

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Innenstadt  
Klinikum der Ludwig- Maximilians- Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

**Immunomagnetische Anreicherung Disseminierter Tumorzellen im  
Knochenmark und Blut von Patientinnen mit Mammakarzinom**

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

vorgelegt von  
Julia Stellwagen  
aus  
Heidelberg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Sommer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Andreas Jung  
Prof. Dr. med. Hubert Elser

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. C. Schindlbeck

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser; FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2009

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Epidemiologie .....	7
1.2 Definition: Mammakarzinom.....	7
1.3 Prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom .....	7
1.4 Metastasierung und disseminierte Tumorzellen .....	9
1.4.1 Metastasierung .....	9
1.4.2 DTZ.....	10
2 Zielstellung .....	13
3 Hintergrund.....	14
4 Material und Methoden.....	18
4.1 Material .....	18
4.1.1 Reagenzien.....	18
4.1.2 KITS und AK.....	19
4.1.3 Puffer und Lösungen.....	19
4.1.4 Geräte .....	20
4.1.5 Verbrauchsmaterialien .....	20
4.2 Patientenkollektiv und –material .....	21
4.2.1 Patientenkollektiv .....	21
4.2.2 Patienten- und tumorbezogene Daten .....	21
4.2.3 Knochenmarkpunktion.....	21
4.2.4 Periphere Venenpunktion.....	22
4.3 Labormethoden .....	22
4.3.1 Aufarbeitung des Knochenmarks.....	22
4.3.2 Herstellen von Nativ- Zytospins .....	24
4.3.3 HEA- Anreicherung mit dem „HEA Tumor Cell Enrichment and Detection Kit“ (human).....	25
4.3.3.1 Zellen anreichern .....	25
4.3.3.2 Angereicherte Zellen färben .....	27
4.3.4 Doppelfärbung am KM: Keratin (A45/B/B3) und HEA (Anti- Ep-CAM) mittels Immunfluoreszenz.....	27

4.3.4.1	HEA (Anti- Ep- CAM) .....	28
4.3.4.2	Keratin- Nachweis .....	28
4.3.5	Anreicherung von Tumorzellen im Knochenmark (KM) mit Anti- Thomsen- Friedenreich IgM (CD176) .....	29
4.3.6	Immunzytologie mit der APAAP Färbung .....	31
4.4	Statistische Methoden .....	34
5	Ergebnisse .....	35
5.1	HEA- Tumorzellanreicherung mit dem „HEA Tumor Cell Enrichment and Detection KIT“ (Miltenyi Biotec).....	35
5.1.1	Patientenauswertung .....	35
5.1.2	Probenauswertung.....	38
5.1.3	Doppelfärbung am KM: Keratin (A45/B/B3) und HEA (Anti- Ep- CAM) mittels Immunofluoreszenz.....	39
5.2	TF- Tumorzellanreicherung im Knochenmark und peripheren Blut .....	40
5.2.1	Patientenauswertung .....	40
5.2.2	Probenauswertung.....	42
5.2.2.1	Knochenmark.....	42
5.2.2.2	Blut.....	46
5.2.2.3	Knochenmark und Blut.....	50
5.2.3	Korrelation der Ergebnisse der TF- Tumorzellanreicherung im KM mit verschiedenen Parametern .....	51
5.2.3.1	Nachweis DTZ in Abhängigkeit von der Tumorgröße (T).....	51
5.2.3.2	Nachweis DTZ in Abhängigkeit vom regionären Lymphknotenstatus (N).....	52
5.2.3.3	Nachweis DTZ in Abhängigkeit vom Fernmetastasenstatus (M).....	53
5.2.3.4	Nachweis DTZ in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad (G) .....	54
5.2.3.5	Nachweis DTZ in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus (ER/PR). 55	
5.2.3.6	Nachweis DTZ in Abhängigkeit vom Her-2/neu- Status (Her-2/neu)... 57	
5.2.4	Beispiele isolierter Tumorzellen aus Patientenproben.....	58
5.3	Negativkontrollen .....	59
5.3.1	Anreicherung.....	59
5.3.2	Primärscreening .....	59
6	Diskussion.....	60
6.1	Zusammenfassung.....	60

6.2	Diskussion der Methoden .....	60
6.2.1	Allgemeine Methodendiskussion.....	60
6.2.2	Diskussion der Methoden der HEA- Anreicherung im KM .....	61
6.2.3	Diskussion der Methoden der TF- Anreicherung im KM und PB.....	63
6.3	Diskussion der Ergebnisse .....	66
6.3.1	Diskussion der Ergebnisse der HEA- Anreicherung im KM.....	66
6.3.2	Diskussion der Ergebnisse der TF- Anreicherung im KM .....	67
6.3.3	Korrelation der Detektionsraten der TF- Anreicherung im KM mit klinischen Parametern.....	70
6.3.3.1	Tumorgröße.....	70
6.3.3.2	Lymphknoten- und Fernmetastasen .....	71
6.3.3.3	Differenzierungsgrad .....	71
6.3.3.4	Hormonrezeptorstatus .....	72
6.3.4	Diskussion der Ergebnisse der TF- Anreicherung im PB .....	73
6.3.5	Klinische Relevanz und Ausblick .....	75
7	Zusammenfassung.....	78
8	Publikationen .....	81
9	Anhang .....	82
9.1	Histologische Klassifikation der Mammakarzinome .....	82
9.2	Klinische TNM- Klassifikation Mammatumoren (TNM) .....	83
9.3	Kriterien des Gratings beim Mammakarzinom nach <i>Elston</i> und <i>Ellis</i> .....	86
9.4	Hormonrezeptorstatus .....	87
9.5	Her2/neu- Expressionsstatus .....	88
9.6	TNM- Klassifikation: Isolierte Tumorzellen (ITC) .....	89
9.7	Knochenmarkstatus Primärscreening - TF-Anreicherung .....	90
9.8	Wilcoxon-Test: absolute Tumorzellzahl Primärscreening - TF- Anreicherung im KM.....	91
9.9	Wilcoxon-Test: relative Tumorzellzahl Primärscreening - TF-Anreicherung im KM.....	92
9.10	Blutstatus Primärscreening - TF-Anreicherung .....	93
9.11	Wilcoxon-Test: absolute Tumorzellzahl Primärscreening - TF- Anreicherung im Blut .....	94
9.12	Wilcoxon-Test: relative Tumorzellzahl Primärscreening - TF-Anreicherung im Blut .....	95

10	Literaturverzeichnis .....	97
11	Curriculum Vitae .....	106
12	Danksagung.....	108

## Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	<u>Destilliertes Wasser</u>
Ag	<u>Antigen</u>
AK	<u>Antikörper</u>
APAAP	<u>Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische Phosphatase</u>
BET	<u>Brusterhaltende Therapie</u>
Bidest.	<u>Bidestilliert</u>
BSA	<u>Albumin bovine serum</u>
Bzw.	<u>Beziehungsweise</u>
CD45	<u>Cluster of Differentiation</u>
CIS	<u>Carcinoma in situ</u>
CK+/-	<u>Cytokeratin positiv/negativ</u>
DCIS	<u>Duktales Carcinoma in situ</u>
DMF	<u>Dimethylformamid</u>
DTZ	<u>Disseminierte Tumorzellen</u>
EDTA	<u>Ethylene diamine tetraacetic acid</u>
ER+/-	<u>Estrogenrezeptor positiv/negativ</u>
Erys	<u>Erythrozyten</u>
FCS	<u>Fetal calf serum</u>
G	<u>Grading</u>
HEA	<u>Human Epithelial Antigen</u>
HER-2/neu	<u>Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor</u>
HLA	<u>Humanes Leukozyten Antigen</u>
ICC	<u>Immuncytochemie</u>
Ig M/G	<u>Immunglobulin M/G</u>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<u>Kaliumdihydrogenphosphat</u>
KM	<u>Knochenmark</u>
KMP	<u>Knochenmarkpunktion</u>
LCIS	<u>Lobuläres Carcinoma in situ</u>
LK	<u>Lymphknoten</u>
M	<u>Fernmetastasierung</u>
MACS	<u>Magnetic activated cell sorting</u>
mAK	<u>monoklonaler Antikörper</u>

<b>MAX</b>	<b><u>M</u>aximum</b>
<b>MHC</b>	<b><u>M</u>ajor <u>h</u>istocompatibility <u>c</u>omplex</b>
<b>MIN</b>	<b><u>M</u>inimum</b>
<b>MNC</b>	<b><u>M</u>ono<u>n</u>uklear <u>c</u>ells</b>
<b>MNZ</b>	<b><u>M</u>ono<u>n</u>ukleare <u>Z</u>ellen</b>
<b>MRD</b>	<b><u>M</u>inimal <u>r</u>esidual <u>d</u>isease</b>
<b>N</b>	<b><u>N</u>odulärer Status</b>
<b>n.a.</b>	<b><u>n</u>icht <u>a</u>ngegeben</b>
<b>NaCl</b>	<b>Natriumchlorid</b>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>Dinatriumhydrogenphosphat</b>
<b>NaNO<sub>2</sub></b>	<b>Natriumnitrit</b>
<b>neg</b>	<b><u>n</u>egativ</b>
<b>OT</b>	<b><u>O</u>bjekt<u>t</u>räger</b>
<b>PB</b>	<b><u>P</u>eripheres <u>B</u>lut</b>
<b>PBS</b>	<b><u>P</u>hosphate <u>b</u>uffered <u>s</u>aline</b>
<b>PCR</b>	<b><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</b>
<b>pos</b>	<b><u>p</u>ositiv</b>
<b>PR+/-</b>	<b><u>P</u>rogesteron<u>r</u>ezeptor positiv/negativ</b>
<b>RT</b>	<b><u>R</u>aum<u>t</u>emperatur</b>
<b>RT- PCR</b>	<b><u>R</u>everse <u>T</u>ranskription- PCR</b>
<b>T</b>	<b><u>T</u>umorgröße</b>
<b>TF</b>	<b><u>T</u>homsen- <u>F</u>riedenreich</b>
<b>TRIS</b>	<b><u>T</u>ris- Buffered Saline</b>
<b>TZ</b>	<b><u>T</u>umorzellen</b>



# **1 Einleitung**

## **1.1 Epidemiologie**

Das Mammakarzinom ist die häufigste krebsbedingte Todesursache der Frau. Im Jahr 2004 wurden europaweit über 370.100 Neuerkrankungen und 129.900 Todesfälle verzeichnet [1]. Allein in Deutschland erkranken jährlich etwa 47.500 Frauen an Brustkrebs. Die letzten Zahlen aus dem Jahre 2002 verzeichnen laut statistischem Bundesamt rund 18.000 Todesfälle auf Grund dieser Erkrankung in der Bundesrepublik.

## **1.2 Definition: Mammakarzinom**

Der Begriff Mammakarzinom umfasst jene bösartigen Tumoren, die entweder von den Epithelien der Milchgänge ausgehen = duktale Karzinome, oder von den lobulären Drüsenendstücken = lobuläre Karzinome. Bei beiden Formen unterscheidet man präinvasive und invasive Veränderungen. Erstere bezeichnet man als duktale und lobuläre In- situ Karzinome (DCIS und LCIS), die sich zunächst noch an die natürlichen Grenzen der Läppchen bzw. der Milchgänge halten. Wird die Basalmembran zerstört und wächst das Karzinom in das angrenzende Stroma, spricht man von einem invasiven Mammakarzinom. Das DCIS geht wesentlich häufiger und schneller in ein invasives Karzinom über als das LCIS. Unter den invasiven Befunden ist das duktale Mammakarzinom mit ca. 80% die häufigste Form. Daneben gibt es noch einige seltenere Mammakarzinomtypen mit jedoch deutlich geringerem Malignitätsgrad.

## **1.3 Prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom**

Sowohl zur individuellen Therapieplanung als auch zur Prognoseabschätzung ist eine routinemäßige Beurteilung des Tumors nach bestimmten Kriterien unablässig. Diese erfolgt nach histomorphologischen Kriterien (dukta, lobulär, usw.) [2] (Anhang 1), nach der TNM- Klassifikation, 6. Auflage [3] - die Tumorgöße (T), regionären Lymphknotenstatus (N) und Fernmetastasierung (M) erfasst (Anhang 2) - sowie histologischem Differenzierungsgrad (G) nach Elston und Ellis [4] (Anhang 3). Des Weiteren ist die Bestimmung des Estrogen (ER)- und Progesteronrezeptorstatus (PR) von klinischer Bedeutung (Anhang 4). Als wichtigster prognostischer Einzelfaktor in Bezug auf Rezidiv und Überleben gilt derzeit der axilläre Lymphknotenstatus. Je höher die Anzahl der befallenen Lymphknoten, desto höher das Rezidiv- und Mortalitätsrisiko. Sind keine Lymphknotenmetastasen vorhanden, gewinnt die Größe des Primärtumors

zunehmend an prognostischer Bedeutung. Daneben weisen die deutlich selteneren Mammakarzinomtypen wie medulläres, muzinöses, papilläres und tubuläres Karzinom eine wesentlich bessere Prognose auf als etwa das lobuläre und duktales Mammakarzinom. Ein Einbruch des Tumors in Blut- und/oder Lymphgefäße deutet ebenfalls auf eine schlechte Prognose hin. Auch das histopathologische Grading zur Beurteilung des Malignitätsgrades aller Typen des Mammakarzinoms weist eine eindeutige Abhängigkeit in Bezug auf das Rezidivrisiko und das Gesamtüberleben auf. So steigt mit abnehmendem Differenzierungsgrad das Risiko ein Rezidiv zu erleiden und die Überlebenszeit sinkt entsprechend [5]. Denn je undifferenzierter das Tumorgewebe ist, umso größer ist seine Bösartigkeit und Wachstumsgeschwindigkeit, jedoch auch seine Strahlenempfindlichkeit, was für eine Radiotherapie von wesentlicher Bedeutung ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass ca. 25-30% der Patientinnen ohne LK Befall (N0) ein Rezidiv erleiden [6, 7], während der Prozentsatz bei Patientinnen mit LK Metastasen (N1) bei 60% liegt [8, 9].

Von diesen Prognosefaktoren sind die prädiktiven Faktoren abzugrenzen, die eine individuelle Therapieplanung ermöglichen und eine Vorhersage über das Ansprechen und den Erfolg der Therapie zulassen. Zu diesen gehören der Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus, dessen Positivität Voraussetzung für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie ist sowie die Bestimmung einer HER-2/neu Überexpression (humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor) (Anhang 5), von welcher der Therapieerfolg einer Herceptintherapie abhängt. Diese wird inzwischen sowohl adjuvant als auch beim metastasierten Mammakarzinom eingesetzt.

Zurzeit werden die TNM- Klassifikation, Grading, Hormonrezeptorstatus und Alter für Behandlungs- und prognostische Entscheidungen verwendet. Diese Faktoren reichen jedoch nicht aus für eine genaue Einteilung in eine low- risk Gruppe, die keine adjuvante Chemotherapie benötigt, und in eine Hochrisikogruppe für ein frühes Rezidiv [10, 11]. Deshalb müssen weitere Faktoren evaluiert werden, die eine noch genauere Risikoabschätzung und individuellere Therapieplanung ermöglichen.

Prinzipiell stehen für die Therapie des Mammakarzinoms die operative Therapie - Brusterhaltende Therapie (BET) oder Mastektomie, die systemische Therapie im Sinne einer Chemo- oder Hormontherapie und die Strahlentherapie sowie seit einiger Zeit die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern als neuere Form der systemischen antineoplastischen Therapie zur Verfügung. Diese verschiedenen Möglichkeiten sind

jedoch keineswegs nur als Monotherapien anzusehen, sondern in Kombination, angepasst an die individuelle Ausprägung des Krankheitsbildes der Patientin, anzuwenden.

#### **1.4 Metastasierung und disseminierte Tumorzellen**

Im Rahmen verstärkter Brustkrebs- Früherkennungsuntersuchungen und Mammographie Screening Untersuchungen ist es heutzutage möglich, Brustkrebs in einem früheren und somit prognostisch günstigeren Stadium zu diagnostizieren als noch vor einigen Jahren [12-14]. Daher ist es häufig nicht mehr der Primärtumor, der für Morbidität und Mortalität verantwortlich ist, sondern die frühzeitige Streuung der Tumorzellen. Diese disseminierten Tumorzellen (DTZ), auch minimale Tumorresiduen (MRD = minimal residual disease) genannt, können Ausgangspunkt für eine spätere Metastasierung oder Rezidivierung der Erkrankung sein und damit die Prognose bestimmen, weshalb ihre Erfassung von großer klinischer Bedeutung ist. Die klinischen Verfahren zur Diagnostik einer Metastasierung beim Mammakarzinom umfassen Anamnese, Tastbefund, Röntgen, Sonographie, Szintigraphie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie und die Positronenemissionstomographie [15]. Mit Hilfe dieser konventionellen diagnostischen Verfahren sind jedoch nur manifeste Metastasen nachweisbar. Zum frühen Nachweis von DTZ sind sie daher nicht geeignet. Durch den Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper sowie molekularbiologischer Techniken gibt es jedoch mittlerweile die Möglichkeit, isolierte Tumorzellen frühzeitig nachzuweisen [16, 17].

##### **1.4.1 Metastasierung**

Unter Metastasierung versteht man ganz allgemein den Prozess der Verschleppung maligner Zellen und ihr An- und Weiterwachsen in vom Primärtumor entfernten Körperregionen. Man unterscheidet - je nach anatomischer Struktur, innerhalb derer sie erfolgt - fünf Metastasierungswege: Die lymphogene Metastasierung über die Lymphbahnen, die hämatogene Metastasierung über die Blutbahn, die kavitäre Metastasierung über präformierte Körperhöhlen, die kanalikuläre Metastasierung über epithelial ausgekleidete Kanäle sowie sogenannte Impfmetastasen, bei denen die Tumorzellverschleppung und -absiedlung entlang eines Stichkanals erfolgt. Dieser entsteht im Rahmen diagnostisch- chirurgischer Eingriffe wie Punktionen und Biopsien. Voraussetzung für eine Metastasierung ist zunächst der Defekt bestimmter Gene wie etwa des so genannten Antimetastasesgens pNM23. Des Weiteren verlieren die Tumorzellen Gene, die Zelladhäsionsmoleküle (Integrine) sowie die entsprechenden

Rezeptoren dafür exprimieren. Dies führt zu einem Kohäsionsverlust des Zellverbandes. Außerdem bilden die Tumorzellen Motilitätsfaktoren und Chemokine, welche die Zellmotilität weiter fördern und Unruhe in den Zellverband bringen. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie TGF $\beta$  und bFGF sezernieren die Tumorzellen Metalloproteinasen, mit denen sie die Basalmembrankollagene aufspalten können, darüber hinaus einen Plasminogenaktivator, um Kollagene, Laminin und Fibronectin abzubauen. Nun können sich die Tumorzellen aus dem Zellverband lösen und sind in der Lage in das umliegende Gewebe und in Gefäße einzubrechen (Intra-, Extravasation). Schließlich bleiben sie irgendwann in der terminalen Strombahn stecken. Um vom Immunsystem nicht gleich vernichtet werden zu können, schützen sie sich mit einer verminderten Expression von HLA- Selbsterkennungsmolekülen [18] und mit einer Fibrinummantelung. Nun hängt es von den ortsspezifischen Anheftungs- und Wachstumsbedingungen sowie von der Bestimmungsadresse auf der Tumorzelle selbst ab, ob sie sich in einem bestimmten Organ absiedeln kann oder nicht: soil and seed-Konzept. Doch trotz diverser Schutzmechanismen überlebt nur ein sehr geringer Prozentsatz, etwa 0,05%, der zirkulierenden Tumorzellen und kann zur Metastasenbildung führen [19]. Einzelne Tumorzellen können sich als sogenannte schlafende Tumorzellen in Organen oder Geweben absiedeln und nach einer Latenzzeit von 10 bis 20 Jahren zu aggressiven Spätmetastasen auswachsen. Dieser Verlauf ist beim Mammakarzinom häufig [20]. Das Skelett ist beim Mammakarzinom eines der am häufigsten von Fernmetastasen betroffenen Organsysteme. 75% der Patienten, die an Brustkrebs versterben weisen eine Skelettbeteiligung auf. Daher, und weil epitheliale Zellen unter normalen Umständen im KM nicht nachweisbar sind, eignet es sich besonders für den Nachweis von DTZ [21]. Außerdem kann es für den Patienten relativ ungefährlich aspiriert werden [22]. Auch das periphere Blut (PB) wird häufig für das Screening auf DTZ verwendet. Etwas problematisch ist allerdings, dass hier zirkulierende isolierte Tumorzellen nur relativ selten nachweisbar sind.

#### **1.4.2 DTZ**

Im Zusammenhang mit Tumorzell disseminierung wird häufig der Begriff der Mikrometastasierung verwendet. Dies ist jedoch etwas problematisch, da es sich bei Mikrometastasen definitionsgemäß um organisierte stromahaltige Zellverbände (<0.2cm) handelt, die Anschluss an das Kapillarsystem gefunden haben [23-25]. Darüber hinaus sind Mikrometastasen proliferationstüchtig und damit in therapeutischer Hinsicht das Ziel

einer klassischen zytotoxischen Therapie. Disseminierte Tumorzellen als Korrelat einer minimalen Residualerkrankung müssen vielmehr als Vorstufen einer Mikrometastasierung angesehen werden [26]. Die Ergebnisse zahlreicher Studien stützen die Hypothese, dass die Streuung isolierter Tumorzellen eine Vorstufe auf dem Weg zur klinisch manifesten Metastasierung darstellt [27-34]. Diese okkulte Streuung von isolierten Tumorzellen beziehungsweise kleinen Zellclustern tritt im Verlauf der Erkrankung vermutlich schon sehr frühzeitig auf und kann dann - auch nach langer Latenzzeit - die Bildung solider Metastasen nach sich ziehen [35]. Die prognostische Relevanz von DTZ wird in der Literatur allerdings nach wie vor kontrovers diskutiert. Innerhalb der letzten Jahre hat sich der Nachweis von DTZ jedoch in den meisten Studien als wichtiger prognostischer Faktor in Hinblick auf das Gesamt- und rezidivfreie Überleben erhärtet [10, 16, 28-34, 36-40]. In einigen Studien wurde er sogar als unabhängiger Prognosefaktor bestätigt [10, 22, 27, 31, 41, 42]. Die UICC hat den Nachweis disseminierter Tumorzellen in regionären Lymphknoten als pN0(i+)-Stadium, bei nicht regionärer Lokalisation als pM0(i+)-Stadium in die TNM- Klassifikation eingeführt [23, 43] (Anhang 6). Die frühest mögliche Detektion dieser DTZ beziehungsweise minimalen Tumorresiduen ist somit ein wesentlicher Faktor, um Patientinnen mit einem hohen Rezidivrisiko frühzeitig identifizieren zu können und so eine bessere Prognoseabschätzung zu ermöglichen und eine individuellere Therapieplanung zu gewährleisten. Dadurch ergibt sich außerdem die Möglichkeit zu einer verbesserten Risikostratifizierung bezüglich weiterer Therapieentscheidungen oder auch für die individuelle Durchführung gezielter Therapien zur Eradikation dieser Zellen, bevor sie zu manifesten Metastasen auswachsen [44]. Tatsächlich kann man bei 35% [45] der M0 Patienten DTZ im Knochenmark nachweisen sowie bei 15% [11, 46, 47] der N0 Patienten in den regionären Lymphknoten. Neben dem frühzeitigen Nachweis von DTZ ist jedoch auch die weitere Charakterisierung dieser Zellen wichtig. So kann durch Phänotypisierung [48, 49] die metastatische Potenz der Zelle genauer untersucht werden. Außerdem könnte sie helfen den Vorgang der Metastasierung besser zu verstehen. In diesem Zusammenhang ist auch die Analyse therapierelevanter Antigene von besonderer Bedeutung, da dadurch eine Individualisierung der Therapie zunehmend in den Bereich des Möglichen rückt [21]. Auf Grund genauerer Untersuchungen geht man davon aus, dass es sich bei dem Großteil dieser DTZ um sog. dormant cells handelt; d.h. schlafende Zellen, die sich in einem mitotisch inaktiven Zustand befinden, der G0- Phase [48, 50, 51]. Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, warum sich die Anzahl an DTZ durch die

herkömmlichen Chemotherapeutika kaum vermindern lässt [52, 53]. Denn diese greifen in der Regel in den aktiven Teilungsprozess der Zellen ein.

Aber gerade Patientinnen mit persistierenden DTZ im KM nach Beendigung der Chemotherapie haben eine signifikant schlechtere Prognose bezüglich Gesamt- und rezidivfreiem Überleben als solche, die einen negativen KM- Status aufweisen [52-55]. Daher sind sie potentielle Kandidaten für eine zellzyklusunabhängige Antikörpertherapie [48, 56-61].

Zusammenfassend können neue Marker wie der Nachweis von DTZ im KM als prognostische Faktoren im Hinblick auf den weiteren Verlauf der Erkrankung dienen oder auch als prädiktive Faktoren bei der Abschätzung des erwarteten Therapieansprechens helfen. Außerdem können sie selbst Ziel für neue Therapien wie einer Antikörpertherapie sein. Die weitere Charakterisierung dieser Zellen sowie die Erforschung neuer tumorassoziierter Antigene als Angriffspunkte für eine Immuntherapie sind in diesem Zusammenhang von großem Interesse. Nicht zuletzt ist mit Hilfe DTZ ein Monitoring der Wirksamkeit adjuvanter Therapieverfahren möglich [17, 21, 59].

Der Goldstandard im Nachweis von DTZ ist die Immunzytochemie, da sie zur Zeit die am besten etablierte Methode auf diesem Gebiet darstellt [62, 63]. In der Regel werden hierbei  $2 \cdot 10^6$  mononukleäre Zellen (MNZ) auf das Vorkommen von DTZ gescreent. Da DTZ jedoch nur mit einer Frequenz von ca. 1- 10 Tumorzellen pro  $10^6$  mononukleäre Zellen im Knochenmark auftreten [64], ist die Gefahr eines falsch- negativen Ergebnisses bei der Untersuchung von  $2 \cdot 10^6$  Zellen relativ groß. Des Weiteren ist die Tumorzellausbeute mit dieser Methode gering und damit auch die weitere Charakterisierung der Zellen erheblich erschwert.

Deshalb muss weiter nach Verfahren und Methoden geforscht werden, die insbesondere die Sensitivität des Nachweises isolierter Tumorzellen erhöhen, jedoch gleichzeitig im Rahmen eines Routinescreenings durchführbar sind. Ein besonderer Fokus ist hierbei seit einiger Zeit unter anderem auf die Anreicherung von DTZ mittels magnetisch markierter Antikörper gerichtet, womit sich diese Arbeit beschäftigt.

## 2 Zielstellung

- Tumorzellanreicherung im Knochenmark (KM) mittels monoklonalem Antikörper (mAK) gegen das Human Epithelial Antigen (HEA) mit dem „Tumor Cell Enrichment and Detection Kit“ der Firma Milteny Biotech
- Etablierung einer Methode zur Anreicherung disseminierter Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark (KM) und peripheren Blut (PB) mit einem Antikörper (AK) gegen das Thomsen- Friedenreich- Antigen (TF)
- Vergleich der beiden Anreicherungsverfahren mit der immunzytochemischen Methode (ICC) mittels APAAP- (Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische Phosphatase) Technik zum Nachweis von DTZ
- Vergleich der Detektionsraten mit Parametern wie Tumorgröße, regionärem Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung (TNM), Differenzierungsgrad (G), Hormonrezeptorstatus (ER/PR), HER-2/neu Status

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Tumorzellanreicherung mittels AK gegen das Human Epithelial Antigen und gegen das Thomsen- Friedenreich- Antigen zur Detektion disseminierter Tumorzellen im Vergleich mit dem immunzytochemischen Nachweis mit der APPAP- Methode.

Zunächst wurde die Anreicherung von DTZ im Knochenmark mit einem kommerziell erhältlichen KIT, dem „*Tumor Cell Enrichment and Detection Kit*“ der Firma Milteny Biotec durchgeführt. Anschließend wurde eine Methode zur Anreicherung von DTZ im Knochenmark und peripheren Blut mittels Antikörper gegen das Thomsen- Friedenreich- Antigen entwickelt. Die Ergebnisse der Anreicherung wurden mit denen der etablierten immunzytochemischen Methode mittels APAAP- Technik zum Nachweis von DTZ verglichen. Anschließend wurden die Detektionsraten mit klinischen und histopathologischen Parametern wie Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung, Differenzierungsgrad, Hormonrezeptorstatus und HER-2/neu Status korreliert.

### 3 Hintergrund

In der Literatur findet man im Wesentlichen drei Methoden, um DTZ bzw. minimale Tumorresiduen (minimal residual disease = MRD) zu detektieren: die Immunhistochemie mit monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen Zytokeratine (CK), der Nachweis tumorzellspezifischer Gentranskripte durch Polymerase- Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) und Reverse Transkription- PCR (RT-PCR) sowie die Durchflusszytometrie. Eine Tumorzellanreicherung mittels monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen verschiedene Oberflächenproteine der Tumorzellen kann jeweils den verschiedenen Methoden vorgeschaltet werden.

Bei der Methode der Anreicherung kann man prinzipiell eine Positiv- und eine Negativanreicherung unterscheiden. Bei ersterer werden die Tumorzellen an magnetische Partikel gebunden, bei letzterer hingegen die hämatopoetischen Zellen. Man findet auf dem Markt, neben anderen (CellSearch System von VERIDEX, EasySep/StemSep/RosetteSep von CellSystems, Adna Test Breast Cancer Select/Detect von AdnaGen) zwei weit verbreitete Anreicherungssysteme: das Dynabead- und das MACS- System. Das hier verwendete MACS (magnetic activating cell sorting)- System basiert auf dem Einsatz von MACS Microbeads, superparamagnetische Partikel (ca.50nm), die an hoch spezifische monoklonale Antikörper gegen Tumorzell- Antigene gebunden werden.

Sie werden verwendet, um die anzureichernden Tumorzellen über Antigen- Antikörper- Bindungen magnetisch zu markieren. Die Zellsuspension mit den gebundenen Zellen wird dann in sogenannte Säulen, MACS Columns, pipettiert. Diese Säulen werden in einen permanenten Magneten, MACS Separator, der ein starkes Magnetfeld erzeugt, eingesetzt. Durch die magnetischen Kräfte werden die über Antikörper an die magnetischen Partikel gebundenen Tumorzellen zurückgehalten. Die ungebundenen Zellen laufen durch die Säule durch. Schließlich können die zurückgehaltenen Tumorzellen mit Hilfe eines Stempels aus der Säule

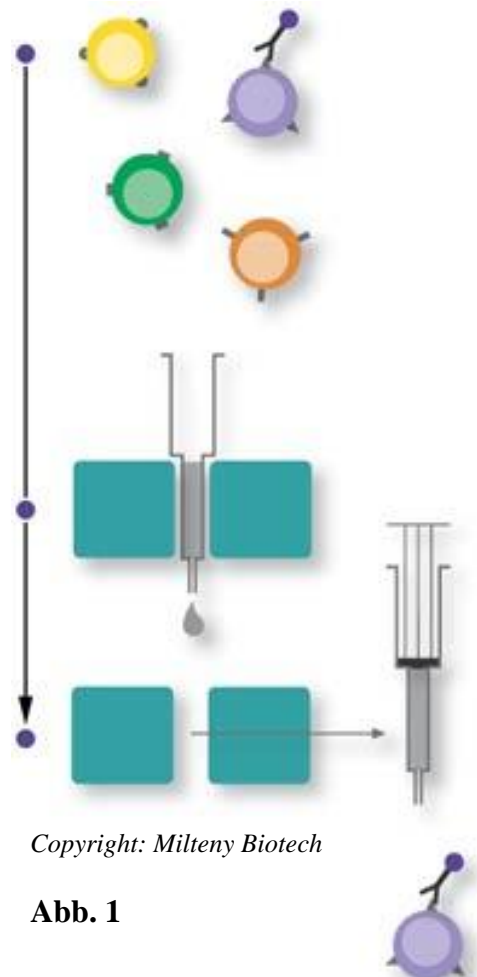


Abb. 1



herausgedrückt werden. Mit diesem Prinzip können Tumorzellen aus einer Zellsuspension mit Hilfe eines magnetischen Feldes selektioniert und angereichert werden. (Abb. 1)

Folgende Antikörper wurden bisher im Wesentlichen zur Anreicherung disseminierter Tumorzellen verwendet: (Tab. 1)

Anreicherungs-system	Positivanreicherung	Negativanreicherung
MACS MicroBeads	MACS Cytokeratin MicroBeads mit mAk CAM 5.2 gegen CK 7,8 [65-67]	CD45 MicroBeads gegen Leukozytenoberflächenantigen [67-69]
	Anti-Cytokeratin MicroBeads mit mAk gegen CK8 [70]	
	IgG MicroBeads mit mAk 3B10 gegen 17-1A [71]	
	MACS c-erbB-2 microbeads [71, 72]	
	Anti-HEA (EpCAM) MicroBeads mit mAk Anti-HEA-125 [67, 68, 72-75]	
	IgG MicroBeads mit mAk Anti-ErbB2 [72]	
	IgG MicroBeads mit mAk Anti-EGFR [72]	
	IgG MicroBeads mit mAk Anti-HEA [72]	
Dynal Dynabeads	Anti-EpCAM/ Anti-HER2/neu -Dynabeads mit mAk 3B10/ mAk 7C1 [76, 77]	Anti-CD45-M450-Dynabeads gegen Leukozytenantigen CD45 [10, 78-81]
	Anti-EpCAM M450-Dynabeads mit mAk Ber-Ep4 [82]	
	Anti Ep-CAM M450-Dynabeads mit mAk MOC31 [81, 83-85]	
	IgG M450-Dynabeads mit mAk MOC-31 [86]	
	IgG M450-Dynabeads mit "panhuman" Ak [86]	
	Anti Ep-CAM Dynabeads mit mAk VU1D9 [81]	
	M280-Dynbeads mit mAk BM2 gegen MUC1 [87]	
	IgG M280-Dynabeads mit mAk MOC31 [80]	
	IgG M280-Dynabeads mit mAk Ber-EP4 [80, 88]	
	IgG M280-Dynabeads mit mAk 317G5 [80]	

**Tabelle 1**

In dieser Arbeit wurde ein Antikörper gerichtet gegen das Thomsen- Friedenreich- Antigen (TF) verwendet, einen Marker, der in den letzten Jahren immer mehr an Interesse gewonnen hat. Das Thomsen- Friedenreich- Antigen wurde bereits 1976 als spezifischer Marker bei bösartigen Brusttumoren entdeckt und ist schon seit langem als Tumor- assoziiertes Antigen bekannt [89, 90]. Außerdem ist TF ein wichtiger Faktor bei der Adhäsion der Tumorzellen an Endothelien sowie der Tumordinvasion und somit ein wichtiger Marker für die Aggressivität eines Tumors [91]. Bei dem Antigen handelt es sich genauer um ein Kohlenhydratepitop, das mit den Blutgruppenantigenen verwandt ist. TF ist ein Disaccharid, das sich aus D-Galactose gekoppelt an N-Acetyl-D-Galactosamin zusammensetzt [92, 93]. Die Vorstufe von TF ist das Tn- Antigen, dessen Struktur GalNAc $\alpha$ 1-R ist [94]. Das Trägerprotein von TF ist MUC-1. TF kommt in normalem adultem Gewebe nur in begrenzter Menge vor, während es auf der Oberfläche von Tumorzellen hingegen stark exprimiert wird [95]; ebenso während einer frühen Fetalphase auf epithelialen und mesothelialen Komponenten [96]. Die Expression des Thomsen- Friedenreich- Antigens auf DTZ im KM von Brustkrebspatientinnen wurde erstmals in einer Studie derselben Arbeitsgruppe erforscht. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass das TF- Antigen auch auf DTZ im KM exprimiert wird. Erstaunlicherweise zeigten 98% aller CK positiven Tumorzellen im KM eine Koexpression von TF, obwohl nur ca. 40-70% aller invasiven primären Mammakarzinome positiv für dieses Antigen sind, wobei hier mit zunehmender Größe des Primärtumors sowie steigender Zahl befallender Lymphknoten die Expressionsrate für TF entsprechend zunimmt [97]. Zur Tumorzellanreicherung im KM mittels Antikörper gegen das Thomsen- Friedenreich- Antigen gibt es bisher keine Literatur.

Zur Detektion der mit TF angereicherten Tumorzellen wurde ein monoklonaler Antikörper (A45-B/B3) [78] gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 verwendet. Diese werden von normalen und veränderten epithelialen Zellen [98, 99] exprimiert, jedoch nicht von Knochenmarkszellen [100, 101]. Diese immunzytochemische Methode gilt zur Zeit als Goldstandard [102] im Nachweis minimaler Tumorresiduen, da sie für ihre reproduzierbare Sensitivität und Spezifität bekannt ist [101]. Die falsch- positive Rate liegt hier bei < 1% [27]. Der mikroskopische Nachweis der Antigen- Antikörper Reaktion erfolgte mit Hilfe der APAAP- Methode (Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische Phosphatase = Enzym- Anti- Enzymkomplex). Der APAAP Komplex wird dabei über einen Brückenantikörper an den Primärantikörper gegen oben genannte Zytokeratine gebunden [103].

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit im Rahmen eines Vorversuchs eine HEA Tumorzellenanreicherung mit dem „*HEA Tumor Cell Enrichment and Detection Kit*“ der Firma Milteny Biotec durchgeführt. HEA ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 25 kDa [104]. Es wird auf 60-70% der Zytokeratin-positiven (CK+) Zellen im Knochenmark von Patienten mit epithelialen Tumoren exprimiert [105].

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Reagenzien

Reagenzien	Firma
Aceton, Code No.: 1.00014.2500	MERCK
Ultra V Block, Code No.: TA-060-UB	Lab Vision Corporation
Albumin bovine serum (BSA), 50g Cat.No.: A 9647	Sigma Aldrich
FCS ("fetal calf serum") Cat. No.: A15-649	PAA Laboratories
AB- Serum, Ref. 805135	Biotest
APAAP, Mouse Monoclonal Code No.: D 0651	DakoCytomation
(-)-Tetramisole hydrochloride, 5g Code No.: L-9756	Sigma Aldrich
Natriumnitrit NaNO <sub>2</sub> Code No.: 106549	MERCK
Neufuchsin Code No.: 20293	Serva
Naphtol- ASBi- Phosphate Code No.: N-2250	Sigma Aldrich
DMF/N,N- Dimethylformamid Code No.: 40255	Sigma Aldrich
Ficoll- Paque™ PLUS Code No.: 17-1440-03	Amersham Biosciences
PBS- DULBECCO (1x) w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , LE; Cat.No.: L1825	Biochrom AG
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG
Tryptan Blue Solution (0,4%) Code No.: T8154	Sigma Aldrich
Kaisers Glyceringelatine Code No.: 1.09242.0100	MERCK
Antibody Diluent, Background Reducing, Code No.: S3022	DakoCytomation
TBS (Tris- Buffered Saline), pH 7,6 Code No.: S3001	DakoCytomation
HANKS´ SALT SOLUTION (1x) w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Phenol Red; LE, Cat.No.: L2045	Biochrom AG

#### 4.1.2 KITS und AK

KITS und AK	Firma
Whole Blood Erythrocyte Lysing Kit Cat.No.: WL1000	R&D Systems
MACS- HEA Tumor Cell Enrichment and Detection Kit (human) Order No.: 130-090-500	Miltenyi Biotec
Mouse Anti Human Ep- CAM Code No.: MCA 850 G	Serotec
Rabbit- Anti- Mouse IgG Cy2 markiert Code No.: 315-226-003	Jackson ImmunoResearch
Pan- Keratin Klon A45-B/B3, Mouse IgG direkt markiert mit Cy3 Code No.: von unserer Arbeitsgruppe in Auftrag gegeben	Micromet
Thomsen- Friedenreich- AK, Anti CD176, Clone Nemo- TF2, Mouse IgM, Code No.: MAB-P301	Nemod Biotherapeutics
Rat Anti- Mouse IgM MicroBeads, Code No.: 130-047-302	Miltenyi Biotec
Mouse monoclonal antibody A45-B/B3 Order No.: R002A	micromet
Polyclonal Rabbit Anti- Mouse Immunoglobulins, Code No.: Z 0259	DakoCytomation
MOPC- 21 Mouse IgG1 Cat.No.: M-9269	Sigma Aldrich
DAKO Fuchsin+Substrate- Chromogen Code No.: K0625	DakoCytomation

#### 4.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Bestandteile	Menge
Substrat- Chromogen- Lösung	Levamisol	90mg
	Natriumnitrit NaNO <sub>2</sub>	50mg
	Neufuchsin	500µl
	Naphtol- ASBI- Phosphat	125mg
	DMF/NN- Dimethyl- Formamid	1500µl
PBS, pH 7,4 "phosphate buffered saline"	NaCl	90g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,33g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,67g
	Ad A.dest.	1000ml
Saure Hämalaulösung (nach P. Mayer)	Hämatoxylin	1,0g
	Natriumjodat	0,2g
	Aluminiumkaliumsulfat*12 H <sub>2</sub> O	50,0g
	Chloralhydrat	50,0g
	Citronensäure*1 H <sub>2</sub> O	1,09g
	Wasser gereinigt	1000,0g

#### 4.1.4 Geräte

Geräte	Firma
Cytozentrifuge Universal 30 F	Hettich Zentrifugen
Megafuge 1,0R	Heraeus Instruments
MACS Seperator (OctoMACS)	Miltenyi Biotec
Sonorex RK510 Transistor	BANDELIN
Neubauer- Zählkammer	BRAND/Marienfeld
Schüttler Vortex Genie2	Bender&Hobein
Photomikroskop Axiophot	ZEISS
Pipettierhilfe Accu-jet pro	BRAND
Pipetten (0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf

#### 4.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Deckgläser 24*24mm (200St.)	Menzel- Gläser
Deckgläser 24*40mm (100St.)	Menzel- Gläser
Objektträger SuperFrost Plus (72St.) Art. No.: J1800AMNZ	Menzel- Gläser
MACS Separation Columns (25 MS Columns) Order No.: 130-042-201	Miltenyi Biotec
MACS Pre- Separation Filters (50St.) Order No.: 130-041-407	Miltenyi Biotec
Falcon 15ml Polypropylene Conical Tube Art.No.: 352096	Becton- Dickinson- Labware
Falcon 50ml Polypropylene Conical Tube Art.No.: 352070	Becton- Dickinson- Labware
Eppendorf- Hütchen 1,5ml	Eppendorf
Serologische Pipette 10ml No./Ref.: 86.1254.025	SARSTEDT
Serologische Pipette 5ml No./Ref.: 86.1253.025	SARSTEDT
2ml Stripette Cat.No.: 4020	Costar
Pipettenspitzen 1000µl, blau (250St.) No./Ref.: 70.762	SARSTEDT
Pipettenspitzen 200µl, gelb (500St.) No./Ref.: 70.760.002	SARSTEDT
Pipettenspitzen 0,1-20µl, Tip-Box N 5*96 St. Code No.: 702408	PLASTIBRAND

## **4.2 Patientenkollektiv und –material**

### **4.2.1 Patientenkollektiv**

Allen Patienten, die zu einer chirurgischen Intervention bei Mammakarzinom in die I. Universitätsfrauenklinik München (Maistrasse) kamen, wurde eine KM- Punktion in Vollnarkose im Rahmen des chirurgischen Eingriffes angeboten. Darüber hinaus wurde eine KM- Punktion in Lokalanästhesie auch allen Patienten mit Radio- oder systemischer Therapie angeboten oder solchen, die zu Follow- up Untersuchungen kamen. Neben den primären KM- Untersuchungen wurden auf Verlangen der Patienten wiederholte Follow- up Punktionen durchgeführt. Eine schriftliche Einverständniserklärung gemäß den Vorgaben des lokalen Ethikkommittees wurde im Rahmen des Aufklärungsgespräches eingeholt (siehe Anhang).

### **4.2.2 Patienten- und tumorbezogene Daten**

Folgende patienten- und tumorbezogene Daten wurden erhoben:

- Alter
- Menopausenstatus
- Histologie
- TNM- Klassifikation
- Grading
- Estrogen- und Progesteronrezeptorstatus
- Her-2/neu Status
- Therapiestadium zum Zeitpunkt der KM- Punktion
- Operative Therapie
- Lymphangiosis
- Hämangiosis

### **4.2.3 Knochenmarkpunktion**

Die Knochenmarkaspiration erfolgte beidseits aus den vorderen Beckenkammknochen im Bereich der Spinae iliacae anteriores superiores (2-8ml pro Seite). Um eine Gerinnung des Probenmaterials zu vermeiden, wurde das Knochenmark in heparinisierten Spritzen abgenommen und innerhalb weniger Stunden weiterverarbeitet. Insgesamt wurden für diese Studie über einen Zeitraum von 1 Jahr KM- Proben von 99 Patienten aus den Frauenkliniken I. Frauenklinik München (Maistrasse), Klinikum Bayreuth und Klinikum Traunstein gewonnen und untersucht.

## 4.2.4 Periphere Venenpunktion

Zusätzlich wurden von 11 Patienten der I. Frauenklinik der Ludwig- Maximilians Universität in München zwischen 25-40ml peripher- venösen Blutes in heparinisierten Spritzen gewonnen und ebenfalls innerhalb weniger Stunden weiterverarbeitet.

## 4.3 Labormethoden

### 4.3.1 Aufarbeitung des Knochenmarks

#### 1. Überführen des Knochenmarks

- Knochenmark direkt aus Punktionskanüle in ein 50ml Zentrifugationsröhrchen (Polypropylene Conical Tube) überführen, Menge bestimmen und Röhrchen mit laufender Nummer beschriften.
- Im Eingangsbuch auf dem Patientenetikett Eingangsdiagnose sowie Eingangsdatum und gesamte Menge des Patientenmaterials vermerken.
- Mit Hanks- Lösung auf 50ml auffüllen

#### 2. Zentrifugation

- Zentrifugation 10min, 169xg, 9°C, ohne Bremse

#### 3. Abpipettieren

- Mit einer 10ml Pipette den oberen Überstand mit Fettphase abpipettieren bis auf das Sediment. Das abpipettierte Material in einen Erlenmeyerkolben werfen und im infektiösen Müll entsorgen.
- Nach diesem Schritt kann der Vorgang für kurze Zeit unterbrochen werden

#### 4. Zugabe von Ficoll

- 8ml Ficoll unter sterilen Bedingungen in 15ml Röhrchen (Polypropylene Conical Tube) vorgeben.
- Die vorbereiteten Ficoll- Röhrchen langsam mit dem Sediment aus Schritt 3 überschichten. Um eine Vermischung zu vermeiden, wird das KM mit einer 5ml Serologischen Pipette aufgenommen und kurz oberhalb des Ficoll- Flüssigkeitsspiegels schräg an der Röhrchenwand abgegeben.
- Häufig werden mehrere 8ml Ficoll- Röhrchen pro KM- Probe benötigt.
- WICHTIG: Zügig arbeiten, sonst rutschen die Zellen ins Ficoll ab

#### 5. Zentrifugation:

- Zentrifugation 20min, 1105xg, 9°C, ohne Bremse

#### 6. Interphase absaugen

- Interphase mit mononukleären Zellen (MNZ) - als dünner Ring sichtbar - und obere Phase mit einer 5ml Pipette abnehmen und in ein neues 50ml Röhrchen überführen.

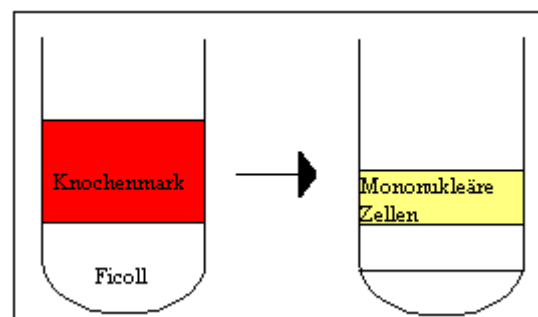


Abb. 2



- **WICHTIG:** Das Abnehmen von Ficoll sowie ein Stehen lassen länger als 10min sollte vermieden werden

### **7. Auffüllen mit PBS**

- Mit PBS auf 50ml auffüllen
- Schütteln

### **8. Zentrifugation**

- Zentrifugation 10min, 535xg, 9°C, mit Bremse

### **9. Überstand abgießen**

- Überstand abgießen

### **10. Erythrozytenlyse**

Bei zu großem Anteil an Erythrozyten in der Suspension (starke Rotfärbung des Präparats) Erythrozytenlyse durchführen gemäß Erythrozyten- Lyse- Kit (R&D System):

- 1-2ml Erythrozytenlysepuffer zugeben (je nach Erythrozytenanteil und Pelletgröße), Verdünnung 1:10 in A. dest. (steril) (Vorrat möglich)
- 5min unter Schütteln inkubieren
- Mit Waschpuffer auf 50ml auffüllen, Verdünnung 1:10 in A. dest. (steril) (täglich frisch ansetzen)
- Zentrifugation 10min, 535xg, 9°C, mit Bremse
- Überstand abgießen

### **11. Sediment re- suspendieren**

- Sediment in PBS re- suspendieren und auf 2-3ml (im Normalfall 3ml/ kleine Zellmenge nur 2ml/ große Zellmenge bis zu 5ml) auffüllen. Hieraus ergeben sich also, wegen eines verbleibenden Restvolumens von ca. 0,3 ml nach Abgießen des Überstands, folgende Gesamtvolumina für die Berechnung der Gesamtzellzahl:
  - o Auf 3ml aufgefüllt: 3,3ml
  - o Auf 2ml aufgefüllt: 2,3ml
- Nach diesem Schritt kann die Knochenmarkaufarbeitung über Nacht unterbrochen werden.

### **12. Trypanblau**

- Zuerst 10µl Trypanblaulösung in Mikrotiterplatte vorgeben
- KM- Suspension auf Schüttler mischen
- Mit einer Eppendorfpipette 10µl KM- Suspension zu dem Trypanblau zugeben und gut mischen

### **13. Neubauer- Kammerzählung**

- Zählkammer vorbereiten:
  - o Kammer anhauchen
  - o Deckglas aufschieben

- Mit Eppendorfpipette 10µl KM-/Trypanblau- Suspension in Kammer geben
- Im Mikroskop mit 10er Objektiv Ebene suchen, mit 20er Objektiv mononukleäre Zellen zählen.
- WICHTIG: Auf Erythrozyten achten und diese nicht mitzählen
- Ausgezählt werden 25 Gruppen- Quadrate im Thoma- Netz

#### **14. Berechnung der Gesamtzellzahl**

- Gesamtzellzahl = Volumen (ml) \* ermittelte Zellzahl je Quadrat \* 2 \* 10<sup>4</sup>

### **4.3.2 Herstellen von Nativ- Zytospins**

#### **1. Ermitteln des benötigten KM- Suspension- Volumens**

- Es werden 18\*10<sup>6</sup> Zellen für 18 Zytospins benötigt, d.h. 1\*10<sup>6</sup> Zellen pro Zytospin
- Berechnung des benötigten Volumens:  $\text{Volumen (ml)} = 18 * 10^6 * \frac{\text{Gesamtvolumen (z.B. 3,3ml)}}{\text{Gesamtzahl} * 10^6}$

#### **2. KM- Suspension überführen**

- Errechnetes Volumen in ein 15ml Röhrchen überführen und mit PBS auf 9ml auffüllen
- 9ml Volumen werden zur Herstellung von 18 Objektträgern a 500µl Suspension benötigt. Bei niedriger Zellzahl Volumen entsprechend verringern, so dass jeder OT weiterhin mit 1\*10<sup>6</sup> beschichtet wird.

#### **3. Zytospin- / Träger- Vorbereitung**

- Objektträger mit Datum, laufender Patientenummer und Materialangabe (Blut/KM) beschriften
- Objektträger in Zytospanplatte einsetzen und Zytospanneinsatz einspannen.
- KM-/Blut- Suspension nochmals mischen (Schüttler)
- Mit einer Eppendorfpipette 500µl Suspension in Zytospanneinsatz geben.

#### **4. Zentrifugation**

- In der Zytospinzentrifuge 5min, 6\*90g, bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugieren

#### **5. Überstand abpipettieren**

- Überstand abpipettieren und die Zytospins 12-24 Std. bei Raumtemperatur trocknen lassen

#### **6. Lagerung**

- Weiterverarbeitung (Färbung) von 4 OT bzw. Lagerung der übrigen 14 OT bei – 80°C
- Zu färbende OT an Auftragsstelle mit weißem Edding markieren

### **4.3.3 HEA- Anreicherung mit dem „HEA Tumor Cell Enrichment and Detection Kit“ (human)**

#### **4.3.3.1 Zellen anreichern**

WICHTIG: Alle Volumenangaben gelten für maximal  $5 \cdot 10^7$  Zellen. Bei größeren Zellzahlen müssen die Volumina entsprechend hochgerechnet werden.

##### **1. Puffer entgasen**

- PBS (pH 7,2 mit 0,5% BSA und 2mM EDTA) gemäß Herstellerangaben zubereiten und im Sonorex RK510 Transistor entgasen.

##### **2. Zentrifugation nach KM Aufarbeitung**

- Nach KM Aufbereitung Abnahme der benötigten Menge an KM für Routinescreening (Nativzytospins)
- Röhrchen mit KM erneut abzentrifugieren, bei 300xg, 10min, mit Bremse

##### **3. Zellen re- suspendieren**

- Überstand abpipettieren und verwerfen
- Sediment mit 300µl kaltem, entgastem Puffer re- suspendieren

##### **4. Blockieren**

- Unspezifische Bindungsstellen mit 100µl FCR Blocking Reagenz blocken
- Gut mischen

##### **5. HEA Mikrobeads**

- 100µl MACS Microbeads dazu geben
- Gut mischen
- 30min bei 4°C inkubieren

##### **6. Zellen waschen**

- Zellen mit 1-2ml Puffer waschen

##### **7. Zentrifugation**

- Zellsuspension bei 300xg, 10min, ohne Bremse abzentrifugieren
- Überstand verwerfen

##### **8. Zellen resuspendieren**

- Zellen mit 500µl Puffer resuspendieren

##### **9. Säule und Filter vorbereiten und anfeuchten**

- Säule in Magneten einsetzen
- Filter auf Säule aufbringen
- Filter und Säule mit 500µl Puffer anfeuchten

##### **10. Zellsuspension in Säule pipettieren**

- Zellsuspension mit einer Eppendorfpipette in Säule pipettieren
- Zellsuspension durch Säule laufen lassen

### **11. Nachspülen**

- Mit 3\*500µl Puffer nachspülen
- Alle unmarkierten Zellen laufen durch die Säule durch, magnetisch markierte Zellen werden gebunden

### **12. Zellen aus Säule drücken**

- Filter abnehmen und verwerfen
- Säule aus Magneten entfernen
- Säule auf ein 15ml Röhrchen aufsetzen
- Zellen mit 500µl Puffer mit einem Stempel aus der Säule drücken

### **13. Fixieren**

- Zu den 500µl Zellsuspension aus der Säule 500µl Inside Fix zugeben (→ Fixationsvolumen = 1ml)
- 20min bei RT inkubieren

### **14. Säule vorbereiten und anfeuchten**

- Neue Säule in Magneten einsetzen
- Säule mit 500µl Puffer anfeuchten

### **15. Zellsuspension in Säule pipettieren**

- Zellsuspension (1ml) mit einer Eppendorfpipette in Säule pipettieren

### **16. Waschen**

- Sofort mit 500µl Puffer nachspülen

### **17. Zellen permeabilisieren**

- 500µl Inside Perm in die Säule geben

### **18. Anti- Cytokeratin- Alkaline- Phosphatase**

- 100µl verdünnte Anti- Cytokeratin- Alkaline- Phosphatase (1:50 in Inside Perm verdünnt) in Säule pipettieren
- 10 min bei RT inkubieren

### **19. Zellen waschen**

- Zellen in der Säule mit 500µl Inside Perm waschen
- Danach erneut mit 500µl PBS waschen

### **20. Zellen aus Säule drücken**

- Säule aus Magneten entfernen
- Säule in den Becher eines vorbereiteten OT geben
- Zellen mit 500µl PBS mit dem Stempel aus der Säule drücken

### **21. Zentrifugation**

- Zellen auf den OT zentrifugieren (Zytozentrifuge), 5min, 6\*90g, bei RT

#### **4.3.3.2 Angereicherte Zellen färben**

##### **22. OT trocknen lassen**

- OT mit angereicherten Zellen 2-18 Std. bei RT trocknen lassen

##### **23. Auftragsfläche markieren**

- Auftragsfläche mit Zellen auf OT mit weißem Edding markieren

##### **24. Färbung vorbereiten**

- Herstellung:
  - o TRIS/HCl Tablette in 1ml dest. Wasser auflösen (Schüttler)
  - o SIGMA FAST Fast Red TR/Naphtol AS- Mx Substrat Tablette zugeben und in TRIS- Puffer lösen

##### **25. OT waschen**

- OT 2min in PBS waschen

##### **26. Zellen anfärben**

- OT in Färbebecken legen
- Je 50-100µl Fast Red Lösung mit Eppendorfpipette auf Auftragsstellen pipettieren
- 15min bei RT inkubieren

##### **27. OT waschen**

- OT in OT- Halter einsetzen
- In bidest. Wasser für 2min waschen

##### **28. Eindeckeln**

- Kaisers Glyceringelatine auf Heizplatte (100-150°C) erwärmen, für 5-10 min, bis flüssig
- Mit Eppendorfpipette 3-4 Tropfen Gelatine auf Auftragsstelle geben und Deckgläschen (24mm\*40mm od. 24mm\*24mm) vorsichtig auflegen
- WICHTIG: Luftbläschen vermeiden, stören beim mikroskopieren

#### **4.3.4 Doppelfärbung am KM: Keratin (A45/B/B3) und HEA (Anti- Ep-CAM) mittels Immunfluoreszenz**

##### **1. Präparate auftauen und trocknen**

- Präparate 10min auftauen lassen
- Präparate ca. 20min trocknen lassen

##### **2. Fixierung**

- Präparate 5min in Aceton fixieren (unter Abzug!)
- Danach trocknen lassen (unter Abzug!)

##### **3. PBS**

- Präparate 3\*2min in PBS spülen

#### **4. Blockierung**

- Ultra V- Block auf Auftragsstellen geben
- 200µl je Auftragsstelle mit Pipette auftragen
- 15min bei RT inkubieren
- Dient zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und verhindert damit unspezifische Anfärbungen
- Nach 15min nur abklopfen, nicht abwaschen sonst ist Ausgangszustand wieder hergestellt

##### **4.3.4.1 HEA (Anti- Ep- CAM)**

#### **5. Primär- AK**

- Anti- Ep- CAM Klon HEA 125, Mouse IgG, Firma: Serotec
- AK 1:20 in Verdünnungsmedium (DAKO S3022) verdünnen
- 200µl verdünnten AK je Auftragsstelle mit Pipette auftragen
- 45min bei RT inkubieren

#### **6. PBS**

- Präparate 3\*2min in PBS spülen

#### **7. Sekundär- AK**

- Rabbit- Anti- Mouse IgG Cy2 markiert 1:50-1:200, Firma: Jackson Immuno Research
- AK 1:100 in Verdünnungsmedium (DAKO S3022) verdünnen
- 200µl verdünnten AK je Auftragsstelle mit Pipette auftragen
- 30min bei RT inkubieren

#### **8. PBS**

- Präparate 3\*2min in PBS spülen

##### **4.3.4.2 Keratin- Nachweis**

#### **9. Primär- AK**

- Pan- Keratin Klon A45-B/B3 (erfasst CK8, CK18, CK19), Mouse IgG direkt markiert mit Cy3, Firma: Micromet
- AK 1:200 in Verdünnungsmedium (DAKO S3022) verdünnen
- 200µl verdünnten AK je Auftragsstelle mit Pipette auftragen
- 45min bei RT inkubieren

#### **10. PBS**

- Präparate 3\*2min in PBS spülen

#### **11. Präparate trocknen lassen**

- Im Dunkeln trocknen lassen

#### **12. Eindeckeln**

- Mit DAPI eindeckeln

### 4.3.5 Anreicherung von Tumorzellen im Knochenmark (KM) mit Anti-Thomsen- Friedenreich IgM (CD176)

Verwendeter Puffer: 10% FCS-PBS (PBS: pH- Wert 7,6-8,0)

#### 1. Zentrifugieren und Re- suspendieren

- Nach Abnahme des benötigten KM für Routinelabor = Nativzytospins ( $18 \cdot 10^6$  Zellen) verbliebene Zellzahl für Anreicherung berechnen:
- Ausgangszellzahl-  $18 \cdot 10^6$  = eingesetzte Zellzahl für Anreicherung
- In Röhrchen verbliebenes KM mit PBS nochmals abzentrifugieren, bei 409xg, 10min
- Überstand verwerfen
- Pellet in 5ml 10% FCS-PBS re- suspendieren

#### 2. Primär- AK

- Thomsen- Friedenreich- AK, Anti- CD176, Klon Nemod- TF2, Mouse IgM, Firma: Nemod Biotherapeutics
- AK- Konzentration nach Lösung in 560 $\mu$ l destilliertem Wasser = 0,42mg/ml (gemäß Vorgabe Nemod Biotherapeutics)
- Verdünnungsmedium: 10% FCS- PBS
- AK wird in einer Konzentration von 4 $\mu$ g/ml verwendet, d.h. bei 5ml Ausgangsvolumen ergeben sich 20 $\mu$ g AK  $\rightarrow 20\mu\text{g} / 0.42\text{mg/ml} = 47,62\mu\text{l}$
- 47,62 $\mu$ l AK in 5ml Ausgangsvolumen pipettieren
- 45min bei 37°C inkubieren

#### 3. Zentrifugation

- Bei 409xg, 10min, ohne Bremse abzentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 200-300 $\mu$ l 10% FCS-PBS re- suspendieren, zellzahlabhängig. Lösung sollte schön flüssig sein, evtl. Volumen erhöhen

#### 4. Sekundär- AK

- Ratte- Anti- Maus IgM Microbeads, Firma: Miltenyi Biotec
- 20 $\mu$ l zur Zellsuspension geben
- 10min bei 4°C inkubieren

#### 5. Magnetsäule anfeuchten

- Säule in den Magneten einsetzen
- Filter auf Säule aufbringen; dient dazu Zellklumpen, welche die Säule verstopfen könnten, zurückzuhalten
- Säule und Filter mit 500 $\mu$ l FCS-PBS anfeuchten
- KM- Suspension in die angefeuchtete Säule geben und durchlaufen lassen
- Mit 4\*1ml 10% FCS-PBS gut nachspülen

- Säule aus dem Magneten nehmen
- Mit 500-1000µl 10% FCS-PBS Zellen mit dem Stempel aus der Säule drücken, 5\* wiederholen

## 6. Zentrifugation

- Bei 409xg, 5min, ohne Bremse abzentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1,5-2ml 10% FCS-PBS (je nach eingesetzter Zellzahl) re-suspendieren

## 7. Zytospins herstellen

- Je 500µl Zellsuspension in die vorbereiteten Zytospinneinsätze geben
- OT 5min in Zytocentrifuge abzentrifugieren, 6\*90g, bei RT
- Überstand abnehmen
- Zytospins ca. 12-24 Std. trocknen lassen
- Zytospins vor dem Färben einfrieren, um die Zellwand durchlässig zu machen

## 8. Detektion der gebundenen Zellen

- Gemäß Färbeprotokoll: Immunzytologie mit der APAAP Färbung

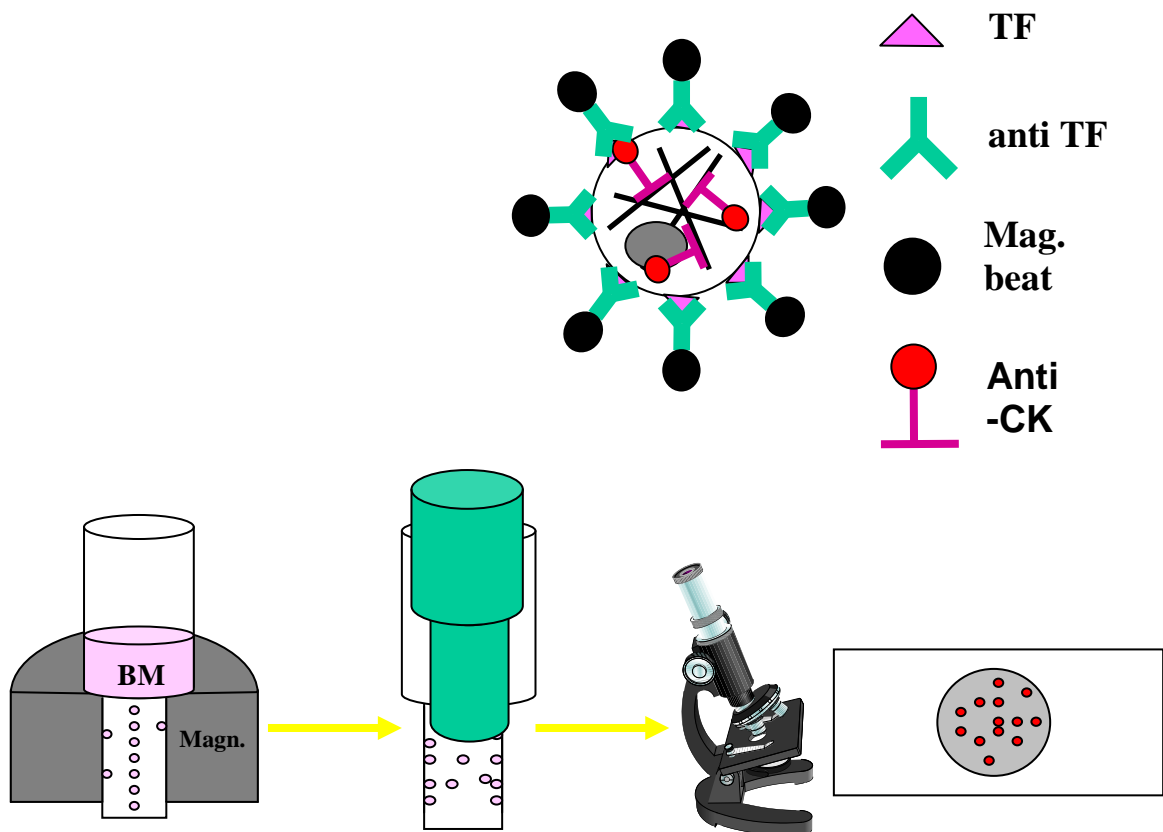


Abb. 3: Ablaufschema der TF- Anreicherung



## 4.3.6 Immunzytologie mit der APAAP Färbung

### 1. Allgemeines

- Gefärbt wird in einem Färbebecken bei RT
- Nativzytospin:
  - o 2 Präparate mit A45-B/B3(1:100)
  - o 2 Präparate als Negativkontrolle mit MOPC- 21(1:500)
- TF- angereicherte Präparate:
  - o Alle mit A45-B/B3(1:100)
- Eine Positivkontrolle (OT mit MCF7 Zellen) sollte immer mitgefärbt werden

### 2. Präparate auftauen

- Präparate etwa 30 min auftauen lassen
- OT beschriften (A45/MOPC)
- AK- Verdünnungen herstellen:
  - o A45-B/B3: (1:100)
  - o MOPC- 21: (1:500)
  - o Z 0259: (1:20)
  - o APAAP: (1:100)
  - o Verdünnt werden die AK mit 10% AB-Serum/TRIS- Puffer

### 3. Blockierung

- Unspezifische Bindungsstellen werden mit 10% AB- Serum (Verdünnung 1:10 in TRIS- Puffer) blockiert
- 200µl pro Auftragsstelle
- 20min inkubieren
- Dient zur Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine und somit zur Verhinderung unspezifischer Anfärbungen

### 4. AB Serum abklopfen

- AB- Serum nur abklopfen und den Objektträgerrand um die Auftragsstelle abwischen
- WICHTIG: AB- Serum nicht abspülen, da sonst der Ausgangszustand wieder hergestellt wird und unspezifische Reaktionen ermöglicht werden
- WICHTIG: Präparate dürfen nicht austrocknen, zügig arbeiten

### 5. Primärantikörper

- Primärantikörper A45-B/B3 (Mikromet), 1:100 gelöst in AB-Serum (1:10 in TRIS- Puffer)
- Negativkontrolle MOPC- 21, 1:100 gelöst in AB-Serum (1:10 in TRIS- Puffer)

## **6. Nativzytospin: PBS**

- 3\*3min in PBS waschen
- WICHTIG: Negativkontrolle in extra Küvette stellen

### **6.1. TF- angereicherte Zytospins: TRIS- Puffer**

- 3\*3min in TRIS- Puffer waschen

## **7. Brückenantikörper/ Sekundärantikörper**

- R&M Brückenantikörper, Rabbit- Anti- Mouse, 1:20 gelöst in AB-Serum (1:10 in TRIS- Puffer)

## **8. Nativzytospin: PBS**

- 3\*3min in PBS waschen

### **8.1. TF- angereicherte Zytospins: TRIS- Puffer**

- 3\*3min in TRIS- Puffer waschen

## **9. APAAP**

- APAAP, 1:100 gelöst in AB- Serum (1:10 in TRIS- Puffer)
- Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische Phosphatase (Enzym- Anti-Enzym- Komplex) besteht aus monoklonalen Maus- IgG- Antikörpern gegen alkalische Phosphatase, welche spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert sind.

## **10. Nativzytospin: PBS**

- 3\*3min in PBS waschen

### **10.1. TF- angereicherte Zytospins: TRIS- Puffer**

- 3\*3min in TRIS- Puffer waschen

## **11. Nativzytospin: Substrat/ Chromogen**

- Substrat- Chromogen- Lösung ca. 30min vor Gebrauch neu herstellen
- Herstellung:
  - o Lösung 1:
  - o 90mg Levamisol einwiegen (weiße Einwageschälchen, klein)
  - o In 62,5ml TRIS- Lösung lösen (Messzylinder)
  - o Auf 250ml mit A. dest. Auffüllen
  - o In Erlenmeyerkolben überführen und mit Magnetrührer mischen
  - o Lösung 2:
  - o 50mg Natriumnitrit einwiegen
  - o In 1250µl Aqua dest. Lösen (15ml Röhrchen auf Schüttler)
  - o 500µl Neufuchsin (Kühlschrank) zugeben und auf Schüttler gut mischen
  - o Lösung 1 und 2 in einem Erlenmeyerkolben mischen

- Lösung 3:
- 125mg Naphtol- ASBI- Phosphat (Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) einwiegen
- 1500 $\mu\text{l}$  DMF/NN- Dimethyl- Formamid (unter Abzug!) hinzu pipettieren und gut mischen
- Lösung sollte klar werden
- Lösung 3 zu dem Gemisch aus Lösung 1 und Lösung 2 in Erlenmeyerkolben geben und für 5min auf dem Magnetrührer mischen
- Fertige Substratlösung filtrieren
- OT unter dem Anzug färben
- Gebrauchte Substratlösung im Sondermüll entsorgen

#### **11.1. TF- angereicherte Zytospins: DAKO Fuchsin+Substrate-Chromogen Lösung**

- DAKO Fuchsin+Substrate- Chromogen: System for Immunohistochemistry and in situ hybridization
- Färbung erfolgte nach Protokoll des Herstellers

#### **12. Nativzytospin: PBS**

- 3\*3min in PBS waschen

#### **12.1. TF- angereicherte Zytospins: A. dest. und Kernfärbung**

- 3\*3min in A. dest. waschen
- Kernfärbung mit Saurer Hämalaunlösung nach Meyer
- OT 30sec in einem Objektträgerhalter in Saure Hämalaunlösung stellen
- Danach solange mit Leitungswasser spülen, bis kein blauer Farbstoff im Wasser mehr sichtbar ist
- 5min in Leitungswasser bläuen
- Bis zum Eindeckeln in A. dest. aufbewahren

#### **13. Eindeckeln**

- Kaisers Glyceringelatine auf Heizplatte ( $100-150^{\circ}\text{C}$ ) erwärmen, für 5-10 min, bis flüssig
- Mit Eppendorfpipette 3-4 Tropfen Gelatine auf OT geben und Deckgläschen (24mm\*40mm od. 24mm\*24mm) vorsichtig auflegen
- WICHTIG: Luftbläschen vermeiden, stören beim Mikroskopieren

#### **4.4 Statistische Methoden**

Die gesammelte Datenmenge wurde mit den Programmen Excel und SPSS ausgewertet. Die deskriptiven Daten wurden mittels Median und Mittelwert sowie Minimum, Maximum und Standardabweichung dargestellt.

Um die detektierte Tumorzellzahl vor und nach Anreicherung zu vergleichen, wurden sowohl die absolute Tumorzellzahl pro Probe als auch die relative Tumorzellzahl pro 1 Mio. MNZ berücksichtigt.

Die **relative Tumorzellzahl** pro 1 Mio. MNZ wurde nach folgender Formel berechnet:

⇒ detektierte Tumorzellzahl pro Probe \*  $10^6$  / eingesetzte MNZ- Zahl

Für den Vergleich zweier verbundener Stichproben wurden der McNemar- Test sowie der Wilcoxon- Test eingesetzt.

##### **McNemar- Test**

Um die Anzahl tumorzellpositiver Patientenproben - Knochenmark und Blut - vor und nach Anreicherung zu vergleichen, wurde der McNemar- Test eingesetzt.

##### **Wilcoxon- Test**

Der Wilcoxon Test wurde durchgeführt, um die absolute und relative Tumorzellzahl vor und nach Anreicherung sowohl im Knochenmark als auch im Blut zu vergleichen.

Der **absolute Anreicherungsfaktor** wurde berechnet nach:

- ⇒ absolute Tumorzellzahl nach Anreicherung / absolute Tumorzellzahl vor Anreicherung

Der **relative Anreicherungsfaktor** entsprechend:

- ⇒ relative Tumorzellzahl nach Anreicherung / relative Tumorzellzahl vor Anreicherung

## 5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl KM- als auch Blutproben von insgesamt 99 Patienten mit histologisch gesichertem Mammakarzinom nach o.g. Protokollen bearbeitet und auf das Vorhandensein von DTZ gescreent. Zunächst wurde im Rahmen eines Vorversuches die Tumorzellanreicherung mittels „*HEA Tumor Cell Enrichment and Detection KIT*“ (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Hierbei wurden 34 Patientenproben, ausschließlich KM, untersucht. Im Anschluss wurde eine Methode zur Anreicherung von DTZ aus KM und peripherem Blut mit einem Antikörper gegen das Thomsen-Friedenreich- Antigen etabliert. Anhand dieses Protokolls wurden weitere 65 KM- sowie 11 Blutproben von 65 Patienten auf DTZ gescreent. Die Gesamtheit der Proben wurde über einen Zeitraum von einem Jahr von Patienten aus den Frauenkliniken I. Frauenklinik München (Maistrasse), Klinikum Bayreuth und Klinikum Traunstein gewonnen. Die klinischen Angaben zu den Patienten stammen aus den entsprechenden Kliniken, in denen die Patienten jeweils behandelt wurden. Die histopathologischen Angaben aus den Pathologielaboratorien, mit denen die Kliniken zusammenarbeiten.

### **5.1 HEA- Tumorzellanreicherung mit dem „HEA Tumor Cell Enrichment and Detection KIT“ (Miltenyi Biotec)**

#### **5.1.1 Patientenauswertung**

Folgende Tabelle (Tab. 2) bietet eine Übersicht über die Verteilung der im Rahmen der HEA- Anreicherung untersuchten 34 Patienten im Hinblick auf Histologie, TNM- Status, Grading, Hormonrezeptor- und HER-2/neu- Status sowie einige weitere histopathologische und klinische Daten.

<b>Parameter</b>		<b>Summe</b>
Probenanzahl		34
Patientenanzahl		34
Mittleres Alter (Intervall)		60 (40-85)
Menopausenstatus	Postmenopausal	25
	Prämenopausal	9

Histologie	DCIS	1
	LCIS	1
	Duktal- invasiv	10
	Duktal- invasiv mit intraduktaler Komponente	14
	Duktal- invasiv mit LCIS	1
	lobulär- invasiv mit LCIS	3
	Medullär	1
	Muzinös	1
	n.a.	2
Tumorgroße	Tis	2
	T1	16
	T2	14
	T3	0
	T4	0
	Tx	2
Lymphknotenstatus	N0	21
	N1	8
	N2	2
	N3	0
	Nx	3
Metastasen	M0	21
	M1	0
	Mx	13
Differenzierung	G1	3
	G2	12
	G3	13
	n.a.	6
Estrogenrezeptorstatus	ER+	22
	ER-	11
	ER n.a.	1
Progesteronrezeptorstatus	PR+	23
	PR-	10
	PR n.a.	1

Her-2/neu Status	Negativ	16
	Schwach positiv	3
	Stark positiv	7
	n.a.	8
Therapiestadium zum Zeitpunkt der KMP	Operative Therapie	28
	+ Postoperative Chemotherapie	2
	+ Postoperative Hormontherapie	1
	+ Postoperative Chemo- und Hormontherapie	2
	+ Postoperative Herceptintherapie	1
Operative Therapie	BET	29
	Ablatio mammae	5
Lymphangiosis	Ja	2
	Nein	29
	n.a.	3
Hämangiosis	Ja	0
	Nein	31
	n.a.	3

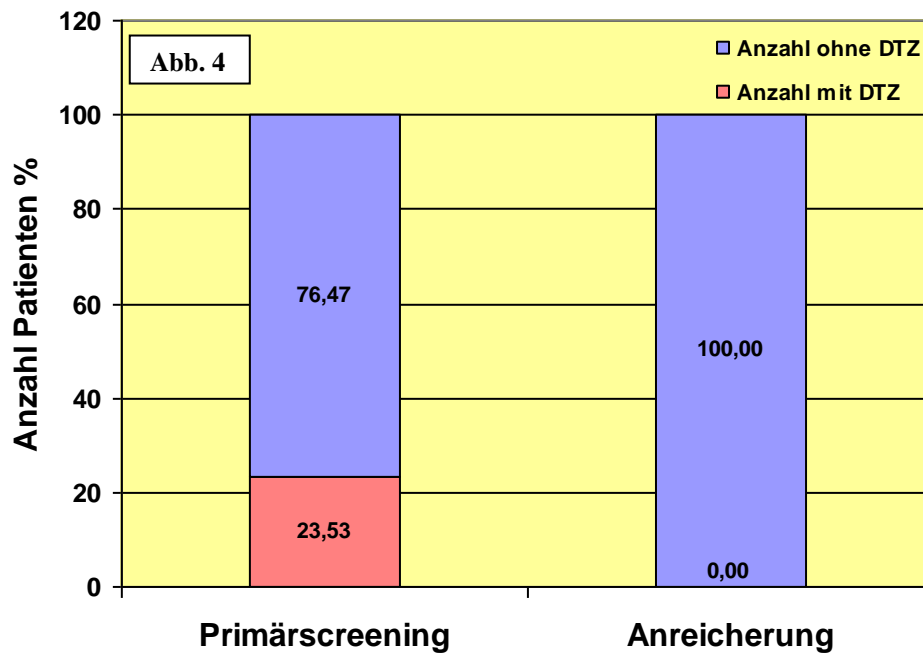
**Tabelle 2**

### 5.1.2 Probenauswertung

Im konventionellen Primärscreening zeigten 8 / 34 (23,5%) Patienten DTZ mit im Mittel 0,68 (Median 0) TZ /  $2 \cdot 10^6$  mononukleäre Zellen (0-6). Nach Anreicherung konnten im Mittel  $4,21 \cdot 10^7$  (Median  $1,78 \cdot 10^7$ ) MNZ ( $3,20 \cdot 10^6$  -  $3,71 \cdot 10^8$ ) gescreent werden. Hierbei zeigten 0 / 34 Patienten (0%) DTZ (Tab. 3, Abb. 4).

Knochenmark	Anzahl (n) der Patienten mit DTZ	Anzahl (n) der Patienten ohne DTZ	Summe (n) der Patienten
Primärscreening	8	26	34
Anreicherung	0	34	34

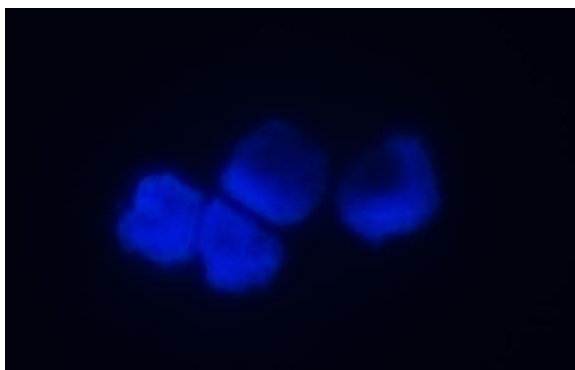
Tabelle 3



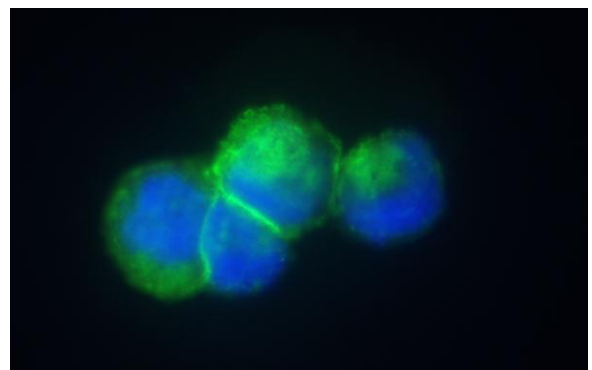


### 5.1.3 Doppelfärbung am KM: Keratin (A45/B/B3) und HEA (Anti-Ep- CAM) mittels Immunofluoreszenz

Zum Nachweis einer HEA- und Zytokeratin (CK)- Koexpression wurden die KM-Präparate der Patientinnen, die im Primärscreening positiv waren (Tab. 3) mit einer Doppelfärbung gegen Keratin und HEA angefärbt. Die CK positiven DTZ im KM der Brustkrebspatientinnen wiesen bei allen 8 Patientinnen (100%) eine Koexpression von HEA und CK auf. Weiterhin war diese Koexpression bei allen im Knochenmark nachgewiesenen isolierten Tumorzellen vorhanden (100%). Mononukleäre Knochenmarkszellen ohne CK Expression waren auch negativ für HEA.

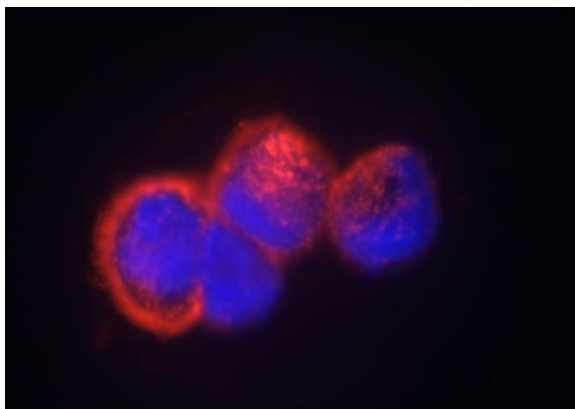


**Zellkern: DAPI blau**



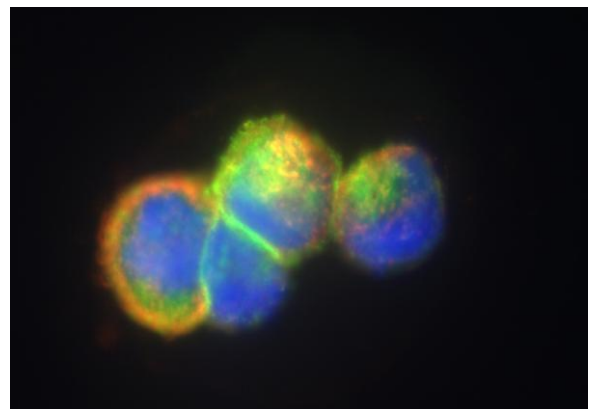
**Zellkern: DAPI blau**

**HEA: Cy2 grün**



**Zellkern: DAPI blau**

**CK: Cy3 rot**



**Zellkern: DAPI blau**

**HEA: Cy2 grün**

**CK: Cy3 rot**

**Abb. 5: CK und HEA- Koexpression auf Tumorzellen im KM**

## 5.2 TF- Tumorzellenanreicherung im Knochenmark und peripheren Blut

### 5.2.1 Patientenauswertung

Folgende Tabelle (Tab. 4) bietet eine Übersicht über die Verteilung der im Rahmen der TF- Anreicherung untersuchten 65 Patienten im Hinblick auf Histologie, TNM- Status, Grading, Hormonrezeptor- und HER-2/neu- Status sowie einige weitere histopathologische und klinische Daten.

Parameter		Summe
Probenanzahl		65
Patientenanzahl		65
Mittleres Alter (Intervall)		58 (27-79)
Menopausenstatus	Postmenopausal	51
	Prämenopausal	14
Histologie	DCIS	6
	Morbus Paget mit DCIS	1
	Duktal- invasiv	35
	Duktal- invasiv mit intraduktaler Komponente	15
	Lobulär- invasiv	2
	lobulär- invasiv mit LCIS	2
	Duktal und lobulär- invasiv	1
	Duktal und lobulär- invasiv mit intraduktaler Komponente	2
	n.a.	1
Tumorgröße	Tis	5
	T1	27
	T2	27
	T3	0
	T4	1
	Tx	5
Lymphknotenstatus	N0	40
	N1	11
	N2	5

	N3	3
	Nx	6
Metastasen	M0	21
	M1	0
	Mx	44
Differenzierung	G1	6
	G2	27
	G3	24
	n.a.	8
Estrogenrezeptorstatus	ER+	39
	ER-	21
	ER n.a.	5
Progesteronrezeptorstatus	PR+	32
	PR-	28
	PR n.a.	5
Her-2/neu Status	Negativ	30
	Schwach positiv	17
	Stark positiv	11
	n.a.	7
Therapiestadium zum Zeitpunkt der KMP	Keine Therapie	1
	Neoadjuvante Chemotherapie	2
	Neoadjuvante Hormontherapie	1
	Operative Therapie	57
	+ Postoperative Chemotherapie	2
	+ Postoperative Chemo und Hormontherapie	1
	+ Postoperative Herceptintherapie	1
Operative Therapie	Brusterhaltende Therapie (BET)	51
	Ablatio mammae	12
	n.a.	2
Lymphangiosis	Ja	9
	Nein	52
	n.a.	4
Hämangiosis	Ja	3

	Nein	58
	n.a.	4

**Tabelle 4**

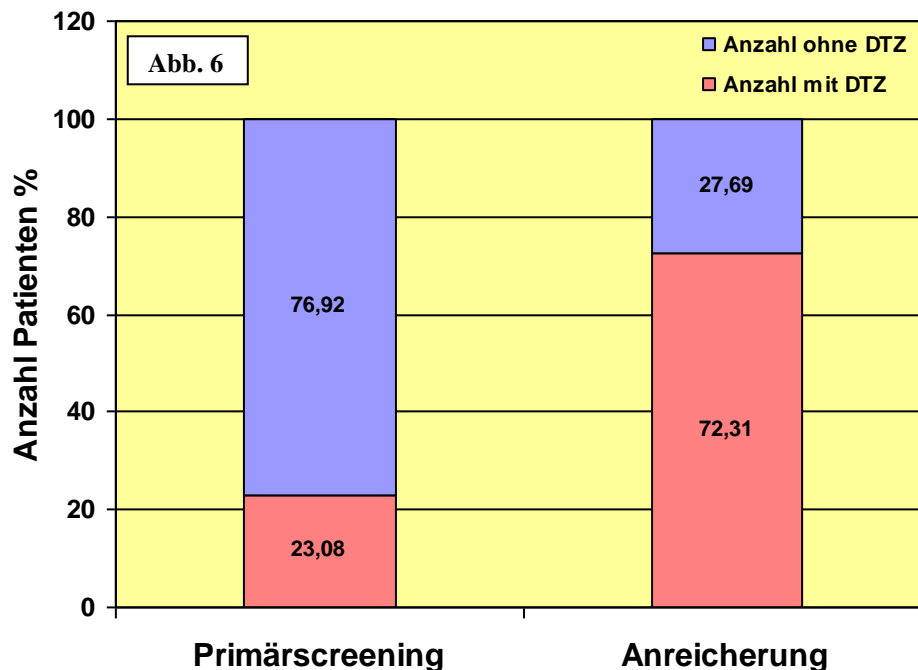
## 5.2.2 Probenauswertung

### 5.2.2.1 Knochenmark

Im konventionellen Primärscreening zeigten 15 / 65 (23,1%) Patienten DTZ im Knochenmark. Nach Anreicherung stieg die Anzahl auf 47 / 65 Patienten (72,3%) an. ( $p < .0001$  [Anhang 7]) (Tab. 5, Abb. 6)

Knochenmark	Anzahl (n) der Patienten mit DTZ	Anzahl (n) der Patienten ohne DTZ	Summe (n) der Patienten
Primärscreening	15	50	65
Anreicherung	47	18	65

**Tabelle 5**



Die detektierte Tumorzellzahl lag vor Anreicherung im Mittel bei 0,74 (Median 0) Zellen (MIN 0, MAX 10, Standardabweichung 2,10). Nach Anreicherung konnten im Mittel  $3,29 \cdot 10^7$  (Median  $2,20 \cdot 10^7$ ) mononukleäre Zellen (MIN  $8,40 \cdot 10^5$ , MAX  $2,18 \cdot 10^8$ ) auf DTZ gescreent werden. Die Anzahl DTZ im Knochenmark stieg auf im Mittel 8,06 (Median 2) Tumorzellen (MIN 0, MAX 105, Standardabweichung 16,93) (Tab. 6).

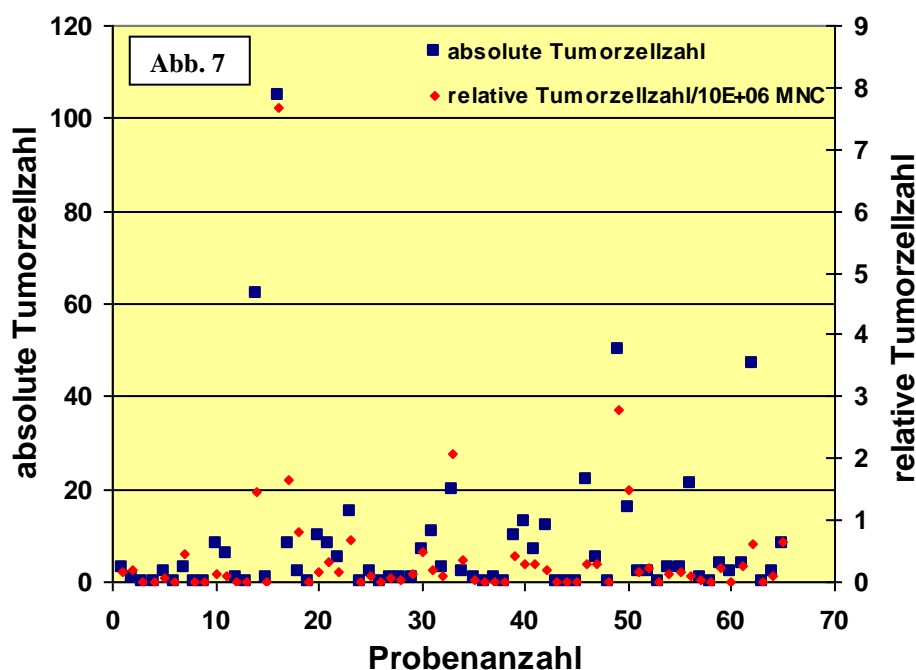
Die relative Tumorzellzahl/ $10^6$  untersuchter MNZ lag im Primärscreening im Mittel bei 0,37 (Median 0) Tumorzellen (MIN 0, MAX 5, Standardabweichung 1,05). Nach Anreicherung konnten im Mittel 0,4 (Median 0,13) DTZ nachgewiesen werden (MIN 0, MAX 7,68, Standardabweichung 1,05) (Tab. 6).

Tab. 6 zeigt zusätzlich die Tumorzellzahlen ausschließlich bezogen auf die positiven KM- Proben:

Tumorzellzahl	Mittelwert	Median	Bereich (MIN-MAX)	Standardabweichung
<b>Alle Proben (n=65)</b>				
<b>Absolut (pro Probe)</b>				
Primärscreening	0,74	0	0-10	2,10
Anreicherung	8,06	2	0-105	16,93
P- Wert	p< .0001 [Anhang 8]			
<b>Relativ (pro <math>10^6</math> MNZ)</b>				
Primärscreening	0,37	0	0-5	1,05
Anreicherung	0,4	0,13	0-7,68	1,05
P- Wert	p= .1110 [Anhang 9]			
<b>Nur positive Proben</b>				
<b>Absolut (pro Probe)</b>				
Primärscreening (positiv: n=15)	3,20	2	1-10	3,43
Anreicherung (positiv: n=47)	11,15	4	1-105	19,07

**Tabelle 6**

In Abb. 7 sind absolute und relative Tumorzellzahl nach Anreicherung im direkten Vergleich pro Probe dargestellt.



Zusammenfassend lag der mittlere absolute Anreicherungsfaktor bei 10,92; der mittlere relative Faktor hatte den Wert 1,10.

Bei dem Vergleich Primärscreening und TF- Anreicherung im KM korrelierte das Ergebnis bei 25 Patienten. Hiervon waren 14 Patienten sowohl im Primärscreening als auch nach Anreicherung negativ, 11 Patienten waren bei beiden Verfahren positiv. 36 Patienten waren im Primärscreening zunächst negativ und zeigten dann nach Anreicherung ein positives Ergebnis. 4 Patienten waren im Primärscreening positiv und nach Anreicherung negativ (Tab. 7, Abb. 8).

	Primärscreening	TF- Anreicherung	Anzahl der Patienten
Knochenmark- status	negativ	negativ	14
	negativ	positiv	36
	positiv	negativ	4
	positiv	positiv	11

**Tabelle 7**

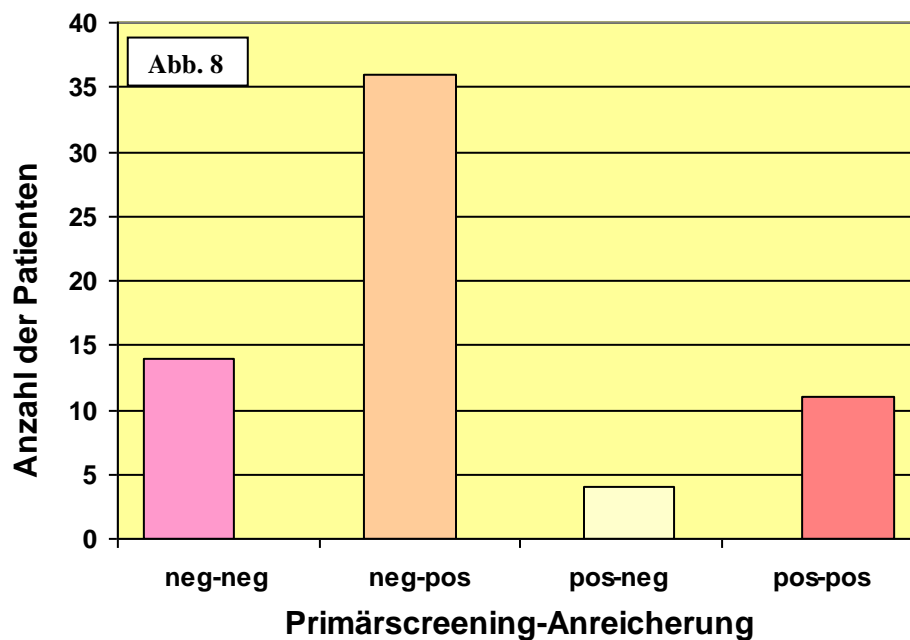
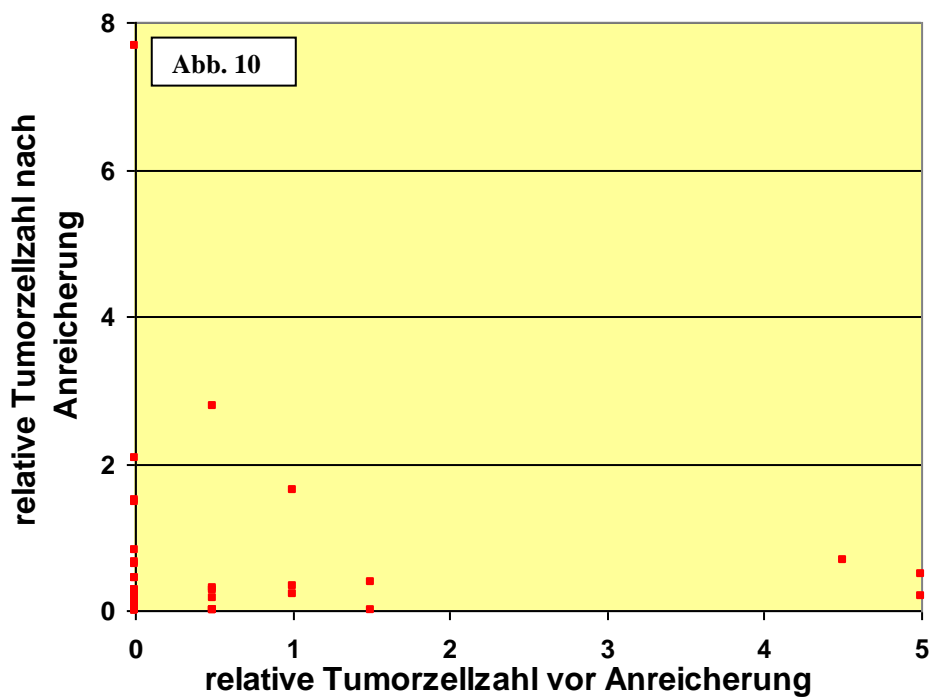
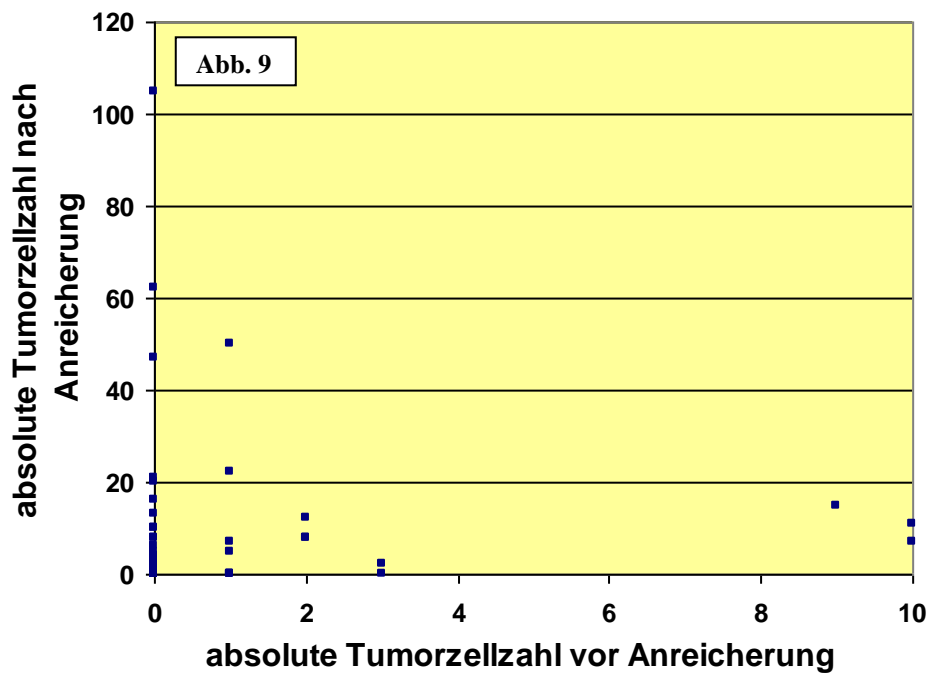


Abb. 9 für die absolute und Abb. 10 für die relative Tumorzellzahl zeigen noch einmal die Proben einzeln aufgeschlüsselt, die im Primärscreening negativ waren und nach Anreicherung positiv wurden, und umgekehrt. Darüber hinaus sind die korrelierenden Ergebnisse dargestellt sowie die Tumorzellzahlen der einzelnen Proben vor und nach Anreicherung im Vergleich.



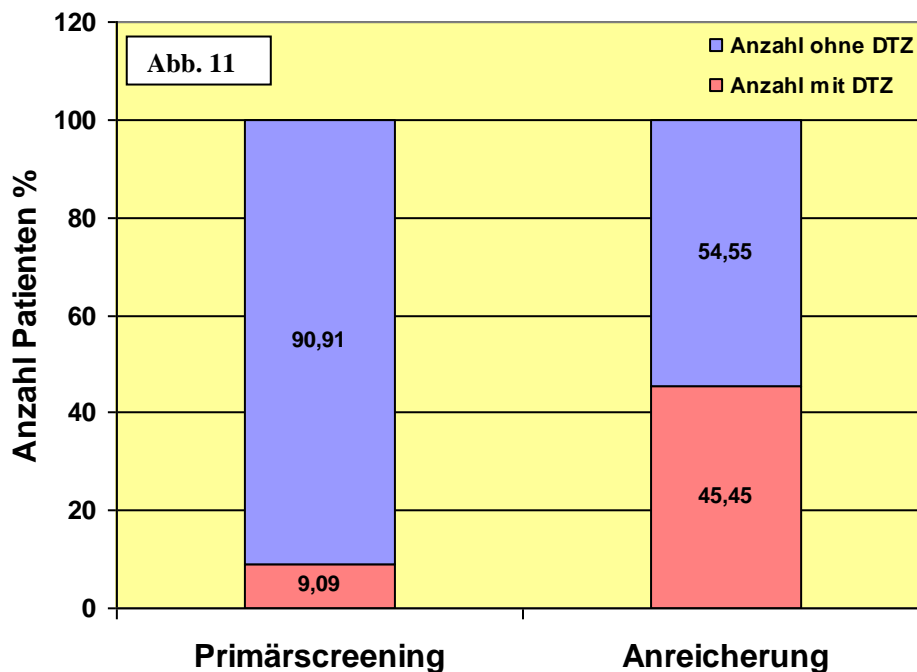
### 5.2.2.2 Blut

Bei Untersuchung des peripheren Blutes zeigte im konventionellen Primärscreening 1 / 11 (9,1%) Patienten DTZ mit im Mittel 0,18 (Median 0) Zellen (MIN 0, MAX 2, Standardabweichung 0,60). Nach Anreicherung konnten im Mittel  $1,62 \cdot 10^7$  (Median  $1,20 \cdot 10^7$ ) MNZ (MIN  $2,57 \cdot 10^6$ , MAX  $3,86 \cdot 10^7$ ) untersucht werden. Hierbei wurden bei 5 / 11 Patienten (45,5%) DTZ im Blut mit im Mittel 1,27 (Median 0) Zellen (MIN 0, MAX 8, Standardabweichung 2,41) nachgewiesen ( $p = .2187$  [Anhang 10]).

(Tab. 8+9, Abb. 11)

Blut	Anzahl (n) der Patienten mit DTZ	Anzahl (n) der Patienten ohne DTZ	Summe (n) der Patienten
Primärscreening	1	10	11
Anreicherung	5	6	11

Tabelle 8



Betrachtet man nun wieder die relative Tumorzellzahl/ $10^6$  untersuchter MNZ, so ergibt sich für das Primärscreening eine detektierte Tumorzellzahl von im Mittel 0,09 (Median 0) TZ (MIN 0, MAX 1, Standardabweichung 0,30). Nach Anreicherung sank die relative

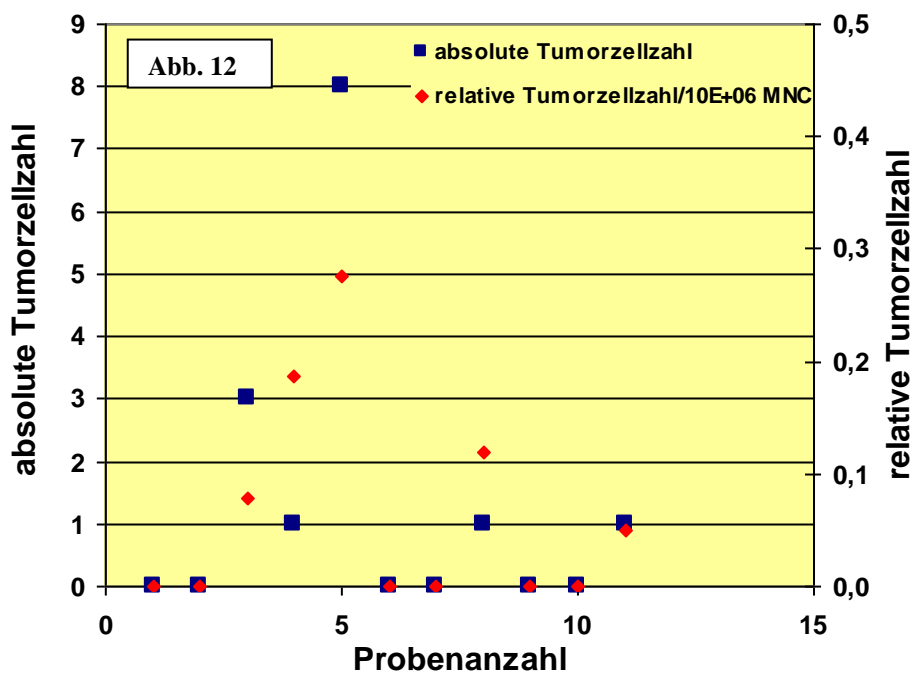


Tumorzellzahl auf im Mittel 0,06 (Median 0) Zellen (MIN 0, MAX 0,28, Standardabweichung 0,09). In Abb. 12 sind absolute und relative Tumorzellzahl nach Anreicherung im direkten Vergleich pro Probe dargestellt.

Tab. 9 zeigt zusätzlich die Tumorzellzahlen ausschließlich bezogen auf die positiven Blutproben.

Tumorzellzahl	Mittelwert	Median	Bereich (MIN-MAX)	Standardabweichung
<b>Alle Proben (n=11)</b>				
<b>Absolut (pro Probe)</b>				
Primärscreening	0,18	0	0-2	0,60
Anreicherung	1,27	0	0-8	2,41
P- Wert	p= .1682 [Anhang 11]			
<b>Relativ (pro 10<sup>6</sup> MNZ)</b>				
Primärscreening	0,09	0	0-1	0,30
Anreicherung	0,06	0	0-0,28	0,09
P- Wert	p= .3454 [Anhang 12]			
<b>Nur positive Proben</b>				
<b>Absolut (pro Probe)</b>				
Primärscreening (positiv: n=1)	2	2	-	-
Anreicherung (positiv: n=5)	2,8	1	1-8	3,03

**Tabelle 9**



Zusammenfassend ergab sich aus den Werten ein mittlerer absoluter Anreicherungsfaktor von 7. Der mittlere relative Anreicherungsfaktor lag bei 0,71.

Im Vergleich Primärscreening und TF- Anreicherung im Blut korrelierte das Ergebnis bei 5 Patienten. Hiervon waren alle 5 Patienten sowohl im Primärscreening als auch nach Anreicherung negativ. 5 Patienten waren zunächst negativ und zeigten dann nach Anreicherung ein positives Ergebnis, wohingegen 1 Patient im Primärscreening positiv war und nach Anreicherung negativ. 5 Patienten waren zunächst negativ und zeigten dann nach Anreicherung ein positives Ergebnis, wohingegen 1 Patient im Primärscreening positiv war und nach Anreicherung negativ. (Tab. 10, Abb. 13)

	Primärscreening	TF- Anreicherung	Anzahl der Patienten
Blutstatus	Negativ	negativ	5
	Negativ	positiv	5
	Positiv	negativ	1
	Positiv	positiv	0

**Tabelle 10**

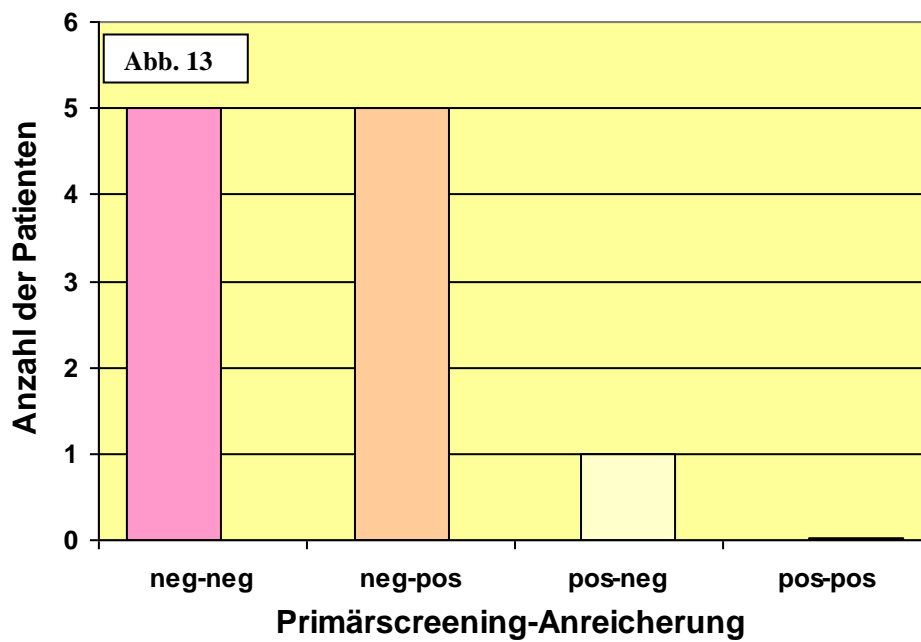
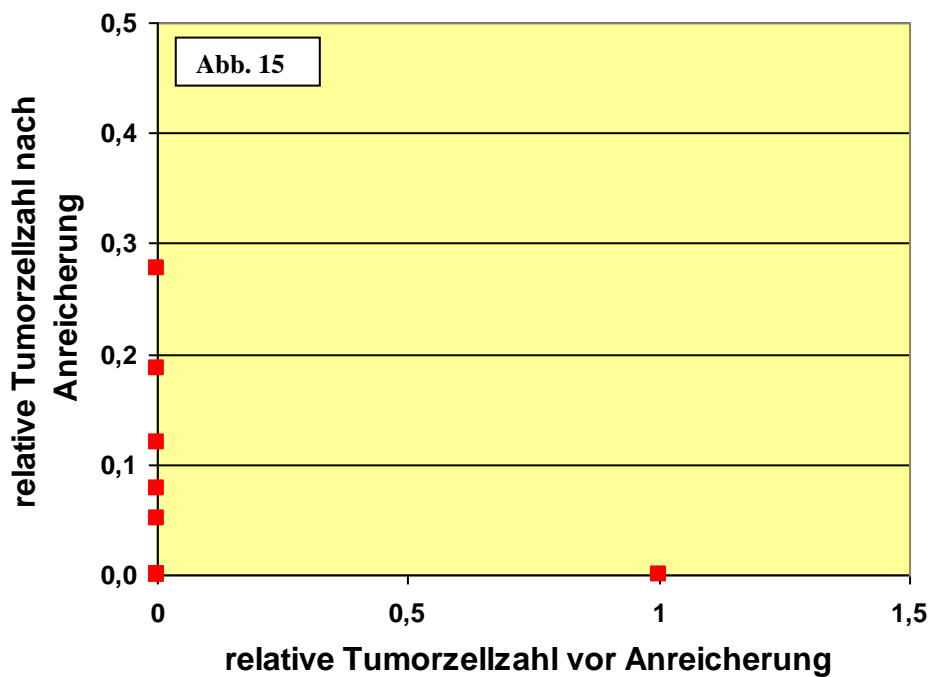
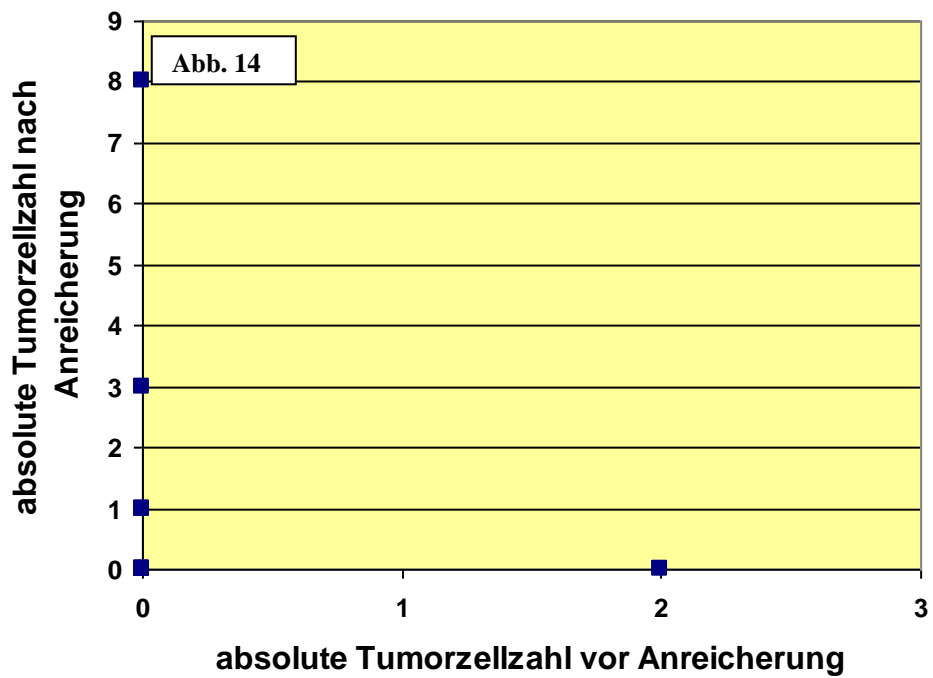


Abb. 14 für die absolute und Abb. 15 für die relative Tumorzellzahl zeigen noch einmal die Proben einzeln aufgeschlüsselt, die im Primärscreening negativ waren und nach Anreicherung positiv wurden, sowie umgekehrt. Darüber hinaus sind die korrelierenden Ergebnisse dargestellt sowie die Tumorzellzahlen der einzelnen Proben im Vergleich vor und nach Anreicherung.



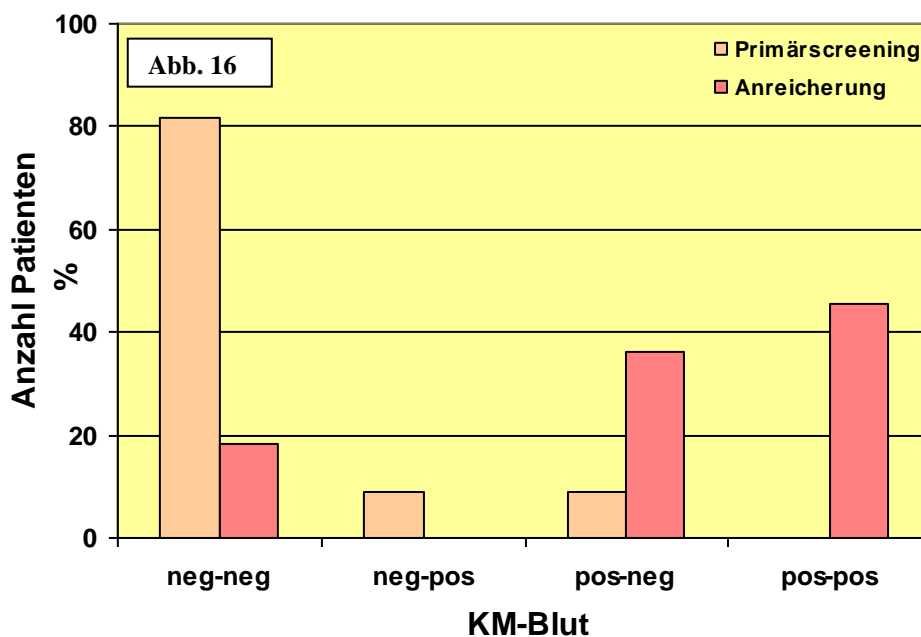
### 5.2.2.3 Knochenmark und Blut

Bei der Untersuchung von 11 KM- und Blutproben jeweils von den selben Patienten ergab sich bei der Gegenüberstellung der Detektionsraten in KM und Blut für Primärscreening und Anreicherung Folgendes:

Im Primärscreening zeigten 9 Patienten weder im KM noch im Blut DTZ. Bei 1 Patienten konnten DTZ nur im KM nachgewiesen werden, bei 1 Patienten nur im peripheren Blut. Sowohl ein positives Ergebnis im KM wie auch im Blut zeigte kein Patient. Nach Anreicherung konnten bei 2 Patienten weder im KM noch im Blut DTZ nachgewiesen werden. Kein Patient war im KM negativ und im Blut positiv. Umgekehrtes hingegen war bei 4 Patienten der Fall. Sowohl im KM als auch im Blut konnten bei 5 Patienten DTZ nachgewiesen werden. (Tab. 11, Abb. 16)

Primärscreening				TF- Anreicherung			
	Knochenmark	Blut	Anzahl der Patienten		Knochenmark	Blut	Anzahl der Patienten
Tumorzellstatus	negativ	negativ	9	Tumorzellstatus	negativ	negativ	2
	negativ	positiv	1		negativ	positiv	0
	positiv	negativ	1		positiv	negativ	4
	positiv	positiv	0		positiv	positiv	5

**Tabelle 11**



## 5.2.3 Korrelation der Ergebnisse der TF- Tumorzellanreicherung im KM mit verschiedenen Parametern

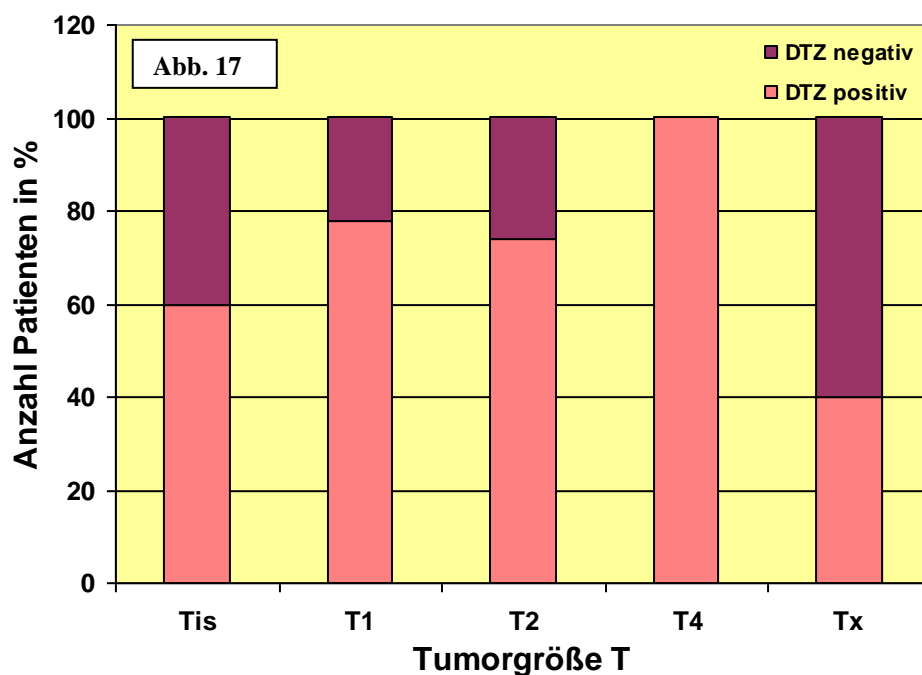
### 5.2.3.1 Nachweis DTZ in Abhängigkeit von der Tumorgröße (T)

60 der 65 Tumorpräparate konnten hinsichtlich Tumorgröße gemäß TNM- Klassifikation genauer eingeteilt werden. Dabei entfielen 8% auf das Tis- Stadium. Die zahlenmäßig stärksten Gruppen waren T1 und T2 mit je 42%. Es befanden sich im Kollektiv keine Patienten im T3-Stadium und nur ein Patient mit Stadium T4 (1,5%).

60% der Patienten im Tis- Stadium zeigten DTZ im KM. Von den Patienten im T1- Stadium konnten bei 78% DTZ nachgewiesen werden. Die Werte waren im T2- Stadium mit 74% positiver Patienten vergleichbar. Im T4 Stadium, das allerdings nur durch einen Patienten vertreten war, stieg die Nachweisrate auf 100%. (Tab. 12, Abb. 17)

Stadium	Anzahl (n) der Patienten mit DTZ	Anzahl (n) der Patienten ohne DTZ	Summe
Tis	3	2	5
T1	21	6	27
T2	20	7	27
T4	1	0	1
Tx	2	3	5

Tabelle 12



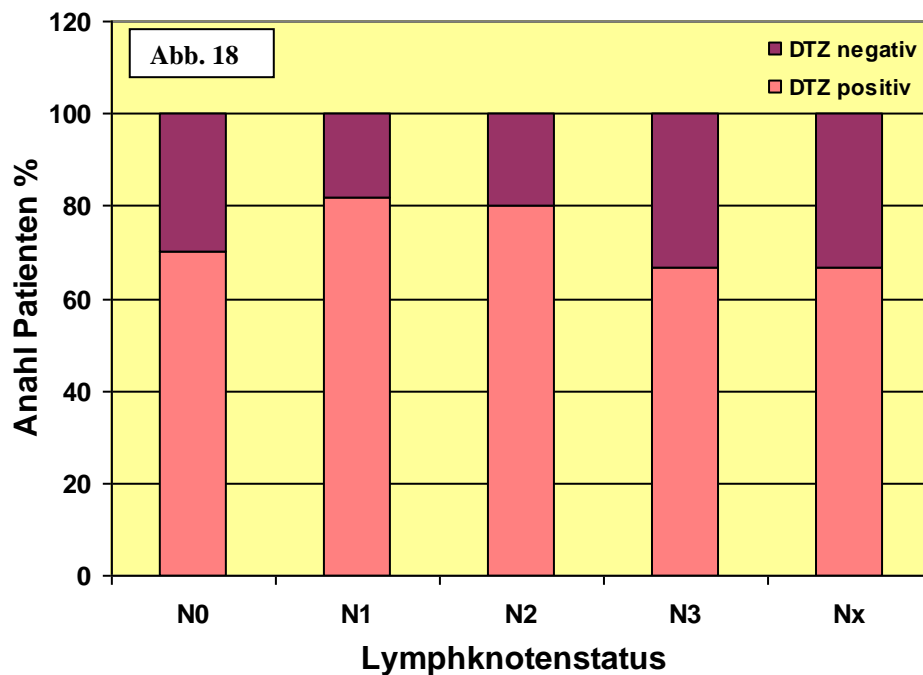
### 5.2.3.2 Nachweis DTZ in Abhängigkeit vom regionären Lymphknotenstatus (N)

Bei der Untersuchung des regionären Lymphknotenstatus konnten 59 der 65 Präparate mit Hilfe der TNM- Klassifikation beurteilt werden. Die zahlenmäßig stärkste Gruppe N0 war mit 62% der Patienten vertreten. Das zweitstärkste Kollektiv waren die N1 Patienten mit 17%. Weitere 8% entfielen auf das Stadium N2 und 5% auf N3.

DTZ im KM wurden bei 70% der N0- Patienten nachgewiesen. Das sind 12% weniger als in der N1- Gruppe, in der die Tumorzellpositivität bei 82% lag. Ein ähnliches Ergebnis zeigten Patienten im N2- Stadium, von denen 80% Tumorzell- positiv waren. Im N3- Stadium waren es 67%. Betrachtet man nun die Ergebnisse bezogen auf das Gesamtkollektiv, so wird deutlich, dass unter Berücksichtigung der Verteilungsverhältnisse ein Anstieg der Detektionsrate DTZ von N0 nach N2 zu verzeichnen ist. Einzig in Gruppe 3, die das kleinste Kollektiv darstellt, ist ein leichter Rückgang zu verzeichnen. (Tab. 13, Abb. 18)

<b>Stadium</b>	<b>Anzahl (n) der Patienten mit DTZ</b>	<b>Anzahl (n) der Patienten ohne DTZ</b>	<b>Summe</b>
N0	28	12	40
N1	9	2	11
N2	4	1	5
N3	2	1	3
Nx	4	2	6

**Tabelle 13**

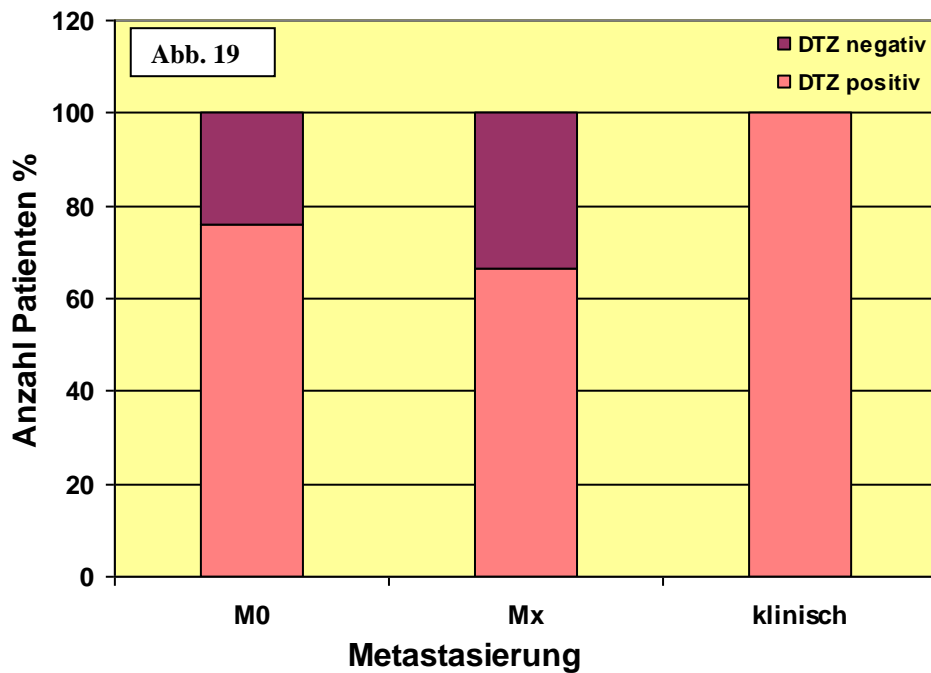


### 5.2.3.3 Nachweis DTZ in Abhängigkeit vom Fernmetastasenstatus (M)

Hinsichtlich Fernmetastasierung waren nur 33 der 65 Patienten nach dem TNM- System gestaged, davon waren alle im M0- Stadium. Bei 2 Patienten (3%) wurden jedoch beim klinischen Metastasenscreening Metastasen nachgewiesen. 46% der Patienten war mit Mx nicht näher beurteilbar. Von den Patienten mit M0- Stadium waren 76% tumorzellpositiv. Die beiden Patienten mit klinisch nachgewiesener Metastasierung waren zu 100% positiv. (Tab. 14, Abb. 19)

Stadium	Anzahl (n) der Patienten mit DTZ	Anzahl (n) der Patienten ohne DTZ	Summe
M0	25	8	33
Mx	20	10	30
Klinisch manifeste Metastasierung	2	0	2

**Tabelle 14**



#### 5.2.3.4 Nachweis DTZ in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad (G)

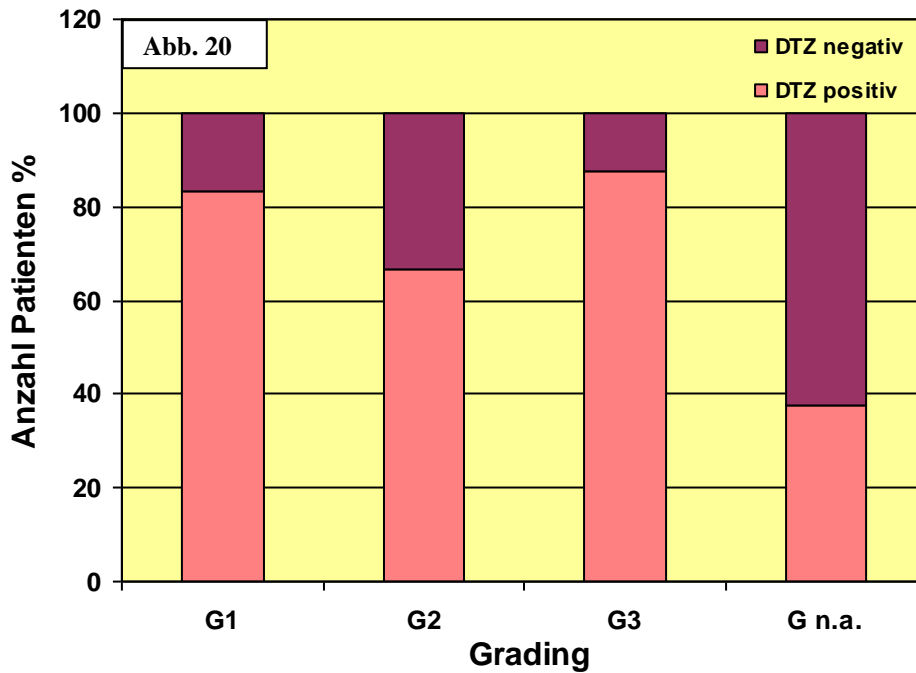
Bei 57 der 65 Patienten wurde im Rahmen der histopathologischen Tumoruntersuchung ein Grading entsprechend Elston und Ellis durchgeführt. Die zahlenmäßig am stärksten vertretenen Gruppen waren G2 mit 42% aller Patienten und danach G3 mit 37%. Den Differenzierungsgrad G1 wies nur ein kleiner Teil von 9% der Patienten auf.

Die Verteilung der Tumorzellpositivität ergab sich wie folgt. In der G1- Gruppe lag sie bei 83%. Von den Patienten mit Differenzierungsgrad G2 ließen sich bei 67% DTZ im KM nachweisen. Von G2 nach G3 stieg die Anzahl der Patienten mit positivem KM-Status um 21% auf 88% an. (Tab. 15, Abb. 20)

Grading	Anzahl (n) der Patienten		Summe
	mit DTZ	ohne DTZ	
G1	5	1	6
G2	18	9	27
G3	21	3	24
G n.a.	3	5	8

**Tabelle 15**





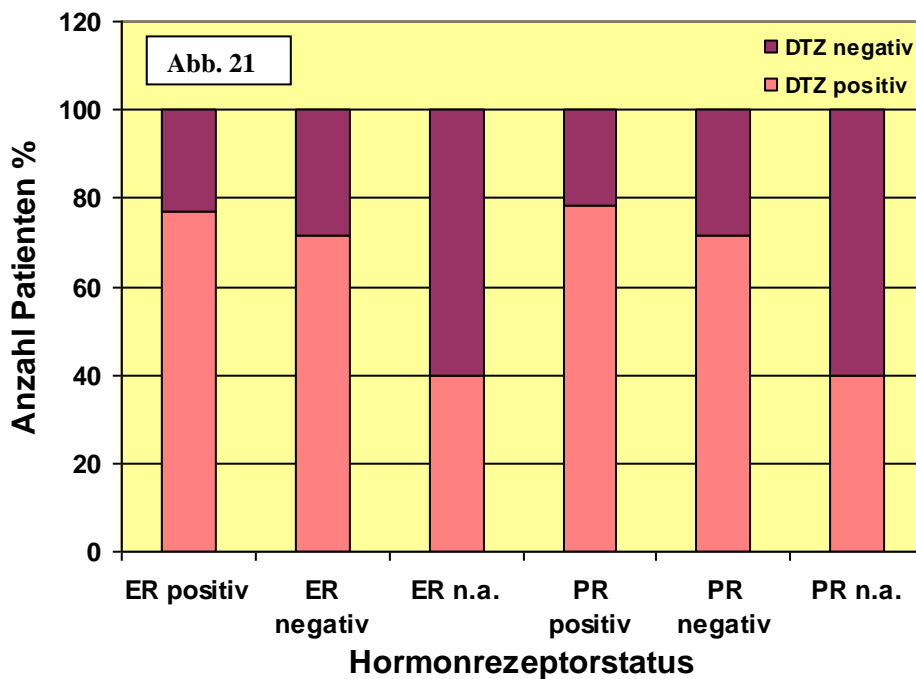
### 5.2.3.5 Nachweis DTZ in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus (ER/PR)

Bei der Untersuchung der Präparate durch den Pathologen wurde bei 60 der 65 Patienten der Estrogen- sowie Progesteronrezeptorstatus bestimmt. Die zahlenmäßig stärkste Gruppe waren die Estrogenrezeptor positiven (ER+) Patienten mit 60% aller Patienten gefolgt von Progesteronrezeptor positiven (PR+) Patienten mit 49%. Progesteronrezeptor negativ (PR-) waren 43%, Estrogenrezeptor negativ (ER-) 32%. Von den ER+ Patienten waren 77% der Patienten auch tumorzellpositiv. Beim Progesteronrezeptor waren es entsprechend 78%. Bei den ER- sowie PR- Patienten hingegen hatten jeweils 71% DTZ im KM.

Vergleicht man nun ER positive Patienten mit ER Negativen, so ließen sich tendenziell bei Patienten mit ER positiven Tumoren häufiger DTZ nachweisen als bei solchen mit ER negativen Tumoren. Gleiches gilt für den Vergleich von Patienten mit positivem PR und solchen mit negativem PR. (Tab. 16, Abb. 21+22)

Hormonrezeptorstatus	Anzahl (n) der Patienten mit DTZ	Anzahl (n) der Patienten ohne DTZ	Summe
ER positiv (ER+)	30	9	39
ER negativ (ER-)	15	6	21
ER nicht angegeben	2	3	5
PR positiv (PR+)	25	7	32
PR negativ (PR-)	20	8	28
PR nicht angegeben	2	3	5

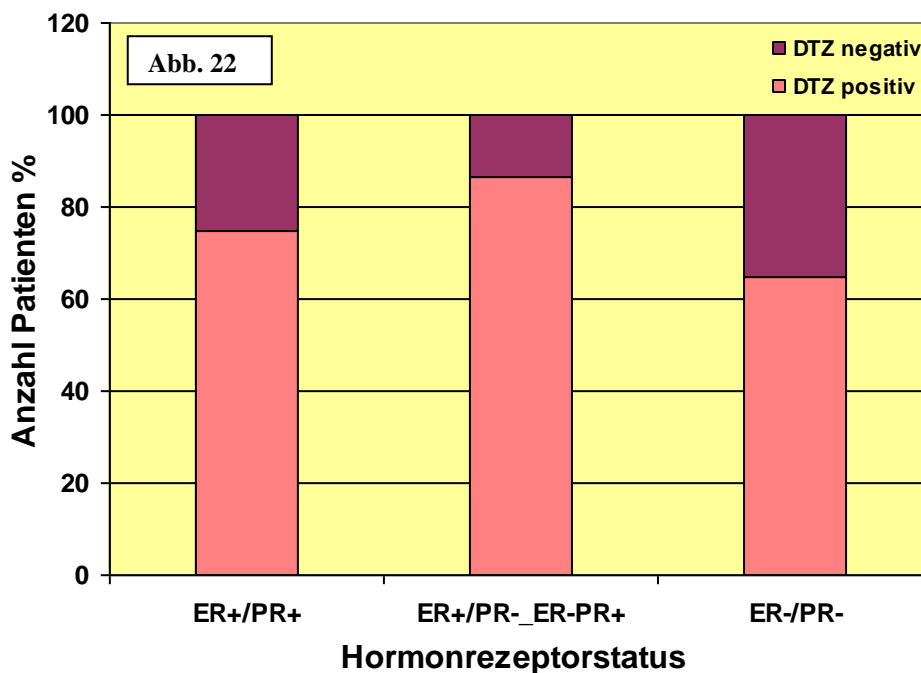
Tabelle 16



Fasst man nun ER+ und PR+ Patienten zu einer Gruppe zusammen und vergleicht sie mit der Gruppe ER+\_PR-/ER-\_PR+ sowie der Gruppe ER- und PR-, so zeigt sich folgendes Ergebnis: 43% der Patienten waren sowohl ER+ als auch PR+, 26% dagegen waren für beide Rezeptoren negativ. Von den 43% konnten bei 75% DTZ nachgewiesen werden bzw. bei 65% der Hormonrezeptor Negativen.

Auf die Patientengruppe, die nur für einen Rezeptor positiv war, entfielen insgesamt 23%. Von denen waren 87% tumorzellpositiv. Zusammenfassend ließ sich ein Anstieg der Detektionsrate bei Patienten mit positivem Hormonrezeptorstatus im Vergleich zu solchen mit negativem Hormonrezeptorstatus nachweisen. Im Vergleich jedoch waren die

Detektionsraten der Gruppe von Patienten, die nur für einen Rezeptor positiv waren, am höchsten.



### 5.2.3.6 Nachweis DTZ in Abhängigkeit vom Her-2/neu- Status (Her-2/neu)

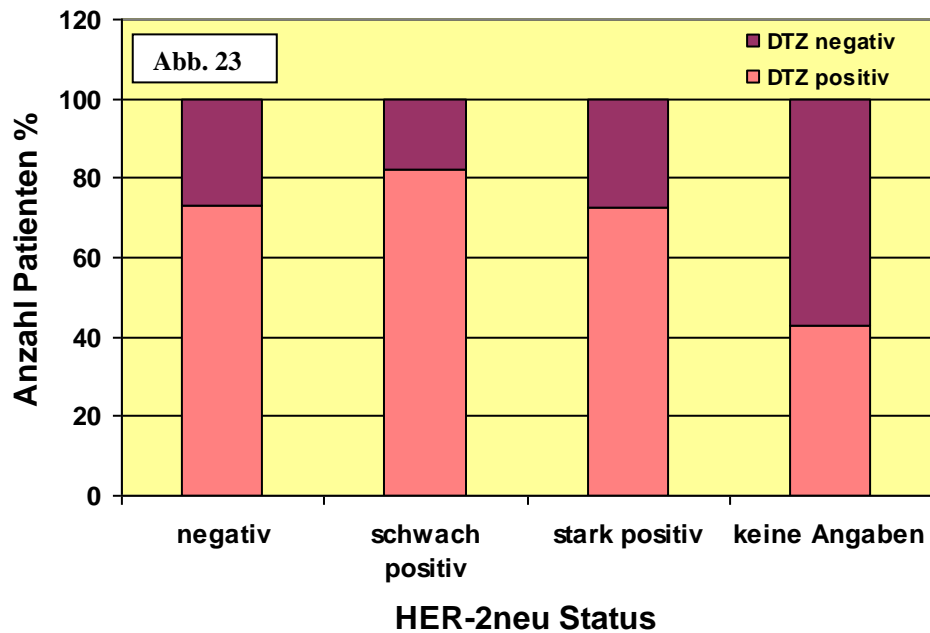
Bei 58 von 65 Patienten wurden die Tumorpräparate außerdem auf eine Her-2/neu-Überexpression untersucht. Ein positiver Her-2/neu- Status fand sich bei insgesamt 43% der Patienten, davon waren 61% schwach, 39% stark positiv. 46% der untersuchten Patienten waren Her-2/neu negativ.

Vergleicht man nun zunächst Her-2/neu positive gegen negative Befunde ohne Berücksichtigung der Expressionsstärke, so findet man bei 73% der HER-2/neu negativen Patienten DTZ im Knochenmark, während bei den Her-2/neu Positiven 79% tumorzellpositiv sind. Vergleicht man nun auch die Untergruppen miteinander, so lässt sich feststellen, dass sich am häufigsten DTZ bei Patienten mit schwacher Überexpression des Her-2/neu -Rezeptors nachweisen lassen, nämlich bei 82% der Untersuchten. Dagegen waren 73% sowohl der Her-2/neu negativen als auch stark positiven Patienten tumorzellpositiv. Zusammenfassend ließen sich DTZ etwas häufiger bei Her-2/neu positiven Patienten nachweisen als bei solchen mit negativem Status.

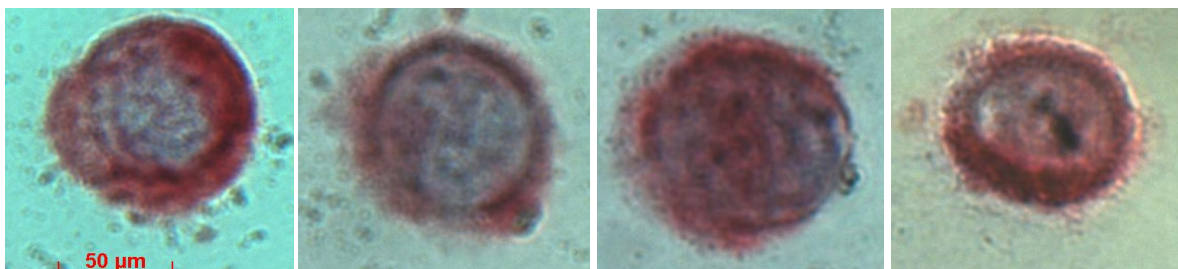
(Tab. 17, Abb. 23)

Her-2/neu- Status	Anzahl (n) der Patienten mit DTZ	Anzahl (n) der Patienten ohne DTZ	Summe
Negativ	22	8	30
Schwach positiv	14	3	17
Stark positiv	8	3	11
Nicht angegeben	3	4	7

**Tabelle 17**



#### 5.2.4 Beispiele isolierter Tumorzellen aus Patientenproben



**Abb. 24: Aufnahmen unter Photomikroskop Axiophot (ZEISS) mit 100x Vergrößerung**

## 5.3 Negativkontrollen

### 5.3.1 Anreicherung

Bei den Negativkontrollen handelt es sich um 3 Patientinnen, bei denen mit der Verdachtsdiagnose Mammakarzinom eine Stanzbiopsie (1 Patient) bzw. BET (2 Patienten) durchgeführt wurde. Die histologische Untersuchung der Proben durch den Pathologen ergab in allen 3 Fällen eine fibrös- zystische Masthopathie ohne Anhalt für eine maligne Entartung des Gewebes.

Parameter		Patientenanzahl
Probenanzahl		3
Patientenanzahl		3
Mittleres Alter (Intervall)		47 (40-52)
Menopausenstatus	Postmenopausal	0
	Prämenopausal	3
Histologie	fibrös-zystische Masthopathie	3
Therapiestadium zum Zeitpunkt der KMP	Keine Therapie	1
	Brusterhaltende operative Therapie	2

**Tabelle 18**

Im konventionellen Primärscreening zeigte kein Patient DTZ im Knochenmark bei  $2 \cdot 10^6$  untersuchten mononukleären Zellen. Nach Anreicherung konnten im Median  $2,67 \cdot 10^7$  (im Mittel  $2,39 \cdot 10^7$ ) Zellen ( $1,64 \cdot 10^7 - 2,86 \cdot 10^7$ ) gescreent werden. Auch hierbei wurden bei keinem der Patienten DTZ im Knochenmark nachgewiesen.

### 5.3.2 Primärscreening

Bei der Immunzytologie mit der APAAP- Methode zur Detektion DTZ im KM wurden pro Patient 2 der 18 Objektträger mit Knochenmarkproben als Negativkontrolle mitgefärbt. Die Färbung wurde mit Hilfe des MOPC- 21 AK durchgeführt. Bei keinem der MOPC- 21 Präparate konnten Zytokeratin- positive Zellen nachgewiesen werden.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Zusammenfassung**

Das Mammakarzinom, der häufigste maligne Tumor der Frau, ist verbunden mit einer frühzeitigen Streuung von Tumorzellen in den Organismus. Dies stellt einen wesentlichen krankheitslimitierenden Faktor dar. Obwohl es zum Zeitpunkt der Primärdiagnose häufig noch keinen Anhalt für eine Tumorzellstreuung gibt, entwickelt ca. ein Drittel der Patienten ein Lokalrezidiv oder Fernmetastasen, z.T. auch noch lange nach Therapie des Primärtumors. Deshalb wurden in den vergangenen Jahren große Anstrengungen unternommen, geeignete Methoden zum frühzeitigen Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen, die zu soliden Metastasen auswachsen können, zu entwickeln. Den Goldstandard im Nachweis DTZ im KM stellt nach wie vor die Immunzytologie mit monoklonalen Antikörpern gegen Zytokeratine dar. Da hierbei jedoch in der Regel nur  $2 \cdot 10^6$  MNZ auf Tumorzellen gescreent werden und weiterhin die Ausbeute zur weiteren Untersuchung dieser Zellen gering ist, wird nach neuen Methoden geforscht. Einer dieser neueren Ansätze, mit dem sich auch diese Studie befasst, ist die Tumorzellanreicherung mittels magnetisch markierter Antikörper. In dieser Arbeit wurde erstmals ein Antikörper gegen das Thomsen- Friedenreich- Antigen zur Anreicherung disseminierter Tumorzellen bzw. minimaler Tumorresiduen im Knochenmark und peripheren Blut von Patientinnen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom eingesetzt. Zuvor wurde im Rahmen eines Vorversuchs eine Anreicherung DTZ mit dem kommerziell erhältlichen „*HEA Tumor Cell Detection and Enrichment Kit*“ der Firma Milteny Biotech durchgeführt. Sowohl das Knochenmark als auch das Blut jedes Patienten wurde darüber hinaus im Rahmen des Routinescreening mittels ICC auf DTZ untersucht. Insgesamt wurden in der Studie 99 Patientinnen im Alter von 27- 85 Jahren auf DTZ gescreent.

### **6.2 Diskussion der Methoden**

#### **6.2.1 Allgemeine Methodendiskussion**

Die ICC stellt die Standardmethode zur Detektion disseminierter epithelialer Zellen dar. Sie hat eine nachgewiesene Sensitivität von bis zu einer Tumorzelle pro  $10^6$  MNZ. Um die Sensitivität weiter zu erhöhen wurden neue Methoden zum Nachweis DTZ entwickelt, darunter auch RT- PCR Protokolle. Während damit die Sensitivität deutlich erhöht werden konnte, bleibt die Spezifität weiterhin fraglich. Limitierend für diese

Methode scheint insbesondere eine so genannte illegitime Genexpression zu sein. Ein weiterer Nachteil dieser molekularen Tumorzell-detektion ist, dass eine weitere Charakterisierung der gefundenen Zellen nicht mehr möglich ist.

Ein anderer Ansatz, die Sensitivität der ICC zu erhöhen, ist die Anreicherung größerer Mengen MNZ mit magnetisch markierten AK vor der Detektion mittels immunzytochemischer Färbung. Doch obwohl in den letzten Jahren neue Anreicherungstechniken entwickelt wurden, die entweder auf einer positiven oder negativen Selektion beruhen, ist es durch die nachgewiesene phänotypische Heterogenität der isolierten Tumorzellen schwierig, einen geeigneten Marker zu finden, der auf weiten Teilen dieser Zellen exprimiert wird [27, 106, 107]. Ein großer Vorteil dieser Studie, die mit AK gegen Oberflächenmarker wie HEA und TF zur Tumorzellanreicherung arbeitet, gegenüber dem System, das Strukturproteine wie CK verwendet, ist, dass die Zellmembran vor der Detektion der Zellen nicht permeabilisiert werden muss. Dies ermöglicht eine weitere Charakterisierung und Kultivierung der Zellen, um ihre Lebensfähigkeit sowie ihr metastatisches Potenzial genauer zu untersuchen.

## **6.2.2 Diskussion der Methoden der HEA- Anreicherung im KM**

34 Knochenmarkaspirate von 34 Patientinnen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom wurden mit einem Antikörper gegen das Human Epithelial Antigen (HEA, Milteny) mittels Immunomagnetabsorption angereichert.

Mit dieser Anreicherungsmethode konnten im Vergleich zur Standard- ICC deutlich mehr MNZ auf DTZ gescreent werden. Während mit der ICC stets nur ein kleiner Anteil der gewonnenen Probe untersucht werden kann, konnte mit dieser Methode das gesamte Probenvolumen gescreent werden. Damit wurde die Gefahr eines falsch negativen Ergebnisses reduziert. Außerdem handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen KIT mit standardisiertem Protokoll, was eine hohe Reproduzierbarkeit der Methodik garantiert. Ein limitierender Faktor dieser sowie auch vieler anderer Anreicherungsmethoden stellt die heterogene Expression einiger Antigene auf isolierten Tumorzellen dar. Auch für HEA gibt es Untersuchungen, die eine variable, inkonstante Expression bestätigen [60, 108].

Außerdem sollte diskutiert werden, inwieweit mit dieser Anreicherungsmethode Tumorzellen verloren gehen können, abgesehen von den Zellen, die auf Grund mangelnder Antigen- Expression nicht detektiert werden können. Hierzu seien drei wesentliche Punkte genannt:

- Zur Isolierung der MNZ Fraktion wurden die KM- Proben mit Hilfe der Ficoll- Dichtezellzentrifugation aufgearbeitet. Durch die Abtrennung der Erythrozyten und Granulozyten von den MNZ können auch Tumorzellen verloren gehen.
- Darüber hinaus besteht auf Grund zusätzlicher Bearbeitungs- und Zentrifugationsschritte der Knochenmarksproben bei der Methode der Anreicherung im Vergleich zur ICC eine weitere Gefahr des Tumorzellverlustes.
- Auch das Alter der Proben kann den Verlust von Tumorzellen begünstigen. So war es auf Grund längerer Transportwege bei Patientinnen aus dem Klinikum Bayreuth nicht immer möglich die Proben innerhalb von 24 Stunden weiter zu verarbeiten. Da die Anreicherung mit einer höheren mechanischen Belastung der Zellen verbunden ist, besteht durchaus die Möglichkeit, dass in älteren Proben einige Tumorzellen bereits tot waren und durch die Anreicherung zerstört wurden. Inwieweit sich das Alter der Proben allerdings tatsächlich auf die Detektionsraten auswirkt, konnte gegenwärtig noch nicht evaluiert werden. Dennoch sind die Empfehlungen dahingehend, dass die Proben schnellstmöglich nach ihrer Gewinnung weiterverarbeitet werden sollten.

In der Mehrzahl der bisherigen Studien zur Tumorzellanreicherung wurde, wie in unserer Studie auch, eine Kombination aus Dichtegradient- Zentrifugation und anschließender Immunomagnetischer Separation durchgeführt [109]. Es gibt jedoch erste Studien zur HEA- Tumorzellanreicherung [65, 76, 81], die die magnetischen Beads direkt auf die nativen KM- bzw. Blutproben geben, ohne vorher die MNC- Fraktion zu isolieren. Dies würde helfen den Tumorzellverlust im Aufbereitungsschritt zu eliminieren.



### 6.2.3 Diskussion der Methoden der TF- Anreicherung im KM und PB

In dieser Arbeit wurde erstmals ein Antikörper gegen das Thomsen- Friedenreich- Antigen auf dem Gebiet der Tumorzellanreicherung eingesetzt.

Die Anreicherung erfolgte mit einem Primär- Antikörper, gerichtet gegen das Thomsen- Friedenreich- Antigen (TF, Nemod) und anschließender Inkubation mit einem magnetisch markierten Sekundär- Antikörper. Mit der TF- Anreicherungsmethode in Kombination mit herkömmlicher Immunzytochemie wurden weitere 65 KM- sowie 11 Blutproben von 65 Patientinnen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom auf DTZ gescreent.

Auch mit dieser Methode konnte im Vergleich zur Standard- ICC die gesamte Probe und damit eine deutlich größere Anzahl MNZ auf isolierte Tumorzellen untersucht werden. Die Gefahr eines falsch negativen Ergebnisses wurde somit verringert.

Die Problematik der heterogenen Expression vieler Antigene auf DTZ wurde bereits bei HEA angesprochen. Schindlbeck et al. konnten bei der Untersuchung der Expressionsrate von TF an DTZ eine Expression auf 98% der untersuchten Tumorzellen nachweisen [97]. Da dies die erste Studie dieser Art war, konnte keine Vergleichsliteratur herangezogen werden. Auf Grund der erzielten Ergebnisse, die eine nahezu vollständige TF- Expression auf DTZ im KM zeigten, schien TF als Antigen für eine Tumorzellanreicherung sehr gut geeignet. Deshalb wurde im Unterschied zu allen bisherigen Untersuchungen auf dem Gebiet der Tumorzellanreicherung in dieser Arbeit erstmals ein AK gegen TF eingesetzt. Unseres Wissens nach ist dies bisher die erste Studie zur Tumorzellanreicherung mit einem AK gegen dieses Ag.

Die bei HEA in Bezug auf den Tumorzellverlust bereits erwähnten Punkte gelten in gleichem Maße auch für die TF- Anreicherungsmethode. Um jedoch einen Tumorzellverlust bei der Anreicherung möglichst gering zu halten, wurde nur ein Durchlauf der Zellsuspension durch die MACS Säulen zur Auftrennung der Zellfraktionen durchgeführt, auch wenn dadurch einige normale Knochenmarkszellen in der Tumorzellfraktion zu finden waren (Abb. 25). Diese konnten jedoch durch die immunzytochemische Färbung und anschließende Detektion mittels APAAP- Methode und Kernfärbung als CK- (negative) Knochenmarkszellen von den CK+ (positiven) Tumorzellen eindeutig abgegrenzt werden. In einer methodisch vergleichbaren Studie von Weihrauch et al., die



Abb. 25

allerdings mit einem AK gegen Zytokeratine arbeiteten, wurden ähnliche Überlegungen angestellt [65].

Auch wenn CK+ (positive) Tumorzellen mit dieser Färbemethode eindeutig identifizierbar waren, fanden sich auf einigen Zytospins Artefakte, die sich am ehesten auf Zellfragmente zurückführen ließen. Es besteht die Vermutung, dass es sich hierbei um tote Zellen in der MNZ- Fraktion handelte, die bei der Anreicherung unspezifisch gebunden sowie angefärbt wurden. Da tote Zellen wesentlich weniger resistent gegen äußere Einflüsse sind, wurden sie vermutlich bei der Anreicherung zerstört, was das Auftreten von Zelltrümmern erklären würde.

Ein allgemeiner Nachteil dieser wie auch vieler anderer Anreicherungsverfahren besteht in der unzureichenden Standardisierung und methodischen Validierung. Um dieses Problem zu lösen, wird ein internationaler Konsens dringend benötigt. Dieser sollte Richtlinien bezüglich Vorgaben zu Qualitätskontrollen, Kriterien zur technischen Untersuchungsdurchführung sowie zu Raten falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse für klinisch anwendbare Untersuchungen enthalten, um einen Vergleich zwischen verschiedenen Methoden überhaupt erst zu ermöglichen [107].

Prinzipiell ist sowohl in Knochenmark- als auch in Blutproben das Screening auf DTZ möglich. Dennoch ist die Blutabnahme für den Patienten wesentlich weniger belastend als eine Knochenmarkaspiration. Des Weiteren würde sich das periphere Blut für die Etablierung einer neuen Methode besser eignen, da es zum einen im Vergleich zu KM leichter und in größeren Mengen zu gewinnen ist, zum anderen ist auch eine wiederholte Abnahme bei ein und demselben Patienten weniger problematisch. Dieser Faktor der Quantität spielt insbesondere bei Versuchsreihen eine wesentliche Rolle. Ein weiterer Vorteil wäre die einfachere Rekrutierung von freiwilligen gesunden Spendern als Negativkontrollen. Der Nachteil bei der Untersuchung des peripheren Blutes im Rahmen der Entwicklung einer neuen Anreicherungsverfahren ist jedoch die sehr geringe Konzentration von Tumorzellen in diesem Medium. Somit ist die Aussage, ob keine Tumorzellen in der Probe vorhanden waren oder sie mit der angewandten Methode nicht nachgewiesen werden konnten, im Vergleich zu KM- Proben noch zusätzlich erschwert. Daher erfolgten in dieser Studie die Versuche zunächst nur mit Knochenmark. Die TF-Anreicherung im peripheren Blut wurde erst nach Fertigstellung eines geeigneten Protokolls durchgeführt. Dennoch ist es ein anzustrebendes Ziel, das Tumorzellscreening künftig im Blut durchzuführen. Wiederholte Untersuchungen wären weniger belastend

für den Patienten, ganz abgesehen von geringeren Risiken und Kosten. Sie sind jedoch klinisch umso wichtiger im Hinblick auf die schlechte Prognose bei persistierendem positiven Knochenmarkstatus sowie für das Therapiemonitoring. Die Blutuntersuchung auf DTZ ist jedoch nur mit einer effizienten Anreicherungs-methode sinnvoll, da auf Grund der noch geringeren Frequenz disseminierter TZ im Blut als im Knochenmark die Zahl falsch negativer Ergebnisse ansonsten zu hoch ausfallen würde. Es gibt bereits einige Studien sowohl zur Positiv- [66, 68, 70, 80, 110] als auch zur Negativanreicherung [69, 78, 80], die den Tumorzellnachweis im PB erfolgreich durchführten. Auch die Untersuchung des Blutstatus von 11 Patientinnen mittels der TF- Anreicherung brachte erste Ergebnisse, die diese Methode als mögliche Untersuchungsmethode bestätigten.

Gegenwärtige Probleme des Tumorzellscreenings sind der technische Verlust von Tumorzellen, die Tumorzellquantität sowie bei manueller Identifikation der Zellen die Subjektivität des Untersuchers. Erste Ansätze den Tumorzellverlust zu reduzieren wurden bereits diskutiert. Die Tumorzellquantität soll an anderer Stelle noch genauer beleuchtet werden. Um das Verfahren von der Subjektivität des Untersuchers unabhängig zu machen, könnte als nächster Schritt die Anwendung automatisierter Systeme für die Anreicherung sowie mikroskopische Screeninguntersuchung erfolgen. Dies würde helfen, den Screeningprozess weiter zu beschleunigen, da in der Regel eine größere Probenanzahl parallel untersucht werden kann, und die Reproduzierbarkeit zu erhöhen.

## **6.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **6.3.1 Diskussion der Ergebnisse der HEA- Anreicherung im KM**

Im Rahmen der HEA- Tumorzellenanreicherung konnte die Anzahl an MNZ, die auf DTZ gescreent wurden, von im Median  $2 \cdot 10^6$  Zellen im Primärscreening auf im Median etwa  $2 \cdot 10^7$  (Mittelwert  $4 \cdot 10^7$ ) Zellen nach Anreicherung erhöht werden. Dies ist besonders wichtig, wenn man bedenkt mit welcher Frequenz DTZ im KM vorkommen ( $1-10 \text{ TZ}/10^6 \text{ MNZ}$ ). Dennoch ließen sich nach Anreicherung in keiner der untersuchten Patientenproben isolierte Tumorzellen nachweisen. Das war insbesondere deshalb sehr verwunderlich, da im konventionellen Primärscreening 8 der 34 Patientinnen (23,5%) DTZ mit im Mittel 0,7 (Median 0; 0-6) Tumorzellen/ $2 \cdot 10^6 \text{ MNZ}$  aufwiesen. Als mögliche Ursache wurde eine bereits angesprochene heterogene HEA-Antigenexpression in Betracht gezogen. Deshalb wurde eine Doppelfärbung der im Primärscreening positiven Patientinnen gegen Keratin (A45/B/B3) und HEA (Anti- Ep-CAM) mittels Immunofluoreszenz durchgeführt. Dabei war im KM aller untersuchten Patientinnen (100%) eine Koexpression von HEA und CK nachzuweisen. Weiterhin wiesen alle (100%) in den Knochenmärkern detektierten DTZ diese Koexpression auf. Mononukleäre Knochenmarkszellen, die keine CK- Expression zeigten, waren auch negativ für HEA. Damit konnte eine heterogene HEA- Expression auf den DTZ nicht als Ursache für die unbefriedigenden Ergebnisse bestätigt werden. Auch eine mehrfache Modifikation der Methodik in den verschiedenen Bearbeitungsschritten brachte keine Verbesserung der Ergebnisse. Einzig nach Spiking- Experimenten des KM von Mammakarzinompatientinnen mit der Tumorzelllinie MCF<sub>7</sub> war eine Tumorzellenanreicherung möglich. Die Verwendung von Tumorzelllinien wurde jedoch bereits von mehreren Arbeitsgruppen diskutiert, da die Antigenexpression in vielen Fällen stärker und homogener ist im Vergleich zu den Tumorzellen im KM der Patienten. Daher ist fraglich, wie gut eine homogene Tumorzelllinie die Heterogenität der Tumorzellen im KM der Patienten reflektiert [44, 63].

Die meisten Studien zur Tumorzellenanreicherung mit HEA wurden, wie sich zeigt, im PB durchgeführt [68, 72, 75]. Abschließend stellt sich somit die Frage, ob eine Anwendung der eingesetzten Methode im PB möglicherweise bessere Ergebnisse liefern würde.

### 6.3.2 Diskussion der Ergebnisse der TF- Anreicherung im KM

Mit der TF- Anreicherungsmethode war im Knochenmark eine Untersuchung von im Median  $2 \cdot 10^7$  MNZ (Mittelwert  $3 \cdot 10^7$ ) möglich. Die maximale untersuchte Zellzahl lag bei  $2 \cdot 10^8$  MNZ. Im Primärscreening hingegen wurden im Vergleich dazu nur  $2 \cdot 10^6$  MNZ gescreent. Damit konnte die Sensitivität mit der TF- Tumorzellanreicherung gegenüber dem Routinescreening deutlich erhöht werden. Es wurde eine Positivitätsrate von 72% nach Anreicherung im Vergleich zu 23% nach Standard- ICC erreicht. Dies entspricht einem Anstieg um rund 50%. Ebenso konnte die Tumorzellausbeute pro Probe deutlich verbessert werden. So lag die absolute Tumorzellzahl vor der Anreicherung bei im Median 0 TZ (Mittelwert 0,7; Bereich 0-10 TZ). Nach Anreicherung stiegen die Werte auf im Median 2 TZ (Mittelwert 8; Bereich 0-105 TZ). Dies ist insbesondere für die weitere molekulare Charakterisierung dieser DTZ entscheidend, die nach wie vor durch die begrenzte zur Verfügung stehende Anzahl an Zellen limitiert wird.

Betrachtet man nun die relativen Tumorzellzahlen bezogen auf  $1 \cdot 10^6$  untersuchte MNZ, so lässt sich ein deutlicher Rückgang der Tumorzellausbeute nach Anreicherung auf im Median 0,13 TZ (Mittelwert 0,4; Bereich 0-7,7 TZ) feststellen. Dennoch liegen diese Werte noch leicht über den relativen Werten vor Anreicherung, wo im Median 0 Zellen (Mittelwert 0,37; Bereich 0-5 TZ) gefunden wurden. Hierin liegt ein entscheidender Unterschied zu anderen Studien, die dieselbe Methodik mit anderen AK einsetzten, bei denen häufig ein Absinken der relativen Tumorzellzahl nach Anreicherung unter die Werte vor der Anreicherung festgestellt wurde [74, 110]. Aber auch aus dem in dieser Studie verzeichneten Rückgang muss eine unvollständige Tumorzelldetektion als mögliche Ursache und wichtiger Verbesserungsansatz in Erwägung gezogen werden.

Weiterhin auffällig war die Tatsache, dass die Detektionsraten von DTZ nach Anreicherung am besten waren in den Proben, die im Primärscreening eine geringe Tumorzellzahl aufwiesen oder negativ waren. Diese Beobachtung wurde zuvor bereits von Krüger et al. in einer Studie zur Tumorzellanreicherung mit HEA beschrieben [74].

Zusammenfassend lag der mittlere absolute Anreicherungsfaktor mit der TF- Anreicherungsmethode bei 10,9; der mittlere relative Faktor hatte den Wert 1,1. Es konnte folglich in jedem Fall mit der TF- Anreicherungsmethode eine Verbesserung der Detektionsraten sowie der Tumorzellausbeute gegenüber dem Primärscreening erzielt werden.

Der Knochenmarkstatus von Mammakarzinompatientinnen wurde bereits in vielen Studien mit unterschiedlichen Techniken untersucht. Doch auf Grund großer

Unterschiede selbst innerhalb eines bestimmten Verfahrens, wie beispielsweise der immunomagnetischen Anreicherung mit unterschiedlichen Beadtypen (Milteny, Dynal), verschiedenen Selektionsvorgängen (positiv, negativ) sowie verschiedenen Markern (Tab. 1 im Hintergrund), machen einen Vergleich der einzelnen Studien sehr schwierig. Dennoch seien die Ergebnisse einiger Studien zusammenfassend genannt. Dabei lagen die Detektionsraten der Anreicherungsstudien zwischen 16% und 88% [10, 65, 71, 74, 76, 78-80, 85, 110]. In den Studien von Weihrauch et al. und Kruger et al., die in 80% bzw. 88% der Proben DTZ nachweisen konnten, war das Patientenkollektiv mit 20 bzw. 25 Patienten allerdings ziemlich klein [65, 74].

Leider standen nur 3 KM- Proben von gesunden Spendern zur Verfügung, um die Spezifität unserer Methode zu prüfen. Dabei handelte es sich um Patientinnen, bei denen sich der Verdacht auf ein Mammakarzinom histologisch nicht bestätigte. Die Untersuchung dieser Proben verlief in allen Fällen negativ aus.

Um das Problem falsch positiver Ergebnisse weiter zu minimieren, wurde, wie in der Methodik beschrieben, in Kombination mit der TF- Anreicherungs- methode eine anschließende immunzytochemische Detektion mit Anti- CK- AK, die ja als Goldstandard im Nachweis isolierter TZ gilt, durchgeführt. Die Spezifität des eingesetzten Antikörpers A45/B-B3 wurde in früheren Studien an großen Kollektiven von Nicht- Tumor- Kontrollpatienten getestet [27]. Da die Rate falsch positiver Färbungen mit dem verwendeten Ak nur bei ca. 1% liegt, sollte das Problem falsch positiver Zellen in dieser Studie sehr gering sein.

Betrachtet man die beschriebenen Ergebnisse nun genauer und vergleicht sie mit denen des etablierten Primärscreenings, so korrelieren sie in 25 Fällen. Dagegen waren 36 Patienten im Primärscreening zunächst negativ und zeigten nach Anreicherung ein positives Ergebnis. 4 Patienten waren im Primärscreening positiv und nach Anreicherung negativ.

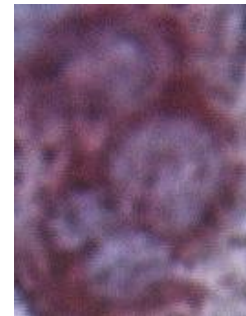
Für letzteres Ergebnis seien verschiedene Erklärungsansätze diskutiert:

- Zum Teil könnten die Ergebnisse dadurch erklärbar sein, dass bei 3 dieser 4 Patientinnen nach Abnahme der  $18 \cdot 10^6$  MNZ für das Primärscreening nur noch eine sehr geringe Restzellzahl im Vergleich zu den übrigen Proben zur Anreicherung zur Verfügung stand. Weiterhin lag die Detektionsrate im Primärscreening in 3 Fällen bei nur 1 Zelle. Bei einer weiteren Patientin wurden 3 Zellen gefunden. Zusammengefasst könnten diese Fakten ein Anhalt

dafür sein, dass tatsächlich keine weiteren Tumorzellen in den untersuchten Proben vorhanden waren.

- Weiterhin könnte, wie bereits bei der Methodendiskussion angesprochen, das Alter der Proben eine Rolle gespielt haben. Da die Anreicherung mit einer höheren mechanischen Belastung der Zellen verbunden ist als die Standard-ICC, besteht durchaus die Möglichkeit, dass bei älteren Proben, falls denn tatsächlich Tumorzellen vorhanden gewesen wären, diese bereits tot waren und durch die Anreicherung zerstört wurden. Sie konnten folglich nicht mehr als Tumorzellen nachgewiesen werden.
- Ein letzter Ansatz wäre schließlich die mögliche Tatsache, dass nicht alle Tumorzellen TF gleichmäßig exprimieren. In wieweit eine heterogene Expression tatsächlich in Frage kommt, kann aber auf Grund der Tatsache, dass es bis zum jetzigen Zeitpunkt nur eine Studie zu diesem Thema gibt, nicht geklärt werden.

Eine weitere auffällige Beobachtung bei den Ergebnissen war das häufigere Vorkommen von CK+ Zellclustern (Abb. 26), d.h. Ansammlungen von mehreren Tumorzellen bei der immunomagnetischen TF- Anreicherungsverfahren im Vergleich zu den Proben aus dem Primärscreening, bei denen nur Einzelzellen beobachtet wurden. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Cluster von den immunomagnetischen Beads verursacht wurden.



**Abb. 26**

Ähnliche Beobachtungen wurden auch von U. Woelfle et al. beschrieben [76].

### **6.3.3 Korrelation der Detektionsraten der TF- Anreicherung im KM mit klinischen Parametern**

Das Ziel hierbei war es, herauszufinden, ob das Vorhandensein DTZ im KM mit den etablierten Risikofaktoren korrelierte. Es wurde jedoch eine rein deskriptive Aufarbeitung der Ergebnisse durchgeführt, da aufgrund des nicht eindeutig nachgewiesenen Zusammenhangs zwischen den jeweiligen Variablen in Bezug auf Stärke und Zuverlässigkeit in Kombination mit der begrenzten Fallzahl sowie der sehr unterschiedlich großen Kollektive in den jeweiligen Untergruppen eine weitergehende statistische Auswertung nicht möglich war.

Vergleicht man nun die Detektionsraten mit Parametern wie Tumorgröße, regionärem Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung (TNM), Differenzierungsgrad (Grading) und Hormonrezeptorstatus, so ergibt sich nachfolgendes Bild:

#### **6.3.3.1 Tumorgröße**

Es konnte zwar eine Tendenz zu steigenden Detektionsraten mit zunehmender Tumorgröße festgestellt werden, jedoch konnte im Gegensatz zu anderen Studien [10, 16, 22, 27, 29, 34, 39, 41, 79] keine eindeutige Korrelation zwischen Tumorgröße T und Anzahl der Patienten mit positivem KM- Status nachgewiesen werden. Allerdings gibt es auch einige andere Arbeiten, die ebenfalls keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen den beiden Variablen nachweisen konnten [33, 53, 54, 111, 112].

An dieser Stelle sei jedoch das Ergebnis der 5 Patienten mit Tis- Stadium, von denen 3 DTZ im KM hatten, einmal genauer beleuchtet. Dieses Tumorstadium hat in den vergangenen 20 Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Das DCIS macht auf Grund verstärkter Screeninguntersuchungen heutzutage 20% aller neu diagnostizierten Brusttumoren aus. Normalerweise müsste man annehmen, dass bei einem Carcinoma in situ keine Tumorzellstreuung stattfinden kann, da es sich ja eigentlich um eine präinvasive Form handelt, bei der die Basalmembran noch intakt ist und das angrenzende Stroma nicht infiltriert wird. D.h. der Nachweis von DTZ beim DCIS ist mit dem pathobiologischen Verhalten dieses Tumors nur schwer in Einklang zu bringen [113]. Dennoch gibt es Publikationen, die das Ergebnis dieser Studie stützen, auch wenn diese sich hauptsächlich auf den Nachweis DTZ in den axillären Lymphknoten beziehen [114, 115]. Als mögliche Ursache wird zum einen eine geringe invasive Komponente diskutiert, die dem Nachweis durch den Pathologen entgehen konnte, zum anderen der histologisch minimale Verlust der begrenzenden Basalmembran [114, 116]. Außerdem



erhöht die Störung der Anatomie, mit der eine partielle oder komplette chirurgische Tumorexzision verbunden ist, ohnehin das Risiko der Tumorzellverschleppung, unabhängig davon, ob es sich um ein CIS oder eine invasive Läsion handelt [117].

### **6.3.3.2 Lymphknoten- und Fernmetastasen**

Bei Patienten mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen konnten häufiger DTZ im KM nachgewiesen werden als bei Patienten ohne regionären Lymphknotenbefall oder Fernmetastasierung. Dieser Zusammenhang wird von Autoren anderer Studien bestätigt [10, 16, 22, 29, 33, 34, 39, 41, 54, 78, 79].

Während in Bezug auf den Metastasierungsstatus in vielen Studien eine Korrelation mit dem Nachweis DTZ festgestellt wurde, ist die Studienlage beim Lymphknotenstatus jedoch eher umstritten. So muss das Vorhandensein von LK- (Mikro)Metastasen nicht notwendigerweise mit dem von DTZ im KM korrelieren [31, 53, 107, 111, 112]. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass es sich bei lymphogener und hämatogener Metastasierung um 2 unabhängige Wege handelt, die von verschiedenen Genen determiniert werden [107, 118]. Andere Arbeitsgruppen wiederum konnten in ihren Studien, wie bereits erwähnt, einen eindeutigen Zusammenhang zwischen DTZ und regionärem Lymphknotenbefall nachweisen.

Weiterhin stellten Braun et al. fest, dass zwar die Inzidenz von KM Mikrometastasen bei Patienten mit und ohne LK Metastasen gleich war, dass aber die Anzahl befallener Lymphknoten signifikant mit einem positiven KM- Status assoziiert war [27].

Darüber hinaus konnten Taubert et al. erstmals eine signifikante Korrelation zwischen CK+ DTZ und Lymphknoten- bzw. Fernmetastasenstatus auch im peripheren Blut nachweisen [69]. Sie fanden bei 25% der N0 Patienten und 30% der M0 Patienten DTZ im Blut, wohingegen bei 54% der N1 Patienten und 75% der M1 Patienten Tumorzellen nachgewiesen werden konnten.

### **6.3.3.3 Differenzierungsgrad**

In der hier durchgeführten Studie stieg die Anzahl an Patienten mit positivem KM- Status von 70% bei Patienten mit Tumoren des Differenzierungsgrades 1 und 2 auf 88% bei solchen mit undifferenzierten G3 Tumoren an. Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Korrelation von Grading und positivem Knochenmarksbefund sind kontrovers. Einige konnten einen eindeutigen Zusammenhang zwischen beiden Parametern feststellen [16, 22, 27, 29], andere wiederum nicht [53, 54, 79, 111, 112].

#### **6.3.3.4 Hormonrezeptorstatus**

Vergleicht man nun ER+/PR+ Patienten mit ER-/PR- Negativen, so ließ sich tendenziell ein Anstieg der Detektionsrate bei Patienten mit positivem Hormonrezeptorstatus im Vergleich zu solchen mit negativem Hormonrezeptorstatus nachweisen. Wie auch in den meisten anderen Studien, die den Hormonrezeptorstatus im Vergleich zu den Knochenmarksbefunden untersuchten, zeigte sich aber auch in dieser Arbeit keine eindeutige Korrelation zwischen den beiden Variablen [22, 27, 53, 54, 112].

In anderen Arbeitsgruppen wiederum konnte jedoch eine Assoziation zwischen beiden Parametern hergestellt werden. So war bei Wiedswang et al. die Detektion DTZ im KM assoziiert mit einer ER/PR Negativität [10]. Einige Arbeitsgruppen fanden Korrelationen in Bezug auf nur einen Rezeptor; so z.B. Mansi et al., die eine inverse Korrelation zwischen Knochenmark- und Estrogenrezeptorstatus feststellten [39]. Andere wiederum fanden eine Assoziation zum Progesteronrezeptor, nicht jedoch zu Estrogenrezeptoren [16]. Naume et al. schließlich konnten keine Korrelation zwischen der Detektion DTZ im Knochenmark und dem ER- Status alleine oder dem PR- Status alleine feststellen. Die Assoziation zwischen der Kombination aus ER- und PR- Expression und dem Vorhandensein von Tumorzellen im KM ergab jedoch eine grenzwertige Signifikanz. Darüber hinaus zeigten innerhalb der N0- Gruppe Patienten mit ER-/PR- Negativität eine signifikant höhere Frequenz an DTZ- positiven KM im Vergleich zu Patienten mit N0 ER- Positivität und/oder PR- Positivität [79].

Zusammenfassend konnte mit der TF- Anreicherungsverfahren sowohl die Detektionsrate von DTZ im KM als auch die Tumorzellausbeute deutlich verbessert werden. Ob eine vermehrte Anreicherung CK+ Zellen auch eine verbesserte prognostische Information liefert, müsste im Rahmen einer follow- up Studie noch genauer untersucht werden. Naume et al. jedenfalls konnten zeigen, dass eine höhere Anzahl von DTZ im KM mit einer schlechteren Prognose korreliert [119]. In jedem Fall jedoch ist die durchgeführte Methode eine nützliche Hilfe im Hinblick auf die weitere geno- sowie phänotypische Untersuchung der detektierten Zellen [86, 120].

### 6.3.4 Diskussion der Ergebnisse der TF- Anreicherung im PB

Bei der Untersuchung des peripheren Blutes zeigte im konventionellen Primärscreening 1 von 11 Patienten (**9,1%**) DTZ mit 2 Zellen/ $2 \cdot 10^6$  MNZ. Nach Anreicherung konnte die untersuchte Zellzahl auf im Median  $1,2 \cdot 10^7$  MNZ (Mittelwert  $1,6 \cdot 10^7$ ) erhöht werden. Die Positivitätsrate stieg dadurch deutlich auf **45,5%** mit im Mittel 1,3 Zellen (Median 0; Bereich 0-8). Damit konnte eine erhöhte Sensitivität dieser Methodik gegenüber der Routinediagnostik eindeutig belegt werden.

Im Unterschied zur Tumorzellanreicherung im KM sanken die relativen Tumorzellzahlen nach TF Anreicherung im Blut (Mittelwert 0,06; Median 0; Bereich 0-0,3) jedoch unter die Werte vor Anreicherung (Mittel 0,09; Median 0; TZ 0-1). Dies ist ein Hinweis auf eine unvollständige Tumorzelldetektion, eine Problematik, die bereits in anderen Studien berichtet wurde [74, 110].

Die erzielte Detektionsrate ordnet sich in die Ergebnisse anderer Studien zur immunomagnetischen Tumorzellanreicherung im peripheren Blut ein, die in einem Bereich zwischen 26% und 62% liegen [66, 68-70, 110, 121]. Kim et al. fanden nach Anreicherung zirkulierende TZ bei 27,6% der Patienten, allerdings nur in metastasierten Fällen [122]. Weiterhin führten Krag et al. eine Studie zur Tumorzellanreicherung bei Mammakarzinompatientinnen im prä- und postoperativen Vergleich durch. Präoperativ wurden bei 95% der 19 untersuchten Patienten DTZ im peripheren Blut detektiert, postoperativ war dies nur noch bei 30% der Fall [123]. Racila et al. fanden bei 97% der Brustkrebspatienten (29/30) DTZ im PB. Allerdings relativiert sich diese sehr hohe Detektionsrate, wenn man berücksichtigt, dass 54% der Blutproben von gesunden Spendern ebenfalls positiv waren [124].

Zusammenfassend konnten sowohl die Detektionsrate als auch die absolute Tumorzellausbeute mit dieser Methode deutlich gesteigert werden.

Im Vergleich Blut mit Knochenmark waren die Detektionsraten und Tumorzellzahlen wie erwartet im peripheren Blut deutlich geringer als im Knochenmark.

Leider gibt es bisher nur sehr wenige Studien, welche die Detektionsraten in Blut und KM anhand des selben Patientenkollektivs untersucht haben [110, 125]. Bei beiden hier genannten Arbeiten waren die Nachweisraten von DTZ im KM mit 77% (17/22) und 52% (33/63) ebenfalls höher als im peripheren Blut mit 20% (5/25) und 34% (20/59). Gleiches verglich die Arbeitsgruppe Müller et al. anhand von 53 M0- Patientinnen. Dabei

konnten bei 3 von 9 Patienten mit positivem Knochenmarkstatus auch DTZ im peripheren Blut nachgewiesen werden. 2 von 44 Probanden zeigten bei negativem KM-Status tumorzellpositive Blutproben. Weiterhin wurde eine signifikant höhere Rate an DTZ im Blut der Patienten mit positivem Knochenmark im Vergleich zu solchen mit negativem Knochenmarkbefund gefunden [126].

Prinzipiell wäre das PB, wie bereits besprochen, wegen seiner einfachen Gewinnung ein ideales Medium zur Detektion DTZ. Es ist jedoch nur ein vorübergehender Aufenthaltsort dieser Zellen und es ist bisher unbekannt, ob ein signifikanter Anteil an Tumorzellen überlebt und zu soliden Metastasen auswachsen kann oder in seinem neuen Mikroenvironment zu Grunde geht. So gibt es z.B. eine Studie an Brustkrebspatienten, die zeigen konnte, dass ein großer Teil der zirkulierenden Tumorzellen apoptotisch und daher nicht in der Lage ist, sich in sekundären Organen abzusiedeln [127]. Dennoch gibt es Arbeiten von Smith et al. und Terstappen et al., die bei Brustkrebspatienten das Vorhandensein von DTZ im peripheren Blut mit dem Krankheitsstadium sowie dem Verlauf der Erkrankung korrelieren konnten [128, 129].

Insgesamt ist jedoch die prognostische Signifikanz von DTZ im peripheren Blut noch weit weniger klar als im Knochenmark [107].

Die prognostische Relevanz von DTZ im Blut ist daher Gegenstand laufender Studien, wie der von der Frauenklinik Innenstadt der LMU initiierten SUCCESS- Studie [130, 131]. Die Ergebnisse des Follow-up hierbei dürfen mit Spannung erwartet werden.

### 6.3.5 Klinische Relevanz und Ausblick

Der Nachweis DTZ im KM zum Zeitpunkt der Primäroperation stellt einen unabhängigen Prognosefaktor für das rezidivfreie wie für das Gesamtüberleben von Mammakarzinompatienten dar [40].

Durch die Untersuchung größerer Zellzahlen im KM und im peripheren Blut konnten mit Hilfe der TF- Anreicherungsverfahren sowohl die Sensitivität als auch die Tumorzellausbeute deutlich erhöht werden. Damit könnten Patienten mit hohem Rezidivrisiko nach vollständiger operativer Entfernung des Primärtumors sicherer identifiziert werden. Sie stellt somit eine viel versprechende Methode zur Differenzierung einer high- risk und low- risk Risikogruppe dar. Denn in den meisten Studien korrelierte das Vorhandensein von DTZ mit einem schlechteren Outcome im Vergleich zu Patienten, bei denen keine DTZ nachgewiesen werden konnten. Dies ist besonders wichtig für Patienten mit negativem Lymphknoten- Status, die nach herkömmlichen Therapieschemata keine Chemotherapie erhalten würden, aber dennoch ein höheres Rezidiv- und Metastasenrisiko besitzen als Frauen ohne Nachweis DTZ. Außerdem könnte der Knochenmark- und insbesondere der Blutstatus im Verlauf auch als Monitoring bezüglich der Wirksamkeit der Therapieverfahren angewendet werden [132]. Im Gegensatz zu Lymphknoten, die bei der Primäroperation entfernt werden, können nämlich Blut sowie KM postoperativ im Verlauf wiederholt abgenommen und auf DTZ untersucht werden. Die Detektion DTZ hat daher nicht nur Einfluss zum Zeitpunkt der Primärdiagnose, sondern auch, wenn diese Zellen persistieren, im Verlauf der follow- up Untersuchungen oder nach abgeschlossener adjuvanter Chemotherapie. Sie stellen somit bisher den einzigen verfügbaren Prognosefaktor für eine follow- up Risikoeinschätzung dar [133].

Der Faktor der erhöhten Tumorzellausbeute spielt insbesondere bei der Entwicklung von Therapiealternativen für Patienten, die auf herkömmliche Therapien nicht ansprechen, eine große Rolle. Da es sich bei den meisten DTZ um nicht proliferierende so genannte dormant cells handelt, lässt sich ihre Anzahl durch eine Chemotherapie kaum reduzieren [126, 134, 135]. Aber gerade Patientinnen mit persistierenden DTZ im KM nach Beendigung der Chemotherapie haben eine signifikant schlechtere Prognose bezüglich dem Gesamt- und rezidivfreien Überleben [52, 54, 55, 119, 136, 137]. Die Identifikation dieser Patientinnen ist daher von großer klinischer Relevanz, da sie von einer zusätzlichen „second- line“ Therapie profitieren würden [132].

Eine Antikörpertherapie stellt hier eine viel versprechende therapeutische Alternative dar [57, 58, 60, 138]. Diese hat den Vorteil, dass ihre Wirkung unabhängig von einer Tumorzellproliferation sowie einer Resistenz gegen Chemotherapeutika ist [59].

Die Wahl des Zielantigens spielt dabei eine zentrale Rolle und entscheidet wesentlich über den Erfolg einer Therapie. So sollte das Antigen möglichst spezifisch mit der Zielzelle reagieren und keine signifikanten Kreuzreaktionen mit dem gesunden Gewebe aufweisen. Darüber hinaus sollte es optimalerweise auf allen Tumorzellen exprimiert werden, um eine effektive Ziel gerichtete Therapie zu ermöglichen und die Proliferation einer Subpopulation von Antigen- negativen Zellen zu verhindern [139].

Die weitere Charakterisierung der Zellen sowie die Analyse therapierrelevanter Antigene als Angriffspunkte für eine Immuntherapie sind in diesem Zusammenhang von großem Interesse [140]. Damit rückt eine Individualisierung der Therapie zunehmend in den Bereich des Möglichen.

Von großer Bedeutung ist hierbei beispielsweise der humane epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor HER- 2, dessen Überexpression auf DTZ mit einem schlechteren klinischen Outcome verbunden ist [141]. Es gibt Hinweise, dass eine Diskrepanz besteht zwischen dem HER- 2 Status im Primärtumor und der HER- 2 Expression auf DTZ im Knochenmark [48, 141, 142] und im peripheren Blut [143, 144]. So konnten bei Patienten mit HER- 2 negativem Primärtumor dennoch HER- 2 positive DTZ nachgewiesen werden. Durch ein individuelles Screening auf DTZ und deren weitere Charakterisierung könnten genau diese Patienten identifiziert werden, die trotz HER- 2 negativem Primärtumor dennoch von einer Therapie mit Trastuzumab [145, 146], einem monoklonalen anti- HER- 2 Antikörper, profitieren würden [142].

Auch mit dem therapeutischen Einsatz des monoklonalen Antikörpers Edrecolomab [147] (monoklonaler 17-1A Antikörper), gerichtet gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM, konnten erste Erfolge erzielt werden. So konnte unter der Therapie mit Edrecolomab eine deutliche Reduktion der Anzahl an DTZ im Knochenmark erreicht werden, in einigen Fällen sogar bis hin zur völligen Elimination dieser Zellen [56, 148, 149].

Dennoch stellt weiterhin die Heterogenität der Antigenexpression auf DTZ einen wichtigen limitierenden Faktor der Effektivität beim Einsatz monoklonaler Antikörper in der Therapie der minimalen Residualkrankheit dar. Daher müssen verschiedene Marker auf den DTZ untersucht und Angriffsmöglichkeiten gegen diese erforscht werden, um

weitere Ziel gerichtete Therapien etablieren zu können und somit die Effektivität einer Antikörpertherapie zu steigern [60].

Entscheidende Voraussetzung für ein effektives Monitoring von DTZ ist allerdings die Optimierung und Standardisierung des Nachweisverfahrens. Die Ansätze zur Erhöhung der Sensitivität sowie der Tumorzellausbeute wurden eingehend besprochen. Konsensusempfehlungen zu methodischen Aspekten und zur klinischen Relevanz des Nachweises von DTZ im KM von Patientinnen mit primären Mammakarzinom wurden bereits festgelegt [150]. Weiterhin wurden Systeme zur automatisierten Anreicherung und Färbung der Zellen entwickelt und in großen Studien getestet [151, 152].

Zusammenfassend könnte der Nachweis von DTZ, neben der Bedeutung als unabhängiger Prognosefaktor zum Zeitpunkt der Primäroperation, ein postoperatives Verlaufsmonitoring ermöglichen und somit wesentliche Informationen für ein individuelles klinisches Management der einzelnen Brustkrebspatientin liefern.

## 7 Zusammenfassung

Hintergrund: Der immunzytochemische Nachweis disseminierter Tumorzellen (DTZ) im Knochenmark (KM) von Mammakarzinompatientinnen ist ein unabhängiger Prognosefaktor in allen Stadien der Erkrankung. Die Detektion dieser Zellen, die durch konventionelle histopathologische Untersuchungen und selbst durch hochauflösende bildgebende Verfahren nicht nachgewiesen werden können, ist somit ein wesentlicher Faktor, um Patientinnen mit einem hohen Rezidivrisiko frühzeitig identifizieren zu können und so eine bessere Prognoseabschätzung zu ermöglichen sowie eine individuelle Therapieplanung zu gewährleisten. Außerdem könnten der Knochenmark- und insbesondere der Blutstatus auch als Monitoring bezüglich der Wirksamkeit von Therapieverfahren angewendet werden. Für ein Verlaufsmonitoring wäre die Untersuchung von DTZ im peripheren Blut wünschenswert. Neben dem frühzeitigen Nachweis von DTZ sind jedoch auch die weitere Charakterisierung der Zellen sowie die Analyse therapierelevanter Antigene als Angriffspunkte für eine Immuntherapie von großem Interesse. Limitierend für eine weitere tumorbiologische Untersuchung ist derzeit die geringe Zahl der detektierten Zellen. Gegenstand dieser Arbeit ist der Vergleich verschiedener Methoden zur Anreicherung von isolierten Tumorzellen aus Knochenmark und peripherem Blut. Hierbei wurde erstmals ein Antikörper gegen das Thomsen-Friedenreich- Antigen (TF) verwendet, nachdem zuvor eine Koexpression von TF auf 98% aller Zytokeratin- positiven Tumorzellen nachgewiesen werden konnte.

Methodik: KM- Aspirate von 99 Patienten mit histologisch gesichertem Mammakarzinom wurden über einen Zeitraum von einem Jahr untersucht. Von 11 Patienten wurde parallel KM und Blut untersucht. Es erfolgte zunächst eine Aufarbeitung der Proben mittels Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation der mononukleären Zellfraktion. Bei hohem Erythrozytenanteil wurde zusätzlich eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Das Primärscreening erfolgte mittels Immunzytologie mit einem monoklonalen Antikörper gegen Zytokeratine und anschließender APAAP- Färbung (Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische Phosphatase). Mit den verbleibenden Zellen wurde eine Anreicherung von DTZ mittels Immunomagnetabsorption durchgeführt. Dabei erfolgte die Anreicherung zunächst mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Human Epithelial Antigen (HEA) mit dem „*Tumor Cell Enrichment and Detection Kit*“ (Milteny Biotech). In einem weiteren Versuch wurde erstmals ein Primärantikörper gegen das Thomsen- Friedenreich- Antigen auf dem Gebiet der Tumorzellanreicherung



eingesetzt. Anschließend wurde mit einem magnetisch markierten Sekundärantikörper inkubiert. Zur Selektion und Anreicherung der Tumorzellen aus der Zellsuspension erfolgte ein Durchlauf im Magnetfeld sowie die anschließende Resuspension der zurückgehaltenen Zellen. Nach Herstellung von Zytospins wurde eine immunzytochemische Färbung und die Detektion der Tumorzellen mittels APAAP-Methode sowie eine Kernfärbung auf dem Objektträger durchgeführt. Abschließend erfolgte die Beurteilung der Zytokeratin-positiven Tumorzellen unter dem Mikroskop.

Ergebnisse: Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigte die Anreicherung mittels TF-Antikörper bessere Ergebnisse. Im konventionellen Primärscreening zeigten 15 / 65 (**23,1%**) Patienten DTZ im Knochenmark. Nach Anreicherung stieg die Anzahl auf 47 / 65 Patienten (**72,3%**) an ( $p < .0001$ ). Die detektierte Tumorzellzahl lag vor der Anreicherung bei im Median 2 Tumorzellen /  $2 \cdot 10^6$  mononukleäre Zellen (1-10). Nach Anreicherung konnten im Median  $2,2 \cdot 10^7$  mononukleäre Zellen (MIN  $8,4 \cdot 10^5$ , MAX  $2,2 \cdot 10^8$ ) auf DTZ gescreent werden. Die Anzahl von DTZ im KM stieg auf im Median 4 Tumorzellen (1-105) an. Damit lag der mittlere absolute Anreicherungsfaktor bei 11.

Beim Vergleich der Ergebnisse des Primärscreenings und der TF-Anreicherung im KM korrelierte das Ergebnis bei 25 Patienten. Hiervon waren 14 Patienten negativ, bei 11 Patienten konnten mit beiden Verfahren DTZ im Knochenmark nachgewiesen werden.

36 Patienten waren im Primärscreening zunächst negativ und zeigten dann nach der Anreicherung ein positives Ergebnis. 4 Patienten hingegen waren im Primärscreening positiv und wurden nach Anreicherung negativ.

Im konventionellen Primärscreening des peripheren Blutes zeigte nur 1 von 11 Patienten (**9,1%**) DTZ mit 2 Tumorzellen /  $2 \cdot 10^6$  mononukleäre Zellen. Nach Anreicherung konnten im Median  $1,2 \cdot 10^7$  mononukleäre Zellen (MIN  $2,6 \cdot 10^6$ , MAX  $3,9 \cdot 10^7$ ) untersucht werden. Es ließen sich bei 5 / 11 Patienten (**45,5%**) 1-8 DTZ im Blut detektieren. Der mittlere absolute Anreicherungsfaktor lag somit bei 7. Im Vergleich zu den Anreicherungsergebnissen im Knochenmark waren die Detektionsraten und Tumorzellzahlen wie erwartet im peripheren Blut deutlich geringer. 4 Patienten zeigten DTZ im KM bei negativen Blutbefunden. Zusätzlich erfolgten deskriptive Auswertungen, bei denen die Ergebnisse der TF-Tumorzellanreicherung im Knochenmark mit Parametern wie Tumorgröße, regionärem Lymphknotenstatus, Vorhandensein von Fernmetastasen, Differenzierungsgrad sowie Hormonrezeptorstatus korreliert wurden. Dabei konnten keine signifikanten Zusammenhänge festgestellt werden.

Diskussion: Bisher gehört der Nachweis von DTZ im KM in der klinischen Praxis nicht zur Routinediagnostik im Rahmen des Tumorstaging beim Mammakarzinom. Dennoch spielt die Detektion von DTZ sowohl zur Risikostratifizierung als auch im Bereich des therapeutischen Monitoring eine zunehmend größere Rolle. So kann ein Nachweis DTZ im Blut oder Knochenmark aktuelle Informationen über die Tumorlast und Tumorbiologie liefern sowie eine Aussage über die Effektivität einer Therapie ermöglichen. In follow-up Untersuchungen kann der Nachweis DTZ darüber hinaus frühzeitige Hinweise auf eine Metastasierung geben.

Mittels Immunomagnetabsorption mit einem Antikörper gegen das Thomsen-Friedenreich-Antigen lässt sich das zu untersuchende Probenvolumen und die Zahl der detektierten Tumorzellen erhöhen. Dies ist die Voraussetzung für ein Monitoring von DTZ im peripheren Blut und spielt weiterhin für die Erforschung neuer tumorassoziierter Antigene als Angriffspunkte für eine Immuntherapie eine große Rolle. Die prognostische Relevanz von DTZ im peripheren Blut ist jedoch noch weit weniger klar als im Knochenmark. Ob der Nachweis DTZ im Blut ein Knochenmarkscreening zukünftig ersetzen kann, ist Gegenstand laufender Studien. Durch die weitere Untersuchung der Antigenprofile auf den DTZ sowie die Erforschung von Angriffsmöglichkeiten gegen diese Oberflächenmarker könnten zukünftig weitere Fortschritte auf dem Gebiet der Antikörpertherapie sowie beim Einsatz von Biologicals erzielt werden. Entscheidende Voraussetzung für ein effektives Monitoring ist allerdings die weitere Optimierung und Standardisierung des Nachweisverfahrens. Die Anwendung automatisierter Systeme für die Anreicherung sowie mikroskopische Screeninguntersuchung ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

## **8 Publikationen**

Schindlbeck C, Stellwagen J, Jeschke U, Karsten U, Rack B, Janni W, Jückstock J, Tulusan A, Sommer H, Friese K.

Immunomagnetic enrichment of disseminated tumor cells in bone marrow and blood of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich-Antigen.

Clin Exp Metastasis. 2008;25(3):233-40.

## 9 Anhang

### 9.1 Histologische Klassifikation der Mammakarzinome

Modifizierte histologische WHO- Klassifikation nach *Rosen* und *Oberman*

Nicht- invasives Karzinom	Duktales Carcinoma in situ (DCIS) - mit Paget- Erkrankung der Brustwarze
	Lobuläres Carcinoma in situ (LCIS)
Invasives Karzinom	Invasives duktales Karzinom - mit Paget- Erkrankung der Brustwarze
	Invasives duktales Karzinom mit prädominierender intraduktaler Komponente
	Invasives lobuläres Karzinom
	Muzinöses Karzinom
	Medulläres Karzinom
	Invasives papilläres Karzinom
	Tubuläres Karzinom
	Adenoid- zystisches Karzinom
	Sekretorisches (juveniles) Karzinom
	Apokrines Karzinom
	Karzinom mit Metaplasie
	Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen
	Zystisch- hypersekretorisches Karzinom mit Invasion
	Karzinom mit endokriner Differenzierung
	Glykogenreiches Karzinom
	Lipidreiches (lipidbildendes) Karzinom
Invasives kribriiformes Karzinom	

## 9.2 Klinische TNM- Klassifikation Mammatumoren (TNM) Pathologische TNM- Klassifikation (pTNM)

Gemäß aktueller TNM- Klassifikation, 6.Auflage, 2003

<b>T-Primärtumor</b>	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Duktales Carcinoma in situ
Tis (LCIS)	Lobuläres Carcinoma in situ
Tis (Paget)	M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
T1	≤ 2 cm
T1 mic	≤ 0,1 cm
T1a	> 0,1-0,5 cm
T1b	> 0,5-1 cm
T1c	>1-2 cm
T2	>2-5 cm
T3	> 5 cm
T4	Brustwand/Haut
T4a	Brustwand
T4b	Hautödem/Ulzeration, Satellitenknötchen der Haut
T4c	4a und 4b
T4d	Entzündliches Karzinom

**Die pT- Kategorien entsprechen den T- Kategorien.**

<b>N- Regionäre Lymphknoten</b>	
N1	Beweglich axillär
pN1mi	Mikrometastasen: 0,2mm < 2mm
pN1a	1-3 axilläre
pN1b	A. mammaria interna, klinisch nicht erkennbar <sup>1</sup>
pN1c	pN1 und pN1b
N2a	Fixiert axillär
pN2a	4-9 axilläre
N2b	A. mammaria interna, klinisch erkennbar
pN2b	A. mammaria interna, klinisch erkennbar <sup>1</sup> / keine axillären
N3a	Infraklavikulär
pN3a	> 10 axilläre oder infraklavikulär
N3b	Axillär und A. mammaria interna, klinisch erkennbar
pN3b	a) Axillär und A. mammaria interna, klinisch erkennbar oder b) > 3 axilläre und A. mammaria interna, klinisch nicht erkennbar <sup>1</sup>
N2c	Supraklavikulär
pN3c	Supraklavikulär

Anmerkung:

<sup>1</sup> Nachgewiesen durch Schildwächterlymphknotenuntersuchung

<b>M- Fernmetastasen</b>	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

**Die pM-Kategorien entsprechen den M- Kategorien.**

Die Kategorien M1 und pM1 können wie folgt spezifiziert werden:

- Lunge (PUL)
- Knochen (OSS)
- Leber (HEP)
- Hirn (BRA)

- Lymphknoten (LYM)
- Andere Organe (OTH)
- Knochenmark (MAR)
- Pleura (PLE)
- Peritoneum (PER)
- Nebenniere (ADR)
- Haut (SKI)

<b>Stadiengruppierung</b>			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1 <sup>1</sup>	N0	M0
Stadium IIA	T0, T1 <sup>1</sup>	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1 <sup>1</sup>	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Anmerkung:

<sup>1</sup> T1 schließt T1mic ein

### 9.3 Kriterien des Gradings beim Mammakarzinom nach *Elston* und *Ellis*

Merkmale	Kriterien	Scorewert
Tubulusausbildung	>75%	1
	10-75%	2
	<10%	3
Kernpolymorphie	gering	1
	mittelgradig	2
	stark	3
Mitoserate (HPF = Objektiv 40x)	0-1 HPF (0-5/10 HPF)	1
	1-2 HPF (6-11/10 HPF)	2
	> 2 HPF (>12/10 HPF)	3
Scoresumme		3-9

**HPF** = high power field, die hier angegebenen Kriterien gelten für einen Gesichtsfelddurchmesser von 0,45 mm

Scoresumme	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3,4,5	gering	G1	Gut differenziert
6,7	mäßig	G2	Mäßig differenziert
8,9	hoch	G3	Schlecht differenziert



## 9.4 Hormonrezeptorstatus

Quantifizierung des Hormonrezeptorgehalts (Immunreaktiver Score = IRS) nach Remmele und Stegner 1987

- **Estrogenrezeptorstatus mit immunreaktivem Score**
- **Progesteronrezeptorstatus mit immunreaktivem Score**

Anzahl positiver Zellen (PP)	Färbeintensität Staining intensity (SI)	IRS
0= keine positiven Zellkerne	0= keine Färbereaktion	3*4= 12
1= <10% positive Zellkerne	1= schwache Färbereaktion	
2= 10-50% positive Zellkerne	2= mäßige Färbereaktion	
3= 51-80% positive Zellkerne	3= starke Färbereaktion	
4= >80% positive Zellkerne		

Bewertung des Immunreaktiven Scores (IRS= SI*PP)	Scoresumme
negativ	0
	1
	2
positiv	3
	4
	6
	8
	9
	12

## 9.5 Her2/neu- Expressionsstatus

<b>Färbemuster</b>	<b>Score</b>	<b>Her2/neu- Überexpressionsbestimmung</b>
Keine Färbung oder membranöse Färbung bei weniger als 10% der Tumorzellen	0	negativ
Eine schwache oder kaum nachweisbare membranöse Färbung von mehr als 10% der Tumorzellen. Die Zellen zeigen nur eine partielle Färbung der Membran	1+	negativ
Eine schwache oder mittlere Färbung der gesamten Membran von mehr als 10% der Tumorzellen	2+	Schwach positiv
Eine kräftige Färbung der gesamten Membran von mehr als 10% der Tumorzellen	3+	Stark positiv

## 9.6 TNM- Klassifikation: Isolierte Tumorzellen (ITC)

<b>ITC in regionären Lymphknoten</b>	
pN0	Histologisch keine Lymphknotenmetastasen, keine Untersuchung zum Nachweis isolierter Tumorzellen
pN0 (i-)	Histologisch keine Lymphknotenmetastasen, kein morphologischer Nachweis von isolierten Tumorzellen
pN0 (i+)	Histologisch keine Lymphknotenmetastasen, morphologischer Nachweis von isolierten Tumorzellen
pN0 (mol-)	Histologisch keine Lymphknotenmetastasen, kein nicht-morphologischer Nachweis von isolierten Tumorzellen
pN0 (mol+)	Histologisch keine Lymphknotenmetastasen, nicht-morphologischer Nachweis von isolierten Tumorzellen

Anmerkung:

Der Nachweis isolierter Tumorzellen mit morphologischen Techniken in nicht regionärer Lokalisation, z.B. im Knochenmark, wird analog wie bei N klassifiziert, z.B. M0 (i+). Für nichtmorphologische Techniken soll „mol“ als Addendum zu M0 hinzugefügt werden, z.B. M0 (mol+)

## 9.7 Knochenmarkstatus Primärscreening - TF-Anreicherung

### Verarbeitete Fälle

	Fälle					
	Gültig		Fehlend		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Primärscreening_KM* TF-Anreicherung_KM	65	100,0%	0	,0%	65	100,0%

### Primärscreening\_KM \* TF-Anreicherung\_KM Kreuztabelle

			TF-Anreicherung_KM		Gesamt
			neg	pos	
Primärscreening_KM	neg	Anzahl	14	36	50
		% v on PS_KM_pos/neg	28,0%	72,0%	100,0%
	pos	Anzahl	4	11	15
		% v on PS_KM_pos/neg	26,7%	73,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	18	47	65
		% v on PS_KM_pos/neg	27,7%	72,3%	100,0%

### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	Exakte Signifikanz (2-seitig)
McNemar-Test Anzahl der gültigen Fälle	65	1,857E-07 <sup>a</sup>

a. Verwendete Binomialverteilung

## 9.8 Wilcoxon-Test: absolute Tumorzellzahl Primärscreening - TF-Anreicherung im KM

Ränge

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
abs. Tumorzellzahl	Negative Ränge	6 <sup>a</sup>	13,33	80,00
TF-Anr. - Primärscreening	Positive Ränge	45 <sup>b</sup>	27,69	1246,00
	Bindungen	14 <sup>c</sup>		
	Gesamt	65		

- a. TF-Anreicherung\_KM\_abs.Tumorzellzahl < Primärscreening\_KM\_abs.Tumorzellzahl
- b. TF-Anreicherung\_KM\_abs.Tumorzellzahl > Primärscreening\_KM\_abs.Tumorzellzahl
- c. TF-Anreicherung\_KM\_abs.Tumorzellzahl = Primärscreening\_KM\_abs.Tumorzellzahl

Statistik für Test<sup>b</sup>

	abs. TuZahl TF-Anr.-PS
Z	-5,483 <sup>a</sup>
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	4,188E-08

- a. Basiert auf negativen Rängen.
- b. Wilcoxon-Test

## 9.9 Wilcoxon-Test: relative Tumorzellzahl Primärscreening - TF-Anreicherung im KM

### Ränge

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
rel. Tumorzellzahl	Negative Ränge	13 <sup>a</sup>	37,92	493,00
TF-Anr. - Primärscreening	Positive Ränge	38 <sup>b</sup>	21,92	833,00
	Bindungen	14 <sup>c</sup>		
	Gesamt	65		

- a. TF-Anreicherung\_KM\_rel. Tumorzellzahl < Primärscreening\_KM\_rel. Tumorzellzahl  
b. TF-Anreicherung\_KM\_rel. Tumorzellzahl > Primärscreening\_KM\_rel. Tumorzellzahl  
c. TF-Anreicherung\_KM\_rel. Tumorzellzahl = Primärscreening\_KM\_rel. Tumorzellzahl

### Statistik für Test<sup>b</sup>

	rel. TuZahl TF-Anr.-PS
Z	-1,594 <sup>a</sup>
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,1110

- a. Basiert auf negativen Rängen.  
b. Wilcoxon-Test

## 9.10 Blutstatus Primärscreening - TF-Anreicherung

### Verarbeitete Fälle

	Fälle					
	Gültig		Fehlend		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Primärscreening_Blut *	11	100,0%	0	,0%	11	100,0%
TF-Anreicherung_Blut						

### Primärscreening\_Blut \* TF-Anreicherung\_Blut Kreuztabelle

			TF-Anreicherung_Blut		Gesamt
			neg	pos	
Primärscreening_Blut	neg	Anzahl	5	5	10
		% v on Primärscreening_Blut	50,0%	50,0%	100,0%
	pos	Anzahl	1	0	1
		% v on Primärscreening_Blut	100,0%	,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	6	5	11
		% v on Primärscreening_Blut	54,5%	45,5%	100,0%

### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	Exakte Signifikanz (2-seitig)
McNemar-Test		,2187 <sup>a</sup>
Anzahl der gültigen Fälle	11	

a. Verwendete Binomialverteilung

## 9.11 Wilcoxon-Test: absolute Tumorzellzahl Primärscreening - TF- Anreicherung im Blut

### Ränge

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
abs. Tumorzellzahl	Negative Ränge	1 <sup>a</sup>	4,00	4,00
TF-Anr. - Primärscreening	Positive Ränge	5 <sup>b</sup>	3,40	17,00
	Bindungen	5 <sup>c</sup>		
	Gesamt	11		

- a. TF-Anreicherung\_Blut\_Tumorzellzahl < Primärscreening\_Blut\_Tumorzellzahl
- b. TF-Anreicherung\_Blut\_Tumorzellzahl > Primärscreening\_Blut\_Tumorzellzahl
- c. TF-Anreicherung\_Blut\_Tumorzellzahl = Primärscreening\_Blut\_Tumorzellzahl

### Statistik für Test<sup>b</sup>

	abs. TuZahl TF-Anr.-PS
Z	-1,378 <sup>a</sup>
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,1682

- a. Basiert auf negativen Rängen.
- b. Wilcoxon-Test



## 9.12 Wilcoxon-Test: relative Tumorzellzahl Primärscreening - TF-Anreicherung im Blut

### Ränge

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
rel. Tumorzellzahl	Negative Ränge	1 <sup>a</sup>	6,00	6,00
TF-Anr. - Primärscreening	Positive Ränge	5 <sup>b</sup>	3,00	15,00
	Bindungen	5 <sup>c</sup>		
	Gesamt	11		

a. TF-Anreicherung\_Blut\_rel.Tumorzellzahl < Primärscreening\_Blut\_rel.Tumorzellzahl

b. TF-Anreicherung\_Blut\_rel.Tumorzellzahl > Primärscreening\_Blut\_rel.Tumorzellzahl

c. TF-Anreicherung\_Blut\_rel.Tumorzellzahl = Primärscreening\_Blut\_rel.Tumorzellzahl

### Statistik für Test<sup>b</sup>

	rel. TuZahl TF-Anr.-PS
Z	-,943 <sup>a</sup>
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,3454

a. Basiert auf negativen Rängen.

b. Wilcoxon-Test

## EINWILLIGUNG ZUR KNOCHENMARKPUNKTION

### IMMUNZITOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Liebe Patientin,

die Untersuchung des Knochenmarks wird in der Krebsdiagnostik eingesetzt, um wertvolle Informationen über den Ausbreitungsgrad der Krankheit zu erhalten. Dieses Verfahren ist momentan noch Gegenstand wissenschaftlicher Forschung, um neue Therapiemöglichkeiten und Chancen der Früherkennung zu entwickeln. Zu diesem Zweck, bitten wir Sie, liebe Patientin, um die Einwilligung zu einer Knochenmarkpunktion. Die Untersuchung ist kostenlos.

#### Untersuchungsverfahren

Mit einer Spezialnadel wird vom Beckenkammknochen der linken und rechten Seite jeweils eine Knochenmarkprobe entnommen. Die Punktion des Knochenmarks erfolgt in örtlicher Betäubung. Anhaltende Schmerzen im Bereich der Punktionsstelle nach der Operation sind nicht zu erwarten. Wird die Punktion in örtlicher Betäubung durchgeführt, so kann das Ansaugen des Knochenmarks einen heftigen, aber sehr kurzen Schmerz verursachen.

#### Mögliche Komplikationen

Die Risiken des Eingriffs, wie z.B. das Infektionsrisiko, sind außerordentlich gering. Eventuelle Nachblutungen aus Hautvenen sind selten und lassen sich durch einfachen Druck auf die Punktionsstelle leicht beherrschen.

Die Beantwortung der folgenden Fragen hilft uns, die Risiken zusätzlich möglichst gering zu halten:

1. Besteht eine vermehrte Blutungsneigung?  
 nein  ja
2. Besteht eine Allergie? (z.B. gegen Medikamente, Pflaster, örtliche Betäubungsmittel ?)  
 nein  ja, welche:

#### Verhalten nach der Untersuchung

Zur Blutstillung genügt in der Regel ein Druck von wenigen Minuten auf die Einstichstelle. Die Punktionsstelle braucht in der Regel vom Arzt nicht mehr kontrolliert zu werden, falls nicht eine Nachblutung aus dem Punktionskanal oder länger andauernde Schmerzen auftreten.

Nach einer Knochenmarkpunktion, die in örtlicher Betäubung durchgeführt wurde, sollten Sie mindestens eine halbe Stunde ruhen.

Herr/Frau Dr.

hat mit mir heute anhand dieses Informationsblattes ein Aufklärungsgespräch geführt, bei dem ich alle mich interessierenden Fragen stellen konnte. Ich stimme zu, dass das entnommene Knochenmark und die Untersuchungsergebnisse wissenschaftlich ausgewertet und weiterverwendet werden.

- Ich habe keine weiteren Fragen und benötige keine zusätzliche Überlegungsfrist.
- Ich willige hiermit in die vorgeschlagene Untersuchung ein.

ODER

- Ich versage meine Zustimmung.

Ort, Datum

Unterschrift der Patientin

Ort, Datum

Unterschrift des Arztes/der Ärztin

## 10 Literaturverzeichnis

1. Boyle, P. and J. Ferlay, *Cancer incidence and mortality in Europe, 2004*. Ann Oncol, 2005. **16**(3): p. 481-8.
2. Rosen, P.P. and H. Oberman, *Tumors of the mammary gland*. Atlas of tumor pathology. AFIP, Washington D.C, 1993. **3rd ser.**(Fasc.7.).
3. Wittekind, C., H.J. Meyer, and F. Bootz, *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Springer, 2003.
4. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. **19**(5): p. 403-10.
5. Harbeck, N., et al., *Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom*. MANUAL Mammakarzinome (Tumorzentrum München), 2003: p. 67-71.
6. De Vita, V.T., Jr., *Breast cancer therapy: exercising all our options*. N Engl J Med, 1989. **320**(8): p. 527-9.
7. Rosner, D. and W.W. Lane, *Predicting recurrence in axillary-node negative breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 1993. **25**(2): p. 127-39.
8. *Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*. Lancet, 1998. **352**(9132): p. 930-42.
9. *Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*. Lancet, 1998. **351**(9114): p. 1451-67.
10. Wiedswang, G., et al., *Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(18): p. 3469-78.
11. Umekita, Y., et al., *Clinical significance of occult micrometastases in axillary lymph nodes in "node-negative" breast cancer patients*. Jpn J Cancer Res, 2002. **93**(6): p. 695-8.
12. Nystrom, L., et al., *Long-term effects of mammography screening: updated overview of the Swedish randomised trials*. Lancet, 2002. **359**(9310): p. 909-19.
13. Janni, W., et al., *[Progress in the early diagnosis of breast carcinoma during the years 1981-1990. Results of a longitudinal study]*. Dtsch Med Wochenschr, 2003. **128**(12): p. 601-6.
14. Klemi, P.J., et al., *Significant improvement in breast cancer survival through population-based mammography screening*. Breast, 2003. **12**(5): p. 308-13.
15. Zhong, X.Y., *[The detection of tumor cells in the bone marrow, peripheral blood and leukapheresis products in breast carcinoma patients]*. Dtsch Med Wochenschr, 2000. **125**(27): p. 840-4.
16. Diel, I.J., et al., *Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis*. J Clin Oncol, 1992. **10**(10): p. 1534-9.
17. Schlimok, G., et al., *Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance*. J Clin Oncol, 1990. **8**(5): p. 831-7.
18. Pantel, K., et al., *Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells*. Cancer Res, 1991. **51**(17): p. 4712-5.

19. Abati, A. and L.A. Liotta, *Looking forward in diagnostic pathology: the molecular superhighway*. Cancer, 1996. **78**(1): p. 1-3.
20. Karrison, T.G., D.J. Ferguson, and P. Meier, *Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(1): p. 80-5.
21. Schlimok, G., *Techniken zur Erkennung minimal residueller Erkrankungen: Zytologie*. Onkologe, 1997. **3**(3): p. 293-297.
22. Diel, I.J., et al., *Prognostische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark im Vergleich zum Nodalstatus beim primären Mammakarzinom*. Geburtsh. u. Frauenheilkunde, 1997. **57**: p. 333-341.
23. Hermanek, P., et al., *International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis*. Cancer, 1999. **86**(12): p. 2668-73.
24. Burkhardt, R., B. Frisch, and G. Kettner, *The clinical study of micro-metastatic cancer by bone biopsy*. Bull Cancer, 1980. **67**(3): p. 291-305.
25. Frisch, B., et al., *Scope and value of bone marrow biopsies in metastatic cancer*. Invasion Metastasis, 1984. **4 Suppl 1**: p. 12-30.
26. Diel, I.J., E.F. Solomayer, and G. Bastert, *[Micrometastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma]*. Radiologe, 2000. **40**(8): p. 681-7.
27. Braun, S., et al., *Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer*. N Engl J Med, 2000. **342**(8): p. 525-33.
28. Cote, R.J., et al., *Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases*. J Clin Oncol, 1991. **9**(10): p. 1749-56.
29. Diel, I.J., et al., *Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(22): p. 1652-8.
30. Gebauer, G., et al., *Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up*. J Clin Oncol, 2001. **19**(16): p. 3669-74.
31. Gerber, B., et al., *Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors*. J Clin Oncol, 2001. **19**(4): p. 960-71.
32. Harbeck, N., et al., *Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up*. Br J Cancer, 1994. **69**(3): p. 566-71.
33. Landys, K., et al., *Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **49**(1): p. 27-33.
34. Mansi, J.L., et al., *Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study*. Lancet, 1999. **354**(9174): p. 197-202.
35. Schmidt-Kittler, O., et al., *From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7737-42.
36. Diel, I.J., et al., *Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment*. N Engl J Med, 1998. **339**(6): p. 357-63.
37. Datta, Y.H., et al., *Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction*. J Clin Oncol, 1994. **12**(3): p. 475-82.
38. Fields, K.K., et al., *Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing*

- high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation.* J Clin Oncol, 1996. **14**(6): p. 1868-76.
39. Mansi, J.L., et al., *Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up.* Eur J Cancer, 1991. **27**(12): p. 1552-5.
  40. Braun, S., et al., *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer.* N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 793-802.
  41. Solomayer, E.F., et al., *Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients.* Clin Cancer Res, 2001. **7**(12): p. 4102-8.
  42. Braun, S., et al., *Pooled analysis of prognostic impact of bone marrow micrometastasis: 10-year survival of 4199 breast cancer patients.* Breast Cancer Res Treat, 2003. **67 (Suppl.)**: p. Abstract SABCS No.7.
  43. Sobin, L.H., *TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules.* Semin Surg Oncol, 2003. **21**(1): p. 19-22.
  44. Janni, W., et al., *Detection of micrometastatic disease in bone marrow: is it ready for prime time?* Oncologist, 2005. **10**(7): p. 480-92.
  45. Funke, I. and W. Schraut, *Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated.* J Clin Oncol, 1998. **16**(2): p. 557-66.
  46. Dowlatshahi, K., et al., *Lymph node micrometastases from breast carcinoma: reviewing the dilemma.* Cancer, 1997. **80**(7): p. 1188-97.
  47. Stosiek, P., B. Gerber, and M. Kasper, *[Prognostic significance of micrometastases in axillary lymph nodes in breast carcinoma].* Pathologe, 1996. **17**(6): p. 433-9.
  48. Pantel, K., et al., *Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells.* J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(17): p. 1419-24.
  49. Putz, E., et al., *Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases.* Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 241-8.
  50. Braun, S. and K. Pantel, *Biological characteristics of micrometastatic carcinoma cells in bone marrow.* Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **213 ( Pt 1)**: p. 163-77.
  51. Demicheli, R., et al., *Local recurrences following mastectomy: support for the concept of tumor dormancy.* J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(1): p. 45-8.
  52. Braun, S., et al., *Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients.* J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 80-6.
  53. Janni, W., et al., *The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence.* Cancer, 2001. **92**(1): p. 46-53.
  54. Wiedswang, G., et al., *Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5342-8.
  55. Janni, W., et al., *The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence.* Cancer, 2005. **103**(5): p. 884-91.
  56. Braun, S., et al., *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**(12): p. 3999-4004.

57. Pantel, K. and G. Riethmuller, *Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **213 ( Pt 3)**: p. 1-18.
58. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344(11)**: p. 783-92.
59. Schlimok, G., et al., *Reduction of metastatic carcinoma cells in bone marrow by intravenously administered monoclonal antibody: towards a novel surrogate test to monitor adjuvant therapies of solid tumours*. Eur J Cancer, 1995. **31A(11)**: p. 1799-803.
60. Braun, S., et al., *Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease*. Int J Cancer, 1999. **84(1)**: p. 1-5.
61. Jain, R.K., *Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46(1-3)**: p. 149-68.
62. Braun, S. and K. Pantel, *Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **52(1-3)**: p. 201-16.
63. Pantel, K., E. Felber, and G. Schlimok, *Detection and characterization of residual disease in breast cancer*. J Hematother, 1994. **3(4)**: p. 315-22.
64. Janni, W., et al., *Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen: Methodik, Biologie und klinische Relevanz*. Dtsch Arztebl, 2004. **101(51-52)**: p. A 3496-3502.
65. Weihrauch, M.R., et al., *Immunomagnetic enrichment and detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with epithelial malignancies*. Clin Exp Metastasis, 2002. **19(7)**: p. 617-21.
66. Gaforio, J.J., et al., *Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis*. Int J Cancer, 2003. **107(6)**: p. 984-90.
67. Bilkenroth, U., et al., *Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation*. Int J Cancer, 2001. **92(4)**: p. 577-82.
68. Witzig, T.E., et al., *Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy*. Clin Cancer Res, 2002. **8(5)**: p. 1085-91.
69. Taubert, H., et al., *Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases*. Gynecol Oncol, 2004. **92(1)**: p. 256-61.
70. Martin, V.M., et al., *Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS*. Exp Hematol, 1998. **26(3)**: p. 252-64.
71. Kasimir-Bauer, S., et al., *Rare expression of target antigens for immunotherapy on disseminated tumor cells in breast cancer patients without overt metastases*. Int J Mol Med, 2003. **12(6)**: p. 969-75.
72. Hager, G., et al., *The use of a panel of monoclonal antibodies to enrich circulating breast cancer cells facilitates their detection*. Gynecol Oncol, 2005. **98(2)**: p. 211-6.
73. Kruger, W., et al., *Immunomagnetic tumor cell selection--implications for the detection of disseminated cancer cells*. Transfusion, 2000. **40(12)**: p. 1489-93.
74. Kruger, W., et al., *Improvement of breast cancer cell detection by immunomagnetic enrichment*. Cytotherapy, 1999. **1(2)**: p. 135-139.

75. Garau, D., et al., *Detection of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: implications for stem cell purging*. Eur J Histochem, 1997. **41 Suppl 2**: p. 17-8.
76. Woelfle, U., et al., *Bi-specific immunomagnetic enrichment of micrometastatic tumour cell clusters from bone marrow of cancer patients*. J Immunol Methods, 2005. **300**(1-2): p. 136-45.
77. Woelfle, U., E. Breit, and K. Pantel, *Influence of immunomagnetic enrichment on gene expression of tumor cells*. J Transl Med, 2005. **3**(1): p. 12.
78. Naume, B., et al., *Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone-marrow/peripheral-blood stem-cell products from breast-cancer patients by negative immunomagnetic separation*. Int J Cancer, 1998. **78**(5): p. 556-60.
79. Naume, B., et al., *Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(12): p. 4122-9.
80. Naume, B., et al., *Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood*. J Hematother, 1997. **6**(2): p. 103-14.
81. Choemmel, V., et al., *A relevant immunomagnetic assay to detect and characterize epithelial cell adhesion molecule-positive cells in bone marrow from patients with breast carcinoma: immunomagnetic purification of micrometastases*. Cancer, 2004. **101**(4): p. 693-703.
82. Kielhorn, E., K. Schofield, and D.L. Rimm, *Use of magnetic enrichment for detection of carcinoma cells in fluid specimens*. Cancer, 2002. **94**(1): p. 205-11.
83. Fodstad, O., et al., *New immunobead techniques for sensitive detection of malignant cells in blood and bone marrow*. Proc Am Assoc Cancer Res, 1996. **37**: p. 214 (Abstract).
84. Forus, A., et al., *Sensitive fluorescent in situ hybridisation method for the characterisation of breast cancer cells in bone marrow aspirates*. Mol Pathol, 1999. **52**(2): p. 68-74.
85. Choemmel, V., et al., *Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(5): p. R556-70.
86. Ree, A.H., et al., *Differential display analysis of breast carcinoma cells enriched by immunomagnetic target cell selection: gene expression profiles in bone marrow target cells*. Int J Cancer, 2002. **97**(1): p. 28-33.
87. Zhong, X.Y., et al., *Sensitive detection of micrometastases in bone marrow from patients with breast cancer using immunomagnetic isolation of tumor cells in combination with reverse transcriptase/polymerase chain reaction for cytokeratin-19*. J Cancer Res Clin Oncol, 2000. **126**(4): p. 212-8.
88. Werther, K., et al., *The use of the CELlection kit in the isolation of carcinoma cells from mononuclear cell suspensions*. J Immunol Methods, 2000. **238**(1-2): p. 133-41.
89. Springer, G.F., P.R. Desai, and E.F. Scanlon, *Blood group MN precursors as human breast carcinoma-associated antigens and "naturally" occurring human cytotoxins against them*. Cancer, 1976. **37**(1): p. 169-76.
90. Springer, G.F., P.R. Desai, and M.S. Murthy, *Histochemical methods for the demonstration of Thomsen-Friedenreich antigen in cell suspensions and tissue sections*. [Klin. Wochenschr. 56, 761--765 (1978)]. Klin Wochenschr, 1978. **56**(24): p. 1225-6.
91. Khaldoyanidi, S.K., et al., *MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-*

- Friedenreich antigen-galectin-3 interactions.* J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 4127-34.
92. Kim, Z. and G. Uhlenbruck, [*Studies on the T-antigen and T-agglutinin*]. Z Immunitatsforsch Allerg Klin Immunol, 1966. **130**(1): p. 88-99.
  93. Klenk, E. and G. Uhlenbruck, [*On the isolation of mucoids containing neuraminic acid from human erythrocyte stroma, a contribution to the chemistry of agglutinogens*]. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1960. **319**: p. 151-60.
  94. Springer, G.F. and P.R. Desai, *Common precursors of human blood group MN specificities.* Biochem Biophys Res Commun, 1974. **61**(2): p. 470-5.
  95. Cao, Y., et al., *Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study.* Histochem Cell Biol, 1996. **106**(2): p. 197-207.
  96. Barr, N., et al., *Are pancarcinoma T and Tn differentiation antigens?* Cancer, 1989. **64**(4): p. 834-41.
  97. Schindlbeck, C., et al., *Characterisation of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich tumor antigen.* Histochem Cell Biol, 2005. **123**(6): p. 631-7.
  98. Stigbrand, T., et al., *Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop.* Tumour Biol, 1998. **19**(2): p. 132-52.
  99. Kasper, M., et al., *Histological evaluation of three new monoclonal anti-cytokeratin antibodies. 1. Normal tissues.* Eur J Cancer Clin Oncol, 1987. **23**(2): p. 137-47.
  100. Pantel, K., et al., *Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow.* J Hematother, 1994. **3**(3): p. 165-73.
  101. Braun, S., et al., *Re: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status.* J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(14): p. 1099-101.
  102. Borgen, E., et al., *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**(4): p. 427-34.
  103. Cordell, J.L., et al., *Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).* J Histochem Cytochem, 1984. **32**(2): p. 219-29.
  104. Moldenhauer, G., et al., *Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker.* Br J Cancer, 1987. **56**(6): p. 714-21.
  105. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 448-56.
  106. Pantel, K., R.J. Cote, and O. Fodstad, *Detection and clinical importance of micrometastatic disease.* J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(13): p. 1113-24.
  107. Pantel, K., et al., *Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6326-34.
  108. Gottschalk, J., et al., *HEA 125 and Ber EP4: two monoclonal anti-epithelial, non-cytokeratin antibodies distinguishing metastatic carcinomas from glial tumors.* Clin Neuropathol, 1993. **12**(2): p. 68-72.
  109. Pantel, K. and M. Otte, *Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells.* Semin Cancer Biol, 2001. **11**(5): p. 327-37.



110. Kruger, W., et al., *Immunomagnetic tumor cell selection--implications for the detection of disseminated cancer cells*. Transfusion, 2000. **40**(12): p. 1489-93.
111. Janni, W., et al., *Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma*. Cancer, 2000. **88**(10): p. 2252-9.
112. Braun, S., et al., *Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy*. J Clin Oncol, 2001. **19**(5): p. 1468-75.
113. Benson, J.R. and G. Querci Della Rovere, *Classification of isolated tumor cells and micrometastasis*. Cancer, 2000. **89**(3): p. 707-9; author reply 711.
114. Pendas, S., et al., *Sentinel node biopsy in ductal carcinoma in situ patients*. Ann Surg Oncol, 2000. **7**(1): p. 15-20.
115. Cox, C.E., et al., *Importance of lymphatic mapping in ductal carcinoma in situ (DCIS): why map DCIS?* Am Surg, 2001. **67**(6): p. 513-9; discussion 519-21.
116. Lara, J.F., et al., *The relevance of occult axillary micrometastasis in ductal carcinoma in situ: a clinicopathologic study with long-term follow-up*. Cancer, 2003. **98**(10): p. 2105-13.
117. Silverstein, M.J., et al., *Ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast: diagnostic and therapeutic controversies*. J Am Coll Surg, 2001. **192**(2): p. 196-214.
118. Woelfle, U., et al., *A new role of cytokeratins as micrometastasis-suppressors in primary breast cancer*. Proc Am Assoc Cancer Res, 2003. **44**: p. 118.
119. Naume, B., et al., *The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(9): p. 3091-7.
120. Klein, C.A., et al., *Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer*. Lancet, 2002. **360**(9334): p. 683-9.
121. Hu, X.C., et al., *Immunomagnetic tumor cell enrichment is promising in detecting circulating breast cancer cells*. Oncology, 2003. **64**(2): p. 160-5.
122. Kim, S.J., et al., *Detection of breast cancer micrometastases in peripheral blood using immunomagnetic separation and immunocytochemistry*. Breast Cancer, 2001. **8**(1): p. 63-9.
123. Krag, D.N., et al., *Breast Cancer Cells in the Blood: A Pilot Study*. Breast J, 1999. **5**(6): p. 354-358.
124. Racila, E., et al., *Detection and characterization of carcinoma cells in the blood*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4589-94.
125. Kraeft, S.K., et al., *Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(2): p. 434-42.
126. Muller, V., et al., *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**(10): p. 3678-85.
127. Mehes, G., et al., *Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic*. Am J Pathol, 2001. **159**(1): p. 17-20.
128. Smith, B.M., et al., *Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques*. J Clin Oncol, 2000. **18**(7): p. 1432-9.
129. Terstappen, L.W., et al., *Peripheral blood tumor cell load reflects the clinical activity of the disease in patients with carcinoma of the breast*. Int J Oncol, 2000. **17**(3): p. 573-8.

130. Rack, B., et al., *Circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of primary breast cancer patients*. J Clin Oncol, 2007. **25 (18S)**: p. Abstract 10595.
131. Rack, B., et al., *Prognostic relevance of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy: The German SUCCESS-Trial*. J Clin Oncol, 2008. **26**: p. Abstract 503.
132. Fehm, T., et al., *Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance*. Breast Cancer Res, 2008. **10 Suppl 1**: p. S1.
133. Braun, S., et al., *Disseminated tumor cells: are they ready for clinical use?* Breast, 2007. **16 Suppl 2**: p. S51-4.
134. Becker, S., et al., *Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **97(1)**: p. 91-6.
135. Becker, S., et al., *Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **106(2)**: p. 239-43.
136. Slade, M.J., et al., *Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years*. Int J Cancer, 2005. **114(1)**: p. 94-100.
137. Janni, W., et al., *Persistence of disseminated tumor cells (DTC) in bone marrow (BM) of breast cancer patients predicts increased risk for relapse - Results of pooled European data*. J Clin Oncol, 2006. **24 (18S)**: p. Abstract 10083.
138. Booy, E.P., et al., *Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2006.
139. White, C.A., R.L. Weaver, and A.J. Grillo-Lopez, *Antibody-targeted immunotherapy for treatment of malignancy*. Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 125-45.
140. Riethdorf, S., H. Wikman, and K. Pantel, *Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients*. Int J Cancer, 2008. **123(9)**: p. 1991-2006.
141. Braun, S., et al., *ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients*. Cancer Res, 2001. **61(5)**: p. 1890-5.
142. Solomayer, E.F., et al., *Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **98(2)**: p. 179-84.
143. Wulfing, P., et al., *HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2006. **12(6)**: p. 1715-20.
144. Meng, S., et al., *HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101(25)**: p. 9393-8.
145. Harris, M., *Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer*. Lancet Oncol, 2004. **5(5)**: p. 292-302.
146. Cersosimo, R.J., *Monoclonal antibodies in the treatment of cancer, Part 1*. Am J Health Syst Pharm, 2003. **60(15)**: p. 1531-48.
147. Adkins, J.C. and C.M. Spencer, *Edrecolomab (monoclonal antibody 17-1A)*. Drugs, 1998. **56(4)**: p. 619-26; discussion 627-8.
148. Hempel, P., et al., *Combination of high-dose chemotherapy and monoclonal antibody in breast-cancer patients: a pilot trial to monitor treatment effects on disseminated tumor cells*. Cytotherapy, 2000. **2(4)**: p. 287-95.

149. Kirchner, E.M., R. Gerhards, and R. Voigtmann, *Sequential immunochemotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumour cells*. *Ann Oncol*, 2002. **13**(7): p. 1044-8.
150. Fehm, T., et al., *A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation*. *Cancer*, 2006. **107**(5): p. 885-92.
151. Riethdorf, S., et al., *Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 920-8.
152. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(8): p. 781-91.

# 11 Curriculum Vitae

Kieferngartenstraße 5  
80939 München  
089/31869637  
0160-96449450  
JuliaStellwagen@aol.com

---

Name: Julia Stellwagen  
Geburtsdatum: 09.12.1981  
Geburtsort: Heidelberg  
Staatsbürgerschaft: deutsch  
Familienstatus: ledig

## Schulen:

1987-1991 Friedrich- Ebert- Grundschule, Mannheim- Waldhof  
1991-1992 Gerhart Hauptmann Grundschule Mannheim, Rheinau- Süd  
1992-2001 Johann- Sebastian- Bach Gymnasium, Mannheim- Neckarau  
2001 Abitur

## Studium:

2001 Aufnahme des Medizinstudiums an der LMU München  
2003 Erfolgreich bestandener erster Abschnitt der Ärztlichen  
Prüfung  
2008 Erfolgreich bestandener zweiter Abschnitt der Ärztlichen  
Prüfung

## Famulaturen:

01.03.-04.04.2004 Internistische Arztpraxis, Beindersheim  
28.02.-01.04.2005 Kreißsaal, Wochenstation, gynäkologische Abteilung mit OP,  
Klinikum Fürstenfeldbruck  
02.04.-31.04.2006 Allgemeine pädiatrische Station und neonatologische  
Intensivstation im AKH, Wien, Österreich  
04.09.-06.10.2006 Anästhesie und Intensivmedizin an der McGill University,  
Montréal, Kanada

**Praktisches Jahr:** Chirurgie: Nepean Hospital der University of Sydney und  
Klinikum Neuperlach, München  
Innere Medizin: Onkologische Abteilung des Klinikums  
Schwabing, München  
Kinderheilkunde: Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des  
Klinikums Harlaching, München

**Promotion:**  
2004-2007 „Immunomagnetische Anreicherung Disseminierter  
Tumorzellen im Knochenmark und Blut von Patientinnen mit  
Mammakarzinom“  
im Klinikum der Ludwig- Maximilians- Universität,  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,  
Maistraße München

**Publikationen:** Schindlbeck C, Stellwagen J, Jeschke U, Karsten U, Rack B,  
Janni W, Jückstock J, Tulusan A, Sommer H, Friese K.  
Immunomagnetic enrichment of disseminated tumor cells in  
bone marrow and blood of breast cancer patients by the  
Thomsen-Friedenreich-Antigen.  
Clin Exp Metastasis. 2008;25(3):233-40.

**Auslandsaufenthalte:** Internationale Arbeitserfahrung mit TravelWorks in  
Australien

**Sprachen:** Deutsch (Muttersprache)  
Englisch (flüssig)  
Französisch (Grundkenntnisse)  
Latein

**Interessen:** Reisen  
Fitness, Radsport, Reiten und Snowboarden  
Klavier

## 12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Harald Sommer für die Überlassung dieses interessanten Themas danken.

Danken darf ich auch meinem Betreuer PD Dr. med. Christian Schindlbeck für die Möglichkeit zur Erstellung der Arbeit sowie für sein Engagement und seine wertvollen Anregungen bei der Durchführung und Abfassung dieser.

Außerdem möchte ich mich bei dem gesamten Laborteam der Tumorbiologie, insbesondere Sandra Schulze und Beate Zill für die stets hilfsbereite Betreuung und Anleitung bei der Durchführung der Labormethoden bedanken.

Auch PD Dr. Udo Jeschke bin ich zu Dank verpflichtet, der mir mit seiner großen Erfahrung auf dem Gebiet der Tumorzellanreicherung stets beratend zur Seite stand.

Ebenso gilt mein Dank den Ärzten der Frauenkliniken I. Frauenklinik München (Maistrasse), Klinikum Bayreuth und Klinikum Traunstein für die zuverlässige Bereitstellung der Knochenmarkproben.

Abschließend danke ich natürlich auch meiner Familie und meinem Schatz Johannes für Ihre liebevolle Unterstützung und Motivation, Sabine für diverse Snackpakete an langen Laborabenden, außerdem all meinen Freunden für die alltäglichen Kleinigkeiten und schließlich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Und nicht zuletzt möchte ich selbstverständlich auch allen fleißigen Korrekturlesern danken.