

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

***Nachweis von disseminierten Tumorzellen im
Knochenmark bei Patientinnen mit primärem, nicht-
metastasiertem Mammakarzinom und
Charakterisierung der Her-2/neu- Expression über
immunzytochemische Doppelfärbungen***

Dissertation

*zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin*


*der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen*

vorgelegt von

Robert Andreas Bachmann

2006

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



***Nachweis von disseminierten Tumorzellen im
Knochenmark bei Patientinnen mit primärem, nicht-
metastasiertem Mammakarzinom und
Charakterisierung der Her-2/neu- Expression über
immunzytochemische Doppelfärbungen***

Dissertation
*zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin*

*der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen*

*vorgelegt von
Robert Andreas Bachmann*

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. E.-F. Solomayer

2. Berichtstatter: Professor Dr. W. Simon

In memoriam patris mei

1. Einleitung	1
1.1. Das Mammakarzinom	1
1.2. Tumorzell dissemination und klinische Bedeutung	3
1.3. Biologische Eigenschaften disseminierter Tumorzellen	5
1.4. Problemstellung	6
1.5. Zielsetzung	7
2. Material und Methoden	8
2.1. Versuchsplan	8
2.2. Material.....	8
2.2.1. Patientenkollektiv	8
2.2.2. Geräte	9
2.2.3. Chemikalien.....	10
2.2.4. Antikörper und Antikörperkonjugate	10
2.2.5. Pufferlösungen.....	10
2.2.6. Zelllinien.....	11
2.3. Methoden.....	11
2.3.1. Techniken/ Grundlagen	11
2.3.1.1. Detektion hämatogen disseminierter Tumorzellen.....	11
2.3.1.2. Zytokeratine.....	12
2.3.1.3. EGFR- Familie	13
2.3.1.4. Immunfluoreszenzfärbung.....	17
2.3.1.5. Antikörper.....	20
2.3.1.6. Markierung der Antikörper.....	23
2.3.2. Vorgehen	25

2.3.2.1. Zellentnahme	25
2.3.2.2. Zellpräparation	25
2.3.2.3. Zytospin- Präparation	27
2.3.2.4. Färbung.....	31
2.3.2.5. Analyse gefärbter Zellen	33
2.3.3. Immunhistochemische Färbung des Primärtumors	40
2.3.4. Abgleich mit Datenbank Tumorcharakteristik	41
2.3.5. TNM- Klassifikation	41
2.3.6. Statistische Methoden.....	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Patientenkollektiv	43
3.2. Knochenmarkbefund	44
3.2.1. Knochenmarkbefunde bei Patientinnen.....	44
3.2.2. Kontrollfärbung anhand tumorspezifischer Zelllinien	48
3.3. Nachweis disseminierter Tumorzellen	50
3.4. Her-2/neu-Expression disseminierter Tumorzellen.....	52
3.5. Heterogenität der Her-2/neu- Expression unter disseminierten Tumorzellen.....	55
3.6. Heterogenität der Her-2/neu- Expression zwischen disseminierten Tumorzellen und dem Primärtumor.....	56
4. Diskussion.....	58
5. Zusammenfassung	69
6. Literaturverzeichnis	72

Abb. 1: Mammakarzinom: Inzidenz und Mortalität	2
Abb. 2: Her (erbB)- Familie mit ihren aktivierenden Liganden.....	16
Abb. 3: Ursachen der Her-2/neu- Überexpression	17
Abb. 4: Technik der direkten und indirekten Immunfluoreszenz.....	19
Abb. 5: Herstellung monoklonaler Antikörper.....	22
Abb. 6: Eigenschaften des Fluorochroms FITC	24
Abb. 7: Eigenschaften des Fluorochroms Texas Red.....	25
Abb. 8: Isolation mononukleärer Zellen I	28
Abb. 9: Isolation mononukleärer Zellen II.....	29
Abb. 10: Isolation mononukleärer Zellen III.....	30
Abb. 11: Färbeautomat von Dako Cytomation.....	33
Abb. 12: Fluoreszenzmikroskop „Axiophot“ von Zeiss.....	34
Abb. 13: Kontrollzelllinien.....	35
Abb. 14: Tumorzellklassifizierung.....	39
Abb. 15: Auswertungskriterien für disseminierte Tumorzellen	39
Abb. 16: Hercep- Test von Dako.....	41
Abb. 17: Zytokeratin- positive Tumorzelle	45
Abb. 18: Her-2/neu-positive Tumorzelle	46
Abb. 19: Zytokeratin- positive/ Her-2/neu- positive Tumorzelle.....	47
Abb. 20: MCF- 7- Zelle.....	48
Abb. 21: SKBr- 3- Zelle	49
Abb. 22: Einteilung der Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen	53
Abb. 23: Homo-/ Heterogenität der Her-2/neu- Expression.....	55

Tab. 1: Ein- und Ausschlusskriterien der Patientinnen.....	9
Tab. 2: Einteilung der disseminierten Tumorzellen.....	36
Tab. 3: Klinische Daten der Patientinnen.....	44
Tab. 4: Klinische Daten der Patientinnen und Tumorzell dissemination.....	51
Tab. 5: Immunphänotyp der disseminierten Tumorzellen.....	52
Tab. 6: Klinische Daten der Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen und Charakterisierung hinsichtlich Her-2/neu- Expression.....	54
Tab. 7: Heterogenität der Her-2/neu- Expression.....	56
Tab. 8: Korrelation zwischen dem Her-2/neu- Status des Primärtumors und dem Her- 2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen.....	57
Tab. 9: Korrelation des Her-2/neu- Status von Primärtumor und Metastasen zu disseminierten Tumorzellen (DTC).....	67

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

Die Mehrzahl der Krebsneuerkrankungen und der malignombedingten Todesfälle in den westlichen Industrieländern wird durch Karzinome verursacht. Karzinome entstehen per definitionem aus maligne entarteten Zellen epithelialen Ursprungs. Karzinome der Lunge, des Darmes und der Brust sind dabei die am häufigsten betroffenen Organsysteme.

Das Mammakarzinom ist zurzeit epidemiologisch nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die häufigste Todesursache bei Frauen. Es nimmt hier unter den malignomverursachten Todesfällen vor dem Kolon- und Rektumkarzinom die erste Stelle ein. Dem Robert Koch Institut zufolge beträgt das mittlere Lebenszeitrisko von Frauen an Brustkrebs zu erkranken 9,2%; somit erkrankt durchschnittlich jede 11. Frau im Lauf ihres Lebens an Brustkrebs.⁸³ Zudem ist Brustkrebs die wichtigste Krebserkrankung bei jüngeren Frauen: Im Alter zwischen 35 und 59 Jahren werden 40% der Krebsneuerkrankungen diagnostiziert; knapp 30% der Krebstodesfälle werden in dieser Altersgruppe durch Brustkrebs verursacht.

Schätzungen der Dachdokumentation Krebs des Robert Koch Institut gehen von jährlich 47.500 Brustkrebsneuerkrankungen in Deutschland aus. Brustkrebs hat damit einen Anteil von 24% bei den Krebsneuerkrankungen der Frauen und ist im Alter von 40 bis 50 Jahren die häufigste Krebsneuerkrankung. Auch bei der Krebssterblichkeit belegt Brustkrebs mit 18% den ersten Rang bei den Frauen. Im Jahr 2003 verstarben laut Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes 17.173 Frauen an Brustkrebs. Seit den 90-iger Jahren ist die Brustkrebsmortalität in Deutschland bei steigender Inzidenz rückläufig.⁶ Zurückgeführt wird dies in erster Linie auf Fortschritte in der Therapie und nur zu einem geringeren Teil in Veränderungen bei der Prävalenz von Risikofaktoren oder der Einführung von Screeningprogrammen.⁶

Weibliche Brustdrüse

Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität in Deutschland 1970–2000
Erkrankungen pro 100.000

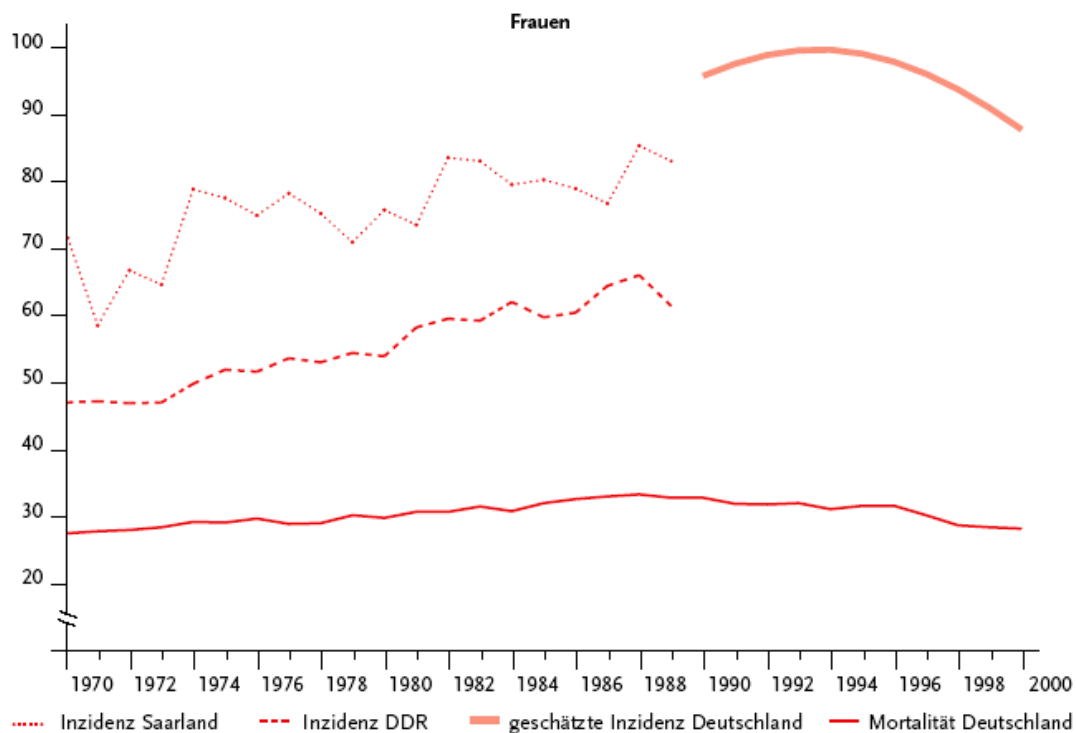


Abbildung 1: Entwicklung Inzidenz u. Mortalität in Deutschland 1970-2000
(entnommen aus: Dachdokumentation Krebs des Robert Koch Institut)

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist weitgehend unbekannt. Eine Reihe von Faktoren ist bekannt, die das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, erhöhen. Dazu gehören Faktoren des Lebensstils, der hormonelle Status und die genetische Disposition.³ Eine genetische Disposition wird in der Literatur bei 5 bis 10% der Brustkrebserkrankungen als Ursache beschrieben.²⁰ Als verantwortlich werden zwei Gene gesehen: BRCA- 1 und BRCA- 2. Trägerinnen dieser Gene haben mit 80 bis 85% ein deutlich erhöhtes Risiko, in ihrem Leben an Brustkrebs zu erkranken.⁹³

Bei 90 bis 95 % der Fälle sind demnach andere Faktoren ursächlich: Steigendes Lebensalter erhöht das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken.¹ Darüber hinaus werden reproduktive Faktoren, wie eine frühe Menarche, eine späte erste Schwangerschaft, eine geringe Anzahl an Schwangerschaften, keine oder eine nur kurze Stillphase und eine späte Menopause, diskutiert.

Aber auch zivilisatorische Faktoren wie Alkoholkonsum, Rauchen, geringe körperliche Aktivität und Strahlenbelastung werden als Risikofaktoren gesehen.²

Entscheidend für die Prognose bei Brustkrebs ist der TNM-Status, also Tumorgröße, Nodalstatus und Fernmetastasierung. Zusätzliche Kriterien sind die Tumormorphologie (Grading I - III, histologischer Typ und peritumorale Lymphgefäßinvasion) und der Steroidhormonrezeptorstatus.⁴³ Prädiktive Faktoren – diese sind für das Therapieansprechen entscheidend - sind der Hormonrezeptorstatus, der Menopausenstatus und der Her-2/neu- Status.

Daneben sind weitere Prognosefaktoren in der Diskussion, die vor allem tumorbiologische Kriterien zu berücksichtigen helfen. Dazu gehören beispielsweise Plasminogenaktivatoren vom Urokinasetyp (uPA) und die Plasminogenaktivatorinhibitoren (PAI- 1/ 2), deren genaue prognostische Bedeutung noch evaluiert werden muß.^{54;56} Desweiteren gehört der immunzytochemische Nachweis von disseminierten epithelialen Tumorzellen im Knochenmark zu diesen neuen Prognosefaktoren.¹⁸ Neuesten Erkenntnissen zufolge ist die Tumorzeldissemination in das Knochenmark als ein unabhängiger Risikofaktor zu betrachten.¹⁹ Im Rahmen dieser Arbeit sollen zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich Tumorzeldissemination gewonnen werden.

1.2. Tumorzeldissemination und klinische Bedeutung

Mammakarzinome zeigen eine große Variabilität in ihrem biologischen Verhalten. So kommt es trotz Berücksichtigung der etablierten prognostischen und prädiktiven Faktoren zu Schwierigkeiten bei der individuellen Einschätzung des Verlaufs und der daran angepassten Therapie. Die Ursache dieser Variabilität ist unklar. Ein Faktor von entscheidender Bedeutung könnte die hämatogene Tumorzeldissemination sein.

Hämatogene Tumorzeldissemination ist definitionsgemäß ein Auftreten von Zellen des Primärtumors in tumorfernen Körperkompartimenten über den Systemkreislauf. Dies gilt als ein wichtiger Schritt im komplexen Prozess der Metastasierung.^{30;89;96} Dabei wird in der Tumorzeldissemination ein sehr frühes Stadium der Metastasierung gesehen, die vor allem durch das Auftreten von

Einzelzellen geprägt ist. Abzugrenzen hiervon ist die Mikrometastasierung, die als Zellkomplexe größer 0.2 mm definiert ist und bereits Stromainvasion zeigt. Prognostische und therapeutische Relevanz gewinnt dies unter anderem dadurch, dass die Tumorzell dissemination im Gegensatz zu der Mikrometastasierung reversibel ist und somit kurativ therapiert werden kann, wohingegen eine Mikrometastasierung eine palliative Situation darstellt.⁸⁸

Bei einem Teil der Patientinnen lassen sich bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose auch bei negativem Lymphknotenstatus hämatogen disseminierte Tumorzellen in Blut und Knochenmark nachweisen.¹⁶ Neuesten Erkenntnissen zufolge, die diesen Zellen ein bedeutendes Potential in der Tumorprogression zusprechen, werden diese als ein unabhängiger Risikofaktor betrachtet.¹⁹ Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass der immunzytologische Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.^{9;16;17;22;28;39;44;89;89} In Langzeitstudien konnte weiterhin dargestellt werden, dass 40 bis 60% der Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen kein Rezidiv entwickeln.^{58;59} Somit reicht der alleinige Nachweis von disseminierten Tumorzellen zur Abschätzung der Prognose und der Therapiebedürftigkeit nicht aus. Es müssen darüber hinaus Unterschiede im metastastischen Potential disseminierter Tumorzellen existieren.³⁴ Genauere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Expression von Proteasen und Her-2/neu zusätzlich mit der Prognose der Patientinnen korreliert.^{18;90} Aktuelle, antiproliferativ ausgerichtete Chemotherapieregime können Studien zufolge disseminierte Tumorzellen nicht vollständig eliminieren, da diese sich zum Teil in einem nicht- proliferierendem Stadium ("Dormancy") befinden.^{15;49} Insofern müssen phänotypische Merkmale disseminierter Tumorzellen als alternative Zielstrukturen charakterisiert werden.

Der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark wurde bereits in die neueste Auflage der TNM- Klassifikation aufgenommen.⁸⁵ Phänotypische Merkmale der disseminierten Tumorzellen finden nur geringfügig Beachtung; diese könnten insbesondere im Stadium des „tumor cell dormancy“ Ziel zukünftiger therapeutischer Maßnahmen werden. Sinnvoll und notwendig ist daher eine weitergehende Charakterisierung der Antigenstruktur dieser Zellen geworden.

1.3. Biologische Eigenschaften disseminierter Tumorzellen - Her-2/neu-Expression -

Wie oben dargelegt scheint das metastatische Potential disseminierter Tumorzellen zu differieren. Diagnostisch und therapeutisch ist somit von Bedeutung, welche Unterschiede zwischen disseminierten Tumorzellen bestehen und diesen Selektionsvorteil ausmachen.

Insbesondere biologische Tumormarker stehen dabei in der Diskussion. Pathophysiologisch wird neben Markern für Invasion und Metastasierung (Urokinase-Plasminogenaktivatoren (uPA) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI- 1/ 2) beispielsweise) der Her-2/neu- Expression eine große Bedeutung zugesprochen. Aufgrund der höheren Motilität mit gesteigertem Invasionspotential der zirkulierenden Her-2/neu-*positiven* Tumorzellen im Vergleich zu Her-2/neu- *negativen* Tumorzellen wird angenommen, dass diese möglicherweise das Bindeglied zwischen Primärtumor und Metastase darstellen.¹²

Beim Menschen findet sich der Her-2/neu- Rezeptor auch in normalem Gewebe. Bestimmte Tumorzellen - beim Mammakarzinom in 25 bis 30 % der Fälle - zeigen eine Überexpression dieses Rezeptors am Primärtumor und möglicherweise bei dessen disseminierten Tumorzellen. Pathophysiologisch lässt sich dies mit einer Amplifikation des Her-2/neu- Gens, mit einer erhöhten Transkription und konsekutiv gesteigerter Proteinsynthese und mit einem vermindertem Turn-over des Her-2/neu- Rezeptors erklären. Dies geht mit einem aggressiven klinischen Tumorverhalten und einer schlechten Prognose einher.^{10;57;87} Die schlechtere Prognose Her-2/neu- positiver Tumoren erklärt sich klinisch aus gesteigerter Invasionsfähigkeit und dadurch begünstigter Metastasierung, einer gesteigerten Tumorprogression, dem verschlechtertem Ansprechen auf eine (antiöstrogene) Hormontherapie und aus einer Resistenz gegenüber bestimmten Chemotherapeutika.^{65;69;87}

Bei diesem Kollektiv kann über biologische Modifizier gezielt in das Tumorwachstum eingegriffen werden. Der Her-2/neu- Rezeptorantikörper Trastuzumab (Herceptin[®]) ist in der metastasierten Situation schon länger zugelassen und wird ab einem Hercep-Score[®] des Primärtumors von 2+

eingesetzt.⁹⁵ Unter Studienbedingungen erhielten auch Patientinnen in der adjuvanten Situation bei positivem Her-2/neu- Status im Rahmen der *HERA*-Studie Trastuzumab. Die Nachbeobachtung zeigte innerhalb der noch recht kurzen Beobachtungszeit eine signifikante Verbesserung bei Trastuzumab-Gabe hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens und der Metastasenfreiheit im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Aus diesem Grund ist er neuerdings auch in der adjuvanten Situation zugelassen.⁷⁷

In der Literatur sind Abweichungen des Her-2/neu- Status zwischen Primärtumor, disseminierten Tumorzellen und Metastasen aufgefallen. Insofern könnte die Berücksichtigung des Her-2/neu- Status der disseminierten Tumorzellen im Rahmen einer erweiterten adjuvanten Therapie sinnvoll erscheinen, zumal jüngste Studien mit in dieser Form durchgeführter Therapie erfolgsversprechende Ergebnisse präsentieren konnten.^{14;82}

1.4. Problemstellung

Klassische Prognosefaktoren und Therapieindikatoren bei Brustkrebs, sich hauptsächlich orientierend an TNM- Klassifikation, Tumormorphologie, Lymphgefäßbeteiligung, Ausprägung von Hormonrezeptoren, Menopausenalter und Her-2/neu- Expression, reichen bei gleichbleibender Mortalität zur Wahl einer optimalen Therapie nicht aus. Vermutlich beruht diese Unsicherheit/Unklarheit in der Wahl der geeigneten Therapie unter anderem darauf, dass tumorbiologische Merkmale bei der Therapiewahl nicht ausreichend berücksichtigt werden können.

Tumorzell dissemination, also hämatogene Aussaat von Tumorzellen des Primärtumors, wird als ein entscheidender Parameter bei der Metastasierung gesehen.

Über die biologischen Eigenschaften dieser Zellen ist bislang nur wenig bekannt. Ihre Bedeutung bei Tumorprogression und Metastasierung ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Für den klinischen Einsatz kann deren Charakterisierung hinsichtlich therapierelevanter Antigene wie beispielsweise Her-2/neu, uPA-R und MHC-I bedeutend werden.

1.5. Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, ob, und wenn, inwieweit es sinnvoll ist, das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und deren tumorbiologischen Status in Form der Her-2/neu-Expression in zukünftige Therapiekonzepte aufzunehmen.

Der Goldstandard zur Detektion von epithelialen und den sich ableitenden karzinomatösen Zellen in Blut und Knochenmark ist derzeit der immunhistochemische Nachweis unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die gegen epitheliale Strukturen gerichtet sind.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte neben dem bloßen Nachweis disseminierter Tumorzellen eine Charakterisierung hinsichtlich Her-2/neu- Expression zur Beantwortung der Fragen (1), welchen Anteil Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark an Patientinnen mit primärem, nicht-metastasiertem Mammakarzinom ausmachen und in welchem Verhältnis dabei Her-2/neu- positive zu rein zytokeratin- positiven beziehungsweise zu doppelt-positiven Tumorzellen stehen, (2) ob sich bei diesem Kollektiv die Zellen des Primärtumors und die disseminierten Tumorzellen in ihrem tumorbiologischen Profil (Her-2/neu) unterscheiden, (3) wie sich bei Patientinnen mit mehreren Tumorzellen die Antigenstruktur der gefundenen Tumorzellen untereinander (homogen/ heterogen) verhält und (4) ob eine Korrelation ersichtlich wird zwischen bekannten Prognosefaktoren und einer Her-2/neu- Expression disseminierter Tumorzellen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsplan

Dem Nachweis hämatogen disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark wird eine zunehmende Bedeutung bei der Metastasierung beigemessen. Der alleinige Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen hat sich als ein nicht ausreichendes Kriterium erwiesen.

Durch eine genauere Charakterisierung des tumorbiologischen Profils einzelner zirkulierender Tumorzellen könnte ein hinreichendes zusätzliches Kriterium geschaffen werden, anhand dessen die Therapie patientenspezifisch ausgerichtet werden kann. Patientenspezifisch meint dabei die Ausrichtung der Therapie anhand eines individuell erstellten Risikoprofils.

Das durch Knochenmarkaspiration gewonnene Zellmaterial wird nach entsprechender Aufbereitung mittels eines Doppel-Immunfluoreszenzverfahrens auf Zytokeratin- Antigene und auf Her-2/neu-Expression hin untersucht. Als Marker für Zytokeratin, dessen Anwesenheit epitheliale Zelloberflächen anzeigt, wird ein Pan- Zytokeratin- Antikörper (C11) verwendet, der über Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) detektiert wird. Als Marker von Her-2/neu wird ein Her-2/neu- Antikörper eines Kaninchens (rabbit) verwendet, der dann mit einem Texas-Red markierten Sekundär-Antikörper gegen Kaninchen (anti-rabbit) detektiert wird. Die Anwesenheit von epithelialen, also zytokeratin- positiven Strukturen in Blut und Knochenmark ist pathologisch und karzinomverdächtig. Die Überexpression von Her-2/neu, einem Rezeptor für Wachstumsfaktoren, ist ebenfalls pathologisch und führt zu einer verschlechterten Prognose.

2.2. Material

2.2.1. Patientenkollektiv

Bei Patientinnen mit primärem, nicht- metastasiertem Mammakarzinom wurde im Rahmen des operativen Primäreingriffs an der Universitätsfrauenklinik Tübingen präoperativ eine Knochenmarkaspiration an der Spina iliaca anterior

superior zur immunhistochemischen Untersuchung auf hämatogene Tumorzell dissemination durchgeführt. Per definitionem versteht man unter *primär* die Erstmanifestation eines Malignoms, *nicht- metastasiert* bezeichnet das Fehlen solider Absiedlungen des Primärtumors. Untersucht wurde gewonnenes Zellmaterial von 137 Patientinnen aus dem Zeitraum von Februar 2002 bis Januar 2005. Die Ein- und Ausschlusskriterien unseres Patientenkollektivs zeigt die Tabelle 1 (siehe auch Kapitel 3.1).

Tabelle 1: Ein- bzw. Ausschlusskriterien der Patientinnen

<u>Einschlusskriterien</u>	<u>Ausschlusskriterien</u>
Weiblich	
<u>Alter:</u> 18 < w < 85 (prä- und postmenopausal)	
Primärdiagnose eines Mamma-Karzinoms <u>TNM:</u> - T1-T4 - N1-N3 - M0	- Metastasen (M1) - Zweitmalignome - Rezidivkrankung

2.2.2. Geräte

Zytozentrifuge	Hettich Typ Universal 16A, Villingen-Schwenningen
Fluoreszenzmikroskop „Axiophot“	Zeiss, Jena
CCD-Kamera „SenSys“	TM Photometrics, AZ
Bildbearbeitung Quips®PathVysion	Vysis, IL
Färbeautomat „DakoAutostainer“	DAKO, Hamburg
Zentrifuge Biofuge primo	Heraeus

2.2.3. Chemikalien

Hank's Salt-Lösung	Biochrom KG, Berlin
Ficoll-Hypaque	Biochrom KG, Berlin
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fettstift Dako [®] -Pen	Dako [®] Diagnostika GmbH, Hamburg
SuperFrost [®] Plus Objektträger	Firma R. Langenbrinck
Tris HCl (pH 7.5)	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Vectashield Mounting Media (DAPI)	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim
Hämatoxylin S2020	DAKO, Hamburg

2.2.4. Antikörper und Antikörperkonjugate

C11-FITC; No F3418	Sigma, MO, USA
Her2-Antikörper (Rabbit)	Klon A 0485, Dako Cytomation
Anti-Rabbit-AK-TexasRed [®]	CB 11, Biogenex, CA
Ak-Verdünnungsmedium S2022	Dako Cytomation (Immunicon Corp., PA)
ABC-kit	Vectastain, Vector Laboratories, CA, USA
HERCEP [™] -Test	Dako, Glostrup, Denmark
Pathvysion [™] -kit HER2/NEU	Vysis (Downers Grove, IL)

2.2.5. Pufferlösungen

PBS-Puffer (Gibco)	150 mM NaCl 3.0 mM KCl 8.0 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1.5 mM KH ₂ PO ₄ pH: 7.4
----------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

TBS-Puffer (Sigma)	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM Tris-HCl pH: 8,3
Erythrozyten-Lyse-Puffer	155.0 mM NH ₄ Cl 10.0 mM KHCO ₃ 0.1 mM EDTA pH: 7.2
Waschpuffer (DAKO)	PBS-0.1%Tween20
Blocking reagent (DAKO)	5% BSA in PBS-0.1%Tween20
Färbepuffer (Miltenyi-Biotec)	1% BSA in PBS-0.1%Tween20

2.2.6. Zelllinien

MCF-7	ATCC®-Nr. HTB-22 von American type culture collection (ATCC)
SKBr-3	ATCC®-Nr. HTB-30 von American type culture collection (ATCC)

2.3. Methoden

2.3.1. Techniken/Grundlagen

2.3.1.1. Detektion hämatogen disseminierter Tumorzellen

Die hämatogene Ausbreitung des Mammakarzinoms erfolgt vor allem in das Skelettsystem. Weitere Lokalisationen möglicher Metastasierung sind unter anderem Lunge, Pleura und die Leber. Für den Nachweis hämatogen disseminierter Tumorzellen bietet sich das Skelettsystem neben einer peripheren Blutentnahme als ein relativ gut zugängliches Körperkompartiment an. Durch Aspiration von Knochenmark können hier Zellen gewonnen werden. Das Knochenmarkmesenchym stellt eine Art Filtersystem dar, in dem es zu einem besonders intensiven Austausch der zirkulierenden Zellen im Blut und dem mesenchymalen Gewebe des Knochenmarkraumes kommt.^{70;84} Die hier gebildeten Zellen der Hämatopoese entstammen mesenchymalen Vorläuferzellen und weisen keine epithelialen Zellstrukturen auf.

Die Anreicherung und der Nachweis disseminierter Tumorzellen aus dem peripheren Blut ist derzeit noch nicht ausreichend validiert.^{42;66;79}

2.3.1.2. Zytokeratine

Die Genfamilie der Zytokeratine wird als Marker für disseminierte Karzinomzellen in Knochenmark, Blut und Lymphknoten eingesetzt. Zytokeratine sind Intermediärfilamente von Epithelzellen und den sich ableitenden Neoplasien, den Karzinomen.^{4;62;63} Sie sind epithelspezifische Strukturen des Zytoskeletts. Epitheliale und damit zytokeratin-positive Zellen kommen normalerweise in mesenchyalem Gewebe wie Knochenmark, Blut und Lymphknoten nicht vor. Das Vorhandensein zytokeratin-postiver Zellen ist somit hinsichtlich einer beginnenden Metastasierung bedeutsam und erklärt ihren Einsatz als Marker hierfür.

Durch fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen Zytokeratinfilamente lassen sich diese Zellen in der Immunfluoreszenz darstellen.

Die Zusammensetzung der Zytokeratinfilamente konnte durch zweidimensionale Gelelektrophorese und molekularbiologische Techniken aufgeklärt werden. Demnach sind an ihrem Aufbau 20 nah verwandte Zytokeratine (CK) mit einem Molekulargewicht von 40 bis 70 kD beteiligt. Abhängig von ihrem Verhalten in der zweidimensionalen Gelelektrophorese und damit von ihrem isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht werden die Zytokeratine zwei Subfamilien zugeordnet. Die saure Subfamilie (Typ I) enthält CK 9 bis 20 mit einem Molekulargewicht von 40 bis 64 kD, die neutral/ basische Subfamilie (Typ II) beinhaltet CK 1 bis 8 mit einem Molekulargewicht von 52 bis 68 kD.

Die Zytokeratinfilamente sind aus heterogenen Tetramerkomplexen aufgebaut, die jeweils aus zwei Heterodimeren aus je einem Typ- I- und einem Typ- II- Zytokeratin bestehen. Typ- I- und Typ- II- Zytokeratine werden also paarweise exprimiert, indem sich ein saures Keratin an einen basischen Partner bindet. Ein Tetramer aus jeweils zwei sauren und zwei basischen Keratinen stellt die eigentliche Grundeinheit des Zytokeratinfilaments dar. Damit enthält eine Epithelzelle immer die gleiche Menge von Typ- I- und Typ- II- Zytokeratinen. Da die Zytokeratine epithelspezifisch sind und eine Epithelzelle immer mindestens ein Zytokeratin- Paar enthält, kann durch Untersuchung der Zytokeratin-

Expression eine epitheliale Differenzierung eindeutig nachgewiesen oder ausgeschlossen werden.

Dies gilt nicht nur für physiologisches Epithelgewebe, sondern auch für dessen Neoplasien. Zellen eines Karzinoms verhalten sich aufgrund ihres epithelialen Ursprungsgewebes bei Anfärbung in der Immunhistochemie immer zytokeratin-positiv. Durch Untersuchung der Zusammensetzung der Zytokeratinstruktur einer Karzinommetastase lassen sich Rückschlüsse auf das Ursprungsgewebe der Neoplasie schließen.

Um möglichst viele Zytokine detektieren zu können, wird der monoklonale Pan-Zytokeratin- Antikörper C11 verwendet. Dieser Antikörper bindet an die humanen Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18.

2.3.1.3. EGFR-Familie

Die EGFR (epidermal growth factor receptor)- Familie wird von vier nah verwandten Rezeptoren aus der Reihe der Tyrosinkinaserzeptoren gebildet (Abbildung 2). Tyrosinkinasen greifen mittels Phosphatgruppenübertragung in den Regulationsmechanismus der zellulären Signaltransduktion ein, die an der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration und der Steuerung der Apoptose beteiligt sind.^{51;53} Tyrosinkinasen lassen sich je nach Lokalisation in der Zelle in nukleäre, zytoplasmatische und membranständige Rezeptortyrosinkinasen einteilen. Membranständige Tyrosinkinasen, zu denen auch die EGFR- Familie gehört, sind zugleich Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Im Rahmen der Karzinomentstehung spielen diese Rezeptoren eine wichtige Rolle. Eine erhöhte EGFR- Expression verursacht über gesteigerte Invasion, gesteigerte Metastasierung, gesteigerte Tumorprogression, Resistenz gegenüber (antiöstrogene) Hormontherapie und über Resistenz gegen bestimmte Chemotherapeutika zu einer verschlechterten Prognose.^{65;69;87} Nach Ligandenbindung erfolgt eine Aktivierung mit den drei verwandten Rezeptoren der EGFR- Familie als Heterodimerisierung (erbB-2 + erbB-3) und kann bei Überexpression einzelner Rezeptortypen innerhalb dieser Gruppe auch als Homodimerisierung (z.B. erbB-2 + erbB-2) erfolgen. Insbesondere bei Überexpression des Her-2/neu- Rezeptors kann es dann zu

spontaner, also ligandenunabhängiger Dimerisierung und anschließender Rezeptoraktivierung kommen.^{23;33;97;98}

Der Her-1- Rezeptor wird auch als EGFR oder ErbB1 bezeichnet. Bei vielen Malignomen - dazu zählt neben dem Kolonkarzinom unter anderem auch das Nicht- Kleinzellige- Bronchialkarzinom (NSCLC = non small cell lung cancer) - ist dieser Rezeptor überexprimiert und führt dadurch zu oben beschriebenen Phänomenen. Therapeutisch wird dies in Form einer Immuntherapie genutzt: Beim NSCLC ist Gefitinib (Iressa[®], ZD1839) als EGFR- Antikörper zugelassen. Beim EGFR- überexprimierenden Kolon- Karzinom wird Cetuximab (Erbix[®]) als Antikörper therapeutisch eingesetzt.

Der Her-2/neu- Rezeptor (Her-2 = Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-rezeptor 2) wird auch als c-erbB-2- Rezeptor bezeichnet. Für die Pathophysiologie des Mammakarzinoms wurde der Her-2/neu- Rezeptor als besonders wichtig identifiziert.^{5;68}

Das Her-2/neu- Gen, welches beim Menschen auf Chromosom 17 kodiert ist, wurde zuerst in Neuroblastomen der Ratte nachgewiesen und trägt daher die Bezeichnung *neu*. Beim Menschen wird der Her-2/neu- Rezeptor als epitheliales Protein von vielen Organen wie zum Beispiel der Brustdrüse, der Lunge, dem Kolon, der Prostata oder der Harnblase exprimiert und ist somit weder geschlechts-, organ- noch erkrankungsspezifisch.¹³ Molekularbiologisch handelt es sich bei dem Her-2/neu- Rezeptor um ein transmembranäres Rezeptorprotein von 185 kDa mit intrazellulärer Tyrosinkinase- Aktivität.⁵² Der Her-2/neu- Rezeptor ist aus drei Domänen zusammengesetzt: einer extrazellulären Domäne (ECD) mit der Bindungsstelle für Wachstumsfaktoren, einem transmembranösen Abschnitt und dem intrazellulären, C- terminalen Anteil. Der c- terminale Anteil initiiert die Signaltransduktion mit der ihm eigenen Tyrosinkinase- Aktivität durch Autophosphorylierung. Auf diese Weise werden Signale weitergegeben oder erzeugt, die neben Zellwachstum und Zelldifferenzierung auch die Angiogenese steuern.^{41;51;53;76} In bestimmten Krebszellen wird der Her-2/neu- Rezeptor überexprimiert. So kann bei 20 bis 40% der Patientinnen mit Brustkrebs eine Her-2/neu- Amplifikation oder die Überexpression seines Proteinprodukts gefunden werden.^{52;86;87} Das Her-

2/neu- Protein ist in normalen Geweben immunhistochemisch nicht nachweisbar, bei Überexpression ist eine membranständige und zum Teil eine zytoplasmatische Reaktion zu sehen. Neben erhöhter Transkription, erhöhter Proteinsynthese oder vermindertem Turnover des Her-2/neu- Proteins ist Genamplifikation ein weiterer Mechanismus, der einer Überexpression zugrunde liegen kann (siehe Abbildung 3). Eine Genamplifikation lässt sich mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) nachweisen.

Zu den Neuentwicklungen auf dem molekularbiologischen Gebiet gehört ein gegen den Her-2/neu- Rezeptor gerichteter humanisierter monoklonaler Antikörper: Trastuzumab (Herceptin[®]). Die Signaltransduktion wird bei vorhandener Extrazellulärdomäne unterbunden oder zumindest gebremst; dies führt zu vermindertem Zellwachstum und endet in der Apoptose Her-2/neu-überexprimierender Zellen.

Dem Nachweis dieses Rezeptors kommt also aufgrund der bei Überexpression des Her-2/neu- Gens deutlich verschlechterten Prognose mit der Möglichkeit der Signaltransduktionshemmung durch Trastuzumab eine bedeutende Rolle zu.

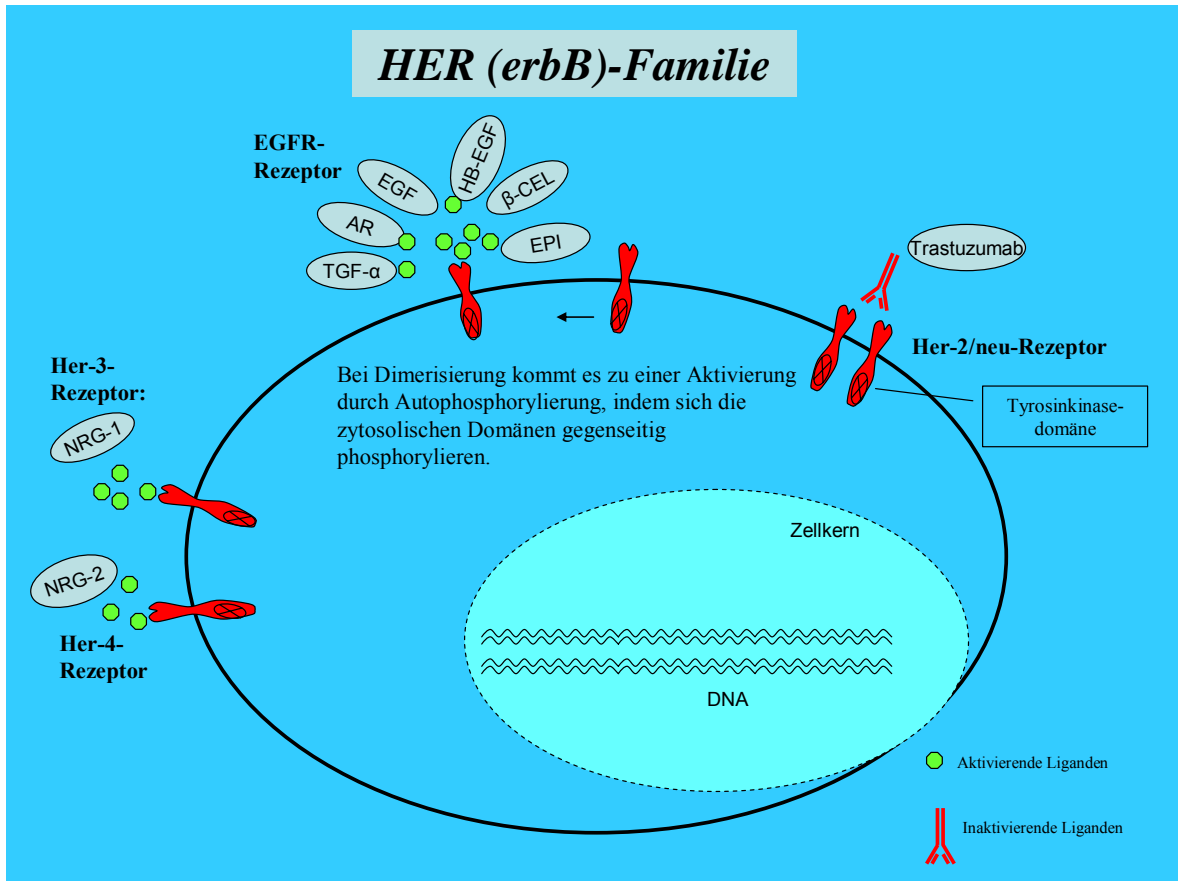


Abbildung 2 zeigt die HER (erbB)-Familie und die aktivierenden Liganden. Der EGFR-Rezeptor wird über TGF- α (transforming growth factor alpha), AR (amphiregulin), EGF (epidermal growth factor), HB-EGF (heparin-binding EGF), β -CEL (beta cellulin) und EPI (Epinephrin) aktiviert und kann mit Cetuximab (Erbitux[®]) blockiert werden. Für den Her-2/neu- Rezeptor ist kein Ligand bekannt; bei Überexpression kann es jedoch zu spontaner Dimerisierung und Aktivierung kommen. Therapeutisch kann dieser Rezeptor mit Trastuzumab (Herceptin[®]) blockiert werden. Her- 3 und Her- 4 werden über die Neureguline 1 beziehungsweise 2 (NRG 1 u. 2) aktiviert.

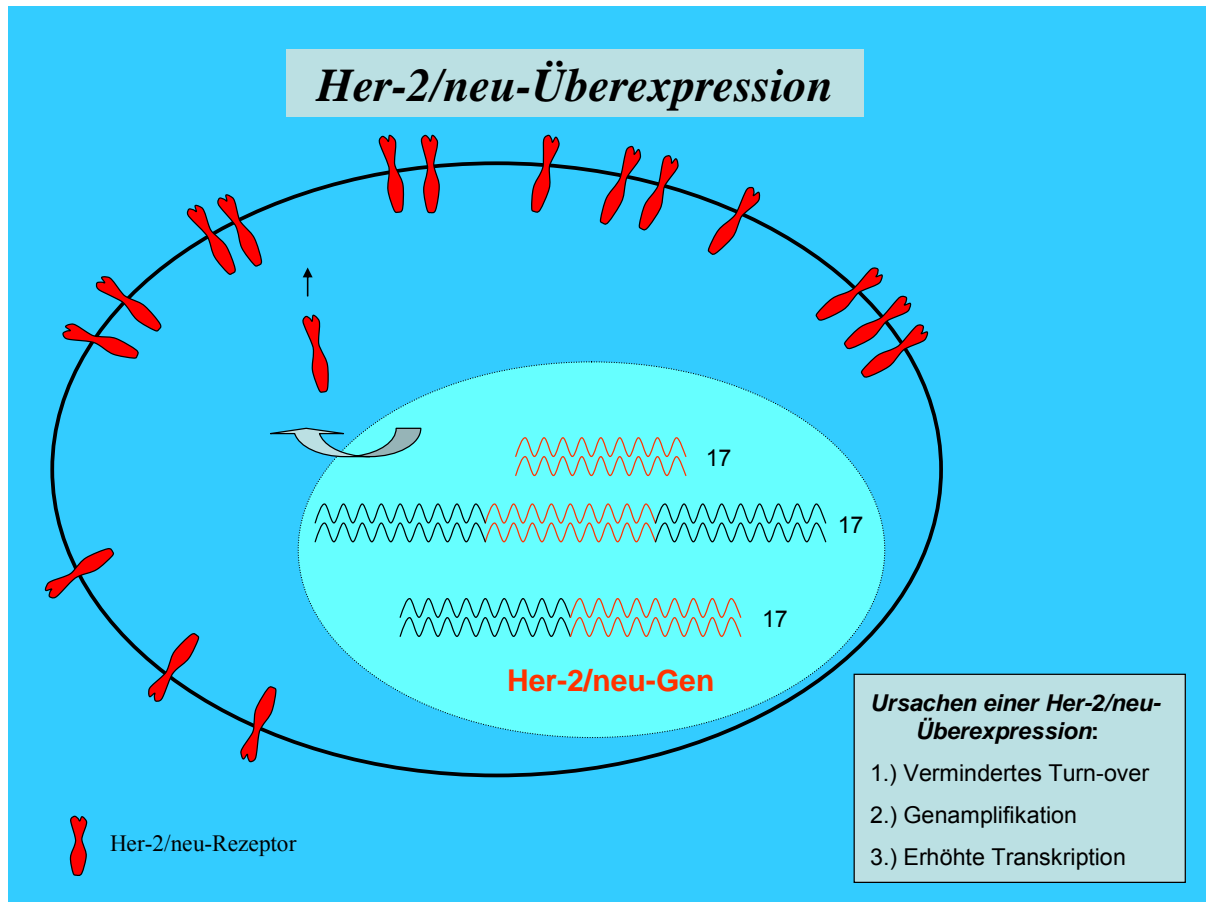


Abbildung 3 zeigt Ursachen einer Her-2/neu- Überexpression. Hierzu zählen neben vermindertem Turn- over, eine Genamplifikation und eine erhöhte Transkription.

Der Her- 3- beziehungsweise Erb-B3- Rezeptor hat keine eigene Kinaseaktivität und ist vor allem in Verbindung mit dem Her-2/neu- Rezeptor von Bedeutung, indem er diesem als Partner bei der Heterodimerisierung dient und dadurch aktiviert.

Die Bedeutung des Her-4- beziehungsweise des Erb-B4- Rezeptors ist weitgehend unbekannt.

2.3.1.4. Immunfluoreszenzfärbung

Die durch markierte Immunglobuline gelungene Darstellung einer Antigen-Antikörper-Reaktion wird als Immunfluoreszenz bezeichnet. Sie stellt eine 1941 durch Coons et al. abgewandelte Variante der Immunhistochemie (IHC) dar.

Fluoreszenz meint in physikalischer Definition die Eigenschaft verschiedener Stoffe, während der Dauer der Belichtung selbst zu leuchten. Nach dem Gesetz von Stokes besitzt das von der fluoreszierenden Substanz emittierte Licht eine

größere Wellenlänge als das von ihr absorbierte; dies zeigen die Abbildungen 6 und 7 anhand der Fluorochromderivate FITC und Texas Red.

Primär- oder Autofluoreszenz werden Fluoreszenzerscheinungen genannt, die an unbehandelten Präparaten auftreten.

In diesem Fall wurden die Fluorochrome Rhodamin und Fluoreszein kovalent mit einem Antikörper verbunden; es entsteht ein fluoreszierender Antikörper, mit dem bestimmte Zellbestandteile markiert werden können. Man spricht von Sekundärfluoreszenz, da die Fluoreszenz über fluoreszierende Antikörper auf bestimmte Zellbestandteile übertragen wird.

Prinzip der Immunfluoreszenz

Coons et al. gelang es durch stabiles Beladen von Antikörpern mit einem Fluorochrom die hohe Nachweisempfindlichkeit fluoreszenzmikroskopischer Methoden mit der Spezifität serologischer Verfahren zu verbinden. Man kann also nachweisen *ob* und *wo* eine Antigen-Antikörper-Reaktion stattfindet (siehe Abbildung 4).

Neben primären Antikörpern, die spezifisch mit einem Zielantigen reagieren, kommen in der Immunzytologie auch Sekundärantikörper zum Einsatz. Diese sind entweder gegen tierische Immunglobuline gerichtet und werden zum direkten Nachweis der Primärantikörper oder zur Verstärkung der Nachweisreaktion verwendet. So entstehen verschiedene Möglichkeiten zum Nachweis einer Antigen- Antikörper- Reaktion:

Direkte Immunfluoreszenz (Einschichtverfahren)

Bei der direkten Methode ist ein Fluorochrom kovalent an einen Antikörper, den Primärantikörper, (oder ein Antigen, das Primärantigen) gebunden.

Nach einer bestimmten Einwirkungszeit werden die fluoreszierenden Antikörper, die keine Antigen-Antikörper-Bindung eingegangen sind, durch einen Spülvorgang entfernt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop sind nun idealerweise nur die markierten Antikörper und das dadurch markierte Antigen sichtbar.

Indirekte Immunfluoreszenz (Zwei- oder Mehrschichtverfahren)⁶⁷

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden in einem ersten Schritt unmarkierte Antikörper verwendet, die sich mit dem Antigen verbinden. In einem zweiten Schritt wird ein markierter Antikörper verwendet, der sich gegen den ersten Antikörper richtet, einem Anti-Antikörper (Anti- Ak).

Die menschlichen Antikörper sind die Immunglobuline (Ig); als Sekundärantikörper verwendet man deshalb Antiglobuline. Die Vorteile hierbei sind:

- 1.) nur ein einziges Konjugat (markiertes Antiglobulin) wird für zahlreiche Fragestellungen gebraucht,
- 2.) höhere Sensitivität, da mehrere Sekundär-Antikörper an einen Primär-Antikörper binden können.

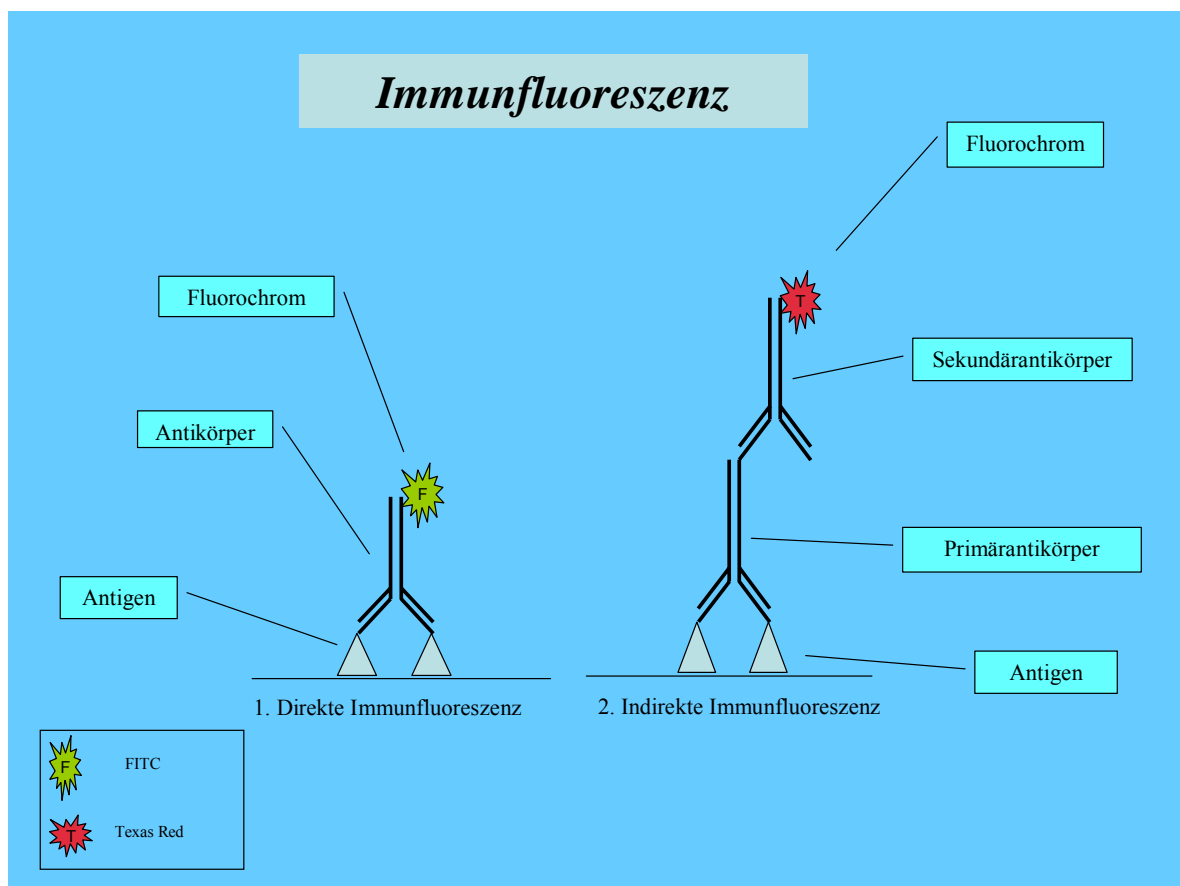


Abbildung 4 zeigt die direkte und indirekte Immunfluoreszenz. Bei der direkten Reaktion ist der direkt bindende (Primär-) Antikörper markiert. Bei der indirekten Reaktion ist der Sekundärantikörper markiert.

Antikomplementmethode (Klein und Burgholder)

Diese Technik beruht darauf, dass Komplementkomponenten (Komplement = z. B. Meerschweinchenserum) die Antigen- Antikörper- Bindung erkennen und daran binden. Mit markiertem Antikomplement (z.B. Anti-Meerschweinchenglobulins serum) lässt sich diese Bindung in einem zweiten Schritt darstellen.

Doppelimmunfluoreszenz

Da zwei Antigen-Strukturen, Zytokeratin und Her2-neu, dargestellt werden sollen, wird ein Doppelimmunfluoreszenzverfahren gewählt, wobei epitheliale, zytokeratin-haltige Strukturen mit einem primären Panzytokeratin- Antikörper (C11), der mit FITC konjugiert ist, direkt dargestellt werden. Zur Darstellung der Her2-neu-/ c-erbB2- Überexpression wird eine indirekte Darstellung mit einem Sekundärantikörper verwendet. Als unmarkierter Primärantikörper wird Her-2/neu- Rabbit eingesetzt, der mit dem markierten Sekundärantikörper Anti-Rabbit- TexasRed, einem Rhodamin- Derivat, detektiert wird.

2.3.1.5. Antikörper

Antikörper sind Proteine, die von lymphatischem Gewebe als Reaktion auf Anwesenheit von Fremdmaterialien oder Antigenen produziert werden.

Die menschlichen Antikörper sind die Immunglobuline. Diese bestehen aus mindestens 4 Polypeptidketten, aufgrund ihres Molekulargewichts unterscheidbar in zwei schwere (heavy, H-) Ketten (chains) und zwei leichte (light, L-) Ketten. Nach den schweren Ketten unterscheidet man IgG, IgA, IgM, IgE und IgD. Die leichten Ketten können als λ - oder κ - Kette vorliegen. Spaltet man die Immunglobuline (Ig) mit proteolytischen Enzymen wie Papain und Pepsin, so bekommt man bei der Behandlung mit Papain 3 Fragmente: 2 univalente F_{ab} -Fragmente (Antigenbindungsfragmente), die mit dem Antigen lösliche Komplexe bilden können und 1 F_c -Fragment (c = crystallizable), welches Komplement binden kann und von Zellen mit entsprechenden Rezeptoren gebunden werden (Gewebsbindungsfähigkeit). Bei der Behandlung mit Pepsin entsteht das $F_{(ab)2}$ -Fragment, welches bivalent ist. Für die Antigen-Bindung ist das F_{ab} -Fragment zuständig, für die biologische Aktivität das F_c -

Fragment. Eine ihrer wichtigsten Eigenschaften ist ihre Spezifität: Die Antikörper binden nach dem Schlüssel-Schloß-System nur die Moleküle einer Zelle, zu denen ihre Antigen-Bindungsstelle passt. Dabei werden Abweichungen von bis zu einer Aminosäure erkannt.

Das Gewinnen von Antikörpern für diagnostische Zwecke erfordert das Einbringen eines Antigens in einen lebenden Organismus, beispielsweise eines Kaninchens. Das Immunsystem reagiert mit einer Produktion von Antikörpern gegen das als fremd erkannte Antigen. Da unterschiedliche Determinanten des Antigens als fremd erkannt werden, entstehen unterschiedliche Antikörper. Diese Antikörper werden als polyklonal bezeichnet.

Herstellung der polyklonalen Antikörper

Nach wiederholten intrakutanen und intramuskulären Injektionen eines Antigens in ein Kaninchen oder eine Ziege kann nach einigen Wochen Blut mit den erwarteten Antikörpern abgenommen werden. Das Blut wird von Zellen und Gerinnungsfaktoren gereinigt wie zur Herstellung eines Antiserums. Die Isolierung der Immunglobuline aus dem Antiserum erfolgt durch Gelchromatographie. Die so gereinigten Antikörper werden durch Affinitätschromatographie weiter gereinigt und zur Auftrennung in Einzelfragmente anschließend mit Pepsin oder Papain usw. behandelt.

Da eine Vielfalt von Antikörpern entstanden ist, die dasselbe Antigen binden, werden sie polyklonal genannt.

Durch eine Modifikation können auch monoklonale Antikörper gewonnen werden. Die entstehenden Antikörper richten sich alle gegen dieselbe Antigen determinante.

Herstellung der monoklonalen Antikörper

Durch die Immunisierung einer Maus mit einem Antigen und anschließender Splenektomie erhält man nach entsprechender Bearbeitung eine Zellsuspension, die immunkompetente B- Lymphozyten enthält. Da B- Lymphozyten unter Kulturbedingungen nicht wachsen, werden diese mit malignen Myelomzellen fusioniert; die Myelomzellen wachsen hier sehr schnell und produzieren große Mengen an Antikörpern. Die fusionierten Zellen nennt

man Hybridome (Hybrid-Zellen). Nach der Fusion werden sie in einem Selektivmedium (HAT-Medium, Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) kultiviert. Die den gewünschten Antikörper produzierenden Hybridome werden kloniert. Der Kulturüberstand mit den monoklonalen Antikörpern wird mittels Gelchromatographie gereinigt.

Übrig bleiben die gereinigten monoklonalen Antikörper, die gegenüber den polyklonalen eine größere Spezifität aufweisen (Abbildung 5).

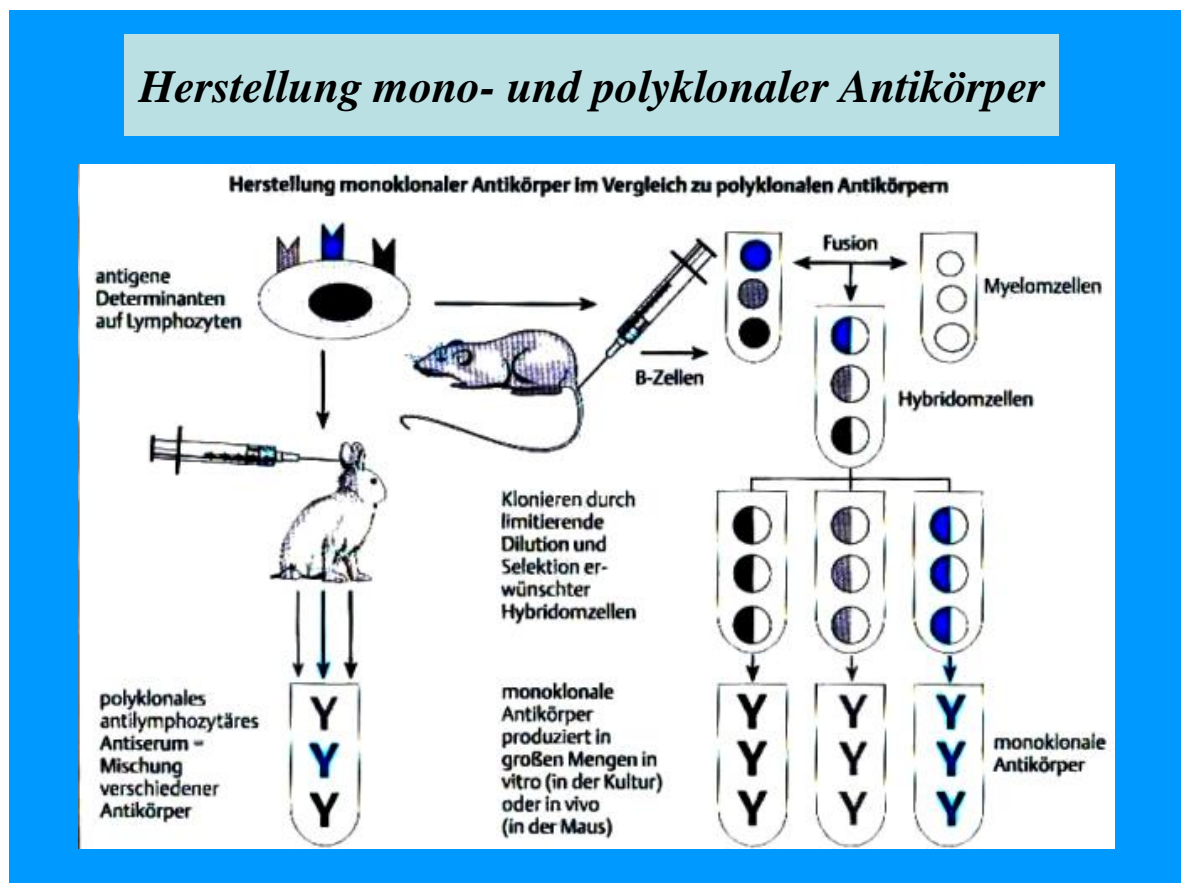


Abbildung 5 zeigt schematisch die Herstellung mono- und polyklonaler Antikörper. Die Immunisierung von Tieren mit Lymphozyten einer anderen Spezies, z.B. humanen Zellen, führt zur Bildung einer Vielfalt von Antikörpern, die gegen die verschiedenen antigenen Determinanten auf der Oberfläche der Lymphozyten gerichtet sind. In polyklonalen Antiseren sind somit Antikörper gegen unterschiedliche lymphozytäre antigenen Determinanten enthalten. In monoklonalen Antiseren sind dagegen nur Antikörper gegen eine, also die gewünschte antigenen Determinante enthalten. Die monoklonalen Antikörper werden über Zellverschmelzung der B-Zellen des immunisierten Tiers mit Myelomzellen, Bildung von verschiedenen Zellklonen der

Hybridzellen und Selektion der jeweiligen erwünschten konstruierten Hybridomzellen in vitro oder in vivo produziert. Abbildung und Text wurden aus *Immunsuppressive Therapie 2* von Walter Gottlieb Land, erschienen im Thieme-Verlag, entnommen.

2.3.1.6. Markierung der Antikörper

Bei dieser 1941 von Coons et al. entwickelten Methode werden Antikörper über eine feste chemische Bindung mit fluoreszierenden Farbstoffen, sogenannten Fluorochromen, verbunden, wobei ihre spezifischen immunologischen Eigenschaften im Wesentlichen erhalten bleiben. Wird das Konjugat mit einer geeigneten Lichtquelle angeregt, so entsteht eine für jedes Fluorochrom typische Fluoreszenz, die den Ort der Bindung sichtbar macht. Die gebräuchlichsten Fluorochrome sind Derivate des Fluoresceins, vor allem des Fluoresceinisothiocyanat (FITC), das durch eine Thiocarbamidbindung an Proteine gebunden werden kann und sein Emissionspektrum im Grünbereich hat. Im Rahmen einer Doppelfärbung werden zusätzlich meistens Rhodaminderivate wie Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) oder Texas Red (TRSC) verwendet. Diese fluoreszieren rot und so können in einem Präparat zwei unterschiedliche Antigen-Antikörper-Reaktionen detektiert werden.

Als Fluochrome wurden FITC und Texas Red verwendet, deren wichtigste Eigenschaften zeigen Abbildung 6 und 7.

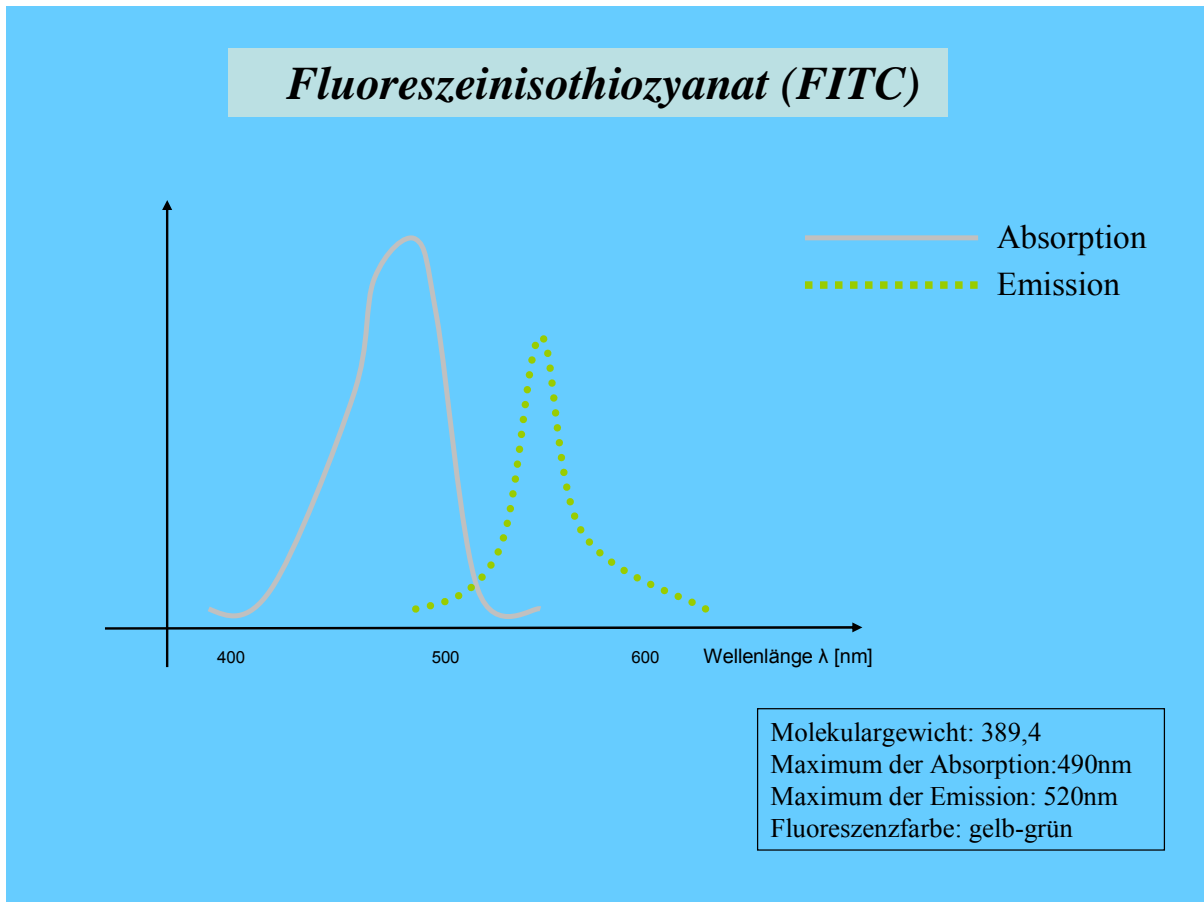


Abbildung 6 zeigt Eigenschaften von FITC. Die durchgezogene Linie zeigt die Anregungswellenlänge und die gepunktete Linie die emittierte Wellenlänge des angeregten Fluorochroms.

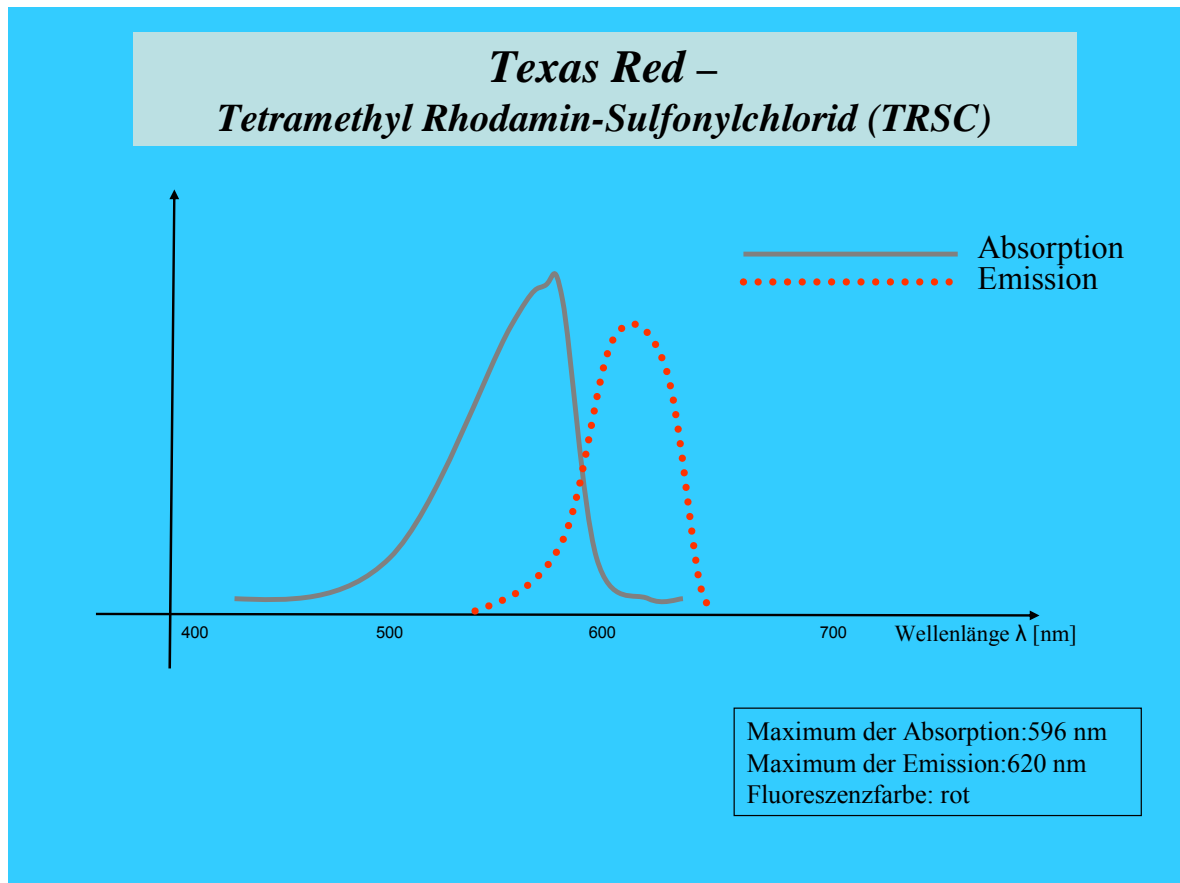


Abbildung 7 zeigt die Eigenschaften des Fluorochroms Texas Red. Die durchgezogene Linie zeigt die Anregungswellenlänge und die gepunktete Linie die emittierte Wellenlänge des angeregten Fluorochroms.

2.3.2. Vorgehen

2.3.2.1. Zellentnahme

Bei 137 Patientinnen mit stanzbioptisch gesichertem, nicht-metastasiertem Mammakarzinom wurden intraoperativ Knochenmarkaspirationen durchgeführt. Die betroffenen Patienten gaben hierfür vor der Operation ihr Einverständnis. Per Punktionsnadel werden 10 bis 20 ml Knochenmark in mittlerem Unterdruck aus dem Beckenkamm (Crista iliaca) aspiriert. Die Antikoagulation des Aspirats erfolgt mit 1000 IE Heparin. Die auf diese Weise gewonnene Zellsuspension wird in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zügig im Tagesverlauf weiter aufbereitet.

2.3.2.2. Zellpräparation

Die Präparation erfolgt entsprechend der von Fehm et al. beschriebenen

Methodik zur Zellseparation.³⁵ Die aus dem Markraum gewonnene Zellsuspension wird mittels Dichtegradientenzentrifugation in die einzelnen Zellfraktionen getrennt werden.

Die Dichtegradientenzentrifugation beruht auf der unterschiedlichen Dichte der Blutbestandteile wie Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen und Serum. Die Dichte der Erythrozyten ist am größten, gefolgt von der der Granulozyten. Die Dichte von Thrombozyten, Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten ist kleiner. Zur Separation wählt man nun ein Medium, dessen Dichte kleiner ist als die Dichte der Granulozyten, jedoch größer als die Dichte der Lymphozyten. Verwendet wird Ficoll-Hypaque[®] (Biochrom, Deutschland), eine synthetische Polysaccharidlösung, deren Dichte durch Zugabe von Natriumdiatrizoat auf einen Wert von 1,077g/cm³ eingestellt wurde.

15 bis 20 ml des heparinisierten Knochenmarkspirats wurden in ein 50 ml Falcon[®]- Polypropylen-Röhrchen überführt. Nach Auffüllen mit Hank's-Salzlösung auf 30 ml wird vorsichtig vermischt. In ein separates 50 ml Falcon[®]- Polypropylen- Röhrchen werden 15 ml Ficoll- Hypaque[®] vorgelegt. Das ficollbeladene 50 ml Falcon[®]- Polypropylen- Röhrchen wird vorsichtig mit dem verdünnten Knochenmark überschichtet. Nach anschließender Zentrifugation über 30 Minuten bei 1600 Umdrehungen pro Minute ohne Bremsfunktion wurde die Interphase -der mononukleären Zellfraktion entsprechend- nach Abheben und Verwerfen des Überstandes mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Falcon[®]- Polypropylen- Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen durch Resuspension mit PBS, welches bis auf 30 ml aufgefüllt wurde, und erneutem Zentrifugieren über 7 Minuten bei 1600 Umdrehungen gewaschen und der Überstand vorsichtig abgekippt. Durch Lysepuffer werden die mononukleären Zellen von verbliebenen Erythrozyten gereinigt. Dies erfolgt je nach Pelletgröße durch Zugabe von 5 bis 10 ml Lysepuffer und anschließender Inkubation im Kühlschrank über 10 Minuten. Nach anschließender Zentrifugation über 7 Minuten bei 1600 Umdrehungen pro Minute wurde der Überstand vorsichtig abgekippt. Das Sediment wird sanft aufgeschüttelt und je nach Pelletgröße mit 5 bis 10 ml PBS-Lösung

resuspendiert. Zur Zellzählung werden 50µl Knochenmark- Suspension mit 50µl Trypanblaulösung in einer Mikrotiterplatte vermischt, anschließend in eine Neubauerkammer gefüllt und unter einem Lichtmikroskop auf mononukleäre Zellen hin ausgezählt. Zur Berechnung der Zellzahl werden die vier Kleinquadrate nach folgendem Schema ausgezählt:

1. Zur Ermittlung der durchschnittlichen Zellzahl pro Quadrat wird die Zellzahl pro Quadrat für den Verdünnungsfaktor mal 2 genommen und für den Kammerfaktor mit 10^4 multipliziert. Ergebnis ist die Zellzahl pro Milliliter.
2. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl wird die Zellzahl pro Milliliter mit den 10ml des gesamten Volumens der Zellsuspension verrechnet.
3. Zur Verdünnung auf 750000 Zellen pro 500µl oder $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter wird die Gesamtzellzahl mit 2/3 multipliziert. Das Ergebnis entspricht der Verdünnung mit PBS in Millilitern.

Nach erneuter 7- minütiger Zentrifugation bei 1600 Umdrehungen pro Minute wird der Überstand abgekippt und entsprechend der Verdünnung für $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter mit PBS resuspendiert (wie oben erläutert).

2.3.2.3. Zytospin-Präparation

Die Anfertigung der Zytospins erfolgt mit 500µl der Zellsuspension; dies entspricht demzufolge einer Zellzahl von $0,75 \times 10^6$ pro Zytospin. Als Objektträger wurden positiv geladene SuperFrost® Plus- Objektträger der Firma R. Langenbrinck verwendet. Mit Hilfe einer Hettich-Zytozentrifuge wurden die Zellen folgendermaßen auf die Zytospins aufgebracht: Die Zytospins werden mit Filterkarten bestückt und die Halterungen werden entsprechend den Herstellervorschriften von Hettich eingespannt. Anschließend wird die Spinhalterung eingesetzt und 500 µl der Zellsuspension nach Aufschütteln in PBS (ohne Vortexen) in die Spotvorlage transferiert. Anschließend erfolgt eine 5-minütige Zentrifugation mit 1600 Umdrehungen pro Minute in der Zytozentrifuge von Hettich. Nach Abziehen des Überstandes wird die Halterung der Zytospins bei beladener Zentrifuge entfernt und die Filterkarte belassen. Zum Trocknen erfolgt eine 1- minütige Zentrifugation bei 1600 Umdrehungen pro Minute. Die Filterkarten können jetzt entfernt werden und die Zytospins werden über Nacht weiter luftgetrocknet und dann immunhistochemisch gefärbt.

Andernfalls erfolgt die Langzeitlagerung in eingeschweißten Plastikbehältnissen bei -20°C ohne Aufbewahrungsmedium.

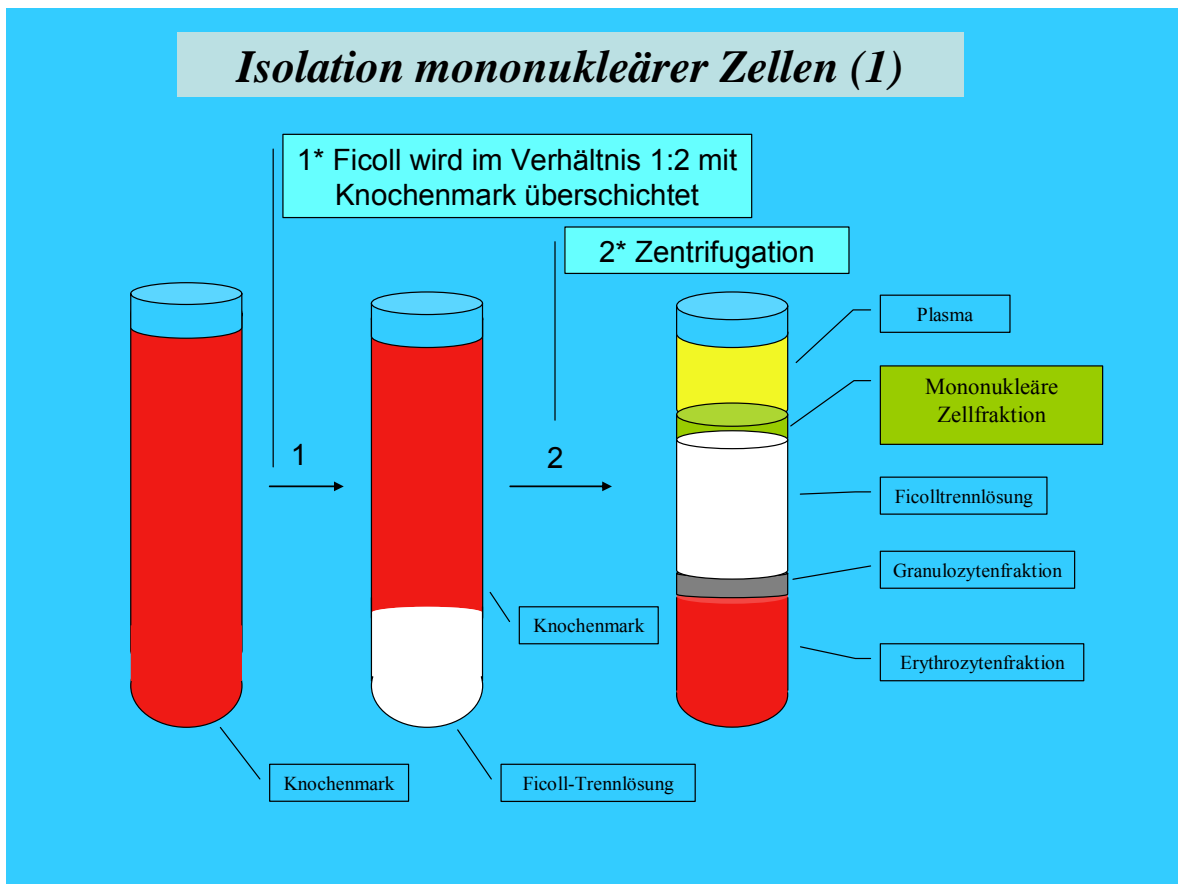


Abbildung 8 zeigt schematisch die Isolation mononukleärer Zellen. Dabei wird Ficoll-Lösung mit Knochenmark überschichtet und zentrifugiert. Das Knochenmark trennt sich der jeweiligen Dichte entsprechend in verschiedene Phasen auf. Die mononukleäre Zellfraktion liegt der Ficoll-Lösung auf und wird in dem sich anschließenden Arbeitsschritt mitsamt dem Plasma in eine neues Falcon-Röhrchen überführt.

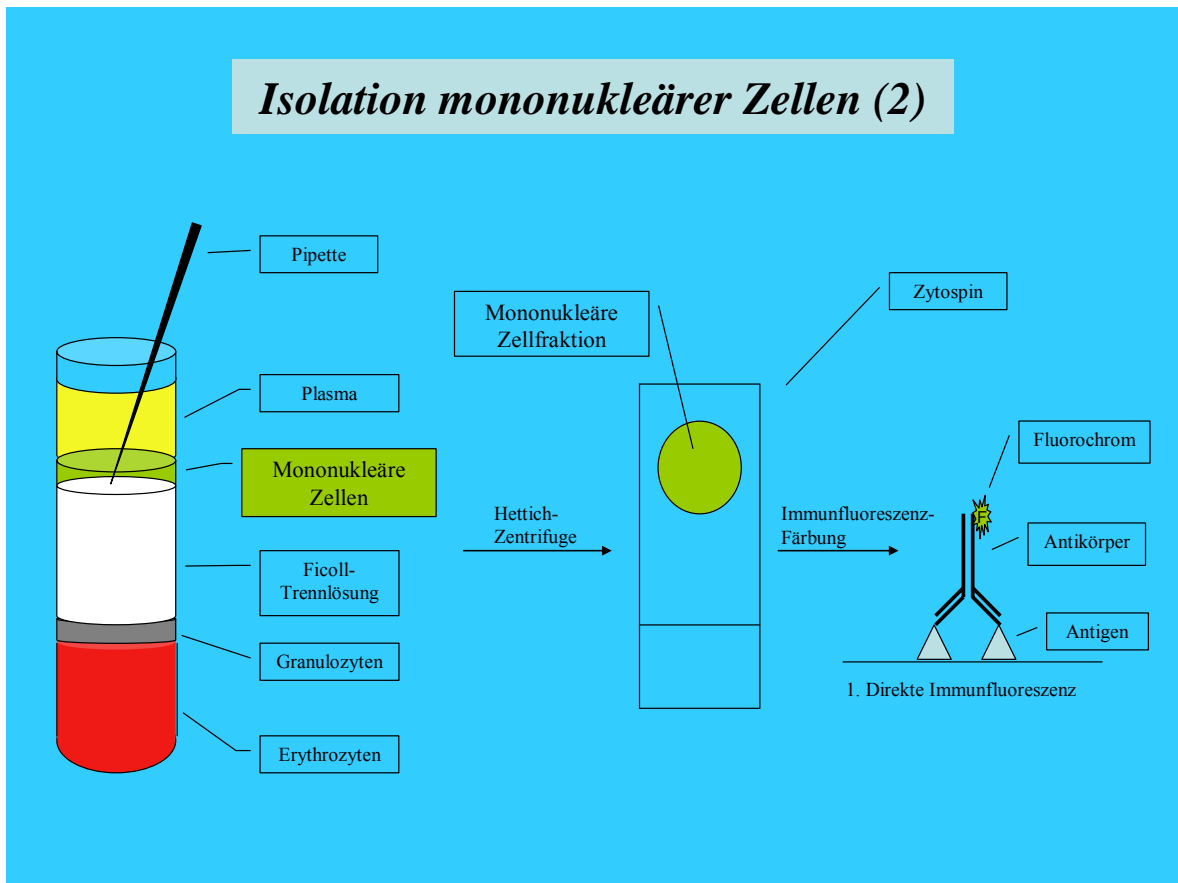
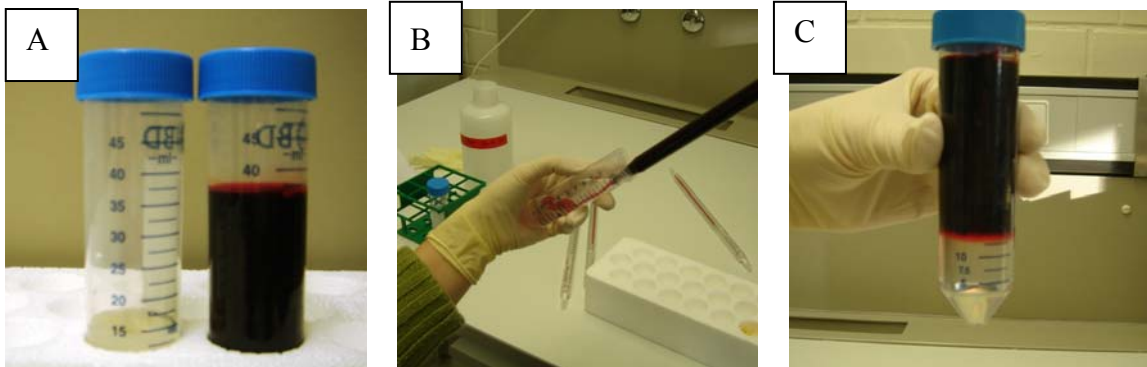
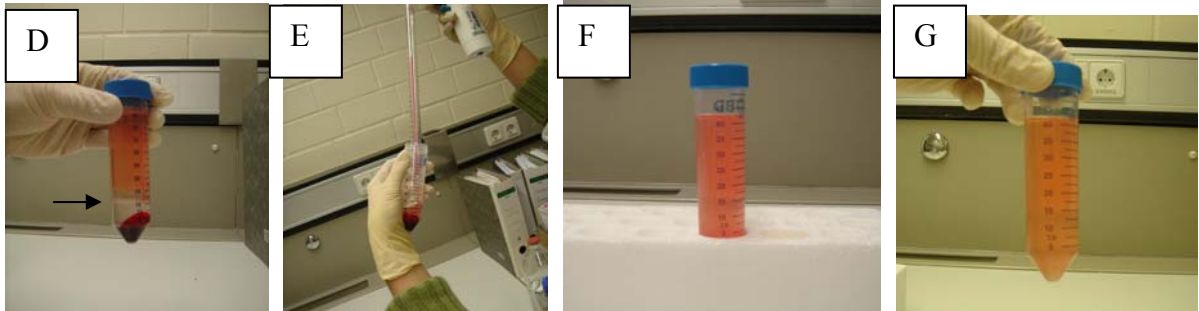


Abbildung 9 zeigt die Fortsetzung der Isolation mononukleärer Zellen. Die mononukleäre Zellfraktion wird mithilfe einer Pipette entnommen und erneut zentrifugiert. Nach Auszählung der Zellzahl erfolgt die Resuspension mit PBS, so dass pro Objektträger $0,75 \times 10^6$ Zellen zu finden sind. Auf die Zytospins aufgebracht werden die Zellen mittels einer Hettich-Zentrifuge, die in Abbildung 10 (I) gezeigt ist.

I.



II.



III.



Abbildung 10 zeigt einzelne Arbeitsschritte zur Isolierung mononukleärer Zellen:

I. A) - C): Bild A) zeigt zwei Falcon-Röhrchen; im linken befindet sich 15 ml Ficoll- Lösung und im rechten 35 ml (verdünntes) Knochenmark (KM). B) + C) Die Ficoll- Lsg. wird vorsichtig mit dem KM überschichtet.

II. D) - G): Nach Zentrifugation ohne Bremse trennen sich die einzelnen Fraktionen entsprechend ihrer Dichte. In der Interphase sammeln sich die mononukleären Zellen auf der Ficoll-Lsg. an (→). Die Interphase wird in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt und nach Auffüllung mit PBS erneut zentrifugiert.

III. H) -J): Nach Auszählung der mononukleären Zellfraktion wird einer Verdünnung von $1.5 \cdot 10^6$ Zellen/ml entsprechend mit PBS resuspendiert. Pro Zytospin werden 500 μ l der Zellsuspension in die Spotvorlage (J) eingebracht (Zellzahl: $0.75 \cdot 10^6$ / Zytospin) und mit der Hettich- Zytozentrifuge (I) auf die Zytospins (J) aufgebracht.

2.3.2.4. Färbung

Der Goldstandard zur Detektion von epithelialen Zellen in Knochenmark und Blut sind derzeit der immunhistochemische Nachweis unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die gegen epitheliale Strukturen gerichtet sind, und die FISH- Analyse über den Nachweis einer chromosomalen Überexpression.^{73;92}

Verwendet wurde ein Doppelimmunfluoreszenzverfahren mit monoklonalen Antikörpern gegen epitheliale Zellstrukturen, einem Anti- Zytokeratinantikörper, und einem polyklonalen Antikörper gegen den Her-2/neu- Rezeptor.

Zur Darstellung epithelialen Gewebes wird der Panzytokeratin- Antikörper C11 (No F3418) verwendet, der mit FITC konjugiert ist. Dieser Antikörper detektiert humanes Zytokeratin 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18. In Vorversuchen war sowohl die Inkubationszeit (30 min, 45 min, 60 min) als auch die geeignete Antikörperkonzentration (getestete Verdünnungen 1:50, 1:100, 1:200, 1:500) optimiert worden.

Für den Nachweis Her-2/neu bzw. c-erb-B2- positiver Zellen wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Her-2/neu, der aus einem Kaninchen (rabbit) isoliert wird, gewählt: rabbit anti-Her-2/neu-AK CB 11 (Biogenex, CA). Die Detektion von CB 11 erfolgt in einem zweiten Schritt mit TexasRed[®]-markierten Sekundär-Antikörpern gegen Her-2/neu- Rabbit.

Auch hier wurde in Vorversuchen sowohl die Inkubationszeit (30 min, 45 min, 60 min) als auch die geeignete Antikörperkonzentration (getestete Verdünnungen 1:50, 1:100, 1:200, 1:500) optimiert.

Zur besseren Darstellung der Kerne wurde eine Hintergrundfärbung mit DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) durchgeführt.

Bei jeder Färbung wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrollen wurden SKBR-3-Zellen, eine Her-2/neu- überexprimierende Brustkrebszelllinie, und MCF-7- Zellen, eine hormonrezeptorpositive Brustkrebszelllinie, mitverarbeitet und untersucht. Als Negativkontrollen wurden Leukozyten gesunder Probanden mitgeführt.

Färbeschritte

Die eingefrorenen Objektträger wurden zunächst aufgetaut und 30 Minuten an die Raumtemperatur adaptiert. Dann wurde der zu färbende Bereich mit einem Fettstift (Dako-Pen) umfahren. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten mit Hilfe eines Färbeautomats von Dako (Abbildung 11) in immer gleichem Schema. In einem ersten Arbeitsschritt wurde der zu färbende Bereich mit PBS befeuchtet, um einen für die Färbung optimalen pH- Bereich zu erhalten. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit 1%-igem Formaldehyd. Dies soll die Zellstrukturen für die nachfolgenden Färbeprozesse empfänglicher machen. Nach 5- minütigem Waschvorgang in PBS wird mit Waschpuffer, bestehend aus PBS und 0,1%-igem Tween-20, der folgende Färbeschritt vorbereitet. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit AB-Serum (*blocking reagent* aus 5%-BSA in PBS-0,1%-igem Tween-20) über 30 Minuten und erneuter 5-minütiger Behandlung mit Waschpuffer erfolgte eine 40-minütige Inkubation mit 200 µl der Primärantikörpern C-11-FITC und Rabbit-Her-2/neu, die auf 1:100 verdünnt wurden. In Vorversuchen hatte sich die Antikörperkonzentration in einer Verdünnung von 1:100 als optimal gezeigt; die Verdünnung erfolgte deshalb entsprechend in Antibody diluent (1% BSA in PBS-0,1% Tween 20). Nach anschließender 5-minütiger Behandlung mit Waschpuffer erfolgte die 30-minütige Inkubation mit 200µl des polyklonalen, Texas-Red-markierten Anti-rabbit-Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100. Nach erneuter Behandlung mit Waschpuffer wurde der Überstand vorsichtig abgetupft und der Hintergrund durch Einbetten in Vectashield Mounting medium[®], welches mit DAPI versetzt ist, gegengefärbt. Dies soll zusätzlich das Ausbleichen der markierten Antikörper verzögern. Nach Aufbringen eines Deckglases (60 mm x 24 mm) werden die Objektträger bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop bei Kühlschranktemperatur gelagert.



Abbildung 11: Färbeautomat von Dako Cytomation

2.3.2.5. Analyse gefärbter Zellen

Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Analyse fluoreszenzmarkierter Tumorzellen, die auf einem Träger fixiert wurden. Hierbei ist es möglich, gleichzeitig, in Abhängigkeit des verwendeten Farbstoffes, verschiedene gefärbte Zellstrukturen einer Zelle zu analysieren. Nach Anregung der Farbstoffe über eine Lichtquelle kann die Emission der Farbstoffe mit Hilfe von Sperrfiltern sichtbar gemacht werden.

Die Beurteilung der Objektträger erfolgte mit dem Mikroskop „Axiophot“ von Zeiss (Abbildung 12), welches mit einem Triple-Bandpass-Filter (FITC/ TRITC/ DAPI) und einem Dual-Bandpass-Filter (FITC/ TRITC) ausgerüstet ist. Desweiteren kann jedes Fluorochrom mit einem Single-Bandpass-Filter beurteilt werden (FITC-, TRITC- oder DAPI- Filter). Zur Anregung von FITC wurde eine Wellenlänge von 460-490 nm und ein Detektionsbandpassfilter von 510- 530nm

gewählt. Zur Anregung von Texas Red wurde eine Wellenlänge von 596 nm und ein Detektionbandpassfilter von 620nm verwendet.

Zur Dokumentation der gefundenen Zellen ist das Mikroskop mit einer CCD-Kamera (SenSys TM Photometrics, AZ) ausgestattet. Das Mikroskop sowie die Kamera sind mit einem Apple Mackintosh Computer verbunden. Beide werden über eine kommerziell erhältliche Software (Quips[®]PathVysion, Vysis, IL) gesteuert. Die Nachbearbeitung der digitalisierten Fluoreszenzbilder erfolgt mit der gleichen Software.

Da die Farbstoffe im Laufe der Zeit verblassen, kommt dieser Form der Dokumentation eine wichtige Bedeutung zu. Der Originalobjektträger wurde tiefgekühlt aufbewahrt.

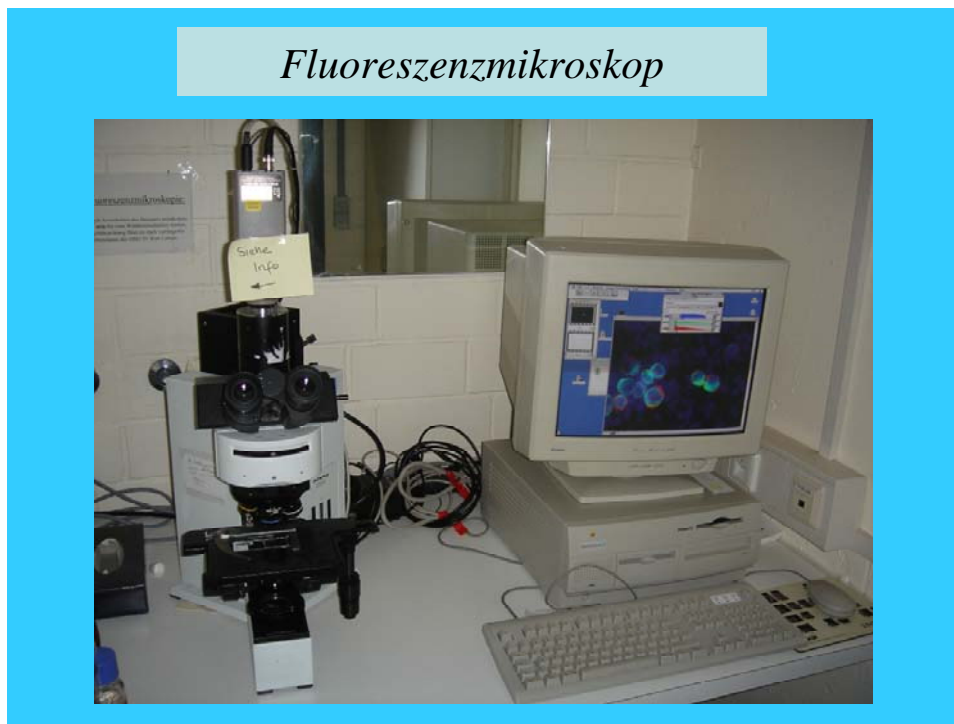


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskop „Axiophot“ von Zeiss

Zur Kontrolle des Färbeporgangs wurde bei jedem Färbeporgang als Positivkontrolle ein Objektträger mit SKBr3- Zellen und MCF-7- Zellen mitgeführt. Die SKBr3- Zellen sind gezüchtete Her-2/neu- überexprimierende Mammakarzinomzellen. Mit diesen Zellen lässt sich Färbepqualität hinsichtlich Her-2/neu beurteilen. Zur Kontrolle der Zytokeratinfärbung wurde als weitere Positivkontrolle bei jeder Färbung ein Objektträger mit MCF-7- Zellen mitgeführt. Diese haben epithelialen Zellcharakter und entstammen einem

Adenokarzinom der weiblichen Brustdrüse. Als Negativkontrolle dient ein Zytospin mit Leukozyten eines gesunden Blutspenders.

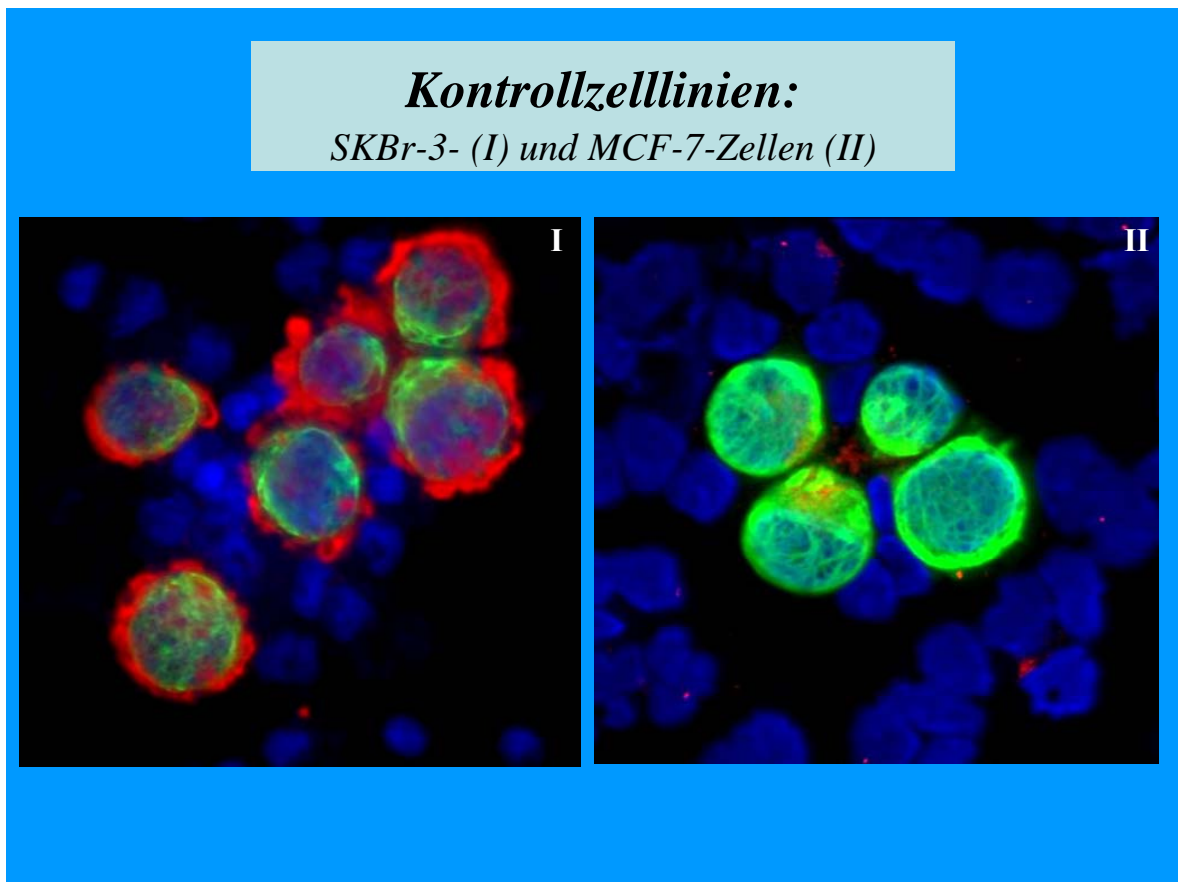


Abbildung 13: Als Kontrollzelllinien wurden SKBr-3-Zellen (I) und MCF-7-Zellen (II) verwendet. SKBr-3- Zellen zeigen neben Zytokeratin- Antigenen eine Überexpression von Her-2/neu. Unspezifische Anfärbungen werden über eine MCF-7- Zelllinie kontrolliert, die nur Zytokeratin- Antigene aufweist, jedoch keine Her-2/neu-Rezeptoren.

Auswertungskriterien

Entsprechend der oben aufgeführten Methoden befindet sich auf jedem Zytospin ungefähr eine Anzahl von $0,75 \times 10^6$ Zellen.

Der Objektträger wird bei einer Vergrößerung von 1:40 unter 1.0 Ölimmersion mäanderförmig im Dual-Bandpass-Filter untersucht; sichtbar werden FITC und Texas Red- markierte Strukturen. Anreicherungen von FITC markieren Zytokeratin- Antigene und Anreicherungen von Texas Red[®] Her-2/neu- Antigene. Stellt sich auf diese Weise eine Zelle als auffällig dar, wird sie unter den einzelnen Filtern – FITC-, TRITC- und DAPI (Single- Bandpass- Filter) – hinsichtlich Antikörperanreicherung und Kernmorphologie betrachtet. Alle

immunphänotypisch- positiven Zellen werden abfotografiert und einem zweiten, unabhängigen Betrachter zur eigenhändigen Analyse zugeführt.

Schwierigkeiten bei der Analyse immunhistochemisch-gefärbter Präparate bereitet die weitgehend subjektive Auswertung potentieller disseminierter Tumorzellen. Diesem bekannten Problem soll mit einer Objektivierung der Auswertungskriterien begegnet werden, welche Borgen et al. definiert hat. Die Einteilung gefärbter Zellbestandteile erfolgte hier in 3 Gruppen:

Tabelle 2: Einteilung der disseminierten Tumorzellen nach der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection (Borgen et al, 1999)

Gruppen	Klassifikation	Definition
1	Tumorzellen	zeigen in der Immunphänotypie pathognomonische Zeichen epithelialen Zellcharakters mit deutlicher Vergrößerung des Zellkerns und/ oder bestehen aus einer Ansammlung von 2 und mehr immunpositiven Zellen
2	Mögliche Tumorzellen	mögliche Tumorzellen, die morphologisch und immunphänotypisch nicht eindeutig von hämatopoetischen Zellen abzugrenzen sind: diese werden als Tumorzellen definiert, wenn eine Kontrollfärbung mit einem für hämatopoetischen Zellen isotypspezifischem Antikörper negativ ausfällt
3	Tumorzellnegativ	beschreibt falsch-positive „Tumor“-zellen, die als Zellen hämatopoetischen Ursprungs, Hautschuppen und Artefakte identifiziert werden

Diese Kriterien zugrunde gelegt, erfolgte die Beurteilung hinsichtlich Abnormität von Zellen also unter anderem anhand der Größe und Form des Zellkerns. Als weitere Kriterien wurden die Ausprägung der Antikörperanreicherung, die Intensität der Fluoreszenz und die Eindeutigkeit der Anreicherung hinsichtlich Spezifität herangezogen. Für die Einschätzung einer Zelle als pathologisch wurde neben der gesamten Zellgröße auch die Größe des Zellkerns mit Berücksichtigung des Kern- Plasma- Verhältnisses herangezogen.

Zytokeratin ist dem Zytoskelett zuzurechnen und stellt sich bei positiver Ausprägung als eine *feinfaserige, wolkige* Struktur in unterschiedlichster Ausprägung im Bereich des Zytoskeletts dar. Entscheidend für die Bewertung

als immunphänotypisch positiv ist die Reinheit und damit Intensität der Fluoreszenz, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Der Her-2/neu- Rezeptorantikörper wird durch Bindung an der Extrazellulärdomäne des Her-2/neu- Rezeptors bei Positivität als eine *ringartige Struktur* sichtbar. Auch hier ist die Ausprägung extrem variabel. Als Her-2/neu-positiv werden die Zellen nur dann gewertet, wenn sich die gesamte Zellmembran mittelmäßig bis stark anfärbt. Wichtig zur Bewertung als immunphänotypisch positiv ist neben der charakteristischen Anordnung erneut die Reinheit und Intensität der Fluoreszenz, um auch hier unspezifische Ansammlungen auszuschließen.

Als Fehlerquellen sind kleine Zellkerne anzusehen, bei denen ein hämatopoetischer Ursprung wahrscheinlich ist und somit auch bei positivem Rezeptorbesatz als falsch positiv klassifiziert werden müssen. Sehr große Zellkerne können auf einer Apoptose des Kerns (hydrophische Zellschwellung), einer Beschädigung der Zellen im Verlauf der Verarbeitung aber auch auf epidermaler Kontamination bei Entnahme oder Prozessierung der Zellen beruhen.

Als unspezifisch und somit nicht-positiv werden Zellen deklariert, deren Fluoreszenz nicht eindeutig auf entsprechende Bereiche beschränkt werden kann, also ähnliche Bereiche von den beiden unterschiedlichen Antikörpern markiert werden.

Die Abbildung 14 zeigt die jeweiligen Zelltypen in ihrer charakteristischen Ausprägung und die entsprechende Klassifikation: Morphologisch runde Zellen mit eindeutig zytoplasmatischem Färbeverhalten, wobei die gefärbten Areale den gesamten Kern fädenartig überziehen müssen, wurden als positiv für die Kategorie 1 gewertet. Gleichfalls positiv für Kategorie 1 wurden Zellen gewertet, die neben einem morphologisch runden Zellkern im Bereich der Zellmembran eine deutliche, ringförmige Reaktion auf den Her-2/neu- Antikörper zeigten. Zellen der Kategorie 1 wurden als disseminierte Tumorzellen definiert.

Zellen, bei denen sich die Antikörperanreicherung nicht über die gesamte Zelle erstreckte, die ansonsten aber die Kriterien der Kategorie 1 erfüllten, wurden als Kategorie 2 definiert und nicht als Tumorzellen gewertet.

Zellen, die eine immunhistochemische Reaktion zeigten, aber weder der Kategorie 1 oder 2 entsprachen, wurden als hämatopoetische, epidermale oder als *unspezifisch* gefärbte Zellen gewertet und in Kategorie 3 definiert.

Basierend auf dieser Einteilung wurden Patientinnen nur dann als positiv im Sinne einer Tumorzell dissemination gewertet, wenn Zellen der Kategorie 1 in ihrem Knochenmarkspirat gefunden wurden.

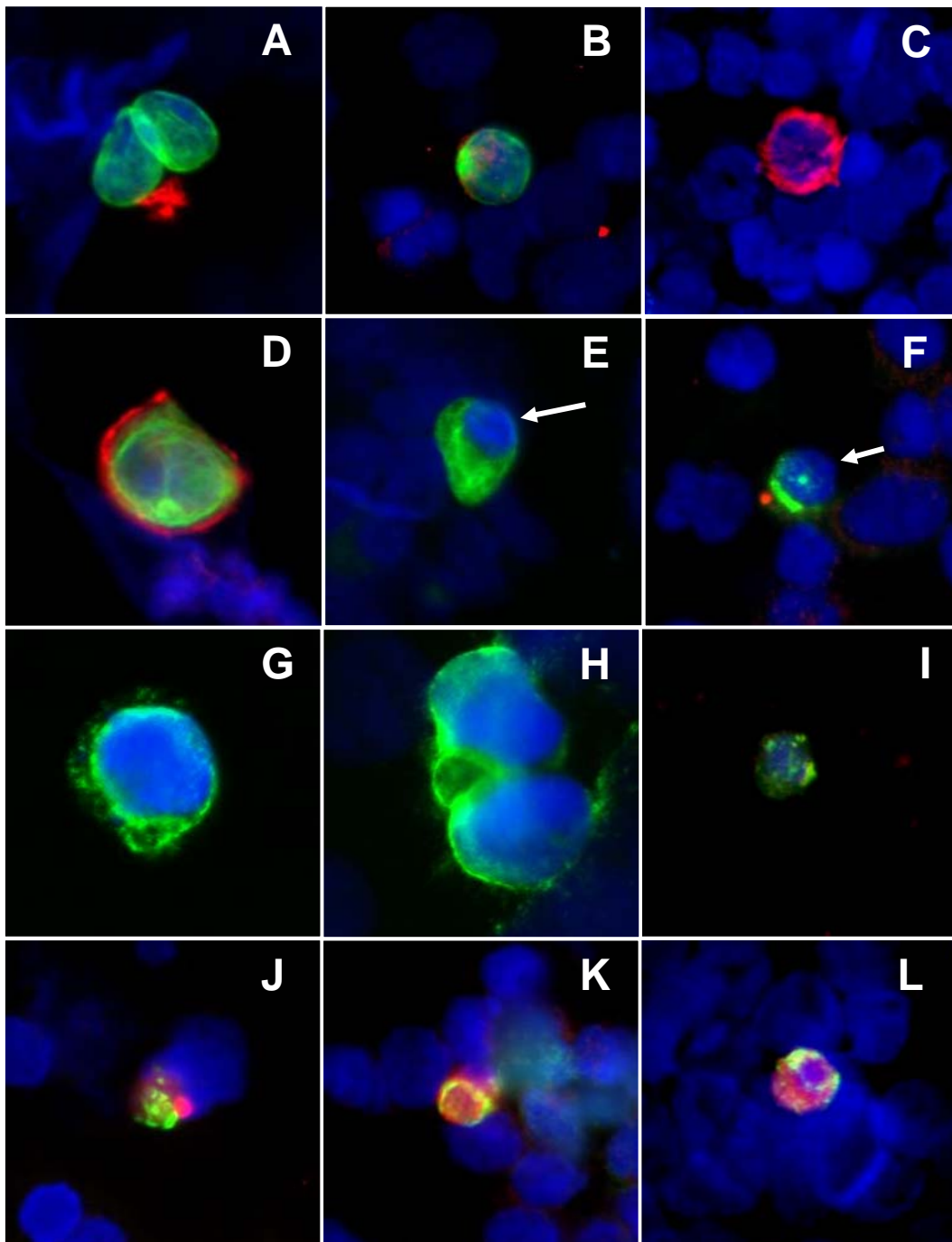


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von Zytokeratin (pCK-FITC, grün) und Her-2/neu (Rabbit CB11, Anti- Rabbit- TexasRed, rot) und Einteilung der gefärbten Zellen in drei Kategorien:

I. A)-D) Diese Zellen sind der Kategorie 1 zugeordnet. Morphologisch große runde Zellen mit zytoplasmatischem, ringförmigem Färbemuster für Zytokeratin und gegebenenfalls randständigem, ebenfalls ringförmigen Färbemuster für Her-2/neu. C) zeigt dabei eine rein Her-2/neu-positive Tumorzelle und D) eine doppelt-positive Tumorzelle.

II. E)-H) sind der Kategorie 2 zuzurechnen. Bei ringförmigem Färbemuster weisen sie einen teilweise ungefärbten Randsaum (→) (E) und (F) auf oder zeigen Anzeichen für Apoptose (G) und (H), entsprechen ansonsten aber Kriterien der Kategorie 1.

III. I)-L) Zellen mit uncharakteristischem Färbemuster werden in Kategorie 3 eingeteilt. Dazu gehören Zellen mit unspezifischer Färbung (I), mit nur teilweiser Anfärbung (J) und kleinere, eher hämatopoetische Zellen (K und L).

Eine eindeutig positive Tumorzelle, sowohl für Zytokeratin, als auch Her-2/neu, zeigt Abbildung 15. Nebstehend finden sich für diese Erläuterungen zytomorphologischer und immunphänotypischer Aspekte.

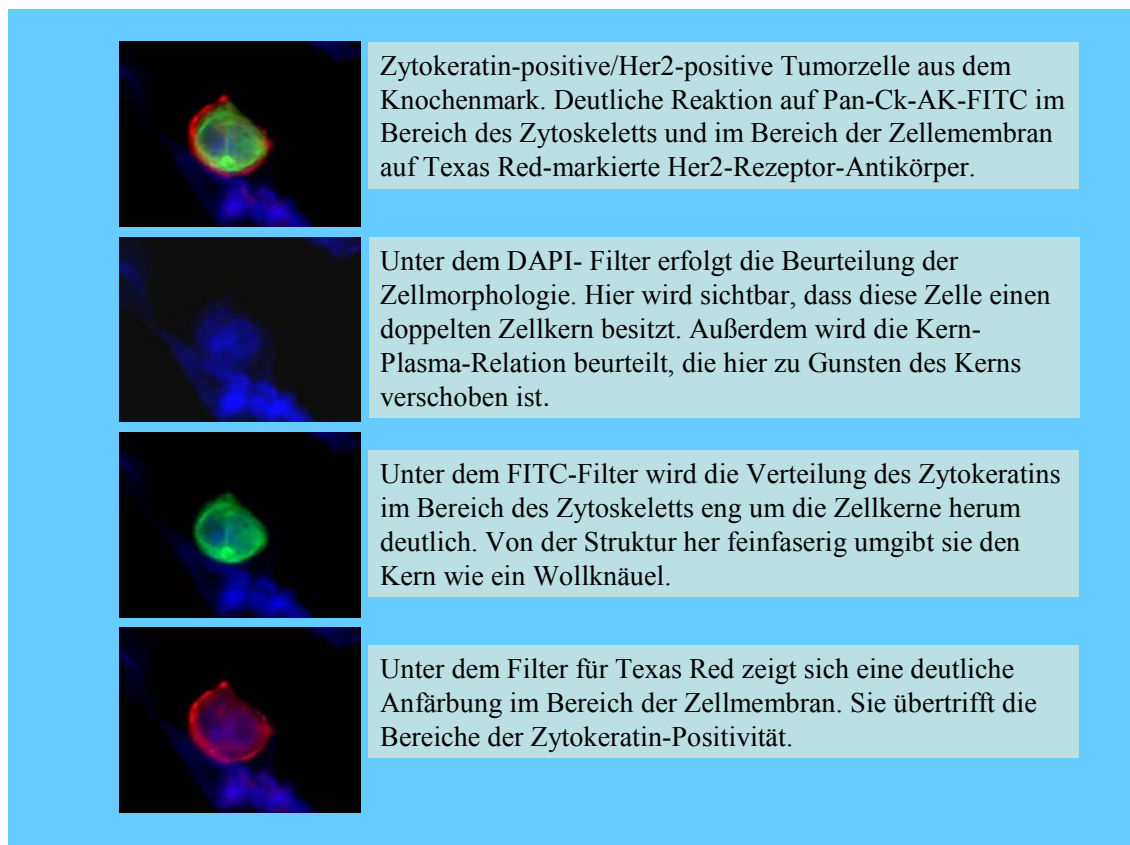


Abbildung 15: Auswertungskriterien einer Tumorzelle. Die hier gezeigte Zelle wird mit Hilfe der 3 Sperrfilter analysiert. Der genaue Ablauf ist neben den Bildern beschrieben.

2.3.3. Immunhistochemische Färbung des Primärtumors

Es gibt mehrere Nachweismöglichkeiten für die Her-2/neu- Expression des Primärtumors. Als Referenzstandard und klinisch praktikable Methode wird derzeit die Immunhistochemie (IHC) angesehen.^{47;55} Hierfür liegt eine nach DAKO® standardisierte und in einem semiquantitativen Score auszuwertende Methode vor.

Die immunhistochemischen Analysen wurden mit bioptisch oder chirurgisch entferntem Untersuchungsmaterial durchgeführt. Das Gewebe wurde mit 4.5%-iger Formalinlösung (pH 7.0) fixiert und in Paraffin eingebettet. Die immunhistochemische Färbung wurde an 3 bis 5 µm dünnen Schnitten durchgeführt, wobei ein kommerziell erhältliches ABC-kit (Vectastain, Vector Laboratories, CA, USA) verwendet wurde. Der Her-2/neu- Antikörper (Klon A 0485) wurde 1:2000 mit Tris-HCl (pH 7.5) verdünnt und entsprechend der Anweisung des Herstellers (HERCEP™ test, Dako, Glostrup, Denmark) aufgebracht. DAB (3,3' diamino-benzidine) wurde dabei als Farbstoff verwendet. Die Objektträger wurden mit Hämatoxylin gefärbt und für die Untersuchung fixiert. Die Her-2/neu- Expression wurde semi-quantitativ nach dem Score 0 bis +3 klassifiziert. Als Her-2/neu- positiv wurden Tumoren bezeichnet, deren Score +2 oder +3 betrug. Bei einem Score von +2 wurde zur Feststellung einer Her-2/neu- Amplifikation eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchgeführt, wobei das Pathvysion™-kit HER2/NEU von Vysis (Downers Grove, IL) entsprechend den Herstellerangaben benutzt wurde.

Immunhistochemie (IHC)

DAKO Hercep Test™ zur Bestimmung der Her-2/neu-Expression des Primärtumors

(IHC)

Bestimmung der HER2-Protein-Überexpression
(semiquantitativer DAKO Hercep Test™)

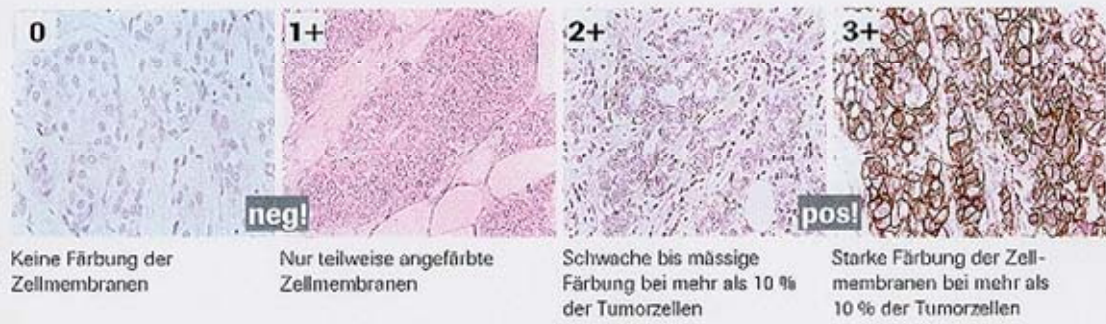


Abbildung 16: Die Abbildung zeigt den Hercep-Test von Dako. Die Her-2/neu-Überexpression des Primärtumors wird anhand des semiquantitativen Scores von 0 bis 3+ klassifiziert. Als positiv wird der Hercep-Test ab einer schwachen bis mässigen Färbung bei mehr als 10% der Tumorzellen gewertet; dies entspricht einem Hercep-Score von 2+.

2.3.4. Abgleich mit Datenbank Tumorcharakteristik

Die erhobenen Daten wurden mit den Befunden der Routinediagnostik verglichen, die ein anderes immunhistochemisches Verfahren (mAb A45-B/B3, APAAP, Neufuchsin) nutzt, und den Ergebnissen der rt-PCR für Her-2/neu. Außerdem wurden die erhobenen Daten mit der Tumorcharakteristik des Primärtumors der einzelnen Patientinnen verglichen.

2.3.5. TNM-Klassifikation

Eingeschlossen wurden Patientinnen der Stadien pT₁- pT₄, pN₀- pN₄, M₀ und dem Grading G₁- G₃ entsprechend der UICC-Einteilung. Die klinischen und pathologischen Angaben zu den Patienten finden sich in Tabelle 3.

2.3.6. Statistische Methoden

Zur Evaluation der Beziehung zwischen den disseminierten Tumorzellen und dem klinischen Profil des Primärtumors wurde der X^2 - Test oder Fishers exact Test verwendet. Die statistische Analyse wurde mit SPSS (Version 11.5) durchgeführt. Als signifikant wurden p-values unter 0.05 bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv

Bei Patientinnen mit primärem, nicht- metastasiertem Mammakarzinom wurde im Rahmen des operativen Primäreingriffs an der Universitätsfrauenklinik Tübingen präoperativ eine Knochenmarkaspiration an der Spina iliaca anterior superior zur immunhistochemischen Untersuchung auf hämatogene Tumorzell dissemination durchgeführt. Per definitionem versteht man unter *primär* die Erstmanifestation eines Malignoms, *nicht- metastasiert* bezeichnet das Fehlen solider Absiedlungen des Primärtumors. Untersucht wurde gewonnenes Zellmaterial von 137 Patientinnen aus einem Zeitraum von Februar 2002 bis Januar 2005. Die klinischen und klinisch- pathologischen Daten der Patientinnen, deren Zellmaterial untersucht wurde, finden sich in Tabelle 3.

Aus ihr wird ersichtlich, dass es sich um überwiegend postmenopausale Patientinnen mit einem Durchschnittsalter von 57 Jahren handelt; die Älteste war 83 Jahre und die Jüngste 24 Jahre alt. Die Tumorgröße war bei der Mehrzahl der Patientinnen kleiner als 2 Zentimeter (55,5% der Fälle pT1). Bei den übrigen Patientinnen war die Tumorgröße 2 Zentimeter und größer. Bei ungefähr 40 % der Patientinnen fand sich eine Beteiligung axillärer Lymphknoten. Keine der Patientinnen zeigte bei Diagnosestellung und Zellentnahme eine Metastasierung (M0). Bei jeder Patientin wurde zum Ausschluß einer Filialisierung die übliche präoperative Diagnostik (Röntgen Thorax, Oberbauchsonographie, Skelettszintigraphie) durchgeführt. Histologisch fanden sich bei dem größten Teil der Patientinnen mäßig differenzierte Tumorzellen (80% der Fälle), entsprechend einem Grading von 2. Dabei handelte es sich in der Mehrzahl um duktale Formen (58%), aber auch lobuläre (17%) und duktulo-lobuläre (21%) Formen. Ein positiver Hormonrezeptorstatus fand sich für Östrogen bei 80 % und für Progesteron bei 65% der Patientinnen. Der Her-2/neu- Status des Primärtumors war bei 79% der Patientinnen negativ, einem Score von 0 oder +1 im HercepTesttm entsprechend.

Tabelle 3: Klinische Daten der Patientinnen

Kriterien	Differenzierung	Anzahl	[%]
Menopausenstatus	prämenopausal	37	27
	postmenopausal	100	73
Tumorgroße	pT1	76	55,5
	pT2-4	59	43
	pTx	2	1,5
Lymphknotenstatus	Negativ (pN ₀)	83	60,5
	Positiv (pN ₁₋₃)	54	39,5
Grading	I	13	10
	II	109	82,5
	III	10	7,5
Histologie	duktal	79	58
	lobulär	23	17
	duktulo-lobulär	29	21
	andere	6	4
ER- Status (ER=Öströgenrezeptor)	negativ	27	20
	positiv	107	80
PR- Status (PR=Progesteronrezeptor)	negativ	47	35
	positiv	87	65
Her-2/neu	negativ (0/+1)	106	79
	positiv (+2/+3)	29	21

3.2. Knochenmarkbefund

3.2.1. Knochenmarkbefunde bei Patientinnen

Nach Zellentnahme und - präparation wurde die mononukleäre Zellfraktion immunhistochemisch gefärbt. Verwendung fanden Antikörper zum Nachweis von Zytokeratin und Her-2/neu, wobei sich sowohl hinsichtlich Zellmorphologie als auch Färbeverhalten deutliche Unterschiede unter den Zellen zeigten.

Zur Klassifizierung wurden diese Zellen in 3 Kategorien unterteilt, die im Material/ Methoden- Teil anhand typischer Vertreter eingehend erläutert sind (siehe Abbildung 14).

Basierend auf dieser Einteilung wurden Patientinnen nur dann als positiv im Sinne einer Tumorzell dissemination gewertet, wenn Zellen der Kategorie 1 in ihrem Knochenmarkspirat gefunden wurden.

So konnten 3 Tumorzelltypen (Zytokeratin- positiv, Her-2/neu- positiv, doppel- positiv) gefunden werden. Der Färbeerfolg wurde mit den Zelllinien SKBr-3 und MCF-7 dokumentiert und kontrolliert (siehe Abschnitt 3.2.2.).

Abbildungen 16 bis 20 zeigen entsprechende Zellen.

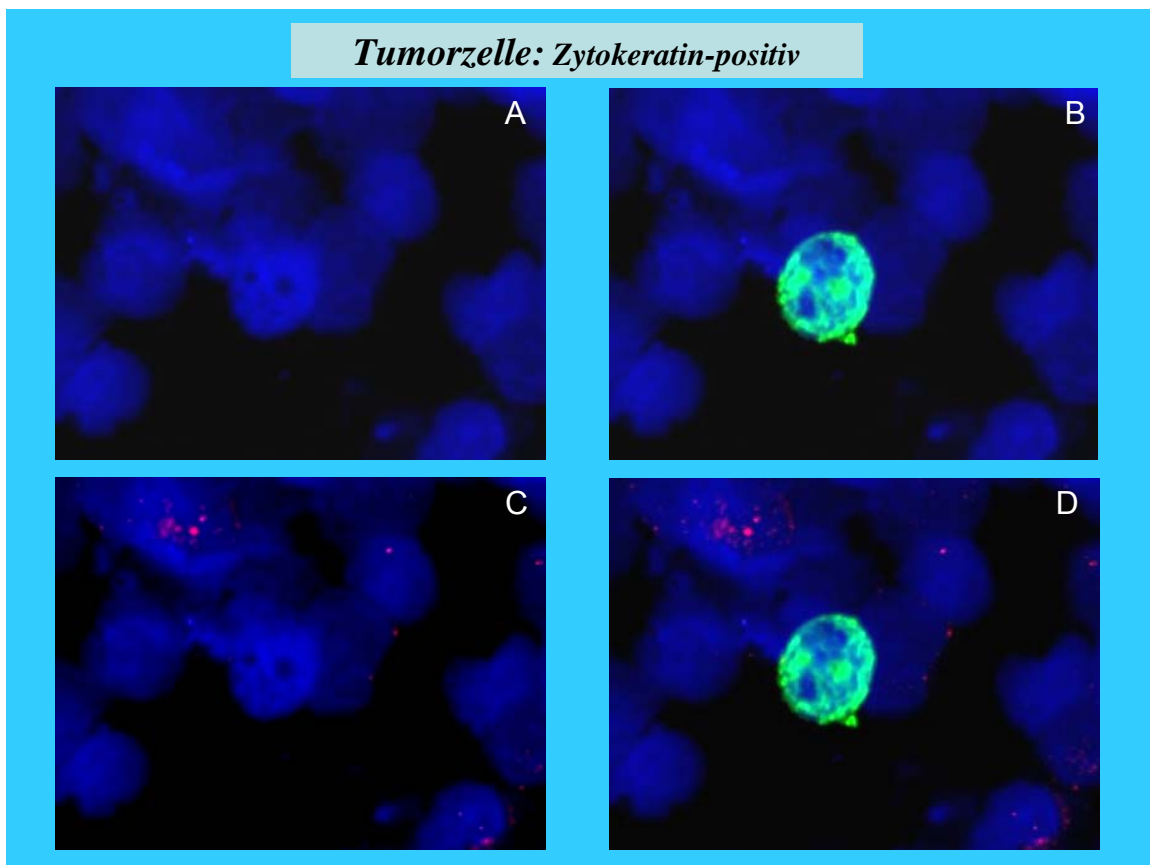


Abbildung 17:

Disseminierte Tumorzelle bei 40-facher Vergrößerung unter 1.00 Ölimmersion zeigen die Bilder **A)-D)** denselben Bildausschnitt unter den verschiedenen Sperrfiltern. Bild **A)** zeigt unter dem DAPI- Filter die Kernmorphologie, **B)** zeigt Zytokeratin- Antigene über die Anreicherung des FITC-markierten Pan-Zytokeratin-Antikörper, **C)** zeigt die Her-2/neu-Expression über die Anreicherung des Texas Red markierten Her-2/neu- Antikörpers und **D)** zeigt die Filter FITC/ TexasRed/ Dapi zusammen (Triple bandpass-filter).

Beurteilung: Bei vergrößertem Zellkern (A) zeigt sich eine deutliche zytoplasmatische Anreicherung des FITC-markierten Pan-Zytokeratin- Antikörpers (B), wobei die Her-2/neu-Reaktion negativ ist (C). Bild (D) zeigt somit eine disseminierte rein zytokeratin-positive Tumorzelle.

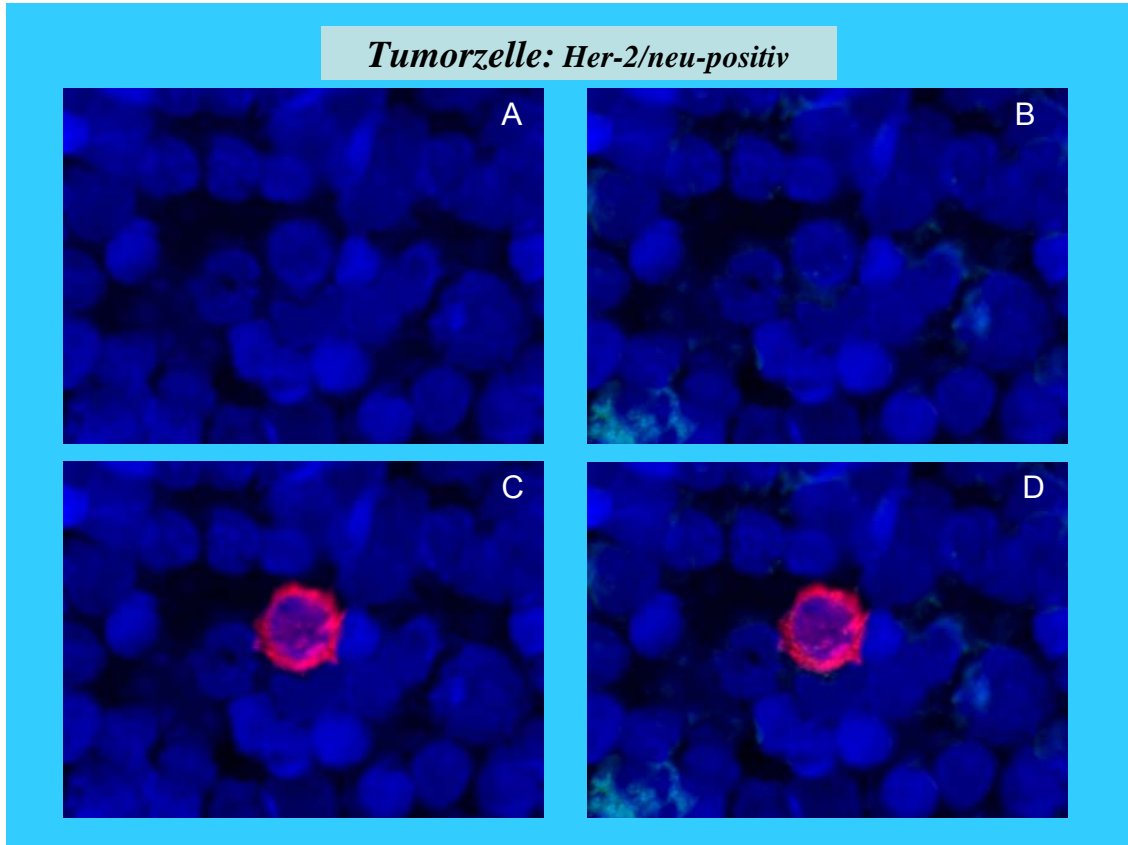


Abbildung 18:

Disseminierte Tumorzelle: Bei 40-facher Vergrößerung unter 1.00 Ölimmersion zeigen die Bilder A)-D) denselben Bildausschnitt unter den verschiedenen Sperrfiltern. Bild A) zeigt unter dem DAPI- Filter die Kernmorphologie, B) zeigt Zytokeratin- Antigene über die Anreicherung des FITC- markierten Pan- Zytokeratin- Antikörper, C) zeigt die Her-2/neu- Expression über die Anreicherung des Texas Red markierten Her-2/neu- Antikörpers und D) zeigt die Filter FITC/ TexasRed/ Dapi zusammen (Triple bandpass- filter).

Beurteilung: Bei (gering) vergrößertem Zellkern (A) zeigt sich bei einer negativen Reaktion auf den FITC- markierten Pan-Zytokeratin- Antikörper (B) eine deutliche ringförmige, zellmembranständige Anreicherung des Texas red-markierten Her-2/neu- Antikörpers (C). Bild (D) zeigt somit eine disseminierte, rein Her-2/neu- positive Tumorzelle.

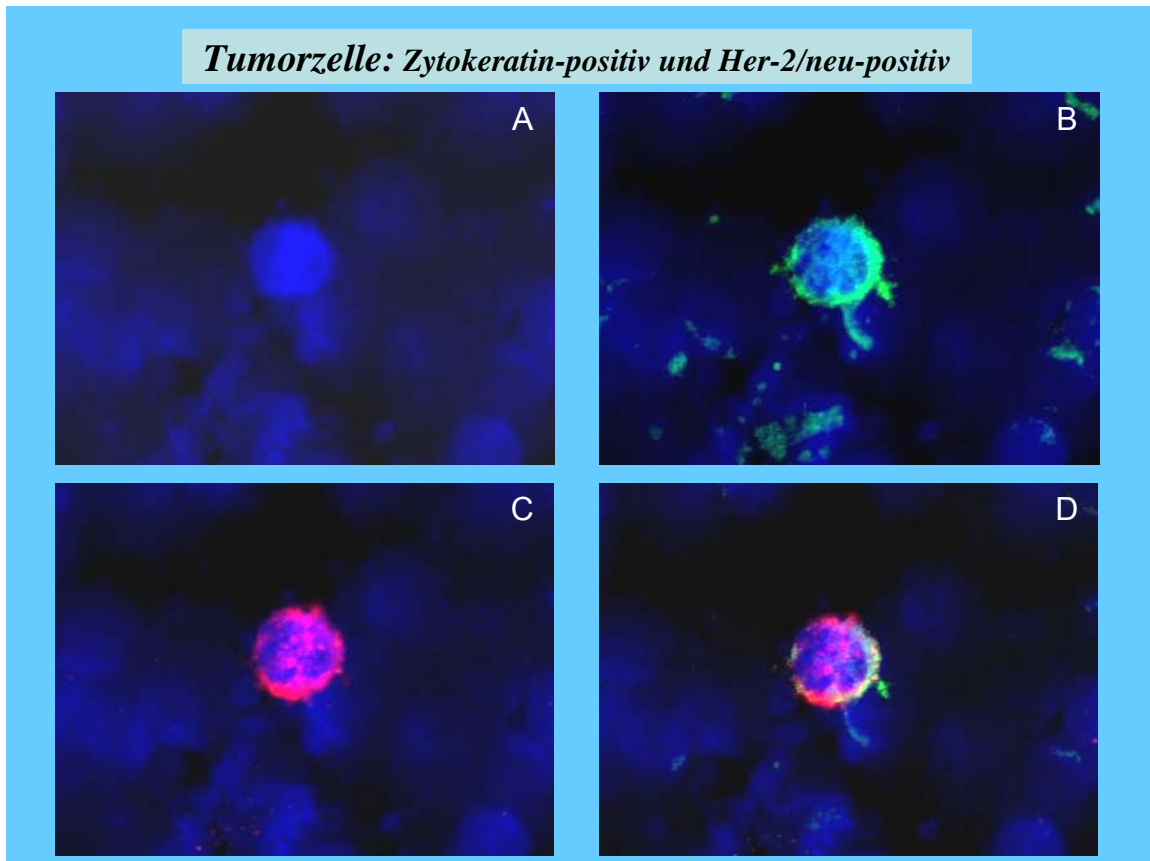


Abbildung 19:

Disseminierte Tumorzelle: Bei 40-facher Vergrößerung unter 1.00 Ölimmersion zeigen die Bilder **A-D**) denselben Bildausschnitt unter den verschiedenen Filtern. Bild **A**) zeigt unter dem DAPI- Filter die Kernmorphologie, **B**) zeigt Zytokeratin- Antigene über die Anreicherung des FITC- markierten Pan- Zytokeratin- Antikörper, **C**) zeigt die Her-2/neu- Expression über die Anreicherung des Texas Red markierten Her-2/neu- Antikörpers und **D**) zeigt die Filter FITC/ TexasRed/ Dapi zusammen (Triple bandpass- filter).

Beurteilung: Bei vergrößertem Zellkern (**A**) zeigt sich eine deutliche zytoplasmatische Anreicherung des FITC-markierten Pan- Zytokeratin- Antikörpers (**B**); gleichzeitig zeigt sich eine deutliche ringförmige, zellmembranständige Anreicherung des Texas red- markierten Her-2/neu- Antikörpers (**C**). In Bild (**D**) wird deutlich sichtbar, dass verschiedene Epitope der Zelle durch die unterschiedlichen Antikörper besetzt sind und somit eine spezifische Anfärbung vorliegt. Somit zeigt (**D**) eine disseminierte zytokeratin- und Her-2/neu- positive Tumorzelle.

3.2.2. Kontrollfärbung anhand tumorspezifischer Zelllinien

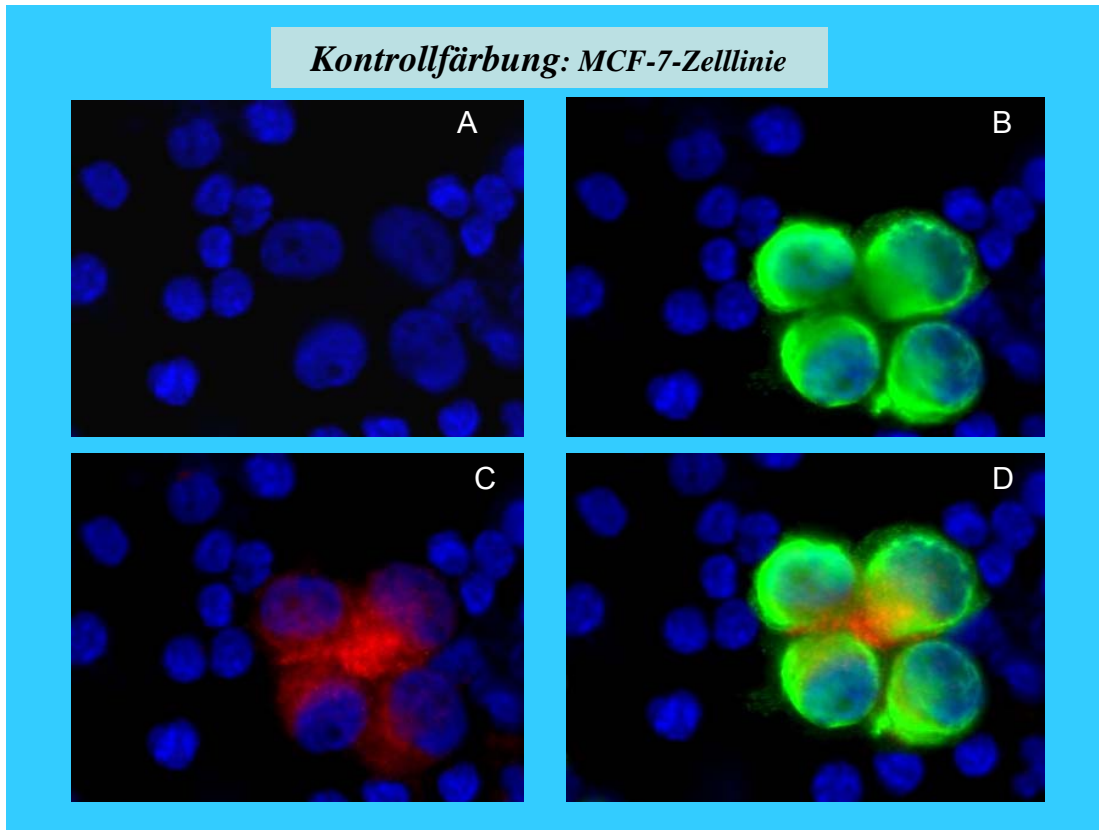


Abbildung 20:

MCF-7-Zellen als Positivkontrolle: Bei 40-facher Vergrößerung unter 1.00 Ölimmersion zeigen die Bilder **A-D**) denselben Bildausschnitt unter den verschiedenen Filtern. Bild **A**) zeigt unter dem DAPI- Filter die Kernmorphologie, **B**) zeigt Zytokeratin- Antigene über die Anreicherung des FITC-markierten Pan- Zytokeratin- Antikörper, **C**) zeigt die Her-2/neu- Expression über die Anreicherung des Texas Red markierten Her-2/neu- Antikörpers und **D**) zeigt die Filter FITC/ TexasRed/ DAPI zusammen (Triple bandpass- Filter).

Beurteilung: Cluster von MCF-7 Zellen mit charakteristischer Zytokeratin- Anfärbung im Zytoplasma- Bereich und unspezifischer Reaktion für Her-2/neu bei Darstellung mit TexasRed. Die Zellkerne sind deutlich vergrößert.

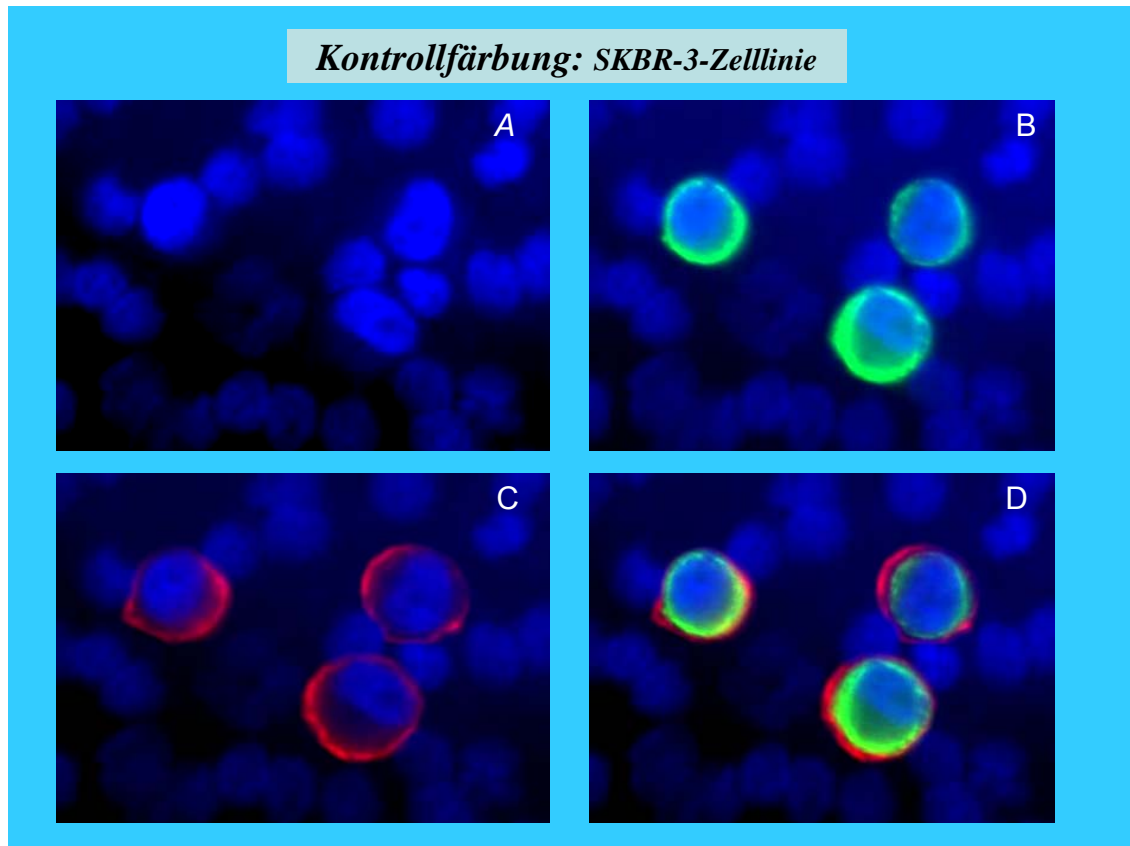


Abbildung 21:

SKBR-3-Zellen als Positivkontrolle: Bei 40-facher Vergrößerung unter 1.00 Ölimmersion zeigen die Bilder **A-D**) denselben Bildausschnitt unter verschiedenen Filtern. Bild **A**) zeigt unter dem DAPI- Filter die Kernmorphologie, **B**) zeigt Zytokeratin- Antigene über die Anreicherung des FITC- markierten Pan- Zytokeratin- Antikörper, **C**) zeigt die Her-2/neu- Expression über die Anreicherung des Texas Red markierten Her-2/neu- Antikörpers und **D**) zeigt die Filter FITC/ TexasRed/ DAPI zusammen (Triple bandpass- Filter).

Beurteilung: Die Abbildung zeigt charakteristische SKBR-3-Zellen mit deutlich vergrößerten Zellkernen, einer deutlichen Zytokeratin-Färbung über FITC im Bereich des Zytoplasma und eine ringförmige Anreicherung im Bereich der Zellmembran für Texas red- markierte Her-2/neu- Antikörper.

3.3. Nachweis disseminierter Tumorzellen

Unter den 137 Patientinnen dieses Kollektivs konnte bei 34% eine Tumorzell dissemination in Form eines positiven Knochenmarkbefundes gezeigt werden.

Die Anzahl der nachgewiesenen disseminierten Tumorzellen variierte zwischen einer und 15 Zellen pro Patientin. Bei 17 der 46 (37%) Patientinnen mit positivem Knochenmarkbefund wurde mehr als eine positive Tumorzelle gefunden.

Innerhalb dieses Kollektivs erwies sich das Auftreten von disseminierten Tumorzellen als unabhängig von herkömmlichen etablierten prognostischen Faktoren. So konnte keine Korrelation zwischen einem positiven Knochenmarkbefund und der Tumorgröße ($p = 0,17$), dem Lymphknotenstatus ($p = 0,75$) und dem Grading ($p = 0,81$) gefunden werden. Auch bei den Faktoren, die der Tumorbiologie zuzurechnen sind, fand sich keine Korrelation zu einem positiven Knochenmarkbefund. Hier ergab sich für disseminierte Tumorzellen und den Her-2/neu-Status des Primärtumors eine p-value von 0.14 ($p = 0,14$), für disseminierte Tumorzellen und den Östrogenrezeptorstatus eine p-value von 0.60 ($p = 0,60$) und für disseminierte Tumorzellen und den Progesteronrezeptorstatus eine p-value von 0,58 ($p = 0,58$). Einzelheiten zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Klinische Daten der Patientinnen und Tumorzelldissemination

	Anzahl	Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen (%)	p- Werte
Anzahl Gesamt	137	46 (34)	
Menopausenstatus			
-prämenopausal	37	14 (38)	0.52
-postmenopausal	100	32 (32)	
Tumorgröße			
-pT1	76	29 (38)	0.17
-pT2-4	59	16 (27)	
Lymphknotenstatus			
-negativ	83	27 (33)	0.75
-positiv	54	19 (35)	
Histologie			
-duktal	79	28 (35)	0.57
-lobulär	23	8 (35)	
-duktal-lobulär	29	7 (24)	
-sonstige	6	3 (50)	
Grading			
-I	13	5 (39)	0.81
-II	109	35 (32)	
-III	10	4 (40)	
Östrogenrezeptor			
-negativ	27	10 (37)	0.60
-positiv	107	34 (32)	
Progesteronrezeptor			
-negativ	47	14 (30)	0.58
-positiv	87	30 (35)	
Her-2/neu			
-negativ (0/+1)	106	32 (30)	0.14
-positiv (+2/+3)	29	13 (45)	

3.4. Her-2/neu-Expression disseminierter Tumorzellen

Bei 25 der 46 (54%) Patientinnen mit einem positiven Knochenmarkbefund zeigte sich keine Her-2/neu-Expression der disseminierten Tumorzellen. Her-2/neu positive Zellen konnten bei 21* (46%) der Patientinnen gefunden werden. (*Aufgrund unvollständiger histologischer Parameter musste eine Patientin für die anschließende Auswertung ausgeschlossen werden). Tabelle 5 zeigt die Einzelheiten der Immunphänotypisierung der disseminierten Tumorzellen, Abbildung 22 zeigt dazu Beispielbilder.

Tabelle 5: Immunphänotyp der disseminierten Tumorzellen

<i>Immunphänotyp</i>	<i>Anzahl Patienten (%)</i>
<i>gesamt</i>	<i>46 (100)</i>
<i>Ck+/ Her2-</i>	<i>25 (54)</i>
<i>Ck-/ Her2+</i>	<i>1 (2)</i>
<i>Ck+/ Her2+</i>	<i>11 (24)</i>
<i>Ck+/ Her2- und Ck+/ Her2+</i>	<i>3 (7)</i>
<i>Ck-/ Her2+ und Ck+/ Her2+</i>	<i>1 (2)</i>
<i>Ck-/ Her2+ und Ck+/ Her2-</i>	<i>5 (11)*</i>
<i>Ck+/ Her2- , Ck+/ Her2+ und Ck-/ Her2+</i>	<i>0 (0)</i>

*Aufgrund unvollständiger histologischer Parameter musste eine Patientin für die anschließende Auswertung ausgeschlossen werden

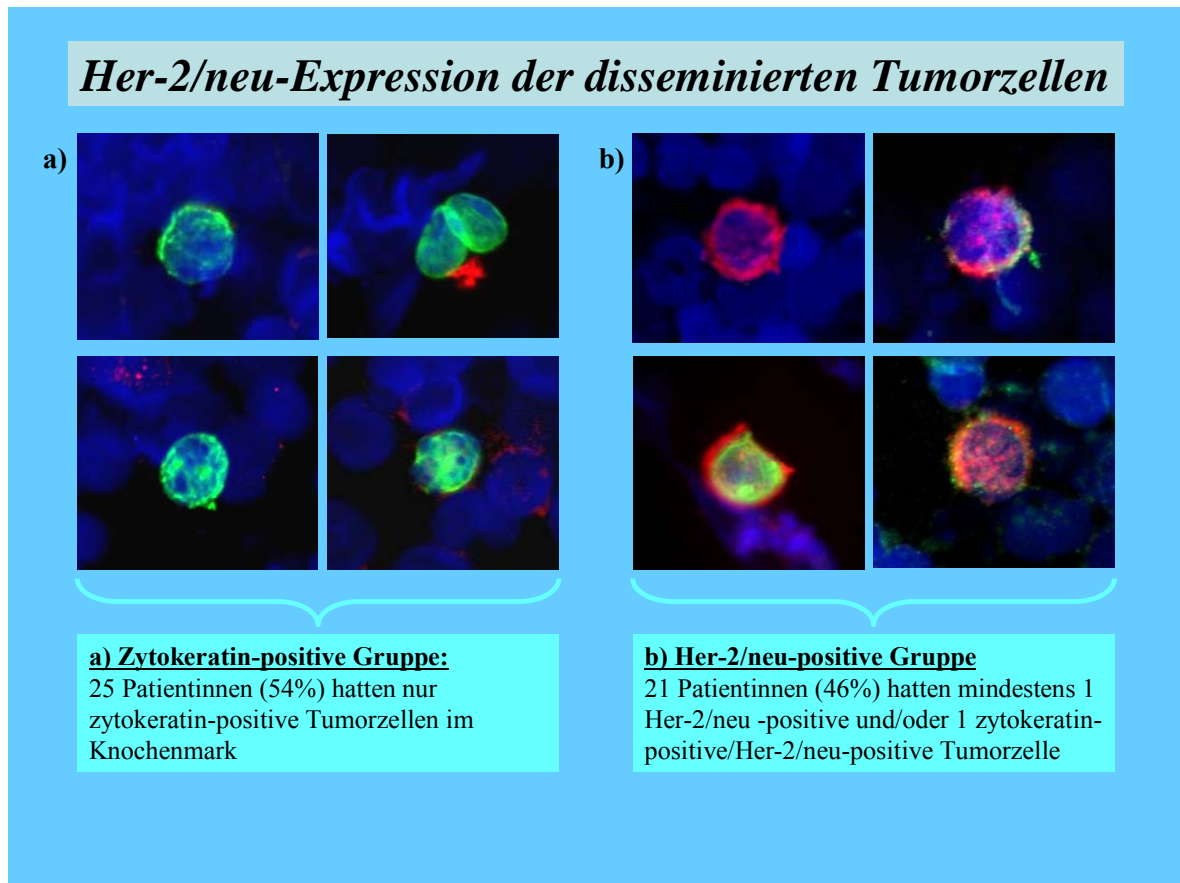


Abbildung 22: Die Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen sind in 2 Gruppen aufgeteilt: Gruppe (A) stellt Beispiele disseminierter Tumorzellen der Patientinnen mit rein zytokeratin-positiven Zellen dar. In Gruppe (B) werden Patientinnen mit Her-2/neu- positiven disseminierten Tumorzellen, darunter Zytokeratin-negativ/ Her-2- positiv, Zytokeratin- positiv/ Her-2- positiv und Mischformen, zusammengefasst.

Die Her-2/neu- Expression der disseminierten Tumorzellen zeigte keine Korrelation zu den herkömmlichen etablierten prognostischen Faktoren wie Menopausenstatus ($p = 0,35$), Tumorgroße ($p = 0,07$), Lymphknotenstatus ($p = 0,38$), Östrogenrezeptorstatus ($p = 1$) und Progesteronrezeptorstatus ($p = 1$). Es zeigte sich auch keine Korrelation hinsichtlich des Her-2/neu- Status des Primärtumors ($p = 0,17$) und dem Auftreten einer Her-2/neu-Überexpression an den disseminierten Tumorzellen. Einzelheiten dazu zeigen Tabelle 5 und Tabelle 6.

Table 6: *Klinische Daten der Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen und Charakterisierung hinsichtlich Her-2/neu-Expression*

	Anzahl Patientinnen	Anzahl Patientinnen mit Her-2/neu-positiven disseminierten Tumorzellen (%)	p- Wert
Gesamt	46	20 (43)	-
Menopausenstatus			
-prämenopausal	14	8 (57)	0.35
-postmenopausal	32	13 (41)	
Tumorgröße			
-pT1	29	16 (55)	0.07
-pT2-4	16	4 (25)	
Lymphknotenstatus			
-negativ	27	14 (52)	0.38
-positiv	19	7 (37)	
Östrogenrezeptor			
-negativ	10	4 (40)	1
-positiv	34	15 (44)	
Progesteronrezeptor			
-negativ	14	6 (43)	1
-positiv	30	13 (43)	

3.5. Heterogenität der Her-2/neu-Expression unter disseminierten Tumorzellen

Es konnten Abweichungen in der Antigenexpression disseminierter Tumorzellen gezeigt werden. Bei einem Teil der Patientinnen lag eine heterogene Expression vor; das bedeutet, dass die bei einer Patientin gefundenen Tumorzellen sich in ihrem Färbeverhalten untereinander unterscheiden.

Die einzelnen gefundenen disseminierten Tumorzellen zeigten untereinander Abweichungen in der Antigenexpression, beschrieben über Zytokeratin und Her-2/neu. Hier konnte eine heterogene Expression von Her-2/neu unter disseminierten Tumorzellen bei 7 von 17 (41%) Patientinnen gesehen werden; dies zeigen Tabelle 7 und Abbildung 23.

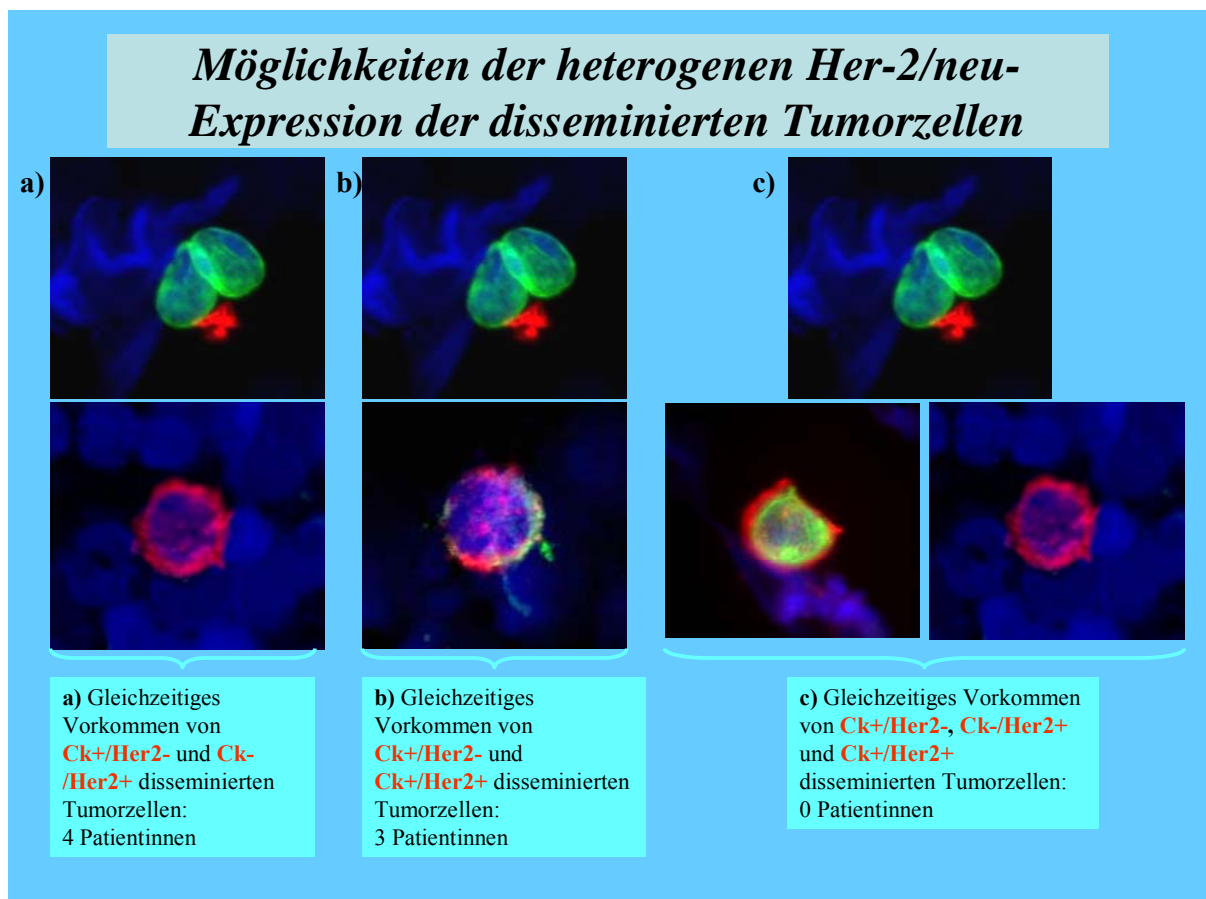


Abbildung 23: Die Her-2/neu-Expression unter den disseminierten Tumorzellen erwies sich bei 7 der 17 Patientinnen (41%) mit mehr als einer Tumorzelle als heterogen. Die genaue Einteilung zeigt die Abbildung. Dabei fallen 4 Patientinnen in Gruppe (a), 3 in Gruppe (b) und 0 Patientinnen in Gruppe (c). 10 Patientinnen (59%) zeigten eine homogene Her-2/neu-Expression.

Table 7: Heterogenität der Her-2/neu- Expression

<i>Immunphänotyp</i>	<i>Anzahl Patientinnen (%) mit >2 disseminierten Tumorzellen</i>
Gesamt	17 (100)
<i>Ck+/ Her2-</i>	6 (35.3)
<i>Ck+/ Her2+</i>	2 (11.8)
<i>Ck-/ Her2+</i>	1 (5.9)
<i>Ck-/ Her2+ und Ck+/ Her2+</i>	1 (5.9)
<i>Ck+/ Her2- und Ck+/ Her2+</i>	3 (17.6)
<i>Ck+/ Her2- und Ck-/ Her2+</i>	4 (23.5)
<i>Ck+/ Her2- , Ck+/ Her2+ und Ck-/ Her2+</i>	0 (0)

3.6. Heterogenität der Her-2/neu-Expression zwischen disseminierten Tumorzellen und dem Primärtumor

Daraus ergab sich als weitere Frage, ob sich Her-2/neu- überexprimierende, disseminierte Tumorzellen auch bei Patientinnen mit einem negativen Befund des Primärtumors in Bezug auf Her-2/neu-Expression finden lassen.

Der Her-2/neu- Status des Primärtumors wurde immunhistochemisch mit dem HERCEP[®]- Test (Dako Co., CA) bestimmt. Die Her-2/neu- Expression wurde nach dem üblichen Score von 0 bis 3+ klassifiziert. Tumoren mit einem HERCEP[®]-Score von +2/+3 werden üblicherweise als Her-2/neu-positiv eingestuft.

Von 46 Patientinnen, die disseminierte Tumorzellen aufwiesen, konnten bei 45 Patientinnen histologische und immunologische Daten des Primärtumors erhoben werden. Bei 32 der 45 (71%) Patientinnen konnte der Primärtumor als Her-2/neu-negativ bewertet werden, welches einem HERCEP[®]- Score von 0 bis

1+ entspricht. Bei 20 von diesen zeigte sich auch an den disseminierten Tumorzellen ein negativer Her-2/neu- Status.

Bei 13 der 45 (29 %) Patientinnen wurde der Primärtumor als Her-2/neu positiv gewertet, welches einem HERCEP®- Score von 2+ und 3+ entspricht. Von diesen zeigten 8 Patientinnen auch einen positiven Her-2/neu- Status bei den disseminierten Tumorzellen.

Die Konkordanzrate zwischen disseminierten Tumorzellen und Primärtumor lag bei 62% (p = 0.17).

Abweichende Ergebnisse zeigten sich dagegen bei 12 der 32 (38%) Patientinnen, die einen negativen Her-2/neu- Status am Primärtumor aufwiesen: Hier konnte bei den disseminierten Tumorzellen eine positive Her-2/neu- Expression nachgewiesen werden. Bei 5 von 13 (38%) Patientinnen mit Her-2/neu- positivem Primärtumor zeigten sich nur Her-2/neu- negative disseminierte Tumorzellen.

Tabelle 8 zeigt den Vergleich der Her-2/neu- Expression zwischen Primärtumor und den disseminierten Tumorzellen.

Tabelle 8: Korrelation zwischen dem Her-2/neu- Status des Primärtumors und dem Her-2/neu- Status der disseminierten Tumorzellen (DTC)

	Her-2/neu-Status disseminierter Tumorzellen	Her-2/neu positiv (%)	Her-2/neu negativ (%)	Gesamt (%)
Primärtumor	<i>Her-2/neu- negativ</i>	12 (27)	20 (44)	32 (71)
	Score 0	7	16	23
	Score +1	5	4	9
	<i>Her-2/neu- positiv</i>	8 (18)	5 (11)	13 (29)
	Score +2	1 ¹	2 ²	3
	Score +3	7	3	10
Gesamt		20 (44)	25 (56)	45 (100)

¹Her-2/neu nicht über Fluoreszenz-in-situ (FISH) amplifiziert;

²Her-2/neu über FISH amplifiziert (Anzahl n = 1), FISH nicht durchgeführt (n = 1).

4. Diskussion

Einleitung und Fragestellung

Die Mehrzahl der Krebsneuerkrankungen und der malignombedingten Todesfälle in den westlichen Industrieländern wird durch maligne epitheliale Tumoren verursacht. Bei sich immer weiter fortentwickelnden Möglichkeiten der chirurgischen Lokalthherapie werden die Mortalitätsraten zunehmend durch Tumorzellstreuung beeinflusst, die mit den derzeitigen bildgebenden Verfahren nicht erfasst werden kann.

Das Verbleiben einzelner versprengter Tumorzellen im Knochenmark äußert sich dann häufig erst Jahre später in Form eines Rezidivs und/oder einer Spätmetastasierung; diese ist insbesondere für das Mammakarzinom geradezu charakteristisch.

Die Prognose des Mammakarzinoms in der adjuvanten Situation konnte durch ausgedehnte Früherkennungs- und modifizierte Therapiemaßnahmen gebessert werden. Das metastasierte Mammakarzinom ist bei heute besseren 5-Jahres-Überlebensraten nach wie vor unheilbar, die Therapie folgt einem palliativen Regime.

Anfängliche radikale Therapiemaßnahmen in Form der verstümmelnden Operation nach Rotter-Halsted (1898) sind heute obsolet und wurden von einem multimodalen Therapiekonzept ersetzt. Dieses umfasst stadienabhängig neben einer zwingenden Tumorsektion, meist in brusterhaltender Form mit Nachbestrahlung, eine Sentinellymphknotenbiopsie, eine adjuvante Chemotherapie, eine Immuntherapie und eine Hormontherapie; denn heute wird Brustkrebs weniger als lokale Erkrankung gesehen, sondern vielmehr als eine chronisch- systemische Tumorerkrankung mit lokaler Komponente und frühem systemischen Befall betrachtet.

Das primäre, nicht- metastasierte Mammakarzinom kann mit diesem Therapieansatz in den meisten Fällen als zumindest lokal geheilt betrachtet werden. Ein großer Teil der Patientinnen weist allerdings zu diesem Zeitpunkt bereits eine hämatogene Streuung auf, die sich den herkömmlichen diagnostischen Verfahren entzieht.³⁸ So erkranken trotz fehlendem Nachweis

neoplastischer Residuen mittels der modernen bildgebenden Verfahren 30 bis 40% der Patientinnen innerhalb der ersten 10 Jahre nach der Primärtherapie an einer Metastase.

Warum adjuvant therapierte Patientinnen noch 10 bis 20 Jahre nach kurativer Primärtherapie eine Metastasierung entwickeln können, ist weitgehend ungeklärt. Für dieses Ereignis sind einerseits allgemeine Risiko-, Prognose und Prädiktionsfaktoren definiert; andererseits lassen diese allgemeinen Faktoren, die neben dem Ausbreitungsstadium des Tumors (pTNM) auch das Wachstumsmuster (Grading, histopathologischer Befund) und andere biologischen Kriterien (Steroidhormonrezeptoren, Proliferationskinetik, Expressionsmuster tumorassoziierter Antigene etc.) berücksichtigen, keine Aussagen über das individuelle Rezidivrisiko einzelner Patientinnen zu.

Ergänzende Faktoren, die eine individuellere Einschätzung für das Risiko eines Rezidivs und/ oder einer (Spät-) Metastasierung erlauben, müssen definiert und etabliert werden; dafür müssen Diagnostik und Therapie erweitert werden.

Dabei wird insbesondere dem Vorkommen von hämatogen disseminierten Tumorzellen im Knochenmark Bedeutung beigemessen. Tumorzell dissemination scheint ein Indikator für systemischen Befall zu sein und ist neuesten Erkenntnissen zufolge als ein unabhängiger Risikofaktor zu sehen.^{19;36} In der neuesten Auflage der TNM-Klassifikation wird das Vorkommen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark als pM0(i+) berücksichtigt, sofern es sich um Tumoreinzellen oder Zellkomplexe kleiner als 0.2mm handelt.⁸⁵ Tumorzell dissemination ist ein Stadium vor der Mikrometastasierung, so dass eine Stromainfiltration (noch) nicht vorliegt; bei der Mikrometastasierung ist das umgebende Gewebe bereits infiltriert, so dass eine palliative Situation vorliegt. Die disseminierten Zellen gehen dagegen nicht unbedingt in eine Metastasierung über. Somit ist in dieser Situation eine kurative Therapie denkbar.⁸⁸ Eine kurative Therapie, die sich gegen einzelne Zellen richtet, ist in Form einer immunologischen Therapie denkbar. Dafür müssen spezielle Tumor- Zell- Epitope als Angriffsziel für eine Therapie mit Antikörpern gefunden werden.

Es war das Ziel der Analysen dieser Dissertationsschrift, die Bedeutung des

Her-2/neu- Proteins exprimiert an den disseminierten Tumorzellen als prognostischen und prädiktiven Faktor für das Mammakarzinom weiter abzugrenzen und seinen Stellenwert in der Her-2/neu- Diagnostik für die Selektion von Patientinnen zugunsten einer Herceptin- Therapie zu bestimmen. Dabei sollte der Her-2/neu- Status der disseminierten Tumorzellen insbesondere im Vergleich zu der Her-2/neu- Expression des Primärtumors untersucht werden.

Methodik

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mittels einer immunhistochemischen Doppelfärbung neben dem Tumorzellnachweis eine Charakterisierung der disseminierten Tumorzellen hinsichtlich ihrer Her-2/neu- Expression. Ziele waren dabei, eine Her-2/neu- Überexpression disseminierter Tumorzellen festzustellen und mit dem Her-2/neu-Status des Primärtumors zu vergleichen.

Das Patientenkollektiv umfasste Patientinnen aller Altersgruppen, die sich in einem frühen Krankheitsstadium befanden; denn insbesondere bei dieser Population kommt dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark größte Bedeutung zu.

Das untersuchte Zellmaterial wurde durch Aspiration aus dem vorderen Beckenkamm gewonnen.^{32;48} Dies entspricht der üblichen Entnahmestelle zum Nachweis einer hämatogenen Tumorzell dissemination. Möglich ist der Nachweis einer Tumorzell dissemination auch in anderen Metastasierungskompartimenten wie Leber und peripherem Blut; Leberbiopsien erwiesen sich in diesem Zusammenhang als zu komplikationsträchtig. Ein weiterer Forschungsschwerpunkt ist der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut; durch Etablierung von Methoden zur Zellanreicherung können auch im peripheren Blut disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden.^{8;42;66;79}

Wegen der langen Überlebenszeit der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sind sie für die genaue Darstellung des Krankheitsverlaufs und den Erfolg einer therapeutischen Intervention wenig hilfreich.¹⁵ Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Blut spiegelt aufgrund einer relativ kurzen Überlebenszeit einen dynamischen Prozess wider. Der Nachweis von

disseminierten Tumorzellen im Blut könnte damit frühzeitig eine Tumorrezidivierung anzeigen und zur Kontrolle des Krankheitsverlaufs und der Therapie eine Alternative zu der aufwendigen Knochenmarkpunktion sein.

Neben methodologischen Schwierigkeiten ist auch die Wertigkeit der auf diese Weise detektierten Zellen fraglich, so dass diese Methode für den Einsatz in der Routine noch zu etablieren ist.⁸

Als Nachweismethoden stehen molekularbiologische (PCR, rt-PCR) und immunologische Methoden (Immunzytologie, FISH, Durchflußzytometrie) zur Verfügung. Der Nachweis einer Zelldissemination solider Karzinome erfolgt mangels (Mammakarzinom-) spezifischer Marker in der Regel über anti-epitheliale Antigene, die in den Metastasierungskompartimenten - Knochenmarkmesenchym beispielsweise- normalerweise nicht vorkommen. Die mit Abstand wichtigste Nachweis- und Screeningmethode nach disseminierten Tumorzellen ist die Immunzytochemie; sie gilt als die Standardnachweismethode.¹¹ Falsch positive Ergebnisse können durch die zusätzliche morphologische Charakterisierung der Zellen minimiert werden. Zusätzlich sind durch die gleichzeitige Durchführung mehrerer Immunfärbungen und/oder die Kombination mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verschiedene Aussagen auf Einzelzellbasis -zum Beispiel zum Vorhandensein spezifischer Antigene wie Her-2/neu- möglich.

Dearnaley et al. war eine der ersten Arbeitsgruppen, die sich mit dem Nachweis von epithelialen Zellen im Knochenmark bei Mammakarzinompatientinnen beschäftigt hatte.²³ Die Detektion erfolgte immunhistochemisch mit einem Antikörper, der gegen das epitheliale muzinöse Oberflächenantigen (*EMA*) gerichtet war.²⁴

Der Marker *EMA* erfüllte allerdings nur bedingt das Kriterium der Spezifität.²⁵ Derzeit werden Zytokeratine zum Nachweis disseminierter Tumorzellen epithelialer Genese als Marker eingesetzt, die eine höhere Spezifität aufweisen.⁷¹

Auf dieser Grundlage erfolgte der Nachweis der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark immunhistochemisch über fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen Zytokeratinbestandteile mittels des FITC- markierten

Panzytokeratinantikörpers C11. Da Zellen der Hämatopoese normalerweise keine Zytokeratinkomponenten auf ihrer Oberfläche exprimieren, können die detektierten zytokeratinpositiven Zellen bei hoher Spezifität und Sensitivität der Nachweismethode als disseminierte Tumorzellen epithelialer Genese angesehen werden.^{74;92}

Vor einem möglichen Routineeinsatz der Immunzytochemie müssen immunzytochemische Assays weiter standardisiert und in prospektiven Studien evaluiert werden. Schnellere Ablesbarkeit, bessere Reproduzierbarkeit und objektivere Auswertung können durch Automatisierung der Testmethoden erreicht werden.

Neben dem immunhistochemischen Nachweis sind mittlerweile auch molekularbiologische Verfahren zur Detektion von epithelialen Zellen im Knochenmark und Blut etabliert worden.^{50;75} Neuere Methoden sollen insbesondere dem Problem der geringen Inzidenz der disseminierten Tumorzellen begegnen. In der Evaluation sind immunomagnetische Anreicherungsverfahren, reverse-transkriptase Polymerase- Ketten Reaktion (rt- PCR) und die Durchflußzytometrie.^{27;70;92} Die molekularbiologische Detektion weist eine hohe Sensitivität mit 1-10 epithelialen Zelle(n) auf 10^9 Leukozyten auf.⁴⁰ Karzinomzellen weisen genetische Alterationen von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen -k-ras- Mutation beispielsweise- auf. Diese können mit der Polymerasekettenreaktion auf DNA-Ebene nachgewiesen werden.⁴⁵

Im Gegensatz zu den hämatologischen Neoplasien liegen beim Mammakarzinom allerdings keine spezifischen Mutationen, wie das Philadelphia-Chromosom beispielsweise, vor, die alle Tumorzellen betreffen. Aus diesem Grund wird die rt- PCR bevorzugt. Bei dieser Methode wird mit Hilfe der reversen Transkriptase mRNA von tumorassoziierten Proteinen amplifiziert und damit die Präsenz von Tumorzellen nachgewiesen. Zu den bisher untersuchten mRNA- Markern zählen Zytokeratin (CK), das Carcinoembryonale Antigen (CEA), und der Rezeptor des Epithelialen Wachstumsfaktor (EGFR).

Der wesentliche limitierende Faktor im klinischen Einsatz der Methode liegt an

der *illegitimen* Amplifikation, die durch das Vorhandensein niedrig exprimierter Tumor- assoziierter Gene auch in gesunden Zellen entsteht. Da sich mit der PCR jede noch so geringe mRNA amplifizieren lässt, ist die Unterscheidung in Einzelfällen schwierig, ob es sich um Amplifikation von mRNA aus einer Tumorzelle oder um eine illegitime Amplifikation einer gesunden Zelle handelt. Auch bestehen Unterschiede in der Transkriptmenge sowohl von Tumorzelle zu Tumorzelle als auch von Patient zu Patient, so dass aufgrund unterschiedlicher Expressionsraten keine sichere Aussage über die tatsächliche Tumorzellzahl möglich ist.

Die gefärbten Präparate wurden manuell unter einem Fluoreszenzmikroskop auf das Vorkommen disseminierter Tumorzellen und deren Her-2/neu-Expression hin untersucht. Neben der geringen Inzidenz und den Schwierigkeiten beim Auffinden der disseminierten Tumorzellen stellte deren Klassifikation ein weiteres Problem dar. Da zytologische Präparate in erster Linie nach subjektiven Kriterien beurteilt werden, können sich hier untersucherabhängige Unterschiede in der Klassifizierung von Tumorzellen ergeben. Um diese Probleme weitgehend zu meiden, folgte die Klassifikation Kriterien, die eine objektive Auswertung ermöglichen sollen. Diese Kriterien sind von der European ISHAGE Working Group zur Standardisierung des Tumorzellnachweises definiert worden.¹¹

Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Knochenmarkaspirate von 137 Patientinnen mit einem primären, nicht metastasierten Mammakarzinom auf disseminierte Tumorzellen und deren Her-2/neu- Expression hin untersucht.

Bei 46 (34%) der 137 untersuchten Patientinnen konnten disseminierte Tumorzellen im Knochenmark gefunden werden. 20 von diesen zeigten Her-2/neu-positive Tumorzellen, wobei sich nur bei 8 dieser Patientinnen Her-2/neu-positive Primärtumoren finden ließen.

Diskutiert werden verschiedene Hypothesen dieser Diskrepanz zwischen dem Primärtumor und seinen disseminierten Tumorzellen hinsichtlich der Her-2/neu-Expression. Ein mögliches Erklärungsmodell ist, dass eine kleine Population

Her-2/neu positiver Tumorzellen innerhalb des Primärtumors existiert und Ausgangspunkt der Streuung dieser Her-2/neu positiven disseminierten Tumorzellen ist. Per definitionem wird ein Primärtumor nämlich erst dann als Her-2/neu- positiv bewertet, wenn der Anteil an Her-2/neu- positiven Zellen in der feingeweblichen Untersuchung mehr als 10% des untersuchten Tumorgewebes ausmacht. Bei einem geringeren Anteil gilt der Tumor als Her-2/neu- negativ und wird entsprechend behandelt.⁶¹ Weiterhin wird vermutet, dass Her-2/neu positive Tumorzellen einen Vorteil bei Wachstum und Überleben haben und deshalb häufiger in Blut und Knochenmark gefunden werden können.¹² Ein anderes Erklärungsmodell ist, dass bei disseminierten Tumorzellen im Verlauf ihrer Dissemination und/oder ihres Wachstums eine Amplifizierung des Her-2/neu- Gens entstanden sein könnte, was ebenfalls eine Überexpression von Her-2/neu zur Folge hätte.⁶¹

Gemäß den derzeitigen Behandlungsstandards wären 12 Patientinnen unserer Studie, die Her-2/neu- positive disseminierte Tumorzellen im Knochenmark aufwiesen, für eine Behandlung mit Trastuzumab nicht geeignet gewesen, da der Primärtumor als Her-2/neu- negativ gewertet wurde.

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die zirkulierenden Tumorzellen bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom durch eine Therapie mit Trastuzumab eliminiert werden können.^{46;61} Diesen Erkenntnissen zufolge wäre es sinnvoll, den Her-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen in die Therapieentscheidung mit einzubeziehen, da dies eine verbesserte und individuellere Behandlung erlaubt, die über die gängige Adjuvantz hinausgeht.

5 von 13 Patientinnen mit Her-2/neu- positivem Primärtumor hatten Her-2/neu- negative disseminierte Tumorzellen. Diese Abweichung hat keine größere therapeutische Konsequenz, da diese Patientinnen als Her-2/neu- positiv gewertet werden und folglich Trastuzumab erhalten würden. Der Effekt von Trastuzumab bei Patientinnen mit Her-2/neu- positivem Primärtumor und Her-2/neu- negativen disseminierten Tumorzellen ist nicht bekannt, da bei der *HERA (Herceptin Adjuvant)* - Studie weder das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen (Knochenmarkstatus) noch ihre Charakterisierung hinsichtlich Her-

2/neu- Expression als Behandlungskriterien verwendet wurden.

Bei 7 der 17 Patientinnen, die mehr als eine positive Tumorzelle hatten, war die Her-2/neu- Expression heterogen. Dies könnte durch Heterogenität der Her-2/neu- Expression innerhalb des Primärtumors verursacht sein. Bei diesen Patientinnen könnte Trastuzumab nicht ausreichen, die gestreuten Zellen vollständig zu zerstören. Erforderlich ist also, weitere Moleküle als Angriffspunkt zu finden, die es - nach erfolgter adjuvanter Therapie - ermöglichen, verbleibende Tumorzellnester zu zerstören. Vielversprechende Objekte einer Zweitlinientherapie sind hierbei zum Beispiel der EGF- Rezeptor und tumorassoziierte Glykoproteine.

Literatur

Durchschnittlich weisen je nach Studie 15 bis 50% der Patientinnen mit einem primären, nicht- metastasierten Mammakarzinom bei Diagnosestellung disseminierte Tumorzellen im Knochenmark auf.⁷² 15 % dieser Patientinnen zeigen auch nach erfolgter kurativer Therapie in Form von chirurgischer Tumorsektion und adjuvanter Chemotherapie weiterhin disseminierte Tumorzellen im Knochenmark.⁴⁹ Die Persistenz disseminierter Tumorzellen trotz adjuvanter Chemotherapie ist mit einer schlechten Prognose hinsichtlich Rezidiv und Überleben assoziiert.⁴⁹

Als Ursache für die Ineffektivität konventioneller Chemotherapieprotokolle sieht man biologische Besonderheiten einiger disseminierter Tumorzellen; diese befinden sich zum großen Teil in der G₀ - Phase des Zellzyklus und entgehen somit einer antiproliferativen Chemotherapie. Dieses Phänomen ist in der Literatur als „tumor cell dormancy“ beschrieben.^{60;64} Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß nur ein geringer Prozentsatz proliferiert und somit einer antiproliferativen Therapie zugänglich wird.⁷⁴ Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß auch nach einer hochdosierten Chemotherapie bei 44% der Patientinnen weiterhin disseminierte Tumorzellen im Knochenmark zu finden waren.¹⁵

Die klinische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Hinblick auf eine verschlechterte Prognose ist in den letzten Jahren mit zunehmender Häufigkeit

beschrieben worden.^{15;28;39;59;89} Die Prognoseverschlechterung beruht auf dem metastatischen Potential, welches in den disseminierten Tumorzellen gesehen wird. Dieses metastatische Potential scheint jedoch nicht bei allen Tumorzellen gleichermaßen vorhanden zu sein. In Langzeitstudien konnte nämlich gezeigt werden, dass nicht alle Patientinnen mit nachgewiesenen disseminierten Tumorzellen im Knochenmark auch solide Metastasen entwickeln.⁵⁹ Basierend auf diesen Studien sowie experimentellen Tierversuchen wird vermutet, dass disseminierte Tumorzellen nach Entfernen des Primärtumors bei einem Teil der Patientinnen aus Blut und Knochenmark eliminiert werden und absterben. Bei einem anderen Teil ist dies nicht der Fall; dort persistieren die Tumorzellen.^{29;58;99} Wie oben angesprochen können diese *schlafenden* Tumorzellen einer adjuvanten antiproliferativen Chemotherapie entgehen, da sie sich zum Teil in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden, und können bis zu 20 Jahre später zu proliferieren beginnen. Unklar bleibt, welche Faktoren die Latenzzeit, die von der Tumorzell dissemination bis zur klinischen Manifestation einer Metastase vergeht, bestimmen.

Als mutmaßliche Ursache dieses Phänomens sind tumorbiologische Unterschiede zwischen den einzelnen disseminierten Tumorzellen anzusehen, die eine genauere Charakterisierung erfordern.

Da sich bisherige Therapieregime in minimal residualen Tumorstadien als weitgehend wirkungslos gezeigt haben, könnte eine zusätzliche adjuvante Immuntherapie ausgerichtet auf die disseminierten Tumorzellen sinnvoll sein. Wie in vorangegangenen Studien beschrieben könnten die Patientinnen von dieser profitieren.^{82;87}

Her-2/neu ist das vielversprechendste Ziel einer solchen Therapie. In verschiedenen klinischen Studien hat sich Trastuzumab, ein monoklonaler Antikörper gegen Her-2/neu, bei der Tumorreduktion in der metastasierten Situation als wirksam erwiesen.^{21;94} Die Wirkung von Herceptin in der adjuvanten Situation wurde im Rahmen der *HERA (Herceptin- Adjuvant)*-Studie und der *NSABP-B31/NCCTG N9831*- Studie untersucht.^{77;81}

Die vor kurzem veröffentlichten Studienergebnisse zeigen, dass auch Patientinnen mit primärem Brustkrebs schon in der adjuvanten Situation von

einer Immuntherapie mit Trastuzumab enorm profitieren könnten. Aktuell ist der Phänotyp des Primärtumors der Goldstandard für die Wahl einer antikörpergestützten Therapie.²⁶ So wird der Her-2/neu- Status gewöhnlich anhand von Gewebsschnitten des Primärtumors festgelegt. Der Her-2/neu-Status des Primärtumors ist nicht unbedingt repräsentativ für den Her-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen oder möglicher Metastasen. In diesem Zusammenhang sind Unterschiede im Antigenprofil von Primärtumor und seinen disseminierten Tumorzellen bzw. seinen Metastasen in 5 bis 20% der Fälle beschrieben; Tabelle 9 zeigt entsprechende Daten.^{7;18;31;37;61;91}

Tabelle 9: Korrelation des Her-2/neu- Status von Primärtumor und Metastasen zu disseminierten Tumorzellen (DTC)

<u>Autoren</u>	Anzahl	Primärtumor Her2- positiv (%)	Disseminierte Tumorzellen Her2-positiv (%)	Metastasen Her2- positiv (%)	Übereinstimmung in %
Bachmann	45	14 (29)	20 (44)	n.u. ²	63
Becker ⁷	105	26 (25)	22 (21)	n.u. ²	77
Braun ¹⁸	24	7 (29)	15 (63)	n.u. ²	58
Meng ⁶¹	33	15 (46)	11 (33)	n.u. ²	88
Ganzberg ³⁷	107	13 (12)	n.u. ²	19 (18)	93
Edgerton ³¹	93	n.v. ¹	n.u. ²	n.v. ¹	74-84
Tanner ⁹¹	46	n.v. ¹	n.u. ²	n.v. ¹	100

¹ keine Daten verfügbar, ² nicht untersucht

Schlussfolgerung

Den gewonnenen Erkenntnissen zufolge wäre es sinnvoll, den Her-2/neu-Status der disseminierten Tumorzellen in die Therapieentscheidung mit einzubeziehen, da dies eine verbesserte und individuellere Behandlung erlaubt, die über die gängige Adjuvanz hinausgeht.

Voraussetzung für eine gelungene Selektion der Patientinnen zugunsten einer dieser Therapieformen ist ein gut standardisierter, reliabler und valider Nachweis von Her-2/neu. Im Allgemeinen wird Her-2/neu entweder als membrangebundenes Protein durch die Immunhistochemie (IHC) oder durch die Markierung des überamplifizierten Gens über die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen.^{47;55;78;80}

5. Zusammenfassung

Die Persistenz von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Brustkrebs ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Vorbereitende Studien lassen erkennen, dass diese Patientinnen von einer gezielten, sekundär- adjuvanten Therapie profitieren können. Das Her-2/neu-Protein wird als eines der wichtigsten Targets angesehen. Ziele dieser Studie waren zum einen, den Her-2/neu- Status von disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark festzustellen, und zum anderen, den Her-2/neu- Status der disseminierten Tumorzellen mit dem des Primärtumors zu vergleichen. Hiermit kann die Bedeutung einer Her-2/neu- Expression bei disseminierten Tumorzellen hinsichtlich Prognose und Prädiktion beim Mammakarzinom gezeigt werden; möglich wird dadurch auch eine feinere Selektion von Patientinnen hinsichtlich einer Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab. Der Her-2/neu- Status der disseminierten Tumorzellen sollte dabei im Vergleich zu den klassischen Prognosefaktoren wie beispielsweise der TNM- Klassifikation und der Tumormorphologie untersucht werden. Die Her-2/neu- Expression des Primärtumors sollte dabei besondere Beachtung finden. Tumorzell dissemination ist der entscheidende Schritt im komplexen Prozess der Metastasierung. In den von einem Primarius gestreuten Zellen wird eine frühsystemische Komponente der Tumorausbreitung gesehen. Diese Zellen werden als mögliche Ursache einer Rezidivierung nach kurativer Resektion des Primärtumors diskutiert. Mit den Methoden der modernen Bildgebung ist das Vorkommen von disseminierten Tumorzellen nicht nachweisbar. Die Detektion wird über die Immunzytochemie geführt, indem in mesenchymalen Körperkompartimenten wie beispielsweise dem Knochenmark zellspezifische Strukturen des Zytoskeletts epithelialer Zellen, Zytokeratin- Antigene, nachgewiesen und auf Einzelzellbasis dargestellt werden. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen bei Patientinnen mit Mammakarzinom ist zu jedem Zeitpunkt mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

Nach oft jahrzehntelangem krankheitsfreien Intervall wird insbesondere beim Mammakarzinom in diesen Zellen die mögliche Ursache der (späten) Fernmetastasierung gesehen; deshalb rücken diese in das Zentrum

weitergehender Überlegungen zur Optimierung bisheriger therapeutischer Strategien. Trotzdem ist der alleinige Nachweis disseminierter Tumorzellen prognostisch nicht ausreichend, da nicht alle Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen ein Rezidiv und/ oder Metastasen entwickeln. Mögliche Erklärung sind interindividuelle Unterschiede im tumorbiologischen Profil unter den disseminierten Tumorzellen. Dies erfordert deren genauere Charakterisierung; dem Her-2/neu- Rezeptor wird dabei neben anderen aufgrund aggressiveren Tumorverhaltens bei Überexpression am Primärtumor besondere Bedeutung zugemessen.

In dieser Arbeit wurden Knochenmarkaspirate von 137 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom angefertigt und mit einer immunhistochemischen Doppelfärbung auf zytokeratin- positive und/ oder Her-2/neu- positive Tumorzellen hin untersucht. Der Her-2/neu- Status des Primärtumors wurde mit dem HERCEP- test™ immunhistochemisch an bioptisch und/oder chirurgisch gewonnenem Untersuchungsmaterial festgestellt.

Bei 46 (34%) Patientinnen wurden zytokeratin-positive Tumorzellen im Knochenmark gefunden. 20 (43%) dieser Patientinnen hatten Her-2/neu-positive disseminierte Tumorzellen. Bei 7 (41%) von 17 Patientinnen mit mehr als einer zytokeratin- positiven Tumorzelle war die Her-2/neu- Expression der disseminierten Tumorzellen heterogen. Bei 13 der 45 Primärtumoren fand sich eine Her-2/neu- Überexpression (+2/ +3). Die Konkordanzrate zwischen Primärtumor und disseminierten Tumorzellen lag bei 62 %. Bei 12 der 20 Her-2/neu- negativen Primärtumoren fanden sich Her-2/neu- positive disseminierte Tumorzellen.

Die Erkenntnis, dass Her-2/neu- positive disseminierte Tumorzellen bei Patientinnen mit Her-2/neu- negativen Primärtumoren gefunden werden können, kann durch Erweiterung der etablierten adjuvanten Behandlungsschemata therapeutische Relevanz gewinnen. So kann es sinnvoll sein, die Antigenstruktur der disseminierten Tumorzellen bei der Therapieplanung in Form einer sekundären, Antikörper- gestützten Therapie zu berücksichtigen. Dadurch können auch Tumorzellen, die sich in der G₀ - Phase

des Zellzyklus („Dormancy“) befinden und eine Her-2/neu- Überexpression aufweisen, gezielt bekämpft und die Erkrankung auch im Stadium der Tumorzell dissemination kontrolliert werden.

Weiter konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung der Her-2/neu-Überexpression bei den disseminierten Tumorzellen der einzelnen Patientinnen heterogen ist und damit bei diesem Subkollektiv neben Her-2/neu-überexprimierenden auch Her-2/neu- negative Tumorzellen zu finden sind. Dies kann die Wahl der geeigneten Therapie erschweren, da eine Immuntherapie - selektiv ausgerichtet auf die bei einem Teil der disseminierten Tumorzellen nachgewiesene Her-2/neu- Überexpression- in ihrer Effektivität beeinträchtigt sein könnte. Um in solchen Fällen den Effekt der Immuntherapie zu steigern, ist es erforderlich, zusätzliche Proteine zu finden, die sich als Angriffsziel für eine Therapie mit Antikörpern eignen.

Bisher wird die Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab, der seit einiger Zeit für die metastasierte Situation und in letzter Zeit auch für die adjuvante Situation zugelassen ist, ausschließlich anhand der Her-2/neu-Expression des Primärtumors festgelegt. Diese Dissertationsschrift sollte die Vorteile aufzeigen, die sich durch die Berücksichtigung der Her-2/neu-Expression der disseminierten Tumorzellen bei der Therapiewahl ergeben. Zusammenfassend ist durch Berücksichtigung tumorbiologischer Faktoren der disseminierten Tumorzellen eine schärfere Selektionierung der Subkollektive möglich. Inwiefern dadurch zusätzliche therapeutische Möglichkeiten gewonnen werden, muss noch in Studien überprüft werden. Therapeutische Konsequenzen sind bei der Wahl einer geeigneten, dann individualisierten Therapie des Mammakarzinoms denkbar, indem klarer wird, welche Patientin von welcher Therapie am meisten profitieren kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Hrsg.), Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 4. überarbeitete und aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken 2004.
2. Adzersen KH, Jess P, Freivogel KW, Gerhard I, Bastert G. Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a case-control study in Germany. *Nutr.Cancer* 2003;46:131-137.
3. Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 2000;342:564-571.
4. Bannasch P, Zerban H, Mayer D. The cytoskeleton in tumor cells. *Pathol.Res.Pract.* 1982;175:196-211.
5. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986;319:226-230.
6. Becker N. [Development of the incidence and mortality of breast cancer]. *Radiologe* 2001;41:337-343.
7. Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D, Solomayer EF. Her2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients. *Anticancer Res.* 2005;25:2171-2175.
8. Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D, Solomayer EF. Time is an important factor when processing samples for the detection of disseminated tumor cells in blood/bone marrow by reverse transcription-PCR. *Clin.Chem.* 2004;50:785-786.
9. Berger U, Bettelheim R, Mansi JL, Easton D, Coombes RC, Neville AM The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis. *Am.J.Clin.Pathol.* 1988;90:1-6.
10. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H Clark GM, Ferno M, Fuqua SA, Killander D, McGuire WL. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* 1990;50:4332-4337.
11. Borgen E, Beiske K, Trachsel S Nesland JM, Kvalheim G, Herstad 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.* 1998;185:427-434.
12. Brandt B, Roetger A, Heidl S Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G, Zanker KS. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive

- clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int.J.Cancer* 1998;76:824-828.
13. Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Carney WP. The c-erbB-2 protein in oncogenesis: molecular structure to molecular epidemiology. *Crit Rev.Oncog.* 1994;5:313-329.
 14. Braun S, Hepp F, Kantenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmuller G, Willgeroth F, Sommer HL. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin.Cancer Res.* 1999;5:3999-4004.
 15. Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J.Clin.Oncol.* 2000;18:80-86.
 16. Braun S, Pantel K. [Diagnosis and clinical significance of disseminated tumor cells in bone marrow]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 2000;125:1237-1239.
 17. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich 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.* 2000;342:525-533.
 18. Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G, Pantel K. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res.* 2001;61:1890-1895.
 19. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 2005;353:793-802.
 20. Chang-Claude J. Schwerpunktthema Frauen, Leben und Krebs.: Omnimed Verlagsgesellschaft; 1997:595-597.
 21. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:2639-2648.
 22. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J.Clin.Oncol.* 1991;9:1749-1756.

23. de Bono JS, Rowinsky EK. The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol.Med.* 2002;8:S19-S26.
24. Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG, Steele K, Coombes RC, Clink HM, Powles TJ, Ford HT, Gazet JC, Neville AM. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br.J.Cancer* 1981;44:85-90.
25. Delsol G, Gatter KC, Stein H, Erber WN, Pulford KA, Zinne K, Mason DY. Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. Implications for diagnosis of human neoplasms. *Lancet* 1984;2:1124-1129.
26. Di LA, Dowsett M, Horten B, Penault-Llorca F. Current status of HER2 testing. *Oncology* 2002;63 Suppl 1:25-32.
27. Diel IJ, Cote RJ. Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer. *Cancer Treat.Rev.* 2000;26:53-65.
28. 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 in comparison with nodal status. *J.Natl.Cancer Inst.* 1996;88:1652-1658.
29. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Kaul S, Krempien B, Goerner R, Bastert G. [The prognostic significance of tumor cell detection in bone marrow of patients with breast cancer]. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1990;50:923-928.
30. Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J.Clin.Oncol.* 1992;10:1534-1539.
31. Edgerton SM, Moore D, Merkel D, Thor AD. erbB-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 2003;11:214-221.
32. Ellis LD, Jensen WN, Westerman MP. Needle biopsy of bone and marrow, an experience with 1,445 biopsies. *Arch.Intern.Med.* 1964;114:213-221.
33. Eppenberger-Castori S, Kueng W, Benz C, Caduff R, Varga Z, Bannwart F, Fink D, Dieterich H, Hohl M, Muller H, Paris K, Schoumacher F, Eppenberger. Prognostic and predictive significance of ErbB-2 breast tumor levels measured by enzyme immunoassay. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:645-656.
34. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford 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.* 2002;8:2073-2084.
35. Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J, Gebauer. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy.* 2005;7:171-185.

36. Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J.Clin.Oncol.* 1998; 16:557-566.
37. Gancberg D, Di LA, Cardoso F, Rouas G, Pedrocchi M, Paesmans M, Verhest A, Bernard-Marty C, Piccart MJ, Larsimont D. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann.Oncol.* 2002;13:1036-1043.
38. Garfinkel L, Boring CC, Heath CW, Jr. Changing trends. An overview of breast cancer incidence and mortality. *Cancer* 1994;74:222-227.
39. Gebauer G, Fehm T, Merkle E Beck EP, Lang N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:3669-3674.
40. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J.Clin.Oncol.* 1994;12:725-729.
41. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Simopoulos C Polychronidis A, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E. c-erbB-2 related aggressiveness in breast cancer is hypoxia inducible factor-1alpha dependent. *Clin.Cancer Res.* 2004;10:7972-7977.
42. Griwatz C, Brandt B, Assmann G, Zanker KS. An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood. *J.Immunol.Methods* 1995;183:251-265.
43. Harbeck N. Prognostische und Prädiktive Faktoren beim Mamma- Ca. Vol Manual Mamma-Ca Tumorzentrum München. 2003:
44. Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br.J.Cancer* 1994;69:566-571.
45. Hardingham JE, Kotasek D, Farmer B Butler RN, Mi JX, Sage RE, Dobrovic A. Immunobead-PCR: a technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1993;53:3455-3458.
46. Hayes DF, Walker TM, Singh B Vitetta ES, Uhr JW, Gross S, Rao C, Doyle GV, Terstappen LW. Monitoring expression of HER-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int.J.Oncol.* 2002;21:1111-1117.
47. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:1974-1982.

48. Jamshidi K, Swaim WR. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. *J.Lab Clin.Med.* 1971;77:335-342.
49. Janni W, Rack B, Schindlbeck C Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer H, Pantel K, Gerber B, Friese K. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005;103:884-891.
50. Johnson PW, Burchill SA, Selby PJ. The molecular detection of circulating tumour cells. *Br.J.Cancer* 1995;72:268-276.
51. Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J.* 1996;15:254-264.
52. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985;229:974-976.
53. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:4995-5000.
54. Konecny G, Pauletti G, Pegram M Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 2003;95:142-153.
55. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, Untch M, Lohrs U. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:354-363.
56. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Ferno M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brunner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broet P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Janicke F, Schmitt M, Foekens JA. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J.Natl.Cancer Inst.* 2002;94:116-128.
57. Lovekin C, Ellis IO, Locker A Robertson JF, Bell J, Nicholson R, Gullick WJ, Elston CW, Blamey RW. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. *Br.J.Cancer* 1991;63:439-443.

58. Mansi JL, Berger U, McDonnell T Pople A, Rayter Z, Gazet JC, Coombes RC. The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 1989;7:445-449.
59. 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* 1999;354:197-202.
60. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin.Cancer Res.* 2004;10:8152-8162.
61. Meng S, Tripathy D, Shete S Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004;101:9393-9398.
62. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31:11-24.
63. Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD Keith M, Laufer J, Kasper M, Koch PJ, Franke WW. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* 1993;53:75-93.
64. Muller V, Stahmann N, Riethdorf S Rau T, Zabel T, Goetz A, Janicke F, Pantel K. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin.Cancer Res.* 2005;11:3678-3685.
65. Muss HB, Thor AD, Berry DA Kute T, Liu ET, Koerner F, Cirrincione CT, Budman DR, Wood WC, Barcos M, c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N.Engl.J.Med.* 1994;330:1260-1266.
66. Naume B, Borgen E, Beiske K, Herstad TK, Ravnas G, Renolen A, Trachsel S, Thrane-Steen K, Funderud S, Kvalheim G. Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood. *J.Hematother.* 1997;6:103-114.
67. Nebe H. [Evaluation of indirect immunofluorescence test by Weller and Coons for demonstration of antinuclear factors]. *Dermatol.Monatsschr.* 1970;156:913-918.

68. Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell* 1982;28:865-871.
69. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Yothers G, Park C, Wickerham DL, Wolmark N. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J.Natl.Cancer Inst.* 2000;92:1991-1998.
70. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J.Natl.Cancer Inst.* 1999;91:1113-1124.
71. Pantel K, Felber E, Schlimok G. Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J.Hematother.* 1994;3:315-322.
72. Pantel K, Muller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 2003;9:6326-6334.
73. Pantel K, Schlimok G, Angswurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmuller G. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J.Hematother.* 1994;3:165-173.
74. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J.Natl.Cancer Inst.* 1993;85:1419-1424.
75. Pelkey TJ, Frierson HF, Jr., Bruns DE. Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors. *Clin.Chem.* 1996;42:1369-1381.
76. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am.J.Pathol.* 1997;151:1523-1530.
77. Piccart-Gebhart MJ. First results of the HERA trial. Orlando Florida 2005:
78. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J.Clin.Oncol.* 2002;20:3095-3105.
79. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, Uhr JW. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:4589-4594.

80. Roche PC, Ingle JN. Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:434.
81. Romond E. Joint analysis of NSABP-B-31 and NCCTG-N9831. ASCO-Meeting. Orlando, Florida 2005:
82. Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84:8672-8676.
83. Schön D et al. Die Dachdokumentation Krebs. *Gesundheitsblatt-Gesundheitsforschung- Gesundheitsschutz.* 47, 429-436. 2004. Ref Type: Generic
84. Simpson SJ, Vachula M, Kennedy MJ, Kaizer H, Coon JS, Ghalie R, Williams S, Van Epps D. Detection of tumor cells in the bone marrow, peripheral blood, and apheresis products of breast cancer patients using flow cytometry. *Exp.Hematol.* 1995;23:1062-1068.
85. Singletary SE, ACAPeal. Staging system for breast cancer:revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. 2003:803-819.
86. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
87. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-712.
88. Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bode S, Wallwiener D, Bastert G. Prognostic relevance of cathepsin D detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* 1998;49:145-154.
89. Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schutz F, Bastert G. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 2001;7:4102-4108.
90. Solomayer EF, Diel IJ, Wallwiener D, Bode S, Meyberg G, Sillem M, Gollan C, Kramer MD, Krainick U, Bastert G. Prognostic relevance of urokinase plasminogen activator detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Br.J.Cancer* 1997;76:812-818.
91. Tanner M, Jarvinen P, Isola J. Amplification of HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61:5345-5348.

92. Thor A, Viglione MJ, Ohuchi N, Simpson J, Steis R, Cousar J, Lippman M, Kufe DW, Schlom J. Comparison of monoclonal antibodies for the detection of occult breast carcinoma metastases in bone marrow. *Breast Cancer Res.Treat.* 1988;11:133-145.
93. Tyczynski JE. Breast cancer in Europe. Fact Sheet, European Network of Cancer Registries ENCR. 2002:
94. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 2002;20:719-726.
95. Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin.Oncol.* 1999;26:43-51.
96. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 2003;21:3469-3478.
97. Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001;61 Suppl 2:1-13.
98. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2001;2:127-137.
99. Yoshida K, Fujikawa T, Tanabe A, Sakurai K. Quantitative analysis of distribution and fate of human lung cancer emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine in nude mice. *Surg.Today* 1993;23:979-983.

Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. E.-F. Solomayer für die Vergabe des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und Beratung während der Durchführung und Erstellung der Arbeit sowie die stetige Unterstützung.

Frau PD Dr. med. T. Fehm danke ich für die Unterstützung bei der Einarbeitung in das Fachgebiet und für die Beratung bei der Erstellung der Arbeit.

Ebenfalls danken möchte ich dem Direktor der Universitätsfrauenklinik Tübingen, Herrn Prof. Dr. med. D. Wallwiener, für sein großes Interesse an der Forschung im Bereich der Tumorzell dissemination und allen seinen Patientinnen für die Bereitstellung der Knochenmarkbiopsien zur wissenschaftlichen Auswertung.

Besonderer Dank gilt Frau Silke Dürr-Störzer, die als zytologisch-technische Assistentin mit großer fachlicher Kompetenz und ständiger tatkräftiger Unterstützung eine unverzichtbare Hilfe bei der Bearbeitung des Untersuchungsmaterials und der Auswertung der Präparate war.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Robert Andreas Bachmann
Geburtstag: 13. Juli 1979
Geburtsort: Tübingen

Schulbildung

1990-1999 Uhlandgymnasium Tübingen
06/1999 Abitur

Hochschulbildung

Seit 10/2000 Studium der Humanmedizin an der Universität
Tübingen
08/2002 Ärztliche Vorprüfung
08/2003 Erstes Staatsexamen
08/2005 Zweites Staatsexamen
11/2006 Drittes Staatsexamen

Famulaturen

02/03-10/04 Unfallchirurgie, Viszeralchirurgie, Gynäkologie und
Geburtshilfe, Innere Medizin

Praktisches Jahr

10/05-09/06 Innere Medizin, Chirurgie, Gynäkologie und
Geburtshilfe

Sprachenfolge

Latein, Englisch, Griechisch