

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
am Campus Innenstadt

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Klaus Friese

**Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTC's) im Blut von
Brustkrebspatientinnen mit Hilfe von spezifischen Real-Time PCR
Markern.**

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

vorgelegt von

Ulrich Andergassen

aus

Bozen (Südtirol / Italien)

Jahr

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Christian Schindlbeck
Priv. Doz. Dr. med. Sebastian Stinzing

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2014

Gliederung der wissenschaftlichen Arbeit

I.	Einleitung	03
	I. Brustkrebs.....	04
	II. Ansatz dieser Arbeit – MRD (Minimal Residual Disease).....	14
II.	Material und Methoden	22
	I. Blutproben & Anreicherung der Leukozyten.....	22
	II. RNA Isolierung.....	23
	III. Reverse Transkription.....	27
	IV. Nested PCR.....	28
	V. Real Time PCR.....	29
	VI. Auswertung.....	32
	VII. Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmaterial.....	33
III.	Ergebnisse	36
	I. Patientendaten.....	36
	II. RNA-Isolierung.....	39
	III. Real-Time PCR.....	46
	IV. Her2-Switch.....	50
IV.	Diskussion	51
	I. Vorbereitende Experimente.....	51
	II. Real-Time PCR.....	52
	III. Her2-Switch.....	54
V.	Zusammenfassung	55
VI.	Abkürzungsverzeichnis	57
VII.	Quellenverzeichnis	59
VIII.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	64

IX.	Ethikvotum	66
X.	Eidesstattliche Versicherung	67
XI.	Curriculum vitae	68
	I. Lebenslauf.....	68
	II. Publikationsliste.....	71
XII.	Danksagung	77

I. Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste Tumorerkrankung in der weiblichen Population. Eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an dieser Krebsentität. Im Jahre 2010 mussten rund 72.000 Neuerkrankungen in Deutschland verzeichnet werden. Die Hochrechnung des Robert Koch Institutes im Rahmen der zweijährigen Veröffentlichung „Krebs in Deutschland“ prognostiziert für das Jahr 2012 eine Inzidenz von fast 74.000 Brustkrebsfällen [1].

Diese steigende Zahl der Erstdiagnosen ist jedoch kein Zeichen für ein sich anbahnendes Versagen der modernen Medizin vor einer immer häufiger werdenden und nicht suffizient behandelbaren Erkrankung, sondern vielmehr das Ergebnis einer, über lange Jahre in den Industrieländern aufgebauten, verbesserten und intensivierten Brustkrebsvorsorge insbesondere im Hinblick auf eine immer älter werdende Bevölkerung.

Es werden nun durch Sensibilisierung der weiblichen Bevölkerung viel häufiger erste Veränderungen der Brust von den Betroffenen selbst bemerkt, oder aber mit Hilfe des Brustkrebscreenings frühzeitig entdeckt. Dank dieser Entwicklung lassen sich die Veränderungen meist noch kurativ behandeln, häufiger auch ohne zytostatische Systemtherapie, ohne dadurch das Risiko für ein Rezidiv zu erhöhen [2].

Trotz dieser bemerkenswerten Fortschritte gibt aber bis heute neben den bildgebenden Verfahren keine verlässliche Methode die in der Früherkennung und in der Nachsorge als zusätzliche Untersuchung eingesetzt werden kann.

Seit einiger Zeit steht die Erforschung von Tumorresiduen in Blut und Knochenmark im Fokus der onkologischen Grundlagenforschung. Theoretisch können mit einer einfachen Blutabnahme Tumorzellen im peripheren Blut detektiert werden. Mit geringer Invasivität bestünde so eine Möglichkeit für Tumorfrüherkennung. Die Charakterisierung dieser Zellen ermöglicht eine Prognose bezüglich des malignen Potenzials, die Anzahl der gefundenen Residuen eine Einschätzung bezüglich des Therapieansprechens und das Wiederauftreten eine Aussage über das Rezidivrisiko.

I. Brustkrebs

I. Epidemiologie

Das statistische Risiko von einer malignen Erkrankung betroffen zu sein, liegt heute in Deutschland für Frauen bei 43%, bei Männern sogar höher, jeder zweite männliche Deutsche erkrankt im Laufe seines Lebens an einem bösartigen Tumor.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) errechnete für das Jahr 2000 eine weltweite Inzidenz für Brustkrebs von einer Million neuerkrankten Frauen. In diesem Jahr sollen, laut dieser Prognose, insgesamt 370.000 Frauen aufgrund ihrer Brustkrebserkrankung verstorben sein [3].

Wie bereits angeführt gab es im Jahre 2010 in Deutschland genau 71.660 Brustkrebs Neuerkrankungen, zur Erstdiagnose dieser invasiven Karzinome kommen jedoch nochmals etwa 6.500 in situ Karzinome, die als Präkanzerosen ebenfalls operativ wie systemisch zu therapieren sind und, wenn nicht erkannt, nach einer gewissen Latenzzeit zu einem infausten Karzinom werden können. Mit 520 Neuerkrankungen pro Jahr spielt das virile Mammakarzinom, das, wenn auch mit geschlechtsspezifischen Abänderungen, analog zum weiblichen Kollektiv behandelt wird, eine untergeordnete Rolle.

Jede vierte an Brustkrebs erkrankte Frau ist bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre, jede zehnte hat das 45igste Lebensjahr noch nicht erreicht und das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren.

Jährlich sterben gemäß der aktuellen Statistik jedes Jahr etwa 17.000 Frauen in Deutschland an den Folgen einer Brustkrebserkrankung.

Betrachtet man die statistischen Daten der letzten Jahrzehnte so sieht man, das 2008 etwa doppelt so viele Frauen an Mammakarzinom erkrankt sind wie im Jahre 1980. Die altersstandardisierte Erkrankungsrate ist in diesem Zeitraum also um 50% gestiegen. Die aktuellen Neuerkrankungs- und Sterberaten decken sich in etwa mit den Erhebungen aus den anderen westlichen Industrieländern, erstaunlicherweise gibt es aber innerhalb von Deutschland noch immer erhebliche Unterschiede. Die Brustkrebsinzidenz ist in den neuen Bundesländern noch immer um etwa 25% niedriger als in den alten [1, 2]. Vermutlich liegt dies vor allem an den noch immer mangelhaft ausgebauten Vorsorgeeinrichtungen in den ländlichen Regionen Ostdeutschlands.

Ein anderer wichtiger Aspekt ist sicherlich auch die stetig steigende Lebenserwartung der Bevölkerung. Jede zweite Frau in Deutschland wird ihren 85. Geburtstag erleben und dieses Lebensalter wird sich über die kommenden 50 Jahre gemäß einer OECD (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) Prognose aus dem Jahre 2012 um weitere 7 Jahre erhöhen [1, 2].

	2007		2008		Prognose 2012	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	520	66.490	520	71.660	600	74.500
Rohe Erkrankungsrate¹	1,3	158,5	1,3	171,1	1,5	180,0
Standardisierte Erkrankungsrate^{1,2}	0,9	114,4	1,0	123,1	1,0	124,7
Mittlere Erkrankungsrate³	69	66	68	65		
Sterbefälle	249	16.780	136	17.209		
Rohe Sterbefälle¹	0,6	40	0,3	41,1		
Standardisierte Sterberate^{1,2}	0,5	24,3	0,2	24,6		
5-Jahres-Prävalenz	1.800	260.000	1.900	273.000	2.100	300.900
Absolute 5-Jahres Überlebensrate (2007-2008)⁴			63 (52-64)	78 (75-79)		
relative 5-Jahres Überlebensrate (2007-2008)⁴			76 (61-77)	86 (83-87)		

¹je 100.000 Personen ²altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³median ⁴inProzent

Tab. 01: Epidemiologischen Zahlen für Deutschland (ICD-10 => C50)

II. Histologie / Tumorcharakteristika / TNM Klassifikation

Beurteilt man Brustkrebs auf feingeweblichem Niveau handelt es sich hierbei in etwa 95% der Fälle um ein Adenokarzinom. Dieser Tumor ist entweder ein invasiv duktales Karzinom (IDC), das von den Drüsengängen ausgeht (70-80% absolut), oder ein invasiv lobuläres Karzinom (ILC), das in den Drüsenlappen seinen Ursprung nimmt (10-15 % absolut). Das am häufigsten vorkommende invasiv duktales Mammakarzinom wird in der neuesten und zusehends verwendeten WHO Nomenklatur auch als NST (no special type) oder NOS (not otherwise specified) bezeichnet [4].

Als Präkanzerosen oder nicht invasives Karzinom werden Tumorveränderungen umschrieben, die auf die Brustdrüsengänge (duktales Carcinoma in situ, DCIS) oder -läppchen (lobuläres Carcinoma in situ, LCIS bzw. Lobuläre Neoplasie, LN) beschränkt sind und keine Stromainvasion aufzeigen. Eine Sonderstellung hierbei nimmt der Morbus Paget der Mamille ein, hier zeigt sich eine nicht-invasive

Tumorausbreitung in die Brustwarzenhaut und ist meist mit einem duktalem Carcinoma in situ, deutlich seltener mit einem invasiven Mammakarzinom vergesellschaftet.

Die übrigen invasiven Tumortypen sind mit jeweils etwa 2% sehr selten und zeigen neben einer tubulären, muzinösen, medullären, und papillären Struktur häufig das Bild eines gemischttypischen invasiven Karzinoms [5].

Selten nimmt das invasive Mammakarzinom seinen Ursprung in gutartigen Veränderungen der Brust (Papillome, Adenome, Phylloide-Tumoren, duktale Hyperplasien). Eine Sonderform des Brustkrebses ist das inflammatorische Mammakarzinom, das keinen histologischen Tumortyp beschreibt, sondern eine sichtbare und vor allem palpable Veränderung. Meist zeigt es sich in einer Rötung, die sich über mehr als einen Quadranten der Brust erstreckt, und einer deutlichen Schwellung, die bis in die ableitenden Lymphgebiete reicht. Dieses Krankheitsbild geht in der Regel mit einer bereits fortgeschrittenen Erkrankung einher.

Neben dem Ursprungsgewebe ist auch der Differenzierungsgrad des Tumors für die Einschätzung der Pathogenität entscheidend. Der Tumor wird anhand von strukturellen und zellulären Eigenschaften, sowie der Kernteilungsrate in drei Differenzierungsgrade (Grading) oder auch Malignitätsgrade unterteilt. In der etablierten Methode nach Elston und Ellis beruht [6] die Einstufung des invasiven Karzinoms auf drei Kriterien, der Tubulusbildung (Ausbildung röhrenartiger Tumordrüsen), der Kernpolymorphie (Vielgestaltigkeit der Zellkerne) und der Mitoserate (Teilungsrate der Zellen). Je höher das Grading und somit die Dedifferenzierung, umso ungünstiger ist das Verhalten der Tumorzellen (G1 = gut differenziert, G2 = mäßig differenziert, G3 = gering differenziert) [3, 7].

Ist der Tumor mäßig differenziert wird neuerdings am Tumorgewebe im Rahmen der ersten feingeweblichen Begutachtung auch der Poliferationsfaktor Ki-67 untersucht. Das Antigen Ki-67, ein Protein, das zur Markierung sich teilender menschlicher Zellen geeignet ist, läßt sich einfach immunhistochemisch bestimmen. Diese proliferative Aktivität des G2 Tumors kann eine richtungsweisende Aussage über die Pathogenität des Tumor ermöglichen und hat somit einen maßgeblichen Einfluss auf das 10 Jahres Überleben (OAS = Overall survival), da die Proliferation eine überragende tumorbiologische Bedeutung hat [8].

Die pathologische Begutachtung bzw. immunhistochemische Untersuchung des Hormonrezeptor- und Her2- Status von Mammakarzinomen gehört inzwischen zum allgemeinen Standard der Tumorcharakterisierung, da ihr Befund prognostisch wie therapeutisch eine entscheidende Rolle spielt.

Das Brustgewebe ist in seiner gesamten Entwicklung, und nicht zuletzt während der Laktation hormonabhängig. In der Phase von Entstehung und Wachstum des Mammakarzinoms kommt es ebenfalls zu einer hormonell stimulierten Proliferation des Tumors durch die weiblichen Geschlechtshormone.

Die Bestimmung der Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptorexpression (ER- und PgR) am Tumorgewebe erfolgt, indem man den Prozentsatz derjenigen Tumorzellen, an denen sich die Rezeptoren nachweisen lassen mit der Färbeintensität kombiniert. Die Einteilung erfolgt in Prozent (0-100%), mittels eines 12-stufigen Immunreaktiven Score (IRS), oder gemäß des internationalen 8-stufigen Allred-Scores [9].

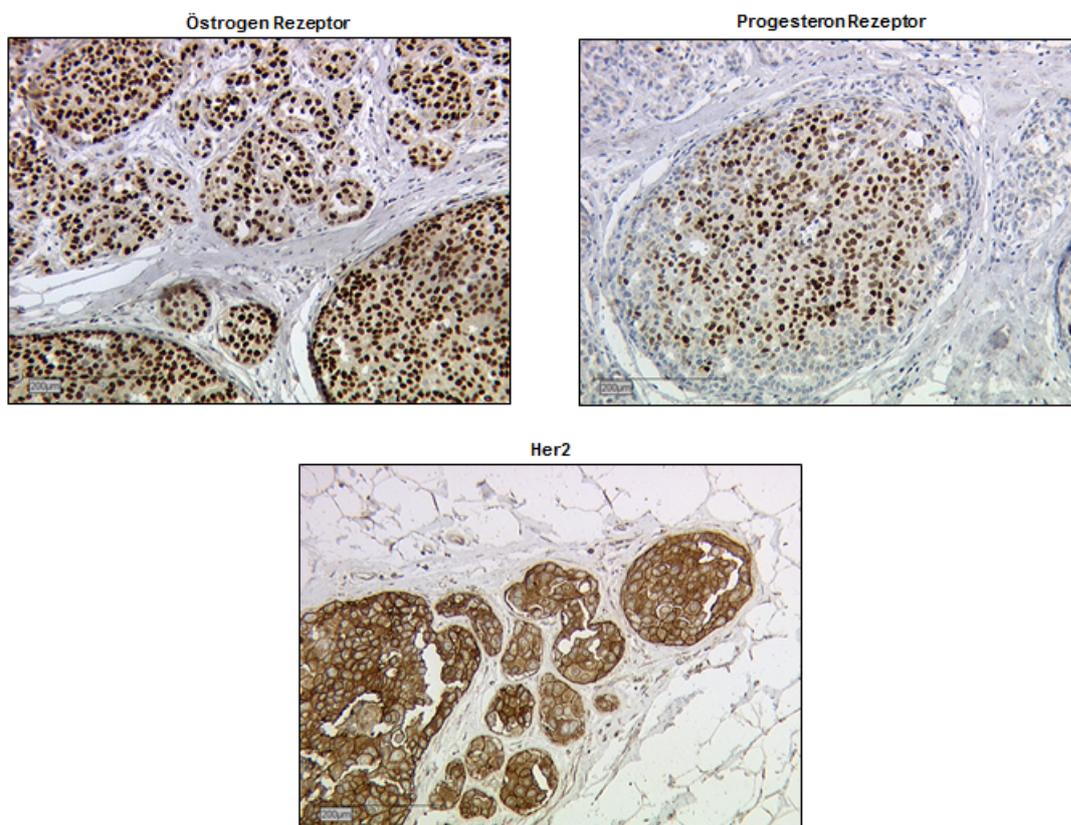


Abb. 01: Immunhistochemische ABC-Färbung des Östrogen Rezeptors (ER), Progesteron Rezeptors (PgR) und des Human epidermal growth factor receptors 2 (Her2) eines invasiv duktales Mammakarzinoms. ER/PR/Her2 ist als brauner Farbniederschlag zu erkennen, die Zellkerne sind mit Hämalalaun (nach Mayer) blau gegengefärbt.

Der „human epidermal growth factor receptor 2“ (Her2) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR) und spielt eine Rolle in der Zellproliferation mittels des RAS-MAP-Kinase Weges und hemmt die Apoptose über den mTOR-Signalweg [10, 11]. Dieser Rezeptor ist in etwa bei 20-30% aller invasiven Mammakarzinome überexprimiert und mit einem infausten Krankheitsverlauf und Überlebensprognose assoziiert. Die Bestimmung der Her2 Positivität erfolgt anhand der immunhistochemischen Färbeintensität die mit Hilfe eines 4-stufigen Score bewertet wird (0 bis 3+). Lassen hierbei sich keine Zellen anfärben, ist das Ergebnis negativ (Score 0), jedoch auch der Score 1+ wird noch als negativ angesehen. Als positiv gewertet wird eine hohe Färbeintensität (Score3). Bei einer mittleren Färbeintensität (Score 2) wird der Tumor mit Hilfe der In situ-Hybridisierung (FisH-Test) nachuntersucht und anhand einer Amplifikation des HER2-Gens entschieden, ob es sich um einen Her2-positiven Tumor handelt [12].

Für jedes therapeutisches Vorgehen ist es neben der geweblichen Bestimmung und dem Wissen über zusätzlichen Tumorcharakteristika auch wichtig, die Ausdehnung des Mammakarzinoms einzuschätzen. Die TNM Klassifikation gemäß der Union internationale contre le cancer (UICC) ermöglicht auch bei Brustkrebs eine Übersicht über Größe und Infiltration des Tumors in umliegende Gewebe (T), eine lokale lymphogene (N) und ferne Filialisierung (M). Auch ob eine Klassifikation nach dem klinischen Bild (cT), nach histologischer Begutachtung (pT) oder auch nach vorangegangener Therapie (ypT) erfolgt, kann in dieser Nomenklatur berücksichtigt werden.

T (TumorgroÙe)		N (befallene Lymphknoten)		M (Filialisierung)	
T0	Kein Tumor	N0	keine	M0	keine
Tis	Carcinoma in situ (nicht invasiv)	N1	1-3 axillär	M1	nachweisbar
T1	Bis 2cm	N2	4-9 axillär		
T1 mic	Mikroinvasion bis 0,1cm	N3	>10 axillär/claviculär		
T1a	<0,5cm				
T1b	>0,5 bis 1cm				
T1c	>1cm bis 2cm				
T2	>2cm bis 5cm				
T3	>5cm				
T4	mit Ausdehnung auf Brustwand				

Tab. 02: TNM-Klassifikation von Tumoren

III. Prävention / Diagnostik / Therapie

Ab dem Jahre 2005 wurde innerhalb von drei Jahren flächendeckend in ganz Deutschland ein Mammographie-Screening-Programm eingeführt. Es werden nun Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr alle zwei Jahre zur Brustkrebsvorsorge mittels Mammographie, Mammasonographie und Tastuntersuchung einbestellt. Um auch bei der jungen Frau, bei der die Brust in der Bildgebung schwer beurteilbar ist, eine Früherkennung zu gewährleisten, ist eine jährliche Tastuntersuchung beim Frauenarzt ab dem 30. Lebensjahr vorgesehen.

Neben der Kombination aus Mammographie (Bruströntgenuntersuchung) und Brustsonographie stehen bei schwer beurteilbaren Befunden, bestehenden Brustimplantaten und Verdacht auf eine Infiltration der umgebenden Strukturen additiv die Magnetresonanztomographie (Brust-MRT) und die Computertomographie (CT) zur Verfügung. Besonders bei Verdacht auf einen Befall der axillären Lymphknoten kommen letztere zum Einsatz. Im Rahmen der Primärdiagnose erfolgt eine sonographisch gestützte Hochgeschwindigkeitsstanze oder Feinnadelpunktion um den, in der Bildgebung suspekten Herd histologisch zu sichern.

Um das systemische Risiko einzuschätzen und eine mögliche Filialisierung auszuschließen wird im onkologischen Staging die CT im Bereich von Thorax und Abdomen und die Ganzkörper-Knochenszintigraphie eingesetzt. Erst bei Konkretisierung des Verdachts wird dies auf Schädel-CT (CCT), Leber-MRT, PET-CT (Positronenemissions-CT) oder ggf. CT gesteuerte Punktion der Filiae, besonders in der Rezidivsituation, erweitert.

Die Säulen in der Therapie des Mammakarzinoms bestehen aus einer operativen Sanierung, einer perkutanen Bestrahlung und einer Systemtherapie die zytotoxisch, aber auch anti-endokrin oder mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern erfolgen kann.

Die operative Sanierung kann abhängig von der Größe des Tumors als lokale Exzision, Brust-Segmentresektion, Subkutane Mastektomie (SSM) oder kompletter Brustamputation erfolgen. Wenn bereits primär ein großer Teil der Brust entfernt werden muss, oder etwa nach einer Nachresektion nicht mehr ausreichend Gewebe vorhanden ist, kann ein Wiederaufbau mittels Prothese oder aber auch mittels Eigengewebe erfolgen (TRAM - Transverser Rectus Abdominis Musculocutaneus-Lappen, LADO - *Musculus latissimus dorsi* Lappen, DIEP-Flap - tiefe inferiore epigastrische Perforatorlappen).

Der Standard in der operativen Untersuchung der axillären Lymphknoten hat sich in den letzten Jahren grundlegend verändert. So war es früher üblich immer systematisch die axillären Lymphknotenstationen auszuräumen. Dies hat sich in der Nachbeobachtung jedoch als eminenter Faktor in der Morbidität (Lymphödem, Bewegungseinschränkung) ohne wesentlichen Gewinn in Bezug auf die Mortalität erwiesen. Eine systematische Lymphknoten Entfernung erfolgt aus diesem Grund nur noch dann, wenn es klinisch und sonographisch auffällige axilläre Lymphknoten gibt, oder im Rahmen einer Sentinel-Lymphonodektomie (Wächterlymphknotenentfernung) nach Radionuklid- oder Blaufärbung 3 der Sentinel-Lymphknoten tumorbefallen sind [13].

Ist das Mammakarzinomgewebe hormonabhängig, so kann dieser Stimulus auf das noch nicht operativ entfernte Tumorgewebe (in der neoadjuvanten Situation), auf das ehemals tumorumgebende gesunde Brustdüsengewebe, auf Tumorfiliae, oder auf der noch gesunden kontralateralen Seite medikamentös eingedämmt werden. Zum Einsatz kommen hierbei zwei Wirkstoffe, bei denen man sich zwei Mechanismen zu Nutzen macht. Tamoxifen ist ein selektiver Östrogenrezeptormodulator, der eine kompetitive Hemmung von Östrogenrezeptoren sowie eine Stimulation von Progesteronrezeptoren bewirkt. Mit der Wirkstoffgruppe der Aromataseinhibitoren wird in die Synthese des Östrogens eingegriffen. Es gibt hierbei steroidale Inhibitoren (Exemestan / Aromasin ©) die eine permanente Deaktivierung des Enzyms bewirken und nicht steroidale Inhibitoren (Anastrozol / Arimidex ©), die die Östrogensynthese mittels reversibler kompetitiver Blockierung hemmen. In der Behandlung von prämenopausalen hormonrezeptorpositiven Patientinnen spielt neben dem Einsatz von Tamoxifen über mindestens 5 Jahre, auch der Einsatz von GnRH-Analoga eine Rolle. Hierbei führt der Einsatz der synthetischen Form des Neurohormons Gonadotropin-Releasing-Hormon dazu, dass es zu keiner vermehrten Ausschüttung von FSH (Follikel Stimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon) kommt und dadurch die Synthese von Östrogen und Testosteron angeregt wird. In der Therapie der postmenopausalen Patientin ist eine Kombination, aber auch eine Monotherapie von Tamoxifen und Aromataseinhibitoren möglich. Neben den Hormonrezeptoren wird heute auch immer mittels Immunhistochemie oder FisH die Exprimierung des Her2/neu Rezeptor untersucht. Ist dieser Status als positiv zu werten, kommt ein humanisierten Antikörper (Trastuzumab / Herceptin ©) zum Einsatz, der gegen den extrazellulären Teil des Her2-Rezeptors gerichtet ist.

Er blockiert ihn und unterbindet damit seine intrazelluläre Wirksamkeit. Neben dieser in der adjuvanten Situation als Goldstandard bestehenden Infusionstherapie (begleitend zur Chemotherapie und weiter über insgesamt 12 Monate) gibt es inzwischen auch eine orale Medikation als zielgerichtete Therapie gegen die Expression von Her2 im Tumorgewebe [14].

IV. Risikofaktoren- /abschätzung

Schon sehr lange beschäftigt man sich mit der Frage nach Risikofaktoren für eine Brustkrebskrankung. Epidemiologische Untersuchungen und retrospektive Untersuchungen haben gezeigt, daß eine frühe Menarche und eine späte Menopause, Kinderlosigkeit oder ein hohes Alter bei Erstgebährenden eine signifikante Risikoerhöhung bedeuten. Viele Kinder zu bekommen, dies auch in einem jungen Alter und möglicherweise auch alle Kinder bis zu einem halben Jahr zu stillen, reduziert wohl maßgeblich die Gefahr an Brustkrebs zu erkranken. Im Gegensatz zu den hormonhaltigen Ovulationshemmern (Kontrazeptiva) bedeutet die Hormonersatztherapie mit Östrogenen und auch in Kombination mit Gestagenen, in und nach den Wechseljahren ein zusätzliches Risiko [15]. Amerikanische Untersuchungen haben in einer großangelegten Studie aufgezeigt, dass Ernährung, ausreichend Bewegung und gesunder Lebenswandel protektiv in Bezug auf die Inzidenz und vermutlich auch vor einem Rezidiv sind. Alkohol und Nikotin, passiv oder aktiv inhaliert, scheinen als allgemeines Kanzerogen eine Rolle zu spielen [16]. Ist das Brustdrüsengewebe einer Frau sehr dicht und schwer zu beurteilen, oder durch gutartige Veränderungen (Mastopathie, duktale Hyperplasie) larviert, ist eine Vorsorge deutlich erschwert, die Inzidenz in diesem Kollektiv steigt ebenfalls.

Ein besonderes Augenmerk in der gynäkologischen Anamnese liegt heute in der Häufung von Brust- und Ovarialkarzinomfällen innerhalb einer Familie. Es konnten nämlich Brustkrebsgene (z.B. BRCA I & II) nachgewiesen werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu den genannten gynäkologischen Tumoren führen. Eine Mutation in BRCA I oder BRCA II kann in 5 bis 10% der Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden und spielt besonders im Risikomanagement von weiblichen Nachkommen oder nahen Verwandten von Patientinnen eine Rolle [17].

Neben diesen mehr oder weniger harten Faktoren, die in der Vor- wie Nachsorge eine Rolle spielen, gibt es inzwischen auch eine multifaktorielle Risikoeinschätzung

anhand der, am Operationspräparat bestimmten Tumorcharakteristika. Sinn und Zweck ist es hierbei, die Tumorbiologie und das persönliche Risiko so zu kombinieren, dass die Therapie in ausreichendem Maße eskaliert wird, ohne jedoch unnötige Morbidität zu schaffen.

Die Intrinsischen Faktoren oder Subtypen stehen in keiner eindeutigen Beziehung zu den 37 histologischen Faktoren die gemäß der WHO dem invasiven Karzinom zugeordnet werden können.

	Luminal A	Luminal B Her2 negativ	Luminal B Her2 positiv	Her2 (non luminal)	Triple negativ (basal-like)
ER	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ
PR	positiv	pos/neg	pos/neg	negativ	negativ
Her2	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ
Ki-67	<20 %	>20%			
Grading	G1, G2	G2, G3	G2, G3	G2, G3	G1, G2, G3

Tab. 03: Intrinsische Subtypen

- Luminal –A und –B Typen sind beide Hormonrezeptor positiv, letztere können jeweils Her2 positiv oder negativ sein, unterscheiden sich jedoch maßgeblich in Rezidiv- und Metastasierungsrisiko.
- Her2 Typ, der eine Überexpression dieses Rezeptors zeigt.
- Basal-like-Typ ist Her2 und Hormonrezeptor negativ und in bis zu 80% der Fälle dem triple-negativen Mammakarzinom gleichzusetzen.

Bei jedem dieser intrinsischen Subtypen ist eine andere adjuvante Therapie sinnvoll. Luminal A Typen werden ausschließlich endokrin therapiert, zusätzlich dazu werden die meisten Luminal B Typen chemotherapeutisch behandelt, ebenso wie die Her2 Typen die eine zusätzliche zielgerichtete Therapie erhalten. Die Triplenegativen dagegen werden ausschließlich mit Zytostatika therapiert.

Man könnte somit sagen, dass die Verwendung dieser intrinsischen Faktoren als Basis für eine therapeutische Konsequenz ist, die auf der sinnvollen Interpretation von prädiktiven und prognostischen Biomarkern basiert [18].

Im Bereich der prognostischen Grauzone, wenn die Indikation zur Systemtherapie aufgrund der Tumorbiologie grenzwertig ist, und aufgrund des Alters (sehr jung / sehr alt) oder von Komorbiditäten nicht leichtfertig gestellt werden sollte, kommen

Genexpressionsprofile zum Einsatz. Die kommerziellen Tests Endopredict©, MammaPrint©, Oncotype DX©, PAM50© messen Genexpressionssignaturen, vor allem Östrogenrezeptor-regulierte und proliferationsassoziierte Gene, die eine prognostische Aussage bzw. Risikoeinschätzung beim Östrogenrezeptor (ER) positiven Mammakarzinom erlauben [19].

Bei primären Mammakarzinomen ohne Lymphknotenbefall und mit einer mäßigen Differenzierung der Tumorzellen (G2-) werden im Rahmen klinischer Prüfungen auch die beiden Proteine uPA und PAI-1 (Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ und sein Inhibitor PAI-1) eingesetzt. Sie sollen zukünftig als zusätzliche Prognosefaktoren über das Rezidivrisiko Auskunft geben können. Im Rahmen der primären OP oder mittels Stanze wird Frischgewebe aus dem Tumor entnommen und untersucht.

Erhöhte Konzentrationen von uPA und / oder PAI-1 im Tumor korrelieren mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf, diese Patientinnen benötigen und profitieren möglicherweise von einer Chemotherapie. Tumore mit niedrigen Werten von uPA und PAI-1 haben einen günstigen Verlauf, diese Patientinnen benötigen dementsprechend keine Chemotherapie [20].

II. Ansatz dieser Arbeit – MRD (Minimal Residual Disease)

Jeder neue Ansatzpunkt in der Behandlung von Tumorerkrankungen muss sich erst bewähren, und Rückschlüsse über eine positive Auswirkung ermöglicht erst ein längerer Beobachtungszeitraum.

Mit Einführung des Mammographie-Screenings etwa sind die Brustkrebsdiagnosen im Jahre 2005 rasant angestiegen. Sicherlich sind viele Tumore viel früher und in einem prognostisch günstigeren Stadium diagnostiziert worden, sicherlich kam es aber auch zu einer gewissen Überdiagnose und konsekutiven Über-Therapie. Die sinkende Mortalitätsrate in den vergangenen 20 Jahren gibt dem Vorsorgeprogramm aber Recht, denn Hand in Hand mit einer modernisierten Therapie hat sich die Prognose nun deutlich verbessert.

Die TNM Klassifikation ermöglicht uns eine recht präzise Aussage über die Ausdehnung der Brustkrebserkrankung und ermöglicht damit, mit anderen Faktoren zusammen, eine relativ sichere Auskunft über das Krankheitsstadium. Besonders entscheidend für die unmittelbare Therapie nach Erstdiagnose ist in diesem Zusammenhang die Einschätzung bezüglich einer möglichen Filialisierung. Metastasen, die bereits eine gewisse Größe erreicht haben, kann man sehr gut mittels Bildgebung (Sonographie, Computertomographie, PET/CT) nachweisen oder aber bis zu einem gewissen Grad ausschließen. Es ist jedoch so, dass kleinste Tumorresiduen, beispielsweise im peripheren Blut, Knochenmark oder anderen Flüssigkeiten nicht mit diesen Methoden dargestellt werden können.

Ein pT1c Tumor kann eine Größe von 10 mm bis 20 mm aufweisen. Bedenkt man, dass der Tumor bei einem Durchmesser von 11 mm ein Volumen $0,6 \text{ cm}^3$ hat, ist dies noch prognostisch gut und eine Filialisierung eher unwahrscheinlich. Bei einem Durchmesser von 19 mm handelt es sich aber bereits um ein Tumolvolumen von $4,5 \text{ cm}^3$. Kommt nun eine ungünstige Tumorbiologie hinzu, so ist von einer bereits stattgehabten Metastasierung auszugehen die man aber möglicherweise in der Bildgebung nicht oder noch nicht sieht.

Kann nun neben dem etablierten Staging auch eine valide Aussage über Tumorresiduen im Blut und Knochenmark getroffen werden, ermöglicht das eine

noch bessere Risikoeinschätzung und erlaubt zusammen mit den neuen Biomarkern eine adäquatere Therapieentscheidung.

Einzelzellen, die sich vom Primärtumor loslösen und sich über das Blutgefäßsystem oder die Lymphe im Körper verteilen, werden als zirkulierende Tumorzellen (CTC's) bezeichnet [21]. Diese Zellen werden zur disseminierten Tumorzellen (DTC's), wenn sie in das Knochenmark übergehen und dort nachweisbar sind [22-27].

Diese im Körper auch nach operativem Vorgehen noch bestehende Resterkrankung, die bildmorphologisch nicht faßbar ist, nennt man MRD (minimal residual disease).

Bereits im Jahre 1869 hat Thomas Ashworth [28] bei einem Patienten, der an einer metastasierten Tumorerkrankung verstorben war, Tumorresiduen im Blut nachgewiesen. Retrospektive Analysen haben gezeigt, dass das Auftreten von CTC's bei Tumoren epithelialen Ursprungs mit einer schlechteren Prognose [21, 29] und einem verkürzten Gesamtüberleben (OAS) einhergehen [30-34]. Diesen Daten ist es geschuldet, dass das Auftreten von CTC's im Blut und DTC's im Knochenmark bereits im internationalen Tumorstagingssystem [35, 36] berücksichtigt wurde. Patienten die weder klinisch noch bilddiagnostisch Anhalt auf eine Filialisierung haben, jedoch CTC's oder DTC's nachgewiesen werden konnten, sind gemäß des 7th AJCC Breast Cancer Staging Manual, nicht mehr als M0 zu werten. Hierbei kommt aber nicht die Nomenklatur „M1“ zur Anwendung, sondern M(i+) [37].

I. Nachweismethode für zirkulierende Tumorzellen (CTC's) / disseminierte Tumorzellen (DTC's)

Die Gewinnung von Proben aus dem Knochenmark (DTC's) ist vergleichbar mit der Gewebsbiopsie aus anderen Organen. Es handelt sich hierbei um eine invasive Untersuchung, die, wenn nicht in Vollnarkose im Rahmen der Tumoroperation auch unter Lokalanästhesie als sehr unangenehm und schmerzhaft empfunden wird, und darum nur im Rahmen klinischer Untersuchungen eingesetzt werden kann [38]. Im Gegensatz dazu ist der Nachweis von CTC's im peripheren Blut gut mit einer Routineblutabnahme kombinierbar. Jedoch ist die Detektion der CTC's aufgrund des

ungünstigen Verhältnisses zwischen Tumorzellen und anderen Blutzellen (1 auf 10^{6-7} Zellen) [39] technisch schwierig.

Bis heute gibt es nur eine gut etablierte und von der amerikanischen Zulassungsbehörde (FDA) genehmigte Methode zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen beim metastasierten Brustkrebs. Mit Hilfe einer immunomagnetischen Anreicherung und Färbung von speziellen Markern an der Zelloberfläche von epithelialen Zellen können mit dem CellSearch[®] System der Firma Veridex LLC (Veridex Web Page) CTC's mit hoher Spezifität und Reproduzierbarkeit nachgewiesen werden [40-42].

Die meisten anderen bekannten Methoden zur Diagnostik zirkulierender Tumorzellen nutzen den Oberflächenmarker EpCAM [38, 43].

So spielt in der aktuellen CTC Forschung der Adna-Test [44], das Auto- MACS (magnetic activated cell sorting) system, die CTC Chip Technologie [44-48], und die Anreicherung epithelialer Zellen mittels Dynabeads[®] eine entscheidende Rolle neben dem CellSearch[®] system. Eine andere Möglichkeit zur Anreicherung von Tumorzellen aus Blutproben stellt die Entfernung der Leukozyten mit Hilfe eines Antikörpers gegen den Pan-Leukozytenmarker CD45 dar. Diese Methode findet in der Dynabeads[®] CD45-Technik (Invitrogen), OMS und RosetteSep-Applied Imaging Rare Event (RARE) System [49] Anwendung.

Man kann CTC's und DTC's aber auch durch ihre, von normalen Blutzellen stark verschiedene Größe anreichern bzw. isolieren, was die Grundlage der Membran Microfilter und in der FAST Cytometry (FACS) [50] ist.

Vor kurzem wurde eine neue Methode das "CTC-iChip" publiziert die es möglich machen soll CTC's unabhängig von Tumor- Oberflächenepitopen sehr spezifisch zu detektieren [51].

All diese Methoden, das CellSearch[®] System eingeschlossen, müssen aber noch in großen klinischen Studien ihre klinische Relevanz belegen, vor allem da sie auch mit einem großen personellen und finanziellen Aufwand verbunden sind [52].

Abschließend ist noch zu erwähnen, dass die Erforschung von CTC's und DTC's in den nächsten Jahren durch das, noch in Entwicklung befindliche, Feld der cfDNA (cell free DNA) Analysen bereichert werden wird, das uns möglicherweise neue und bisher noch nicht bekannte Einblicke in die Krebsforschung ermöglicht [53, 54].

II. Methodischer Ansatz dieser Forschungsarbeit

Diese Arbeit greift die molekulare Detektion von CTC's mit Hilfe der hoch sensiblen Real-Time PCR auf, die auch im bereits erwähnten Adna-Test [44] Anwendung findet. Hierbei wird ausgenutzt, dass zirkulierende Tumorzellen epithelialen Ursprungs sind und aus diesem Grund andere Genexpressionsmuster aufweisen als die umgebenden Blutzellen, die mesenchymalen Ursprungs sind [55]. CTC-positive Blutproben haben somit für einige Gene eine andere Genexpression als Blut gesunder Patienten (Negativkontrolle) bei denen keine CTC's nachgewiesen werden können.

Die Real-Time PCR ist eine Variante der Polymerase-Ketten-Reaktion, in der die Amplifikation eines bestimmten Gens durch einen Anstieg der Fluoreszenz während der PCR Reaktion gemessen werden kann. Sogenannte Reporter Moleküle (z.B. der interkalierende DNA-Farbstoff Sybr-Green) werden dafür der Reaktion beigegeben und während dem Ablauf der PCR-Reaktion in das neue entstehende DNA-Molekül eingebaut, und ergeben dadurch ein Fluoreszenz-Signal [56]. Um die Ergebnisse der Real-Time PCR statistisch auszuwerten gibt es die Möglichkeit der absoluten und relativen Quantifizierung. Für die absolute Quantifizierung muss im Vorfeld eine Standardkurve erstellt werden, die sehr arbeitsaufwendig aber für die Auswertung unabdingbar ist. Für die relative Quantifizierung benötigt man lediglich eine Referenzprobe, meist ein sog. „housekeeping gene“ wie GAPDH oder beta-Aktin, das in der PCR-Reaktion mitläuft und ubiquitär hoch exprimiert ist [57]. Gegen die, von diesem Gen emittierte Fluoreszenz wird die Fluoreszenz des zu untersuchenden Gens normalisiert.

Ist nun so ein Zielgen (target gene) hoch exprimiert, steigt die Zahl der amplifizierten DNA Fragmente rasch an. Das Fluoreszenz Signal steigt somit auch sehr schnell und erreicht den Schwellenwert schneller, als bei Genen die nicht so stark exprimiert sind. Die Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind, bis ein Gen den Schwellenwert erreicht nennt man Ct-Wert. Ein kleiner Ct-Wert steht also für ein hoch exprimiertes Gen. Der Ct-Wert des Zielgenes wird mit Hilfe des Ct-Wertes des Referenzgens normalisiert. Der sich aus dieser Zuordnung ergebende Betrag nennt sich ΔCt -Wert und wird wiederum in Bezug zu einer Kontrollprobe gesetzt. Daraus ergibt sich dann der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert der, die Grundlage für die relative Quantifizierung (RQ) ist, die mit Hilfe der, von Livak et al. veröffentlichten Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ berechnet werden kann [58].

Ist dieser Wert >1 ist das untersuchte Gen in Bezug auf eine Kontrolle hochreguliert, ist es <1 dann hat es eine niedrigere Expression als das Kontrollgen.

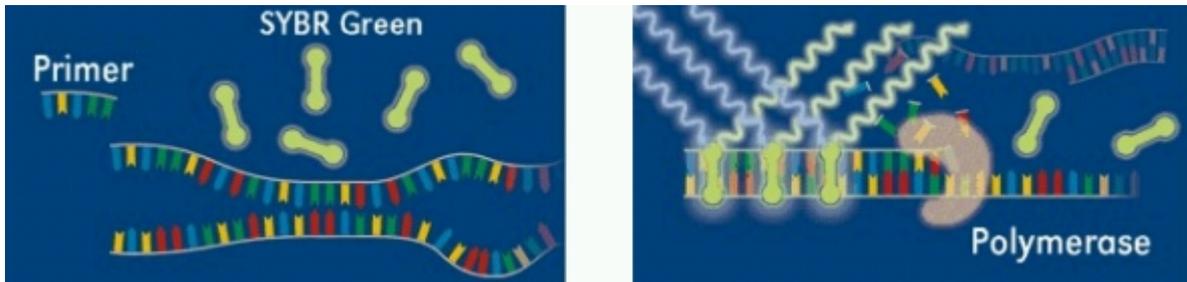


Abb.02: Schematischer Ablauf der Sybr-Green basierten Real-Time PCR.

Eine noch sensiblere Variante der Real-Time PCR ist die TaqMan PCR [59] die von der Cetus Corporation (Berkeley, CA, USA) im Jahre 1991 entwickelt wurde. Das Besondere an der TaqMan PCR ist, dass außer den beiden genspezifischen Primern der Reaktion noch eine weitere, ebenfalls genspezifische Sonde hinzugefügt wird, die an einem Ende ein sog. „Reporter“- am anderen Ende ein „Quencher“-molekül trägt. Sind beide Moleküle an der TaqMan Sonde gebunden wird über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) die Fluoreszenz des Reporters durch den Quencher unterdrückt. Bindet diese Sonde jedoch an die komplementäre Zielsequenz und läuft die PCR-Reaktion ab, wird durch die 5'–3' Exonuclease-Aktivität der Polymerase der Reporter entfernt, beginnt zu leuchten und die Fluoreszenz wird dann vom Real-Time PCR Gerät aufgezeichnet. Ähnlich wie TaqMan-Sonden funktionieren auch z.B. Molecular Beacon Primer.

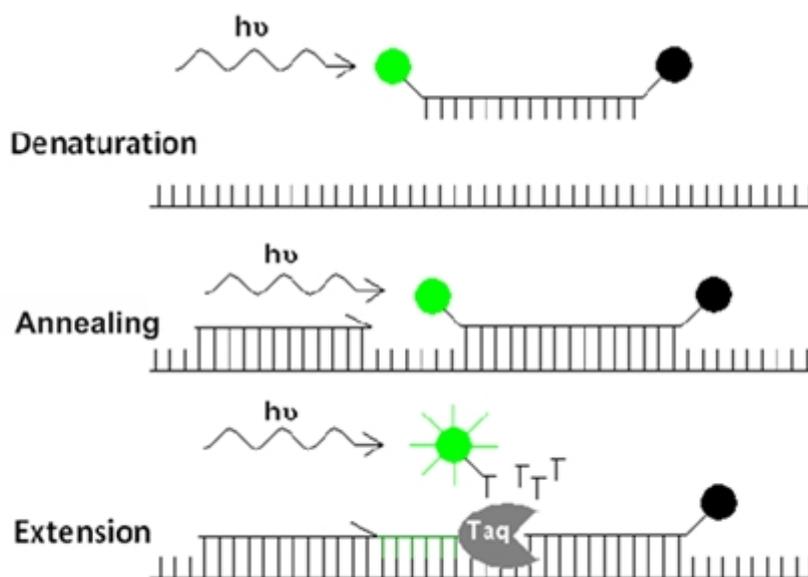


Abb. 03: Der Ablauf einer Real-Time PCR mit TaqMan®-Sonde

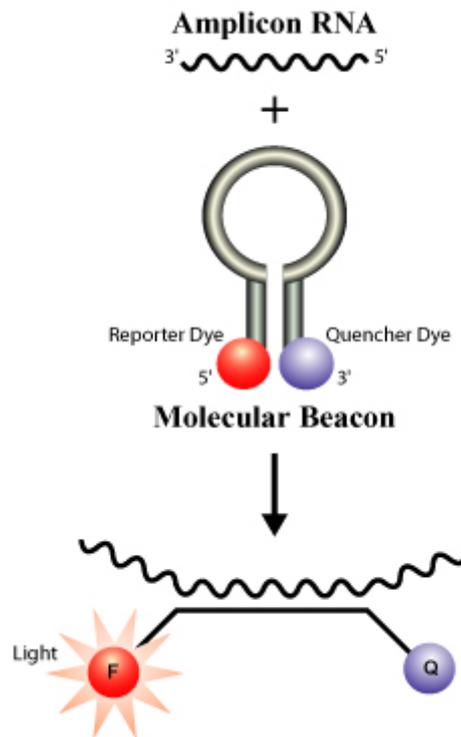


Abb. 04: Molecular Beacon Sonden

III. Markergene für die CTC Detektion

In dieser Arbeit wurden für die TaqMan® PCR sechs Markergene verwendet, die nach eingehender Literaturrecherche, in Brustkrebszellen hochreguliert zu sein scheinen. Um sicher zwischen Blutzellen und zirkulierenden Tumorzellen unterscheiden zu können, wurden die, nur auf epithelialen Zellen exprimierten Cytokeratin -8, -18 und -19 Gene (CK8, CK18, CK19) verwendet, die auch in der immunozytochemischen Färbung (APAAP – Färbung) routinemäßig in der Tumordiagnostik Einsatz finden [60, 61]. Als weitere Mammakarzinommarker wurde Mammaglobin (MGL) ausgewählt das ausschließlich in der reifen Brustdrüse gebildet wird und im Tumor hochreguliert ist [62]. Synuclein gamma, oder auch Breast Cancer Specific Protein (BCSP) genannt, ist bei ausgedehntem Tumorgeschehen mit Infiltration des umgebenden Gewebes besonders stark exprimiert und wird auch als Marker für Tumorrezidive und Metastasenbildung in der Literatur beschrieben [63-66]. Die klinische Relevanz dieses Markers liegt in der Tatsache, daß BCSP positive/BCSP hochregulierte Zellen eine gewisse Chemotherapieresistenz, im Speziellen gegen Taxane aufweisen [67, 68]. Der sechste Marker ist c-erbB2 (Her2),

dieses Oberflächenprotein wird in 20% aller Brustkrebstumore exprimiert und ist mit einem prognostisch deutlich schlechteren Tumorgeschehen verbunden [69-71]. Her2 bietet jedoch auf der anderen Seite mit Hilfe spezifischer monoklonalen Antikörpern auch einen sehr guten und inzwischen etablierten therapeutischen Ansatz und hat darum in der CTC Detektion ebenfalls einen direkten klinischen Bezug [72-74]. In neueren Publikationen bezüglich seiner Verwendung in der Real-TimePCR zeigte dieser Marker aber auch eine Verbesserung in Sensitivität und Spezifität der CTC Erkennung, aber auch in der Prädiktion [75, 76].

IV. Zielsetzung dieser Forschungsarbeit

Tumorresiduen im Blut und Knochenmark von Brustkrebspatienten sind, wie bereits eingehend beschrieben, seit einiger Zeit im Fokus der Brustkrebsforschung. Untersuchungen bei adjuvanten Brustkrebspatienten ohne Fernmetastasen haben das Vorkommen von zirkulierenden Tumorzellen (CTC's) im peripheren Blut und disseminierten Tumorzellen (DTC's) im Knochenmark gezeigt. Leider lassen sich Residuen mit den heute etablierten Methoden nur schwierig und mit großem finanziellem und personellem Aufwand nachweisen. Die Diagnose „Micro-Metastase“ im Blut könnte uns aber helfen, das systemische Risiko der Patientin sofort richtig einzuschätzen und ggf. die Therapie richtigerweise mit einer neoadjuvanten Chemotherapie noch vor der Tumoroperation zu beginnen. Ist es möglich, valide und zuverlässig diese Residuen zu detektieren, wäre damit neben der primären Risikoeinschätzung möglicherweise auch ein Therapiemonitoring und eine Verlaufskontrolle in der Nachsorge möglich.

Aus diesem Grund beschäftigt sich diese wissenschaftliche Arbeit mit der Frage, ob CTCs aus Blutproben von Brustkrebspatientinnen mittels Real-Time PCR nachgewiesen werden können. Nebst der erhofften Spezifität und Sensitivität wäre dies eine kostengünstige Methode, da die dafür notwendige apparative Ausstattung in jedem größeren Forschungslabor einer medizinischen Einrichtung vorhanden sein müsste.

Für diese Untersuchung wurde peripheres Blut von adjuvanten und metastasierten Brustkrebspatientinnen im Rahmen der geplanten Brustkrebsoperation entnommen

und die Expression bestimmter Markergene mit Hilfe der Real-Time PCR untersucht. Die Genexpressionsmuster der Tumorpatienten wurden mit Blutproben von 20 gesunden Probanden (Kontrollgruppe) verglichen. Der Gedanke hinter diesem Projekt ist, durch den Vergleich zwischen drei Probandengruppen eine Markersignatur zu finden mit der man nicht nur sicher CTC's mittels Real-Time PCR detektieren, sondern auch noch einen klinischen Bezug herstellen kann.

II. Material und Methoden

Zur Messung der Expression bestimmter Markergene musste zunächst die entsprechende Zellfraktion über Dichtegradientenzentrifugation angereichert werden, daraus die RNA isoliert und über Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Für einige der zu untersuchenden Gene wurde dann zunächst eine Nested PCR durchgeführt und die daraus resultierenden PCR-Produkte in die Real-Time PCR eingesetzt, die anderen Gene wurden ohne Zwischenschritt in die Real-Time PCR eingesetzt. Für diese Gene wurden kommerziell erworbene TaqMan® Primer verwendet, für die Gene, die mit Nested PCR vorbehandelt wurden, wurden selbst erstellte Sonden verwendet. Die Auswertung erfolgte über die, dem Real-Time PCR-Gerät zugehörigen Software.

I. Blutproben & Anreicherung der Leukozyten

Zunächst musste von der Ethikkommission der LMU München die Erlaubnis zum Sammeln der Blutproben von Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe eingeholt werden. Ein entsprechender Antrag (s. IX.) und ein dementsprechendes Aufklärungsschreiben für die Patientinnen wurden bei der Ethikkommission eingereicht und dem Antrag wurde statt gegeben. Das Ethikvotum trägt die Kennziffer LMU 148-12.

Material:

- EDTA-Röhrchen
- Butterfly, Stauschlauch, Alkohol, Sterile Tupfer
- PBS
- 50ml Falcon Röhrchen
- Histopaque 1077
- Tischzentrifuge
- Glaspipetten
- Pipettierhilfe
- -80°C Gefrierschrank

Methode:

Von 20 gesunden Probanden, 14 adjuvanten und 11 metastasierten Brustkrebspatientinnen wurden, nach Unterschreiben der Einverständniserklärung des Ethikvotums, 20ml Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Das Blut eines Probanden bzw. einer Patientin wurde dann in einem 50 ml Falcon Röhrchen vereinigt, mit PBS auf ca. 30 ml aufgefüllt und vorsichtig, um die Vermischung der Phasen zu vermeiden, über 20 ml Histopaque geschichtet. Die Röhrchen wurden bei 400x g 25 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei trennen sich die Bestandteile des Blutes entsprechend ihrer Dichte, es bildet sich der sog. Buffy Coat, der die Leukozyten und auch die möglicherweise vorhandenen CTCs, beinhaltet. Der Buffy Coat wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Falcon Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und bei 250 x g 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und somit gewaschen. Der Überstand über dem Zellpellet wurde verworfen und das Pellet in PBS gelöst, dann wurde der Waschschrift wiederholt. Nach dem zweiten Waschen wurde das Pellet über Kopf getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

II. RNA Isolierung

Die RNA Isolierung erfolgt nach der Methode einer Phenol-Chloroform Extraktion. Mit Hilfe des Reagenzes Trizol werden die Zellen aufgebrochen, Proteine ausgefällt und die übrigen Zellbestandteile abgetrennt. In Lösung bleibt die Gesamt-RNA der eingesetzten Zellen. Diese kann dann durch die Zugabe von Isopropanol gefällt und mit Ethanol gewaschen werden. So aufbereitet kann sie für weitere Experimente verwendet werden, zuvor muss jedoch photometrisch die RNA-Menge und ihre Reinheit gemessen werden und mittels denaturierender Formaldehyd-Agarosegel Elektrophorese überprüft werden, ob die RNA durch die Isolierung degradiert wurde.

1. RNA-Isolierung

Material:

- Zellpellet
- Trizol LS
- Eppendorf-Tubes
- Chloroform
- Tischzentrifuge
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Isopropanol
- Glycogen
- 75% Ethanol
- DEPC-behandeltes Wasser
- -20°C Gefrierschrank

Methode:

Das Zellpellet, das aus der Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und bei -80°C gelagert wurde wird auf Eis auftauen gelassen. Dann wurde das Zellpellet in 1 ml Trizol LS gelöst, in Eppendorf-Tubes überführt, 0,2 ml Chloroform dazu gegeben und gut gemischt. Nach einer kurzen Inkubation der Lösung auf Eis wurde nochmals gut gemischt und bei 12.000x g 15 min bei 4°C zentrifugiert. Danach konnte man in den Tubes drei Phasen erkennen, von denen die obere, klare Phase mit einer Pipette vorsichtig abgenommen wurde und in ein neues Eppendorf-Tube, in dem bereits 0,5 ml Isopropanol und 2,5 µl Glycogen vorgelegt worden waren, überführt. Die Lösung wurde nochmals gut gemischt und bei -20°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen bei 12.000 x g 10 min. bei 4°C zentrifugiert um die RNA auszufällen. Der Überstand über dem, oft schlecht sichtbaren, RNA Pellet wurde vorsichtig entfernt und das Pellet zweimal durch Zugabe von 1 ml kaltem 75% Ethanol und Zentrifugation bei 12.000 x g 10min bei 4°C gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde der Alkohol möglichst vollständig entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und dann in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die RNA kann dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C, besser -80°C gelagert werden.

2. Messung der RNA Konzentration und Reinheit

Material:

- RNA-Proben
- Wasser zum Kalibrieren des Gerätes
- Photometer
- Pipetten
- Pipettenspitzen

Methode:

Mit Hilfe eines Photometers (Modell Nanodrop, Fa. Implen, München) wurde die Konzentration der isolierten RNA bestimmt. Dazu werden 4 µl der RNA in den Applikator des Gerätes pipettiert und die Messung gestartet. Das Gerät wurde vorher mittels einer Leerprobe (Wasser; generell: Lösungsmittel der RNA) kalibriert. Aus der optischen Dichte der jeweils zu messenden Probe bei 260 nm kann dann die Konzentration der Probe berechnet werden. Der Quotient aus den optischen Dichten der Probe bei 260 nm und 280 nm gibt die Reinheit der RNA von Proteinen an. Dieser Wert sollte bei 1,7 bis 1,9 liegen, um die Probe für weitere Experimente einsetzen zu können.

3. Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Material:

- Ca. 1 µg RNA in max. 2,2 µl Volumen
- Agarose
- 10 x MOPS Puffer
- Formaldehyd (37%)
- Gelkammer /-schlitten /-kamm
- Spannungsgeber
- Formamid

- Sybr Green(1:100 in DMSO)
- Auftragspuffer
- Geldok-System
- Heizblock
- Pipetten
- Pipettenspitzen

Methode:

0,6 g Agarose wurden in 43,5 ml Wasser aufgekocht, auf Handwärme abgekühlt, 5 ml 10 x MOPS und 1,5 ml Formaldehyd zugegeben und in den Gelschlitten (mit Kamm) gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel bis zur Verwendung in Laufpuffer (= 1 x MOPS) aufbewahrt. Die RNA-Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: Die RNA wurde mit 5 µl Formamid, 1,7 µl Formaldehyd und 5 µl 10x MOPS versetzt. Dann wurde 1 µl Sybr Green zugegeben und die Mischung 15 min. auf 65°C inkubiert. Anschließend wurde noch 1 µl Auftragspuffer zugegeben und die Mischung in die Taschen des Gels eingefüllt. Das Gel läuft bei 45 V und 100 mA ca. 1 Stunde. In dieser Zeit muss der Lauf 2-3 mal kurz unterbrochen und der Puffer aus beiden Seiten der Gelkammer vermischt werden, um die Bildung eines zu starken pH-Gradienten zu verhindern. Nach dem Lauf kann das Gel sofort fotografiert werden. Ist die RNA nicht degradiert und damit für weitere Experimente brauchbar, sieht man im Gel zwei deutliche Banden, die von der 18S rRNA und der 28S rRNA stammen, wobei die obere Bande (28S rRNA) in etwa doppelt so dick sein soll wie die untere (28S rRNA). Verlaufen die Banden zu stark wird von einer weiteren Verwendung der RNA abgesehen.

III. Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkription wurde die RNA in Erststrang-cDNA umgeschrieben. Dafür wurde ein Kit der Firma Invitrogen verwendet (Super Script™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR), das bereits alle notwendigen Reagenzien enthält: Der „Enzym-Mix“ enthält die SuperScript™ Reverse Transkriptase, die eine Abwandlung der M-MLV Reversen Transkriptase darstellt, jedoch hitzebeständiger ist und in ihrer RNase Aktivität reduziert wurde [77, 78], und einen RNase Inhibitor, der die Degradation der RNA während der Umschreibung Reaktion verhindert. Der „Reaction Mix“ enthält die notwendigen Primer, hauptsächlich Oligo(dT)₂₀ Primer, die an das Poly-A Ende der mRNA binden und somit sicherstellen, dass nur die mRNA umgeschrieben wird. Zu einem wesentlich geringeren Prozentsatz waren auch Random-Hexamer-Primer enthalten, die für den Fortgang der Reaktion wichtig sind. Weiterhin enthält der „Reaction Mix“ MgCl₂ als Stabilisator für die Reverse Transkriptase und natürlich dNTPs. Als weitere Komponente ist in dem Kit noch eine E.coli RNase H enthalten, die nach Ende der eigentlichen Umschreibereaktion zugegeben wird und cDNA:RNA Dimere abbaut.

Material:

- Isolierte RNA (5 µg in max. 8 µl)
- Super Script™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR-Kit
- Pipetten
- Pipettenspitzen
- Hotblock: 25°C, 42°C, 85°C, 37°C

Methode:

Zur isolierten RNA wurden 10 µl des „Reaction Mixes“ und 2 µl des „Enzyme Mixes“ gegeben und das Reaktionsvolumen auf 20 µl mit DEPC-behandeltem Wasser eingestellt. Die Mischung wurde 10 min. bei 25°C und anschließend 50 min. bei 42°C inkubiert. Danach wurde die Reverse Transkriptase durch Inkubation bei 85°C für 5 min. denaturiert und der Ablauf der Reaktion damit gestoppt. Die Proben wurden kurz auf Eis gestellt, dann wurde die RNase H zugegeben und die

Reaktionsansätze nochmals 20 min. bei 37°C inkubiert. Die cDNA kann dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

IV. Nested PCR

Bei der sog. "nested" PCR handelt es sich um eine hochspezifische Form der Polymerase-Kettenreaktion. Dafür sind zwei getrennte PCR Reaktionen nötig: In der ersten PCR werden Primer, die spezifisch für das zu amplifizierende Gen sind, verwendet. In der nachfolgenden Reaktion werden dann Primer eingesetzt, die innerhalb des bereits amplifizierten Bereichs der ersten PCR liegen. In der hier nachfolgend beschriebenen Reaktion wurden in der zweiten Reaktion Primer eingesetzt, die zusätzlich eine TaqMan Sonde für den Real-Time-PCR Nachweis haben. Mit Hilfe der Nested PCR können somit Gene bzw. Genprodukte nachgewiesen werden, die in geringer Anzahl im Vergleich zum gesamten Reaktionsansatz vorhanden sind.

Material:

- cDNA aus der Reversen Transkription
- Primer gegen CK8, CK19 und BCSP (s. Tabelle 1)
- Nuclease-freies Wasser
- PCR Mastermix (Promega)
- Eppendorf Mastercycler
- Pipetten
- Pipettenspitzen

Methode:

Zu 1 µl der vorbereiteten cDNA wurde 1 µl der Primer, 10,5 µl nuclease-freies Wasser und 12,5 µl des PCR-Mastermixes gegeben. Die Proben wurden in dem Eppendorf Mastercycler inkubiert, der Verlauf der PCR ist in Tabelle 2 dargestellt. Das PCR-Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung auf -20°C gelagert.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
CK8	5'-cgtcaagctgctggac-3'	5'-aggctgtagcggccgg-3'
CK19	5'-gcctggttcaagccgg-3'	5'-ctcctgattcccgtc-3'
BCSP	5'-acactgtgtggccaagac-3'	5'-ccactctgggtctgcc-3'

Tab. 04: Primer für die nested PCR

Schritt	Parameter	Anzahl Zyklen
1	98°C, 30sec	1
2	98°C, 15sec 57°C, 30sec 72°C, 2min	34
3	72°C, 5min	1

Tab. 05: Verlauf der PCR Reaktion

V. Real Time PCR

Mit Hilfe der Real Time PCR wird, sowohl relativ als auch absolut, die Menge eines DNA- Abschnittes in einer nucleinsäurehaltigen Lösung bestimmt. Dabei werden während der Amplifikationsreaktion Partikel in die neu synthetisierte DNA eingebaut, die dann fluoreszieren. Der Anstieg der Fluoreszenz, der somit proportional zur Menge an synthetisierter DNA ist, wird bei jedem Zyklus der PCR aufgezeichnet. Aus den so generierten Daten wurden Rückschlüsse über die anfangs vorhandene DNA-Menge gezogen.

Hier wurde eine besondere Form der Real-Time PCR verwendet, die TaqMan PCR. Hierzu liegen die fluoreszierenden Moleküle, die in die DNA eingebaut werden könnten nicht im Reaktionsansatz vor, anstatt dessen enthält der Ansatz außer den genspezifischen Primern für das zu untersuchende Gen noch eine sog. Hydrolyse- oder TaqMan Sonde. Auch diese zusätzliche Sonde ist spezifisch für das zu untersuchende Gen und ist an zwei Moleküle gekoppelt: den "Reporter" und den „Quencher“. Dabei handelt es sich bei dem Reporter um ein Molekül mit Fluoreszenzeigenschaften, die Fluoreszenz wird aber vom Quencher-Molekül unterdrückt. Erst wenn die Sonde an die geeignete Stelle in der DNA bindet, wird durch die 5`-3`Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase das Reporter-Molekül

abgespalten und beginnt zu fluoreszieren. Somit wird mit der TaqMan PCR eine noch höhere Spezifität erreicht, als mit der herkömmlichen Real-Time PCR.

Die kommerziell erworbenen TaqMan-Primer haben laut Herstellerangaben eine PCR-Effizienz von $100\% \pm 10\%$, für die selbst designten Primer musste die PCR-Effizienz mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt werden.

1. Messung der PCR-Effizienz

Material:

- Nested PCR Produkt; Verdünnungsreihe
- Selbst designte Primer (CK8, CK19, BCSP, B2M)
- 96-Well Real Time PCR Platte
- TaqMan PCR Mastermix
- PCR-Wasser
- Abdeckfolie für die Real Time PCR Platte
- Pipetten
- Pipettenspitzen
- 7500 Fast Real Time PCR Gerät

Methode:

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine absolute Quantifizierung der Genexpression durchgeführt. Dabei wurden in die Real-Time PCR Platte für jedes zu untersuchende Gen 1 μl von Verdünnungen des Ausgangsmaterials (nested PCR-Produkt) über 5 Zehnerpotenzen gegeben (also unverdünntes nested PCR-Produkt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000 verdünntes nested PCR-Produkt). Dazu wurden 1 μl des jeweiligen Primers (s. Tabelle 4), 8 μl PCR-Wasser und 10 μl des TaqMan Mastermixes pipettiert, die Platte mit der Abdeckfolie abgedeckt und im Real Time PCR Gerät analysiert. Aus den von der Software ausgegebenen Kurven werden in Microsoft® ExcelTM Eichkurven erstellt, mit deren Hilfe dann auch die PCR Effizienz errechnet werden konnte.

2. Durchführung der Real-Time PCR

Material:

- Vorbereitete cDNA bzw. Nested-PCR-Produkt
- Non-Template und –RT Kontrollen
- 96-Well Real Time PCR Platte
- Kommerzielle TaqMan Primer (CK18, Her-2, MGL, GAPDH)
- TaqMan PCR Mastermix
- PCR-Wasser
- Selbst designte Primer (CK8, CK19, BCSP, B2M)
- Abdeckfolie für die Real Time PCR Platte
- Pipetten
- Pipettenspitzen
- 7500 Fast Real Time PCR Gerät

Methode:

Die Real-Time PCR Reaktionen wurden für jedes Gen in vierfacher Ausführung durchgeführt. Zunächst wurde 1 µl der hergestellten cDNA bzw. des Nested PCR Produktes in die entsprechenden Vertiefungen der 96-Well Platte gegeben. Dazu wurden 1 µl des jeweiligen Primers (s. Tabellen 06 und 07), 8 µl PCR-Wasser und 10 µl des TaqMan PCR Mastermixes gegeben. Für das Referenzgen B2M wurde dieselbe Mischung, jedoch mit einem FAM-Tamra Primer Mix verwendet. Nachdem alle Wells der Platte befüllt worden waren, wurde die Platte mit der Abdeckfolie versiegelt und die Proben im Real Time PCR Gerät analysiert. Dafür wurde das in Tabelle 08 dargestellte Programm verwendet. Die Fluoreszenz wird von dem Gerät bei jedem PCR Zyklus gemessen und von der zugehörigen Software (SDS V. 1.3.1) dargestellt. Für die Negativkontrollen (Non-Template Kontrolle, -RT-Ansatz) ergaben sich keine Fluoreszenzsignale.

Gen	Bezeichnung (ABI)
CK 18	Hs_01920599_gH
Her-2	Hs_00170433_m1
MGL	Hs_00419570_m1
GAPDH	Hs_99999905_m1

Tab. 06: kommerziell erworbene TaqMan Primer (Applied Biosystems)

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	TaqMan Sonde
B2M	5'-ggccgagatggctccg-3'	5'-gatgaaaccccatagc-3'	5'-aggctatccagattca-3'
CK8	5'-cctacaggaagctgga-3'	5'-gctcagaccaatagcc-3'	5'-ggagagccggggagtc-3'
CK19	5'-ccgaggttacacctgc-3'	5'-gatcagcgccgatatg-3'	5'-ctgagcatgagctgcc-3'
BCSP	5'-ggagaacatcgtcacc-3'	5'-ggatgcctcactcctg-3'	5'-tgcgcaaggagaggcc-3'

Tab. 07: selbst designte TaqMan Primer

Schritt	Parameter	Anzahl Zyklen
1	95°C, 20sec	1
2	95°C, 3sec 60°C, 30sec	40

Tab. 08: Ablauf der Real Time PCR

VI. Auswertung

Die erhaltenen Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe der SDS-Software ausgewertet. Das Programm berechnet die CT-, Δ CT-, $\Delta\Delta$ CT-Werte und ermittelt daraus die Werte der relativen Genquantifizierung nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Formel [58]. Die so gewonnenen Daten wurden dann exportiert und in Microsoft® Excel™ entsprechende Graphiken daraus erstellt.

Gene werden dabei als hochreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe bezeichnet, wenn ihr relativer Genexpressionswert (RQ) >1 , als herabreguliert wenn der RQ-Wert <1 ist.

VII. Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmaterial

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz
Agarose	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Auftragspuffer	New England Biolabs Inc.	Ipswich, Massachusetts, USA
Chloroform p.a.	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
DEPC-H ₂ O	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
Ethanol p.a.	Mallinckrodt Baker B.V.	Deventer, Niederlande
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, Missouri, USA
Formamid	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Glycogen	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, Missouri, USA
Isopropanol p.a.	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
MOPS	Sigma-Aldrich Corporation	St. Louis, Missouri, USA
Nested-PCR Primer	Eurofins MWG Operon	Ebersberg, Deutschland
Nuclease-freies Wasser	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG	Darmstadt, Deutschland
PCR-Mastermix	Promega	
Real-Time Primer	Eurofins MWG Operon	Ebersberg, Deutschland
SuperScript III First Strand Synthesis Super Mix for qPCR	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
Sybr Green	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
TaqMan Fast Universal PCR Mastermix (2x), No AmpErase UNG	Applied Biosystems	Carlsbad, Kalifornien, USA
TaqMan Gene Expression Assays	Applied Biosystems	Carlsbad, Kalifornien, USA
Trizol LS	Ambion	Carlsbad, Kalifornien, USA

Tab. 09: Chemikalien

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Gefrierschrank -20°C	Bosch Cooler	Robert Bosch GmbH	Gerlingen, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Hera Freeze	Thermo Electron Corporation	Waltham, Massachusetts, USA
Geldokumentations-System	GelDok TM XR+	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Gelkammer und Zubehör	Agagel Standard	Biometra GmbH	Goettingen, Deutschland
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Minizentrifuge	Centrifuge 5415	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
PCR-Gerät	Mastercycler Gradient	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Photometer	Nanodrop	Implen	München, Deutschland
Pipetten	Finnpipette F2; Volumina: 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Pipettierhilfe	Accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co KG	Wertheim, Deutschland
Real Time PCR Gerät	7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems	Carlsbad, Kalifornien, USA
Spannungsgeber	Consort E815	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Tischzentrifuge	Multifuge 3SR+/3L-R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

Tab. 10: Geräte

Material	Hersteller	Firmensitz
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0,1ml	Applied Biosystems	Carlsbad, Kalifornien,USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems	Carlsbad, Kalifornien,USA
Butterfly Vacutainer® Safety Lok™	Becton Dickinson and Company AG	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Vacutainer Blood Collection Tubes EDTA (K2) 18,0mg	Becton Dickinson and Company AG	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Multi Safe Seal Tubes, 1,5/1,7ml	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Falcon-Röhrchen, 50ml, 15ml	Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Oberösterreich
Glaspipetten, 10ml	SARSTEDT AG & Co.	Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
Pipettenspitzen, -10µl, -100µl, -1000µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland

Tab. 11: Verbrauchsmaterialien

III. Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der im vorigen Teil beschriebenen Versuche dargestellt werden. Dazu werden zunächst die relevanten Patientendaten vorgestellt, dann wird auf die Ergebnisse der RNA-Isolierung eingegangen und die Messung der PCR-Effizienz gezeigt. Als letztes werden die Ergebnisse der Real-Time PCR erörtert.

I. Patientendaten

Mit dem positiven Votum der Ethikkommission (Kennziffer LMU 148-12) konnte Blut von Brustkrebspatientinnen der Universitätsfrauenklinik München am Campus Innenstadt für Forschungszwecke abgenommen und analysiert werden.

Die Blutentnahme erfolgte bei 14 adjuvanten und 11 metastasierten Brustkrebspatientinnen über das Vacutainer®-System der Firma BD in EDTA-Röhrchen um eine Agglutination des Blutes zu verhindern. Pro Patientin wurden ca. 20ml Blut abgenommen. Als Kontrollgruppe für die Real-Time-PCR Experimente wurde 20 gesunden Probanden dieselbe Menge Blut entnommen und analog zum Patientenblut weiterbehandelt.

Die Brustkrebspatientinnen wiesen folgende Charakteristika in Bezug auf Staging und Hormonrezeptorstatus auf (Tabelle 12 und 13).

Patient	Histologie	T-Status	N-Status	Her2-Status	Östrogen-rezeptor-Status (%)	Progesteron-rezeptor-Status (%)
Adj.1	Inv. Ductal	pT2	pN3	+++	0	0
Adj.2	Inv. Ductal	pT1c	pN0	++	90	90
Adj.3	Inv. Ductal	pT2	pN0	-	90	90
Adj.4	Inv. Ductal	pT1c	pN0	-	95	90
Adj.5	Inv. Ductal	pT2	pN0	-	30	50
Adj.6	Adeno-squamös	pT3	pN0	+++	0	0
Adj.7	Inv. Ductal	pT1c	pN3a	+	80	50
Adj.8	Inv. Ductal	pT2	pN3a	+++	30	10
Adj.9	Inv. Ductal	pT2	pN0	+	0	10
Adj.10	Inv. Ductal	pT1c	pN0	++	90	60
Adj.11	Lobuläres Adenokarzinom	pT2	pN1	+	80	30
Adj.12	Inv. Ductal	pT2	pN0	-	90	30
Adj.13	Inv. Ductal	pT2	pN0	+	80	80
Adj.14	Inv. Ductal	pT1c	pN0	-	0	0

Tab. 12: Patientendaten adjuvanter Patientinnen

Patient	Histologie	T-Status	N-Status	Metastasen	Her2-Status	Östrogen-rezeptor-Status (%)	Progesteron-rezeptor-Status (%)
Met.1	Inv. Ductal	pT2	pN0	Leber, Knochen	-	0	0
Met.2	Inv. Ductal	pT2	pN0	Gehirn	+++	0	0
Met.3	Inv. Ductal	pT4	pN0	Knochen	+	0	0
Met.4	Inv. Ductal	pT4	pN1	Lunge	++	0	0
Met.5	Inv. Ductal	pT4	pN0	Lunge	+	60	40
Met.6	Inv. Ductal	pT1c	pN0	Knochen, Leber	-	0	0
Met.7	Inv. Ductal	pT2	pN0	Leber	+	0	0
Met.8	Inv. Ductal	pT3c	pN1	Leber, Knochen, Gehirn	-	0	0
Met.9	Inv. Ductal	pT3	pN0	Knochen	+++	20	10
Met.10	Inv. Ductal	pT2	pN1	Lunge, Knochen	-	30	10
Met.11	Inv. Ductal	pT1c	pN0	Knochen	-	90	70

Tab. 13: Patientendaten metastasierter Patientinnen

Aus dem anti-koagulierten Blut wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation über Histopaque 1077 die Leukozytenfraktion, in der sich auch die, möglicherweise vorhandenen, zirkulierenden Tumorzellen befinden, angereichert. Diese Zellfraktion wird durch zweimalige Zentrifugation mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

II. RNA-Isolierung

Die RNA Isolierung aus dem Zellpellet erfolgt über Phenol-Chloroform-Extraktion mit Hilfe des Trizol®- Reagenzes. Auch wenn Trizol® die Eigenschaft besitzt, wenigstens die zellulär vorhandenen RNasen zu inhibieren, muss dennoch bei der RNA Isolierung mit besonderer Sorgfalt gearbeitet werden, denn RNasen sind ubiquitär vorhanden und würden die isolierte RNA soweit degradieren, dass keine weiteren Versuche damit möglich wären. Eine Kontamination sollte also durch entsprechend vorsichtiges Arbeiten vermieden werden. Dennoch ist es nötig, die RNA nach der Isolierung auf ihre Unversehrtheit hin zu überprüfen. Weiterhin muss die Konzentration der isolierten RNA bestimmt werden, um bestimmen zu können, welche Menge in nachfolgende Experimente eingesetzt werden muss. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch, gleichzeitig wird noch die Ratio bestimmt, die ein Maß der Reinheit der RNA von Proteinen ist.

1. Bestimmung von Konzentration und Ratio der isolierten RNA

Konzentration und Ratio der RNA werden mit dem Nanodrop-Photometer der Firma Implen bestimmt. Die Ratio ist der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm und gibt die Reinheit der RNA von Proteinen an. Um die RNA in weitere Experimente einsetzen zu können sollte die Ratio zwischen 1,7 und 1,9 liegen (Tabelle 14, 15, 16).

Folgende Konzentration/Ratio wurde gemessen:

Patient / RNA	Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Ratio
Adj. 1	1,18	1,74
Adj. 2	0,38	1,86
Adj. 3	0,374	1,80
Adj. 4	0,949	1,82
Adj. 5	0,947	1,86
Adj. 6	0,575	1,91

Adj. 7	0,306	1,90
Adj. 8	0,729	1,90
Adj. 9	0,322	1,87
Adj. 10	0,628	1,75
Adj. 11	0,438	1,72
Adj. 12	0,566	1,77
Adj. 13	0,843	1,87
Adj. 14	1,026	1,81

Tab. 14: RNA-Konzentration und Ratio adjuvanter Patientinnen

Patient / RNA	Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Ratio
Met.1	1,3	1,78
Met.2	0,77	1,83
Met.3	0,85	1,90
Met.4	0,54	1,69
Met.5	0,66	1,75
Met.6	0,75	1,77
Met.7	0,308	1,89
Met.8	1,154	1,84
Met.9	1,386	1,91
Met.10	0,875	1,76
Met.11	0,657	1,84

Tab. 15: RNA-Konzentration und Ratio metastasierter Patientinnen

Proband / RNA	Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Ratio
Neg.1	3,22	1,81
Neg.2	1,88	1,75
Neg.3	3,06	1,77
Neg.4	2,07	1,79
Neg.5	2,53	1,74
Neg.6	0,704	1,91
Neg.7	1,844	1,85
Neg.8	2,69	1,83
Neg.9	0,61	1,78
Neg.10	1,04	1,74
Neg.11	1,69	1,79
Neg.12	0,837	1,80
Neg.13	2,789	1,69
Neg.14	2,38	1,78
Neg.15	2,576	1,75
Neg.16	3,63	1,84
Neg.17	2,76	1,89
Neg.18	0,543	1,90
Neg.19	0,983	1,72
Neg.20	1,325	1,76

Tab. 16: RNA-Konzentration und Ratio gesunder Probanden (Negativ-Kollektiv)

Die gemessenen Werte zeigen, dass alle RNAs in ausreichender Menge und Qualität vorliegen. Da die RNA in 20 μl DEPC-behandeltem Wasser gelöst ist, kann, notfalls durch Reduktion des Volumens mit Hilfe der Vakuumzentrifuge, die für die reverse Transkription benötigte Konzentration (5 μg in max. 8 μl) erlangt werden.

2. Überprüfung Integrität der RNA mittels Gelelektrophorese

Die Integrität der RNA lässt sich mittels denaturierender Agarosegel-Elektrophorese untersuchen. Ist die RNA im Isolierungsprozess intakt geblieben, zeigen sich im Gel zwei deutliche Banden: die obere Bande entspricht der 28S rRNA, die untere der 18S rRNA. Die beiden Banden sollten ungefähr ein Verhältnis von 2:1 aufweisen. Dann kann davon ausgegangen werden, dass die RNA nicht degradiert ist und für weitere Experimente verwendet werden kann.

Beispielhaft wird hier das Gel der RNA der metastasierten Patientinnen gezeigt (Abb. 05).

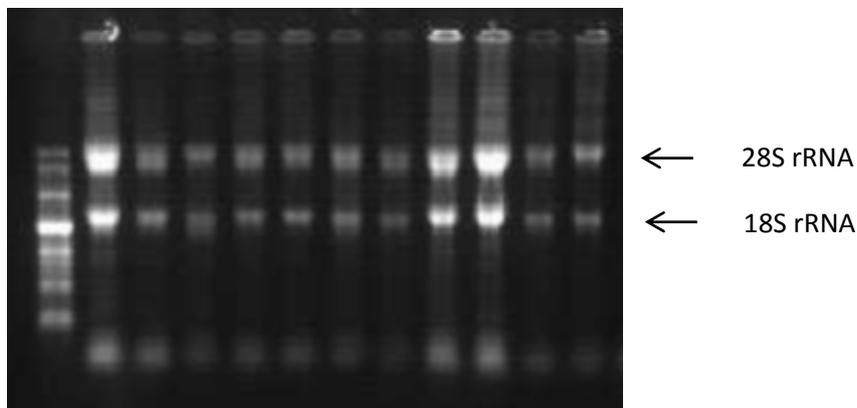


Abb. 05: Gel zur Überprüfung der RNA-Integrität.
RNA isoliert aus dem Blut metastasierter Brustkrebspatientinnen; V.l.n.r.: RNA Größenmarker, Met. 1, Met. 2, Met. 3, Met. 4, Met. 5, Met. 6, Met. 7, Met. 8, Met. 9, Met. 10, Met. 11.

Auch bei den RNAs der adjuvanten Patientinnen und der gesunden Probanden wurde darauf geachtet, dass die Banden der 28S rRNA und der 18S rRNA deutlich zu sehen sind und die RNA somit keine Degradierung aufweist, die für die anschließenden Experimente hinderlich wäre.

Die entstandenen Banden im Agarosegel der Proben der metastasierten Patientinnen entsprechen in Dicke und Helligkeit den photometrisch gemessenen Konzentrationen, was weiterhin für die gute Qualität der isolierten RNA spricht.

3. Messung der PCR-Effizienz

Die PCR-Effizienz ist ein Maß dafür, wie gut ein Gen mit einem bestimmten Primerpaar amplifiziert werden kann. Für die TaqMan-Primer, die bei Applied Biosystems erworben wurden, wird die PCR-Effizienz bereits vom Hersteller getestet und mit $100\% \pm 10\%$ angegeben. Die TaqMan Primer, die selbst erstellt wurden müssen jedoch auf ihre PCR-Effizienz hin getestet werden. Dazu wird eine Real-Time PCR mit den entsprechenden Primern und einer „Test- cDNA“ in verschiedenen Konzentrationen (Verdünnungen über 5 Log-Stufen) durchgeführt. Als „Test- cDNA“ kann eine cDNA z.B. aus Zelllinien-RNA verwendet werden. Es ist lediglich darauf zu achten, dass das zu untersuchende Gen von der Zelllinie exprimiert wird. Nach Ablauf der Real-Time PCR Reaktion wird für jede der eingesetzten Konzentrationen der CT-Wert bestimmt und daraus mittels Microsoft[®] Excel[™] eine Eichgerade erstellt, aus der dann die PCR Effizienz berechnet werden kann.

In Abb. 06 sind die CT-Werte der zu untersuchenden Gene bei den verschiedenen eingesetzten RNA-Konzentrationen gezeigt. Es ist zu sehen, dass das Referenzgen B2M, das ein „Housekeeping“-Gen ist, deutlich niedrigere CT-Werte, also einen höhere Expression aufweist, als die anderen drei untersuchten Gene.

Abb. 06a

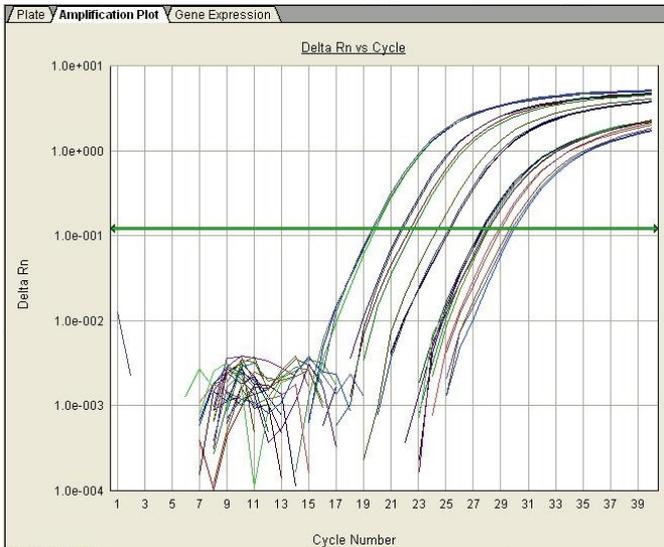


Abb. 06b



Abb. 06c

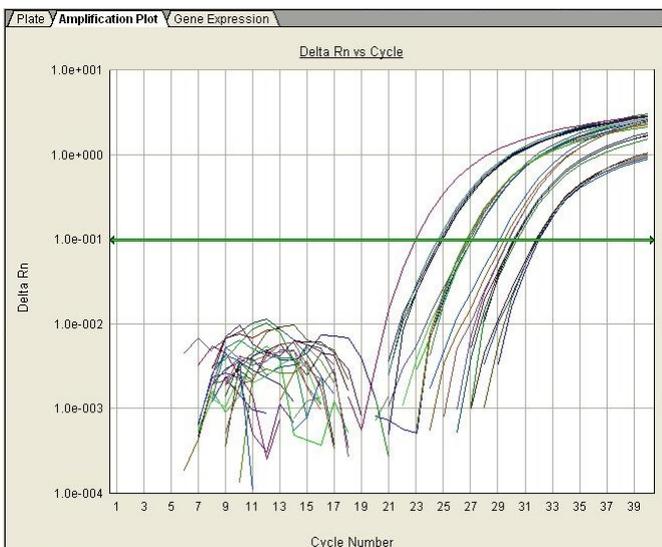


Abb. 06d



Abb. 06: Screenshots der Amplifikationskurven der vier Gene zur Erstellung der Standardkurven.
a: CK8, b: CK19, c: BCSP, d: B2M

Folgend gezeigte Standardkurven wurden erstellt, und daraus die PCR-Effizienzen berechnet (Abb.07):

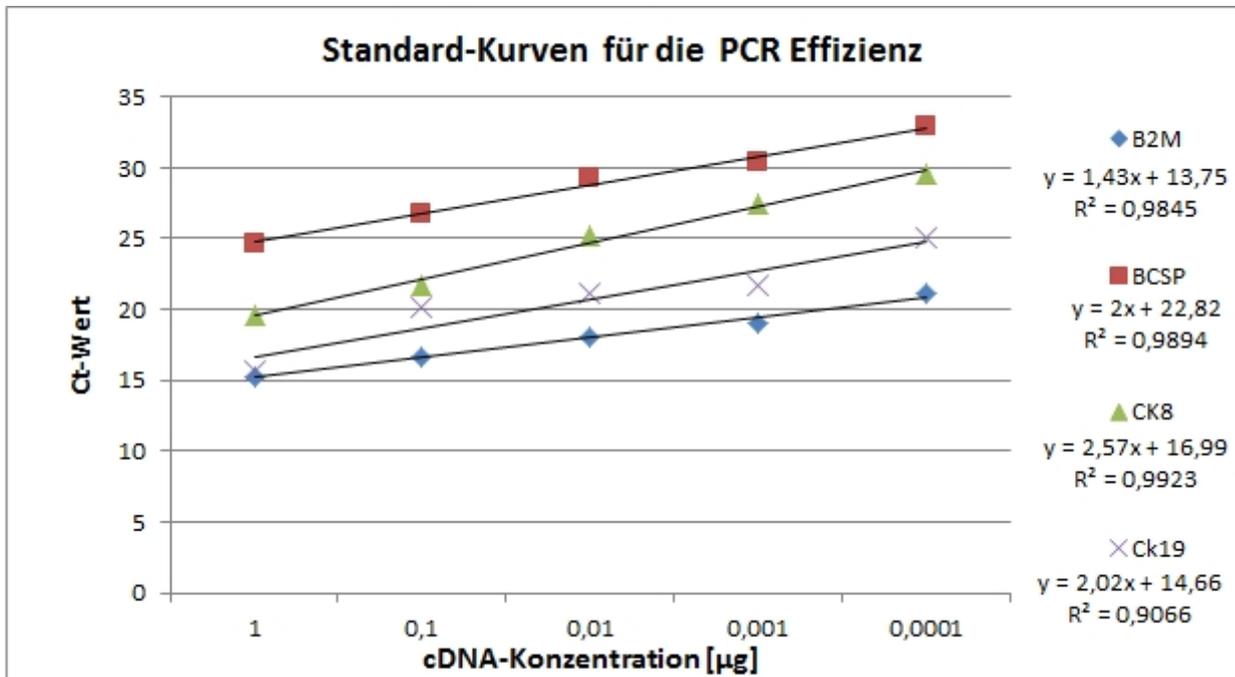


Abb. 07: Standardkurven zur Bestimmung der PCR Effizienz für die Primer gegen B2M, BCSP, CK8 und CK19.

Gen/Primer	R ² -Wert	PCR-Effizienz
B2M	0,9845	98,45%
CK8	0,9923	99,23%
CK19	0,9066	90,66%
BCSP	0,9894	98,94%

Tab. 17: PCR-Effizienzen für selbst designte Primer

Da die so bestimmten PCR-Effizienzen (Abb. 07, Tab.17) der selbst designten Primer, denen der kommerziell erworbenen Primer entsprechen, können die Ergebnisse der im Anschluss durchgeführten Real Time PCR ohne Vorbehalte miteinander verglichen werden.

III. Real-Time PCR

Mit Hilfe der Real-Time PCR kann die Expression eines Gens über den Anstieg der Fluoreszenzintensität während der PCR-Reaktion gemessen werden. Je stärker ein Gen exprimiert ist, d.h. je mehr mRNA dieses Gens vorliegt, umso mehr wird in cDNA umgeschrieben und umso mehr Template steht für die Real-Time PCR Reaktion zur Verfügung. Daraus folgt, dass der Anstieg der Fluoreszenz umso stärker ist, also der Threshold früher erreicht wird (kleiner Ct-Wert), je höher ein Gen exprimiert wird. Um eine Aussage über einen relativen Anstieg bzw. Abfall in der Genexpression machen zu können, muss der jeweilige Ct-Wert eines Gens in Bezug zu den Referenzgenen (meist ubiquitär hoch exprimierte Haushaltsgene) und weiterhin auf eine Negativ-Probe gesehen werden. Das erfolgt über die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Ist der Wert der relativen Quantifizierung >1 , kann das untersuchte Gen als hochreguliert im Bezug zur Negativprobe angesehen werden, ist der Wert jedoch <1 , ist die Expression des Gens geringer als in der Negativprobe.

1. Expression der untersuchten Gene bei adjuvanten Patientinnen

Betrachtet man zunächst die untersuchten Cytokeratin-Gene, CK8, 18 und 19, so findet man in zwei Fällen eine gleichzeitige Hochregulation von CK 8 und 19 (Adj. 6 und 8). In weiteren fünf Proben ist nur CK 8 hochreguliert (Adj. 3, 4, 11, 12, 14), in zweien nur CK 19 (Adj. 7 und 13). In vier der Proben zeigen alle drei untersuchten Cytokeratin-Gene eine Herabregulation (Adj. 2, 5, 9, 10), Cytokeratin 18 ist in allen Proben unterhalb des Expressionsniveaus der Negativproben (gesunde Probanden) (Abb. 08).

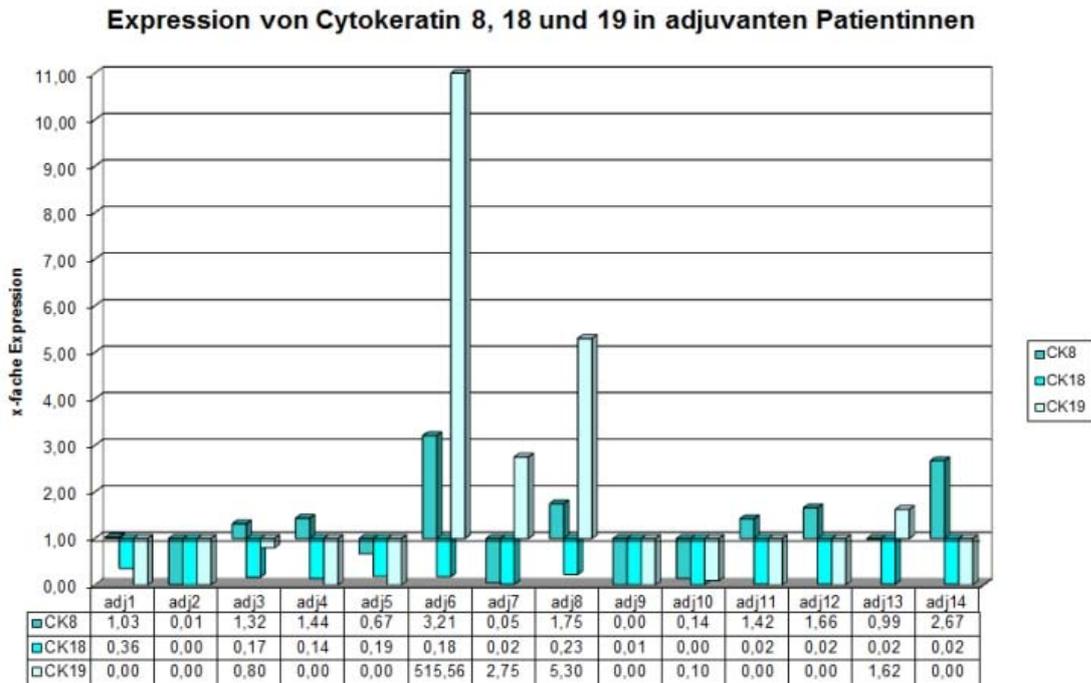


Abb. 08: Expression der untersuchten Cytokeratin-Gene in adjuvanten Patientinnen

Bei der Auswertung der Expressionsdaten für MGL, BCSP und Her2 wurde deutlich, dass in der adjuvanten Situation nur in einem Fall zwei Gene, BCSP und Her2, gleichzeitig hochreguliert sind (Adj. 1). Dagegen sind in fünf der untersuchten Patientenproben alle drei Gene herabreguliert (Adj. 5, 7, 10, 11, 12). In einer Probe konnte kein Fluoreszenzsignal für Her2 detektiert werden (Adj. 9). In vier der Proben war MGL hochreguliert (Adj. 3, 4, 8, 13) und in drei Proben waren die Expressionswerte für Her2 >1 (Adj. 6, 6, 14) (Abb. 09).

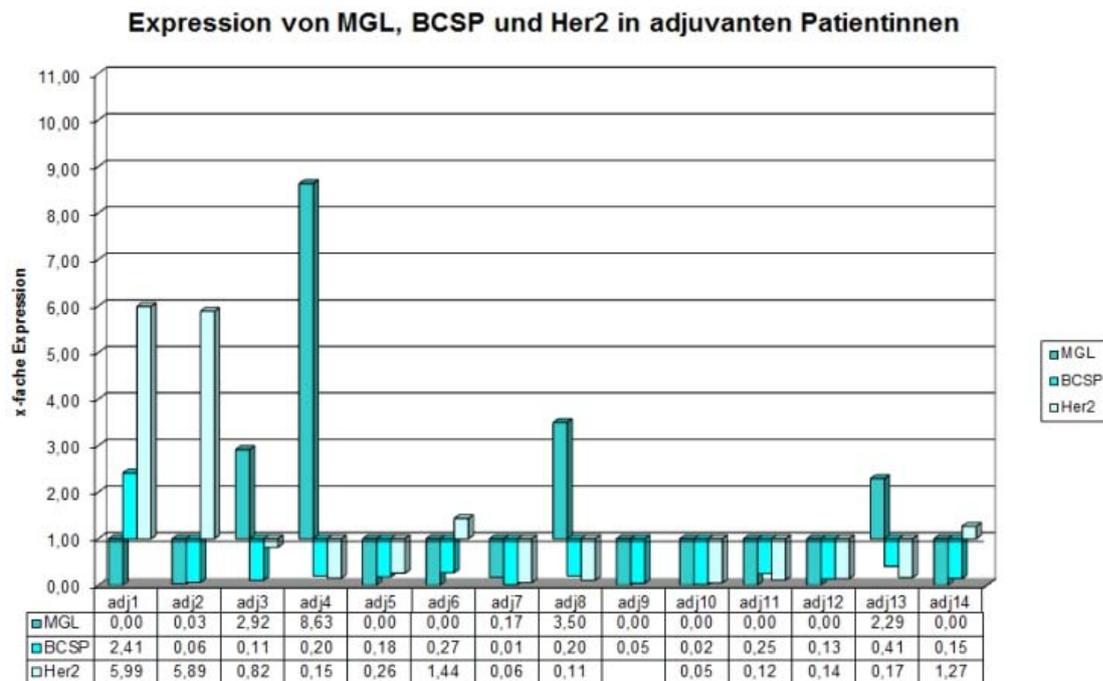


Abb. 09: Expression von MGL, BCSP und Her2 in adjuvanten Patientinnen

2. Expression der untersuchten Gene bei metastasierten Patientinnen

In den Proben der metastasierten Brustkrebspatientinnen findet sich eine, in der zwei Gene, CK 8 und 18 gleichzeitig hochreguliert sind (Met. 4). Cytokeratin 8 ist noch in fünf weiteren Proben höher exprimiert als in der Kontrollgruppe (Met. 2, 3, 7, 8, 11). Eine Besonderheit tritt in der Expression von Cytokeratin 19 auf: in 9 der 11 Proben ist eine Detektion des Fluoreszenzsignals praktisch nicht möglich, in den beiden verbleibenden Proben jedoch finden sich sehr hohe Expressionswerte (Met. 9 und 10) (Abb. 10).

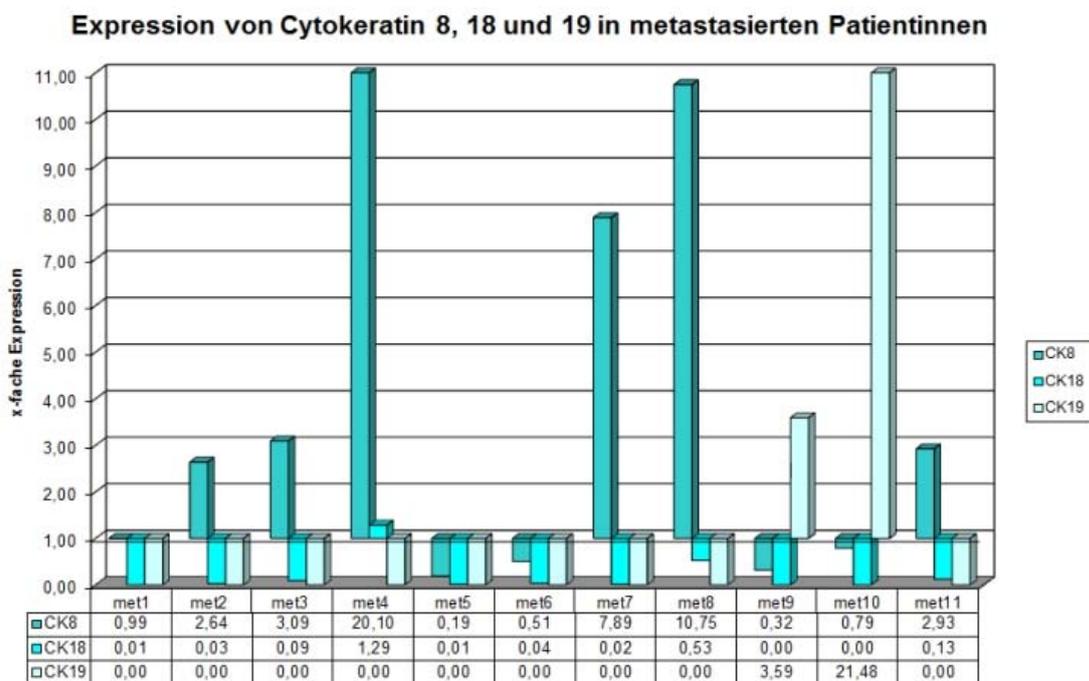


Abb. 10: Expression der untersuchten Cytokeratin-Gene in metastasierten Patientinnen

Bei Betrachtung der Expressionswerte für MGL, BCSP und Her2 kann man feststellen, dass alle drei Gene in fünf der untersuchten 11 Proben herabreguliert sind (Met. 1, 3, 5, 6, 9). Nur in einer Probe waren BCSP und Her2 gleichzeitig, und auch nur schwach hochreguliert (Met.4). MGL und Her2 sind in jeweils einer Probe höher exprimiert als in der Kontrollgruppe der gesunden Probanden (Met.8 bzw. Met.11) und BCSP ist in drei Proben hochreguliert (Met.2, 7, 10) (Abb. 11).

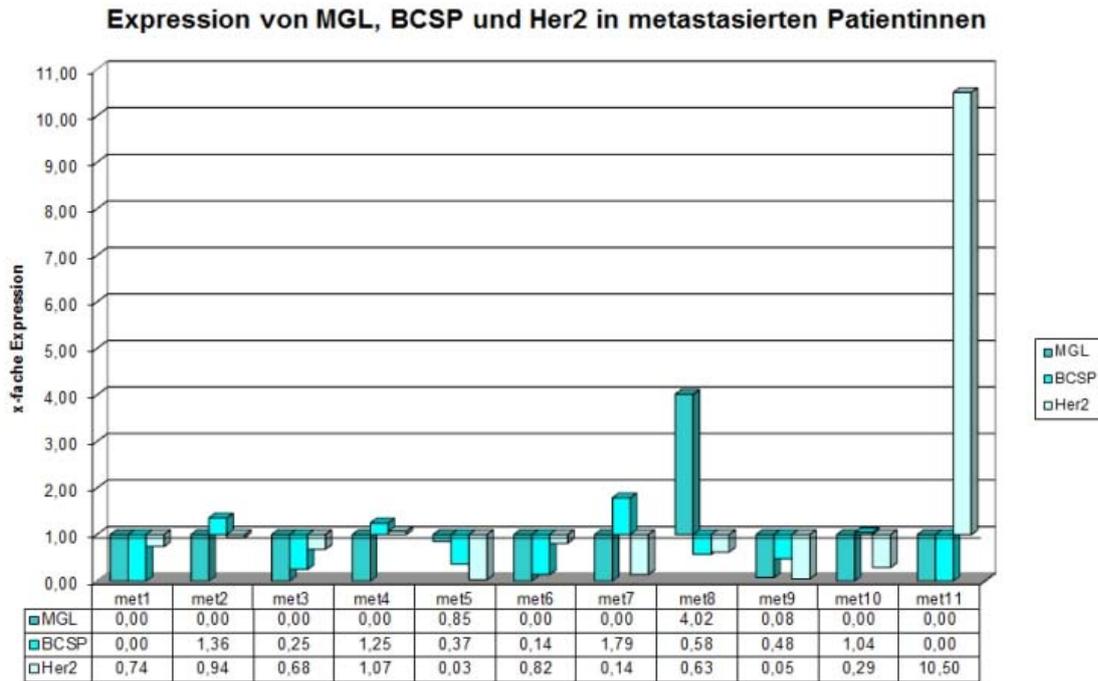


Abb. 11: Expression von MGL, BCSP und Her2 in metastasierten Patientinnen

IV. Her2-Switch

Aus den in den Tabellen 1 und 2 dargestellten Patientendaten und den Ergebnissen der Real-Time PCR kann ermittelt werden, wie häufig es zu einem sog. Her2-Switch kommt. Dieses bereits aus der Literatur bekannte Phänomen [79, 80] beschreibt die Tatsache, dass Primärtumor und CTCs nicht in ihrem Her2 Status übereinstimmen. So können zum Beispiel die zirkulierenden Tumorzellen positiv für Her2 sein, wobei der Primärtumor negativ ist, oder auch umgekehrt.

Bei den, in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben adjuvanter Brustkrebspatientinnen wiesen 50% der Proben einen solchen Switch auf, bei den Proben der metastasierten Patientinnen sogar 64% (Tabelle 18).

Her2-Status Tumor/CTCs	Adjuvant		Metastasiert	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
+ / +	3/14	22%	1/11	9%
+ / -	1/14	7%	6/11	55%
- / +	6/14	43%	1/11	9%
- / -	4/14	28%	3/11	27%

Tab. 18: Her2-Switch bei adjuvanter und metastasierter Brustkrebspatientinnen

IV. Diskussion

Die Durchführung der Real-Time PCR fordert viele experimentelle Vorarbeiten, von der Aufarbeitung der Blutproben, über die RNA-Isolierung bis hin zur reversen Transkription zur Herstellung der letztendlich benötigten cDNA. Die korrekte und sorgfältige Ausführung dieser Vorarbeiten ist aber unerlässlich, um verwertbare Ergebnisse aus der Real-Time PCR zu bekommen. Daher soll der erste Teil der Diskussion den Ergebnissen dieser Vorarbeiten gewidmet sein, bevor auf die Ergebnisse der Real-Time PCR eingegangen wird. Im letzten Teil der Diskussion wird dann noch auf das Phänomen des sog. „Her2-Switch“ eingegangen.

I. Vorbereitende Experimente

1. Blutproben

Die Blutproben der adjuvanten und metastasierten Brustkrebspatientinnen, die überwiegend invasiv duktales Karzinome verschiedener Größe und histologischer Subtypen aufweisen, sowie der gesunden Probanden wurden möglichst frisch nach der Entnahme verarbeitet. Über Dichtegradientenzentrifugation wurde die Leukozytenfraktion, die auch CTCs enthält, isoliert und gewaschen. Es ist dabei darauf zu achten, dass das erhaltene Zellpellet wenig Erythrozyten enthält, welche die RNA-Isolierung behindern würden.

2. RNA-Isolierung

Bei der RNA-Isolierung muss auf sorgfältiges Arbeiten geachtet werden, damit eine Kontamination mit RNasen, die die isolierte RNA abbauen würden, zu vermeiden. Weiterhin muss die RNA eine ausreichende Konzentration von mindestens 0,25 µg/µl aufweisen, damit genügend Material für die Umschreibung (5 µg) vorhanden ist. Wichtig ist weiterhin, dass die Ratio der RNA zwischen 1,7 und 1,9 liegt, um eine Kontamination mit Proteinen ausschließen zu können. Auch auf die Kontrolle der Unversehrtheit der RNA mittels Agarosegelelektrophorese ist größter Wert zu legen. Würde hier bereits eine Degradierung der RNA festgestellt werden, sollte die RNA

Isolierung wiederholt werden, da sonst die Ergebnisse der Real-Time PCR verfälscht würden.

3. PCR-Effizienzen

Da einige der Gene direkt mit TaqMan Primern der Firma Applied Biosystems in der Real-Time PCR nachgewiesen werden, und die restlichen Gene zunächst mit Hilfe einer nested PCR voramplifiziert und dann mit nested-TaqMan Primern analysiert werden, müssen vor einem Vergleich der Real-Time PCR Ergebnisse gleichmäßige PCR-Effizienzen der verwendeten Primer sichergestellt werden. Für die Primer der Firma Applied Biosystems (CK18, Her-2, MGL und GAPDH) wird eine PCR-Effizienz von $100\% \pm 10\%$ garantiert. Mit Hilfe eines Standardkuven-Assays wurde die PCR Effizienz der übrigen Primer (für die Gene CK8, CK19, BCSP und B2M) bestimmt. Da die Effizienzen der Primer zwischen 90% und 99% lagen, sind die später in der Real-Time PCR gewonnenen Ergebnisse der verschiedenen Primer vergleichbar.

II. Real-Time PCR

Bei der Real-Time PCR handelt es sich um eine Methode, die bereits in der Diagnostik und Charakterisierung von soliden Tumoren etabliert ist [81]. Der Vorteil dieser Methode ist die schnelle und einfache Durchführbarkeit, die hohe Sensitivität wie auch die Kostengünstigkeit im Vergleich zu anderen Methoden. In der vorliegenden Arbeit soll diese Methode nun auch auf die Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen aus Blutproben von Brustkrebspatientinnen übertragen werden. Das würde für die Patientinnen den entscheidenden Vorteil bringen, dass keine Biopsien bzw. Knochenmark für die Untersuchung entnommen werden müsste, sondern lediglich einige ml Blut für die Analyse von Nöten ist.

Um zu zeigen, dass der Nachweis von CTCs aus Blutproben von Krebspatientinnen möglich ist, wurde hier Blut von adjuvanten und metastasierten Brustkrebspatientinnen mit Hilfe der Real-Time PCR untersucht und mit Blutproben gesunder Probanden verglichen. Als Markergene wurden die Cytokeratine 8, 18 und

19 verwendet, die auch in der APAAP-Färbung routinemäßig in der Krebsdiagnostik Anwendung finden [60, 61]. Sie eignen sich besonders, da sie hauptsächlich in epithelialen Zellen, wie eben den vom Primärtumor abgelösten Tumorzellen, exprimiert werden, nicht jedoch von den Blutzellen, die mesenchymalen Ursprungs sind. Weiterhin dienen Mammaglobin (MGL), Her-2 und BCSP als Markergene. Von MGL ist bekannt, dass es in der adulten Brustdrüse exprimiert, und bei malignen Veränderungen der Brustdrüse hochreguliert wird [62]. BCSP ist als Marker für Metastasierung und rezidiv bekannt [63-66] und Her-2, das in 20% aller Brustkrebsfälle hochreguliert [64, 66, 69, 72] und auch einen Ansatzpunkt für verschiedene Therapien ist [72-74].

In der Real-Time PCR zeigten sich die Cytokeratine als besonders geeignete Marker, vor allem CK8 war in 25% (10 von 40 Fällen) hochreguliert, angezeigt durch RQ-Werte >1 . Die RQ-Werte der Zytokeratine zeigten jeweils in den metastasierten Patientinnen eine höhere Amplitude als in den Proben der adjuvanten Patientinnen. BCSP, MGL und Her-2 zeigten nicht so viele positive Ergebnisse, scheinen also möglicherweise weniger geeignet für den Nachweis von CTCs aus Blutproben zu sein. Für den weiteren Nachweis zirkulierender Tumorzellen aus Blutproben wären weitere Markergene wünschenswert, anbieten würden sich beispielsweise MMP13 [82-85], UBE2Q2 [86], Nectin-4 [87] oder ALDH [88]. Um diese und weitere Gene zu testen und wertvolles Patientenmaterial einzusparen, sollten diese versuche zunächst an Blutproben, denen Tumorzellen aus Brustkrebszelllinien zugesetzt wurden, durchgeführt werden. So könnten auch Standardkurven erstellt werden, womit dann eine bestimmte Genexpression einer bezeichneten Anzahl an Tumorzellen/ml Blut zugeordnet werden können. Die somit gewonnenen Erkenntnisse müssen dann jedoch zur weiteren Validierung auf eine möglichst große Anzahl an Patientenproben übertragen werden. Aus diesen Versuchen zum Nachweis von CTCs könnte dann auch eine Charakterisierung der Tumorzellen ermöglicht werden, was dann wiederum einen Einfluss auf die anzuwendenden Therapiestrategien haben könnten. Somit könnte ein weiterer Schritt in Richtung personalisierter Krebsmedizin gemacht werden.

III. Her2-Switch

In einigen der Proben ist ein unterschiedlicher Her2-Status zwischen Primärtumor und den mit Hilfe der Real-Time PCR detektierten zirkulierenden Tumorzellen feststellbar (adj. 7-11, 13 und 14; met. 2-5, 7, 9 und 11). Dieses Phänomen wird unter dem Begriff „Her2 Switch“ beschrieben [79, 80]. So können bei einem Her2 positiven Primärtumor Her2 negative CTCs auftreten und umgekehrt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Phänomen in 50% der adjuvanten und 64% der metastasierten Proben festgestellt und scheint somit in der metastasierten Situation häufiger aufzutreten.

V. Zusammenfassung

Brustkrebs ist die häufigste bei Frauen auftretende Krebsart. Bei einer von acht Frauen wird im Laufe ihres Lebens Brustkrebs diagnostiziert, so wurden 2010 in Deutschland ca. 72.000 Neuerkrankungen verzeichnet. Weltweit starben im Jahre 2004 etwa 520.000 Frauen an den Folgen einer Brustkrebserkrankung.

In den letzten 40 Jahren hat sich aufgrund einer möglichen Brustkrebsvorsorge und erweiterten Diagnose- und Therapiemöglichkeit die Prognose beim Mammakarzinom ständig verbessert. Bereits drei Viertel der Patientinnen überleben die "Diagnose Brustkrebs" zehn oder mehr Jahre, dennoch liegt das durchschnittliche Todesalter noch immer bei 68 Jahren. Dabei ist die Todesursache meist nicht der primäre Tumor, sondern die vom Tumor ausgehende Metastasierung in anderen, lebenswichtigen Organen. Die gängigen Modelle der Metastasierung gehen davon aus, dass sich Einzelzellen aus dem Zellverband des epithelialen Primärtumors ablösen, sich über Blut und Lymphe im Körper verteilen, an anderen Stellen im Organismus festsetzen und damit die Grundlage der Metastasierung darstellen.

Vermutlich geht hierbei die größte Gefahr von den sogenannten Tumorstammzellen aus. Sie sind nicht nur der Ursprung des Malignoms und sorgen stets für neue Krebszellen mit denen sie den Tumor wachsen lassen, sondern Ihre Filiae sind es wohl die sich vom Primärtumor lösen und Absiedelungen im ganzen Körper bilden können. Diese malignen Zellen im Blut und Knochenmark die vermutlich auch über Stammzeleigenschaften verfügen, sind relativ unempfindlich gegenüber jeder System- und Strahlentherapie und Hauptursache für Rezidive und Fernmetastasen.

Findet man diese minimalen Tumorresiduen (MRD) im Blut, werden sie als zirkulierende Tumorzellen (CTC's) bezeichnet, werden sie im Knochenmark gefunden, werden sie disseminierte Tumorzellen (DTC's) genannt.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die hochsensitive Methode der TaqMan® basierten Real-Time PCR (RT-PCR) zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen aus Blutproben von adjuvanten und metastasierten Brustkrebspatientinnen geeignet ist. Für den RT-PCR Nachweis der CTC's wurden Markergene verwendet, die in der Literatur häufig in Zusammenhang mit Brustkrebs gebracht werden, bzw. in Brustkrebsgewebe und -zellen als hochreguliert gelten.

Primärer Endpunkt der Forschungsarbeit war es, Unterschiede in der Genexpression zwischen den Proben gesunder Probandinnen, adjuvanter und metastasierter

Brustkrebspatientinnen herauszuarbeiten, die exakte Quantifizierung stand hierbei jedoch im Hintergrund.

Aus den, zu diesem Zwecke untersuchten Blutproben von 20 gesunden Probandinnen, 14 adjuvanten und 11 metastasierten Brustkrebspatientinnen wurde über Dichtegradientenzentrifugation die Fraktion der mononukleären Blutzellen, in der sich auch die CTC's befinden, angereichert, daraus die RNA isoliert und mit Hilfe einer reversen Transkription in cDNA umgewandelt. Die cDNA wurde, zum Teil über den Umweg einer nested-PCR, in die Real-Time PCR mit den Markergenen BCSP (Breast Cancer Specific Protein), Her2 (human epidermal growth factor receptor 2), MGL (Mammaglobin), CK8, CK18 und CK19 (Cytokeratin -8, -18 und -19) eingesetzt. GAPDH und B2M dienten dabei als Kontroll- und Referenzgene.

Bereits in den Proben der adjuvanten Brustkrebspatientinnen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Genexpression, speziell für die Cytokeratin-Gene, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Noch deutlicher ist dies in der Gruppe der metastasierten Brustkrebspatientinnen zu verzeichnen. Auch für MGL, Her2 und BCSP zeigt sich in einigen der Patientenproben ein signifikanter Anstieg in der Genexpression, jedoch weniger deutlich als bei den Cytokeratin-Genen.

In Kombination zeigten die gewählten Marker eine hohe Sensitivität und Spezifität, jedoch war es nicht möglich CTC's mit nur einem dieser Markergene sicher in der Real-Time PCR zu detektieren. Somit kann nur die Untersuchung weiterer Gene, die mit Brustkrebs in Zusammenhang gebracht werden, wie beispielsweise MMP-13, UBE2Q2, Nec-4 oder ALDH, letztendlich zu einem Set von Markergenen führen, die eine reliable und sichere Detektion von CTC's im klinischen Alltag erlauben.

Der Nachweis von CTC's mit Hilfe der Real-Time PCR könnte zukünftig nicht nur in der Diagnostik einer beginnenden Filialisierung über das Blutgefäßsystem eingesetzt werden, sondern auch sehr früh zusätzlich Aufschluss über die Tumorbilogie geben, um dann frühzeitig eine angemessene Therapie einzuleiten. Besondere Bedeutung hat hierbei der Wechsel der Tumorbilogie zwischen Primärtumor und Tumorabsiedelung. Kann diese Änderung bereits frühzeitig auf Ebene der MRD nachgewiesen werden, ermöglicht dies das systemische Risiko noch effizienter zu behandeln. Der nächste Schritt wird nun die Untersuchung weiterer brustkrebsassoziierter Genmarker sein, zunächst im Modellsystem mit verschiedenen Mammakarzinom- Zelllinien. Bewähren sich diese, werden weitere Kombinationen am gesammelten Patientenmaterial getestet.

VI. Abkürzungsverzeichnis

Adj.	Adjuvant
AJCC	American Joint Comitee on Cancer
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
B2M	Beta-2-Microglobulin
BCSP	Breast Cancer Specific Protein
BRCA	Breast Cancer Associated
CCT	Craniale Computer Tomographie
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy-DNA
CK	Cytokeratin
CT	Computer Tomographie
Ct	“Cycle over Threshold”
CTC	Circulating Tumour Cell
DCIS	Duktales carzinoma in situ
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTC	Disseminated Tumour Cell
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EpCAM	Epidermales Zelladhäsionsmolekül
ER	Östrogenrezeptor
FAM	6-Carboxyfluorescin
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
HER	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor
IDC	Invasiv duktales Karzinom
ILC	Invasiv lobuläres Karzinom
LADO	Musculus latissimus dorsi Lappen
LCIS	Lobuläres Karzinom in situ

LH	Luteinisierendes Hormon
LN	Lobuläre Neoplasie
MACS	Magnetic activated cell sorting
Met.	Metastasiert
MGL	Mammaglobin
M-MLV	Moloney-Mouse Leukemia Virus
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NOS	“Not otherwise specified” Karzinom
NST	“no special type” Karzinom
OAS	Overall Survival
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PET	Positronen Emmissions Tomographie
PgR	Progesteron Rezeptor
Q-PCR	Quantitative PCR
RARE	RosetteSep-Applied Imaging Rare Event
RNA	Ribonucleinsäure
RQ	Relative Quantifizierung
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
SSM	Subkutane Mastektomie
TAMRA	Tetramethylrhodamine
TRAM	Transverser Rectus Abdominis Musculocutaneus-Lappen
UBE2Q2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q
UICC	Union for International Cancer Control
uPA	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ
WHO	World Health Organisation

VII. Quellenverzeichnis

1. RKI: **Krebs in Deutschland**. Berlin; 2012.
2. Kaatsch P., Spix C., Katalinic A., Hentschel S.: **Krebs in Deutschland 2007/2008**. Zentrum für Krebsregisterdaten 2012.
3. **Cancer Mortality Database** [<http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm>]
4. Bandyopadhyay S, Ali-Fehmi R: **Breast carcinoma: molecular profiling and updates**. *Clin Lab Med* 2013, **33**(4):891-909.
5. Böcker W, Denk H, Heitz PU: **Pathologie**, vol. 3; 2004.
6. Elston CW, Ellis IO: **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):403-410.
7. Sohn U, Blohmer JU: **Mammasonographie: Lehratlas zur Technik und Befundinterpretation**. Stuttgart: Thieme Verlag; 2009.
8. Dixon JM, Gregory K, Johnston S, Rodger A: **Breast cancer: non-metastatic**. *Clin Evid* 2002(8):1811-1839.
9. Allred DC, Bustamante MA, Daniel CO, Gaskill HV, Cruz AB, Jr.: **Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas. Evaluation of 130 cases and review of the literature regarding concordance with biochemical assay and clinical relevance**. *Arch Surg* 1990, **125**(1):107-113.
10. Cuorvo LV, Verderio P, Ciniselli CM, Girlando S, Decarli N, Leonardi E, Ferro A, Caldara A, Triolo R, Eccher C *et al*: **PI3KCA mutation status is of limited prognostic relevance in ER-positive breast cancer patients treated with hormone therapy**. *Virchows Arch* 2013.
11. Lopez R, Arumugam A, Joseph R, Monga K, Boopalan T, Agullo P, Gutierrez C, Nandy S, Subramani R, de la Rosa JM *et al*: **Hyperglycemia Enhances the Proliferation of Non-Tumorigenic and Malignant Mammary Epithelial Cells through Increased leptin/IGF1R Signaling and Activation of AKT/mTOR**. *PLoS One* 2013, **8**(11):e79708.
12. Hudis CA: **Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice**. *N Engl J Med* 2007, **357**(1):39-51.
13. Jähne J: **Was gibt es neues in der Chirurgie? Jahresband 2010: Berichte zur Fort- und Weiterbildung**; 2010.
14. Wöckel A., R K: **S3 Leitlinie Mammakarzinom**. *Frauenarzt* 2012, **53**(12).
15. Britt K: **Menarche, menopause, and breast cancer risk**. *Lancet Oncol* 2012, **13**(11):1071-1072.
16. Chlebowski RT, Blackburn GL, Thomson CA, Nixon DW, Shapiro A, Hoy MK, Goodman MT, Giuliano AE, Karanja N, McAndrew P *et al*: **Dietary fat reduction and breast cancer outcome: interim efficacy results from the Women's Intervention Nutrition Study**. *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**(24):1767-1776.
17. Whittemore AS: **Risk of breast cancer in carriers of BRCA gene mutations**. *N Engl J Med* 1997, **337**(11):788-789.
18. Untch M., Harbeck N., Thomssen c., SD C: **Colloquium Senologie 2013**. *Agileum Verlagsgesellschaft* 2013.
19. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S: **Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: Today and tomorrow**. *Cancer Treat Rev* 2013.
20. Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, Wang HJ, Untch M, Meng G, Pegram MD, Podratz KC, Crown J, Slamon DJ *et al*: **Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1**. *Ann Oncol* 2006, **17**(4):597-604.

21. Franken B, de Groot MR, Mastboom WJ, Vermes I, van der Palen J, Tibbe AG, Terstappen LW: **Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2012, **14**(5):R133.
22. Bragado P, Sosa MS, Keely P, Condeelis J, Aguirre-Ghiso JA: **Microenvironments dictating tumor cell dormancy.** *Recent Results Cancer Res* 2012, **195**:25-39.
23. Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G: **Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment.** *N Engl J Med* 1998, **339**(6):357-363.
24. Pantel K, Brakenhoff RH: **Dissecting the metastatic cascade.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(6):448-456.
25. Riethdorf S, Pantel K: **Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization.** *Pathobiology* 2008, **75**(2):140-148.
26. Ring A, Smith IE, Dowsett M: **Circulating tumour cells in breast cancer.** *Lancet Oncol* 2004, **5**(2):79-88.
27. Smerage JB, Hayes DF: **The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer.** *Br J Cancer* 2006, **94**(1):8-12.
28. Asworth TR: **A case of cancer in which cells similar to those in tumours were seen in the blood after death.** *Australian Medical Journal* 1869, **14**:146-147.
29. Graves H, Czerniecki BJ: **Circulating tumor cells in breast cancer patients: an evolving role in patient prognosis and disease progression.** *Patholog Res Int* 2011, **2011**:621090.
30. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G *et al*: **Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.** *N Engl J Med* 2000, **342**(8):525-533.
31. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G *et al*: **A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer.** *N Engl J Med* 2005, **353**(8):793-802.
32. Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, Synnestvedt M, Fehm T, Juckstock J, Borgen E, Rack B, Braun S, Sommer H *et al*: **Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(9):2967-2976.
33. Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S: **Cancer micrometastases.** *Nat Rev Clin Oncol* 2009, **6**(6):339-351.
34. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B: **Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**(5):329-340.
35. Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C: **International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis.** *Cancer* 1999, **86**(12):2668-2673.
36. Singletary SE, Patel-Parekh L, Bland KI: **Treatment trends in early-stage invasive lobular carcinoma: a report from the National Cancer Data Base.** *Ann Surg* 2005, **242**(2):281-289.
37. Edge SB, Compton CC: **The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM.** *Ann Surg Oncol* 2010, **17**(6):1471-1474.
38. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K: **Clinical relevance and biology of circulating tumor cells.** *Breast Cancer Res* 2011, **13**(6):228.
39. Ghossein RA, Bhattacharya S, Rosai J: **Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors.** *Clin Cancer Res* 1999, **5**(8):1950-1960.
40. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LW: **Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(14 Pt 1):4218-4224.

41. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, Bhattacharyya A, Anderson AE, Xiao L, Bedrosian I, Kuerer HM, Krishnamurthy S: **Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study.** *Lancet Oncol* 2012, **13**(7):688-695.
42. Rack B: **Use of circulating tumour cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients.** In: *ASCO 2010*. vol. 28: Journal Clin. Onc; 2010.
43. Lianidou ES, Markou A: **Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer.** *Clin Chem Lab Med* 2011, **49**(10):1579-1590.
44. Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, Valero V, Fritsche HA, Cristofanilli M: **Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system.** *Int J Cancer* 2012, **130**(7):1590-1597.
45. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, Inserra E, Diederichs S, Iafrate AJ, Bell DW *et al*: **Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells.** *N Engl J Med* 2008, **359**(4):366-377.
46. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A *et al*: **Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology.** *Nature* 2007, **450**(7173):1235-1239.
47. Saliba AE, Saias L, Psychari E, Minc N, Simon D, Bidard FC, Mathiot C, Pierga JY, Fraisier V, Salamero J *et al*: **Microfluidic sorting and multimodal typing of cancer cells in self-assembled magnetic arrays.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(33):14524-14529.
48. Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, Yu M, Miyamoto DT, Waltman BA, Rothenberg SM, Shah AM, Smas ME, Korir GK *et al*: **Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(43):18392-18397.
49. Gerges N, Rak J, Jabado N: **New technologies for the detection of circulating tumour cells.** *Br Med Bull* 2010, **94**:49-64.
50. Parkinson DR, Johnson BE, Sledge GW: **Making personalized cancer medicine a reality: challenges and opportunities in the development of biomarkers and companion diagnostics.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**(3):619-624.
51. Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL, Miyamoto DT, Brachtel E, Yu M, Chen PI, Morgan B, Trautwein J *et al*: **Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells.** *Sci Transl Med* 2013, **5**(179):179ra147.
52. Alix-Panabieres C, Pantel K: **Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer.** *Clin Chem* 2013, **59**(1):110-118.
53. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B *et al*: **Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer.** *N Engl J Med* 2013, **368**(13):1199-1209.
54. Pantel K, Diaz LA, Jr., Polyak K: **Tracking tumor resistance using 'liquid biopsies'.** *Nat Med* 2013, **19**(6):676-677.
55. Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: **Gene expression profiles in normal and cancer cells.** *Science* 1997, **276**(5316):1268-1272.
56. Devlin TM: **regulation of gene expression.** In: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Edited by Sons JW, vol. 7th edition; 2010: pp.257.
57. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**(7):RESEARCH0034.
58. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
59. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: **Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(16):7276-7280.

60. Kurec AS, Baltrucki L, Mason DY, Davey FR: **Use of the APAAP method in the classification and diagnosis of hematologic disorders.** *Clin Lab Med* 1988, **8**(1):223-236.
61. Noack F, Schmitt M, Bauer J, Helmecke D, Kruger W, Thorban S, Sandherr M, Kuhn W, Graeff H, Harbeck N: **A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications.** *Int J Biol Markers* 2000, **15**(1):100-104.
62. Fleming TP, Watson MA: **Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer.** *Ann N Y Acad Sci* 2000, **923**:78-89.
63. Inaba S, Li C, Shi YE, Song DQ, Jiang JD, Liu J: **Synuclein gamma inhibits the mitotic checkpoint function and promotes chromosomal instability of breast cancer cells.** *Breast Cancer Res Treat* 2005, **94**(1):25-35.
64. Jiang WG, Watkins G, Fodstad O, Douglas-Jones A, Mokbel K, Mansel RE: **Differential expression of the CCN family members Cyr61, CTGF and Nov in human breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2004, **11**(4):781-791.
65. Wu K, Quan Z, Weng Z, Li F, Zhang Y, Yao X, Chen Y, Budman D, Goldberg ID, Shi YE: **Expression of neuronal protein synuclein gamma gene as a novel marker for breast cancer prognosis.** *Breast Cancer Res Treat* 2007, **101**(3):259-267.
66. Wu K, Weng Z, Tao Q, Lin G, Wu X, Qian H, Zhang Y, Ding X, Jiang Y, Shi YE: **Stage-specific expression of breast cancer-specific gene gamma-synuclein.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003, **12**(9):920-925.
67. Guo J, Shou C, Meng L, Jiang B, Dong B, Yao L, Xie Y, Zhang J, Chen Y, Budman DR *et al*: **Neuronal protein synuclein gamma predicts poor clinical outcome in breast cancer.** *Int J Cancer* 2007, **121**(6):1296-1305.
68. Pan ZZ, Bruening W, Giasson BI, Lee VM, Godwin AK: **Gamma-synuclein promotes cancer cell survival and inhibits stress- and chemotherapy drug-induced apoptosis by modulating MAPK pathways.** *J Biol Chem* 2002, **277**(38):35050-35060.
69. Giani C, Casalini P, Pupa SM, De Vecchi R, Ardini E, Colnaghi MI, Giordano A, Menard S: **Increased expression of c-erbB-2 in hormone-dependent breast cancer cells inhibits cell growth and induces differentiation.** *Oncogene* 1998, **17**(4):425-432.
70. Kim YS, Konoplev SN, Montemurro F, Hoy E, Smith TL, Rondon G, Champlin RE, Sahin AA, Ueno NT: **HER-2/neu overexpression as a poor prognostic factor for patients with metastatic breast cancer undergoing high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**(12):4008-4012.
71. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** *Science* 1987, **235**(4785):177-182.
72. Konecny GE, Thomssen C, Luck HJ, Untch M, Wang HJ, Kuhn W, Eidtmann H, du Bois A, Olbricht S, Steinfeld D *et al*: **Her-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2004, **96**(15):1141-1151.
73. Moliterni A, Menard S, Valagussa P, Biganzoli E, Boracchi P, Balsari A, Casalini P, Tomasic G, Marubini E, Pilotti S *et al*: **HER2 overexpression and doxorubicin in adjuvant chemotherapy for resectable breast cancer.** *J Clin Oncol* 2003, **21**(3):458-462.
74. Tai W, Qin B, Cheng K: **Inhibition of breast cancer cell growth and invasiveness by dual silencing of HER-2 and VEGF.** *Mol Pharm* 2010, **7**(2):543-556.
75. Bergquist H, Johnsson A, Hammerlid E, Wenger U, Lundell L, Ruth M: **Factors predicting survival in patients with advanced oesophageal cancer: a prospective multicentre evaluation.** *Aliment Pharmacol Ther* 2008, **27**(5):385-395.
76. Mendoza G, Portillo A, Olmos-Soto J: **Accurate breast cancer diagnosis through real-time PCR her-2 gene quantification using immunohistochemically-identified biopsies.** *Oncol Lett* 2013, **5**(1):295-298.
77. Gerard GF, D'Alessio JM, Kotewicz ML, Noon MC: **Influence on stability in Escherichia coli of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase.** *DNA* 1986, **5**(4):271-279.

78. Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, Blodgett KP, Gerard GF: **Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli.** *Gene* 1985, **35**(3):249-258.
79. Krawczyk N, Banyas M, Neubauer H, Solomayer EF, Gall C, Hahn M, Becker S, Bachmann R, Wallwiener D, Fehm T: **HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor.** *Anticancer Res* 2009, **29**(10):4019-4024.
80. Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G, Bachmann R, Kramer B, Vogel U, Neubauer H, Wallwiener D, Huober J, Fehm TN: **Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2006, **98**(2):179-184.
81. Bernard PS, Wittwer CT: **Real-time PCR technology for cancer diagnostics.** *Clin Chem* 2002, **48**(8):1178-1185.
82. Balbin M, Pendas AM, Uria JA, Jimenez MG, Freije JP, Lopez-Otin C: **Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors.** *APMIS* 1999, **107**(1):45-53.
83. Chang CJ, Hsu LA, Ko YH, Chen PL, Chuang YT, Lin CY, Liao CH, Pang JH: **Thrombin regulates matrix metalloproteinase-9 expression in human monocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **385**(2):241-246.
84. Lafleur MA, Drew AF, de Sousa EL, Blick T, Bills M, Walker EC, Williams ED, Waltham M, Thompson EW: **Upregulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer xenografts: a major induction of stromal MMP-13.** *Int J Cancer* 2005, **114**(4):544-554.
85. Selvamurugan N, Partridge NC: **Constitutive expression and regulation of collagenase-3 in human breast cancer cells.** *Mol Cell Biol Res Commun* 2000, **3**(4):218-223.
86. Nikseresht M, Seghatoleslam A, Monabati A, Talei A, Ghalati FB, Owji AA: **Overexpression of the novel human gene, UBE2Q2, in breast cancer.** *Cancer Genet Cytogenet* 2010, **197**(2):101-106.
87. Fabre-Lafay S, Garrido-Urbani S, Reymond N, Goncalves A, Dubreuil P, Lopez M: **Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17.** *J Biol Chem* 2005, **280**(20):19543-19550.
88. Dontu G: **Breast cancer stem cell markers - the rocky road to clinical applications.** *Breast Cancer Res* 2008, **10**(5):110.

VIII. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tab. 01: Epidemiologischen Zahlen für Deutschland (ICD-10 => C50)

Quelle: Robert Koch „Krebs in Deutschland“ 2010

Seite 5

Abb. 01: Immunhistochemische ABC-Färbung des Östrogen Rezeptors (ER), Progesteron Rezeptors (PgR) und des Human epidermal growth factor receptors 2 (Her2)

Quelle: Tumorimmunologisches Labor der LMU Frauenklinik – Campus Innenstadt, Christina Kuhn

Seite 7

Tab. 02: TNM-Klassifikation von Tumoren

Seite 8

Tab. 03: Intrinsische Subtypen´

Seite 12

Abb. 02: Schematischer Ablauf der Sybr-Green basierten Real-Time PCR.

Quelle: DKFZ-Website

Seite 18

Abb. 03: Der Ablauf einer Real-Time PCR mit TaqMan® Sonde

Quelle: Eligene-Webseite // www.eligene.com

Seite 18

Abb. 04: Molecular Beacon Sonden

Quelle: Scientific Software Solutions international Web page // www.scientificsoftware-solutions.com

Seite 19

Tab. 04: Primer für die nested PCR

Seite 29

Tab.05: Verlauf der PCR Reaktion

Seite 29

Tab. 06: kommerziell erworbene TaqMan Primer (Applied Biosystems)

Seite 32

Tab. 07: selbst designte TaqMan Primer

Seite 32

Tab. 08: Ablauf der Real Time PCR

Seite 32

Tab. 09: Chemikalien

Seite 33

Tab. 10: Geräte

Seite 34

Tab. 11: Verbrauchsmaterialien

Seite 35

Tab. 12: Patientendaten adjuvanter Patientinnen

Seite 37

Tab. 13: Patientendaten metastasierter Patientinnen

Seite 38

Tab. 14: RNA-Konzentration und Ratio adjuvanter Patientinnen
Seite 40

Tab. 15: RNA-Konzentration und Ratio metastasierter Patientinnen
Seite 40

Tab. 16: RNA-Konzentration und Ratio gesunder Probanden (negativ-Kollektiv)
Seite 41

Abb. 05: Gel zur Überprüfung der RNA-Integrität.
Seite 42

Abb. 06: Screenshots der Amplifikationskurven der vier Gene zur Erstellung der Standardkurven.
a: CK8, b: CK19, c: BCSP, d: B2M
Seite 44

Abb. 07: Standardkurven zur Bestimmung der PCR Effizienz für die Primer gegen B2M, BCSP, CK8 und CK19.
Seite 45

Tab. 17: PCR-Effizienzen für selbst designte Primer
Seite 45

Abb. 08: PCR-Effizienzen für selbst designte Primer
Seite 45

Abb. 09: Expression der untersuchten Cytokeratin-Gene in adjuvanter Patientinnen
Seite 47

Abb. 10: Expression von MGL, BCSP und Her2 in adjuvanter Patientinnen
Seite 48

Abb. 11: Expression der untersuchten Cytokeratin-Gene in metastasierten Patientinnen
Seite 49

Abb. 12: Expression von MGL, BCSP und Her2 in metastasierten Patientinnen
Seite 50

Tab. 18: Her2-Switch bei adjuvanter und metastasierter Brustkrebspatientinnen
Seite 50

IX. Ethikvotum



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission - Pettenkoferstr. 8 - 80336 München

Herrn
Prof. Dr. Udo Jeschke
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
Maistr. 11
80337 München

Vorsitzender:
Prof. Dr. W. Eisenmenger
Telefon+49 (0)89 5160 - 5191
Telefax+49 (0)89 5160 - 5192
Ethikkommission@
med.uni-muenchen.de

www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Pettenkoferstr. 8a
D-80336 München

Hausanschrift:
Pettenkoferstr. 8
D-80336 München
München, 10.05.2012 EM /sc

Titel:	Krebsfrüherkennung bei gynäkologischen Tumoren
Antragsteller:	Prof. Dr. U. Jeschke, Dr. U. Andergassen
Projekt- Nr.	148-12

Sehr geehrter Herr Kollege Jeschke,
sehr geehrter Herr Kollege Andergassen,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 06.05.2012 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (EK- Antrag, Patienten- Information u. – Einverständniserklärung).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. W. Eisenmenger
Vorsitzender der Ethikkommission

N/ Mitglieder der Ethikkommission

P.S.: Bitte beachten Sie die aktuellen Richtlinien für Anträge an die Ethikkommission.
Internetadresse: www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Mitglieder der Kommission:
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. G. Paumgartner (stellv. Vorsitzender), PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zach

X. Eidesstattliche Versicherung

Ulrich Andergassen

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTC´s) im Blut von Brustkrebspatientinnen mit Hilfe von spezifischen Real-Time PCR Markern.

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01. Januar 2014

XI. Curriculum vitae

I. Lebenslauf

Ulrich Andergassen

Geburtsdatum	08. August 1979
Geburtsort	Bozen (Südtirol)
Familienstand	verheiratet, eine Tochter
Staatsangehörigkeit	Deutschland, Italien

Beruf

November 2008	Arzt in Weiterbildung Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum der Ludwig-Maximilians Universität München • Campus Innenstadt
seit 2009	Stellvertretende Leitung des Tumormmunologischen Forschungslabors Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum der Ludwig-Maximilians Universität München • Campus Innenstadt
seit 2010	Stellvertretender Lehrbeauftragter (Organisation und Planung der Studentenausbildung) Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum der Ludwig-Maximilians Universität München • Campus Innenstadt

Ausbildung

Schule

1990 - 1998 Klosterschule des Franziskanerordens in Bozen
Humanistisches Gymnasium mit altphilologische Ausbildung
Latein und Altgriechisch (Abitur Juli 1998)

Studium der Humanmedizin

2000 - 2008 Medizinische Fakultät der Leopold-Franzens Universität Innsbruck
Medizinische Fakultät der Universität Zürich

Dissertation bei Prof. Dr. med. Irene J. Virgolini

2006 - 2008 Universitätsklinik für Nuklearmedizin · Medizinische Universität Innsbruck

Promotion (Dr. med. univ.)

Oktober an der Medizinischen Universität Innsbruck
2008 „Radioaktive Somatostatin-Analoga in der Behandlung fortgeschrittener
Tumorerkrankungen“

Berufserlaubnis/Approbation

Dezember
2008 Berufserlaubnis Regierung von Oberbayern

September
2011 Approbation Regierung von Oberbayern

Wehrdienst

Verpflichtung bei der Gebirgsbrigade 23

1998 - 2000 Dienst in der 3. Kampfkompanie des Gebirgsjägerbataillon 233 Mittenwald

WISSENSCHAFTLICHE Arbeitsgruppen

seit 2008 **SUCCESS A / SUCCESS B / SUCCESS C / DETECT III / TREAT CTC – Studien**

Organisatorische- und wissenschaftliche Mitarbeit im Rahmen der deutschlandweiten Phase III Multicenter-Studien beim primären Mammakarzinom

seit 2010 **CaMiNEMS – Projekt**

Seventh Framework Programme – European Commission

Wissenschaftliche Mitarbeit als deutscher Partner am EU – Projekt

seit 2010 Gründung Arbeitsgruppe **Andergassen/Jeschke**

Tumorbiologie und Immunhistochemie gynäkologischer Tumore

MITGLIEDSCHAFTEN

seit 2008 American Society of Clinical Oncology (ASCO)

seit 2009 Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)

seit 2012 Bayrische Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde (BGGF)

FÖRDERUNGEN / PREISE

- 2013 **Heuer Stiftung für Medizinische Forschung** (16.598.-€)
„Real-Time-PCR basierter Nachweis zirkulierender Tumorzellen aus dem peripheren Blut von Brustkrebspatientinnen“
- 2011 **Friedrich-Baur-Stiftung** (5.000.-€)
„Nachweis disseminierter Mammakarzinom - Tumorzellen mittels Real-Time-PCR“
- 2011 **Posterpreis** (500.-€)
„Quantifizierung von CTC's beim Mammakarzinom mit Hilfe der Taq-Man-PCR“
Gemeinsame Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (OEGGG) und der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde (BGGF)
Erlangen 25. - 28. Juni 2011

II. Veröffentlichungen

Publizierte Artikel

Genome-wide association study identifies 25 known breast cancer susceptibility loci as risk factors for triple negative breast cancer.

Purrington KS, Slager S, Eccles D, Yannoukakos D, Fasching PA, Miron P, Carpenter J, Chang-Claude J, Martin NG, Montgomery GW, Kristensen V, Anton-Culver H, Goodfellow P, Tapper WJ, Rafiq S, Gerty SM, Durcan L, Konstantopoulou I, Fostira F, Vratimos A, Apostolou P, Konstanta I, Kotoula V, Lakis S, Dimopoulos MA, Skarlos D, Pectasides D, Fountzilas G, Beckmann MW, Hein A, Ruebner M, Ekici AB, Hartmann A, Schulz-Wendtland R, Renner SP, Janni W, Rack B, Scholz C, Neugebauer J, **Andergassen U**, Lux MP, Haeberle L, Clarke C, Pathmanathan N, Rudolph A, Flesch-Janys D, Nickels S, Olson JE, Ingle JN, Olswold C, Slettedahl S, Eckel-Passow JE, Anderson SK, Visscher DW, Cafourek V, Sicotte H, Prodduturi N, Weiderpass E, Bernstein L, Ziogas A, Ivanovich J, Giles GG, Baglietto L, Southey M, Kosma VM, Fischer HP, Network TG, Reed MW, Cross SS, Deming-Halverson S, Shrubsole M, Cai Q, Shu XO, Daly M, Weaver J, Ross E, Klemp J, Sharma P, Torres D, Rüdiger T, Wölfing H, Ulmer HU, Försti A, Khoury T, Kumar S, Pilarski R, Shapiro CL, Greco D, Heikkilä P, Aittomäki K, Blomqvist C, Irwanto A, Liu J, Pankratz VS, Wang X, Severi G, Mannermaa A, Easton D, Hall P, Brauch H, Cox A, Zheng W, Godwin AK, Hamann U, Ambrosone C, Toland AE, Nevanlinna H, Vachon CM, Couch FJ.

Carcinogenesis. 2013 Dec 9.

Detection of Circulating Tumour Cells from Blood of Breast Cancer Patients via RT-qPCR.

Andergassen U, Kölbl AC, Hutter S, Friese K, Jeschke U.

Cancers (Basel). 2013 Sep 25;5(4):1212-20.

Expression and function of galectins in the endometrium and at the human fetomaternal interface.

Jeschke U, Hutter S, Heublein S, Vrekoussis T, **Andergassen U**, Unverdorben L, Papadakis G, Makrigiannakis A.

Placenta. 2013 Oct;34(10):863-72. doi: 10.1016/j.placenta.2013.07.005. Epub 2013 Jul 30.

Toxicity Analysis in the ADEBAR Trial: Sequential Anthracycline-Taxane Therapy Compared with FEC120 for the Adjuvant Treatment of High-Risk Breast Cancer.

Schönherr A, Aivazova-Fuchs V, Annecke K, Jückstock J, Hepp P, **Andergassen U**, Augustin D, Simon W, Wischnik A, Mohrmann S, Salmen J, Zwingers T, Kiechle M, Harbeck N, Friese K, Janni W, Rack B.

Breast Care (Basel). 2012 Aug;7(4):289-95.

Macrophages: are they involved in endometriosis, abortion and preeclampsia and how?

Hutter S, Heublein S, Knabl J, **Andergassen U**, Vrekoussis T, Makrigiannakis A, Friese K, Mayr D, Jeschke U.

J Nippon Med Sch. 2013;80(2):97-103.

Detection of circulating tumour cells from peripheral blood of breast cancer patients via real-time PCR

Andergassen U, Kölbl AC, Friese K, Jeschke U

CLI 2013, 04/05

Detection of breast cancer cells in blood samples by immunostaining of the Thomsen-Friedenreich antigen.

Andergassen U, Zebisch M, Kölbl AC, Schindlbeck C, Ilmer M, Hutter S, Heublein S, Rack B, Friese K, Jeschke U.

Future Oncol. 2013 May;9(5):747-52. doi: 10.2217/fo.13.24.

The Role of PPARs in Placental Immunology: A Systematic Review of the Literature.

Hutter S, Knabl J, **Andergassen U**, Jeschke U.

PPAR Res. 2013;2013:970276. doi: 10.1155/2013/970276. Epub 2013 Mar 10.

Comparison of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and disseminated tumor cells in the bone marrow (DTC-BM) of breast cancer patients.

Schindlbeck C, **Andergassen U**, Hofmann S, Jückstock J, Jeschke U, Sommer H, Friese K, Janni W, Rack B.

J Cancer Res Clin Oncol. 2013 Jun;139(6):1055-62. doi: 10.1007/s00432-013-1418-0. Epub 2013 Mar 23.

Teilnahme an der SUCCESS-A Studie verbessert Intensität und Qualität der medizinischen Betreuung bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

Andergassen U, Kasprovicz N, Hepp P, Schindlbeck C, Harbeck N, Kiechle M, Sommer H, Beckmann M W, Friese K, Rack B J, Janni W, Scholz C

Geburtsh Frauenheilk 2013; 73: 63–69

Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer

Thalgott M, Rack B, Maurer T, Souvatzoglou M, Eiber M, Kreß V, Heck MM, **Andergassen U**, Nawroth R, Gschwend JE, Retz M.

J Cancer Res Clin Oncol. 2013 May;139(5):755-63. doi: 10.1007/s00432-013-1377-5.

Detection of Tumor Cell-Specific mRNA in the Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer; Evaluation of Several Markers with Real-Time Reverse Transcription-PCR.

Andergassen U, Hofmann S, Kölbl AC, Schindlbeck C, Neugebauer J, Hutter S, Engelstädter V, Ilmer M, Friese K, Jeschke U.

Int J Mol Sci. 2013 Jan 8;14(1):1093-104. doi: 10.3390/ijms14011093.

Mucin-1 and its relation to grade, stage and survival in ovarian carcinoma patients.

Engelstaedter V, Heublein S, Schumacher AL, Lenhard M, Engelstaedter H, **Andergassen U**, Guenther-Biller M, Kuhn C, Rack B, Kupka M, Mayr D, Jeschke U.

BMC Cancer. 2012 Dec 15;12:600. doi: 10.1186/1471-2407-12-600.

Quantification of breast cancer cells in peripheral blood samples by real-time rt-PCR.

Zebisch M, Kölbl AC, Schindlbeck C, Neugebauer J, Heublein S, Ilmer M, Rack B, Friese K, Jeschke U, **Andergassen U**.

Anticancer Res. 2012 Dec;32(12):5387-91.

Hormone receptor status erbB2 expression and cancer stem cell characteristics of circulating tumor cells in breast cancer patients

Rack B, Bock C, **Andergassen U**, Doisneau-Sixou S.

Histol Histopathol. 2012 Jul; 27(7): 855-64. Review.

CTCs in primary breast cancer

Rack B, **Andergassen U**, Janni W, Neugebauer J

Recent Results Cancer Res. 2012 ;195:179-85. Review.

Modifizierbare Lebensstilfaktoren und ihr Einfluss auf das Mammakarzinom

Salmen J, Hauner H, Hauner D, Rack B, Ortmann U, **Andergassen U**, Mohrmann S, Beckmann M W, Janni W

Geburtsh Frauenheilk 2011; 71(2): 149-150

Lebensstil-Beratung nach Mammakarzinom

Hepp P, Rack B, Salmen J, **Andergassen U**, Janni W

Frauenheilkunde up2date 2011;5(4): 237-244

Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer - results of a standardized follow-up.

Schindlbeck C, Pfab G, Jueckstock J, **Andergassen U**, Sommer H, Janni W, Friese K, Rack B. *Anticancer Res.* 2011 Sep;31(9):2749-55.

Trastuzumab clears HER2/neu-positive isolated tumor cells from bone marrow in primary breast cancer patients.

Rack B, Jueckstock J, Günthner-Biller M, **Andergassen U**, Neugebauer J, Hepp P, Schoberth A, Mayr D, Zwingers T, Schindlbeck C, Friese K, Janni W.

Arch Gynecol Obstet. 2011 Jun 30.

Modifizierbarer Lebensstil und sein Einfluß auf das Mammakarzinom

Salmen J, Hauner H, Hauner D, Rack B, Ortmann U, **Andergassen U**, Mohrmann S, Beckmann M W, Janni W

Senologie – Zeitschrift für Mammadiagnostik und –therapie 2011; 7(04): 184-185

The German SUCCESS C Study - The First European Lifestyle Study on Breast Cancer.

Rack B, **Andergassen U**, Neugebauer J, Salmen J, Hepp P, Sommer H, Lichtenegger W, Friese K, Beckmann MW, Hauner D, Hauner H, Janni W.

Breast Care (Basel). 2010;5(6):395-400. Epub 2010 Dec 8.

Individualized peptide-related-radionuclide-therapy concept using different radiolabelled somatostatin analogs in advanced cancer patients.

Gabriel M, **Andergassen U**, Putzer D, Kroiss A, Waitz D, Von Guggenberg E, Kendler D, Virgolini IJ.

Q J Nucl Med Mol Imaging. 2010 Feb;54(1):92-9.

Topoisomerase II alpha expression rather than gene amplification predicts responsiveness of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in women with primary breast cancer.

Schindlbeck C, Mayr D, Olivier C, Rack B, Engelstaedter V, Jueckstock J, Jenderek C, **Andergassen U**, Jeschke U, Friese K.

J Cancer Res Clin Oncol. 2010 Jul;136(7):1029-37. Epub 2010 Jan 6

Innsbruck experience with targeted radionuclide therapy using different radiolabeled somatostatin analogs

Gabriel M, **Andergassen U**, Putzer D, Decristoforo C, von Guggenberg E, Heute D, Madleitner R, Warwitz B, Dobrozemsky G, Virgolini I

Eur J Nucl Med Mol Imaging 2007; 34, (Supplement 2) 220-245

Usefulness of combined application of radiolabeled and long acting somatostatin analogues in patients with somatostatin receptor expressing malignancies

Gabriel M, Heute D, **Andergassen U**, Kendler D, Rodrigues M, Decristoforo C, Traub-Weidinger T, von Guggenberg E, Virgolini I

Eur J Nucl Med Mol Imaging 2007; 32, 65-72

BUCHBEITRÄGE

Gynäkologie und Geburtshilfe

Kapitel: Gynäkologische Notfälle

Andergassen U

4. überarbeitete Auflage: M. Stauber, T. Weyerstahl

Duale Reihe im Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2013

Adipositas und Brustkrebs – Ergebnisse der ADEBAR-Studie

Andergassen U

Current congress. 31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie

Karl Demeter Verlag im Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2011

Advances in Nuclear Oncology: Diagnosis and Therapy

Kapitel: Therapeutic Applications in Neuroendocrine Tumours

Virgolini I, **Andergassen U**

Bombardieri E, Buscombe J, Lucignani G, Schober O (eds).

Informa Healthcare, November 2007

XII. Danksagung

Als ich erfuhr, daß die Bürokratie in unserem Land mich noch einmal in die Rolle eines Doktoranden zwingen werden wird, damit also zwei Jahre Dissertation an der Klinik für Neuklarmedizin der Medizinischen Universität Innsbruck ad absurdum geführt wird, verfiel ich in kindlichen Trotz und verdrängte diese Tatsache für ein Jahr.

Zwei Menschen haben mich dazu gebracht über meinen Schatten zu springen und dafür möchte ich ihnen sehr danken. Allen voran der Seele und Mutter „unserer Maistraße“ Frau Christl Friedl. Frau Doktor Alexandra Kölbl spielte in dieser Entscheidungsfindung eine ebenso gewichtige Rolle. In Ihrer unvergleichlich trockenen, unnachgiebigen und doch liebenswürdigen Art trieb sie mich voran, wie sie es so wohl auch mit ihren Pferden macht, nur dieses Mal handelte es sich eben um einen Esel.

Metaphorisch ausgedrückt, ist der Inhalt dieser Dissertation eine der tragenden Wände meiner wissenschaftlichen Tätigkeit. Mit ein paar zusätzlichen Bauelementen wurde daraus ein Haus, erfüllt mit Leben, einer eigenen Arbeitsgruppe und Doktoranden. Nun wird vielleicht mit der Habilitation auch noch ein Tympanon in den Giebel dieses Gebäudes eingesetzt. Alles das verdanke ich meinem wissenschaftlichen Mentor Professor Udo Jeschke. Danken möchte ich ihm für die große, stets ungebrochene Unterstützung und vor allem für die unschätzbare Fähigkeit immer wieder einen Gordischen Knoten aus uninterpretierbaren statistischen Daten zu lösen.

Jede wissenschaftliche Forschungsarbeit braucht helfende Hände. Meine Arbeitsgruppe steht und fällt mit meiner Biologin Dr. Alexandra Kölbl und nahm ihren Anfang mit einem unvergeßlichen Doktoranden Herrn Dipl.-Pharm. Michael Zebisch. Sie waren in den Jahren oft Bauarbeiter und Abrißbrine an meinen Ideen. Für dies und mehr, vielen Dank.

Ohne einen Chef der einen fördert und fordert kann man nicht wachsen. Professor Klaus Friese, für mich als Arzt, Hochschullehrer, Wissenschaftler und vor allem als Mensch ein großes Vorbild.

Das was ich bin und woraus dies entstand, verdanke ich meinen Eltern. Vorbild, Wegweiser, stets Triebfeder und Unterstützer in allem. Vielen Dank Mama und Papa.

Widmen möchte ich diese Arbeit den zwei Damen an meiner Seite. Meiner geliebten Gattin Annette und meiner kleinen Tochter Itha. Ihr seit das Fundament auf dem ich bauen darf. Ich liebe Euch.