hat sich weltweit zu einem etablierten Verfahren entwickelt, deren Indikationen zunehmend weiter gestellt werden. Ziel dieses Vorgehens ist es, ein möglichst intaktes weibliches Aussehen zu erhalten, ohne dabei die lokale Tumorkontrolle und die kurative Chance der Patientin zu gefährden. Die Behandlung des Mammakarzinom nach erfolgter Operation ist ein umstrittenes und uneinheitlich beantwortetes Kapitel. Auch hier kommen im wesentlichen die Polychemotherapie, die Hormontherapie mit AntiEstrogenen und die Strahlentherapie in Frage. Man muss bei jeder Patientin mit Mammakarzinom davon ausgehen, dass zum Zeitpunkt der Diagnose bzw. der primären Operation sowohl Lokal- als auch Fernmikrometastasen vorliegen können. Selbst bei ausreichender lokaler Therapie bestimmen sie das Gesamtüberleben einer Patientin.

Der Begriff der adjuvant beinhaltet, dass infolge der Therapie kein sichtbarer oder durch irgendeine andere Art diagnostizierbarer Tumorrest vorliegt. Es werden lediglich vermutete Mikrometastasen durch dieses Therapieverfahren angegangen. Es gilt heute als gesichert (10 bis 15 Jahre Überlebensdaten der Metaanalyse der Early Breast Cancer Triallists Collaborative Group = EBCTCG), dass eine adjuvante systemische Therapie das Gesamtüberleben und nicht nur das rezidivfreie Überleben deutlich verbessert (EBCTCG, 1998).

Die optimale Therapie ist jedoch bis heute für keine der Patientengruppen endgültig definiert. Bei sehr günstiger Prognose, d.h. einem Rückfallrisiko unter 15 % über einen Zeitraum von 10 Jahren, ist eine adjuvante Therapie nicht notwendig. Alle anderen Patientinnen können von einer systemischen adjuvanten Therapie profitieren. Trotz optimaler Primärtherapie ist bei 40 bis 50 % der Patientinnen mit operablem Brustkrebs im Laufe eines Intervalls bis zu 20 Jahren mit einem Rückfall zu rechnen. Treten Metastasen auf, ist durch eine medikamentöse Therapie keine Heilung mehr möglich. Durch die Ausbildung von Estrogen- und Progesteronrezeptoren (ER/PR) ist das Mammakarzinom durch verschiedene hormonelle

Manipulationen kontrollierbar. Der Nachweis von Hormonrezeptoren ist für die zu behandelnde Patientin generell ein günstiger Prognosefaktor für die Überlebenszeit. 60% aller prämenopausalen und ungefähr 75% aller postmenopausalen Patientinnen weisen positive Hormonrezeptoren im Tumorgewebe auf.

Mit steigendem Rezeptorgehalt steigen auch die Ansprechraten auf eine hormonelle Therapie. Während nur mit 7%-igen Ansprechraten bei Patientinnen mit rezeptornegativen Tumoren zu rechnen ist, lassen sich bei rezeptorpositiven Tumoren objektive Remissionen bei etwa 70% der Patientinnen erwarten (EBCTCG, 1992). Die Hormontherapie basiert vorwiegend auf einem Entzug des steroidalen Wachstumsfaktors „Estrogen“. Dieser hormonelle Entzug kann permanent durch Operation oder Radiomenolyse oder reversibel medikamentös erfolgen. Alle Methoden der Ovarialausschaltung führen zu nahezu identischen Ergebnisse (EBCTCG, 1996). Zu neuen viel versprechenden Therapien, wie z.B. eine AK-Behandlung gegen HER-2, müssen noch die Langzeitergebnisse abgewartet werden. Die Tatsache, dass aktuell keine kurativen Strategien beim primär metastasierten Mammakarzinom existieren, macht deutlich, wie wichtig die Optimierung und Entwicklung sowohl bestehender als auch neuer diagnostischer Maßnahmen zur Früherkennung ist.

### 1.3 Metastasierung

Der gesamte Vorgang der Metastasierung ist ein sehr komplexes Geschehen, welches in weiten Teilen noch wenig verstanden ist. Diese Vorgänge bezeichnet man je nach Ursprung als sekundäre oder tertiäre Metastasierung. Es ist bisher unklar wann und in welcher Menge diese Zellen auf den Weg geschickt werden (Rath und Schönfelder, 2002).

Der Beginn einer Zellablösung ist gekennzeichnet durch verschiedene parallel, ablaufende Prozesse. So findet in der betroffenen Zelle ein Genverlust statt, der für Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. Integrine kodiert, was einen Kohäsionsverlust des Zellverbandes nach sich zieht. Darüber hinaus werden Motilitätsfaktoren und Chemokine gebildet. Schlussendlich sezernieren die Tumorzellen unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie bFGF und TGF $\beta$  auch Metalloproteinasen, welche die Basalmembrankollagene aufspalten und einen Plasminogenaktivator, welcher Kollagene, Laminin und Fibronectin abbauen kann. Somit können diese sich nicht nur ungehindert bewegen, sondern auch in umliegende Gefäße einbrechen. Hinsichtlich der Metastasierungswege unterscheidet man (Tab. 6):

Metastasierungsform	Erläuterung
Lymphogen	Metastasierung erfolgt über Lymphbahnen
Hämatogen	Metastasierung erfolgt über Blutbahnen
Kavitär	Metastasierung erfolgt über die präformierten Körperhöhlen
Kanalikulär	Metastasierung erfolgt über epitheliale Kanäle

Tabelle 6: Metastasierungswege maligner Tumore

Dabei erfolgt insbesondere die hämatogene Metastasierung in mehreren Phasen (Tab. 7, Abb.3)

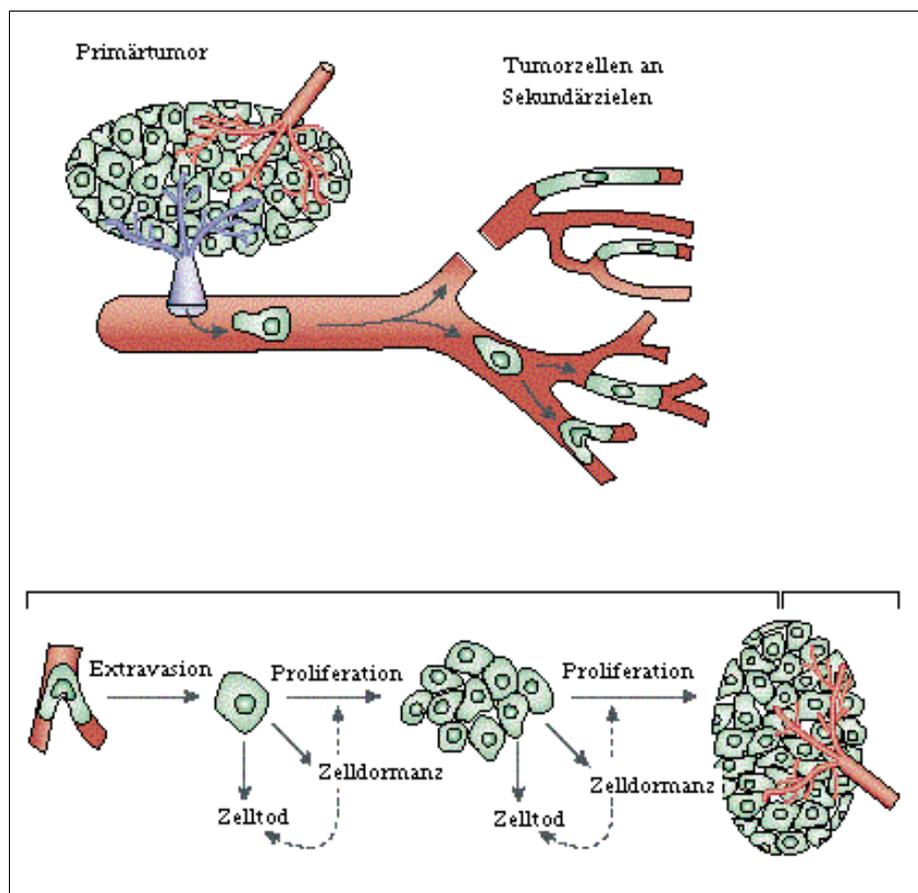


Abbildung 3: Biologie der Metastasierung

Die Absiedlung der Tumorzellen von einem Primärtumor und das Festsetzen an entfernten Plätzen. Die Zellen sind zum Ausbruch in den Blutkreislauf fähig, worauf sie sich im Kapillarbett der Zielorgane festsetzen. (Chambers, 2002).

Phase	Erläuterung
Intravasation	Durch oben beschriebene Vorgänge kommt es zum Einbruch ins Blutsystem, wobei die meisten Tumorzellen intravasal zerstört werden.
Embolisierungsphase	Im Rahmen der Interaktion von Tumorzellen mit Blutsustanzen werden diese von Thrombozyten und Fibrin eingeschlossen, was einen gewissen Schutz gegen das Immunsystem bietet.
Implantationsphase	Nach dem Ausbruch aus dem Embolus im postkapillären Venuolenbett, binden die Tumorzellen an entsprechende adhäsionsfaktorbestückte Ankerplätze im Endothel bestimmter Organe. Die Tumorzellen dringen in das Organgewebe ein und veranlassen mit ihren eigenen oder induzierten Angiogenesefaktoren den Aufbau einer eigenen Gefäßversorgung.

Tabelle 7: Phasen der hämatogenen Metastasierung

Je nach Primärtumor lassen sich die Metastasierungswege in Lungentyp, Lebertyp, Kavatyptyp und Pfortadertyp einteilen (Abb. 2). Das hier hauptsächlich besprochene Mammakarzinom metastasiert am ehesten lympho- und hämatogen mit lungentypischen Metastasierungswegen und Absiedlungen in Knochen, Lunge, Leber und Gehirn. (Riede et al., 1996)

#### 1.4 DTZ (**Disseminierte Tumorzellen**) und deren klinische Bedeutung

In den letzten Jahren wurden wesentliche Fortschritte im Verständnis der Biologie und Pathogenese der soliden Tumoren erzielt. Diese Fortschritte wurden vor allem durch die Anwendung moderner Methoden der Zytogenetik und Molekularbiologie beim Studium der physiologischen und pathologischen Zellentwicklung erreicht.

Die Disseminierung von Tumorzellen ist ein weit verbreitetes, vermutlich ein ubiquitäres Phänomen, welches aber in keinem bisher nachgewiesenen Zusammenhang mit der Metastasierung steht.

Bei Diagnosestellung tragen Patienten mit soliden Tumoren eine Gesamtzahl maligner Zellen von etwa  $10^{10}$  bis  $10^{12}$  in sich, was in etwa einer Tumorzellmasse von 10g bis 1kg entspricht (Campana und Pui, 1995). Durch die hoch entwickelte Tumorchirurgie und die verfügbaren effektiven Chemotherapieverfahren wird heute das Schicksal der Patienten nach

makroskopisch und mikroskopisch vollständiger Tumorentfernung in zunehmenden Maße allein durch die Anwesenheit von DTZ nach Therapieende bestimmt.

Während der Phase der Disseminierung können mit unterschiedlichen Verfahren isolierte Tumorzellen oder kleine Cluster im Blut gefunden werden, die in einigen Publikationen auch als Mikrometastasen bezeichnet werden, wobei dies zu hinterfragen ist, da der Begriff der Metastase einen organisierten, stromahaltigen Zellverband voraussetzt, der Anschluß an das Kapillarsystem gefunden hat. Allerdings können disseminierte Tumorzellen als Vorstufen von Mikrometastasen angesehen werden. Wie unabhängig das Streuverhalten von der Tumorgroße ist zeigt die Tatsache, dass auch Mikrometastasen in einer Größe vom  $2\text{mm}^2$  proliferationsstüchtig sein können (Diel et al., 2000).

Die absolut überwiegende Zahl der DTZ befinden sich im mitotisch inaktiven Zustand, der sogenannten G<sub>0</sub>-Phase. Dies ist ein möglicher Grund, warum herkömmliche Chemotherapeutika, die vor allem in den aktiven Teilungsprozess einer Zelle eingreifen, die die Last an DTZ kaum vermindern. Es ist bisher unklar, welche Faktoren ursächlich sind für die bis zu 20 Jahren ausgeprägte Latenzzeit der Tumorzellen. In diesem Zustand der Zelldormanz scheinen die DTZ vom Zeitpunkt der Aussaat bis zur Metastasenentstehung zu verharren (Pantel et al., 1997).

Die oben beschriebene Komplexität der Metastasenbildung, vor allem in der Implantationsphase, erklärt, warum nur wenige der DTZ überleben und Metastasen bilden können. Auch das körpereigene Immunsystem, welches sehr schnell mit natürlichen Killerzellen und Makrophagen zu reagieren scheint, reduziert vermutlich die Anzahl der DTZ. Aber auch chemische und mechanische Elimination spielen eine wichtige Rolle in diesem Prozess der Abwehr. Auch wurde nachgewiesen, dass metastatische Zellen oft einer Apoptoseinduktion unterliegen (Fournier et al., 1999).

In Tierversuchsmodellen konnte gezeigt werden, dass etwa eine Anzahl von  $10^3$  Tumorzellen ausreicht um eine Metastase zu setzen (Hardingham et al., 1995). Bei einem in dieser Studie angegebenen Detektionslimit von ca. 10 Zellen je Milliliter Blut können also je nach Blutvolumen  $0,5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^5$  Zellen zu einem Zeitpunkt zirkulieren. Wenn man also davon ausgeht, dass etwa ein Hunderttausendstel der gestreuten Zellen überlebt, ist hinreichend Potential für einige solitäre Metastasen gegeben (Hardingham et al., 1995).

Etliche der angegriffenen Tumorzellen können sich durch Effekte wie Fibrinablagerungen, Thrombozytenaggregationen und mechanische Adhäsionen um die Tumoremboli vor der Zerstörung durch die Immunabwehr schützen (Fournier et al., 1999).

Bei Lymphomen oder soliden Tumoren wird eine Rückbildung ehemaliger Raumforderungen

unter die Nachweisgrenze der Bildgebung, oder im Falle der Lymphknoten unterhalb 1cm Größe, als komplette Remission gewertet. Wie grob diese Definition der kompletten Remission ist, wird deutlich, wenn man bedenkt, dass immerhin eine Gesamtzahl von bis zu etwa  $10^8$  bis  $10^9$  in den Patienten verbliebenen Tumorzellen dem diagnostischen Nachweis mit konventionellen Methoden entgehen.

Die mit den verfügbaren konventionellen Untersuchungsmethoden nicht erfassten und durch Operation, Chemotherapie und Strahlentherapie nicht eliminierten okkulten Tumorzellen werden als Ausgangspunkt für Rezidive und Metastasen angesehen. Ihre Erfassung hat daher Bedeutung für die Prognose und zum Teil auch für das klinische Management von Patienten mit malignen Erkrankungen (Cheung et al., 1997; Diel et al., 1996; Rosset al., 1998).

#### 1.4.1 Molekularbiologische Eigenschaften DTZ

Bisher sind einige molekular- und zellbiologische Eigenschaften von DTZ entdeckt worden. Die Kenntnis dieser Mechanismen oder Gegebenheiten sind immens wichtig, sowohl für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien als auch und gerade für das Verständnis der Entwicklung einer malignen Tumorerkrankung.

Es wurde bei einigen Karzinomen gefunden, dass in DTZ die Regulation zur Expression von MHC-Klasse I (engl.: „major histocompatibility complex“) Rezeptoren auf der Zelloberfläche beeinflusst werden kann im Sinne einer Herunterregulation (Pantel et al., 1991). Diese Rezeptoren sind zur T-Zell vermittelten Immunabwehr notwendig, so dass hier ein Grund für das teilweise auftretende Versagen der zellulären Abwehr als Erklärung herangezogen werden kann. Außerdem sind zum Teil Expressionen von Wachstumsfaktoren aufgeklärt. So kodiert das humane erbB2-Protoonkogen für einen transmembranösen Glykoproteinrezeptor p185<sup>erbB2</sup>, der Homologien zum epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor zeigt. Daneben konnte mit HER-2/neu ein weiterer transmembranöser Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinase-Typ beschrieben werden. Ca. 25% aller Mammakarzinome zeigen eine HER-2/neu Überexpression und eine Amplifizierung von erbB2 und damit eine erhöhte p185<sup>erbB2</sup> Expression.

Es werden nebenher viele verschiedene weitere Faktoren wie E-Cadherin (Umbas et al., 1994; Klein et al., 2002) oder EMMPRIN (Klein et al., 2002) untersucht und hinsichtlich Ihrer Bedeutung diskutiert. Dieser Erkenntnisprozeß ist noch am Anfang und aufgrund der großen Heterogenität DTZ wichtig für künftige Therapieansatzpunkte.

### 1.4.2 Allgemeines zur AK-Markierung

MicroBeads bestehen aus AK gegen spezifische Antigene, sind mit einem nur 50 nm messenden, paramagnetischen Eisenoxid-Dextran-Partikel gekoppelt und können so in einem Magnetfeld zurückgehalten werden. Oberflächen von Zellen zeichnen sich durch mehr oder weniger oberflächenspezifische Antigenstrukturen aus, welche mit AK in Wechselwirkung treten können und werden nach einem einheitlichen internationalen System mit CD XXX (engl.: „cluster of differentiation“) bezeichnet. CD45 zum Beispiel ist ein Oberflächenantigen, welches auf menschlichen mononukleären Zellen, wie Leukozyten, stabil exprimiert wird. Da Leukozyten den größten Anteil des Zellsuspensats einnehmen, ist es also von Vorteil diese herauszufiltern, zumal die interessierenden Tumorzellen dieses Oberflächenantigen nicht exprimieren.

CK (Cytokeratin) sind Teil des Zytoskelettes epithelialer Zellen und werden bei Karzinomen vermehrt exprimiert, so dass ein AK gegen diese intrazellulären Strukturen hier eine positive Selektion möglich macht. Eine Markierung der Zytokeratine wird seit langem zur histologischen Färbung zur Charakterisierung und Differentialdiagnostik eingesetzt. Grundsätzlich gibt es also die Möglichkeit einer Positivmarkierung, bei der die interessierenden Tumorzellen markiert oder die Möglichkeit einer Negativmarkierung, bei der die nicht interessierenden Zellen markiert werden. Da aber nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft kein Oberflächenantigen mit hoher Spezifität auf Karzinomzellen bekannt ist und die Permeabilisierung dieser Zellen, um die vermehrt exprimierten Zytokeratine zugänglich zu machen, oft mit deren Tod einhergeht, wird in dieser Untersuchung die Negativmarkierung bevorzugt.

### 1.4.3 Detektionsverfahren von DTZ

Schon bald nach dem invasiven Wachstum streuen Mammakarzinomzellen bevorzugt über Blutgefäße oder Lymphbahnen und bilden Metastasen in Lunge, Pleura, Leber, Gehirn, Knochen und Lymphknoten. Bei jedem zweiten Patienten mit einem scheinbaren Fehlen von Fernmetastasen (Stadium M0) wird nach Tumorresektion innerhalb von fünf Jahren ein metastatisches Geschehen diagnostiziert. Von Patienten mit einem negativen Lymphknotenstatus wird aber etwa jeder dritte Metastasen entwickeln.

DTZ kommen in verschiedenen Körperflüssigkeiten vor, so konnten sie in Urin, Galle,

Pankreassaft und Sputum nachgewiesen werden (Vogel und Kalthoff, 2001). Der Nachweis in Blut und Knochenmark hat sich aufgrund des häufigen Befalls und der leichten Zugänglichkeit bisher durchgesetzt. Deshalb kann der Fähigkeit zum Auffinden und Identifizieren von zirkulierenden Tumorzellen im Blut oder Knochenmark immer größere Bedeutung für Diagnose und Prognose beigemessen werden. Darüber hinaus kann eine Methode mit einer hohen Sensitivität hinsichtlich der Detektion von DTZ ein effizientes Werkzeug zum molekularen Tumorstaging sein, wenn die gefunden Tumorzellen entsprechend weiter untersucht werden. Es wurden hauptsächlich drei Möglichkeiten zur Detektion einzelner streuender Tumorzellen bei Patienten mit soliden Primärtumoren beschrieben (Knebel-Doeberitz und Lacroix, 1999; Pantel et al., 1999).

1) Konventionelle histopathologische Methoden wenden FärbeprozEDUREN in Kombination mit der zytologischen Beurteilung zur Identifikation von DTZ an. Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) wird in der pathologischen Routine genutzt, um Tumorzellen in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Lymphknoten zu lokalisieren. Die mikroskopische Auswertung braucht einen erfahrenen Pathologen. Die Immunhistochemie (IHC) erhöht signifikant die Sensitivität in der Detektion okkulten Lymphknotenmetastasen. Hier werden auch monoklonale AK gegen stabil exprimierte Zellstrukturen wie Zytokeratin 8 und 18 mit nachfolgender Anfärbung genutzt. Nachteile dieser Methode sind die zum Teil unspezifischen Bindungen hämatopoetischer Zellen direkt an die alkalische Phosphatase oder die Peroxidase (Zehentner, 2002).

2) Eine Alternative stellt der Nachweis tumorzellspezifischer Gentranskripte durch das Benutzen der PCR (engl.: „polymerase chain reaction“) und die RT-PCR (engl.: „reverse transkriptase polymerase chain reaction“) dar. Hierbei werden tumorzellspezifische Veränderungen der DNA und der mRNA (engl.: „messenger ribonucleic acid“) zur Detektion und Amplifikation genutzt (Pantel et al., 1999; Maitri et al. 1999). Verschiedene mRNA-Marker und Gentranskripte wurden schon evaluiert hinsichtlich ihrer Tauglichkeit zur Detektion von DTZ in Lymphknoten oder Blutproben von Patienten mit Mammakarzinom, einschließlich CK-19, CK-20, CEA, PSA, Mammoglobin 1 und 2, MUC-1 und c-myc. (Cremoux P de et al., 2000; Braun S et al., 2000; Berois N et al., 2000) und k-ras, p53 oder Tyrosinase (An et al., 2001, De Luca et al., 2002).

RT-PCR basierte Detektion von DTZ in axillären Lymphknoten zeigte in einer retrospektiven Studie klinische Signifikanz hinsichtlich ihrer unabhängigen Voraussagekraft im klinischen Ergebnis (Masuda et al., 2000). Einige Studien versuchten Sensitivität und Spezifität von verschiedenen mRNA-Markern disseminierter Brustkarzinomzellen in Lymphknoten oder

Blutproben durch Amplifikation derselben, zu erheben (Schönfeld et al., 1997; de Cremoux et al., 2000; Berois et al., 2000; Ooka et al., 2000). Leider war keiner dieser Marker sensitiv oder spezifisch genug, um in der klinischen Praxis Anwendung zu finden (Braun und Pantel 2001, Knebel Doeberitz und Lacroix, 1999; Zach et al., 1999; de Luca et al., 2000; Pantel und Otte, 2001).

Ferner ist der positive prädiktive Wert der DTZ für den Verlauf und die Behandlung der Erkrankung weiterhin unklar. Bis deshalb diese Verfahren zur Detektion DTZ Einzug in den klinischen Alltag finden, sind neben der Suche nach sensitiveren und spezifischeren Möglichkeiten strenge Qualitätskontrollen nötig.

Trotzdem zeigen große Studien, dass das Auftreten von DTZ zwar unabhängig von Lymphknotenmetastasen ist, aber ein Zusammenhang zwischen der klinischen Manifestationen durch entfernte Metastasen und dem tumorbedingten Tod des Individuums hergestellt werden konnte (Braun und Pantel, 1999; Braun et al., 2001). Jüngere Ergebnisse deuten darauf hin, dass apoptotische Zellen einen signifikanten Beitrag zur zirkulierenden Tumorzellmasse beisteuern (Mehes et al., 2001). Die Anwesenheit von DNA-Markern zeigt allerdings nicht zwangsläufig die Anwesenheit von lebensfähigen zirkulierenden Zellen an, sind aber indikativ für das Vorhandensein einer Tumorlast.

3) Ein anderer Ansatz ist die Entwicklung von monoklonalen AK gegen unterschiedliche Oberflächenproteine einzelner Karzinomzellen in Blut und Knochenmark. Die Identifikation der markierten Zellen als Tumorzellen muss dann nach pathomorphologischen Kriterien erfolgen. Die Lymphozyten und Tumorzellen werden von den Erythrozyten getrennt. Dann werden durch Markierung mit AK die verschiedenen Zellen je nach Anspruch oder Fragestellung markiert und fraktioniert.

In vielen Berichten wird die IME (engl.: „immunomagnetic enrichment“) als effiziente Prozedur zur Auffindung von DTZ eines Mammakarzinoms beschrieben (Maas et al., 1995; Garau et al., 1997; Martin et al., 1998; Racila et al., 1998; Engel et al., 1999; Krüger et al., 1999; Zhong et al., 2000; Beitsch und Clifford, 2000). Die wenigsten dieser Studien benutzten ein MACS-System (engl.: „magnetic activated cell sorting“), obwohl dies ein Verfahren mit einer recht hohen Sensitivität und Spezifität ist und ein hohes Potential besitzt für zukünftige Routineuntersuchungen zur Tumorzellanreicherung und -detektion (Martin et al., 1998; Krüger et al., 1999). Neben der positiven Tumorzellanreicherung nutzen einige Autoren auch die Leukozytendepletion mit CD45 MicroBeads (linuma et al., 2000; Bilkenroth et al., 2001; Meye et al., 2002).

Der größte Teil der Studien mit IME basiert auf einer positiven Anreicherung der

Tumorzellen, bei der paramagnetische MicroBeads mit AK gegen CK oder epithelzellosoziierte Oberflächenantigene verwendet werden. Eine andere Idee beruht darauf, dass alle Zellen (außer den Tumorzellen) charakteristische Oberflächenantigene besitzen, welche eine ebenso spezifische Depletion eben dieser Zellfraktion gestatten. So etablierten und optimierten einige Arbeitsgruppen, nebst unserer, diese Methode für die Detektion von DTZ aus peripher-venös gewonnenen Blutproben über die Ficoll-Gradienten-Zentrifugation und Leukozytendepletion (Imuna et al., 2000; Bilkenroth et al., 2001; Meye et al., 2002). Die AutoMACS Methode hat viele der nötigen Präparationsschritte automatisiert. Lag die Sensitivität der Nachweismethoden 1998 (Cote et al., 1998) noch bei der Detektion einer Tumorzelle in  $0,5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^5$  hämatopoetischen Zellen, so kann heute eine Tumorzelle in  $10^6$  bis  $10^7$  hämatopoetischen Zellen detektiert werden (Bockmann, 2001).

Der Nachweis von DTZ stellt viele Probleme dar, wie Artefakte bei der ICC (Immunocytochemie) der isolierten Tumorzellen, die illegitime Transkription der respektiven Marker oder der Expression von Pseudogenen. Beispielsweise können falsch exprimierte CK-18 und CK-19 insbesondere bei der Single-Marker RT-PCR als ursächlich für falsch positive Ergebnisse angeschuldigt werden (Borgen et al., 1998; Hu und Chow, 2000).

Da mit diesen Verfahren leistungsfähige Methoden zur Detektion von DTZ im Blutkreislauf zur Verfügung stehen, sollten weiterführende Studien diese Verfahren nutzen, um deren Leistungsfähigkeit unter klinischen Bedingungen zu testen und deren Anwendbarkeit im klinischen Alltag zu etablieren. Mittelfristig könnte so ein einfaches Screeningverfahren sowohl zur verbesserten Frühdiagnostik bei Karzinompatienten als auch zur Beurteilung von Krankheitsverlauf und Therapieerfolg zur Verfügung stehen. Dies würde die Möglichkeiten für klinische Diagnostik und Therapie bei onkologischen Patienten um einen Schritt erweitern.

## 2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, DTZ aus dem peripheren Blut bei Patientinnen mit klinisch bekannten Mammakarzinom mit einer zum Zeitpunkt der Datenerhebung neuen Methode (AutoMACS) zu finden, und deren Detektionrate hinsichtlich verschiedener klinisch und pathologisch charakterisierender Parameter wie TumorgroÙe, Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad, dem Vorhandensein von Fernmetastasen oder dem Zeitpunkt und der Art der Therapieverfahren zu prüfen.

Ein wesentlicher Anspruch der Arbeit ist es, einen Schritt in der Erkenntnis zur klinischen Bedeutung der DTZ zu gehen, um mittelfristig mit deren Nachweis ein zusätzliches Kriterium zur Früherkennung, dem Verlauf oder notwendigen Therapieentscheidungen von Mammakarzinomerkkrankungen zu gewinnen.

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Schritte durchgeführt werden:

- A) Prospektive Untersuchung von Blutproben von Patientinnen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom mit einem etablierten artifiziellen System zur Tumorzellanreicherung (AutoMACS)
  
- B) Vergleich des AutoMACS-System mit dem VarioMACS-System

### 3 Materialien

#### 3.1 Zellreihen

Die verwandten Zellreihen sind in der Abteilung Zell- und Gewebezüchtung des Institutes für Pathologie der Universität Halle Wittenberg kultiviert (Kap. 4.2) und für Untersuchungen zur Leistungsüberprüfung und Optimierung der MACS-Versuche eingesetzt worden.

#### 3.2 Patientengut und Blutproben

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Gynäkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurden von 83 Patientinnen, mit klinisch gesicherten Mammakarzinomen, insgesamt 125 Blutproben gesammelt und einheitlich untersucht. Es wurde jeweils Tumorgewebe exstirpiert, an welchem die histologische Diagnose gestellt und die Hormonrezeptorbestimmung durchgeführt wurde (Kap. 4.10).

Die Blutproben wurden peripher-venös in 2x8ml fassenden Monovetten gewonnen und bis zur Untersuchung maximal 5 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Für die Negativkontrolle und die Positivkontrolle wurden je 15 Blutproben von freiwilligen Probanden ohne bekannte Malignome untersucht oder mit Zellen der MCF-7 Zellreihe versetzt.

Anlehnend an eine frühere Studie in unserem Labor wurden, um Kontaminationen zu vermeiden, die Positivkontrollen streng getrennt von den Patientenproben bearbeitet (Bilkenroth et al., 2001; Meye et al., 2002). Es wurden keine klinischen Entscheidungen in Abhängigkeit dieser Experimente getroffen. Die Verschlüsselung der Proben und die Anonymisierung der klinischen Daten erfolgte in Abhängigkeit ihres chronologischen Einganges. Alle angefertigten Zytospinpräparate wurden nach eigener Sichtung von OA Dr.med. U. Bilkenroth, Facharzt für Pathologie, nachbegutachtet. Den Tabellen in Kapitel 5.2 können die Daten der Mammakarzinompatienten entnommen werden.

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Firma
MCF-7	Mammakarzinom	ATCC, Rockville, Maryland/USA

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien für die Verdünnungsexperimente

### 3.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Firma
APAAP – Kit	Dako, Hamburg
Biocoll Separating Solution	Biochrom KG, Berlin
BSA (engl.: „bovine serum albumin“)	Promega, Heidelberg
CD45 Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
D – Glucose	Serva, Heidelberg
DAPI	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (96% reinst)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Freiburg
FKS (Fötale Kälberserum)	Promega, Heidelberg
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Serva, Heidelberg
Natriumpyruvat	Bio-Whittaker, Verviers, Belgien
Phenol	Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin Mixtur (10.000 units penicillin/ 10.000 $\mu\text{g}$ Streptomycin/ml)	Bio-Whittaker, Verviers, Belgien
RPMI-1640 – Pulver	Bio-Whittaker, Verviers, Belgien
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Serva, Heidelberg
Tris (hydroxymethyl) aminomethan-HCl	Serva, Heidelberg
Trypsin	Serva, Heidelberg
Zellkulturmedium RPMI-1640 (mit 25mM HEPES, L-Glutamin)	Bio-Whittaker, Verviers, Belgien

### 3.4 Kits und AK

Bezeichnung	Firma
Carcinoma Cell Enrichment and Detection Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD45-Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Kaninchen-Anti-Maus Immunglobin G	Dako, Hamburg
Primär-AK ER/PR	Dako, Hamburg
CK 8/18	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

### 3.5 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Bestandteile	Menge
Hämalaun  (in 2,5 l Aqua bidest.)	Hämatoxylin	2,50 g
	KJO <sub>3</sub> oder NaJO <sub>3</sub>	500 mg
	Kalialaun	125 g
	Chloralhydrat	125 g
	Zitronensäure	2,50 g
PBS (engl.: „phosphate buffered saline“)	NaCl	8,00 g
	KCl	0,20 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
PBS zur Zellzucht	NaCl	8,00 g
	KCl	0,40 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g
	D-Glucose	1,00 g
RPMI	RPMI-1640-Pulver	16,4 g
	FKS	8-10%
Trypsin - Lösung	EDTA	0,20 g
	Trypsin	0,50 g

Puffer und Lösungen	Bestandteile	Menge
Zellkulturmedium	RPMI-1640-Medium	0,50 l
	Penicillin-	
	Streptomycin-Mixtur	10 ml
	FKS	80 ml
	Na-Pyruvat	5 ml

### 3.6 Geräte

Geräte	Firma
AutoMACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Olympus BX 40, Japan
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Universalzentrifuge 30 RF	Hettich, Tuttingen
Vortex-Schüttler VF 2	IKA-Labortechnik, Stauffen

### 3.7 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
10 ml Röhrchen	Greiner, Nürtingen
50 ml Röhrchen	Greiner, Nürtingen
8 ml EDTA Monovetten	Sarstedt, Nürnberg
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Laminarbox	Flow Laboratories, Meckenheim
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Reaktionsgefäße 0,2ml / 0,5ml / 1,5ml / 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Säulen für AutoMACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen

## 4 Methoden

### 4.1 Blutprobengewinnung

Das für die Negativkontrolle, die Positivkontrolle und die Testreihen zur Verifizierung des VarioMACS und des AutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) benötigte Blut wurde peripher-venös von freiwilligen Spendern ohne bekannte maligne Tumorerkrankung, um eine Gerinnung zu verhindern, in 2x8 ml EDTA-Monovetten gewonnen und bei 4°C für maximal 5 Stunden gelagert, danach wie in Punkt 4.3 beschrieben, bearbeitet.

### 4.2 Zellkultivierung und Zellgewinnung

Die Zellen der Zellreihen Caki-1 und MCF-7 wurden in herkömmlichen 25 cm<sup>2</sup> fassenden Zellkulturflaschen kultiviert, vermehrt und nach Konfluenz regelmäßig passagiert, wobei das bei uns hergestellte Zellzuchtmedium als Nähr- und Kulturmedium zum Tragen kam. Für unsere Untersuchungen wurde die erste Zellpassage verwendet.

Sowohl zur Zellgewinnung für Experimente als auch zum Umsiedeln nach Zellvermehrung für optimale Wuchsbedingungen wurden die Zellen wie folgt behandelt:

- Waschen mit 3ml PBS in den Kulturflaschen
- Lösen vom Flaschenboden mit 3 ml Trypsin-Puffer
- In 4 ml RPMI-Lösung aufnehmen, um eine Schädigung der Zellen durch die Trypsinreaktion zu vermeiden
- 10-minütige Zentrifugation der Zellsuspension bei 1000 U/min und Raumtemperatur
- Vorsichtiges Absaugen des Überstandes
- Das Zellpellet entweder in Zellkulturmedium zur weiteren Kultivierung oder in PBS-Puffer zur weiteren Verwendung aufnehmen
- Anschliessende Zählung in einer Neubauer-Zählkammer (Kap. 4.3)

### 4.3 Zellzählung

Um standardisierte Bedingungen bei der Durchführung der Verdünnungsexperimente zu gewährleisten, wurden die eingestreuten und detektierten MCF-7-Zellen mit Hilfe einer

Neubauer-Zählkammer gezählt, die dabei mit ca. 20 µl der bei der Zellgewinnung erhaltenen Zellsuspension befüllt wurde. Dies geschieht durch Ansetzen der Pipettenspitze an der Kante der Zählkammer, wobei die Suspension durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Kammer gesaugt wird. Vorher ist darauf zu achten, dass „Newtonringe“ nach dem Auflegen des Deckglases auf der Kammer erscheinen. Sie zeigen an, dass die Tiefe der Kammer richtig eingestellt ist (0,1mm). Das Hämozytometer kann nun unter das Mikroskop gelegt werden, welches so eingestellt wird, dass die Einteilungslinien der Kammer sichtbar werden. Anschließend werden vier der großen Quadrate der Neubauer-Kammer ausgezählt.

Die genaue Zellzahl kann dann folgendermaßen berechnet werden:

$$\begin{aligned} \Sigma \text{ Zellzahl aller Quadrate} / 4 &= \text{Mittelwert der Zellzahl/Quadrat} \\ \text{Mittelwert der Zellzahl eines Quadrates} \times 10^4 &= \text{Zellen/ml} \\ \text{Zellen/ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} &= \text{Gesamtzellzahl} \end{aligned}$$

#### 4.4 Zeit- und Konzentrationsexperiment

Zur möglichen Optimierung der Detektionsraten des AutoMACS wurden weiterführende Experimente durchgeführt. Es wurde Blut aus einer peripheren Venen gesunder und freiwilliger Spender entnommen und nach dem in Kap. 4.5 beschriebenen Protokoll präpariert. In die entnommene Interphase mit den enthaltenen MNC (engl.: „mononuclear cells“) werden MCF-7-Zellen suspendiert, welche aus den Zellkulturflaschen gewonnen und abgezählt wurden (Kap. 4.2 und 4.3). Diesem Zellgemisch wurde dann CD45-MicroBeads in verschiedenen Konzentrationen und varianten Inkubationszeiten hinzugegeben und nach Kap 4.5, 4.7 und 4.8 weiter bearbeitet. Die detektierten MCF-7-Zellen wurden dann gezählt und ausgewertet.

#### 4.5 Ficoll-dichtegradientenzentrifugation

Die Ficoll-dichtegradientenzentrifugation ist ein Verfahren bei dem die Blutprobe über das Ficoll geschichtet wird. Dieses wirkt während der Zentrifugation wie ein Filter, der je nach Dichte der einzelnen Blutanteile für diese weniger oder mehr durchlässig ist. Bei unten beschriebenem Protokoll bleiben so die MNC in der Interphase auf dem Ficoll zurück. Die

Blutproben der gesunden Spender wurden zur Negativkontrolle so belassen, zur Positivkontrolle mit vorbereiteten Zellen der Zellreihen Caki-1 oder MCF-7 verschiedener Konzentrationen versetzt. Im Anschluss daran wurden alle Proben, auch die der Patienten, nach folgendem Protokoll behandelt:

- Blut aus EDTA-Monovetten in 50ml Zentrifugationsröhrchen überführen
- Auffüllen auf 25ml mit eiskaltem PBS-Puffer
- 25ml Ficoll in ein weiteres 50ml Zentrifugationsröhrchen füllen
- Blut mit eiskaltem BPS-Puffer sehr vorsichtig mit Pipette aufschichten
- Zentrifugation ohne Bremse für 20 min bei 20°C mit 2000 U/min
- Vorsichtiges Abpipettieren der Interphase mit den mononukleären Zellen
- Aufnahme der Interphase in ein mit 50ml PBS-Puffer gefüllten 50ml Zentrifugationsröhrchen
- Erneute Zentrifugation mit Bremse für 20 min bei 20°C mit 2000 U/min
- Entfernen und Verwerfen des Überstandes
- Aufnahme des Zellpellet in 1 ml PBS-Puffer
- Zellen zählen in Neubauer-Kammer (nur bei Verdünnungsversuchen Kap. 4.3 und 4.4)
- Erneute Zentrifugation für 10 min bei 20°C und 2000 U/min
- Entfernen und Verwerfen des Überstandes
- Aufnehmen des Pellet in 60µl PBS-Puffer lagern bei 4°C



Abbildung 4: Probenbearbeitung I

*Ficoll mit Blutproben nach der Dichtezentrifugation in 50ml-Zentrifugationsröhrchen (weisse Interphase mit mononukleärer Zellfraktion)*

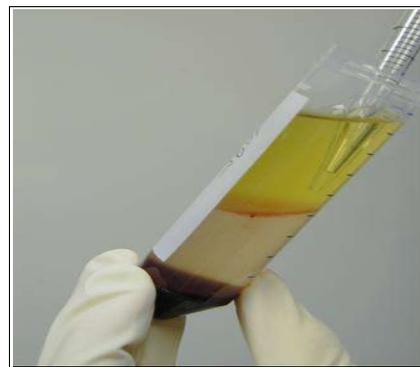


Abbildung 5: Probenbearbeitung II

*Probe nach Zentrifugation mit vorsichtigem Abpipettieren der Interphase*

## 4.6 Markierung der Leukozyten mit CD45-MicroBeads

- die 60µl Zellsuspension mit 40 µl MicroBeads CD45 vorsichtig mischen und bei 4°C für 15min inkubieren
- Abstoppen der Reaktion mit 400µl PBS-Puffer
- Zentrifugation für 10min bei 6°C und 2000 U/min
- Absaugen und Verwerfen des Überstandes
- Aufnahme des Zellpellet in 60µl PBS-Puffer

## 4.7 Zellseparation mit AutoMACS

AutoMACS ist eine Weiterentwicklung des VarioMACS der Firma Miltenyi Biotec in Bergisch Gladbach. Kurz gesagt wird eine Zellsuspension, in welcher sich eine beliebige Teilmenge mit MicroBeads markierter Zellen befindet, langsam und mit kleinem Volumen über eine mit Eisenspänen gefüllte Säule durch ein elektromagnetisches Feld geführt. Dies macht es möglich die magnetisch markierte von der unmarkierten Fraktion zu trennen und somit letztendlich eine hohe Aufreinigung der interessierenden Zellfraktion zu bekommen, so dass darauf folgende Versuche oder Untersuchungen wie z.B. immunhistochemische Färbeverfahren erst möglich gemacht werden können.

- Vorbereitetes Suspensat (Kap. 4.5/4.6) in die dafür vorgesehene Sonde geben
- Separation am AutoMACS mit dem Deplete S – Programm
- Nachspülen mit PBS-Puffer
- Auffangen der magnetisch positiven Zellfraktion in einem vorbereiteten Objektträger mit Zytospinhalterung
- Zytospinzentrifugation für 5min bei 1650 U/min
- Lagerung der Präparate bei 4°C bis zur immunzytochemischen Färbung

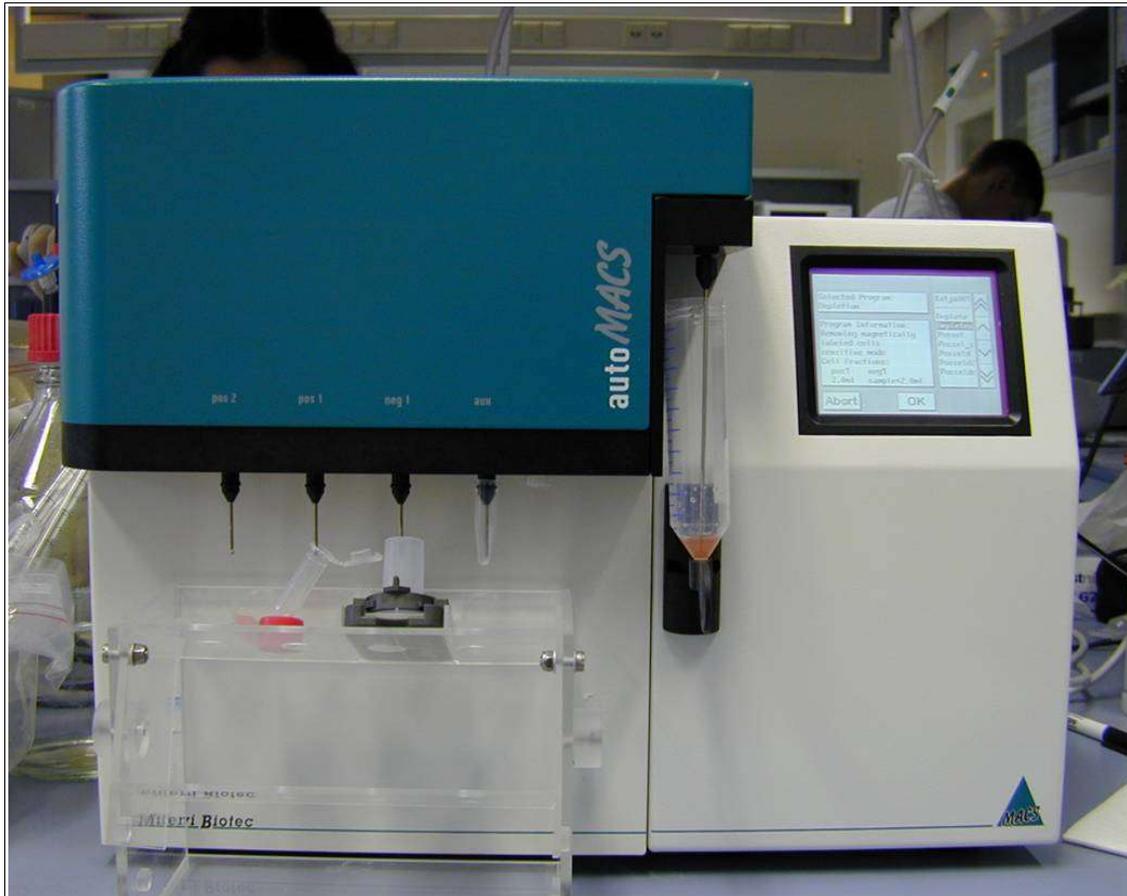


Abbildung 6: AutoMACS

Mit Einsaugvorrichtung, Cytospinobjektträger und Eppendorfgefäß zur getrennten Aufnahme der immunologisch markierten und unmarkierten Fraktionen.

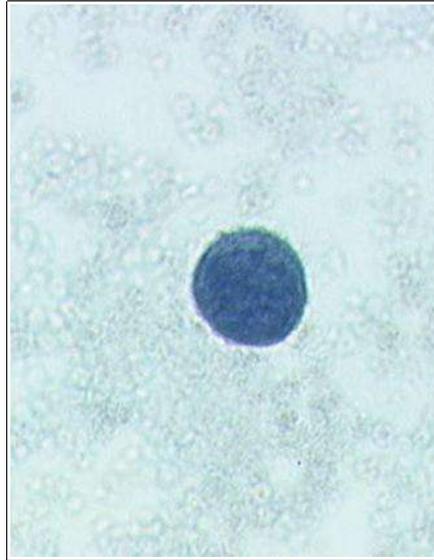
## 4.8 Immunzytochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung wurde mittels der indirekten Nachweismethode durchgeführt. Hierbei kommt es zur Bindung eines unkonjugierten AKs an das Antigen im Präparat. Bei der verwendeten APAAP – Methode kam ein Enzym-Anti-Enzymkomplex zum Einsatz. Als Enzym wurde die alkalische Phosphatase eingesetzt. Die Katalysatorwirkung von Enzymen wurde ausgenutzt, um die AK-Bindung an spezifische Antigene nachzuweisen. Alkalische Phosphatase hydrolysiert Naphtolphosphatester zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole koppeln mit farblosen Diazoniumsalzen und bilden so unlösliche Azofarbstoffe. Es wurde hier New Fuchsin verwendet, welches ein rotes Reaktionsprodukt liefert. Die entstehende Farbe ist nicht in Alkohol oder anderen organischen Lösungsmitteln lösbar (Storjohann et al., 1998).

- Objektträger mindestens 24h im Kühlschrank lufttrocknen und mit einem Diamantstift das mikroskopisch sichtbare Zellgebiet umranden
- Umrandete Gebiet für 3 min mit 3%-igen Formalin fixieren
- Anschließend mit 10 mM Tris-HCl-Puffer für 6-7min spülen
- Aufbringen der Primär-AK (CK 8/18 1:50 mit RPMI verdünnt)
- 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Danach 3 mal für je 5 min mit Tris-HCl-Puffer spülen
- Sekundär-AK aufbringen (Kaninchen-Anti-Mausimmunoglobuline 1:200 mit RPMI verdünnt)
- 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Objektträger 3 mal für je 5 min mit Tris-HCl-Puffer spülen
- APAAP-Komplex aufbringen und 60 min bei Raumtemperatur inkubieren (1:100 mit RPMI verdünnt)
- Mit PBS spülen
- Färben mit New Fuchsin Substrate System und für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Spülen mit Tris-HCl-Puffer Gegenfärben des Objektträgers für 1 min mit Hämalaun-Lösung
- Spülen mit Wasser
- Zellgebiet mit flüssiger Glycerin-Gelatine und Deckgläschen eindecken

#### 4.9 Auswertung der Präparate

Die mikroskopische Auswertung der immunzytochemisch gefärbten Präparate und die damit verbundene Zählung der sicheren und fraglichen DTZ wurde freundlicherweise nach eigener Sichtung durch den Pathologen Dr. U. Bilkenroth des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Kriterien für die Bewertung waren dabei das Kern-Zytoplasma-Verhältnis, das Auftreten von Nukleolen, die Nukleolenvergrößerung, die Kernpolychromasie und das Zytokeratinexpressionsmuster (Tab. 2).



*Abbildung 7: DTZ*

*Beispiel einer DTZ von einer Patientin  
mit histologisch gesicherten  
Mammakarzinom*

#### **4.10 Estrogen- und Progesteronrezeptorbestimmung**

Von allen untersuchten Patientinnen wurden Paraffinschnitte des exstirpierten Gewebes zur immunhistochemischen Bestimmung der Estrogen- und Progesteronrezeptoren angefertigt. Die histologische Diagnose und der Rezeptorstatus des jeweiligen Präparates wurde im Rahmen der Routinediagnostik bestimmt und für diese Arbeit den jeweiligen Befunden entnommen. Zur Beurteilung der Präparate wurde ein bewährtes, semiquantitatives Bewertungsverfahren (Remmele W et al., 1987) herangezogen, welches die Färbeintensität und den Prozentsatz positiv gefärbter Zellen beschreibt. Das Produkt der vergebenen Punkte wird im so genannten Remmele Score zusammengefasst, wobei der Schwellenwert des von 0 bis 12 reichenden immunreaktiven Scores bei 3 liegt.

## 5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden nach einigen methodischen Experimenten mit Verdünnungsreihen, welche zur Verifikation der in der Literatur beschriebenen und vom Hersteller angegebenen Leistungsfähigkeit des AutoMACS im Vergleich zum VarioMACS dienen sollten, durchgeführt.

Im Anschluß daran wurden sowohl Blutproben von Patientinnen mit histologisch gesicherten Mammakarzinomen abgenommen und nach oben beschriebenen Protokollen bearbeitet, so dass eine Aufreinigung der Blutproben zum Zweck der Entfernung der Zellfraktionen, die nicht im Zentrum des Interesses standen, sowohl bessere Wiederfindungsraten als auch eine bessere Beurteilbarkeit der DTZ möglich machten. Weiterhin wurden die bearbeiteten Proben auf Zytospinobjekträger zentrifugiert, immunzytochemisch gefärbt und bezüglich des Vorhandenseins von DTZ begutachtet.

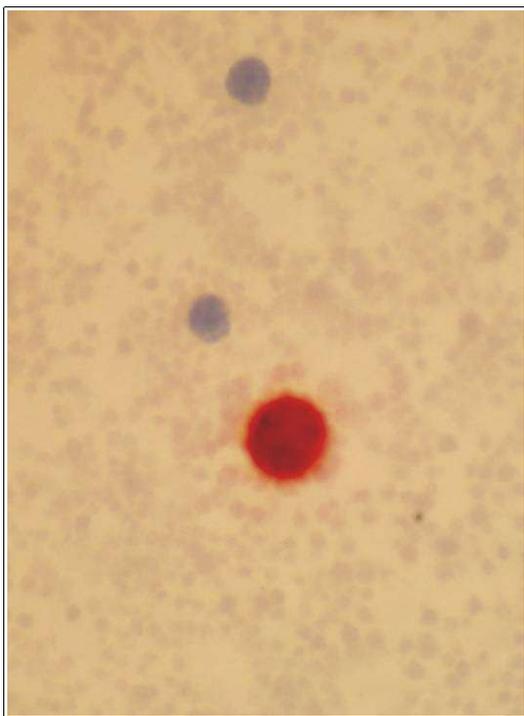


Abbildung 8: CK<sup>+</sup> DTZ

*Beispiel einer CK<sup>+</sup> DTZ im peripheren Blut bei bekanntem Mammakarzinom*

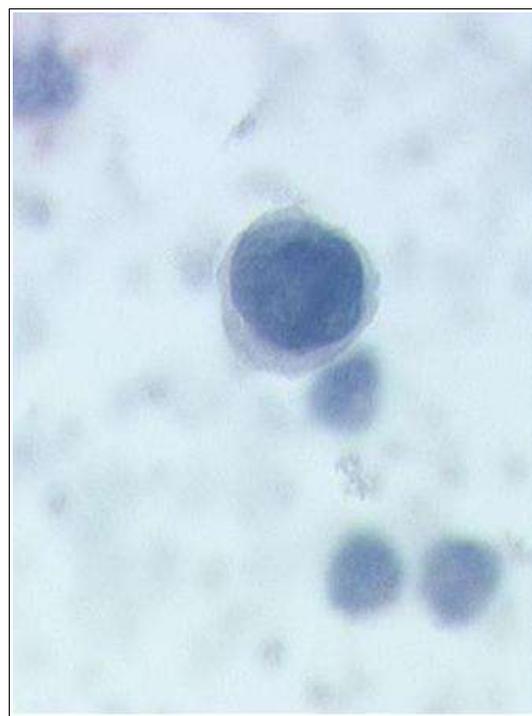


Abbildung 9: CK<sup>-</sup> DTZ

*Beispiel einer CK<sup>-</sup> DTZ im peripheren Blut bei bekanntem Mammakarzinom*

Insgesamt wurden 125 Blutproben von 83 Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht. Im Untersuchungszeitraum, basierend auf der TNM-Klassifikation (Wittekind, 1997) für Mammakarzinome befanden sich 49 Tumoren (59%) in einem T1-Stadium, 30 Tumoren (36%) in einem T2-Stadium und je 2 Tumoren in einem T3 und T4-Stadium.

## 5.1 Weiterführende Testreihen zur Optimierung des AutoMACS

Insgesamt wurde für den AutoMACS das Protokoll zur Abreicherung und Wiederfindung der DTZ, welches im Labor des Institutes für Pathologie der MLU-Halle zunächst für den VarioMACS etabliert und modifiziert wurde (Bilkenroth et al., 2001), übernommen.

Ausserdem konnten verschiedene Verdünnungsexperimente durchgeführt werden, bei denen in Blutproben gesunder Spender Tumorzellen aus Zelllinien verschiedener Konzentrationen eingestreut wurden. Die Wiederfindungsraten lagen je nach Testreihe zwischen 70% und 100% (Meye et al., 2002; Bilkenroth et al., 2001).

Weiterhin wurden Experimente durchgeführt, welche in beschränktem Umfang die Konzentration der MicroBeads und die Inkubationszeit testen sollten, um gegebenenfalls eine Optimierung der Laborprotokolle zu erreichen. Es wurden je 10.000 MCF-7-Zellen in die MNC-Fraktion des vorbereiteten Blutes gesunder Spender gegeben und diese Proben nach den in Kap. 4 dargestellten Methoden bearbeitet. Hierbei konnten folgende Ergebnisse gezeigt werden:

Inkubationszeit t in min.	Detektionsrate bei 40µl MicroBeads	Detektionsraten bei 80µl Microbeads
10	75,8%	66,2%
15	74,4%	72,4%
20	73,0%	81,1%
25	58,6%	62,4%
60	n.b.	54,2%

Tabelle 9: Darstellung der Detektionsraten in Abhängigkeit von Inkubationszeit und MicroBead-Konzentration. Legende: n.b. (nicht bestimmt)

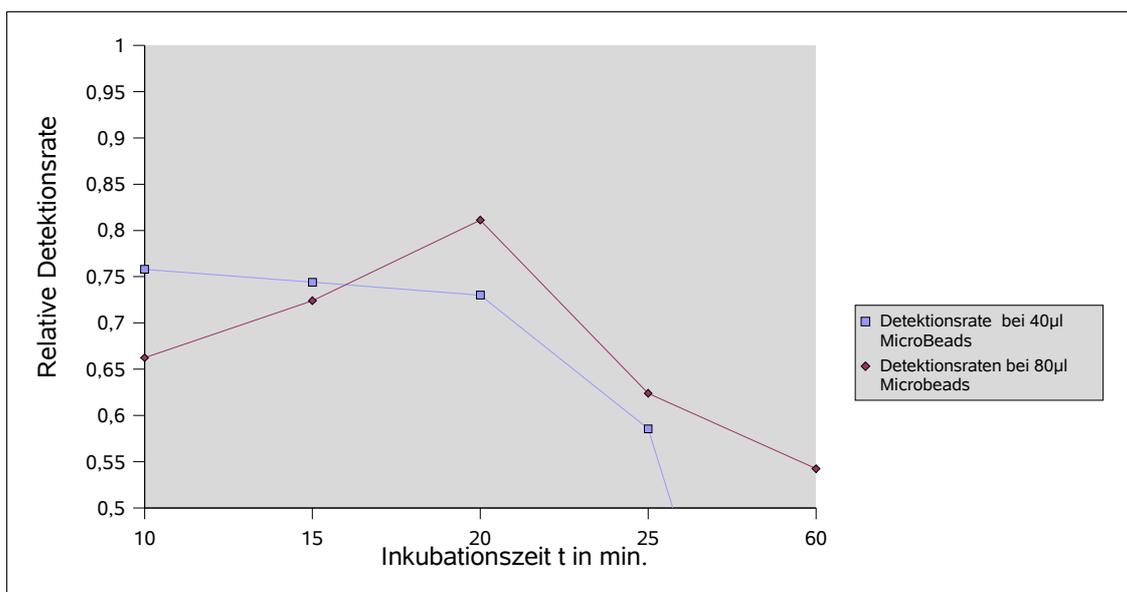


Abbildung 10: Detektionsraten in Abhängigkeit von Inkubationszeit und MicroBeads-Konzentration

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass trotz ähnlicher Detektionsraten ein Maximum bei einer Inkubationszeit von 20 min mit 80µl MicroBeads möglich ist. Dies wurde in weiterführenden Untersuchungen mit umfangreicheren Tests bestätigt (Bilkenroth et al., 2001). Wegen der vergleichbaren Ergebnisse wurden aus ökonomischen Gründen die 40µg Variante verwendet.

## 5.2 Detektion von DTZ in den Patientenproben

Insgesamt wurden 125 Blutproben von 83 Patientinnen mit bekannten malignem Mammakarzinom untersucht. Die Mehrfachpräparate kommen durch den Umstand zustande, dass bei einigen Patienten die Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie, prä-postoperativ und zum Zeitpunkt der Chemotherapie, gewonnen werden konnten. Die Patientinnen waren zwischen 32 und 90 Jahre alt und allesamt Patienten der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Alle Patientenproben wurden histopathologisch begutachtet und nach dem TNM-System nach Tumorgroße, Lymphknotenbefall und dem Vorhandensein von Fernmetastasen klassifiziert. Die Probenentnahmen und -untersuchungen fanden in einem Zeitraum von 8 Wochen im April und Mai 2001 statt. Einen Überblick über die Verteilung der Tumorklassifikationen (Tab. 10) und über die Daten der 29 Patientinnen bei denen DTZ

nachgewiesen werden konnten (Tab.11), geben nachfolgende Übersichten.

Parameter		CK+ (%)	CK- (%)	Summe
Probenanzahl		33 (26)	92 (74)	125
Patientenzahl		29 (35)	54 (65)	83
Alter (Intervall)		61 (38-81)	59 (32-90)	60
Tumorgröße	T1	14 (29)	35 (71)	49
	T2	13 (43)	17 (57)	30
	T3	2 (100)	0	2
	T4	0	2 (100)	2
Lymphknotenstatus	N0	13 (25)	40 (75)	53
	N1	15 (54)	13 (26)	28
	Nx	1 (50)	1 (50)	3
Metastasen	M0	20 (30)	47 (70)	67
	M1	9 (75)	3 (25)	12
	Mx	0	4 (100)	4
Differenzierung	G1	1 (17)	5 (83)	6
	G2	14 (32)	30 (68)	44
	G3	14 (42)	19 (58)	33
Estrogenstatus	ER+	17 (35)	31 (65)	48
	ER-	11 (41)	16 (59)	27
	ER n.d.	2 (25)	6 (75)	8
Progesteronstatus	PR+	18 (38)	30 (62)	48
	PR-	9 (33)	18 (67)	27
	PR n.d.	2 (25)	6 (75)	8
ER/PR Status	ER+/PR+	15 (36)	27 (64)	42
	ER+/PR- oder ER-/PR+	4 (33)	8 (66)	12
	ER-/PR-	8 (38)	13 (62)	21
	ER/PR n.d.	0	5 (100)	5
Therapiestadium	präoperativ	14 (25)	42 (75)	56
	postoperativ	6 (17)	29 (83)	35
	Chemotherapie	13 (38)	21 (62)	34

Tabelle 10: Daten der Mammakarzinompatienten bzw. deren Proben.

Patient	Alter	pT	pN	pM	G	ER	PR	Therapie-stadium	Anzahl DTZ
Mca 2	65	pT1	N0	M0	G3	-	-	prä/post/CT	0/0/8
Mca 3	57	pT1	N1	M1	G2	+	+	prä/post/CT	0/2/0
Mca 6	76	pT1	N0	M0	G2	+	+	prä/post	2/0
Mca 7	66	pT1	N0	M0	G1	+	+	prä/post/CT	1/0/0
Mca 9	47	pT1	N0	M0	G3	n.d.	n.d.	prä/post/CT	0/0/3
Mca 10	71	pT1	N1	M1	G2	n.d.	n.d.	prä/post	4/50
Mca 11	38	pT1	N1	M0	G3	n.d.	n.d.	prä/post/CT	0/0/9
Mca 12	81	pT3	N1	M0	G3	n.d.	n.d.	prä/CT	0/7
Mca 14	42	pT1	N1	M0	G3	+	+	prä/post/CT	0/0/2
Mca 15	63	pT1	N1	M0	G2	+	+	post/CT	9/2
Mca 21	59	pT1	N1	M0	G2	+	+	prä/post/CT	4/0/0
Mca 22	71	pT2	N0	M1	G2	-	-	prä/CT	1/0
Mca 25	80	pT2	N0	M0	G2	+	+	prä/post	4/4
Mca 28	59	pT2	N0	M0	G2	+	+	prä/post/CT	1/0/0
Mca 34	56	pT2	N0	M0	G3	-	-	prä/post	12/0
Mca 42	69	pT2	N0	M0	G2	+	+	post/CT	0/7
Mca 45	59	pT2	N1	M1	G3	-	+	prä	7
Mca 49	39	pT2	N1	M1	G3	n.d.	n.d.	prä	36
Mca 50	48	pT2	N0	M0	G2	n.d.	n.d.	post	8
Mca 51	46	pT1	N0	M0	G3	-	-	CT	2
Mca 52	50	pT2	N1	M1	G3	-	-	CT	2
Mca 53	61	pT2	N1	M0	G2	-	+	CT	2
Mca 56	51	pT2	N1	M1	G2	-	-	prä	7
Mca 60	66	pT1	Nx	M0	G2	n.d.	n.d.	prä/post	0/6
Mca 62	77	pT2	N0	M0	G3	+	+	prä/prä	2/6
Mca 65	62	pT2	N1	M0	G2	+	+	CT	4
Mca 66	50	pT1	N1	M0	G3	+	+	CT	2
Mca 67	54	pT3	N1	M1	G3	+	+	prä	7
Mca 69	58	pT2	Nx	M1	G2	n.d.	n.d.	prä	34
Mca 73	73	pT2	N0	M0	G3	-	-	prä	5

Tabelle 11: Übersicht der Patientinnen mit nachgewiesenen DTZ

Insgesamt konnten DTZ bei 33 von 125 (26%) der Blutproben und bei 29 von 83 (35%) der Patienten nachgewiesen werden, während dies bei 92 Blutproben bzw. 54 Patienten nicht gelang (Abb. 11). In jeder positiven Blutprobe ließen sich zwischen 1 und 50 DTZ finden (Median = 8). Es konnten somit bis zu drei DTZ je Milliliter Blutprobe nachgewiesen werden.

	Anzahl (n) der Proben mit DTZ (CK <sup>+</sup> )	Anzahl (n) der Proben ohne DTZ (CK <sup>-</sup> )	Summe (n) der Proben
Anzahl der Patienten	29	54	83
Anzahl der Proben	33	92	125

Tabelle 12: Übersicht der Patienten und Probenanzahl mit dem Anteil an DTZ

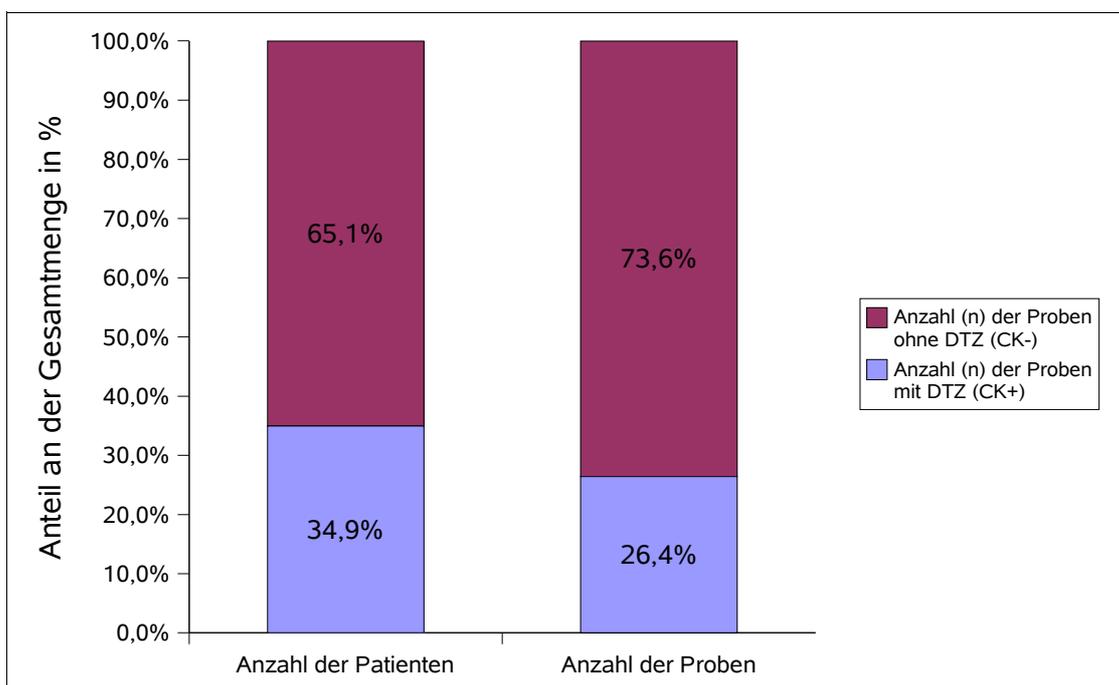


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Gesamtpopulation und der Anteil an DTZ

### 5.3 Detektionsraten in Abhängigkeit vom Therapiestadium

Von den 125 untersuchten Proben wurden 56 Proben präoperativ, 35 postoperativ, wobei in dieser Studie nicht zwischen den einzelnen Operationsarten bzw. Techniken unterschieden wird, und 34 Proben von Patientinnen in einem Stadium der chemotherapeutischen Intervention untersucht. Auch bei den mit Chemotherapeutika behandelten Patientinnen wird hier nicht zwischen den einzelnen Medikamenten oder therapeutischen Ansätzen wie adjuvant oder neoadjuvant unterschieden.

Es konnten in insgesamt 14 der 56 (25%) Proben von Patientinnen, die sich in einem frühen bzw. aus klinischen Gründen präoperativen Stadium befanden, untersucht und als positiv im Sinne von gefundenen DTZ definiert werden.

In den Proben des postoperativ entnommen Blutes waren 6 von 35 (17%) Proben CK<sup>+</sup>. Von den 34 Proben der Patientinnen, welche sich in einem konservativem, also hier chemotherapeutischen Stadium befanden waren, konnten wir noch 13 (38%) CK<sup>+</sup> Proben finden. Eine statistische Überprüfung der Ergebnisse, insbesondere mit Augenmerk auf den Vergleich der prä- und postoperativen Gruppen, ließen keine eindeutig signifikante Aussage zu.

	Anzahl (n) der Proben mit DTZ (CK <sup>+</sup> )	Anzahl (n) der Proben ohne DTZ (CK <sup>-</sup> )	Summe (n) der Proben
Präoperativ	14	42	56
Postoperativ	6	29	35
Chemotherapie	13	21	34

*Tabelle 13: Übersicht der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Therapiestadium*

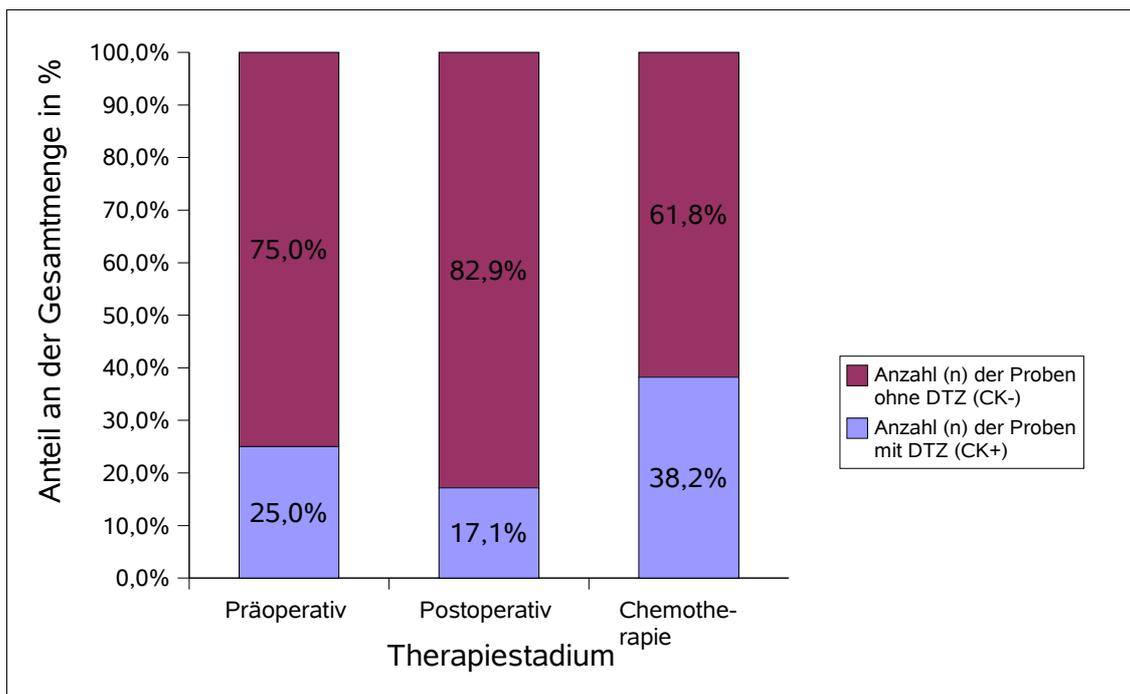


Abbildung 12: Darstellung der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Therapiestadium

#### 5.4 Detektionsraten in Abhängigkeit von der Primärtumorgröße

Nach der immunomagnetischen Depletion und damit Abreicherung der Proben und ihrer ICC-Färbung konnten insgesamt 83 Präparate, bei denen eine pathologische Einordnung bezüglich der Tumorgröße nach dem TNM-Stadium möglich war, beurteilt werden.

In 29 (35%) dieser Proben konnten CK<sup>+</sup>-Zellen identifiziert werden, wobei in der Betrachtung der einzelnen Stadien T1-T4 folgende Beobachtungen möglich waren.

14 der 49 (29%) untersuchten Patientenproben in einem relativ frühen Stadium (T1) des diagnostizierten Mammakarzinomes konnten hinsichtlich des Färbeverhaltens und der mikroskopischen Beurteilung als positiv bestimmt werden. In den fortgeschritteneren Stadien bezüglich der Tumorgröße zeigten sich steigende Wiederfindungsraten von CK<sup>+</sup>-Zellen. In 13 (43%) der 30 Proben von Patientinnen mit Mammakarzinom im Stadium T2 konnten wir DTZ finden. Leider konnten nur zwei Proben von Patientinnen im Tumorstadium T3 akquiriert werden, allerdings waren beide CK<sup>+</sup>.

Bei den 2 Proben der Patientinnen im Mammakarzinomstadium T4 konnte keine Probe als positiv bewertet werden.

Eine statistische Betrachtung eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Anzahl der gefundenen CK<sup>+</sup>-Proben und der Tumorgröße, zeigte insbesondere in den zahlenmäßig

starken T1 und T2 Patientengruppen eine deskriptiv und tendenziell zu beobachtende Steigerung der Detektionsraten, die sich statistisch aber nicht verifizieren ließ.

Stadium	Anzahl der Präparate mit DTZ (CK <sup>+</sup> )	Anzahl der Präparate ohne DTZ (CK <sup>-</sup> )	Summe der Proben
T1	14	35	49
T2	13	17	30
T3	2	0	2
T4	0	2	2

Tabelle 14: Übersicht der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit von der Primärtumorgröße

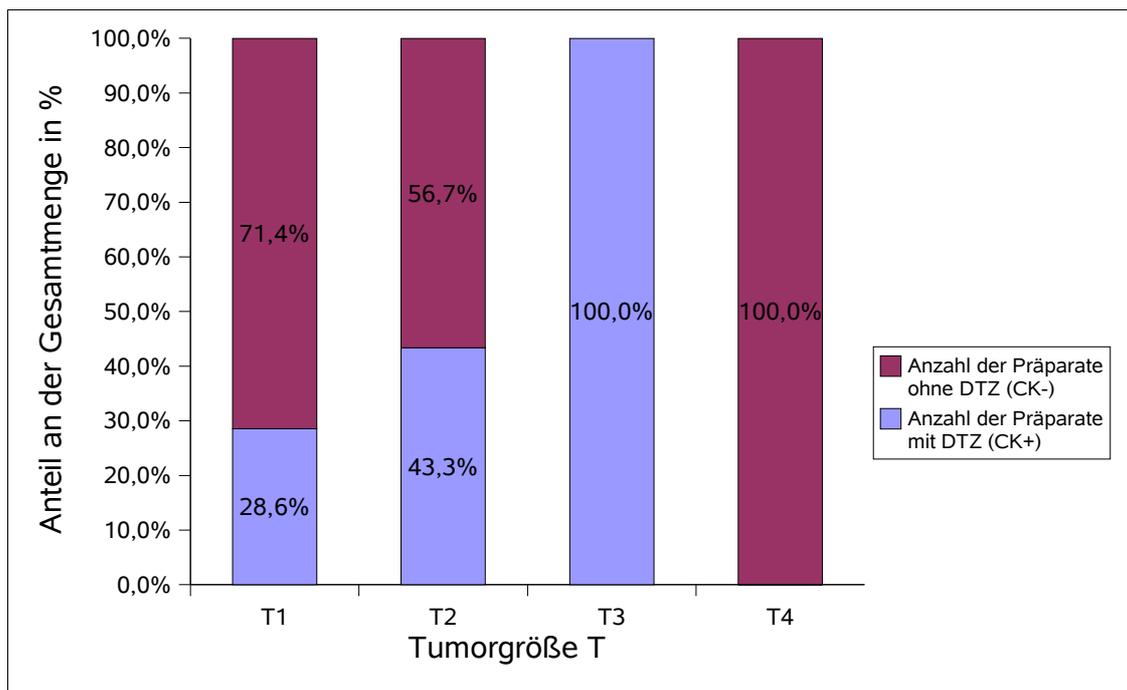


Abbildung 13: Darstellung der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit von der Primärtumorgröße

## 5.5 Detektionsraten in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

Der Gruppe der ausgewerteten Präparate der Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus kommt eine herausgehobene Stellung zu, da der Lymphknotenbefall nach wie vor den wichtigsten prognostischen Faktor bezüglich Therapierbarkeit und Überlebenswahrscheinlichkeit stellt.

Die in dieser Arbeit ausgewerteten 125 Präparate ließen sich in eine Gruppe von 53 (64%) Präparaten von N0-Patientinnen, das heißt es konnte klinisch keine vom Primärtumor durch disseminierte Tumorzellen befallenen Lymphknoten gefunden werden, und eine Gruppe von 28 (34%) Proben von N1-Patientinnen einteilen. 2 der 52 (2%) Präparate konnten nicht sicher klassifiziert werden.

Bei 13 der 53 (25%) Präparate von N0-Patientinnen konnten DTZ identifiziert werden, während in der Gruppe der Patientinnen mit klinisch imponierendem Lymphknotenbefall bei 15 von 28 (54 %) Präparaten DTZ gefunden wurden.

Diese schon durch Beobachtung auffallende Verdopplung der Detektionsraten zwischen den Gruppen der Patientinnen mit noch nicht befallenen (N0, Lymphknotenstatus negativ) Lymphknoten und den Patientinnen bei denen Lymphknoten gefunden worden, welche schon mit metastatische Absiedlungen vom Primärtumor belastet waren, ließ sich mit einem CHI<sup>2</sup>-Test ( $\chi^2=6,83 > \chi^2_{1-\alpha}$  ;  $\alpha=0.05$ ) und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% als signifikant zeigen.

Stadium	Anzahl der Präparate mit DTZ (CK <sup>+</sup> )	Anzahl der Präparate ohne DTZ (CK <sup>-</sup> )	Summe der Proben
N0	13	40	53
N1	15	13	28
Nx	1	1	2

Tabelle 15: Übersicht der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

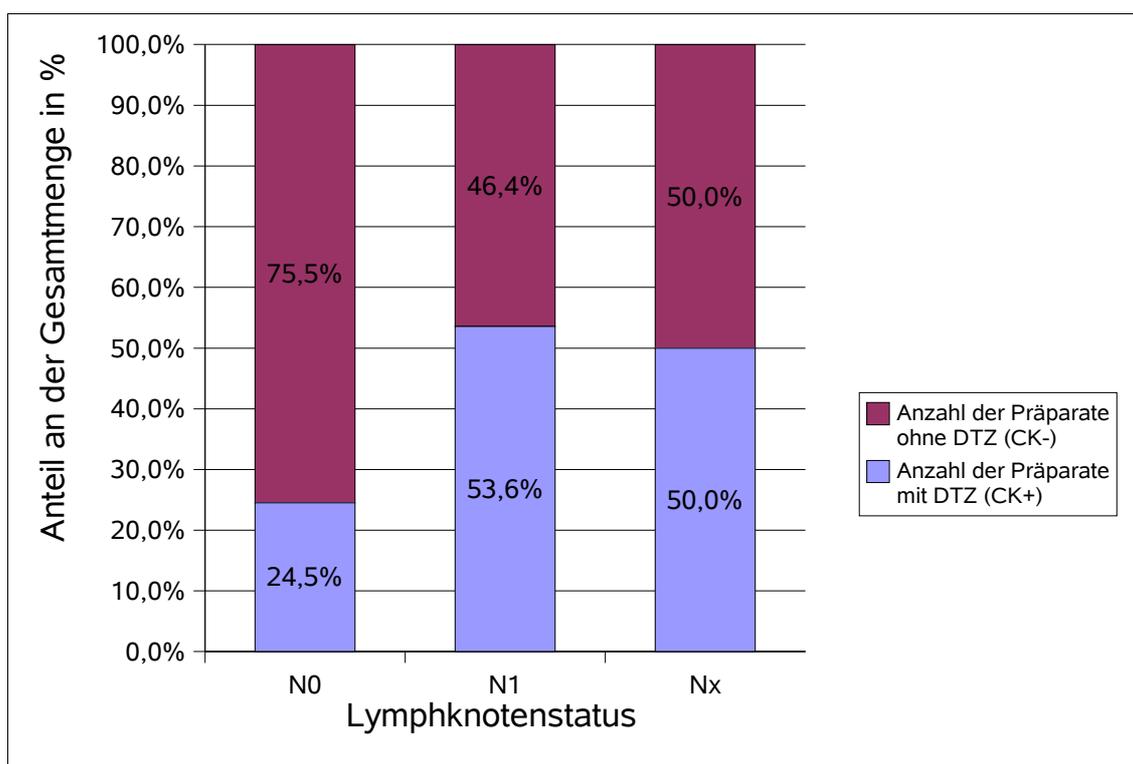


Abbildung 14: Darstellung der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

## 5.6 Detektionsraten in Abhängigkeit vom Fernmetastasenstatus

Die Beobachtung und Untersuchung der Datenmenge bezüglich der möglichen Streuung von Tumorzellen im Hinblick auf das Vorhandensein oder nicht Vorhandensein von Fernmetastasen zeigten folgende Ergebnisse.

Von den untersuchten 125 Patientenproben waren 67 (54%) Patienten nach klinischen Kriterien als im Stadium M0, 12 (1%) Patienten als im Stadium M1, das heißt es wurden klinisch Fernmetastasen in beliebigen Organen festgestellt, und 4 Patienten als im Stadium Mx befindlich klassifiziert.

Unter den 67 Patientenproben, die keine klinisch feststellbaren Metastasen aufwiesen, wurden 20 (30%) Proben gezählt bei denen CK<sup>+</sup> und damit streuende Tumorzellen darstellbar waren.

Von den 12 Proben, bei denen eine Fernmetastase festgestellt wurde, waren 9 (75%) Proben CK<sup>+</sup>. Bei den beiden 4 Proben ohne sichere Klassifikation konnten keine DTZ gefunden werden.

Ähnlich wie Kapitel 5.5 beschrieben, fällt hier eine deutliche Steigerung der Detektionsraten auf, die mit einem  $\chi^2$ -Test auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Steigerung der Detektionsraten, und damit dem Streuverhalten der DTZ, und dem Vorhandensein von klinisch durch bildgebende oder laborchemische Verfahren festgestellte Organfernmetastasen überprüft wurden.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% kann das Ergebnis als statistisch signifikant angenommen werden, das heißt bei Patientinnen mit einer schon festgestellten Absiedlung von Tochtergeschwülsten konnten signifikant mehr DTZ im peripheren Blut gefunden werden, als bei Patientinnen ohne Metastasen ( $\chi^2=8,93 > \chi^2_{1-\alpha}$ ;  $\alpha=0.05$ ).

Stadium	Anzahl der Präparate mit DTZ (CK <sup>+</sup> )	Anzahl der Präparate ohne DTZ (CK <sup>-</sup> )	Summe der Proben
M0	20	47	67
M1	9	3	12
Mx	0	4	4

Tabelle 16: Übersicht der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Fernmetastasenstatus

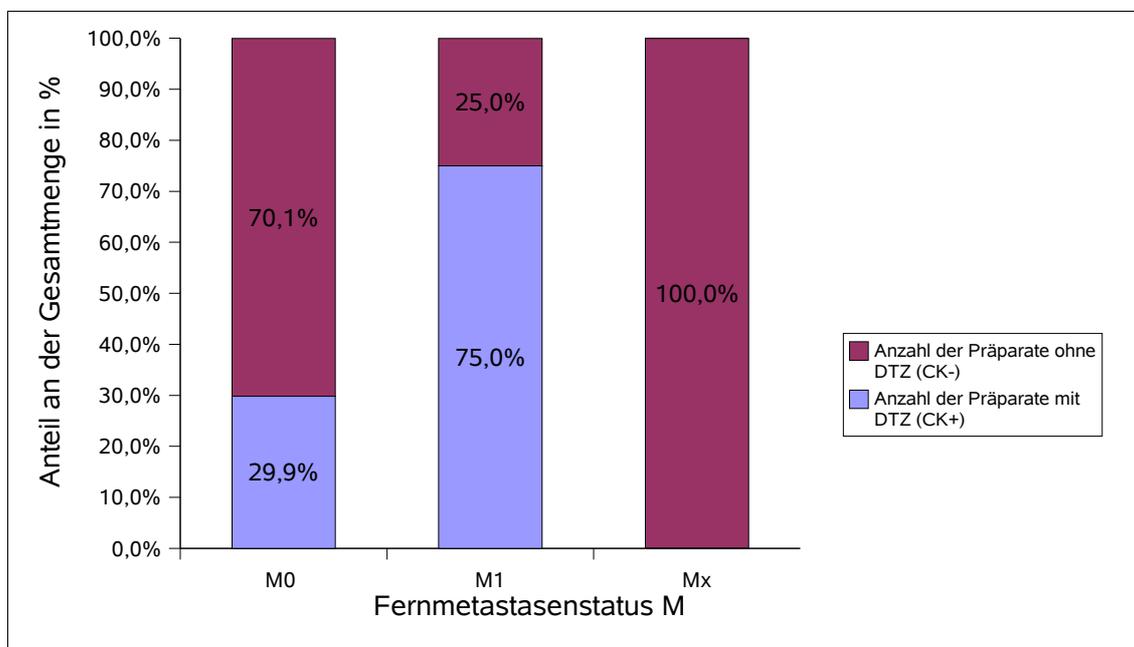


Abbildung 15: Darstellung der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Fernmetastasenstatus

## 5.7 Detektionsraten in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad

Zur Beurteilung des Differenzierungsgrades wurde das Verfahren von Bloom und Richardson angewandt, welches histomorphologische Einzelkriterien wie Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate semiquantitativ zu einem Score zusammenfasst, welcher die Zuordnung zu den verschiedenen Graden erlaubt (Bloom HJG et al., 1957).

6 der 83 (7%) Patientinnen konnten dem Differenzierungsgrad G1, einem dem Ursprungsgewebe sehr ähnlichem Gewebe, 44 (53%) Proben dem Differenzierungsgrad G2, und 33 (40%) Proben dem Differenzierungsgrad G3, einem anaplastischen Stadium, zugeordnet werden.

Bei der Zytokeratinfärbung der einzelnen Objektträger ließen sich bei 1 von 6 (17%) Proben im G1-Stadium Tumorzellen finden. 14 von 44 (32%) Proben der dem G2-Stadium zugeordneten Proben waren CK<sup>+</sup>. Bei 14 der 33 (42%) Patientenproben des G3-Stadiums konnten ebenfalls Tumorzellen gefunden werden.

Deskriptiv konnte eine Steigerung der Detektionsraten nachgewiesen werden, die sich direkt proportional zur Entdifferenzierung des Tumorgewebes entwickelt. Die obligate statistische Überprüfung zeigte allerdings keinen gesicherten Zusammenhang, die diesen Trend validiert hätte.

Stadium	Anzahl der Präparate mit DTZ (CK <sup>+</sup> )	Anzahl der Präparate ohne DTZ (CK <sup>-</sup> )	Summe der Proben
G1	1	5	6
G2	14	30	44
G3	14	19	33

*Tabelle 17: Übersicht der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad*

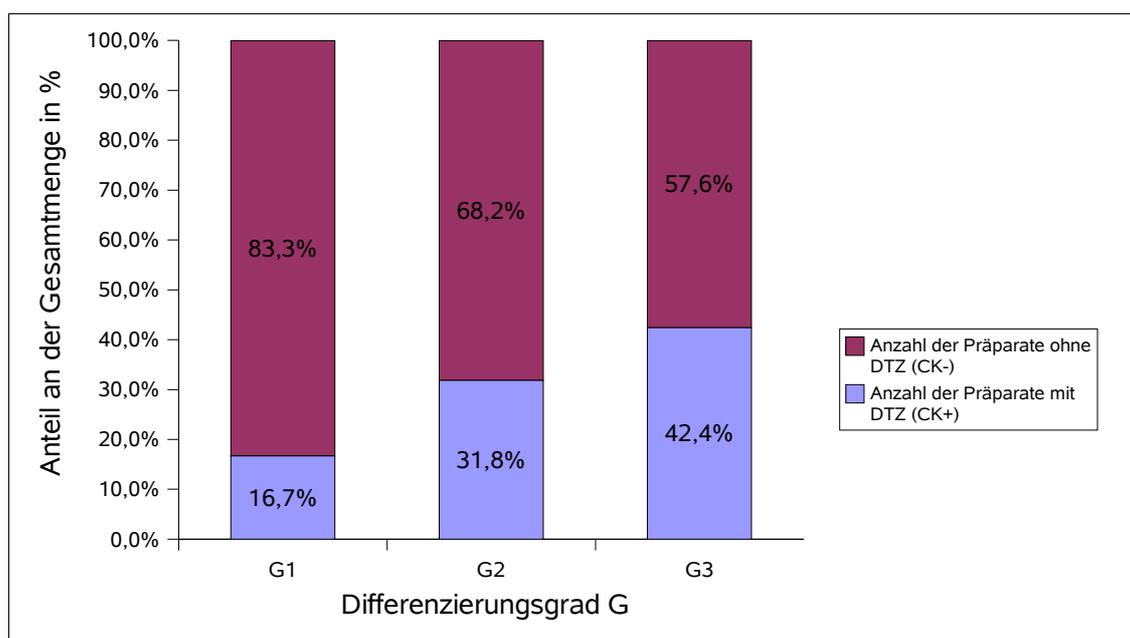


Abbildung 16: Darstellung der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad

## 5.8 Detektionsraten in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus

Als weiteres Vergleichskriterium wurde das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein der Estrogen- und Progesteronrezeptoren an der Oberfläche des Mammakarzinomgewebes untersucht und nach dem so genannten Remmele Score definiert (Kap. 4.10). Hierbei wurden die Fraktionen sowohl hinsichtlich der jeweils singulären Existenz des interessierenden Rezeptors unabhängig vom Vorhandensein des anderen, aber auch in allen kombinatorischen Varianten der Rezeptoren beobachtet. So konnten insgesamt 11 von 27 Proben mit ER (41% CK<sup>+</sup>), 17 von 48 Proben mit ER<sup>+</sup> (40% CK<sup>+</sup>), 9 von 27 Proben (33%) mit PR<sup>-</sup> und 18 von 48 Proben mit PR<sup>+</sup> (38% CK<sup>+</sup>) unterschieden werden. Außerdem wurden zwei Gruppen mit ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup> (42 Proben / 36% CK<sup>+</sup>) und ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup> (21 Proben / 39% CK<sup>+</sup>) gebildet. Bei 12 Proben ließen sich entweder ein ER<sup>-</sup>/PR<sup>+</sup> oder ER<sup>+</sup>/PR<sup>-</sup> (33% CK<sup>+</sup>) finden.

Eine statistische Prüfung der Ergebnisse hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Expressierung oder Nichtexpressierung der klinisch, therapeutisch und damit prognostisch bedeutsamen Estrogen- und Progesteronrezeptoren und der Detektion von Tumorzellen und damit indirekt deren Disseminierungsverhalten zeigte je nach Kombination keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Stadium	Anzahl der Präparate mit DTZ (CK <sup>+</sup> )	Anzahl der Präparate ohne DTZ (CK <sup>-</sup> )	Summe der Proben
ER <sup>-</sup>	11	16	27
ER <sup>+</sup>	17	31	48
PR <sup>-</sup>	9	18	27
PR <sup>+</sup>	18	30	48
ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup>	15	27	42
ER <sup>-</sup> /PR <sup>-</sup>	8	13	21
ER <sup>-</sup> /PR <sup>+</sup> o. ER <sup>+</sup> /PR <sup>-</sup>	4	8	12
n.b.	4	17	21

Tabelle 18: Übersicht der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus

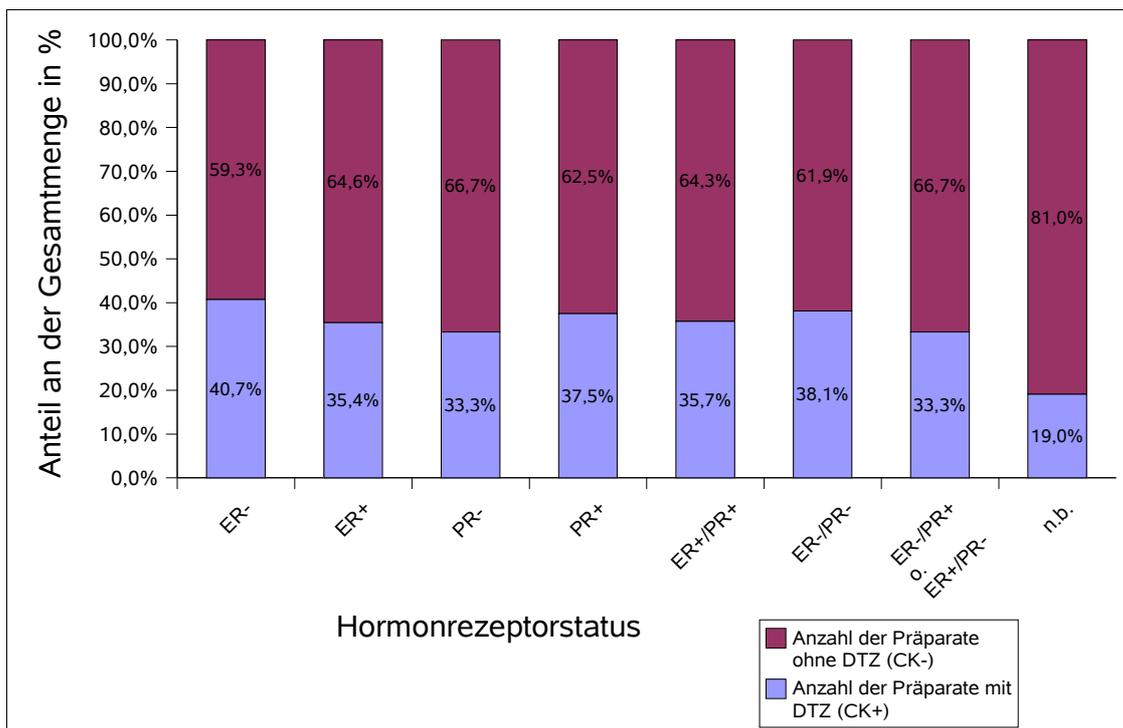


Abbildung 17: Darstellung der DTZ-Detektionsraten in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus

## 5.9 Kontrollstudie an gesunden Patienten

Zur Prüfung der Leistungsfähigkeit der angewandten Methoden wurde als Negativkontrolle je 2x8 ml Blut von 15 freiwilligen Spendern im Alter von 26 bis 53 Jahren ohne bekannte Grunderkrankung, insbesondere ohne maligne Erkrankung entnommen und nach exakt denselben Protokollen (Kap. 4.5-4.9) bearbeitet wie die Blutproben der Patientinnen mit gesichertem Mammakarzinom.

Bei keinem der 15 Spender wurden DTZ (CK<sup>+</sup>) gefunden.

## 6 Diskussion

Eine grundlegende und notwendige Eigenschaft maligner Tumoren, Einzelzellen vom Primärtumorzellverband abzulösen und über verschiedenen Wege, wie beispielsweise Blut- und Lymphbahnen, in die meisten Regionen des Körpers zu entsenden, um dort Tochtergeschwülste zu induzieren, ist die häufigste Ursache für den oft progressiven Verlauf der Erkrankung und nicht zuletzt den Tod des betroffenen Individuums.

Selbst bei dem häufigsten malignen Tumor der Frau, dem Mammakarzinom, bei dem hinsichtlich einer suffizienten Früherkennung grosse Anstrengungen unternommen werden, stellt das frühzeitige Streuen von Tumoreinzelzellen einen bedeutenden krankheitslimitierende Faktor dar.

Bei etwa einem Drittel der Patientinnen, bei denen zum Zeitpunkt der Mammakarzinomdiagnosestellung kein klinischer, radiologischer oder biochemischer Hinweis auf eine schon vorhandene vom Primärtumor stammende Metastase (ca. 95%) zu finden war (Slade et al., 1999), lassen sich innerhalb von fünf Jahren Tochtergeschwülste feststellen (Pantel und Otte, 2001). Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass DTZ zu den unterschiedlichsten Phasen des Krankheitsverlaufes existieren und bisher ist noch unklar, zu welchem Zeitpunkt oder nach welchen biologischen Regeln diese Tumorzellen vom Hauptzellverband gelöst werden.

DTZ befinden sich in aller Regel in der mitotischen G<sub>0</sub>-Phase, was heißt, dass diese Zellen insbesondere beim Mammakarzinom über 20-25 Jahre in oben erwähnter Ruhephase in den verschiedensten Kompartimenten des Körpers verharren können, ohne mitotisch aktiv zu werden (Karrison et al., 1999). Dies stellt therapeutisch eine besondere Schwierigkeit dar, da das klassische Zytostatikum in den Mitoseablauf einer Zelle eingreift, wodurch es ausgesprochen schwierig ist, diese so genannten okkulten DTZ suffizient zu bekämpfen. Hier mag eine Ursache für das erwähnte Auftreten von Metastasen trotz guter Rückbildung der soliden Tumoren zu suchen sein. Weiterhin ist unklar wann und wie sich diese ruhenden DTZ aus ihrer Stase lösen und zur Metastasenbildung befähigt werden.

Nichtsdestotrotz ist die klinische Bedeutung dieser DTZ mittlerweile erkannt und zum Teil anerkannt worden, wenn auch Ihre Relevanz und Aussagefähigkeit bezüglich der Zusammenhänge ihres Auftretens, dem Krankheitsstadium und der Prognose beim Mammakarzinom umstritten sind. Diel et al. (1996) konnten erstmals eine Korrelation zwischen der Detektion von DTZ im Knochenmark betroffener Patienten, der Tumorgröße,

dem Lymphknotenstatus und dem histologischen Differenzierungsgrad beschrieben werden, ohne dass die Daten einen Schluss hinsichtlich der klinischen Relevanz erlaubt hätten.

Die reine Detektion zirkulierender Tumoreinzelnzellen ist bisher nicht hinreichend, um der biologischen und klinischen Heterogenität von Krankheitsverläufen und dem zell- und molekularbiologischen Potential der DTZ gerecht zu werden oder gar abzubilden. Vielmehr sind hier weiterführende Studien zur molekularbiologischen Charakterisierung dieser Zellen und ein weitergehendes Verständnis der umfangreichen Zellinteraktionen notwendig und wünschenswert (Pantel et al., 2000).

Nach bisherigen klinischen Gepflogenheiten gehen in die Entscheidung, welche therapeutischen Maßnahmen bei Mammakarzinompatientinnen getroffen werden, bei denen noch keine Fernmetastasen feststellbar sind, vor allem der Lymphknotenstatus aber auch die Tumorgöße ein. Während die Tumorgöße vor allem auf die operative Intervention Einfluss nimmt, entscheidet der Lymphknotenbefall oftmals über die Gabe von chemotherapeutischen oder hormonellen Medikationen. Patientinnen die sonst keine Therapie erhalten würden, könnten bei einem besseren Verständnis streuender Tumorzellen, von neuen Therapieansätzen profitieren, wobei der Therapieverlauf und damit Therapieerfolg durch die regelmäßige Blutuntersuchung auf Tumorzellen unterstützend kontrolliert werden könnte.

Ein früheres Screening scheint möglich, da der Nachweis von DTZ sowohl vor dem Absiedeln von Metastasen, als auch vor dem radiologischen oder klinischen Nachweis eines Primärtumors denkbar ist.

Der suffiziente und validierte Nachweis von DTZ kann in Zukunft eine bedeutende Rolle in der klinischen Onkologie spielen.

## 6.1 Auswahl, Optimierung und Effizienz der Detektionsmethode

Zur Detektion von DTZ gibt es mittlerweile mehrere häufig angewandte direkte Methoden, welche die gesuchten Zellen selbst aufspüren (ICC, DFZ (Durchflußzytometrie) etc.) und indirekte Methoden, welche Zellprodukte wie DNA, RNA und mehr oder minder tumorzellspezifische Proteine nachweisen (PCR, RT-PCR). Alle Methoden haben wichtige Vor- und Nachteile und sollen hier kurz besprochen werden.

Grundsätzlich stellen sich ökonomische und methodische Probleme beim Nachweis von streuenden Tumorzellen. Zum einen muss ein leicht zugängliches Medium gewählt werden, in welchem mit hoher Wahrscheinlichkeit Tumorzellen zu finden sind. Blut aus einer

peripheren Vene ist aufgrund der geringeren interventionellen und zeitlichen Inanspruchnahme des Patienten dem Knochmarksaspirat überlegen, andererseits ist es im Blut deutlich schwieriger die einzelne Tumorzelle von den restlichen zellulären Bestandteilen zu unterscheiden. Zum anderen ist eine zelluläre Struktur zum Nachweis nötig, die von den Tumorzellen stabil exprimiert wird, so dass eine hinreichend hohe Spezifität und Sensitivität garantiert werden kann.

PCR, RT-PCR (Krismann et al., 1995; Fields et al., 1995) und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Klein et al., 1999) versuchen spezifisch veränderte DNA oder mRNA einer Tumorzelle nachzuweisen. Der Vorteil der RT-PCR gegenüber der PCR besteht nun darin, dass die mit der RT-PCR nachweisbare tumorspezifische mRNA aufgrund ihrer geringeren Stabilität im Vergleich zur DNA, die Anwesenheit vitaler Tumorzellen anzeigen kann. Spezifischen AK zugängliche Tumorzelltranskripte sind bisher nur bei wenigen Tumorarten beschrieben worden, so Fusionsgene in verschiedenen Weichteilsarkomen. Häufiger sind hier Transkripte von Genen, die für tumorassoziierte Proteine wie CEA oder gewebspezifische Differenzierungsmarker wie PSA (prostataspezifisches Antigen) kodieren (An et al., 2001; Manzotti et al., 2001; De Luca et al., 2000). Ein wesentlicher Vorteil ist hier sicher die hohe Sensitivität, wobei allerdings ein Zerstören der Zellen notwendig ist, was weiterführende Untersuchungen unmöglich macht. Außerdem ist die Expression von Pseudogenen möglich, welche zu einem Anstieg der PCR Produkte führen können (Zehentner et al., 2002). Die Immunzytochemie (Pantel et al., 1994; Borgen et al., 1998; Li et al., 1995) und die Durchflußzytometrie (Gross et al., 1995; Racila et al., 1998) beruhen vor allem auf Antigen-AK-Reaktionen zur Detektion der Tumorzellen. Das sich hier stellende Hauptproblem ist, dass auf der Mehrheit der Tumorzellen keine spezifischen Oberflächenantigene (z.B. HEA) gefunden worden. Die bei Karzinomen stabil und vermehrt exprimierten Zytokeratine sind Teil des Zytoskelettes und setzen meist eine Zellmembranzerstörung zur AK-Bindung voraus (Bilkenroth et al., 2001). Vorteile dieser Methoden sind die mögliche Weiterverwendung der untersuchten Zellen, Nachteile sind hier zum einen die mit einem höheren Aufwand verbundene Methodik, da es einen erfahrenen Pathologen zur Analyse braucht. Zum Anderen stellt sich die größte Schwierigkeit im Auffinden der Zellen dar, da die wenigen Tumorzellen in einer 16ml Blutprobe zwischen den Millionen anderen Zellen schwer aufzuspüren sind, es häufiger zu falsch positiven Antigen-AK Reaktionen kommt und somit die Spezifität verringert wird.

Eine kombinierte Möglichkeit, die zu einer deutlichen Verbesserung der Ergebnisse führte, stellte die Ficoll-dichtegradientenzentrifugation mit nachfolgender immunomagnetischer

Zellmarkierung und Separation dar (Martin et al., 1997). Bei dieser Methode ist es durch eine Markierung mit CD45 sensiblen AK möglich, die Fraktion der nicht interessierenden Zellen in den Proben so deutlich zu verkleinern, dass die übrig gebliebenen Zellen inklusive der Tumorzellen, mit einem negativen Anreicherungsfaktor von  $10^3$ - $10^4$  (Bilkenroth et al., 2001) auf einen einzigen Objektträger aufzubringen und zu beurteilen waren. Diese so genannte negative Anreicherung der DTZ ist unabhängig von den exprimierten Antigenen auf den Oberflächen der Tumorzellen (Bilkenroth et al., 2001; linuma et al., 2000). Eine Reduktion der Tumorzellanzahl ist allerdings denkbar aufgrund von Interaktionen zwischen Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen (Pantel und Otte, 2001).

Grundsätzlich können aber DTZ auch direkt über Zelloberflächenantigene markiert werden, was aber aufgrund möglicher Fehl- und Überexpressionen auf den Tumor- aber auch auf anderen epithelialen Zellen zu falsch negativen und positiven Ergebnissen führen kann, so dass in dieser Arbeit der negativen Selektion der Vorzug gegeben wurde.

Insgesamt konnten die ursprünglichen Protokolle durch Versuche in unserer Arbeitsgruppe insofern modifiziert werden, dass befriedigende und reproduzierbare Ergebnisse bei den Wiederfindungsraten erzielt werden konnten. Durch die Variationen von Parametern, wie der Inkubationszeit, der AK-Menge oder der Inkubationstemperatur (Tab.9 / Abb.10) sind Detektionsraten zwischen 72,3% und 100% (Mittelwert 84%) (Bilkenroth et al., 2001) erreicht worden. Diese Ergebnisse sind denen in der bisher vorliegenden Literatur ähnlich oder zum Teil überlegen, so sind z.B. die Wiederfindungsraten bei einer negativen Anreicherungsmethode von linuma et al. (2000) mit 77,3% angegeben.

Einige Arbeitsgruppen haben DTZ mit spezifischen AK gegen HEA 125 markiert und selektiert (Krüger et al., 1999), wobei hier aber gesagt werden muss, dass HEA 125 auch von anderen epithelialen Zellen exprimiert wird und es daher zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. In einer Studie (Zigeuner et al., 2000) erwies sich die positive Selektionsmethode als sensitiver. In den von uns durchgeführten Versuchen (Bilkenroth et al., 2001) ließen sich diese Ergebnisse nicht wiederholen und es zeigten sich bessere Detektionsraten bei der negativen Selektionsmethode, vermutlich weil die AK-Bindung von vornherein an einer anderen als der Tumorzellfraktion vonstatten geht.

Die Wiederfindungsraten der für diese Arbeit gewählten Ficoll-dichtezentrifugation mit anschließender immunomagnetischer Depletion lagen zwischen 70% und 100% und reihen sich damit in Daten der verfügbaren Literaturangaben ein.

Insgesamt lässt sich sagen, dass mit den verfügbaren Methoden leistungsfähige Verfahren zur Verfügung stehen, welche in der Lage sind DTZ zur Beurteilung zu detektieren und für

weiterführende Untersuchungen zu gewinnen und anzuzüchten. Trotzdem werden diese Verfahren immer artifizielle Systeme sein, so ist es z.B. bisher unbekannt in welchem Maße die humorale oder zelluläre Immunantwort der gesunden Spender die MCF-7-Zellen angreifen oder wie stark mechanische Ursachen die Anzahl der frei detektierbaren MCF-7-Zellen vermindern.

## 6.2 Detektion von DTZ in den untersuchten Patientenblutproben

Das Mammakarzinom ist ein maligner Tumor, welcher unter anderem durch die Fähigkeit gekennzeichnet ist, frühzeitig Tumorzellen über die Blutbahnen zu streuen und damit Metastasen zu setzen, welche letztendlich den entscheidenden Faktor für den Krankheitsverlauf des Patienten darstellen (Diel et al., 1996). Da diese streuenden Tumorzellen wahrscheinlich das entscheidende Glied in der Kette vom Primärtumor zu den Metastasen sind, sollte ihnen besondere Beachtung geschenkt werden. Bisher ist nur der Knochenmarkstatus, mit der Beobachtung des Anteils an DTZ in diesem, in die Faktoren für die Beschreibung des Krankheitsverlauf und die -Prognose von Patientinnen mit Mammakarzinom eingegangen (Harbeck et al., 1994; Mansi et al., 1999; Braun et al., 2000).

Sollte dies auch mit dem Medium Blut gelingen können, wäre ein wichtiger Schritt getan, den die Entnahme von Blut ist weitaus weniger invasiv und belastend für den Patienten als die Knochenmarkspunktion.

Wir benutzten aus in Kapitel 6.1. beschriebenen Gründen eine immunomagnetische Methode zur negativen Anreicherung von disseminierten Tumorzellen (MACS CD45 Methode), welche wir schon in früheren Untersuchungen bei Patienten mit renalen und urologischen Tumoren erfolgreich verwendet hatten (Bilkenroth et al., 2001; Meye et al., 2002). In dieser Studie wurde das Bearbeitungsprotokoll für den VarioMACS leicht verändert, um es an die Bedürfnisse und Anforderungen des AutoMACS anzupassen. Unsere Erfahrungen und Experimente zeigen deutlich, dass die automatisierte Variante mehrere Vorteile gegenüber den früheren nichtautomatisierten Methoden birgt. So sind weniger Bearbeitungsschritte nötig, was den systematischen Fehler verkleinert, außerdem ist es möglich mehrere Proben parallel zu bearbeiten, was die Geschwindigkeit erhöht und nicht zuletzt die Kosten für die einzelnen Untersuchungen senkt. In einer prospektiven Studie bei Proben von Patienten mit urologischen Tumoren, welche mit dieser automatisierten Methode bearbeitet worden, war es

möglich über 30 Proben je Tag mit einem Mitarbeiter und einem Gerät zu bearbeiten (Meyer et al., 2002).

In dieser Studie war es uns möglich insgesamt 261 CK<sup>+</sup> Zellen (Mittelwert 7,9 Zellen je positiver Probe) in 26% der 125 Blutproben und bei 35% der 83 Patientinnen zu detektieren. Die Anzahl und der prozentuale Anteil der detektierten DTZ ist vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen Werten, die von Arbeitsgruppen erhoben wurden, die ebenfalls die immunomagnetische Methode zur Anreicherung nutzten.

So konnte in einer Studie in 23,5% von 165 Proben DTZ nachgewiesen werden (Naume et al., 1998), während in einer weiteren Studie in 28% von 84 Proben von Patientinnen mit Mammakarzinom CK<sup>+</sup> Zellen gefunden wurden (Witzig et al., 2002).

Ein wichtiges Anliegen dieser Arbeit bestand darin, einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten zirkulierender Tumorzellen im Blut und dem Tumorstadium des Betroffenen nachzuweisen. So ließen sich sowohl eine diesbezügliche Korrelation mit dem Lymphknotenstatus als auch mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen bei Mammakarzinompatientinnen zeigen. Bei der Auswertung der Daten hinsichtlich der tumorzellpositiven oder -negativen Lymphknoten fiel auf, dass nur in 13 der 53 (25%) Präparate von Patientinnen mit negativen Lymphknotenstatus (N0) Tumorzellen gefunden werden konnten, während in den Präparaten mit positivem Lymphknotenstatus (N1) in 15 von 28 (54%) Objektträgern DTZ zu finden waren. Der scheinbare Zusammenhang ließ sich statistisch sichern ( $\chi^2=6,83 > \chi^2_{1-\alpha}$ ;  $\alpha=0.05$ ). Somit ist die Aussage gerechtfertigt, dass bei Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus von einer erhöhten Zirkulation dieser DTZ auszugehen ist, da die DTZ einer Normalverteilung unterliegen.

Ähnlich sind die Ergebnisse im Kontext zum Vorhandensein von Metastasen. Hier war es uns nur bei 20 von 67 (30%) Präparaten möglich, bei nicht nachgewiesenen Fernmetastasen (M0), Tumorzellen zu finden. Dieses gelang uns allerdings bei 75% (9 von 12) der Präparate der Patientinnen im Stadium M1. Auch hier konnten wir einen Signifikanznachweis erfolgreich führen ( $\chi^2=8,93 > \chi^2_{1-\alpha}$ ;  $\alpha=0.05$ ) der die Aussage erlaubt, dass bei Patientinnen mit klinisch gesicherten Metastasen vermehrt Tumorzellen zirkulieren und nachweisbar sind. Insgesamt lässt sich somit vermuten, dass mit dem Befall von primärtumorfremden Lokalisationen eine vermehrte Tumoreinzelzellstreuung einhergeht, obwohl dies nicht notwendigerweise voraussetzend ist, da sowohl bei insgesamt 25% der Patientinnen ohne nachgewiesenen Lymphknotenbefall als auch bei 30% der Patientinnen ohne nachgewiesene Metastase zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden konnten. Es war nicht möglich in der zum Zeitpunkt des Erstellens dieser Arbeit verfügbaren Literatur, vergleichbare Angaben

für Untersuchungen im peripheren Blut zu finden, so dass wir davon ausgehen, dass diese Zusammenhänge bisher nicht beschrieben wurden. Die Ergebnisse dieser Studie sind im Januar publiziert worden (Taubert et al., 2004).

Wie andere Studien mit Knochenmarksproben zeigen (Diel et al., 1998) konnten auch Korrelationen zwischen der Tumorgröße T, dem Differenzierungsgrad G (engl.: „grading“) und den entsprechenden Detektionsraten gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte nur deskriptiv eine Tendenz zur Steigerung der Detektionsraten sowohl in den nach Tumorgröße als auch nach Differenzierungsgrad gebildeten Gruppen beobachtet werden (Kap. 5.4 und 5.7).

Zudem wurde überprüft, ob sich die klinische Bedeutung der Hormonrezeptoren in den Detektionsraten und damit indirekt im Streuverhalten von DTZ niederschlägt. Unabhängig von der Kombination der Gruppen scheint zwar die Abwesenheit des Estrogenhormonrezeptor die Detektionsraten leicht zu erhöhen, insgesamt lässt sich diese Beobachtung aber mit der zufälligen Verteilung erklären, so dass das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein von Estrogen- und/oder Progesteronrezeptoren in dieser Studie in keinem Zusammenhang mit der Menge an DTZ steht.

Interessanter, weil klinisch nicht unbedeutend, ist die Beobachtung der Detektionsraten in Abhängigkeit zum Therapiestadium. Hier haben Bilkenroth et al. (2001) beobachtet, dass bei Nierenzellkarzinompatienten postoperativ mehr CK<sup>+</sup>-DTZ als präoperativ im Blut zu finden waren und damit den Verdacht nahegelegt, dass es intraoperativ zu einer verstärkten Tumorzellaussaat kommen kann. Ähnliche Hinweise konnten schon 1996 (Oefelein et al.) bei Prostatakarzinompatienten finden, auch hier kam es postoperativ zu einer verstärkten Tumorzellausschwemmung. Andererseits konnte bei einer Gruppe die aus 21 Patienten bestand, sowohl mit immunomagnetische Separation (Krag et al., 1999) als auch mit einem Fluoreszenzmikroskop (Krag et al., 2000) eine präoperative Detektionsrate von 95% bzw. 97% und eine postoperative Detektionsrate von Tumorzellen von je 30% gezeigt werden.

In dieser Studie fanden wir bei 25% der präoperativen Patienten, bei 17% der postoperativen Patienten und bei 38% der konservativ mit Chemotherapeutika behandelten Patienten DTZ. Dies legt nun wieder den Verdacht nahe, dass es postoperativ durch eine Verkleinerung des operierten Tumors zu einer geringeren Aussaat von DTZ käme, was statistisch nicht zu belegen war. Hier sind weitere Studien erforderlich, die den Nachweis suchen, ob der prä- und postoperative Nachweis von DTZ als qualitative und quantitative Kontrolle dienen könnte.

Ebenfalls interessant ist, dass bei 38% der chemotherapeutisch behandelten Patienten

zirkulierende Tumorzellen zu finden waren. Hier lässt sich durchaus die Aussage vom Anfang stützen, dass eine zytostatische oder zytotoxische Therapie DTZ, die sich in der G0-Phase befinden, nur unzureichend angreift. Daher ist hier sicher einer der Gründe für das recht hohe Rezidivrisiko zu suchen.

Es gibt verschiedene Studien, die vergleichbare Korrelationen bei Mammakarzinompatientinnen, deren Proben mit immunomagnetischen Verfahren untersucht worden, zeigen konnten, allerdings sind diese nur im Knochenmark gesichert. So haben Diel et al. (1998) bei 727 Knochenmarksbiopsaten von sich im Stadium N1 befindlichen Mammakarzinompatientinnen bei 55% und bei 31% der N0-Patientengruppe DTZ nachgewiesen und außerdem eine Korrelation zwischen dem Nachweis von DTZ im Knochenmark, der Tumorgroße T, dem Lymphknotenstatus N und dem Differenzierungsgrad G gezeigt. Braun et al. (2000) untersuchten Knochenmarksausstriche von 552 Mammakarzinompatientinnen, fanden bei 36% der Proben DTZ und zeigten wiederum einen Zusammenhang der Detektionsrate mit dem Nachweis von Fernmetastasen. Solomayer et al. (2001) zeigten bei untersuchten Knochenmarksproben vergleichbare Aussagen.

Daneben existieren einige Studien, die mit den in Kapitel 1.4 beschriebenen Techniken an Blutproben durchgeführt worden sind und hier zur methodenvergleichenden Aussage herangezogen werden sollen. So wiesen Hu et al. (2003) bei 14 von 36 (38,9%) Mammakarzinompatientinnen DTZ in 20ml Blutproben, mit der von uns ebenfalls verwandten Negativdepletion, nach, während in der Positivfraktion nur in 5,6% Tumorzellen zu zeigen waren. Witzig et al. (2002) konnten bei 21 von 75 (28%) Patientinnen mit Mammakarzinom DTZ nachweisen, was unseren Ergebnissen (35%) entspricht. Eine kleinere Studie mit 29 Patientinnen (Kim et al., 2001) ließ bei 8 Proben (27,6%) einen Nachweis von DTZ zu, ohne dass ein Zusammenhang mit der Lokalisation, der Anzahl der betroffenen Organe oder dem Tumormarkerstatus zu zeigen war, allerdings ließen die Daten hier den Schluss auf eine Korrelation zwischen der Detektionsrate und der Abwesenheit des Progesteronstatus zu. Eine andere Gruppe (Kraeft et al., 2000) nutzte eine automatisiertes System mit einem Fluoreszenzmikroskop ohne immunomagnetische Anreicherung und fand in 20 der 59 (35%) Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom DTZ. Allerdings konnten in dieser Studie, die parallel dazu auch die entsprechenden Knochenmarkbiopsate untersuchte, in 52% der Proben Tumorzellen gefunden werden. Eine von Racila et al. (1999) durchgeführte Studie zeigte eine Detektionsrate in einer immunomagnetisch angereicherten Positivfraktion von 97% (29 von 30 Proben). Dieses Ergebnis scheint jedoch hinterfragbar, da in derselben Studie 54% (7 von 13 Proben) der gesunden Spender ebenfalls Tumorzellen

zeigten, hier also ein überdurchschnittlich hoher Anteil an falsch positiven Ergebnissen enthalten ist.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass von einer Detektionsrate von DTZ in Blutproben von mit einem Mammakarzinom erkrankten Patientinnen zwischen 27%-39% auszugehen ist. Damit ordnen sich die Befunde der vorliegenden Studie in die Literaturangaben ein. Eine deutlich höhere Anzahl von Studien ist mit Knochenmarksproben bei Patienten mit Mammakarzinom durchgeführt worden. Hier wurden insgesamt Detektionsraten zwischen 16% und 43% dargestellt (Naume et al., 1998; Beitsch et al., 2000; Diel et al., 2001; Landys et al., 1998; Kasimir-Bauer et al., 2001). Auch hier sind zwei Studien durchgeführt worden, welche mit deutlich höheren Detektionsraten aufwarten. Eine Gruppe hat (Weihrauch et al., 2002) in 80% der untersuchten Proben DTZ nachgewiesen, allerdings war die Gruppe mit 10 Patienten relativ klein. Die von einer anderen Arbeitsgruppe (Kraeft et al., 2000) untersuchten Proben, ließen in 33 von 63 (53%) Fällen DTZ vermuten, allerdings waren hier 17% der Proben der Negativkontrollgruppe Probanden positiv, so dass hier von verfälschten Ergebnissen durch zu hohe falsch-positive Werte ausgegangen werden kann.

Bisher existieren lediglich zwei Studien, die bei derselben Patientenpopulation Detektionsraten im Blut und im Knochenmark bestimmt haben (Kraeft et al., 2000; Krueger et al., 2000). Bei beiden waren die Detektionsraten im Knochenmark mit 77% (17/22) und 52% (33/63) höher als im peripheren Blut mit 20% (5/25) und 34% (20/59). Die durchschnittlich höheren Detektionsraten bei Knochenmarkproben im Vergleich zu denen bei Blutproben und die derzeitige Studienlage sprechen eher für die Anwendung von Knochenmarkbiopsaten, da eindeutige Zusammenhänge zwischen der Zirkulation von DTZ, dem krankheitsfreien Intervall und der Überlebenszeit bisher nur für diese gezeigt werden konnten (Diel et al., 2000; Diel et al., 1996; Mansi JL et al., 1999). Einen Ausschnitt der bisher publizierten Daten zeigt Tabelle 19.

Referenz	Material	Verfahren	Patienten / Proben	Resultate
Harbeck et al., 1994	KM	ICC mit anti-EMA und anti-CK	100 MammaCa Pat.	Positiv bei 38%; Im Verlauf Hinweis auf verkürztes metastasenfreies Intervall
Diel et al., 1996	KM	ICC mit AK gegen TAG12	727 MammaCa Pat.	DTZ in 55% bei N1 & 31% bei N0 Patienten; Korrelation mit T, N und G
Fields et al., 1996	KM	RT-PCR mit CK-19	83 MammaCa Pat.	CK <sup>+</sup> bei 52-82% je nach Stadium und Korrelation mit diesem
Borgen et al., 1998	KM	ICC mit AK-CK (Mabs, AE1/AE3)	257 MammaCa Pat.	CK <sup>+</sup> bei 26,6% der Patienten
Naume et al., 1998	KM	MACS mit anti-CD45 und ICC mit anti-CK	165 MammaCa Pat.	CK <sup>+</sup> bei 11,7% mit ICC und 23,5% mit MACS
Mansi et al., 1999	KM	ICC anti-EMA	350 MammaCa Pat.	Im Verlauf (12 Jahre) Verkürzung von M0-Intervall und ÜLZ bei DTZ; kein unabhängiger Faktor
Braun et al., 2000	KM	ICC mit anti-CK	552 MammaCa Pat. verschiedener Stadien	CK <sup>+</sup> bei 36% N-unabhängig von aber im Verlauf Korrelation mit M0/1; unabhängiger Faktor
Krismann et al., 1995	PVB	RT-PCR mit mRNA von CK-19	17 LungenCa-Zelllinien 50 BronchialCa Pat. 65 gesunde Spender	CK-19 in allen Zelllinien und in 50% der Proben aber auch in 20% der Negativkontrollen
Martin et al., 1997	PVB	MACS, ICC mit CK-8	33 Proben mit je 5000 TZ einer MammaCa-Zelllinie; 34 Patienten	57,7% detektierte Zellen und 61,8% CK <sup>+</sup> bei den Patientenproben
Racila et al., 1998	PVB	IME, DFZ, ICC mit CD45-, CK+	30 MammaCa Pat. 13 Kontrollen	26,7% pos. Proben mit Korrelation mit Therapie- und klinischem Stadium

Referenz	Material	Verfahren	Patienten / Proben	Resultate
Krüger et al., 1999	PVB	RT-PCR und ICC, CK-19	79 MammaCa Pat.	CK <sup>+</sup> bei 55,3%
DeLuca et al., 2000	PVB	RT-PCR für EGFR, CK-19, CEA	91 Pat. verschiedener Tumoren, 38 Gesunde	EGFR <sup>+</sup> bei 59% entspricht IHC
Iinuma et al., 2000	PVB	MACS mit anti-CD45, n MASA mit p53 und K-ras	Proben von tumordrainierenden Venen (1) und PVB (2) von je 23 Pat.	Positiv bei 87% (1) und 45% (2); Korrelation zur ÜLZ
An et al., 2001	PVB	RT-PCR für CEA	32 MammaCa Pat.	CEA in 38% der Proben; Hinweis auf Verlaufsparameter
Bilkenroth et al., 2001	PVB	MACS, ICC mit CK-19	104 Proben / 59 Pat. mit NierenzellCa	CK <sup>+</sup> bei 32%; Korrelation mit G-Stadium
Kim et al., 2001	PVB	MACS, ICC	21 Gesunde, MammaCa- Pat 21 M0 und 29 M1	CK <sup>+</sup> bei 0% M0 und 27,6% M1; Korrelation mit PR
Meye et al., 2002	PVB	AutoMACS, ICC mit anti-CK	186 Proben von 128 Pat. mit urologischen Karzinomen	CK <sup>+</sup> bei 38-53% der Patienten (je nach Tumortyp); 20 PVB/Tag/Gerät
Witzig et al., 2002	PVB	MACS mit anti-EpCAM, ADMS	85 MammaCa Pat. 34 Negativkontrolle 15 Positivkontrolle	Positiv bei 28% der Pat., Hinweis auf Zusammenhang mit N0/1
Taubert et al., 2004	PVB	AutoMACS mit anti-CD45, ICC mit anti-CK	125 Proben von 83 MammaCa Pat.	CK <sup>+</sup> bei 26% der Proben, Korrelation mit N0/1 und M0/1
Kraeft et al., 2000	KM/PVB	Automatisches Fluoreszenzmikroskop mit anti-CK	355 KM/PVB von MammaCa Pat.	CK <sup>+</sup> bei 52% der KM-Proben und 35% der PVB
Zigeuner et al., 2000	Zelllinien	MACS anti CD45 und ICC versus ICC	5 Zelllinien von urolog. Malignomen 96 Tests	MACS signifikant besser Wilcoxon-Test (p<0,01)
Manzotti et al., 2001	Lymphknoten-bioptate	RT-PCR für CK19, M.globulin 1 vs IHC	123 Pat. mit 146 MammaCa Pat.	Sensitivität ca. 80% bei Konkordanz je nach Marker 75-88%

Tabelle 19: Überblick über ausgewählte Publikationen

Legende: KM (Knochenmark); PVB (Peripher Venöse Blutprobe); Ca (Carzinom)

### 6.3 Klinische Relevanz

Die wichtigste Frage, ob das Auftreten von DTZ mit einem klinisch bedeutendem Zustand einhergeht oder eine prognostische Aussagekraft besitzt, konnte bisher nur unvollständig beantwortet werden (Pantel, 2003). Die bisher durchgeführten Studien mit einer prognostisch relevanten Aussage basieren überwiegend auf Untersuchungen von DTZ im Knochenmark. Hier fanden Diel et al. (1996) eine signifikante Korrelation zwischen DTZ im Knochenmark, der Tumorgröße, dem Lymphknotenstatus, der histopathologischen Differenzierung und der Postmenopause. Ebenso beschrieb die London Ludwig Cancer Group einen Zusammenhang zwischen den DTZ im Knochenmark, der Präsenz des epithelialen Membranantigenes (EMA), dem Lymphknotenstatus und der Tumorgröße (Berger et al., 1988). Um die klinische Relevanz zu überprüfen, wurden einige Langzeitstudien initiiert. In einer Studie, die über insgesamt 12 Jahre durchgeführt wurde (Mansi et al., 1999), wurde nachgewiesen, dass die prognostische Bedeutung dieser EMA-Zellen nicht unabhängig von den etablierten Risikofaktoren wie Tumorgröße und Lymphknotenstatus ist. Diel et al. (1996) zeigten in einem mittleren Beobachtungszeitraum von 3 Jahren, dass die Anwesenheit von DTZ im Knochenmark ein unabhängiger prognostischer Faktor, sowohl des metastasenfreen Intervalls als auch der Überlebenszeit ist. Andere Studien die mit verschiedenen Methoden gearbeitet haben (Cote et al., 1991; Harbeck et al., 1994 und Gebauer et al., 2001) führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Ein potentieller Nachteil dieser frühen Studien ist die große methodische Breite, mit der die einzelnen Ergebnisse erzielt wurden. Deshalb wurde eine prospektive 2-Zentren-Studie mit 552 Patientinnen durchgeführt, in welcher ein Immunoassay genutzt wurde (Braun et al., 1998; Pantel et al., 1994). Die Resultate dieser Studie erbrachten erstmals reproduzierbare Ergebnisse und verifizierten, dass das Vorhandensein von DTZ im Knochenmark einen vom Lymphknotenstatus unabhängigen prognostischen Faktor hinsichtlich der Überlebenszeit und des metastasenfreen Intervalls darstellt. Allerdings konnte hier keine Korrelation zwischen den Lymphknotenmetastasen und den DTZ nachgewiesen werden, was möglicherweise mit den verschiedenen Zirkulationswegen der DTZ erklärbar ist (Woelfle et al., 2003).

Im Gegensatz zu den umfangreichen Untersuchungen zu DTZ im Knochenmark existieren relativ wenige Studien zu DTZ im peripheren Blut, obwohl hier aufgrund der leichten Zugänglichkeit ein ideales Medium zur Verfügung steht. Diese DTZ im peripheren Blut wurden schon sehr früh beschrieben (Zeidmann, 1961). Einige Studien versuchten durch molekulare und zytogenetische Analysen die maligne Natur der DTZ zu untersuchen (Engel

et al., 1999; Fehm et al., 2002; Klein et al., 2002). Weitere Studien zeigten eine intraoperativ gesteigerte DTZ-Streuung (Weitz et al., 1998; Uchikura et al., 2002). Trotzdem bleibt Blut für DTZ nur ein temporäres Kompartiment und es ist im Augenblick nicht bekannt ob ein signifikant großer Anteil überlebt und die Fähigkeit besitzt, detektierbare Metastasen zu bilden. Eine Publikation zeigt, dass eine große Anzahl der DTZ apoptotisch und damit kaum in der Lage waren, Metastasen zu generieren (Mehes et al., 2001). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass DNA von Apoptosekörpern in andere Zellen transferiert werden kann, so dass hier weiterführende Spekulationen über die Harmlosigkeit apoptotischer DTZ gerechtfertigt sind (Bergsmedh et al., 2001).

Die prognostische Bedeutung von DTZ im peripheren Blut ist weitaus weniger geklärt als für DTZ im Knochenmark. Bei Brustkrebspatientinnen konnte bisher nachgewiesen werden, dass die Detektion von DTZ mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korreliert (Terstappen et al., 2000; Smith et al., 2000). Unseres Wissens existieren im Augenblick neben der hier vorliegenden Untersuchung (Taubert et al., 2004), welche einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl der detektierten DTZ und den Parametern Lymphknoten- und Metastasenstatus beschreibt, nur eine weitere Arbeit die bei Mammakarzinompatientinnen den DTZ (mit einer RT-PCR zur Amplifikation von CK19) eine prognostische Relevanz zuschreibt (Stathopoulou et al., 2002).

## 6.4 Schlüsse und Ausblick

Im Augenblick existieren verschiedenste Methoden und Auffassungen wie DTZ zu detektieren und zu bewerten sind. Einigkeit besteht darin, dass eine Erweiterung des klassischen TNM-Systems um zelluläre oder molekulare Faktoren gebraucht würde. Es gibt im Augenblick Vorschläge, aber noch keine brauchbare Umsetzung. Einen nützlichen Vorschlag machte die International Union Against Cancer (Hermanek et al., 1999), wo neben der Feststellung der DTZ auch die entsprechende Methode genannt wird.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die gewählte Methode suffizient zur Detektion von DTZ im peripheren Blut eingesetzt werden kann. Der im Vergleich zur Knochenmarkbiopsie deutlich geringere interventionelle Aufwand, die damit verbundenen geringeren Risiken und nicht zuletzt die geringere Belastung für den Patienten sprechen eher für die Anwendbarkeit dieses Verfahrens. Die Detektion von DTZ korreliert signifikant sowohl mit dem Lymphknotenstatus als auch mit dem klinischen-pathologischen Nachweis von

Fernmetastasen, lässt aber auch tendenzielle Aussagen hinsichtlich der Tumorgröße und dem Differenzierungsgrad zu, so dass die Bedeutung der DTZ unterstrichen wird. Zum Einfluss des Therapiestadiums und des Vorhandenseins von Progesteron- oder Estrogenrezeptoren auf den Karzinomzellen konnten keine sicheren Aussagen getroffen werden. Nichtsdestotrotz sind weitere Studien unabdingbar, die zum einen die Rolle der DTZ im Blut oder im Knochenmark intensiv untersuchen, zum anderen spezifische morphologische, molekularbiologische oder biochemische Unterschiede zwischen entarteten und nichtentarteten Zellen feststellen. Aufgrund der leichten und wiederholten Verfügbarkeit des Mediums Blut bieten sich Untersuchungen zu Verlaufskontrollen und außerdem zum qualitativen und quantitativen Nachweis DTZ als potentieller additiver Parameter für ein kontinuierliches Therapiemonitoring an, so dass die Effizienz von Therapieverfahren bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom, welche sowohl gegen den Primärtumor, die entsprechenden Metastasen als auch gegen die DTZ selbst gerichtet sind, darstellt werden kann. Weiterhin sind Studien denkbar, die den Einfluss einer Entfernung der DTZ durch immunologische Verfahren auf das metastasenfreie Intervall und die Überlebenszeit untersuchen.

## 7 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist eine heterogene Erkrankung, die vor allem dadurch eine frühe Metastasierung gekennzeichnet ist, die den Krankheitsverlauf und die Prognose mit der verbleibenden Überlebenszeit bestimmt. Um diese Aussage nachvollziehen zu können, muss man sich bewusst machen, dass es trotz der Tatsache, dass bei 95% der Patientinnen mit einem klinisch gesicherten Mammakarzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oder der Detektion des Primärtumors es keinen radiologischen, biochemischen oder klinischen Hinweis auf ein metastatisches Geschehen gibt, ca. 30% dieser Patientinnen einen Rückfall durch Metastasen innerhalb der folgenden fünf Jahre erleiden.

Seit Jahren werden vermehrt Anstrengungen unternommen diese DTZ (Disseminierte Tumorzellen) zu finden und zu isolieren, um sowohl ihr Zirkulationsverhalten als auch ihre zell- und molekularbiologischen Besonderheiten zu verstehen.

Nachdem erstmals 1869 von T.R. Ashworth streuende Tumorzellen im Blut beobachtet wurden, sind Mitte des letzten Jahrzehnts die ersten DTZ beim Mammakarzinom vor allem in Knochenmarkbiopsaten regelmäßig, systematisch und erfolgreich gewonnen und beschrieben worden, so dass der Knochenmarksstatus bei verschiedenen Tumoren in die Liste der Prognosefaktoren eingegangen ist und somit einen wichtigen Anteil in der klinischen Beurteilbarkeit von malignen Tumoren inne hat. Untersuchung von Blutproben aus peripheren Venen, die wegen der besseren Zugänglichkeit und der geringeren Belastung für den Patienten vorzuziehen wären, sind bisher in weitaus geringerem Maße und mit deutlich geringerem Erfolg hinsichtlich der Aussagekraft durchgeführt worden.

In dieser Arbeit wurde also versucht, weitere Aussagen über das Disseminierungsverhalten dieser Tumoreinzelzellen zu machen, um nicht nur deren Zusammenhang mit der Organfernmetastasierung besser verstehen zu können, sondern auch um ein verbessertes Werkzeug, sowohl zur Früherkennung als auch zum Erkrankungsverlauf maligner Tumoren, neben einer möglichen Qualitätskontrolle bestimmter therapeutischer Maßnahmen zu entwickeln.

Dafür wurden 125 Blutproben von insgesamt 83 Patientinnen mit bekanntem Mammakarzinom aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg untersucht. Im Weiteren wurden 16ml Blut aus einer peripheren

Vene genommen und mit einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation die mononukleäre Zellfraktion gewonnen. Danach wurden mit einem 50nm Eisenpartikel konjugierte Antikörper die gegen den Oberflächenmarker CD45 gerichtet sind, welcher spezifisch von Leukozyten exprimiert wird, hinzugegeben. Mittels immunomagnetischer Zellsortierung erfolgt eine Depletion der Leukozyten und eine relative Anreicherung von potentiellen Tumorzellen. Letztere wurden auf einen speziellen Objektträger zentrifugiert, mit der APAAP-Methode für das Antigen Zytokeratin angefärbt und unter einem Mikroskop beurteilt. Dadurch ist es möglich, Tumorzellen einer 16ml Blutprobe auf einem Objektträger zu konzentrieren und die Detektionswahrscheinlichkeit zu erhöhen. Die zytologische Beurteilung der DTZ erfolgte durch einen Pathologen.

Die Tests mit den Verdünnungsreihen, mit denen wir durch verschiedene Konzentrationen mit Tumorzelllinien die Leistungsfähigkeit des AutoMACS im Vergleich mit dem schon etablierten VarioMACS untersucht haben, zeigten vergleichbare Detektionsraten zwischen beiden Systemen. Die Vorteile, die für das Benutzen des AutoMACS sprechen, sind die Automatisierung und damit Standardisierung einzelner Arbeitsschritte (geringere Fehlerrate) und nicht zuletzt die höhere Geschwindigkeit der Methode durch weniger Arbeitsschritte.

Das Ergebnis des Tumorzellnachweises im Rahmen dieser Arbeit (bei 29 von 83 Patientinnen konnten DTZ gefunden werden) stimmt prinzipiell mit den Literaturangaben überein.

In den darauf folgenden deskriptiven Auswertungen und Gruppenbildungen, bei denen wir die Patientenproben nach Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad, dem Vorhandensein von Metastasen, Hormonrezeptoren und dem therapeutischen Stadium einteilten, ließen sich vor allem in den einzelnen TNM-Stadien interessante Beobachtungen machen. So konnten wir eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Detektionsrate von DTZ und sowohl dem Lymphknotenstatus als auch dem Fernmetastasenstatus nachweisen. In der Gruppe der Patienten mit negativem Lymphknotenstatus konnten in 25% der Proben DTZ gefunden werden, während es in der Gruppe der Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus schon 54% waren. Bei der Gruppe ohne nachgewiesene Fernmetastasen waren in 30% der Proben DTZ zu finden, in der Gruppe mit vorbekannten Metastasen schon 75%.

Die Betrachtung der Gruppen in Hinblick auf die Tumorgröße und den Differenzierungsgrad zeigten deutliche Tendenzen (29% DTZ im T1-Stadium, 44% DTZ im T2-Stadium, 100% DTZ im T3-Stadium), hielten aber einer strengen statistischen Prüfung nicht stand. Das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein von Estrogen- oder Progesteronrezeptoren hatte in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Detektionsraten.

Die von uns gefunden statistisch signifikanten Korrelationen, welche die vermutete wichtige Rolle der DTZ am Metastasierungsprozess unterstreichen, wurden nach unserem Wissen in der aktuellen Literatur in diesem Rahmen noch nicht beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die gewählte Methode als suffizient erwiesen hat und es vorstellbar ist, dass mit diesen Ergebnissen in einiger Zeit ein Werkzeug zur Verfügung steht, welches dem klinisch tätigen Mediziner einen weiteren Baustein zur Beurteilung, den Verlauf und die Suffizienz der gewählten Therapie einer malignen Tumorerkrankung in die Hände gibt.

Weiterführende Studien sollten neben der allgemeinen Verbesserung der Methode und dem Erforschen des Zirkulationsverhaltens vor allem die molekularbiologische Charakterisierung der isolierten DTZ und die klinische Anwendbarkeit zum Ziel haben, um neue Therapiestrategien für diese Zellen zu entwickeln. Außerdem wäre es interessant zu prüfen, ob eine immunologische Eliminierung oder Reduktion der DTZ im zirkulierenden Blut einen Einfluss auf das metastasenfrem Intervall oder die Überlebenszeit hat.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1) Alves F, Contag S, Missbach M, Kaspareit J, Nebendahl K, Borchers U, Heidrich B, Streich R, Hiddemann W: An orthotopic model of ductal adenocarcinoma of the pancreas in severe combined immunodeficient mice representing all steps of metastatic cascade. *Pancreas* 23 (2001) 227-235
- 2) An XY, Egami H, Hayashi N, Kurusu Y, Yamashita JL, Ogawa M: Clinical significance of circulating cancer cells in peripheral blood detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in patients with breast cancer. *Tohoku J Exp Med* 2 (2001) 153-162
- 3) Ashworth TR: A case of cancer in which cells similar to those in the tumour were seen in the blood after death. *Aust Med J* 14 (1896) 146
- 4) Beckmann MW, Fasching PA, Gall C, Bani M, Brumm C, Krämer S: Genetische Risikofaktoren des Mammakarzinoms. *Der Gynäkologe* 35 (2002) 527-536
- 5) Beitsch PD, Clifford E. Detection of carcinoma cells in the blood of breast cancer patients: *Am J Surg* 180 (2000) 446– 8
- 6) Benez A, Geiselhart A, Handgretinger R, Schiebel U, and Fierlbeck G: Detection of circulating melanoma cells by immunomagnetic cell sorting: *J. Clin Lab Anal* 13 (1999) 229-233
- 7) Bennett JJ, Kooby DA, Delman K, McAuliffe P, Halterman MW, Ferderoff H, Fong Y: Antitumor efficacy of regional oncolytic viral therapy for peritoneally disseminated cancer. *J Mol Med* 78 (2000) 166-174
- 8) Berger U, Bettelheim R, Mansi JL, Easton D, Coombes RC, Neville AM: The relationship between micrometastases in bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis. *Am J Clin Pathol* 90 (1988) 1-6
- 9) Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, Holmgren L: Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 6407-6411
- 10) Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernandez P, Krygier G, Simonet F, Barrios E, Muse I, Osinaga E: Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Eur J Cancer* 36 (2000) 717-723
- 11) Berruti A, Dogliotti L, Mosca A, Bellina M, Mari M, Torta M, Tarabuzzi R, Bollito E,

- Fontana D, Angeli A: Circulating neuroendocrine markers in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 88 (2000) 2590-2597
- 12) Bertheau PH, Plassa LF, Lerebours F, de Roquancourt A, Turpin E, Lidereau R, de Thé H and Janin A: Allelic loss detection in inflammatory breast cancer: Improvement with Laser Microdissection. *Lab Invest* 81 (2001) 1397-1402
- 13) Bertwistle D and Ashworth A: Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes. *Curr Opin Genet Dev* 8 (1998) 14-20
- 14) Bilkenroth U, Taubert H, Riemann D, Rebmann U, Heynemann H and Meye A: Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation. *Int J Cancer* 92 (2001) 577-582
- 15) Bloom HJG, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 11 (1957) 359-377
- 16) Bockmann B, Grill HJ, Giesing M: Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors. *Biomol Eng* 17 (2001) 95-111
- 17) Borgen E, Beiske K, Trachsel S, Nesland JM, Kvalheim G, Herstadt TK, Schlichting E, Qvist H, Naume B: Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J Pathol* 185 (1998) 427-437
- 18) Braun S, Muller M, Hepp F, Schlimok G, Riethmuller G, Pantel K: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer* 90 (1998) 1099-101
- 19) Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer: *N Engl J Med*. 342:525-33 (2000).
- 20) Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmüller G and Pantel K: erbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Research* 61 (2001) 1890-1895
- 21) Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L: Mobilization of tumor cells and hematopoietic cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 83 (1994) 636-640
- 22) Campana D, Pui CH: Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85 (1995) 1416-1434
- 23) Chambers AF, Groom AC and MacDonald IC: Dissemination and growth of cancer

- cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer* 2 (2002) 563-572
- 24) Champelovier P, Mongelard F, and Seigneurin D: CK20 gene expression: technical limits for the detection of circulating tumor cells. *Anticancer Res.* 19 (1999) 2073-2078
- 25) Corey E, and Corey MJ: Detection of disseminated prostate cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): technical and clinical aspects. *Int J Cancer* 77 (1998) 655-673
- 26) Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 12 (1994) 475-82
- 27) De Luca A, Pignata S, Casamassimi A, D'Antonio A, Gridelli C, Rossi A, Cremona F, Parisi V, De Matteis A, Normanno N: Detection of circulating tumor cells in carcinoma patients by a novel epidermal growth factor receptor reversetranscription-PCR assay. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 1439-44
- 28) Diedrich K: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1. Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 2000
- 29) Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: Prognostic value comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 88 (1996) 1652-1658
- 30) Diel IJ, Solomayer EF, Bastert G: Mikrometastatische Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom. *Radiologie* 40 (2000) 681-687
- 31) Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmöller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstädter F, Rüschoff J: Multiple mutation analysis in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol* 154 (1999) 83-95
- 32) Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group: Ovarian ablation in early breast cancer: Overview of randomised trials. *Lancet* 348 (1996) 1189-1196
- 33) Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group: Polychemotherapie for early breast cancer: An overview of randomised trials. *Lancet* 352 (1998) 930-942
- 34) Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 339 (1992) 71-85
- 35) Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group: Tamoxifen for early breast cancer:

- an overview of randomised trials. *Lancet* 351 (1998) 1451-1467
- 36) Eaton MC, Hardingham JE, Kotasek D, Dobrovic A: Immunobead RT-PCR: a sensitive method for detection of circulating tumor cells. *Biotechniques* 22 (1997) 100-105
- 37) Engel H, Kleespies C, Friedrich H, Breidenbach M, Kallenborn A, Schondorf T, Kolhagen H and Mallmann P: Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics. *Br J Cancer* 81 (1999) 1165-1173
- 38) Fehm T, Sagalowsky A, Cifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C, Uhr J: Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 2073-2084
- 39) Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau W, Perkins JB, Janssen WE, Moscinski LC: Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 14 (1996) 1868-1876
- 40) Garau D, Regazzi E, Savaldo B, Sammarelli G, Rizzoli V and Carlo-Stella C: Detection of breast cancer cells using magnetic cell separation (MACS) system: implications for stem cell purging. *Eur J Histochem* 41 (Suppl 2) (1997) 17-18
- 41) 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 time follow up. *J Clin Oncol* 19 (2001) 3669-3674
- 42) Ghossein RA, Rosai J: Polymerase chain reaction of micrometases and circulating tumor cells. *Cancer* (1996) 100-106
- 43) Gross HJ, Verwer B, Houck D, Hoffman RA, Recktenwald D: Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as 10<sup>-7</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 537-41
- 44) Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Lebeau A, Permanetter W, Untch M: Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom. *MANUAL Mammakarzinome Tumorzentrum München* (2001)
- 45) 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* 69 (1994) 566-71
- 46) Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE, Eaton M, Pasoe VH and Dobrovic A: Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer by immuno-bead-PCR is a sensitive

- prognostic marker for relapse of disease. *Mol Med* 1 (1995) 789-794
- 47) Hermanek P: Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer Res* 19 (1999) 2771-2774
- 48) Hesch RD, Thommen A, Beckmann MW: Das Mammakarzinom: Molekularpathologie – Molekulargenetik – Präventionsstrategien. *Der Gynäkologe* 30 (1997) 969-976
- 49) Hilakivi-Clarke L: Estrogens, BRCA1, and breast cancer. *Cancer Research* 60 (2000) 4993-5001
- 50) Hirsch-Ginsberg C: Detection of minimal residual disease: relevance for diagnosis and treatment of human malignancies. *Annu Rev Medicine* 49 (1998) 111-122
- 51) Hochtlen-Vollmar W, Gruber R, Bodenmüller H, Felber E, Lindemann F, Passlick B, Schlimok G, Pantel K, Riethmüller G: Occult epithelial tumor cells detected in bone marrow by an enzyme immunoassay specific for cytokeratin 19. *Int J Cancer* 70 (1997) 396-400
- 52) Hu XC, Chow LWC: Fine needle aspiration may shed breast cells into peripheral blood as determined by RT-PCR: *Oncology* 59 (2000) 217-222
- 53) Hu XC, Wang Y, Shi DR, Loo TY, Chow LW: Immunomagnetic tumor cell enrichment is promising in detecting circulating breast cancer cells. *Oncology* 64 (2003) 160– 5
- 54) Iinuma H, Okinag K, Adachi M, Suda K, Sekine T, Sakagawa K, Baba Y, Tamura J, Kumagai H and Ida A: Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 an K-ras genes in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 89 (2000) 337-344
- 55) Isbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, Rehders A, Bush C, Niendorf A, Passlick B, Broelsch CE, Pantel K: Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely esophageal cancer. *N Engl J Med* 337 (1997) 1188-1194
- 56) Karrison TG, Ferguson TJ, Meier P: Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* 91 (1999) 80-85
- 57) Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Sliwinska K, Neumann R, Schindler AE, Seeber S: Evaluation of different methods for the detection of minimal residual disease in blood and bone marrow of patients with primary breast cancer: importance for clinical use? *Breast Cancer Res Treat* 69 (2001) 123–32.
- 58) Kim SJ, Ikeda N, Shiba E, Takamura Y, Noguchi S: Detection of breast cancer

- micrometastases in peripheral blood using immunomagnetic separation and immunocytochemistry. *Breast Cancer* 8 (2001) 63–9
- 59) Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G: Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 4494-4499
- 60) Klein CA: The biology and analysis of single disseminated tumor cells. *Trends in Cell Biology* 10 (2000) 489-493
- 61) Köllermann J, Heseding B, Helpap B, Köllermann MW, Pantel K: Comparative immunocytochemical assessment of isolated carcinoma cells in lymph nodes and bone marrow of patients with clinically localized prostate cancer. *Int J Cancer* 84 (1999) 145-149
- 62) Kraeft SK, Sutherland R, Gravelin L, Hu GH, Ferland LH, Richardson P, Elias A, Chen LB: Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 434-42
- 63) Krag DN, Ashikaga T, Moss TJ, Kusminsky RE, Feldman S, Carp NZ, et al.: Breast cancer cells in the blood: a pilot study. *Breast J* 5 (1999) 354–8
- 64) Krismann M, Todt B, Schröder J, Gareis D, Müller KM, Seeber S, Schütte J: Low specificity of cytokeratin 19 reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol* 13 (1995) 2769-2775
- 65) Krueger W, Datta C, Badbaran A, Togel F, Gutensohn K, Carrero I et al: Immunomagnetic tumor cell selection-implications for the detection of disseminated cancer cells. *Transfusion* 40 (2000) 1489–93
- 66) Kruger W, Togel F, Rösing S and Zander AR: Improvement of breast cancer cell detection by immunomagnetic enrichment. *Cytotherapy* 1 (1999) 135-139
- 67) Landys K, Persson S, Kovarik J, Hultborn R, Holmberg E: Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 49 (1998) 27–33.
- 68) Leinung ST, Würfl P, Schönfelder A, Weiss CL, Roder I and Schönfelder M: Detection of cytokeratin-positive cells in bone marrow in breast cancer and colorectal carcinoma in comparison with other factors of prognosis. *J Hematother Stem Cell Res* 6 (2000 [a]) 905-1011
- 69) Leinung ST, Würfl P, Schönfelder A, Weiss CL, Roder I and Schönfelder M: Rating of disseminated isolated tumor cells in bone marrow in comparison with other factors of

- prognosis in breast carcinoma I *Journal of Surgical Investigation* 2 (2000 [b]) 193-202
- 70) Lopez-Guerrero JA, Bolufer-Gilabert P, Sanz-Alonso M, Barragan-Gonzalez E, Palau-Perez J, De la Rubia-Comos J, Sempere-Talens A, Bonanad-Boix S: Minimal illegitimate levels of cytokeratin K19 expression in mononucleated blood cells detected by a reverse transcription PCR method (RT-PCR). *Clin Chim Acta* 263 (1997) 105-16
- 71) Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC: Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* 354 (1999) 197– 202
- 72) Manzotti M, Dell'Orto P, Maisonneuve P, Zurrida S, Mazzarol G and Viale G: Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Int J Cancer* 95 (2001) 307.312
- 73) Martin KJ, Graner E, Li Y, Price LM, Kritzman BM, FournierMV, et al.:High-sensitivity array analysis of gene expression for the early detection of disseminated breast tumor cells in peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 2646– 51
- 74) Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Öhl S, Radbruch A, Miltenyi S and Schmitz J: Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from periperal blood by MACS. *Exp. Hematol.* 26 (1998) 252-264
- 75) Mehes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF: Circulating breast cancer are frequently apoptotic. *Am J Pathol* 159 (2001) 17-20
- 76) Meye A, Bilkenroth U, Schmidt U, Fuessel S, Robel K, Melchior AM et al.: Isolation and enrichment of urologic tumor cells in blood samples by a semi-automated CD45 depletion AutoMACS protocol. *Int J Oncol* 20 (2002) 521–30
- 77) Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P: Immuncytochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res* 47 ( 1987) 2883-1891
- 78) Naume B, Borgen E, Nesland JM, Beiske K, Herstadt TK, Ravnas G, Renolen A, Trachsel S, Thranestehen K, Funerud S and Kvalheim G: Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone-marrow/peripheral-blood stem-cell products from breast-cancer patients by negative immunomagnetic separation. *Int J Cancer* 78 (1998) 556-560
- 79) Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Sauer T, Kumar T, Nesland JM: Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperativ clinical parameters and primary tumor

- characteristics. *Clinical Cancer Research* 12 (2001) 4122-4129
- 80) Oefelein MG, Kaul K, Herz B, Blum MD, Holland JM, Keeler TC, Cook WA and Ignatoff JM: Molecular detection of prostate epithelial cells from surgical field and peripheral circulation during radical prostatectomy. *The Journal of Urology* 155 (1996) 238-242
- 81) Offener S, Schmaus W, Witter K, Baretton G, Schlimok G, Passlick B, Riethmüller G, Pantel K: P53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 6942-6946
- 82) Ooka M, Sakita I, Fujiwara Y, Tamaki Y, Yamamoto H, Aihara T, Miyazaki M, Kadota M, Masuda N, Sugita Y, Iwao K, Monden M: Selection of mRNA markers for detection of lymph node micrometastases in breast cancer patients. *Oncol Rep* 7 (2000) 561-6
- 83) Pantel K and Otte M: Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumor cells. *Seminars in Cancer Biology* 11 (2001) 327-337
- 84) Pantel K, Cote RJ and Fodstad O: Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91 (1999) 1113-1124
- 85) Pantel K, Enzmann T, Kollermann J, Caprano J, Riethmüller G, Kollermann MW: Immunocytochemical monitoring of micrometastatic disease: reduction of prostate cancer cells in bone marrow by androgen deprivation. *Int J Cancer* 71 (1997) 521-525
- 86) Pantel K, Müller Volkmar, Auer Margeritha, Nusser Nathalie, Harbeck Nadja, Braun Stephan: Detection and Clinical Implications of Early Systemic Tumor Cell Dissemination in Breast Cancer. *Clin Cancer Research* 9 (2003) 6326-6334
- 87) Pantel K, von Knebel-Doeberitz M: Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Current Opinion in Oncology* 12 (2000) 95-101
- 88) Pantel K, von Knebel-Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmüller G: Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien. *Chirurg* 68 (1997) 1241-1250
- 89) Pantel K: Detection of minimal disease in patients with solid tumors. *J Hematother* 5 (1996) 359-367
- 90) Pantel K, Schlimock G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmüller G: Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 3 (1994) 165-173

- 91) Papac RJ: Bone marrow metastases. *Cancer* 74 (1994) 2403-2413
- 92) Pauslon TG, Galipeau PC, Reid PJ: Loss of heterozygosity analysis using whole genome amplification, cell sorting and fluorescence PCR. *Genome Res* 9 (1999) 482-491
- 93) Putz E, Witter K, Offner S, Stosiek P, Zippelius A, Johnson J, Zahn R, Riethmüller G, Pantel K: Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* 59 (1999) 241-248
- 94) Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LWMM and Uhr JWÖ: Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 4589-4594
- 95) Rath FW und Schönfelder M: Weichteilsarkome des Erwachsenen: Standards, Molekularbiologie, Perspektiven. *Beiträge zur Onkologie* 56, Karger Verlag Freiburg, Basel 2002
- 96) Remmele W, Stegner HE: Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8 (1987) 138-140
- 97) Ridewski K, Meyer F, Fahlke J, Kasper U, Roessner A, Lippert H: Klinik und Forschung: Stellenwert von Cytokeratin- und CA19-9-Antigen im immunhistologischen Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten beim Pankreaskarzinom. *Der Chirurg* 8 (2001) 920-926
- 98) Riede U-N, Schaefer H-E: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4.Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999
- 99) Ross JS, Fletscher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ: The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *The Oncologist* 8 (2003) 307-325
- 100) Singletary SE, Larry L, Trucker SL, Spitzer G: Detection of micrometastatic tumor cells in bone marrow of breast carcinoma patients. *J Surg Oncol* 47 (1991) 32-36
- 101) Slade MJ, Smith BM, Sinnet HD, Cross NCP, Coombes RC: Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastasis in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 17 (1999) 870-879
- 102) Smith BM, Stade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnet HD, Gross NC, Coombes RC: Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and

- immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 18 (2000) 1432-1439
- 103) 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* 7 (2001) 4102– 8
- 104) Stathopoulou A, Vlachonikotis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulis: Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 20 (2002) 3404-3412
- 105) Storjohann HE: Immunhistologie in der täglichen Praxis. *Mta* 13 (1998) 236-241
- 106) Sugio K, Kase S, Sakada T, Yamazaki K, Yamagucci M, Ondo K, Yano T: Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and [beta]-catenin: Risk assessment by immunohistochemistry. *Surgery* 131 (2002) 226-231
- 107) Taubert H: Molekularpathologische Untersuchungen von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen in Weichteilsarkomen. MLU-Halle-Wittenberg, Habilitationsarbeit (1999)
- 108) Taubert H, Blümke K, Bilkenroth U, Meye A, Kutz A, Bartel F, Lautenschläger C, Ulbrich EJ, Nass N, Holzhausen HJ, Koelbl H and Lebrecht A: Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gynecologic Oncology* 92(2004) 256–261
- 109) Terstappen LW, Rao C, Gross S, Weiss AJ: Peripheral blood tumor cell load reflects the clinical activity of the disease in patients with carcinoma of the breast. *Int J Oncol* 17 (2000) 573-578
- 110) Uchikura K, Takao S, Nakajo A, Miyazono F, Nakashima S, Tokuda K, Masumoto M, Shinchi H, Natsugoe S, Aikou T: Intraoperative molekular detection of circulating tumor cells by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with biliary-pancreatic cancer is associated with haematogenous metastasis. *Ann Surg Oncol* 9 (2002) 364-370
- 111) Vogel I, Kruger U, Marxsen J, Soeth E, Kalthoff H, Henne-Bruns D, Kremer B, Juhl H: Disseminated tumor cells in pancreatic cancer patients detected by immunocytology: a new prognostic factor. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 593-599
- 112) Von Knebel-Doeberitz M and Lacroix J: Nucleic acid based techniques for the detection of rare cancer cells in clinical samples. *Cancer Metast Rev* 18 (1999) 43-64

- 113) Wagener C: Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren. Georg Thieme Verlag, 2. Aufl. Stuttgart, New York, 1999
- 114) Weihrauch MR, Skibowski E, Draube A, Geller A, Tesch H, Diehl V, et al: Immunomagnetic enrichment and detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with epithelial malignancies. *Clin Exp Metastasis* 19 (2002) 617–21
- 115) Weiss JM, Diedrich K, Ortmann O: Chemoprävention des Mammakarzinoms durch Tamoxifen und Raloxifen. *Der Gynäkologe* 36 (2003) 97-102
- 116) Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfahrt C, von Knebel Doeberitz M: Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 4 (1998) 343-348
- 117) Wittekind C and Wagner G: TNM Klassifikation maligner Tumoren. 3.Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1997
- 118) Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, Roche PC, Ingle JN, Grant C: Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 1085–91
- 119) Woelfle U, Cloos J, Riethdorf L, Jänicke F, Sauter G, Brakenhoff R, Pantel K: A new role of cytokeratines as micrometastases-suppressors in primary breast cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 44 (2003) 118
- 120) Wörmann B, Wulf GG, Griesinger F, Hiddemann W: Sensitiver Nachweis disseminierter Tumorzellen – Prognostische Bedeutung und Therapieansätze. *Internist* 38 (1997) 1083-1091
- 121) Xu CF, Greenman J, Solomon E: Truncated TSG101 transcripts are present in peripheral blood from both familial breast cancer patients and controls. *Eur J Cancer* 34 (1998) 1077-80
- 122) Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikowsky M, Lutz D: Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 17 (1999) 2015-2019
- 123) Zehentner BK: Detection of disseminated tumor cells: strategies and diagnostic implications. *Expert Mol Diagn* 2 (2002) 41-48
- 124) Zeidmann I: The fate of circulating tumor cells. I. Passage of cells through capillaries. *Cancer Re* 21 (1961) 38-39
- 125) Zigeuner RE, Riesenberger R, Pohla H, Hofstetter A and Oberneder R.

Immunomagnetic cell enrichment detects more disseminated tumor cells than immunocytochemistry in vitro. *The Journal of Urology* 164 (2000) 1834-1837

- 126) Zippelius JR, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G, Riethmüller G and Pantel K: Limitations of reverse-transcriptase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol* 15 (1997) 1702-1708

## 9 Anlagen

Stadium	Erläuterung
<b>pT – Primärtumor</b>	
pT0	Primärtumor nicht nachweisbar
pT1a	Tumor mit Durchmesser von 0,5cm oder weniger
pT1b	Tumor > 0,5cm bis 1,0cm
pT1c	Tumor > 1,0cm bis 2,0cm
pT2a / pT2b	Tumor > 2,0cm bis 5,0cm ohne / mit Fixierung an der darunter liegenden Pectoralis-Faszie und/oder dem Muskel
pT3a / pT3b	Tumor > 5,0cm ohne / mit Fixierung an der darunter liegenden Pectoralis-Faszie und/oder dem Muskel
pT4a	Tumor irgendeiner Größe mit Fixierung an der Brustwand
pT4b	Tumor irgendeiner Größe mit Ödem, Infiltration oder Ulzeration der Brustdrüsenwand oder Satelliten nur im Bereich der gleichen Brustdrüse
pT4c	
pTx	Kombination von pT4a und pT4b Ausmaß der Invasion kann nicht bestimmt werden
<b>pN – Lymphknoten</b>	
pN0	kein Nachweis einer Invasion regionärer Lymphknoten
pN1	Nachweis einer Invasion von beweglichen homolateralen Achsellymphknoten
pN1a / pN1b	Mikrometastasierung, Größe < 0,2cm/Makrometastasierung, Größe>0,2cm <ul style="list-style-type: none"> <li>I / II in ein bis drei / vier oder mehr Lymphknoten</li> <li>III Metastase breitet sich über die Kapsel hinaus aus</li> <li>IV positive Lymphknoten von &gt; 2,0cm Größe</li> </ul>
pN2	Nachweis der Invasion homolateraler Achsellymphknoten, die aneinander oder an eine andere Struktur fixiert sind
pN3	Nachweis der Invasion homolateraler supraclaviculärer oder infraclaviculärer Lymphknoten
pNx	Das Ausmaß der Invasion kann nicht bestimmt werden
<b>pM – Metastasen</b>	
pM0	kein Nachweis von Fernmetastasen
pM1	Nachweis von Fernmetastasen
pMx	Die Minimalanforderungen zur Bestimmung werden nicht erfüllt

Tabelle 20: TNM Klassifizierung für Mammakarzinome

## 10 Thesen

1. Das Mammakarzinom, ein hormonabhängiger heterogener maligner Tumor, ist unter anderem durch seine Fähigkeit zur frühen Streuung von Tumorzellen, damit zur Metastasensetzung und wesentlichen Beeinflussung des Krankheitsverlaufes und der Prognose gekennzeichnet.
2. Trotz der Tatsache, dass bei 95% der Frauen mit Mammakarzinom keine Hinweise auf Metastasen vorliegen, erleidet ein Drittel innerhalb der ersten 5 Jahre, da oft nicht präventiv therapiert, einen Rückfall durch Tochtergeschwülste.
3. Klinisch lassen sich Metastasen durch radiologische Verfahren erst ab etwa einem Tumordurchmesser von 1cm (ca.  $10^9$  Zellen) sicher diagnostizieren, wohingegen die Disseminierung viel früher erfolgen kann.
4. DTZ sind trotz bisher unklarer klinischer Bedeutung als das wichtigste Bindeglied zwischen Primärtumor und den abgesiedelten Metastasen zu betrachten, somit kommt einem erweiterten Verständnis des biologischen Verhaltens der DTZ eine zentrale Bedeutung zu.
5. Bisherige Detektionsverfahren haben vor allem Knochenmarkbiopate benutzt und dort Zusammenhänge mit dem klinischen Stadium des Mammakarzinoms und dessen Disseminierungsverhalten beschrieben.
6. Peripheren Blutproben eignen sich aufgrund der einfachen Gewinnung, der geringeren Patientenbelastung und der geringeren Intervention besser als Knochenmarkbiopate für Untersuchungen zur Detektion von DTZ.
7. Die AutoMACS-Methode in Kombination mit der Ficolllichtgradientenzentrifugation hat sich wegen ihrer Standardisierung, der geringeren Fehlerquellen (im Vergleich zu manuellen Verfahren) und der Möglichkeit der parallelen Bearbeitung von Proben im Vergleich zur VarioMACS-Methode als überlegen erwiesen, und damit das Potenzial als Screeningverfahren etabliert zu werden.

8. Es konnten 261 CK<sup>+</sup> DTZ bei 29 von 83 (35%) Patientinnen bzw. 33 von 125 (26%) Blutproben bei Patientinnen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom detektiert werden.
9. Sowohl der Lymphknoten- als auch der Metastasenstatus zeigen eine statistisch signifikante Korrelation mit der Detektionsrate von DTZ und damit indirekt mit der absoluten Anzahl zirkulierender Tumoreinzellen.
10. Der Einfluss der Tumorgröße und des Differenzierungsgrades des Tumorgewebes auf die Detektionsraten lassen durch Beobachtung der Daten eine direkte Proportionalität erkennen, welche zwar einer strengen statistischen Prüfung nicht genügen, die aber Vermutung über einen Zusammenhang durchaus zulassen.
11. Das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein von Estrogen- oder Progesteronrezeptoren an den Zelloberflächen des Tumors korreliert nicht mit dem Auftreten von DTZ.
12. Mit dieser Methode ist es möglich eine disseminierende Mammakarzinomerkrankung sehr frühzeitig zu erkennen, ihrem Verlauf zu beobachten und eine Qualitätskontrolle einzelner Therapieverfahren zu ermöglichen.
13. Weiterführende Studien sollten vor allem die bisher unverstandene Rolle von DTZ untersuchen. Außerdem scheint es sinnvoll, die AutoMACS-Methode im Monitoring bei Therapieverfahren weiter zu entwickeln und zu etablieren. Auch könnte eine Untersuchung viel versprechend sein, die den Einfluss eliminiertes DTZ aus dem Blutkreislauf auf das metastasenfreie Intervall und die Überlebenszeit der betroffenen Patientinnen erforscht.

## **Publikation:**

Teile dieser Arbeit wurden im Folgenden publiziert:

**Taubert H, Blümke K, Bilkenroth U, Meye A, Kutz A, Bartel F, Lautenschläger C, Ulbrich EJ, Nass N, Holzhausen HJ, Koelbl H and Lebrecht A:** Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gynecologic Oncology* 92 (2004) 256–261

## Tabellarischer Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Vor- und Zuname: Andreas Odparlik (geb. Kutz)  
Geburtsdatum: 14. Februar 1973  
Geburtsort: Halle/Saale  
Familienstand: verheiratet  
Wohnsitz: Weimar / Thüringen

### **Schulbildung**

1979 – 1989 Besuch der POS „Ernst-Schneller“ in Halle  
1989 – 1990 Mathematik/Physik – Abitur an der Pädagogischen  
Hochschule Halle-Köthen in Dessau  
1996 Allgemeine Hochschulreife für Autodidakten am  
Regierungspräsidium Halle / Saale

### **Wehrdienst**

1992 – 1993 Wehrdienst in Kassel und Hohenmölsen

### **Studium**

1990 – 1996 Studium der Mathematik, Physik und Informatik an den  
Universitäten Halle und Jena  
1996 – 2002 Studium der Zahnmedizin und Medizin an den Universitäten  
Halle, Greifswald, Pretoria und Bern

### **Berufliche Laufbahn**

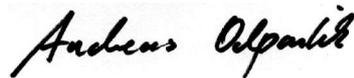
2003 Arzt im Praktikum in den neurologischen Abteilungen des BG-  
Klinikum „Bergmannstrost“ in Halle und an der Zentralklinik  
Bad Berka  
bis 06/2004 Arzt im Praktikum am Institut für Diagnostische Radiologie  
des Klinikum Erfurt  
seit 07/2004 Assistenzarzt am Institut für Diagnostische Radiologie  
des Klinikum Erfurt

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir mittelbar oder unmittelbar geldwertige Leistungen erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.



Andreas Odparlik

Halle, den 12. Oktober 2004

## Danksagung

Am Ende ist es mir eine angenehme Pflicht, mich bei denen zu bedanken, die mir für das Gelingen dieser Arbeit besonders wichtig waren.

Zuerst geht mein Dank natürlich an Herrn Prof.Dr.med.habil F.W.Rath für die Überlassung dieses interessanten Themas.

Ausserdem gilt mein Dank den Kollegen der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der MLU-Halle Herrn Prof. Dr. med. H. Kölbl und Frau Dr.med. A. Lebrecht für das unkomplizierte und zuverlässige Bereitstellen der Patientenproben.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei Dr.rer.nat. A. Meye bedanken, der trotz vielfacher Höhen und Tiefen und der doch stetig wechselnden Entfernungen, die dies alles sicher nicht einfacher gemacht haben mir als „naturwissenschaftlicher“ Betreuer immer mit Geduld zur Seite stand.

Herrn OA Dr.med. U.Bilkenroth gilt mein Dank für die mit viel Arbeit verbundene Auswertung der Cytospinpräparate und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr.rer.nat.habil H.Taubert in seiner Eigenschaft als Arbeitsgruppenleiter, bei dem viele Dinge sehr unbürokratisch möglich waren.

Ebenso dem technischen Personal der zellbiologischen AG der Pathologie der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, namentlich vertreten durch Frau G. Bauer, die mir doch das eine- oder andere mal das Leben beträchtlich erleichtert haben.

Und nicht zuletzt meiner Frau – Frau Dipl.-Humanbiol. Sabine Odparlik- für Ihre Tips, Ihren Ansporn und Ihr Kontrolllesen.