

**Untersuchung des Verhaltens zirkulierender epithelialer
Tumorzellen und ihrer Her2-Amplifikation bei
Mammakarzinompatientinnen unter Trastuzumabtherapie in
der adjuvanten Situation und nach Rezidiv**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

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

**von Anne-Kathrin Gellner
geboren am 21.07.1985 in Jena**

Gutachter

1. Frau Prof. Dr. med. Katharina Pachmann, Jena
2. Herr Prof. Dr. med. Ingo B. Runnebaum, Jena
3. Herr Prof. Dr. med. Ralf Hofheinz, Mannheim

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01. März 2011

Abkürzungsverzeichnis

α	Signifikanzniveau alpha
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
CD	cluster of differentiation
CEP	chromosome enumeration DNA probe
ChT	Chemotherapie
cm ²	Quadratzenimeter
CO	Kombinationstherapie ChT und Trastuzumab
CTC	circulating tumor cell, zirkulierende Tumorzelle
CETC	circulating epithelial tumor cell, zirkulierende epitheliale Tumorzelle
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DFS	disease free survival, rezidivfreies/kranheitsfreies Überleben
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EL-Puffer	Erythrozytenlysepuffer
EpCam	epithelial cell adhesion molecule
ER	Estrogenrezeptor
et al.	und andere
FDA	Food and Drug Administration, USA
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Grading
G	Grün; niedrigamplifizierte Subgruppe
GO	grün-orange, niedrig- und mittelamplifizierte Subgruppe
Her	human epidermal growth factor receptor
HERA-Studie	Herceptin® Adjuvant Trial
IHC	Immunhistochemie

kDa	Kilodalton
l	Liter
LSC®	Laser Scanning Cytometer
LSI	locus specific identifier
ml	Milliliter
mM	Millimol
MRD	minimal residual disease
N	Nodalstatus (TNM-Klassifikation)
n.e.	nicht erhoben
nm	Nanometer
O	Orange, mittelamplifizierte Subgruppe
ON	Trastuzumab als Monotherapie
OP	Operation
OR	Orange-Rot, mittel- und hochamplifizierte Subgruppe
OS	overall survival, Gesamtüberleben
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
Pat.	Patientin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Puffer	PBS mit 2 mM EDTA
pm	primär metastasiert
PR	Progesteronrezeptor
R	Rot, hochamplifizierte Subgruppe
RECO	Kombinationstherapie ChT und Trastuzumab nach Rezidiv
REON	Trastuzumabmonotherapie nach Rezidiv
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SEQ	sequentieller Therapiemodus: Trastuzumab folgt ChT
SPSS	Statistiksoftware der Firma SPSS
SSC	sodium saline citrate
T	Tumorgröße (TNM-Klassifikation)
Tab.	Tabelle

TGF α	transforming growth factor α
TZM	Trastuzumab
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus
WCP	Whole Chromosome Painting Probe
χ^2 -Test	Chi-Quadrat-Test

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	10
3. Ziele der Arbeit	20
4. Methoden	21
4.1 Patientinnengut	21
4.2 Methoden	25
4.2.1 Quantifizierung zirkulierender Tumorzellen mittels LSC®	25
4.2.1.1 Prinzip	25
4.2.1.2 Durchführung	26
4.2.1.3 Auswertung	27
4.2.2 Bestimmung der Her2-Amplifikation in den CETC mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	28
4.2.2.1 Prinzip	28
4.2.2.2 Durchführung	29
4.2.2.3 Auswertung	30
4.2.3 Statistische Auswertung	32
5. Ergebnisse	33
5.1 Quantitative Analyse der CETC unter Trastuzumab	33
5.2 Kontrolle der Her2-Amplifikation in den CETC durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	44
6. Diskussion	56
7. Schlussfolgerung	75
8. Literaturverzeichnis	77

9. Anhang

86

9.1 Ehrenwörtliche Erklärung

86

1. Zusammenfassung

Trotz ständiger Forschung liegt die Rezidivrate beim Mammakarzinom bei über 40 %. Als Ursache werden minimale Tumorreste im Körper angesehen, unter anderem in Form isolierter Tumorzellen in der Blutbahn. Wichtige Prognosefaktoren sind die Genamplifikation und Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors Her2 in den Tumoren von über einem Viertel der Patienten als Zeichen einer aggressiveren Tumorbiologie. Hierfür existiert ein gezielter Therapieansatz: der Her2-Antikörper Trastuzumab. Seine Wirksamkeit basiert vor allem auf der korrekten Bestimmung des Her2-Status im gesamten Krankheitsverlauf.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die zirkulierenden epithelialen Tumorzellen (CETC) unter Trastuzumab als adjuvante und Rezidivtherapie zu quantifizieren und zu Klinik und Therapiezeitpunkt zu korrelieren. Zusätzlich wurde die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Her2-Amplifikationsbestimmung in den CETC etabliert. Überprüft wurden Eignung dieser Methode, Abweichungen des Her2-Status vom Primärtumor und Zusammenhänge mit Zellzahl, Klinik und Outcome.

Von November 2002 bis August 2008 wurde bei 79 Mammakarzinompatientinnen die CETC-Zahl mehrfach bestimmt und bei 48 dieser Patientinnen von September 2007 bis Juli 2008 zusätzlich die Her2-Amplifikation in den CETC meist mehrfach erhoben. Die CETC-Quantifizierung erfolgte immunfluorometrisch mit dem Laser Scanning Cytometer: malignomverdächtige Zellen wurden mit fluoreszierendem EpCam-Antikörper für die automatische Registrierung und mikroskopische Auswertung sichtbar gemacht. Lagern ausreichend viele CETC vor, erfolgte eine FISH-Analyse. Diese Methode ist in der hier angewandten Art und in ihrem Umfang neu.

Die Ergebnisse der Zellzahlanalyse unter Trastuzumab bestätigen teilweise frühere Untersuchungen zum CETC-Monitoring: steigende Zellzahlen sind gegenüber stabilen Verläufen eindeutig assoziiert mit einem verkürzten Gesamtüberleben bei Rezidivtherapie. Bisher vernachlässigte man zudem den Einfluss des Verabreichungsmodus von Trastuzumab auf dessen Wirksamkeit. Diese Studie zeigt deutlich, dass sich die gleichzeitige adjuvante Chemo- und Trastuzumabtherapie im Vergleich zur sequentiellen Therapie nachteilig auf das krankheitsfreie Überleben und die Rezidivhäufigkeit auswirkt. Die Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in CETC gelang effektiv und reproduzierbar und ist damit routinemäßig einsetzbar. Die entdeckten CETC-Amplifikationssubgruppen besitzen ein unterschiedliches Verhalten unter Therapie. Dies

und die parallele Überwachung von Anzahl und Her2-Amplifikation der CETC ist in dieser Form noch nicht berichtet worden. Die niedrigamplifizierte Subgruppe lässt sich unter Therapie nicht eradizieren und ihr Dominieren zusammen mit mittelgradig amplifizierten CETC zeigt einen negativen Krankheitsverlauf an. Trastuzumab ist vielleicht nicht in der Lage, diese CETC zu eliminieren und zusätzliche Medikamente sind erforderlich. Die Ergebnisse sprechen für die Möglichkeit einer wechselseitigen Inhibierung von Chemotherapeutika und Trastuzumab. Die starken Schwankungen der hochamplifizierten Zellen korrelieren mit steigenden Zellzahlen und einer schlechteren Prognose. Diese Zellpopulation mit vermutlich erhöhter Proliferationsaktivität ist somit auch für die Überwachung der Trastuzumabwirkung und einer Resistenzentwicklung interessant. Eine entgegengesetzte Dynamik der hoch- zu mittelamplifizierten Zellen scheint eine noch vorhandene Therapiewirksamkeit anzuzeigen. Stillstand im Verlauf der hochamplifizierten CETC muss an einen Wirkungsverlust von Trastuzumab denken lassen. Man könnte also künftig Risikopatienten an ihrem Amplifikationsprofil und -verhalten erkennen.

Alarmierend ist die Bestätigung des regelhaften Auftretens amplifizierter Zellen bei primär Her2-negativen Patientinnen. Sie zeigen ein abweichendes Verhalten der Zellzahl und Amplifikationssubgruppen. Her2-negative Fälle mit leitlinienabweichender Trastuzumabtherapie reagieren jedoch wie primär Her2-positiv Patientinnen. Es stellt sich daher die Frage nach einer Indikationsausweitung für den Einsatz des Antikörpers.

Die festgestellten Verhaltensmuster der Subpopulationen lassen noch keine Korrelation mit klinischen Charakteristika oder Krankheitsverlauf zu. Die ermittelten Trends sollten an größeren Patientenkollektiven über einen längeren Zeitraum weiter überprüft werden.

Die gelungene Charakterisierung von drei Amplifikationssubgruppen ermöglicht bisher folgende Aussage: Dominanz der niedrig- und mittelgradig amplifizierten CETC bedeutet ein signifikant verkürztes krankheitsfreies Überleben.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sprechen für die Notwendigkeit der Einführung einer regelmäßigen Reevaluation des Her2-Status im Krankheitsverlauf, um die Fraktion Her2-positiver Zellen zu beobachten, die Wirksamkeit der Trastuzumabtherapie individuell und aktuell einzuschätzen und einer auf Anstieg oder Änderung der Zellpopulationen beruhenden Tumorprogression zeitig therapeutisch zu begegnen. Dafür hat sich die Verlaufsbeobachtung zirkulierender Tumorzellen als geeignet erwiesen.

2. Einleitung

Das Mammakarzinom stellt mit jährlich rund 60000 Neuerkrankungen nach wie vor die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland dar. Dies entspricht etwa 28 % aller weiblichen Krebserkrankungsfälle. Im Schnitt erkrankt jede 10. Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren und damit sechs Jahre unterhalb des Durchschnitts für alle Tumorentitäten. Etwa ein Drittel der Patientinnen ist jünger als 60 Jahre. Seit 1980 wird ein stetiges Ansteigen der Inzidenz verzeichnet, während die Mortalität seit Mitte der 1990er Jahre leicht sinkt. Dennoch stellt das Mammakarzinom mit rund 18000 Sterbefällen nach aktuellen Daten von 2004 die häufigste Krebstodesursache bei Frauen in der Bundesrepublik Deutschland dar. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Brustkrebspatientinnen beträgt derzeit über alle Stadien betrachtet circa 81 % (Robert-Koch-Institut 2008).

Die operative Entfernung des Tumors und gegebenenfalls befallener axillärer Lymphknoten bildet noch immer die zentrale Säule der Brustkrebstherapie.

Bereits vor vier Jahrzehnten setzte man bei lokal fortgeschrittenen oder inflammatorischen Mammakarzinomen eine präoperative Chemotherapie ein, um kurative Operationen und guten Wundverschluss zu ermöglichen (Hortobagyi et al. 1988). Später wurde die Indikation auch auf den primär operablen Brustkrebs ausgeweitet, allerdings begleitet von kontroversen Diskussionen bezüglich Nutzen und Risiko einer Therapie, die zwar einen früheren Behandlungsbeginn ermöglicht, den Tumor aber länger im Körper belässt. Studienergebnisse zeigten bisher einen positiven Effekt hinsichtlich der steigenden Zahl brusterhaltender Operationen und Negativierung des Nodalstatus. Für das Langzeitüberleben konnte keine Verbesserung gegenüber der rein adjuvanten Chemotherapie festgestellt werden (Bergh et al. 2001, Charfare et al. 2005).

Die adjuvante Chemotherapie mit dem Ziel einer kurativen Beseitigung möglicher Mikrometastasen und disseminierter Tumorzellen (minimal residual disease, MRD) bis unterhalb der klinischen Nachweisgrenze setzt voraus, dass vor Therapiebeginn eine Fernmetastasierung ausgeschlossen wird. Es sollen Rezidive vermieden und das Langzeitüberleben verbessert werden (EBCTCG 2005).

Schon Ende der 1950er Jahre untersuchte man in klinischen Studien die Wirkung von perioperativ lokal verabreichten Chemotherapeutika. In einem Teil der Fälle traten jedoch trotzdem Rezidive auf und man folgerte damals richtig, dass das Mammakarzinom meist

keine ausschließlich lokale Erkrankung darstellt und einer systemischen Therapie bedarf (Fisher et al. 1968, Skipper 1971).

Die daraufhin in den folgenden Jahrzehnten durchgeführten Polychemotherapien mit alten und neuen Substanzen sowie die Kombination mit Hormontherapien konnten einen bedeutenden Vorteil für das progressionsfreie und Langzeitüberleben erreichen (Bergh et al. 2001, EBCTCG 2005).

Als Teil der adjuvanten Therapie gelten neben den Zytostatika (Chemotherapeutika i.e.S.) auch die Bestrahlung, die endokrine Therapie und die Immuntherapie mit Antikörpern. Über die beiden zuletzt genannten Optionen wird mittels Bestimmung des individuellen tumorbiologischen Risikoprofils im Primärtumor entschieden. Die beiden Optionen werden als sogenannte „targeted therapies“, gezielte Therapien, bezeichnet. Die dafür therapierelevanten Tumoreigenschaften umfassen die prädiktiven Faktoren Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus und die Expression beziehungsweise Amplifikation des Gens für den Her2-Rezeptor. Das Expressionsprofil bestimmt also zusammen mit Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Alter der Patientin den primären Einsatz einer systemischen Therapie und deren zielgerichteter Komponenten (Goldhirsch et al. 2007).

Die Entwicklung von maßgeschneiderten Brustkrebstherapien wurde dadurch vorangetrieben, dass trotz allem wissenschaftlichen Fortschritts Rezidive bis heute in circa 40 % der Fälle auftreten (EBCTCG 2005). Dies geht fast immer mit einer infausten Prognose für die Patientin einher. Dabei sind in der Vergangenheit Patientenkollektive mit besonders schlechten Krankheitsverläufen aufgefallen, in denen sich dann bestimmte Prognosefaktoren herauskristallisierten. Hierbei erscheinen besonders die eben genannten Hormonrezeptoren und der Wachstumsfaktorrezeptor Her2 von größter therapeutischer Bedeutung als bisher einzige evidenzbasierte prädiktive Faktoren (Goldhirsch et al. 2005, EBCTCG 2005).

Mit 25-30 % stellt der Anteil an Mammakarzinomen mit einer Überexpression des Her2-Rezeptors auf den Zellen des Primärtumors einen nicht zu übersehenden tumorbiologischen Faktor für Klinik, Therapie und Erforschung der Krankheit dar (Pauletti et al. 1996).

Der Genlocus für Her2 befindet sich auf Chromosom 17q2 und kodiert für ein 185 kDa großes transmembranöses Glykoprotein aus der Familie der EGF-Rezeptortyrosinkinasen. Zur gleichen Gruppe gehören auch Her1, Her3 und Her4. Die Bindung von Liganden an der extrazellulären Domäne führt zur Dimerisierung (Homo- und bevorzugt

Heterodimerisierung) der RTK. Erst dadurch wird die intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität mit nachfolgenden hochkomplexen Signaltransduktionswegen und damit zahlreichen Wirkungen auf zellulärer Ebene initiiert (Stern 2000). Obwohl eine Vielzahl an möglichen Liganden für die Her-Rezeptoren identifiziert wurde, beispielsweise EGF, TGF α , Epiregulin und Neureguline, konnte kein spezifischer Agonist für Her2 gefunden werden (Riese und Stern 1998, Hynes et al. 2001). Stattdessen stellt Her2 den favorisierten Dimerisierungspartner innerhalb der Her-Familie dar, der konstitutiv eine sogenannte Dimerisierungsschleife zur Interaktion exponiert (Garrett et al. 2003). Nach der Heterodimerisierung mit Her2 erhöht sich darüber hinaus die Affinität des anderen Rezeptors zu seinen Liganden, wodurch eine Intensivierung und Verlängerung der Signalweiterleitung eintritt (Karunagaran et al. 1996, Hynes et al. 2001).

Zusätzlich bestehen multiple positive und negative Regulationsmöglichkeiten für die Rezeptorfunktion, wie (De-)Phosphorylierung innerhalb der Signalwege, Internalisierung der Rezeptoren (Downregulation), Abbau von Rezeptor-Liganden-Komplexen und die Möglichkeit des Wiedereinbaus in die Zellmembran (Schlessinger 2000).

Die physiologischen Aufgabengebiete der Her-Familie während der Ontogenese liegen hauptsächlich in der Beeinflussung von Entwicklung und Differenzierung, Zellproliferation und -tod. Später finden sich die Her-Rezeptoren vor allem auf epithelialen Zellen und greifen in Wachstum und Regeneration ein (Yarden und Sliwkowski 2001, Olayioye et al. 2000). Dies gilt auch für die Brustdrüse, in der während Pubertät und Schwangerschaft eine vermehrte Expression der EGFR-Familie auftritt (Stern 2003).

In diesem Aufgabenspektrum liegt schließlich auch die Ursache für das onkogene Potential der Her-Rezeptoren im Falle von Mutationen, Deletionen, Ligandenüberangebot durch Koexpression oder Rezeptorüberexpression (Holbro et al. 2003).

Letzteres trifft für Her2 zu, das in über einem Viertel aller Mammakarzinome überexprimiert vorliegt. Dabei beruht die Überexpression in 97 % der Fälle auf der Amplifikation des Her2-Onkogens und damit einem typischen Mechanismus der Tumorentstehung und -progression von Karzinomen (Pauletti et al. 1996).

Die Vervielfachung von spezifischen DNA-Sequenzen in Form eines Amplikons ist ein beim Menschen physiologischerweise nicht bekannter und bisher nur bei einigen niederen Spezies entdeckter Vorgang. Dagegen weisen Zelllinien mit Resistenz gegenüber verschiedenen zytotoxischen Substanzen und Tumorzellen gehäuft Amplifikationen auf

(Brison 1993, Claycomb et al. 2004). Mehrere Untersuchungen unterstreichen, dass der Erwerb von Genamplifikationen ein relativ später Vorgang innerhalb der Karzinogenese ist und eine bereits tolerierte genomische Instabilität voraussetzt (Brison 1993, Beckmann et al. 1997).

Die betroffenen Genloci und ihre Expressionsprodukte verschaffen den Zellen zumeist einen entscheidenden Vorteil im Hinblick auf Wachstum, Proliferation, Metastasierung und Angiogenese. Für Her2 liegen zahlreiche Studien vor, die einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Rezeptorüberexpression und einem verkürzten rezidivfreien Überleben sowie einer insgesamt schlechteren Prognose zeigen konnten (Slamon et al. 1987, Ross und Gray 2003, Ingvarsson 1999). Der Her2-Status korrelierte dabei mit Tumorgröße, Grading, positivem Lymphknotenstatus, dem Vorhandensein von Fernmetastasen, Rezidivrate und dem Ansprechen auf Radio- und Chemotherapien (Ingvarsson 1999).

Als Hauptmechanismen für diese negativen Effekte der Überexpression wurden ligandenunabhängige Zelltransformation und -proliferation durch die verstärkte und spontane Bildung von Her2-Homodimeren und -Heterodimeren beschrieben sowie konstitutive Rezeptoraktivität (Ben-Levy et al. 1994). Hinzu kommen die anti-apoptotischen sowie Migration, Invasion und damit Metastasenbildung unterstützenden Eigenschaften solcher Tumorzellen (Holbro et al. 2003).

Es wäre deshalb wünschenswert, schon im Vorfeld der Behandlung die mögliche Aggressivität einer Tumorerkrankung abzuschätzen, wozu auch die Feststellung der Amplifikation und/oder Überexpression von Her2 zählt. Die mittlerweile bei allen Brustkrebspatientinnen erfolgende Bestimmung des Her2-Status wird standardmäßig mittels semiquantitativer immunhistochemischer Bestimmung (IHC) der Proteinexpression im Primärtumor durchgeführt. Pathologen ermitteln hierbei den prozentualen Anteil von Tumorzellen, die mit einer Intensität von 0 bis +3 durch einen gegen Her2 gerichteten Antikörper gefärbt werden. Ab einem Wert von 30 % +3-positiver Zellen (zuvor 10 %) gilt ein Tumor nach aktuellen Richtlinien der ASCO (Wolff et al. 2007) als Her2-positiv, darunter entweder als negativ (0, +1) oder grenzwertig negativ (+2). Ist letzteres der Fall, wird eine Nachuntersuchung mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) empfohlen. Hierfür stehen drei durch die FDA anerkannte Tests, unter anderem PathVysion der Firma Vysis, zur Verfügung (Carney et al. 2007). Diese Methode kann auf zytogenetischer Ebene chromosomale Aberrationen, wozu die Genamplifikation zählt,

sichtbar machen. Dazu wird die DNA der Zielzellen in Einzelstränge aufgespalten und lässt so die lokusspezifische Anlagerung von ebenfalls einzelsträngigen, komplementären DNA-Sonden zu. Diese Sonden sind zusätzlich direkt oder indirekt mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die die interessierenden Gene oder Chromosomenabschnitte sichtbar machen und es erlauben, die Amplifikate zu zählen (Joos et al. 1994).

Zwar ist die FISH-Methode noch kein Standard in der Brustkrebsdiagnostik, was von einigen Autoren jedoch auf Grund ihrer Ergebnisse angeraten wurde. Sie sahen die FISH-Methode zumeist als komplementär, wenn nicht sogar überlegen gegenüber der IHC (Bartlett et al. 2001, Tsuda et al. 2001, Press et al. 2005, Hofmann et al. 2008, Sauer et al. 2003).

Wiederholt belegten Studien der letzten Jahre, dass der Anteil falsch-negativer oder zumindest fraglicher Befunde im Primärtumor durch die IHC bis zu 20 % betragen kann (Carney et al. 2007). Insbesondere bei Betrachtung von progredientem Brustkrebs treten zusätzliche Fragen hinsichtlich der Verlässlichkeit und Stabilität des einmal festgelegten Her2-Status auf: Zidan et al. fanden bei 12 % der ursprünglich als Her2-negativ bestimmten Patientinnen Her2-positive Metastasen vor und weisen nachdrücklich auf die Relevanz dieser Ergebnisse für Therapieentscheidungen hin. Andere Gruppen unterstreichen diesen Mangel an Übereinstimmung der Ergebnisse in 6-20 % der Fälle (Gancberg et al. 2002, Edgerton et al. 2003, Zidan et al. 2005). Daher ist davon auszugehen, dass ein Teil der Brustkrebspatientinnen mit adjuvanter oder palliativer Therapie momentan nicht die für ihr Rezeptorprofil passende medikamentöse Behandlung erhält (Carney et al. 2007).

Für Patientinnen mit positivem Her2-Status (IHC +3 oder FISH >6 Genkopien pro Zelle) gilt mittlerweile die (neo)adjuvante und palliative Gabe von Trastuzumab als Standardtherapie (Wolff et al. 2007). Dieser rekombinante humanisierte monoklonale Antikörper richtet sich gegen eine extrazelluläre Region des Her2-Rezeptors und verhindert dessen Signalweiterleitung in das Zellinnere. Durch das Ausbleiben dieser stimulierenden Impulse wird ein Zellzyklusarrest und teilweise die Apoptose eingeleitet. In vitro und teilweise in vivo konnte außerdem eine Aktivierung von Natürlichen Killerzellen im Sinne einer antikörperabhängigen Zytotoxizität (ADCC) durch Her2-Antikörper nachgewiesen werden, was ebenfalls zum Absterben von Brustkrebszellen führte. Als weiterer Mechanismus gilt die Inhibition der Angiogenese im Tumor (Nahta und Esteva 2006a).

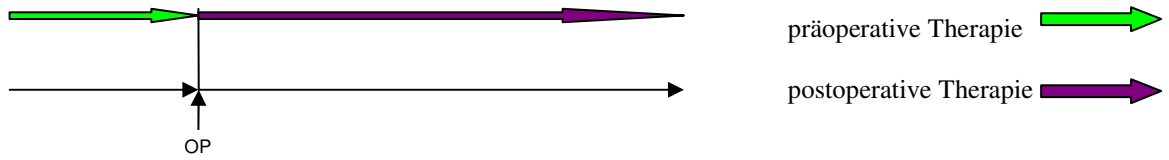
Obwohl die exakte Wirkungsweise noch nicht entschlüsselt wurde, konnten in klinischen Studien bereits nach einem Jahr beeindruckende Effekte einer adjuvanten Trastuzumabgabe, besonders in Kombination mit Anthrazyklinen, auf das rezidivfreie und Gesamtüberleben beobachtet werden: die Rezidivraten verminderten sich um 39 – 52 %, die Mortalität sank um durchschnittlich 30 %. Dies bestätigte die zuvor erhaltenen positiven Ergebnisse im Rahmen des metastasierten Mammakarzinoms auch für eine kurative Zielstellung (Dinh et al. 2008).

Dennoch birgt die Anwendung von Trastuzumab Risiken, die es im Kontext der Krankheit abzuwägen gilt. Mögliche kardiotoxische Nebenwirkungen, insbesondere assoziiert mit der zeitnahen Gabe von Anthrazyklinen, erfordern die Abklärung der kardialen Ausgangssituation jeder Patientin im Vorfeld. Außerdem fand sich eine erhöhte Inzidenz von Hirnmetastasen in den mit dem Antikörper behandelten Studienarmen (Viani et al. 2007).

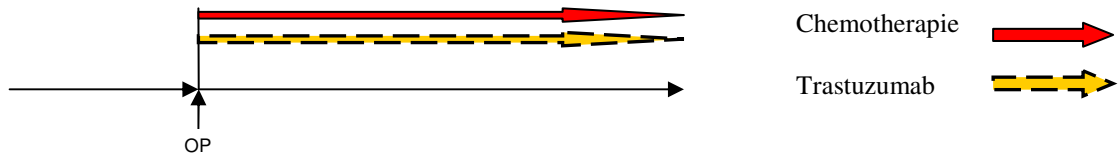
Mittlerweile wird auch ein präoperativer Einsatz von Trastuzumab intensiv untersucht, die Ergebnisse hierzu stehen allerdings noch aus (Madarnas et al. 2008).

Es bestehen zahlreiche Möglichkeiten, Trastuzumab in die Brustkrebstherapie zu integrieren: vor oder nach der Operation des Tumors, parallel zur Chemotherapie (kombiniert) oder der Chemotherapie folgend (sequentiell) (Abb. 1). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der postoperativen und insbesondere mit der adjuvanten Trastuzumabtherapie sowie der Rezidivtherapie.

Trotz intensiver klinischer Forschung besteht aber weiterhin die Frage, ob die zeitliche Reihenfolge – insbesondere sequentielle versus kombinierte Gabe zur Chemotherapie – von Bedeutung für den Behandlungserfolg ist (Madarnas et al. 2008, Dinh et al. 2008).



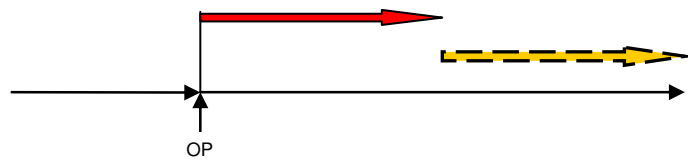
a) Einteilung der Gesamttherapie des Mammakarzinoms



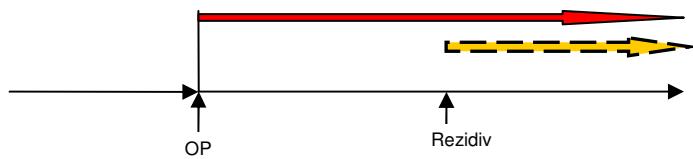
b) adjuvant Trastuzumab und gleichzeitige Chemotherapie (kombiniert = CO)



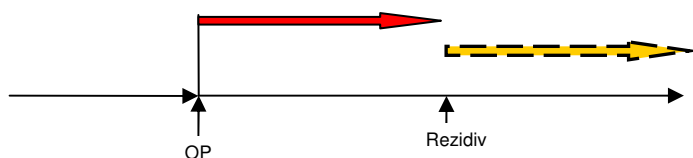
c) adjuvant Trastuzumab als Monotherapie (allein = ON)



d) adjuvant Trastuzumab der Chemotherapie folgend (sequentiell = SEQ)



e) Trastuzumab und gleichzeitige Chemotherapie nach Rezidiv (kombiniert nach Rezidiv = RECO)



f) Trastuzumab als Monotherapie nach Rezidiv (allein nach Rezidiv = REON)

Abb. 1: Darstellung der möglichen Zeitpunkte einer postoperativen Trastuzumabtherapie

Trotz ständiger Verbesserung von Früherkennungs-, Operations- und (neo)adjuvanten Therapiemethoden erfolgt in circa 30 % der Fälle im weiteren Verlauf ein Krankheitsrückfall, obwohl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und Tumorentfernung kein Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen detektierbar waren (Fisher et al. 2002). Ursächlich hierfür sind trotz sorgfältiger Resektion und Einsatz adjuvanter Medikamente offenbar im Patienten früh hämatogen und lymphogen gestreute überlebende Tumorzellen (Pantel et al. 1993). Diese Art des Fortbestehens der Erkrankung in Knochenmark, Blut und Lymphknoten unterhalb der Nachweisgrenze routinemäßiger Untersuchungsmethoden wird als minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) bezeichnet und findet sich auch bei anderen Tumorentitäten wieder (Mocellin et al. 2006).

Fehm et al. zeigten 2002 darüber hinaus für die im peripheren Blut zirkulierenden Tumorzellen, dass der Großteil dieser Zellen auf Grund zytogenetischer Klonalität vom Primärtumor abstammen muss (Fehm et al. 2002).

Es liegen weiterhin Ergebnisse mehrerer Studien vor, die die Theorie stützen, dass die MRD den Beginn der Metastasierungskaskade darstellt (Gerber et al. 2001, Mansi et al. 1999). Allerdings kann analog zur heterogenen Tumorbilogie auch erwartet werden, dass die ausgeschwemmten Zellen ein sehr unterschiedliches Metastasierungspotential aufweisen und nur ein Teil auf Grund genetischer Eigenschaften und epigenetischer Veränderungen zu klinisch manifesten Metastasen heranwachsen kann (Hunter 2004). Es wurde belegt, dass zirkulierende Tumorzellen bis zu 22 Jahre nach Tumorentfernung und bei klinisch gesunden Patientinnen nachweisbar blieben und somit weitere CTC-Subpopulationen im ruhenden (Meng et al. 2004a, Pachmann 2005) als auch im apoptotischen Zustand existieren (Mehes et al. 2001).

Daher erscheint es umso bedeutsamer, die Charakterisierung der CTC bezüglich prognostischer und prädiktiver Marker genauer zu untersuchen, da erst hierdurch die Relevanz für Therapie und Metastasenbildung weiter eingeschätzt werden kann (Chambers et al. 2000).

Ein gehäuftes Auftreten von ossären Metastasen im Rahmen von Brustkrebserkrankungen wurde bereits im Jahre 1889 durch Paget im Rahmen seiner "seed and soil"-Theorie (Paget 1889) aufgezeigt. Rohr und Hegglin gelang 47 Jahre später der Nachweis von Tumorzellen in Sternalpunktat mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Rohr und Hegglin 1936). Sie legten damit die Grundlage für die Entwicklung immunzytochemischer, immunomagnetischer und molekularer Detektionsmethoden für disseminierte Tumorzellen im Knochenmark

(DTC) (Sloane et al. 1980, Choemmel et al. 2004, Lankiewicz et al. 2006). In einigen Studien der vergangenen Jahre konnte damit eine prognostische Relevanz für das Vorhandensein von DTC bei Mammakarzinompatientinnen gezeigt werden (Braun et al. 2000, Janni et al. 2005).

Allerdings stellt die Knochenmarkspunktion einen invasiven, aufwändigen und hinsichtlich Entnahmeevolumen und Qualität des Materials unsicheren Faktor dar, welcher dem Ziel einer regelmäßigen und verlässlichen Überwachung der Krankheit entgegensteht (Riethdorf und Pantel 2008). Daher verlagerte sich der Schwerpunkt der Erforschung der minimalen Resterkrankung in den letzten Jahren von den DTC vermehrt zur Detektion und Analyse von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) im peripher-venösen Blut.

Obwohl die erste Identifikation maligner Zellen im Blut eines Tumorpatienten schon 1869 gelang (Ashworth 1869), dauert die Etablierung einer einheitlichen Nachweismethode bis heute an. Dienten Mitte des vergangenen Jahrhunderts noch mikroskopische Verfahren der morphologischen Betrachtung tumorverdächtiger Zellen in der Zirkulation (Christopherson 1965), so konzentrierte man sich später auf Anreicherungsverfahren wie die Dichtezellzentrifugation (Pierga et al. 2004) oder antikörpergekoppelte Magnetbeads in Kombination mit immunzytochemischen (Rolle et al. 2005, Racila et al. 1998), molekulargenetischen (Xenidis et al. 2006, Nakagawa et al. 2007) oder bildgebenden Verfahren (Witzig et al. 2002).

Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruht auf der Immunfluorometrie, verbindet dabei Mikrofluorometrie mit der Effektivität der Durchflusszytometrie und wurde 2001 von Pachmann et al. zuerst beschrieben (Pachmann et al. 2001).

Primär lag der Fokus der meisten Untersucher auf bereits metastasierten Patientinnen und mehrere Studien konnten hier einen prognostischen Nutzen der zahlenmäßigen CTC-Analyse hinsichtlich des krankheitsfreien und Gesamtüberlebens belegen (Cristofanilli et al. 2005, Hayes et al. 2006). In einigen Untersuchungen offenbarte sich aber bereits die Aussagekraft und klinische Relevanz der Quantifizierung von zirkulierenden Tumorzellen auch in früheren Krankheitsstadien. So konnten sowohl Voraussagen hinsichtlich neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapieerfolge aufgrund von Tumorzellverläufen getroffen werden als auch für das Rezidivrisiko nach Ende der Therapie (Pachmann et al. 2005, Pachmann et al. 2008b, Pachmann et al. 2008a, Camara et al. 2007, Lobodasch et al. 2007).

Es besteht weiterhin Einigkeit darüber, dass ein Teil der Patientinnen über- oder fehltherapiert wird auf Grund unzulänglicher Risikoabschätzung. Dem versucht man mit ständig aktualisierten Leitlinien beizukommen (Goldhirsch et al. 2005, Goldhirsch et al. 2007).

Mit Hilfe weiterer prädiktiver oder prognostischer Merkmale der zirkulierenden Tumorzellen als persistierender Spiegel der Krankheit besteht hier die Chance für einen Fortschritt (Riethdorf und Pantel 2008).

Wie in vorangegangenen Abschnitten bereits mehrfach angedeutet, könnten Detektion und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen besonders im Hinblick auf Abweichungen zum Primärtumor wertvolle Informationen zu Prognose, Therapieplanung und -effekten liefern (Klein 2005, Fehm und Solomayer 2004). Einigen Untersuchergruppen gelang es in der Vergangenheit, unter anderem Hormonrezeptoren und Her2 auf und in CTC nachzuweisen und teilweise zu quantifizieren. So konnten sowohl Unterschiede zum Primärtumor als auch Veränderungen unter Therapie festgestellt werden (Tewes et al. 2008).

Speziell für die Erforschung von Her2 bei zirkulierenden Mammakarzinomzellen liegen bisher nur Ergebnisse für vorwiegend sehr kleine Patientenkollektive mit stark variierenden methodischen Ansätzen für CTC-Detektion und Her2-Bestimmung vor (Brandt et al. 1998, Fehm und Solomayer 2004, Wulfing et al. 2006, Tewes et al. 2008, Ignatiadis et al. 2008). Noch weniger Informationen existieren zur Amplifikationsbestimmung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und der Amplifikationsdynamik in solchen Zellen (Meng et al. 2004b, Meng et al. 2006). Auch die kontinuierliche Überwachung der Tumorzellzahl parallel zur wiederholten Erhebung der Her2-Amplifikation unter zusätzlicher Berücksichtigung der Therapie mit Trastuzumab erfolgte bisher laut Literatur nicht.

Zusammen mit der immer deutlicher werdenden Aussagekraft der zirkulierenden Tumorzellen unterstreicht dies die zukunftsweisenden Möglichkeiten der Charakterisierung von CTC, was hier an Hand der Her2-Amplifikation demonstriert werden soll.

3. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht folgende Punkte:

- Welchen Einfluss übt Trastuzumab innerhalb der adjuvanten Therapie und der Rezidivtherapie auf die zirkulierenden epithelialen Tumorzellen aus und besteht ein Zusammenhang zwischen dem Verhalten der Zellzahl, Zeitpunkt der Antikörpertherapie, klinischen Parametern und dem Outcome dieser Patientinnen?
- Ist eine Her2-Amplifikation auch in den zirkulierenden epithelialen Tumorzellen von Patientinnen mit Her2-überexprimierenden Mammakarzinomen verlässlich und wiederholt mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nachweisbar?
- Existieren Unterschiede hinsichtlich des Amplifikationsgrades der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen?
- Wie verhält sich die Her2-Amplifikatzahl unter der Therapie mit Trastuzumab?
- Findet sich eine Her2-Überamplifikation auch in den zirkulierenden epithelialen Tumorzellen von primär Her2-negativen (IHC-Status 0 bis +2) Patientinnen und lässt sich auch hier eine Veränderung unter Therapie mit beziehungsweise ohne Trastuzumab feststellen?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen den Amplifikationsgraden der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen, Klinik und Outcome der untersuchten Patientinnen?

4. Material und Methoden

4.1 Patientinnengut

Im Zeitraum von November 2002 bis August 2008 wurde bei 79 Mammakarzinompatientinnen im Alter von 28 bis 73 Jahren (Mittelwert 57,5 Jahre, Median 56 Jahre) mit ihrem Einverständnis und der Zustimmung der Ethikkommission wiederholt die Anzahl der im Blut zirkulierenden epithelialen Tumorzellen (CETC) ermittelt. Im Rahmen der Therapiekontrolle wurde in der Universitätsfrauenklinik Jena in unterschiedlichen Abständen peripher-venöses Blut und dabei zusätzliche 10 ml EDTA-Blut für die CETC-Analyse entnommen. Die Zeitpunkte umfassten gegebenenfalls sowohl die medikamentöse und nicht-medikamentöse Therapie als auch Nachsorgetermine. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hierbei zum einem mit dem Verhalten der CETC-Zahl unter Trastuzumabtherapie (n = 50) bei Patientinnen mit postoperativer Therapie (n = 45) oder im primär metastasierten Zustand (n = 5).

Von insgesamt 48 der insgesamt 79 Patientinnen wurde von September 2007 bis Juli 2008 zusätzlich zur Zellzahlbestimmung der Status der Her2-Amplifikation in den zirkulierenden epithelialen Tumorzellen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erhoben. Bei 30 Patientinnen gelang eine solche Analyse zu mindestens zwei verschiedenen Zeitpunkten. Dabei betrug der minimale Abstand zwischen zwei Her2-Kontrollen drei Wochen, der maximale acht Monate.

Die Einteilung der Patientinnen hinsichtlich Therapie und FISH-Analysen ist in Abbildung 2 wie folgt aufgeschlüsselt (TZM = Trastuzumab):

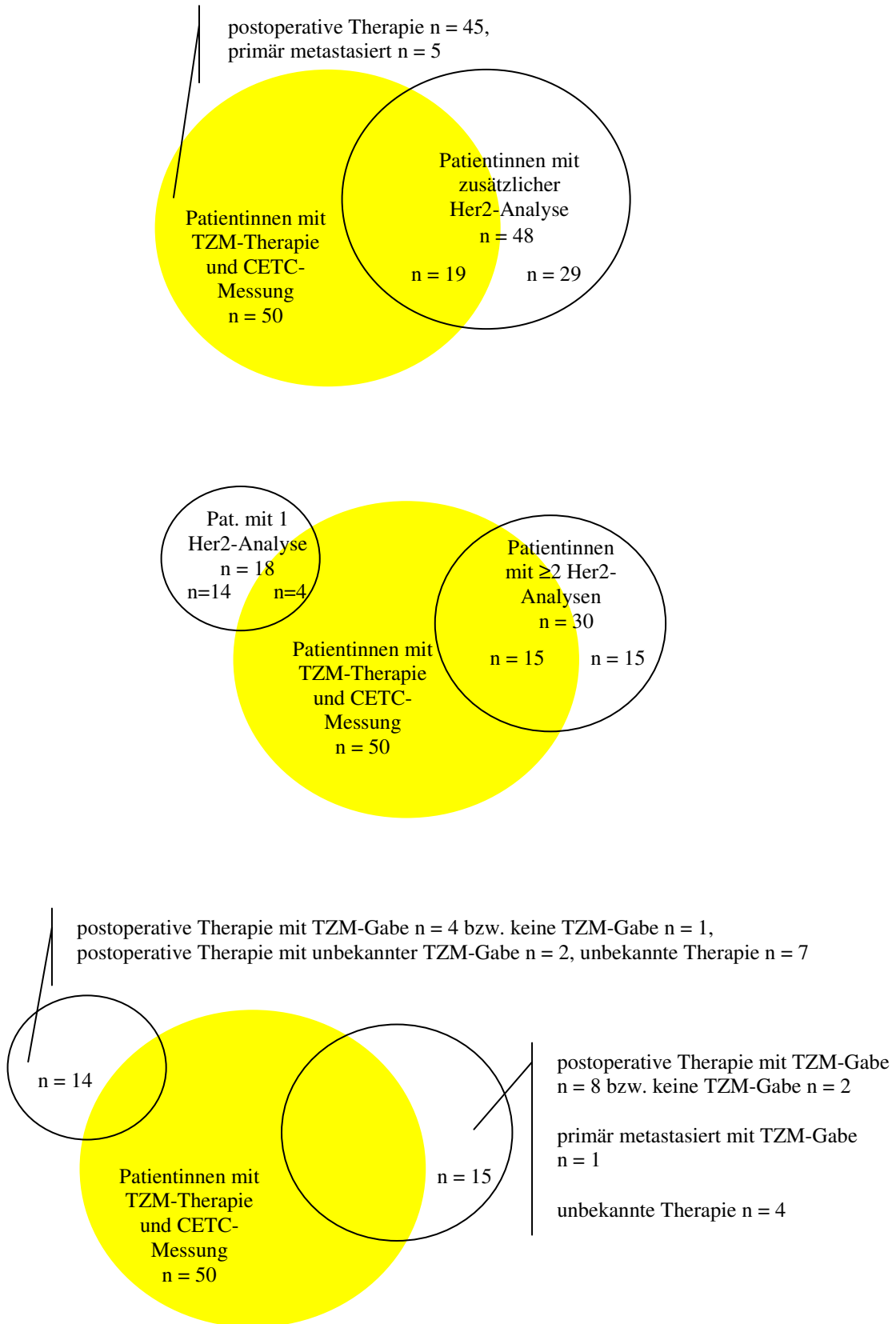


Abb. 2: Einteilung der Patientinnen nach Therapie und Her2-Analysehäufigkeit

Das folgende Diagramm (Abb. 3) zeigt die weitere Aufteilung aller Patientinnen auf Untergruppen hinsichtlich des Therapiemodus:

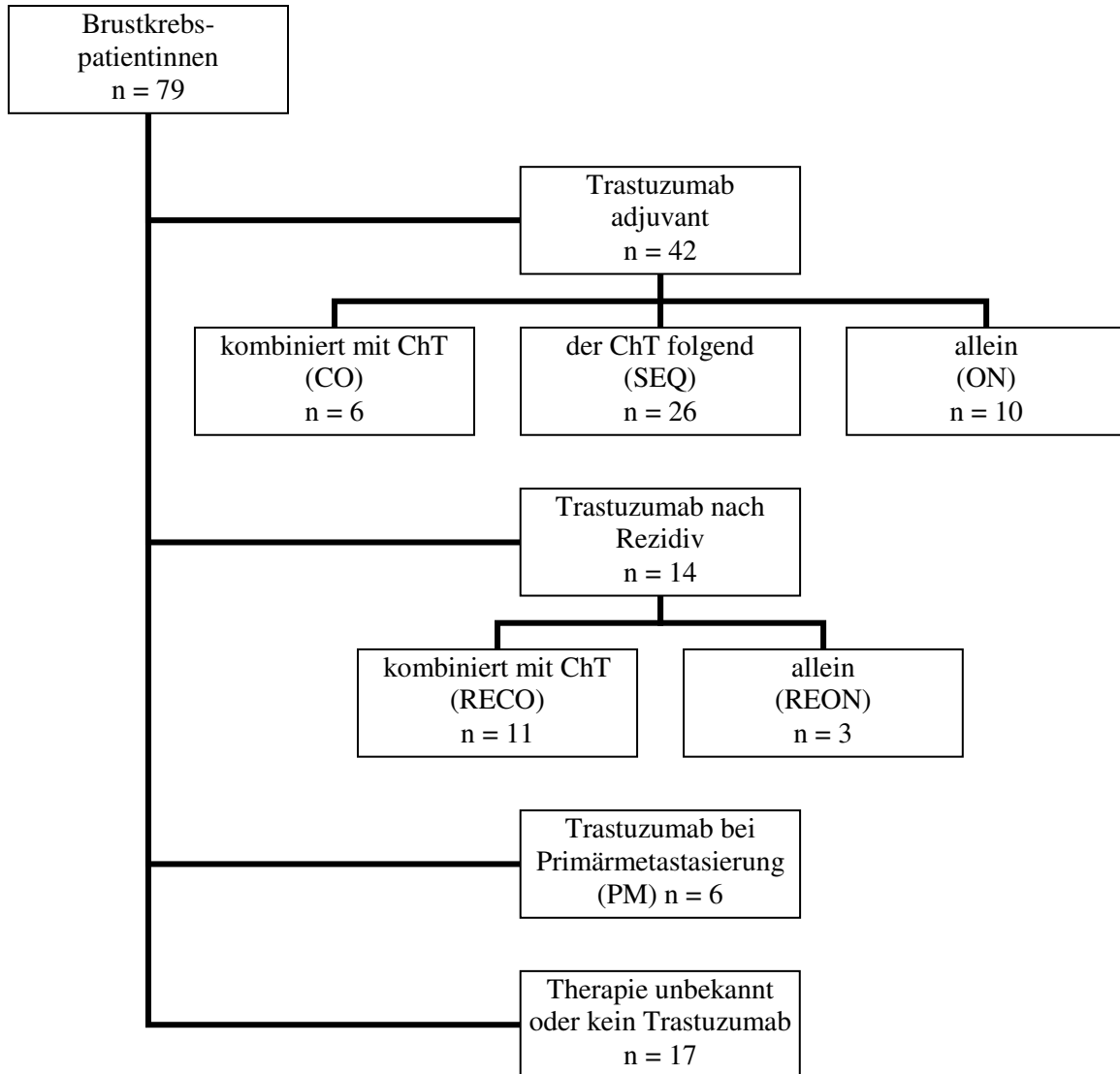


Abb. 3: Aufteilung der Patientinnen nach Therapiemodus

Die klinisch-pathologischen Patientendaten stammen aus den Unterlagen der Universitätsfrauenklinik Jena.

Die Tabelle 1 stellt die prozentuale Verteilung dieser Merkmale von allen Patientinnen, unterteilt nach den Therapiemodusgruppen, dar:

Tab. 1: Verteilung der klinisch-pathologischen Merkmale in den Therapiemodusgruppen

	CO (%)	SEQ (%)	ON (%)	RECO (%)	REON (%)	PM (%)	Therapie unbek./ kein TZM (%)
T							
0-1	50	54	80	73	67	50	6
2	33	46	20	18	33	33	17
3-4	17	0	0	0	0	17	12
n.e.	0	0	0	9	0	0	65
N							
positiv	50	38	30	82	33	83	18
negativ	50	58	70	9	67	17	18
n.e.	0	4	0	9	0	0	64
G							
1	0	0	0	0	0	0	0
2	33	39	50	9	0	50	18
3	50	61	50	73	100	50	18
n.e.	17	0	0	18	0	0	64
ER							
positiv	83	73	40	73	33	66	23
negativ	17	27	60	27	67	17	12
n.e.	0	0	0	0	0	17	65
PR							
positiv	67	69	60	27	67	87	18
negativ	33	31	40	73	33	17	18
n.e.	0	0	0	0	0	0	64
Her2-Status Primärtumor							
positiv +3	100	96	100	46	100	67	18
negativ 0,+1,+2	0	4	0	36	0	33	76
n.e.	0	0	0	18	0	0	6

CO: TZM und Chemotherapie parallel; ER: Estrogenrezeptorstatus; G: Grading; N: Nodalstatus; n.e.: nicht erhoben; ON: TZM-Monotherapie; PM: primär metastasiert; PR: Progesteronrezeptorstatus; RECO: TZM und Chemotherapie parallel nach Rezidiv; REON: TZM-Monotherapie nach Rezidiv; SEQ: TZM auf Chemotherapie folgend; T: Tumorgröße; TZM: Trastuzumab, unbek.: unbekannt

4.2 Methoden

4.2.1 Quantifizierung zirkulierender epithelialer Tumorzellen mittels LSC®

4.2.1.1 Prinzip

Das Laser-Scanning-Cytometer LSC® (CompuCyte, Cambridge Mass.) erlaubt die durchflusszytometrische Analyse von bis zu 50000 Zellen in 30 Minuten mit der Möglichkeit, jedes positive Event im Nachhinein zu relokalisieren und damit auch individuell zu reevaluieren. Dies beruht auf der gezielten Anfärbung zellulärer Strukturen mit fluoreszenzgekoppelten monoklonalen Antikörpern, wie unter 4.2.1.2 beschrieben, und der computergesteuerten Bestimmung der x- und y-Position jeder erkannten Zelle auf dem Objektträger.

Zum einen wird die Fraktion der weißen Blutkörperchen mit einem durch Phycoerythrin (PE) orange fluoreszierenden Antikörper gegen das in allen Leukozyten exprimierte Antigen CD45 markiert. Zum anderen charakterisiert die Positivität für anti-EpCam (grüne Fluoreszenz durch FITC) alle Zellen epithelialen Ursprungs und damit auch Mammakarzinomzellen, die bekannt sind für eine Überexpression dieses Oberflächenmoleküls (Osta et al. 2004).

Die einzelnen Zellen werden mittels Vorwärtsstreulicht auf dem Objektträger registriert. Die Festlegung von positiven Ereignissen erfolgt über die Intensität der grünen und orangen Fluoreszenz, die durch einen Argon-Ionen-Laser (Wellenlänge 488 nm) gemessen wird bei einer Emission von 515-545 nm für FITC und 565-585 nm für PE.

Die Visualisierung der Fluoreszenzverteilung erscheint bereits während des Scanvorgangs in einem Histogramm (Abb. 4b), wobei die x-Achse die grüne und die y-Achse die orange Fluoreszenzstärke wiedergibt. Dem Histogramm wird ein Gate hinzugefügt, das die zu evaluierenden wahrscheinlichen CETC als positive Events deklariert und ihre exakte Lokalisation auf dem Objektträger abspeichert, wie aus Abbildung 4a ersichtlich.

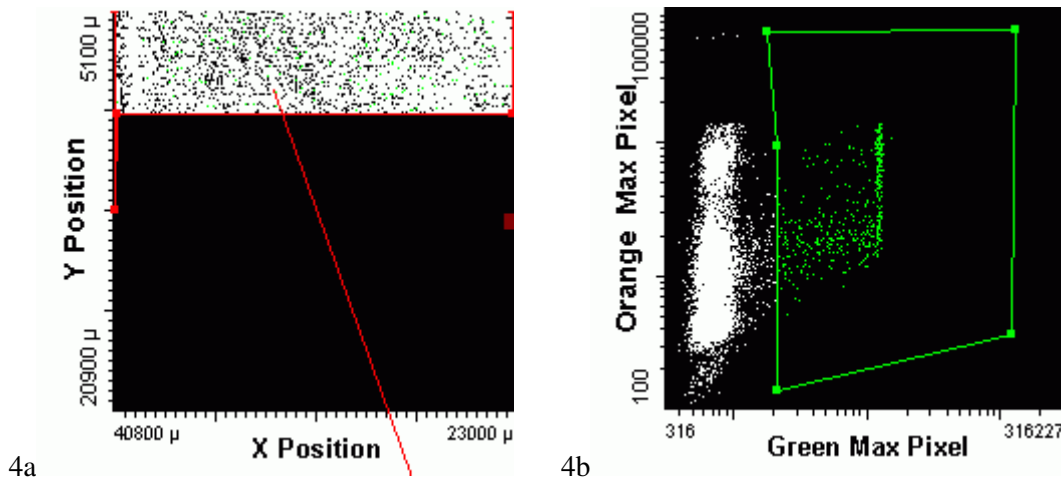


Abb. 4a: Lokalisation auf dem Objektträger; 4b: Histogramm der Fluoreszenzintensität

Nach dem Scanvorgang des LSC® kann nach Relokalisation an Hand der Intensität und dem Ort der Fluoreszenz (in oder auf der Zelle) sowie der Morphologie eine Einteilung vorgenommen werden:

Tote Zellen, gekennzeichnet durch intrazelluläre Anfärbung mit FITC, und unspezifische Fluoreszenzereignisse werden nicht gezählt. Ziel ist die ausschließliche Zählung von Zellen mit grüner Oberflächenfärbung, charakteristischerweise in Kappenform, die mit hoher Wahrscheinlichkeit vital und malignen Ursprungs sind.

4.2.1.2 Durchführung

Die Aufarbeitung des bei Zimmertemperatur gelagerten peripher-venösen EDTA-Blutes erfolgte am zweiten bis maximal dritten Tag nach der Entnahme.

Ein Milliliter Vollblut wurde für zehn Minuten in 9 ml Erythrozytenlysepuffer (EL-Puffer) lysiert. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 14 °C und 1200 U/min trennte sich die Fraktion der kernhaltigen Zellen von den flüssigen und lysierten Bestandteilen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 μl PE-Puffer (PBS mit 2 mM EDTA) resuspendiert. Es folgte eine mindestens fünfzehnminütige Inkubation von 100 μl der Zellsuspension mit 2,5 μl anti-CD326-FITC (Anti-EpCam, gekoppelt an Fluoresceinthiocyanat) und 1 μl anti-CD45-PE bei 4 °C und danach eine Auffüllung auf 1 ml mit PE-Puffer. 100 μl dieser Suspension wurden zusammen mit 80 μl PE-Puffer auf ein mit Fettstift begrenztes Feld eines Adhäsions-Objektträgers aufgebracht. Nach circa 10 Minuten hatten sich die Zellen in einer Ebene abgesetzt und konnten nun vom Laser

Scanning Cytometer bei 20x12,5facher Vergrößerung analysiert werden. Nach dem circa zwanzigminütigen Scanvorgang wurden die ersten 50 als positiv bestimmten Events individuell bei 40x12,5facher Vergrößerung wie unter 4.2.2.1 beschrieben bewertet.

Es folgte eine statistische Hochrechnung der gezählten zirkulierenden epithelialen Tumorzellen auf einen Milliliter Vollblut unter Beachtung der 50fachen Verdünnung der Blutprobe für den Messvorgang. Dieser Wert wurde für die Überwachung der Tumorzellzahl logarithmisch in einem Diagramm für jede Patientin dokumentiert, wie in der folgenden Abbildung 5 an Hand von Patientin 3 exemplarisch dargestellt. Festgehalten wurden zusätzlich Datum, Anlass (Therapie, Nachsorge, Rezidiv) und gegebenenfalls weitere Informationen unabhängig von der CETC-Analyse.

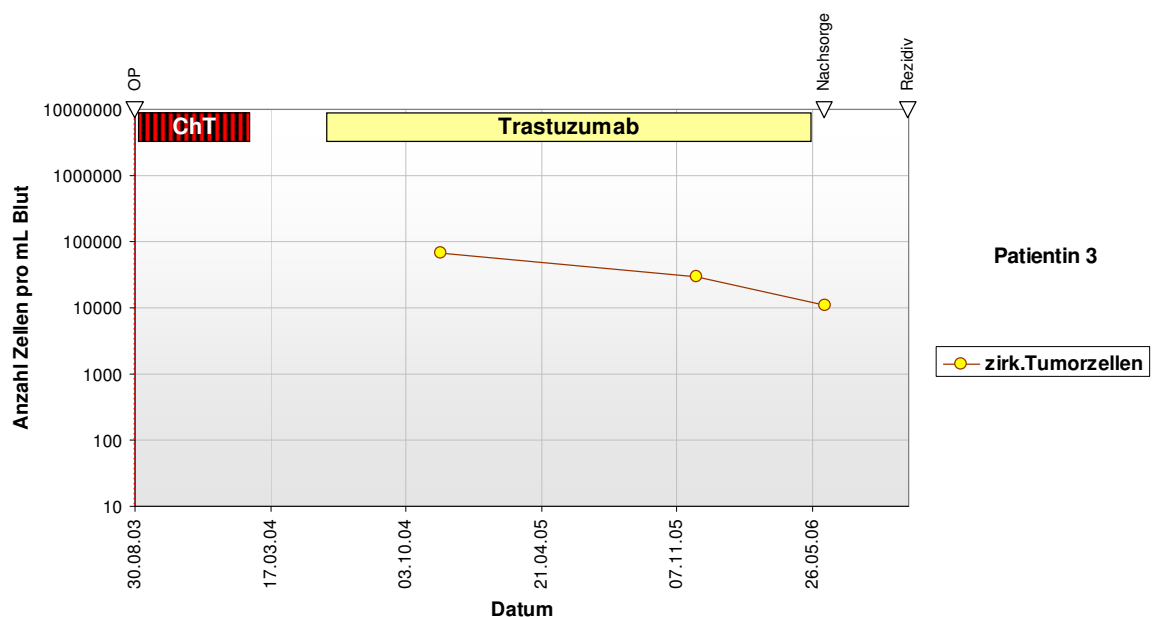


Abb. 5: Beispiel der Darstellung des CETC-Verlaufes bei Patientin 3 (ChT = Chemotherapie)

4.2.1.3 Auswertung

Der CETC-Verlauf einer Patientin unter Trastuzumabtherapie wurde bei mindestens zwei vorliegenden CETC-Werten in die Auswertung einbezogen.

Hinsichtlich der Klassifikation als ansteigendes, fallendes oder überwiegend stabiles Verhalten galten weitere Bedingungen: ein Anstieg oder Abfall definiert sich über eine mindestens 10fache Veränderung der Tumorzellzahl. Für die Bewertung des Trends über den zu analysierenden Zeitraum musste daher die Entwicklung von den ersten Werten bis hin zum Abschluss der Therapie oder zu den letzten vorhandenen Messungen betrachtet werden.

4.2.2 Bestimmung der Her2-Amplifikation in den CETC mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

4.2.2.1 Prinzip

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) stellt eine molekularzytogenetische Methode zur Visualisierung definierter DNA-Abschnitte dar. Dies ist sowohl in Metaphase- als auch in Interphasekernen möglich, wobei sich vor allem letzteres für die diagnostische Anwendung eignet.

Eine zur interessierenden Chromosomenregion komplementäre, fluoreszenzmarkierte DNA-Probe, auch Sonde genannt, wird in denaturiertem Zustand der ebenfalls denaturiert vorliegenden Ziel-DNA hinzugefügt. Die gebundene Probe kann nun im Fluoreszenzmikroskop bewertet werden, wobei in Interphasekernen vor allem numerische Abweichungen der Genkopien von ihrem Normalwert (2) auffallen.

Es existieren verschiedene Formen von DNA-Sonden:

1. WCP-Sonden (Whole Chromosome Painting Probe): das gesamte Euchromatin eines Chromosoms kann unterschiedlich markiert werden,
2. LSI-Sonden (Locus Specific Identifier): ein bestimmter Genlocus wird durch spezifische, klonierte DNA-Proben sichtbar gemacht,
3. CEP-Sonden (Chromosome Enumeration Probe): Sonden binden an Satelliten-DNA, meist im Zentromerbereich lokalisiert, und ermöglichen die Diagnose numerischer Chromosomenabweichungen (Aneuploidiediagnostik).

Das für unsere Untersuchungen verwendete PathVysion™ Her2 DNA Sonden-Kit der Firma Vysis enthält die LSI Her2-Sonde für den Locus 17q11.2-q12 und die für die alpha-Satelliten-DNA von Chromosom 17 (17p11.1-q11.1) spezifische CEP 17-Sonde.

4.2.2.2 Durchführung

Herstellung der Zellpräparate

Bei Ermittlung einer CETC-Zahl von mindestens 1000 pro ml Blut wurde eine Analyse der Her2-Amplifikate durchgeführt. Hierzu wurden zeitnah zur LSC®-Messung 100 µl der Zellsuspension (siehe 4.2.1.2) ausschließlich mit 3 µl anti-CD326-FITC inkubiert und in Abhängigkeit von der zuvor ermittelten Zellzahl mit 10 bis 896 µl PE-Puffer verdünnt. So konnte eine möglichst gut im Fluoreszenzmikroskop beurteilbare Zelldichte in Verbindung mit einer realistisch hohen Auffindbarkeit von idealerweise 20 epithelialen Zellen je Analyse erreicht werden. 50 bis 80 µl der Suspension wurden auf das mit Fettstift auf 1 cm² begrenzte Feld eines Adhäsions-Objektträgers gegeben. Nachdem sich die Zellen 10 Minuten lang absetzen konnten, wurden zur Blockierung unspezifischer Bindungen äquivalent zum Zellsuspensionsvolumen 50 bis 80 µl BSA 4 % hinzu pipettiert. Aufgrund der lichtempfindlichen Fluoreszenz des verwendeten Antikörpers lagen die Objektträger abgedeckt für mindestens 8 Stunden zum Eintrocknen. Die so vorbereiteten Proben wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Diese erfolgte mit dem von der FDA zur Untersuchung des Her2-Genstatus bei Mammakarzinomen freigegebenen PathVysion™ Her2 DNA Sonden-Kit der Firma Vysis. Es enthält die LSI Her2-Sonde für den Locus 17q11.2-q12, direkt gekoppelt an das Fluorochrom SpectrumOrange, und die für die alpha-Satelliten-DNA von Chromosom 17 (17p11.1-q11.1) spezifische CEP 17-Sonde. Diese ist direktmarkiert mit dem Fluorochrom SpectrumGreen. Die Sondenmischung liegt bereits denaturiert und mit blockierender DNA versetzt vor. Ebenfalls enthält das Kit den Post-Hybridisierungspuffer (0.4xSSC/0.3 % NP-40) und Proteinase K.

Das vom Hersteller vorgegebene Protokoll wurde der Analyse einer Zellsuspension anstatt der üblichen Paraffinschnitte angepasst.

Vorbehandlung und Denaturierung:

- Objektträger für 10 Minuten in Paraformaldehyd tauchen
- markiertes Feld mit Proteinase K bedecken und für 5 Minuten bei 37 °C inkubieren
- in Paraformaldehyd waschen
- für 5 Minuten in Post-Hybridisierungspuffer tauchen
- Objektträger vollständig trocknen lassen

- 5 Minuten in Formamid bei 72 °C tauchen
- in aufsteigender Alkoholreihe abkühlen und entwässern (70 %, 85 %, 96 % für je 1 Minute)
- Objektträger vollständig trocknen lassen

Hybridisierung:

- 2,5 µl der Sondenmischung auf das Feld geben
- Deckglas auf das Feld legen und luftblasenfrei andrücken
- mit Fahrradkleber den Deckglasrand luftdicht abschließen
- 14 bis 18 Stunden bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubieren

Waschen und Gegenfärben:

- Fahrradkleber vollständig entfernen
- Deckglas durch Waschen in Post-Hybridisierungspuffer entfernen
- 2 Minuten in auf 72 °C erhitzten Post-Hybridisierungspuffer tauchen
- Objektträger vollständig trocknen lassen
- 10 µl DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) zur Anfärbung der Zellkerne auf die Zellen geben
- Deckglas luftblasenfrei andrücken
- lichtgeschützt lagern

4.2.2.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging der Firma Zeiss und geeigneten Filtern für DAPI, SpectrumOrange und FITC. Unter Verwendung des 10er und 40er Objektivs und des DAPI-Filters (Fluoreszenzoptimum 365 ± 12 nm) wurde zuerst die Zellebene ermittelt. Die Beurteilung und Analyse der Zellen wurde mit mittels 100er Objektiv und Immersionsöl durchgeführt. Unter Verwendung eines geeigneten Filters (450-490 nm) wurden je Probe 20 EpCam-positive Zellen mit intakten Grenzen und Kern (Kontrolle mittels DAPI-Färbung) durch mäanderförmiges Abfahren des Objektträgers aufgesucht. Die Auswertung der Her2-Signale erfolgte mittels eines Filters für das Fluoreszenzoptimum von 546 ± 12 nm. Dabei war es notwendig, jede Zelle in allen

Ebenen zu fokussieren, um alle Signale erfassen zu können. Es erfolgte eine Kategorisierung anhand der Anzahl von Amplifikaten pro Zelle (Abb. 6a):

0-2 Signale	3-5 Signale	6-10 Signale	>10 Signale	>20 Signale
-------------	-------------	--------------	-------------	-------------

Abb. 6a: ursprüngliche Kategorien der Amplifikatzahl pro Zelle mit symbolischer Farbzuordnung

Der prozentuale Anteil einer Kategorie an der Gesamtzahl analysierter Zellen diente als Vergleichswert für den Verlauf der Amplifikation inter- sowie intraindividuell. Letztendlich erwies sich für die Interpretation ein weiteres Zusammenfassen der Amplifikatgruppen als praktikabler, so dass drei Subpopulationen der CETC erkennbar wurden (Abb. 6b):

<6 Signale niedrigamplifizierte Zellen (G)	6-10 Signale mittelamplifizierte Zellen (O)	>10 Signale hochamplifizierte Zellen (R)
--	---	--

Abb. 6b: endgültige Subgruppen der Amplifikatzahl pro Zelle mit symbolischer Farbzuordnung

Die erhaltenen Werte wurden zusammen mit den Tumorzellzahlen in die Verlaufsdiagramme der Patientinnen übernommen, was eine gemeinsame visuelle Darstellung der Amplifikatgruppen- und CETC-Verläufe ermöglichte (Abb. 7):

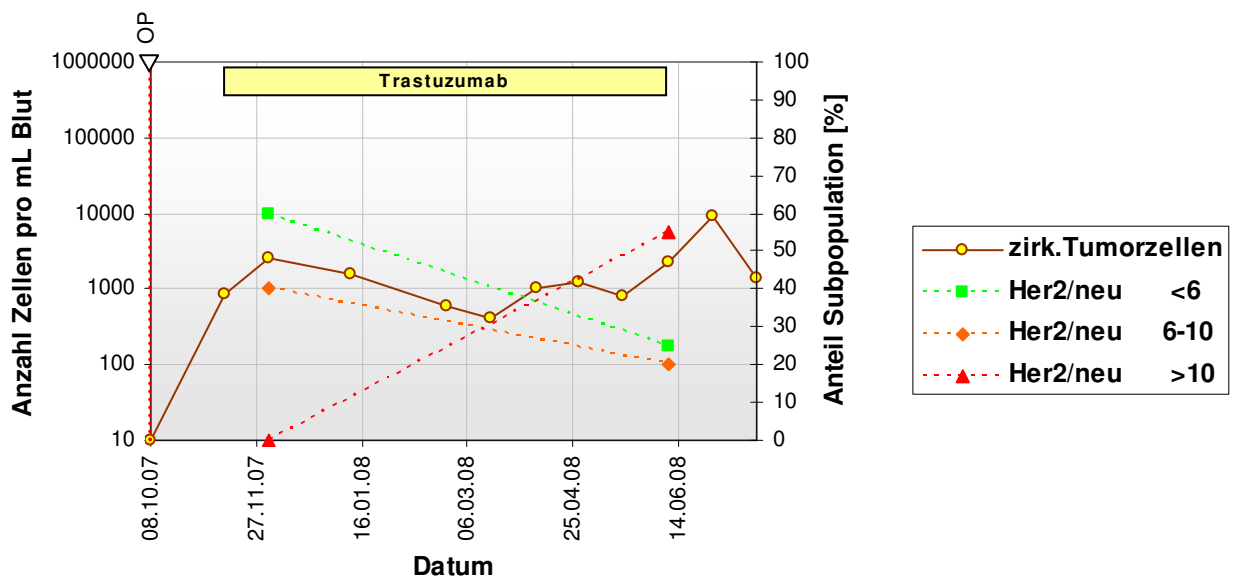


Abb. 7: gemeinsame Darstellung von Tumorzellverlauf und Verhalten der Her2-Subpopulationen

Eine Dokumentation charakteristischer Zellen erfolgte mit der AxioCam HRc der Firma Zeiss und der dazugehörigen Software AxioVision Rel. 4.6.3.0.

Die Abbildungen 8a-d zeigen Aufnahmen von Her2-positiven CETC, wobei Abb. 8a und 8c Her2-Sondenfluoreszenz und EpCam-FITC-Fluoreszenz gemeinsam zeigen. In Abb. 8b und 8d ist allein die Her2-Sondenfluoreszenz dargestellt:

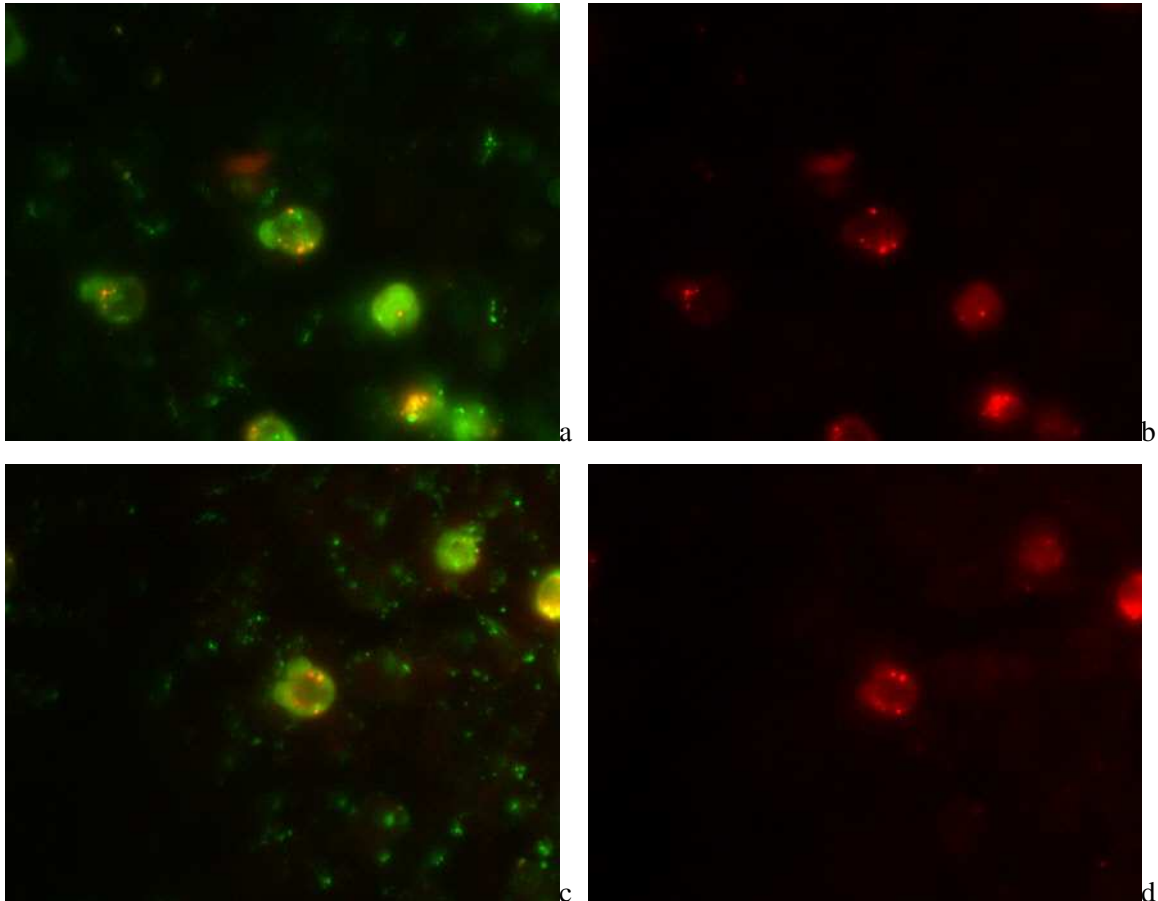


Abb. 8: Her2-positive CETC (a+c: Her2- und EpCam-Signal gemeinsam, b+d: nur Her2-Signal)

4.2.3 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm SPSS 16.0 (SPSS, München). Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt, somit besteht bei $p < 0,05$ statistische Signifikanz zum gewählten Niveau.

Die Zusammenhänge zwischen den CETC-Verläufen, FISH-Analyse-Ergebnissen und anderen klinisch-pathologischen Parametern wurden in Kreuztabellen unter Verwendung des Pearson- χ^2 -Tests auf statistische Signifikanz geprüft.

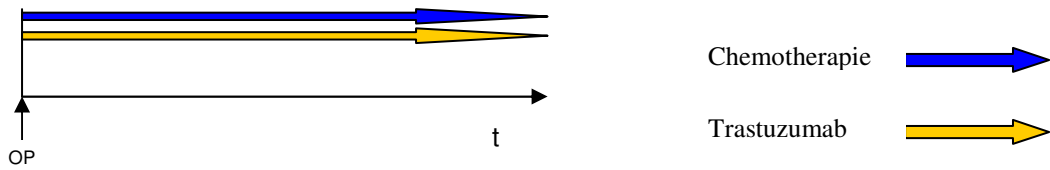
Nach Anfertigung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden Vergleiche unter Verwendung des Log-Rang-Tests vorgenommen.

5. Ergebnisse

5.1 Quantitative Analyse der CETC unter Trastuzumab

Es erfolgte primär eine Unterscheidung des Patientenkollektives hinsichtlich der Trastuzumabgabe innerhalb der postoperativen Therapie. Die zwei Hauptgruppen bilden Patientinnen mit Beginn der Trastuzumabgabe in der klinisch tumorfreien, adjuvanten Situation (Hauptgruppe 1) beziehungsweise mit Trastuzumaberstgabe nach Rezidiv (Hauptgruppe 2). Weiter wurde eine Einteilung nach der möglichen zeitlichen Kombination mit einer Chemotherapie vorgenommen. Abbildung 9 verdeutlicht dieses Vorgehen:

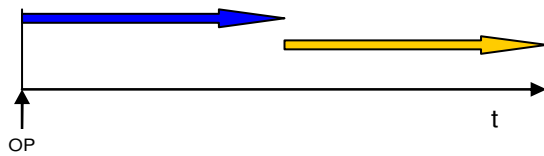
Hauptgruppe 1: erste Trastuzumabgabe in adjuvanter Situation (n = 32)



a) Trastuzumab kombiniert mit Chemotherapie (CO)

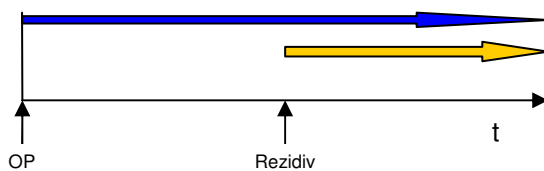


b) Trastuzumab als Monotherapie (ON)

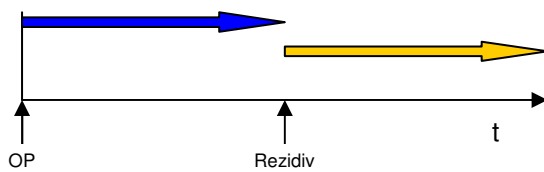


c) Trastuzumab sequentiell zur Chemotherapie (SEQ)

Hauptgruppe 2: erste Trastuzumabgabe nach Rezidiv (n = 13)



d) erste Trastuzumabgabe nach Rezidiv kombiniert zur Chemotherapie (RECO)



e) erste Trastuzumabgabe nach Rezidiv als Monotherapie (REON)

Abb. 9: Einteilung der Patientinnen nach Trastuzumabtherapie Reihenfolge und -zeitpunkt

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstarben fünf Patientinnen. Sie alle erhielten nach erfolgtem Rezidiv eine Kombination aus Chemotherapie und Trastuzumab (RECO) ($p = 0,001$). In Tabelle 2 wird diese Verteilung dargestellt (Abkürzungen nach Abb. 9):

Tab. 2: Verteilung der Todesfälle auf alle Therapiemodi:

Therapiemodus	n	Todesfälle
CO	3	0
ON	3	0
SEQ	26	0
RECO	10	5
REON	3	0
Gesamt	45	0

Auch die Rezidivhäufigkeiten in den fünf Untergruppen unterschieden sich deutlich voneinander ($p = 0,012$), insbesondere die adjuvante kombinierte (CO) von der sequentiellen (SEQ) Therapieform. Bei letzterer rezidierte nur eine von 26 Patientinnen, wie aus Tabelle 3 ersichtlich wird (Abkürzungen nach Abb. 9):

Tab. 3: Verteilung der Rezidive auf alle Therapiemodi:

Therapiemodus	n	Rezidive
CO	3	2
ON	3	1
SEQ	26	1
RECO	10	4
REON	3	0
Gesamt	45	8

Das CETC-Verhalten unter Antikörpertherapie konnte in seinem zeitlichen Verlauf als ansteigend, fallend oder überwiegend stabil charakterisiert werden. Für die Klassifizierung als ansteigendes, fallendes oder stabiles Verhalten galten die bereits erwähnten Bedingungen: ein Anstieg oder Abfall definiert sich über eine mindestens 10fache Veränderung der Tumorzellzahl. Es wurde der Trend vom ersten Wert oder gegebenenfalls von mehreren Werten bis zur letzten Messung unter Trastuzumab betrachtet. Die folgenden Abbildungen zeigen je ein Beispiel für Anstieg (Abb. 10), Abfall (Abb. 11) oder stabilen Verlauf (Abb. 12) unter Antikörpergabe:

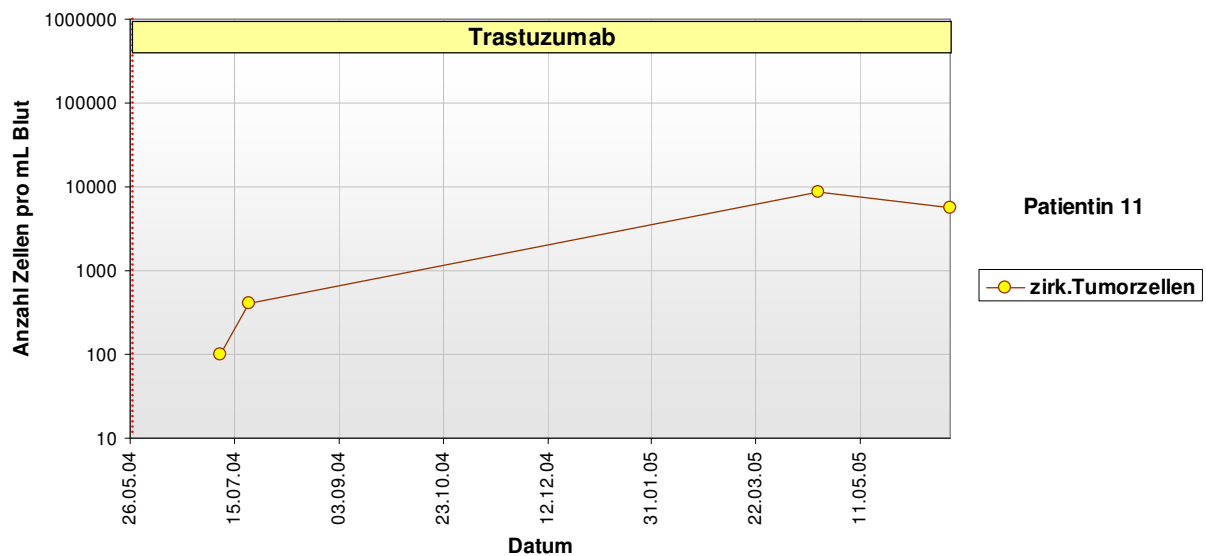


Abb. 10: Zellzahlanstieg unter Trastuzumabtherapie

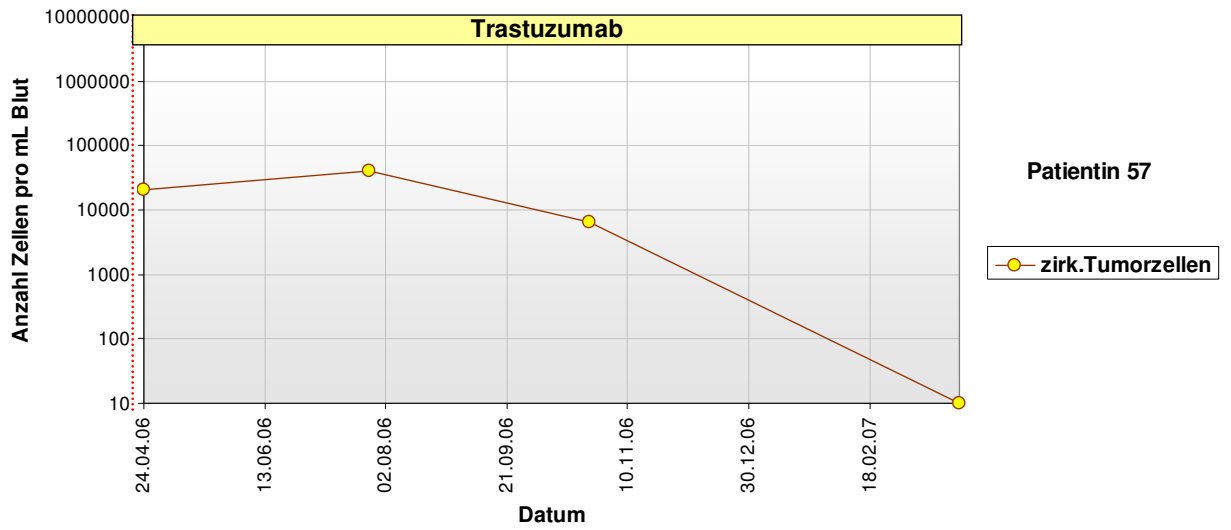


Abb. 11: Zellzahlabfall unter Trastuzumabtherapie

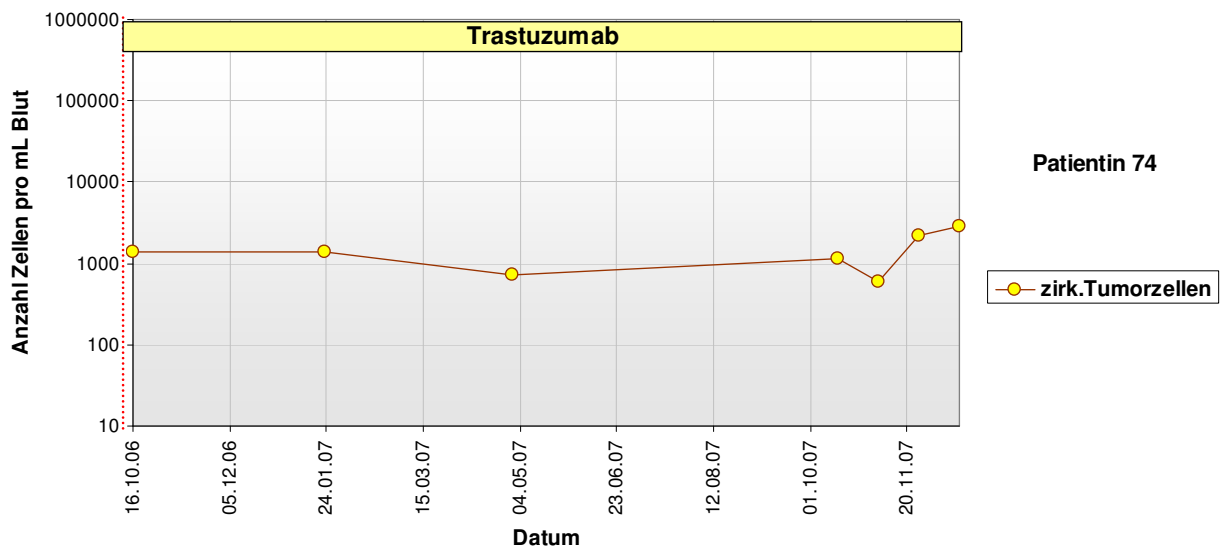


Abb. 12: stabiler Zellzahlverlauf unter Trastuzumabtherapie

Eine Beziehung zwischen dem Auftreten eines bestimmten Zellzahlverhaltens und dem Therapiemodus konnte statistisch nicht hergestellt werden ($p = 0,409$). Dennoch überwiegen bei sequentiellen Modus die fallenden und stabilen Verläufe (siehe Pfeile), wie aus Abbildung 13 ersichtlich wird.

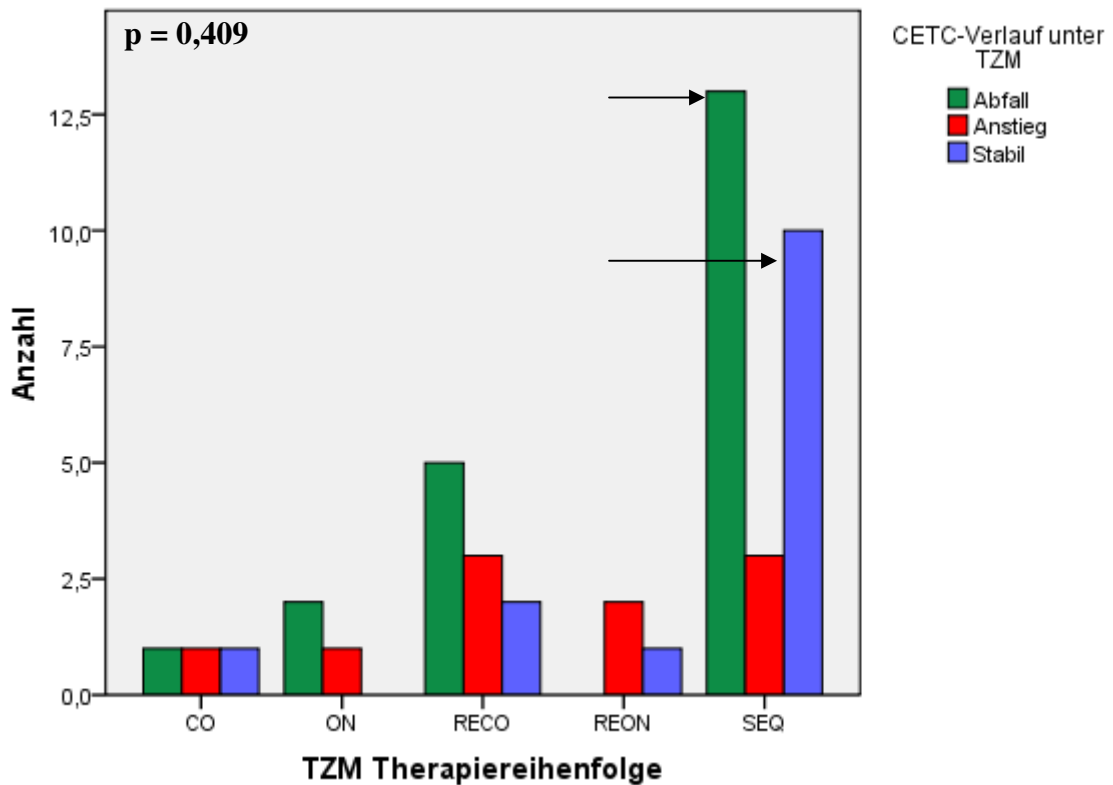


Abb. 13: Häufigkeit von CETC-Verläufen in Abhängigkeit vom Therapiemodus

Die Prüfung des krankheitsfreien Überlebens für die einzelnen Verabreichungsmodi in der Hauptgruppe 1 (n = 32), d.h. Trastuzumab adjuvant, zeigte eindeutig, dass die Kombination von Trastuzumab mit Chemotherapeutika (CO) einen hochsignifikanten Nachteil gegenüber der sequentiellen Gabe (SEQ) darstellte (p = 0,001), siehe Abb. 14:

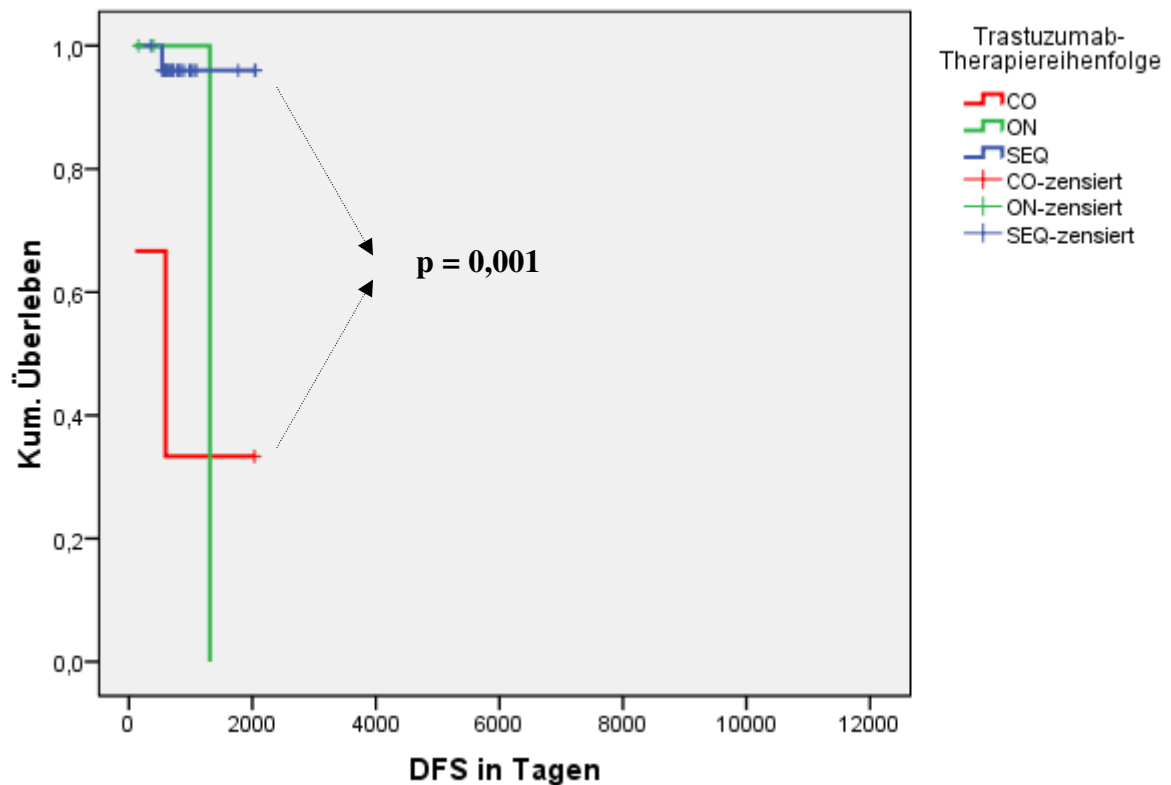


Abb. 14: krankheitsfreies Überleben (DFS) in Abhängigkeit vom Therapiemodus

Ebenso häuften sich bei kombinierter Therapie (CO) Rezidive signifikant (p = 0,004).

Das Gesamtüberleben war aufgrund der in Hauptgruppe 1 noch nicht aufgetretenen Todesfälle nicht auswertbar.

Zwischen Verabreichungsmodus und Verhalten der zirkulierenden Tumorzellen ließ sich bei Betrachtung der Hauptgruppe 1 kein statistischer Zusammenhang nachweisen (p = 0,562), allerdings überwogen bei sequentieller Gabe wieder die fallenden und stabilen Verläufe.

Für die Hauptgruppe 2 mit Trastuzumabtherapie erst nach Rezidiv (n = 13) war kein signifikanter Unterschied zwischen den hier ausschließlich angewandten Therapieoptionen RECO (Trastuzumab und Chemotherapie simultan nach Rezidiv) und REON (Trastuzumab als Monotherapie nach Rezidiv) für das progressionsfreie Überleben ermittelbar (p = 0,353). Es zeigte sich aber ebenfalls tendenziell ein schlechteres Abschneiden der kombinierten Therapie. Gleiches gilt bei Betrachtung der Todesfälle (p = 0,118) und erneuten Rezidive (p = 0,188) in den beiden Gruppen. Trotz fehlender Signifikanz im Gesamtüberleben bezüglich des Therapiemodus (p = 0,362) war auffällig, dass alle 5 Todesfälle bei den Patientinnen mit kombinierter Therapie (RECO) auftraten (Tab. 4).

Tab. 4: Verteilung der Todesfälle in den Gruppen mit kombinierter oder Monotherapie mit TZM

Therapiemodus	n	Todesfälle
RECO	10	5
REON	3	0
Gesamt	13	5

Das Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit vom Verhalten der CETC zeigte in Hauptgruppe 2 (Trastuzumab nach Rezidiv) mit guter Signifikanz, dass ein Anstieg gegenüber einem stabilen Verhalten der Tumorzellzahl unter Trastuzumab auf eine negative Prognose hinweist ($p = 0,034$). Ebenso bildete sich tendenziell ein Vorteil des fallenden gegenüber des steigenden CETC-Verlaufs ab ($p = 0,122$). Dies ist in Abbildung 15 dargestellt:

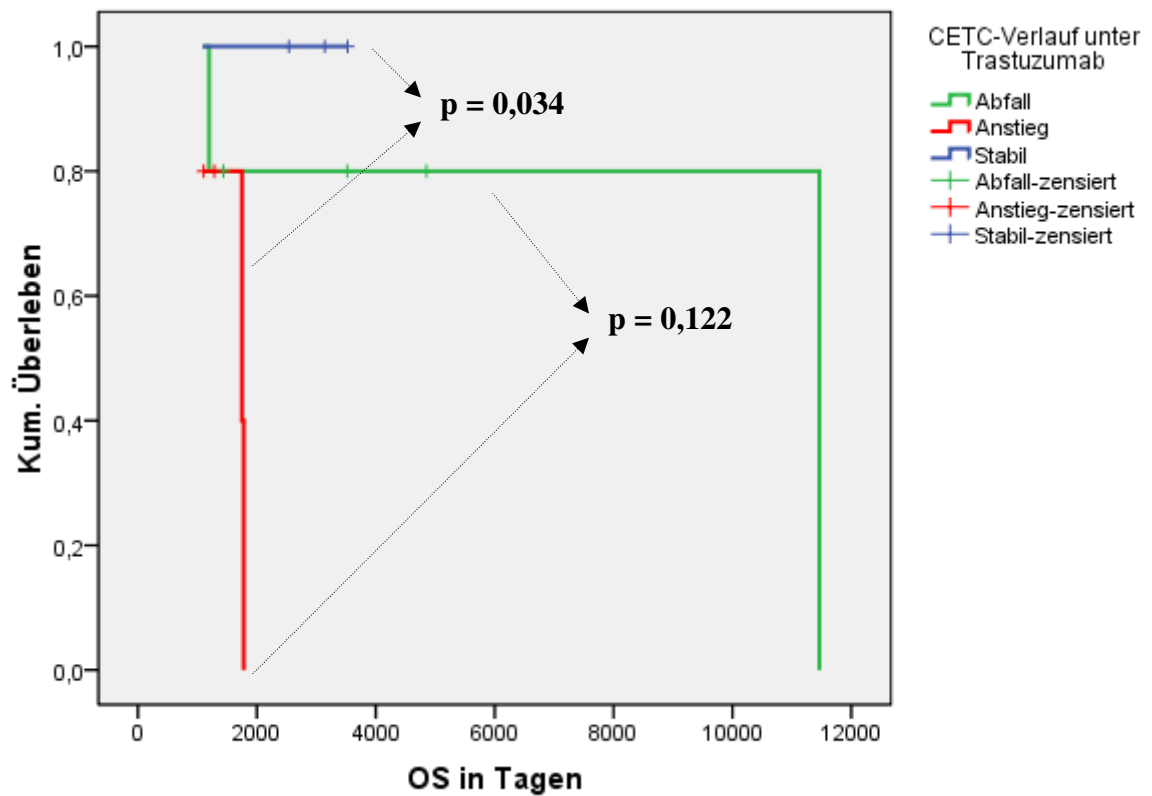


Abb. 15: OS in Abhängigkeit vom CETC-Verhalten bei Trastuzumabtherapie nach Rezidiv

Bei der Prüfung von Zusammenhängen zwischen klinischen Charakteristika und dem Outcome der Patientinnen ohne Primärmetastasierung zeigte sich, dass der Lymphknotenstatus (positiv versus negativ) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als einziger Faktor nachweislich eine wichtige Rolle spielte. So traten alle vier Rezidive der adjuvant mit Trastuzumab behandelten Patientinnen ausschließlich in der Gruppe mit primär befallenen Lymphknoten auf ($p = 0,001$). Ebenso rezidierten nur Patientinnen der Hauptgruppe 2 (Trastuzumab nach Rezidiv) erneut, die primär nodalpositiv gewesen waren, was allerdings statistisch noch keine Signifikanz besitzt ($p = 0,157$).

Bei isolierter Betrachtung der Hauptgruppe 1 (Trastuzumabgabe adjuvan) verlief das rückfallfreie Überleben signifikant kürzer für die nodalpositiven Fälle ($p = 0,025$). Die Abbildung 16 stellt dies dar:

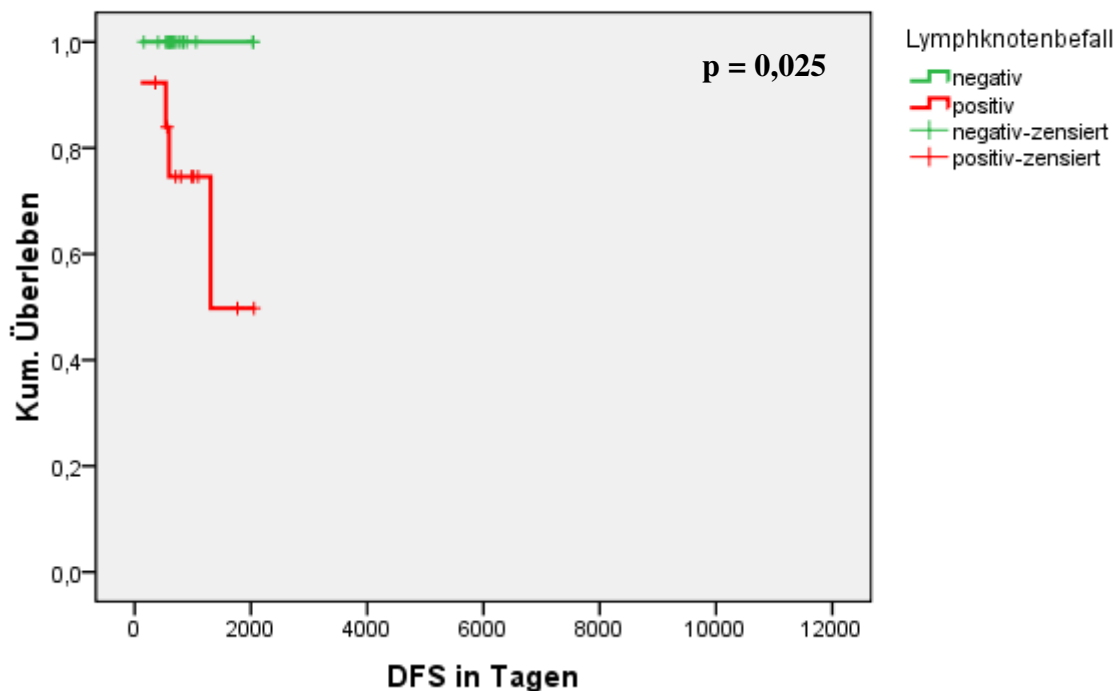


Abb. 16: DFS unter adjuvanter Trastuzumabgabe in Abhängigkeit vom Nodalstatus

5.2 Kontrolle der Her2-Amplifikation in den CETC durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Für die hier dargestellten Ergebnisse wurden insgesamt 113 Her2-Analysen mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchgeführt. Hierbei ließ sich die hohe Durchführungssicherheit und Reproduzierbarkeit der Methode verifizieren, da 109 Proben (96,5 %) epitheliale Zellen mit stets detektierbaren DNA-Sondensignalen aufwiesen.

Zu Beginn der Anfertigung und Auswertung der Präparate fiel eine störende Interferenz des zu diesem Zeitpunkt noch analog zur LSC®-Analyse verwendeten CD45-PE-Antikörpers mit der Fluoreszenz der Her2-Sonde auf. In vier Fällen resultierte dies in einer Nichtauswertbarkeit. Als Konsequenz wurde daraufhin ausschließlich anti-EpCam-FITC für die Anfertigung der FISH-Präparate verwendet. Die Antikörpermenge wurde von 2,5 µl auf 3 µl erhöht.

Das sichere Wiederfinden von EpCam-positiven Zellen gelang weitgehend unabhängig von der ermittelten CETC-Zahl pro Milliliter Patientenblut, wobei die ermittelte Untergrenze für eine verlässliche Auffindbarkeit von 20 epithelialen Zellen im FISH-Präparat bei 1000 Zellen/ml Vollblut lag.

In 21 von 109 Präparaten (19,3 %) gelang nur ein Auffinden von minimal 4 bis maximal 19 Zellen, trotz einer per LSC® ermittelten Zellzahl von 1000 bis 21456 CETC/ml Vollblut (Tab. 5).

Tab. 5: FISH-Präparate mit <20 CETC und die dazugehörigen LSC®-ermittelten Zellzahlen

CETC/ml Blut	CETC/Präparat	CETC/ml Blut	CETC/Präparat
2000	4	3000	10
11972	5	1344	10
3476	6	2996	10
1152	6	1400	14
2688	6	3872	14
4224	7	5928	14
1836	7	12056	15
2964	9	21456	15
2200	10	1428	16
2256	10	1000	16
12960	10	1000	19

Die Kohärenz der Ergebnisse zeigte sich sowohl in den Verläufen der Amplifikatzahlen der Tumorzellen als auch in den stabilen Befunden von amplifizierten Tumorzellen. Dies gilt insbesondere für Patientinnen mit vier oder fünf Analysen (n = 9) verteilt über einen Zeitraum von bis zu neun Monaten. Dabei ergab die Verschiebung der Amplifikationsgrenze für Her2-Positivität auf >5 Signale, in Anlehnung an neuere Richtlinien, kaum einschneidende Veränderungen für den Amplifikationsgrad der einzelnen Patientin (siehe Tab. 6).

Tab. 6: Anteil der amplifizierten CETC in allen Präparaten von Patientinnen mit ≥ 4 Analysen

Patientin	Zellzahl/ml	CETC mit >2 Signalen	CETC mit >5 Signalen
1	3476	67 %	17 %
	2288	95 %	85 %
	3648	80 %	70%
	1600	100 %	85 %
	6944	100 %	95 %
10	2964	67 %	44 %
	9360	100 %	65 %
	32516	100 %	95 %
	4708	80 %	55 %
18	25272	95 %	85 %
	1600	100 %	85 %
	1976	100 %	90 %
	5312	100 %	100 %
29	4224	71 %	57 %
	3000	100 %	70 %
	9064	100 %	100 %
	5200	100 %	95 %
	2800	90 %	70 %
45	19400	100 %	90 %
	12384	95 %	95 %
	1200	100 %	100 %
	12308	100 %	95 %
	2996	100 %	100 %
60	6776	100 %	100 %
	5856	100 %	100 %
	21456	100 %	100 %
	1200	100 %	95 %
62	12960	80 %	80 %
	8816	95 %	75 %
	6716	85 %	55 %
	1000	100 %	100 %
	1200	100 %	95 %
67	9672	100 %	100 %
	10676	100 %	80 %
	2688	100 %	50 %
	2144	100 %	95 %
71	2600	100 %	85 %
	1344	80 %	70 %
	8224	95 %	80 %
	4086	100 %	100 %

Die Darstellung in Abbildung 18 soll zusätzlich die Häufigkeit von ermittelten CETC-Anteilen mit >5 Amplifikaten in allen analysierten Proben (n = 109) verdeutlichen.

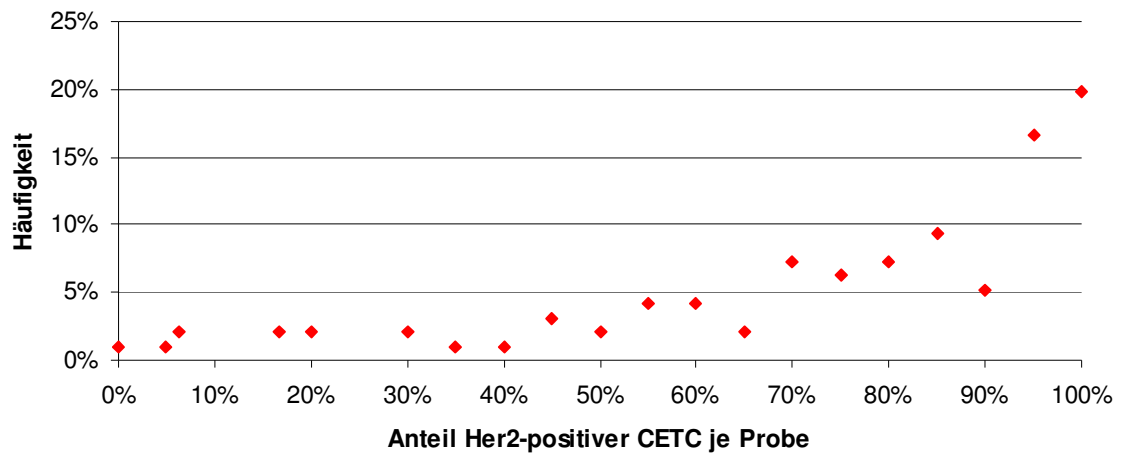


Abb. 18: Häufigkeit und Verteilung der Anteile Her2-positiver CETC aller FISH-Proben

Zum Zeitpunkt der Analyse der Proben erfolgte noch eine Aufteilung in die Amplifikationsgrade 2, 3-5, 6-10, >10 und >20 Genkopien pro Zelle. Hinsichtlich eines klarer erkennbaren Verlaufes erwies sich jedoch bei der Auswertung eine Zusammenfassung in drei Gruppen als sinnvoller: <6 (niedrigamplifiziert), 6-10 (mittelamplifiziert) und >10 (hochamplifiziert) Amplifikate je CETC. Diese Gruppen können als Subpopulationen der Tumorzellen bezeichnet werden, da sie wiederholt charakteristische Verläufe zueinander und auch im Vergleich zum Verlauf der Tumorzellzahl im Blut zeigten.

Bei 30 Patientinnen gelang eine Erhebung der Her2-Amplifikation in den CETC zu ≥ 2 Zeitpunkten, so dass sowohl eine Beurteilung der Veränderung der Amplifikation als auch deren Verhältnis zum Tumorzellverlauf im Blut möglich wurde.

Das Verhalten der Subpopulationen erwies sich als signifikant mit dem Verlauf der CETC-Zahl unter Trastuzumabtherapie und dem Vorkommen von „Dips“ (starker CETC-Abfall um mindestens das 100fache mit kurz darauf folgendem Wiederanstieg) assoziiert: Ein Anstieg der Tumorzellzahl wurde häufiger begleitet von kurzen, deutlichen Zellzahlabfällen und schnellem Wiederanstieg („Dip“). Während des Wiederanstieges der Zellzahl folgte dann in 100 % der Fälle eine deutliche Zunahme der hochamplifizierten Subgruppe. Der Verlauf von Patientin 71 verdeutlicht dieses Verhalten (Abb. 19):

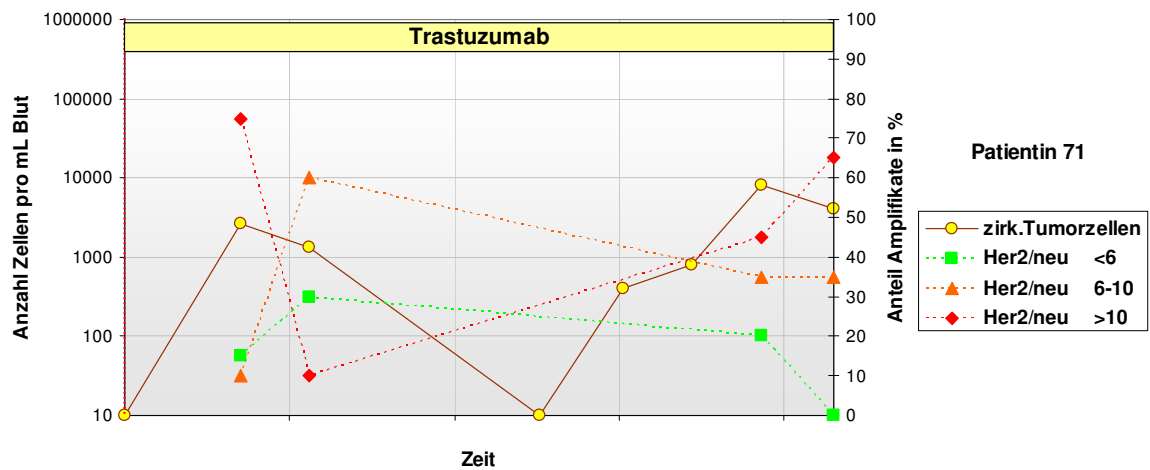


Abb. 19: ansteigender Zellzahlverlauf mit „Dip“ und typischem Verhalten der hochamplifizierten Subgruppe

Im Gegensatz dazu traten kurze Zellzahlabfälle mit Wiederanstieg („Dip“) nur bei der Hälfte der Verläufe mit fallender Tendenz unter Trastuzumab auf und waren immer gefolgt von einem Abfall der hochamplifizierten Zellen ($p = 0,049$), exemplarisch dargestellt bei Patientin 67 (Abb. 20):

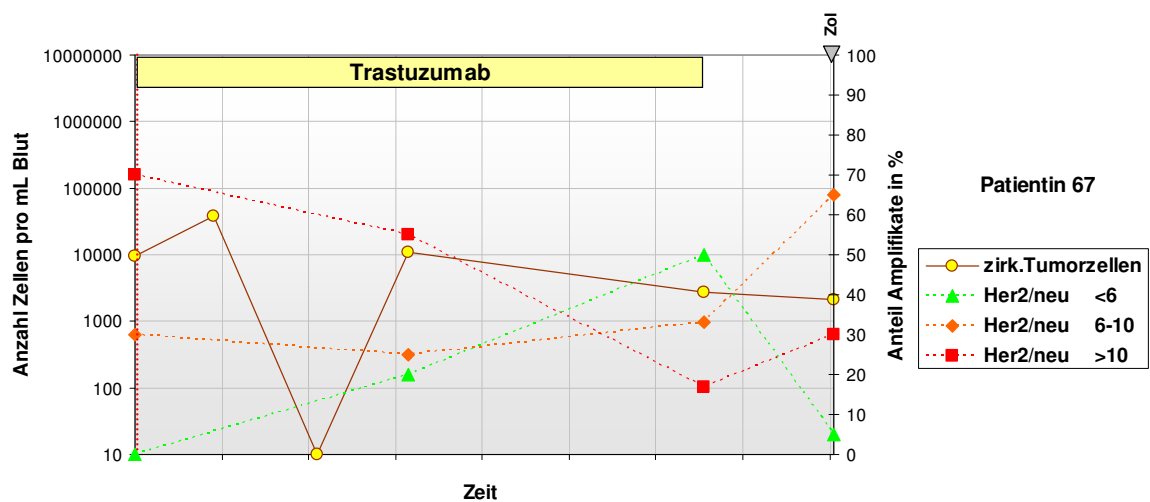


Abb. 20: fallender Zellzahlverlauf mit „Dip „und typischem Verhalten der hochamplifizierten Subgruppe

Die Höhe der Tumorzellzahl korrelierte positiv (+0,193) mit dem Anteil mittel- und hochamplifizierter CETC, negativ (-0,193) mit dem Anteil niedrigamplifizierter CETC (jeweils grenzwertig signifikant mit $p = 0,061$).

Die Subpopulationen wiesen außerdem ein typisches Muster in ihrem Verhältnis zueinander auf. So bewegte sich der Anteil der hochamplifizierten Zellen am stärksten gegenläufig zum Anteil der niedrigamplifizierten Zellen mit einem Korrelationskoeffizienten von $\sim -0,8$ beziehungsweise im Verhältnis zur mittelamplifizierten Subgruppe von $\sim -0,5$ (jeweils $p < 0,001$). Das Verhalten von mittel- zu niedrigamplifizierten Zellen ließ dagegen kein Muster erkennen.

Auffallend erschien, dass besonderes bei acht Patientinnen (1, 10, 23, 29, 31, 62, 67, 71) mit mindestens drei Her2-Analysen ein starkes Schwanken der Zahl hochamplifizierter Zellen zu beobachten war. Es kam hierbei meist zum teils wiederholten steilen Abfall dieser dominierenden Subpopulation und nachfolgendem deutlichen Wiederanstieg („Dip“). In sechs von den oben genannten acht Fällen verhielt sich die mittelamplifizierte Gruppe dabei spiegelbildlich zu den hochamplifizierten CETC (Beispiel in Abb. 21), in zwei Fällen galt dies für die niedrigamplifizierten Zellen (Beispiel in Abb. 22).

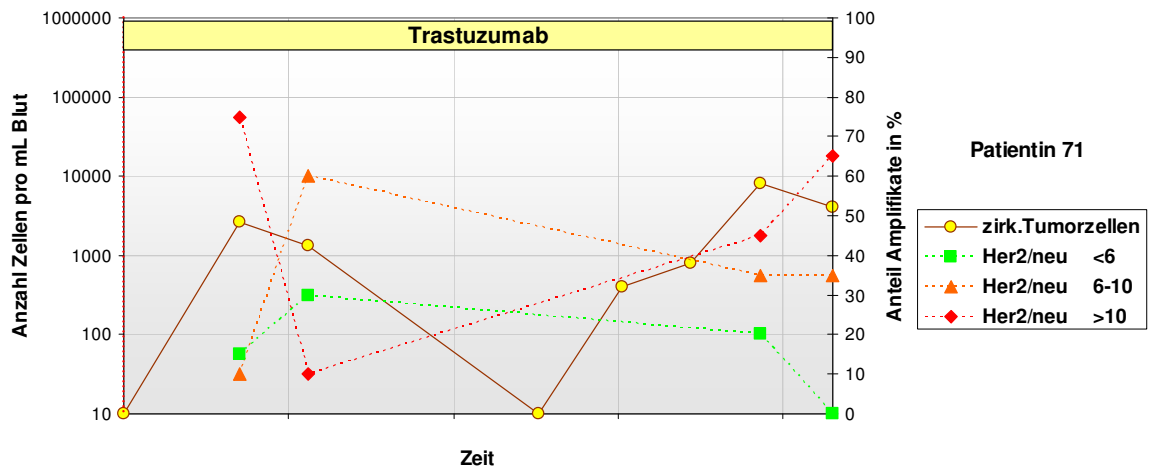


Abb. 21: Schwanken der hochamplifizierten CETC mit gegenläufigen mittelamplifizierten CETC

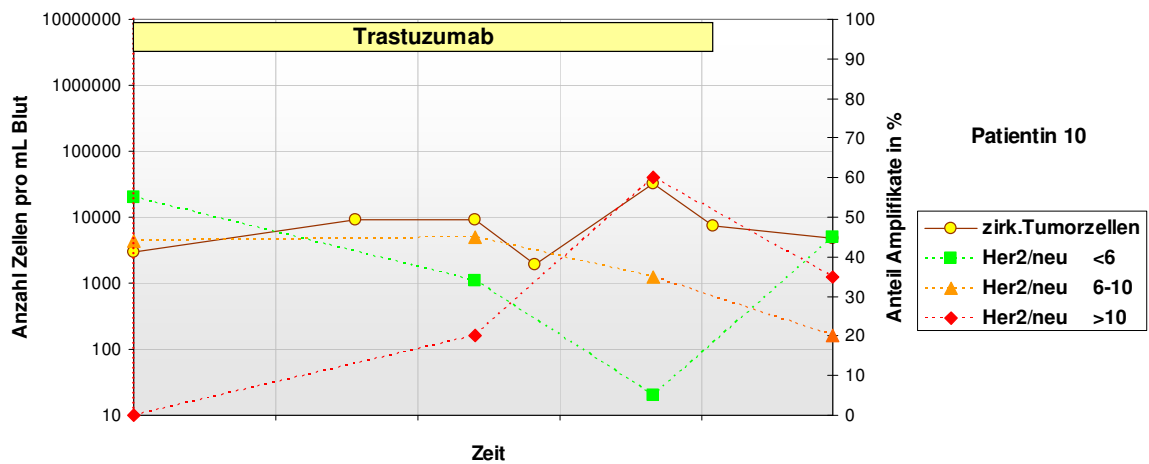


Abb. 22: Schwanken der hochamplifizierten CETC mit gegenläufigen niedrigamplifizierten CETC

Ein ähnliches Verhalten fand sich bei der Mehrzahl der anderen Patientinnen. Lediglich bei 2 von 23 Patientinnen (8, 18) blieben die Amplifikatbefunde über längere Zeiträume relativ konstant.

Für 18 Patientinnen lag nur eine einmalige Erhebung des Her2-Status der CETC vor, acht davon mit auswertbaren Zellzahlverläufen. Aber auch hier bildeten sich trotz kleiner Fallzahl regelhafte Amplifikationsmuster in Bezug auf Tumorzellverläufe unter Trastuzumab ab:

So überwog unter stabilen CETC-Werten ($n = 3$) in 2 Fällen (Pat. 15, 64) die niedrigamplifizierte deutlich alle anderen Subpopulationen, einmal die hochamplifizierte bei Patientin 61 – hier allerdings auffälligerweise mit „Dip“ der CETC.

Bei den drei fallenden CETC-Verläufen dominierten zweimal (Pat. 14, 65) die hochamplifizierten Zellen, wobei sich hier charakteristischerweise ein steiler Abfall mit Wiederanstieg der CETC anschloss („Dip“). Bei der dritten Patientin (47) überwogen mit 85 % die mittel- und niedriggradig amplifizierten Zellen am Ende ihrer Trastuzumabtherapie bei gleichzeitig leichtem Wiederanstieg der Zellzahl.

Bei den zwei Patientinnen (4, 33) mit steigenden CETC-Werten stellten sich bei Patientin 4 die mittel- und hochamplifizierte Subpopulation als führend dar nach massivem Zellzahlanstieg unter Trastuzumabgabe. Patientin 33 zeigte unter Trastuzumab noch fallende Zellzahlen, 6 Monate nach der Antikörpertherapie jedoch einen Anstieg um das 15fache. Sie wies keine niedrigamplifizierten Zellen und ein Überwiegen der hochamplifizierten Tumorzellen auf.

Bei allen Patientinnen ($n = 17$) mit im Primärtumor bestimmtem negativen Her2-Status von 0, +1 oder +2 fanden sich in jeder Probe ($n = 34$) amplifizierte CETC. Der Anteil von Tumorzellen mit mehr als fünf Signalen reichte von 5 bis 100 %. In Abbildung 23 wird die Häufigkeit der Anteile Her2-positiver Zellen in den Proben der primär negativ bestimmten Patientinnen dargestellt. Die Häufigkeit bezieht sich dabei auf alle Proben ($n = 34$) dieser Patientinnen:

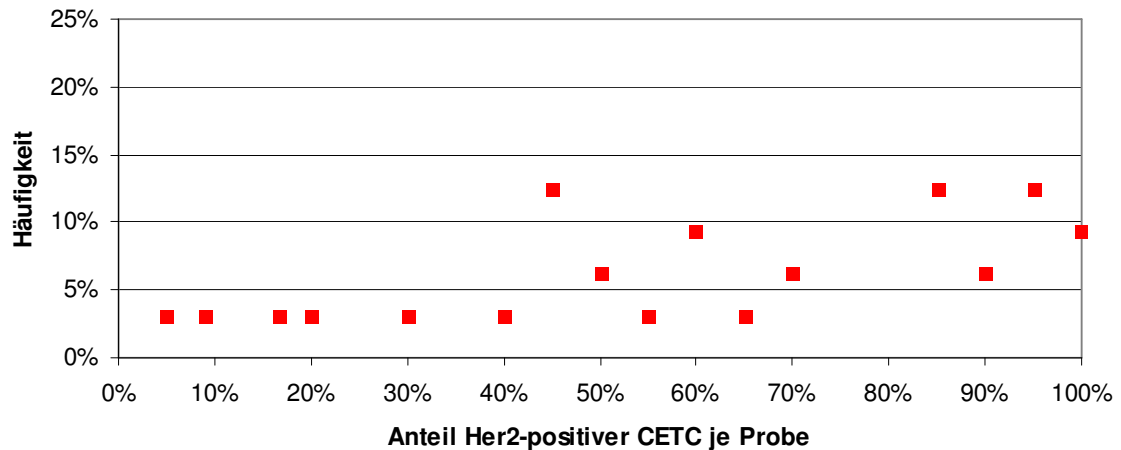


Abb. 23: Vorkommen von Her2-positiven CETC bei primär Her2-negativen Patientinnen

Sieben der primär Her2-negativen Patientinnen (41,2 %) wiesen zu einem einzelnen Zeitpunkt weniger als 50 % amplifizierte Zellen auf, wobei in drei Fällen (Patientinnen 35, 53, 78) Analysen zu anderen Zeitpunkten Resultate über 50 % positiver CETC lieferten. Das Vorkommen von niedrigen Werten war dabei unabhängig vom primären IHC-Status.

Hinsichtlich des CETC-Verhaltens waren 6 Her2-negative Patientinnen auswertbar (mindestens zwei Zellzahlanalysen lagen vor). Alle drei Patientinnen (13, 37, 76) mit Her2-Status 0 (hier keine Trastuzumabtherapie erfolgt) zeigten einen Tumorzellverlauf ohne steile Abfälle und Wiederanstieg („Dips“). Im Gegensatz dazu trat bei einem Her2-Status von +1 (Patientin 45, Trastuzumabgabe erfolgt) ein steiler CETC-Abfall mit Wiederanstieg („Dip“) und nachfolgendem Abfall der stark amplifizierten CETC auf. Die Patientinnen 1 und 35 mit Her2-Status +2 ließen in ihrem Verlauf, in dem auch die Trastuzumabgabe erfolgte, ebenfalls einen „Dip“ der CETC erkennen, dem allerdings ein Anstieg der überamplifizierten Zellen folgte. Trotz Nachforschungen war es nicht möglich, den Grund für die Entscheidung zur nicht leitlinienkonformen Therapie mit Trastuzumab bei Patientin 1, 35 und 45 zu eruieren.

Bei Patientinnen mit einem primären Her2-Status von +3 trat im Vergleich gleichfalls wie bei Patientinnen mit IHC +2 gehäuft ein kurzzeitiger steiler Abfall der Tumorzellen („Dip“) mit anschließendem Ansteigen der überamplifizierten CETC auf. Dieser Trend erweist sich als noch nicht signifikant ($p = 0,076$).

Gelang eine Erhebung von mindestens zwei Her2-Analysen pro Patientin, so wurde die langfristig dominierende Amplifikationssubgruppe der zirkulierenden Tumorzellen hinsichtlich des Einflusses auf das krankheitsfreie Überleben (DFS) untersucht. Das Einbeziehungsweise Ausschließen von etwaigen FISH-Analysen außerhalb der Trastuzumabtherapie ergab dabei keinen Unterschied in der Auswertung (Abb. 24 versus Abb. 25). Die Berechnung des DFS bei adjuvant therapierten Patientinnen offenbarte dabei einen klaren Nachteil bei Verläufen, die von niedrig- und mittelamplifizierten (GO) CETC dominiert wurden gegenüber solchen mit überwiegend hochamplifizierten (R) Zellen ($p = 0,046$).

Die Kaplan-Meier-Kurve in Abb. 24 zeigt diesen Unterschied im rezidivfreien Überleben (G = niedrigamplifiziert, O = mittelamplifiziert, R = hochamplifiziert; GO = gleichzeitiges Dominieren von niedrig- und mittelamplifizierten Zellen, OR = gleichzeitiges Dominieren von mittel- und hochamplifizierten Zellen):

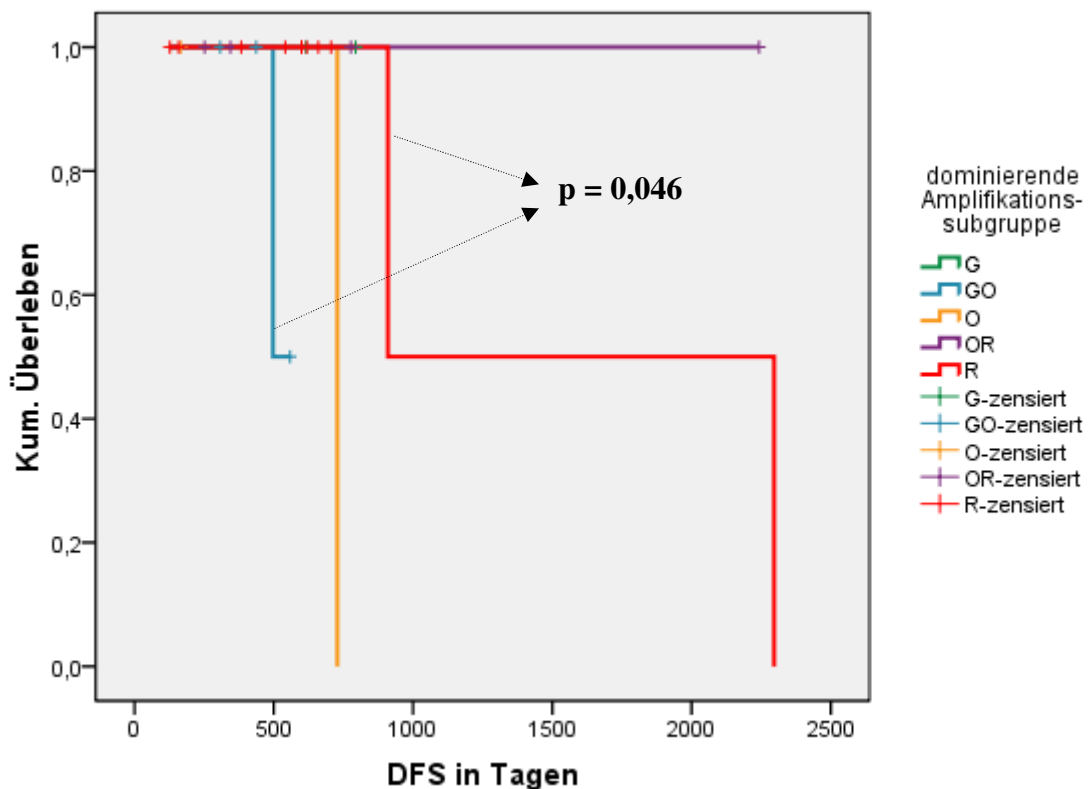


Abb. 24: DFS in Abhängigkeit von der dominierenden Amplifikationssubgruppe; alle Analysen

Zum Vergleich die Kaplan-Meier-Kurve bei alleiniger Betrachtung von FISH-Analysen unter Trastuzumab mit identischem Resultat (Abb. 25):

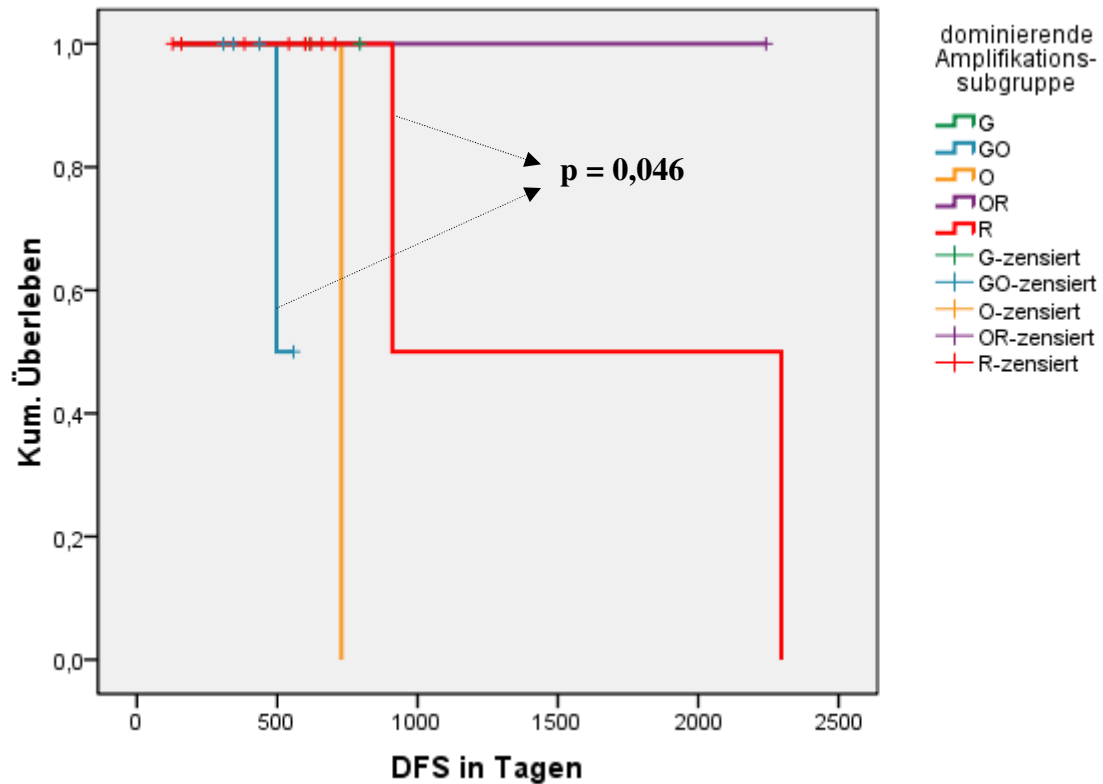


Abb. 25: DFS in Abhängigkeit von der dominierenden Amplifikations-subgruppe; nur Analysen unter TZM

Das Vorkommen von kurzzeitigen steilen Zellzahlabfällen im Tumorzellverlauf war für alle Patientinnen signifikant assoziiert mit dem prognostisch schlechteren Tumorgrading G3, wobei der Anstieg der stark amplifizierten Subgruppe im CETC-Wiederanstieg überwog ($p = 0,027$).

Ein Unterschied im Outcome zwischen den zwei verschiedenen Möglichkeiten des Verhaltens der Amplifikationssubgruppen zueinander (Grün vs. Rot, Orange vs. Rot) ließ sich noch nicht ermitteln ($p = 0,661$), dargestellt in Abbildung 26 (Grün = niedrigamplifizierte, Orange = mittelamplifizierte, Rot = hochamplifizierte CETC). Die beiden Verhaltensweisen zeigen jeweils das spiegelbildliche Verhalten der niedrig- zu hochgradig (Grün vs. Rot) amplifizierten CETC und der mittel- zu hochgradig (Orange vs. Rot) amplifizierten Zellpopulation.

Es konnte in dieser Arbeit noch keine eindeutige Beziehung zwischen dem Subgruppenverhalten Grün vs. Rot, Orange vs. Rot) und klinischen Parametern hergestellt werden.

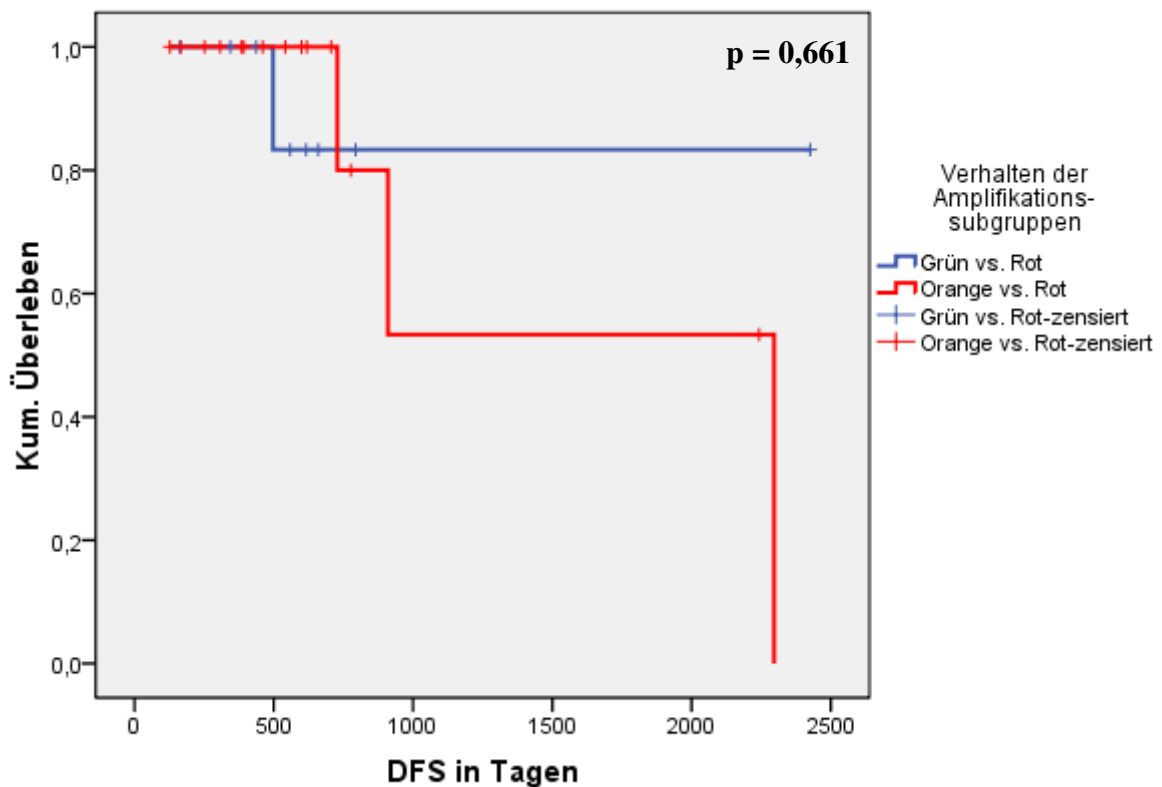


Abb. 26: rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Verhalten der Amplifikationssubgruppen

6. Diskussion

Zur prognostischen Relevanz der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ist die Datenlage in der Literatur teils widersprüchlich, dennoch scheint sie sich zu bestätigen (Muller et al. 2006). Dies ist bisher noch nicht für die im peripheren Blut zirkulierenden malignen Zellen (CTC) anerkannt (Fehm et al. 2008), obwohl kohärente Untersuchungen verschiedener Forschergruppen in den letzten Jahren immer wieder die Bedeutung der CTC für die Therapieüberwachung und Prognoseabschätzung herausstellen (Xenidis et al. 2006, Pachmann et al. 2005, Pachmann et al. 2008b). Doch die angegebenen Detektionsmethoden und Studiendesigns sind sehr unterschiedlich, sodass bisher kein Konsens erreicht werden konnte.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode scheint anderen publizierten Methoden in wichtigen Bereichen überlegen zu sein: in der Menge auffindbarer CTC bei nicht metastasierten und metastasierten Patienten, in der Anzahl der möglichen Untersuchungen pro Patient und in der Gesamtzahl und Überwachungsdauer der untersuchten Patienten. Die Mehrzahl der Untersuchungsgruppen findet im Patientenblut trotz eines umfassenden Methodenspektrums nur geringe Mengen an CTC und plädiert für aufwändige Anreicherungsverfahren (Fehm et al. 2005, Nagrath et al. 2007, Deng et al. 2008). Deng et al. fanden mittels einer ausgedehnten Anreicherungskaskade zwischen einer und maximal 571 Tumorzellen pro 7,5 ml Vollblut, was 0,13 bis 76,13 Zellen pro einem Milliliter entspricht (Deng et al. 2008). Mit Hilfe eines Mikrochips gelangen Nagrath et al. eine Steigerung auf fünf bis maximal 1281 CTC pro Milliliter Patientenblut (Nagrath et al. 2007). Beide Gruppen untersuchten vorwiegend metastasierte Fälle, bei denen bereits eine höhere Auffindungsrate von zirkulierenden Tumorzellen belegt wurde (Pierga et al. 2003). Nagrath et al. schlossen zusätzlich sieben Patienten mit lokal begrenzten Prostatakarzinomen ein und konnten dort 35 bis 174 Zellen je Milliliter detektieren (Nagrath et al. 2007).

Die von der FDA zugelassene CellSearch®-Technologie besitzt eine Untergrenze von 5 CTC/7,5 ml, entsprechend 0,67 Zellen/ml (Nole et al. 2008) beziehungsweise findet zwischen einer und maximal 270 CTC/7,5 ml Vollblut, umgerechnet 0,13 bis 36 Zellen pro Milliliter (Cristofanilli et al. 2004, Deng et al. 2008).

Im Gegensatz dazu detektiert die in dieser Arbeit verwendete EpCam-basierte Quantifizierung mittels LSC® zwischen 200 und maximal 100000 CTC je Milliliter Vollblut und damit etwa das Zehnfache der Mikrochip-Technologie und das Hundert- bis

Hunderttausendfache der CellSearch®-Methode. Auch die Auffindungsrate liegt mit 90 % bereits bei nicht metastasierten Patienten weit über den dort erreichten 10 %, jedoch wurden mit der Mikrochipmethode auch bei allen sieben nicht metastasierten Prostatakrebspatienten Zellen entdeckt (Pachmann et al. 2008b, Fehm et al. 2008, Nagrath et al. 2007).

Wie eingangs erwähnt, zeigen mehrere Untersuchungen, dass die Anwesenheit und Anzahl von CTC zu bestimmten Zeitpunkten der Erkrankung Aussagen zu Therapieerfolg und Prognose zulassen. Gleiches gilt für den Zellzahlverlauf (Xenidis et al. 2006, Pachmann et al. 2005, Pachmann et al. 2008b). Diese Ansätze wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um zu überprüfen, inwiefern sie auf die noch relativ neue Therapie mit Trastuzumab übertragbar sind.

Die Analyse der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen unter Therapie war in der Lage, folgende Informationen zu liefern:

Ein Anstieg der CETC-Zahl unter Trastuzumabgabe erwies sich im Gegensatz zum vorteilhaften stabilen Verlauf als Hinweis auf ein verkürztes Gesamtüberleben bei rezidierten Patientinnen und ist vergleichbar mit Untersuchungen des rezidivfreien Überlebens bei adjuvant behandelten Patientinnenkollektiven in früheren Publikationen (Pachmann et al. 2008a, Pachmann et al. 2008b). Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass die im Körper verbliebenen zirkulierenden Tumorreste auf die antikörperhaltige Therapie teilweise nicht ansprechen und deckt sich mit den Hypothesen von Komarova und Wodarz: Mit hoher Wahrscheinlichkeit bestehen schon vor Beginn der medikamentösen Therapie resistente Tumorzelllinien, die auf Grund des einsetzenden Selektionsdrucks, beispielsweise durch Her2-Antikörper, einen Stimulus zur Vermehrung erfahren (Komarova und Wodarz 2005).

Ursächlich führt möglicherweise bei den Patientinnen im fortgeschrittenen Krankheitsstadium die höhere Tumormasse zu einer verstärkten CETC-Freisetzung mit Zellzahlanstieg, vergleichbar mit der Freisetzung aus dem Primärtumor (Klein 2009).

Ein stabiler CETC-Verlauf könnte zudem auf ein Ruhen der Zellen mit ausbleibender Abwanderung ins Gewebe (Pachmann 2005) durch die Antikörperwirkung (Nahta et al. 2006) hindeuten.

Da bei den rezidierten primär Her2-positiven und Her2-negativen Patientinnen kein therapeutischer Antikörper vor dem Rückfall gegeben worden war, könnte hier im Verlauf

der Tumorevolution eine Selektion der aggressiveren Subklone, nach dem Prinzip des „survival of the fittest“ (Nowell 1976), erfolgt sein. Selbst eine kleine Her2-positive Subpopulation könnte in der Lage sein, über die nicht amplifizierte CETC-Klone zu dominieren und eine Veränderung des Her2-Status hin zu höherer Malignität zu verursachen (Santinelli et al. 2008). Als Folge davon können Her2-positive Rezidive auftreten, wie bei Patientin 41 (Primärtumor IHC +1), 44 (IHC +2) und 45 (IHC +1).

Nach Eintritt eines Rezidivs ergibt sich bereits eine schlechtere Krankheitssituation und eine erhöhte Tumormasse, die sich, anders als in der adjuvanten Situation, kaum mehr kurativ therapieren lässt (Kauraniemi und Kallioniemi 2006). Es sollte deshalb über eine Erweiterung der Indikationsstellung für die Trastuzumabtherapie auch bei heute noch nach den Leitlinien als Her2-negativ (IHC +1 und +2) betrachteten Patientinnen nachgedacht werden (Meng et al. 2004b). Hier bietet vor allem die Überprüfung des Her2-Status der Residualerkrankung, wie in dieser Arbeit an Hand der CETC, neue Ansatzpunkte.

Die Ergebnisse der bisherigen Studien hinsichtlich der Wirksamkeit von Trastuzumab (Viani et al. 2007) bestätigen, dass die adjuvante Gabe von Trastuzumab für die Her2-positiven Patientinnen essentiell ist, denn ohne den Einsatz des Antikörpers ist das rezidivfreie Überleben deutlich verkürzt.

Die Übersichtsarbeiten zu den bisher ausgewerteten internationalen Studien bezüglich Trastuzumab vernachlässigen bis jetzt den möglichen Einfluss des Verabreichungsmodus auf den Therapieerfolg. Dies liegt daran, dass, obwohl in der HERA-Studie ein sequentielles Schema und in den zusammen ausgewerteten Studien NSABP-B31 und N9831 eine Kombinationstherapie angewandt wurden, keine Unterschiede in der Effektivität von Trastuzumab auftraten (Piccart-Gebhart 2006, Viani et al. 2007).

Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass in der adjuvanten Situation die simultane Gabe von Trastuzumab und Chemotherapie bezüglich des krankheitsfreien Überlebens und der Rezidivhäufigkeit nachteilig für die Patientinnen ist, insbesondere im Vergleich zur sequentiellen Therapie.

Nach dem Rezidiv erhielten die Patientinnen Trastuzumab entweder als Monotherapie oder zusammen mit einer Chemotherapie. Es war kein signifikanter Unterschied im Gesamt- und progressionsfreien Überleben zwischen beiden Varianten festzustellen, jedoch wieder ein Trend zu Ungunsten der kombinierten Therapieform für das progressionsfreie Intervall.

Alle Todesfälle traten zudem in der Gruppe mit kombinierter Gabe auf als Hinweis auf einen Nachteil bei diesen Patientinnen.

Die Trastuzumab-Studie N9381 der North Central Cancer Treatment Group beinhaltete ursprünglich sowohl einen Arm mit der Kombination von Paclitaxel und Trastuzumab als auch einen mit einer sequentiellen Abfolge von Taxan und Antikörper. Die zweite Gruppe wurde jedoch von den Auswertungen stets ausgeschlossen, da sie nicht kompatibel mit dem Design der NSABP-B31-Studie war. Zwischenauswertungen der beiden Arme ergaben zudem eine Erhöhung des Rezidivrisikos für den sequentiellen Arm um 13 % und einen leichten Anstieg des kardialen Risikos. Letzteres bestätigte sich jedoch nicht in der HERA-Studie (Piccart-Gebhart 2006). Hervorzuheben ist, dass ausschließlich eine gemeinsame Verabreichung von Trastuzumab mit Taxanen erfolgte, jedoch nicht mit anderen klassischen Chemotherapeutika. Dies könnte für einen Vorteil dieser speziellen Kombination Taxane/Trastuzumab sprechen. Zur mögliche Erklärung muss ein Blick auf die Wirkungsweise von Trastuzumab und Taxanen im Zellzyklus geworfen werden: Der Antikörper arretiert die Zellen laut Lane et al. während der G1-Phase und verhindert einen Übertritt in die S-Phase, die der Replikation der DNA dient (Lane et al. 2001). Taxane als Spindelgifte dagegen stoppen den Zellzyklus in der darauf folgenden Mitosephase (Lane et al. 2001, Abal et al. 2003). Hier kann von einem Synergismus der phasenspezifischen Medikament ausgegangen werden, da die von Trastuzumab nicht erreichten CTC noch von der Taxanwirkung getroffen werden könnten und umgekehrt. Andere Pharmaka, wie zum Beispiel Antimetabolite, Alkylantien, Topoisomerasehemmstoffe und zytostatische Antibiotika wirken entweder zyklusspezifisch in allen Phasen oder in der S-Phase, indem sie die Integrität der DNA zerstören (Remvikos et al. 1993). Damit kann es nicht zur Replikation (S-Phase) kommen. Studien konnten einen Zusammenhang von Her2-Überexpression und Chemotherapieresistenz belegen (Colomer et al. 2000, Gusterson et al. 1992). Die durch Trastuzumab in G1 gehaltenen Zellen sind dem gleichzeitigen Angriff der klassischen Chemotherapeutika teilweise nicht zugänglich und könnten so theoretisch überleben.

Solche zellzyklusspezifischen Zusammenhänge gilt es daher bei der gemeinsamen Gabe von Trastuzumab und Chemotherapeutika stärker zu beachten, um eine optimale Wirkung aller beteiligten Medikamente zu erhalten.

Die in der vorliegenden Arbeit ausgewerteten Fälle stellen eine unselektierte Mischung verschiedenster Mono-, Sequenz- und Kombinationstherapien dar, so dass von einem realistischen Abbild der Behandlungssituation von Brustkrebs ausgegangen werden kann.

Dies könnte die widersprüchliche Datenlage hinsichtlich der Effekte einer sequentiellen und kombinierten Trastuzumabgabe zwischen den internationalen Trastuzumab-Studien mit ihrer Therapie-Vorselektion (Piccart-Gebhart 2006) und den hier vorliegenden Resultaten erklären.

Weiterhin muss beachtet werden, dass die erwähnten Studien bereits nach kurzer Nachbeobachtungszeit (2 Jahre) ausgewertet wurden. Natürlich beinhalten kurzfristige Analysen zur Wirksamkeit neuer Medikamente allgemein den Vorteil, positive Effekte zeitnah aufdecken zu können. Nachteilig schlägt sich dagegen nieder, dass Reevaluationen zu späteren Zeitpunkten in der Vergangenheit oft nicht die früheren Ergebnisse bestätigen konnten. Zur Verdeutlichung sei die Phase III-Studie PACS-04 erwähnt, bei der die Ergebnisse der Trastuzumabtherapie von Spielmann et al. 2007 nach drei Jahren ausgewertet wurden: dabei sank der Vorteil der Trastuzumab-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe im krankheitsfreien Überleben auf unscheinbare 0,5 %, während die HERA-Studie nach einem beziehungsweise zwei Jahren einen Vorteil von 36 % und später nur noch 8,4 % postulierte (Spielmann et al. 2007, Viani et al. 2007, Piccart-Gebhart et al. 2005).

Große Studien sind im Rahmen der adjuvanten Therapie bisher das hauptsächliche Mittel, um Therapieeffekte aufzuzeigen. Dennoch ist ihre Erhebung zeitraubend und teils wenig hilfreich für die einzelne Patientin mit ihrer individuellen Brustkrebserkrankung. Eine Abstimmung der Therapie sollte daher über die Einbeziehung von individuellen Faktoren erfolgen. Dazu könnten in Zukunft die zirkulierenden epithelialen Tumorzellen, die eine Therapieüberwachung ermöglichen, beitragen (Pachmann et al. 2008b).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Therapiemodus und dem Verhalten der Zellzahlen ließ sich nicht zeigen, obwohl Hinweise für solche Zusammenhänge bestehen: Die prognostisch ungünstigere Gruppe mit adjuvant kombinierter Therapie wies eine Häufung der steigenden Verläufe auf, wohingegen die Zellzahlen bei sequentieller Gabe hauptsächlich fielen oder sich stabilisierten. Dies deckt sich mit den Feststellungen von Pachmann et al. bezüglich der prognostischen Aussagefähigkeit von Zellzahlverläufen (Pachmann et al. 2005, Pachmann et al. 2008b). Ein Problem stellt die noch relativ kleine Fallzahl des in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektives in Bezug auf Trastuzumab dar. Dies liegt zum einen daran, dass es sich bei Trastuzumab um eine vergleichsweise

neue Therapiemöglichkeit handelt, zum anderen, dass ausschließlich Patientinnen eines Behandlungszentrums eingeschlossen worden sind.

Der primäre Nodalstatus (positiv versus negativ) der Patientinnen wurde in dieser Arbeit im Hinblick auf seine Aussagekraft für das rezidivfreie Überleben, die Rezidivhäufigkeit und Mortalität eingehend untersucht. Dabei konnte ein verkürztes krankheitsfreies Überleben bei primär nodalpositiven Patientinnen mit adjuvanter Trastuzumabtherapie gegenüber nodalnegativen Patientinnen ermittelt werden, was den 2007 von Smith et al. publizierten Daten und den Ergebnissen von Bedard und Piccart-Gebhart widerspricht (Smith et al. 2007, Bedard und Piccart-Gebhart 2008).

Obwohl dem Lymphknotenstatus somit eine höhere Bedeutung zukommt als beispielsweise Hormonrezeptor- oder Her2-Status für sich allein genommen und damit in der prädiktiven Aussagekraft über Hormonrezeptor- und Her2-Status gestellt wird, besteht zwischen diesen ein bisher noch unbekannter Zusammenhang (Decker et al. 2009).

Zum Vergleich der Zellzahlverläufe mit der adjuvanten Therapie wurden auch fünf primär metastasierte Patientinnen, die Trastuzumab erhalten hatten oder erhielten, analysiert.

Auffällig in allen Verläufen waren die stark schwankenden Werte sowie das gehäufte Auftreten von Dips. Eine Erklärung dafür könnte die Tumormasse der Metastasen sein, die wiederholt Zellen in den Blutkreislauf entsenden kann, möglicherweise mit der Bildung neuer Tochtergeschwülste (Butler und Gullino 1975). Zur frühen Metastasierung könnte beitragen, dass Her2-positive Zellen eine aggressivere Population darstellen, von der möglicherweise bevorzugt Zellen vom Tumor in den Blutkreislauf abgegeben werden. Das wiederholte Absinken der Zellzahlen könnte darauf beruhen, dass Zellen immer wieder aus dem Kreislauf ins Gewebe abwandern. Denn für zirkulierende Tumorzellen war gezeigt worden, dass sie hervorragend effizient die Gefäße verlassen können (Extravasation) (Chambers et al. 2000). Die hier beobachtete CETC-Dynamik könnte ein Spiegelbild dieses Zusammenspiels in der Metastasierungskaskade sein.

Des Weiteren stellt sich die Frage, welche zusätzlichen Faktoren und Marker für die Therapieplanung, die Erfolgs- und Prognoseabschätzung genutzt werden könnten (Bear 2008). In dieser Arbeit wurde daher versucht, ein anerkanntes Verfahren zur Ermittlung des Her2-Amplifikationsstatus im Primärtumor, die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, auf die zirkulierenden epithelialen Tumorzellen zu übertragen, um daraus relevante Schlüsse abzuleiten.

Für die Untersuchungen wurden Her2-positive Patientinnen, bei denen bereits zirkulierende Tumorzellen mittels LSC® nachgewiesen worden waren, ausgewählt. Hinzu kam je eine kleinere Gruppe von Patientinnen mit beziehungsweise ohne Trastuzumabgabe bei Her2-negativem Primärtumor.

Als Untergrenze für eine realistische Auffindbarkeit von idealerweise mindestens 20 CETC im FISH-Präparat ergab sich eine Zellzahl von mindestens 1000 CETC/ml Vollblut. Dies entspricht bei dem während der Versuche ermittelten Verdünnungsgrad im Idealfall 100 Zellen pro Präparat. Auf Grund von Schwankungen durch mögliche Fehler bei der Zellzahlanalyse beziehungsweise auf Grund methodischer Probleme (wiederholte Waschschriffe), erwies sich diese Grenze als praktikabel, um in den meisten Fällen auch 20 Zellen auffinden zu können. In 21 von 109 Präparaten (19,3 %) gelang wie bereits beschrieben nur ein Wiederfinden von minimal 4 bis maximal 19 Zellen, trotz einer zuvor per LSC® ermittelten Zellzahl von 1000 bis 21456 CETC/ml Vollblut.

In einem Präparat mit theoretisch nur bis zu 40 CETC (entspricht einer Zellzahl von 400/ml Blut) gelang allerdings auch eine hervorragende Beurteilung von 20 Tumorzellen. Wenn unter Umständen weniger als 20 analysierbare Zellen toleriert werden, wäre auch eine Verschiebung der Untergrenze auf etwa 400 – 600 Zellen pro Milliliter Patientenblut denkbar, um zufriedenstellende FISH-Analysen durchführen zu können. Ergänzend sollte in der Zukunft ein Versuch über die Aussagekraft von Analysen geringerer Zellzahlen im Vergleich zu den bisher 20 CETC erfolgen. Diese Standardzahl wurde ursprünglich aus der zytogenetischen Diagnostik übernommen und soll die statistische Sicherheit der Analysen erhöhen (Mitelman 1995).

Eine Limitierung für eine niedrigere Untergrenze ergibt sich auch aus dem zeitlichen Aufwand, der durch eine erschwerte manuelle Auffindbarkeit der Tumorzellen im Präparat zu erwarten ist. Bei einer angestrebten routinemäßigen Einführung der hier vorgestellten Methodik in die klinische Diagnostik ist dies ein nicht zu vernachlässigender Faktor.

Für die Praktikabilität und Verlässlichkeit der hier etablierten Methode spricht die auf die Patientinnen bezogene inter- und intraindividuelle Reproduzierbarkeit der Resultate, die sich ebenso schlüssig in die gleichzeitig erhobenen CETC-Verläufe einfügten.

Allerdings wurden die in dieser Arbeit evaluierten Präparate überwiegend von einem Untersucher visuell ausgewertet, so dass zwar eine gute Übereinstimmung zwischen den einzelnen FISH-Analysen zu erwarten ist, die Inter-Observer-Korrelation dagegen nicht berechnet werden konnte. Die stichprobenartige Überprüfung der Analysen durch einen zweiten erfahrenen Untersucher zeigte aber eine einheitliche Bewertung der Amplifikatzahl. In anderen Veröffentlichungen zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung für Her2-Analysen an isolierten Tumorzellen wurde jedoch ebenfalls nicht auf die Inter-Observer-Korrelation eingegangen (Meng et al. 2006, Vincent-Salomon et al. 2007).

Kritisch muss auch die fehlende Zentromerzählung betrachtet werden. Zwar wurde hier absichtlich nur auf die absolute Anzahl an Signalen pro Zellen eingegangen und nicht auf das Verhältnis der Signale zur Anzahl der Chromosomen 17. Allerdings kann so nicht überprüft werden, inwiefern Polysomien vorlagen, die zunehmend in den Fokus von Untersuchungen zur Her2-Amplifikation rücken (Hofmann et al. 2008, Dal Lago et al. 2006). Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass das ebenso von der FDA zugelassene Her2-Diagnostik-Kit INFORM (Ventana Medical Systems) von vornherein eine alleinige Evaluation der Her2-Signale vorsieht (Carney et al. 2007).

Bisher herrscht noch keine Einigkeit über den Einfluss von Polysomien auf den Phänotyp von Tumorzellen. Die bisherigen Daten bezüglich des Primärtumors konnten keine klare Aussage hinsichtlich der Konsequenz von Chromosom 17-Polysomie treffen: Reine Polysomie ohne Überexpression wurde ebenso nachgewiesen wie verschiedenste Kombinationen von positiven/negativen IHC-Ergebnissen bei Polysomie 17 und gleichzeitiger positiver/negativer Her2-Amplifikation. Die prognostischen Aussagen variierten folglich und führten zu keiner einheitlichen Aussage (Vanden Bempt et al. 2008, Hofmann et al. 2008).

Bei alleiniger Beschränkung auf die Her2/Chromosom 17-Ratio oder die reine Her2-Amplifikatzählung könnten auch Informationen verloren gehen. Sie sollten beide in zukünftigen Untersuchungen parallel erhoben und ausgewertet werden, um ihre Aussagekraft vergleichen zu können.

Einen Anhaltspunkt liefert in der vorliegenden Arbeit das wiederholte Auffinden von Zellclustern in den FISH-Präparaten, was laut Forus et al. ein Hinweis auf Polysomie sein kann (Forus et al. 1999). Bei zukünftigen Analysen sollte deswegen sowohl auf die

absolute Her2-Amplifikationszahl als auch die Vermehrung von Chromosom 17 geachtet werden.

Im Zusammenhang mit der EpCam-basierten Immunfluorometrie ist bemerkenswert, dass in den morphologisch durch die Antikörperfärbung gut zu identifizierenden epithelialen Zellen in hohem Maße Amplifikationen aufzufinden waren - in 50 von 109 auswertbaren Proben (45,9 %) wiesen alle untersuchten CETC >2 Her2-Signale auf, in den restlichen 59 Fällen rangierte der Anteil zwischen dreizehn und 95 %. Dabei gilt die Genervielfältigung unbestritten als Beweis von Malignität (Brison 1993). Diese Kombination von Zellcharakterisierung erlaubt damit umso mehr, die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Quantifizierung von zirkulierenden Tumorzellen zu bestätigen (Pachmann et al. 2001).

Die hier etablierte Methode, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung in EpCam-markierten und quantifizierten CETC, erwies sich letztendlich als sehr effektiv und verlässlich. Das ohne Waschschriffe oder Anreicherung auskommende Protokoll für die Quantifizierung führt zu Zeitersparnis und minimalem Verlust von Tumorzellen im Gegensatz zu den Versuchen anderer Gruppen (Wulfing et al. 2006, Ignatiadis et al. 2008, Brandt et al. 1998), besonders solchen, die FISH mit komplexen Methoden für Selektion und Anreicherung kombinieren (Fehm und Solomayer 2004). Die hierfür verwendeten Methoden sind die Magnetseparation, Cytospins, Dichtegradientenzentrifugation und als neuere Entwicklung FICTION (Meng et al. 2006, Campos et al. 2008).

Weiterhin gibt es Kritik an den dort verwendeten Detektionsmethoden für Her2:

Die Immunhistochemie stellt für den Primärtumor bisher noch den Goldstandard in der Festlegung des Her2-Status dar. Allerdings besteht die Gefahr, durch Lagerung oder Verarbeitungsschritte das oberflächlich gelegene Her2-Protein zu verlieren. Dies trifft ebenso auf die isolierten Tumorzellen zu. Hinzu kommt, dass Her2-Amplifikationen ohne Überexpression übersehen werden, obwohl Hinweise existieren, dass in solchen Fällen die Prognose ausgehend von Zellen mit Amplifikation der mit gleichzeitiger Überexpression gleicht (Pauletti et al. 2000).

Die hohe Aussagekraft von FISH-Analysen unterstreicht eine weitere Untersuchung von Mass et al., die bei Patientinnen mit bestätigter Her2-Amplifikation im Primärtumor eine bessere Wirksamkeit von Trastuzumab nachwies als bei solchen mit lediglich immunhistochemisch positivem Her2-Status (Mass et al. 2005).

Die RT-PCR ist besonders sensitiv in der Detektion von CTC, wenn die mRNA von krankheitsrelevanten Genen wie Her2 analysiert wird (Tewes et al. 2008). Da sich der RNA-Gehalt in Abhängigkeit von Zellstoffwechsel und Degradation jedoch verändert, kann dies einen Schwachpunkt darstellen und muss nicht den Amplifikationsgrad oder die Menge an tatsächlicher Proteinexpression der einzelnen Zelle repräsentieren (Gygi et al. 1999). Hinzu kommt, dass das Zellmaterial für die PCR zerstört werden muss und nicht für weitere Analysen zur Verfügung steht, wie dies theoretisch für die FISH-Präparate möglich ist. Darüber hinaus zeigten sich die FISH-Präparate über mindestens drei Monate unempfindlich gegenüber Lagerung, sowohl vor als auch nach der Hybridisierung, was sich in der Stabilität von Immunfluoreszenz und DNA-Signalen widerspiegelt. Dies widerlegt die Meinung von Ross et al., der die Haltbarkeit und fehlende Möglichkeit zur Reevaluation kritisierte (Ross et al. 2003).

Ebenso wie in der Literatur bereits vereinzelt berichtet, traten Abweichungen zum Primärtumor auf. Dies war in der Vergangenheit für Metastasen in geringem Umfang von 7 bis 20 % festgestellt worden (Gancberg et al. 2002, Edgerton et al. 2003, Zidan et al. 2005), zumeist jedoch lediglich für die Überexpression des Rezeptors.

Mit dem wachsenden Interesse an den zirkulierenden Tumorzellen mehren sich auch Untersuchungen, die auf die tumorbiologischen Profile der CTC als oft noch einzig vorhandenes Zeichen und letzten diagnostischen Spiegel der Krebserkrankung eingehen.

Bisher existieren noch wenige Längsschnittanalysen zu den zirkulierenden Tumorzellen, meist mit relativ kleinen Patientenzahlen, deshalb stellt insbesondere unsere Verknüpfung der Zellzahlverläufe mit den Amplifikationsergebnissen zum jetzigen Zeitpunkt ein absolutes Novum dar.

Besonders interessant ist die dadurch gewonnene Erkenntnis, dass die CETC keine tumorbiologisch einheitliche Masse sind, sondern Subpopulationen mit variierendem Verhaltensmuster ausbilden können.

Die in der vorliegenden Arbeit entdeckten und eingehend untersuchten Amplifikationssubgruppen gründen sich auf dem Vorgehen für den Primärtumor und begrenzten Erfahrungen aus der Literatur (Wolff et al. 2007, Skaland et al. 2008). Hervorzuheben ist allerdings, dass das in dieser Untersuchung verwendete Scoring-System eine Modifikation des für das Vysis-Protokoll vorgesehenen Vorgehens darstellt und sich

dadurch insbesondere für die Überwachung der Subgruppen eignet. Diese kristallisierten sich erst im Verlauf der Auswertungen heraus, da primär noch eine feinere Einteilung der Amplifikationsgrade vorgenommen worden war.

Die weitere Zusammenfassung diente der Hervorhebung beziehungsweise Sichtbarmachung von individuellen zellulären Verhaltensmustern durch Einteilung in drei Subgruppen:

nicht bis leichtgradig amplifiziert (<6 Signale),

mittelgradig (6-10 Signale)

und hochgradig (>10 Signale) amplifizierte CETC.

Die nach neuen Empfehlungen laut Wolff et al. amplifikationsdeterminierenden 6 Signale wurden hier als Grenze von niedrig- zu mittelgradiger Genervielfältigung festgelegt, die Wertung von >10 Signalen als hochamplifiziert lehnt sich an die Einteilung von Skaland et al. an (Wolff et al. 2007, Skaland et al. 2008). Aktuelle Richtlinien propagieren sogar, eine Positivität im Primärtumor erst ab >6 Signalen zu bestätigen (Wolff et al. 2007). Dies unterstreicht auf der einen Seite die Notwendigkeit einer graduellen Unterteilung, lässt aber die unter Umständen krankheitsrelevanten niedrigamplifizierten Tumorzellen außer Acht (Jensen et al. 2008).

Bisherige Untersuchungen auf diesem Gebiet beschäftigen sich vorrangig mit der Feststellung einer Amplifikation beziehungsweise viel mehr der Überexpression von Her2 ohne Beachtung weiterer Unterschiede. Methoden wie die PCR bergen trotz hoher Sensitivität den Nachteil, sich auf die Expressionsaktivität, unabhängig von der Genebene, zu beziehen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Abweichungen zwischen diesen zellulären Ebenen bestehen können (Mocellin et al. 2006).

Inwiefern dies eine klinische Relevanz hat, muss in weiterführenden Experimenten erforscht werden. Hierzu bietet sich eine Weiterführung der hier begonnenen regelmäßigen FISH-Analysen unter Beobachtung der CETC-Zahlen an, möglicherweise ergänzt durch immunhistochemische oder PCR-basierte Methoden. Damit könnte zusammen mit den bisher gesammelten Befunden ein detaillierteres Bild über Dynamik und intrazelluläre Interaktion der CETC in Bezug auf das Her2-Gen und -Protein gezeichnet werden.

Patientinnen mit tendenziell steigenden Zellzahlen unter Trastuzumab zeigten auffallend häufig ein wiederholtes Ansteigen der hochamplifizierten Subgruppe mit plötzlichem massivem Abfall gefolgt von einem Wiederanstieg. Dies war meist assoziiert mit einem vorangehenden Abfall der CETC, d.h. sehr starkem Absinken und sofort folgendem

Wiederanstieg der CETC. In Fällen von stabilen oder gar fallenden Zellzahlen zeigte sich kein charakteristisches Verhalten der hochgradig amplifizierten Zellen. Solche Patientinnen wiesen eine bessere Prognose auf.

Es stellt sich die Frage, inwiefern die Veränderung der Zellzahl mit der Dynamik der Her2-Subpopulationen gekoppelt ist. Eine Vermutung ist, dass der therapiebedingte Tumorzellabfall darauf beruht, dass zuerst die Zellen der hochamplifizierten Population durch Trastuzumab eliminiert werden. Dadurch beginnen die verbliebenen weniger amplifizierten Zellen mit einer erhöhten Proliferationsaktivität. Gleichzeitig kommt es dabei in diesen Zellen zur Amplifikatvermehrung – Ausgangspunkt für die neue hochgradig amplifizierte Subgruppe. Gestützt wird dies durch die Korrelation von Amplifikation und Zellzyklusaktivität und der Tatsache, dass Trastuzumab bevorzugt proliferierende Zellen im Übergang von der G1- zur S-Phase angreift (Brison 1993, Yarden und Sliwkowski 2001).

Dies deckt sich mit den bereits 1971 aufgestellten Theorien zur Kinetik von Brustkrebszellen unter zytotoxischer Therapie: Die normalerweise exponentiell anwachsende Tumormasse besteht aus einem überwiegenden Anteil ruhender G_0 -Zellen, insbesondere beim Mammakarzinom, und einem kleineren Anteil proliferierender Tumorzellen. Nur letztere können durch die Chemotherapeutika, die Zellzyklusaktivität voraussetzen, eliminiert werden. Im Anschluss gehen anteilig Zellen der ruhenden Fraktion in die Proliferationsphase über und die Therapie kann erneut angreifen (Skipper 1971). Daraus ergibt sich eine charakteristische Tumorzellkinetik, wie in Abb. 27 dargestellt:

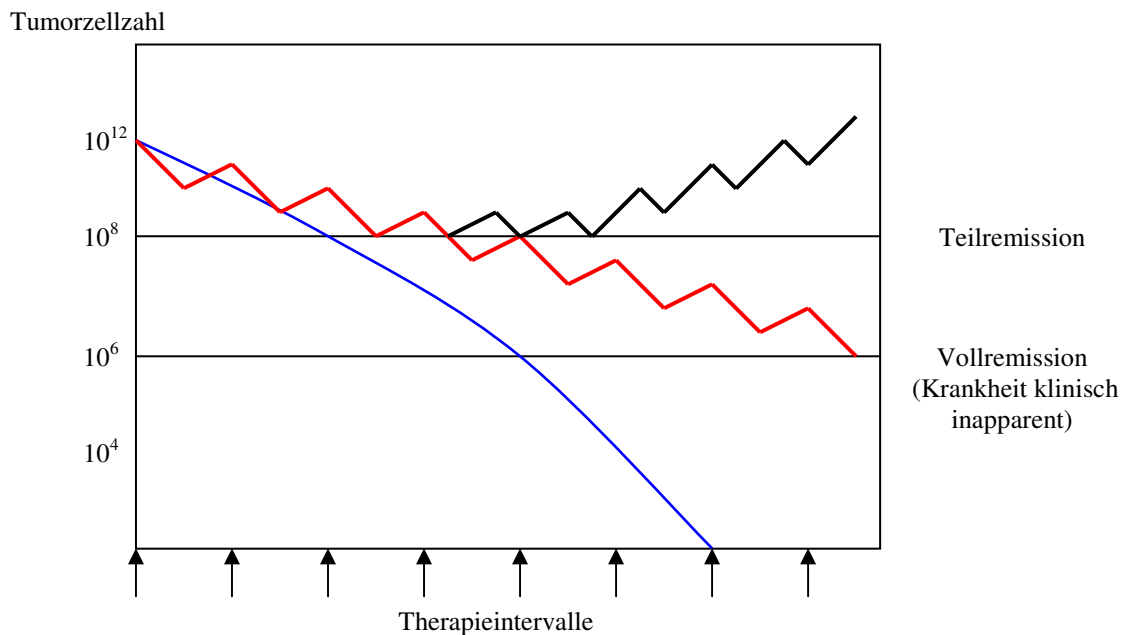


Abb. 27: Tumorzellkinetikmodell nach Skipper, Schabel und Wilcox
(blau: Verhalten bei hypothetischer uniformer Chemosensitivität der Zellen und gleichmäßig fraktioniertem Absterben; **rot:** tatsächliche zusätzliche Proliferation von weniger chemosensiblen Zellen während der Therapieintervalle; **schwarz:** Wachstum übersteigt Elimination bei Versagen der Chemotherapie)

Auf die einzelne proliferierende CETC entfielen zuerst eine relativ größere Menge an Wachstumsfaktoren, da ein Teil der darum konkurrierenden Tumorzellen weggefallen ist. Später, im Rahmen des massiven Wiederanstieges der hochamplifizierten Subgruppe, könnte der Anteil an Her2-Antikörper für die einzelne Zelle niedriger ausfallen – ein möglicherweise entscheidender Überlebensvorteil.

Aber auch für die Therapieüberwachung sind Aussagen bereits jetzt möglich, die vor allem die Resistenzentwicklung gegenüber Trastuzumab betreffen: In den letzten Jahren mehren sich Hinweise, dass Tumorzellen unter Trastuzumabexposition ihre Oberflächenrezeptoren, also auch Her2-Rezeptoren, abschirmen. Bestätigt wurde die Wirkung der Hyaluronsäure in Kooperation mit ihrem Rezeptor CD44, der in Wechselwirkung mit dem Her2-Rezeptor treten kann und zu dessen Internalisierung und Herunterregulation führt (Palyi-Krekk et al. 2007). Földi et al. zeigten eine gesteigerte Fähigkeit von Brustkrebszellen zu Gewebeinvasion und Metastasierung durch Hyaluronsäurebildung und CD44-Expression (Foldi et al. 2007). Besonders Zellen mit niedrig- und mittelgradiger Amplifikation könnten aufgrund solcher Mechanismen einen Vorteil erlangen. Brison stellt zu Tumorprogression und Amplifikation fest, dass eine

Vermehrung von Genen und damit auch der Expression eine Antwort der Zellen auf schwache beziehungsweise unterschwellige Wachstumsstimuli darstellt (Brison 1993). Zellen mit <10 Amplifikaten und damit geringerer Rezeptordichte sind somit unter Umständen effektiver abgeschirmt – sowohl gegenüber Trastuzumab als auch gegenüber Wachstumsfaktoren, was die Amplifikation von Her2 begünstigen würde. Andererseits könnten die hochgradig amplifizierte Zellen einen solch hohen Rezeptorbesatz aufweisen, dass eine Abdeckung erschwert wird. Im Gegensatz zu der Population mit <10 Signalen bieten dann vor allem solche Zellen Angriffspunkte für Trastuzumab und Proliferationsstimuli. Dies würde die erkennbare Fluktuation der Zellen mit >10 Amplifikaten wahrscheinlich als Folge der Antikörperwirkung erklären. Diese Zellen wären nicht nur Spiegel für den Therapieeffekt, sondern könnten auch eine Resistenz der Tumorzellen anzeigen. Insbesondere die typischerweise gefundene spiegelbildliche Dynamik der hoch- und mittelamplifizierten Zellen (Orange vs. Rot) scheint dabei für noch bestehende Therapiewirkung, hohe Proliferationsaktivität und drohende Progredienz der Malignität – wie die Her2-Amplifikation – zu stehen. Sobald Patientinnen stabile Verläufe der hochamplifizierten CETC aufweisen, sollte daher an einen Wirkungsverlust von Trastuzumab mit weitreichenden Konsequenzen gedacht werden.

Zum anderen könnte man auch von einem „Wegfangen“ von Trastuzumab und Wachstumsfaktoren sprechen, was wieder zu einem Überlebensvorteil für die niedrig- und mittelamplifizierten CETC sowie zum oben besprochenen Proliferationsreiz führen kann.

Ein weiterer Aspekt, der in diesem Zusammenhang zu nennen ist, betrifft die Trastuzumabresistenz. Es existiert eine gewisse Diskrepanz zwischen Genvervielfältigung und Rezeptorexpression. Pauletti et al. berichteten von Fällen, in denen gering amplifizierte Zellen keinerlei Überexpression von Her2 aufwiesen. Zum anderen fanden sie auch eine Subgruppe von Zellen mit über 32 Signalen, die ebenfalls eine geringe Rezeptorexpression besaßen (Pauletti et al. 2000). Hierin liegen möglicherweise Erklärungen für das teilweise Ausbleiben von Rezidiven trotz auffällig hoher Zahlen von zirkulierenden Tumorzellen oder hoher Her2-Amplifikation in diesen.

Es konnte beobachtet werden, dass unter Trastuzumabgabe die niedrigamplifizierte Zellpopulation kaum Schwankungen zeigt und bedeutend seltener eradiziert wird verglichen mit den beiden anderen Subgruppen. Eine alleinige Therapie mit Trastuzumab scheint also nicht alle amplifizierten Zellen zu erreichen, die aber durch andere Pharmaka

eliminiert werden könnten. Dies birgt allerdings das bereits dargestellte Problem der gegenseitigen Inhibierung von Chemotherapeutika und Trastuzumab.

Die drei Zellpopulationen beinhalten aber noch weitere Aussagemöglichkeiten: Patientinnen, die während der Verlaufsuntersuchungen vor allem niedrig- und mittelgradig amplifizierte Zellen aufweisen, haben ein signifikant verkürztes krankheitsfreies Überleben. Möglicherweise birgt allein schon das Vorhandensein überwiegend solcher CETC eine Art Resistenzmechanismus in sich, der die Antikörper zumindest in der angewandten Form und Dosierung weniger wirksam macht.

Unabhängig vom Zeitpunkt der Therapien geht ein Anstieg der Zellzahl tendenziell mit einem Ansteigen der mittel- und hochgradig amplifizierten Populationen einher. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Zellen ein erhöhtes Proliferationspotential besitzen. Brison et al. zeigten hierzu, dass die Genamplifikation einen relativ späten Schritt in der Tumorprogression unter Umgehung der Wachstumskontrolle und ein eindeutiges Zeichen von Proliferation darstellt (Brison 1993) – ein Widerspruch zu der oft verfochtenen These, dass die meisten zirkulierenden Zellen ruhend und mit wenig Metastasierungspotential ausgestattet wären. Zumindest in Hinblick auf die Her2-positiven CETC erscheint dies ein Trugschluss zu sein und eröffnet gleichzeitig ein Werkzeug zum Erkennen einer Risikogruppe.

Wie bereits erwähnt, wurde in der Vergangenheit vereinzelt auf die möglichen tumorbiologischen Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastasen beziehungsweise von isolierten Tumorzellen eingegangen. Als unabdingbarer Parameter für die Auswahl der sogenannten „targeted therapy“ rückt die genauere Beachtung der CETC-Eigenschaften demnach immer mehr in den Mittelpunkt.

Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden CETC von Patientinnen mit Her2-negativ getestetem Primärherd wiederholt auf das Vorliegen einer Her2-Amplifikation hin untersucht. 17 Patientinnen mit Her2-Status 0 bis +2 mit zusammen 34 FISH-Analysen besaßen stets einen Anteil amplifizierter zirkulierender Tumorzellen (>5 Signale) von 5 bis 100 % mit Überwiegen der hohen Anteile >50 %. In 10 Fällen wurden ≥ 2 zeitlich unabhängige Analysen pro Patientin vorgenommen, die das Ergebnis bestätigten.

Das Her2-negative Patientenkollektiv zeigt zudem ein eigenständiges Verhalten der Zellzahl gekoppelt mit einer bestimmten Dynamik der Amplifikationssubgruppen:

Bei einem Her2-Status von 0 im Primärtumor enthält der CETC-Verlauf auffälligerweise keine Dips sowie eine unterschiedliche Dominanz der Subgruppen. Patientinnen mit einem Status von +1 und +2 verzeichnen hingegen immer einen Dip der Tumorzellzahl, gefolgt von einem Abfall der hochgradig amplifizierten Zellen bei +1 und einem Anstieg derselben Population bei +2 im Primärtumor. Die CETC-Verläufe und die Her2-Dynamik der Gruppe mit einem primären Status von +3 gleichen der Gruppe mit +2. Es zeigt sich hier eine auffallende Ähnlichkeit der Zellzahldynamik von Patientinnen mit Status +2 und +3. Dies sollte auch in therapeutische Überlegungen einbezogen werden, da in beiden Fällen von +2, trotz der Festlegung, dass diese Patienten als Her2-negativ gelten, Trastuzumab erfolgreich eingesetzt wurde. Geht man sonst von einer Wirkung des Antikörpers vor allem in der Gruppe mit +3 aus, so könnte hiermit auch von einer Wirkung bei den Patientinnen mit +2 gesprochen werden.

Das Abweichen der CETC auf genetischer Ebene in Bezug zum Primärtumor gibt immer noch Rätsel auf. Mehrere Theorien existieren dazu, denen letztendlich noch die abschließenden Beweise fehlen:

1. Die histologische Aufarbeitung des Primärtumors kann niemals das gesamte Tumolvolumen erfassen. Kleine und disseminierte Zellverbände mit abweichender Her2-Amplifikation werden somit nicht zur Beurteilung herangezogen. Dennoch können diese Zellen bereits prä- und intraoperativ gestreut haben. Durch die nun eingeleitete, auf Her2-negative Tumoren bezogene Therapie ergibt sich möglicherweise ein Überlebensvorteil für diese höhermalignen CTC (Nowell 1976, Santinelli et al. 2008).

Für diese Theorie sprechen die Tumorzellbefunde der Patientinnen 13 und 37, die trotz ursprünglich ermitteltem Her2-Befund von 0 im Primärtumor über 249 beziehungsweise 191 Tage eine Dominanz der höhergradig amplifizierten Tumorzellen zeigten. Hervorzuheben ist dabei, dass die erste FISH-Analyse bei beiden zum Operationszeitpunkt stattfand, der Tumor also bereits Her2-positive Zellen in die Peripherie entlassen haben musste. Beide haben kein Trastuzumab erhalten.

2. Auch unter Trastuzumabtherapie gibt es teilweise eine Progression der CETC. Hierbei werden Zellen bevorzugt, die aufgrund verschiedener Mechanismen der Antikörperwirkung entgehen können. Resistenzmechanismen gegen Trastuzumab wurden schon vor geraumer Zeit postuliert (Nahta und Esteva 2006b, Ritter et al. 2007). Hinzu kommen die hier gemachten Beobachtungen, dass niedrig- und

mittelamplifizierte Zellen trotz Therapie zahlenmäßig stabil bleiben können. Diese Zellen könnten einen Überlebensvorteil auf Grund der geringen Rezeptorexpression haben. Eine vermutete Abschirmung der Rezeptoren (Palyi-Krekk et al. 2007) sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Unabhängig davon weist die hochamplifizierte Subgruppe offensichtlich ein massives Proliferationspotential auf. Dies ist am sofortigen Wiederanstieg zu erkennen, wenn die Population wohl durch die Trastuzumabwirkung zusammengebrochen ist. In diesen Fällen liegt jedoch noch eine andere Vermutung nahe: Zellen mit geringeren Amplifikationsgraden, die wie oben bereits erwähnt auch einen Selektionsvorteil aufweisen könnten, entwickeln sich unter Umständen progredient hin zu Zellen höherer Amplifikationsgrade (Santinelli et al. 2008).

Hierfür spricht auch der Befund der Patientin 76, deren Her2-Status primär mit 0 bezeichnet worden war. 441 beziehungsweise 462 Tage nach der Operation bestätigte allerdings je eine FISH-Analyse das Vorhandensein von 45 % mittel- und hochamplifizierten Zellen. Die Patientin erhielt kein Trastuzumab und wies bereits bei Erstdiagnose Metastasen auf.

Solche Befunde sprechen deutlich für die Notwendigkeit einer regelmäßigen Reevaluation des Her2-Status mittels der zirkulierenden Tumorzellen. Schon 2004 zeigten Meng et al., dass es im Krankheitsverlauf zu einer Neuerwerbung und Progression der Her2-Amplifikation kommen kann (Meng et al. 2004b) und Pantel und Brakenhoff verglichen die Progressionsfähigkeit der isolierten Tumorzellen mit der des Primärtumors. Die isolierten Tumorzellen verfügen dabei zum Teil über die gleichen Fähigkeiten hinsichtlich einer Progression zu höherer Malignität, schlagen aber individuelle Entwicklungswege nach ihrer Ablösung vom Primärtumor ein (Pantel und Brakenhoff 2004).

Nur durch Reevaluation können Patientinnen einer gezielten Therapie zugeführt und das Nutzen-Risiko-Verhältnis optimiert werden. Auch ein vermeintlich geringer Anteil hochamplifizierter CETC und grenzwertige Amplifikations- und Immunhistochemiewerte dürfen nicht vernachlässigt werden, wie die Progressionstendenzen bei den nicht mit Trastuzumab behandelten Patientinnen verdeutlichen.

Dennoch muss bei den eben genannten Patientinnen 37 und 17 (negativer Primärtumor, positive CETC, kein Trastuzumab) noch auf den Einfluss der durchgeführten Therapien eingegangen werden. Patientin 37 erhielt adjuvant sechs Zyklen eines anthrazyklinhaltigen

Schemas und erreichte damit eine schrittweise Abnahme der Zellzahl um etwa das Zehnfache auf 200 pro ml. Zum Ende der Chemotherapie kam es dann zu einem Wiederanstieg bis knapp unterhalb des Ausgangswertes. Dies könnte sich mit einer These von Coon et al. decken, welche feststellten, dass es häufig zu einer Koamplifikation von Her2 und Topoisomerase II alpha auf Chromosom 17 kommt. In diesem Fall würden solche Zellen besonders gut auf Anthrazykline ansprechen, da diese an die Topoisomerase II alpha binden und somit die Zellteilung inhibieren (Coon et al. 2002). Eine zumindest zeitlich begrenzte Beherrschung der Her2-positiven CETC scheint somit möglich.

Im Gegensatz dazu erhielt Patientin 17 postoperativ bisher ausschließlich ein Bisphosphonat. Ihre Zellzahlen stiegen zu Beginn der Therapie um über das Zehnfache an und blieben auf diesem Niveau seither relativ stabil.

Auffallend war, dass die mittelamplifizierten CETC um 45 % bei Patientin 17 anstiegen, zu Lasten der niedrigamplifizierten Zellen. Dagegen stiegen die mittelgradig amplifizierten Tumorzellen bei Patientin 37 lediglich um 15 % bei gleichzeitigem Absinken der Zellen mit >10 Signalen. Dies unterstreicht die mögliche eindämmende Wirkung von Anthrazyklinen auf die Proliferation von Her2-positiven CETC ohne Trastuzumabgabe.

Weiter stellt sich die Frage, inwiefern bereits isolierte Tumorzellen in Blut und Knochenmark als Metastasen zu werten sind beziehungsweise welches Metastasierungspotential die Mehrzahl von ihnen aufweist. Dies ist eng verbunden mit der Proliferationsaktivität und dem biologischen Profil der CETC, was sich hier vor allem in den Schwankungen der absoluten Zellzahl und im wechselnden Verhältnis der Subpopulationen zueinander widerspiegelt. Hervorzuheben ist dabei die charakteristische Dynamik der hochamplifizierten Tumorzellen. Ein Absinken einer dieser Werte (Zellzahl, Anteil der hochamplifizierten Zellen) könnte dabei nicht allein auf die Wirkung der Therapie zurückzuführen sein, sondern auch darauf hindeuten, dass die Zellen die Zirkulation in Richtung Gewebe verlassen. Dabei kann die Metastasierungsfähigkeit der CTC nach der Extravasation variieren und ein Eintritt der CTC in Ruhestadien trotz vorhergehender Proliferation erfolgen. Es könnte aber auch zu plötzlich klinisch fassbar werdenden Metastasen kommen (Chambers et al. 2000).

Einen weiteren interessanten Aspekt, warum zahlreiche Her2-positiven Tumorzellen bei gleichzeitig langem rezidivfreien Intervall gefunden werden können, erwähnten

Chambers et al. in der gleichen Publikation: Sie vermuteten, dass insbesondere aggressive Tumoren zwar eine höhere Zahl an CTC in die Blutbahn entlassen, diese Zellen aber bevorzugt ein geringeres Metastasierungspotential aufweisen. Dazu könnten genetische Veränderungen der CTC, die nach dem Eindringen in die Blutgefäße eintreten, führen (Chambers et al. 2000).

Dies liefert mögliche Erklärungen für das Ausbleiben von Rezidiven trotz erhöhter oder fluktuierender Zellzahlen.

Die verschiedenen Verhaltensmuster (Grün vs. Rot, Orange vs. Rot) der Subpopulationen untereinander waren in Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern oder dem Überleben noch nicht statistisch signifikant. Dennoch ist zu erwarten, dass sich bei Beobachtung eines größeren Patientenkollektivs und mit längeren Beobachtungszeiträumen die gezeigten Trends weiter verstärken werden.

7. Schlussfolgerung

Die Quantifizierung zirkulierender epithelialer Tumorzellen mittels LSC® war hervorragend zur Überwachung der postoperativen Trastuzumabtherapie geeignet.

Bei Patientinnen mit Antikörpergabe nach Rezidiv deutet eine Zellzahlanstieg auf ein verkürztes Gesamtüberleben hin, was sich mit früheren Untersuchungen zum CETC-Monitoring deckt.

Unter den Patientinnen befinden sich auch primär Her2-negative Fälle mit Her2-positiven CETC, die leitlinienabweichend Trastuzumab erhalten haben und wie die Her2-positiven Patientinnen darauf ansprechen. Eine Indikationsausweitung für den Einsatz des Antikörpers auch bei heute noch als Her2-negativ betrachteten Patientinnen sollte überdacht werden. Vor allem, da die Reevaluation des Her2-Status an Hand der CETC einen Zugang zur klinisch inapparenten Residualerkrankung bietet.

Bisherige Studien vernachlässigen den Einfluss des Verabreichungsmodus von Trastuzumab auf dessen Wirksamkeit. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich die simultane Chemo- und Trastuzumabtherapie nachteilig auf das krankheitsfreie Überleben und die Rezidivhäufigkeit auswirkt. Zellzyklusspezifische Zusammenhänge gilt es möglicherweise stärker zu beachten, um eine optimale Wirkung aller beteiligten Medikamente zu erhalten. Die CETC-Dynamik der Therapiemodi zeigt Trends an, die künftig an größeren Patientengruppen weiter beobachtet werden sollten.

Die Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an zirkulierenden Tumorzellen zur Überwachung der Her2-Amplifikation gelang nach Optimierung des Protokolls effektiv und verlässlich. Die Reproduzierbarkeit und die erkennbaren Verhaltensmuster der Amplifikationsgrade zu den CETC-Verläufen weisen den Weg zu einem routinemäßigen Einsatz der Methode. Die in dieser Studie durchgeführte parallele Überwachung der Dynamik der Zellzahl und der Her2-Amplifikation in den CETC ist in dieser Form bisher noch nicht berichtet worden. Dies gilt insbesondere für die Entdeckung von CETC-Subpopulationen hinsichtlich ihres Amplifikationsgrades. Diese Populationen erscheinen tumorbiologisch und in ihrem Verhalten unterschiedlich. Obwohl in dieser Arbeit die Grenze für die Her2-Positivität im Tumorzellbefund in Anlehnung an neueste Richtlinien auf 6 Signale festgesetzt wurde, darf die niedrigamplifizierte Subgruppe (<6 Signale) nicht vernachlässigt werden. Dominieren der niedrig- und mittelgradig amplifizierten CETC bedeutet ein signifikant verkürztes krankheitsfreies Überleben. Darin liegt vielleicht ein Resistenzmechanismus, der die Antikörpertherapie weniger wirksam macht.

Auffallend war der Zusammenhang zwischen den Her2-Subgruppen und dem Zellzahlverhalten: ein Ansteigen der CETC ist geknüpft an eine massiv schwankende hochamplifizierte Zellpopulation und eine schlechtere Prognose. Damit ist diese Subgruppe in ihrem Kontext auch für die Überwachung der Trastuzumabwirkung und einer Resistenzentwicklung in Betracht zu ziehen. Insgesamt deutet vieles auf eine erhöhte Proliferationsaktivität der hochamplifizierten Zellen hin. Dies spricht gegen das Ruhen der CETC und für ein erhöhtes Metastasierungspotential. Man kann also unter Umständen Risikopatienten in Zukunft durch ihr Amplifikationsprofil und -verhalten identifizieren.

Eine entgegengesetzte Dynamik der hoch- zu mittelamplifizierten Zellen scheint eine noch vorhandene Therapiewirksamkeit anzuzeigen, aber auch eine starke Proliferationsaktivität und drohende Progression des Amplifikationsgrades. Stillstand im Verlauf der hochamplifizierten CETC muss an einen Wirkungsverlust von Trastuzumab denken lassen. Die Zellpopulation mit <6 Signalen schwankt geringer und lässt sich zudem nie vollständig eradizieren. Trastuzumab ist vielleicht nicht in der Lage, diese CETC zu eliminieren und erfordert das Hinzuziehen weiterer Medikamente. Zu beachten bleibt die mögliche wechselseitige Inhibierung von Chemotherapeutika und Trastuzumab.

Alarmierend ist die Bestätigung des regelhaften Auftretens amplifizierter Zellen bei primär Her2-negativen Patientinnen. Diese weisen ein abweichendes Verhalten der Zellzahl und der Amplifikationssubgruppen auf. Nur die ursprünglich als +2 bestimmten und mit Trastuzumab behandelten Patientinnen gleichen hierin der Her2-positiven Gruppe, ein erneutes Argument für eine Indikationsausweitung der Antikörpertherapie.

Noch können die festgestellten typischen Verhaltensmuster der Subpopulationen nicht in einen statistisch gesicherten Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern oder dem Überleben gebracht werden. Die ermittelten Trends sollten daher an größeren Patientenkollektiven und über einen noch längeren Zeitraum überprüft werden.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sprechen für die Einführung einer regelmäßigen Reevaluation des Her2-Status im Krankheitsverlauf, wobei sich zirkulierende epitheliale Tumorzellen als geeignet erwiesen haben.

8. Literaturverzeichnis

- Abal M, Andreu JM, Barasoain I. 2003. Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets*, 3 (3):193-203.
- Ashworth TR. 1869. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J*, 14:146-149.
- Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P, Richmond J, Donald B, Ferrier R, Cooke TG. 2001. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. *J Pathol*, 195 (4):422-428.
- Bear HD. 2008. Measuring circulating tumor cells as a surrogate end point for adjuvant therapy of breast cancer: what do they mean and what should we do about them? *J Clin Oncol*, 26 (8):1195-1197.
- Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. 1997. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med*, 75 (6):429-439.
- Bedard PL, Piccart-Gebhart MJ. 2008. Current paradigms for the use of HER2-targeted therapy in early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 8 Suppl 4:S157-165.
- Ben-Levy R, Paterson HF, Marshall CJ, Yarden Y. 1994. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *Embo J*, 13 (14):3302-3311.
- Bergh J, Jonsson PE, Glimelius B, Nygren P. 2001. A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer. *Acta Oncol*, 40 (2-3):253-281.
- Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G, Zanker KS. 1998. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer*, 76 (6):824-828.
- Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich 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.
- Brisson O. 1993. Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta*, 1155 (1):25-41.
- Butler TP, Gullino PM. 1975. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res*, 35 (3):512-516.
- Camara O, Rengsberger M, Egbe A, Koch A, Gajda M, Hammer U, Jorke C, Rabenstein C, Untch M, Pachmann K. 2007. The relevance of circulating epithelial tumor cells (CETC) for therapy monitoring during neoadjuvant (primary systemic) chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol*, 18 (9):1484-1492.
- Campos M, Prior C, Warleta F, Zudaire I, Ruiz-Mora J, Catena R, Calvo A, Gaforio JJ. 2008. Phenotypic and genetic characterization of circulating tumor cells by combining immunomagnetic selection and FICTION techniques. *J Histochem Cytochem*, 56 (7):667-675.
- Carney WP, Litzel K, Ali S, Neumann R, Lipton A. 2007. HER-2/neu diagnostics in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 9 (3):207.
- Chambers AF, Naumov GN, Vantighem 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.
- Charfare H, Limongelli S, Purushotham AD. 2005. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Br J Surg*, 92 (1):14-23.

- Choesmel V, Anract P, Hoifodt H, Thiery JP, Blin N. 2004. A relevant immunomagnetic assay to detect and characterize epithelial cell adhesion molecule-positive cells in bone marrow from patients with breast carcinoma: immunomagnetic purification of micrometastases. *Cancer*, 101 (4):693-703.
- Christopherson WM. 1965. Cancer Cells in the Peripheral Blood: a Second Look. *Acta Cytol*, 9:169-174.
- Claycomb JM, Benasutti M, Bosco G, Fenger DD, Orr-Weaver TL. 2004. Gene amplification as a developmental strategy: isolation of two developmental amplicons in *Drosophila*. *Dev Cell*, 6 (1):145-155.
- Colomer R, Montero S, Lluch A, Ojeda B, Barnadas A, Casado A, Massuti B, Cortes-Funes H, Lloveras B. 2000. Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*, 6 (6):2356-2362.
- Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, Seelig S, Jacobson K, Chen S, Renta V, Fronda G, Preisler HD. 2002. Amplification and overexpression of topoisomerase IIalpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*, 8 (4):1061-1067.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351 (8):781-791.
- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW. 2005. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 23 (7):1420-1430.
- Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, Salgado R, Verjat T, Lespagnard L, Ma Y, Veys I, Di Leo A, Sotiriou C, Piccart M, Larsimont D. 2006. Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 5 (10):2572-2579.
- Decker T, Hungermann D, Bocker W. 2009. [Prognostic and predictive factors of invasive breast cancer: update 2009]. *Pathologe*, 30 (1):49-55.
- Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, 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 (4):R69.
- Dinh P, de Azambuja E, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ. 2008. Facts and controversies in the use of trastuzumab in the adjuvant setting. *Nat Clin Pract Oncol*, 5 (11):645-654.
- EBCTCG 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 (9472):1687-1717.
- Edgerton SM, Moore D, 2nd, Merkel D, Thor AD. 2003. erbB-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 11 (3):214-221.
- Fehm T, Solomayer EF. 2004. Genotypisierung von disseminierten epithelialen Zellen bei Mammakarzinom-Patientinnen. *Geburtsh Frauenheilk*, (64):255-260
- Fehm T, Muller V, Alix-Panabieres C, Pantel K. 2008. Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance
- Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J, Gebauer G. 2005. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy*, 7 (2):171-185.

- Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, Meng S, Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Ried T, Rao C, Uhr J. 2002. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res*, 8 (7):2073-2084.
- Fisher B, Ravdin RG, Ausman RK, Slack NH, Moore GE, Noer RJ. 1968. Surgical adjuvant chemotherapy in cancer of the breast: results of a decade of cooperative investigation. *Ann Surg*, 168 (3):337-356.
- 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.
- Foldi M, Stickeler E, Bau L, Kretz O, Watermann D, Gitsch G, Kayser G, Zur Hausen A, Coy JF. 2007. Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer. *Oncol Rep*, 17 (4):841-845.
- Forus A, Hoifodt HK, Overli GE, Myklebost O, Fodstad O. 1999. Sensitive fluorescent in situ hybridisation method for the characterisation of breast cancer cells in bone marrow aspirates. *Mol Pathol*, 52 (2):68-74.
- Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G, Pedrocchi M, Paesmans M, Verhest A, Bernard-Marty C, Piccart MJ, Larsimont D. 2002. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol*, 13 (7):1036-1043.
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW. 2003. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell*, 11 (2):495-505.
- Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. 2001. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol*, 19 (4):960-971.
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. 2005. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*, 16 (10):1569-1583.
- Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. 2007. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol*, 18 (7):1133-1144.
- Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R, et al. 1992. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 10 (7):1049-1056.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, 19 (3):1720-1730.
- Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LW. 2006. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res*, 12 (14 Pt 1):4218-4224.
- Hofmann M, Stoss O, Gaiser T, Kneitz H, Heinmoller P, Gutjahr T, Kaufmann M, Henkel T, Ruschoff J. 2008. Central HER2 IHC and FISH analysis in a trastuzumab (Herceptin) phase II monotherapy study: assessment of test sensitivity and impact of chromosome 17 polysomy. *J Clin Pathol*, 61 (1):89-94.
- Holbro T, Civenni G, Hynes NE. 2003. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*, 284 (1):99-110.

- Hortobagyi GN, Ames FC, Buzdar AU, Kau SW, McNeese MD, Paulus D, Hug V, Holmes FA, Romsdahl MM, Frascini G, et al. 1988. Management of stage III primary breast cancer with primary chemotherapy, surgery, and radiation therapy. *Cancer*, 62 (12):2507-2516.
- 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.
- Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, Chlouverakis G, Stathopoulos E, Lianidou E, Georgoulis V, Mavroudis D. 2008. Prognostic Value of the Molecular Detection of Circulating Tumor Cells Using a Multimarker Reverse Transcription-PCR Assay for Cytokeratin 19, Mammaglobin A, and HER2 in Early Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 14 (9):2593-2600.
- Ingvarsson S. 1999. Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin Cancer Biol*, 9 (4):277-288.
- 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):884-891.
- Jensen KC, Turbin DA, Leung S, Miller MA, Johnson K, Norris B, Hastie T, McKinney S, Nielsen TO, Huntsman DG, Gilks CB, West RB. 2008. New cutpoints to identify increased HER2 copy number: analysis of a large, population-based cohort with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat*,
- Joos S, Fink TM, Ratsch A, Lichter P. 1994. Mapping and chromosome analysis: the potential of fluorescence in situ hybridization. *J Biotechnol*, 35 (2-3):135-153.
- Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. 1996. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *Embo J*, 15 (2):254-264.
- Kauraniemi P, Kallioniemi A. 2006. Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 13 (1):39-49.
- Klein CA. 2005. Single cell amplification methods for the study of cancer and cellular ageing. *Mech Ageing Dev*, 126 (1):147-151.
- Klein CA. 2009. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*, 9 (4):302-312.
- Komarova NL, Wodarz D. 2005. Drug resistance in cancer: principles of emergence and prevention. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (27):9714-9719.
- Lane HA, Motoyama AB, Beuvink I, Hynes NE. 2001. Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. *Ann Oncol*, 12 Suppl 1:S21-22.
- 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.
- 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.
- Madarnas Y, Trudeau M, Franek JA, McCready D, Pritchard KI, Messersmith H. 2008. Adjuvant/neoadjuvant trastuzumab therapy in women with HER-2/neu-overexpressing breast cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev*, 34 (6):539-557.

- Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. 1999. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet*, 354 (9174):197-202.
- Mass RD, Press MF, Anderson S, Cobleigh MA, Vogel CL, Dybdal N, Leiberman G, Slamon DJ. 2005. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin Breast Cancer*, 6 (3):240-246.
- Mehes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. 2001. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol*, 159 (1):17-20.
- 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. 2004a. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*, 10 (24):8152-8162.
- Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, Frenkel E, Euhus D, Leitch M, Osborne C, Clifford E, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Lane N, Wang J, Uhr J. 2006. uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (46):17361-17365.
- Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J. 2004b. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (25):9393-9398.
- Mitelman F. 1995. *ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Aufl. Basel, Switzerland: Karger, S.
- Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. 2006. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med*, 12 (3):130-139.
- Muller V, Hayes DF, Pantel K. 2006. Recent translational research: circulating tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 8 (5):110.
- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. 2007. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450 (7173):1235-1239.
- Nahta R, Esteva FJ. 2006a. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett*, 232 (2):123-138.
- Nahta R, Esteva FJ. 2006b. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res*, 8 (6):215.
- Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. 2006. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 3 (5):269-280.
- 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.
- Nole F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, Medici M, Verri E, Adamoli L, Rotmensz N, Goldhirsch A, Sandri MT. 2008. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol*, 19 (5):891-897.
- Nowell PC. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194 (4260):23-28.

- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J*, 19 (13):3159-3167.
- 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):5818-5824.
- Pachmann K. 2005. Longtime recirculating tumor cells in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 11 (15):5657; author reply 5657-5658.
- 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). *Clin Chem Lab Med*, 39 (9):811-817.
- Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Schneider U, Schunemann S, Hoffken 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):R975-979.
- Pachmann K, Dengler R, Lobodasch K, Frohlich F, Kroll T, Rengsberger M, Schubert R, Pachmann U. 2008a. 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 K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jorke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I, Hoffken K. 2008b. 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):1208-1215.
- Paget S. 1889. Contribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, 1:571.
- Palyi-Krek Z, Barok M, Isola J, Tammi M, Szollosi J, Nagy P. 2007. Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer*, 43 (16):2423-2433.
- Pantel K, Brakenhoff RH. 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 4 (6):448-456.
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. 1993. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 85 (17):1419-1424.
- 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.
- Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. 2000. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 18 (21):3651-3664.
- Piccart-Gebhart MJ. 2006. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-overexpressing breast cancer: what we know and what we still need to learn. *Eur J Cancer*, 42 (12):1715-1719.
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD. 2005. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 353 (16):1659-1672.

- Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H, Vincent-Salomon A, Nos C, Pouillart P, Thiery JP. 2003. Clinical significance of proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with breast cancer. *Br J Cancer*, 89 (3):539-545.
- Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thiery 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.
- Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, Wardeh R, Li YT, Guzman R, Ma Y, Sullivan-Halley J, Santiago A, Park JM, Riva A, Slamon DJ. 2005. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res*, 11 (18):6598-6607.
- 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 U S A*, 95 (8):4589-4594.
- Remvikos Y, Jouve M, Beuzeboc P, Viehl P, Magdelenat H, Pouillart P. 1993. Cell cycle modifications of breast cancers during neoadjuvant chemotherapy: a flow cytometry study on fine needle aspirates. *Eur J Cancer*, 29A (13):1843-1848.
- Riese DJ, 2nd, Stern DF. 1998. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*, 20 (1):41-48.
- 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.
- 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):4909-4919.
- Robert-Koch-Institut. 2008. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg).
- Rohr K, Heggin R. 1936. Tumorzellen im Sternalpunktat. *Deutsch Arch Klin Med*, 179:61-79.
- 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.
- Ross JS, Gray GS. 2003. Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu and Herceptin story. *Clin Leadersh Manag Rev*, 17 (6):333-340.
- 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.
- Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G. 2008. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer*, 122 (5):999-1004.
- Sauer T, Wiedswang G, Boudjema G, Christensen H, Karesen R. 2003. Assessment of HER-2/neu overexpression and/or gene amplification in breast carcinomas: should in situ hybridization be the method of choice? *Apmis*, 111 (3):444-450.
- Schlessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103 (2):211-225.
- Skaland I, Ovestad I, Janssen EA, Klos J, Kjellevoid KH, Helliesen T, Baak JP. 2008. Comparing subjective and digital image analysis HER2/neu expression scores with

- conventional and modified FISH scores in breast cancer. *J Clin Pathol*, 61 (1):68-71.
- Skipper HE. 1971. Kinetics of mammary tumor cell growth and implications for therapy. *Cancer*, 28 (6):1479-1499.
- 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.
- Sloane JP, Ormerod MG, Neville AM. 1980. Potential pathological application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastases. *Cancer Res*, 40 (8 Pt 2):3079-3082.
- Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M, Cameron D, Bell R, Bergh J, Coleman R, Wardley A, Harbeck N, Lopez RI, Mallmann P, Gelmon K, Wilcken N, Wist E, Sanchez Rovira P, Piccart-Gebhart MJ. 2007. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*, 369 (9555):29-36.
- Spielmann M, Roché H, Humblet Y, Delozier T. 2007. 3-year follow-up of trastuzumab following adjuvant chemotherapy in node positive HER2-positive breast cancer patients: results of the PACS-04 trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, (106, Supplement 1: San Antonio Breast Cancer Symposium 2007, abstract 72)
- Stern DF. 2000. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res*, 2 (3):176-183.
- Stern DF. 2003. ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res*, 284 (1):89-98.
- Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. 2008. 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*,
- Tsuda H, Akiyama F, Terasaki H, Hasegawa T, Kurosumi M, Shimadzu M, Yamamori S, Sakamoto G. 2001. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer*, 92 (12):2965-2974.
- Vanden Bempt I, Van Loo P, Drijkoningen M, Neven P, Smeets A, Christiaens MR, Paridaens R, De Wolf-Peeters C. 2008. Polysomy 17 in breast cancer: clinicopathologic significance and impact on HER-2 testing. *J Clin Oncol*, 26 (30):4869-4874.
- Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. 2007. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer*, 7:153.
- Vincent-Salomon A, Pierga JY, Couturier J, d'Enghien CD, Nos C, Sigal-Zafrani B, Lae M, Freneaux P, Dieras V, Thierry JP, Sastre-Garau X. 2007. HER2 status of bone marrow micrometastasis and their corresponding primary tumours in a pilot study of 27 cases: a possible tool for anti-HER2 therapy management? *Br J Cancer*, 96 (4):654-659.
- 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.
- Wulfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zanker KS, Kiesel L, Brandt B. 2006. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 12 (6):1715-1720.
- 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.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (2):127-137.
- Zidan J, Dashkovsky I, Stayerman C, Basher W, Cozacov C, Hadary A. 2005. Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. *Br J Cancer*, 93 (5):552-556.

9. Anhang

9.1 Ehrenwörtliche Erklärung

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

ich die Dissertation selbst 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 Professor Dr. med. Katharina Pachmann,

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, 29.12.2009

Anne-Kathrin Gellner