

**Analysen zirkulierender epithelialer Tumorzellen  
im periphervenösen Blut bei Patientinnen mit primär nicht  
metastasiertem Mammakarzinom unter adjuvanter Radiotherapie**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae  
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Matthias Andreas Mäurer  
geboren am 03.05.1988 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. K. Pachmann, Bayreuth
2. Prof. Dr. med. T. Wendt, Jena
3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Debus, Heidelberg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 2. Dezember 2014

## ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

Die nachstehend aufgeführten Abkürzungen werden im fortlaufenden Text der Arbeit verwendet und nicht nochmals explizit ausgewiesen.

7AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BB	Blutbild
Bcl-2	“B-cell lymphoma 2“- Gen
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA 1	“ <i>breast cancer 1</i> “- Gen
BRCA 2	“ <i>breast cancer 2</i> “- Gen
BSA	bovines Serumalbumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA 15-3	“ <i>cancer antigen 15-3</i> “ (Tumormarker)
CA 27-29	“ <i>cancer antigen 27-29</i> “ (Tumormarker)
CEA	Carcinoembryonales Antigen (Tumormarker)
CETC	“circulating epithelial tumour cells“ (zirkulierende epitheliale Tumorzellen)
c-Met	“met proto-oncogene“ / “hepatocyte growth factor receptor“- Gen
COX-2	Cyclooxygenase-2
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCIS	“ <i>ductal carcinoma in Situ</i> “(duktales Karzinom in situ)
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
D-PBS	Puffer: “Dulbecco's phosphate buffered saline“

DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL-Puffer	Erythrozytenlysepuffer
EpCAM	“ <i>epithelial cell adhesion molecule</i> “ (epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
ER	“ <i>estrogen receptor</i> “ (Östrogenrezeptor)
ET	Endokrine Therapie
FDA	“US Food and Drug Administration“
FITC	Fluorescein (fluoreszierender Farbstoff)
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
G	Grading (Differenzierungsgrad)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase
GGT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HDR	High-Dose-Rate-Brachytherapie
Her/2neu	“human epithelial growth factor receptor 2“ (humaner epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor 2 = Synonym für das Gen ERBB2: <i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i> )
ID	Identifikationsnummer
IOERT	“intraoperative electron radiation therapy“ (intraoperative Strahlentherapie)
IQR	“ <i>interquartile range</i> “ (Interquartilbereich)
i.S.	im Sinne
i.v.	intravenös
Ki-67	“antigen identified by monoclonal antibody Ki-67“- Gen
LAG	Lymphabflussgebiete
LDR	Low-Dose-Rate-Brachytherapie
LINAC	“ <i>linear accelerator</i> “ (Linearbeschleuniger)
MCF7	Brustkrebszelllinie etabliert durch die <i>Michigan Cancer Foundation</i>
MK	Mammakarzinom
NANOG	Bezeichnung für das Homöoboxgen Nanog
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid

o.g.	oben genannte
PAI-1	“plasminogen activator inhibitor type 1“ (Invasionsfaktor)
PBS	Puffer: <i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Saline)
PCR	“ <i>polymerase chain reaction</i> “ (Polymerasekettenreaktion)
PDR	Pulsed-Dose-Rate-Brachytherapie
PE	Puffer: PBS + 2mM EDTA
PIK3CA	“phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase“- Gen
PR	“ <i>progesterone receptor</i> “ (Progesteronrezeptor)
PTEN	“Phosphatase abd tensin homolog“- Gen
PTV	“ <i>planning target volume</i> “ (Planungs-Zielvolumen)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Radiotherapie / Strahlentherapie
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Tab.	Tabelle
TLR4	“toll-like receptor 4“- Gen
TNM	Tumorklassifikationssystem nach Tumorgroße (T), Nodalstatus (N), Metastasen (M)
UICC	“ <i>Union internationale contre le cancer</i> “ (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
UKJ	Universitätsklinikum Jena
uPA	“urokinase-type plasminogen activator“ (Invasionsfaktor)
z.T.	zum Teil

### Einheiten

μl	Volumen [Mikroliter, $1 \cdot 10^{-6}$ l]
ml	Volumen [Milliliter, $1 \cdot 10^{-3}$ l]
l	Volumen [Liter]
nm	Länge [Nanometer, $1 \cdot 10^{-9}$ m]
m	Länge [Meter]
pg	Masse [Pikogramm, $1 \cdot 10^{-12}$ g]
ng	Masse [Nanogramm, $1 \cdot 10^{-9}$ g]

μg	Masse [Mikrogramm, $1 \cdot 10^{-6}$ g]
mg	Masse [Milligramm, $1 \cdot 10^{-3}$ g]
g	Masse [Gramm, $10^{-3}$ kg]
Gy	Energiedosis [Gray, Joule pro Kilogramm, 1 J/kg]
μmol	Stoffmenge [Mikromol, $1 \cdot 10^{-6}$ Mol]
mmol	Stoffmenge [Mikromol, $1 \cdot 10^{-3}$ Mol]
mol	Stoffmenge [Mol]
bp	DNA-Länge [Basenpaare]
kb	DNA-Länge [Kilobasenpaare, $1 \cdot 10^3$ bp]
μM	Konzentration [Mikromol ( $1 \cdot 10^{-6}$ Mol) pro Liter, μmol/l]
mM	Konzentration [Millimol ( $1 \cdot 10^{-3}$ Mol) pro Liter, mmol/l]
M	Konzentration [Mol pro Liter, mol/l]
MeV	Energie [Megaelektronenvolt, $1 \cdot 10^6$ eV]
°C	Temperatur [Grad Celsius]
%	prozentualer Anteil [1/100]
sec	Zeit [Sekunde]
min	Zeit [Minute, 60 sec]
h	Zeit [Stunde, 60 min]
σ	Standardabweichung
$\bar{x}$	Mittelwert

### **Chemotherapeutika und Therapieschemata**

Capec	Capecitabin
CarbPl	Carboplatin
CyPH	Cyclophosphamid
Doc/Dotxl	Docetaxel; Taxotere <sup>®</sup>
EC	Epirubicin/Cyclophosphamid
Epi	Epirubicin
FEC	Fluorouracil/Epirubicin/Cisplatin
Gem	Gemcitabin
Pac	Paclitaxel; Taxol <sup>®</sup> ; Ribotax <sup>®</sup>
TAC	Docetaxel/Doxorubicin/Cyclophosphamid
Tax	Taxol <sup>®</sup>

# INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	3
2.1 Das Mammakarzinom.....	3
2.1.1 Zur Epidemiologie.....	3
2.1.2 Zu Ätiologie und Risikofaktoren.....	3
2.1.3 Zur Prognose.....	5
2.1.4. Zur Metastasierung.....	7
2.1.5 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik.....	9
2.1.6 Therapieprinzipien.....	10
2.1.6.1 Operation.....	10
2.1.6.2 Systemische Therapie.....	11
2.1.6.3. Radiotherapie (RT).....	14
2.2 Zirkulierende Tumorzellen.....	16
2.3 Tumorgenetik.....	19
3 ZIELE DER ARBEIT.....	26
4 MATERIALIEN UND METHODEN.....	27
4.1 Patientengut.....	27
4.1.1 Altersverteilung.....	28
4.1.2 Tumorcharakteristika.....	29
4.1.3 Operation.....	30
4.1.4 Chemotherapie.....	30
4.1.5 Antihormonelle Therapie.....	30
4.1.6 Radiotherapie (RT).....	31
4.2 Materialien.....	32
4.2.1 Chemikalien.....	32
4.2.2 Puffer und Lösungen.....	32
4.2.3 DNA-Oligonukleotide.....	33
4.2.4 Antikörper.....	34
4.2.5 Kits.....	34
4.2.6 Verbrauchsmaterialien.....	34
4.2.7 Laborgeräte.....	35
4.2.8 Software.....	35

4.3 Methoden.....	36
4.3.1 Immunfluoreszenz-Verfahren (MAINTRAC™) .....	36
4.3.1.1 Prinzip.....	36
4.3.1.2 Durchführung .....	36
4.3.1.3 Messung und Auswertung.....	38
4.3.2 Quantitative Genexpressionsanalyse.....	39
4.3.2.1 Zell-Isolierung mittels Single-Cell-Picking.....	40
4.3.2.2 Zell-Lyse und RNA-Isolierung .....	41
4.3.2.3 cDNA-Synthese.....	42
4.3.2.4 cDNA-Amplifikation.....	42
4.3.2.5 Quantitative Messung und qRT-PCR .....	43
4.3.2.6 Auswertung der qRT-PCR.....	45
4.3.2.7 Schmelzkurvenanalyse .....	46
4.3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	48
4.3.3 Statistische Auswertung .....	49
5 ERGEBNISSE.....	50
5.1 Ergebnisse der quantitativen CETC-Messungen.....	50
5.1.1 Patientenspezifische Verlaufsmessungen .....	50
5.1.2 Patientengruppierung .....	52
5.1.3 Datenanalyse „Ereignis-freie“ Überlebenszeit .....	54
5.1.3.1 Vergleich der Patientengruppen AN und AB .....	54
5.1.3.2 Vergleich der Patientengruppen AN und AB bzgl. Lokalrezidiven und Metastasen .....	55
5.1.3.3 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des Maßes der Zellzahländerung.....	55
5.1.3.4 Vergleich der Patientengruppen bzgl. einer Bestrahlung der LAG .....	57
5.1.3.5 Vergleich der Patientengruppen bzgl. einer Boost – Bestrahlung.....	58
5.1.3.6 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des pT – Stadiums .....	60
5.1.3.7 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des pN – Stadiums.....	61
5.1.3.8 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des Gradings.....	61
5.1.3.9 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des Progesteronrezeptor – Status.....	62
5.1.3.10 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des ER – & Her2/neu – Status.....	63
5.1.3.11 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des Parameters „Triple – Negativität“ .....	63
5.1.3.12 Vergleich der Patientengruppen hinsichtlich ausgewählter Parameter.....	64



5.1.4 Datenanalyse der Ereigniswahrscheinlichkeit .....	65
5.1.4.1 Vergleich Absinken/Anstieg (Beobachtungszeitraum 5 Jahre) .....	65
5.1.4.2 Vergleich Absinken/Anstieg differenziert nach Rezidiv und Fernmetastasen ..	65
5.1.4.3 Vergleich 10-faches Absinken/Anstieg (Beobachtungszeitraum 5 Jahre) .....	66
5.1.4.4 Bestrahlung der Lymphabflussgebiete (LAG) .....	67
5.1.4.5 Boost – Bestrahlung .....	68
5.1.4.6 pT – Stadium .....	68
5.1.4.7 pN – Stadium .....	68
5.1.4.8 Grading .....	69
5.1.4.9 Progesteronrezeptor – Status (PR) .....	69
5.1.4.10 Östrogen – & Her2/neu – Status .....	69
5.1.4.11 Triple-Negativität .....	70
5.1.4.12 Untersuchung weiterer Parameter .....	70
5.1.5 Vergleich der absoluten Anzahl zirkulierender Tumorzellen.....	71
5.1.6 Absolute Häufigkeit von lokoregionären Rezidiven und Fernmetastasen .....	73
5.2 Genexpressionsanalyse .....	74
5.2.1 GAPDH als Housekeeping – Gen.....	74
5.2.2 Ausgewählte Einzelzell-Profile.....	75
5.2.3 CETC-Verhalten der untersuchten Patientinnen.....	79
5.2.4 Expressionsverhalten von GAPDH (Housekeeping-Gen) .....	80
5.2.5 Expressionsverhalten von EpCAM.....	81
5.2.6 Expressionsverhalten von NANOG .....	82
5.2.7 Expressionsverhalten von Bcl-2 .....	82
5.2.8 Expressionsverhalten von TLR 4.....	83
5.2.9 Expressionsverhalten von COX-2.....	84
5.2.10 Expressionsverhalten von PIK3CA.....	85
5.2.11 Expressionsverhalten von Her2/neu .....	87
5.2.12 Expressionsverhalten von Vimentin.....	87
5.2.13 Expressionsverhalten von c-Met.....	88
5.2.14 Expressionsverhalten von Ki-67 .....	89
6 DISKUSSION .....	91
6.1 Bedeutung zirkulierender Tumorzellen.....	92
6.2 Bedeutung der Zellzahl-Erhöhung von CETC .....	93

6.3 Bedeutung der CETC bei Metastasierungsvorgängen .....	94
6.4 Bewertung der Methoden.....	95
6.4.1 Detektion von CETC mittels MAINTRAC™ .....	95
6.4.2 Sensitivität von EpCAM .....	97
6.4.3 Single-Cell-Picking und Einzelzell - qRT - PCR.....	98
6.5 Quantitative CETC - Messungen.....	100
6.5.1 Ereignis-freie Überlebenszeit .....	100
6.5.2 Ereigniswahrscheinlichkeit.....	103
6.5.3 Lokoregionäre Rezidive .....	106
6.5.4 Fernmetastasen.....	107
6.5.5 Gesamtüberleben.....	107
6.6 Genexpressionsanalyse .....	107
6.6.1 GAPDH (Housekeeping-Gen).....	109
6.6.2 EpCAM .....	109
6.6.3 NANOG.....	110
6.6.4 Bcl-2 .....	110
6.6.5 TLR 4 .....	110
6.6.6 COX-2 .....	111
6.6.7 PIK3CA .....	111
6.6.8 Her2/neu .....	112
6.6.9 Vimentin .....	112
6.6.10 c-Met .....	113
6.6.11 Ki-67.....	113
6.6.12 Ursachen für die allgemeine Expressionssteigerung.....	114
6.7 Relevanz der CETC im klinischen Alltag .....	116
7 SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	120
8 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	IX
9 ANHANG.....	XLIV
9.1 Abbildungsverzeichnis .....	XLIV
9.2 Tabellenverzeichnis.....	XLVI
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung .....	XLVIII
9.4 Lebenslauf.....	XLIX
9.5 Danksagung.....	XLIX

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung und krebsbedingte Todesursache bei Frauen. Die Mehrzahl der Erkrankten verstirbt nicht am Tumor selbst, sondern an den bei etwa einem Drittel aller Patientinnen auftretenden Metastasen (Martin 2005). Die im Blutkreislauf zirkulierenden epithelialen Tumorzellen (CETC) werden als mitverantwortlich für die Metastasenbildung angesehen, weshalb deren Bedeutung als prognostische und/oder prädiktive Marker in der Tumorthherapie intensiv untersucht wird (Schmidt-Kittler 2003).

## **Zielsetzung:**

Ziel dieser Arbeit war es, anhand der CETC den systemischen Effekt der Strahlentherapie bei Patientinnen mit primär nicht metastasiertem Mammakarzinom zu untersuchen und mögliche Veränderungen der CETC bzgl. ihrer Quantität und Genexpression im Rahmen der Strahlentherapie zu analysieren.

## **Material/Methoden:**

In Zusammenarbeit mit der Frauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurden insgesamt 161 Patientinnen mit klinisch gesichertem, primär nicht metastasiertem Mammakarzinom über einen Zeitraum von 09/2002 bis 09/2012 jeweils vor und nach der Radiotherapie Blutproben entnommen und untersucht. Dabei wurde zum einen mittels des MAINTRAC<sup>TM</sup> –Verfahren die Menge der CETC quantitativ im Blut bestimmt und deren peritherapeutischer Verlauf beobachtet.

Zum anderen wurde bei 9 Patientinnen eine Genexpressionsanalyse von 11 ausgewählten Genen (GAPDH, EpCAM, NANOG, Bcl-2, TLR 4, COX-2, PIK3CA, Her2/neu, Vimentin, c-Met und Ki-67) durchgeführt. Hierfür wurden vor und nach Strahlentherapie CETC einzeln isoliert und mittels Einzelzell-qRT-PCR untersucht. Auf diese Weise gelang es aus 131 Zellen insgesamt 1505 Messwerte zu gewinnen, wobei jeder einzelnen Tumorzelle eine definierte Kopienzahl des jeweiligen Gens zugeordnet werden konnte.

## **Ergebnisse:**

Das quantitative Verhalten der CETC wurde mit Hilfe von Kaplan-Meier Überlebenskurven im Hinblick auf die Entstehung von lokoregionären Rezidiven und Fernmetastasen ausgewertet. Kam es im Rahmen der leitliniengerecht durchgeführten Strahlentherapie zu einem Anstieg der CETC-Zellzahl, war dies mit einer signifikant schlechteren Prognose

hinsichtlich der Ereignis-freien Überlebenszeit und der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fernmetastasen verbunden (jeweils p-Wert < 0,05). Ein Absinken der detektierten Anzahl von CETC war hingegen mit einem besseren Outcome der Patientinnen verbunden.

Die Aktivitätsbestimmung der ausgewählten Gene erbrachte, dass es infolge der Strahlentherapie zu einer Steigerung der Expression aller untersuchten Gene kam. Die analysierten CETC zeichneten sich neben einem allgemein erhöhten Zellstoffwechsel, durch die Überexpression von Genen aus, welche eine Fernmetastasierung begünstigen.

### **Schlussfolgerungen:**

Anhand der Ergebnisse der quantitativen CETC-Bestimmung konnte gezeigt werden, dass das Verhalten der CETC mit dem tatsächlichen Krankheitsverlauf der Patientinnen korreliert. Durch die genetischen Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die Strahlentherapie systemische Wirkungen auf Expressionsebene hat und es bei den CETC zu einer Genaktivitätssteigerung kommt. Probleme der Detektionsmethoden wurden im Rahmen dieser Arbeit erkannt, analysiert und Verbesserungsvorschläge für weitere Untersuchungen aufgezeigt. Die Grenzen der MAINTRAC™ -Methode liegen vor allem darin, dass mit den verwendeten Antikörpern bisher nicht eindeutig zwischen Tumorzellen und normalen epithelialen Zellen unterschieden werden kann. Bei den Genexpressionsanalysen kam es aufgrund der Untersuchung von Einzelzellen zu einer starken Streuung der Messwerte.

Untersuchungen an den CETC in Kombination mit genetischen Analysen könnten künftig präzisere Aussagen hinsichtlich der Entstehung von Strahlenresistenzen und den dabei zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen ermöglichen. Damit könnte der Einsatz systemischer Therapien wie auch die Durchführung einer Strahlenbehandlung optimiert und Patientinnen erfolgreicher therapiert werden.

## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 Das Mammakarzinom

#### 2.1.1 Zur Epidemiologie

In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich ca. 70.000 Frauen an Brustkrebs (RKI 2012). Das Mammakarzinom (im Folgenden mit MK bezeichnet) ist damit die häufigste Krebserkrankung des weiblichen Geschlechtes und für 29 % aller Malignom-Neuerkrankungen bei Frauen verantwortlich. Das Risiko einer Frau, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken, liegt aktuell bei 12 %, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 64 Jahren (Kreienberg 2012).

Während die Zahl der Neuerkrankungen leicht ansteigt (für das Jahr 2012 wurden insgesamt 74.500 Neuerkrankungen prognostiziert), ist die Mortalität seit 20 Jahren nahezu konstant geblieben (RKI 2012). Diese Entwicklung kann auf ein vermehrtes Gesundheitsbewusstsein, auf zunehmend effektivere Methoden der Frühdiagnostik und diesbezüglich adjuvante Therapiemaßnahmen (Strahlen- und Chemotherapie) zurückgeführt werden (Blanks 2000, RKI 2012), möglicherweise aber auch auf die zunehmende Diagnose von Tumoren, die nicht lebensbedrohlich wären (Independent UK Panel on Breast Cancer Screening 2012). Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Brustkrebspatientinnen werden in Deutschland derzeit mit 83 % bis 87 % angegeben (Kreienberg 2012). Dennoch starben nach Angaben des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2010 in Deutschland 17.466 Frauen an Brustkrebs. Das MK war damit für 29 % aller Todesfälle bezogen auf Krebserkrankungen von Frauen im Alter von 35 bis 60 Jahren verantwortlich (Statistisches Bundesamt 2012).

#### 2.1.2 Zu Ätiologie und Risikofaktoren

Etwa 90 - 95 % aller Mammakarzinome treten sporadisch auf. Nur 5 % - 10 % sind erblich familiär bedingt und vorzugsweise bei jüngeren Familienmitgliedern anzutreffen, ohne dass auffällige Risikofaktoren dafür bekannt wären. Während bei den sporadisch auftretenden Mammakarzinomen u.a. Veränderungen des p53- und PTEN-Gens, des Her-2/neu-Onkoproteins, der Gene Cyclin D1 und Cyclin E, des epidermalen Wachstumsfaktors und des c-myc-Gens nachgewiesen wurden, können bei der Hälfte der hereditären Mammakarzinome heterozygote Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2 nachgewiesen

werden (Lynch 1995, Lancaster 1996). Diese wiederum werden, anders als beim sporadisch auftretenden MK, wo jeweils heterozygote Keimbahnmutationen vorliegen, autosomal dominant vererbt und zu 50 % an die folgende Generation weitergegeben (Satagopan 2001, Hofmann 2000, Kenemans 2008).

Die BRCA-Proteine nehmen an mehreren Prozessen in der Zelle teil, so z.B. an der Transkriptionskontrolle, der Zellzyklusregulation oder der DNA-Reparatur mittels homologer Rekombination (Venkitaraman 2004). Vor allem der Verlust der letzten Funktion erklärt die Fragilität und strukturelle Desorganisation des Genoms der BRCA1- und BRCA2-Tumoren. Trägerinnen dieser Defekte erkranken ca. 20 Jahre früher als Frauen ohne familiäres Risiko und haben ein kumulativ gehäuftes Lebenszeitrisiko von 50 % - 80 % an einem MK und/oder 10 % - 40 % an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Antoniou 2003, Goldberg 2006, Boulton 2006, Sauer 2009). Für die erst kürzlich identifizierten Gene RAD51C und RAD51D werden ähnlich hohe Risiken angenommen (Meindl 2010, Loveday 2011).

Das individuelle Erkrankungsrisiko des sporadisch auftretenden Mammakarzinoms wird aus einer Vielzahl von Faktoren errechnet, die teilweise in ihrer Wichtung noch nicht abschließend bestätigt sind. Hinzu kommen weitere, bisher unbekannte bzw. noch nicht hinlänglich untersuchte Faktoren. Die wichtigsten sind, neben ethnischen Besonderheiten und Umwelteinflüssen (Strahlenexposition), vor allem Faktoren des gynäkologischen und hormonellen Status (Ballaro-Bersbash 1999), der Familienanamnese (bei Verwandten 1. Grades steigt das Risiko um das 4 - bis 6 - fache an, siehe Chang-Claude 1994 & 1995, Becker 1996, Houlston 2004), der Lebensweise (Schatzkin 1994, Calle 2003, Wolf 2007) und des Sozialstatus (Chen 2006, Tab. 1).

Risikofaktoren		Relatives Risiko
Alter	25 : 45 Jahre	1 : 20
Alter bei Menopause	42 : 52 Jahre	1 : 2,0
Körpergewicht	normalgewichtig : adipös	1 : 2,5
Serumlipide	normal : erhöht	1 : 1,6
Antibiotikatherapie	Nie : 50 Tage insgesamt	1 : 1,5
Alter bei erster Geburt	20 : 35 Jahre	1 : 1,4
Alter bei Menarche	14 : 11 Jahre	1 : 1,3
Parität	Multipara : Nullipara	1 : 1,3
Alkoholkonsum	kein : $\geq 20$ g / Tag	1 : 1,3
Sportliche Aktivität	Aktiv : nicht aktiv	1 : 1,2

Tab. 1 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms (Strauss 2009).

Diese miteinander interagierenden Faktoren, welche schließlich zur Entstehung von invasiven Malignomen führen können, bedingen die hohe biologische Variabilität der Erkrankung zwischen einzelnen Patienten und machen individuelle Präventivmaßnahmen bzw. Therapieansätze erforderlich.

### 2.1.3 Zur Prognose

Brustkrebs ist in seinem klinischen und histopathologischen Erscheinungsbild sehr heterogen, die Prognose und die Behandlungsformen sind stark vom Typ des Tumors und dem Zeitpunkt der Diagnose abhängig. Die Tumorgröße, der axilläre Lymphknotenstatus und das Vorhandensein von Fernmetastasen besitzen, gemäß der TNM-Klassifikation, das höchste prognostische Gewicht für das Überleben 5, 10 und 15 Jahre nach Erstdiagnose (Rosen 1989 & 1993, Page 1992 & 1998, Bundred 2001, Carter 1989, NZGG 2009, NCCN 2011). Als weitere evidenzbasierte Prognosefaktoren gelten die Tumorhistologie (günstig: tubuläre, kribiforme, muzinöse, adenoid-zystische und papilläre Karzinome, siehe Fisher 1990), die histologische Graduierung (Bloom 1957, Elston 1991), peritumorale Lymph- und Blutgefäßeinbrüche (Gasparini 1994, Kato 2003, Colleoni 2007), Invasionsfaktoren uPA und PAI-I bei nodal negativen Karzinomen (Janicke 2001, Look 2002, Harris 2007, Harbeck 2009), Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus (Osborne 1998, Bundred 2001, Gaforio 2003, NCCN 2011), sowie das Vorhandensein der Her-2/neu-Überexpression (Slamon 1987, Ingvarsson 1999, Goldhirsch 2005, Nothackern 2007). Vor allem die beiden letztgenannten Faktoren sind für die Therapieplanung von großer Bedeutung.

Kontrovers diskutiert wird die Frage, ob das Erkrankungsalter und der Menopausenstatus voneinander unabhängige prognostische Faktoren sind. Darüber hinaus sind jedoch zahlreiche weitere, sogenannte „neue Prognosefaktoren“, Gegenstand aktueller Forschung. Diese berücksichtigen u.a.

- biochemische Aspekte (z.B. tumorassoziierte Proteolysefaktoren oder die Tumormarker CA 15-3, CEA, CA 27-29),
- zellkinetische Aspekte (S-Phase, Ploidie, Ki-67),
- genetische (Genexpressionsprofile) oder
- morphologische Aspekte wie die in dieser Arbeit untersuchten zirkulierenden Tumorzellen im Blut bzw. Tumorzellen im Knochenmark (Yerushalmi 2010, Dowsett 2011).

Aufgrund verbesserter Vorsorgeuntersuchungen werden zurzeit ca. 50 % aller Brustkrebsfälle diagnostiziert, bevor eine Lymphknotenbeteiligung vorliegt. Bei diesen Patientinnen beträgt das zu erwartende Rezidivrisiko über einen Zeitraum von 10 Jahren hinweg etwa 30 % (Fisher 2002, Pantel 2004). Bei nodal positiven Patientinnen beträgt das Rezidivrisiko etwa 75 %, wobei sich die Prognose ihrerseits in Abhängigkeit von der Anzahl der befallenen Lymphknoten deutlich verschlechtert (Kiechle 2010).

Für die Entstehung von Rezidiven und Metastasen werden - trotz sorgfältiger Resektion und dem Einsatz adjuvanter Medikamente - die im Patienten frühzeitig hämatogen und lymphogen gestreuten überlebenden Tumorzellen verantwortlich gemacht und stellen auf diese Weise einen prognosebestimmenden Faktor dar (Glaves 1983, Pantel 1993 & 2003, Braun 2000, Chambers 2000, Pachmann 2001, Taubert 2004). Laut Gupta und Massagué werden nur 10 % der Primärtumore für den Tod von Krebspatienten verantwortlich gemacht, 90 % werden von Metastasen und ihren Folgen verursacht (Gupta & Massagué 2006). Diese Ergebnisse sind insbesondere deshalb von großer Bedeutung, da das metastasierte MK als nicht heilbar angesehen wird (Christofanilli 2005, Zielinski 2005). Weniger als 10 % dieser Patienten bleiben mehr als fünf Jahre progressionsfrei (Greenberg 1996). Deshalb sollte es ein vordringliches Ziel sein, die Krankheit bereits vor der Manifestation von Metastasen zu behandeln (siehe Kapitel 2.1.4).

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die genetischen Voraussetzungen für eine Metastasierung in einem sehr frühen Entwicklungsstadium des Tumors festgelegt werden, wobei Tumorentwicklung und Metastasierung nicht auf denselben genetischen Grundlagen beruhen müssen (Fidler 1990). Daraus folgt, dass es einen hohen Bedarf gibt, weitere prognostische Marker für die Brustkrebsentstehung und -metastasierung zu finden, um Patientinnen mit hohem Rückfallrisiko frühzeitig erkennen zu können. Außerdem wäre es dann vielleicht möglich, eine spezifischere, adjuvante hormonale Therapie bzw. Chemotherapie durchzuführen.

Inwiefern im Knochenmark detektierte Tumorzellen mit einer ungünstigeren Prognose hinsichtlich des Krankheitsverlaufes einer Patientin einhergehen und daraus resultierend als Parameter bzw. unabhängiger Prognosefaktor fungiert, wird kontrovers diskutiert (Diel 1992, Kvalheim 1996, Lalle 2000, Janni 2005, Braun 2005, Falck 2012). Der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark fand 1997 optional Eingang in die TNM-Klassifikation, nachdem deren Nachweis als unabhängiger Prognosefaktor auf der Grundlage von ausgewerteten Knochenmarkproben als erbracht angesehen wurde. Es konnte eine



signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Knochenmarktumorzellen und der rezidivfreien Überlebenszeit gezeigt werden (Diel 1996 & 1998, Solomayer 1998, Janni 2000). Andere Forschungsgruppen kamen allerdings in Metaanalysen zu dem Schluss, dass der eigentliche Beweis der unabhängigen prognostischen Bedeutsamkeit noch nicht erbracht sei (Funke 1998, Gebauer 2001). Zur Lösung dieser Problematik bedarf es weiterer Studien. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob und inwiefern die im peripher-venösen Blut zirkulierenden Tumorzellen als prognostische Parameter bzw. als Tumormarker genutzt werden können (siehe Kapitel 2.1.7).

#### **2.1.4. Zur Metastasierung**

Die zentrale Bedeutung der okkulten Tumorzell dissemination und der daraus resultierenden Entstehung von Metastasen in Bezug auf den Verlauf und die Prognose des Mammakarzinoms wurde bereits im Kapitel Prognose (2.1.3) beschrieben.

Sowohl die Tumorgenese als auch die Dissoziation einzelner Tumorzellen vom Primärtumor werden durch verschiedene Faktoren bedingt. Beispielsweise spielt die sukzessive Akkumulation von multiplen genetischen und epigenetischen Alterationen, denen die Desorganisation der Gewebemorphologie und unkontrolliertes Wachstum zugrunde liegen, eine Rolle (Fearon 1990). Zusätzliche genomische Ereignisse erhöhen die Invasivität der Tumorzellen, wodurch die Entstehung von Mikrometastasen und Metastasen überhaupt gefördert wird (Schmidt-Kittler 2003, Klein 2003). Einzelne Tumorzellen lösen sich häufig bereits im Frühstadium aus dem Zellverband des soliden Primärtumors und gelangen über das Lymph- und Blutgefäßsystem (lymphogen und hämatogen) in andere Organe (Pantel 2004, Braun 2005, Klein 2008, Stoecklein 2010).

Die Vaskularisierung des Primärtumors wie auch Proteolyse-, Adhäsions- und Migrationsmechanismen sind für die Loslösung der Tumorzellen aus dem Zellverband entscheidend. Während der inflammatorischen Phase der Wundheilung sind rekrutierte Granulozyten, die in devitalisiertes Gewebe infiltrieren und das Debridement beginnen, der vorherrschende Zelltyp (Eming 2007). In dieser Phase werden von den Granulozyten eine Vielzahl von hoch-aktiven antimikrobiellen Substanzen, wie kationische Peptide und vor allem Proteasen, ins umgebende Gewebe abgegeben (Weiss 1989, Eming 2007). Dies führt zu einer Akkumulation von Tumorzellen durch Zell-Zell-Adhäsion in den Blutkapillaren und dann zu einer Invasion dieser in das umliegende Gewebe und schließlich zum Übertritt in das Gefäßsystem. Über Vorgänge, welche unzureichend erforscht sind, kommt es zur Adhäsion an

das Gefäßendothel des Zielorgans mit anschließendem Wachstum der Tumorzellaggregate im Kapillarendbett (Chambers 2002).

Die Extravasation erfolgt durch die gleichen Mechanismen, die zuvor die Invasion des Primärtumors begünstigt haben. Hierfür wird insbesondere der auf Oberflächen von MK-Zellen exprimierte chemotaktische Rezeptor CXCR4 verantwortlich gemacht (Müller 2001). Sind die Erfolgsorgane erreicht, präsentieren sich die Tumorzellen entweder als einzelne Vorläuferzellen, die am Aufbau eines tumoreigenen Gefäßsystems beteiligt sind oder als Zusammenschluss mehrerer Tumorzellen, welche proliferieren oder in einen mitotisch inaktiven Ruhezustand („cell dormancy“) eintreten (Meng 2004, Aguirre-Ghiso 2007, Goss 2008). Letztere werden vor allem für eine Manifestation von Fernmetastasen nach einer langen, krankheitsfreien Latenzzeit, verantwortlich gemacht.

Das MK metastasiert bevorzugt in mehrere, verschiedene Organsysteme gleichzeitig. Am häufigsten betroffen sind Lunge (55 % - 77 %), Leber (50 % - 71 %) und Knochen (49 % - 74 %) (Strauss 2009).

Daneben wird die Rolle der aus dem Primärtumor ausgeschwemmten, okkulten Tumorstammzellen diskutiert (Al-Hajj 2003, Balic 2006). Tumorstammzellen selbst zeichnen sich durch ihre Langlebigkeit, ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung mit nachfolgender Ausdifferenzierung sowie durch eine Strahlen- und Chemotherapieresistenz aus (Reya 2001, Al-Hajj 2003, Diehn 2006, Phillips 2006, Wright 2008, Cariatì 2008, Nicolini 2010). Aufgrund dieser Eigenschaften ist es disseminierten Tumorstammzellen möglich, eine Primärtherapie zu überleben, lange im Knochenmark zu verbleiben, in der Zirkulation zu persistieren und Fernmetastasen zu initialisieren. Die Wirksamkeit einer Therapie hängt folglich stark von der selektiven Eliminierung von tumorinduzierenden Stammzellen ab (Shigdar 2011). Darüber hinaus wird angenommen, dass primär die Tumorstammzellen für die Formation und das Wachstum eines Tumors verantwortlich sind und somit auch als Ursprung der Primärerkrankung angesehen werden können (Reya 2001, Tan 2006, Diehn 2006, Cariatì 2008, Charafe-Jauffret 2009). Somit ist sowohl die Anzahl als auch das Metastasierungspotential im Organismus verbliebener Tumorstammzellen für die Prognose und die Therapie von Krebspatienten von großer Bedeutung (Al-Hajj 2003, Tan 2006, Cariatì 2008).

### 2.1.5 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik

Das MK manifestiert sich typischerweise als tastbarer Knoten (60 %) in der Brust, ggf. in Verbindung mit vergrößerten axillären Lymphknoten. Der Knoten befindet sich in 50 % der Fälle im äußeren oberen Quadranten. In den übrigen Quadranten werden jeweils etwa 10 % und in der retromamillären Region etwa 20 % der Karzinome diagnostiziert (Böcker 2008). In 20 % der Fälle treten Schmerzen in der betroffenen Brust sowie Druck- und Spannungsgefühle auf. Des Weiteren können Einziehungen oder Formveränderungen (in 6 % der Fälle Peau d'orange, Erytheme oder Ekzeme) sowie Sekretionen aus der Mamille einseitig, (wässrig-blutig, 4 % ohne umschriebene tastbare Veränderung) beobachtet werden. Allgemeinsymptome wie z.B. Gewichtsverlust, sind nur bei 2 % der Patientinnen zu beobachten und betreffen v.a. Patienten im metastasierten Stadium.

Im Rahmen der Frühdiagnostik haben die klinische Untersuchung, die Mammographie (ggf. mammographische Zusatzaufnahmen) und die Sonographie einen zentralen Stellenwert („Goldstandard“). Sie werden unter dem Begriff „Komplementäre Mammadiagnostik“ zur Abklärung von Herdbefunden zusammengefasst (NICE 2009, NZGG 2009). Zur klinischen Untersuchung gehört insbesondere die Palpation der Brust einschließlich ihrer Lymphabflusswege axillär, infra- und supraklavikulär, obgleich die Sensitivität der alleinigen Tastuntersuchung mit knapp 30 % unbefriedigend ist (Kolb 2002). Bei allen auffälligen Befunden sowie klinisch okkulten, mammographisch suspekten Herden ist eine histologische Sicherung mittels minimalinvasiver Diagnostik anzustreben (Albert 2008).

Die Mammasonographie mittels Hochfrequenzsonde, die Mamma-MRT (durch Sensitivität > 95 % v.a. hilfreich bei Verdacht auf Multizentrität), die Galaktographie sowie spezielle interventionelle Methoden, wie Stanzbiopsie, Vakuumbiopsie oder Feinnadelpunktionen ergänzen die diagnostischen Optionen. Bei allen Patientinnen mit gesichertem positivem Befund sollte bezüglich der Tumorausbreitung ein prätherapeutisches „Staging“ (Einteilung in TNM-Klassifikation der UICC) erfolgen. Hierzu werden weitere Untersuchungen, wie z.B. jene der Röntgen-Thorax-Aufnahme in zwei Ebenen, der Leber-sonographie, der Skelettszintigraphie mit gezielter Röntgenkontrolle der mehrspeichernden Areale und des Blutes (BB, BSG, Kalzium, Transaminasen, GGT, Kreatinin, alkalische Phosphatase etc.) für die Klassifikation empfohlen (Wannemacher 2006, Kreienberg 2012). Neben diesen genannten diagnostischen Methoden besteht außerdem die Möglichkeit den Hormonrezeptor- und Her-2-Status in der Stanzbiopsie bzw. die Tumormarker (CEA, CA 15-3, CA 27-29, uPA/PAI-1) im Blut zu bestimmen (Harris 2007, NICE 2009, Hammond 2010, NCCN 2011).

Aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität der Tumormarker beim MK sind diese Untersuchungen jedoch nicht für Screenings oder Früherkennungsmaßnahmen, sondern v.a. für die Prognosebestimmung sowie zur Verlaufsbeurteilung geeignet (siehe Kapitel 2.1.3).

Neben den von der ASCO als wissenschaftlich gesichert betrachteten Tumormarkern gibt es noch weitere, auf deren Validierung in verschiedenen Studien hingearbeitet wird: DNA flow cytometry-basierende Proliferation, p53, Cathepsin D, Ki-67, Cyclin D, Cyclin E (oder andere Proliferationsmarker), Proteomik, bestimmte Multiparameterassays sowie die Detektion von Knochenmarksmikrometastasen und zirkulierende Tumorzellen. Mit diesen zirkulierenden Tumorzellen im peripheren venösen Blut befasst sich die vorliegende Arbeit (siehe Kapitel 2.2).

### **2.1.6 Therapieprinzipien**

Die in den letzten Jahren gewonnenen neuesten Erkenntnisse bzgl. des Charakters der Erkrankung machen eine differenzierte Betrachtungsweise bzgl. der Therapiemaßnahmen notwendig. Demnach gilt das primäre MK bereits im Frühstadium (d.h. auch ohne den Nachweis manifester Fernmetastasen) als eine Systemerkrankung mit lokaler Komponente (Spektrumhypothese, Hellmann 1997). Diese Annahme besitzt jedoch nach wie vor hypothetischen Charakter, da ein hoher Anteil der Patientinnen nie Fernmetastasen entwickelt und zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nur etwa 10 % der Frauen Metastasen aufweisen (Abraham 2001). Ziel muss es daher sein, die Patientinnen mit einem hohen Fernmetastasen-Risiko von jenen zu unterscheiden, welche diesbezüglich kein erhöhtes Risiko aufweisen.

Eine individualisierte, dem Befund und den Prognosefaktoren angepasste Behandlung, in die auch das Alter und das Allgemeinbefinden der Patientinnen eingehen sollten, steht daher im Vordergrund. Etwa 95 % aller MK-Patientinnen erhalten eine Kombinationsbehandlung, bestehend aus Operation und adjuvanter Strahlen- bzw. Chemo-/Hormontherapie, mit dem Ergebnis signifikanter Überlebensvorteile gegenüber einer alleinigen lokoregionalen Behandlung (Earl 2004).

#### **2.1.6.1 Operation**

Als Therapiegrundlage für alle nicht fortgeschrittenen Mammakarzinome fungiert die operative Entfernung des Tumors als Primärmaßnahme. Eine solche Operation umfasst als „onkologische Mindestanforderung“ sowohl die vollständige Entfernung des Tumors mit gesundem Randsaum (R0-Status) als auch die Entfernung befallender axillärer Lymphknoten (Renton 1996, Blichert-Toft 1998, Houssami 2010). Die Bestimmung des histologischen

Nodalstatus (pN-Status) ist dabei standardmäßiger Bestandteil der operativen Therapie und erfolgt heutzutage anhand der Sentinel-Lymphknotenbestimmung (Kühn 2005, Lymann 2005).

Der Umfang des operativen Eingriffs orientiert sich an der präoperativen, bildgebenden Diagnostik, am histopathologischen Befund und am Wunsch der Patientin, unter Berücksichtigung des Verhältnisses von Tumorgröße und Brustvolumen sowie des zu erwartenden kosmetischen Ergebnisses. Prinzipiell hat die Radikalität des lokalen Vorgehens keinen Einfluss auf die Heilungsaussichten (Stauber 2007). 70 % - 80 % aller Operationen bei Patientinnen mit primär nicht metastasiertem MK können bzw. sollten brusterhaltend durchgeführt werden (Winzer 2005, Kreienberg 2012). Die brusterhaltende Therapie (BET) mit anschließender Strahlenbehandlung ist der modifizierten radikalen Mastektomie bzgl. des Überlebens mindestens gleichwertig (Wald 1995, Fisher 2002, Veronesi 2002, Wallgren 2003, EBCTCG 2005). Das operative Verfahren betreffend, sollten deshalb alle Patientinnen, besonders im Hinblick auf die psychische Belastung, über eventuelle Einschränkungen der Lebensqualität und in Bezug auf das ästhetische Ergebnis gründlich aufgeklärt werden (Al-Ghazal 1999, NZGG 2009).

Bei großen, multifokalen, inflammatorischen, weit ausgebreiteten Tumoren (> 3,0 cm) oder bei Hautinfiltrationen ist eine BET nicht möglich. In diesem Fall muss eine radikale Mastektomie vorgenommen werden (Fisher 1994, NZGG 2009). Bei erhöhtem Risiko für ein lokales oder regionäres Rezidiv erfolgt eine lokoregionale Strahlentherapie (Kreienberg 2012; siehe Kapitel 2.1.6.3).

### **2.1.6.2 Systemische Therapie**

Aufgrund der Annahme, dass es sich beim MK um eine Systemerkrankung mit früher Dissemination von Tumorzellen handelt, wird in der Regel 1-2 Wochen nach der Operation eine systemische, zytostatische, endokrine und/oder auf Antikörpern basierende Therapie begonnen (Schmidt-Kittler 2003, Klein 2003, Rühl 2004, Stoecklein 2010). Das Ziel besteht darin, bereits disseminierte Tumorzellen in ihrem Wachstum zu hemmen und zu eliminieren, um insbesondere Rezidive bzw. Fernmetasen, die unbehandelt bei 60 % der Patientinnen entstehen würden, verhindern und somit die rezidivfreie Zeit verlängern zu können (Racila 1998, Schmid 2002, Eucker 2006).

Bei der Entscheidung bzgl. der Notwendigkeit und Auswahl der adjuvanten Therapie werden die Patientinnen in unterschiedliche Risikogruppen eingeteilt. Dabei werden Faktoren wie Tumorgröße, Grading, Ki-67-Wert, Alter, Menopausen-, Lymphknoten-, Hormonrezeptor-

und Her-2-Status berücksichtigt (EBCTCG 2011, Goldhirsch 2011). Die „St. Galler Empfehlungen“ aus dem Jahre 2009 verweisen v.a. auf die endokrine Sensitivität, jene von 2011 beziehen sich hauptsächlich auf die molekularen Subtypen als entscheidendes Kriterium für die Indikationsstellung zur adjuvanten Chemotherapie (Goldhirsch 2011, siehe Tab. 2).

Subtyp	Luminal A - like	Luminal B - like		HER/2neu - positiv	Triple - negativ
		HER/2neu - negativ	HER/2neu - positiv	non - luminal	duktal
ER / PgR	Hoch positiv	positiv	positiv	negativ	negativ
HER-2	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ
Ki-67 / G	niedrig	hoch	-	-	-
	< 14 % G1	≥ 14 % / G3			
Häufigkeit	~ 65 %		~ 10 %	~ 10 %	~ 15 %
Therapie	Endokrine Therapie (ET)	Chemotherapie (CT) + ET	Trastuzumab (T) + CT + ET	CT + T	CT

60 %

**Tab. 2 Risikoeinteilung und Therapieauswahl nach molekularbiologischem Subtyp, St. Gallen 2011.**

Demnach ist bei Patientinnen vom Tumortyp Luminal A eine endokrine Therapie (ET) angezeigt und ausreichend, prämenopausal mit Tamoxifen/GnRH-Analoga und postmenopausal mit Aromataseinhibitoren der 3. Generation (NICE 2009, NZGG 2009, EBCTCG: Davies 2011). Die endokrine Therapie beeinflusst das östrogenabhängige Tumorstadium durch die Ausschaltung der Ovarialfunktion (GnRH-Analoga), durch Reduktion der Östrogenproduktion (Aromataseinhibitoren) bzw. durch die kompetitive Hemmung des Östrogenrezeptors (Tamoxifen, siehe Arteaga 1991, Ellis 1997, Boeddinghaus 2001). Bei intermediärem Rezidivrisiko mit hoher endokriner Sensitivität muss der Nutzen einer Kombination aus Chemo- und Hormontherapie gegenüber der alleinigen endokrinen Therapie abgewogen werden (Einzelfallanalyse, siehe Thuerlimann 2001). Bei erhöhtem Risiko und/oder Rezeptornegativität ist immer eine Chemotherapie anzustreben (NICE 2009, EBCTCG: Davies 2011).

Als europaweite Standardchemotherapie im adjuvanten Setting gilt die anthrazyklinhaltige Therapie (5-Fluorouracil/Epirubicin/Adriamycin). Bei axillärem Lymphknotenbefall werden zusätzlich Taxane (Paclitaxel/Docetaxel) eingesetzt. In der Regel werden 4 - 6 Zyklen einer Kombinationstherapie verabreicht, wobei eine sequentielle Gabe zulässig ist. Vor allem Hochrisiko-Patientinnen, aber auch nodal negative Patientinnen (pN0), die als ER - bzw. PR -

negativ einzustufen sind, scheinen von einer Chemotherapie mit Anthrazyklinen zu profitieren (Bria 2006). So konnte z.B. bei unter 50-jährigen Patientinnen nach Anwendung einer anthrazyklinbasierenden Polychemotherapie eine Sterblichkeitsreduktion um 38 % nachgewiesen werden.

Sowohl die adjuvante, endokrine Therapie (Tamoxifen) als auch die Chemotherapie (Anthrazykline) reduzieren, unabhängig voneinander, das individuelle Rezidivrisiko und die Sterblichkeit um etwa 30 % (EBCTCG: Davies 2011). Die Kombination von Chemo- und Hormontherapie wiederum erwies sich hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens bei rezeptorpositiven Patientinnen gegenüber dem Einsatz einer alleinigen Chemotherapie als überlegen (Davidson 1999).

Bei Patientinnen mit Her2-positivem MK kann die einjährige, adjuvante Antikörpertherapie mit dem Wirkstoff Trastuzumab zu einer Senkung der Rezidivrate von 20,5 % auf 12,9 % innerhalb eines Jahres nach der Operation führen. Der hierbei verwendete humanisierte, monoklonale Antikörper wird entweder simultan oder sequentiell zur Chemotherapie verabreicht (Gianni 2011, Perez 2011, Slamon 2011, Yin 2011). Als Vorteile von Immuntherapien gelten im Allgemeinen, dass sie zielgerichtet („targeted therapy“), zellzyklusunabhängig und besser verträglich sind als traditionelle Medikamente (Riethmüller 1993, Baeuerle 2009). Ein geeignetes Ziel für einen immunologischen Therapieansatz sind u.a. die in dieser Arbeit untersuchten disseminierten und im Blut zirkulierenden epithelialen Tumorzellen (Riethmüller 1998, Müller 2001). Das bei epithelialen Tumoren, wie dem MK, häufig überexprimierte Protein EpCAM (siehe Kapitel 2.4.) bietet neben seiner prognostischen Relevanz diesbezüglich einen weiteren, neuen Ansatz (Armstrong 2003, Spizzo 2004, Ruf 2007, Sebastian 2009).

Die adjuvante Gabe von Bisphosphonaten wie z.B. Clodronat oder Zoledronat verringern sowohl signifikant den therapieinduzierten Knochendichteverlust als auch Knochenschmerzen. Eindeutige Daten bzgl. der Beeinflussung der rezidivfreien Zeit und des Gesamtüberlebens liegen aktuell jedoch nicht vor (Pavlakakis 2005, Loibl 2009, Kreienberg 2012).

Es sei nochmals darauf verwiesen, dass sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit dem primär nicht metastasierten MK befasst. Aus diesem Grund wird auf die Therapie des metastasierten Verlaufes nicht detaillierter eingegangen.

### 2.1.6.3. Radiotherapie (RT)

Im Rahmen der BET ist die perkutane Homogenbestrahlung der betroffenen Brust obligat und damit integraler Bestandteil des Therapiekonzeptes beim invasiven MK (NHMRC 2001, Van de Steene 2004, Clarke 2005, EBMG 2006, NCCN 2007). Prospektive, randomisierte Studien verglichen die Ergebnisse der alleinigen brusterhaltenden Operationen mit jenen, welche zusätzliche postoperative Homogenbestrahlung anwandten. Alle Studien wiesen für die bestrahlten Patientinnen eine signifikante Senkung der In-Brust-Rezidivrate nach und erbrachten für diese auch Überlebensvorteile (Fisher 1993, Liljegren 1999, Veronesi 2002, Wallgreen 2003, Fyles 2004, Vinh Hung 2004, Whelan 2005). Es konnte kein Subkollektiv ermittelt werden, welches nicht von einer solchen Behandlung profitiert hätte (Anderson 2009, Prescott 2007, van Wely 2011, EBCTCG: Darby 2011).

Primäres Ziel jeder Bestrahlungstherapie ist die lokale Tumorkontrolle durch die Vermeidung von Rezidiven. Abhängig vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung kann die Rate lokaler bzw. lokoregionaler Rückfälle um bis zu 80 % mittels Bestrahlung gesenkt werden (von 25 % - 40 % ohne RT auf 5 % - 10 % mit Bestrahlung, siehe Clarke 2005, Potter 2007, Kribus 2008, EBCTCG 2011: Darby 2011). Dieses prozentuale Verhältnis ist invariant hinsichtlich der Art des operativen Eingriffs.

Das sekundäre Ziel der Radiatio ist die Anhebung der Überlebensraten durch Vermeidung der aus lokoregionären Rezidiven hervorgehenden, sekundären Fernmetastasen (Hölzel 2001). Abhängig vom Nodalstatus haben Metaanalysen eine diesbezüglich um 3 % – 9 %-ige Reduktion der erkrankungsspezifischen Mortalität nach 15 Jahren gezeigt (Clarke 2005; EBCTCG 2011: Darby 2011, Mannino 2009, Peto 2006, Poortmans 2007, Weaver 2011). Im Gegensatz zur lokoregionären Tumorkontrolle, ist bei der klinischen Bewertung von Langzeiteffekten zu berücksichtigen, dass der Einfluss der RT auf die Überlebenswahrscheinlichkeit erst nach mehr als 5 Jahren erkennbar und statistisch wirksam wird (EBCTCG 2011: Darby 2011). So kann z.B., statistisch gesehen, ein krebsbedingter Todesfall im Verlauf von 15 Jahren vermieden werden, wenn 4 Lokalrezidive innerhalb der ersten 10 Jahre verhindert werden können (Clarke 2005, EBCTCG 2011: Darby 2011, Peto 2006, Whelan 2007).

In der Regel beginnt die postoperative RT nach abgeschlossener Wundheilung, spätestens jedoch 6 bis 8 Wochen nach der Operation (Recht 2003, 2004). Sofern eine adjuvante Chemotherapie vorgesehen ist (siehe oben), erfolgt die RT für gewöhnlich sequentiell.



Theoretische Vorteile eines synchronen, systemischen und lokoregionären Behandlungskonzeptes bestehen darin, dass Verzögerungen onkologisch notwendiger Maßnahmen vermieden und durch die Chemotherapie eine Radiosensibilisierung von Tumorzellen genutzt werden könnte. Eine simultane Chemo- und RT führt allerdings zu höherer Toxizität und sollte deshalb individuell entschieden werden. Demgegenüber gibt es für eine simultan zur RT laufende Hormontherapie mit Antiöstrogenen oder Aromatasehemmern keine Kontraindikationen (Ahn 2005, Harris 2005, Pierce 2005, Whelan 2005).

Wenngleich der optimale Zeitpunkt für den Beginn der postoperativen Radiatio nicht ausreichend abgesichert ist, konnte beobachtet werden, dass der verzögerte Beginn der RT häufiger zu Lokalrezidiven führt (Hartsell 1995, Recht 1996, Huang 2003, Hebert-Croteau 2004).

Das klinische Zielvolumen der perkutanen Nachbestrahlung schließt die gesamte verbliebene Brust und die angrenzende Thoraxwand ein. Dabei wird eine Dosis von 50 Gy (bzw. 50,4 Gy) in fünf wöchentlichen Einzeldosen von 2,0 Gy (bzw. 1,8 Gy) verabreicht. Es hat sich erwiesen, dass jede Tumorkontrolle einer Dosis-Wirkungs-Beziehung unterliegt und die Wahrscheinlichkeit von okkulten Tumorzellen im Bereich des primären Tumorbereiches („Tumorbett“) am höchsten ist (Holland 1985, Sinn 1994). Um die Entstehung von Lokalrezidiven zu verhindern, ist eine zusätzliche umschriebene, lokal auf diesen Bereich begrenzte, Boost-Bestrahlung angezeigt. Hierbei konnte bei R0-resezierten Patientinnen eine Senkung der Rezidivrate von 10,2 % auf 6,2 % in allen Altersgruppen (bezogen auf einen Zeitraum von 10 Jahren) erreicht werden (Antonini 2007, Bartelink 2007, Jones 2009, Poortmans 2008, 2009). Den größten Nutzen von einer Boost-Bestrahlung haben, gemessen an der absoluten Minderung des lokalen Rückfallrisikos, jüngere Patientinnen bzw. Frauen mit erhöhtem Lokalrezidivrisiko (pT2 oder cT2, Malignitätsgrad 3, Multifokalität, Rezeptornegativität). Aufgrund dieser Daten wird aktuell für alle Patientinnen im Alter  $\leq 50$  Jahren ein Boost mit insgesamt 10-16 Gy empfohlen, appliziert in 5 wöchentlichen Einzeldosen von 1,8-2 Gy (Kreienberg 2012). Im Falle einer unvollständigen Resektion (R1/R2) kann die Dosis auf 20 Gy bei gleicher Einzelgabe und Fraktionierung erhöht werden. Bei Patientinnen über 50 Jahren ist die Datenlage hinsichtlich des Nutzens einer Boost-Bestrahlung allerdings nicht eindeutig. Um Bewegungs- und Lagerungsunsicherheiten des Patienten zu berücksichtigen, wird bei der Planung des Bestrahlungsraumes allseits ein Sicherheitssaum von 1,0 - 1,5 cm hinzugefügt. Der unumgänglich mindestbestrahlte

Lungensaum sollte jedoch  $< 2$  cm sein. Das Zielvolumen des Boosts umfasst das Tumorbett bzw. die Operationshöhle mit einem Sicherheitssaum von etwa 2 cm (Bartelink 2001).

Die Bestrahlung der Mamma und Thoraxwand erfolgt in der Regel über opponierende Felder mit Linac-Photonen. Zur Optimierung und Homogenisierung der Dosisverteilung dient die 3D-Planung. Auf diese Weise wird die Dosisinhomogenität zwischen maximal -5 % bis +7 % gehalten (ICRU 50). Die örtliche Dosiserhöhung erfolgt mittels Teletherapie (Linac-Elektronen- oder Linac-Photonen), Brachytherapie (Multikatheter-Technik mit HDR, PDR oder LDR) oder intraoperativen Techniken (Linac-Elektronen, IOERT, siehe Poortmans 2004).

Falls axilläre Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden (obligat bei mehr als 3 befallenen Lymphknoten) oder ein hohes Risiko für einen okkulten Befall besteht, wird eine RT der supraklavikulären Lymphabflusswege und der axillären Lymphknoten im Level III durchgeführt. Bei nicht erfolgter oder inkompletter Axilladissektion (weniger als 10 axilläre Lymphknoten) wird zusätzlich der Lymphabfluss im Level I und II bestrahlt. Die Indikation orientiert sich dabei immer an den individuell angepassten operativen Gegebenheiten und wird interdisziplinär diskutiert (EBCTCG 2005, Taghian 2004, Ragaz 2005).

Bei der Lymphknotenbestrahlung (supraklavikulär, axillär, parasternal) entsprechen die Lagerungs- und Dosierungsverhältnisse denen der Homogenbestrahlung der Brust (Gesamtdosis 50 Gy / 50,4 Gy, fünfmalige Einzeldosen von 2,0 Gy / 1,8 Gy pro Woche, siehe Kreienberg 2012).

An dieser Stelle sei betont, dass in dieser Arbeit nicht näher auf die Rolle der RT bzgl. Mastektomiepatientinnen sowie anderer Tumorentitäten (inflammatorisches MK, DCIS, Morbus Paget) eingegangen wird.

## **2.2 Zirkulierende Tumorzellen**

Wie bereits dargestellt, werden zirkulierende, epitheliale Tumorzellen frühzeitig vom Primärtumor ausgeschwemmt (Liotta 1974, Gray 2003) und können ihrerseits bereits im Primärstadium der Tumorentwicklung sowohl im peripher-venösen Blut (Pachmann 2001, 2005b, Allan 2010) als auch im Knochenmark (Pantel 2003, Janni 2004, Riethdorf 2008) von MK-Patientinnen nachgewiesen werden.

Da jene, durch Operation, Chemotherapie und RT nicht eliminierten, okkulten Tumorzellen („minimal residual disease“) als Ausgangspunkt für Rezidive und Fernmetastasen angesehen werden (Jiang 2002, Meng 2004, Pachmann 2005c), ist deren Erfassung sowohl für

prognostische Aussagen als auch für das klinische Management relevant (Pantel 1999, Braun 2004, Taubert 2004, Cristofanilli 2006, Saad 2008, Graves 2011). Die Detektion zirkulierender Tumorzellen stellt einen unabhängigen, diagnostischen Marker dar und ist somit ein additiver Parameter für die unmittelbare Effizienzkontrolle („Therapie-Monitoring“) systemischer Therapieverfahren (Lobodasch 2007, Pachmann 2005, 2005b, 2008, 2008b, Maheswaran 2010). Rack und Mostert haben gezeigt, dass das MK dabei der Tumortyp ist, bei dem zirkulierende Tumorzellen ihre prognostische Wertigkeit am stärksten bewiesen haben und an dem bislang die größte Vielfalt an Detektionsmethoden angewandt wurde (Rack 2008, Mostert 2009). Es kann davon ausgegangen werden, dass der positive Nachweis zirkulierender Tumorzellen einen frühzeitigen Hinweis auf einen tumorproliferativen Prozess geben kann (Schnakenberg 2006, Maheswaran 2010) und beim metastasierten MK mit einer ungünstigen Prognose einhergeht (Braun 2004, Cristofanilli 2005, 2009, Tewes 2009). Darüber hinaus korrelieren Veränderungen in der Zellzahl der zirkulierenden Tumorzellen während der Therapie mit einer Regression oder Progression der Krankheit (Pachmann 2008), wobei eine Tumorzellpersistenz im Knochenmark unter laufender first-line Therapie in jedem Falle mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein scheint (Wiedswang 2004, Janni 2005, Pierga 2008).

Zirkulierende Tumorzellen bilden somit eine Schnittstelle zwischen Primärtumor und Metastasenbildung (Taubert 2004). In tierexperimentellen Studien konnten durch die Injektion zirkulierender Tumorzellen Metastasen induziert werden (Pretlow 2000). Analog zur heterogenen Tumorbiologie muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die zirkulierenden Tumorzellen ein sehr unterschiedliches Metastasierungspotential aufweisen und nur ein Teil, aufgrund genetischer Eigenschaften und epigenetischer Veränderungen, zu klinisch manifesten Metastasen heranwachsen kann (Hunter 2004). Es wird geschätzt, dass nur eine von 10.000 Tumorzellen zu den verschiedenen Schritten der Metastasierung (Dissoziation vom Primärverband, Intra- & Extravasation, klonales Wachstum in ortsfremdem Gewebe) fähig ist (Liotta 1991, Schmidt-Kittler 2003, Klein 2008). Die Frage, inwiefern die detektierten Tumorzellen direkt vom Primärtumor (zytogenetische Klonalität) oder von okkulten Mikrometastasen abstammen, wird kontrovers diskutiert (Holmgren 1995, Fehm 2002, Meng 2004). Bekannt ist, dass sich die Mehrzahl der disseminierten Tumorzellen in einem nichtproliferativen Zustand, d.h. in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befindet, und sich somit z.B. der Wirkung adjuvanter Chemotherapie entzieht (Pantel 1997). Deshalb weisen diese z.T. lange Überlebenszeiten auf und können bis zu 22 Jahre nach Tumorentfernung auch

bei klinisch gesunden Patientinnen nachgewiesen werden (Jotsuka 2004, Meng 2004, Pachmann 2005c). Was genau diese, mitunter lange, Tumorzell dormanz bewirkt ist bisher unklar.

Zirkulierende Tumorzellen wurden erstmals von Thomas Ashworth im Jahre 1869 beschrieben (Ashworth 1869). Ihr gehäuftes Auftreten bei Brustkrebs-Patientinnen mit ossären Metastasen wurde zwanzig Jahre später durch Paget im Rahmen seiner "seed and soil"-Theorie bestätigt (Paget 1889). Rohr und Hegglin legten 1936 die Grundlage für die Entwicklung der heute verwendeten Detektionsmethoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen. Dabei gelang ihnen der Nachweis von Tumorzellen in Sternalpunktaten mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Rohr 1936, Lankiewicz 2006). Während noch Mitte des vergangenen Jahrhunderts allein mikroskopische Verfahren zur morphologischen Betrachtung tumorverdächtiger, zirkulierender Zellen eingesetzt wurden, haben sich in den letzten 30 Jahren die Nachweismethoden und das fortschreitende Verständnis für Metastasierungsvorgänge bzgl. zirkulierender Tumorzellen stetig erweitert (Christopherson 1965, Fidler 2003).

Heute zählen zu den routinemäßig verwendeten Anreicherungsverfahren jene, wie die Dichtezellzentrifugation (Pierga 2004), antikörpergekoppelte Magnetbeads in Kombination mit immunzytochemischen Verfahren (Racila 1998, Rolle 2005, Antolovic 2010), molekulargenetische (Xenidis 2006, Nakagawa 2007) und bildanalytische Methoden (Witzig 2002). Jede dieser Verfahrensweisen besitzt jedoch unterschiedliche Vor- und Nachteile (Allan 2010).

Da zirkulierende Tumorzellen lediglich mit einem Frequenz - Verhältnis von  $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  auftreten, ist für die Detektion dieser Zellen eine besonders hohe Sensitivität erforderlich (Pachmann 2001).

Das in dieser Arbeit verwendete Scan<sup>R</sup>-Verfahren macht sich die Eigenschaft zirkulierender Tumorzellen, bestimmte Membranproteine zu exprimieren, zunutze. Jene Membranproteine können mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch gekennzeichnet und dadurch mit hoher Sensitivität detektiert werden (Pachmann 2001, 2005b). Hierbei ist vor allem das Zelladhäsionsmolekül EpCAM, welches auf der Zellmembran von Epithelgeweben exprimiert wird, bedeutsam, da epitheliale Zellen im Blut natürlicherweise nicht vorkommen (Balzar 1999, Witzig 2002, Pachmann 2005b, Maheswaran 2010). Durch o.g. Verfahren können zudem Veränderungen in der Zellzahl der zirkulierenden Tumorzellen bei laufender Therapie in sehr kurzer Zeit nachgewiesen werden. Zudem liefert der Nachweis zirkulierender

Tumorzellen im peripheren Blut von Krebspatienten, besonders im Hinblick auf Abweichungen zum Primärtumor, wertvolle Informationen bzgl. Therapieplanung und -effekten (Klein 2005, Fehm 2004, Riethdorf 2008).

Der Nachweis von Knochenmarktumorzellen ist aufwändiger, kostenintensiver, wird weniger gut von den Patienten toleriert und ist hinsichtlich der Entnahmekapazität und der Qualität des Materials ein unsicherer Faktor im Vergleich zur Entnahme von Tumorzellen aus dem peripher-venösen Blut. Aus diesen Gründen sind sequentielle, periphere Blutanalysen für den qualitativen und quantitativen Nachweis zirkulierender epithelialer Tumorzellen unter postoperativer Betrachtungsweise einer wiederholten Knochenmarksaspiration überlegen (Pachmann 2001, 2005, 2005b, 2008, 2008b).

### **2.3 Tumorgenetik**

Die an der Entstehung und Progression maligner Tumoren beteiligten Gene, lassen sich als Tumorgene bezeichnen (Knudson 1993). Hierzu werden Onkogene bzw. Proto-Onkogene als aktivierte proliferationsfördernde Signalmoleküle und Tumorsuppressorgene als inaktivierte proliferationshemmende Moleküle gezählt.

Die häufigsten Ereignisse stellen chromosomale Translokationen und Deletionen dar (Mitelman 1997). Kodierende Sequenzen werden unter dem Einfluss regulatorischer Sequenzen anderer Gene verstärkt oder auf andere Weise nicht korrekt exprimiert. Bei Genamplifikationen kommt es durch die höhere, verfügbare Kopienzahl zu einer verstärkten Expression und damit zu einer Beeinflussung der malignen Transformation.

In den hier vorgestellten Untersuchungen ging es aber nicht um veränderte Genexpression auf Grund von Mutationen oder anderen Genveränderungen sondern um eine reaktiv veränderte Expression durch therapeutische Intervention.

Für die Untersuchung der Genexpression im Verlauf der RT wurden 11 Kandidatengene (siehe nachfolgende Tabellen) ausgewählt:

**2.3.1 GAPDH** (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

<b>Synonyme:</b>	G3PD, GAPD
<b>Lokalisation:</b>	12p13.31
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ubiquitär</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schlüsselenzym der Glykolyse &amp; Glukoneogenese (katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat)</li> <li>• Transport &amp; Fusion von Membranen, Endozytose, Regulation von mRNA, Export von tRNA, Replikation bzw. Reparatur von DNA (Sirover 1999)</li> <li>• Beteiligung an Apoptosemechanismen (Berry 2000)</li> <li>• besitzt Phosphotransferase- &amp; -kinase-Aktivität (Zhang 1992)</li> </ul>
<b>Diagnostische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GAPDH gehört zu den am häufigsten verwendeten internen Standardgenen („Housekeeping-Gen“) bei der Quantifizierung von mRNA (Barber 2005)</li> <li>• Zellproliferation führt zu einer erhöhten GAPDH-Expression (Goldsworthy 1999)</li> </ul>

**2.3.2 EpCAM** (epithelial cell adhesion molecule)

<b>Synonyme:</b>	17-1A, 323/A3, CD326, CO-17A, EGP-2, EGP-34, EGP-40, EGP-314, ESA, GA 733-2, HEA-125, KS-1/4, KSA, Ly-74, M4S1, MH-99, MIC-18, MK-1, MOC-31, TACST-1, TROP-1
<b>Lokalisation:</b>	2p21
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• basolaterale Membran einfacher Epithelien (insbesondere Drüsengewebe), Pseudo-Plattenepithelien und Übergangsepithelien (Moldenhauer 1987, Momburg 1987, Balzar 1999): Lunge, Brustdrüse, Schilddrüse, Kolonepithel, Tubuluszellen der Niere, intestinale Lymphozyten, undifferenzierte embryonale Stammzellen (sinkende Expression mit zunehmender Differenzierung, siehe de Boer 1999)</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vermittlung <math>\text{Ca}^{2+}</math>-unabhängiger, homophiler Zell-Zell-Adhäsionen (Litvinov 1994, Balzar 1999, Went 2004, Osta 2004)</li> <li>• Modulation bei Zellmigration, -differenzierung, -interaktionen, -proliferation, -metabolismus, -morphogenese und -zyklus (Litvinov 1997, Winter 2003a, Osta 2006, Trzpis 2007, Shiah 2008, Mätzel 2009)</li> <li>• Beteiligung an Vorgängen des Zellzyklus, -metabolismus sowie der Morphogenese &amp; Geweberegeneration (Trzpis 2008)</li> <li>• embryonale Stammzellproliferation und -differenzierung, Hochregulierung von FABP5, MYC, Cyclins A &amp; E (Münz 2004)</li> </ul>
<b>Onkologische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transkriptionsinduktion von Proto-Onkogenen wie c-myc und der Cycline A/E → verstärkte Proliferation und Zellteilung (Münz 2004, Mätzel 2009), deshalb als Marker für epitheliale Tumoren (Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome) geeignet (Bauerle 2007)</li> <li>• bei Lungen-, Brust- und Kolonkarzinomen am stärksten überexprimiert (Moldenhauer 1987, Litvinov 1994, Balzar 1999, Went 2004, Osta</li> </ul>

	<p>2004)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• weitere EpCAM-überexprimierende Tumoren: u.a. Karzinome des Rektums, Ösophagus, Pankreas, Hals- und Nackenbereiches, der Prostata und Leber (Salem 1993, Balzar 1999, Piyathilake 2000, Winter 2003b)</li> <li>• in Mammakarzinomen korreliert die EpCAM-Überexpression mit der Tumormasse, dem Lymphknotenstatus und dem Vorhandensein von Östrogenrezeptoren (Tandon 1990)</li> <li>• kein regelhafter Nachweis EpCAM-positiver Zellen im gesunden Organismus (Negativkontrolle)</li> <li>• Expression durch entzündliche oder maligne Prozesse im Sinne einer über- oder <i>de novo</i>-Expression beeinflussbar (Litvinov 1994 &amp; 1996, Balzar 1999, de Boer 1999, Trzpis 2007)</li> <li>• Überexpression fördert die Proliferation, Migration und Invasivität von Brustkrebszellen (Trzpis 2007, van der Gun 2010)</li> <li>• Zielmolekül für immuntherapeutische, diagnostische und prognostische Zwecke (Balzar 1999)</li> </ul>
--	--

### 2.3.3 NANOG (Nanog homeobox)

<b>Synonyme:</b>	-
<b>Lokalisation:</b>	12p13.31
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• embryonale Stamm- und Tumorzellen, Expression sinkt mit zunehmender Differenzierung (Chambers 2003)</li> <li>• regelhaft nicht in gesundem, adultem Gewebe exprimiert (Mitsui 2003)</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulation der RNA-Polymerase-Bindungsfähigkeit während der Transkription (Transkriptionsfaktor)</li> <li>• Schlüsselfaktor zur Aufrechterhaltung der zellulären Pluripotenz (Darr 2006, Zhang 2006)</li> <li>• Inhibition der neuralen und mesodermalen Differenzierung (Ying 2003) &amp; Blockade der Differenzierung von aggregierten, embryonalen Stammzellen in primitivem Endoderm (Hamazaki 2004)</li> </ul>
<b>Onkologische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Überexpression in Keimzell- und Brusttumoren sowie in transformierten Zell-Linien wie z.B. MCF7 (Ezeh 2005, Hart 2005)</li> <li>• Ausschaltung des Gens bewirkt die Differenzierung der betroffenen Zelle (Takahashi 2006)</li> </ul>

**2.3.4 Bcl-2** (B-cell CLL/lymphoma 2)

<b>Synonyme:</b>	PPP1R50, protein phosphatase 1, regulatory subunit 50
<b>Lokalisation:</b>	18q21.3
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>embryonales Gewebe, Stamm- und Progenitorzellen z.B. des Darms und des hämatopoetischen Systems (sinkende Expression mit zunehmender Differenzierung, siehe Vaux 1988, McDonnell 1993)</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Schlüsselfunktion bei der Apoptoseinhibition u.a. durch Regulation der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium und Hemmung des die Caspase 9 aktivierenden Apaf-1/Cyto-C-Komplexes (Hockenbery 1991 &amp; 1993, Kluck 1997, Pan1998, Laurenzi 2000)</li> </ul>
<b>Onkologische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proto-Onkogen (Überaktivierung führt zu Gewebeproliferation und Tumorgenese)</li> <li>in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert: u.a. MK, Melanom, Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom, AML, Lymphome (Lee 1987, Weiss 1987, Joensuu 1994, Catz 2003)</li> <li>Überexpression von Bcl-2 beim MK mit besserer Prognose assoziiert, jedoch auch mit Entwicklung von Zytostatikaresistenz in Verbindung gebracht (Martínez-Arribas 2007, Tabuchi 2009)</li> <li>umgekehrt-proportionaler Zusammenhang zwischen Bcl-2 und p53 (Silvestrini 1994, Haldar 1994)</li> </ul>

**2.3.5 TLR 4** (toll-like receptor 4)

<b>Synonyme:</b>	ARMD10, CD284, hToll, TOLL
<b>Lokalisation:</b>	9q33.1
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (Muzio 2000), Mastzellen, B-Lymphozyten (Gerondakis 2007)</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>angeborenes Abwehrsystem: Erkennung viraler, bakterieller oder von Pilzen stammenden PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns)</li> <li>physiologischer Rezeptor für Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien (Takeuchi 1999, Arbour 2000, Tapping 2000)</li> <li>Aktivierung &amp; Modulation des „Antigen-spezifischen erworbenen Immunsystems“ (Poltorak 1998, Rifkin 2005)</li> </ul>
<b>Onkologische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aktivierung immunologischer und inflammatorischer Signalkaskaden nach Bindung endogener Aktivatoren wie Fibrinogen oder Hitzeschockproteinen (Sabroe 2008)</li> <li>Überexpression spielt beim MK durch die Bildung eines inflammatorischen Mikromilieus in der Tumorumgebung eine bedeutende Rolle bei der Tumorgenese, Metastasierung, Angiogenese, Ausschaltung der adaptiven Immunität (TLR4 induziert die Produktion von Zytokinen &amp; Chemokinen) und Progression (Yang 2010, Bhattacharya 2011)</li> </ul>



**2.3.6 COX-2** (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)

<b>Synonyme:</b>	GRIPGHS, hCox-2, PGHS-2, PHS-2, PGG/HS, PDGS2
<b>Lokalisation:</b>	1q25.2-q25.3
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Makrophagen, Endothelzellen proliferierender Blutgefäße &amp; monozytärer Schaumzellen in atherosklerotischen Läsionen, Macula densa der Niere, Hypothalamus, Gliazellen, Neuronen, Rückenmark (Hla 1992, Samad 2001, Steiner 2006)</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zentrale Funktion bei Entzündungsreaktionen, Knochenentwicklung und Schmerzempfinden (Hyperalgesie)</li> <li>• Integrität der Magenschleimhaut, Nierendurchblutung &amp; Thrombozyten-aggregation (Levy 1997, Smith 2000, Steiner 2006, Ricciotti 2011)</li> <li>• Schlüsselrolle bei der Prostaglandin- und Thromboxansynthese aus Arachidonsäure (Herschman 1996), Verstoffwechslung von Substraten wie Endocannabinoide, Anandamid oder 2-Arachidonylglycerol zu Prostanoidenoxidieren (Simmons 2004)</li> </ul>
<b>Onkologische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• beim MK, sowie bei mehreren anderen malignen, epithelialen Tumoren (Prostata, Kolon, Magen, Ösophagus, Lunge, Pankreas) wird COX-2 sowohl in den eigentlichen Tumorzellen als auch im umgebenden Stroma überexprimiert (Gupta 2000, Soslow 2000, Sales 2001, Subbaramaiah 2002, Pan 2008)</li> <li>• die im Tumorgewebe gebildeten Prostaglandine, insbesondere PGE<sub>2</sub>, können sowohl das Tumorstroma (Angiogenese, Immunsuppression etc.) als auch Tumorzellen direkt (Proliferation, Hemmung des programmierten Zelltodes – Apoptose) beeinflussen (Jones 1993, Tsujii 1995 &amp; 1998, Tang 2002, Simmons 2004)</li> <li>• Überexpression korreliert mit einer erhöhten Metastasenbildung und einer schlechten Prognose (Kim 2002)</li> </ul>

**2.3.7 PIK3CA** (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha)

<b>Synonyme:</b>	CLOVE, MCAP, MCM, MCMTC, p110-alpha, PI3K
<b>Lokalisation:</b>	3q26.3
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ubiquitär</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• P110<math>\alpha</math>-Protein: Katalyse der Umwandlung von Phosphatidyl-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidyl-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>) → Aktivierung des PIK-Akt-Signalweges mit breitem Spektrum zellulärer Funktionen: Zellwachstum, Zellproliferation, Migration, Motilität, Apoptose, Differenzierung, Überleben &amp; Zelladhäsion (Vivanco 2002, Lee 2005, Li 2006)</li> </ul>
<b>Onkologische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Onkogen → infolge von Mutationen erhöhte Aktivität des PIK-Akt-Signalwegs/Dysregulation führt zu Tumorgenese (Zellwachstum, Zelltransformation, Zelladhäsion, veränderte Zellmigration bzw. Störungen in Apoptose und Zellüberleben; Cantley 2000, Buttitta 2005)</li> <li>• Überexpression bei Mamma-, Lungen-, Kolon-, Ovarial-, Hirn- und Magentumoren (Campbell 2004, Lee 2005, Saal 2005, Wu 2005)</li> </ul>

**2.3.8 Her2/neu** (human epidermal growth factor receptor 2)

<b>Synonyme:</b>	CD340, Herstatin, NEU, NGL, MLN 19, TKR1, erb-B2, c-erbB2, ERBB2
<b>Lokalisation:</b>	17q12
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ubiquitär</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fundamentale Rolle bei Entwicklung, Zellproliferation &amp; Differenzierung über den RAS-MAP-Kinase-Weg</li> <li>• Apoptoseinhibition über mTOR-Signalweg (Olayioye 2000, Hudis 2007)</li> </ul>
<b>Onkologische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Onkogen → Überexpression mit erhöhter Angiogenese, Invasivität, gesteigerter Tumorprogression &amp; Metastasierungsfähigkeit (Slamon 1989, Hynes 1994, Ross 1998)</li> <li>• Überexpression bei ca. 20 % aller invasiven Mammakarzinome (diagnostische und therapeutische Bedeutung, siehe Ross 2003)</li> <li>• ist mit besonders aggressiver Karzinogenese &amp; signifikant verkürztem, krankheitsfreiem Überleben verbunden (Slamon 1987, Quenel 1995, Pauletti 1996, Gabriel 2002)</li> </ul>

**2.3.9 Vimentin**

<b>Synonyme:</b>	-
<b>Lokalisation:</b>	10p13
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellen mesenchymalen Ursprungs (Fibroblasten, Endothelzellen) (Bachmann 1983, Colucci-Guyon 1994)</li> <li>• hämatopoetische Vorläuferzellen (Dellagi 1983)</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitglied der Intermediärfilament-Familie: Stabilisierung der Zellen durch Ausbildung eines suprazellulären Zytoskeletts und Sicherstellung der Gewebeintegrität durch Interaktion mit Adhäsionsstrukturen (Herrmann 2003, Ivaska 2007)</li> <li>• putative Funktionen bzgl. der Beteiligung an Signaltransduktion, Lipid-metabolismus, Zelladhäsion, Migration und Transportvorgängen in der Zelle werden diskutiert (Franke 1987, Tsuruta 2003, Nieminen 2006, Ivaska 2007)</li> </ul>
<b>Onkologische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumormarker bei Weichgewebstumoren (insbesondere beim MK), der den Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Eigenschaften der Zellen (EMT) anzeigt (Kokkinos 2007, Mandal 2008)</li> <li>• Expression im Tumorstroma könnte auf dessen Umbau im Rahmen von Metastasierungsereignissen durch erleichtertes Herauslösen der Tumorzellen hindeuten (Dutsch-Wicherek 2010)</li> <li>• Überexpression ist mit biologisch aggressivem Wachstum beim MK assoziiert (Vora 2009)</li> </ul>

**2.3.10 c-Met** (met proto-oncogene, hepatocyte growth factor receptor)

<b>Synonyme:</b>	AUTS9, HGFR, RCCP2, MET
<b>Lokalisation:</b>	7q31
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• membranständig in Geweben epithelialer Herkunft: z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, Myoblasten, Stromazellen, glatte Muskelzellen und Perizyten (Sonnenberg 1993, Rosen 1995, Ferracini 1996, Jin 1997)</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• der cMet-Rezeptor (heterodimerer Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität) bildet in Verbindung mit dem Liganden HGF (Hepatocyte growth factor / Scatter factor) ein physiologisch parakrin wirkendes System innerhalb der Signaltransduktion der Zelle (Rosen 1995, Jeffers 1996)</li> <li>• wichtige Rolle bei Embryonalentwicklung, Organogenese, Geweberegeneration, Wundheilung, Zell-Mitogenese, Zellbeweglichkeit und Zellwachstum (Bladt 1995, Anen 1996, Takayama 1997)</li> </ul>
<b>Onkologische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proto-Onkogen → für die Onkogenese wird ein autokriner Stimulationsmechanismus angenommen; die onkogene Wirkung wird als Folge mitogener und angiogener Signale durch das c-Met Protein gedeutet (aus dem c-Met-Protoonkogen hervorgehend), insbesondere der Beeinflussung von Invasivität und Metastasierungsfähigkeit des Tumors durch den Wachstumsfaktor (Bellusci 1994, Di Renzo 1995, Scotlandi 1996, Jeffers 1996, Hiscox 1997)</li> <li>• Überexpression in mehreren epithelialen Tumoren u.a. beim Magen- (Akimoto 1998), Nierenzell- (Natali 1996), Schilddrüsen- (Oyama 1998), Lungen- (Olivero 1996), Prostata- (Tsuka 1998), Endometrium- (Wagatsuma 1998), Ovarial- (Di Renzo 1994) und MK (Camp 1999) sowie bei kolorektalen Karzinomen (Hiscox 1997) und diversen Hirntumoren (Hirose 1998)</li> </ul>

**2.3.11 Ki-67** (antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)

<b>Synonyme:</b>	Antigen KI-67, KIA, MKI67
<b>Lokalisation:</b>	10q26.2
<b>Vorkommen:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ubiquitär, in proliferativen Zellen während der G1-, S-, G2- und M-Phase, nicht jedoch in der G0-Phase (Gerdes 1984, Scholzen 2000)</li> </ul>
<b>Biologische Aktivität:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Funktion weitgehend ungeklärt</li> <li>• Expression des Proteins an zelluläre Proliferation gekoppelt (Scholzen 2000)</li> <li>• Beteiligung an Prozessen im Rahmen von Zellwachstum und -teilung wird diskutiert (Schlüter 1993, Duchrow 2001)</li> </ul>
<b>Onkologische Bedeutung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumor-Proliferationsmarker (Wachstumsfraktion)</li> <li>• Überexpression korreliert mit zellulärer Proliferationsrate und gibt dadurch Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit (Gerdes 1983, Hou 2011)</li> <li>• Anteil Ki-67-positiver Zellen an der Gesamtzellpopulation von prognostischer Relevanz für das MK (Jansen 1998)</li> </ul>

### **3 ZIELE DER ARBEIT**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, das Verhalten zirkulierender epithelialer Tumorzellen (fortan mit CETC bezeichnet) bei Patientinnen mit neudiagnostiziertem, primär nicht metastasiertem MK, während der RT zu untersuchen. Besondere Berücksichtigung sollten dabei auch die Expression ausgewählter Gene erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen näher betrachtet:

#### **1. Quantitatives Verhalten von CETC während der Strahlentherapie**

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Verlauf der vitalen CETC und klinischen Parametern (u.a. TNM-Stadium, Histopathologie) und dem strahlentherapeutischen Behandlungsregime sowie dem Outcome der Patientinnen besteht (Ereignis-freie Zeit, Lokalrezidiv- bzw. Fernmetastasenbildung).

#### **2. Bestimmung differentieller Genexpression vor- und nach der Radiotherapie**

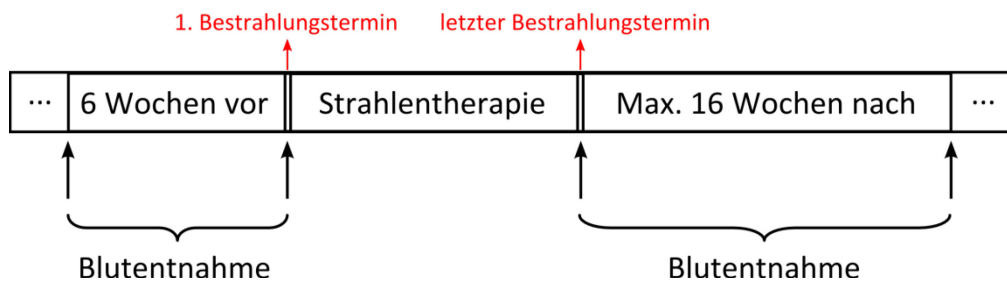
Zunächst wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung spezifischer mRNA von isolierten Tumorzellen etabliert und validiert. Anschließend wurde untersucht, ob es im Rahmen der RT bei CETC zu einer veränderten Expression ausgewählter Gene kommt. Die Untersuchungen erfolgten hierbei mittels qRT-PCR und Gelelektrophorese.

## 4 MATERIALIEN UND METHODEN

### 4.1 Patientengut

Die Untersuchungen wurden im Onkologischen Forschungslabor der FSU an 161 Patientinnen der Klinik für Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Jena vorgenommen. Einbezogen wurden ausschließlich Patientinnen mit stanzbioptisch gesichertem, primär nicht metastasiertem MK. Über einen Zeitraum von 10 Jahren (Sept. 2002 - Sept. 2012) wurden bei den Patientinnen die für die Untersuchungen notwendigen Blutproben entnommen. Dabei handelte es sich um venöses, nicht-koaguliertes EDTA-Blut. Alle Patientinnen wurden über die Studie genau informiert und erklärten sich mit der Weiterverwendung des Blutes einverstanden. Eine schriftliche Einwilligung sowie Genehmigung der Ethikkommission lagen vor. Die klinischen Daten wurden unter Berücksichtigung des Datenschutzgesetzes und der Schweigepflicht erhoben.

Die Blutentnahmen fanden jeweils innerhalb eines Zeitraums von 6 Wochen vor der RT und 16 Wochen nach der RT statt (siehe Abb. 1):



**Abb. 1 Blutentnahme-Schema.**

Um für alle Blutproben eine zeitgleiche Analyse zu gewährleisten wurden diese stets am 2. Tag nach der Blutentnahme untersucht.

Als zusätzliche Studien-Aufnahmekriterien dienten folgende Aspekte:

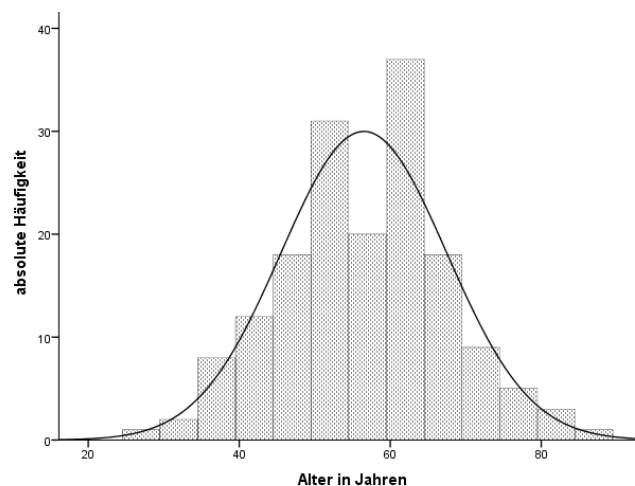
- weibliches Geschlecht
- vollendetes 18. Lebensjahr
- ausschließliche Behandlung in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe / Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des UKJ

Ausschlusskriterien waren:

- mangelnde Einwilligungsbereitschaft
- zusätzliche maligne Erkrankungen und/oder Rezidive

#### 4.1.1 Altersverteilung

Das durchschnittliche Alter der 161 untersuchten Patientinnen betrug bei Erstdiagnose 56,5 Jahre ( $\pm 11,0$  Jahre; Median 57,0 Jahre). Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 27 Jahre, die älteste Patientin 89 Jahre alt. 50 % der Patientinnen hatten ein Alter zwischen 49,5 und 64 Jahren (siehe Häufigkeitsgipfel in Abb. 2).



**Abb. 2 Häufigkeitsverteilung nach Alter der Patientinnen.**

Als statistische Methode für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Lebensalter und der Anzahl der CETC wurde die Spearman-Rangkorrelation verwendet. Hiermit konnte allerdings keine Wechselbeziehung gefunden werden (vor Radiatio:  $p = 0,120$ ; nach Radiatio:  $p = 0,086$ ). Ebenso ließ sich keine Korrelation zwischen der 5-jährigen Ereignis-freien Überlebenszeit und dem Lebensalter der Patientinnen ermitteln ( $p = 0,441$ ).

### 4.1.2 Tumorcharakteristika

Die Tumorcharakteristika der 161 in die Studie einbezogenen Patientinnen sind in der nachfolgenden Tabelle 3 zusammengefasst. Dabei zeigte sich, dass die beiden, später genauer erläuterten, Patientengruppen AB und AN (siehe Kapitel 5.1.2) hinsichtlich der verschiedenen Merkmale nahezu gleich verteilt sind. Eine Einteilung der Patientinnen anhand von molekularen Tumorklassifikationen (z.B. Luminal A, Luminal B, etc.) wurde in der Jenaer Frauenklinik selbst nicht vorgenommen.

Eigenschaft	Klassifikation	AB	AB %	AN	AN %	gesamt	gesamt %
Tumor-Status	(yp) T0	0	0	0	0	0	0,0 %
	pT1	41	62,4 %	53	53,9 %	94	58,4 %
	pT2	31	29,4 %	25	40,8 %	56	34,8 %
	pT3	2	4,7 %	4	2,6 %	6	3,7 %
	pT4	2	3,5 %	3	2,6 %	5	3,1 %
Lymphknoten-Status	pN0	51	65,9 %	56	67,1 %	107	66,5 %
	pN1	20	23,5 %	20	26,3 %	40	24,8 %
	pN2	1	5,9 %	5	1,3 %	6	3,7 %
	pN3	4	4,7 %	4	5,3 %	8	5,0 %
Fernmetastasen bei ED	M0	76	100 %	85	100 %	161	100 %
	M1	0	0 %	0	0 %	0	0,0 %
Histologisches Grading	G1	4	8,4 %	7	5,5 %	11	7,1 %
	G2	28	43,4 %	36	38,4 %	64	41,0 %
	G3	41	48,2 %	40	56,1 %	81	51,9 %
	x	3	-	2	-	5	-
Pathologischer Tumor-Typ	invasiv duktal	60	76,9 %	60	84,5 %	120	80,5 %
	invasiv lobulär	8	19,2 %	15	11,3 %	23	15,4 %
	invasiv tubulär	0	2,6 %	2	0 %	2	1,3 %
	Andere	3	0 %	1	2,8 %	4	1,3 %
	x	5	1,3 %	7	1,4 %	12	-
Her-2/neu - Status	Überexpression (3+)	28	29,4 %	25	39,4 %	53	34,0 %
	keine Überexpr. (< 3+)	43	70,6 %	60	60,6 %	103	66,0 %
	x	5	-	0	-	5	-
Östrogen - rezeptor	positiv (> 10 %)	48	76,5 %	65	64,9 %	113	71,1 %
	negativ (≤ 10 %)	26	23,5 %	20	35,1 %	46	28,9 %
	x	2	-	0	-	2	-
Progesteron - rezeptor	positiv (> 10 %)	48	68,2 %	58	64,9 %	106	66,7 %
	negativ (≤ 10 %)	26	31,8 %	27	35,1 %	53	33,3 %
	x	2	-	0	-	2	-
Rezeptorstatus	ER pos. / PR pos.	40	63,5 %	54	51,1 %	94	59,1 %
	ER pos. / PR neg.	8	12,9 %	11	10,8 %	19	11,9 %
	ER neg. / PR pos.	8	4,7 %	4	10,8 %	12	7,5 %
	ER neg. / PR neg.	18	18,8 %	16	24,3 %	34	21,4 %
	x	2	-	0	-	2	-
	Triple neg.	8	6,1 %	10	4,8 %	18	11,2 %

**Tab. 3 Übersichtstabelle der Tumorcharakteristika.**

AN: Patientinnen mit Anstieg der CETC-Zellzahl im Rahmen der Radiatio. AB: Patientinnen mit Absinken der CETC-Zellzahl; ED: Erstdiagnose, T, N, M, G: entsprechend TNM-Klassifikation der UICC, ER: Östrogenrezeptorstatus, PR: Progesteronrezeptorstatus, x: das Merkmal war nicht sicher zu bestimmen.

### 4.1.3 Operation

Alle Studienteilnehmerinnen wurden in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Jena brusterhaltend operiert. Die Wahl der Operationsmethode wurde im Einzelfall anhand der Mammographieaufnahmen entschieden. Bei allen Patientinnen konnte eine R0 – Resektion erreicht werden.

Da der Fokus dieser Dissertation im Wesentlichen auf der Analyse zirkulierender Tumorzellen lag, wird auf Erläuterungen der verschiedenen Operationsverfahren und deren Häufigkeit verzichtet.

### 4.1.4 Chemotherapie

Insgesamt erhielten 129 der 161 Patientinnen (80,1 %) eine systemische Chemotherapie. Von dieser Untergruppe wurden 46 Patientinnen (35,7 %) neoadjuvant und 83 Patientinnen (64,3 %) adjuvant behandelt. Nachfolgend sind die Verteilungen der Zytostatika-Behandlungen aufgelistet. Dabei kam adjuvant vor allem das FEC-Schema und neoadjuvant am häufigsten das EC-Schema zur Anwendung (siehe Tab. 4).

Zytostatika-Schema (adjuvant)		Zytostatika-Schema (neoadjuvant)	
30FEC	3EC/1Tax	27EC/25Pac	1 TAC
31FEC/31Doc/7Gem	2Epi/2Pac/2CyPH	10EC/10Doc	1Tax
7Doc/7CyPH	2Doc/2CarbPI	5Epi/5Pac/5CMF	1Doc/1CyPH
3FEC/3Pac	1Pac/1Capec	1Epi/1Pac	
1FEC/1Pac/1Gem	2Capec		
1FEC/1Pac/1CarbPI			

**Tab. 4 Übersicht der bei den beobachteten Patientinnen eingesetzten Chemotherapie – Schemata.**

### 4.1.5 Antihormonelle Therapie

Bei 111 der 161 Patientinnen (68,9 %) wurde eine Hormontherapie durchgeführt. Hierbei kamen einerseits Aromataseinhibitoren (n = 55) und zum anderen Tamoxifen (n = 63) zum Einsatz. Bei 7 Patientinnen wurden beide Therapieformen angewendet.



#### 4.1.6 Radiotherapie (RT)

Alle Patientinnen wurden, leitliniengerecht, im Rahmen einer brusterhaltenden Therapie bestrahlt (siehe Einschlusskriterien). Die Bestrahlungsgeometrie sah für die Brustwand mit Mamma und die axillären Lymphknoten zwei tangentielle Gegenfelder vor. Auf die supraklavikulären und die retro- bzw. parasternalen Lymphknoten wurden jeweils einzelne Stehfelder ausgerichtet. Die Gesamtdosis der Brustwandbestrahlung betrug im PTV 50 Gy. Diese Dosis wurde jeweils in 25 Fraktionen mit einer Einzeldosis von 2 Gy appliziert. Verwendet wurde Photonenstrahlung (LINAC) mit typischerweise 6 MeV zur optimalen Erfassung der oberflächlichen Bereiche. Zur vollen Erfassung der Thoraxwand wurde das mediale Brustwand- Feld so gewählt, dass eine Mitbestrahlung des Lungensaums von 3 cm nicht überschritten wurde. Bei 39 Patientinnen (24,2 %) wurden neben der perkutanen RT der Brust/Brustwand zusätzlich die regionären Lymphabflussgebiete (parasternal, axillär, Supraklavikularegebiete) bestrahlt. Die Strahlendosis hierfür betrug 46 Gy in jeweils 23 Fraktionen. Wegen der erhöhten Kardiotoxizität wurde die Gesamtdosis von 50 Gy für retro- und parasternale Lymphknoten auf Photonen und schnelle Elektronen aufgeteilt (ca. 24 Gy Elektronen mit 6 bzw. 15 MeV und ca. 26 Gy in Form von Photonen). Bei 70 Patientinnen (43,5 %) erfolgte eine kleinräumige, lokale Dosisaufsättigung in Form eines Elektronenboosts im Bereich des ehemaligen Tumorbettes von 10 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 60 Gy bzw. 66 Gy. Als Kriterium für eine sogenannte Boost-Bestrahlung wurde ein Lebensalter < 60 Jahre bei Erstdiagnose angewandt.

## 4.2 Materialien

Für die experimentellen Untersuchungen wurden die in den folgenden Tabellen aufgeführten Materialien verwendet.

### 4.2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Erläuterung
Agarose (Elektrophoresis Grade)	Invitrogen™, Karlsruhe
Ampuwa® H <sub>2</sub> O für Injektionszwecke	Fresenius, Bad Homburg
dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	NEB, Ipswich, GB
EDTA	Sigma-Aldrich Co., München
Ethidiumbromid	Invitrogen™, Karlsruhe
Formalin Lösung 10 %	Sigma-Aldrich Co., München, neutral gepuffert
KHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Co., München
Na <sub>2</sub> -EDTA	Sigma-Aldrich Co., München
NH <sub>4</sub> Cl	Sigma-Aldrich Co., München
PBS	Invitrogen™, Karlsruhe
PCR-grade H <sub>2</sub> O	Roche, Mannheim
Tris-Acetat	Sigma-Aldrich Co., München

Tab. 5 Chemikalien.

### 4.2.2 Puffer und Lösungen

Lösungen	Hersteller/Erläuterung
1kb DNA-ladder	Sigma-Aldrich Co., München
10 % BSA	Sigma-Aldrich Co., München
EL-Puffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl + 10 mM KHCO <sub>3</sub> + 0,5 mM EDTA
PE-Puffer	PBS + 2 mM EDTA
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	Sigma-Aldrich Co., München

Tab. 6 Lösungen.

### 4.2.3 DNA-Oligonukleotide

Das umfangreiche Primer-Design erfolgte mit Hilfe des „primer designing tools“ der NCBI-Primer-BLAST Datenbank. Alle Primer wurden von der Jena Bioscience GmbH bezogen.

Name des Gens	Produktlänge	Primersequenzen (s – sense, a – antisense)	Temperatur	GC %
GAPDH	104 bp	s: GAC AGT CAG CCG CAT CTT CT a: GCG CCC AAT ACG ACC AAA TC	60,11 °C 59,97 °C	55% 55 %
EpCAM	219 bp	s: GGG AAA TAG CAA ATG GAC ACA a: CGA TGG AGT CCA AGT TCT GG	58,35 °C 59,08 °C	43 % 55 %
NANOG	674 bp	s: GGA TCC AGC TTG TCC CCA AA a: TGC ACC AGG TCT GAG TGT TC	59,96 °C 59,89 °C	55% 55 %
Bcl-2 (Var $\alpha$ )	519 bp	s: TTT GTG GAA CTG TAC GGC CC a: CCG GCC AAC AAC ATG GAA AG	60,54 °C 60,04 °C	55% 55 %
Bcl-2 (Var $\beta$ )	169 bp	s: CTT TGA GTT CGG TGG GGT CA a: TCA GCC CAG ACT CAC ATC AC	59,89 °C 59,39 °C	55% 55 %
TLR4 (Var 1)	179 bp	s: GGT CAG ACG GTG ATA GCG AG a: ATT AGG AAC CAC CTC CAC GC	59,97 °C 59,75 °C	60% 55 %
COX-2	274 bp	s: GAT GAT TGC CCG ACT CCC TT a: TGA AAA GGC GCA GTT TAC GC	59,82 °C 60,04 °C	55% 50 %
PIK3CA	925 bp	s: CCC AGG TGG AAT GAA TGG CT a: CCA AAA GCA GGC CAA ACC TC	60,03 °C 59,97 °C	55% 55 %
Her2/neu	539 bp	s: AGG TAA CCC TGG CCC CTT T a: TTC AGC GGG TCT CCA TTG TC	60,47 °C 60,04 °C	58 % 55 %
Vimentin	161 bp	s: TCC GCA CAT TCG AGC AAA GA a: ATT CAA GTC TCA GCG GGC TC	60,32 °C 60,11 °C	50 % 55 %
Ki-67 (Var 1)	466 bp	s: CCT CAG CAC CTG CTT GTT TG a: TCC CTG AGC AAC ACT GTC TTT	59,69 °C 59,51 °C	55 % 48 %
Ki-67 (Var 2)	928 bp	s: ACC CTG ATG AGA GTG AGG GA a: GTG GGG AGC AGA GGT TCT TC	59,29 °C 60,04 °C	55 % 60 %
c-Met (Var 1)	73 bp	s: GGT CTT CAA GTA GCC AAA GCG a: TTC TTG CAG CCA AGT CTC TGT	59,54 °C 59,86 °C	52 % 48 %
c-Met (Var 2)	114 bp	s: TCC TCT GGG AGC TGA TGA CA a: CTG GGC AGT ATT CGG GTT GT	59,96 °C 60,04 °C	55 % 55 %

Tab. 7 DNA-Oligonukleotide.

#### 4.2.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller/Erläuterung
CD326 (EpCAM)-FITC = (HEA-FITC) = (FITC-anti-EpCAM)	Miltenyi Biotec GmbH, monoklonaler Antikörper HEA-125 für die Erkennung des „humanen epithelialen Antigens“ (HEA) auf Zellen, einschließlich epithelialer Tumorzellen (mouse-antihuman), primär konjugiert mit FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)
7AAD (Fluoreszenzfarbstoff für HEA-FITC)	Sigma-Aldrich Co., 7-Aminoactinomycin D., interkaliert mit doppelsträngiger DNA membranpermeabler (toter) Zellen

Tab. 8 Antikörper und Farbstoffe.

#### 4.2.5 Kits

Kits	Hersteller/Erläuterung
CellAmp™ Whole Transcriptome Amplification Kit (Real Time)	Takara Bio Inc. / Mobitec, Göttingen
LightCycler® SYBR Green I Master	Roche, Mannheim

Tab. 9 Kits.

#### 4.2.6 Verbrauchsmaterialien

Materiale	Hersteller/Erläuterung
2 ml Reaktionsgefäße, PP	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml Falcons®	BD, Heidelberg
CapStrips flat (Strips of 8 caps)	Eppendorf, Hamburg
Einweg-Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Imaging Plate = PCR-Well-Platte	Zell-kontakt GmbH, 96 Wells (Untersuchungskammern)
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg

Tab. 10 Verbrauchsmaterialien.

### 4.2.7 Laborgeräte

Geräte	Hersteller/Erläuterung
CellEctor plus™	MMI, Eching
Mastercycler® ep realplex	Eppendorf, Hamburg
Kühlblock für 96-Well PCR-Platten	Eppendorf, Hamburg
Scan ^R Olympus IX81 ZDC	Olympus GmbH, Hamburg Scan^R ist eine modulare, Mikroskop-basierte Imaging-Plattform, die speziell für vollautomatische Bilderfassungen und Datenanalysen biologischer Proben entwickelt wurde
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Vortexer MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Zentrifuge; Eppendorf Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg

**Tab. 11 Geräte.**

### 4.2.8 Software

Geräte	Hersteller/Erläuterung
Mastercycler ep realplex 2.0	Eppendorf, Hamburg
IBM® SPSS® Statistics 2.0	SPSS GmbH Software, IBM Company, München
Scan^R Analysis 1.06 beta	Olympus GmbH, Hamburg

**Tab. 12 Software.**

## 4.3 Methoden

Für die experimentellen Untersuchungen kamen zwei Methoden zum Einsatz. Zum einen handelt es sich dabei um ein spezielles Immunfluoreszenz-Verfahren zum quantitativen Nachweis vitaler CETC, zum anderen um die quantitative Genexpressionsanalyse von Einzelzellen mittels qRT-PCR. Letztgenannte Methode diente der differentiellen Expressionsbestimmung ausgewählter Gene (GAPDH, EpCAM, NANOG, Bcl-2, TLR4, PDGS2, PIK3CA, ERBB2, Vimentin, MKI-67, MET).

Sowohl für das Immunfluoreszenz-Verfahren als auch für die quantitative Genexpressionsanalyse wurden die gleichen Blutproben verwandt.

### 4.3.1 Immunfluoreszenz-Verfahren (MAINTRAC™)

#### 4.3.1.1 Prinzip

Die Zellanalyse wurde mittels des Antikörpers EpCAM-FITC (FITC-anti-EpCAM) und dem Fluoreszenzfarbstoff 7AAD durchgeführt. Das an der basolateralen Oberfläche von Karzinom- und epithelialen Zellen exprimierte Antigen EpCAM (siehe Kapitel 2.3) geht dabei eine spezifische Bindung mit dem Fluoresceinthiocyanat-konjugierten Antikörper FITC-anti-EpCAM ein. Dies führt zu einer grünen, typischerweise kappenförmigen Fluoreszenz-Markierung („Caps“) von EpCAM-positiven Zellen, wodurch die Unterscheidung von Leukozyten und anderen im Blut zirkulierenden Zellen gewährleistet wird. Die Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen EpCAM und FITC-anti-EpCAM wird durch die Zugabe von 10 % BSA erhöht, indem die verbleibenden unspezifischen Epitope des Antigens blockiert werden.

Der Fluoreszenzfarbstoff 7AAD interkaliert mit der DNA sobald die Zellmembran ihre natürliche Barrierefunktion verloren hat und dient damit zur Unterscheidung vitaler und avitaler CETC. Nach der Färbereaktion wurde durch die Fixation mittels 5 %-igem Formalin der unerwünschte Effekt des Infundierens von 7AAD in vitale CETC minimiert.

#### 4.3.1.2 Durchführung

Die Blutuntersuchungen im Rahmen des Immunfluoreszenz-Verfahrens fanden jeweils am 2. Tag nach den Blutentnahmen statt. Dies war notwendig, da das nachzuweisende EpCAM-Antigen auf der Zellmembran der CETC erst zu diesem Zeitpunkt in demaskierter und für die meisten Anti-EpCAM-Antikörper in zugänglicher Form vorlag (Balzar 2001, Hekimian

2012). Zum Zweck der Ergebnisvalidierung erfolgte die Untersuchung von jeweils 2 Blutproben pro Patient.

Da die CETC eine Fraktion der weißen Blutzellen darstellen, wurde für die Gewinnung von Leukozyten und CETC aus peripherem Blut zunächst eine Erythrozytenlyse durchgeführt:

Hierfür wurde 1 ml anti-koaguliertes EDTA-Blut für 10 min mit 7 ml Erythrozytenlysepuffer (EL-Puffer) bei Raumtemperatur lysiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 14 °C und 1200 U/min wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet in 500 µl PE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl dieser Zellsuspension zusammen mit 20 µl des Mastermixes 30 min lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert (siehe Tab. 13).

Lösungen	Volumen für 1 Probe ( $\Sigma$ 20 µl)
FITC-anti-EpCAM	2,40 µl
10 % BSA	2,00 µl
7AAD	0,08 µl
PE-Puffer	15,52 µl

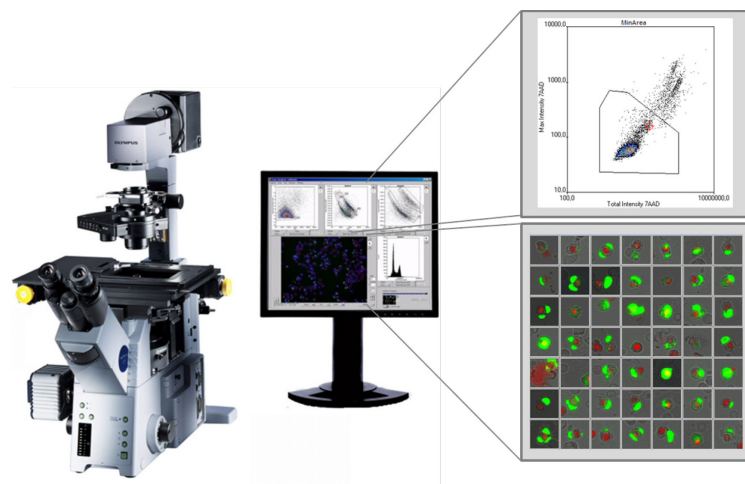
**Tab. 13 Mastermix der Immunfluoreszenz-Messung.**

Nach abgeschlossener Antikörper-Inkubation wurden die Zellen noch einmal mit 160 µl des PE-Puffers versetzt. Schließlich wurden 20 µl dieser Suspension in eine 96-Well-Platte überführt, in welcher sich bereits 150 µl einer PE-Formalin-Lösung (PE und 10 %iges Formalin im Verhältnis 1 : 1) befanden.

Nach einer einstündigen Sedimentationsdauer konnte mit der Fluoreszenzdetektion begonnen werden.

### 4.3.1.3 Messung und Auswertung

Im Anschluss an die Blutaufbereitung erfolgte die Messung, Auswertung und Darstellung der CETC durch das Scan<sup>^</sup>R (Abb. 3). Jede der oben genannten Wellflächen wurde hierbei im Rahmen von 100 Einzelmessungen analysiert. Diese ca. 12-minütige Analyse jeder einzelnen Wellfläche basierte auf Standardmessparametern des Onkologischen Forschungslabors der FSU. Ein exaktes Detektieren und Zuordnen der Objekte wurde durch unterschiedliche Partikel- und Objekterkennungsfunktionen ermöglicht. Hierbei macht man sich die unterschiedlichen Emissions-Intensitäten der Marker (515-545 nm für FITC und 565-585 nm für PE) zunutze.



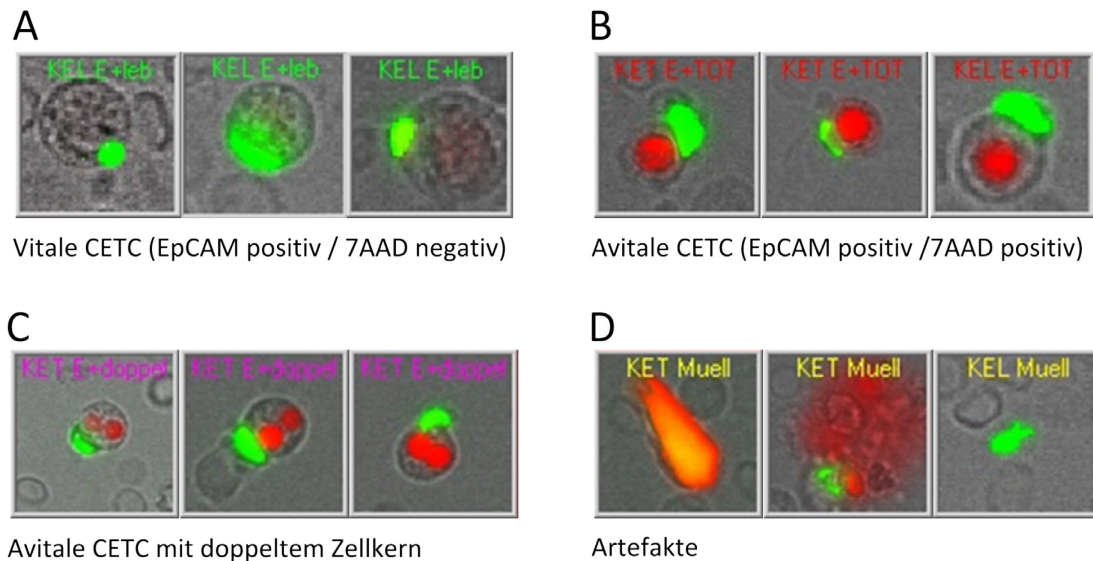
**Abb. 3 Scan<sup>^</sup>R und Analyseprogramm.**

Mittels der verschiedenen Klassifikationsparameter für 7AAD und EpCAM konnten komplexe Bildanalysen erstellt werden. Objekte mit einem bestimmten Mindestschwellenwert der EpCAM-Expression wurden dabei automatisch erfasst. Mit Hilfe der Intensität des Farbstoffes 7AAD konnten die Zellen in einem Histogramm dargestellt und eine Unterscheidung in „vital“ und „avital“ vorgenommen werden (Abb. 4).

Schließlich wurden aus einer randomisierten Stichprobe (max. 100 Zellen pro Patientenprobe) die als EpCAM-positiv erkannten Zellen visuell evaluiert. Als „vitale“ CETC (Abb. 4 A) wurden dabei jene Zellen eingestuft, die ausschließlich ein grünes „Cap“ (siehe 4.3.1.1) an ihrer Zelloberfläche aufwiesen (EpCAM positiv/7AAD negativ). Avitale Zellen hingegen (Abb. 4 B) zeigten zusätzlich zum grün-markierten „Cap“ einen rot gefärbten Zellkern bzw. eine grüne intrazelluläre Matrix (EpCAM positiv/7AAD positiv) und wurden außerdem auf das Vorhandensein mehrerer Zellkerne untersucht (Abb. 4 C). Zusätzlich detektierte, fluoreszierende Partikel (Fremdkörper, Makrophagen, Leukozyten) wurden als „Artefakte“ eingestuft und blieben später bei der Auswertung unberücksichtigt (Abb. 4 D). In einem



letzten Schritt wurden alle gemessenen und evaluierten EpCAM-positiven Zellen auf 1 ml EDTA-Blut extrapoliert.



**Abb. 4 Analysebilder der Routinemessungen.**

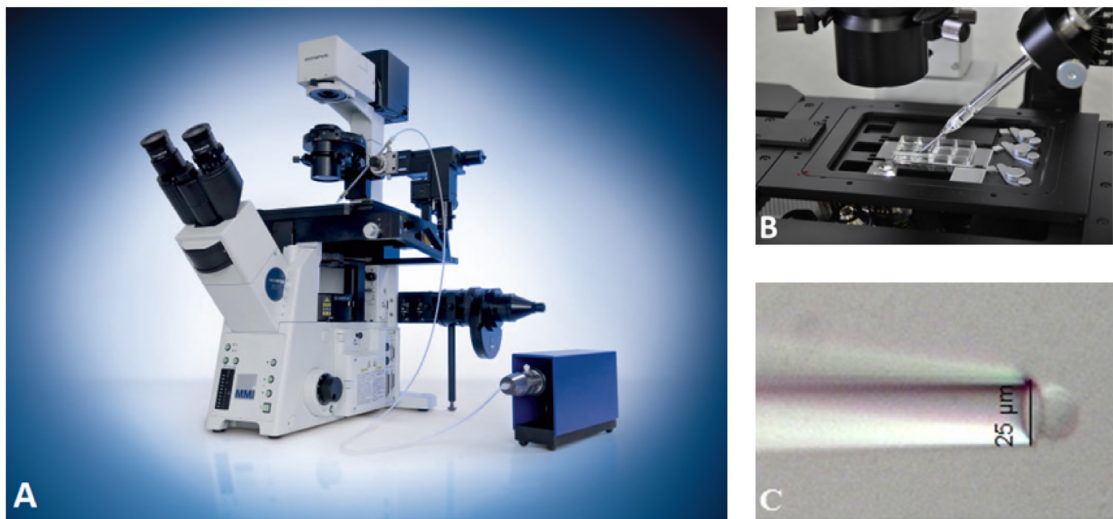
#### 4.3.2 Quantitative Genexpressionsanalyse

Die in dieser Arbeit angewandte Methode der qRT-PCR ermöglicht nicht nur die gezielte Genexpressionsanalyse einzelner Zellen, sondern auch die Bestimmung der Ausgangsmenge des jeweiligen Genprodukts. Die qRT-PCR stellt die sensitivste Technologie zum Nachweis tumorassoziiertes Genexpressionen dar (Bosma 2003, Ring 2005).

Nach Isolation der Einzel-Zellen aus dem Probenmaterial, wurden diese jeweils nacheinander der Lyse, Amplifikation und qRT-PCR unterzogen. Hierbei kamen das „CellAmp™ Whole Transcriptome Amplification Kit“ und der Mastercycler® zum Einsatz. Anschließend wurde die Effektivität und Spezifität der qRT-PCR mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese ermittelt.

#### 4.3.2.1 Zell-Isolierung mittels Single-Cell-Picking

Zunächst wurde die in Kapitel 4.3.1.2. beschriebene Aufbereitung der EDTA-Blutproben vorgenommen. Zur Isolierung der mit FITC-anti-EpCAM und 7AAD markierten Einzel-Zellen wurde das „Single Cell Sorting System mmi-CellEctor plus™“ eingesetzt und vom Transfusionsmedizinischen Zentrum Bayreuth zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um eine Gerätekombination bestehend aus einem Hochleistungs-Stereomikroskop, einem dreidimensional steuerbaren Mikromanipulator mit Ansaugvorrichtung und einer speziell entwickelten Steuereinheit (Abb. 5).



**Abb. 5** Präparationsplattform mmi CellEctor plus™.

(A) Hochleistungs-Stereomikroskop, mit dreidimensional steuerbarem Mikromanipulator und speziell entwickelter Steuereinheit (B) Steuereinheit mit Ansaugvorrichtung (C) Mikromanipulation mittels Kapillare, welche die Zelle einsaugt.

Nach erfolgter Blutaufbereitung wurden die gewonnenen Zellen auf einen Objektträger aufgetragen, wo sie wenige Minuten sedimentierten. Als Medium diente hierbei PE-Puffer. Anschließend wurde eine Kapillare vorsichtig in die Zellsuspension eingetaucht, abgesenkt und direkt an eine geeignete Zielzelle herangeführt. Mit Hilfe einer Hydraulik wurden 30 nl dieses Mediums, die Zelle inklusive, angesogen. Im Anschluss daran wurde die Tumorzelle zusammen mit 150 nl des PE-Puffers in ein „Flat-Cap-Strip“ (Abb. 6) abgelegt, mit einem Mikroreaktionsgefäß abgedeckt und schließlich bei -20 °C eingefroren.



**Abb. 6 „Flat-Cap-Strip“ mit Einzelzelle.**

(A) „Flat-Cap-Strip“ mit Einzelzelle (B) Abdeckung mittels Mikroreaktionsgefäßen.

#### 4.3.2.2 Zell-Lyse und RNA-Isolierung

Die aus dem Transfusionsmedizinischen Zentrum Bayreuth ins Onkologische Forschungslabor des Universitätsklinikums Jena überführten, tiefgefrorenen Einzelzellen wurden vor der Amplifikation zunächst einer Lysereaktion unterzogen.

Der im Flat-Cap bei Raumtemperatur aufgetauten Zelle wurden 3  $\mu\text{l}$  des MasterMixes 1 (Tab. 14) zugegeben. Anschließend wurde der gesamte Flat-Cap-Inhalt in ein separates Mikroreaktionsgefäß überführt.

Lösungen	Volumen für 8 Proben ( $\Sigma$ 24 $\mu\text{l}$ )
Lysis Buffer	11,2 $\mu\text{l}$
RNase Inhibitor	1,0 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix	0,8 $\mu\text{l}$
RT dT Primer	0,8 $\mu\text{l}$
RNase-freies H <sub>2</sub> O	10,2 $\mu\text{l}$

**Tab. 14 Mastermix 1 für Lyseschritt 1.**

Im Rahmen der thermischen Lyse erfolgte die Inkubation der Proben für 1 min bei 75 °C in einem Thermocycler. Anschließend wurde der Suspension 1  $\mu\text{l}$  des MasterMixes 2 (Tab. 15) hinzugefügt.

Lösungen	Volumen für 8 Proben ( $\Sigma$ 8 $\mu\text{l}$ )
Lysis Buffer	2,8 $\mu\text{l}$
RT Enzyme Mix	2,0 $\mu\text{l}$
RNase-freies H <sub>2</sub> O	3,2 $\mu\text{l}$

**Tab. 15 Mastermix 2 für Lyseschritt 2.**

### 4.3.2.3 cDNA-Synthese

Im nächsten Schritt wurde das Zelllysate zunächst 5 Minuten bei 42 °C und anschließend 5 Sekunden bei 85 °C inkubiert. Danach wurden 5 µl des MasterMixes 3 (Tab. 16) hinzugegeben.

Lösungen	Volumen für 8 Proben ( $\Sigma$ 40µl)
TdT Buffer	12,0 µl
dATP	1,2 µl
TdT Enzyme Mix	1,0 µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	25,8 µl

**Tab. 16 Mastermix 3, Poly-A-Additions-Mix.**

Um die Poly-A-Additions-Reaktion zu initiieren wurden die Proben 15 Minuten bei 37 °C und abschließend 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die so erhaltene cDNA-Lösung wurde anschließend zur Amplifikation eingesetzt (bzw. bei -20 °C aufbewahrt).

### 4.3.2.4 cDNA-Amplifikation

Zunächst wurden für jede Probe 23 µl des MasterMixes 4 (Tab. 17) in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben und mit 2 µl des jeweiligen Lysates versetzt.

Lösungen	Volumen für 1 Proben ( $\Sigma$ 23 µl)
10x Ex Taq Buffer	2,5 µl
dNTP Mix	2,0 µl
PCR Primer Mix	3,0 µl
Taq Polymerase	0,125 µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	15,375 µl

**Tab. 17 Mastermix 4.**

Nachdem das oben beschriebene Probenmaterial im Vortexer durchmischt und anschließend zentrifugiert wurde, erfolgte die Amplifikation des Templates mit dem Mastercycler<sup>®</sup> nach dem in Tab. 18 angegebenen PCR-Programm.

Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
initiale Denaturierung (1 Zyklus)	3 min	95 °C
	2 min	50 °C
	3 min	72 °C
Amplifikation (20 Zyklen)	30 sec	95 °C
	1 min	67 °C
	3 min	72 °C
	10 min	72 °C

**Tab. 18 cDNA-Amplifikationsprogramm.**

Die nach der Amplifikation vervielfältigte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 4.3.2.5 Quantitative Messung und qRT-PCR

##### **Prinzip:**

Da mittels qualitativer Analysen oftmals keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich der Unterschiede in der Genexpression verschiedener Zellpopulationen getroffen werden können, wurde ein quantitatives Verfahren als Einzelanalyse (1 untersuchtes Gen je Probe) durchgeführt. Dabei kam das „Real time“-Prinzip zum Einsatz, bei welchem nach jedem Zyklus die aktuell vorhandene DNA-Menge mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes genau bestimmt werden konnte. Dieser im verwendeten „LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit“ enthaltene Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, bindet unspezifisch an die kleine Furche doppelsträngiger DNA. Dadurch steigt die Fluoreszenz des Farbstoffes stark an und ermöglicht die quantitative Bestimmung der amplifizierten DNA in Korrelation mit deren Emissionsintensität. Der Mastercycler® selbst kann 1 bis  $10^{10}$  DNA-Kopien pro  $\mu\text{l}$  nachweisen und erlaubt daher eine sehr exakte DNA-Mengenbestimmung.

##### **Durchführung:**

Zunächst wurden alle Proben lichtgeschützt in einem Kühlblock bei 4 °C angesetzt. Als Template wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden cDNA bzw. 1  $\mu\text{l}$  RNase-freies H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) in einer 96-Well-Platte vorgelegt.

Zur Erstellung der später benötigten Standardkurven (siehe Kapitel 4.3.2.6) wurde ein Kontrollfragment verwendet, welches den Sequenzabschnitt für das *housekeeping*-Gen  $\beta$ -Aktin enthielt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des Kontrollfragmentes hergestellt ( $10^{-2}$  bis  $10^{-7}$  entsprechend 50 pg /  $\mu$ l bis 0,0005 pg /  $\mu$ l) und wiederum 1  $\mu$ l der entsprechenden Verdünnung in die Wells gegeben. Anschließend wurden jeweils 19  $\mu$ l des MasterMixes (mit den jeweiligen Primern, siehe Tab. 19) zu den Proben pipettiert und die Wells mit Flat-Cap-Strips verschlossen.

Komponente	Volumen für 8 Proben ( $\Sigma$ 152 $\mu$ l)
RNase-freies H <sub>2</sub> O	64,0 $\mu$ l
Primer (Sense+Antisense) [100 $\mu$ M]	8,0 $\mu$ l
LightCycler <sup>®</sup> 480 SYBR Green I Mastermix	80,0 $\mu$ l

**Tab. 19 Master Ansatz für qRT-PCR.**

Abschließend wurde die 96-Well-Platte in den Mastercycler<sup>®</sup> eingesetzt und die PCR-Reaktion mit dem entsprechenden Programm gestartet (siehe Tab. 20).

Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
Vorinkubation	10 min	95 °C
Denaturierung	10 sec	95 °C
Annealing	15 sec	60 °C
Elongation	25 sec	72 °C
Cooling	30 sec	4 °C

**Tab. 20 qPCR - Programm für die Einzelzellanalyse.**

Um die PCR-Spezifität einzuschätzen, erfolgte im Anschluss daran die Erstellung einer Schmelzkurve. Dafür wurde das PCR-Produkt schrittweise von 60 °C auf 95 °C aufgeschmolzen (siehe Tab. 21). Die Ermittlung der  $c_t$ -Werte (siehe Kapitel 4.3.2.6) und die Datenanalyse (Quantifizierung, Schmelzkurvenanalyse) erfolgten über die zugehörige Software (Mastercycler ep realplex 2.0).

Programm	Dauer	Temperatur
Schmelzkurve	90 sec	60 °C
	8,5 sec / 0,2 °C	60 °C → 95 °C

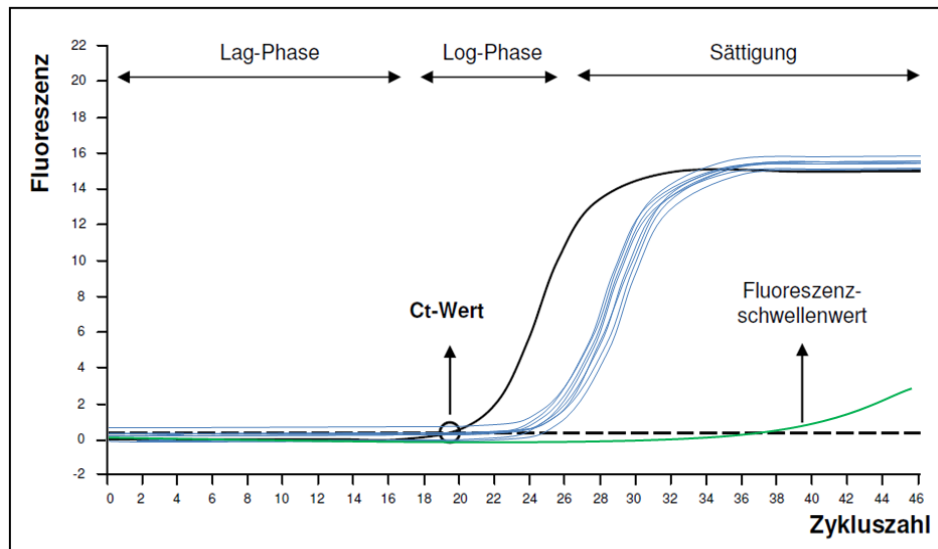
**Tab. 21 Programm für die Schmelzkurvenanalyse.**

#### 4.3.2.6 Auswertung der qRT-PCR

Wie in den vorhergehenden Abschnitten dargestellt, konnte über das Verfahren der ‚relativen Quantifizierung‘ die Transkriptionsstärke der untersuchten Gene bestimmt werden. So wurden anhand bekannter cDNA-Mengen Standardkurven definiert, mit deren Hilfe die Kopienzahl unbekannter Proben berechnet werden konnte.

Trägt man die Fluoreszenzintensität (Ordinate) in Abhängigkeit von der Zykluszahl (Abszisse) in ein Koordinatensystem ein, so ergeben die Messwerte der ‚positiven‘ Probe einen S-förmigen Kurvenverlauf - mit einem langsamen, in die exponentielle Wachstumsphase übergehenden Steigungsbeginn, einem Abschnitt quasi-linearer Fluoreszenzzunahme und einer Abflachung bzw. Plateauphase zum Ende hin (Abb. 7). Der Kurvenverlauf ist durch die unterschiedlich guten Reaktionsbedingungen, insbesondere sich wandelnder Enzym-Substrat-/dNTP-Verhältnisse (z.B. Hemmwirkungen, Mangel-Situationen), erklärbar.

Lediglich während der Logphase der PCR liegt eine annähernd direkte Proportionalität zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität und der Menge des PCR-Produkts vor (die Zunahme des PCR-Produkts korreliert mit der initial eingesetzten Menge an cDNA (siehe Abb. 7)). Um die cDNA-Proben-Konzentration zu ermitteln, wurden die Wendepunkte der einzelnen Amplifikationskurven (Kurvenschar) bestimmt. Die Abszissenkoordinaten der jeweiligen Wendepunkte wiederum ließen sich auch als Zykluszahl („Threshold Cycle“) ausdrücken und kennzeichnen ihrerseits den sogenannten „ $c_t$ -Wert“. Je geringer die Menge an Ausgangsmaterial war, umso länger dauerte es die jeweiligen Amplifikat-Mengen zu detektieren und desto höher war der ermittelte Zyklus bzw.  $c_t$ -Wert.



**Abb. 7 Prinzip der Amplifikation der qRT-PCR (Abszisse: Zykluszahl, Ordinate: Fluoreszenz-Intensität).** Gemessen wird der Zeitpunkt, bei dem das Fluoreszenzsignal gerade exponentiell ansteigt ( $c_t$ -Wert). Schwarz: Standardkurve, Blau: Probenschar, Grün: Negativkontrolle, bei der nur unspezifische Primer Dimere entstehen.

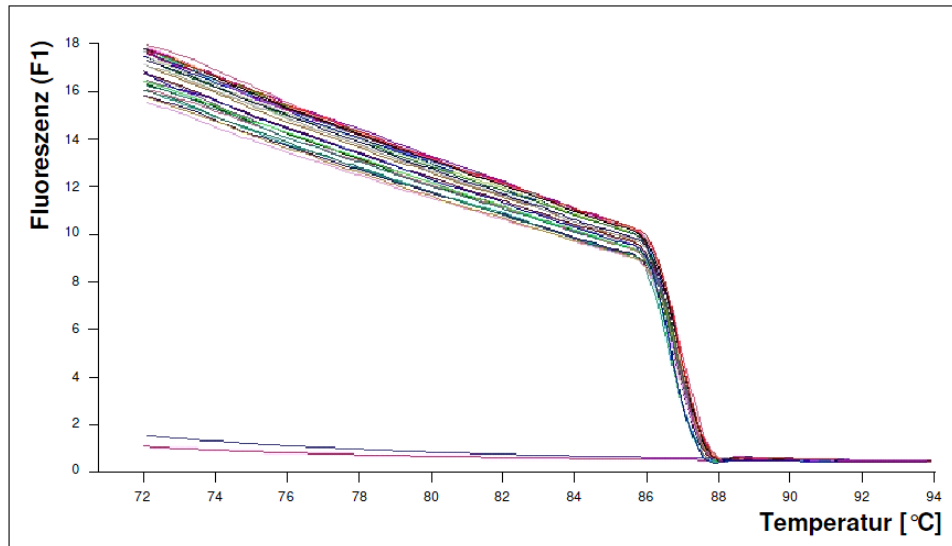
Für die Bestimmung der relativen Menge genügt der Vergleich der ermittelten Zykluszahlen, für die Bestimmung der absoluten Konzentration mussten die Standardkonzentrationen herangezogen werden (siehe Kapitel 4.3.2.5). Die Nutzung eines halblogarithmischen Koordinatensystems ermöglichte es eine Regressionsgerade durch die Punkte der Standardwerte zu legen, wobei jede Zykluszahl einer entsprechenden Konzentration/Kopienzahl der untersuchten cDNA-Proben entspricht.

Für die Auswertung wurden nur solche Proben als eindeutig positiv gewertet, in denen als Untergrenze mindestens 5 Kopien/ $\mu$ l detektiert werden konnten. Jene Proben, in denen nach 40 Zyklen keine Amplifikation stattfand, wurden dagegen als eindeutig negativ gewertet.

#### 4.3.2.7 Schmelzkurvenanalyse

Zur Qualitätskontrolle der qRT-PCR und nicht zuletzt um Artefakte ausschließen zu können, wurde, wie in Kapitel 4.3.2.5 dargestellt, eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abb. 8). Bei Vorliegen besonders niedriger Konzentrationen des Ausgangsmaterials kann es zur unerwünschten Bildung von Primer-Dimeren und/oder unspezifischen Produkten kommen. Es wurde erkennbar, dass das Quantifizierungsergebnis unter Verwendung des Farbstoffes SYBR Green I (und dessen Wechselwirkung mit der DNA) zu erheblichen Verfälschungen führen kann. Mit Hilfe der Schmelzkurve ist es möglich solche Fehler nachzuweisen und bei der weiteren Auswertung zu berücksichtigen.

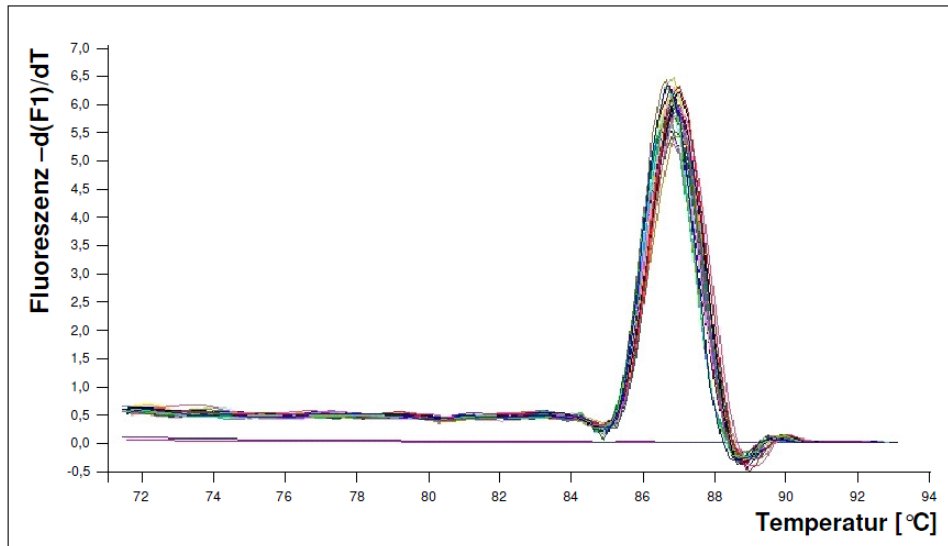




**Abb. 8 Schmelzkurve für verschiedene Proben.**

Durch sukzessives Erhitzen auf insgesamt 95°C kommt es zu einer Fluoreszenzabnahme, da die DNA-Doppelstränge dissoziieren, so dass SYBR Green I nicht mehr interkalieren kann. Die Fluoreszenzminderung während der Erwärmung ist in diesem Beispiel bei ca. 87°C besonders stark (Tipp 2010).

Zur Ermittlung der spezifischen Schmelzpunkte wurden die Proben sukzessive erwärmt (Übergang der dsDNA in die ssDNA-Form). Die Schmelzpunkte konnten, je nach Produktlänge bzw. Bindungsstärke, bei unterschiedlichen Temperaturen liegen, was sich als plötzliche, starke Fluoreszenzabnahme im Rahmen eines sonst gleichmäßigen Intensitätsgefälles bemerkbar machte. Die Primer-Dimere hatten in der Regel einen um ca. 10 °C niedrigeren Schmelzpunkt als die tatsächlichen Amplifikate. Unspezifische Produkte lagen entsprechend ihrer Größe und Bindungsstärke bei einem höheren oder tieferen Schmelzpunkt vor (Abb. 9).



**Abb. 9 Schmelzkipfel (Melting Peaks) als Darstellung der negativen Ableitung der Schmelzkurve.**

Der einzelne, saubere Peak bei ca. 87 °C in allen Proben verdeutlicht, dass nur das gewünschte, spezifische Produkt amplifiziert worden ist. Die Negativkontrollen sind frei von DNA-Kontamination, sie weisen kein Genprodukt auf (Tipp 2010).

#### 4.3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Als zusätzliche Kontrolle wurden die PCR-Produkte mit Hilfe eines Agarose-Gels elektrophoretisch aufgetrennt, um die Größe der erwarteten Banden zu bestätigen. Da bei der qRT-PCR die Sättigungsphase erreicht wird, erscheinen die Produktbanden in der Gelelektrophorese mit annähernd gleicher Intensität, unabhängig von einem nachgewiesenen Unterschied der  $c_t$ -Werte in der Amplifikation.

Zur Herstellung eines Gels wurden zunächst 50 g TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) mit 150 ml Agarose (in 1 %-iger Konzentration) in einem Becherglas vermischt und anschließend in der Mikrowelle zum Sieden gebracht. Die dabei entstandene Flüssigkeit wurde nach Abkühlung (auf ca. 60 °C) mit 3  $\mu$ l Ethidiumbromid versetzt und nach guter Durchmischung blasenfrei in einen sogenannten Schlitten gegossen. In Folge dessen kam es zum Erstarren des Gels, wobei durch einen in das Gel ragenden Kamm Vertiefungen (sogenannte Taschen) entstanden, in welche die Proben später eingebracht wurden. Anschließend wurde das Gel in einer mit TAE-Puffer gefüllten Laufkammer positioniert. In jede Tasche wurden 20  $\mu$ l des PCR-Produktes gegeben (Laufpuffer nicht nötig, da der PCR-Puffer bereits gefärbt war).

Nun wurde die eigentliche Elektrophorese durchgeführt, indem an die Laufkammer eine Gleichspannung von 120 V über einen Zeitraum von 30 Minuten (Stromstärke 250 mA) angeschlossen wurde. Die entstandenen DNA-Banden konnten anschließend unter einer UV-Lampe (CCD-Kamera, 322 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden. Um die Länge und

Konzentration der Fragmente abschätzen zu können, wurde parallel zu den Proben ein sogenannter Molekulargewichtsstandard (5 µl 100 bp - DNA-Marker) aufgetrennt, welcher DNA-Stränge in bekannter Menge und Größe enthielt.

### 4.3.3 Statistische Auswertung

Zur Feststellung signifikanter Verteilungsunterschiede kamen bei der statistischen Auswertung des MAINTRAC™ – Verfahrens der  $\chi^2$ - Test sowie der exakte Test nach Fisher zum Einsatz. Die Methode von Kaplan und Meier diente außerdem der Berechnung von kumulierten Überlebensraten. Der Einfluss verschiedener prognostischer Faktoren zur Ermittlung der Ereignis-freien Überlebenszeit wurde unter der Nullhypothesenannahme, dass der jeweilige Untersuchungsparameter keinen Einfluss besitzen würde, mit Hilfe univarianter Analysen mittels des sogenannten „Log-Rank Tests“ geprüft. Unterschiede wurden hierbei als statistisch signifikant bezeichnet, wenn  $p < 0,05$  war. Konnte ein statistischer Zusammenhang nachgewiesen werden, schloss sich eine multivariate Analyse nach Cox an um mit Hilfe der Hazard Ratio den jeweiligen, statistisch unabhängigen Einfluss auf die Überlebensraten zu ermitteln. Als statistisch signifikant wurden auch hier die Unterschiede der untersuchten Parameter bei einem p-Wert  $< 0,05$  bezeichnet.

Da bei den durchgeführten Genanalysen die Verteilung der erhobenen Daten unter Ausschluss einzelner Fälle für alle Gene symmetrisch war, konnte stets der „T – Test für verbundene Stichproben“ zur Anwendung kommen. Hierbei wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung für die Berechnungen herangezogen. Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten der Nullhypothese (kein Unterschied zwischen den Gruppen) wurde als „p-Wert“ ausgedrückt, wobei Resultate mit  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant interpretiert wurden. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Boxplot – Diagrammen, wobei die „Box“ dem sogenannten Interquartilenbereich (25. bis 75. Perzentile) und die zentrale Linie dem Median entspricht.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Ergebnisse der quantitativen CETC-Messungen

Bei 157 der 161 untersuchten Patientinnen konnten innerhalb des festgelegten Beobachtungszeitraumes CETC nachgewiesen werden (Detektionsrate 97,5 %). Im Therapieverlauf wurden Patienten mit sinkender Anzahl der CETC von jenen unterschieden, deren CETC-Anzahl im Verlauf der RT anstieg.

Der Zeitpunkt der Erstdiagnose bildete den Beginn des Beobachtungszeitraumes. Endpunkte der Studie waren:

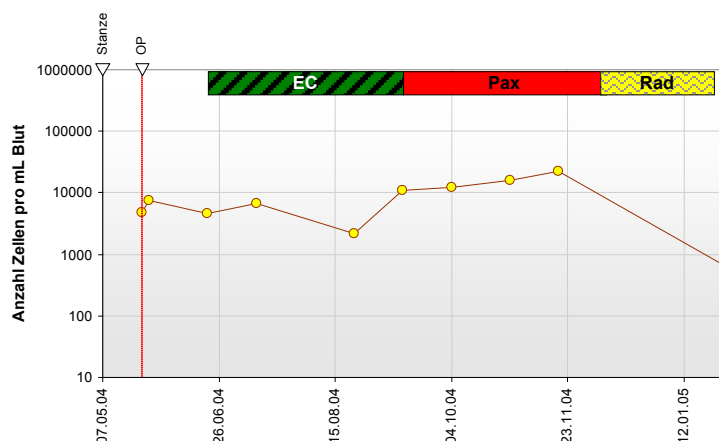
- das Auftreten von Fernmetastasen und/oder Lokalrezidiven (22 Patientinnen)
- der Tod der Patientin (6 Patientinnen)
- die letzte Nachsorge- bzw. Kontrolluntersuchung, Re-Staging (133 Patientinnen).

Der Zeitraum zwischen Anfangs- und Endpunkt der Messungen wurde als „Ereignis-freie Überlebenszeit“ definiert. Diese diente der Analyse des Therapieerfolges und wurde in Bezug auf einen möglichen Zusammenhang mit dem Verhalten der CETC untersucht. Lokalrezidive und Fernmetastasen wurden dabei zu dem Parameter „Ereignis“ zusammengefasst. Der mittlere Beobachtungszeitraum betrug 1478 Tage (Minimum 122 Tage, Maximum 3569 Tage).

#### 5.1.1 Patientenspezifische Verlaufsmessungen

Anhand der jeweils vor und nach der RT untersuchten CETC, konnten individuelle Patientenverläufe erstellt werden. Im Folgenden soll die Einteilung der Patientinnen in verschiedene Beobachtungsgruppen (siehe Kapitel 5.1.1) anhand zweier typischer Patientenverläufe verdeutlicht werden.

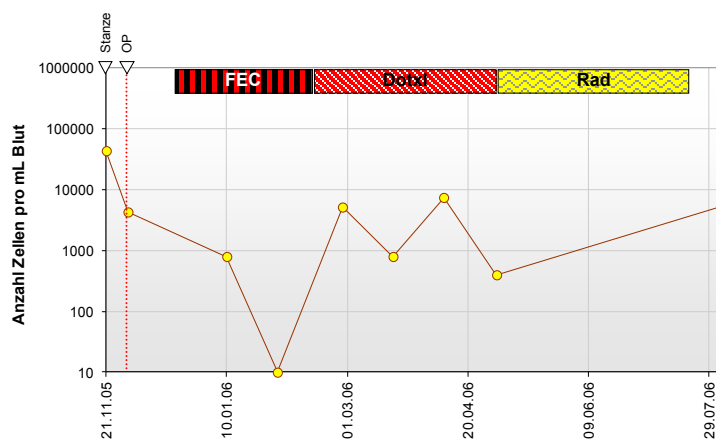
In Abbildung 10 wird das deutliche Absinken der CETC-Zellzahl im Rahmen der strahlentherapeutischen Behandlung (als Rad dargestellt) erkennbar. Die bei der Patientin vorangestellte Chemotherapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Paclitaxel führte nicht zu einem signifikanten Absinken der CETC-Zellzahl. Erst die RT konnte ein Absinken von 22464 CETC/ml auf 600 CETC/ml bewirken. Ein solcher Verlauf gilt als prognostisch günstig.



**Abb. 10 Typischer Patientenverlauf mit absinkenden CETC im Rahmen der Radiatio.**

Vor der Strahlentherapie (gelb: Rad) erfolgte eine Chemotherapie (grün: EC, rot: Pax), durch welche die CETC Zellzahl nicht signifikant vermindert werden konnte.

Bei dem in Abbildung 11 dargestellten Patientenverlauf kam es hingegen trotz RT zu einer Freisetzung von Tumorzellen und damit zu einem Anstieg der CETC. Die einzelnen Messwerte variierten dabei sehr stark. Ein solches Verhalten der CETC wird häufig beobachtet und als zusätzliche Freisetzung von Tumorzellen aus okkulten Residuen interpretiert. Dieses Beispiel spricht eher für eine ungünstige Prognose, wobei hierfür neben einer quantitativen Vermehrung der CETC auch eine erhöhte Zellaktivität verantwortlich zu sein scheint.



**Abb. 11 Typischer Patientenverlauf mit ansteigenden CETC im Rahmen der Radiatio.**

Vor der Strahlentherapie (gelb: Rad) erfolgte eine Chemotherapie (rot-schwarz: FEC, rot-weiß: Dotxl), durch welche die CETC-Zellzahl zunächst absank, dann aber wieder anstieg und bis zum Ende der Chemotherapie nicht signifikant vermindert werden konnte. Auch durch die Radiatio konnte kein Absinken der CETC erreicht werden.

### 5.1.2 Patientengruppierung

Bei den 161 untersuchten Patientinnen wurden im Untersuchungszeitraum vom 01.09.2002 bis zum 01.09.2012 insgesamt 22 Lokalrezidive oder Fernmetastasen beobachtet. Prozentual betrachtet bedeutet dies, dass es bei 13,7 % der Probandinnen bis Studienende zu einem Wiederauftreten bzw. einer Streuung der Tumorerkrankung kam.

Zur Datenauswertung wurde aus den Messwerten der CETC (vor und nach der RT) der nachfolgend erläuterte Quotient gebildet:

$$x(\text{Quotient}) = \frac{\text{CETC vor der Strahlentherapie}}{\text{CETC nach der Strahlentherapie}}$$

In Abhängigkeit davon wurden die Patientinnen in verschiedene Gruppen unterteilt. Gruppe AB (siehe unten) enthält alle Patientinnen, die nach der RT eine geringere Anzahl CETC als vor der RT aufwiesen. Gruppe AN enthält entsprechend jene Patientinnen, bei denen es im Rahmen der Behandlung zu einer höheren Zellzahl kam. Je nachdem, ob das Absinken bzw. Ansteigen der Zellzahl mehr oder weniger als 10 % des Ausgangswertes ausmachte, wurden die Patientinnen in zwei weitere Untergruppen, gemäß dem folgenden Schema (Tab. 22), eingeteilt.

Gruppe AB (Absinken)	}	Gruppe 1 (10-faches Absinken der CETC)	$x \leq 0,10$
		Gruppe 2 (Absinken kleiner als das 10-fache)	$0,10 < x \leq 1,00$
Gruppe AN (Anstieg)	}	Gruppe 3 (Anstieg kleiner als das 10-fache)	$1,00 < x \leq 10,0$
		Gruppe 4 (10-facher Anstieg der CETC)	$10,0 < x$

**Tab. 22 Einteilungsschema der Patientinnen in unterschiedliche Beobachtungsgruppen in Abhängigkeit vom Quotienten der CETC-Zellzahl vor und nach der Bestrahlung.**

Bei den Patientinnen wurden außerdem weitere Tumoreigenschaften bzw. Faktoren im Hinblick auf die Ereignis-freie Überlebenszeit und die 5-Jahres-Ereigniswahrscheinlichkeit untersucht. In der nachfolgenden Übersicht sind die dabei als statistisch signifikant ermittelten Zusammenhänge grün dargestellt. Ein deutlicher tendenzieller Zusammenhang ohne statistische Signifikanz wurde jeweils gelb gekennzeichnet. Jene Merkmale, die in keinem Zusammenhang mit dem Auftreten von Ereignissen standen, wurden farblich nicht hervorgehoben.

Darüber hinaus wurden noch weitere Tumor-, Behandlungs- oder Patienteneigenschaften untersucht, welche ihrerseits entweder keine signifikanten Zusammenhänge in Bezug auf die Ereignis-freie Überlebenszeit aufwiesen oder nicht im Detail dargestellt werden konnten. Hierzu gehören die in Tabelle 23 kursiv hervorgehobenen Kategorien.

5.1.3 P (Ereignis-freies Überleben)		5.1.4 P (Ereignis in 5 Jahren)	
<b>CETC Anstieg/Absinken gesamt</b>	p = 0,004	<b>CETC Anstieg/Absinken gesamt</b>	p = 0,019
• Lokalrezidive	p = 0,341	Lokalrezidive	p = 0,710
• <b>Fernmetastasen</b>	p = 0,004	<b>Fernmetastasen</b>	p = 0,009
<b>CETC Anstieg/Absinken (10-fach)</b>	p = 0,020	<b>CETC Anstieg/Absinken 10-fach</b>	p = 0,069
<b>Bestrahlung der LAG</b>	p = 0,039	Bestrahlung der LAG	p = 0,145
<b>Boost-Bestrahlung</b>	p = 0,028	<b>Boost-Bestrahlung</b>	p = 0,040
pT-Stadium	p = 0,399	pT-Stadium	p = 0,442
pN-Status	p = 0,289	pN-Status	p = 0,419
Grading	p = 0,449	Grading	p = 0,415
<b>Progesteronrezeptor-Status</b>	p = 0,061	<b>Progesteronrezeptor – Status</b>	p = 0,064
Östrogenrezeptor – Status	p = 0,956	Östrogenrezeptor – Status	p = 1,000
Her2/neu – Status	p = 0,212	Her2/neu – Status	p = 0,438
<b>Triple-Negativität</b>	p = 0,063	Triple-Negativität	p = 0,121
<i>Histologie</i>	<i>p = 0,817</i>	<i>Histologie</i>	<i>p = 0,867</i>
<i>Alter</i>	<i>p = 0,461</i>	<i>Alter</i>	<i>p = 0,538</i>
<b>Neoadjuvante Chemotherapie</b>	<i>p = 0,050</i>	<i>Neoadjuvante Chemotherapie</i>	<i>p = 0,191</i>
<b>Einsatz einer Antikörpertherapie</b>	<i>p = 0,071</i>	<i>Einsatz einer Antikörpertherapie</i>	<i>p = 0,171</i>
<i>Anti-Hormonbehandlung</i>	<i>p = 0,500</i>	<i>Anti-Hormonbehandlung</i>	<i>p = 0,407</i>

**Tab. 23 Übersicht der bzgl. Ereignis-freier Überlebenszeit und 5-jähriger Ereigniswahrscheinlichkeit untersuchten Merkmale.** Gelb: tendenzieller Zusammenhang, Grün: signifikanter Zusammenhang, Kursiv: Merkmale, die aufgrund der begrenzten Kapazität nicht näher erläutert werden.

### 5.1.3 Datenanalyse „Ereignis-freie“ Überlebenszeit

#### 5.1.3.1 Vergleich der Patientengruppen AN und AB

Zuerst sollte eine Korrelation der CETC mit der Ereignis-freien Überlebenszeit i.S. eines Ansteigens oder Absinkens untersucht werden. Neben der signifikant höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses bei angestiegenen CETC zeigte sich zusätzlich ein Zusammenhang zwischen dem Verhalten der CETC und der Ereignis -freien Überlebenszeit. Mit Hilfe des Log-Rank-Testes anhand der Kaplan-Meier-Kurve (Abb. 12) ließ sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ermitteln ( $p = 0,004$ ).

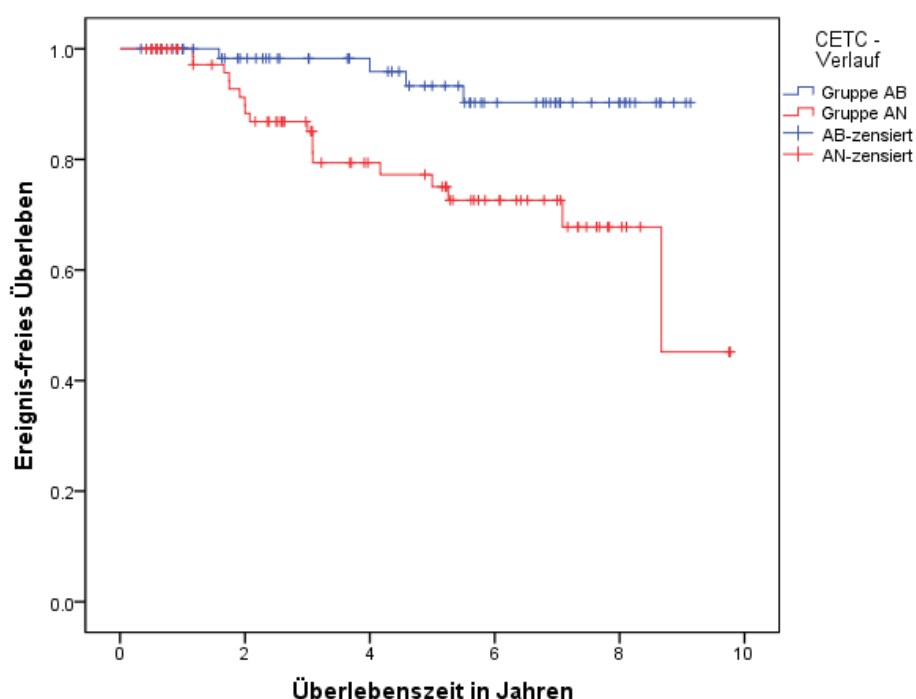


Abb. 12 Überlebensfunktion der Gruppen AN und AB in Abhängigkeit des jeweiligen CETC-Verlaufes.

Die Wahrscheinlichkeit der Ereignisfreiheit einer Patientin 5 Jahre nach Erstdiagnose liegt in der Gruppe AB bei 90,9 %, in der Gruppe AN hingegen bei 73,3 %. Die mittlere Ereignis-freie Überlebenszeit liegt in Gruppe AB bei etwa 8,7 Jahre und in Gruppe AN bei ca. 7,5 Jahren.

Mittels COX-Regression konnte gezeigt werden, dass das Verhalten der Tumorzellen im Rahmen der RT einen signifikanten Einfluss auf die Ereignis-freie Überlebenszeit der Patientinnen aufweist ( $p = 0,009$ ; 95 % - Konfidenzintervall: 1,438 – 12,574). Das Risiko für das Auftreten eines Ereignisses (Hazard) war bei Patientinnen mit ansteigender CETC-Zahl nach RT 4,3-mal so hoch, wie jenes der Patientinnen mit sinkender Zellzahl.



### 5.1.3.2 Vergleich der Patientengruppen AN und AB bzgl. Lokalrezidiven und Metastasen

Betrachtet man die o.g. Ereignisse differenziert nach Lokalrezidiven und Fernmetastasen und analysiert anschließend den Zusammenhang zwischen deren Auftretswahrscheinlichkeit und der Überlebenszeit, so fällt auf, dass vor allem die Entstehung von Fernmetastasen mit einem Anstieg der CETC in Verbindung steht. Bei der Analyse der Lokalrezidive und des CETC-Verlaufes erbrachte der anhand der Kaplan-Meier-Kurve durchgeführte Log-Rank-Test keinen signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,341$ ). Die Korrelation zwischen einem Anstieg der CETC im Rahmen der RT und dem späteren Auftreten von Fernmetastasen ist hingegen statistisch signifikant ( $p = 0,004$ ). Das bedeutet somit, dass für den signifikanten Zusammenhang aller beobachteten Ereignisse mit der Ereignis-freien Überlebenszeit vor allem die Fernmetastasen Relevanz haben.

### 5.1.3.3 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des Maßes der Zellzahländerung

Zusätzlich zum CETC-Verhalten wurde in einem weiteren Schritt das Maß der jeweiligen Zellzahländerung pro Patient in die Untersuchung einbezogen und bezüglich der Ereignis-freien Überlebensrate analysiert. Hierfür wurden, wie oben genannt, zwei weitere Gruppen unterschieden, in welche diejenigen Patientinnen eingruppiert wurden, bei denen sich die Zellzahlen besonders stark änderten (Anstieg auf  $> 10$ -Fache).

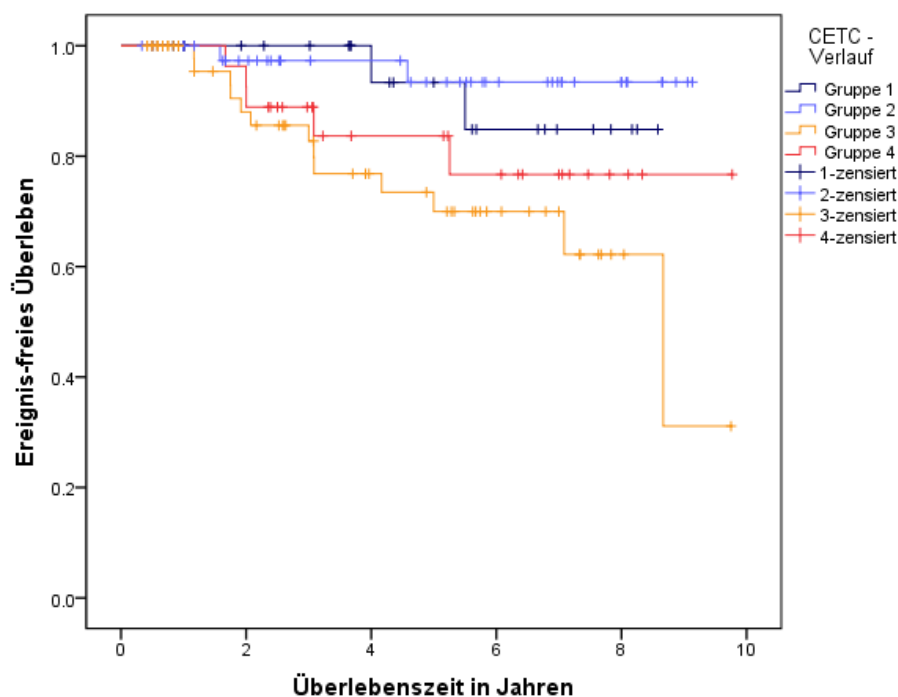


Abb. 13 Überlebensfunktion der Gruppen 1-4 in Abhängigkeit des jeweiligen CETC-Verlaufes.

Neben der signifikant niedrigeren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses in Gruppe 1 und 2 wurde auch hier ein Zusammenhang zwischen dem Verhalten der CETC und der Ereignis-freien Zeit untersucht. Dabei ließ sich mit Hilfe des Log-Rank-Testes (anhand der Kaplan-Meier-Kurve) ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ermitteln ( $p = 0,020$ ).

Es ergaben sich folgende Wahrscheinlichkeitsgruppen für die Ereignisfreiheit einer Patientin bezogen auf die 5-Jahres-Zeitspanne nach der Erstdiagnose (siehe Tab. 24).

Patientengruppe	5- Jahres- Überlebenswahrscheinlichkeit	mittlere Ereignis-freie Zeit
Gruppe 1	84,8 %	8,0 Jahre
Gruppe 2	93,4 %	8,7 Jahre
Gruppe 3	70,0 %	7,1 Jahre
Gruppe 4	76,7 %	8,2 Jahre

**Tab. 24 Ergebnisse der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit und der geschätzten mittleren Überlebenszeit ohne Lokalrezidiv oder Fernmetastase in Abhängigkeit vom Zellzahl-Verlauf.**

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass ein mäßiger Anstieg der gemessenen CETC prognostisch ungünstiger zu werten ist, als ein starker Anstieg. Ebenso scheint ein moderates Absinken der Zellzahl prognostisch günstiger für die Patientinnen zu sein, als ein starkes Absinken um mehr als das 10-fache des Ausgangswertes. Möglicherweise ist ein starker Anstieg der gemessenen EpCAM – positiven Zellen durch die Freisetzung epithelialer Zellen im Rahmen der RT zu erklären. Inwieweit in diesem Fall von einer suffizienten Therapie gesprochen bzw. eine Aussage hinsichtlich des Auftretens von Lokalrezidiven oder Metastasen getroffen werden kann, ist bislang nicht bekannt.

Ebenso konnte bei differenzierter Betrachtung der einzelnen Gruppen (mittels COX-Regression) gezeigt werden, dass das Verhalten der Tumorzellen im Rahmen der RT einen signifikanten Einfluss auf die Ereignis-freie Überlebenszeit, bezogen auf die Null-Hypothese, aufweist ( $p = 0,036$ ). Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses ist bei Gruppe 3 um das 3,5-fache, bei Gruppe 4 um das 2,1-fache höher als bei Gruppe 1 (siehe Tab. 25). Gruppe 2 hat im Vergleich zu Gruppe 1 sogar ein niedrigeres Risiko für das Auftreten eines Rezidives oder einer Metastase. Auch hier scheint sich die Hypothese zu bestätigen, dass sich ein moderater Anstieg der CETC für den weiteren klinischen Verlauf prognostisch am ungünstigsten auswirkt.

	Signifikanz	Exp(B)	95 % - Konfidenzinterv. für Exp(B)	
			Untere	Obere
Gruppe 1	0,046			
Gruppe 2	0,546	0,546	0,076	3,899
Gruppe 3	0,095	3,566	0,802	15,863
Gruppe 4	0,368	2,128	0,412	10,999

Tab. 25 Ergebnisse der COX-Regression bzgl. Ereignis-freiem Überleben und CETC-Verlauf.

#### 5.1.3.4 Vergleich der Patientengruppen bzgl. einer Bestrahlung der LAG

Von den 161 Patientinnen der Studie erhielten 41 Patientinnen neben der Bestrahlung der Brust eine zusätzliche Bestrahlung der Lymphabflussgebiete (LAG). Zwecks Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen einer solchen Zusatzbestrahlung und der Ereignis-freien Überlebenszeit, wurden all jene Patientinnen, deren Lymphabflussgebiete bestrahlt wurden, zu einer Gruppe zusammengefasst. Auf die Unterteilung in weitere, einzelne Subgruppen (Level, verschiedene Lymphknotenstationen) wurde jedoch an dieser Stelle verzichtet. Mittels Log-Rank-Test (anhand der Kaplan-Meier-Kurve) konnte ermittelt werden, dass es bei genannten Patientinnen zu einem statistisch signifikant häufigeren Auftreten von Ereignissen kam ( $p = 0,039$ ).

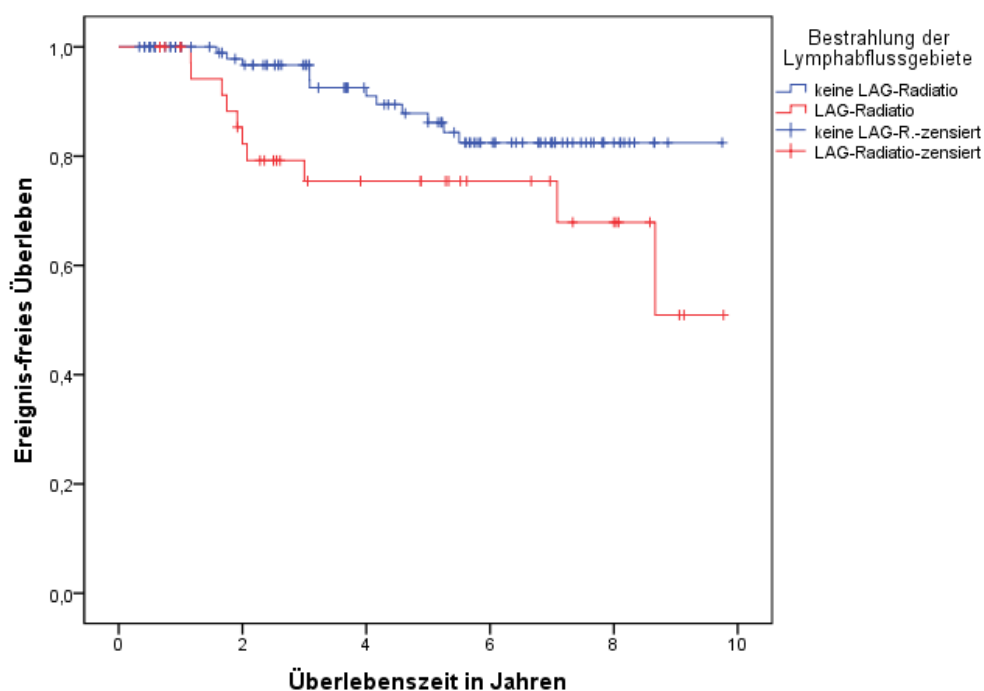


Abb. 14 Überlebensfunktion in Abhängigkeit der LAG-Bestrahlung.

Die Wahrscheinlichkeit der Ereignisfreiheit einer Patientin 5 Jahre nach der Erstdiagnose betrug in der Gruppe mit LAG-Bestrahlung 75,5 % und in der Patientengruppe ohne LAG-Bestrahlung 86,2 %. Die geschätzte mittlere Ereignis-freie Überlebenszeit betrug in der Gruppe mit LAG-Bestrahlung etwa 7,4 Jahre, bei den Patientinnen ohne zusätzliche LAG-Bestrahlung hingegen etwa 8,7 Jahre.

Aus obigen Ergebnissen geht hervor, dass es gerade bei jenen Patientinnen zu vermehrten Ereignissen kam, die eine zusätzliche RT erhielten. Diese paradoxe Beobachtung ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass jene Patientinnen, die einer Bestrahlung der Lymphabflussgebiete bedurften, von vornherein eine schlechtere Prognose aufwiesen (positiver N - Status). Somit ist insbesondere bei diesen Patientinnen ein Auftreten von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen wahrscheinlicher. Inwieweit die jeweils durchgeführte RT eine noch schlechtere Prognose verhindern konnte, ist dabei nicht abzuschätzen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wären weiterführende Untersuchungen notwendig.

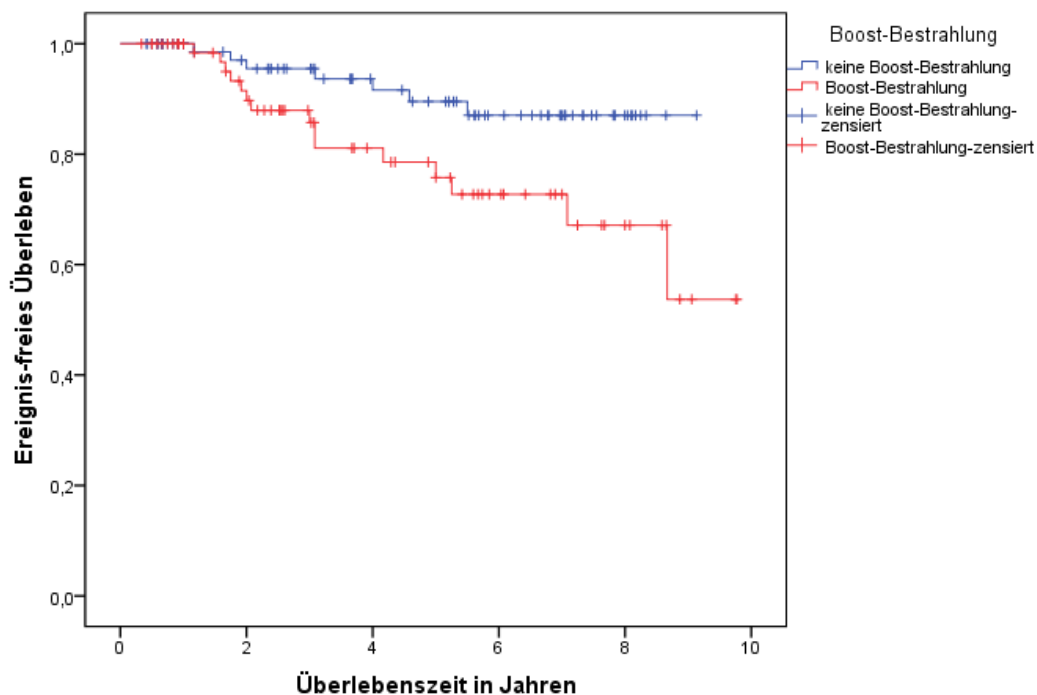
Mittels COX-Regression konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche LAG-Bestrahlung einen signifikanten Einfluss auf die Ereignis-freie Überlebenszeit in Bezug auf die Null-Hypothese aufweist ( $p = 0,045$ ; 95 % - Konfidenzintervall: 1,018 – 5,597).

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses ist, bezogen auf die Patientengruppe mit LAG-Bestrahlung, um das 2,4-fache höher als bei den Patientinnen, bei denen keine zusätzliche Bestrahlung der Lymphabflussgebiete notwendig war.

#### **5.1.3.5 Vergleich der Patientengruppen bzgl. einer Boost – Bestrahlung**

Zusätzlich zu den Patientinnen mit Bestrahlung der LAG wurde jene Patientengruppe auch hinsichtlich des Einflusses auf die Ereignis-freie Überlebenszeit untersucht, welche eine Boost-Bestrahlung auf das Tumorbett erhielt. 73 von insgesamt 161 Patientinnen wurden mit einer solchen Boost-Bestrahlung behandelt (Strahlendosis 66 Gy). Mittels Log-Rank-Test konnte auch hier ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der jeweiligen Boost-Bestrahlung und der Ereignis-freien Überlebenszeit gefunden werden ( $p = 0,028$ ). So hatten Patientinnen, die eine Boost-Bestrahlung benötigten, eine deutlich schlechtere Prognose hinsichtlich der Ereignis-freien Überlebenszeit und dem damit verbundenen Auftreten von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen.

In der Gruppe mit Boost-Bestrahlung betrug die Wahrscheinlichkeit der Ereignisfreiheit einer Patientin (5 Jahre nach Erstdiagnose) 75,8 %, in der Patientengruppe ohne Boost-Bestrahlung betrug diese 89,5 %. Die geschätzte mittlere Ereignis-freie Überlebenszeit betrug in der Gruppe mit Boost 7,6 Jahre und in der Gruppe ohne Boost-Behandlung 8,4 Jahre.



**Abb. 15 Überlebensfunktion in Abhängigkeit einer Boost-Bestrahlung.**

Mittels COX-Regression konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Boost-Bestrahlung einen signifikanten Einfluss auf die Ereignis-freie Überlebenszeit besitzt ( $p = 0,034$ ; 95 % - Konfidenzintervall: 1,076 – 6,569).

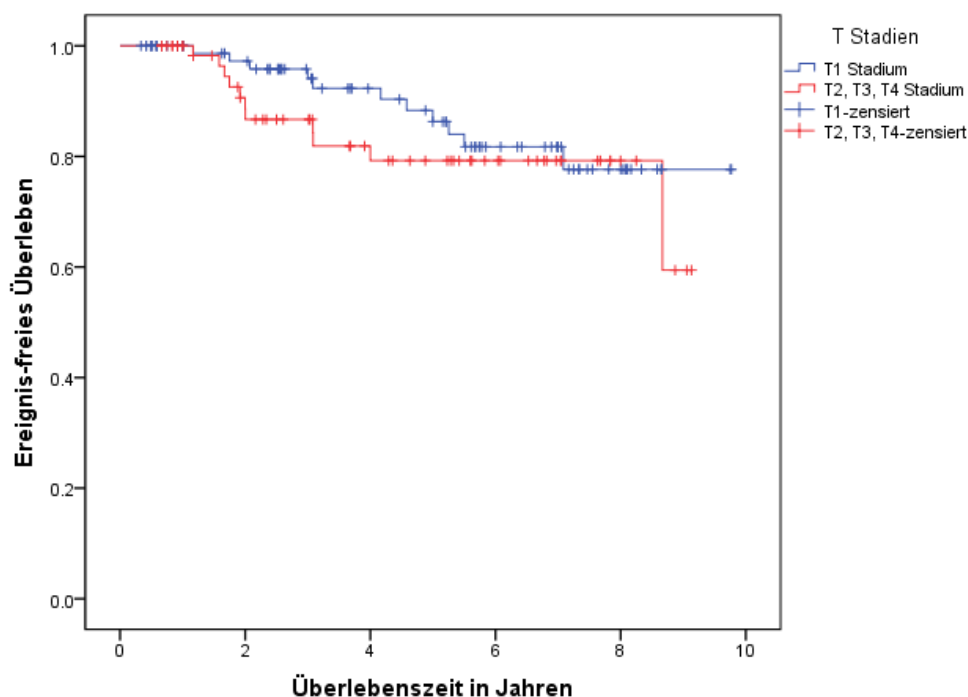
Es ist ersichtlich, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Ereignisses, bezogen auf die Patientengruppe mit Boost-Bestrahlung, um das 2,7-fache höher als bei den Patientinnen, bei denen keine zusätzliche Bestrahlung des Tumorbettes notwendig war.

Auch bei der Boost-Bestrahlung stellte sich, ähnlich der Situation bei der LAG-Bestrahlung, die Frage, inwieweit die Patientinnen von einer solchen Behandlung jeweils profitieren. Die „Vorauswahl“ der Probandinnen scheint in diesen Fällen eine zentrale Rolle zu spielen, da überhaupt nur jene Patientinnen eine Boost-Bestrahlung des Tumorbettes erhalten, die ein besonderes Risikoprofil bzgl. der Entstehung von Lokalrezidiven und Metastasen aufweisen. Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv scheint eine solche Boost-Bestrahlung das prognostische Defizit dieser Patientinnen nicht ausgleichen zu können. Die Frage, inwiefern ein Boost auf das Tumorbett die allgemeine Ereignis-freie Überlebenszeit beeinflusst, kann im Rahmen dieser Dissertation nicht abschließend geklärt werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sind Vergleichsuntersuchungen zwischen verschiedenen Patientenkollektiven mit Boost-Therapien notwendig.

### 5.1.3.6 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des pT – Stadiums

Neben den Untersuchungen zum quantitativen Verhalten der CETC wurden weitere ausgewählte Parameter, z.B. Tumoreigenschaften, hinsichtlich deren Einfluss auf die Ereignis-freie Überlebenszeit analysiert.

Bei der Untersuchung des pT-Stadiums konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den einzelnen pT-Stadien und dem Auftreten von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen nachgewiesen werden. Bei der Gegenüberstellung des pT1-Stadiums und den Stadien pT2, pT3 und pT4 ließ sich jedoch eine interessante Beobachtung machen:



**Abb. 16 Überlebensfunktion in Abhängigkeit des pT-Stadiums.**

Mit Hilfe des Log-Rank-Testes konnte kein signifikanter Unterschied der einzelnen Tumorstadien bezogen auf die 10-jährige Beobachtungszeit ermittelt werden ( $p = 0,399$ ). Es zeigte sich jedoch, dass es bei high-grade Tumoren offenbar frühzeitiger zu einem Ereignis kommt als bei low-grade Tumoren. Bei Begrenzung des Beobachtungszeitraums auf 4 Jahre, ließ sich eine deutlichere Tendenz dieses Zusammenhangs erkennen ( $p = 0,060$ ). Eine Signifikanz konnte aber auch in diesem Fall nicht ermittelt werden.

### 5.1.3.7 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des pN – Stadiums

Für die Analyse des pN-Stadiums hinsichtlich der Ereignis-freien Überlebenszeit wurde auf die Unterteilung der einzelnen Subklassen (pN1, pN2, etc.) verzichtet und lediglich 2 Gruppen, nämlich pN+ (histopathologischer Lymphknotenbefall) und pN0 (histopathologisch keine Lymphknotenmetastasen) untersucht. Dabei konnte die folgende Kaplan-Meier-Kurve erstellt werden:

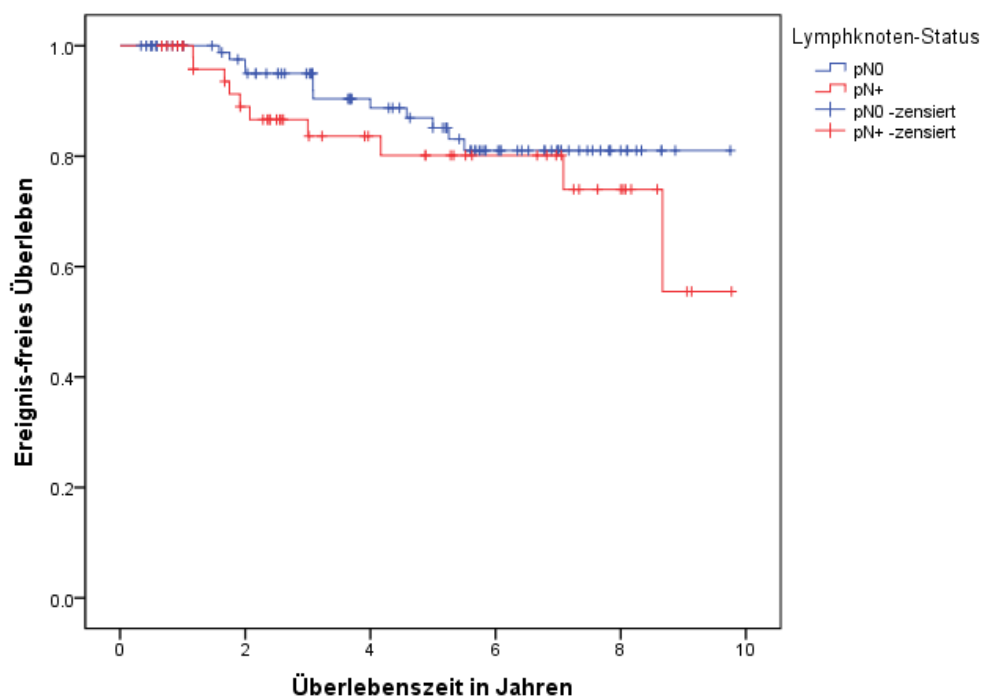


Abb. 17 Überlebensfunktion in Abhängigkeit des pN-Stadiums.

Mit Hilfe des Log-Rank-Testes konnte gezeigt werden, dass sich die erwartete Differenz N-positiver und N-negativer Patientinnen infolge der RT hinsichtlich der Ereignis-freien Überlebenszeit aufhob. Auch wenn sich die Messkurve der Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus tendenziell unterhalb der Vergleichsgruppe befindet, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied beider Gruppen ( $p = 0,289$ ) über einen Beobachtungszeitraum von 10 Jahren ermittelt werden.

### 5.1.3.8 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des Gradings

Bei der Untersuchung des Tumor-Gradings (G1, G2, G3) konnte kein signifikanter Zusammenhang bzgl. der Ereignis-freien Überlebenszeit nachgewiesen werden ( $p = 0,449$ ).

### 5.1.3.9 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des Progesteronrezeptor – Status

Keine statistische Signifikanz ließ sich ebenso bei der Analyse des Progesteronrezeptor-Status (PR) in Zusammenhang mit der Ereignis-freien Überlebenszeit feststellen. Unter Anwendung des Log-Rank-Tests zeigte sich jedoch eine starke Tendenz für eine Korrelation beider Parameter ( $p = 0,061$ ). Demzufolge haben Patientinnen mit einem positiven PR-Status eine tendenziell günstigere Prognose hinsichtlich der Ereignis-freien Überlebenszeit. In nachfolgender Kaplan-Meier-Überlebenskurve sind die Ergebnisse der beiden Patientengruppen dargestellt (Abb. 18).

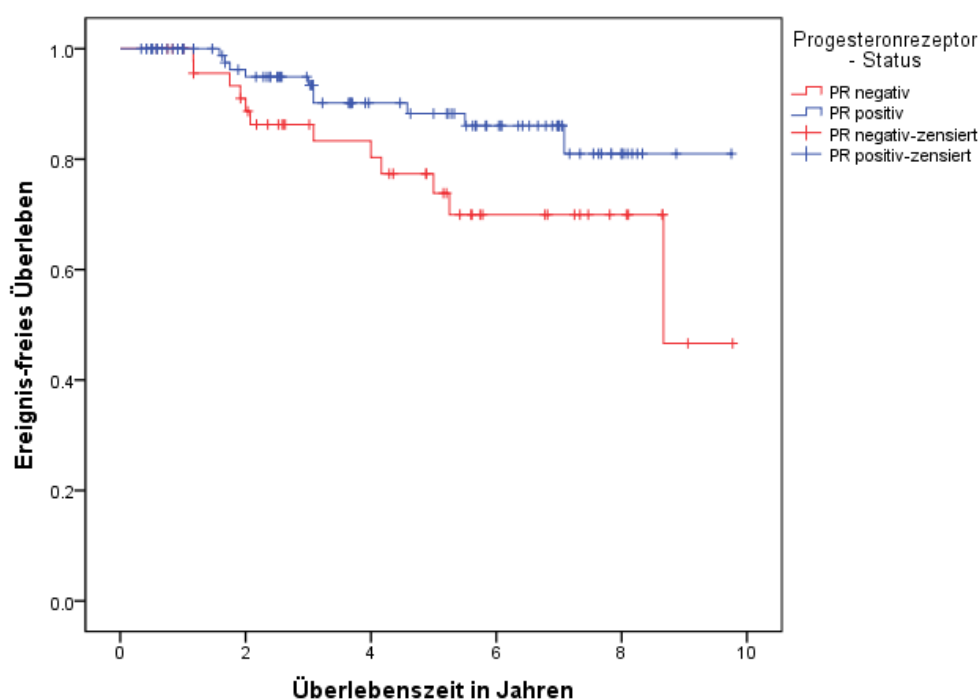


Abb. 18 Überlebensfunktion in Abhängigkeit des Progesteronrezeptor-Status.

Da sich der Zusammenhang zwischen einem positiven bzw. negativen PR-Status und der Ereignis-freien Überlebenszeit als statistisch nicht signifikant erwies, wurde auf weitere Berechnungen wie etwa die COX-Regression oder die Berechnung der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit verzichtet.



### 5.1.3.10 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des Östrogenrezeptor – & Her2/neu – Status

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab die Analyse des Östrogenrezeptor – und des Her2/neu – Status ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang mit der Ereignis-freien Überlebenszeit ( $p = 0,956$  bzw.  $p = 0,212$ ).

### 5.1.3.11 Vergleich der Patientengruppen bzgl. des Parameters „Triple – Negativität“

Bei der Untersuchung der Patientinnen mit triple-negativem MK (negativer Östrogenrezeptor- Progesteronrezeptor- und Her2/neu-Status) konnte, wie bei der Analyse des pT-Stadiums, ein besonderer Verlauf der Kaplan-Meyer-Kurve beobachtet werden. So kam es bei der Patientengruppe mit triple-negativem MK zu einem frühzeitigen Auftreten von Lokalrezidiven oder Metastasen, wohingegen bei der Vergleichsgruppe derartige Ereignisse erst im späteren Beobachtungsverlauf eintraten. Beide Kurvenverläufe näherten sich bei genauerer Betrachtung nach etwa 10-jähriger Beobachtungsphase wieder an (siehe Abb. 19). Der Zusammenhang zwischen der „Triple-Negativität“ und der Ereignis-freien Überlebenszeit erwies sich zwar statistisch als nicht signifikant, jedoch konnte eine deutliche Tendenz für eine Korrelation beobachtet werden ( $p = 0,063$ ).

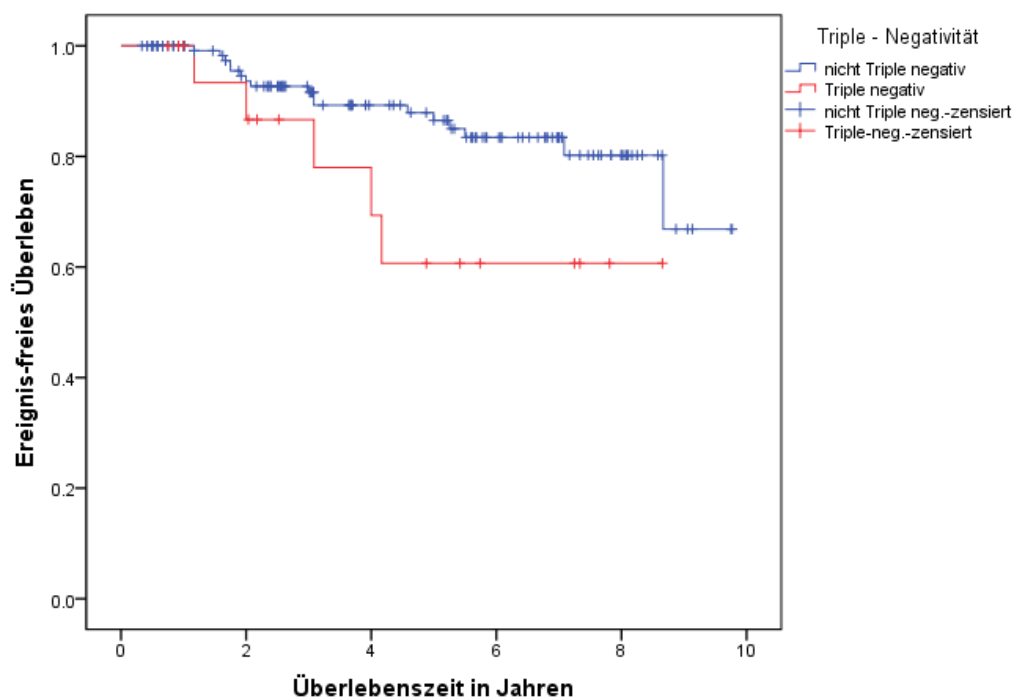


Abb. 19 Überlebensfunktion in Abhängigkeit der Triple-Negativität des Primärtumors.

Es sei an dieser Stelle nochmals betont, dass ausschließlich bestrahlte Patientinnen in die Studie eingeschlossen wurden. Dies ist insofern von Relevanz, da bei Patientinnen mit tripel-negativem Primärtumor vor allem in der Frühphase der Nachkontrolle Lokalrezidive bzw. Fernmetastasen beobachtet wurden (Retsky 2009). Eine derartige Entwicklung konnte beim vorliegenden Patientenkollektiv trotz RT nicht positiv beeinflusst werden.

#### **5.1.3.12 Vergleich der Patientengruppen hinsichtlich ausgewählter Parameter**

Über die in den bisherigen Abschnitten ausführlich dargestellten Merkmale hinaus, wurden einige weitere Parameter bezüglich ihres Einflusses auf die Ereignis-freie Überlebenszeit untersucht.

Bei der Untersuchung des histologischen Befundes (invasiv duktal, lobulär und tubulär) konnte kein signifikanter Zusammenhang bzgl. der Ereignis-freien Überlebenszeit nachgewiesen werden ( $p = 0,449$  bzw.  $p = 0,817$ ).

Auch das Alter der Patientinnen schien keinen Einfluss auf die Ereignis-freie Überlebenszeit zu haben ( $p = 0,461$ ).

Da die neoadjuvante Chemotherapie aktuell immer zentraler in das wissenschaftliche Interesse rückt, wurde im Rahmen dieser Dissertation auch der Einfluss einer solchen Therapie auf die Ereignis-freie Überlebenszeit untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine neoadjuvante Behandlung mit Chemotherapeutika sogar von Nachteil für die behandelten Patientinnen sein kann. Mögliche Verzerrungen der Ergebnisse, bedingt durch das besondere Risikoprofil der Patienten, welche eine derartige Behandlung erhielten, können allerdings nicht ausgeschlossen werden. Eine RT konnte das o.g. Defizit im vorliegenden Fall nicht ausgleichen. In der Patientengruppe, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten, wurde eine statistisch signifikant niedrigere Ereignisfreie-Überlebenszeit beobachtet ( $p = 0,050$ ).

Auch bei den Untersuchungen zum Einfluss einer Hormontherapie (Tamoxifen bzw. Aromataseinhibitoren) auf die Ereignis-freie Überlebenszeit konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden ( $p = 0,500$ ).

Der Einsatz einer Antikörperbehandlung mit Herceptin erbrachte hingegen den Nachweis eines tendenziellen Zusammenhangs. Dabei konnte zwar keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Einsatz von Herceptin und der Ereignis-freien Überlebenszeit nachgewiesen werden, eine deutliche Tendenz, i.S. einer günstigeren Prognose für jene Patientinnen mit Antikörpertherapie, war jedoch offensichtlich ( $p = 0,071$ ).

## 5.1.4 Datenanalyse der Ereigniswahrscheinlichkeit

### 5.1.4.1 Vergleich Absinken/Anstieg (Beobachtungszeitraum 5 Jahre)

Um das Auftreten lokoregionärer Rezidive oder Fernmetastasen in Abhängigkeit des CETC-Verhaltens zu untersuchen, wurden zum einen nur solche Patientinnen in die Berechnungen der Ereigniswahrscheinlichkeit einbezogen, die mindestens 5 Jahre nachbeobachtet wurden. Zum anderen wurden jene Patientinnen in die Untersuchungen eingeschlossen, bei denen innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose ein Ereignis zu verzeichnen war. Die hierbei verwendete Gruppeneinteilung entspricht der aus Kapitel 5.1.1. Da von den ursprünglich in die Studie aufgenommenen 161 Patientinnen insgesamt nur 84 über einen Zeitraum von mindestens 5 Jahren beobachtet wurden, ergaben sich nun allerdings veränderte Gruppengrößen (siehe Tab. 26).

	Ereignis innerhalb von 5 Jahren	
	nein	ja
Gruppe AB	33	4
%	(89,2 %)	(10,8 %)
Gruppe AN	31	16
%	(66,0 %)	(34,0 %)

**Tab. 26 Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose in Abhängigkeit des CETC – Verhaltens.**

Im exakten Test nach Fisher konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Eintreten eines Ereignisses innerhalb von 5 Jahren und dem Verhalten der CETC gezeigt werden ( $p = 0,019$ ). In der Patientengruppe mit einer sinkenden Anzahl an CETC, im Rahmen der RT, kam es in 4 Fällen (10,8 % der Patientinnen) zu deutlich weniger Ereignissen als bei der Gruppe mit angestiegenen Tumorzellen und 16 beobachteten Ereignissen (34,0 % der Patientinnen).

### 5.1.4.2 Vergleich Absinken/Anstieg differenziert nach Lokalrezidiv und Fernmetastasen

In einem nächsten Schritt wurden die als „Ereignisse“ zusammengefassten Lokalrezidive und Fernmetastasen differenziert voneinander betrachtet. Wiederum diente das Verhalten der CETC als Grundlage für die Analyse von Zusammenhängen. In der folgenden Übersicht sind die Häufigkeiten der einzelnen Ereignisse sowohl in absoluten Werten als auch prozentual dargestellt:

	Ereignis innerhalb von 5 Jahren		
	kein Ereignis	Lokalrezidiv	Fernmetastasen
Gruppe AB	33	3	1
%	(89,2 %)	(8,1 %)	(2,7 %)
Gruppe AN	31	5	11
%	(66,0 %)	(10,6 %)	(23,4 %)

**Tab. 27 Übersicht der differenziert beobachteten Lokalrezidive und Fernmetastasen innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose in Abhängigkeit des CETC – Verhaltens.**

Mit Hilfe des Fisher-Tests konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Eintreten eines Ereignisses (Lokalrezidiv, Fernmetastasen) innerhalb von 5 Jahren und dem Verhalten der CETC festgestellt werden. Insbesondere ergab sich, dass bei Gruppe AB mit 8,1 % (Rezidiven) bzw. 2,7 % (Metastasen) signifikant weniger Ereignisse auftraten im Vergleich zur Gruppe AN mit 10,6 % (Rezidiven) bzw. 23,4 % (Metastasen) ( $p = 0,015$ ).

Bei der Betrachtung der Wahrscheinlichkeiten für Lokalrezidive und Fernmetastasen getrennt voneinander, ließ sich folgende Beobachtung machen: Der Zusammenhang zwischen einem Ansteigen der CETC und dem Auftreten von Lokalrezidiven erwies sich als statistisch nicht signifikant ( $p = 0,710$ ). Lediglich das Auftreten von Fernmetastasen korrelierte auf signifikante Weise mit einem Anstieg der CETC ( $p = 0,009$ ). Zusammenfassend ist daher zu konstatieren, dass in erster Linie die Fernmetastasenrate für den signifikanten Zusammenhang aller „Ereignisse“ mit dem Anstieg der CETC verantwortlich zu sein scheint. Die beobachteten Lokalrezidive scheinen unabhängig von der gemessenen CETC-Zahl aufzutreten. Die Entstehung von Fernmetastasen scheint hingegen direkt mit einem Anstieg der CETC im Rahmen der RT verbunden zu sein.

#### **5.1.4.3 Vergleich 10-faches Absinken/Anstieg (Beobachtungszeitraum 5 Jahre)**

Analysen zur Ereigniswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der einfachen- bzw. zehnfachen CETC-Veränderung konnten mit Hilfe des Fisher-Tests keinen statistisch gesicherten signifikanten Zusammenhang nachweisen ( $p = 0,069$ ). Es konnte jedoch festgestellt werden, dass es im Beobachtungszeitraum bei Gruppe 3, also jenen Patientinnen mit einem nur mäßigen Anstieg der CETC, zu den meisten Ereignissen kam. Erst an zweiter Stelle standen die Patientinnen mit einem mehr als 10-fachen Anstieg. Die Patientinnen mit einer niedrigeren Anzahl an CETC nach RT wiesen tendenziell seltener Ereignisse auf. Hier traten in beiden Gruppen je 2 Ereignisse auf, wobei in Gruppe 1, bei mehr als 10-fachem Absinken, sogar

mehr Ereignisse, prozentual betrachtet, stattfanden. Also scheint auch in diesem Fall eine starke Veränderung der Tumorzellzahl prognostisch von Nachteil zu sein.

	Ereignis innerhalb von 5 Jahren	
	nein	ja
Gruppe 1	11	2
%	(84,6 %)	(15,4 %)
Gruppe 2	22	2
%	(91,7 %)	(8,3 %)
Gruppe 3	18	11
%	(62,1 %)	(37,9 %)
Gruppe 4	13	5
%	(72,2 %)	(27,8 %)

**Tab. 28** Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose in Abhängigkeit der einfachen und zehn-fachen CETC – Veränderung.

Betrachtet man, wie bereits im Abschnitt 5.1.4.2, die Entstehung von Lokalrezidiven losgelöst von der Metastasenentstehung, lässt sich erneut ein signifikanter Zusammenhang zugunsten der Fernmetastasen feststellen ( $p = 0,008$ ). Das bedeutet, dass durch einen mäßigen oder starken Anstieg der CETC im Rahmen einer RT mit der Entstehung von Fernmetastasen gerechnet werden muss. Die Ausbildung von Lokalrezidiven scheint infolge eines solchen Anstiegs eher von untergeordneter Bedeutung zu sein ( $p = 0,778$ ).

#### 5.1.4.4 Bestrahlung der Lymphabflussgebiete (LAG)

Zwischen dem Eintreten eines Ereignisses und einer vorausgegangenen Bestrahlung regionärer LAG konnte ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ( $p = 0,145$ ). Allerdings muss von einem tendenziell höheren Risiko für ein eventuelles Ereignis bei Patientinnen mit stattgefundenener LAG-Bestrahlung ausgegangen werden.

		Ereignis innerhalb von 5 Jahren	
		nein	ja
Bestrahlung der LAG	nein	50	12
		(80,6 %)	(19,4 %)
	ja	14	8
		(63,6 %)	(36,4 %)

**Tab. 29** Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose in Abhängigkeit einer zusätzlichen LAG - Bestrahlung.

### 5.1.4.5 Boost – Bestrahlung

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde wiederum der Fisher-Test eingesetzt. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Eintreten eines Ereignisses und vorausgegangener Boost-Bestrahlung ermittelt werden ( $p = 0,040$ ). Statistisch betrachtet war hierfür die Fernmetastasierung verantwortlich ( $p = 0,025$ ). Das Auftreten von Lokalrezidiven, für sich allein, stand in keinem signifikanten Zusammenhang mit der Boost-Bestrahlung ( $p = 0,703$ ).

		Ereignis innerhalb von 5 Jahren	
		nein	ja
Boost - Bestrahlung	nein	40	7
		(85,1 %)	(14,9 %)
	ja	24	13
		(64,9 %)	(35,1 %)

**Tab. 30** Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose in Abhängigkeit einer zusätzlichen Boost – Bestrahlung auf das Tumorbett.

### 5.1.4.6 pT – Stadium

Bezüglich des pT-Stadiums und der Auftrittswahrscheinlichkeit eines Ereignisses konnte, anhand der in Tabelle 31 ersichtlichen Daten, keine Signifikanz nachgewiesen werden ( $p = 0,442$ ).

		Ereignis innerhalb von 5 Jahren	
		nein	ja
pT1 %		39	10
		(79,6 %)	(20,4 %)
pT2-4 %		25	10
		(71,4 %)	(28,6 %)

**Tab. 31** Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose in Abhängigkeit des T-Stadiums.

### 5.1.4.7 pN – Stadium

Der Vergleich von pN-positiven mit pN-negativen Patientinnen ergab ebenfalls einen nicht signifikanten Zusammenhang im Hinblick auf ein späteres Auftreten von Ereignissen ( $p = 0,419$ ).

	Ereignis innerhalb von 5 Jahren	
	nein	ja
pN0	45	12
%	(78,9 %)	(21,1 %)
pN+	19	8
%	(70,4 %)	(29,6 %)

**Tab. 32** Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose in Abhängigkeit des pN-Status.

#### 5.1.4.8 Grading

Bei der Untersuchung des Tumor-Gradings (G1, G2, G3) konnte kein signifikanter Zusammenhang bzgl. der Ereigniswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden ( $p = 0,415$ ).

#### 5.1.4.9 Progesteronrezeptor – Status (PR)

Auch hier ließ sich mit dem Fisher-Test keine Signifikanz zwischen dem Progesteronrezeptor-Status und dem Auftreten von Ereignissen im 5 Jahres-Beobachtungszeitraum nachweisen ( $p = 0,064$ ). Da der p-Wert des Fisher-Tests den Signifikanzbereich nur knapp verfehlte, konnte dennoch von einem tendenziellen Zusammenhang der o.g. Parameter ausgegangen werden. Eine isolierte Betrachtung des Auftretens von Fernmetastasen, ließ sogar eine signifikante Korrelation erkennen ( $p = 0,024$ ).

	Ereignis innerhalb von 5 Jahren	
	nein	ja
PR negativ	19	11
%	(63,3 %)	(36,7 %)
PR positiv	43	9
%	(82,7 %)	(17,3 %)

**Tab. 33** Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose in Abhängigkeit des PR-Stadiums.

#### 5.1.4.10 Östrogen – & Her2/neu – Status

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab die Analyse des Östrogenrezeptor- und des Her2/neu-Status ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang mit der Ereigniswahrscheinlichkeit ( $p = 1,000$  bzw.  $p = 0,438$ ).

### 5.1.4.11 Triple-Negativität

Die Patientinnen mit triple-negativem MK besaßen, von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ausgehend, ein tendenziell erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Lokalrezidives oder von Fernmetastasen. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen war dieser Zusammenhang jedoch als nicht signifikant gegeben ( $p = 0,121$ ). Mögliche Ursache dafür, dass sich der p-Wert des Fisher-Tests trotz der prozentual deutlich erhöhten Ereignisrate nicht im Signifikanzbereich befand, ist die geringe absolute Anzahl von Ereignissen.

		Ereignis innerhalb von 5 Jahren	
		nein	ja
Triple - negativ	nein	58	15
		(79,5 %)	(20,5 %)
	ja	6	5
		(54,5 %)	(45,5 %)

**Tab. 34** Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose in Abhängigkeit der Tripel – Negativität.

### 5.1.4.12 Untersuchung weiterer Parameter

Insgesamt führten die Parameter: Histologie, neoadjuvante Chemotherapie, Hormontherapie (Tamoxifen bzw. Aromataseinhibitoren), Antikörpertherapie (Herceptin) und Alter der Probandinnen zu keinen signifikanten Messwerten in Bezug auf das Eintreten von Ereignissen wie lokoregionäre Rezidive oder Fernmetastasen.

Histologie	$p = 0,867$	Alter	$p = 0,538$
neoadj. Chemotherapie	$p = 0,191$	Hormontherapie	$p = 0,407$
Antikörpertherapie	$p = 0,171$		

Die Frage, welchen Einfluss die RT auf die verschiedenen Parameter hat, bleibt offen.



### 5.1.5 Vergleich der absoluten Anzahl zirkulierender Tumorzellen

In den vorangestellten Kapiteln stand stets die relative Änderung der jeweiligen CETC-Zahl im Mittelpunkt. Inwieweit die absolute Zellzahl für die Prognose der Patientinnen eine Rolle spielt, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden.

Zunächst wurden die Messwerte vor der RT herangezogen und mittels COX-Regression in Bezug auf die Ereignis-freie Überlebenszeit betrachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der absoluten CETC-Anzahl vor der RT und der Ereignis-freien Überlebenszeit gibt ( $p = 0,399$ ).

	Signifikanz	Exp(B)	95 % - Konfidenzinterv. für Exp(B)	
			Untere	Obere
Zellen vor Radiatio	0,399	0,982	0,940	1,025

**Tab. 35 Ergebnisse der COX-Regression bzgl. Ereignis-freiem Überleben und absoluter CETC - Zahl vor Radiatio.**

Mittels binär logistischer Regression wurde außerdem eine Korrelation zur Ereignisrate untersucht. Hierbei ließ sich nachweisen, dass die absolute Anzahl CETC vor RT keinen Einfluss auf das Eintreten von Rezidiven innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 5 Jahren hat. Es ist lediglich eine Tendenz erkennbar ( $p = 0,075$ ). Je höher die Anzahl der CETC vor Therapie, desto niedriger scheint die Ereigniswahrscheinlichkeit zu sein.

	Signifikanz	Exp(B)	95 % - Konfidenzinterv. für Exp(B)	
			Untere	Obere
Zellen vor Radiatio	0,075	0,888	0,778	1,012
Konstante	0,028	0,491		

**Tab. 36 Ergebnisse der binär logistischen Regression bzgl. absoluter CETC-Zahl vor Radiatio und der Häufigkeiten von Ereignissen.**

Ferner war von Interesse, inwiefern die Parameter „Zellzahl vor Radiatio“ und „Differenz der Zellzahlen vor und nach Bestrahlung“ eine prognostische Aussage in Bezug auf die Entstehung von Rezidiven oder Metastasen innerhalb der ersten 5 Jahre nach Erstdiagnose zulassen. Die mittels binär logistischer Regression berechneten Werte aus Tab. 37 zeigen, dass für die prognostische Aussage hinsichtlich der Ereigniswahrscheinlichkeit lediglich die

Differenz der Tumorzellen nach und vor der RT von zentraler Bedeutung zu sein scheint und nicht der absolute Ausgangswert. Bei Änderung der CETC-Zahl um eine Einheit, erhöht sich die Ereigniswahrscheinlichkeit um das 1,054-fache. Erhöht sich die Zellzahl hingegen um 1000, erhöht sich die Rezidivwahrscheinlichkeit um das  $1,054^{1000}$ -fache ( $p = 0,023$ ) (siehe Tab. 37).

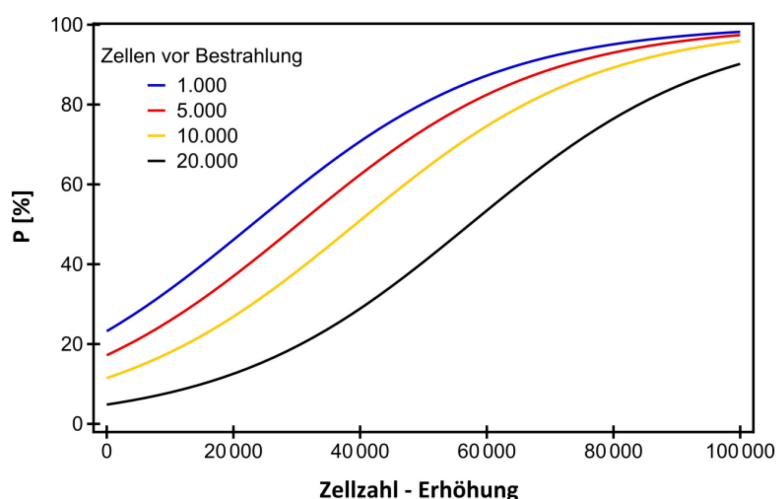
	Signifikanz	Exp(B)	95 % - Konfidenzinterv. für Exp(B)	
			Untere	Obere
Zelle vor Radiatio	0,241	0,910	0,778	1,065
Zell - Differenz	0,023	1,054	1,007	1,104
Konstante	0,004	0,332		

**Tab. 37 Ergebnisse der binär logistischen Regression bzgl. absoluter CETC - Zahl vor Radiatio und Häufigkeiten von Ereignissen.**

Anhand der Regressionskoeffizienten der jeweiligen Parameter ließ sich die untenstehende Formel ableiten, welche die Ereigniswahrscheinlichkeit im 5 Jahres-Beobachtungszeitraum nach Erstdiagnose beschreibt. Bei bekannter Anzahl der CETC vor der RT sowie bekannter Differenz der Zellzahlen vor/nach RT, lässt sich die Wahrscheinlichkeit P bzgl. des Auftretens eines Ereignisses wie folgt berechnen:

$$P(\text{Ereignis}) = \frac{e^{-1,102 - 0,094 \left(\frac{\text{Zellen}_{\text{vor}}}{1000}\right) + 0,053 \left(\frac{\text{Differenz}}{1000}\right)}}{1 + e^{-1,102 - 0,094 \left(\frac{\text{Zellen}_{\text{vor}}}{1000}\right) + 0,053 \left(\frac{\text{Differenz}}{1000}\right)}}$$

Daraus ergibt sich, dass z.B. bei einer Erhöhung der Zellzahl um 1000 (bei vor der RT 1000 gemessenen CETC) die Rezidivwahrscheinlichkeit 24,2 % beträgt (siehe Abb. 20). Bei der Messung einer Differenz von 10.000 Zellen bei gleichem Ausgangswert, erhöhte sich die Ereigniswahrscheinlichkeit auf 33,9 %.



**Abb. 20** Übersicht einzelner Ereigniswahrscheinlichkeiten (P) in Abhängigkeit der CETC-Differenz und des CETC-Messwertes vor der RT.

### 5.1.6 Absolute Häufigkeit von lokoregionären Rezidiven und Fernmetastasen

Bei den in der Studie eingeschlossenen Probandinnen wurden 22 Ereignisse beobachtet (86,3 % aller Probandinnen ohne Ereignis). In 9 Fällen handelte es sich um Lokalrezidive, in 13 Fällen um Fernmetastasen. Dies bedeutet, dass es bei 13,7 % der Probandinnen bis Studienende zu einem Wiederauftreten der Tumorerkrankung bzw. zur Metastasierung kam. Bei den 84 Patientinnen mit 5-jähriger Beobachtungszeit konnten 8-mal Lokalrezidive (9,5 %) und 12-mal Fernmetastasen (14,3 %) detektiert werden. Diese Probandinnen waren im Rezidivfall 3,3 Jahre und im Falle einer Metastase nur 2,8 Jahre Ereignis-frei (siehe Tab. 38).

Patientengruppe	P (Ereignis in 5 Jahren)	Ereignis-freie Zeit	Mortalität
Lokalrezidiv	11,1 %	3,3 Jahre	11,1 %
Fernmetastasen	7,7 %	2,8 Jahre	23,1 %

**Tab. 38** Übersicht: Ereigniswahrscheinlichkeit innerhalb von 5 Jahren, mittlere Ereignis-freie Überlebenszeit und Mortalität in Abhängigkeit von Lokalrezidiven und Fernmetastasen.

Von allen Studienteilnehmerinnen verstarben insgesamt 6 Patientinnen bis zum Ende des 10-jährigen Beobachtungszeitraumes, 4 davon infolge ihrer Grunderkrankung. Bei wiederum 3 dieser Frauen traten im Vorfeld Fernmetastasen auf, bei einer Patientin konnte zuvor ein lokoregionäres Rezidiv diagnostiziert werden. Die daraus errechnete Mortalitätsrate beträgt in der vorliegenden Stichprobe bei Nachweis von Fernmetastasen 23,1 %, bei Diagnose eines Lokalrezidives hingegen 11,1 %.

## 5.2 Genexpressionsanalyse

Bei insgesamt 9 Patientinnen wurden neben quantitativen Messungen zur Anzahl der CETC weiterführende Untersuchungen mittels Genexpressionsanalyse durchgeführt. Diese wurden an einzeln isolierten Tumorzellen vorgenommen. Pro Patientin wurden max. 8 Tumorzellen vor und max. 8 Tumorzellen nach der RT gewonnen und auf Expressionsmuster von 13 ausgewählten Genen untersucht (bei 2 Patientinnen konnten Tumorzellen lediglich vor der RT gesichert werden). Die Blutproben hierfür wurden jeweils am ersten und letzten Bestrahlungstag entnommen. Zwecks Analyse genspezifischer cDNA- bzw. m-RNA wurde jede Probe mit dem Mastercycler<sup>®</sup> unter Verwendung des Farbstoffes SYBR Green I (siehe Kapitel 4.3.2.5 ff.) untersucht und quantifiziert. Auf diese Weise konnten anhand der insgesamt 131 gewonnenen Zellen 1505 einzelne Messwerte (Kopienzahl > 0  $\mu$ l) erfasst werden. Die in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführten Messwerte sind jeweils in „Kopien /  $\mu$ l“ angegeben.

### 5.2.1 GAPDH als Housekeeping – Gen

Bei der Analyse genetischer Expressionsmuster ist es üblich das Vorhandensein detektierbarer RNA mit Hilfe eines sogenannten *housekeeping*-Gens sicherzustellen (Barber 2005). Hierfür wird in der Regel ein Gen ausgewählt, welches eine Funktion bei der Basisregulation des zellulären Stoffwechsels übernimmt und somit in jeder kernhaltigen Zelle vorhanden ist.

Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde das GAPDH-Gen als interner Marker verwendet, dessen Genprodukt ein Schlüsselenzym der Glykolyse darstellt. GAPDH-mRNA wird ubiquitär exprimiert und ist sogar extrazellulär im Serum detektierbar. Bei Experimenten mit Primärzellen ist es möglich, die Expression der Zielgene auf *housekeeping*-Gene zu normalisieren, da diese konstitutiv exprimierten Gene eher mit der Zellzahl korrelieren als regulierte Gene. Im Rahmen einer solchen Normalisierung können Variationen zwischen verschiedenen Proben, beispielsweise infolge von Pipettierungenauigkeiten, ausgeglichen werden. Durch neoplastisches Wachstum kann jedoch auch die Expression von *housekeeping*-Genen variieren, so dass eine Normalisierung auf diese nicht mehr zuverlässig ist (Goidin 2001). Dabei sind nicht nur Unterschiede in der GAPDH-Expression zwischen verschiedenen Personen feststellbar, sondern auch beim einzelnen Individuum, falls, wie im vorliegenden Fall, Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden.

Außerdem stimulieren verschiedene Faktoren die GAPDH-Transkription und beeinflussen die Nachweismethoden nachhaltig. Solche Faktoren sind z.B.:

- Insulin (Rolland 1995, Barroso 1999)
- Östrogen (Revillion 2000)
- Vitamin D (Desprez 1992)
- Hypoxie im Gewebe (Graven 1994, Zhong 1999).

Insbesondere beim MK besteht außerdem eine negative Korrelation zwischen der GAPDH-Expression im Tumorgewebe und dem Patientenalter  $> 40$  Jahre (Zeitpunkt der Erstdiagnose) sowie dem Vorhandensein von Östrogen- und Progesteronrezeptoren.

Eine positive Korrelation hingegen wurde zwischen der GAPDH-Expression und dem histologischen Grading festgestellt. Möglicherweise liegt hierbei ein Zusammenhang zwischen der GAPDH-Expression und der Zellproliferation bzw. Tumoraggressivität vor (Revillion 2000).

Aufgrund der vielfältigen Ursachen für Variationen in der GAPDH-Expression und der Tatsache, dass im vorliegenden Fall Messungen an Einzelzellen durchgeführt wurden (naturgemäß größere Streuung), erscheint es nicht sinnvoll, detektierte RNA-Spezies auf GAPDH zu normieren.

Daher wurden in dieser Arbeit bei den Detektionen aus zellulärer RNA vorzugsweise die Absolutwerte der Messungen abgebildet und keine Normierungen vorgenommen. GAPDH wurde dementsprechend lediglich als interner Standard verwendet, der das Vorhandensein von detektierbarer RNA nach der Präparation sicherstellen sollte. Dieses Ziel wurde erreicht. Schließlich konnte in allen untersuchten Zellen mit jeweils mindestens 7,20 Kopien /  $\mu$ l GAPDH-mRNA detektiert werden.

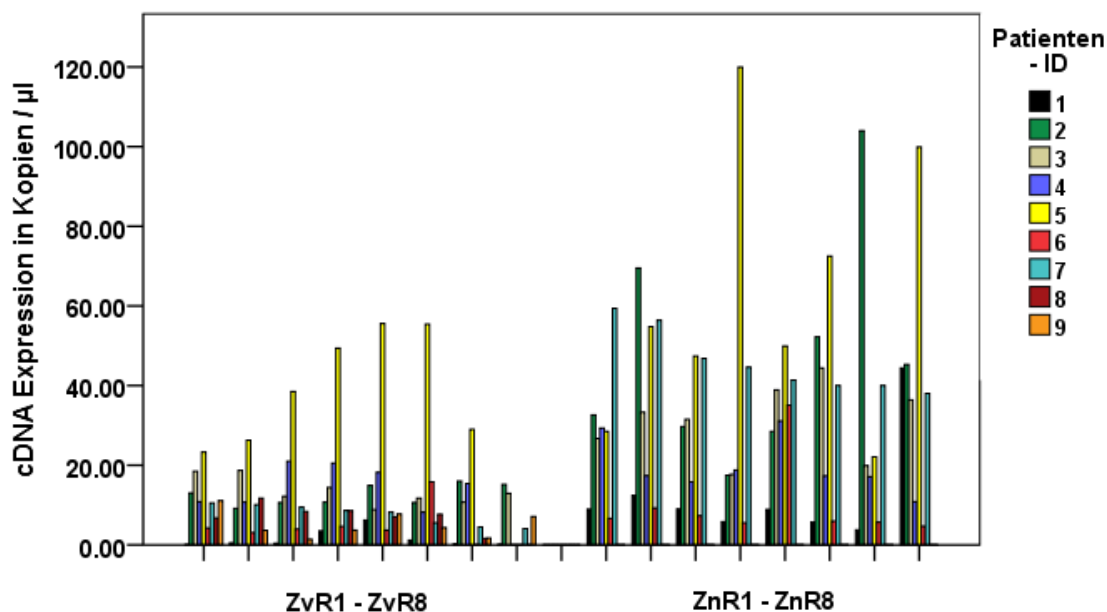
### **5.2.2 Ausgewählte Einzelzell-Profile**

Anhand der im Folgenden dargestellten Tabelle kann man erkennen, wie stark die Messwerte der Einzelzellen variieren. Bei einigen Genen, wie dem hier exemplarisch dargestellten NANOG, sind die Kopienzahlen der verschiedenen Tumorzellen nahezu gleich. Bei anderen Genen jedoch, wie am Beispiel von Bcl-2 gezeigt, streuen die Werte sehr stark (siehe Tab. 39).

Zelle	NANOG				Bcl-2			
	Vor Radiatio		Nach Radiatio		Vor Radiatio		Nach Radiatio	
	ct -Wert	Kopien	ct -Wert	Kopien	ct -Wert	Kopien	ct -Wert	Kopien
1	26,35	44,70	24,13	349,00	31,66	1,06	31,82	5,78
2	27,15	30,80	24,06	360,00	31,42	1,19	31,20	7,64
3	26,75	37,10	24,20	339,00	31,17	1,36	28,75	23,30
4	26,54	40,80	24,02	366,00	30,19	2,24	31,57	6,48
5	26,86	35,30	24,39	314,00	30,96	1,51	30,79	9,23
6	27,84	22,50	23,93	379,00	30,39	2,03	32,79	3,72
7	27,15	30,80	24,46	305,00	33,09	0,51	33,47	2,73
8			23,37	479,00	31,87	0,95	27,76	36,50
$\bar{x}$	26,95	34,57	24,07	361,38	31,34	1,36	31,02	11,92

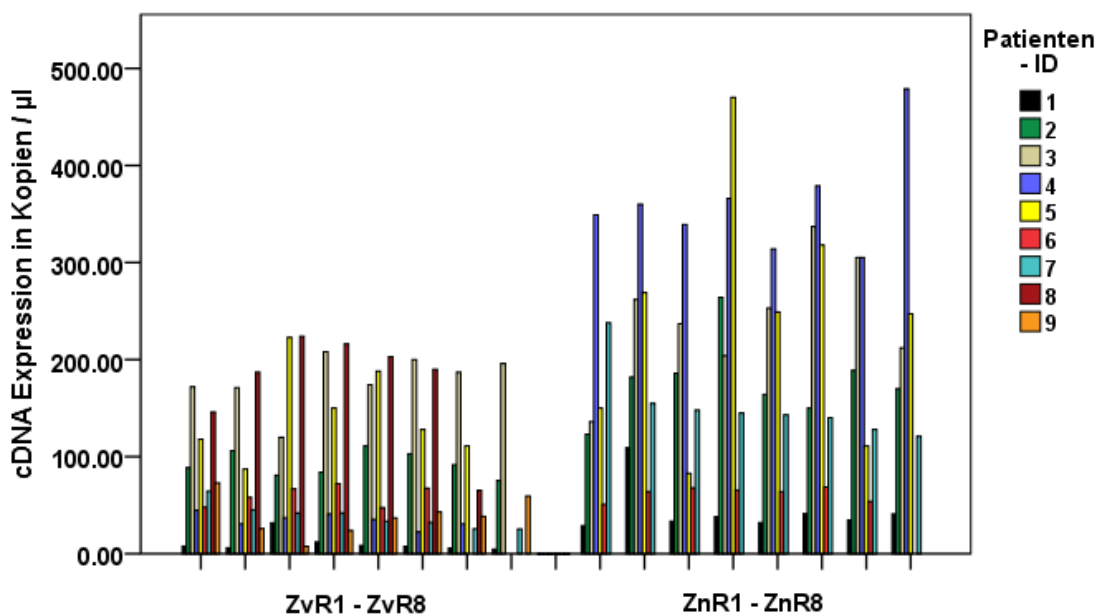
**Tab. 39** Darstellung der ct -Werte und Kopien von NANOG (Pat-ID 4) und Bcl-2 (Pat-ID 1). Bei NANOG (links) streuen die Werte weniger stark als bei Bcl 2 (rechts).

In den Abb. 21 und 22 wird am Beispiel von EpCAM und NANOG das unterschiedliche Expressionsniveau jeder einzelnen Zelle einer Patientin vor und nach RT veranschaulicht. Man erkennt in beiden Fällen, dass die Amplituden der Kopienzahlen nach der RT im Mittel höher sind (Steigerung der Genaktivität) als vor der RT. Die detektierten cDNA-Konzentrationen variierten dabei mitunter sehr stark von Patient zu Patient bzw. von Tumorzelle zu Tumorzelle.



**Abb. 21** Übersicht der EpCAM – Expressionsanalyse.

ZvR1 – ZvR8 markiert die Zellen vor, ZnR1 – ZnR8 die Zellen nach der Radiatio. Jeder Balken repräsentiert die Expression einer einzelnen Tumorzelle / Patient.



**Abb. 22** Übersicht der NANOG – Expressionsanalyse.

ZvR1 – ZvR8 markiert die Zellen vor, ZnR1 – ZnR8 die Zellen nach der Radiatio. Jeder Balken repräsentiert die Expression einer einzelnen Tumorzelle / Patient.

Für die Datenauswertung wurden zunächst aus den maximal 8 Einzelmesswerten die Mittelwerte berechnet (mit  $\bar{x}$  angegeben). Mit Hilfe dieser Mittelwerte konnte die Genaktivität der Tumorzellen vor der RT mit jener nach der Strahlenbehandlung verglichen werden. Dabei zeigten beinahe alle untersuchten Gene nach der RT eine höhere Expression im Vergleich zum Ausgangszustand. In der folgenden Tabelle sind wiederum die Quotienten der Mittelwerte aus den jeweiligen 8 Einzelzellen, vor und nach der RT dargestellt. Die grüne Markierung veranschaulicht eine moderate Aktivitätssteigerung (maximal das 5-fache des Ausgangswertes), die gelbe einen deutlichen Aktivitätsanstieg (zwischen dem 5- und dem 10-fachen des Ausgangswertes) und rot markiert einen Anstieg um das mehr als 10-fache des Wertes vor Beginn der RT. Blau sind jene Quotienten unterlegt, die eine Aktivitätssenkung kennzeichnen. Neben den Quotienten der cDNA-Kopien ist hier auch der Quotient aus den CETC vor und nach RT angegeben. Ausführliche Erläuterungen der quantitativen CETC-Messung bei den Patientinnen mit genetischer Untersuchung der Tumorzellen, erfolgt in Kapitel 5.2.3.

Betrachtet man sämtliche untersuchten Gene, so ist insgesamt von einer Expressionssteigerung auszugehen. Lediglich bei den Zellen einer einzigen Probandin kam es zu mehreren Aktivitätsverlusten.

Auch die Quantität der CETC hat sich im Rahmen der RT erhöht. Mehrheitlich kam es zu einem Anstieg der CETC-Zahl.

Pat. ID	CETC	GAPDH	EpCAM	NANOG	Bcl-2	TLR 4	COX-2
1	2,72	3,97	8,12	4,26	8,79	9,31	18,67
2	2,66	5,81	3,79	1,93	8,84	37,18	41,65
3	2,50	3,59	2,31	1,36	3,00	3,27	4,69
4	0,96	1,85	0,67	10,45	0,87	0,23	0,51
5	0,83	1,12	1,56	1,65	1,63	1,82	1,58
6	1,91	1,30	1,70	1,04	1,63	1,33	2,69
7	2,73	4,70	6,01	3,93	4,41	5,16	4,90
<b>Mittelwert:</b>	2,04	3,19	3,45	3,52	4,17	8,33	10,67

Pat. ID	PIK3CA	Her2/neu	Vimentin	c-Met-1	c-Met-2	Ki 67-1	Ki 67-2
1	5,74	10,46	6,59	8,03		3,96	
2	14,68	21,07	10,83	3,97		4,19	
3	6,47	4,65	1,27	2,25	2,36	1,14	1,66
4	0,25	0,16	0,50	0,84	1,47	2,82	0,56
5	1,17	0,98	2,26	1,95	3,22	1,24	1,30
6	1,78	2,05	1,99	4,90	1,98	1,05	3,00
7	2,40	15,16	1,57	7,47	2,15	4,28	9,03
<b>Mittelwert:</b>	4,64	7,79	3,57	4,20	1,60	2,67	2,22

Tab. 40 Zusammenfassung der aus den Kopienzahlen vor und nach Radiatio gebildeten Quotienten (Q).

Rot:  $Q \geq 10$ , Gelb:  $5 \leq Q < 10$ , Grün:  $1 \leq Q < 5$ , Blau:  $Q < 1$ .

Im nächsten Kapitel sind die Ergebnisse der einzelnen Genexpressionsanalysen exemplarisch für GAPDH und EpCAM aufgeführt. Bei einigen Genen wurden die Messwerte der Patientinnen mit ID 2 und 4 für die weiteren Berechnungen vernachlässigt, weil diese besonders stark variierten. Unter partiellem Ausschluss der genannten Probandinnen konnte eine symmetrische Verteilung der Mittelwerte erreicht werden (Shapiro Wilk – Test:  $p \leq 0,05$ ; Boxplot-Diagramm der Mittelwert-Differenz symmetrisch). Aufgrund dessen war es im Anschluss möglich den T-Test für verbundene Stichproben anzuwenden. Auf den folgenden Seiten sind für jedes untersuchte Gen sowohl die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) aller analysierten Zellen als auch die jeweiligen Standardabweichung ( $\sigma$ ) angegeben. Darüber hinaus wird jeweils die dem Gen entsprechende Gelelektrophorese aufgeführt. Zuletzt sind die vor und nach RT gemessenen Genaktivitäten in Form von Boxplot-Diagrammen dargestellt.



## 5.2.3 CETC-Verhalten der untersuchten Patientinnen

Patienten ID	vor Strahlentherapie		nach Strahlentherapie		Quotient
	CETC lebend	CETC gesamt	CETC lebend	CETC gesamt	
1	3170	4390	8640	17340	2,72
2	2200	20750	5860	16360	2,66
3	2440	11720	6100	12700	2,50
4	18070	33690	17340	21970	0,96
5	1460	2930	1220	2200	0,83
6	2690	3170	5150	28530	1,91
7	4200	13670	11480	15140	2,73
8	2930	3420	4150	11230	1,42
9	11720	23440	18120	34400	1,55

Tab. 41 Mittelwerte der quantitativen CETC Messungen.

$$\bar{x}_{\text{ges}} \text{ vor Radiatio: } \mathbf{5431 / ml} \qquad \bar{x}_{\text{ges}} \text{ nach Radiatio: } \mathbf{8673 / ml}$$

$$\sigma \text{ vor Radiatio: } \mathbf{5644 / ml} \qquad \sigma \text{ nach Radiatio: } \mathbf{5865 / ml}$$

Das Verhalten der CETC korrelierte sehr stark mit den Beobachtungen zur Genexpression (siehe Tab. 40). Bei insgesamt 7 der 9 Probandinnen kam es zu einem Anstieg der Zellzahl. Nur bei 2 Patientinnen wurden nach erfolgter RT weniger CETC gemessen. Dabei handelt es sich gerade um jene Patientinnen, deren CETC bei den genetischen Untersuchungen teilweise eine Geninaktivierung zeigten. An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass lediglich eine dieser Patientinnen eine Chemotherapie erhielt. Die statistische Auswertung mittels T-Test zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl von CETC nach der RT im Vergleich zu jener vor der RT ( $p = 0,009$ ). In Abb. 23 wurde der signifikante Unterschied der gemessenen CETC-Konzentration durch ein Boxplot-Diagramm graphisch veranschaulicht.

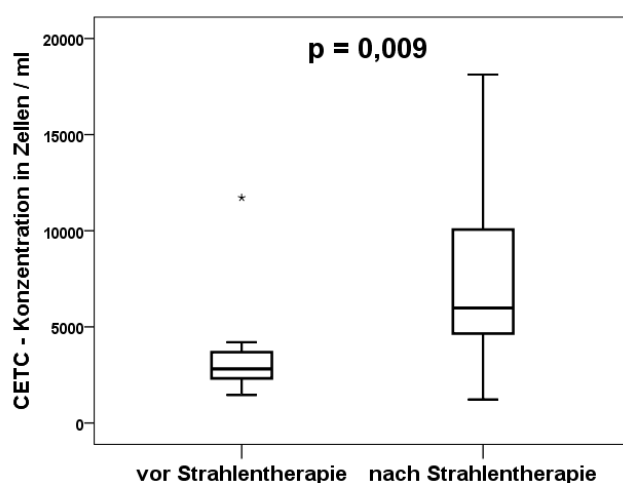


Abb. 23 Darstellung der CETC - Konzentration vor und nach der Strahlentherapie.

### 5.2.4 Expressionsverhalten von GAPDH (Housekeeping-Gen)

Patienten ID	vor Strahlentherapie		nach Strahlentherapie		Quotient
	ct -Wert	$\bar{x}$	ct -Wert	$\bar{x}$	
1	28,89	<b>16,52</b>	28,95	<b>65,51</b>	<b>3,97</b>
2	28,92	<b>33,98</b>	26,02	<b>197,44</b>	<b>5,81</b>
3	29,96	<b>16,55</b>	28,61	<b>59,38</b>	<b>3,59</b>
4	29,83	<b>11,14</b>	31,59	<b>20,57</b>	<b>1,85</b>
5	27,65	<b>59,36</b>	27,36	<b>66,78</b>	<b>1,12</b>
6	29,18	<b>13,33</b>	28,44	<b>17,37</b>	<b>1,30</b>
7	31,69	<b>14,25</b>	28,24	<b>66,95</b>	<b>4,70</b>
8	26,30	<b>11,35</b>			
9	34,82	<b>7,20</b>			

Tab. 42 Mittelwerte der GAPDH-Expression aus der qRT-PCR von Einzel-Zellen (in Kopien /  $\mu$ l cDNA).

$\bar{x}_{\text{ges}}$  vor Radiatio: **21,86 /  $\mu$ l**       $\bar{x}_{\text{ges}}$  nach Radiatio: **49,43 /  $\mu$ l**

$\sigma$  vor Radiatio: **18,49 /  $\mu$ l**       $\sigma$  nach Radiatio: **23,78 /  $\mu$ l**

In der statistischen Auswertung mittels T-Test zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von GAPDH nach der RT im Vergleich zur Expression vor der RT ( $p = 0,032$ ). 6 von 7 der mittels Gelelektrophorese untersuchten Zellen gelang es, das erzeugte Genprodukt nachzuweisen (Produktlänge: 104 bp). In der Darstellung der cDNA-Expression mit Hilfe eines Boxplot-Diagramms kann der signifikante Genaktivitätsunterschied aufgezeigt werden (siehe Abb. 24).

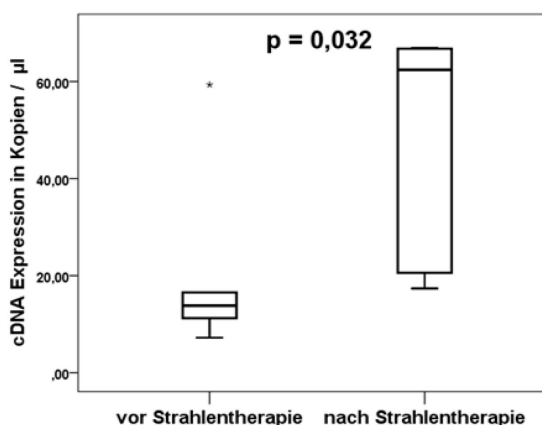
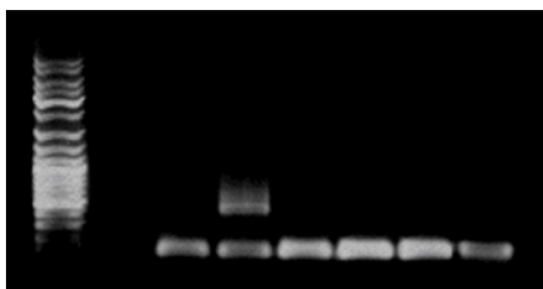


Abb. 24 GAPDH, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).

Links: Ergebnis der Gelelektrophorese, jede Spalte entspricht einer Zelle (Pat. ID: 7, vor Radiatio). Bei 6 von 7 untersuchten Zellen gelang die Darstellung des Genproduktes (Produktlänge: 104 bp). Bei einer Zelle trat eine zusätzliche Bande auf, die einem Pseudogen entsprechen könnte. Rechts: Darstellung der gemessenen GAPDH-spezifischen cDNA vor und nach der Strahlentherapie in Form eines Boxplot-Diagramms.

## 5.2.5 Expressionsverhalten von EpCAM

Patienten ID	vor Strahlentherapie		nach Strahlentherapie		Quotient
	ct -Wert	$\bar{x}$	ct -Wert	$\bar{x}$	
1	33,05	1,52	30,81	12,35	8,12
2	30,03	12,52	27,94	47,41	3,79
3	30,35	13,49	29,34	31,10	2,31
4	28,29	29,25	31,27	19,70	0,67
5	28,48	39,64	27,64	61,89	1,56
6	30,59	5,91	29,78	10,02	1,70
7	32,92	7,62	28,16	45,83	6,01
8	31,80	7,38			
9	36,13	5,09			

Tab. 43 Mittelwerte der EpCAM-Expression aus der qRT-PCR von Einzel-Zellen (in Kopien /  $\mu$ l cDNA).

$\bar{x}_{\text{ges}}$  vor Radiatio: **15,71 /  $\mu$ l**       $\bar{x}_{\text{ges}}$  nach Radiatio: **32,71 /  $\mu$ l**

$\sigma$  vor Radiatio: **13,74 /  $\mu$ l**       $\sigma$  nach Radiatio: **19,75 /  $\mu$ l**

Die statistische Auswertung mittels T-Test zeigte auch hier wiederum eine signifikant erhöhte Expression von EpCAM nach der RT im Vergleich zur Expression vor der RT ( $p = 0,038$ ). Bei allen mittels Gelelektrophorese untersuchten Zellen gelang es das erzeugte Genprodukt nachzuweisen (Produktlänge: 219 bp). In der Darstellung der cDNA-Expression, ausgedrückt durch ein Boxplot-Diagramm, wird der signifikante Genaktivitätsunterschied graphisch veranschaulicht (Abb. 25).

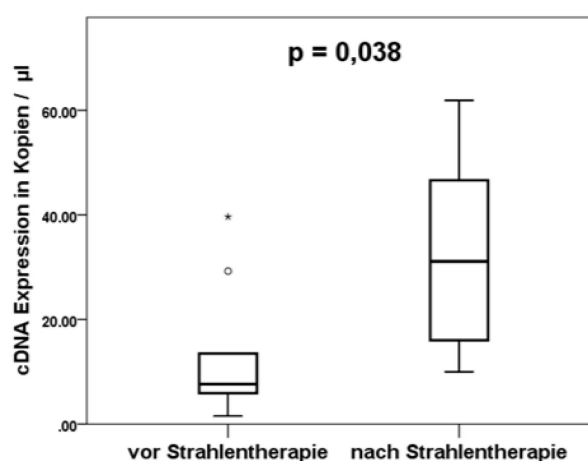
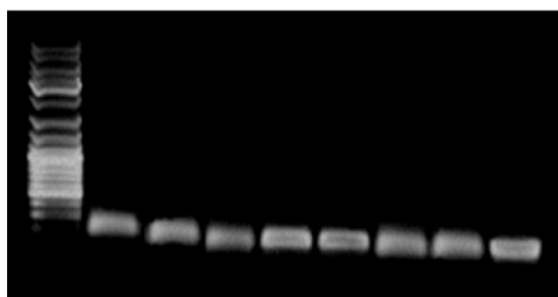


Abb. 25 EpCAM, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).

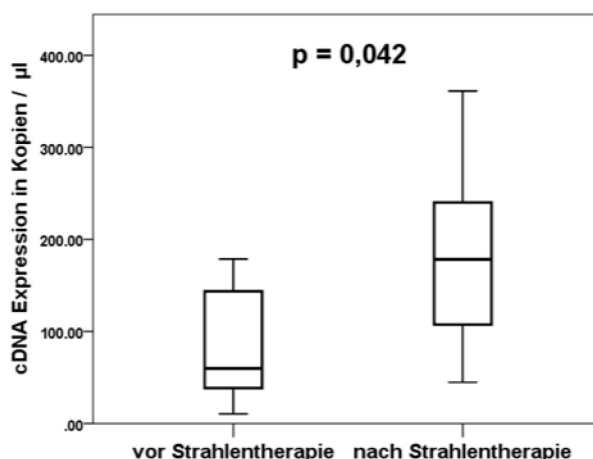
Links: Ergebnis der Gelelektrophorese, jede Spalte entspricht einer Zelle (Pat. ID: 7, vor Radiatio). Das Genprodukt (Produktlänge: 219 bp) konnte bei allen untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Rechts: Darstellung EpCAM-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie in Form eines Boxplot-Diagramms.

### 5.2.6 Expressionsverhalten von NANOG

Die gebildeten Mittelwerte, bezogen auf alle Patientinnen, unterschieden sich vor und nach der RT deutlich. Die statistische Auswertung mittels T-Test ergab eine signifikant erhöhte, genetische Expression von NANOG nach der RT im Vergleich zum Ausgangszustand ( $p = 0,042$ ).

$$\begin{array}{ll} \bar{x}_{\text{ges}} \text{ vor Radiatio:} & \mathbf{79,79 / \mu l} & \bar{x}_{\text{ges}} \text{ nach Radiatio:} & \mathbf{182,82 / \mu l} \\ \sigma \text{ vor Radiatio:} & \mathbf{61,78 / \mu l} & \sigma \text{ nach Radiatio:} & \mathbf{110,29 / \mu l} \end{array}$$

Es gelang bei 5 von 8 der mittels Gelelektrophorese untersuchten Zellen das Genprodukt (Produktlänge: 674 bp) nachzuweisen. Das signifikante erhöhte Genaktivitätsniveau ist in Abb. 26 graphisch veranschaulicht.



**Abb. 26 NANOG, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).**

Links: Ergebnis der Gelelektrophorese, jede Spalte entspricht einer Zelle (Pat. ID: 7, vor Radiatio). Bei 5 von 8 untersuchten Zellen gelang die Darstellung des Genproduktes (Produktlänge: 674 bp). Rechts: Darstellung NANOG-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie in Form eines Boxplot-Diagramms.

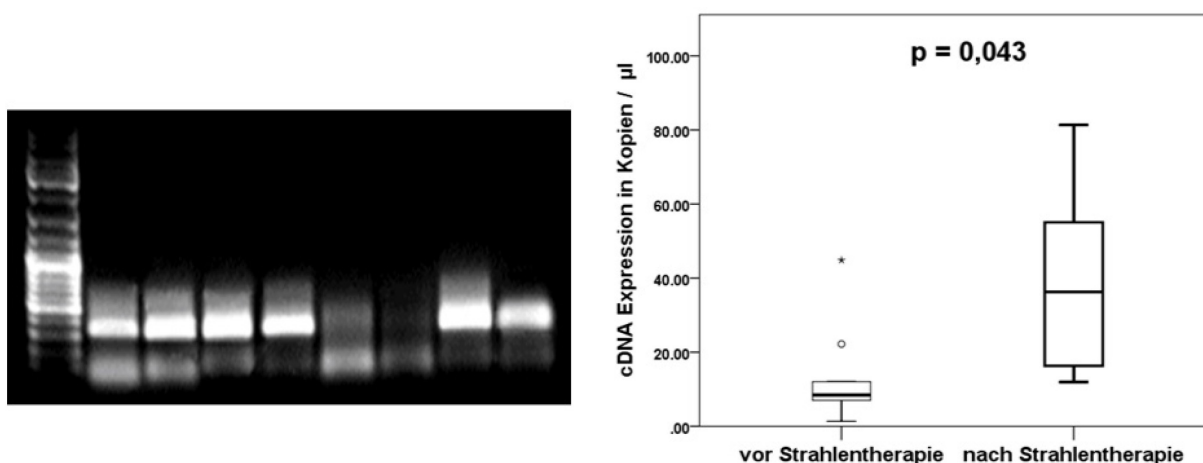
### 5.2.7 Expressionsverhalten von Bcl-2

Die statistischen Mittelwerte, welche über alle Probandinnen gebildet wurden, unterschieden sich vor und nach der RT deutlich. Nach Anwendung des T-Tests zeigte sich eine signifikant erhöhte genetische Expression von Bcl-2 nach der RT im Vergleich zum Zustand vor der RT ( $p = 0,043$ ).

$\bar{x}_{\text{ges}}$ vor Radiatio:	<b>15,18 / <math>\mu\text{l}</math></b>	$\bar{x}_{\text{ges}}$ nach Radiatio:	<b>38,89 / <math>\mu\text{l}</math></b>
$\sigma$ vor Radiatio:	<b>14,49 / <math>\mu\text{l}</math></b>	$\sigma$ nach Radiatio:	<b>28,09 / <math>\mu\text{l}</math></b>

Die Erzeugung des Genprodukts mit der Produktlänge 519 bp gelang bei 6 von 8 der mittels Gelelektrophorese untersuchten Tumorzellen. Die einzelnen Banden waren bei diesem Gel etwas schlechter zu diskriminieren. Vielmehr entstanden homogene Anreicherungen des markierten Genproduktes im Bereich der Laufschalen. Darüber hinaus fanden sich bei 4 Zellen zusätzliche Banden, die einem Pseudogen entsprechen könnten. Die signalintensivsten Bereiche lassen sich aufgrund ihrer Anordnung bei etwa 500 bp dennoch dem zu erwartenden Genprodukt zuordnen.

In der Darstellung der cDNA-Expression durch ein Boxplot-Diagramm wird das signifikant erhöhte Genaktivitätsniveau graphisch verdeutlicht (siehe Abb. 27).



**Abb. 27 Bcl-2, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).**

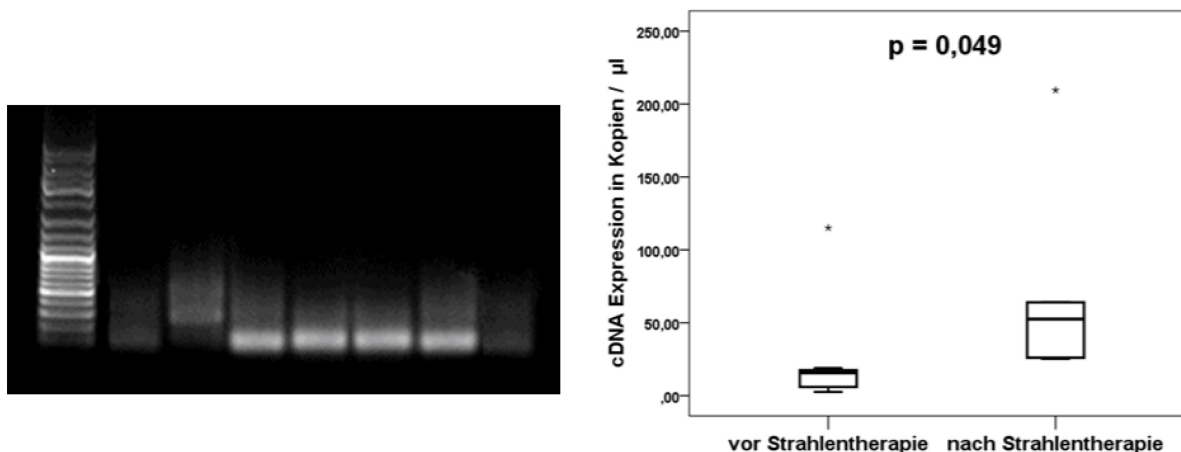
Links: Ergebnis der Gelelektrophorese, jede Spalte entspricht einer Zelle (Pat. ID: 5, vor Radiatio). Bei 6 von 8 untersuchten Zellen gelang die Darstellung des Genproduktes auf Höhe der zu erwartenden Bande (Produktlänge: 519 bp). Rechts: Darstellung Bcl-2-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie in Form eines Boxplot-Diagramms.

### 5.2.8 Expressionsverhalten von TLR 4

Die Mittelwertanalyse ergab auch beim TLR4-Gen deutliche Unterschiede in Bezug auf den Bestrahlungszeitpunkt. Der T-Test für verbundene Stichproben zeigte eine signifikant erhöhte, genetische Expression des Gens nach der Behandlung im Vergleich zum Zustand vor der RT ( $p = 0,049$ ). Die gemittelten Messwerte der Patientinnen mit der ID 2 und 4 wurden bei der Auswertung aus o.g. Gründen nicht berücksichtigt.

$\bar{x}_{\text{ges}}$ vor Radiatio:	<b>32,36 / <math>\mu\text{l}</math></b>	$\bar{x}_{\text{ges}}$ nach Radiatio:	<b>75,40 / <math>\mu\text{l}</math></b>
$\sigma$ vor Radiatio:	<b>46,60 / <math>\mu\text{l}</math></b>	$\sigma$ nach Radiatio:	<b>76,83 / <math>\mu\text{l}</math></b>

Bei allen, der durch Gelelektrophorese untersuchten Zellen, konnte das erzeugte Genprodukt nachgewiesen werden (Produktlänge: 179 bp). In Abb. 28 wurde das signifikant erhöhte Genaktivitätsniveau graphisch dargestellt.



**Abb. 28 TLR 4, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).**

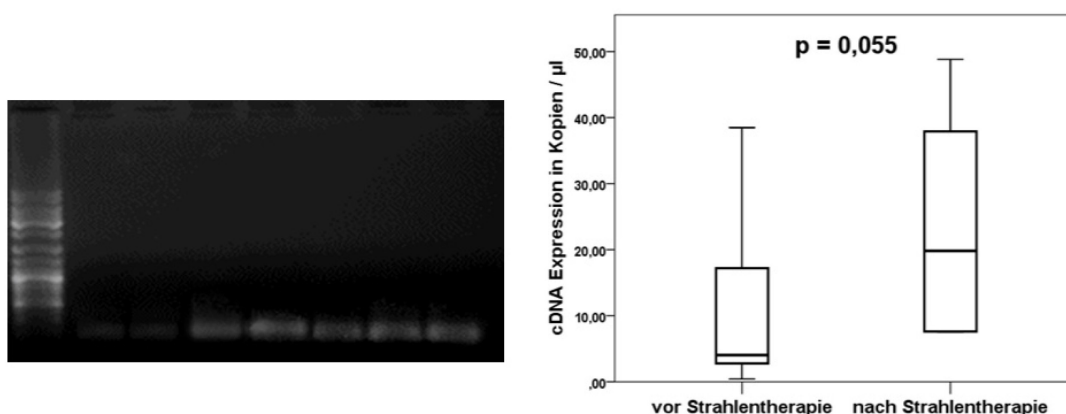
Links: Ergebnis der Gelelektrophorese, jede Bande entspricht einer Zelle (Pat. ID: 7, vor Radiatio). Bei allen untersuchten Zellen konnte das Genprodukt (Produktlänge: 179 bp) nachgewiesen werden. Bei 4 der 7 untersuchten Zellen ist ein deutlich abgrenzbares Signal im Bereich der zu erwartenden Lauflänge festzustellen, bei den 3 anderen Zellen sind die Banden weniger scharf begrenzt. Rechts: Darstellung TLR 4-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie in Form eines Boxplot-Diagramms.

### 5.2.9 Expressionsverhalten von COX-2

Die für alle Patientinnen gebildeten statistischen Mittelwerte unterschieden sich vor und nach der RT deutlich. Der T-Test erbrachte eine nicht signifikant erhöhte Expression von COX-2 in Bezug auf den Vergleich des Strahlenbehandlungszeitpunktes ( $p = 0,055$ ). Der Unterschied der beiden Gruppen hinsichtlich der Genexpression ist allerdings als Trend zu werten.

$\bar{x}_{\text{ges}}$ vor Radiatio:	<b>27,99 / <math>\mu\text{l}</math></b>	$\bar{x}_{\text{ges}}$ nach Radiatio:	<b>100,95 / <math>\mu\text{l}</math></b>
$\sigma$ vor Radiatio:	<b>43,03 / <math>\mu\text{l}</math></b>	$\sigma$ nach Radiatio:	<b>92,96 / <math>\mu\text{l}</math></b>

Bei 7 von 8 der mittels Gelelektrophorese untersuchten Zellen gelang der Nachweis des erzeugten Genprodukts (Produktlänge: 274 bp). Die einzelnen Banden erschienen im Vergleich zu den Gelelektrophoresen der anderen Gene zwar weniger leuchtintensiv, dennoch konnten die diskreten Signale dem entsprechenden Genprodukt zugeordnet werden, da sie jeweils bei der zu erwartenden Lauflänge des Genproduktes, erkennbar waren. Das signifikant erhöhte Genaktivitätsniveau wurde in nachfolgender Abbildung 29 graphisch verdeutlicht.



**Abb. 29 COX-2, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).**

Links: Ergebnis der Gelelektrophorese, jede Spalte entspricht einer Zelle (Pat. ID: 3, vor Radiatio). Bei 7 der 8 untersuchten Zellen konnte das Genprodukt (Produktlänge: 274 bp) nachgewiesen werden. Rechts: Darstellung COX-2-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie in Form eines Boxplot-Diagramms.

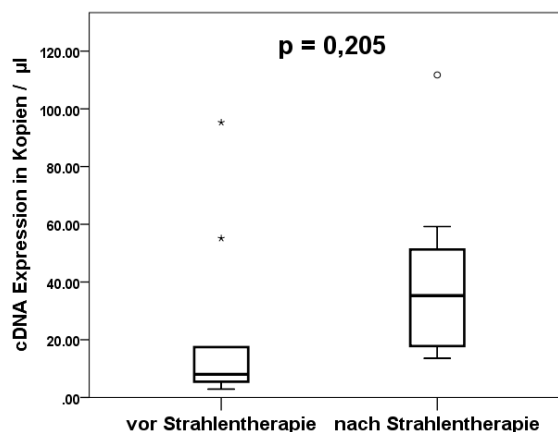
### 5.2.10 Expressionsverhalten von PIK3CA

Ähnliches, wie bei der Expression von COX-2 im vorausgegangenen Abschnitt, lässt sich zur Expression von PIK3CA sagen. Die Mittelwertbestimmung über alle Patientinnen zeigte vor und nach der RT deutliche Unterschiede. Statistisch konnte keine Signifikanz für eine erhöhte genetische Expression von PIK3CA nach der RT nachgewiesen werden ( $p = 0,205$ ). Ein tendenzieller Zusammenhang im Sinne einer erhöhten Genexpression war jedoch erkennbar.

$$\bar{x}_{\text{ges}} \text{ vor Radiatio: } \mathbf{26,34 / \mu\text{l}} \qquad \bar{x}_{\text{ges}} \text{ nach Radiatio: } \mathbf{42,68 / \mu\text{l}}$$

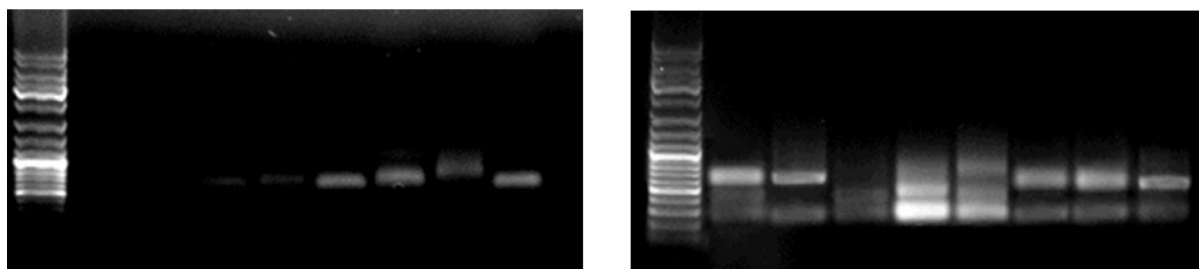
$$\sigma \text{ vor Radiatio: } \mathbf{35,38 / \mu\text{l}} \qquad \sigma \text{ nach Radiatio: } \mathbf{34,65 / \mu\text{l}}$$

Anhand eines Boxplot-Diagramms wurde das erhöhte Genaktivitätsniveau nach der RT graphisch verdeutlicht (siehe Abb. 30).



**Abb. 30** Darstellung PIK3CA-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie.

In Abb. 31 sind die Ergebnisse der Gelelektrophorese sowohl vor der RT als auch nach der RT dargestellt. Man erkennt an der erhöhten Signalintensität, dass nach erfolgter RT mittels Elektrophorese deutlich mehr Genprodukt nachgewiesen werden konnte. Insgesamt gelang die Detektion des Genproduktes (Produktlänge: 925 bp) vor der RT bei 5 von 7 und nach der RT bei 6 von 8 untersuchten Zellen. Bei den „bestrahlten CETC“ traten zusätzliche Banden im Produktlängenbereich von etwa 300 bp auf. Verantwortlich sein könnten hierfür Verunreinigungen des Gels oder der Nachweis eines Pseudogens. Die in der Abbildung 31 sichtbare, „obere Bande“ kann dennoch eindeutig dem zu erwartenden Genprodukt zugeordnet werden.



**Abb. 31** PIK3CA, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).

Ergebnis der Gelelektrophoresen, jede Spalte entspricht einer Zelle (beide Gele von Pat. ID: 3). Links (vor Radiatio): 5 Banden sind erkennbar und dem Genprodukt zuzuordnen. Rechts (nach Radiatio): deutliche Signalanhebung im Vgl. vor der Radiatio. Bei 6 Zellen befindet sich im Bereich des zu erwartenden Genproduktes (Produktlänge: 925 bp) eine klar abgrenzbare Bande. Zusätzlich treten bei allen Zellen weitere Banden im Bereich einer Produktlänge von etwa 300 bp auf.



### 5.2.11 Expressionsverhalten von Her2/neu

Die statistischen Mittelwerte über alle Patientinnen unterschieden sich vor und nach der RT um das ca. 3-fache. Der T-Test selbst konnte jedoch keine Signifikanz für eine erhöhte genetische Expression von Her2/neu, unter Berücksichtigung des Vergleichs, zum Zustand vor der RT nachweisen ( $p = 0,272$ ). Von einer eindeutigen Tendenz im Sinne einer erhöhten Genexpression nach der RT kann dennoch ausgegangen werden.

$$\bar{x}_{\text{ges}} \text{ vor Radiatio: } \mathbf{5,41 / \mu\text{l}} \qquad \bar{x}_{\text{ges}} \text{ nach Radiatio: } \mathbf{14,39 / \mu\text{l}}$$

$$\sigma \text{ vor Radiatio: } \mathbf{9,15 / \mu\text{l}} \qquad \sigma \text{ nach Radiatio: } \mathbf{14,94 / \mu\text{l}}$$

Im untenstehenden Boxplot-Diagramm ist das erhöhte Genaktivitätsniveau graphisch dargestellt worden (siehe Abb. 32).

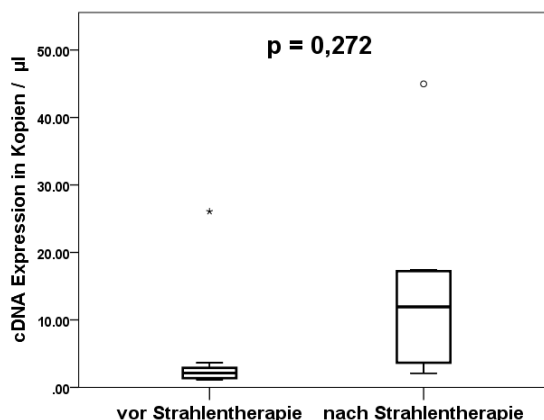


Abb. 32 Darstellung Her2/neu-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie.

### 5.2.12 Expressionsverhalten von Vimentin

Die Auswertung der Mittelwerte zeigte einen deutlichen Unterschied (vor/nach RT). Mit Hilfe des T-Tests konnte zwar keine Signifikanz für die erhöhte genetische Expression von Vimentin nach der Behandlung im Vergleich zum Zustand vor der RT nachgewiesen werden ( $p = 0,145$ ). Jedoch kann von einer eindeutigen Tendenz im Sinne einer erhöhten Genexpression von Vimentin nach der RT gesprochen werden.

$$\bar{x}_{\text{ges}} \text{ vor Radiatio: } \mathbf{4,43 / \mu\text{l}} \qquad \bar{x}_{\text{ges}} \text{ nach Radiatio: } \mathbf{11,98 / \mu\text{l}}$$

$$\sigma \text{ vor Radiatio: } \mathbf{2,98 / \mu\text{l}} \qquad \sigma \text{ nach Radiatio: } \mathbf{10,63 / \mu\text{l}}$$

In der Darstellung der cDNA-Expression durch ein Boxplot-Diagramm wird das tendenziell erhöhte Genaktivitätsniveau graphisch verdeutlicht (siehe Abb. 33).

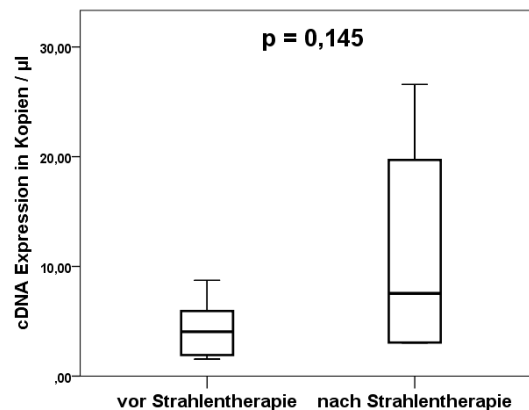
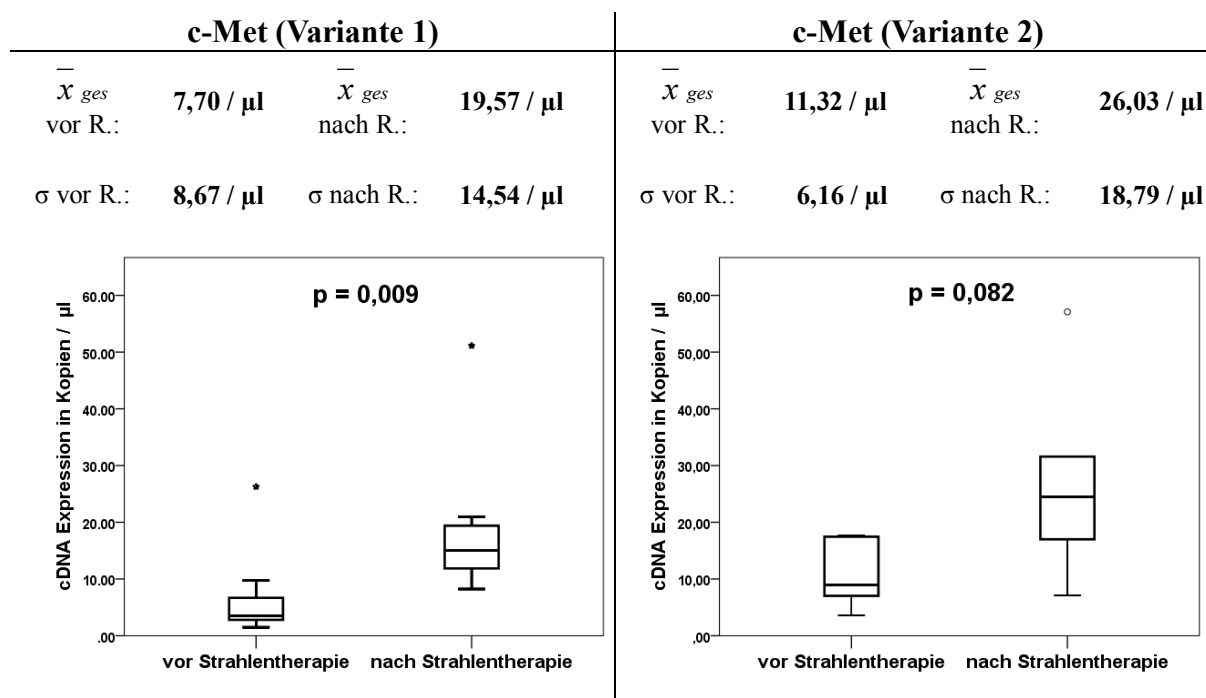


Abb. 33 Darstellung Vimentin-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie.

### 5.2.13 Expressionsverhalten von c-Met

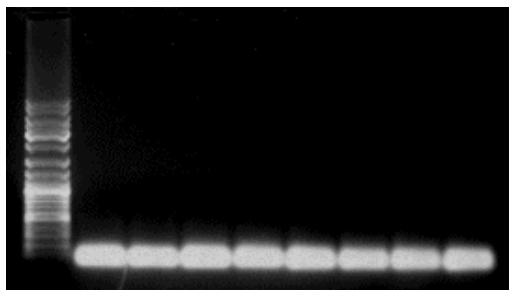
Bei dieser Genexpressionsanalyse kamen zwei unterschiedliche Primer-Varianten zum Einsatz. In der nachfolgenden Abbildung 34 sind die beiden Primer gegenübergestellt. Die Mittelwerte vor und nach der RT unterschieden sich deutlich bei beiden Primern. Durch die statistische Auswertung mittels T-Test konnte zwar nur bei einem Primer eine signifikant erhöhte genetische Expression von c-Met ( $p = 0,009$ ) nachgewiesen werden (nach RT). Allerdings kann auch bei der nicht signifikanten Primervariante von einem stark korrelativen Zusammenhang ausgegangen werden ( $p = 0,082$ ).

Bei allen mittels Gelelektrophorese untersuchten Tumorzellen (Pat.-ID: 7, vor Radiatio) gelang es das erzeugte Genprodukt (Produktlänge: 114 bp) nachzuweisen. Dabei wurde die Messung von keinerlei Verunreinigungen beeinträchtigt. Es traten auch keine zusätzlichen Banden auf. Die Gelelektrophorese bestätigte nahezu idealerweise das in der qRT-PCR erzeugte und detektierte Genprodukt.



**Abb. 34** Darstellung c-Met-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie.

In beiden Varianten des MET-Gens konnte ein deutlicher Expressionsunterschied gemessen werden. Damit liegt nach der Radiatio ein deutlich erhöhter Aktivitätszustand des Genes vor.

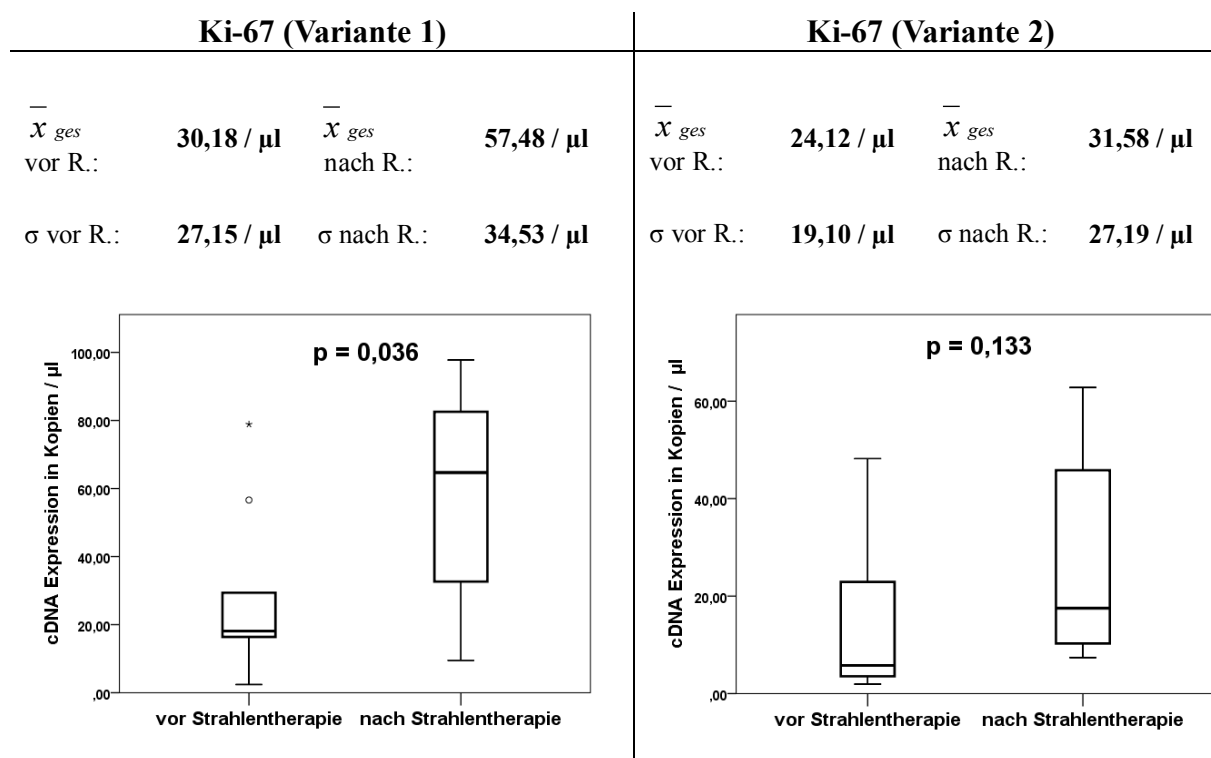


**Abb. 35** Ergebnis der c-Met-Gelelektrophorese.

Jede Bande entspricht einer Zelle (Pat. ID: 7, vor Radiatio). Bei allen untersuchten Zellen gelang die Darstellung des Genproduktes auf Höhe der zu erwartenden Bande (Produktlänge: 114 bp).

### 5.2.14 Expressionsverhalten von Ki-67

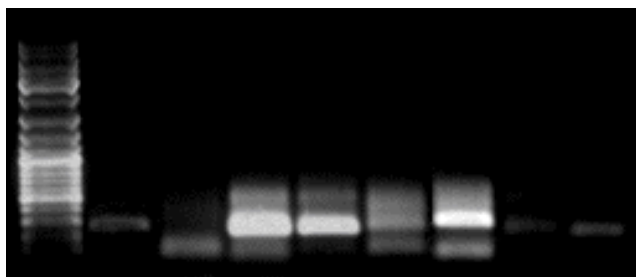
Ebenso wie bei den Untersuchungen des c-Met-Gens im vorausgegangenen Abschnitt, kamen auch hier zwei unterschiedliche Primer-Varianten zum Einsatz. In der nachfolgenden Abbildung sind die beiden Primer gegenübergestellt. Die errechneten Mittelwerte der cDNA-Kopien vor und nach der RT unterschieden sich wiederum deutlich bei beiden Primern. Bei einem der beiden Primer (Variante 1) konnte eine signifikant erhöhte, genetische Expression festgestellt werden ( $p = 0,036$ ). Bei Variante 2 lag keine Signifikanz vor; es kann jedoch von einer starken Korrelation ausgegangen werden ( $p = 0,133$ ).



**Abb. 36** Darstellung Ki-67-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie.

In beiden Varianten des Ki-67-Gens konnte ein deutlicher Expressionsunterschied gemessen werden. Damit liegt nach der Radiatio ein deutlich erhöhter Aktivitätszustand des Genes vor.

Bei allen Tumorzellen, welche mittels Gelelektrophorese untersucht wurden, gelang es das erzeugte Genprodukt nachzuweisen (Produktlänge: 466 bp). Die Laufspuren einiger Zellen wurden etwas verschwommen abgebildet. Bei 2 Zellen ließ sich sogar eine zusätzliche Bande abgrenzen. Diese diskreten Messfehler sind am ehesten mit Verunreinigungen des cDNA-Materials bzw. mit dem Nachweis von Pseudogenen erklärbar. Die nachzuweisenden Banden der Ki-67-cDNA sind anhand ihrer Position und Signalintensität trotzdem sehr gut zu erkennen.



**Abb. 37** Ergebnis der Ki-67-Gelelektrophorese.

Jede Bande entspricht einer Zelle (Pat. ID: 7, vor Radiatio). Bei allen untersuchten Zellen gelang die Darstellung des Genproduktes auf Höhe der zu erwartenden Bande (Produktlänge: 466 bp).

## 6 DISKUSSION

Obwohl nur etwa 6 % aller Brustkrebspatientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Metastasen aufweisen, können 20-50 % der diagnostizierten, primären Mammakarzinome im Krankheitsverlauf Metastasen entwickeln (Lu 2009). Wie auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte, führen ca. 10 % der Primärtumore zum Tod der Patienten, 90 % werden durch Metastasen und deren Folgen verursacht. Daher ist es von zentraler Bedeutung so früh wie möglich Metastasierungsvorgänge zu erkennen und gezielt zu behandeln.

Meist bleibt jedoch, nach Weinberg (2007), die bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung stattfindende Ausbreitung von Tumorzellen unerkannt (Braun 2000, Diel 1998). Neuere Technologien ermöglichen es, bereits Vorläuferzellen von okkulten Metastasen, wie z.B. die in dieser Arbeit untersuchten disseminierten bzw. zirkulierenden Tumorzellen, im Knochenmark und/oder Blut nachzuweisen. Während die Existenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark vielfach als prognostisch relevanter Faktor bei sowohl metastasierten als auch nicht metastasierten Brustkrebspatientinnen bestätigt wurde (Wiedswang 2004, Braun 2005, Müller 2006), ist dies für die Detektion der CETC im Blut noch nicht hinreichend geklärt. Dabei gelten gerade die CETC als potenzieller Aktivitätsindikator von Fernmetastasen, wohingegen die disseminierenden Tumorzellen im Knochenmark als inaktiv und bisher mit prognostisch geringerem Interesse betrachtet wurden (Kasmir-Bauer 2009). In der Fachliteratur existiert bereits eine Vielzahl an Forschungsarbeiten, die sich mit der Thematik zirkulierender Tumorzellen und deren Relevanz als Prognosefaktor bzw. Verlaufsparemeter auseinandersetzen. In den letzten Jahren stieg jedoch das wissenschaftliche Interesse solche Zellen noch exakter zu charakterisieren und in den Fokus der onkologischen Forschung zu stellen (Tewes 2009, Fehm 2009).

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem quantitativen und qualitativen Verhalten von CETC im peripher-venösen Blut von Patientinnen mit primär nicht metastasiertem MK. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin Aussagen über den peritherapeutischen CETC-Verlauf im Hinblick auf abzuleitende Prognose-, Rezidiv- und Metastasierungswahrscheinlichkeiten zu treffen. Um andererseits molekularbiologische Ursachen für die Entstehung von Fernmetastasen identifizieren zu können, wurde die Aktivität ausgewählter Gene im Rahmen der RT untersucht. Anhand dieser Ergebnisse wurden mögliche therapeutische Konsequenzen im Therapiemanagement des Mammakarzinoms diskutiert.

## 6.1 Bedeutung zirkulierender Tumorzellen

Aus Tiermodellexperimenten ist bekannt, dass bereits kleine Tumore Millionen von Zellen in den Blutkreislauf abgeben können (Engers 1998). Butler und Gullino konnten zeigen, dass 3,2 Millionen Zellen pro Gramm Tumorgewebe in einem Zeitraum von 24 h in die Blutzirkulation eingeschwemmt werden (Buttler 1975). Diese Zellen können sich im Kapillarbett arretieren und zum Teil mehrere Jahre überleben (Chambers 2000). Andere Experimente belegen wiederum, dass nur etwa 0.01 % der als zirkulierende Tumorzellen kategorisierten Zellen zu Metastasen führen (Glaves 1998). Werden also Tumorzellen im peripher venösen Blut nachgewiesen, bedeutet dies keinesfalls, dass bereits eine Fernmetastasierung stattgefunden haben muss. Diese Tatsache wird auch durch die Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigt. So konnte beispielsweise kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der quantitativen Menge an CETC und dem Auftreten von Fernmetastasen hergestellt werden. Andererseits stellt sich gleichzeitig die Frage, ob Patientinnen, bei denen keine CETC nachgewiesen werden, auch tatsächlich tumorfrei sind und bleiben. Je nach angewandter Methode können bei Patientinnen mit manifesten Fernmetastasen nicht zwangsläufig CETC nachgewiesen werden (Foss 1965).

Der Einbruch lebensfähiger Tumorzellen in den Blutkreislauf kennzeichnet einen kritischen Einschnitt in der metastatischen Kaskade, mit der Konsequenz, dass es zur Ausbreitung des Primärtumors kommen kann (Nakamori 1997). Das einfache Vorliegen von CETC kann daher als eine notwendige Voraussetzung, nicht aber als hinreichende Bedingung für das Zustandekommen einer späteren Metastasierung des Tumors gewertet werden. Die CETC werden somit als ein erster Indikator einer minimal residualen Tumorerkrankung betrachtet (nach kurativ-operativer Beseitigung des Primärtumors). Dennoch konnte bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass die Größe des Primärtumors mit der absoluten Anzahl der CETC korreliert (Pachmann 2005, Fehm 2008).

Von größerer Bedeutung als die alleinige Detektion von CETC oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes scheint jedoch deren Entwicklung im klinischen Verlauf zu sein. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Korrelation zwischen der absoluten Konzentration an Tumorzellen und der klinischen Prognose festgestellt werden. Patienten mit konstant hoher CETC-Anzahl im Blut hatten im Vergleich zu Patientinnen mit niedriger oder sinkender Zellzahl ein vergleichbares Lokalrezidiv- bzw. Metastasierungsrisiko. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang war dagegen zwischen einem Anstieg der CETC-Zahl und dem Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen nachweisbar. Diese Patientengruppe

zeichnete sich außerdem durch eine signifikant kürzere Ereignis-freie Überlebenszeit aus. Cristofanilli gelang es einen direkten Zusammenhang zwischen der peritherapeutisch angestiegenen CETC-Anzahl und einer verkürzten Rezidiv-freien Überlebenszeit bei Patientinnen mit metastasiertem MK nachzuweisen (Cristofanilli 2004, 2007, 2013). Durch eine Studie der Jenaer Frauenklinik an 91 Probandinnen konnte dies auch für primär nicht metastasierte Brustkrebspatientinnen bestätigt werden. Es zeigte sich, dass das Risiko, innerhalb von 40 Monaten ein Lokalrezidiv zu entwickeln bei Patientinnen mit einem Anstieg der CETC um das 12-fache erhöht war (Pachmann 2008). Darüber hinaus veranschaulichte eine ähnliche Forschungsarbeit an Brustkrebspatientinnen, dass auch mehrere Jahre nach Vollremission noch CETC im Blut zu finden sind (Pachmann 2005).

Letztlich ist die prognostische Relevanz der im peripheren Blut zirkulierenden, malignen Zellen noch nicht anerkannt (Fehm 2008). Obwohl in den letzten Jahren immer wieder von verschiedenen Forschungsgruppen die Bedeutung der CETC für prognostische Zwecke und die Therapieüberwachung herausgestellt wurde, herrscht diesbezüglich kein Konsens (Braun 2000, Xenidis 2006, Pachmann 2005 & 2008, Wallwiener 2013).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Blut noch immer kein wissenschaftlich ausreichend fundierter Parameter, um daraus Therapieempfehlungen außerhalb von Studien ableiten zu können. Es fehlen außerdem Daten dahingehend, ob eine therapeutische Beeinflussung dieser minimal residualen Erkrankung tatsächlich die Prognose der Patienten verbessert. Hierzu bedarf es dringend weiterer, kontrollierter, klinischer Studien. Dies gilt auch für die Standardisierung der Nachweismethoden um das Evidenzniveau des Nachweises von CETC als Surrogatmarker besser etablieren zu können (Dawood 2008, Riethdorf 2008, Allan 2010, Maheswaran 2010, Banys 2013).

## **6.2 Bedeutung der Zellzahl-Erhöhung von CETC**

Bislang wurde die Wirksamkeit einer adjuvanten Therapie vor allem aufgrund der Tumorprogredienz, des Rezidiv-freien Überlebens und des Gesamtüberlebens beurteilt. Die CETC stellen einen neuen Kontrollparameter dar, der sogar Einfluss auf die Therapieentscheidungen haben kann, vorausgesetzt, es kann bewiesen werden, dass ihre Detektion bzw. ihr Verhalten das Ansprechen der jeweiligen Therapie widerspiegelt (Pantel 2003, Ring 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte u.a. gezeigt werden, dass ein Anstieg der CETC unter RT mit einer schlechteren Prognose und dem vermehrten Auftreten von Rezidiven und Fernmetastasen assoziiert ist. Die Frage, inwiefern eine solche quantitative Zunahme der Tumorzellen nicht allein in Zusammenhang mit einer erhöhten Krankheitsaktivität, sondern auch mit einer größeren Tumormasse im fortgeschrittenen Krankheitsstadium steht, ist nicht eindeutig zu beantworten. Die verstärkte CETC-Freisetzung aus dem Primärtumor könnte eine mögliche Ursache für diese Beobachtung sein (Klein 2009). Zellzahlanstiege nach bereits gesunkenen CETC könnten darauf hindeuten, dass Tumorzellen zwar vollständig aus dem Blut entfernt wurden, später aber aus okkulten, noch nicht nachweisbaren Metastasen erneut ins Blutsystem gelangt sind. Ein stabiler CETC-Verlauf könnte demnach auf einen Ruhezustand der Zellen mit ausbleibender Abwanderung ins Gewebe hindeuten (Pachmann 2005). Ein Absinken der Zahl an Tumorzellen muss jedoch nicht allein mit der Wirksamkeit der Strahlen- oder Chemotherapie erklärt werden. Vielmehr kann dies auch bedeuten, dass die Tumorzellen den Blutkreislauf verlassen um sich im Gewebe festzusetzen (charakteristische Dynamik). Die Metastasierungsfähigkeit der CETC kann nach der Extravasation variieren, beispielsweise kann es trotz vorausgegangener Proliferation zum Eintritt von CETC in Ruhestadien kommen. Plötzlich auftretende klinisch manifeste Metastasen sind bei diesem Prozess ebenso möglich (Chambers 2000).

Das Ansprechen verschiedener Therapien scheint aber vor allem mit der Wachstumspotenz einzelner Zellen assoziiert zu sein. So konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass sich migrierende und proliferierende Tumorzellen vor allem in der aktiven Phase des Zellzyklus befinden und somit besonders sensibel für eine Chemotherapie oder RT sind (Kubens 2002). Der Anstieg der Zellzahl wäre dann auf wenige (z.T. nicht mehr nachweisbare) Restzellen zurückzuführen, welche ihrerseits erneut zur Proliferation fähig sind.

### **6.3 Bedeutung der CETC bei Metastasierungsvorgängen**

Wie in Kapitel 6.1. bereits angedeutet, ist bislang nicht bekannt, ob eine bestimmte Mindestanzahl von CETC im Blutkreislauf erforderlich ist, um Metastasen hervorzurufen (Pantel 2003). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass eine steigende Anzahl bzw. eine große Menge an CETC die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass wenigstens eine dieser Zellen zur Metastasenbildung in der Lage ist. Nach Engers (1998) durchläuft jede einzelne Tumorzelle eine Metastasierungskaskade (Engers 1998). Das bedeutet, dass eine Tumorzelle erst jede einzelne Stufe einer Abfolge, bestehend aus Dissoziation, Invasion, Intravasation,



Dissemination, Arrest, Extravasation und schließlich wieder Invasion, durchlaufen muss, um überhaupt eine Metastase bilden zu können. Diesen selektiven Vorgang zu überstehen gelingt jedoch nur einem äußerst geringen Teil der Tumorzellen. Die ständige Wiederholung der Kaskade soll wiederum die Metastasenentstehung begünstigen. Der bei vielen Patientinnen beobachtete, unstete und stark wechselhafte CETC-Verlauf könnte vor diesem Hintergrund aus betrachtet erklärbar sein. Sicher spielt dabei auch die Proliferationsaktivität und das biologische Profil der CETC eine zentrale Rolle. Inwiefern einzelne Tumorzellen selbst bereits als Metastasen zu werten sind steht zur Diskussion.

## 6.4 Bewertung der Methoden

### 6.4.1 Detektion von CETC mittels MAINTRAC™

Es gibt verschiedene Ansätze zur Identifizierung und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen. Dabei werden insbesondere molekulargenetische von immunologischen Methoden unterschieden. Ein im Forschungsbereich diesbezüglich häufig angewendetes Verfahren ist die immunmagnetische Separation. Hierbei kommen Antikörper zum Einsatz, welche gegen tumorassoziierte Antigene gerichtet und an magnetische Partikel gebunden sind (positive Selektion). Man spricht von negativer Selektion, wenn Antikörper gegen Blutzellbestandteile, wie das Leukozytenantigen CD45, gerichtet sind (Hoon 2011).

Positive Selektionen sind möglich mittels folgender Antigene: EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), MUCIN1 (MUC1 = CA 15-3; MK-Tumormarker), Cytokeratin (Intermediärfilamente epithelialer Zellen) oder A-T reiche Regionen in der DNA.

Mani (2008) zufolge sind alle auf EpCAM basierenden Methoden mit dem Problem der EpCAM-Downregulation während der EMT (epithelial mesenchymal transition) in Bezug auf die disseminierten Tumorzellen konfrontiert (Mani 2008). Man geht davon aus, dass sich Epithelzellen z.B. bei chronischen Entzündungszuständen phänotypisch in Richtung mesenchymaler Zellen transformieren, aufgrund des Verlusts von E-Cadherin aus dem Zellverband lösen und auf diese Weise aktiv in das Interstitium migrieren um dort extrazelluläre Matrix zu synthetisieren (Kalluri 2003, Ogawa 2009, Guarino 2009). Dennoch wird dieses auf anti-EpCAM-Antikörpern basierende Verfahren am häufigsten in der Praxis eingesetzt (Schlimok 1987, Osta 2004, Lankiewicz 2006).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Verfahren der immunfluorimetrischen Detektion von CETC macht sich das Prinzip der fluoreszenzmarkierten anti-EpCAM-Antikörper

zunutze (Anfärbung der gesuchten Zellen). Diese Detektionsmethode ist als MAINTRAC™ patentiert. Sie gestattet die Detektion von Zellen mit minimaler Expression von Oberflächenantigenen und erlaubt zusätzlich die Unterscheidung in apoptotische und vitale CETC. Während die intakte Zellmembran – ein Indiz für vitale Zellen – nicht permeabel für den Fluoreszenzfarbstoff 7AAD ist, vermag dieser Farbstoff durch die Membran avitaler Zellen zu diffundieren und die Kern-DNA anzufärben.

Die sogenannte EPISPOT-Methode, welche den Anspruch erhebt, ebenfalls nur vitale Zellen nachzuweisen, verwendet dagegen die Sekretion individueller Proteine zum Nachweis funktionstüchtiger zirkulierender Tumorzellen (Alix-Panabieres 2007). Auf diese Weise werden Zellen, die das entsprechende Protein nicht sezernieren, vom Nachweis ausgeschlossen (Bronner 2009).

Vergleichend sei außerdem das Detektionssystem CellSearch™ (Veridex) genannt, welches von der FDA als anerkanntes Instrument für die Detektion von CETC bei metastasierten Brustkrebskrankungen gilt (Cristofanilli 2004). Hierbei werden die anti-EpCAM-Antikörper lediglich zur immunomagnetischen Anreicherung der Zellen verwendet; für die eigentliche Identifizierung bzw. Charakterisierung von anti-Cytokeratin, DAPI und anti-CD45 werden Antikörper eingesetzt (Riethdorf 2008). Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit angewandten Methode wird beim CellSearch™ System das Blut an Stelle der Standard EDTA-Monovetten in spezielle CellSave Röhrchen mit zusätzlicher Fixationslösung aspiriert. Diese, in den CellSave Röhrchen befindliche Fixationslösung, scheint die nachweisbare Menge an CETC stark zu beeinflussen. In der Arbeit von Pachmann 2011 konnte veranschaulicht werden, dass unter Verwendung der CellSave Röhrchen, im Vergleich zum Vorgehen bei der MAINTRAC™ – Methode, eine Reduktion des Nachweises EpCAM-positiver Zellen um mehr als das 10-fache erfolgt. Anderen Studien zufolge wird mittels CellSearch-Verfahren ein hoher Anteil an Zellbruchstücken detektiert, welchem allerdings die gleiche prognostische Bedeutung wie intakten, vitalen Zellen zugeschrieben wird (Coumans 2010).

Die prognostisch relevante Nachweisgrenze des CellSearch™ Systems wird, bezogen auf metastasierte Patienten, mit 5 Zellen / 7,5 ml Blut ( $\geq 0,67$  Zellen/ml Blut) bis max. 270 Zellen / 7,5 ml Blut angegeben (Cristofanilli 2004, Nolé 2008, Deng 2008). Demgegenüber konnten in der vorliegenden Arbeit mittels Scan^R vergleichbare Zellzahlen wie mit dem *Laser-Scanning-Cytometer*, nämlich zwischen 0 und maximal 114.000 EpCAM positive Zellen/ml Blut (Mittelwert: 7849 Zellen/ml, Median: 3374 Zellen/ml) nachgewiesen werden.

Wenngleich die mittels verschiedener Methoden ermittelte Menge an CETC kontrovers diskutiert wird, ist die hohe Zahl der beim MAINTRAC<sup>TM</sup> – Verfahren detektierten CETC von Vorteil. Während in anderen Studien bei nur 10-60 % der Patientinnen mit metastasiertem MK Tumorzellen im Blut bzw. Knochenmark gefunden wurden (Fehm 2008), ist dies mit der vorliegenden Methode in 90 % der Fälle von primär nicht metastasierten Mammakarzinomen möglich (Pachmann 2008). In Anbetracht der heterogenen Literaturangaben wäre die Standardisierung der Testmethoden ein anzustrebendes Ziel diagnostischer Forschung (Gaforio 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bei 161 Patientinnen mit primär nicht metastasiertem MK 322 Messdaten erhoben (Messung jeweils vor und nach RT). Der Nachweis von EpCAM-positiven Zellen gelang bei 157 Patientinnen (Detektionsrate 97,5 %). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit CETC zu detektieren deutlich höher war als mit anderen, auf EpCAM-basierenden Verfahren.

#### **6.4.2 Sensitivität von EpCAM**

Da das Epithelantigen EpCAM zum Nachweis der CETC verwendet wurde, stellt sich die Frage, in welchem Umfang detektierte Zellen auch tatsächlich Tumorzellen verkörpern. Die Gefahr falsch positiver Ergebnisse ist in jedem Fall zu bedenken. Schließlich wird das im Rahmen des MAINTRAC<sup>TM</sup> –Verfahrens verwendete EpCAM-Antigen nicht allein an der Oberflächenmembran von Zellen des Mammakarzinoms exprimiert. Zwar korreliert eine EpCAM-Überexpression vor allem beim MK mit dessen Tumormasse, dem Lymphknotenstatus und dem Vorhandensein von Östrogenrezeptoren (Tandon 1990) das EpCAM-Antigen findet sich jedoch auch bei anderen malignen Erkrankungen wie z.B. dem Bronchial-, oder klostalen Karzinom (Moldenhauer 1987, Litvinov 1994, Balzar 1999, Went 2004, Osta 2004). Eine Über- bzw. de novo-Expression von EpCAM wurde, wie bereits in Kapitel 2.3.2 beschrieben, auch bei entzündlichen Prozessen in Leber, Nieren und im Darm beobachtet (Litvinov 1994, 1996; Balzar 1999, de Boer 1999, Trzpis 2007). Es liegen auch einige Forschungsergebnisse vor, in denen nachgewiesen werden konnte, dass EpCAM-mRNA auch in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden kann und darüber hinaus als spezifischer Marker der frühen Erythropoese im Knochenmark dient. Allerdings konnte dies nicht für die Zelloberfläche gezeigt werden (Bergsagel 1992, Borkowski 1996, Nelson 1999, Lammers 2002).

Im gesunden Organismus sind EpCAM-positive Zellen in der Regel nicht nachweisbar (Negativkontrolle). Dennoch stellte Cristofanilli 2005 bei Patienten mit metastasierten Karzinomen fest, dass nicht nur bei erkrankten Personen CETC aufzufinden waren, sondern auch bei 1 % der gesunden Probanden. Die dabei gemessene Konzentration der Zellen im Blutkreislauf befand sich allerdings unterhalb eines Schwellenwertes von 3 Zellen / 7,5 ml Blut (Cristofanilli 2005).

Verschiedenen Lehrmeinungen folgend stellen EpCAM-positive Zellen in gesunden Organen Stammzellen dar, die ihrerseits die Grundlage für Regenerationsvorgänge bilden (Stingl 2001, Gargett 2009, Jozefczuk 2010). Dieser Theorie entsprechend ziehen Reorganisationsprozesse als Folge von Organschädigungen eine Überexpression von EpCAM nach sich (Trzpis 2007). Terstappen 2000 und Fehm 2002 schrieben den EpCAM-positiven Zellen wiederum maligne Eigenschaften zu (Terstappen 2000, Fehm 2002).

#### **6.4.3 Single-Cell-Picking und Einzelzell - qRT - PCR**

Neben der quantitativen Bestimmung von Tumorzellen im peripheren Blut (siehe Kapitel 6.4.1), wurde zur Genexpressionsanalyse der CETC das Verfahren der Real Time – Polymerase – Kettenreaktion (qRT-PCR) angewandt.

Die dabei untersuchten EpCAM-positiven Zellen wurden zunächst mit Hilfe des MAINTRAC<sup>TM</sup> - Prinzips markiert und danach mittels Cell-Picking-Verfahren einzeln isoliert. Dadurch konnten die PCR-Ergebnisse eindeutig den jeweiligen CETC zugeordnet werden, da diese explizit angefärbt und einzeln separiert wurden. Mit der qRT-PCR selbst steht eine häufig verwendete und sehr sensitive Nachweismethode zur Analyse der Expression spezifischer Genabschnitte zur Verfügung. Aktuell stellt sie die schnellste und präziseste Methode zur Bestimmung der Genexpression dar (Wang 2006). Selbst geringe Änderungen in der Zahl der aktiven Gentranskripte lassen sich zuverlässig nachweisen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass hierbei maximal 10 ng Nukleinsäure pro Reaktion eingesetzt werden müssen (Fehm 2009). Nicht zuletzt konnte mit Einführung der qRT-PCR die Nachweis-Sensitivität für Zellen mit tumorassoziierter Genexpression (von denen angenommen wird, dass es sich um Mikrometastasen handelt) deutlich erhöht werden.

Bei der im Rahmen des Verfahrens zur Anwendung kommenden reversen Transkriptionsreaktion, erfolgt zunächst die Erstellung einer cDNA-Kopie von der mRNA-Matrize. Anschließend werden bestimmte cDNA-Abschnitte mittels PCR vervielfältigt. Auf diese Weise ist es möglich bereits geringe Mengen der mRNA schnell einer Analyse zugänglich zu

machen und damit einzelne, im peripheren Blut zirkulierende, Zellen mit Expression tumorassoziierter Gene nachzuweisen. Da mRNA nur in lebensfähigen Zellen transkribiert und beim Zellzerfall sehr schnell abgebaut wird, geht man davon aus, dass der Nachweis von gewebsspezifischer mRNA in peripherem Blut auf die Präsenz zirkulierender Tumorzellen hindeutet (Jonas 1996, Keilholz 1997). Es sei an dieser Stelle darauf verwiesen, dass eine Hautkontamination der Proben als Quelle für falsch-positive Resultate stets zu berücksichtigen ist (Gilbey 2004). Zudem kommt es mit und ohne vorherige Zellseparation häufig zu Verunreinigungen der Proben mit daraus resultierender verminderter Spezifität. Die in dieser Arbeit angewandte Kombination aus vorgeschalteter Zellisolierung (mittels Single-Cell-Picking) und nachfolgender Multiplex-PCR anhand von Einzelzellen, kann helfen Fehlerquellen zu minimieren und gleichzeitig die Sensitivität wie auch die Spezifität zu erhöhen (Johnson 1995, Jäger 1996, Keilholz 1998, Pantel 2009).

Die qRT-PCR birgt jedoch auch die Gefahr sich unabhängig von der Protein-Ebene v.a. auf die Genexpressionsaktivität zu beziehen. Abweichungen zwischen diesen zellulären Ebenen werden dadurch nicht erfasst. Letztlich sind aber die Proteine für die Umsetzung der genomischen Information in einen biologischen Effekt verantwortlich (Mocellin 2006). Auf eine Änderung in der Genexpression folgt nicht zwangsläufig die Synthese des entsprechenden Proteins, da diese außerdem durch posttranskriptionelle bzw. posttranslationelle Mechanismen kontrolliert wird. Um die biologische Relevanz von Änderungen in der mRNA-Aktivität zu erfassen, sollte deshalb unbedingt auch die Proteinebene betrachtet werden. Hierzu bieten sich Verfahren, wie das der Quantifizierung mittels Western Blot oder die Immunhistochemie, an welche dazu dienen das zelluläre Verteilungsmuster der Proteine im Gewebe zu charakterisieren.

Im Hinblick auf die Verifizierung der qRT-PCR-Ergebnisse ergeben sich v.a. bei niedrig exprimierten Genen Schwierigkeiten. Da hierbei interindividuelle Schwankungen einen großen Einfluss haben, können bei Extremwerten einzelner Proben Regulationsprozesse vorgetäuscht werden (Rajeevan 2001). Vorsicht ist ebenso bei extremen Expressionswerten geboten, da diese auch auf Artefakten bei der Bildauswertung beruhen können.

Trotz ihrer Grenzen hat sich die qRT-PCR in der vorliegenden Arbeit bewährt. Die Ergebnisse dürfen allerdings nicht als Endpunkt einer Untersuchung aufgefasst, vielmehr sollten sie als eine frühe Screening-Methode und somit als Ausgangspunkt für vertiefende Forschungen verstanden werden. Inwiefern die ermittelten Daten tatsächlich von klinischer Relevanz sind, sollte Gegenstand weiterführender Experimente sein. Unter Zuhilfenahme o.g. Techniken

sollte ein noch detaillierteres Verständnis in Bezug auf die Dynamik von intrazellulären Vorgängen und Genaktivitäten entwickelt werden, nicht zuletzt um beispielsweise Metastasierungsvorgänge noch besser verstehen zu lernen.

## **6.5 Quantitative CETC - Messungen**

### **6.5.1 Ereignis-freie Überlebenszeit**

Der in dieser Arbeit ermittelte Zusammenhang zwischen dem Verhalten der CETC und dem Auftreten von lokoregionären Rezidiven bzw. Fernmetastasen, bei primär nicht metastasierten Patientinnen, bestätigt die von Cristofanilli 2005 aufgestellte These einer Korrelation zwischen dem quantitativen Verhalten der CETC und dem Ereignis-freiem Überleben (Cristofanilli 2005). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete, mittlere Ereignis-freie Zeit betrug dabei in der durch einen Anstieg der Zellzahl gekennzeichneten Patientengruppe, unter der RT, 7,5 Jahre und in der Gruppe mit gesunkener Zellzahl 8,7 Jahre. Der Unterschied zwischen beiden Kollektiven war hinsichtlich der Ereignis-freien Überlebenszeit statistisch signifikant ( $p = 0,004$ ). Bei der Differenzierung der Ereignisse nach „Lokalrezidiven“ und „Fernmetastasen“ zeigte sich, dass der Anstieg der Tumorzellzahl v.a. die Fernmetastasierung voraussagte, weil die RT das Ziel der lokalen Kontrolle im vorliegenden Fall offensichtlich erreichte. Das bedeutet, dass der systemische Effekt der RT nicht hinreichend groß war, um Fernmetastasen im klinischen Verlauf, trotz steigender CETC-Zahl, zu verhindern.

Einerseits wiesen Patientinnen, deren CETC-Zellzahl im Rahmen der RT zunahm, ein deutlich höheres Risiko dahingehend auf im weiteren Krankheitsverlauf Fernmetastasen zu entwickeln. Andererseits zeigte sich bei ihnen auch eine signifikant verkürzte Ereignis-freie Überlebenszeit.

Neben der Veränderung der absoluten CETC-Konzentration wurde in einem nächsten Schritt das Maß der Zelländerung analysiert und hinsichtlich der Ereignis-freien Zeit untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich ein mäßiger Anstieg detektierter CETC als prognostisch ungünstiger als ein starker Anstieg erwies. Ebenso scheint eine moderate Verringerung der Zellzahl für die Patientinnen prognostisch günstiger zu sein, als ein sehr starkes Absinken, beispielsweise um mehr als das 10-fache des Ausgangswertes. Verantwortlich für diese paradox erscheinende Beobachtung könnte die unter der RT erfolgende Freisetzung epithelialer Zellen sein. Inwiefern die Behandlung in diesen Fällen noch als suffizient bezeichnet werden kann, ist fraglich. Möglicherweise werden nicht nur

„gesunde“ epitheliale Zellen sondern auch Tumorzellen aus okkulten Residuen gelöst und in den Blutkreislauf ausgeschwemmt. Die durch die RT angestrebte lokale Kontrolle des Tumors würde dann mit dem Nachteil einer Dissemination von Tumorzellen einhergehen (EBCTCG: Darby 2011). Die Hypothese der Tumorzellfreisetzung als Folge der RT wird durch die Tatsache unterstützt, dass im vorliegenden Patientenkollektiv insgesamt sogar mehr Patientinnen einen Anstieg der CETC-Zahl aufwiesen (85 Patientinnen) als ein diesbezügliches Absinken (76 Patientinnen). Nach durchgeführter RT wurden demnach mehrheitlich höhere CETC-Zahlen detektiert als vor der Behandlung. In diesem Zusammenhang kann also nicht von einer allgemeinen Eliminierung der CETC infolge der RT ausgegangen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Verhalten der detektierten CETC eine enorme prognostische Aussagekraft in Bezug auf die Manifestation von Fernmetastasen besitzt.

Bislang ist die Bedeutung der CETC als Parameter für ein Therapieansprechen nur für die palliative Chemotherapie belegt (Terstappen 2000, Cristofanilli 2005). Bzgl. der Bestrahlung liegen hierzu bislang keine Daten vor.

Bezogen auf das pT-Stadium und den pN-Status konnte, entgegen den Erwartungen, kein Zusammenhang bzgl. der Ereignis-freien Überlebenszeit festgestellt werden (Hill-Kayser 2006). Beim vorliegenden Patientenkollektiv scheinen die negativen Effekte der ungünstigen Prognosefaktoren (positiver Lymphknotenstatus, großer Primärtumor) mittels RT ausgeglichen worden zu sein.

Die in der Literatur mehrfach beschriebene prognostische Bedeutung des Progesteronrezeptorstatus konnte auch durch die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse bestätigt werden (Bardou 2003). Zwar war die Ereignis-freie Überlebenszeit bei Progesteronrezeptor-positiven Patientinnen nicht signifikant länger als bei Frauen mit negativem Progesteronrezeptorstatus, es konnte aber eine starke Tendenz i.S. einer günstigen Prognose nachgewiesen werden. Ähnliches gilt für die Untersuchungen hinsichtlich des Prognosefaktors „Triple-Negativität“. Auch hier erbrachte der Log Rang-Test keinen Wahrscheinlichkeitswert von p-Wert  $\leq 0,05$ , dennoch kann von einem korrelativen Zusammenhang zwischen triple-negativem MK und verkürzter Ereignis-freier Überlebenszeit ausgegangen werden. Um den Nachweis signifikant negativer Patientenprognosen zu erbringen, sind, wie in verschiedener Fachliteratur beschrieben, weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven notwendig (Tian 2008).

Patientinnen, die neben der adjuvanten Brustwand-Bestrahlung eine RT der Lymphabflussgebiete erhielten, zeichneten sich durch eine signifikant verkürzte Ereignis-freie Überlebenszeit aus. Eine Ursache für diese Beobachtung könnte sein, dass diese Patientinnen ein besonderes Risikoprofil aufwiesen bzw. die Indikation zur LAG-Bestrahlung nur bei Risikopatienten gestellt wurde. Hauptindikationskriterium für eine LAG-Bestrahlung ist ein positiver Lymphknotenstatus. Die Frage, weshalb dieser Faktor keinen Zusammenhang mit der Ereignis-freien Zeit zeigte, ist am ehesten durch die nicht hinreichende Probandenzahl zu erklären.

Bei den Betrachtungen hinsichtlich des Einsatzes eines Elektronenboostes konnten ähnliche Ergebnisse wie bei der LAG-Bestrahlung ermittelt werden. Auch hier wiesen Patientinnen, die diese zusätzliche Therapie erhielten, statistisch signifikant nachteilige Ergebnisse auf ( $p = 0,034$ ). Als Ursache dieser scheinbar paradoxen Resultate kann das spezielle, möglicherweise sehr heterogene Risikoprofil der Patientinnen angeführt werden (Bayerl 2001). Vor allem junge Patientinnen ( $< 60$  Jahre), welche allein durch ihr Alter eine ungünstigere Prognose aufwiesen, erhielten eine zusätzliche Boost-Bestrahlung (Elkhuizen 1998).

Die im Ergebnisteil nur ansatzweise erläuterten Untersuchungen zum Einsatz neoadjuvanter Chemotherapien konnten nachweisen, dass solche neoadjuvante Behandlungen mit Chemotherapeutika für die behandelten Patientinnen von Nachteil zu sein scheinen. Zwar spielt auch hier das besondere Ereignis-Risiko der Patientinnen (inoperables MK, großer Tumor in der pT-Klassifikation; positiver pN-Status, negativer Hormonrezeptorstatus) eine große Rolle; die Durchführung einer neoadjuvanten Behandlung wird in der Literatur jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert. Zum einen kommt es bei neoadjuvanter Applikation von Chemotherapeutika vor, dass die disseminierten Tumorzellen nur unvollständig eliminiert werden und im ungünstigsten Fall durch die Behandlung sogar Tumorzellen aus dem Primärtumor gelöst und als CETC in den Blutkreislauf ausgeschwemmt werden können (Pachmann 2005, Hall 2012, Hartkopf 2013). Andererseits liefert die Sentinellymphknoten-Biopsie nach erfolgter neoadjuvanter Chemotherapie nicht immer sichere Ergebnisse (Boughey 2013). Im vorliegenden Patientenkollektiv zeichnete sich die Gruppe nach angewandter, neoadjuvanter Chemotherapie durch eine signifikant verkürzte, Ereignis-freie Überlebenszeit gegenüber der Gruppe ohne Behandlung aus. Die RT war in diesem Fall nicht in der Lage dieses Defizit auszugleichen.

In keinem Fall zeigten die Ergebnisse der Merkmalsanalysen von Grading, Östrogenrezeptorstatus, Her/2-neu-Status, von Tumorhistologie, Alter, Behandlung mit Antikörpern



(Herceptin) und Hormontherapie korrelative Beziehungen zur Ereignis-freien Zeit. Aus Kapazitätsgründen werden die Ergebnisse dieser Merkmale an dieser Stelle nicht näher diskutiert (siehe aber Kapitel 6.6).

### 6.5.2 Ereigniswahrscheinlichkeit

Die in dieser Arbeit ermittelten, kumulierten Ereignisraten korrespondieren sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen bzgl. des krankheitsfreien Überlebens.

Nach einem 5-jährigen Beobachtungszeitraum lag die Ereignisrate im vorliegenden Patientenkollektiv bei 23,8 %. Bayerl kam 2001 (bei gleichem Beobachtungszeitraum) zu ähnlichen Ergebnissen (Ereignisrate 24 %; Bayerl 2001). Andere Studien wiesen, bezogen auf eine 5-jährige Zeitspanne, deutlich weniger Ereignisse nach: Horiguchi 2002: 11 %, Palazzi 2006: 11 %, Vujovic 2006: 20 %. Die längere, krankheitsfreie Überlebenszeit wurde in den Untersuchungen mit der Zusammensetzung des Patientenkollektivs erklärt. In die Studie von Vujovic wurden z.B. nur jene Patientinnen einbezogen, deren Primärtumor sich im pT1- oder pT2 Stadium befand und welche einen negativen Lymphknotenstatus (pN0) hatten (Vujovic et al 2006).

Wie bereits in Kapitel 6.5 beschrieben, konnte auch bzgl. der Ereigniswahrscheinlichkeit ein signifikanter Einfluss des CETC-Verhaltens im Rahmen der RT nachgewiesen werden. Innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 5 Jahren kam es bei Patientinnen mit ansteigender CETC-Zellzahl signifikant häufiger zum Auftreten von Ereignissen als bei jenen mit sinkender Anzahl der CETC ( $p = 0,019$ ). Während in der Gruppe AB nur 10,4 % der Patientinnen ein Ereignis innerhalb von 5 Jahren aufwiesen, waren es in der Gruppe AN 34,0 %. Damit wurde erneut der Nachweis erbracht, dass ein Anstieg der Tumorzellzahl mit einer ungünstigen Prognose einhergeht. Bei der Unterscheidung der Ereignisse nach lokoregionären Rezidiven und Fernmetastasen konnte, wie schon bei den Betrachtungen der Ereignis-freien Überlebenszeit, gezeigt werden, dass vor allem die Zahl entstandener Fernmetastasen vom jeweiligen CETC-Verlauf abhängt.

Der Prozentsatz der Lokalrezidive war bei Patientinnen, welche von einem Anstieg der Tumorzellzahl betroffen waren (10,4 %), nahezu gleich zur Gruppe mit gesunkener Zellzahl (8,4 %). Der Unterschied der beiden Gruppen war somit statistisch nicht signifikant ( $p = 0,710$ ). Im Gegensatz dazu war der Prozentsatz jener Frauen mit Fernmetastasen und angestiegener CETC-Zahl (23,7 %) deutlich höher als bei denen, deren Tumorzellzahl nach erfolgter RT gesunken war (2,7 %). Die Differenz beider Untersuchungsgruppen war

statistisch signifikant ( $p = 0,015$ ). Es ist zu konstatieren, dass vor allem die Fernmetastasenrate für die Korrelation zwischen den „Ereignissen“ und dem Anstieg der CETC verantwortlich ist. Daraus folgt, dass auf der Grundlage der CETC-Analysen in erster Linie die Risikoabschätzung für die Entstehung von Metastasen und deren Prognostizierbarkeit möglich wird. Hervorgehoben sei, dass das Auftreten von Fernmetastasen in direktem Zusammenhang mit dem Anstieg der CETC-Zahl unter RT steht. Die beobachteten Lokalrezidive scheinen unabhängig von der im Rahmen der RT gemessenen CETC-Zahl aufzutreten.

Neben einer Veränderung der absoluten CETC-Konzentration wurde auch im Rahmen der Untersuchungen zur Ereigniswahrscheinlichkeit das Maß der Zelländerung analysiert. Offensichtlich wurde, dass sich ein mäßiger Anstieg der detektierten CETC als prognostisch ungünstiger erweist als ein diesbezüglich starker Anstieg. Während bei mäßigem Anstieg der Zellzahl 37,9 % der Patientinnen Ereignisse aufwiesen, waren es bei einem starken Anstieg (um mehr als das 10-fache des Ausgangswertes) nur 27,8 %. Ähnliches gilt für gesunkene Zellzahlen unter RT. Verringerte sich die CETC-Zahl um mehr als das 10-fache kam es bei 15,4 % der Patientinnen, unter Berücksichtigung des 5-Jahres-Zeitraumes, zu einem Ereignis. Bei mäßigem Abfall hingegen zeigten sich Lokalrezidive oder Fernmetastasen bei lediglich 8,3 % der Patientinnen. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Patientengruppe mit mäßigem Absinken der CETC unter RT die günstigste und Patientinnen mit einem geringgradigen Anstieg die schlechteste Prognose hinsichtlich des Eintretens von Ereignissen aufwiesen. Wie bereits in Kapitel 6.5 beschrieben, wird dieser auf den ersten Blick paradoxe Zusammenhang mit der Freisetzung von „gesunden epithelialen Zellen“ als Folge der RT erklärt.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode besitzt eine eingeschränkte Sensitivität dahingehend, dass nicht explizit zwischen Tumorzellen und normalen, epithelialen Zellen unterschieden werden kann (siehe Kapitel 6.4.2). Es ist daher nicht ausschließbar, dass die Ergebnisse diesbezüglich verfälscht sind (Detektion gesunder Zellen). Dennoch steht zur Diskussion, inwiefern Tumorzellen als Folge einer wirksamen RT von nicht bekannten Residuen abgelöst und in den Blutkreislauf ausgeschwemmt werden. Möglicherweise spielt hierbei eine erhöhte Gefäßpermeabilität infolge des radiogenen Ödems eine wichtige Rolle, wodurch der Übertritt der Tumorzellen in den Blutkreislauf begünstigt werden könnte. Vielleicht besteht hier aber auch eine Verbindung zu Tumorstammzellen, die sich ihrerseits häufig durch Zytostatikaresistenzen auszeichnen (Xia 2002, Luzhna 2013). Infolge der RT ist

eine Negativselektion der Stammzellen denkbar, wodurch überlebende Tumorzellen mit einer größeren Widerstandsfähigkeit z.B. in Bezug auf eine adjuvante Chemotherapie, ausgestattet sind (Zielske 2011). Die Beeinflussung dieser Tumorzellen, i.S. einer Erhöhung der Sensitivität von Strahlen- und Chemotherapien, ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten (Schilling 2012). Die Kenntnisse über das Verhalten der CETC und deren genetisches Expressionsprofil könnte bei der Erforschung weiterer Resistenzen und therapeutischer Verfahren einen wichtigen Beitrag leisten.

Neben den Betrachtungen der CETC und ihrer Rolle in Bezug auf die Entstehung von „Ereignissen“, wurden in dieser Arbeit noch andere Einflussfaktoren für das Zustandekommen lokoregionärer Rezidive oder Fernmetastasen untersucht:

Entgegen der Erwartung, dass Patientinnen mit kleinen Tumoren der Kategorie pT1 ein niedrigeres Ereignis-Risiko gegenüber größeren Primärtumoren der Kategorien pT2, pT3 oder pT4 besitzen, konnte dieser Sachverhalt nicht festgestellt werden (Carter 1989, Hill-Kayser 2006).

Der Lymphknotenbefall selbst gilt als aussagekräftigster klinischer Faktor für die Prognose des weiteren Krankheitsverlaufs beim MK (Diel 1997, Jänicke 1995). Hinsichtlich des Lymphknotenstatus konnte bei den hier vorliegenden Ergebnissen kein Korrelat zur Ereignisrate gefunden werden. So entwickelten 29,6 % der Patientinnen mit initialem Lymphknotenbefall Lokalrezidive oder Fernmetastasen. Allerdings zeigten sich auch bei 21,1 % der Patientinnen Ereignisse, obwohl sie initial keine befallenen Lymphknoten aufwiesen. Der Unterschied war nicht statistisch signifikant ( $p = 0,419$ ).

Da das MK zu den hormonabhängigen Tumoren zählt, spielen Analysen der Östrogen- und Progesteronrezeptoren eine wichtige Rolle für die Prognose und Therapiewahl (Scharl 1989). Die Expression von Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren gilt beim primären MK als Marker einer erhaltenen funktionellen Differenzierung der Zellen und damit als positives Prognosekriterium (Lohmann 2001, Horiguchi 2002, Bardou 2003). Bezüglich der Entstehung von Fernmetastasen konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant günstigere Prognose bei Patientinnen mit positivem Progesteronrezeptor-Status gegenüber Rezeptor-negativen Patientinnen nachgewiesen werden ( $p = 0,024$ ). Bei Betrachtung der Gesamtheit von „Ereignissen“ war dieser Zusammenhang allerdings statistisch nicht signifikant ( $p = 0,064$ ). Die Ursache hierfür liegt wohl am ehesten in der nicht hinreichend großen Patientenzahl begründet.

Im Falle, dass der Progesteronrezeptor-, der Östrogenrezeptor- und auch der Her2/neu-Status negativ (triple-negativ) waren, konnte, anders als bei der Analyse der Ereignis-freien Überlebenszeit, kein signifikanter Zusammenhang hinsichtlich des Auftretens von Ereignissen festgestellt werden. Um die in verschiedener Fachliteratur beschriebene, signifikant erhöhte Ereigniswahrscheinlichkeit nachzuweisen, wäre es notwendig, künftige Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven durchzuführen (Tian 2008).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Ereignis-freien Überlebenszeit, wiesen die Patientinnen mit einer LAG-Bestrahlung kein signifikant erhöhtes Ereignisrisiko innerhalb des 5-jährigen Beobachtungszeitraumes auf. Dagegen wurde bei Patientinnen, die eine zusätzliche Boost-Bestrahlung erhielten, ein erhöhtes Ereignisrisiko festgestellt. Obwohl eine solche zusätzliche Behandlung das Risiko, ein Lokalrezidiv oder Fernmetastasen zu entwickeln, im Allgemeinen gesenkt werden soll, traten im vorliegenden Patientenkollektiv signifikant häufiger Ereignisse auf (Bayerl 2001). Eine mögliche Begründung für diese Beobachtungen könnte sein, dass v.a. diejenigen Patientinnen eine Boost-Bestrahlung erhielten, deren Primärtumor prognostisch ungünstige Eigenschaften aufwies. Zudem wurden v.a. Patientinnen, die jünger als 60 Jahre waren therapiert. Gerade diese Personengruppe (siehe oben) zeichnet sich durch ein erhöhtes Ereignisrisiko aus (Elkhuizen 1998, Bartelink 2001, Yau 2002).

Die Untersuchungen zum Grading, zum Östrogenrezeptorstatus, zum Her2/neu-Status, zur Tumorphistologie, zum Lebensalter, zur neoadjuvanten Chemotherapie, zur Antikörperbehandlung (Herceptin) und zur Hormontherapie, lieferten jeweils keine statistisch signifikanten Werte in Bezug auf deren Beeinflussung der Ereignisrate

### **6.5.3 Lokoregionäre Rezidive**

Die in dieser Dissertation über 5 Jahre beobachteten Patientinnen waren zu 90,5 %, 5 Jahre nach Erstdiagnose, frei von Lokalrezidiven. Literaturrecherchen führten diesbezüglich zu vergleichbaren Werten (etwa 95 %; siehe Bartelink 2001, Bayerl 2001, Karasawa 2003, Mitov 2006, Vujovic 2006). Horiguchins Studien ermittelten diesbezüglich sogar eine 5-Jahres-Rate von 97,4 % (Horiguchi 2002). Allerdings wurden hier lediglich Tumoren im Stadium I und II betrachtet.

Pötter (2007) belegte die enorme Bedeutung der RT für die lokale Tumorkontrolle (Pötter 2007). Anhand der von dieser Forschungsgruppe vorgelegten Daten konnte gezeigt werden, dass die 5-Jahres-Lokalrezidivrate v.a. bei prognostisch günstigen Mammakarzinomen

signifikant gesenkt werden konnte (5,1 % ohne RT, 0,4 % mit RT). Vermutlich kann die im Vergleich zur vorliegenden Arbeit besonders niedrige Rate an Lokalrezidiven mit Hilfe der besonderen Einschlusskriterien der Studie begründet werden (Tumorgröße < 3 cm, nur Grading 1 und 2, negativer Lymphknotenstatus, positiver Rezeptorstatus).

#### **6.5.4 Fernmetastasen**

Nach einer Beobachtungszeit von 5 Jahren wurden in der vorliegenden Arbeit bei 14,3 % der Patientinnen Fernmetastasen diagnostiziert. Diese Rate ist vergleichbar mit anderen Daten der Fachliteratur. So wurde zum Beispiel in einer retrospektiven Studie an 270 brusterhaltend operierten und anschließend bestrahlten Patientinnen eine Metastasenrate von 15,6 % innerhalb eines 5-jährigen Beobachtungszeitraums nachgewiesen (Bayerl 2001). Allerdings wurde in dieser Studie das Tumorbett nicht mit einem Elektronenboost aufgesättigt. In einer anderen, multizentrischen Studie zeigten sich bei lediglich 8 % der Patientinnen nach 5 Jahren Fernmetastasen. Diese niedrige Quote ist möglicherweise auf den in dieser Studie hohen Anteil von pT1 Tumoren zurückzuführen (Palazzi 2006). Ähnliche Ergebnisse fanden auch Bartelink in einer Studie zur Aufsättigung des Tumorbettes. Die 5-Jahres-Metastasenrate betrug hier 13 % für Patientinnen ohne zusätzliche Boost-Bestrahlung und 9 % für Patientinnen, welche die Boost-Bestrahlung (16 Gy) erhielten (Bartelink 2001).

#### **6.5.5 Gesamtüberleben**

In dem hier analysierten Beobachtungszeitraum von 10 Jahren verstarben 4 Patientinnen an den Folgen des MKs. Dies entspricht 2,5 % des gesamten, in die Studie einbezogenen, Patientenkollektivs. Betrachtet man ausschließlich jene Patientinnen, die mindestens 5 Jahre nachbeobachtet wurden, beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate 94,4 %. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen ermittelt (Maessen 1998, Horiguchi 2002). Eine relative Überlebensrate von 88,3 % konnte Bayerl z.B. in einer retrospektiven Studie mit 270 Patientinnen nach 5 Jahren feststellen (Bayerl 2001). In einer Arbeit von Nottage betrug die 5-Jahres-Überlebensrate 95 % und ist damit direkt mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar (Nottage 2006).

### **6.6 Genexpressionsanalyse**

Im 2. Teil der vorliegenden Arbeit wurden die zirkulierenden Tumorzellen bei 9 Patientinnen im Hinblick auf ihre Genexpression untersucht. Dabei wurde die Expression 11 ausgewählter

Gene (und zwei zusätzliche Genvarianten) mittels qRT-PCR und Gelelektrophorese jeweils vor und nach der RT analysiert. Es mussten insgesamt 131 EpCAM-positive Tumorzellen einzeln aufgesucht, isoliert, aufbereitet, mittels qRT-PCR-Analyse untersucht und das entstandene Genprodukt mittels Gelelektrophorese überprüft werden. Insgesamt konnten damit 1505 einzelne Messwerte mit diesem Verfahren generiert werden, wobei jeder Einzelzelle eine definierte Kopienzahl des jeweiligen Gens zugeordnet werden konnte.

Die einerseits hochspezifische Untersuchungstechnik der qRT-PCR (an Einzelzellen) und die damit verbundene Möglichkeit hochsensitiver Genaktivitätsmessung besaß jedoch den Nachteil der starken Streuung (gemessene Zellaktivitäten). Aus diesem Grund wurde das *housekeeping*-Gen GAPDH lediglich als interner Standard verwendet (siehe Kapitel 5.2.1). Die gemessenen GAPDH-Kopienzahlen wurden als Absolutwerte abgebildet, gemittelt und ins Verhältnis zueinander gesetzt. GAPDH diente somit nicht als Referenzwert und es fand keine Normierung der einzelnen Genaktivitäten statt.

Die nachgewiesenen Kopienzahlen der Einzelzellen variierten deutlich und lagen zwischen nicht detektierbar (Her2/neu bei Pat. ID: 1) und 479,0 Kopien /  $\mu$ l (Nanog bei Pat. ID: 4). Die enorme Streubreite und die damit verbundenen hohen Werte der jeweiligen Standardabweichungen sind auf die Methode selbst zurückzuführen. Da die Messungen an Einzelzellen durchgeführt wurden, ist von einer starken Heterogenität der Genexpression auszugehen. Deshalb wurden auch aus den einzelnen Messwerten der anderen Gen-Kopien zunächst die Mittelwerte gebildet und danach zueinander ins Verhältnis gesetzt. Der daraus resultierende Quotient diente als Maß für die Genaktivitätssteigerung bzw. den Expressionsverlust und ist v.a. als tendenzieller, nicht aber absoluter, Wert zu verstehen. Um allgemeingültige Aussagen hinsichtlich des Genaktivitätsverhaltens treffen zu können, benötigt man eine größere Stichprobe der zu untersuchenden Zellen. Prognostische Aussagen bzgl. der Entstehung von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen aus den einzelnen Zellen können aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden. Die bisherigen Ergebnisse sprechen jedoch eindeutig dafür, dass eine RT direkten Einfluss auf die Aktivität der CETC ausübt und diese erhöht. Entgegen aller Erwartungen befinden sich die vom Primärtumor in den Blutkreislauf ausgeschwemmten, vitalen Zellen bzgl. der untersuchten Gene auf einem höheren Genaktivitätsniveau als vor der RT. Aus den vorliegenden Ergebnissen können, vor allem im Hinblick auf die untersuchten Adhäsionseigenschaften der Tumorzellen, wichtige Informationen über Metastasierungsvorgänge abgeleitet werden.

Zusätzlich zur Genexpressionsanalyse wurde bei allen Patientinnen auch die quantitative Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen bestimmt. Diese korrelierte sehr stark mit den ermittelten Veränderungen der Genexpression. Es kann einerseits davon ausgegangen werden, dass sich durch die RT nicht nur Zellen aus okkulten Residuen ablösen und in die Blutbahn übergehen bzw. dort zirkulieren, sondern auch eine gesteigerte Stoffwechselaktivität dieser Zellen zu verzeichnen ist. Die davon betroffenen Gene werden im Folgenden detaillierter erläutert.

### **6.6.1 GAPDH (Housekeeping-Gen)**

GAPDH wird ubiquitär exprimiert und ist als Schlüsselenzym der Glykolyse an zahlreichen, z.T. proliferativen, Stoffwechselfvorgängen beteiligt (Goldsworthy 1999). Eine erhöhte Expression spricht für einen insgesamt gesteigerten Zellstoffwechsel der Tumorzellen. Da GAPDH auch an DNA-Reparaturmechanismen mitwirkt, könnte eine posttherapeutische Überexpression bedeuten, dass die Tumorzellen „versuchen“ die bewirkten Strahlenschäden (DNA-Strangbrüche) zu kompensieren (Sirover 1999). Ein direkter Zusammenhang zwischen der GAPDH-Expression und der Zellproliferation bzw. Tumoraggressivität wird diskutiert (Revillion 2000).

In der vorliegenden Arbeit diene GAPDH in erster Linie zur Evaluation der eingesetzten Untersuchungsmethoden.

### **6.6.2 EpCAM**

Bei EpCAM handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, welches u.a. für diagnostische Zwecke von besonderem Interesse ist. Desweiteren scheint es nicht unerheblich an Metastasierungsvorgängen beteiligt zu sein (Balzar 1999).

Durch eine Überexpression kommt es zur Verstärkung von Zellmigrations-, differenzierungs-, interaktions- und Proliferationsprozessen. Außerdem werden die Proto-Onkogene wie c-myc und die Cycline A und E vermehrt induziert (Litvinov 1997). Dadurch wiederum erhöht sich die Zellproliferations- und Zellteilungsrate, welche ihrerseits das weitere Tumorwachstum begünstigen (Münz 2004, Mätzel 2009).

Beim Kolonkarzinom z.B. wird EpCAM, im Rahmen von klinischen Studien, bereits als Zielmolekül für immuntherapeutische Ansätze eingesetzt (Hao 2013). Möglicherweise könnte der Nachweis einer erhöhten EpCAM-Expression später auch beim MK therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen.

### **6.6.3 NANOG**

Bei NANOG handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor aus der Familie der homöotischen Gene, der in die Kontrolle der Selbsterneuerung von Stammzellen involviert ist (Chambers 2003).

Die Ausschaltung des NANOG-Gens bewirkt die Differenzierung der betroffenen Zelle, weshalb dem Gen eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Pluripotenz zukommt (Darr 2006, Zhang 2006, Takahashi 2006). Die Überexpression in den CETC ist daher von besonderem Interesse. Offenbar sind die Tumorzellen bestrebt die Pluripotenz im Rahmen der RT aufrecht zu erhalten um sich dadurch Überlebensvorteile zu sichern. An dieser Stelle sei nochmals auf einen möglichen Zusammenhang zu Tumorstammzellen verwiesen, welche bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Radio- bzw. Chemotherapien eine wichtige Rolle spielen (Xia 2002, Luzhna 2013). Eine Überexpression von NANOG legt einen diesbezüglichen Zusammenhang nahe.

### **6.6.4 Bcl-2**

Dem Proto-Onkogen Bcl-2 wird eine Schlüsselfunktion bei der Inhibition von Apoptosemechanismen zugeschrieben (Laurenzi 2000). Seine Expression sinkt im Allgemeinen mit zunehmender Zelldifferenzierung (McDonnell 1993). Eine Überexpression wird beim MK zwar mit einer günstigen Prognose assoziiert, allerdings wird Bcl-2 auch mit der Entwicklung von Zytostatikaresistenzen in Verbindung gebracht (Martínez-Arribas 2007, Tabuchi 2009). Eventuell existiert auch in diesem Fall eine Korrelation zwischen den CETC und den o.g. Tumorstammzellen.

### **6.6.5 TLR 4**

Der Toll-like Rezeptor 4 ist vor allem wegen seiner Bedeutung als Teil des angeborenen Immunsystems, insbesondere der Aktivierung bzw. Modulation des Antigen-spezifischen, erworbenen Immunsystems bekannt (Poltorak 1998, Rifkin 2005, Sabroe 2008).

Beim MK spielt die (Über-) Expression von TLR 4 aufgrund der Bildung eines inflammatorischen Mikromilieus der Tumorumgebung eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Tumorgenese, Progression, Metastasierung und Angiogenese (Yang 2010).

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Überexpression von TLR 4 legt die Hypothese nahe, dass die CETC in besonderer Weise ausgestattet sein müssen um manifeste Metastasen ausbilden zu können. Darüber hinaus wird deutlich, dass durch die verstärkte Zytokin- und



Chemokinproduktion eine körpereigene, adaptive Immunreaktion unterdrückt und eine Fernmetastasierung begünstigt wird (Bhattacharya 2011).

Die Kombination von Strahlen- und Immuntherapie ist Gegenstand aktueller Forschung (Formenti 2013). Mittels der in dieser Arbeit gewonnenen Daten, wird die bislang möglicherweise unterschätzte Bedeutung des Immunsystems für die Tumor- bzw. Fernmetastasenentstehung unterstrichen. Möglicherweise basiert die systemische Wirkung der RT insbesondere auf immunologischen Prozessen. Inwiefern eine strahleninduzierte Immunsuppression für die Entstehung von Fernmetastasen bzw. Lokalrezidiven verantwortlich zu machen ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abgeschätzt werden. Gleiches gilt für eine potenziell zur Anwendung kommende therapeutische Immunsupprimierung.

#### **6.6.6 COX-2**

Die Relevanz inflammatorischer Prozesse für die Entstehung von Fernmetastasen kann anhand der in dieser Arbeit nachgewiesenen COX-2-Überexpression verdeutlicht werden. Dem COX-2-Gen selbst wird eine Schlüsselrolle bei Entzündungsreaktionen aufgrund der Prostaglandin- und Thromboxansyntheseregulation zugeschrieben (Herschman 1996). Beim MK wird COX-2 in den eigentlichen Tumorzellen wie auch im umgebenden Stroma überexprimiert (Gupta 2000, Soslow 2000, Pan 2008). Die im Tumorgewebe gebildeten Prostaglandine können sowohl das Tumorstroma (Angiogenese, Immunsuppression) als auch die Tumorzellen direkt beeinflussen (Proliferation, Apoptoseinhibition, siehe Jones 1993, Tsujii 1998, Simmons 2004). Mit den Ergebnissen dieser Studie wird nicht nur die Überexpression des Gens bei CETC belegt, sondern auch die infolge der RT beobachtete zusätzliche Expressionssteigerung nachgewiesen. Die mit einer COX-2 evozierte Überexpression und die damit verbundene schlechtere Prognose bzw. Metastasierungsgefahr, könnte dadurch zusätzlich beeinflusst werden (Kim 2002).

#### **6.6.7 PIK3CA**

Das ubiquitär exprimierte Onkogen PIK3CA ist aufgrund der Aktivierung des PIK-Akt-Signalweges an einem breiten Spektrum zellulärer Funktionen beteiligt.

Hierzu gehören Zellwachstum, -proliferation, Migration, Motilität, Differenzierung und Zelladhäsion (Vivanco 2002, Lee 2005, Li 2006). Eine erhöhte Genexpression führt dementsprechend zu einer Steigerung der genannten Merkmale und kann die Tumorgenese

befördern (Buttitta 2005). Die in der Literatur beim MK angegebene Überexpression kann mit den vorliegenden Untersuchungen an CETC bestätigt werden. Da es unter der RT zu einer weiteren Erhöhung der Genexpression kam, bleibt offen, inwiefern Strahlentherapien vitale Tumorzellen zusätzlich aktivieren bzw. inwieweit die RT selbst als suffizient bezeichnet werden kann.

### **6.6.8 Her2/neu**

Her2/neu ist beim MK nicht nur von enormer diagnostischer und therapeutischer Bedeutung, das Gen spielt auch eine bei der Zellentwicklung, -proliferation und -differenzierung mittels Regulation des RAS-MAP-Kinase-Weges eine fundamentale Rolle (Ross 2003). Außerdem trägt es über den mTOR-Signalweg zur Hemmung von Apoptosemechanismen bei. Her2/neu-positive Tumoren sind im Allgemeinen mit einer besonders aggressiven Karzinogenese und einer signifikant verkürzten Überlebenszeit verbunden (Slamon 1987, Gabriel 2002). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Radiatio-bedingte Aktivierung der genetischen Expression könnte dahingehend interpretiert werden, dass die CETC eine gesteigerte Bereitschaft zur Tumorprogression und Metastasierung aufweisen (Slamon 1989, Hynes 1994, Ross 1998).

### **6.6.9 Vimentin**

Als Intermediärfilament dient Vimentin der Zellstabilisierung, indem es zur Ausbildung eines suprazellulären Zytoskeletts und Sicherung der Gewebeintegrität aufgrund der Interaktion mit Adhäsionsstrukturen kommt (Herrmann 2003, Ivaska 2007).

Daneben verfügt es über putative Funktionen in Bezug auf Signaltransduktions-, Zelladhäsions-, und zelluläre Transportmechanismen und wird in klinischen Studien als Tumormarker verwendet (Franke 1987, Nieminen 2006, Ivaska 2007).

Ein besonders aggressives biologisches Tumorwachstum wurde bei der Überexpression von Vimentin in Studien zum MK beschrieben (Kokkinos 2007, Mandal 2008, Vora 2009). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten bestätigen die in der Fachliteratur berichtete Überexpression und weisen eine weitere Aktivitätssteigerung des Gens durch die RT nach. Die aufgetretene, vermehrte Genaktivität könnte auf Umbauvorgänge im Bereich des Tumorstomas hindeuten, welche es Tumorzellen erleichtern sich aus dem umgebenden Gewebe zu lösen und in den Blutkreislauf zu gelangen (Dutsch-Wicherek 2010). Insofern stellt die Genaktivierung im Rahmen der RT einen Ausgangspunkt für die potentielle Fernmetastasierung dar.

### **6.6.10 c-Met**

Ein durch c-Met kodierter Rezeptor bildet in Verbindung mit dem Liganden HGF ein physiologisch parakrin wirkendes System innerhalb der Signaltransduktion einer Zelle (Rosen 1995, Jeffers 1996). C-Met spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Geweberegeneration, Zell-Mitogenese, Zellbeweglichkeit und beim Zellwachstum (Bladt 1995, Annen 1996, Takayama 1997).

Ferner werden dem Gen Eigenschaften eines Proto-Onkogens zugeschrieben, in dem Sinne, dass der o.g. autokrine Stimulationsmechanismus eine Onkogenese begünstigen kann (Bellusci 1994, Scotlandi 1996, Hiscox 1997). Die onkogene Wirkung wird dabei als Folge mitogener und angiogener Signale gedeutet, welche ihrerseits die Invasivität und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen beeinflussen können (Di Renzo 1995, Jeffers 1996). Insofern war u.a. die Analyse der Expression des c-Met-Gens von besonderem Interesse für diese Arbeit. Zum einen bestätigte sich dabei die in der Fachliteratur bereits dargelegte Überexpression bei MK-Zellen (Camp 1999). Zum anderen stellt sich jedoch auch hier die Frage nach der Rolle der RT bezogen auf die Genaktivierung, zumal bei Betrachtung von c-Met eine deutliche Aktivitätszunahme nachgewiesen werden konnte.

### **6.6.11 Ki-67**

Ki-67 dient insbesondere beim MK als Tumor-Proliferationsmarker (Scholzen 2000). Wenngleich die Funktion des kodierten Proteins selbst als ungeklärt betrachtet wird, ist gezeigt worden, dass der Anteil Ki-67-positiver Tumorzellen an der Gesamtzellpopulation von prognostischer Relevanz für das MK ist (Jansen 1998). Eine Überexpression des Gens korreliert mit der zellulären Proliferationsrate und gibt dadurch Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorzellen (Gerdes 1983, Hou 2011). In dieser Arbeit konnte eine Aktivitätszunahme im Rahmen der RT beobachtet werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die überlebenden, vitalen CETC im Vergleich zum Zustand vor der RT eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen (Schlüter 1993, Duchrow 2001). Die gesteigerte Zellproliferation wiederum könnte die Entstehung von lokoregionären Rezidiven oder Fernmetastasen begünstigen.

### 6.6.12 Ursachen für die allgemeine Expressionssteigerung

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen konnte eine allgemeine Aktivitätszunahme der ausgewählten Gene beobachtet werden. Obwohl gerade mittels RT eine Zerstörung der stark proliferativen Tumorzellen beabsichtigt wird, scheint die RT ihrerseits auch Gen-aktivierende Eigenschaften zu besitzen (Withers 1999).

Unbekannt ist, welche molekularbiologischen Ursachen hierfür im Einzelnen eine Rolle spielen. Eventuell handelt es sich bei den detektierten CETC um strahlenresistente Tumorstammzellen, die nach abgeschlossener Behandlung ihre Zellaktivität in ihrer Gesamtheit steigern. Dieser Annahme widerspricht der Fakt, dass die Blutentnahmen direkt am Tag nach der letzten RT erfolgten. Bekanntermaßen reicht Therapie- und Nebenwirkungseffekt über den eigentlichen Behandlungszeitraum hinaus, weshalb zu diesem Messzeitpunkt ggf. noch Zellen nachgewiesen wurden, die im weiteren Verlauf nicht nachweisbar wären (Perez 1993, Rosen 1999, Sauer 2003, Stone 2003). Die gesteigerte Genexpression betroffener Tumorzellen würde dann einer Art „reaktiver Widerstandsreaktion“ entgegen der zytotoxischen Strahlenwirkung entsprechen (auf eine detailliertere Diskussion der zellulären, strahlenbiologischen Grundlagen wird an dieser Stelle verzichtet). Derartige Beobachtungen sind jedoch bislang nicht wissenschaftlich belegt.

Inwiefern es sich bei den untersuchten CETC um Tumorstammzellen handelt, ist nicht einfach zu beantworten. Einerseits wird das zur Markierung der CETC verwendete EpCAM-Molekül in Verbindung mit im gesunden Organismus vorhandenen Stammzellen gebracht (Stingl 2001, Gargett 2009, Jozefczuk 2010). Andererseits liegen bislang keine Literaturnachweise in Bezug auf EpCAM-positive Tumorstammzellen vor. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den analysierten CETC mit gesteigertem Genexpressionsprofil um strahlenresistente Subklone handelt, die über ein ausgeprägtes Differenzierungspotenzial verfügen. Bezogen auf die erläuterten Gene würden diese aktiven Zellen dann ein besonderes Risiko für die Entstehung von Lokalrezidiven und Fernmetastasen darstellen (an dieser Stelle sei auf den engen Zusammenhang zu den Ausführungen von Kapitel 6.5, 6.6 und 6.7 verwiesen).

Ferner steht die Frage offen, ob es sich bei den CETC um dem Primärtumor zugehörige Zellen handelt. Würden die Tumorzellen dem Primärtumor zugeordnet werden, wäre die allgemeine Genaktivitätssteigerung schwer nachvollziehbar, sollen doch gerade (auf direktem oder indirektem Wege) DNA-Schäden mittels RT evoziert werden (v.a. Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie oxidative DNA-Schäden, siehe Dewey 1995, Yarnold 1997). Eine paradoxerweise verstärkte Genexpression würde den Prinzipien der Strahlenbiologie

widersprechen und die gewünschten Therapieeffekte negieren. Derartige Überexpressionen kommen zwar im Falle von strahleninduzierten Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen vor (Rosen 1999); in der vorliegenden Arbeit wurde jedoch auch bei anderen Genen eine Überexpression beobachtet. Insofern liegt es nahe, dass auch die nach der RT detektierten CETC bereits vor der Behandlung im Blutkreislauf zirkulierten. Dennoch ist nicht gesichert, ob die nach der RT gemessenen Zellen den vor der Therapie detektierten CETC entsprechen. Zur Klärung dieser Fragestellungen wäre es in weiterführenden Untersuchungen sinnvoll auch ortständige Zellen zu analysieren und mit dem Expressionsprofil der CETC zu vergleichen. Mittels Stanzbiopsie könnten einzelne in der Brust bzw. Brustwand verbliebene Tumorzellen gesichert und hinsichtlich ihrer genetischen Expressionsmuster untersucht werden. Anhand dieser Ergebnisse könnten anschließend detailliertere Aussagen hinsichtlich der lokalen und systemischen Wirkung der RT getroffen werden. Welche systemisch wirksamen Bestrahlungsfaktoren für die Zellaktivierung im Detail verantwortlich sind, ist bislang wissenschaftlich nicht aufgeklärt.

Von den zur Bestrahlung der Brustdrüse eingesetzten 50 Gy Gesamtdosis erreichen ca. 3 % die übrigen Körperteile. Dies entspricht einer Durchlassstrahlung von etwa 1,5 Gy. Eine solche Gesamtdosis wird im Allgemeinen nicht als ausreichend angesehen um Tumorzellen zu eliminieren bzw. deren Genaktivität zu beeinflussen (entsprechend der DIN-Norm; Stone 2003).

Ebenso unklar ist, ob die unmittelbar nach erfolgter RT beobachtete Genaktivitätssteigerung zu einem späteren Zeitpunkt wieder abnimmt. Denkbar wäre, dass die CETC trotz der initial erhöhten Expression im weiteren klinischen Verlauf in einen „schlafähnlichen Zustand“ (cell dormancy) übergehen und erst nach einer längeren Latenzphase erneut proliferieren und ggf. Metastasen evozieren (Meltzer 1990, Al-Haji 2003). Die RT könnte in diesem Falle als Auslöser einer Zellaktivität gelten, dessen zytotoxischer Effekt jedoch nicht hinreichend stark ist um einen Zelluntergang herbeizuführen. Durch o.g. Regenerationsmechanismen (EpCAM, c-Met) könnten die CETC in der Lage sein Strahlenschäden zu reparieren, um auch noch nach Jahren als vitale CETC im Blutkreislauf zu zirkulieren (Thacker 1986, Ward 1999, Sauer 2003). Dies würde die jahrelange Latenzphase zwischen abgeschlossener Therapie und dem Auftreten von Fernmetastasen erklären.

Für die adjuvante Chemotherapie und auch RT wurden diesbezüglich bereits Resistenzmechanismen bestimmt (Nahta 2006, Ritter 2007). Derartig ausgestattete Zellen sind möglicherweise lange überlebensfähig, verfügen auch noch nach Jahren über die Fähigkeit

zur Absiedelung und sind deshalb von speziellem Interesse in Bezug auf Metastasierungsprozesse (Komarova 2005). In Anlehnung an die vorliegende Arbeit könnte ein Ziel künftiger Untersuchungen darin bestehen, Gene zu identifizieren, welche in direktem Zusammenhang mit der strahlentherapeutischen Wirkung stehen und Aussagen in Bezug auf die Beeinflussbarkeit ihrer Aktivität erlaubt (El-Awady 2010). Ansatzweise ist dies im Rahmen experimenteller Studien beim sogenannten POLQ-Gen bereits gelungen. Mittels molekularbiologischer Blockade des Gens konnte die Sensibilität der Tumorzellen bzgl. einer RT erhöht werden (Higgins 2010). Um frühzeitige Vorhersagen bzgl. eines Therapieansprechens treffen zu können genügt jedoch nicht die Analyse eines einzigen Parameters oder Genes. Neben DNA-Reparaturmechanismen müssen viele weitere strahlenrelevante Zellfunktionen untersucht werden. Dazu gehört, neben den in dieser Arbeit vorgestellten Genexpressionsanalysen, bestimmte funktionelle Parameter, wie z.B. Analysen der strahleninduzierten Apoptose und des Zellzyklusarrestes oder die Untersuchung der Kapazität zwecks Entgiftung der strahleninduzierten radikalen Sauerstoffspezies zu ermitteln und die Ursachen der hervorgerufenen genomischen Instabilität zu erforschen. Schließlich ist ein Vergleich von den auf zellulärer Ebene gewonnenen Daten mit den klinischen Ergebnissen notwendig, um alle Patientinnen, die von einer RT profitieren, von denjenigen zu unterscheiden, bei welchen es nicht zum gewünschten Therapieeffekt oder nachteiligen Ergebnissen kommt (Tucker 1996). Zur Optimierung der therapeutischen Maßnahmen, z.B. durch Erhöhung der Strahlensensibilität bzw. Vermeidung von Strahlenresistenz, bzw. damit verbundenen Verbesserung des klinischen Outcomes der Patientinnen, sind dringend weitere Untersuchungen erforderlich. Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Ergebnisse können hierfür als Grundlage dienen. Für künftige Untersuchungen wären größere Probandenzahlen empfehlenswert.

### **6.7 Relevanz der CETC im klinischen Alltag**

Zur Behandlung des MKs existiert, aufgrund seiner individuellen Ausprägung und starken Variabilität, kein allumfassendes Therapiekonzept (Tkaczuk 2009). Aufgabe der Ärzte ist es deshalb, die für die jeweilige Patientin bestgeeignete, auf dem individuellen klinischen Risikoprofil basierende, therapeutische Intervention festzulegen. Radio-, Chemo- und Hormontherapie sind fester Bestandteil der adjuvanten Behandlung von Mammakarzinompatientinnen und führen, statistisch betrachtet, zu verbesserten Ereignis-freien Überlebenszeiten (EBCTCG: Darby 2011).

Abgesehen von retrospektiven, rein statistischen Analysen gibt es bislang kein anerkanntes Konzept zur Therapieverlaufskontrolle für Brustkrebspatientinnen (Müller 2005). Insofern ist es wissenschaftlich von Interesse z.B. im Blut befindliche, zirkulierende Tumorzellen als möglichen Verlaufparameter hinsichtlich deren Relevanz für die Prognostik, Risikoabschätzung, Therapieeffektivität und Kontrolle des Krankheitsverlaufes zu untersuchen. Die dafür erforderliche Probengewinnung kann ohne größeren Aufwand durchgeführt werden und wird von den Patientinnen, im Unterschied zur Knochenmarkspunktion z.B. (Gewinnung von disseminierten Tumorzellen), besser toleriert.

In den vergangenen Jahren konnten vor allem beim metastasierten MK mittels Detektion von CETC zahlreiche Erkenntnisse über deren Verhalten gesammelt werden (Ring 2004, Cristofanilli 2004, Pachmann 2005, Fehm 2009). Aber auch hinsichtlich Forschungsarbeiten zum primär nicht metastasierten MK gibt es zunehmend mehr Untersuchungen. Verwiesen sei auf Pachmann oder Oierga, welche einen direkten Zusammenhang zwischen dem biochemischen Nachweis von CETC und der klinischen Prognose bzw. Entstehung von Lokalrezidiven und Fernmetastasen, nachgewiesen haben (Pachmann 2008, Oierga 2008). Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der CETC als klinischer Verlaufparameter. Die Hypothese, dass mit einem peritherapeutischen Anstieg der CETC ein prognostisch ungünstiger klinischer Verlauf einhergeht (verkürzte Ereignis-freie Überlebenszeit, vermehrtes Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen innerhalb des 5-jährigen Beobachtungszeitraumes), konnte mittels Beobachtung der CETC-Verläufe im Rahmen der RT bestätigt werden. Die Ergebnisse des Log-Rang-Testes und der COX-Regression lieferten jeweils signifikante p-Werte. Betont sei nochmals, dass die prognostische Aussagekraft des CETC-Verlaufes von besonderer Bedeutung für das Auftreten von Fernmetastasen, weniger für die Entstehung von Lokalrezidiven, ist. Der durch die RT erzielte Effekt einer verbesserten lokalen Kontrolle scheint sich in diesen Ergebnissen widerzuspiegeln (Poetter 2007, EBCTCG: Darby 2011). Zwar war die Zahl der Lokalrezidive bei steigender CETC-Zahl erhöht, das Risiko für die Entstehung von Fernmetastasen war im Vergleich dazu dennoch deutlich größer (Hölzel 2001).

In Kapitel 6.3 wurde bereits auf die für die Entstehung manifester Fernmetastasen notwendigen Voraussetzungen eingegangen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte bereits eine eindeutige Korrelation zwischen der quantitativen Anzahl der CETC und dem Auftreten von Metastasen hergestellt werden. Untersuchungen zur Rolle dabei wirksamer molekularer Mechanismen und Zelleigenschaften könnte z.B. Gegenstand weiterer

Untersuchungen sein. Es ist zu konstatieren, dass jene Patientinnen, deren gemessene CETC-Konzentration im Rahmen der RT zunahm, ein signifikant schlechteres Outcome hatten. Interessanterweise waren insbesondere diejenigen Patientinnen benachteiligt, deren Zellverlauf nur mäßig anstieg. Eine mögliche Erklärung für diese paradox erscheinende Beobachtung könnte sein, dass bei stark zunehmenden CETC das Ausgangsniveau der Zellzahl niedriger war als bei nur mäßigem Zellzahl-Anstieg. Zwar konnte von der absoluten CETC-Anzahl keine prognostische Aussagekraft abgeleitet werden. Die alleinige Betrachtung der Zelländerungsamplitude scheint hierbei jedoch keine hinreichende Begründung zu liefern. Die Untersuchungen zur Ereignis-freien Überlebenszeit und Ereigniswahrscheinlichkeit unterstreichen die Annahme, dass Patientinnen mit steigendem CETC-Verlauf weniger von einer RT in Bezug auf die Entstehung von Fernmetastasen profitieren. Gründe hierfür könnten niedrigere Proliferationsraten EpCAM-positiver Zellen und Resistenzentwicklungen sein. Die Grenze der hier angewandten Methode liegt v.a. darin, dass es die zur Zellmarkierung verwendeten Antikörper nicht zulassen, eindeutig zwischen Tumorzellen und „gesunden“ epithelialen Zellen zu unterscheiden.

Neben molekularen Nachweismethoden wurden andere, spezifisch-analytische Detektionsverfahren entwickelt. Bislang existiert jedoch nur eine geringe Anzahl von Studien, welche neben quantitativen Analysen auch Untersuchungen zur Genexpression ausgewählter Gene (wie z.B. Her/2neu oder COX2 mittels qRT-PCR) durchgeführt haben (Fehm 2008).

Genetische Untersuchungen, welche mittels qRT-PCR an einzeln isolierten, zirkulierenden Tumorzellen vorgenommen wurden, stellen ein Novum dar. Dieses, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, praktizierte Verfahren wurde im Onkologischen Forschungslabor der FSU etabliert. Die EpCAM-positiven Zellen wurden dabei im Transfusionsmedizinischen Zentrum Bayreuth aufbereitet, isoliert, anschließend wieder dem Onkologischen Forschungslabor der FSU zugeführt und dort mittels qRT-PCR analysiert.

Bei allen mit diesem Verfahren untersuchten Patientinnen konnten CETC nachgewiesen und diese nachfolgend der genetischen Analyse unterzogen werden. Probleme bei der Anwendung des Verfahrens, seiner Durchführung bis hin zu Schwankungen in der Variabilität der Messwerte oder Präzision der Antikörperreaktion und anderer Primer-Sequenzen wurden entdeckt, diskutiert und analysiert.

Auch wenn es weiterer Verbesserungen in der Verfahrensentwicklung bedarf, konnte hiermit die Basis für künftige, diesbezügliche Genexpressionsanalysen in diesem Rahmen geschaffen werden. Inwiefern solche genetischen Analysen in der täglichen Praxis Eingang finden ist



jedoch, in Anbetracht des derzeitigen finanziellen Aufwands, fraglich. Für nachfolgende Forschungsarbeiten, beispielsweise mit Fragestellungen bzgl. des Einflusses von CETC auf Metastasierungsvorgänge, eignen sich die in dieser Arbeit angewandten Methoden.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass ein längerfristiges Therapiemonitoring anhand der hier vorgestellten Methoden sinnvoll erscheint. Ein Anstieg zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut von Patientinnen mit MK kann als Warnsignal aufgefasst werden und Anlass geben, bestehende Therapien zu überdenken, ggf. zu ändern, zu intensivieren oder andere diagnostische Schritte einzuleiten. Es ist zwar weder möglich, noch notwendig, alle CETC bei den betroffenen Patientinnen zu eliminieren, da auch mit konstant niedrigen bzw. sinkenden Tumorzellzahlen ein Ereignis-freies Überleben bzw. eine Komplettremission, sogar über einen längeren Zeitraum möglich ist (Meng 2004, Pachmann 2005). Die Kontrolle des Zellzahlverlaufes wäre aber in jedem Falle empfehlenswert um diagnostisch und therapeutisch rechtzeitig und rasch auf die Zellzahlanstiege von CETC bei den Patientinnen reagieren zu können.

## 7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Patientinnen mit einer im Rahmen der RT ansteigenden Anzahl von CETC häufiger Lokalrezidive und statistisch signifikant häufiger Fernmetastasen entwickeln. Dagegen zeichnen sich Patientinnen mit sinkender Anzahl von CETC nach durchgeführter RT durch ein besseres Outcome aus. Die Studie hat eindeutig gezeigt, dass eine Veränderung der Anzahl CETC mit der Ereignis-freien Überlebenszeit korreliert. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Messungen der CETC im peripheren Blut zum einen als Parameter für die Überprüfung des Ansprechens einer RT, zum anderen als Prognosefaktor für das Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen genutzt werden kann.

Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR an Einzelzellen konnte der Nachweis erbracht werden, dass die RT bei den CETC zu einer Steigerung ihrer Genaktivität führt. Dabei wurden die folgenden Gene untersucht: GAPDH, EpCAM, NANOG, Bcl-2, TLR 4, COX-2, PIK3CA, Her2/neu, Vimentin, c-Met und Ki-67. Die im Hinblick auf o.g. Gene untersuchten CETC zeichneten sich neben einem allgemein erhöhten Zellstoffwechsel, durch eine Überexpression von Genen aus, die an inflammatorischen und immunologischen Prozessen, Zellproliferations-, Zelladhäsion-, Zelldifferenzierungs- und Zellmigrationsmechanismen sowie an Vorgängen der Angiogenese, Apoptoseinhibition und dem Erhalt der zellulären Pluripotenz beteiligt sind. Insofern leisten die Ergebnisse dieser Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis jener Mechanismen, welche eine Fernmetastasierung begünstigen.

Die in der vorliegenden Dissertation vorgestellten Verfahren ermöglichen es disseminierende Brustkrebserkrankungen frühzeitig zu erkennen und eine diesbezügliche Verlaufsdagnostik, ebenso wie eine Qualitätskontrolle der RT, zu gewährleisten. Die im ersten Teil der Arbeit erläuterte quantitative Bestimmung der CETC stellt ein einfach handhabbares, für die Patienten gut zu tolerierendes und kostengünstiges Verfahren dar, welches sowohl im Rahmen von Therapiekontrollen, wie auch bei Studien zu Effektivitätskontrollen von bestimmten Medikamenten bzw. Behandlungsverfahren bzgl. epithelialer Tumorzellen eingesetzt werden kann.

Die Genexpressionsanalysen wiederum sind derzeit für ein Routine-Monitoring im klinischen Alltag ungeeignet. Sie können jedoch als Ausgangspunkt weiterer Forschungsarbeiten fungieren, welche die Entstehung und Beeinflussung von strahlentherapeutischen Resistenzen auf molekularbiologischer Ebene betrachten. Von gleicher Forschungsrelevanz wäre der Zusammenhang von CETC und Tumorstammzellen. Darüber hinaus erscheint es sinnvoll in weiterführenden Untersuchungen die nach erfolgter Operation in der Brust/Brustwand verbliebenen, ortständigen Tumorzellen zu analysieren und mit dem Expressionsprofil der CETC zu vergleichen. Anhand dieser Ergebnisse könnten anschließend detailliertere Aussagen hinsichtlich der lokalen und systemischen Wirkung der RT getroffen werden.

Die Grenze beider dargestellten Methoden liegt vor allem darin, dass bislang nicht eindeutig zwischen Tumorzellen und „gesunden“ epithelialen Zellen unterschieden werden kann. Die klinische Relevanz der vorliegenden Arbeit sollte daher bei künftigen Untersuchungen unter Anwendung größerer Probandenzahlen (Fälle) vorgenommen und analysiert werden.

## 8 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Abraham J, Zujewski J. 2001. Breast cancer. In J. Abraham & C. J. Allegra (Eds.), Bethesda handbook of clinical oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. S. 127-141.
- Aguirre-Ghiso JA. 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 7(11):834-46.
- Akimoto S, Ochiai A, Inomata M, Hirohashi S. 1998. Expression of cadherin-catenin cell adhesion molecules, phosphorylated tyrosine residues and growth factor receptor-tyrosine kinases in gastric cancers. *Jpn J Cancer Res*. 89(8):829-36.
- Albert US, und die Mitglieder der Planungskommission und Arbeitsgruppenleiter der Konzertierten Aktion Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland. 2008. Stufe-3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland, 1. Aktualisierung. München: Zuckschwerdt Verlag.
- Al-Ghazal SK, Fallowfield L, Blamey RW. 1999. Does cosmetic outcome from treatment of primary breast cancer influence psychosocial morbidity? *Eur J Surg Oncol*. 25 (6):571-573.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(7):3983-8.
- Alix-Panabieres C, Vendrell J-P, Pelle O, Rebillard X, Riethdorf S, Muller V, Fabbro M und Pantel K. 2007. Detection and Characterization of Putative Metastatic Precursor Cells in Cancer Patients. *Clin Chem*. 53:537-539.
- Allan AL, Keeney M. 2010. Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic. *J Oncol*. 2010:426218.
- Anderson SJ, Wapnir I, Dignam JJ, Fisher B, Mamounas EP, Jeong JH, Geyer CE Jr, Wickerham DL, Costantino JP, Wolmark N. 2009. Prognosis after ipsilateral breast tumor recurrence and locoregional recurrences in patients treated by breast-conserving therapy in five National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocols of node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 27(15):2466-2473.
- Annen K, Nojima T, Hata Y, Uchino J, Tanaka S, Matsuda M, Tahara E, Nagashima K. 1996. Analysis of the hepatocyte growth factor receptor in regeneration and oncogenesis of the liver. *Gen Diagn Pathol*. 141(3-4):179-86.
- Antolovic D, Galindo L, Carstens A, Rahbari N, Büchler MW, Weitz J, Koch M. 2010. Heterogeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different EpCAM-specific antibodies. *BMC Biotechnol*. 10:35.
- Antonini N, Jones H, Horiot JC, Poortmans P, Struikmans H, Van den Bogaert W, Barillot I, Fourquet A, Jager J, Hoogenraad W, Collette L, Pierart M, Hart G, Bartelink H. 2007.

- Effect of age and radiation dose on local control after breast conserving treatment: EORTC trial 22881-10882. *Radiother Oncol.* 82(3):265-271.
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjakoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 72(5):1117-1130.
- Ashworth T. 1869. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aus Med J.* 146-149.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 25:187-91.
- Armstrong A, Eck SL. 2003. EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther.* 2(4):320-6. Review.
- Arriagada R, Le MG, Contesso G, Guinebretiere JM, Rochard F, Spielmann M. 2002. Predictive factors for local recurrence in 2006 patients with surgically resected small breast cancer. *Ann Oncol.* 13(9):1404-1413.
- Arteaga CL und Osborne CK. 1991. Growth factors as mediators of estrogen/antiestrogen action in human breast cancer cells. *Cancer Treat. Res.* 53:289-304.
- Aziz D, Rawlinson E, Narod SA, Sun P, Lickley HL, McCready DR, Holloway CM. 2006. The role of reexcision for positive margins in optimizing local disease control after breast-conserving surgery for cancer. *Breast J.* 12(4):331-337.
- Bachmann S, Kriz W, Kuhn C, Franke WW. 1983. Differentiation of cell types in the mammalian kidney by immunofluorescence microscopy using antibodies to intermediate filament proteins and desmoplakins. *Histochemistry.* 77:365-94.
- Baeuerle PA, Gires O. 2007. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer.* 96(3):417-423. Review.
- Baeuerle PA, Reinhardt C. 2009. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therap. *Cancer Res.* 69(12):4941-4.
- Ballard-Barbash R, Forman MR, Kipnis V. 1999. Dietary fat, serum estrogen levels, and breast cancer risk: a multifaceted story. *J Natl Cancer Inst.* 91(6):492-4.
- Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. 1999. The biology of the 17-1A antigen (EpCAM). *J Mol Med.* 77(10):699-712.
- Banys M, Müller V, Melcher C, Aktas B, Kasimir-Bauer S, Hagenbeck C, Hartkopf A, Fehm T. 2013. Circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Chim Acta.* 423:39-45.

- Barber R, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics*. 21:389-395.
- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. 2003. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*. 21(10):1973-9.
- Barroso I, Benito B, Garcia-Jimenez C, Hernandez A, Obregon MJ, Santisteban P. 1999. Norepinephrine, tri-iodothyronine and insulin upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA during brown adipocyte differentiation. *Eur J Endocrinol*. 141:169-179.
- Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P, Struikmans H, Van den Bogaert W, Barillot I, Fourquet A, Borger J, Jager J, Hoogenraad W, Collette L, Pierart M. 2001. Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *N Engl J Med*. 345 (19):1378-1387.
- Bartelink H, Horiot JC, Poortmans PM, Struikmans H, Van den Bogaert W, Fourquet A, Jager JJ, Hoogenraad WJ, Oei SB, Warlam-Rodenhuis CC, Pierart M, Collette L. 2007. Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10- year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *J Clin Oncol*. 25(22):3259-3265.
- Bayerl A, Frank D, Lenz A, Hoss C, Lukas P, Feldmann HJ, Molls M. 2001. Local tumor control and cosmetic outcome following breast-conserving surgery and radiation up to a total dose of 56 Gy without boost in breast cancer. *Strahlenther Onkol*. 177(1):25-32.
- Becker H, Chang-Claude J. 1996. Estimating population-specific disease risks for a given family history with an application to breast cancer. *Fenet Epidemiol*. 13:229-242.
- Bellusci S, Moens G, Gaudino G, Comoglio P, Nakamura T, Thierry JP, Jouanneau J. 1994. Creation of an hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in carcinoma cells induces invasive properties associated with increased tumorigenicity. *Oncogene*. 9(4):1091-9.
- Bergsagel PL, Victor-Kobrin C, Timblin CR, Trepel J, Kuehl WM. 1992. A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells. *J Immunol*. 148(2): 590-6.
- Berry M, Boulton A. 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase and apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*. 60:150-154.
- Bhattacharya D, Yusuf N. 2011. Expression of Toll-Like Receptors on Breast Tumors: Taking a Toll on Tumor Microenvironment. *Int J Breast Cancer*. 2012:716564.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Sguzzi A, Birchmeier C. 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 376: 768-771.

- Blanks RG, Moss SM, McGahan CE, Quinn MJ, Babb PJ. 2000. Effects of NHS breast screening programme on mortality from breast cancer in England and Wales, 1990-8: comparison of observed with predicted mortality. *BMJ*. 16; 321(7262):665-9.
- Blichert-Toft M, Smola MG, Cataliotti L. 1998. O'Higgins N. Principles and guidelines for surgeons-management of symptomatic breast cancer. On behalf of the European Society of Surgical Oncology. *Ann Chir Gynaecol*. 87(1):101-109.
- Bloom HJG, Richardson WW. 1957. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 11(3): 359-377.
- Boeddinghaus IM und Dowsett M. 2001. Comparative clinical pharmacology and pharmacokinetic interactions of aromatase inhibitors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 79:85-91.
- Borkowski TA, Nelson AJ, Farr AG, Udey MC. 1996. Expression of gp40, the murine homologue of human epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), by murine dendritic cells. *Eur J Immunol*. 26(1):110-4.
- Bosma AJ, Weigelt B, Lambrechts AC, Verhagen OJ, Prunzel R, Hart AA, Rodenhuis S, van 't Veer LJ. 2002. Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes. *Clin Cancer Res*. 8(6):1871-7.
- Boughey JC, Suman VJ, Mittendorf EA, Ahrendt GM, Wilke LG, Taback B, Leitch AM, Kuerer HM, Bowling M, Flippo-Morton TS, Byrd DR, Ollila DW, Julian TB, McLaughlin SA, McCall L, Symmans WF, Le-Petross HT, Haffty BG, Buchholz TA, Nelson H, Hunt KK; Alliance for Clinical Trials in Oncology. 2013. Sentinel lymph node surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with node-positive breast cancer: the ACOSOG Z1071 (Alliance) clinical trial. *JAMA*. 310(14):1455-61.
- Boulton SJ. 2006. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans*. 34:633-45.
- Bria E, Nistico C, Cuppone F, Carlini P, Ciccarese M, Milella M, Natoli G, Terzoli E, Cognetti F und Giannarelli D. 2006. Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Cancer*. 106:2337-2344.
- Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G. 2000. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med*. 342(8):525-533.
- Braun S, Marth C. 2004. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer - toward individualized treatment? *N Engl J Med*. 351(8):824-6.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga J-Y, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer E-F, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GYC, Bliss J, Vincent-Salomon A und Pantel K. 2005. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 353:793-802.

- Bronner F, Mary Farach-Carson C. 2009. Bone and Cancer. *Springer Verlag London Limited*. 2009:107-109.
- Bundred NJ. 2001. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 27(3):137-14.
- Buttitta F, Felicioni L, Barassi F, Martella C, Paolizzi D, Fresu G, Salvatore S, Cuccurullo F, Mezzetti A, Campani D, Marchetti A. 2005. PIK3CA mutation and histological type in breast carcinoma: high frequency of mutations in lobular carcinoma. *J Pathol*. 208(3):350-355.
- Buttler T, Gullino P. 1975. Quantification of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res*. 35:512-516.
- Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 296(5573):1655-7.
- Carter CL, Allen C, Henson DE. 1989. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 63(1):181-187.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 348(17):1625-38.
- Catz SD, Johnson JL. 2003. BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis*. 8(1):29-37.
- Chambers AF, Naumov GN, Vantyghem SA, Tuck AB. 2000. Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. *Breast Cancer Res*. 2(6):400-407.
- Chambers AF, Groom AC und MacDonald IC. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer*. 2:563-572.
- Chambers I, Colby D. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 113(5):643-55.
- Camp RL, Rimm EB, Rimm DL. 1999. Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. *Cancer*. 86(11):2259-65.
- Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, Cristiano BE, Pearson RB, Phillips WA. 2004. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res*. 64(21):7678-81.
- Chang-Claude J, Ebg N, Becker H. 1994. Die Bedeutung genetischer Faktoren für die Entstehung von Brustkrebs. *Zentralbl Gynäkol*. 116:660-669.
- Chang-Claude J, Becker H, Hamann U, Schröder-Kurtz T. 1995. Risikoschätzung für das familiäre Auftreten von Brustkrebs. *Zentralbl Gynäkol*. 117:432-434.
- Chen D, Chung Y, Yeh Y, Chaung H, Kuo F, Fu O, Chen H, Hou M und Yuan S. 2006. Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. *Cancer Letters*. 237:109-114.



- Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y. 2005. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 366(9503):2087-2106.
- Collaborative Group (EBCTCG). 2005. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 366:2087-106.
- Colleoni M, Rotmensz N, Maisonneuve P, Sonzogni A, Pruneri G, Casadio C, Luini A, Veronesi P, Intra M, Galimberti V, Torrisi R, Andrighetto S, Ghisini R, Goldhirsch A, Viale G. 2007. Prognostic role of the extent of peritumoral vascular invasion in operable breast cancer. *Ann Oncol*. 18(10):1632-1640.
- Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C. 1994. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*. 79:679-94.
- Coumans FAW, Doggen CJM, Attard G, de Bono JS und Terstappen LWMM. 2010. All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Annals of Oncology*. 21:1851-1857.
- Christopherson WM. 1965. Cancer Cells in the Peripheral Blood: a Second Look. *Acta Cytol*. 9:169-174.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LWMM und Hayes DF. 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med*. 351:781-791.
- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MG, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW. 2005. Circulating tumor cells: A novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 23:1420-1430.
- Cristofanilli M, Mendelsohn J. 2006. Circulating tumor cells in breast cancer: Advanced tools for "tailored" therapy? *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(46):17073-4.
- Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R, Dawood S, Reuben JM, Kau SW, Lara JM, Krishnamurthy S, Ueno NT, Hortobagyi GN, Valero V. 2007. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer*. 7(6):471-9.
- Cristofanilli M. 2009. The biological information obtainable from circulating tumor cells. *Breast*. 18 Suppl 3:S38-40.
- Cristofanilli M, Fortina P. 2013. Circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 369(1):93.
- Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. 2006. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*. 133(6):1193-201.

- Davidson K, Cameron DA, Dillon P, Bowman A, Stewart M, Leonard RC. 1999. Locally advanced breast cancer. *Breast*. 8(3):110-5.
- Dawood S, Cristofanilli M. 2007. Integrating circulating tumor cell assays into the management of breast cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 8(1):89-95. Review.
- de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. 1999. Expression of EpCAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol*. 188(2):201-6.
- Dellagi K, Vainchenker W, Vinci G, Paulin D, Brouet JC. 1983. Alteration of vimentin intermediate filament expression during differentiation of human hemopoietic cells. *Embo J*. 2:1509-14.
- Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D und Burke JF. 2008. Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 10:R69-R69.
- Desprez PY, Poujol D, Saez S. 1992. Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: B-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). *Cancer Lett*. 64:219-224.
- Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. 1995. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 33 (4):781-796.
- Di Renzo MF, Olivero M, Katsaros D, Crepaldi T, Gaglia P, Zola P, Sismondi P, Comoglio PM. 1994. Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer. *Int J Cancer*. 58(5):658-62.
- Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S. 1995. Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 1(2):147-54.
- Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. 1992. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J Clin Oncol*. 10(10):1534-9.
- Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. 1996. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst*. 88(22):1652-8.
- Diel IJ, Kaufmann M, Solomayer EF, Wallwiener D, Gollan C, Goerner R, Kaul S, Costa SD, von Minckwitz G, Holle R, Bastert G. 1997. Prognostische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark im Vergleich zum Nodalstatus beim primären Mammakarzinom. *Geburtsh. u. Frauenheilk*. 57:333-341.

- Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G. 1998. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med.* 339(6):357-63.
- Dowsett M, Nielsen TO, A'hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF. 2011. Assessment of ki67 in breast cancer: recommendations from the international ki67 in breast cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 103(22):1656-1664.
- Duchrow M, Schmidt MH, Zingler M, Anemüller S, Bruch HP, Broll R. 2001. Suppression of cell division by pKi-67 antisense-RNA and recombinant protein. *Cell Physiol Biochem.* 11:331-338.
- Dutsch-Wicherek M. 2010. RCAS1, MT1, and vimentin as potential markers of tumor microenvironment remodeling. *Am J Reprod Immunol.* 63(3):181-188.
- Earl H and Iddawela M. 2004. Epirubicin as adjuvant therapy in breast cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 4(2):189-195.
- EBCTCG. 2005. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 365:1687-1717.
- EBCTCG: Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. 2011. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet.* 378(9804):1707-1716.
- EBCTCG: Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C, Wang YC, Bergh J, Di Leo A, Albain K, Swain S, Piccart M, Pritchard K. 2011. Comparisons between different polychemotherapy regimes for early breast cancer: metaanalysis of long-term outcome among 100000 women in 123 randomised trials. *Lancet.* 379(9814):432-44.
- EBCTCG: Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R. 2011. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 378(9793):771-784.
- EBMG. Evidence-Based Medicine Guidelines. 2006. Article ID: evd02580 (025.023).
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 127(3):514-25.
- El-Awady RA, Saleh EM, Dahm-Daphi J. 2010. Targeting DNA double-strand break repair: is it the right way for sensitizing cells to 5-fluorouracil? *Anti-Cancer Drugs.* 21:277-287.
- Elkhuizen PH, van de Vijver MJ, Hermans J, Zonderland HM, van de Velde CJ, Leer JW. 1998. Local recurrence after breast-conserving therapy for invasive breast cancer: high

- incidence in young patients and association with poor survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 40 (4):859-867.
- Ellis PA, Saccani-Jotti G, Clarke R, Johnston SR, Anderson E, Howell A, A'Hern R, Salter J, Detre S, Nicholson R, Robertson J, Smith IE und Dowsett M. 1997. Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int. J. Cancer.* 72:608-613.
- Elston CW, Ellis IO. 1991. 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.* 19(5):403-410.
- Engers R. and Gabbert H. 1998. Basismechanismen der Metastasierung. *Onkologe.* 4,8:682-88.
- Eucker J, Emde A, Possinger K. 2006. Therapie des Mammakarzinoms: Vom Hormon bis zum Antikörper. *Internist (Berl).* 47(12):1223-4, 1226-8.
- Ezeh UI, Turek PJ. 2005. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer.* 104(10): 2255-65.
- Falck AK, Bendahl PO, Ingvar C, Isola J, Jönsson PE, Lindblom P, Lövgren K, Rennstam K, Fernö M, Rydén L. 2012. Analysis of and prognostic information from disseminated tumour cells in bone marrow in primary breast cancer: a prospective observational study. *BMC Cancer.* 12:403.
- Fearon ER und Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61:759-767.
- Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi M, Hesselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C, Uhr J. 2002. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res Vol 8.* 7:2073-84.
- Fehm T, Solomayer EF. 2004. Genotypisierung von disseminierten epithelialien Zellen bei Mammakarzinom-Patientinnen. *Geburtsh Frauenheilk.* 64:255-260.
- Fehm T, Müller V, Alix-Panabieres C, Pantel K. 2008. Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance. *Breast Cancer Res.* 10 (Suppl 1):S1.
- Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer E, Wallwiener D, Kimmig R und Kasimir-Bauer S. 2009. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Research.* 11(4):R59.
- Ferracini R, Olivero M, Di Renzo MF, Martano M, De Giovanni C, Nanni P, Basso G, Scotlandi K, Lollini PL, Comoglio PM. 1996. Retrogenic expression of the MET proto-oncogene correlates with the invasive phenotype of human rhabdomyosarcomas. *Oncogene.* 12(8):1697-705.

- Fidler IJ. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 3:453-458.
- Fisher B, Constantino J, Redmond C. 1993. Lumpectomy compared with lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer. *N Engl J Med*. 328:1581-1586.
- Fisher B, Anderson S. 1994. Conservative surgery for the management of invasive and noninvasive carcinoma of the breast: NSABP trials. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. *World J Surg*. 18(1):63-69.
- Fisher B, Jeong JH, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. 2002. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med*. 347(8):567-575, 1233-1241.
- Foss O, Brennhovd I, Messelt T, Efskind J, Liverud K. 1965. Invasion of tumor cells into the bloodstream caused by palpation or biopsy of the tumor. *Surgery*. 53:691-695.
- Formenti SC, Demaria S. 2013. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: a paradigm shift. *J Natl Cancer Inst*. 105(4):256-65.
- Franke WW, Hergt M, Grund C. 1987. Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell*. 49:131-41.
- Funke I, Schraut W. 1998. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol*. 16(2):557-66.
- Fyles AW, McCready DR, Manchul LA, et al. Tamoxifen with or without breast irradiation in women 50 years of age or older with early breast cancer. 2004. *N Engl J Med*. 351:963-70.
- Gabriel B, Fischer D-C, Kieback DG. 2002. Molecular Mechanisms in Signal Transduction: New Targets for the Therapy of Gynecologic Malignancies. *Onkologie*. 25:240-247.
- Gaforio JJ, Serrano MJ, Rovira PS, Sirvent A, Rodriguez MD, Campos M, De La Torre N, Algara I, Duenas R, Lozano A. 2003. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer*. 107:984-990.
- Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. 2009. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod*. 80(6):1136-45.
- Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, Barbareschi M, Boracchi P, Marubini E, Pozza F. 1994. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 12(3):454-466.

- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 31(1):13-20.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 133:1710-1715.
- Gerondakis S, Grumont RJ, Banerjee A. 2007. Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol Cell Biol*. 85(6):471-5.
- Gianni L, Dafni U, Gelber RD, Azambuja E, Muehlbauer S, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Baselga J, Jackisch C, Cameron D, Mano M, Pedrini JL, Veronesi A, Mendiola C, Pluzanska A, Semiglazov V, Vrdoljak E, Eckart MJ, Shen Z, Skiadopoulos G, Procter M, Pritchard KI, Piccart-Gebhart MJ, Bell R. 2011. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 12(3):236-244.
- Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Holen I. 2004. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol*. 57:903-911.
- Glaves D. 1983. Correlation between circulating cancer cells and incidence of metastasis. *Br.J. Cancer*. 48:665-673.
- Glaves D, Huben RP, Weiss L. 1988. Haematogenous dissemination of cells from human renal adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 57(1):32-5.
- Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, de la Torre N, Algarra I, Dueñas R, Lozano A. 2003. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer*. 107(6):984-90.
- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. 2001. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and non-invasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem*. 295(1):17-21.
- Goldberg JI, Borgen PI. 2006. Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther*. 6(8):1205-1214.
- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. 2011. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 22(8):1736-1747.
- Goldsworthy S, Goldsworthy T, Sprankle C, Butterworth B. 1993. Variation in expression of genes used for normalization of Northern blots after induction of cell proliferation. *Cell Prolif*. 26:511-518.

- Goss P, Allan AL, Rodenhiser DI, Foster PJ, Chambers AF. 2008. New clinical and experimental approaches for studying tumor dormancy: does tumor dormancy offer a therapeutic target? *APMIS*. 116(7-8):552-68.
- Grabenbauer GG. 2004. Internal mammary nodes in invasive breast carcinoma – to treat or not to treat? *Strahlenther Onkol*. 180:690–4.
- Graven KK, Troxler RF, Kornfeld H, Panchenko MV, Farber HW. 1994. Regulation of endothelial cell glyceraldehydaldehyd-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *J Biol Chem*. 269(39):24446-24453.
- Graves H, Czerniecki BJ. 2011. Circulating tumor cells in breast cancer patients: an evolving role in patient prognosis and disease progression. *Patholog Res Int*. 2011:621090.
- Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL, Ziegler LD, Frye DK, Buzdar AU. 1996. Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 14(8):2197-205.
- Greene F, Page D, Fleming I, Fritz A, Balch C, Haller D, Morrow M. 2002. AJCC cancer staging handbook. 6. Aufl. Springer-Verlag New York.
- Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. 2009. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol*. 40(10):1365-76.
- Gupta GP und Massagué J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 127:679-695.
- Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. 2000. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate*. 42:73-78.
- Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. 1994. Down-Regulation of bcl-2 by p53 in Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 54(8):2095-7.
- Hall C, Krishnamurthy S, Lodhi A, Bhattacharyya A, Anderson A, Kuerer H, Bedrosian I, Singh B, Lucci A. 2012. Disseminated tumor cells predict survival after neoadjuvant therapy in primary breast cancer. *Cancer*. 118(2):342-8.
- Hamazaki T, Oka M. 2004. Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation. *J Cell Sci*. 117(Pt 23):5681-6.
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. 2010. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 28(16):2784-2795.
- Hao H, Zhen Y, Wang Z, Chen F, Xie X. 2013. A novel therapeutic drug for colon cancer: EpCAM scFv-truncated protamine (tp)-siRNA. *Cell Biol Int*. 37(8):860-4.

- Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, Lisboa B, Sweep C, Janicke F, Thomssen C. 2009. Final 10-year analysis of prospective multicenter Chemo N0 trial for validation of ASCO-recommended biomarkers uPA/PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* (27):15s (suppl; abstr. 511).
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF und Bast RC. 2007. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 25:5287-5312.
- Hart AH, Hartley L. 2005. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer.* 104(10): 2092-8.
- Hartkopf AD, Taran FA, Wallwiener M, Hagenbeck C, Melcher C, Krawczyk N, Hahn M, Wallwiener D, Fehm T. 2013. The presence and prognostic impact of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells in the bone marrow of primary breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 15(5):R94.
- Hekimian K, Stein EL, Pachmann U, Pachmann K. 2012. Demasking of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) on circulating epithelial tumor cells by Tween® 20 treatment in breast cancer patients. *Clin Chem Lab Med.* 50(4):34-42.
- Hellman S. 1997. Stopping metastases at their source. *N Engl J Med.* 337(14):996-997.
- Herrmann H, Hesse M, Reichenzeller M, Aebi U, Magin TM. 2003. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol.* 223:83-175.
- Herschman HR. 1996. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta.* 1299:125-140.
- Higgins GS, Harris AL, Prevo R, Helleday T, McKenna WG, Buffa FM. 2010. Overexpression of POLQ confers a poor prognosis in early breast cancer patients. *Oncotarget.* 1(3):175-84.
- Hill-Kayser CE, Harris EE, Hwang WT, Solin LJ. 2006. Twenty-year incidence and patterns of contralateral breast cancer after breast conservation treatment with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 66(5):1313-1319.
- Hirose Y, Kojima M, Sagoh M, Hayashi T, Murakami H, Shimazaki K, Yoshida K, Kawase T. 1998. Clinical importance of c-Met protein expression in high grade astrocytic tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 38(12):851-8; discussion 858-9.
- Hiscox SE, Hallett MB, Puntis MC, Nakamura T, Jiang WG. 1997. Expression of the HGF/SF receptor, c-met, and its ligand in human colorectal cancers. *Cancer Invest.* 1997;15(6):513-21.
- Hla T, Neilson K. 1992. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 7384-7388.
- Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. 1991. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 6961-6965.



- Hockenbery DM, Oltvai Z, Yin X, Millman C, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 75:241-251.
- Hölzel D, Engel J, Schmidt M, Sauer H. 2001. A model for primary and secondary metastasis in breast cancer and the clinical consequences. *Strahlenther Onkol*. 177(1):10-24.
- Hofmann W, Schlag PM. 2000. BRCA1 and BRCA2 - breast cancer susceptibility genes. *J Cancer Res Clin Oncol*. 126(9):487-96.
- Holland R, Veiling SH, Mravunac M. 1985. Histologic multifocality of Tis, T1-2 breast carcinomas. Implications for clinical trials of breast conserving surgery. *Cancer*. 56:979-990.
- Holmgren L, O'Reilly MS und Folkman J. 1995. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*. 1:149-153.
- Hoon DSB, Ferris R, Tanaka R, Chong KK, Alix-Panabières C und Pantel K. 2011. Molecular mechanisms of metastasis. *J Surg Oncol*. 103:508-517.
- Horiguchi J, Koibuchi Y, Takei H, Yokoe T, Yamakawa M, Nakajima T, Oyama T, Iino Y, Morishita Y. 2002. Breast-conserving surgery following radiation therapy of 50 Gy in stages I and II carcinoma of the breast: the experience at one institute in Japan. *Oncol Rep*. 9(5):1053-1057.
- Hou YY, Cao WW, Li L, Li SP, Liu T, Wan HY, Liu M, Li X, Tang H. 2011. MicroRNA-519d targets MKi67 and suppresses cell growth in the hepatocellular carcinoma cellline QGY-7703. *Cancer Lett*. 307(2):182-90.
- Houlston RS, Peto J. 2004. The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene*. 23(38):6471-6476.
- Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Dixon JM, Irwig L, Brennan ME, Solin LJ. 2010. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer*. 46(18):3219-3232.
- Hudis CA. 2007. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 357(1):39-51.
- Hunter KW. 2004. Host genetics and tumour metastasis. *Br J Cancer*. 90(4):752-755.
- Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A. 2001. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer*. 8(3):151-159.
- Hynes NE, Stern DF. 1994. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1198(2-3):165-84.
- Igvarsson S. 1999. Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin Cancer Biol*. 9(4):277-288.

- Independent UK Panel on Breast Cancer Screening. 2012. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. *The Lancet*. Vol. 380, Issue 9855:1778-1786.
- Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res*. 313:2050-62.
- Jäger U, Laczika K, Scholten C, Mitterbauer M, Novak M, Lechner K. 1996. Klinischer Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion zu Diagnose und Monitoring maligner Erkrankungen. *Wien Klin Wochenschr*. 108(20):634-9.
- Jänicke F. 1995. Etablierte und neue Prognosefaktoren für das primäre Mammakarzinom Gyn Spectrum 2:3-5 (1995); Beilage zu „Der Gynäkologe“ 28[3].
- Janni W, Rjosk D, Braun S. 2000. Clinical relevance of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with different stages of breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 1(3):217-25.
- Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer H, Pantel K, Gerber B, Friese K. 2005. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer*. 103(5):884-91.
- Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M, German N0 Study Group. 2001. Randomized adjuvant therapy trial in high-risk lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type I. *J Natl Cancer Inst*. 93(12):913-920.
- Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC, Hillen HF. 1998. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 78:460-465.
- Jeffers M, Rong S, Vande Woude GF. 1996. Enhanced tumorigenicity and invasion-metastasis by hepatocyte growth factor/scatter factor-met signalling in human cells concomitant with induction of the urokinase proteolysis network. *Mol Cell Biol*. 16(3):1115-25.
- Jin L, Fuchs A, Schnitt SJ, Yao Y, Joseph A, Lamszus K, Park M, Goldberg ID, Rosen EM. 1997. Expression of scatter factor and c-met receptor in benign and malignant breast tissue. *Cancer*. 79(4):749-60.
- Joensuu H, Pylkkänen L, Toikkanen S. 1994. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 145(5):1191-1198.
- Johnson PW, Burchill SA, Selby PJ. 1995. The molecular detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer*. 72(2):268-76.
- Jonas S, Windeatt S, O-Boateng A, Fordy C, Allen-Mersh TG. 1996. Identification of carcinoembryonic antigen-producing cells circulating in the blood of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Gut*. 39(5):717-21.

- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. 1993. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem.* 268:9049-9054.
- Jones HA, Antonini N, Hart AA, Peterse JL, Horiot JC, Collin F, Poortmans PM, Oei SB, Collette L, Struikmans H, Van den Bogaert WF, Fourquet A, Jager JJ, Schinagl DA, Warlam-Rodenhuis CC, Bartelink H. 2009. Impact of pathological characteristics on local relapse after breastconserving therapy: a subgroup analysis of the EORTC boost versus no boost trial. *J Clin Oncol.* 27(30):4939-4947.
- Jotsuka T, Okumura Y, Nakano S, Nitta H, Sato T, Miyachi M, Suzumura K, Yamashita J. 2004. Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer. *Surgery.* 135(4):419-26.
- Jozefczuk J, Stachelscheid H, Chavez L, Herwig R, Lehrach H, Zeilinger K, Gerlach JC, Adjaye J. 2010. Molecular characterization of cultured adult human liver progenitor cells. *Tissue Eng Part C Methods.* Oct;16(5):821-34.
- Kalluri R, Neilson EG. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 112(12):1776-84.
- Karasawa K, Obara T, Shimizu T, Haga S, Okamoto T, Ito Y, Kamio T, Kimura T, Kameoka S, Mitsuhashi N, Nishikawa T, Aiba M, Izuo M. 2003. Outcome of breast-conserving therapy in the Tokyo Women's Medical University Breast Cancer Society experience. *Breast Cancer.* 10(4):341-348.
- Kasimir-Bauer S, Mayer S, Bojko P, Borquez D, Neumann R und Seeber S. 2001. Survival of tumor cells in stem cell preparations and bone marrow of patients with high-risk or metastatic breast cancer after receiving dose-intensive or high-dose chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 7:1582-1589.
- Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kobayashi M. 2003. The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 88(12):1900-1908.
- Keilholz U, Willhauck M, Scheibenbogen C, de Vries TJ, Burchill S. 1997. Polymerase chain reaction detection of circulating tumour cells. EORTC Melanoma Cooperative Group, Immunotherapy Subgroup. *Melanoma Res.* 7 Suppl 2:133-41.
- Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, Brasseur F, Dummer W, Rass K, de Vries T, Blaheta J, Voit C, Lethe B, Burchill S. 1998. Reliability of reverse transcriptionpolymerase chain reaction (RT-PCR)-based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality-assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. *Eur J Cancer.* 34(5):750-3.
- Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RH. 2008. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas.* 61(1-2):141-50.
- Kiechle M (Hrsg). 2010. Gynäkologie und Geburtshilfe. 2. Auflage. *Urban & Fischer.* S. 479-501.

- Kim YB, Kim GE, Cho NH. 2002. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer*. 95:531-539.
- Klein CA. 2003. The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell - the unit of selection. *Adv Cancer Res*. 89:35-67.
- Klein CA. 2005. Single cell amplification methods for the study of cancer and cellular ageing. *Mech Ageing Dev*. 126(1):147-151.
- Klein CA. 2008. Cancer. The metastasis cascade. *Science*. 321(5897):1785-7.
- Klein CA. 2009. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 9(4):302-12.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of Apoptosis. *Science*. 275:1132-1136.
- Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. 2007. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs*. 185:191-203.
- Kolb TM, Lichy J, Newhouse JH. 2002. Comparison of the performance of screening mammography, physical examination, and breast US and evaluation of factors that influence them: an analysis of 27,825 patient evaluations. *Radiology*. 22:165-175.
- Komarova N, Wodarz D. 2005. Drug resistance in cancer: Principles of emergence and prevention. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(27):9714-9719.
- Kreienberg R, Albert US, Follmann M, Kopp I, Kühn T, Wöckel A und Zemmler T. 2012. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. 18-19.
- Kribus M. 2008. Überlebensraten, Rezidivmuster und ästhetische Ergebnisse nach Strahlentherapie beim brusterhaltend operierten Mammakarzinom der Frau am Universitätsklinikum Jena in den Jahren 1993 bis 2003 [Dissertation]. FSU Jena. S. 64-77.
- Kubens B, Feldner J, Brandt B. 2002. Migrating and circulating breast carcinoma cells are within active phases of the cell cycle. *Anticancer Res*. 22, 2A: 899-903.
- Kuehn T, Bembenek A, Decker T, Munz DL, Sautter-Bihl ML, Untch M, Wallwiener D. 2005. A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer*. 103(3):451-461.
- Kvalheim G. 1996. Detection of occult tumour cells in bone marrow and blood in breast cancer patients. *Acta oncologica*. 35,8:13-8.

- Lalle M, De Rosa L, Marzetti L, Montuoro A. 2000. Detection of breast cancer cells in the bone marrow or peripheral blood: methods and prognostic significance. *Tumori*. 86(3):183-90.
- Lammers R, Giesert C, Grünebach F, Marxer A, Vogel W, Bühring HJ. 2002. Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis. *Exp Hematol*. Jun;30(6):537-45.
- Lancaster JM, Wooster R, Manjion J. 1996. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat Genet*. 13/2:238-240.
- Lankiewicz S, Rivero BG, Bocher O. 2006. Quantitative real-time RT-PCR of disseminated tumor cells in combination with immunomagnetic cell enrichment. *Mol Biotechnol*. 34 (1):15-27.
- Laurenzi DV, Gerry M. 2000. The little devil of death. *Nature*. 406:135-136.
- Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. 2005. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene*. 24(8):1477-80.
- Lee MS, Blick MB, Pathak S, Trujillo JM, Butler JJ, Katz RL, McLaughlin P, Hagemester FB, Velasquez WS, Goodacrea A. 1987. The gene located at chromosome 18 band q21 is rearranged in uncultured diffuse lymphomas as well as follicular lymphoma. *Blood*. 70: 90-95.
- Levy GN. 1997. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *Faseb J*. 11:234-247.
- Li SY, Rong M, Grier F, Iacopetta B. 2006. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 96(1):91-95.
- Liljegren G, Holmberg L, Bergh J. 1999. 10-Year results after sector resection with or without postoperative radiotherapy for stage I breast cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*. 17:2326-33.
- Liotta LA und Stetler-Stevenson WG. 1991. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res*. 51:5054s-5059s.
- Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. 1994. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*. 125(2):437-46.
- Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, Fleuren GJ, Warnaar SO. 1997. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol*. 139(5):1337-48.
- Lobodasch K, Frohlich F, Rengsberger M, Schubert R, Dengler R, Pachmann U, Pachmann K. 2007. Quantification of circulating tumour cells for the monitoring of adjuvant therapy in breast cancer: an increase in cell number at completion of therapy is a predictor of early relapse. *Breast*. 16 (2):211-218.

- Lohmann C, Gibney E, Cotsonis G, Lawson D, Cohen C. 2001. Progesterone receptor immunohistochemical quantitation compared with cytosolic assay: correlation with prognosis in breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 9(1):49-53.
- Loibl S, Solbach C und Souchon R. 2009. Primäres Mammakarzinom. *Best Practice Onkologie.* 4:4-14.
- Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Ferno M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brunner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-Van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broet P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Janicke F, Schmitt M, Foekens JA. 2002. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 94(2):116-128.
- Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, Hughes D, Ruark E, Frankum JR, Bowden G, Kalmyrzaev B, Warren-Perry M, Snape K, Adlard JW, Barwell J, Berg J, Brady AF, Brewer C, Brice G, Chapman C, Cook J, Davidson R, Donaldson A, Douglas F, Greenhalgh L, Henderson A, Izatt L, Kumar A, Lalloo F, Miedzybrodzka Z, Morrison PJ, Paterson J, Porteous M, Rogers MT, Shanley S, Walker L, Eccles D, Evans DG, Renwick A, Seal S, Lord CJ, Ashworth A, Reis-Filho JS, Antoniou AC, Rahman N. 2011. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet.* 43(9):879-882.
- Lu J, Steeg PS, Price JE, Krishnamurthy S, Mani SA, Reuben J, Cristofanilli M, Dontu G, Bidaut L, Valero V, Hortobagyi GN und Yu D. 2009. Breast Cancer Metastasis: Challenges and Opportunities. *Cancer Research.* 69:4951-4953.
- Luzhna L, Golubov A, Ilnytsky S, Chekhun VF, Kovalchuk O. 2013. Molecular mechanisms of radiation resistance in doxorubicin - resistant breast adenocarcinoma cells. *Int J Oncol.* 42(5):1692-708.
- Lyman GH, Giuliano AE Somerfield MR, Benson AB, III, Bodurka DC, Burstein HJ, Cochran AJ, Cody HS, III, Edge SB, Galper S, Hayman JA, Kim TY, Perkins CL, Podoloff DA, Sivasubramaniam VH, Turner RR, Wahl R, Weaver DL, Wolff AC, Winer EP. 2005. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 23(30):7703-7720.
- Lynch HT, Fusaro RM, Lynch J. 1995. Hereditary cancer in adults. *Cancer Just.* 86/12:921-925.
- Maessen D, Flentje M, Weischedel U. 1998. [Cosmetic results of breast conserving therapy for breast carcinoma. Treatment results from the Heidelberg Radiation Clinic in the years 1984 to 1992]. *Strahlenther Onkol.* 174(5):251-256.
- Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. 2009. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol.* (2):162-71.
- Maheswaran S, Haber DA. 2010. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev.* 20(1):96-9.

- Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, Ohshiro K, Rosenthal DI, Weber RS, Gallick GE. 2008. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer*. 112:2088-100.
- Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J und Weinberg RA. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 133:704-715.
- Martínez-Arribas F, Alvarez T, Del Val G, Martín-Garabato E, Núñez-Villar MJ, Lucas R, Sánchez J, Tejerina A, Schneider J. 2007. Bcl-2 expression in breast cancer: a comparative study at the mRNA and protein level. *Anticancer Res*. 27(1A):219-22.
- McDonnell TJ, Marin MC, Hsu B, Brisbay SM, McConnell K, Tu SM, Campbell ML, Rodriguez-Villanueva J. 1993. The bcl-2 oncogene: apoptosis and neoplasia. *Rad Res*. 136:307-312.
- Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, Freund M, Lichtner P, Hartmann L, Schaal H, Ramser J, Honisch E, Kubisch C, Wichmann HE, Kast K, Deissler H, Engel C, Muller-Myhsok B, Neveling K, Kiechle M, Mathew CG, Schindler D, Schmutzler R K, Hanenberg H. 2010. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*. 42(5):410-414.
- Meltzer A. 1990. Dormancy and breast cancer. *J Surg Oncol*. 43(3):181-8.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW. 2004. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*. 10(24):8152-8162.
- Mitelman F, Johansson B, Mandahl N, Mertens F. 1997. Cytogenetic diagnosis of tumors. Clinical significance of chromosome aberrations. *Lakartidningen*. 94(24):2277-81.
- Mitov FS, Molov VV. 2006. Breast-conserving surgery in early-stage breast cancer (indications, local recurrences, survival, cosmetic results). *Folia Med (Plovdiv)*. 48(1):23-30.
- Mitsui K, Tokuzawa Y. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 113(5):631-42.
- Mocellin S, Shrager J, Scolyer R, Pasquali S, Verdi D, Marincola FM, Briarava M, Gobbel R, Rossi C, Nitti D. 2010. Targeted Therapy Database (TTD): a model to match patient's molecular profile with current knowledge on cancer biology. *PLoS One*. 5(8):e11965.
- Moldenhauer G, Momburg F, Moller P, Schwartz R, Hammerling GJ. 1987. Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed humancarcinoma marker. *Br J Cancer*. 56:714-721.
- Momburg F, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Moller P. 1987. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res*. 47(11):2883-91.

- Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA und Gratama JW. 2009. Circulating tumor cells (CTCs): Detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 35:463-474.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E und Zlotnik A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 410:50-56.
- Müller P, Schlimok G. 2001. Development and use of anti-epithelial antibodies in solid tumors. *Internist (Berl)*. 42(6):827-34.
- Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F und Pantel K. 2005. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Correlation to Bone Marrow Micrometastases, Heterogeneous Response to Systemic Therapy and Low Proliferative Activity. *Clinical Cancer Research*. 11:3678-3685.
- Münz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. 2004. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*. 23(34):5748-58.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*. 164:5998-6004.
- Nahta R, Esteva FJ. 2006. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res*. 8(6):215.
- Nakagawa T, Martinez SR, Goto Y, Koyanagi K, Kitago M, Shingai T, Elashoff DA, Ye X, Singer FR, Giuliano AE, Hoon DS. 2007. Detection of circulating tumor cells in early-stage breast cancer metastasis to axillary lymph nodes. *Clin Cancer Res*. 13 (14):4105-4110.
- Nakamori S, Kameyama M, Furukawa H, Takeda O, Sugai S, Imaoka S, Nakamura Y. 1997. Genetic detection of colorectal cancer cells in circulation and lymph nodes. *Dis Colon Rectum*. 40(10 Suppl):29-36.
- Natali PG, Prat M, Nicotra MR, Bigotti A, Olivero M, Comoglio PM, Di Renzo MF. 1996. Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int J Cancer*. 69(3):212-7.
- NCCN. 2011. National Comprehensive Cancer Network. *Breast cancer*. V.2.2011.
- Nelson AJ, Dunn RJ, Peach R, Aruffo A, Farr AG. 1996. The murine homolog of human EpCAM, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells. *Eur J Immunol*. 26(2):401-8.
- NHMRC. Clinical Practice Guidelines for the management of early breast cancer. 2001.
- NICE. 2009. National Institute for Clinical Excellence (NICE): Early and locally advanced breast cancer: diagnosis and treatment.



- Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S. 2006. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol.* 8:156-62.
- Nolé F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, Medici M, Verri E, Adamoli L, Rotmensz N, Goldhirsch A und Sandri MT. 2008. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Annals of Oncology.* 19:891-897.
- Nothacker M, Lelgemann M, Giersiepen K, and Weinbrenner S. 2007. Evidenzbericht 2007 zur S3-Leitlinie Brustkrebsfrüherkennung in Deutschland.
- Nottage MK, Kopciuk KA, Tzontcheva A, Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME. 2006. Analysis of incidence and prognostic factors for ipsilateral breast tumour recurrence and its impact on disease-specific survival of women with node- negative breast cancer: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res.* 8(4):R44.
- NZGG. 2009. New Zealand Guidelines Group: Management of early breast cancer. Wellington.
- Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Yoshida S, Kawakami Y, Tsubota K. 2009. Epithelial mesenchymal transition in human ocular chronic graft-versus-host disease. *Am J Pathol.* 175(6):2372-81.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19(13):3159-67.
- Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, Prat M, Maggi G, Arena N, Natali PG, Comoglio PM, Di Renzo MF. 1996. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer.* 74(12):1862-8.
- Osborne CK. 1998. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat.* 51(3):227-238.
- Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE. 2004. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 64(16):5818-24.
- Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE. 2006. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 64(16):5818-24.
- Oyama T, Ichimura E, Sano T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. 1998. c-Met expression of thyroid tissue with special reference to papillary carcinoma. *Pathol Int.* 48(10):763-8.
- Pachmann K, Heiss P, Demel U, Tilz G. 2001. Detection and quantification of small numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using laser scanning cytometer (LSC<sup>®</sup>). *Clin Chem Lab Med.* 39(9):811-7.

- Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Schneider U, Schünemann S, Höffken K. 2005. Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Res.* 7(6):R975-9.
- Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U, Höffken K. 2005b. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med.* 43(6):617-27.
- Pachmann K. Longtime recirculating tumor cells in breast cancer patients. 2005c. *Clin Cancer Res.* 11(15):5657.
- Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jörke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I, Höffken K. 2008. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol.* 26(8):1208-15.
- Pachmann K, Dengler R, Lobodasch K, Fröhlich F, Kroll T, Rengsberger M, Schubert R, Pachmann U. 2008b. An increase in cell number at completion of therapy may develop as an indicator of early relapse: quantification of circulating epithelial tumor cells (CETC) for monitoring of adjuvant therapy in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 134(1):59-65.
- Pachmann UA, Hekimian K, Carl S, Ruediger N, Rabenstein C, Pachmann K. 2011. Comparing Sequential Steps For Detection Of Circulating Tumor Cells: More Specific Or Just Less Sensitive?. *WebmedCentral CANCER.* 2(2):WMC001490.
- Page DL, Rogers LW. 1992. Combined histologic and cytologic criteria for the diagnosis of mammary atypical ductal hyperplasia. *Hum Pathol.* 23(10):1095-1097.
- Page DL, Jensen RA, Simpson JF. 1998. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 51(3):195-208.
- Paget S. 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet.* 133(3421):571-573.
- Palazzi M, Tomatis S, Valli MC, Guzzetti R, Tonoli S, Bertoni F, Magrini SM, Meregalli S, Asnaghi D, Arienti V, Pradella R, Cafaro I. 2006. Impact of radiotherapy technique on the outcome of early breast cancer treated with conservative surgery: A multicenter observational study on 1,176 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 65(5):1361-1367.
- Pan MR, Hou MF, Chang HC, Hung WC. 2008. Cyclooxygenase-2 up-regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells. *J Biol Chem.* 283:11155-11163.
- Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. 1998. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem.* 273:5841-5845.
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR und Riethmuller G. 1993. Differential Expression of Proliferation-Associated Molecules in

- Individual Micrometastatic Carcinoma Cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 85:1419-1424.
- Pantel K, von Knebel Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmüller G. 1997. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Chirurg*. 68(12):1241-1250. Review.
- Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. 1999. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst*. 91(13):1113-24.
- Pantel K, Müller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S. 2003. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 9(17):6326-34.
- Pantel K, Brakenhoff RH. 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*. 4 (6):448-456.
- Pantel K, Alix-Panabières C und Riethdorf S. 2009. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*. 6:339-351.
- Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. 1996. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 13(1):63-72.
- Perez CA; Brady LW. 1993. Acute radiation morbidity scoring criteria. & Late radiation morbidity scoring criteria. In: Perez CA, Brady LW (eds.) Principles and practice of radiation oncology (2nd ed.) *Lippincott, Philadelphia*. S.51-55.
- Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Davidson NE, Geyer CE Jr, Martino S, Mamounas EP, Kaufman PA, Wolmark N. 2011. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol*. 29(25):3366-3373.
- Pretlow T, Schwartz S, Giaconia J, Wright A, Grimm Heather, Edgehouse N, Murphy J, Markowitz S, Jamison J, Summer J, Hamlin C. 2000. Prostate cancer and other xenografts from cells in peripheral blood of patients. *Cancer Res*. 60: 4033-6.
- Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thierry JP, Magdelenat H. 2004. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 10 (4):1392-1400.
- Pierga JY, Bidard F-C, Mathiot C, Brain E, Delalogue S, Giachetti S, de Cremoux P, Salmon R, Vincent-Salomon A und Marty M. 2008. Circulating Tumor Cell Detection Predicts Early Metastatic Relapse After Neoadjuvant Chemotherapy in Large Operable and Locally Advanced Breast Cancer in a Phase II Randomized Trial. *Clinical Cancer Research*. 14:7004-7010.

- Piyathilake CJ, Frost AR, Weiss H, Manne U, Heimbürger DC, Grizzle WE. 2000. The expression of Ep-CAM (17-1A) in squamous cell cancers of the lung. *Hum Pathol.* 31(4):482-7.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M Y, Huffel C V, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* (282):2085-2088.
- Poortmans PM, Collette L, Bartelink H, Struikmans H, Van den Bogaert WF, Fourquet A, Jager JJ, Hoogenraad W, Müller RP, Dubois JB, Bolla M, Van Der Hulst M, Warlam-Rodenhuis CC, Pierart M, Horiot JC. 2008. The addition of a boost dose on the primary tumour bed after lumpectomy in breast conserving treatment for breast cancer. A summary of the results of EORTC 22881-10882 "boost versus no boost" trial. *Cancer Radiother.* 12(6-7):565-570.
- Poortmans PM, Collette L, Horiot JC, Van den Bogaert WF, Fourquet A, Kuten A, Noordijk EM, Hoogenraad W, Mirimanoff RO, Pierart M, Van Limbergen E, Bartelink H. 2009. Impact of the boost dose of 10 Gy versus 26 Gy in patients with early stage breast cancer after a microscopically incomplete lumpectomy: 10-year results of the randomised EORTC boost trial. *Radiother Oncol.* 90(1):80-85.
- Poetter R, Gnant M, Kwasny W, Tausch C, Handl-Zeller L, Pakisch B, Taucher S, Hammer J, Luschin-Ebengreuth G, Schmid M, Sedlmayer F, Stierer M, Reiner G, Kapp K, Hofbauer F, Rottenfusser A, Postlberger S, Haider K, Draxler W, Jakesz R. 2007. Lumpectomy plus tamoxifen or anastrozole with or without whole breast irradiation in women with favorable early breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol.* 68(2):334-340.
- Prescott RJ, Kunkler IH, Williams LJ, King CC, Jack W, van der Pol M, Goh TT, Lindley R, Cairns J. 2007. A randomised controlled trial of postoperative radiotherapy following breast-conserving surgery in a minimum-risk older population. The PRIME trial. *Health Technol Assess.* 11(31):1-149, iii-iv.
- Quenel N, Wafflart J, Bonichon F, de MI, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre J. 1995. The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases". *Breast Cancer Res Treat.* 35(3):283-291.
- Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, Uhr JW. 1998. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(8):4589-4594.
- Rack BK, Schindlbeck C, Schneeweiss A und Janni WJ. 2008. Prognostic relevance of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy: The German SUCCESS-Trial. - ASCO. *J Clin Oncol.* 503.
- Ragaz J, Olivotto IA, Spinelli JJ. 2005. Locoregional radiation therapy in patients with high-risk breast cancer receiving adjuvant chemotherapy: 20-year results of the British Columbia randomized trial. *J Natl Cancer Inst.* 97:116-26.

- Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER. 2001. Validation of array- based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn.* 3(1):26-31.
- Renton SC, Gazet JC, Ford HT, Corbishley C, Sutcliffe R. 1996. The importance of the resection margin in conservative surgery for breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 22(1):17-22.
- Retsky M. 2009. New concepts in breast cancer emerge from analyzing clinical data using numerical algorithms. *Int J Environ Res Public Health.* 6(1):329-48.
- Revillion F, Pawlowski V, Hornez L, Peyrat J-P. 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer.* 36:1038-1042.
- Ricciotti E, Fitzgerald GA. 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(5):986-1000.
- Riethdorf S, Pantel K. 2008. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology.* 75(2):140-148.
- Riethmüller G, Schneider-Gädicke E, Johnson JP. 1993. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol.* 5(5):732-9.
- Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmayr R. 1998. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol.* 16(5):1788-94.
- Ring A, Smith I, Dowsett M. 2004. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet.* 5: 79-88.
- Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. 2005. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer.* 92(5):906-12.
- Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA, Arteaga CL. 2007. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res.* 13(16):4909-19.
- Robert-Koch-Institut (Hrsg) & die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). 2012. RKI Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. S. 64-67.
- Rohr K, Hegglin R. 1936. Tumorzellen im Sternalpunktat. *Deutsch Arch Klin Med.* 179:61-79.
- Rolland V, Dugail I, Le Liepvre X, Lavau M. 1995. Evidence of increased glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthetase promoter activities in transiently transfected adipocytes from genetically obese rats. *J Biol Chem.* 270(3):1102-1106.

- Rolle A, Gunzel R, Pachmann U, Willen B, Hoffken K, Pachmann K. 2005. Increase in number of circulating disseminated epithelial cells after surgery for non-small cell lung cancer monitored by MAINTRAC(R) is a predictor for relapse: A preliminary report. *World J Surg Oncol.* 3(1):18.
- Rosen EM, Goldberg ID. 1995. Scatter factor and angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 67:257-79.
- Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID. 1999. The molecular and cellular basis of radio sensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest.* 17(1):56-72.
- Rosen PP, Groshen S, Sanjo PE, Kinne DW, Hellmann S. 1989. A long-term follow-up study of survival in Stage I (T1 N0 M0) and Stage II (T1 N1 M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 7:355-366.
- Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. 1993. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol.* 11(11):2090-2100.
- Ross JS, Fletcher JA. 1998. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells.* 16:413-428.
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ. 2003. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* 8(4):307-325. Review.
- Rühl I, Bauerfeind I, Kahlert S, Untch M, and Hepp H. 2004. Neoadjuvante Chemotherapie bei Mammakarzinom. *Gynäkologische Geburtshilfliche Rundschau.* 44:92-101.
- Ruf P, Gires O, Jäger M, Fellingner K, Atz J, Lindhofer H. 2007. Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Cancer.* 97(3):315-21.
- Rychahou PG, Jackson LN, Silva SR, Rajaraman S, Evers BM. 2006. Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma. *Ann Surg.* 243(6):833-42; discussion 843-4.
- Saad A, Abraham J. 2008. Role of tumor markers and circulating tumors cells in the management of breast cancer. *Oncology (Williston Park).* 22(7):726-31; discussion 734, 739,743-4.
- Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malström P-O, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R (2005) PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, an ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 65(7):2554-2559.
- Sabroe I, Parker LC, Dower SK, Whyte MKB. 2008. The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol.* 214:126-135.
- Salem RR, Wolf BC, Sears HF, Lavin PT, Ravikummar TS, DeCoste D, D'Emilia JC, Herlyn M, Schlom J, Gottlieb LS. 1993. Expression of colorectal carcinoma-associated antigens in colonic polyps. *J Surg Res.* 55(3):249-55.

- Sales KJ, Katz AA, Davis M, Hinz S, Soeters RP, Hofmeyr MD, Millar RP, Jabbour, HN. 2001. Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. *J Clin Endocr Metab.* 86:2243-2249.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. 2001. Interleukin-1-beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature.* 410:471-475.
- Satagopan JM, Offit K, Foulkes W, Robson ME, Wacholder S, Eng CM, Karp SE, Begg CB. 2001. The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10:467-73.
- Sauer R. 2003. Strahlentherapie und Onkologie. 4. Auflage. *Urban & Fischer. München, Jena.* S. 138-176.
- Sauer R, Sauer G. 2009. Mamma. In: Sack H, Molls M, Bamberg M (Hrsg.). Radioonkologie. Band 2: Klinik. *Zuckschwerdt Verlag, München.* S. 647-689.
- Scharl A, Vierbuchen M, Würz H. 1989. Immunhistochemischer Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren beim Mammakarzinom mit Hilfe monoklonaler Antikörper: Vergleich mit der biochemischen Rezeptoranalyse. *Pathologe.* 10:31-38.
- Schatzkin A, Longnecker MP. 1994. Alcohol and breast cancer. Where are we now and where do we go from here? *Cancer.* 74:1101-1110.
- Schilling D, Bayer C, Li W, Molls M, Vaupel P, Multhoff G. 2012. Radiosensitization of normoxic and hypoxic h1339 lung tumor cells by heat shock protein 90 inhibition is independent of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ . *PLoS One.* 7(2):e31110.
- Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Göttlinger G, Schmidt G, Häuser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H. 1987. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(23):8672-6.
- Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad H-D, Gerdes, J. 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.* 123:513-522.
- Schmid P, Possinger K. 2002. Adjuvante und neoadjuvante systemische Therapie des Mammakarzinoms. *Internist (Berl).* 43(3):341-4, 347-53.
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Müller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmüller G, Eils R, Klein CA. 2003. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(13):7737-42.

- Schnakenberg E, Krasemann E, Kleeberg UR. 2006. Nachweis zirkulierender Tumorzellen für die Prognose, Diagnostik und Therapie unter besonderer Berücksichtigung des Mammakarzinoms. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*. 38:123-128.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 182:311-322.
- Scotlandi K, Baldini N, Oliviero M, Di Renzo MF, Martano M, Serra M, Manara MC, Comoglio PM, Ferracini R. 1996. Expression of Met/hepatocyte growth factor receptor gene and malignant behavior of musculoskeletal tumors. *Am J Pathol*. 149(4):1209-19.
- Sebastian M, Kiewe P, Schuette W, Brust D, Peschel C, Schneller F, Rühle KH, Nilius G, Ewert R, Lodziewski S, Passlick B, Siemel W, Wiewrodt R, Jäger M, Lindhofer H, Friccius-Quecke H, Schmittel A. 2009. Treatment of malignant pleural effusion with the trifunctional antibody catumaxomab (Removab) (anti-EpCAM x Anti-CD3): results of a phase 1/2 study. *J Immunother*. 32(2):195-202.
- Shiah SG, Chang LC, Tai KY, Lee GH, Wu CW, Shieh YS. 2009. The involvement of promoter methylation and DNA methyltransferase-1 in the regulation of EpCAM expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. (1):e1-8.
- Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Rilke F, Veronesi U. 1994. The Bcl-2 Protein: a Prognostic Indicator Strongly Related to p53 Protein in Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 86(7):499-504.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T. 2004. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews*. Vol. 56no. 3 387-437.
- Sinn HP, Schmid H, Junkermann H. 1994. Histologische Regression des Mammakarzinoms nach primärer (neoadjuvanter) Chemotherapie. *Geburtsh Frauenheilkd*. 54:552-558.
- Sirover M. 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1432:159-184.
- Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minckwitz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J. 2011. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 365(14):1273-1283.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 235(4785):177-182.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 69:145-182.



- Solomayer EF, Diel IJ, Krempien B, Meyberg GC, Gollan C, Krainick U, Wallwiender D, Bastert G. 1998. Results of iliac crest biopsies taken from 1465 patients with primary breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 124(1):44-8.
- Sonnenberg E, Meyer D, Weidner HM, Birchmeier C. 1993. Scatter factor/ hepatocyte growth factor and its receptor, the c- met tyrosine kinase, can mediate a single exchange between mesenchym and epithelia during mouse development. *J cell Biol.* 123:223-235.
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. 2000. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer.* 89: 2637-2645.
- Spizzo G, Went P, Dirnhofner S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, Maurer R, Metzger U, von Castelberg B, Bart R, Stopatschinskaya S, Köchli OR, Haas P, Mross F, Zuber M, Dietrich H, Bischoff S, Mirlacher M, Sauter G, Gastl G. 2004. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 86(3):207-13.
- Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. 2012. Statistisches Jahrbuch Deutschland und Internationales. S. 131.
- Stauber M, Weyerstahl T. 2007. Gynäkologie und Geburtshilfe. Thieme, Stuttgart, 3. Auflage. S. 371-396.
- Steiner AA, Ivanov AI, Serrats J, Hosokawa H, Phayre AN, Robbins JR, Roberts JL, Kobayashi S, Matsumura K, Sawchenko PE, Romanovsky AA. 2006. Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol.* 4(9):e284.
- Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT. 2001. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 67(2):93-109.
- Stoecklein NH, Klein CA. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. 2010. *Int J Cancer.* 126(3):589-98.
- Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. 2003. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* 4(9):529-36.
- Strauss A, Janni W und Maass N. 2009. Klinikmanual Gynäkologie und Geburtshilfe. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. S. 173-198.
- Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ. 2002. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem.* 277:18649-18657.
- Tabuchi Y, Matsuoka J, Gunduz M, Imada T, Ono R, Ito M, Motoki T, Yamatsuji T, Shirakawa Y, Takaoka M, Haisa M, Tanaka N, Kurebayashi J, Jordan VC, Naomoto Y. 2009. Resistance to paclitaxel therapy is related with Bcl-2 expression through an estrogen receptor mediated pathway in breast cancer. *Int J Oncol.* 34(2):313-9.

- Taghian A, Jeong JH, Mamounas E. 2004. Patterns of locoregional failure in patients with operable breast cancer treated by mastectomy and adjuvant chemotherapy with or without tamoxifen and adjuvant radiotherapy: results from five National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomized clinical trials. *J Clin Oncol.* 22:4247-57.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126(4):663-76.
- Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA, Merlino G. 1997. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(2):701-6.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 11:443-51.
- Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, McGuire WL. 1990. Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer. *Cancer Res.* 50(11):3317-21.
- Tang X, Sun YJ, Half E, Kuo MT, Sinicrope F. 2002. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 62:4903-4908.
- Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS. 2000. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia coli* and salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol.* 165:5780-7.
- Taubert H, Blümke K, Bilkenroth U, Meye A. 2004. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gynecologic oncology.* 92:256-261.
- Terstappen LW, Rao C, Gross S, Weiss AJ. 2000. Peripheral blood tumor cell load reflects the clinical activity of the disease in patients with carcinoma of the breast. *Int J Oncol.* 17(3):573-8.
- Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R und Kasimir-Bauer S. 2009. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res. Treat.* 115:581-590.
- Thacker J. 1986. The nature of mutants induced by ionising radiation in cultured hamster cells. III Molecular characterization of HPRT-deficient mutants induced by gamma-rays or alpha-particles showing that the majority have deletions of all or part of the hprt gene. *Mutat Res.* 160(3):267-275.
- Thuerlimann B. 2001. International consensus meeting on the treatment of primary breast cancer 2001, St. Gallen, Switzerland. *Breast Cancer.* 8:294-297.

- Tian XS, Cong MH, Zhou WH, Zhu J, Chen YZ, Liu Q. 2008. Clinicopathologic and prognostic characteristics of triple-negative breast cancer. *Onkologie*. 31(11):610-4.
- Tipp AJ. 2010. Die differentielle Expression tumorfördernder und tumorinhibierender Gene im ersten und zweiten Trimester der Schwangerschaft [Dissertation]. RWTH Aachen. S. 15-17.
- Tkaczuk KHR. 2009. Review of the contemporary cytotoxic and biologic combinations available for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther*. 31 Pt 2:2273-2289.
- Trzpis M, McLaughlin PMJ, de Leij LMFH, Harmsen MC. 2007. Epithelial Cell Adhesion Molecule- More than a Carcinoma Marker and Adhesion Molecule. *Am J Pathol*. 171:386-395.
- Trzpis M, Bremer E, McLaughlin PM, de Leij LF, Harmsen MC. 2008. EpCAM in morphogenesis. *Front Biosci*. 13:5050-5.
- Tsuji M, DuBois RN. 1995. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*. 83:493-501.
- Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 93:705-716.
- Tsuka H, Mori H, Li B, Kanamaru H, Matsukawa S, Okada K. 1998. Expression of c-MET/HGF receptor mRNA and protein in human non-malignant and malignant prostate tissues. *Int J Oncol*. 13(5):927-34.
- Tsuruta D, Jones, JC. 2003. The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J Cell Sci*. 116:4977-84.
- Tucker SL, Geara FB, Peters LJ, Brock WA. 1996. How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients based on a predictive assay of normal-tissue radio sensitivity? *Radiother Oncol*. 38(2):103-113.
- UICC. TNM Classification of Malignant Tumours. 1997. 5th Edition ed. John Wiley and Sons, New York.
- Van de Steene J, Vinh-Hung V, Cutuli B, Storme G. 2004. Adjuvant radiotherapy for breast cancer: effects of longer follow-up. *Radiother Oncol*. 72(1):35-43.
- Van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH, de Leij LF, McLaughlin PM, Rots MG. 2010. EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis*. 31(11):1913-21.
- Van Wely BJ, Teerenstra S, Schinagl DA, Aufenacker TJ, de Wilt JH, Strobbe LJ. 2011. Systematic review of the effect of external beam radiation therapy to the breast on axillary recurrence after negative sentinel lymph node biopsy. *Br J Surg*. 98(3):326-333.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM. 1988. Bcl-2 promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 335:440-442.

- Venkitaraman AR. 2004. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat. Rev. Cancer.* 4:266-276.
- Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L. 2002. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med.* 347:1227-32.
- Vinh-Hung V, Verschraegen C. 2004. Breast-Conserving Surgery With or Without Radiotherapy: Pooled-Analysis for Risks of Ipsilateral Breast Tumor Recurrence and Mortality. *J Natl Cancer Inst.* 96:115-21.
- Vivanco I, Sawyers CL. 2002. The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2(7):489-501.
- Vora HH, Patel NA, Rajvik KN, Mehta SV, Brahmhatt BV, Shah MJ, Shukla SN, Shah PM. 2009. Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer. *Int J Biol Markers.* 24(1):38-46.
- Vujovic O, Yu E, Cherian A, Dar AR, Stitt L, Perera F. 2006. Eleven-year follow-up results in the delay of breast irradiation after conservative breast surgery in node-negative breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 64(3):760-764.
- Wagatsuma S, Konno R, Sato S, Yajima A. 1998. Tumor angiogenesis, hepatocyte growth factor, and c-Met expression in endometrial carcinoma. *Cancer.* 82(3):520-30.
- Wald NJ, Murphy P, Major P. 1995. UKCCCR multicentre randomised controlled trial of one and two view mammography in breast cancer screening. *BMJ.* 311:1189-93.
- Wallgren A, Bonetti M, Gelber RD. 2003. International Breast Cancer Study Group Trials I through VII. Risk factors for locoregional recurrence among breast cancer patients: results from International Breast Cancer Study Group Trials I through VII. *J Clin Oncol.* 21:1205-13.
- Wallwiener M, Hartkopf AD, Baccelli I, Riethdorf S, Schott S, Pantel K, Marmé F, Sohn C, Trumpp A, Rack B, Aktas B, Solomayer EF, Müller V, Janni W, Schneeweiss A, Fehm TN. 2013. The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 137(2):503-10.
- Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, Xiao W, Hunkapiller KL, Blake J, Chan F, Gonzalez C, Zhang L, Samaha RR. 2006. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics.* 7:59.
- Wannenmacher M, Debus J, Wenz F. 2006. Strahlentherapie. Springerverlag. S. 453-482.
- Ward JF. 1999. Ionizing radiation damage to DNA. In: Dizdaroglu M, Karakaya AE Advances in DNA repair. *Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.* S. 431-439.
- Weiss SJ. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 320(6):365-76.

- Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. 1987. Molecular analysis of the t (14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *New Engl J Med.* 317:1185-1189.
- Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. 2004. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol.* 35(1):122-8.
- Whelan T, Levine M. 2005. More evidence that locoregional radiation therapy improves survival: what should we do? *J Natl Cancer Inst.* 97:82-4.
- Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM und Naume B. 2004. Isolated Tumor Cells in Bone Marrow Three Years after Diagnosis in Disease-Free Breast Cancer Patients Predict Unfavorable Clinical Outcome. *Clinical Cancer Research.* 10:5342-5348.
- Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE, Rees-Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV. 2003a. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res.* 285(1):50-8.
- Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV. 2003b. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol.* 163(6):2139-48.
- Winzer KJ. 2005. Diagnosis and treatment of breast cancer. *Chirurg.* 76 (8):803-816.
- Withers HR. 1999. Radiation biology and treatment options in radiation oncology. *Cancer Res.* 59(7 Suppl):1676-1684.
- Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, Roche PC, Ingle JN, Grant C, Donohue J, Suman VJ, Harrington D, Torre-Bueno J, Bauer KD. 2002. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res.* 8(5):1085-1091.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF. 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 25 (1):118-145.
- enkitaraman AR. 2004. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat. Rev. Cancer.* 4:266-276.
- Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, Chatterjee A, Goldenberg D, Gollin SM, Sukumar S, Trink B, Sidransky D. 2005. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 7(5):609-616.
- Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, Kalbakis K, Androulakis N, Kouroussis C, Pallis T, Christophylakis C, Argyraki K, Lianidou ES, Stathopoulos S, Georgoulas V, Mavroudis D. 2006. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time

- polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 24 (23):3756-3762.
- Xia F, Powell SN. 2002. The molecular basis of radiosensitivity and chemosensitivity in the treatment of breast cancer. *Semin Radiat Oncol.* 12(4):296-304.
- Yang H, Zhou H, Feng P, Zhou X, Wen H, Xie X, Shen H, Zhu X. 2010. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J Exp Clin Cancer Res.* 29:92.
- Yarnold J. 1997. Molecular aspects of cellular responses to radiotherapy. *Radiother Oncol.* 44 (1):1-7.
- Yau TK, Lau Y, Kong J, Yeung MW, Chan M, Sze WM, Cheung P, Lim BH, Lee A. 2002. Breast conservation treatment in Hong Kong-early results of 203 patients: retrospective study. *Hong Kong Med J.* 8 (5):322-328.
- Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. 2010. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 11(2):174-183.
- Yin W, Jiang Y, Shen Z, Shao Z, Lu J. 2011. Trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients: a meta-analysis of published randomized controlled trials. *PLoS One.* 6(6):e21030.
- Ying, QL, Nichols J. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 115(3): 281-92.
- Zhang J, Snyder S. 1992. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:9382-9385.
- Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, Cooke M, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. 2006. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells.* 24(12):2669-76.
- Zhong H, Simons JW. 1999. Direct comparison of GAPDH,  $\beta$ -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 259:523-526.
- Zielinski C, Beslija S, Krmpotic Z M, Jaskiewicz-Welnicka M, Wiltchke C, Kahan Z, Grgic M, Tzekova V, Inbar M, Cervek J, Chernochemsky I, Szanto J, Spanik S, Wagnerova V, Ghilezan N, Pawlega J, Vrbanec D, Khamtsov D, Soldatenkova V, Brodowicz T. 2005. Gemcitabine, epirubicin and paclitaxel versus fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer: a central european cooperative oncology group international, multicenter, prospective, randomized phase III trial. *J Clin Oncol.* 23:1401-1408.
- Zielske SP, Spalding AC, Wicha MS, Lawrence TS. 2011. Ablation of breast cancer stem cells with radiation. *Transl Oncol.* 4(4):227-33.

## 9 ANHANG

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b>	Blutentnahme-Schema.....	27
<b>Abb. 2</b>	Häufigkeitsverteilung nach Alter der Patientinnen.....	28
<b>Abb. 3</b>	Scan^R und Analyseprogramm.....	38
<b>Abb. 4</b>	Analysebilder der Routinemessungen.....	39
<b>Abb. 5</b>	Präparationsplattform mmi CellEctor plus™.....	40
<b>Abb. 6</b>	„Flat-Cap-Strip“ mit Einzelzelle.....	41
<b>Abb. 7</b>	Prinzip der Amplifikation der qRT-PCR.....	46
<b>Abb. 8</b>	Schmelzkurve für verschiedene Proben.....	47
<b>Abb. 9</b>	Schmelzkipfel (Melting Peaks) als Darstellung der negativen Ableitung der Schmelzkurve.....	48
<b>Abb. 10</b>	Typischer Patientenverlauf mit absinkenden CETC im Rahmen der Radiatio.....	51
<b>Abb. 11</b>	Typischer Patientenverlauf mit ansteigenden CETC im Rahmen der Radiatio.....	51
<b>Abb. 12</b>	Überlebensfunktion der Gruppen AN und AB in Abhängigkeit des jeweiligen CETC-Verlaufes.....	54
<b>Abb. 13</b>	Überlebensfunktion der Gruppen 1-4 in Abhängigkeit des jeweiligen CETC-Verlaufes.....	55
<b>Abb. 14</b>	Überlebensfunktion in Abhängigkeit der LAG-Bestrahlung.....	57
<b>Abb. 15</b>	Überlebensfunktion in Abhängigkeit einer Boost-Bestrahlung.....	59
<b>Abb. 16</b>	Überlebensfunktion in Abhängigkeit des pT-Stadiums.....	60
<b>Abb. 17</b>	Überlebensfunktion in Abhängigkeit des pN-Stadiums.....	61
<b>Abb. 18</b>	Überlebensfunktion in Abhängigkeit des Progesteronrezeptor-Status.....	62
<b>Abb. 19</b>	Überlebensfunktion in Abhängigkeit der Triple-Negativität des Primärtumors.....	63
<b>Abb. 20</b>	Übersicht einzelner Ereigniswahrscheinlichkeiten (P) in Abhängigkeit der CETC-Differenz und des CETC-Messwertes vor der RT.....	73
<b>Abb. 21</b>	Übersicht der EpCAM – Expressionsanalyse.....	76
<b>Abb. 22</b>	Übersicht der NANOG – Expressionsanalyse.....	77
<b>Abb. 23</b>	Darstellung der CETC - Konzentration vor und nach der Strahlentherapie.....	79
<b>Abb. 24</b>	GAPDH, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).....	80
<b>Abb. 25</b>	EpCAM, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).....	81
<b>Abb. 26</b>	NANOG, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).....	82

---

<b>Abb. 27</b>	Bcl-2, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).....	83
<b>Abb. 28</b>	TLR 4, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).....	84
<b>Abb. 29</b>	COX-2, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9). ....	85
<b>Abb. 30</b>	Darstellung PIK3CA-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie. ....	86
<b>Abb. 31</b>	PIK3CA, Quantitative RT-PCR der untersuchten Proben (n = 9).....	86
<b>Abb. 32</b>	Darstellung Her2/neu-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie. ....	87
<b>Abb. 33</b>	Darstellung Vimentin-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie. ....	88
<b>Abb. 34</b>	Darstellung c-Met-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie. ....	89
<b>Abb. 35</b>	Ergebnis der c-Met-Gelelektrophorese.....	89
<b>Abb. 36</b>	Darstellung Ki-67-spezifischer cDNA vor und nach der Strahlentherapie.....	90
<b>Abb. 37</b>	Ergebnis der Ki-67-Gelelektrophorese. ....	90



## 9.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b>	Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms (Strauss 2009). .....	4
<b>Tab. 2</b>	Risikoeinteilung und Therapieauswahl nach molekularbiologischem Subtyp .....	12
<b>Tab. 3</b>	Übersichtstabelle der Tumorcharakteristika.....	29
<b>Tab. 4</b>	Übersicht der bei den beobachteten Patientinnen eingesetzten Chemotherapie – Schemata. ....	30
<b>Tab. 5</b>	Chemikalien. ....	32
<b>Tab. 6</b>	Lösungen. ....	32
<b>Tab. 7</b>	DNA-Oligonukleotide. ....	33
<b>Tab. 8</b>	Antikörper und Farbstoffe.....	34
<b>Tab. 9</b>	Kits.....	34
<b>Tab. 10</b>	Verbrauchsmaterialien. ....	34
<b>Tab. 11</b>	Geräte.....	35
<b>Tab. 12</b>	Software. ....	35
<b>Tab. 13</b>	Mastermix der Immunfluoreszenz-Messung. ....	37
<b>Tab. 14</b>	Mastermix 1 für Lyseschritt 1. ....	41
<b>Tab. 15</b>	Mastermix 2 für Lyseschritt 2. ....	41
<b>Tab. 16</b>	Mastermix 3, Poly-A-Additions-Mix. ....	42
<b>Tab. 17</b>	Mastermix 4. ....	42
<b>Tab. 18</b>	cDNA-Amplifikationsprogramm. ....	43
<b>Tab. 19</b>	Master Ansatz für qRT-PCR.....	44
<b>Tab. 20</b>	qPCR - Programm für die Einzelzellanalyse. ....	44
<b>Tab. 21</b>	Programm für die Schmelzkurvenanalyse. ....	45
<b>Tab. 22</b>	Einteilungsschema der Patientinnen in unterschiedliche Beobachtungsgruppen in Abhängigkeit vom Quotienten der CETC-Zellzahl vor und nach der RT .....	52
<b>Tab. 23</b>	Übersicht der bzgl. Ereignis-freier Überlebenszeit und 5-jähriger Ereigniswahrscheinlichkeit untersuchten Merkmale.....	53
<b>Tab. 24</b>	Ergebnisse der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit und der geschätzten mittleren Überlebenszeit ohne Lokalrezidiv oder Fernmetastase in Abhängigkeit vom Zellzahl-Verlauf.....	56
<b>Tab. 25</b>	Ergebnisse der COX-Regression bzgl. Ereignis-freiem Überleben und CETC- Verlauf.....	57
<b>Tab. 26</b>	Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach ED in	

	Abhängigkeit des CETC – Verhaltens. ....	65
<b>Tab. 27</b>	Übersicht der differenziert beobachteten Lokalrezidive und Fernmetastasen innerhalb von 5 Jahren nach ED in Abhängigkeit des CETC – Verhaltens. ....	66
<b>Tab. 28</b>	Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach ED in Abhängigkeit der einfachen und zehn-fachen CETC – Veränderung. ....	67
<b>Tab. 29</b>	Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach ED in Abhängigkeit einer zusätzlichen LAG - Bestrahlung. ....	67
<b>Tab. 30</b>	Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach ED in Abhängigkeit einer zusätzlichen Boost – Bestrahlung auf das Tumorbett. ....	68
<b>Tab. 31</b>	Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach ED in Abhängigkeit des T-Stadiums. ....	68
<b>Tab. 32</b>	Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach ED in Abhängigkeit des pN-Status. ....	69
<b>Tab. 33</b>	Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach ED in Abhängigkeit des PR-Stadiums. ....	69
<b>Tab. 34</b>	Übersicht der beobachteten Ereignisse innerhalb von 5 Jahren nach ED in Abhängigkeit der Tripel – Negativität. ....	70
<b>Tab. 35</b>	Ergebnisse der COX-Regression bzgl. Ereignis-freiem Überleben und absoluter CETC - Zahl vor Radiatio. ....	71
<b>Tab. 36</b>	Ergebnisse der binär logistischen Regression bzgl. absoluter CETC-Zahl vor Radiatio und der Häufigkeiten von Ereignissen. ....	71
<b>Tab. 37</b>	Ergebnisse der binär logistischen Regression bzgl. absoluter CETC - Zahl vor Radiatio und der Häufigkeiten von Ereignissen. ....	72
<b>Tab. 38</b>	Ereigniswahrscheinlichkeit innerhalb von 5 Jahren, mittlere Ereignis-freie Überlebenszeit und Mortalität in Abhängigkeit von Rezidiven und Metastasen. ....	73
<b>Tab. 39</b>	Darstellung der ct -Werte und Kopien von NANOG und Bcl-2 ....	76
<b>Tab. 40</b>	Zusammenfassung der aus den Kopienzahlen vor und nach Radiatio gebildeten Quotienten (Q). ....	78
<b>Tab. 41</b>	Mittelwerte der quantitativen CETC Messungen. ....	79
<b>Tab. 42</b>	Mittelwerte der GAPDH-Expression aus der qRT-PCR von Einzel-Zellen ....	80
<b>Tab. 43</b>	Mittelwerte der EpCAM-Expression aus der qRT-PCR von Einzel-Zellen ....	81

### 9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbstständig angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. Katharina Pachmann, Herr Prof. Dr. Thomas G. Wendt, Herr Dr. Mario Walther,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 2. Dezember 2014

Matthias Mäurer

## **9.4 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Jena, den 2. Dezember 2014

Matthias Mäurer

## 9.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Pachmann für die Bereitstellung der brisanten Thematik, ihre kontinuierliche Betreuung und das hohe, selbstlose Engagement bei allen Forschungsobliegenheiten. Das ihrerseits in mich gesetzte Vertrauen, die offene und herzliche Art haben mich stets inspiriert und in allen Phasen des Promotionsprozesses bestärkt.

Großer Dank gebührt ebenso Herrn Prof. Dr. Wendt für seine von mir geschätzte Hilfsbereitschaft, seine kompetente Beratung, die zahlreichen, nützlichen Hinweise und die zeitnahe Korrektur meiner Arbeit. In diesem Zusammenhang sei hiermit auch dem gesamten medizinischen Personal der Strahlenklinik Jena für die freundliche Unterstützung bei der Gewinnung der Blutproben gedankt.

Ebenso herzlich danke ich Frau Dr. Hekimian für ihre fachkundige Betreuung einschließlich der Korrektur meiner Dissertation. Ihrer Hilfe bei den anspruchsvollen, experimentellen Laborversuchen und ihrer einfühlsamen und tatkräftigen Unterstützung hierbei ist es zu verdanken, dass diese Arbeit überhaupt möglich wurde.

Dem gesamten Arbeitskreis des Onkologischen Forschungslabors danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und Hilfestellung bei fachspezifischen Fragestellungen. Dabei danke ich insbesondere Herrn Dr. Winkens für die optimale Einarbeitung in den ersten Tagen der experimentellen Tätigkeit und Frau Sorg für die moralische Unterstützung bei der gemeinsamen Laborarbeit.

Mein Dank gilt ferner Frau Köhler für die arbeitsintensive Präparation der Einzel-Zellen im Transfusionsmedizinischen Zentrum Bayreuth und Herrn Dr. Walther vom Institut für Medizinische Statistik für die kompetente und geduldige biometrische Beratung.

Meinen Eltern und meiner Freundin Sarah danke ich für ihre motivierende und emotionale Unterstützung, ihre Förderung, ihr verlässliches und einsatzbereites Mitwirken, ihre Anregungen und liebevolle Kritik. Durch ihre Hilfe fühlte ich mich während des gesamten Studiums getragen.

Meinen Freunden, insbesondere Christoph und allen „Octavians“, danke ich, dass sie mir stets verständnisvoll und treu zur Seite standen und mir durch das entgegengebrachte Vertrauen und ihren Humor auf ihre spezifische Weise weiterhalfen.