

**Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. mult. D. Wallwiener**

**Vergleich einer neuen RT-PCR-basierten Methode
zum Nachweis disseminierter Tumorzellen
im Knochenmark
von Mammakarzinompatientinnen
mit Immunzytochemie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Malgorzata Joanna Banys**

**aus
Wrocław (Breslau)**

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Frau Professor Dr. T. Fehm

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend

Meinen Großeltern

Halina, Stanisława und Kazimierz

gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden bisher veröffentlicht in:

Becker S, Becker-Pergola G, Banys M, Krawczyk N, Wallwiener D, Solomayer E, Schuetz C, Fehm T. Evaluation of a RT-PCR based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008 Sep 14. [Epub ahead of print]

Banys MJ, Krawczyk N, Becker S et al. Evaluation of a RT-PCR based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients. *Onkologie* 2008;31(suppl 1):101-148

Banys M, Dürr-Störzer S, Becker-Pergola G, Becker S, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Disseminated tumor cells in bone marrow of breast cancer patients - Comparison of immunocytochemistry and RT-PCR. 27. Deutscher Krebskongress, electronic version: <http://www.egms.de/en/meetings/dkk2006/06dkk209.shtml>

Becker S, Banys M, Krawczyk N et al. Evaluation of a RT-PCR based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients. *European Journal of Cancer Supplements* 2008;6(suppl 7): 61

Banys M, Krawczyk N, Becker S et al. Disseminated tumor cells in bone marrow of breast cancer patients – Comparison of immunocytochemistry and RT-PCR. 6th International Symposium On Minimal Residual Cancer, Hamburg 2007

Banys M, Becker S, Becker-Pergola G et al. Bestimmung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark - Vergleich von Immunzytochemie und RT-PCR. *Senologie* 2005;03 (lecture)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1. DAS MAMMAKARZINOM | 1 |
| 1.1.1. Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2. Risikofaktoren | 1 |
| 1.1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren | 2 |
| 1.1.4. Therapie des Mammakarzinoms | 3 |
| 1.1.4.1. Adjuvante Systemtherapie | 3 |
| 1.1.4.2. Neoadjuvante Therapie | 4 |
| 1.1.4.3. Radiotherapie | 4 |
| 1.1.4.4. Therapie des metastasierten Mammakarzinoms | 4 |
| 1.2. KLINISCHE BEDEUTUNG VON TUMORZELLDISSEMINATION | 4 |
| 1.2.1. Mammakarzinom als eine systemische Erkrankung | 4 |
| 1.2.2. Tumorzelldissemination | 5 |
| 1.2.3. Knochenmark als Indikator der hämatogenen Streuung | 6 |
| 1.2.4. Inzidenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und Blut von Mammakarzinompatientinnen | 6 |
| 1.2.5. Biologische Eigenschaften von disseminierten Tumorzellen | 7 |
| 1.2.5.1. Phänotypisierung von DTZ | 7 |
| 1.2.6. Prognostische Bedeutung der Tumorzelldissemination | 8 |
| 1.3. METHODEN ZUM NACHWEIS VON DISSEMINIERTEN TUMORZELLEN | 11 |
| 1.3.1. Anreicherung der Zellen | 11 |
| 1.3.2. Detektionssysteme | 11 |
| 1.3.2.1. Antikörper-basierte Detektionsmethoden | 12 |
| 1.3.2.2. Molekularbiologische Verfahren zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen | 15 |
| 1.4. PROBLEMSTELLUNG | 17 |
| 1.4.1. Etablierung eines RT-PCR-Assays zur Detektion von Tumorzellen | 17 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 20 |
| 2.1. PATIENTENKOLLEKTIV | 20 |
| 2.2. METHODEN | 20 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.1. | Knochenmarkaspiration..... | 20 |
| 2.2.2. | Immunzytochemie | 21 |
| 2.2.2.1. | Zytokeratine | 21 |
| 2.2.2.2. | Aufarbeitung der Knochenmarksuspension..... | 22 |
| 2.2.2.3. | Zytospin-Präparation..... | 24 |
| 2.2.2.4. | Immunzytochemische Färbung..... | 26 |
| 2.2.2.5. | Mikroskopische Auswertung am ACIS-System | 27 |
| 2.2.2.6. | Auswertungskriterien | 29 |
| 2.2.2.7. | Kontrollen..... | 30 |
| 2.2.3. | RT-PCR..... | 32 |
| 2.2.3.1. | Stabilisierung der mRNA..... | 32 |
| 2.2.3.2. | Isolierung der RNA..... | 32 |
| 2.2.3.3. | „One-Step“ RT-PCR..... | 35 |
| 2.2.4. | Statistik..... | 42 |
| 3. | ERGEBNISSE | 43 |
| 3.1. | KLINISCHE DATEN DER PATIENTINNEN..... | 43 |
| 3.1.1. | Altersverteilung..... | 43 |
| 3.1.2. | Klinisch-histologische Daten der primär operierten Patientinnen | 44 |
| 3.2. | ANALYSE DES KM-ASPIRATES MITTELS IMMUNZYTOCHEMIE | 46 |
| 3.2.1. | Anzahl der Zytokeratin-positiven Zellen..... | 48 |
| 3.2.2. | Immunzytochemische Befunde in unterschiedlichen Subkollektiven..... | 48 |
| 3.3. | ANALYSE DES KNOCHENMARKASPIRATES MITTELS RT-PCR | 50 |
| 3.3.1. | Korrelation mit klinisch-histologischen Daten..... | 50 |
| 3.4. | VERGLEICH DER RT-PCR MIT IMMUNZYTOCHEMIE | 52 |
| 3.4.1. | Korrelation der Positivitätsraten beider Methoden | 52 |
| 3.4.2. | Korrelation mit etablierten klinisch-histologischen Faktoren | 54 |
| 3.5. | EINSETZBARKEIT DER RT-PCR IN DER KLINISCHEN ROUTINEDIAGNOSTIK | 56 |
| 4. | DISKUSSION..... | 58 |
| 4.1. | PROBLEME DER DTZ-DETEKTION..... | 58 |
| 4.2. | RT-PCR-BASIERTE VERFAHREN | 61 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.2.1. | Voraussetzungen für eine effiziente Methode zur Detektion von disseminierten Tumorzellen | 61 |
| 4.2.2. | Kritische Punkte des Etablierungsprozesses | 62 |
| 4.2.2.1. | Auswahl des optimalen Markers | 64 |
| 4.2.2.2. | Anreicherung der Zellen..... | 66 |
| 4.2.2.3. | mRNA-Isolierung..... | 67 |
| 4.2.2.4. | Auswahl der geeigneten RT-PCR-Methode | 68 |
| 4.3. | EINSETZBARKEIT DER RT-PCR IN DER KLINISCHEN ROUTINEDIAGNOSTIK | 71 |
| 4.4. | KORRELATION BEIDER METHODEN | 72 |
| 4.4.1. | Positivitätsraten | 73 |
| 4.4.2. | Sensitivität des Tumorzellnachweises | 74 |
| 4.4.3. | Diskordante Befunde..... | 75 |
| 4.4.3.1. | Illegitime Transkription | 77 |
| 4.4.3.2. | Pseudogene..... | 78 |
| 4.4.3.3. | Kontamination mit epithelialen Zellen | 79 |
| 4.5. | KORRELATION MIT ETABLIERTEN KLINISCH-HISTOLOGISCHEN FAKTOREN | 79 |
| 4.5.1. | Tumorzell dissemination und neoadjuvante Therapie | 80 |
| 4.5.2. | Tumorzell dissemination und klassische klinisch-histologische Faktoren | 81 |
| 4.6. | KORRELATION MIT FOLLOW-UP | 83 |
| 4.7. | SCHLUSSFOLGERUNGEN..... | 85 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 86 |
| 6. | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 89 |
| 7. | TABELLENVERZEICHNIS | 91 |
| 8. | APPENDIX – VERWENDETE MATERIALIEN..... | 93 |
| 9. | LITERATURVERZEICHNIS..... | 95 |
| | DANKSAGUNG..... | 108 |
| | LEBENS LAUF..... | 110 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| AK | Antikörper |
| APAAP | Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase |
| CK | Zytokeratin |
| DFS | Krankheitsfreies Überleben (disease-free survival) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTZ | Disseminierte Tumorzellen |
| EpCAM | Epitheliales Zelladhäsionsmolekül |
| ER | Östrogenrezeptor |
| FisH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| FRET | Fluoreszenzresonanz-Energietransfer |
| HER-2/neu | Human epidermal growth factor receptor 2 |
| hMAM | Humanes Mammaglobin |
| ICC | Immunzytochemie |
| ISHAGE | International Society of Hematotherapy and Graft Engineering |
| KM | Knochenmark |
| MGPs | Magnetische Glaspartikel |
| MNC | Mononukleäre Zellen (mononuclear cells) |
| OS | Gesamtüberleben (overall survival) |
| PB | Peripheres Blut |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PR | Progesteronrezeptor |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion |
| SMPs | Streptavidin-markierte Magnetpartikel |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| uPA | Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp |
| uPA-R | Rezeptor des Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp |
| ZTZ | Zirkulierende Tumorzellen |

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist in Deutschland und in den anderen Industrieländern die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau (¹²²). Derzeit muss jede zehnte Frau damit rechnen im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom zu entwickeln.

Schätzungen der Dachdokumentation Krebs des Robert Koch Instituts gehen von jährlich 55.000 Brustkrebsneuerkrankungen in Deutschland aus. Brustkrebs hat damit einen Anteil von 27% bei den Krebsneuerkrankungen der Frauen und ist im Alter von 40 bis 50 Jahren die häufigste Krebsneuerkrankung. Die Zunahme der Inzidenz ist vermutlich in großem Maße auf die intensivierten Screeningprogramme der meisten westlichen Länder zurückzuführen.

Auch bei der Krebssterblichkeit belegt Brustkrebs mit 27 Todesfällen pro 100.000 Einwohner den ersten Rang bei den Frauen. Im Jahr 2005 verstarben laut Todesursachenstatistik der Gesundheitsberichterstattung des Bundes 17.475 Frauen an Brustkrebs. Bei steigender Inzidenz zeigte die absolute Mortalität der Patientinnen mit Mammakarzinom in der letzten Dekade jedoch eine fallende Tendenz um 20 bis 30% (¹⁶). Diese Beobachtung wird insbesondere auf Fortschritte in der adjuvanten Therapie und – in geringerem Maße – auf Durchführung der Früherkennungsuntersuchungen zurückgeführt.

1.1.2. Risikofaktoren

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist weitgehend unbekannt. Heutzutage wird angenommen, dass bei der Krankheitsentstehung viele verschiedene Einflüsse gemeinsam mitbeteiligt sind. In der Literatur wird auf eine Reihe von Risikofaktoren eingegangen. Zu den etablierten gehören das Alter, hormonelle Situation, benigne Brusterkrankungen und die genetische Disposition (Mutation

der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2). Aber auch zivilisatorische Faktoren wie Alkoholkonsum, Rauchen, Diät, geringe körperliche Aktivität und Strahlenbelastung werden als Risikofaktoren diskutiert (¹⁶, ¹). Tab. 1 zeigt eine Übersicht von etablierten Risikofaktoren (⁷).

Tab. 1. Etablierte Risikofaktoren (⁷)

| Risikofaktor | Relatives Risiko |
|--|------------------|
| Alter (≥ 50 Jahre vs. < 50 Jahre) | 6,5 |
| Familiäre Belastung (Verwandschaft ersten Grades) | 1,4 – 13,6 |
| Gutartige Brusterkrankung: atypische Hyperplasie | 4,0 – 4,4 |
| Alter bei Menopause (≥ 55 Jahre vs. < 55 Jahre) | 1,5 – 2,0 |
| Gutartige Brusterkrankung: Biopsie (mit jedem histol. Befund) | 1,5 – 1,8 |
| Familiäre Belastung (Verwandschaft zweiten Grades) | 1,5 – 1,8 |
| Alter bei erster Lebendgeburt (> 30 Jahre vs. < 20 Jahre) | 1,3 – 2,2 |
| Alter bei Menarche (< 12 Jahre vs. ≥ 14 Jahre) | 1,2 – 1,5 |
| Hormonersatztherapie | 1,0 – 1,5 |

1.1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren

Die Prognosefaktoren haben das Ziel, den Verlauf der Erkrankung individuell abzuschätzen. Sie unterscheiden sich von prädiktiven Faktoren, die ein Therapieansprechen vorhersagen.

Zu den weltweit anerkannten („klassischen“) Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz gehören das Ausbreitungsstadium des Tumors (TNM-Klassifikation), der histopathologische Typ, Grading und Hormonrezeptorstatus. Weitere Kriterien berücksichtigen morphologische, biochemische, zellkinetische und genetische Aspekte. Dazu gehören andere tumorassoziierte Proteolysefaktoren (Kathepsine, Matrixmetalloproteinasen), zellkinetische Marker (S-Phase, Ploidie, Ki-67, MIB1, Proliferating Cell Nuclear Antigen) und

Genexpressionsprofile/ Microarrays. Ihre Validierung in klinischen Studien steht noch aus.

Nach heutigem Kenntnisstand werden folgende Faktoren als evidenz-basierte prädiktive Faktoren betrachtet: Östrogen-/Progesteronrezeptorstatus und HER-2/neu-Status.

1.1.4. Therapie des Mammakarzinoms

Die Behandlung des Mammakarzinoms ist heutzutage durch ein individualisiertes Vorgehen gekennzeichnet. Möglichst früh wird ein Gesamtkonzept erarbeitet, zu dem nicht nur die Operation, sondern auch eine Chemo-, Hormon- oder Antikörpertherapie und eventuell die Bestrahlung gehören. Brusterhaltende Therapie ist bei angemessener Indikation und Technik der eingeschränkt radikalen Mastektomie sowohl in Bezug auf Rezidivfreiheit sowie auf Überlebenszeit gleichzusetzen⁽⁶⁴⁾. Standard der brusterhaltenden Behandlung ist die Kombination von Tumorexzision mit Sentinel-Lymphknoten-Biopsie oder Axilladissektion und Bestrahlung des Restparenchyms⁽¹⁴²⁾. Bei vorliegenden Kontraindikationen ist die modifiziert radikale Mastektomie Therapie der Wahl.

1.1.4.1. Adjuvante Systemtherapie

Große Metaanalysen unterstreichen die Bedeutung der postoperativen Systemtherapie für die Senkung der Rezidivraten und Todesfälle⁽⁴⁴⁾. Die aktuellen Empfehlungen richten sich nach den Ergebnissen der Konsensus-Konferenzen zur Therapie des frühen Brustkrebs von St.Gallen⁽⁴⁵⁾ und den Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie⁽⁶⁾ und beinhalten Chemo- und Hormontherapie. Darüber hinaus hat sich der monoklonale humanisierte Antikörper Trastuzumab in der metastasierten Situation ausgezeichnet bewährt und wird im Rahmen großer Studien als adjuvante Therapie eingesetzt^(125, 130). Eine weitere Therapieoption in der adjuvanten Situation stellen Bisphosphonate dar^(111, 42).

1.1.4.2. Neoadjuvante Therapie

Die neoadjuvante, oder primär systemische Therapie, wird vor Durchführung der operativen Maßnahmen verabreicht. Als etablierte Indikationen gelten das inflammatorische und das primär weit fortgeschrittene Mammakarzinom, welches zunächst als nicht sinnvoll operabel beurteilt wird.

1.1.4.3. Radiotherapie

Der Brustkrebs im frühen Stadium ohne Risikofaktoren kann durch eine operative Therapie mit anschließender Radiotherapie geheilt werden. Eine lokoregionäre Nachbestrahlung nach brusterhaltender Therapie ist in jedem Fall erforderlich (¹⁴³). Die Indikationen zur postoperativen Radiotherapie wurden von der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, sowie in der interdisziplinären S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms festgelegt (⁸⁷).

1.1.4.4. Therapie des metastasierten Mammakarzinoms

Der metastasierte Brustkrebs gilt als nicht heilbare Erkrankung. Die Behandlung setzt sich aus der hormonellen, zytostatischen und/oder Antikörperbasierten Therapie und Bisphosphonaten bei ossären Metastasen zusammen. Einzig bei Mammakarzinompatientinnen mit langem therapiefreien Intervall, isolierter hepatischer bzw. pulmonaler Metastasierung, gutem Allgemeinzustand und Möglichkeit der R0-Resektion scheint die hepatische bzw. pulmonale Metastasektomie in Einzelfällen eine Therapieoption darzustellen.

1.2. Klinische Bedeutung von Tumorzelldissemination

1.2.1. Mammakarzinom als eine systemische Erkrankung

Die Mehrzahl der Krebsneuerkrankungen und der dadurch bedingten Todesfälle in den westlichen Industrieländern wird durch maligne epitheliale Tumoren verursacht. Studien mit langer Nachbeobachtungszeit konnten zeigen, dass ca. 30% der Patientinnen mit Mammakarzinom, die sich einer chirurgischen

Therapie unterzogen und bei denen keine Metastasen in den axillären Lymphknoten oder an anderer Stelle zum Zeitpunkt der Operation nachgewiesen wurden, trotzdem mit einer Reaktivierung der Erkrankung in Form eines Rezidivs oder einer Fernmetastasierung rechnen müssen^(28, 88, 75). Diese Beobachtung legt nahe, dass einzelne Tumorzellen außerhalb der Brust persistieren und sich dem adjuvanten Therapieregime entziehen können^(73, 90). Aus diesem Grund wird das Mammakarzinom zunehmend als eine systemische Erkrankung angesehen, die ein alleiniger lokaler bzw. regionärer Therapieansatz nicht bewältigen kann.

Es bleibt weitgehend ungeklärt, welche Faktoren zur Entstehung von Metastasen jahrelang nach erfolgreich abgeschlossener Primärtherapie führen. Trotz allgemein anerkannter klinisch-pathologischer prognostischer Marker, die sowohl die TNM-Klassifikation, als auch Differenzierung und biologische Faktoren berücksichtigen, ist eine zuverlässige Abschätzung des individuellen Rezidivrisikos heutzutage nicht möglich. Aus diesem Grund ist die Suche nach neuen prognostischen und prädiktiven Faktoren von höchster Bedeutung, was eine weitere Unterteilung der Patientinnen in Subkollektive mit individuell angepassten Therapiestrategien ermöglichen würde.

1.2.2. Tumorzell dissemination

Fehlender Nachweis von Lymphknotenmetastasen ist einer der wichtigsten unabhängigen prognostischen Marker. Trotzdem bleiben nicht alle nodal-negativen Patientinnen metastasenfrei. Diese Tatsache führt zu der Annahme, dass in solchen Fällen ein anderer Ausbreitungsweg der Tumorzellen als über die Lymphbahn vorhanden war.

Hämatogene Tumorzell dissemination gilt als ein wichtiger Schritt im komplexen Prozess der Metastasierung. Nach Invasion in ein Gefäß geht der Großteil der Tumorzellen durch mechanische Kräfte und Immunabwehrfaktoren zugrunde. Die Adhäsion an der Gefäßwand ist Voraussetzung für die weitere Ausbreitung.

Nach Emigration aus dem Gefäß liegen die Zellen als isolierte disseminierte Tumorzellen vor.

1.2.3. Knochenmark als Indikator der hämatogenen Streuung

Als Indikator hämatogener Streuung gilt der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im peripheren Blut oder im Knochenmark. Bereits im Jahr 1889 beschrieb Paget einen Zusammenhang zwischen Mammakarzinom und dem Auftreten von Knochenmetastasen ⁽¹⁰⁰⁾. Die Theorie der hämatogenen Streuung wurde 1936 durch Nachweis von metastatischen Zellen im Knochenmark unterstützt ⁽¹¹⁵⁾.

Das Knochenmark stellt aus verschiedenen Gründen ein Kompartiment zur Suche nach Anzeichen einer generalisierten Erkrankung dar. Die Vorteile der Detektion im Knochenmark liegen einerseits in der relativ leichten Zugänglichkeit und der Möglichkeit, zu verschiedenen Zeitpunkten Material zu gewinnen (Repunktionen), andererseits in der gesicherten prognostischen Relevanz von DTZ im Knochenmark (Level-1-Evidenz, ³¹). In der aktuellen TNM-Klassifikation wird der morphologische und nicht-morphologische Nachweis von DTZ im KM berücksichtigt ^(126, 127, 67). Einige Studien weisen zwar darauf hin, dass zirkulierende Tumorzellen (ZTZ) im Blut mit verkürzter Überlebenszeit assoziiert sein können, allerdings gilt diese Beobachtung nur für ein metastasiertes Kollektiv ⁽³⁸⁾. Anhand von FisH- (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung-) Analysen wurde gezeigt, dass ZTZ eindeutig maligne sind ^(53, 51). Welche prognostische Bedeutung dem Nachweis zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut von nicht-metastasierten Patientinnen zukommt, bleibt unklar ^(110, 139, 153, 154, 136).

1.2.4. Inzidenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und Blut von Mammakarzinompatientinnen

Die von verschiedenen Forschungsgruppen berichtete Inzidenz der DTZ im Knochenmark variiert zwischen 10% und 43% aller Mammakarzinompatientinnen. Im peripheren Blut konnten bei 25-71% epitheliale Zellen

nachgewiesen werden (^{5, 12, 110, 60, 68, 149, 27, 80, 46, 140}). Die Positivitätsraten können aufgrund der unterschiedlichen Methodik und des Patientenkollektivs nicht direkt miteinander verglichen werden. Mehrere Studien konnten bis jetzt belegen, dass der Nachweis von Tumorzellen mit der Tumorlast wie z. B. Tumorgröße und Lymphknotenstatus korreliert (^{88, 41, 97, 148}). Eine im Jahr 2005 durchgeführte Metaanalyse von über vier Tausend Patientinnen demonstrierte eine signifikante Korrelation zwischen Vorhandensein von DTZ und Alter, Menopausalstatus, Tumorgröße, Nodalstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus und histologischem Tumortyp (³¹).

1.2.5. Biologische Eigenschaften von disseminierten Tumorzellen

1.2.5.1. Phänotypisierung von DTZ

Das metastatische Potential der DTZ scheint zu differieren. Diagnostisch und therapeutisch ist wichtig, welche Unterschiede zwischen disseminierten Tumorzellen bestehen und diesen Selektionsvorgang beeinträchtigen. Zur weitergehenden Charakterisierung mittels Doppelfärbungen werden verschiedene Antikörper gegen z. B. Proliferationsmarker, Wachstumsrezeptoren, Adhäsionmoleküle oder Proteasen verwandt.

Die Frage nach dem Proliferationsverhalten der disseminierten Zellen ist heutzutage noch nicht ausreichend geklärt. Manche Studien konnten zeigen, dass die DTZ nur zu einem geringen Anteil Proliferationsmarker Ki-67 und p120 exprimieren (¹⁰⁶). Aus diesem Grund ist eine gegen sich teilende Zellen gerichtete Chemotherapie zur kompletten Eliminierung von DTZ nicht geeignet (^{15, 29}). Diese Beobachtung erklärt auch die z. T. sehr lange Latenz bis zum Auftreten klinisch manifester Metastasen. Ob die epithelialen Zellen im Knochenmark sich tatsächlich jahrelang im Ruhezustand befinden oder ob der Proliferationsprozess kontinuierlich, aber sehr langsam, stattfindet, ist noch unklar.

Durch Doppelfärbungen wurde eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I Oberflächenantigenen festgestellt, was eine Erklärung für das lange vom

Immunsystem unbehelligte Überleben dieser Zellen im Knochenmark bietet⁽¹⁰⁷⁾. DTZ weisen eine niedrige Östrogenrezeptor(ER)-Expression auf, die möglicherweise das Phänomen des Nicht-Ansprechens auf Hormontherapie trotz ER-positiven Primärtumors erklärt⁽⁵⁵⁾.

Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) mit seinem entsprechenden membranständigen Rezeptor (uPA-R), Kathepsin D und EMMPRIN (extrazelluläres Matrixmetalloproteaseinducer Protein) gelten als Marker für Invasivität, da sie eine Rolle bei der Auflösung der extrazellulären Matrix spielen. Isolierte Tumorzellen müssen über eine hohe Proteaseaktivität verfügen, um Matrixproteine und Basalmembranstrukturen zu degradieren^(133, 135, 113). Auch das Zellkontakt-vermittelnde E-Cadherin korreliert mit der Fähigkeit zur Metastasenbildung im Knochenmark und wird auf DTZ von Mammakarzinompatientinnen häufig exprimiert⁽⁵⁹⁾.

In den letzten Jahren war der Nachweis des Wachstumsfaktorrezeptors Her-2/neu sowie des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM von großem Interesse. Diese Marker sind vor allem von Bedeutung, da bereits Antikörperbasierte zielgerichtete Therapieoptionen wie z. B. Trastuzumab (Herceptin®) oder Edrecolomab (Panorex®) eingesetzt werden können^(132, 66).

1.2.6. Prognostische Bedeutung der Tumorzell dissemination

Zahlreiche Studien zeigten in univariaten Überlebensanalysen, dass Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und positivem Knochenmarksbefund ein sowohl signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben als auch Gesamtüberleben im Gegensatz zu knochenmarksnegativen Patientinnen aufweisen^(134, 30, 41, 88, 27). 2005 wurde eine Metaanalyse aus den bislang publizierten großen Studien erstellt, die das Follow-Up von über 4700 Patientinnen erfasst⁽³¹⁾. Diese Daten belegen mit Level-1-Evidenz, dass der Nachweis von DTZ im Knochenmark die Prognose – sowohl hinsichtlich des Gesamtüberlebens als auch des krankheitsfreien Überlebens – beeinträchtigt und als ein unabhängiger Risikofaktor betrachtet werden sollte. Trotzdem

erleiden auch im Langzeitverlauf nicht alle Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus eine Fernmetastasierung (^{31, 62, 88}). Aufgrund dieser Daten und experimenteller Tierversuche wird angenommen, dass die DTZ nach operativer Entfernung des Primärtumors bei einem Teil der Patientinnen aus dem Blut und Knochenmark eliminiert werden bzw. absterben (⁵⁷). Manche Studien weisen darauf hin, dass der Knochenmark-Status möglicherweise zum Therapie-Monitoring beitragen könnte (⁴⁸). Die jahrelange Persistenz der Tumorzellen im Blut oder Knochenmark wird als Phänomen des Tumorzellschlafs oder „Tumor cell dormancy“ beschrieben (^{73, 90}). Die unterschiedlichen Schicksale disseminierter Tumorzellen werden in der Abb. 1 dargestellt.

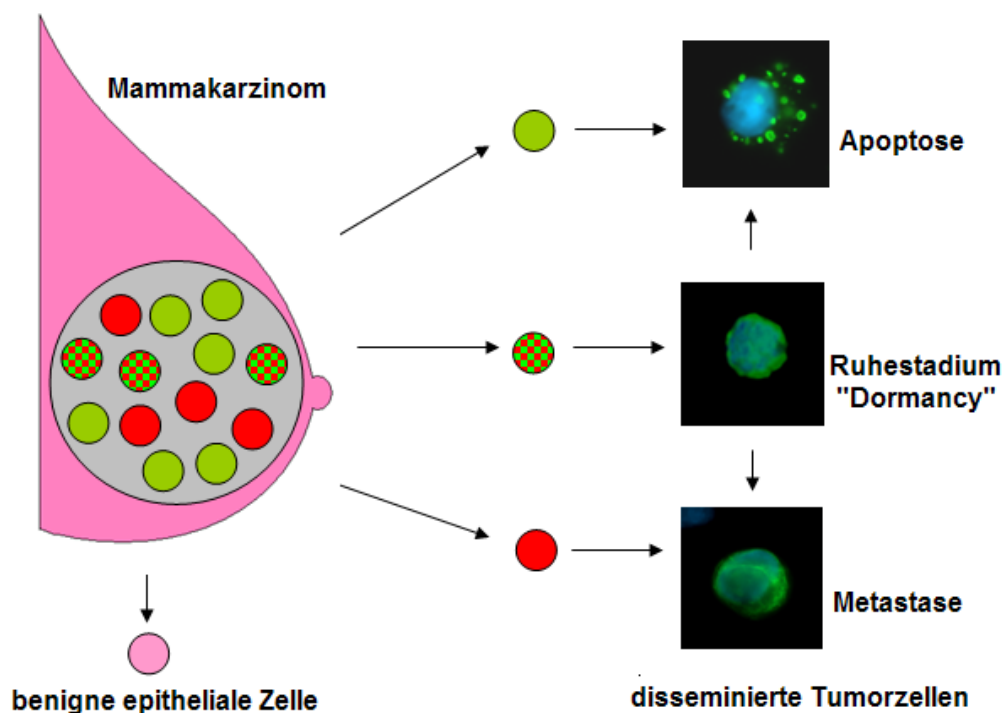


Abb. 1. „Schicksale“ disseminierter epithelialer Zellen von Mammakarzinompatientinnen (mod. nach: Fehm, Onkologie 2006, ⁴⁷)

Der morphologische Nachweis von DTZ im Knochenmark wird in der aktuellsten TNM-Klassifikation als pM0(i+) berücksichtigt (^{67, 126, 127}). Falls die verwendete

Methode keine morphologische Beurteilung ermöglicht, wie z. B. molekularbiologische Verfahren, wird der Befund als pM0(mol+) dokumentiert. Es wird auf den Unterschied zwischen einer Mikrometastase und isolierten Tumorzellen (ITN) hingewiesen (Tab. 2).

Die prognostische Bedeutung von epithelialen Zellen im Blut bleibt nach wie vor unklar (^{139, 153, 110, 154, 136}). Die vorliegenden Studien beschränken sich vor allem auf ein metastasiertes Patientenkollektiv. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von mehr als 5 Tumorzellen im Blut mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ist (³⁸).

Tab. 2. *Isolierte Tumorzellen vs. Mikrometastasen (von: Hermanek et al., ⁶⁷)*

| | Isolierte (disseminierte oder zirkulierende) Tumorzellen | Mikrometastasen (okkulte Metastasen) |
|--|---|---|
| Größe | Einzelne Tumorzellen oder kleine Zell-Cluster | ≤0,2 cm im größten Durchmesser |
| Kontakt mit Gefäß oder Sinuswand des Lymphknotens | Nein | Ja |
| Extravasation (Invasion und Penetration des Gefäßes oder der Sinuswand des Lymphknotens) | Nein | Ja |
| Extravaskuläre (extrasinusoidale) stromale Reaktion | Nein | Meistens ja |
| Extravaskuläre (extrasinusoidale) Tumorzellproliferation | Nein | Ja |

1.3. Methoden zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen

1.3.1. Anreicherung der Zellen

Ein bedeutendes Problem beim Nachweis von DTZ in Knochenmark oder ZTZ im Blut ist deren geringe Anzahl. Durchschnittlich weisen Karzinompatientinnen nur ca. 10 Tumorzellen pro 1 ml Blut auf (¹⁰²). Unabhängig davon, welche Detektionsmethode gewählt wurde, stehen zahlreiche Verfahren zur Anreicherung der Tumorzellen zur Verfügung. Die Dichtegradientenzentrifugation beruht auf der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit der Blutbestandteile. In den meisten Studien wird zur Isolierung der epithelialen Zellen diese Separationsmethode ausgewählt (^{54, 110, 20, 60}). Des Weiteren werden immunomagnetische Anreicherungsverfahren eingesetzt. Hier unterscheidet man zwei Methoden, die positive und negative Selektion. Im Rahmen der positiven Selektion werden disseminierte Tumorzellen mit magnetischen Partikeln („Beads“) gegen Zytokeratine oder epitheliale Membranantigene (z. B. EpCAM, HEA) markiert und anschließend mit einem Magneten von der Lösung getrennt (^{68, 84}). Die negative Selektion hingegen beruht auf der Verwendung von Antikörpern gegen Leukozytenantigene (z. B. CD45). Auf diese Weise können CD45-negative Tumorzellen abgetrennt und in Kultur gebracht werden (¹⁵⁹).

1.3.2. Detektionssysteme

Derzeit gibt es zwei grundlegenden Methoden zum Nachweis von DTZ. Zum einen werden Antikörper-basierte Verfahren (Immunzytochemie, Immunfluoreszenz, Flowzytometrie), zum anderen molekularbiologische Methoden (PCR, RT-PCR, In-Situ-Hybridisierung) eingesetzt (⁵⁴). Die einzelnen Verfahren werden in Tab. 3 und Abb. 2 erklärt.

Tab. 3. Methoden zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen

| Antikörper-basierte Verfahren | |
|---------------------------------------|---|
| Immunzytochemie | Anfärbung von Zielproteinen mit Farbstoff-markierten Antikörpern |
| Immunfluoreszenz | Diagnostische Methode aus dem Bereich der Immunhistochemie, bei der Fluoreszenz-Farbstoff-konjugierte Antikörper eingesetzt werden |
| Flowzytometrie | Inkubation der Zellsuspension mit Antikörpern gegen Leukozytenantigene/epitheliale Antigene und anschließende Messung von Signalen an einem gebündelten Lichtstrahl |
| Molekularbiologische Verfahren | |
| PCR | Nachweis von DNA-Sequenzen mit Hilfe des Enzyms Polymerase |
| RT-PCR | Nachweis von spezifischen RNA-Sequenzen. Umschreibung von RNA in cDNA mit Reverser Transkriptase und anschließende PCR |
| FisH | Nachweis von Chromosomenaberrationen mit Hilfe Fluoreszenz-markierter DNA-Sonden |

1.3.2.1. Antikörper-basierte Detektionsmethoden

Immunzytochemie

Die Immunzytochemie ist der Goldstandard zum Nachweis von DTZ. Die Mehrheit der Studien, die sich mit dem Thema der Tumorzell-dissemination im Knochenmark befassen, verwendet eine immunzytochemische Detektion von Zytokeratinen als Methode der Wahl.

Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern (AK) zu einem bestimmten Epitop. Bei der direkten Methode wird das zu untersuchende Antigen mit einem spezifischen Antikörper zusammengebracht, der direkt mit einem Enzym oder Fluorochrom konjugiert ist. Heutzutage wird oft die indirekte Methode bevorzugt. Bei diesem Verfahren wird zunächst ein Primärantikörper an entsprechendes Epitop gebunden. In einem zweiten Schritt werden auf die Zellen/Gewebe die mit einem Enzym gekoppelten Sekundär-AK aufgebracht, die sich gegen den Primär-AK richten. Durch die Enzym-Substrat-Reaktion entsteht ein sichtbarer Farbstoff.

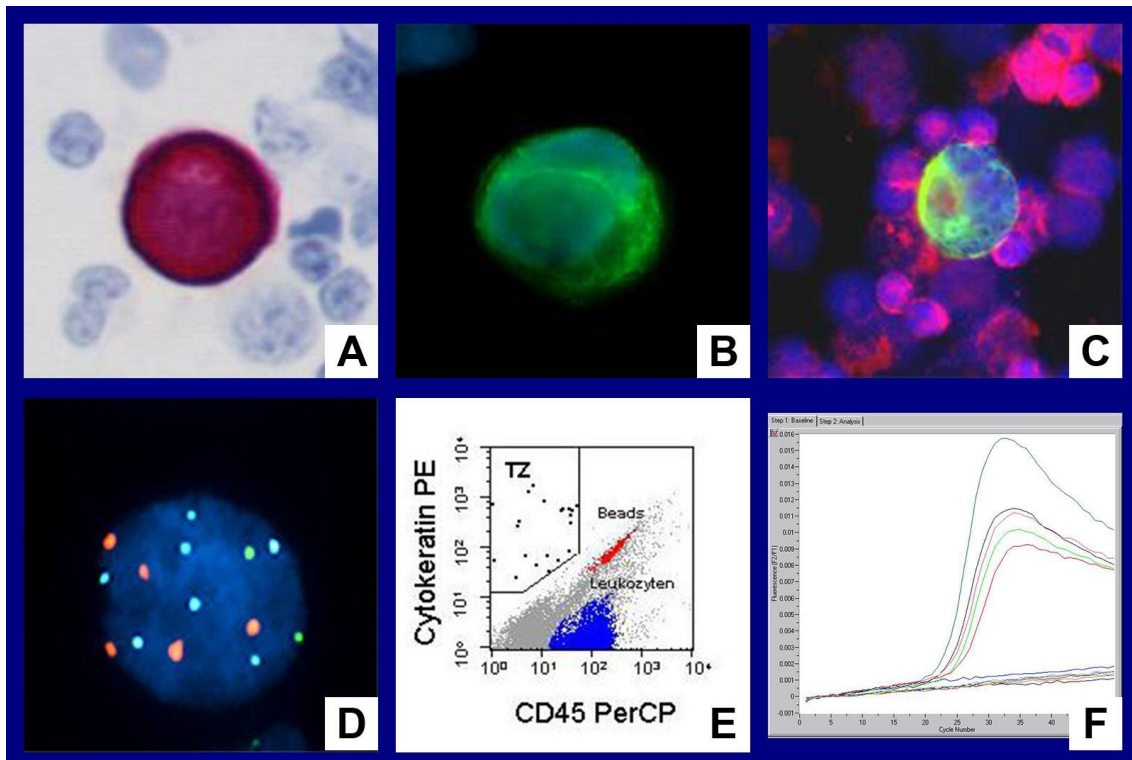


Abb. 2. Nachweis von disseminierten Tumorzellen über verschiedene Detektionsverfahren:

- (A) Immunzytochemisch gefärbte Tumorzelle (Anti-Zytokeratin(CK)-Antikörper(AK))
- (B) Immunfluoreszenz gefärbte Tumorzelle (Anti-CK-AK)
- (C) Immunfluoreszenz, Doppelfärbung (Anti-CK-AK: grün, Leukozytenmarker: Anti-CD45-AK: rosa)
- (D) Fluoreszenz-markierte DNA-Sonden in der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
- (E) Signale der Zellsuspension bei der Flowzytometrie
- (F) Amplifikationskurven der RT-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die APAAP-Methode verwendet, die ihren Namen vom Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex ableitet. Wie in Abb. 3 dargestellt, fungiert bei der APAAP-Methode ein fertig löslicher Immunkomplex, bestehend aus anti-Alkalische Phosphatase Antikörpern mit Alkalische Phosphatase-Molekülen, als Nachweisreagenz. Der Sekundär-AK wird als Brücke zwischen Primär-AK und APAAP-Komplex eingesetzt, der hier nach dem Sekundär-AK aufgetragen wird. Anschließend

wird durch eine Enzym-Substrat-Reaktion eine Färbung zum sichtbaren Nachweis erreicht. Diese Methode zeigt erhöhte Sensitivität und geringere Hintergrundanfärbung als die direkte Immunzytochemie.

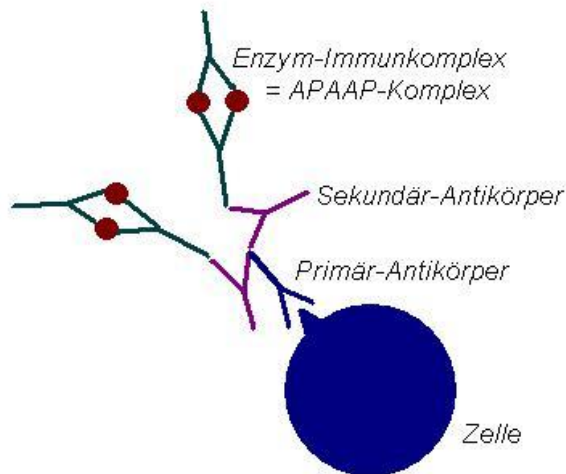


Abb. 3. Prinzip der APAAP-Methode

Immunzytochemie ist der Goldstandard zum Nachweis von DTZ. Der zweifelsfreie Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit einer morphologischen Beurteilung. Auf diese Weise können falsch-positiv angefärbte hämatopoetische Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Im Jahr 2006 wurden von Fehm *et al.* Konsensusempfehlungen eines internationalen Experten-Panels zum immunzytochemischen Nachweis von DTZ veröffentlicht⁽⁵⁰⁾. Grundlage für die Identifikation der Tumorzellen sind zum einen die Zytokeratin-Färbung, zum anderen die morphologischen Kriterien der ISHAGE sowie des Konsensus zur Tumorzelldetektion (Tab. 5, S. 29).

Der immunzytochemische DTZ-Nachweis ist allerdings mit Schwierigkeiten behaftet. Obwohl mehrere Kriterien, wie die Morphologie der Zellen oder der Anfärbungstyp zur Einordnung als Tumorzelle angewendet werden, kann die Möglichkeit einer fehlerhaften Einordnung der Zellen nicht komplett ausgeschlossen werden. Diese Problematik wurde im Rahmen eines Ringversuches der International Society of Hematotherapy and Graft

Engineering (ISHAGE) untersucht (²²). Die Beurteilung derselben Knochenmarkaspirate lieferte je nach Zentrum unterschiedliche Ergebnisse. Trotz definierter Kriterien ist die zweifelsfreie Identifikation von Tumorzellen bedingt durch Falschpositivität bzw. unspezifische Anfärbung hämatopoetischer Zellen erschwert. In Anbetracht dieser Problematik scheint die Suche nach alternativen Verfahren zur Detektion von DTZ wünschenswert.

1.3.2.2. Molekularbiologische Verfahren zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen

Neben den Antikörper-basierten Detektionsmethoden stehen molekularbiologische Verfahren zur Verfügung (^{8, 21}). Bisherige Studien konnten zeigen, dass DTZ von Mammakarzinompatientinnen häufig Mutationen von Onko- und Tumorsuppressorgenen aufweisen, es wurden aber bis jetzt keine Mammakarzinom-spezifischen genetischen Alterationen identifiziert, die alle Zellen betreffen (¹⁰⁸). Aus diesem Grund wird die RT-PCR zum Nachweis von zellulärer mRNA bevorzugt. Hierbei wird epithel- oder gewebspezifische mRNA amplifiziert (^{40, 138, 161}).

Im nachfolgenden Kapitel werden die grundlegenden Kenntnisse über die molekularbiologischen Techniken vermittelt.

Prinzipien der molekularbiologischen Diagnostik

Grundlage der RT-PCR ist zunächst die PCR. Diese Methode ist eine der empfindlichsten biologischen Techniken überhaupt. Die PCR beruht auf einer enzymatischen in-vitro Replikation einer Zielsequenz mit Hilfe hochspezifischer Primer und auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten: Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung. Durch die ständige Wiederholung dieser drei Schritte verdoppelt sich jedes Mal die Anzahl an kopierten DNA-Molekülen, so dass aus einem DNA-Strang nach zwanzig Zyklen etwa eine Million Moleküle entstehen, die anschließend mit traditionellen Methoden nachgewiesen werden können.

Klassische RT-PCR

Um die Transkription eines Gens zum Zeitpunkt der RNA-Isolation nachzuweisen, muss die abgelesene RNA untersucht werden. Bei der Amplifikation von DNA durch die Polymerasekettenreaktion werden spezifische DNA-abhängige DNA-Polymerasen verwendet, die nicht in der Lage sind, RNA zu amplifizieren. Daher muss der erste Schritt die Umschreibung der mRNA in cDNA sein. Dies erfolgt mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase (RT). Die cDNA kann im Anschluss als Ausgangsmaterial in einer klassischen PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. In der „klassischen“ PCR-Methode wird das PCR-Produkt anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese anhand seiner Größe und somit unterschiedlicher Wandergeschwindigkeit identifiziert.

Real-time RT-PCR

Die *real-time* RT-PCR erlaubt hingegen eine Quantifizierung in Echtzeit des RT-PCR-Produktes über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen am Ende oder während eines Zyklus. Zum Ansatz wird eine spezifische TaqManTM-Sonde, ein interkalierender fluoreszierender Farbstoff (z. B. SYBR-Green) oder – wie in dieser Arbeit – eine auf der FRET-Technologie (Fluoreszenzresonanz-Energietransfer) basierende Hybridisierungssonde zugegeben. Dadurch ist es möglich, die Menge der amplifizierten RT-PCR-Produkte im Verlauf der RT-PCR zu bestimmen und somit Rückschlüsse auf die Menge der im Material vorhandenen mRNA zu ziehen.

PCR-Produkte werden somit in Echtzeit durch direkte Visualisierung am Monitor während der Amplifikationsphase detektiert. Sie können anschließend qualitativ oder relativ und absolut quantitativ ausgewertet werden. Somit entfällt die Elektrophoresetechnik, die ohnehin weitaus weniger sensitiv als die *real-time* PCR ist, und aufwändige Aufarbeitung des Agarosegels zur Detektion und Verifikation der entstandenen Endprodukte der PCR beinhaltet.

1.4. Problemstellung

Die Tumorzell dissemination im Knochenmark gilt als Beweis einer minimalen residualen Tumorerkrankung und ist mittlerweile als ein unabhängiger prognostischer Faktor anerkannt. Da der Tumor im Rahmen von operativen Maßnahmen komplett entfernt werden kann, wird die Eliminierung von DTZ zu einem idealen Ziel der systemischen Therapie. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, die Nachweismethoden der DTZ weiterhin zu optimieren.

Methode der Wahl ist heutzutage die immunzytochemische Detektion mittels Zytokeratin-Antikörper. Die zweifelsfreie Einordnung der Zellen als Tumorzellen bereitet Schwierigkeiten. Zwar wird die Morphologie der Zellen berücksichtigt, dennoch bleibt der Nachweis weitgehend subjektiv. Diese Beobachtung und methodologische Unterschiede erklären die zum Teil sehr variierenden Inzidenzen von DTZ. Ein anderes Problem stellt eine gewisse Falschpositivität der Gesunden und Patienten mit benignen Erkrankungen dar. In Anbetracht dieser Problematik erscheint die Suche nach alternativen oder ergänzenden Methoden wünschenswert.

1.4.1. Etablierung eines RT-PCR-Assays zur Detektion von Tumorzellen

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein RT-PCR-basiertes Verfahren zum Nachweis disseminierter Tumorzellen etabliert ⁽¹⁴⁾. Im Rahmen zahlreicher Vorexperimente wurden folgende Fragestellungen geklärt: Wahl des optimalen Markers, eventuelle Anreicherung der Tumorzellen, geeignete RNA-Isolierung und Wahl der optimalen RT-PCR-Methode. In den Vorversuchen wurden unterschiedliche Anreicherungsmethoden und RNA-Isolierungsmethoden am Modell einer Verdünnungsreihe mit MCF-7-Zellen verglichen. Im nächsten Schritt wurde die Wichtigkeit des Zeitfaktors bei RT-PCR-Analysen am Modell von 15 Positivkontrollen evaluiert, die zu unterschiedlichen Zeiten nach Probenabnahme analysiert wurden ⁽¹⁴⁾.

Das Verfahren wurde als „One-Step“ *real-time* RT-PCR durchgeführt und beruhte auf der Amplifikation von Zytokeratin 19-mRNA. In den Vor-experimenten mit Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen mit hoher Sensitivität und Spezifität detektiert werden (Tab. 4). Die ausführliche Erklärung der Methodik und die detaillierte Vorgehensweise werden im Kapitel 2.2.3 erläutert.

Tab. 4. Vergleich der Immunzytochemie mit dem neu etablierten RT-PCR-basierten Verfahren zum DTZ-Nachweis

| | Immunzytochemie | RT-PCR |
|--------------------------------|--|---|
| Zielantigen / Ziel-mRNA | CK 8, 18, 19 | CK19-mRNA |
| Target | Protein, stabil | mRNA, instabil |
| Sensitivität | 1-5 Zellen pro 10 ⁶ MNC | 5 Zellen pro 10 ⁶ MNC |
| Spezifität | ca. 99%; Epithel-spezifischer Antikörper | ca. 99%; Sequenz-spezifische Primer |

Bis dato wurde die RT-PCR-basierte Methode nicht in der klinischen Routine eingesetzt. Da basierend auf umfangreichen Versuchsreihen mit Tumorzelllinien die Methode über hohe Sensitivität und Spezifität verfügt, sollten im Rahmen einer prospektiven Studie über den Zeitraum von vier Jahren alle Knochenmarksproben mit beiden Verfahren untersucht werden. Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

1. die Evaluation eines neu etablierten RT-PCR-basierten Verfahrens zum Nachweis der Tumorzell dissemination bei Mammakarzinompatientinnen in der klinischen Diagnostik, hinsichtlich Zeit, Durchführbarkeit und Kosten im Vergleich zur Immunzytochemie;
2. der Vergleich der molekularbiologischen Methode mit dem antikörperbasierten Standardverfahren (Immunzytochemie) hinsichtlich Positivitätsraten;

3. die Bestimmung der Korrelation der Positivitätsraten der beiden Verfahren in der Routine. Daneben sollte in diesem großen Kollektiv die Korrelation von DTZ-Nachweis mit etablierten klinisch-pathologischen Faktoren untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Untersucht wurden Knochenmarkaspirate von 405 Patientinnen, die im Zeitraum von Januar 2003 bis Juni 2006 wegen Diagnose Mammakarzinom im zertifizierten Brustzentrum der Universitäts-Frauenklinik Tübingen therapiert wurden. In die Studie wurden auch Patientinnen aufgenommen, die sich zur Repunktion und Reevaluation des Knochenmarkstatus im Rahmen einer Follow-Up Studie in der Klinik befanden. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patientin, die Einwilligung zur Knochenmarkspunktion sowie ein positives Votum der lokalen Ethikkommission lagen vor.

2.2. Methoden

2.2.1. Knochenmarkaspiration

Die Knochenmarkentnahme erfolgte nach der Jamshidi-Technik (⁷⁰). Aus der Punktion an der Spina iliaca anterior superior wurde jeweils 10-20 ml Material unter sterilen Bedingungen in eine Spritze entnommen, die zwecks Antikoagulation mit 1000 IE Heparin versetzt war (Abb. 4). Das Aspirat wurde anschließend in das immunzytologische Labor der Universitäts-Frauenklinik übersandt und halbiert, wobei die eine Hälfte mittels Immunzytochemie, und die andere Hälfte mittels RT-PCR untersucht wurde. Die Verarbeitung der Aspiarte begann innerhalb von 30 Minuten nach der Entnahme.

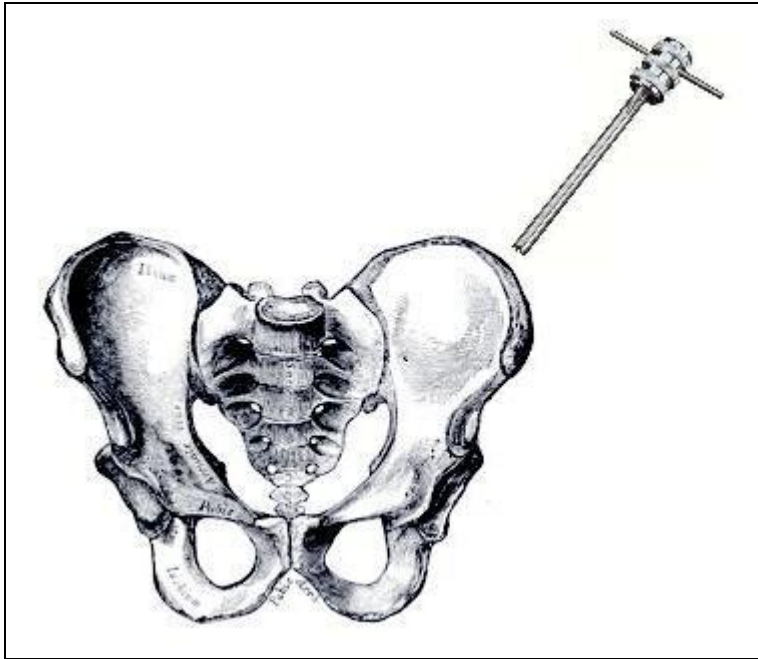


Abb. 4. Knochenmarkaspiration mittels Jamshidi-Nadel

2.2.2. Immunzytochemie

2.2.2.1. Zytokeratine

Zum Nachweis von DTZ werden monoklonale Antikörper eingesetzt, die gegen epitheliale Antigene gerichtet sind und nicht bei hämatopoetischen Zellen vorkommen. Antikörper, die nur Karzinomzellantigene detektieren, stehen als Alternative nicht zur Verfügung. Heutzutage werden in Studien zum Thema Tumorzell dissemination fast ausnahmslos Anti-Zytokeratin-Antikörper verwendet.

Zytokeratine sind epithelspezifische Strukturen des Zytoskeletts. Durch Untersuchung der CK-Expression kann die epitheliale Herkunft eindeutig nachgewiesen oder ausgeschlossen werden. Dies gilt auch für maligne Tumoren epithelialer Genese. Da epitheliale Zellen im Normalfall nicht zu mesenchyalem Gewebe wie Knochenmark oder Blut gehören, wird angenommen, dass die detektierten CK-positiven Zellen vom Primärtumor oder – in metastasierter Situation – Metastase gestreut wurden. Darüber hinaus

wurde durch aufwendige molekulare Charakterisierungsmethoden nachgewiesen, dass es sich bei den CK-positiven Zellen im Knochenmark um Tumorzellen handelt (^{61, 76, 119}).

Bisher wurden über 20 verschiedene Zytokeratine in humanen Epithelien identifiziert und je nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht zwei Gruppen zugeordnet, nämlich dem sauren Subtyp I und dem neutralen/basischen Subtyp II (^{9, 92}). CK 1 bis 8 (Molekulargewicht von 52 kD bis 68 kD) gehören der Subtypfamilie II an. Typ I beinhaltet die restlichen CK 9 bis 20 mit einem Molekulargewicht von 40 kD bis 64 kD. Die Grundeinheit des CK-Interfilaments ist ein Tetramer aus jeweils zwei sauren und zwei neutral/basischen Zytokeratinen. Da individuelle CK-Proteine in Karzinomzellen zum Teil sehr heterogen exprimiert werden (¹⁵⁰), kommen vor allem klassenspezifische Antikörper oder Gemische von Antikörpern, die mehrere CK-Proteine erkennen, zum Einsatz.

2.2.2.2. Aufarbeitung der Knochenmarksuspension

Dichtegradientenzentrifugation

Diese Methode gehört zu den physikalischen Trennverfahren und beruht auf der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Blutkörperchen und des Serums. Ficoll-Hypaque (Biochrom AG, Berlin) hat mit $1,077\text{g/cm}^3$ eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, jedoch kleinere als die von Erythrozyten und Granulozyten.

Das Knochenmarkspirat wird in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS (PBS = phosphate buffered saline, SIGMA Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover) auf 30 ml aufgefüllt und auf das Separiermedium (15 ml Ficoll-Hypaque) sorgfältig aufgetragen, sodass sich die zwei Lagen nicht vermischen. Danach wird die Zellsuspension 30 Minuten lang bei 1600 U/min ohne Bremse zentrifugiert (Biofuge primo, Heraeus Instruments, Hamburg). Während der Zentrifugation bilden sich die in Abb. 5 dargestellten Phasen. Die mononukleären Zellen (MNC) aus der Interphase-Schicht werden mit einer

Pipette vorsichtig abgenommen und in einem neuen Falcon-Röhrchen mit PBS-Lösung resuspendiert. Die Zellen werden durch erneute Zentrifugation über 7 Minuten bei 1600 U/min gereinigt. Nach dem Abkippen des Überstandes erfolgt die Auftrennung der MNC von restlichen Erythrozyten, indem die Zellsuspension mit 10-20 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgefüllt wird und 8 min bei 4-8°C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (7 min, 1600 U/min) wird der Überstand verworfen und das Sediment mit mononukleären Zellen in 10 ml PBS-Lösung resuspendiert.

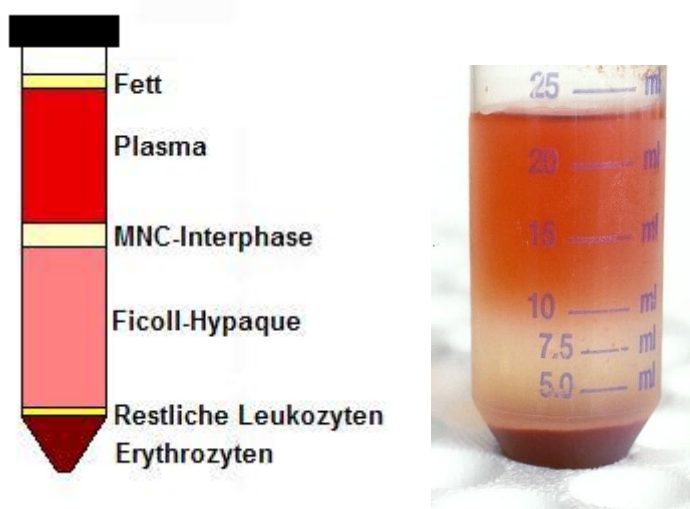


Abb. 5. Schematische und fotografische Darstellung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (MNC – Mononukleäre Zellen)

Zellzählung

Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl wird 1 µl der mit Trypanblaulösung 1:1 verdünnten KM-Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und anschließend in vier Kleinquadraten unter Lichtmikroskopie auf MNC hin ausgezählt. Die Zellzahl pro ml wird nach entsprechender Formel ausgerechnet (die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat x 2 [Verdünnungsfaktor] x 10⁴ [Kammerfaktor]). Nach erneuter Zentrifugation (7 Minuten, 1600 U/min) wird der Überstand abgekippt und entsprechend der Verdünnung für 1,5 x 10⁶ Zellen / ml mit PBS resuspendiert.

2.2.2.3. Zytospin-Präparation

Für die Anfertigung der Zytospins wird jeweils 1 ml Zellsuspension verwendet, was einer Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen entspricht. Nachdem die SuperFrost Plus-Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen) entsprechend den Herstellervorschriften von Zentrifuge (Universal 16A, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) mit Filterkarten und speziellen Halterungen bestückt werden, wird die Zellsuspension auf Objektträger aufgetragen. Anschließend erfolgt eine 5-minütige Zentrifugation (1600 U/min). Nach Abziehen des Überstandes wird die Halterung der Zytospins entfernt und die Filterkarte belassen. Nach erneuter Zentrifugation (1 Minute bei 1600 U/min) werden die Filterkarten aus getrockneten Objektträgern entfernt. Die Zytospins werden über Nacht weiter luftgetrocknet. Falls die Zytospins nicht anschließend immunzytochemisch gefärbt werden, erfolgt die Langzeitlagerung in Plastikbehältnissen bei -20 °C bis zur weiteren Aufarbeitung. In Abb. 6 wird die Aufarbeitung des Knochenmarkspirates einschließlich der Zytospin-Anfertigung dargestellt.

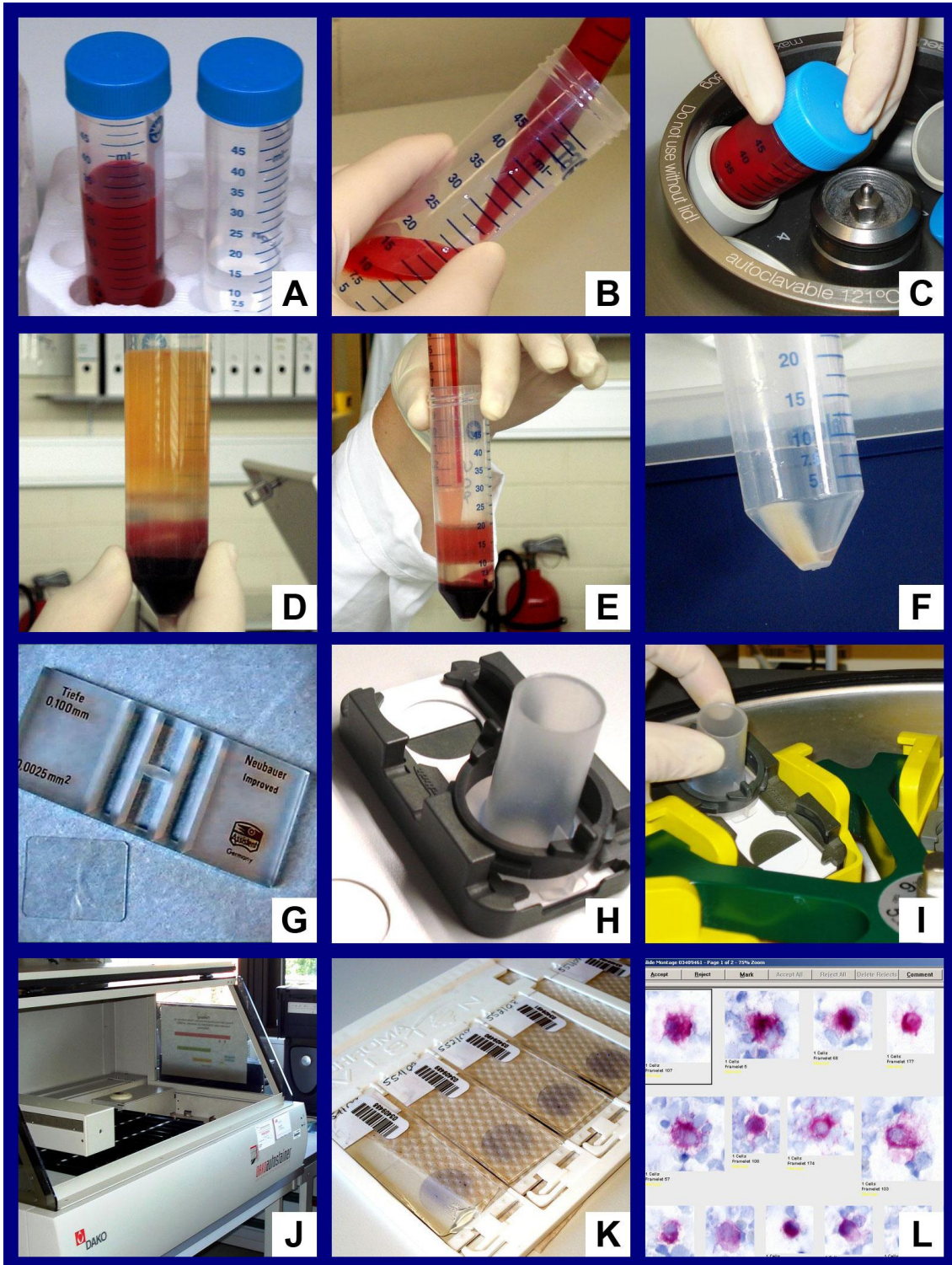


Abb. 6. Einzelne Schritte der Dichtegradientenzentrifugation und der Zytopspin-Präparation

(A) Vorbereitung des Knochenmarkspirates und PBS-Lösung zur Auffüllung auf 30 ml

- (B) *Auftragung des mit PBS vermischten Knochenmarks auf Ficoll-Hypaque (Separiermedium)*
- (C) *Zentrifugation (30 Minuten, 1600 U/min, ohne Bremse)*
- (D) *Phasen der zentrifugierten Zellsuspension (mononukleäre Zellen in der Interphase)*
- (E) *Vorsichtige Abnahme der Interphase-Zellen, Resuspendieren mit PBS*
- (F) *Nach erneuter Zentrifugation Abkippen des Überstandes (Zellpellet), Waschen mit Erythrozyten-Lysepuffer, Resuspendieren mit PBS*
- (G) *Zellzählung mit Neubauer-Kammer*
- (H) *Bestücken der SuperFrost Plus-Objektträger mit Filterkarten und speziellen Halterungen, Auftragung der Zellsuspension*
- (I) *Zentrifugation (5 Minuten, 1600 U/min)*
- (J) *Färbung am Autostainer*
- (K) *Gefärbte Präparate*
- (L) *Auswertung am Automated Cell Imaging System (Clariant Inc., Aliso Valley, CA, USA)*

2.2.2.4. Immunzytochemische Färbung

Die Färbung der Zytospins findet automatisiert am Autostainer (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) statt. Die Präparate werden nach Anfeuchtung der Zellen mit 1 x TBS mit 0,5% Formalin für 10 Minuten fixiert. Nach einem Waschschrift werden die Antigene mit Antibody Diluent für 10 Minuten demaskiert. Anschließend wird der Panzytokeratin-Antikörper A45-B/B3 (1:400) (Mikromet AG, München) aufgetragen und für 15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt ein Waschschrift mit 1 x TBS und anschließend die Bindung mit dem Sekundär-AK (ChemMate Kit Bottle A) für 15 Minuten. Immunkomplexe, die ungebunden blieben, werden mit 1 x TBS-Puffer entfernt. Die APAAP Komplex Suspension (ChemMate Kit Bottle B) wird anschließend für 15 Minuten aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit 1 x TBS-Puffer werden die Präparate mit dem Substrat Neufuchsin (ChemMate Kit Mix Bottle C, D, E, F exakt nach Anweisungen des Herstellers) zweimal inkubiert (jeweils 6 Minuten). Die Substratreaktion wird mit Puffer abgestoppt. Eine schematische Darstellung des Prinzips der APAAP-Methode ist in Abb. 3 ersichtlich (S. 14).

Anschließend erfolgt die Gegenfärbung mit Hämatoxin (Verdünnung 1:3) für 1 Minute. Die Objektträger werden mit destilliertem Wasser gewaschen und zur Trocknung bei Raumtemperatur belassen. Zur anschließenden mikroskopischen Auswertung werden die Zytospins mit dem wasserlöslichen Eindeckmedium Aquatex (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

2.2.2.5. Mikroskopische Auswertung am ACIS-System

Die Detektion von disseminierten Tumorzellen erfolgt ausschließlich unter Verwendung des Automated Cell Imaging System, ACIS (Clariant Inc., Aliso Valley, CA, USA). Das System automatisiert die Aufgaben des Pathologen und verbessert damit Genauigkeit und Zuverlässigkeit der bild-basierenden Untersuchungen. Die Vorteile automatisierter Mikroskopie gegenüber manueller Auswertemethoden konnten in einer Studie von ca. 300 Proben bestätigt werden. Die Verwendung automatisierter Systeme ergab eine deutliche Überlegenheit bezüglich Detektionsrate und Qualitätssicherung, sowie Reproduzierbarkeit^(81, 80, 13).

Das ACIS-System besteht aus einem Computer-gesteuerten Mikroskop, welches über eine digitale Kamera an einen Computer mit einer Image Processing Software, version 2.4.4.7 ausgestattet ist. Das Gerät kann pro Lauf ca. 100 Präparate analysieren. Die Analyse besteht aus drei Schritten: a) Fokussieren, b) Detektion von disseminierten Tumorzellen und c) Erstellung eines Reports.

Fokussierung

Das ACIS-System sucht in einem ersten Schritt nach 3 Fokuspunkten bei niedriger Vergrößerung (10x) (Abb. 7). Diese werden zufällig selektiert und als Bilder gespeichert. Nur bei erfolgreicher Fokussierung kann das Scanning der Zellen beginnen. Die Fokuspunkte dienen zum Ausschluß ungeeigneter Präparate, die z. B. eingeschlossene Luftbläschen enthalten oder durch zu altes Probenmaterial oder fehlerhafte Aufbereitung ein schlechtes Zellbild darstellen.

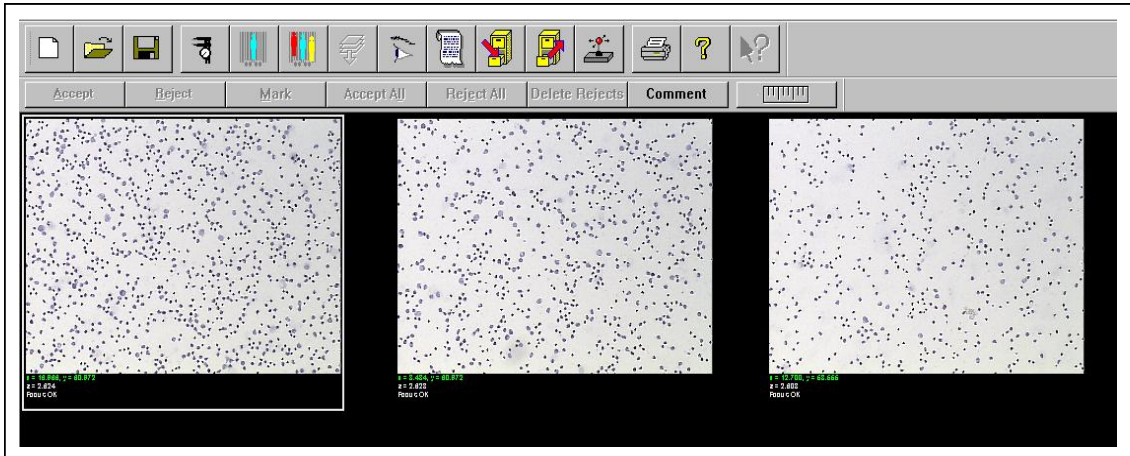


Abb. 7. Fokussierung

Drei Fokuspunkte eines Präparats. Zelldichte und Farbintensität werden beurteilt.

Scanning

Nach der Fokussierung werden die Präparate bei niedriger Vergrößerung gescannt und verdächtige Tumorzellen selektiert. Bildverarbeitungsalgorithmen analysieren jedes Bild. Ausschlaggebend ist eine zuvor erstellte individuelle Minimal Residual Disease Applikation, welche morphologische Eigenschaften und Farbgebung der Tumorzellen definiert. So werden diese Zellen von Artefakten, Luftbläschen, unspezifischer Farbstoffanlagerungen oder anderen atypischen Zellen selektiert. Wird bei der Verarbeitung verdächtige Zellbilder erkannt, dann schaltet die Mikroskopoptik auf eine höhere Vergrößerung und die Kamera erfasst dann weitere Bilder für die Analyse. In diesem Schritt der ACIS-Analyse werden die tumorverdächtigen Zellen mit einer 40x oder 60x Vergrößerung dargestellt und gespeichert.

Erstellung eines Reports

Nachdem die Analyse abgeschlossen ist, werden die gespeicherten Bilder in Form eines Slide Reports angezeigt und können hier nochmals von einem Experten beurteilt werden.

2.2.2.6. Auswertungskriterien

Die Beurteilung immunzytochemischer Färbungen erfolgt immer im morphologischen Kontext. Die Zytomorphologie der Zelle, unter anderem Größe und Form des Zellkerns, die Ausprägung der Antikörperanreicherung, die Intensität des Farbstoffs und die Eindeutigkeit der Anreicherung werden in die Beurteilung miteinbezogen, um Zytokeratin-positive hämatopoetische oder epidermale Zellen von epithelialen Tumorzellen abzugrenzen. Abb. 8 zeigt einige Beispiele der im Knochenmark aufzufindenden Zellen.

Die Identifikation von disseminierten Tumorzellen richtet sich nach den Konsensusempfehlungen der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Senologie (⁵²). Die Kriterien werden in Tab. 5 aufgelistet.

Tab. 5. Kriterien zur Identifikation von Tumorzellen (mod. nach Fehm et al., ⁵²)

| Zytomorphologie und Phänotyp disseminierter Tumorzellen |
|--|
| ➤ vergrößerter Zellkern |
| ➤ Verhältnis Zellkern/Zytoplasma > 1 |
| ➤ Granulierter Zellkern (unregelmäßige Struktur des Zellkerns) |
| ➤ Große Nukleoli |
| ➤ Zellkluster |
| ➤ Starkes und/oder unregelmäßig gefärbtes Zytoplasma |
| ➤ Immunzytologische Färbung bedeckt zumindest partiell Zellkern |
| ➤ evtl. perinukläere Farbverdichtung |
| ➤ Einzelne Zytokeratinfilamente sind erkennbar (netzartige Struktur) |
| ➤ Tumorzellen größer als hämatopoetische Zellen |

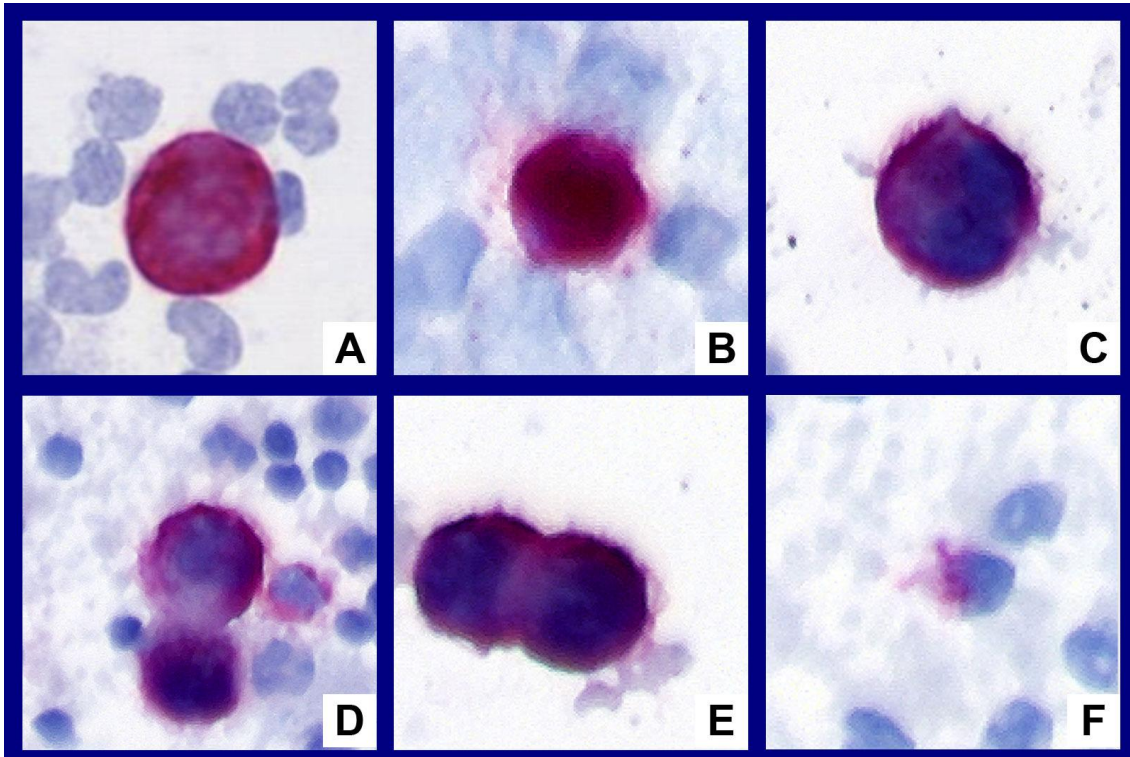


Abb. 8. Beispiele der im Knochenmark aufzufindenden Zellen
 (A-C) Tumorzellen mit typischer Morphologie und eindeutigem Staining
 (D-E) Tumorzell-Cluster
 (F) Unspezifisches Staining, hämatopoetische Zelle

Die fehlerfreie Auswertung potentieller DTZ bereitet Schwierigkeiten. Aus diesem Grund soll eine Objektivierung der Auswertungskriterien angestrebt werden (Tab. 5). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Zytospinpräparate immer durch zwei unabhängige erfahrene Zytologen ausgewertet. Die Patientendaten waren den Untersuchern nicht bekannt.

2.2.2.7. Kontrollen

Die Nachweisgrenze dieser Methode wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen mit MCF-7 Zellen bestimmt. Unterschiedliche Präparationen von MCF-7 Zellen (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 Zellen) wurden jeweils mit 10 ml Blut von einem gesunden Spender vermischt und anschließend wie Patientenproben verarbeitet. Die Nachweisgrenze für dieses Verfahren beträgt 1 MCF-7-Zelle in

$1,5 \times 10^6$ MNC. Jeder Lauf beinhaltete zusätzlich positive und negative Kontrollpräparate zur Sicherung der Sensitivität und Spezifität.

Positivkontrollen

Positivkontrollen bestanden aus Präparaten mit peripheren mononukleären Zellen, die mit 10% MCF-7 Zellen gespikt wurden. Die Zellkulturzellen wurden geerntet und mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen und in 10 ml PBS resuspendiert. Eine Konzentration von $1,5 \times 10^6$ MNC-Zellen / ml wurde eingestellt. Die gewaschenen MCF-7 Zellen wurden in entsprechender Menge zu der Suspension mit MNC zugefügt, so daß die Endkonzentration von MCF-7 Zellen 10% betrug. Die hergestellten Zystospins wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und vor jedem Lauf aufgetaut.

Negativkontrollen

Die Präparation von Negativkontrollen erfolgte analog zu den Positivkontrollen, nur ohne Beimengung von Tumorzellen. Negativkontrollen bestanden ausschließlich aus mononukleären Zellen vom gesunden Spender und wurden bei jedem Färbelauf wie Patientenproben behandelt.

Isotypenkontrolle

Zur Sicherung der Spezifität wurde eine Isotypenkontrolle durch Klon MOPC21 (#555746, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) mitgeführt. Die Isotypenkontrolle beinhaltete eine Positivkontrolle mit MCF-7 Zellen, die aber nach einem geänderten Färbeprotokoll bearbeitet wurde. Der Sekundär-AK wurde mit dem Anti-Maus-Immunglobulin IgG1, κ ersetzt.

2.2.3. RT-PCR

2.2.3.1. Stabilisierung der mRNA

Knochenmarkaspirate werden sofort nach Ankunft im klinischen Labor mit dem RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bone Marrow (Roche Diagnostics, Mannheim) auf 50 ml aufgefüllt und bei -20 °C eingefroren. Das Guanidinisothiocyanat und Detergenz enthaltende Reagenz inhibiert die RNAsen und verhindert somit die Degradierung von Nukleinsäuren. Sobald 5-6 Proben vorhanden waren („Batching“), werden sie bei Raumtemperatur aufgetaut.

2.2.3.2. Isolierung der RNA

Die mRNA Extraktion und Aufreinigung erfolgt mit dem mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) exakt nach Gebrauchsvorschrift. Dieses Kit enthält alle erforderlichen Reagenzien für die Isolierung der mRNA aus der Blut-/Knochenmarkprobe.

Das Prinzip der mRNA-Isolation mit Hilfe dieses kommerziell erhältlichen Kits basiert auf der magnetischen Separation von Nukleinsäuren und wird in Abb. 9 dargestellt. Im ersten Schritt werden alle Nukleinsäuren (DNA, RNA) von übrigen Lysatbestandteilen getrennt. Anschließend erfolgt die Extraktion von mRNA aus dem Nukleinsäuregemisch.

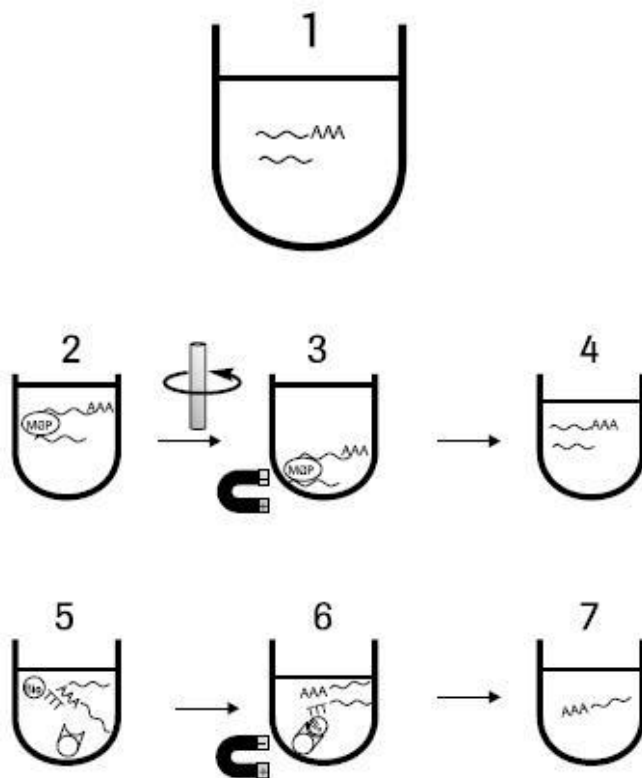


Abb. 9. Schematische Darstellung der mRNA-Isolation mit dem mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow (Roche Molecular Biochemicals)

Quelle: Instruction Manual, Firma Roche

- (1) Lyse und Stabilisierung des Knochenmarkaspirates mit Hilfe des RNA/DNA Stabilization Reagent (Roche Molecular Biochemicals)
- (2) Zugabe der magnetischen Glaspartikel (MGPs). MGPs binden an Nucleinsäuren (DNA, RNA) während der Inkubation
- (3) MGPs und damit die DNA/RNA werden magnetisch oder durch Zentrifugation von den übrigen Lysatbestandteilen getrennt und gewaschen
- (4) Nucleinsäuren werden von den MGP eluiert
- (5) Zugabe von oligo(dT) und Streptavidin-markierten Magnetpartikeln (SMPs). mRNA wird gebunden
- (6) SMPs und damit mRNA werden von dem übrigen Nucleinsäuregemisch (DNA, rRNA, tRNA) magnetisch getrennt und gewaschen
- (7) mRNA wird eluiert

Isolierung der Nukleinsäuren

60 mg MGPs (magnetische Glaspartikel) werden zu der mit dem RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bone Marrow gefüllten KM-Probe hinzugegeben. Es folgt eine Inkubationszeit von 30 Minuten auf einem Rolleninkubator (DynaL Sample Mixer, Dynal, Hamburg) bei Raumtemperatur und anschließend eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 1100 x g (Biofuge primo, Heraeus Instruments). Nach dem Abgießen des Überstands wird das Pellet (MGPs und Nukleinsäuren) in 1 ml Waschpuffer gelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Mit Hilfe eines magnetischen Separators werden die MGPs mit den gebundenen Nukleinsäuren abgetrennt und der Überstand abpipettiert und verworfen.

Die MGPs werden mit 1 ml Waschpuffer resuspendiert und anschließend magnetisch separiert. Der Überstand wird verworfen. Der Waschschrift wird dreimal wiederholt. Anschließend wird die Probe mit 1 ml Elutionspuffer vermischt und 5 Minuten bei 70 °C in einem Thermoschüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert (1400 U/min). Die nicht mehr an DNA/RNA gebundene MGPs werden durch magnetische Separation von den Nukleinsäuren getrennt und verworfen. 100 µl Streptavidin-markierte Magnetpartikel (SMPs) werden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Isolierung der mRNA

Nach der magnetischen Abtrennung vom Aufbewahrungspuffer wird 0,5 ml Hybridisierungsreagenz zu den SMPs hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren vermischt.

Das Hybridisierungsreagenz enthält Biotin-markierte oligo(dT), die sowohl an die SMPs (Biotinanteil), als auch spezifisch an die mRNA binden können. Das Gemisch wird für 5 Minuten bei 37 °C und anschließend 3 Minuten bei Raumtemperatur im magnetischen Separator inkubiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes werden die verbliebenen SMPs mit der gebundenen mRNA in einem Waschpuffer resuspendiert und anschließend durch magnetische

Separation erneut abgetrennt. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt. Zu der Probe werden 20 µl „DEPC-treated“ Wasser hinzugegeben. Es folgt eine Inkubation für 2 min bei 70 °C, um die Bindung der mRNA mit den SMPs zu lösen. Nach der erneuten magnetischen Separation wird der Überstand mit der eluierten mRNA sofort in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die im „DEPC-treated“ Wasser gelöste mRNA wird sofort weiter verarbeitet. Alternativ erlaubt das Protokoll auch die Aufbewahrung der mRNA-Proben bei -20 °C zur weiteren Aufarbeitung.

2.2.3.3. „One-Step“ RT-PCR

Die *real-time* RT-PCR erfolgt mit dem LightCycler RNA Master HybProbe Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Die im Kit erhaltene thermostabile Tth- (Thermus Thermophilus-) DNA-Polymerase fungiert sowohl als RNA-abhängige Reverse Transkriptase, als auch DNA-abhängige DNA-Polymerase und erlaubt somit die Durchführung beider Schritte der RT-PCR in einem Reaktionsgefäß („One-Step“).

Die Hybridisierungssonden-Technologie basiert auf dem Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET-Phänomen). Zwei spezifisch markierte Oligonukleotidsonden (Donor und Akzeptor) binden am amplifizierten Fragment während der Verlängerungsphase des PCR-Zyklus. Die am 3'-Ende mit Fluoreszein markierte Sonde fungiert als Donor-Fluorophor und wird mit der Lichtquelle des LightCycler-Systems angeregt. Das Donor-Fluorophor überträgt seine Energie auf das Akzeptor-Fluorophor (am 5'-Ende mit LightCycler Red markierte Sonde), wenn dieses sich in unmittelbarer Nähe befindet. Der Akzeptor-Farbstoff emittiert Licht mit einer längeren Wellenlänge, wobei die Lichtquelle den Akzeptor-Farbstoff nicht direkt anregen kann. Die Lichtemission des Akzeptor-Fluorophors wird im LightCycler-System während jedes PCR-Zyklus gemessen (Abb. 10).

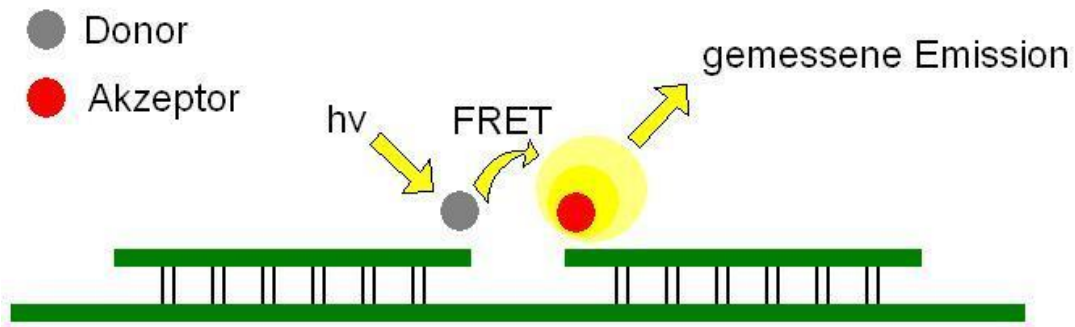


Abb. 10. Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-Phänomen (FRET-Phänomen)

Das LightCycler RNA Master HybProbe Kit enthält alle zur Durchführung von „One-Step“ RT-PCR benötigten Reagenzien: Tth-DNA-Polymerase, Reaktionsbuffer, Nukleoside, $Mn(OAc)_2$ und PCR-geeignetes Wasser. Es wird nach den Anweisungen des Herstellers ein MasterMix vorbereitet, das spezifische Primer und Sonden in entsprechender Konzentration enthält (Tab. 6). Das Design der Sequenzen der Primer und Sonden wurde von TIB Molbiol, Berlin erstellt (Sense-Primer: AGATC CTGAG TGACA TGCGA A; Anti-Sense-Primer: CCCAG CTGGG CTTCA ATAC; Donor-Sonde: CCCTT CAGGG GTCTT GAGAT GAGC-FL; Akzeptor-Sonde: LC-Red-640-GCAGT CACAG CTGAG CATGA AAGC). Das Amplifikationsprodukt ist etwa 308bp lang. Die unspezifische Primerelongation wird durch die Verwendung von Aptameren verhindert, die im aktiven Zentrum der Polymerase binden und jegliche enzymatische Reaktion unterhalb des Temperaturoptimums des Enzyms inhibieren. Die optimale $Mn(OAc)_2$ -Konzentration wurde in vorgeschalteten Experimenten ermittelt.

Tab. 6. Herstellung des MasterMix für die „One-Step“ RT-PCR mit Hilfe des LightCycler RNA Master HybProbe Kits (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

| Reagenz | Volumen | Konzentration im MasterMix |
|---|--------------|----------------------------|
| H ₂ O, PCR-grade | 6,2 µl | - |
| Mn(OAc) ₂ , 50 mM | 1,3 µl | 3,25 mM |
| PCR Primer Mix, 10× konz. | 2,0 µl | 0,50 µM |
| HybProbe Sonden Mix , 10× konz. | 2,0 µl | 0,25 µM |
| LightCycler RNA Master HybProbe, 2.7× konz. | 7,5 µl | 1 x |
| Gesamtvolumen | 19 µl | |

Die LightCycler-Kapillaren (Roche Diagnostics, Mannheim) werden jeweils mit 19 µl MasterMix und 1 µl mRNA aufgefüllt und in LightCycler Zentrifuge-Adapter platziert (Roche Diagnostics, Mannheim) und herunterzentrifugiert. Die Kapillaren werden in das LightCycler Proben-Karussell übertragen und in das LightCycler 1.2.-Instrument eingesetzt. Reverse Transkription wird bei 61 °C für 20 min durchgeführt und ist direkt der PCR vorgeschaltet (Hotstart bei 95 °C für 30 sec). Es werden anschließend 50 Zyklen durchgeführt, die jeweils aus drei Phasen bestehen: 1 sec bei 95 °C, 15 sec bei 55 °C, 13 sec bei 72 °C. Abb. 11 zeigt schematisch einzelne Schritte der PCR-Reaktion. Die Aufarbeitung des Knochenmarkspirates einschließlich der mRNA-Isolation und RT-PCR wird in Abb. 12 veranschaulicht.

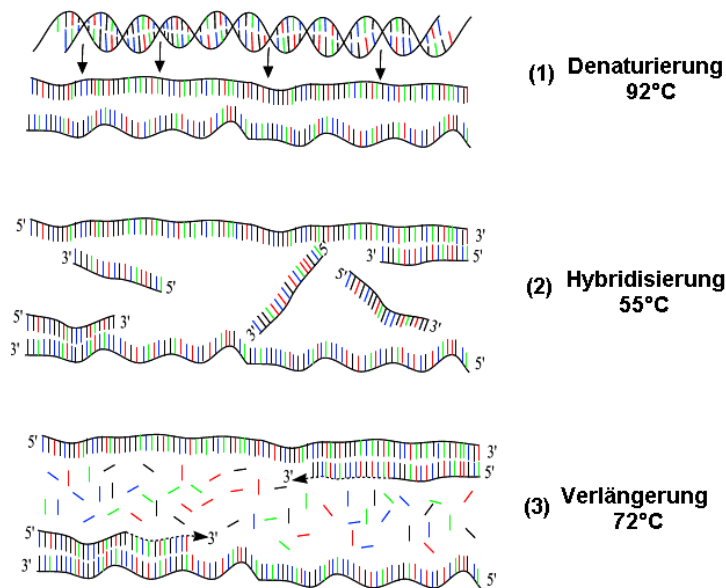


Abb. 11. Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Polymerasekettenreaktion

Quelle: Instruction Manual, Firma Roche

- (1) Die Erhitzung der Reaktionslösung (Original-DNA, Polymerasen, zwei Primer, Desoxynukleosidtriphosphate, Mg^{2+} -Ionen, Pufferlösungen) auf ca. 92-96 °C erzeugt eine Trennung der beiden komplementären DNA-Stränge (Denaturierung).
- (2) Nach dem Herabsetzen der Temperatur auf ca. 55-65 °C lagern sich die beiden Primer („upstream“ und „downstream“) an der Ausgangsmatrize an (Hybridisierung). So wird der Startpunkt für die Polymerasen definiert.
- (3) Bei der optimalen Temperatur von ca. 68-72 °C beginnt die Verlängerung des DNA-Strangs durch die Polymerasen.

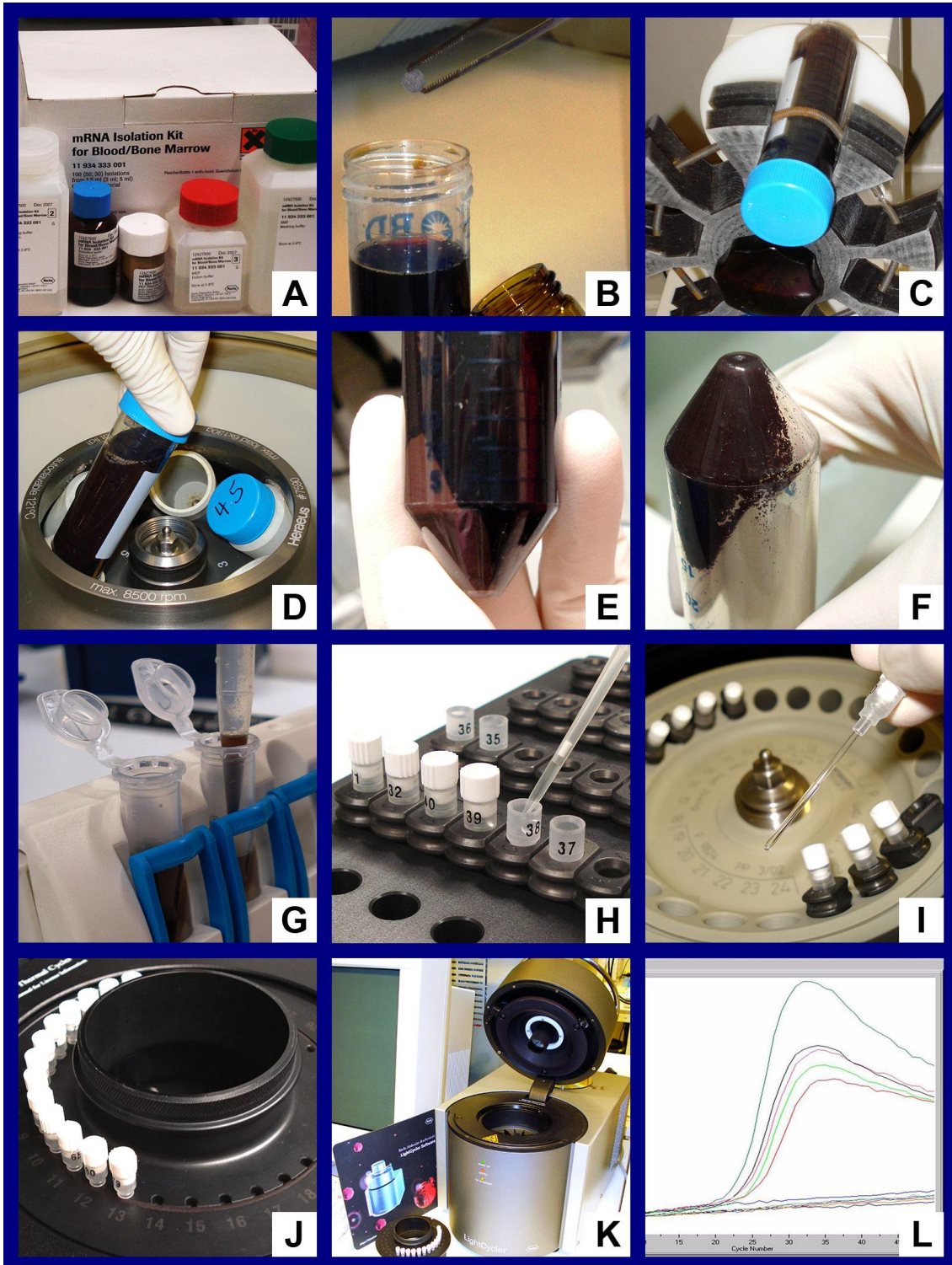


Abb. 12. Einzelne Schritte der mRNA-Isolation und RT-PCR

- (A) mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
- (B) Zugabe der an Nucleinsäuren bindenden magnetischen Glaspartikel
- (C) Inkubation auf dem Rotator (30 Minuten)

- (D) *Zentrifugation (2 Minuten, 1100 x g)*
- (E) *Das Pellet der magnetischen Glaspartikel und Nukleinsäuren*
- (F) *Abgießen des Überstands*
- (G) *Waschen mit dem Waschpuffer und Trennung von Glaspartikeln mittels magnetischen Separators*
- (H) *Auffüllung der LightCycler-Kapillaren (Roche Diagnostics, Mannheim) mit MasterMix und mRNA*
- (I) *Zentrifugation im LightCycler Zentrifuge-Adapter (Roche Diagnostics, Mannheim)*
- (J) *Platzierung der Proben im LightCycler-Probenkarussell (maximal 32 Proben)*
- (K) *Das LightCycler-System für „One-Step“ RT-PCR*
- (L) *Analyse der Amplifikationskurven*

Schmelzkurvenanalyse

Um zu beweisen, dass ausschließlich das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert wurde, wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer der GC-Gehalt des Produktes und somit indirekt die Fragmentlänge und dadurch die Spezifität bestimmt werden kann. Dazu wird nach abgelaufener PCR das Reaktionsgemisch langsam kontinuierlich auf 95 °C erhitzt. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird der aufgeschmolzene Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül. Der Fluoreszenzabfall wird vom LightCycler-Instrument als Schmelzgipfel angezeigt. Die Abwesenheit von zusätzlichen Schmelzgipfeln beweist, dass die PCR nur ein einziges Amplifikationsprodukt hervorgebracht hat.

Etablierung einer Standardkurve

MCF-7 Zellen (ATCC[®]-Nr. HTB-22 von American type culture collection) wurden mit Trypsin geerntet und nach mehrmaligem Waschen ausgezählt. 10^5 Zellen wurden isoliert. 60 ml Blut von gesunden Spendern wurde mit MCF-7 Zellsuspensionen in einer geometrischen Verdünnungsreihe zugemischt. Die

Proben wurden anschließend nach dem RT-PCR-Protokoll aufgearbeitet und eine Standardkurve wurde erstellt (Abb. 13).

Die Patienten-PCR-Produkte werden mit der Fit Points Method der LightCycler Quantifizierungs-Software 3.5 analysiert, wobei die ermittelten Crossing Points mit der importierten und zuvor etablierten Standardkurve verglichen werden.

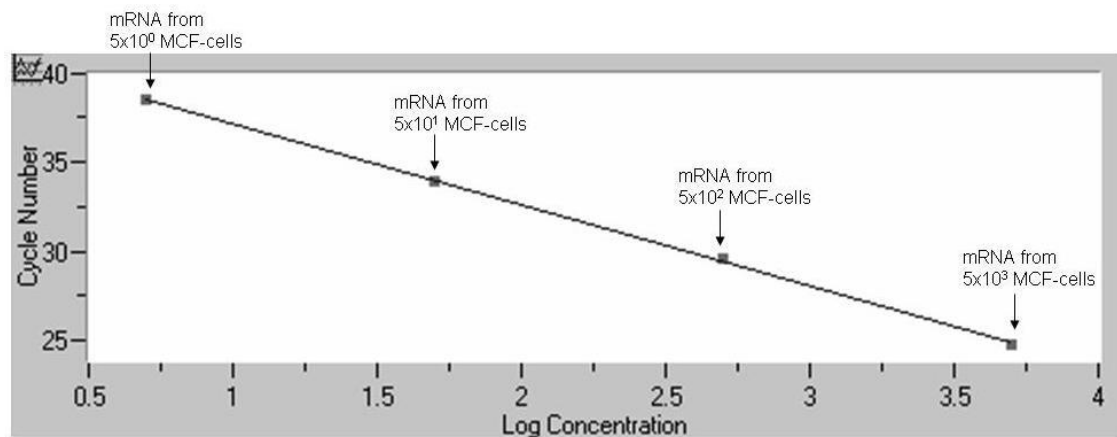


Abb. 13. Standardkurve der „One-Step“ RT-PCR. Eine geometrische Verdünnungsreihe der MCF-7 Zellen wurde analysiert.

Der Arbeitsplatz wird täglich mit RNase Zap (Ambion) abgewischt und es werden nur spezielle Pipetten und Filterpipettenspitzen verwendet. Handschuhe werden zu jeder Zeit getragen und häufig gewechselt, um die Gefahr der RNA-Degradierung durch kontaminierende RNAsen zu minimieren.

Herstellung einer Positivkontrolle

Jeder Lauf beinhaltet sowohl Negativ- als auch Positivkontrolle, wobei die Negativkontrolle statt Patienten-mRNA PCR-geeignetes Wasser enthält. Als Positivkontrolle wird 10 ml Blut eines gesunden Spenders mit zugegebenen 10^3 MCF-7 Zellen (in PBS suspendiert) verwendet. Die Proben wurden mit dem RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bone Marrow auf 50 ml aufgefüllt und wie Patientenproben behandelt. Auf diese Weise hergestellte mRNA-Positivkontrollen werden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, vor jedem Lauf aufgetaut und

Proben-Batch zugefügt. Da durch repetitives Auftauen die mRNA degradieren könnte, werden aliquotierte Teströhrchen der MCF-7 Kontrollen nicht häufiger als 5-mal verwendet.

2.2.4. Statistik

Die statistische Analyse der Patientendaten wurde mit SPSS 15.0 und JMP 5.1 für Windows XP vorgenommen.

Wir untersuchten Assoziationen zwischen immunzytochemischen bzw. RT-PCR-basierten Nachweis von Tumorzellen und anderen klinisch-pathologischen Faktoren (Chi-Square-Test). Kategorische Variablen mit mehr als zwei Kategorien wurden bezüglich eines Trends untersucht. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Die Positivitätsraten von Immunzytochemie und RT-PCR wurden mittels des Fisher's Exact-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95% verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten der Patientinnen

Im Rahmen der klinischen Studie wurden beide Verfahren an 405 Knochenmarkaspiraten eingesetzt. Davon wurden 331 Patientinnen bei primärem Mammakarzinom im Rahmen der Operation intraoperativ punktiert (Tab. 7). Eine neoadjuvante Chemotherapie war zu diesem Zeitpunkt bei 29 Patientinnen bereits durchgeführt worden. Weitere 19 Mammakarzinompatientinnen wurden bei Rezidiv oder Metastasierung während ihres Klinikaufenthalts punktiert. Bei 55 Frauen mit Mammakarzinom in der Anamnese wurde eine sekundäre Kontrollknochenmarkspunktion durchgeführt. Bei diesen Patientinnen bestand zum Zeitpunkt der Punktion kein Hinweis auf das Vorliegen eines Rezidivs oder einer Metastasierung.

Tab. 7. Zusammensetzung des Patientenkollektivs

| Anzahl der Patientinnen | N=405 |
|---|------------|
| Primäres Mammakarzinom | 331 |
| Primäre operative Therapie / keine neoadjuvante Chemotherapie | 302 |
| Stadium I | 207 |
| Stadium II | 50 |
| Stadium III | 33 |
| Stadium IV | 12 |
| Nach der neoadjuvanten Therapie | 29 |
| Rezidiv / Metastasiert | 19 |
| Kontrollpunktion | 55 |
| Total | 405 |

3.1.1. Altersverteilung

Die Anzahl der zu unserem Kollektiv gehörenden Fälle liegt bei 405. Das mediane Alter der Patientinnen betrug 57 Jahre (Abb. 14). Die jüngste Patientin

war zur Zeit der Knochenmarkspunktion 22 Jahre, die älteste 87 Jahre alt (Mittelwert 57, Standardabweichung 11 Jahre).

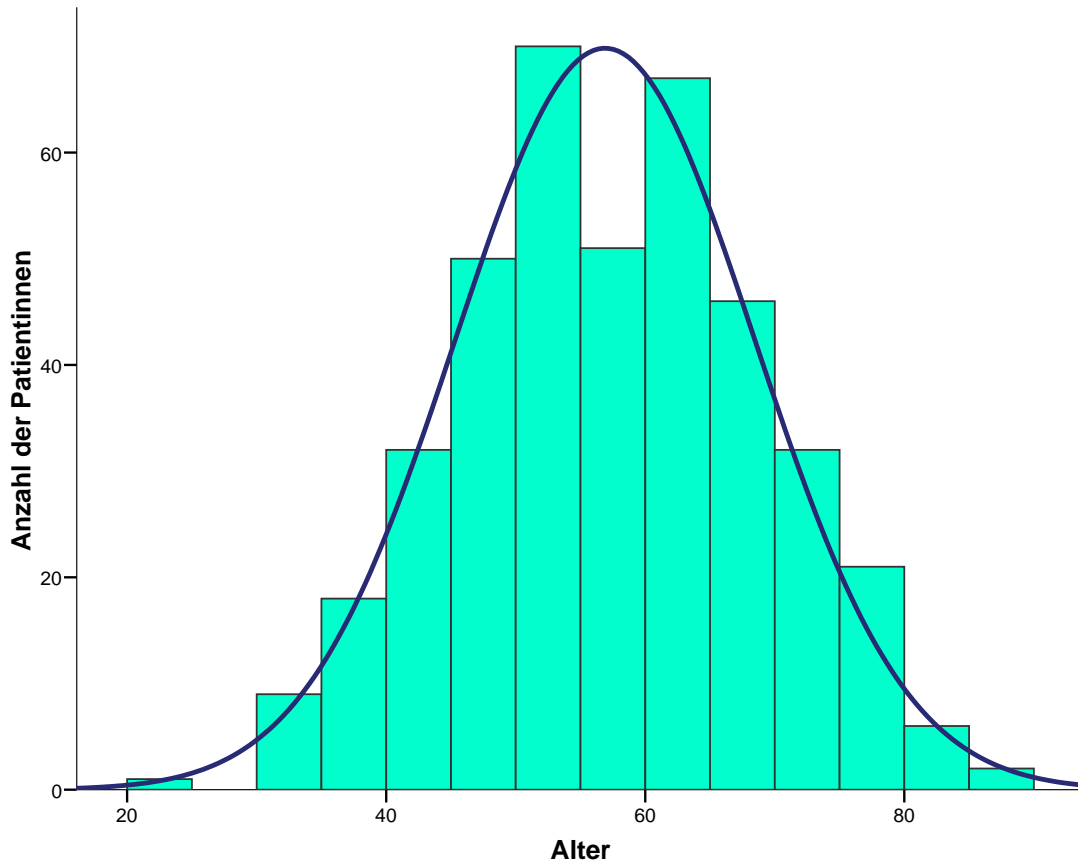


Abb. 14. Altersverteilung des Patientenkollektivs

3.1.2. Klinisch-histologische Daten der primär operierten Patientinnen

Bei 302 Patientinnen wurde eine primäre Operation durchgeführt. Klinisch-histologische Daten dieser Subgruppe sind in Tab. 8 dargestellt.

Wie das Balkendiagramm der Stadieneinteilung verdeutlicht (Abb. 15), stellen 207 Patientinnen mit Stadium I der Erkrankung die größte Subgruppe (69%) des Kollektivs dar. Weitere 83 Patientinnen wurden mit Mammakarzinom im Stadium II/III diagnostiziert. Lediglich 12 Patientinnen wiesen Stadium IV auf.

Tab. 8. *Klinisch-pathologische Daten des primär operierten Patientenkollektivs*

| Merkmal | Anzahl der Patientinnen | |
|------------------------------------|-------------------------|-----|
| | N (N=302) | % |
| Lokalisation des Tumors | | |
| Rechts | 149 | 49% |
| Links | 141 | 47% |
| Bilateral | 12 | 4% |
| Grading | | |
| G1 | 24 | 8% |
| G2 | 226 | 79% |
| G3 | 36 | 13% |
| Histologie | | |
| Duktal invasiv | 175 | 61% |
| Lobulär invasiv | 54 | 19% |
| Duktal-lobulär | 34 | 12% |
| Tubulär | 13 | 5% |
| Muzinös | 4 | 1% |
| Medullär | 4 | 1% |
| Anderer Typ | 5 | 2% |
| Stadium | | |
| I | 207 | 69% |
| II | 50 | 17% |
| III | 33 | 11% |
| IV | 12 | 4% |
| Tumorgröße | | |
| T1 | 208 | 69% |
| T2 | 84 | 28% |
| T3 | 8 | 3% |
| T4 | 2 | 1% |
| Lymphknotenstatus | | |
| Neg | 219 | 72% |
| Pos | 83 | 28% |
| Metastasierung | | |
| M0 | 290 | 96% |
| M1 | 12 | 4% |
| Lymphangiosis carcinomatosa | | |
| L0 | 263 | 92% |
| L1 | 22 | 8% |
| ER Status | | |
| Neg | 50 | 18% |
| Pos | 234 | 82% |
| PR Status | | |
| Neg | 93 | 33% |
| Pos | 189 | 67% |
| Her-2/neu Status | | |
| Neg | 237 | 87% |
| Pos | 36 | 13% |

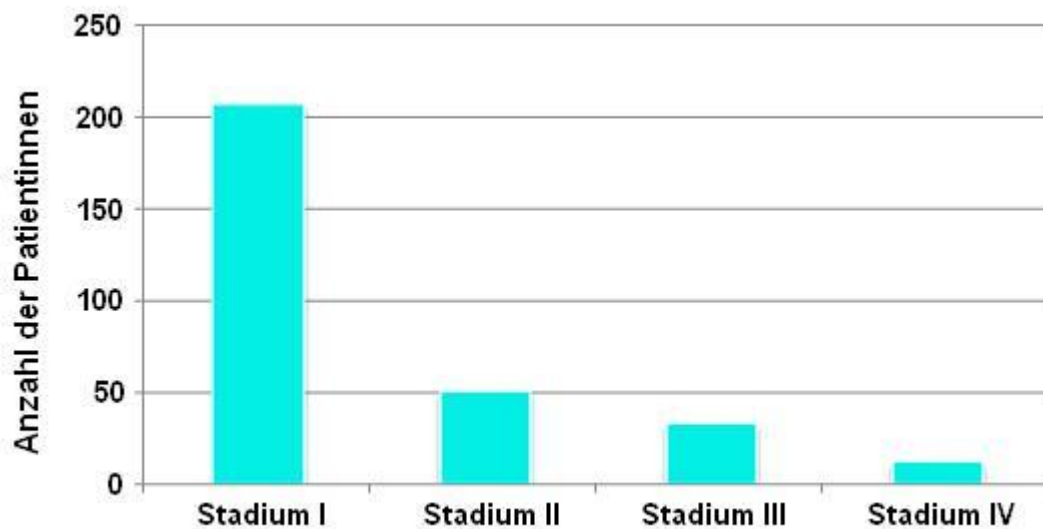


Abb. 15. Verteilung der Stadien im Kollektiv der primär operierten Patientinnen

3.2. Analyse des KM-Aspirates mittels Immunzytochemie

405 Knochenmarkaspirate wurden immunzytochemisch untersucht. In 139 (34%) Proben konnten Zytokeratin-positive Zellen nachgewiesen werden.

Abb. 16 zeigt eine disseminierte Tumorzelle aus dem Knochenmarkspunktat einer Patientin mit primärem Mammakarzinom. In Abb. 17 sind angefärbte Zellen in einer Übersicht dargestellt; diese wurden durch einen Zytologen anschließend bewertet.

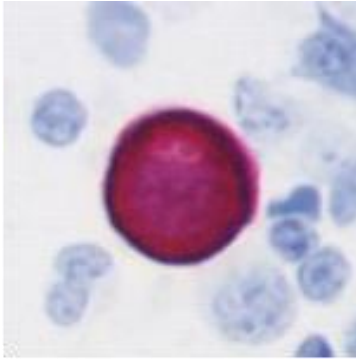


Abb. 16. Zytokeratin-positive Zelle aus dem Knochenmarkspirat einer Mammakarzinompatientin

Die Morphologie der Zelle und der Anfärbungstyp entsprechen den Kriterien der Konsensus-Empfehlungen zur Tumorzellendiagnostik (positive Zytokeratin-Anfärbung, großer Nukleus, hohes Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis, Nukleus teilweise durch Zytokeratin-Anfärbung bedeckt, ⁵⁰).

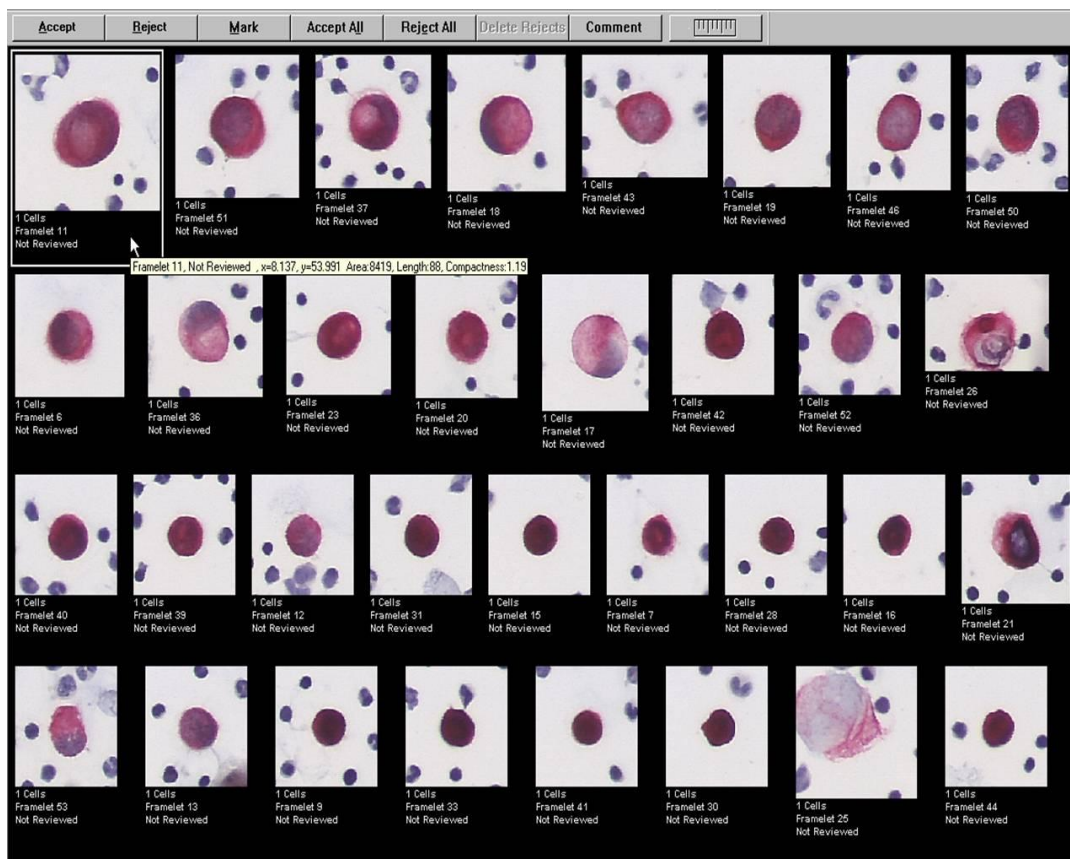


Abb. 17. Mehrere Zellen aus dem Knochenmarkspunktat aufbereitet für die morphologische Beurteilung durch einen erfahrenen Zytologen

3.2.1. Anzahl der Zytokeratin-positiven Zellen

Die Anzahl der disseminierten Zellen variierte zwischen 1 und 8 mit dem Mittelwert von 2,17 und Standardfehler des Mittelwerts von 0,11 (Abb. 18).

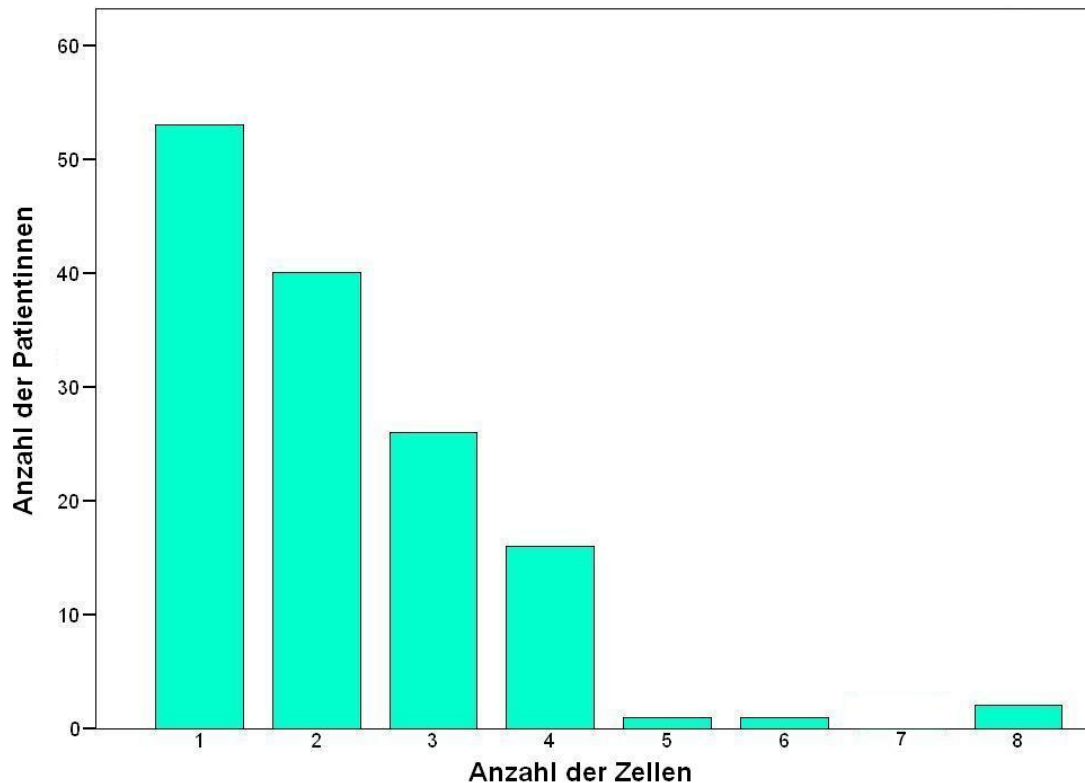


Abb. 18. Verteilung der Anzahl immunzytochemisch positiver Zellen

3.2.2. Immunzytochemische Befunde in unterschiedlichen Subkollektiven

In Abb. 19 wird der immunzytochemische Knochenmarksbefund in Abhängigkeit von der klinischen Situation der Patientin dargestellt. Die höchste Positivitätsrate (58%) wurde in der Subgruppe der Patientinnen mit Rezidiv / Metastasierung beobachtet. Hingegen blieben 20% der Patientinnen ohne Hinweis auf Reaktivierung der Erkrankung (sekundäre Kontrollpunktionen) positiv.

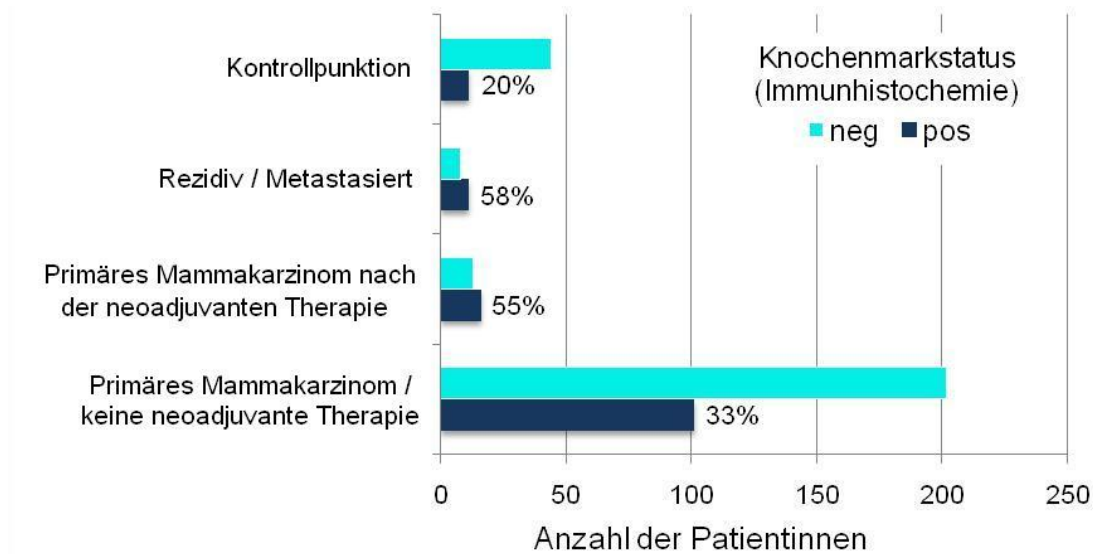


Abb. 19. Korrelation des immunzytochemischen Befundes mit der klinischen Situation der Patientin

In Tab. 9 ist eine Übersicht dargestellt, die einerseits die immunzytochemische Positivitätsrate (ICC-positiv) der jeweiligen Patientinnen-Subgruppe darstellt, andererseits die durchschnittliche Anzahl der disseminierten Tumorzellen enthält und auch Aufschluss darüber gibt, wie hoch im Vergleich dazu die mittlere Anzahl bei den jeweils ICC-positiven Patientinnen war ($p = 0,002$).

Tab. 9. Korrelation des Knochenmarkstatus (ICC) und der Anzahl der disseminierten Tumorzellen mit klinischen Faktoren

| Anzahl der Patientinnen | N | ICC-positiv | | Anzahl der DTZ |
|--|------------|-------------|------------|--------------------------------------|
| | | n | % | |
| Primäres Mammakarzinom | 331 | 117 | 35% | 2,2 ¹ (0,1 ²) |
| Primäre operative Therapie / keine neoadjuvante Therapie | 302 | 101 | 33% | 2,0 (0,1) |
| Nach der neoadjuvanten Therapie | 29 | 16 | 55% | 3,6 (0,5) |
| Rezidiv / Metastasiert | 19 | 11 | 58% | 2,1 (0,3) |
| Kontrollpunkt | 55 | 11 | 20% | 1,7 (0,3) |
| Total | 405 | 139 | 34% | 2,2 (0,1) |

¹ Mittelwert

² Standardfehler des Mittelwerts

3.3. Analyse des Knochenmarkspirates mittels RT-PCR

3.3.1. Korrelation mit klinisch-histologischen Daten

142 von 405 (35%) Knochenmarkspiraten wurden mittels qualitativer RT-PCR als positiv beurteilt. In Abb. 20 ist ein Beispiel einer *real-time* RT-PCR Analyse abgebildet.

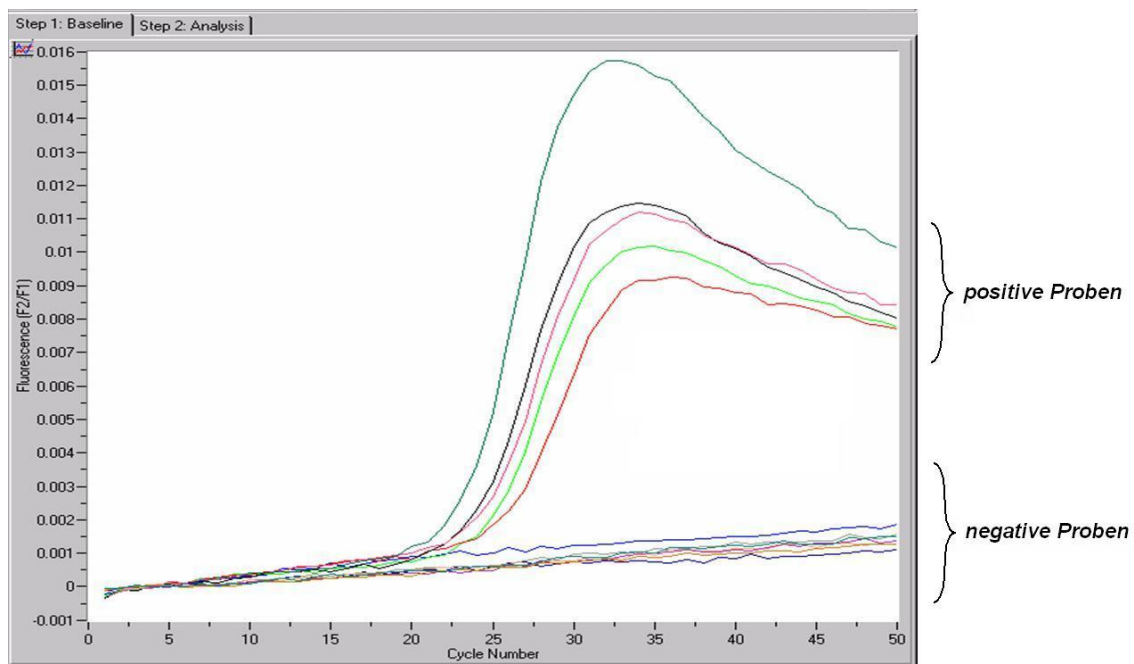


Abb. 20. LightCycler-Amplifikationskurven

Die x-Achse beschreibt den Zeitpunkt (PCR-Cycle Number), bei welchem die PCR in die Amplifikationsphase übergang. Die y-Achse veranschaulicht die Intensität der Fluoreszenz.

In diesem Beispiel werden 5 Proben amplifiziert (positiv). Bei weiteren 5 Proben fiel das PCR-Ergebnis negativ aus (keine Amplifikation nachweisbar)

Abb. 21 und Tab. 10 veranschaulichen die Verteilung der Befunde innerhalb der klinischen Patientinnengruppen. Die höchste Positivitätsrate ergab sich in der Subgruppe neoadjuvant vorbehandelter Patientinnen (48%), gefolgt von Patientinnen mit Rezidiv / Metastase (42%) und primär operierten Patientinnen (37%). Die niedrigste Positivitätsrate wurde im Kollektiv der Patientinnen mit Kontrollpunkt beobachtet (15%) ($p = 0,004$).

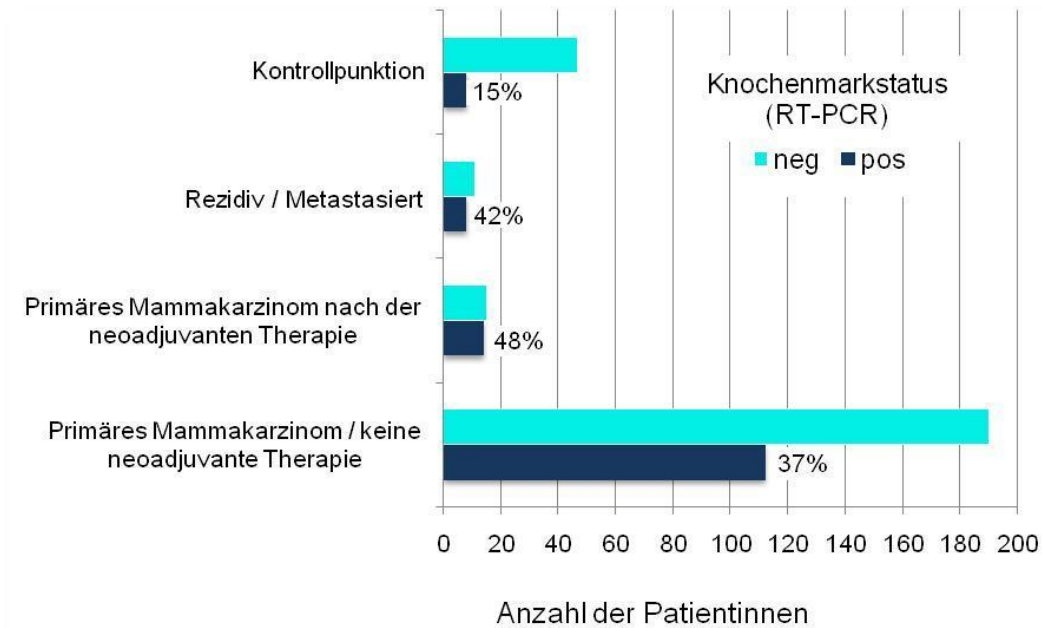


Abb. 21. Korrelation des mittels RT-PCR ermittelten Knochenmarkstatus mit der klinischen Situation der Patientin

Tab. 10. Korrelation des Knochenmarkstatus (RT-PCR) mit klinischen Faktoren

| Anzahl der Patientinnen | N | RT-PCR positiv | |
|--|------------|----------------|------------|
| | | n | % |
| Primäres Mammakarzinom | 331 | 126 | 38% |
| Primäre operative Therapie / keine neoadjuvante Therapie | 302 | 112 | 37% |
| Nach der neoadjuvanten Therapie | 29 | 14 | 48% |
| Rezidiv / Metastasiert | 19 | 8 | 42% |
| Kontrollpunkt | 55 | 8 | 15% |
| Total | 405 | 142 | 35% |

3.4. Vergleich der RT-PCR mit Immunzytochemie

3.4.1. Korrelation der Positivitätsraten beider Methoden

Knochenmarksproben von 405 Patientinnen wurden mit Immunzytochemie und RT-PCR untersucht. Bei 294 (73%) Knochenmarkaspiraten lieferten beide Methoden das gleiche Ergebnis ($p < 0,001$ mit Chi-Quadrat-Test; Tab. 11).

111 Befunde waren hingegen diskordant. Die Positivitätsraten von ICC und RT-PCR waren 34% und 35%, respektive. 196 von 405 (48%) Aspiarte waren bei mindestens einem Verfahren positiv.

Tab. 11. Positivitätsraten mittels Immunzytochemie und RT-PCR

| | <i>ICC positiv</i> | <i>ICC negativ</i> | Total |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| <i>RT-PCR positiv</i> | 85 (21%) | 57 (14%) | 142 (35%) |
| <i>RT-PCR negativ</i> | 54 (13%) | 209 (52%) | 263 (65%) |
| Total | 139 (34%) | 266 (66%) | 405 (100%) |

Unter KM-Aspiraten von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom lieferten 35% (ICC) und 38% (RT-PCR) ein positives Ergebnis (Tab. 9, Tab. 10). Hingegen im rezidierten / metastasierten Kollektiv und in der Gruppe von Patientinnen nach neoadjuvanter Chemotherapie war die ICC-Positivitätsrate höher (Tab. 12).

Tab. 12. Verteilung der Befunde in Abhängigkeit von Methode und klinischer Situation der Patientin

| Anzahl der Patientinnen | N | ICC-positiv | | RT-PCR-positiv | |
|---|------------|-------------|------------|----------------|------------|
| | | N | % | n | % |
| Primäres Mammakarzinom | 331 | 117 | 35% | 126 | 38% |
| Primäre operative Therapie / keine neoadjuvante Chemotherapie | 302 | 101 | 33% | 112 | 37% |
| Stadium I | 207 | 71 | 34% | 76 | 37% |
| Stadium II | 50 | 13 | 26% | 19 | 38% |
| Stadium III | 33 | 14 | 42% | 13 | 40% |
| Stadium IV | 12 | 3 | 25% | 4 | 33% |
| Nach der neoadjuvanten Therapie | 29 | 16 | 55% | 14 | 48% |
| Rezidiv / Metastasiert | 19 | 11 | 58% | 8 | 42% |
| Kontrollpunktion | 55 | 11 | 20% | 8 | 15% |
| Total | 405 | 139 | 34% | 142 | 35% |

Abb. 22 veranschaulicht die Verteilung der Befunde in Abhängigkeit von verwendeter Methode in verschiedenen Patientensubkollektiven.

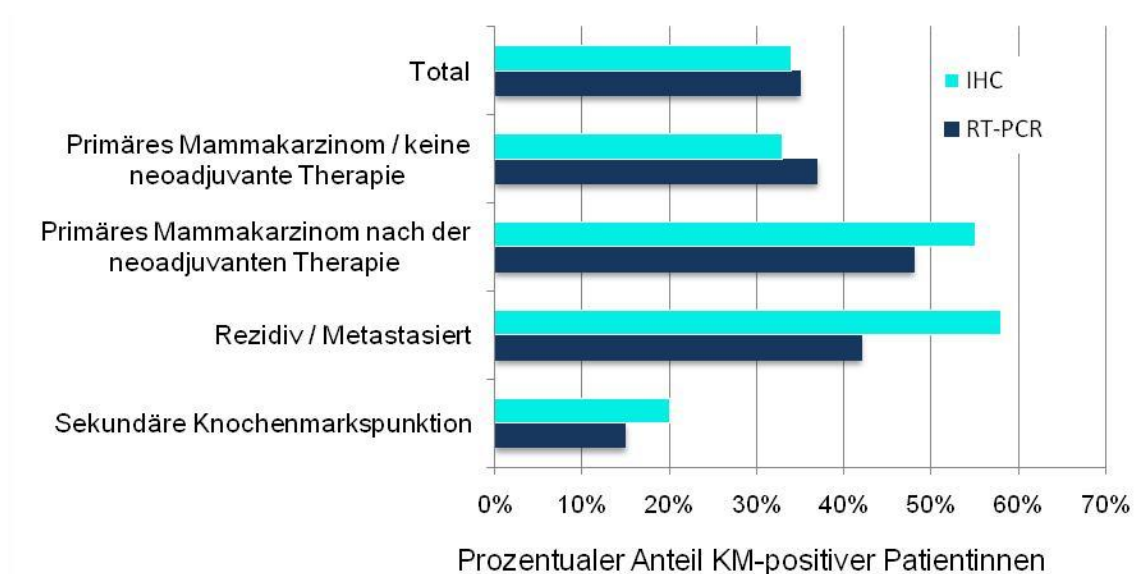


Abb. 22. Verteilung der Befunde in Abhängigkeit von Methode und klinischer Situation (in %)

3.4.2. Korrelation mit etablierten klinisch-histologischen Faktoren

Die Ergebnisse beider Verfahren wurden innerhalb der Gruppe der primär operierten Patientinnen unter Einbeziehung klinisch-pathologischer Daten verglichen. 302 Patientinnen konnten in diese Analyse eingeschlossen werden. In diesem Kollektiv wiesen 33% Tumorzellen in der Immunzytochemie auf. Hingegen waren 37% in der RT-PCR positiv. Tab. 13 bietet eine Übersicht der Positivitätsraten beider Methoden und der Korrelation mit etablierten prognostischen Faktoren wie TNM-Stadium, Grading, Hormonrezeptorstatus und anderen. Es konnte keine Korrelation zwischen DTZ-Nachweis, sowohl immunzytochemisch, als auch mittels RT-PCR, und den klinisch-histologischen Faktoren festgestellt werden ($p > 0,05$).

Tab. 13. Korrelation der Befunde mit klinisch-pathologischen Daten des Patientenkollektivs

| Merkmal | N | ICC positiv | | RT-PCR positiv | | | |
|------------------------------------|-----|-------------|-----|----------------|-----|-----|---------|
| | | n | % | p-value | n | % | p-value |
| Total | 302 | 101 | 33% | | 112 | 37% | |
| Lokalisation des Tumors | | | | n.s. | | | n.s. |
| Rechts | 149 | 50 | 34% | | 55 | 37% | |
| Links | 141 | 49 | 35% | | 51 | 36% | |
| Bilateral | 12 | 2 | 17% | | 6 | 50% | |
| Grading | | | | n.s. | | | n.s. |
| G1 | 24 | 4 | 17% | | 7 | 29% | |
| G2 | 226 | 79 | 35% | | 82 | 36% | |
| G3 | 36 | 16 | 44% | | 17 | 47% | |
| Histologie | | | | n.s. | | | n.s. |
| Duktal invasiv | 175 | 59 | 34% | | 66 | 38% | |
| Lobulär invasiv | 54 | 18 | 33% | | 21 | 39% | |
| Duktal-lobulär | 34 | 13 | 38% | | 11 | 32% | |
| Anderer Typ | 26 | 10 | 39% | | 10 | 39% | |
| Stadium | | | | n.s. | | | n.s. |
| I | 207 | 71 | 34% | | 76 | 37% | |
| II | 50 | 13 | 26% | | 19 | 38% | |
| III-IV | 45 | 17 | 38% | | 17 | 38% | |
| Tumorgröße | | | | n.s. | | | n.s. |
| T1 | 208 | 67 | 32% | | 77 | 37% | |
| T2 | 84 | 29 | 35% | | 30 | 36% | |
| T3 | 8 | 5 | 63% | | 5 | 63% | |
| T4 | 2 | 0 | 0% | | 0 | 0% | |
| Lymphknotenstatus | | | | n.s. | | | n.s. |
| Neg | 219 | 71 | 32% | | 80 | 37% | |
| Pos | 83 | 30 | 36% | | 32 | 39% | |
| Metastasierung | | | | n.s. | | | n.s. |
| M0 | 290 | 98 | 34% | | 108 | 37% | |
| M1 | 12 | 3 | 25% | | 4 | 33% | |
| Lymphangiosis carcinomatosa | | | | n.s. | | | n.s. |
| L0 | 263 | 89 | 34% | | 98 | 37% | |
| L1 | 22 | 9 | 41% | | 8 | 36% | |
| ER Status | | | | n.s. | | | n.s. |
| Neg | 50 | 16 | 32% | | 19 | 38% | |
| Pos | 234 | 81 | 35% | | 88 | 38% | |
| PR Status | | | | n.s. | | | n.s. |
| Neg | 93 | 36 | 39% | | 29 | 31% | |
| Pos | 189 | 60 | 32% | | 78 | 41% | |
| Her-2/neu Status | | | | n.s. | | | n.s. |
| Neg | 237 | 83 | 35% | | 86 | 36% | |
| Pos | 36 | 9 | 25% | | 16 | 44% | |

Abkürzungen: n.s. – nicht signifikant

3.5. Einsetzbarkeit der RT-PCR in der klinischen Routinediagnostik

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das neu etablierte RT-PCR-basierte Verfahren im klinischen Setting an einem Kollektiv von 405 Patientinnen evaluiert. Zu den wichtigsten Aspekten der Methodenevaluation gehörten: Sensitivität/Spezifität, Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, Dauer (auch Dauer der manuellen Verarbeitung), Kosten und Personalbeteiligung.

Sowohl die RT-PCR, als auch Immunzytochemie verfügten über vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität. Die Zeit der manuellen Aufarbeitung unterschied sich nicht, jedoch die Zeit vom Anfang der Bearbeitung bis zum Ergebnis war für die RT-PCR wesentlich kürzer als für ICC (5 Stunden vs. 2 Tage). Dies wird durch nötiges Auftrocknen der Objektträger bei der Immunzytochemie bedingt. Die Kosten pro Probe waren niedriger bei der Immunzytochemie (13 € vs. 35 €), darunter werden aber die Personalkosten nicht berücksichtigt. Durch Möglichkeit der Proben-„Batching“ bei der RT-PCR wird die Personalbelastung reduziert.

In der Tab. 14 werden die beiden Verfahren hinsichtlich der relevanten Aspekte der Routinediagnostik verglichen.

Tab. 14. Methodologischer Vergleich der Standard-Immunzytochemie und RT-PCR am LightCycler

| | Immunzytochemie | RT-PCR |
|--|---|--|
| Zielantigen / Ziel-mRNA | CK 8, 18, 19 | CK19-mRNA |
| Target | Protein, stabil | mRNA, instabil |
| Sensitivität | 1-5 Zellen pro 10 ⁶ MNC | 5 Zellen pro 10 ⁶ MNC |
| Spezifität | Falsch-positive Ergebnisse: 1 / 100; Epithel-spezifischer Antikörper | Falsch-positive Ergebnisse: 1 / 100; Sequenz-spezifische Primer |
| Anreicherung | Ja (Dichtegradientenzentrifugation) | Nein |
| Dauer | 2 Tage | 5 h |
| Hand-on Zeit | 3 h | 2,5 h |
| Kosten | € 13,- / assay | € 35,- / assay |
| Möglichkeit der Proben-„Batching“ | Nein | Ja |
| Möglichkeit der langfristigen Probenasservierung | Nein (nur Zytospins) | Ja |
| Angeschlossenes Computerprogramm zur Auswertung | Ja | Ja |
| Möglichkeit der wiederholten Auswertung | Ja | Ja |
| Auswertung subjektiv | Ja | Nein |
| Ergebnis | Visuelle Darstellung der Zellen | Amplifikationskurven |
| Morphologische Kriterien in die Auswertung einbezogen | Ja | Nein |

Abkürzungen: MNC – mononukleäre Zellen; CK - Zytokeratin

4. Diskussion

Die hämatogene Tumorzell dissemination ist ein wichtiger Schritt in der metastatischen Kaskade. Trotz negativen Nodalstatus und ausreichenden Sicherheitsabstandes bei der chirurgischen Entfernung des Primärtumors müssen ca. 30% der Patientinnen aus dieser Gruppe mit einem Rezidiv oder einer Metastase rechnen. Eine präzise Abschätzung der Prognose ist somit anhand herkömmlicher klinisch-pathologischer Faktoren nicht möglich. Zur Suche nach Generalisierung der Erkrankung wird der Nachweis von DTZ im Knochenmark verwendet. DTZ können nicht nur bei Mammakarzinom, sondern auch bei anderen soliden Tumoren nachgewiesen werden (^{20, 5, 43, 39, 10}). Es stehen zahlreiche Verfahren und Protokolle zur Verfügung, wobei aufgrund der gesicherten prognostischen Relevanz (³¹) heutzutage die immunzytochemische Detektion als Goldstandardmethode gilt.

4.1. Probleme der DTZ-Detektion

Der Nachweis von DTZ im Knochenmark und Blut ist mit methodischen Problemen behaftet. Kritische Punkte und mögliche Lösungen werden in Tab. 15 zusammengefasst.

Die zweifelsfreie Einordnung der Zellen als Tumorzellen/hämatogene Zellen bereitet Schwierigkeiten. Obwohl mehrere Kriterien, wie Morphologie der Zellen oder Anfärbungstyp zur Einordnung als Tumorzelle angewendet werden, besteht die Gefahr der Subjektivität. Diese Beobachtung und methodologische Unterschiede erklären die zum Teil sehr variierenden Inzidenzen von DTZ. Diese Problematik wurde im Rahmen eines Ringversuches der International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) untersucht (²³). Die Beurteilung derselben Knochenmarkaspirate lieferte je nach Zentrum unterschiedliche Ergebnisse (Tab. 16). In Anbetracht dieser Diskrepanz erscheint die Suche nach alternativen oder ergänzenden Methoden wünschenswert.

Tab. 15. Kritische Aspekte der Detektion von disseminierten Tumorzellen

| Problem | Lösungsmöglichkeit |
|---|--|
| Fehlende Standardisierung | Konsensusempfehlungen zum standardisierten Nachweis von DTZ ⁽⁵⁰⁾ |
| Keine karzinomspezifischen Marker | Doppelfärbungen |
| Falsch-positive Ergebnisse | Kontrollen, Mehrfachfärbungen |
| Pseudogene | Verwendung von Primern, die eine Differenzierung zwischen DNA und cDNA ermöglichen (Introns überspannend etc.) |
| Kontamination zwischen RT-Schritt und PCR | „One-Step“ RT-PCR |
| Andere Kontaminationsquellen | Geschlossene Systeme (z. B. LightCycler), Schmelzkurvenanalyse |
| Kontamination mit epithelialen Zellen | KM - Beckenkampnpunktion erst nach Stichinzision; Blut – sog. Mittelstrahlblut |
| Illegitime Expression | Gute Markerauswahl (keine oder extrem niedrige Expression des Markers von hämatopoetischen Zellen) |
| Falsch-negative Ergebnisse | Kontrollen |
| Extrem niedrige Zahl von DTZ | evtl. Anreicherung (cave: Zerstörung von mRNA bei langen Anreicherungsverfahren) ⁽¹⁴⁾ |
| Antigen/Marker-Abschwächung nach Zeit | Beginn der Verarbeitung max. 30 Minuten nach der KM-Punktion |
| Subjektivität der Auswertung | Molekularbiologische Methoden; Auswertung durch min. 2 unabhängige Zytologen (falls ICC) |

Tab. 16. Ergebnisse des Ringversuches, ISHAGE (mod. nach Borgen et al., ²³)

Es wurden 48 Knochenmarkaspirate in drei verschiedenen Laboratorien mit drei Standardprotokollen auf DTZ untersucht. Die Aspire wurden aufgrund der Morphologie und des Anfärbungstyps der Zellen als KM-positiv bzw. KM-negativ beurteilt. Keine Probe wurde von mehr als einem Zentrum als KM-positiv eingeordnet.

| Verwendeter Antikörper | Zentrum | Gesamtzahl der KM-positiven Aspire |
|------------------------|----------|------------------------------------|
| A45-B/B3 | Hamburg | 1 (2%) |
| CK2 | Augsburg | 4 (8%) |
| AE1AE3 | Oslo | 1 (2%) |

Ein anderes Problem stellt eine gewisse Falschpositivität der Gesunden dar. Mehrere Studien haben gezeigt, dass CK-positive Zellen bei einem signifikanten Anteil der Kontrollpersonen immunzytochemisch nachgewiesen werden können (Tab. 17).

Tab. 17. Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen bei Kontrollpersonen (Gesunden und Patienten mit benignen Erkrankungen)

| Studie | N | Material | Kontrolle | Methode; Detektions-AK | Positiv (%) |
|---|------------|----------|-----------|---------------------------|------------------------------------|
| Muller <i>et al.</i> ⁽⁹⁵⁾ | 25 | PB | G | ICC CK 8, 18, 19 | 4 |
| Naume <i>et al.</i> ⁽⁹⁸⁾ | 98 | KM | G | ICC CK | 4 |
| Kraeft <i>et al.</i> ⁽⁸¹⁾ | 57 | PB | G | IF CK | 17 |
| Molnar <i>et al.</i> ⁽⁹³⁾ | 20 | PB | G | ICC CK 7, 8 | 10 |
| Krag <i>et al.</i> ⁽⁸²⁾ | 53 | PB | G BE | ICC CK 8, 18 | 0 |
| Wang <i>et al.</i> ⁽¹⁴⁶⁾ | 43 | PB | G | ICC CK 7, 8 | 7 ² |
| Müller <i>et al.</i> ⁽⁹⁴⁾ | 14 | PB, KM | G BE | IF CK 8, 18 | 14 |
| Braun <i>et al.</i> ⁽³⁰⁾ | 191 | KM | BE | ICC CK 8, 18, 19 | 1 |
| Racila <i>et al.</i> ⁽¹¹²⁾ | 13 | PB | G | FC | 54 ¹ |
| Cristofanilli <i>et al.</i> ⁽³⁸⁾ | 145 200 | PB | G BE | IF CK 8, 18, 19 | 1 ⁴ 0,5 ⁴ |
| Allard <i>et al.</i> ⁽⁵⁾ | 145 199 | PB | G BE | IF CK 8, 18, 19 | 6 ³ 8 ³ |

Abkürzungen: G – Gesund; BE – benigne Erkrankung; PB – peripheres Blut; KM – Knochenmark; ICC – Immunzytochemie; IF – Immunfluoreszenz; FC - Flowzytometrie

¹ Bei 7 von 13 Kontrollen epitheliale Zellen mittels Flowzytometrie nachgewiesen

² Mittels ICC nachgewiesene Zellen wiesen im FisH keine numerischen Aberrationen auf

³ Grenzwert in dieser Studie lag bei 2 Tumorzellen; bei diesem Grenzwert hätte keiner der Gesunden und nur ein Patient mit benigner Erkrankung den Grenzwert überschritten

⁴ Grenzwert: 2 epitheliale Zellen

4.2. RT-PCR-basierte Verfahren

Molekulargenetische Diagnostik hat sich seit ihrer Einführung in mehreren Bereichen als Methode der Wahl bewährt und gehören zu den sensitivsten heutzutage zur Verfügung stehenden Verfahren. Zahlreiche Protokolle zur RT-PCR-basierten Detektion von DTZ wurden in den letzten zwei Dekaden vorgeschlagen (die genaue Übersicht der verwendeten Marker und Inzidenzen ist in Kap. 4.6, Tab. 26 zu finden). Die Präsenz von Tumorzellen wird dabei durch die Amplifikation der mRNA von tumor-/gewebsassoziierten Proteinen nachgewiesen. Allerdings lassen sich die Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen aufgrund der methodologischen Diskrepanzen nur schwierig vergleichen. Zudem setzen viele der etablierten Protokolle eine aufwendige Aufarbeitung und erhebliche Personalbeteiligung voraus, sodass ihre Anwendung nur im Rahmen von Studien möglich erscheint.

Die in dieser Arbeit beschriebene RT-PCR-basierte Methode wurde hauptsächlich mit dem Ziel der klinischen Einsetzbarkeit als eine Alternative zur Immunzytochemie etabliert. Das Protokoll musste daher maximal optimiert und robust sein, um bei der üblicherweise hohen Auslastung des klinischen Laboratoriums reproduzierbare Ergebnisse zu liefern.

4.2.1. Voraussetzungen für eine effiziente Methode zur Detektion von disseminierten Tumorzellen

Neben der methodologischen Problematik ist es essentiell für eine Überführung in die Routinediagnostik, ein einfaches und unkompliziertes Verfahren zu etablieren. Mehrere Anforderungen müssen berücksichtigt werden, bevor es im klinischen Alltag eingesetzt werden kann. Tab. 18 bietet eine Übersicht über die relevanten Aspekte, die bei der Evaluation einer neu eingeführten Methode beachtet werden müssen. Gleichzeitig sollten eine adäquate Sensitivität und Spezifität des Verfahrens angestrebt werden.

Tab. 18. Voraussetzungen für ein effizientes Verfahren der Routinediagnostik

| Die wichtigsten Aspekte der Methodenevaluation |
|---|
| Hohe Sensitivität und Spezifität |
| Kurze Dauer |
| „Hand-On“ Zeit |
| Dauer Anfang der Aufarbeitung – Ergebnis |
| Robustheit |
| Niedrige Kosten |
| Wenig Störfaktoren, niedriges Kontaminationsrisiko |
| Wenig Personalbelastung |
| Reproduzierbarkeit der Ergebnisse |
| Qualitätskontrolle / Qualitätssicherung |
| Möglichkeit der Proben-„Batching“ |
| Kits / Reagenzien leicht verfügbar |
| Unterstützung des Herstellers bei Problemen |
| Möglichkeit der langfristigen Probenasservierung |
| Möglichkeit einer wiederholten Auswertung |

4.2.2. Kritische Punkte des Etablierungsprozesses

Im Allgemeinen muss die RT-PCR als ein komplexes Verfahren angesehen werden, dessen Etablierung eine Herausforderung darstellt und mit einigen Schwierigkeiten behaftet ist. Kritische Punkte der Etablierung und Optimierung wurden in Tab. 19 zusammengefasst.

Disseminierte Tumorzellen sind zum Teil bereits apoptotisch und sehr fragil und können somit durch mechanische Aufarbeitung leicht zerstört werden^(89, 86, 14). Insbesondere Anreicherungsverfahren und Zytocentrifugation sind potentiell mit einem hohen Zellverlust verbunden. Darüber hinaus erfordert der Umgang mit RNA auf Grund der sehr stabilen RNAsen wesentlich mehr Sorgfalt als der Umgang mit der robusteren DNA oder Proteinstrukturen auf intakten Zellen.

Becker *et al.* zeigten, dass sich die Menge an zellulärer mRNA in den ersten Stunden nach Probenentnahme signifikant verringert, was zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann (Abb. 23).

Tab. 19. Optimierung des Verfahrens – kritische Aspekte

| Schritte der Etablierung / Optimierung |
|--|
| Wahl des idealen Markers |
| Anreicherung von Zellen |
| Isolierung der mRNA |
| Auswahl der geeigneten RT-PCR-Methode |
| Klassisch vs. <i>Real-time</i> |
| „One-Step“ vs. „Two-Step“ |
| Verschiedene Detektionssysteme |
| Qualitativ vs. Quantitativ |

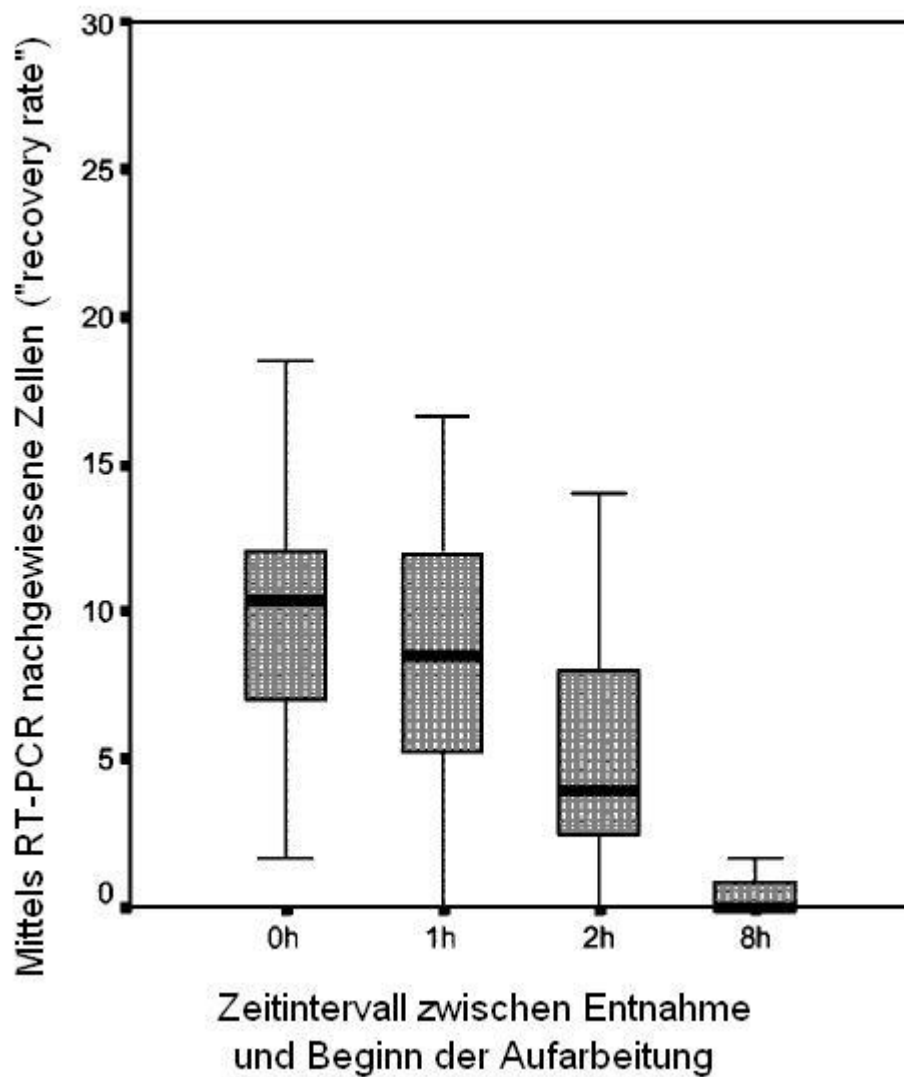


Abb. 23. Durch Spiking-Experiments mit MCF7-Zellen ermittelte Nachweisrate von Tumorzellen in Abhängigkeit vom Zeitabstand zwischen Entnahme und Beginn der Aufarbeitung
(mod. nach Becker et al., ¹⁴)

4.2.2.1. Auswahl des optimalen Markers

Zytokeratine

In der Literatur wird eine Reihe RT-PCR-basierter Protokolle zum Nachweis von DTZ beschrieben. Bei der Entwicklung einer neuen Methode erscheint es zunächst sinnvoll, sich an dem etablierten ICC-Marker zu orientieren und die

Genexpression entsprechender Proteine in Erwägung zu ziehen. Zur immunzytochemischen Detektion DTZ haben sich Zytokeratine als integrale Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen als vielversprechend erwiesen und wurden aufgrund der hohen Spezifität und stabiler Expression zu dem mit Abstand am häufigsten verwendeten Marker (^{105, 118}).

Darüber hinaus ist bekannt, dass CK-positive Zellen im Knochenmark zum großen Teil außerhalb der Gefäße nachgewiesen werden, was zur Annahme führt, dass sie einen der letzten Schritte der Metastasierungskaskade (Extravasation) erfolgreich durchlaufen haben müssen. Somit repräsentieren sie nicht eine randomisierte Subpopulation der Tumorzellen, sondern eine Subgruppe mit aggressiverem Phänotyp (¹³¹).

Eine mögliche illegitime Zytokeratin-Expression und Amplifikation ihrer mRNA in hämatopoetischen Zellen wurde zwar von manchen Autoren beobachtet (^{160, 83, 141}), jedoch berichten Studien mit einer großen Anzahl von Kontrollpatienten mit benignen Erkrankungen über eine äußerst niedrige Inzidenz CK-positiver Knochenmarkzellen (^{103, 105, 118}).

Dementsprechend analysieren die meisten RT-PCR-basierten Protokolle verschiedene Zytokeratintypen. Davon wurde das Zytokeratin 19 von den meisten Autoren getestet (^{137, 26, 18, 114, 128, 120, 129, 69, 2}). Seine Vorteile liegen in der im Vergleich zu anderen CK-Typen hohen und konstanten Expressionspezifität (¹¹). Die weniger spezifischen Zytokeratine 8, 18 und 20 können auch in nicht-epithelialen Geweben nachgewiesen werden und führen zu falsch-positiven Ergebnissen (^{35, 141, 145, 34, 85, 39}).

Die Sensitivität der RT-PCR für CK19 variiert je nach Studie zwischen 1 und 10 Zellen pro 10^6 MNC und ist somit sensitiver als die Immunzytochemie (^{139, 141, 121, 40}).

Alternativmarker

Zu den bisher untersuchten Markern zum Nachweis von DTZ zählen außer Zytokeratinen das humane Mammaglobin (hMAM), das Carcinoembryonale Antigen (CEA) und der Rezeptor des Epithelialen Wachstumsfaktors (EGFR). Allerdings bleibt ihre Spezifität kontrovers (^{160, 3}). Einige Studien konnten zeigen, dass die Expression von hMAM und CEA in Blut- und KM-Zellen durch manche Zytokine (vor allem Akutphase - Interferon und Tumornekrosefaktor) induziert wird und somit zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann (^{79, 85}). Darüber hinaus scheint die Expression des Mammaglobins von der jeweiligen Brustkrebsart abhängig zu sein. Daher erlaubt seine Genexpression nicht unbedingt den Rückschluss auf die hypothetische Anzahl der Tumorzellen (¹⁵⁵).

4.2.2.2. Anreicherung der Zellen

Mehrere Anreicherungsverfahren, sowohl Selektionsmethoden wie Dichtegradientenzentrifugation, als auch positive und negative Selektion mittels Antikörper, können theoretisch die Sensitivität der Detektion von DTZ erhöhen. Aus diesem Grund werden sie oft mit Immunzytochemie kombiniert. Allerdings beruht die RT-PCR im Gegensatz zu ICC nicht auf einer stabilen Proteinexpression, sondern auf der Amplifikation instabiler mRNA. Nach der Initiierung der Transkription ist die Regulation der Halbwertszeit einer mRNA ein wichtiger Regulationsprozess. Die mRNA der Proteine, die konstant exprimiert werden (wie z. B. Zytokeratine), scheint zwar im Vergleich zur mRNA instabiler Proteine eine längere Halbwertszeit zu haben, es muss aber trotzdem eine rasche Probenverarbeitung angestrebt werden, da der rapide und fortschreitende Abbau durch die im menschlichen Gewebe allgegenwärtig vorhandenen RNAsen eine der wichtigsten Limitationen aller RT-PCR-basierten Verfahren darstellt. Die Zeit zwischen Knochenmark-aspiration und der RNA-Stabilisierung ist somit ein wichtiger Faktor für die Qualität der anschließenden RT-PCR (¹⁴). Der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Vergleich verschiedener Anreicherungsverfahren ergab keine zufriedenstellenden Resultate für die Anreicherung, wobei sowohl

Dichtegradientenzentrifugation, als auch positive Selektion getestet wurden. Dies kann auf die sehr zeitaufwendige Aufarbeitung und die damit verbundene Gefahr der RNA-Degradierung zurückgeführt werden und entspricht auch den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (³³).

Ein anderer Aspekt, der in diesem Kontext berücksichtigt werden muss, ist die Einsetzbarkeit in der klinischen Routine. Heutzutage wird die Labordiagnostik mit dem Ziel der Chargierung („Batching“) der Proben für die spätere Aufarbeitung optimiert. Ein individualisiertes Vorgehen im Fall von aufwendigen, mehrere Stunden dauernden Protokollen wäre kaum denkbar. Magnetische und zentrifugationsbasierte Anreicherungsverfahren bedürfen mindestens 40-50 Minuten (manche Protokolle sogar bis einige Stunden), bevor sich das Material in einem RNA-stabilisierenden Milieu befindet. Somit ist das Chargieren der Proben zwar möglich, der tägliche Arbeitsaufwand aber sehr hoch.

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll verzichtet daher auf den Anreicherungsschritt und beinhaltet das sofortige Hinzufügen einer mRNA-stabilisierenden Reagenz. Auf diese Weise angefertigte Proben können bis zum Erreichen einer genügenden Anzahl eingefroren bleiben („Batching“).

4.2.2.3. mRNA-Isolierung

Wie oben bereits erwähnt, ist RNA im Gegensatz zu DNA sehr instabil. Aus diesem Grund beruhen alle RNA-Isolierungsverfahren darauf, die Zellen in einem RNA-stabilisierenden Milieu zu lysieren, in dem die RNAsen effektiv und schnell denaturiert werden, um anschließend die RNA von zellulären Bestandteilen zu trennen. Die bekannte Inhibition der Taq-Polymerase und somit der PCR durch Häm-Derivate erfordert eine fehlerfreie Trennung der Erythrozyten von RNA (⁴).

Von den unterschiedlichen Herstellern werden fertige Kits zur Isolierung von Gesamt-RNA oder mRNA aus Blut/Knochenmark angeboten. In der Literatur werden beide Verfahren beschrieben, wobei die meisten Autoren Isolierung der

Gesamt-RNA bevorzugen (^{37, 18, 109}). Allerdings konnten Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die direkte Isolierung von mRNA einige Vorteile gegenüber der Gesamt-RNA-Isolierung bietet. Die erreichte Sensitivität der anschließenden „One-Step“ RT-PCR nach mRNA-Isolierung war höher (5 Zellen pro 10^6 MNC vs. 50 Zellen pro 10^6 MNC nach Gesamt-RNA-Isolierung). Auch aus der Arbeit von Burchill *et al.* lässt sich eine bessere Sensitivität und Reproduzierbarkeit von poly-A+ RNA-Isolierung im Vergleich zur Gesamt-RNA behaupten. Dies kann auf hohe, die Effizienz der PCR vermindern Konzentrationen von unnötiger cDNA zurückgeführt werden (³³).

4.2.2.4. Auswahl der geeigneten RT-PCR-Methode

Die *real-time* PCR ist eine neuartige Technologie, die zu Beginn der 1990er Jahre eingeführt wurde und seit einer Dekade für den kommerziellen Markt verfügbar ist. Diese Methodik erlaubt den Nachweis von Genprodukten und gleichzeitig die absolute bzw. relative Quantifizierung des PCR-Produkts. Das Konzept der *real-time* Verfahren beruht auf einer visuellen „*live*“-Verfolgung der Veränderungen im Reaktionsgefäß. Die Amplifikation entsprechender Nukleinsäuren wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während jedes PCR-Zyklus quantifiziert und bietet somit einen wesentlichen Vorteil gegenüber anderen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden. Dazu beinhaltet die *real-time* PCR alle Vorteile einer konventionellen PCR, nämlich Schnelligkeit, hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit. Dank des Entfallens einer langen und aufwendigen Auswertung mittels Gelelektrophorese eignet sich die *real-time* RT-PCR besonders für die Routinearbeit eines klinischen Labors (siehe Tab. 20).

LightCycler-Technologie

Das LightCycler-System ist eines der kommerziell erhältlichen *real-time* PCR Systeme und wird zum Nachweis von DTZ bei soliden Tumoren von mehreren Arbeitsgruppen weltweit eingesetzt (^{71, 137, 39, 56}). Das System besteht aus einer karussellbasierten Thermocycler-Plattform mit sechs Detektionskanälen für die

Fluoreszenzdetektion und integriert Hybridisierungssonden, Echtzeit-Schmelzkurvenanalyse, automatisierte absolute Quantifizierung und relative Quantifizierung mit Effizienzkorrektur. Vorteile der RT-PCR am LightCycler-System gegenüber klassischer PCR werden in Tab. 20 zusammengefasst. Demzufolge erfüllt das LightCycler-System alle Anforderungen eines effizienten, für die Routine geeigneten *real-time* RT-PCR Systems, vor allem durch das niedrige Kontaminationsrisiko, eine hohe Spezifität, die enorme Zeitersparnis und die Möglichkeit der Proben-„Batching“.

Tab. 20. Vergleich der konventionellen RT-PCR und RT-PCR am LightCycler-System

| | Konventionelle RT-PCR | RT-PCR am LightCycler |
|--|-----------------------|--|
| Gelelektrophorese nötig | Ja | Nein |
| Möglichkeit der relativen Quantifizierung | Ja (limitiert) | Ja |
| Möglichkeit der absoluten Quantifizierung | Nein | Ja |
| Geschlossenes System | Nein | Ja (Glaskapillaren) |
| Kontaminationsrisiko | Möglich | Sehr gering |
| „One-Step“ Verfahren | Nein | Ja |
| Hand-on Zeit | 20 min | 20 min |
| Dauer | 4-5 h | 1-1,5 h (Optimierung: Luft als Temperaturmedium, kleines Volumen der Kapillare) |
| Reproduzierbarkeit | Mittelhoch | Sehr hoch |
| Personalaufwand | Hoch | Niedrig |
| Spezifität | Hoch | Sehr hoch (Hybridisierungssonden- und FRET-Technologie) |
| Real-time Auswertung | Nein | Ja |
| Möglichkeit einer Multiplex-PCR | Ja | Ja |
| Maximale Anzahl der Proben | i.d.R. 96 | 32 |
| Unerwünschte Signalstörungen | Möglich | Reduziert (günstiges Signal-Rausch-Verhältnis durch schnelle Äquilibrierung zwischen der Luft und den Reaktionskomponenten) |
| Möglichkeit der Proben-„Batching“ | Ja | Ja |
| Angeschlossenes Computerprogramm zur Auswertung | Nein | Ja |

Abkürzungen: FRET - Fluoreszenzresonanz-Energietransfer

4.3. Einsetzbarkeit der RT-PCR in der klinischen Routinediagnostik

Die RT-PCR und Immunzytochemie wurden an einem großen Kollektiv im klinischen Alltag verglichen. Beide Verfahren verfügen über ähnliche Sensitivität und Spezifität. Die RT-PCR ist aufwendiger, da sie als Target die instabile mRNA statt stabilen Proteins hat. Die Vorteile der RT-PCR liegen in der kürzeren Dauer und Möglichkeiten der Proben-„Batching“. Nach der mRNA-Isolation folgt die automatisierte „One-Step“ RT-PCR. Das Ergebnis kann schon nach 5 Stunden nach dem Anfang der Aufarbeitung erwartet werden. Immunzytochemie liefert das Ergebnis erst am nächsten Tag (Abtrocknen der Zytospins über Nacht). Die Auswertung der Amplifikationskurven ist weniger subjektiv und die Proben können langfristig asserviert werden. Zu den Nachteilen der RT-PCR gehören höhere Kosten (13 € vs. 35 €). Dies wird allerdings durch weniger Personalbelastung (Proben-„Batching“) relativiert. Die RT-PCR erfüllt somit die Anforderungen an ein effizientes Verfahren zum Nachweis disseminierter Tumorzellen.

Die beiden Methoden wurden hinsichtlich relevanter Aspekte der klinischen Routinediagnostik in der Tab. 14 verglichen (S. 57). Tab. 21 fasst die Vorteile der beiden Verfahren zusammen.

Tab. 21. Vorteile beider Methoden im Vergleich

| |
|--|
| Vorteile der RT-PCR |
| Hohe Sensitivität und Spezifität |
| Kürzere Dauer (5 h vs. 2 Tage) |
| Weniger Personalbeteiligung |
| Auswertung weniger subjektiv |
| Möglichkeit der Proben-„Batching“ |
| Vorteile der Immunzytochemie |
| Hohe Sensitivität und Spezifität |
| Robustheit |
| Niedrigere Kosten (13 € vs. 35 €) |
| Möglichkeit der morphologischen Beurteilung |
| In mehreren Studien nachgewiesene Korrelation mit der Prognose |

4.4. Korrelation beider Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Knochenmarkproben von insgesamt 405 Patientinnen mit dem Goldstandard-Verfahren Immunzytochemie und mit dem neu etablierten RT-PCR-Protokoll untersucht. 48% der Aspiate wurden mit mindestens einem Verfahren als positiv diagnostiziert. Die Ergebnisse beider Methoden korrelierten in 73% der Fälle ($p < 0,001$ mit Chi-Quadrat-Test). Die hoch signifikante Korrelation zwischen immunzytochemischem Befund und RT-PCR-Ergebnis wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen berichtet, allerdings basieren diese Studien auf kleineren Patientinnenzahlen (^{18, 158}). Eine niedrigere Konkordanz bei primären Mammakarzinompatientinnen und eine etwas höhere im metastasierten Kollektiv wird von Slade *et al.* beschrieben (¹²⁸). Auch im peripheren Blut scheint die Korrelation hoch zu sein (¹²⁹). Tab. 22 fasst die Studien zusammen, die anhand desselben Patientenkollektivs Ergebnisse der Immunzytochemie und der RT-PCR vergleichen.

4.4.1. Positivitätsraten

Die Positivitätsraten von ICC und RT-PCR waren vergleichbar (34% und 35%, respektive). Die Untersuchung lieferte in 111 Knochenmarkaspiraten diskordante Befunde. In 54 (13%) Proben konnten CK-positive Zellen im KM nachgewiesen werden, die RT-PCR zeigte aber keine CK19-Amplifikation. Hingegen waren 14% der Aspirate mittels RT-PCR positiv, die ICC lieferte aber ein negatives Ergebnis.

In diesem Kontext müssen verschiedene Aspekte der Sensitivität und Spezifität der Methoden und mögliche Erklärungen dieser Diskrepanz besprochen werden.

Tab. 22. Konkordanzraten zwischen immunzytochemischen und RT-PCR-basierten Verfahren zum Nachweis von Tumorzelldissemination

| Studie | Marker | | Patientenzahl | Material | Sensitivität (pro 10 ⁷ MNC) | | Positivitätsrate | | Konkordanzrate |
|--|-------------------------|--|--|----------|--|---------------------|---|--|--------------------------|
| | ICC | RT-PCR | | | ICC | RT-PCR | ICC | RT-PCR | |
| Zippelius <i>et al.</i> , 1997 ⁽¹⁶⁰⁾ | A45-B/B3 CK18 PSA | PSA, PSM, <i>erb</i> -B2, <i>erb</i> -B3, CEA, CK18, EGP-40, DPI I | 10 ⁽¹⁾ , 53 ⁽²⁾ | KM | k.A. | 12.5 | k.A. | 28% ⁽³⁾ | k.A. |
| Benoy <i>et al.</i> , 2004 ⁽¹⁸⁾ | A45-B/B3 | CK19, hMAM | 29 ^(1b) | KM | 100 | 5-10 ⁽⁷⁾ | 62% | 40-80% ⁽⁸⁾ | 75% (CK19) 70% (hMAM) |
| Smith <i>et al.</i> , 2000 ⁽¹²⁹⁾ | A45-B/B3 | CK19 | 22 ⁽⁴⁾ | PB | k.A. | 1 | 42% | 50% | 65% |
| Slade <i>et al.</i> , 1999 ⁽¹²⁸⁾ | A45-B/B3 | CK19 | 60 ⁽¹⁾ | KM, PB | k.A. | 1 | PB: 22% ^(1b) , 9% ^(1a) KM: 43% ^(1a) | PB: 54% ^(1b) , 13% ^(1a) KM: 61% ^(1a) | 50% ^(1a) |
| Bosma <i>et al.</i> , 2002 ⁽²⁴⁾ | CK19 | CK19, p1B, PS2, EGP-2 | 103 ^(1b) | PB | k.A. | k.A. | 16% | 28% ⁽⁵⁾ | 63% |
| Schroeder <i>et al.</i> , 2003 ⁽¹²³⁾ | EGP-2, CK19 | EGP-2, CK19 | 58 ⁽¹⁾ ⁽⁶⁾ | PB | 5 | 10 | 0% | 10-11% | 89-90% |
| Schoenfeld <i>et al.</i> , 1997 ⁽¹²⁰⁾ | CK19 | CK19 | 78 ⁽¹⁾ | KM, PB | 100 | 10 | PB: 5% KM: 22% | PB: 25% KM: 35% | k.A. |

Abkürzungen: ICC – Immunzytochemie; MNC – mononukleäre Zellen; k.A. – keine Angaben; KM – Knochenmark; PB – peripheres Blut; CK – Zytokeratin; hMAM – humanes Mammaglobin

⁽¹⁾ Mammakarzinom (^{1a} – primäres, ^{1b} – metastasiertes Mammakarzinom)

⁽²⁾ Prostatakarzinom (M0)

⁽³⁾ PSA bei Prostatakarzinompatienten

⁽⁴⁾ 145 Proben von 22 Patienten

⁽⁵⁾ Vier Marker kombiniert

⁽⁶⁾ 149 Proben von 58 Patienten

⁽⁷⁾ CK19 – 5, hMAM - 10 Zellen pro 10⁷ MNC

⁽⁸⁾ CK19 – 80%, hMAM – 40%

4.4.2. Sensitivität des Tumorzellnachweises

Die Studien von Bostick *et al.* und Ko *et al.* beobachten eine schwache basale CK19-Expression in hämatopoetischen Zellen ^(25, 77), die zu falsch-positiven

Ergebnissen führen kann. Somit wird die Spezifität von der Sensitivität direkt beeinflusst, da eine verbesserte Sensitivität des Verfahrens gleichzeitig die Gefahr mit sich bringt, dass auch die extrem niedrige CK19-Expression der nicht-epithelialen Zellen als positiver Befund gewertet wird. Die Festlegung eines Cut-Off-Niveaus zur Vermeidung dieses Problems wäre denkbar, allerdings sind quantitative *real-time* RT-PCR Techniken aufgrund anspruchsvoller Auswertung äußerst aufwendig und schwer in der klinischen Routine einsetzbar. Aus diesem Grund hat unsere Arbeitsgruppe bei der Etablierung des RT-PCR basierten Verfahrens zum Nachweis von DTZ bewusst auf die Quantifizierung verzichtet.

Die Mehrzahl der Studien beschreibt eine bis zu 20-mal höhere Sensitivität der RT-PCR verglichen mit Immunzytochemie⁽¹⁸⁾. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse beider Methoden waren allerdings vergleichbar hinsichtlich der Positivitätsrate (RT-PCR: 35%, ICC: 34%). Die Frage, ob eine erhöhte Sensitivität zur besseren Einsetzbarkeit der Methode beiträgt, bleibt kontrovers. Wiedswang *et al.* zeigte anhand von 464 Knochenmarkaspiraten, dass die Analyse von 6×10^6 anstelle von nur 2×10^6 MNC und die Verwendung zusätzlicher Anreicherungsverfahren zwar die Sensitivität des Assays steigert, aber keineswegs die prognostische Relevanz im Hinblick auf das erkrankungsfreie Überleben verbessert⁽¹⁴⁷⁾. Ein Erklärungsmodell für diese Beobachtung setzt voraus, dass bei der Mehrheit der Mammakarzinome einzelne Tumorzellen in die Blutbahn gelangen können, und somit nicht die alleinige Präsenz von DTZ, sondern vielmehr die Effizienz der Intravasation und die damit verbundene Konzentration der im Knochenmark vorhandenen Zellen prognostisch aussagekräftig ist⁽¹⁵²⁾.

4.4.3. Diskordante Befunde

54 KM-Aspirate waren immunzytochemisch positiv, es wurde aber keine Amplifikation von CK19-mRNA gemessen (Tab. 23). Dies wird auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet^(129, 120) und kann verschiedene Ursachen haben. Erstens ist der für die immunzytochemische Färbung verwendete

Antikörper gegen die Zytokeratintypen 8, 18 und 19 gerichtet, wobei die RT-PCR nur CK19-mRNA amplifiziert. Ferner liegt die Vermutung nahe, dass sich zumindest manche von den ICC-gefärbten Zellen im Dormancy-Zustand befanden, was einen herabgesetzten Metabolismus und dadurch eine schwächere mRNA-Synthese bedingt hat. Auch apoptotische Zellen können immunzytochemisch als positiv beurteilt werden, vor allem wenn die morphologischen Kriterien in die Auswertung nicht strikt einbezogen werden. Ferner können die Expressionslevel von CK19-mRNA aufgrund der Tumoheterogenität innerhalb einer Patientin stark variieren. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Amplifikation der CK19-mRNA trotz ihres Vorhandenseins im Material aus verschiedenen methodologischen Gründen misslang und auf diese Weise zu falsch-negativen Befunden beitrug. Bei jeder PCR können beispielsweise Inhibitoren im Probenmaterial oder eine fehlerhafte Basenpaarung (Mismatch) des Primers vorkommen, wodurch sich die Polymerase nicht richtig anlagert. Weiterhin hängt die Detektion einer einzelnen Tumorzelle direkt von der Menge des zu untersuchenden Materials ab. Eine KM-Probe kann realistisch gesehen 10-20 ml nicht überschreiten, was einer erwünschten Sensitivität von 1 Zelle pro 10^6 MNC entspricht. Jedes Nachweisverfahren funktioniert also auch bei maximaler Optimierung an den Grenzen der Möglichkeiten der Detektion. Ein weiterer Grund für die Diskrepanz liegt darin, dass die Expression des Proteins nicht unbedingt mit der Menge der entsprechenden mRNA in der Zelle korrelieren muss.

Tab. 23. Zahl der positiven Knochenmarkaspirate mittels Immunzytochemie und RT-PCR (diskordante Befunde – 27%)

| | <i>ICC positiv</i> | <i>ICC negativ</i> | Total |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| <i>RT-PCR positiv</i> | 85 (21%) | 57 (14%) | 142 (35%) |
| <i>RT-PCR negativ</i> | 54 (13%) | 209 (52%) | 263 (65%) |
| Total | 139 (34%) | 266 (66%) | 405 (100%) |

Im Fall von 57 KM-Aspiraten wurden immunzytochemisch keine DTZ detektiert, dennoch wurde mit RT-PCR eine CK19-Expression nachgewiesen. Neben möglichen Erklärungen, wie die niedrige Korrelation der Protein- und mRNA-Expression und ein unterschiedliches Sensitivitätsspektrum, können auch Gründe wie beispielsweise eine illegitime Expression verantwortlich sein. In diesem Kontext müssen verschiedene Aspekte der falsch-positiven Ergebnisse diskutiert werden. Drei prinzipielle Gründe falsch-positiver Ergebnisse scheinen eine Rolle zu spielen: (1) illegitime Expression von CK19-mRNA in hämatopoetischen Zellen, (2) Amplifikation von Pseudogenen und (3) Präsenz kontaminierender epithelialer Zellen (¹²⁸).

4.4.3.1. Illegitime Transkription

Der Begriff „illegitime Transkription“ wurde 1989 von zwei Arbeitsgruppen eingeführt und beschreibt den Nachweis von gewebespezifischen Markern in gewebetyp-unspezifischen Zellen und somit die Fähigkeit einer jeden Zelle, jede mRNA des gesamten Transkriptoms eines Organismus exprimieren zu können (^{36, 117}). Es wird vermutet, dass während der DNA-Replikation jeder Promotor durch ubiquitär vorhandene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden kann, was zu einer geschätzten Expression von einem Transkript in 500-1000 Zellen führt (¹⁶¹). Diese niedrige basale Expression von mRNA stellt eine der wesentlichen Limitationen beim Routineeinsatz der hochsensitiven RT-PCR-basierten Verfahren zur Detektion einzelner DTZ dar. Trotzdem wurde dieses Phänomen seit der ersten Beschreibung von Chelly *et al.* relativ wenig erforscht. Einige Studien weisen darauf hin, dass chronisch-entzündliche Erkrankungen, Stimulation mit Interleukinen und γ -Interferon oder Mobilisation von Stammzellen mit G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) eine ektope Transkription der zum Nachweis von DTZ verwendeten Marker induzieren können (^{72, 63}).

Eine illegitime Expression von CK19-mRNA kann man zwar nicht vollständig ausschließen, allerdings zeigten zahlreiche Studien, dass der Nachweis von

CK19-mRNA den anderen Markern wie Muzin-1 oder polymorphes epitheliales Muzin in der Spezifität überlegen ist (^{19, 104}, siehe auch Kap. 4.2.2.1).

4.4.3.2. Pseudogene

Pseudogene sind genomische DNA-Abschnitte, die hohe Ähnlichkeit mit funktionellen Genen aufweisen, in der Regel aber selbst nicht transkribiert werden können (¹⁴⁴). Ihre Sequenz ähnelt der zellulären mRNA-Sequenz so stark, dass sie zur Amplifikation von PCR-Produkten führt, die von dem Amplifikon aus cDNA kaum zu unterscheiden sind. Somit können Pseudogene zu Falsch-Positivität beitragen. In der Literatur wurden vier CK19-Pseudogene auf den Chromosomen 4, 6, 10 und 12 beschrieben. Ihre Sequenz ist mit der CK19-mRNA in bis zu 85% identisch (¹⁵⁷). Diese Pseudogene konnten den diagnostischen Erfolg vieler Protokolle zum Nachweis von DTZ beeinträchtigen und erklären auch teilweise die hohe Positivitätsrate unter gesunden Kontrollpersonen, die manche Arbeitsgruppen berichteten (^{32, 83, 43}). Ruud *et al.* zeigten, dass es sich in diesen Studien um Primer handelte, die sowohl CK19-mRNA als auch die Pseudogensequenzen amplifizieren konnten (¹¹⁶). Aus diesem Grund wurden die in unserer Studie verwendeten Primer mit dem Ziel der Differenzierung zwischen DNA und cDNA und somit Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse aufgebaut. Dies wird durch das spezielle Primer- und Sondendesign erreicht, in dem die Introns des CK19-Gens überspannt werden und nur mRNA amplifiziert wird, ohne dass möglicherweise vorhandene DNA eine Fehlerquelle darstellt. In dieser Hinsicht ist es auch extrem wichtig, jegliche DNA-Kontamination während der Probenverarbeitung zu vermeiden, im Sinne von Kreuzkontaminationen (Verschleppung der Nukleinsäuren zwischen den Proben) oder „*Carry-Over*“ (DNA aus vorangegangenen PCR-Läufen). Durch den Einsatz der LightCycler „One-Step“ RT-PCR konnten in unserer Studie diese potentiellen Kontaminationsquellen verhindert werden, da die cDNA-Synthese und die anschließende PCR in einem Gefäß durchgeführt wurden, ohne das Gefäß während der Reaktion öffnen zu müssen. Auch die Schmelzkurvenanalyse konnte keine DNA detektieren.

4.4.3.3. Kontamination mit epithelialen Zellen

Während der Knochenmarkpunktion kann es zur Verschleppung der Hautzellen kommen. Da CK19 zu den gewebspezifischen, nicht aber tumorspezifischen Markern gehört, würden diese Proben ein positives Ergebnis liefern. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die Beckenkammpunktionen erst nach einer Hautstichinzision durchgeführt. Beim Nachweis von DTZ im peripheren Blut ist es stattdessen ratsam, das so genannte Mittelstrahlblut zu untersuchen.

4.5. Korrelation mit etablierten klinisch-histologischen Faktoren

Knochenmarkaspirate von 405 Patientinnen wurden sowohl mittels ICC, als auch RT-PCR untersucht. Die Positivitätsraten waren 34% in der ICC und 35% mittels RT-PCR. Das Patientenkollektiv wurde in vier Subgruppen eingeteilt:

- Patientinnen mit primärem Mammakarzinom, bei denen eine primäre Operation durchgeführt wurde (302 Pat.);
- Patientinnen mit primärem Mammakarzinom, bei denen eine neoadjuvante Chemotherapie und anschließende Operation durchgeführt wurden (29 Pat.);
- Patientinnen mit Mammakarzinom in der Vorgeschichte, die zum Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme mit Rezidiv / Metastase diagnostiziert wurden (19 Pat.);
- Patientinnen mit Mammakarzinom in der Vorgeschichte, die zum Zeitpunkt der Knochenmarkaspiration gesund waren (55 Pat.).

Die höchsten Positivitätsraten wurden in Kollektiven der Patientinnen mit Rezidiv/Metastase und Patientinnen nach neoadjuvanter Therapie beobachtet. In der Subgruppe mit Rezidiv/Metastase waren 58% immunzytochemisch und 42% mittels RT-PCR Tumorzell-positiv. Die hohen Positivitätsraten im

metastasierten Kollektiv wurden in zahlreichen Studien beobachtet (⁷⁴). Nach der neoadjuvanten Chemotherapie wiesen hingegen 55% in der ICC und 48% mittels RT-PCR Tumorzellen auf.

4.5.1. Tumorzeldissemination und neoadjuvante Therapie

Die neoadjuvante systemische Therapie ist eine etablierte Strategie zur Reduktion der Tumormasse vor der geplanten chirurgischen Resektion. Gleichzeitig kann die Chemosensitivität des Tumors *in vivo* getestet werden und eine genauere Aussage hinsichtlich der Prognose gestellt werden (¹⁵¹). Eine komplette pathologische Remission lässt eine Eradikation der minimalen residualen Erkrankung vermuten. Allerdings werden 15-25% dieser Patientinnen innerhalb von 5 Jahren mit Metastasen diagnostiziert (⁴⁸). Das Monitoring der Tumorzeldissemination im Knochenmark oder Blut kann zur Überwachung während und nach der neoadjuvanten Therapie beitragen. Die Inzidenz von DTZ nach der präoperativen Chemotherapie ist generell höher als in der Gruppe der primär operierten Patientinnen, denen eine systemische Therapie noch bevorsteht (⁴⁸). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Tab. 24). Beachtet man jedoch die klinisch-histologischen Merkmale dieser zwei Kollektive, wird die unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Gruppen deutlich. Patientinnen, bei denen eine neoadjuvante Therapie durchgeführt wurde, befanden sich zunächst in einem fortgeschrittenen Stadium mit positivem Nodalstatus. Zum Anderen wies ein Hauptanteil der Patientinnen einen Resttumor trotz Chemotherapie auf. Bekanntermaßen sind nicht nur progressiv wachsende, sondern auch die sich in der Regressionsphase befindlichen Tumore fähig, Tumorzellen zu streuen (¹⁰¹).

Tab. 24. Anteil der Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark in unterschiedlichen Subkollektiven

| | Immunzytochemie | RT-PCR |
|--|-----------------|--------|
| <i>Primäre operative Therapie</i> | 33% | 37% |
| <i>Nach der neoadjuvanten Therapie</i> | 55% | 48% |

Die niedrigste DTZ-Positivitätsrate wurde in der Subgruppe der Patientinnen mit Mammakarzinom in der Vorgeschichte ohne Hinweis auf Reaktivierung der Erkrankung erfasst. Nichtsdestotrotz konnten im Knochenmark von 15%-20% Patientinnen (je nach Methode) Tumorzellen detektiert werden. Möglicherweise kann der DTZ-Nachweis solche Patientinnen identifizieren, die von einer zusätzlichen oder aggressiveren Behandlungsstrategie profitieren würden⁽¹⁵⁾.

4.5.2. Tumorzell dissemination und klassische klinisch-histologische Faktoren

Zwischen dem immunzytochemischen bzw. RT-PCR-basierten Tumorzellnachweis wurde keine direkte Korrelation mit Patientencharakteristika oder klinisch-histologischen Faktoren (Lokalisation des Tumors, Grading, Histologie, AJCC-Stadium, T-Stadium, Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus und Her-2/neu-Status) gefunden. Dies steht nicht im Gegensatz zu einer umfassenden Metaanalyse⁽³¹⁾, da diese Studie auf einem wesentlich größeren Patientenkollektiv beruhte und dadurch über eine höhere statistische Power verfügte. Tab. 25 stellt eine Übersicht der bisherigen Publikationen zu diesem Thema dar. Fünf von zehn genannten Originalarbeiten weisen auf eine signifikante Korrelation zwischen KM-Status und Tumorgröße, Nodalstatus bzw. ER-Status hin. Einzelne Studien berichten über die Assoziation der Tumorzell dissemination mit Grading, PR- und HER2-Status. Fehm *et al.* zeigten, dass Tumore mit höherem Proliferationsindex (Ki-67) und stärkerer p53-Expression häufiger einen positiven KM-Status aufweisen.

Tab. 25. Korrelation zwischen Tumorzelldissemination und tumorbiologischen / klinisch-histologischen Faktoren des Primärtumors(mod. nach Fehm et al., ⁴⁹)

| Studie | N | Positivitätsrate | Stadium | Tumorgröße | LK-Status | Grading | Histologie | ER | PR | p53 | bcl-2 | HER2 | Ki-67 |
|--------------------------|------|-------------------------|---------|------------|-----------|---------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Braun ³¹ | 4703 | 31% | I-III | <0.01 | <0.01 | n.s. | n.s. | <0.01 | <0.01 | - | - | - | - |
| Naume ⁹⁶ | 827 | 13% | I-III | <0.05 | <0.01 | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | - | <0.05 | - |
| Fox ⁵⁸ | 214 | 20% | I-III | n.s. | n.s. | <0.01 | - | <0.05 | - | - | - | - | - |
| Molino ⁹¹ | 109 | 31% | I-II | n.s. | n.s. | - | - | n.s. | - | - | - | - | n.s. |
| Diel ⁴¹ | 727 | 43% | I-III | <0.01 | <0.01 | <0.01 | - | n.s. | n.s. | - | - | - | - |
| Harbeck ⁶⁵ | 100 | 38% | I-III | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | - | - | - | - |
| Mansi ⁸⁸ | 350 | 25% | I-III | <0.01 | <0.01 | - | - | <0.05 | - | - | - | - | - |
| Wiedswang ¹⁴⁷ | 817 | 13% | I-III | <0.05 | <0.01 | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | - | n.s. | - |
| Gaforio ⁶⁰ | 92 | 62% | I-IV | n.s. | <0.05 | - | n.s. | <0.05 | n.s. | n.s. | - | n.s. | n.s. |
| Pierga ¹¹⁰ | 75 | 59% | I-IV | <0.05 | n.s. | n.s. | n.s. | <0.05 | n.s. | - | - | - | - |
| Fehm ⁴⁹ | 508 | 40% | I-III | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | <0.05 | <0.05 | <0.05 | n.s. | <0.05 | <0.05 |
| Unsere Studie | 302 | ICC: 34% RT-PCR: 35% | I-IV | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | - | - | n.s. | - |

Abkürzungen: LK - Lymphknotenstatus

4.6. Korrelation mit Follow-Up

Einer der Vorteile der immunzytochemischen Verfahren zur Detektion von DTZ ist, neben der morphologischen Beurteilung der Zellen, die nachgewiesene Korrelation mit dem Überleben. Zahlreiche Studien, deren Ergebnisse teilweise in einer Metaanalyse mit über 4000 Patientinnen zusammengefasst wurden, zeigten einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben, Brustkrebs-spezifischen Überleben und Erkrankungsfreien Überleben im Kollektiv mit DTZ verglichen mit Knochenmark-negativen Patientinnen (³¹).

Im Vergleich zur Immunzytochemie ist die prognostische Aussagekraft RT-PCR-basierter Protokolle weniger erforscht. Einerseits wird RT-PCR zum Nachweis von DTZ seit relativ kurzer Zeit verwendet, andererseits wäre eine retrospektive multi-center Metaanalyse mit hoher Patientenzahl aufgrund methodischer Differenzen einzelner Verfahren nur schwer durchführbar. In Tab. 26 werden Studien dargestellt, die Tumorzell dissemination mit Hilfe von RT-PCR untersuchten, allerdings wurden bis jetzt nur wenige mit einer adäquaten Anzahl von Follow-Up Proben publiziert. *Bis dato* zeigten nur drei Studien eine Korrelation zwischen dem molekularbiologisch ermittelten KM-Status und dem Gesamt- bzw. krankheitsfreien Überleben. Somit ist die Datenlage bezüglich der prognostischen Bedeutung viel weniger klar als im Fall der Immunzytochemie.

Tab. 26. Prognostische Aussagekraft der RT-PCR-basierten Verfahren zum Nachweis von DTZ

| Studie | Marker | Material | Patienten- zahl | Detektions- rate | Prognostische Relevanz |
|--|---------------|----------|--------------------|--|---|
| Zach <i>et al.</i> , 2002 ⁽¹⁵⁶⁾ | hMAM | PB | 467 | 11% | OS |
| Benoy <i>et al.</i> , 2006 ⁽¹⁷⁾ | CK19, hMAM | KM, PB | 148 | CK19: 28% im KM; 15% im PB. hMAM: 20% im KM und im PB | DFS, OS ¹ |
| Stathopoulou <i>et al.</i> , 2002 ⁽¹³⁹⁾ | CK19 | KM, PB | 198 | KM: 63% ² , 74% ³ ; PB: 30% ² , 52% ³ | DFS, OS ⁴ |
| Xenidis <i>et al.</i> , 2006 ⁽¹⁵³⁾ | CK19 | PB | 167 ⁵ | 22% | DFS, OS |
| Ntoulia <i>et al.</i> , 2006 ⁽⁹⁹⁾ | hMAM-A | PB | 140 | 15% | DFS |
| Smith <i>et al.</i> , 2000 ⁽¹²⁹⁾ | CK19 | PB | 22 ⁶ | 50% | Korreliert mit Therapie- ansprechen |
| Sienel <i>et al.</i> , 2007 ⁽¹²⁴⁾ | MAGE-A | KM | 50 ⁷ | 52% | DFS ⁵ |
| Koch <i>et al.</i> , 2006 ⁽⁷⁸⁾ | CK20 | KM, PB | 90 ⁸ | - | DFS |

Abkürzungen: MNC – mononukleäre Zellen; KM – Knochenmark; PB – peripheres Blut; DFS (disease-free survival) – krankheitsfreies Überleben; OS (overall survival) – Gesamtüberleben;

- ¹ beides CK19 und hMAM, aber nur KM prognostisch signifikant
- ² Stadium I-II des Mammakarzinoms
- ³ metastasiert
- ⁴ Follow-Up wurde nur für operables Mammakarzinom und PB durchgeführt
- ⁵ negatives Nodalstatus
- ⁶ 145 Proben von 22 metastasierten Patienten
- ⁷ Bronchialkarzinom
- ⁸ kolorektales Karzinom

4.7. Schlussfolgerungen

Der immunzytochemische Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark ist die am besten etablierte Methode, um Tumorresiduen zu detektieren. Immunzytochemie ist ein billiges, robustes Verfahren, das eine hohe Sensitivität und Möglichkeit einer morphologischen Beurteilung bietet. Das in dieser Studie evaluierte RT-PCR-basierte Verfahren verfügt ebenfalls über hohe Sensitivität und Spezifität, setzt jedoch weniger Personalbeteiligung voraus, ist schneller, automatisiert, reproduzierbar und weniger subjektiv. Die RT-PCR stellt somit eine Alternative zur Immunzytochemie dar.

Die Inzidenz der Tumorzellen in dem Patientengut betrug 34% immunzytochemisch und 35% mit RT-PCR und ist mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar. Es zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation von 73% zwischen beiden Verfahren. Das lässt sich mit den Beobachtungen der bis jetzt publizierten Studien vereinbaren, allerdings anhand eines größeren Patientenkollektivs (über 400 Patientinnen).

Zahlreiche Studien zeigten, dass die Tumorzell dissemination einen prognostischen Faktor darstellt. Es wurde auch beschrieben, dass die Präsenz von DTZ ein unabhängiges Merkmal ist und ergänzt somit die gängigen diagnostischen Möglichkeiten. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Korrelation zwischen dem Nachweis von Tumorzellen und etablierten klinisch-histologischen Faktoren beobachtet. Dies unterstützt auch Erkenntnisse anderer Studien.

Mittels RT-PCR ist es möglich, disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen zu identifizieren. Ziel künftiger Studien muss sein, den prognostischen Wert molekularbiologischer Verfahren anhand eines großen Patientenkollektivs mit entsprechend langem Follow-Up zu evaluieren.

5. Zusammenfassung

Tumorzelldissemination ist ein wichtiger Schritt im komplexen Prozess der Metastasierung. Die klinische Relevanz der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sowie ihr Einfluss auf die Prognose von Mammakarzinompatientinnen wurden in zahlreichen Studien und einer Metaanalyse demonstriert (Level-1-Evidenz).

Zum Nachweis der disseminierten Tumorzellen stehen diverse Verfahren zur Verfügung, wobei aufgrund der gesicherten prognostischen Relevanz heutzutage die immunzytochemische Detektion als Goldstandard gilt. Die Tumorzellen werden mittels Zytokeratinpositivität und zytomorphologischen Kriterien identifiziert. Nachteile dieser Methode liegen in ihrer Subjektivität und einer Falschpositivität bei Gesunden. Im Hinblick auf diese Beobachtungen erscheint die Suche nach alternativen oder ergänzenden Verfahren wünschenswert.

Die Ziele der vorliegenden Studie waren einerseits die Evaluation einer neu etablierten RT-PCR-basierten Methode zum Nachweis der Tumorzelldissemination in der klinischen Routine und andererseits ihr Vergleich mit dem antikörperbasierten Goldstandard (Immunzytochemie). Die von uns verwendete *real-time* „One-Step“ RT-PCR basiert auf der Hybridisierungssonden-Technologie und amplifiziert die in epithelialen Zellen üblicherweise vorhandene Zytokeratin 19-mRNA.

Knochenmarkaspirate von 405 Mammakarzinompatientinnen wurden mittels Immunzytochemie und RT-PCR untersucht. Davon wurden 331 bei primärem Mammakarzinom intraoperativ punktiert. Bei 19 Patientinnen mit Rezidiv oder Metastasierung wurde eine Knochenmarkaspiration durchgeführt. Bei den restlichen 55 Patientinnen mit Mammakarzinom in der Anamnese wurde eine Kontrollpunktion durchgeführt.

Immunzytochemisch ließen sich bei 34% aller Patientinnen disseminierte Tumorzellen nachweisen. Die höchste Positivitätsrate (58%) wurde in der Subgruppe der Patientinnen mit Rezidiv / Metastasierung beobachtet. Hingegen blieben 20% der Patientinnen ohne Hinweis auf Reaktivierung der Erkrankung (Kontrollpunktionen) positiv.

142 von 405 (35%) Knochenmarkaspiraten wurden mittels qualitativer RT-PCR als positiv beurteilt. Die höchste Positivitätsrate ergab sich im Kollektiv der neoadjuvant vorbehandelten Patientinnen (48%), gefolgt von Patientinnen mit Rezidiv/Metastase (42%) und primär operierten Patientinnen (37%). Die niedrigste Positivitätsrate wurde in der Subgruppe der Patientinnen mit Kontrollpunktion beobachtet (15%).

48% der Aspiate wurden mit mindestens einer Methode als positiv diagnostiziert. Bei 294 (73%) Knochenmarkaspiraten lieferten beide Methoden das gleiche Ergebnis ($p < 0,001$). Die Ergebnisse beider Verfahren wurden innerhalb der Gruppe der primär operierten Patientinnen unter Einbeziehung klinisch-pathologischer Daten verglichen. 302 Patientinnen wurden in diese Analyse eingeschlossen.

Zwischen dem immunzytochemischen bzw. RT-PCR-basierten Tumorzellnachweis wurde keine direkte Korrelation mit Patientencharakteristika oder klinisch-pathologischen Faktoren gefunden, wodurch die DTZ als eine Erweiterung der bisher vorhandenen Diagnostik anzusehen ist.

In dieser Arbeit wurde eine neu etablierte molekularbiologische Methode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen anhand eines großen Patientenkollektivs evaluiert. Immunzytochemie, die Standardmethode zur DTZ-Detektion, ist ein preiswertes, robustes Verfahren, verfügt über eine hohe Sensitivität und wurde *bis dato* in zahlreichen Studien evaluiert. Die in unserer Arbeitsgruppe etablierte *real-time* RT-PCR zum Nachweis von Tumorzellen bietet alle Vorteile einer konventionellen PCR, nämlich Schnelligkeit, hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit. Da die lange und aufwendige Auswertung mittels

Gelelektrophorese entfällt, eignet sich unsere Methode besonders für die Routinearbeit eines klinischen Labors. Das Verfahren ist schnell, reproduzierbar und weitgehend automatisiert, und stellt somit eine Alternative zur Diagnostik der Tumorzell dissemination dar.

Ziel künftiger Studie muss sein, die prognostische Relevanz beider Verfahren zu evaluieren. Möglicherweise kann die RT-PCR die Diagnostik der Tumorzell dissemination und ihre Relevanz hinsichtlich der Prognose ergänzen.

6. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1. „Schicksale“ disseminierter epithelialer Zellen von Mammakarzinompatientinnen (mod. nach: Fehm, Onkologie 2006 , ⁴⁵) | 9 |
| Abb. 2. Nachweis von disseminierten Tumorzellen über verschiedene Detektionsverfahren:..... | 13 |
| Abb. 3. Prinzip der APAAP-Methode | 14 |
| Abb. 4. Knochenmarkaspiration mittels Jamshidi-Nadel | 21 |
| Abb. 5. Schematische und fotografische Darstellung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (MNC – Mononukleäre Zellen) | 23 |
| Abb. 6. Einzelne Schritte der Dichtegradientenzentrifugation und der Zytospin-Präparation | 25 |
| Abb. 7. Fokussierung | 28 |
| Abb. 8. Beispiele der im Knochenmark aufzufindenden Zellen | 30 |
| Abb. 9. Schematische Darstellung der mRNA-Isolation mit dem mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow (Roche Molecular Biochemicals)..... | 33 |
| Abb. 10. Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-Phänomen (FRET-Phänomen)..... | 36 |
| Abb. 11. Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Polymerasekettenreaktion | 38 |
| Abb. 12. Einzelne Schritte der mRNA-Isolation und RT-PCR | 39 |
| Abb. 13. Standardkurve der „One-Step“ RT-PCR. Eine geometrische Verdünnungsreihe der MCF-7 Zellen wurde analysiert. | 41 |
| Abb. 14. Altersverteilung des Patientenkollektivs | 44 |
| Abb. 15. Verteilung der Stadien im Kollektiv der primär operierten Patientinnen | 46 |

| | |
|---|----|
| Abb. 16. Zytokeratin-positive Zelle aus dem Knochenmarkspirat einer Mammakarzinompatientin | 47 |
| Abb. 17. Mehrere Zellen aus dem Knochenmarkspunktat aufbereitet für die morphologische Beurteilung durch einen erfahrenen Zytologen..... | 47 |
| Abb. 18. Verteilung der Anzahl immunzytochemisch positiver Zellen | 48 |
| Abb. 19. Korrelation des immunzytochemischen Befundes mit der klinischen Situation der Patientin | 49 |
| Abb. 20. LightCycler-Amplifikationskurven | 50 |
| Abb. 21. Korrelation des mittels RT-PCR ermittelten Knochenmarkstatus mit der klinischen Situation der Patientin | 51 |
| Abb. 22. Verteilung der Befunde in Abhängigkeit von Methode und klinischer Situation (in %) | 53 |
| Abb. 23. Durch Spiking-Experiments mit MCF7-Zellen ermittelte Nachweisrate von Tumorzellen in Abhängigkeit vom Zeitabstand zwischen Entnahme und Beginn der Aufarbeitung | 64 |

7. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1. Etablierte Risikofaktoren (⁷) | 2 |
| Tab. 2. Isolierte Tumorzellen vs. Mikrometastasen (von: Hermanek et al., ⁶⁷)..... | 10 |
| Tab. 3. Methoden zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen..... | 12 |
| Tab. 4. Vergleich der Immunzytochemie mit dem neu etablierten RT-PCR-basierten Verfahren zum DTZ-Nachweis..... | 18 |
| Tab. 5. Kriterien zur Identifikation von Tumorzellen (mod. nach Fehm et al., ⁵⁰) | 29 |
| Tab. 6. Herstellung des MasterMix für die „One-Step“ RT-PCR mit Hilfe des LightCycler RNA Master HybProbe Kits (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) 37 | |
| Tab. 7. Zusammensetzung des Patientenkollektivs | 43 |
| Tab. 8. Klinisch-pathologische Daten des primär operierten Patientenkollektivs | 45 |
| Tab. 9. Korrelation des Knochenmarkstatus (ICC) und der Anzahl der disseminierten Tumorzellen mit klinischen Faktoren..... | 49 |
| Tab. 10. Korrelation des Knochenmarkstatus (RT-PCR) mit klinischen Faktoren..... | 51 |
| Tab. 11. Positivitätsraten mittels Immunzytochemie und RT-PCR..... | 52 |
| Tab. 12. Verteilung der Befunde in Abhängigkeit von Methode und klinischer Situation der Patientin | 53 |
| Tab. 13. Korrelation der Befunde mit klinisch-pathologischen Daten des Patientenkollektivs | 55 |
| Tab. 14. Methodologischer Vergleich der Standard-Immunzytochemie und RT-PCR am LightCycler..... | 57 |
| Tab. 15. Kritische Aspekte der Detektion von disseminierten Tumorzellen | 59 |
| Tab. 16. Ergebnisse des Ringversuches, ISHAGE (mod. nach Borgen et al., ²³)..... | 59 |

| | |
|--|----|
| Tab. 17. Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen bei Kontrollpersonen (Gesunden und Patienten mit benignen Erkrankungen) | 60 |
| Tab. 18. Voraussetzungen für ein effizientes Verfahren der Routinediagnostik..... | 62 |
| Tab. 19. Optimierung des Verfahrens – kritische Aspekte | 63 |
| Tab. 20. Vergleich der konventionellen RT-PCR und RT-PCR am LightCycler-System | 70 |
| Tab. 21. Vorteile beider Methoden im Vergleich | 72 |
| Tab. 22. Konkordanzraten zwischen immunzytochemischen und RT-PCR-basierten Verfahren zum Nachweis von Tumorzell dissemination | 74 |
| Tab. 23. Zahl der positiven Knochenmarkaspirate mittels Immunzytochemie und RT-PCR (diskordante Befunde – 27%) | 76 |
| Tab. 24. Anteil der Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark in unterschiedlichen Subkollektiven | 80 |
| Tab. 25. Korrelation zwischen Tumorzell dissemination und tumorbiologischen / klinisch-histologischen Faktoren des Primärtumors | 82 |
| Tab. 26. Prognostische Aussagekraft der RT-PCR-basierten Verfahren zum Nachweis von DTZ..... | 84 |

8. Appendix – Verwendete Materialien

Lösungen

| Lösung | Herstellung |
|---------------------------------|---|
| Erythrozyten-Lyse-Puffer | 1,0 g KHCO ₃ ; 8,3 g NH ₄ Cl; 0,037 g EDTA in 800 ml Aqua destillata lösen. pH Wert mit KOH auf pH 7,5 einstellen und dann das Volumen auf 1 L auffüllen. Im Kühlschrank lagern. |
| PBS (Phosphate Buffered Saline) | Gebrauchslösung 1 x PBS (SIGMA Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover, Deutschland); 5 Tabletten in 1 L Ampuwa H ₂ O (Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland) lösen. Bei Raumtemperatur lagern. |
| Formalin 0,5% | 1,35 ml Formalin (37%ig, #1.03999, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) auf 100ml mit PBS auffüllen. |

Chemikalien / Kits

| Produkt | Hersteller |
|---|--|
| Panzytokeratin-Antikörper mouse monoclonal, [c]0,2mg/ml; Clone A45BB3 | Mikromet AG, München, Deutschland |
| Mouse IgG1,k Monoclonal Ig Control, 0,1mg; Clone MOPC21 | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| ChemMate APAAP Neufuchsin Kit | Dako GmbH, Hamburg, Deutschland |
| AK-Verdünnungsmedium | Dako GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Biocoll | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| TBS Waschpuffer (10x) | Dako GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Hämatoxilin | Dako GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Phosphate Buffered Saline | SIGMA Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover, Deutschland |
| Trypanblau | Gibco, Invitrogen, Karlsruhe |
| Aquatex Einbettmedium | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland |
| RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bone Marrow | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow | Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland |
| RNA Master HybProbe Kit | Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland |

Geräte

| Gerätebezeichnung | Hersteller |
|---|--|
| Biofuge primo | Heraeus Instruments, Hamburg, Deutschland |
| Zytozentrifuge Universal16A | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland |
| Dako Autostainer | Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland |
| ACIS | Clariant Inc., Aliso Valley, CA, USA |
| Rolleninkubator Dynal Sample Mixer | Dynal, Hamburg, Deutschland |
| Thermomixer Comfort | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| LightCycler 1.2 Instrument mit LightCycler Software 3.5 | Roche, Mannheim, Deutschland |

Allgemeines Laborequipment

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--------------------------------|--|
| Pipetten, 25 ml, 10 ml | Eppendorf Corning Costar, USA |
| Falcon-Röhrchen, 50ml | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| H ₂ O (Ampuwa) | Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland |
| SuperFrost Plus-Objektträger | Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland |
| Filterkarten | Hettich, Tuttlingen, Deutschland |
| Safeskin Handschuhe | Kimberly Clark, USA |
| Neubauerkammer | SIGMA Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover, Deutschland |
| Magnetischer Separator | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| LightCycler Kapillaren | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| LightCycler Zentrifuge-Adapter | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| RNAse Zap | Ambion, Applied Biosystems, Austin, Texas |

Zelllinien

| Zelllinie | Bezugsquelle |
|-----------|---|
| MCF-7 | ATCC [®] -Nr. HTB-22 von American type culture collection, Manassas, USA |

Sonden- und Primersequenzen

| Primer/Sonde | Sequenz |
|-------------------|---|
| Sense-Primer | AGATC CTGAG TGACA TGCGA A |
| Anti-Sense-Primer | CCCAG CTGGG CTTCA ATAC |
| Donor-Sonde | CCCTT CAGGG GTCTT GAGAT GAGC-FL |
| Akzeptor-Sonde | LC-Red-640-GCAGT CACAG CTGAG CATGA AAGC |

Hersteller: TIB Molbiol, Berlin, Deutschland

9. Literaturverzeichnis

1. Adzersen KH, Jess P, Freivogel KW, Gerhard I, Bastert G. Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: a case-control study in Germany. *Nutr Cancer* **2003**; 46(2): 131-7.
2. Aerts J, Wynendaele W, Paridaens R, Christiaens MR, van den Bogaert W, van Oosterom AT, et al. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood. *Ann Oncol* **2001**; 12(1): 39-46.
3. Aihara T, Fujiwara Y, Miyake Y, Okami J, Okada Y, Iwao K, et al. Mammaglobin B gene as a novel marker for lymph node micrometastasis in patients with abdominal cancers. *Cancer Lett* **2000**; 150(1): 79-84.
4. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci* **1994**; 39(2): 362-72.
5. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(20): 6897-904.
6. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Kommission MAMMA. Aktuelle Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome der Kommission MAMMA in der AGO e.V., 2006.
7. Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med* **2000**; 342(8): 564-71.
8. Austrup F, Uciechowski P, Eder C, Bockmann B, Suchy B, Driesel G, et al. Prognostic value of genomic alterations in minimal residual cancer cells purified from the blood of breast cancer patients. *Br J Cancer* **2000**; 83(12): 1664-73.
9. Bannasch P, Zerban H, Mayer D. The cytoskeleton in tumor cells. *Pathol Res Pract* **1982**; 175(2-3): 196-211.
10. Banys M, Solomayer E, Becker S, Krawczyk N, Gardanis K, Staebler A, et al. Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow May Affect Prognosis of Patients With Gynecologic Malignancies. *Int J Gynecol Cancer, accepted for publication* **2009**.
11. Bartek J, Bartkova J, Schneider J, Taylor-Papadimitriou J, Kovarik J, Rejthar A. Expression of monoclonal antibody-defined epitopes of keratin 19 in human tumours and cultured cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* **1986**; 22(12): 1441-52.
12. Bauernhofer T, Zenahlik S, Hofmann G, Balic M, Resel M, Pirchmoser R, et al. Association of disease progression and poor overall survival with detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer. *Oncol Rep* **2005**; 13(2): 179-84.
13. Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Emig R, Wallwiener D, Solomayer EF. Image analysis systems for the detection of disseminated breast

- cancer cells on bone-marrow cytopspins. *J Clin Lab Anal* **2005**; 19(3): 115-9.
14. Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D, Solomayer EF. Time is an important factor when processing samples for the detection of disseminated tumor cells in blood/bone marrow by reverse transcription-PCR. *Clin Chem* **2004**; 50(4): 785-6.
 15. Becker S, Solomayer E, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Fehm T. Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **2007**.
 16. Beckmann MW, Fasching PA, Weiss JM, Ortmann O. Update Primäres Mammakarzinom. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **2003**; 63(24): 65-92.
 17. Benoy IH, Elst H, Philips M, Wuyts H, Van Dam P, Scharpe S, et al. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* **2006**; 94(5): 672-80.
 18. Benoy IH, Elst H, Van der Auwera I, Van Laere S, van Dam P, Van Marck E, et al. Real-time RT-PCR correlates with immunocytochemistry for the detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer. *Br J Cancer* **2004**; 91(10): 1813-20.
 19. Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernandez P, et al. Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT-PCR. *Eur J Cancer* **2000**; 36(6): 717-23.
 20. Bilkenroth U, Taubert H, Riemann D, Rebmann U, Heynemann H, Meye A. Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation. *Int J Cancer* **2001**; 92(4): 577-82.
 21. Bockmann B, Grill HJ, Giesing M. Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors. *Biomol Eng* **2001**; 17(3): 95-111.
 22. Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy* **1999**; 5: 377-88.
 23. Borgen E, Pantel K, Schlimok G, Muller P, Otte M, Renolen A, et al. A European interlaboratory testing of three well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow. Results from analysis of normal bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* **2006**; 70(6): 400-9.
 24. Bosma AJ, Weigelt B, Lambrechts AC, Verhagen OJ, Pruntel R, Hart AA, et al. Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes. *Clin Cancer Res* **2002**; 8(6): 1871-7.
 25. Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, et al. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol* **1998**; 16(8): 2632-40.

26. Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E, et al. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(24): 8185-94.
27. Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G, et al. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* **1998**; 76(6): 824-8.
28. Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kentenich CR, Schindlbeck C, et al. Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol* **2001**; 19(5): 1468-75.
29. Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* **2000**; 18(1): 80-6.
30. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* **2000**; 342(8): 525-33.
31. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* **2005**; 353(8): 793-802.
32. Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* **1995**; 71(2): 278-81.
33. Burchill SA, Lewis IJ, Selby P. Improved methods using the reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect tumour cells. *Br J Cancer* **1999**; 79(5-6): 971-7.
34. Bustin SA, Gyselman VG, Siddiqi S, Dorudi S. Cytokeratin 20 is not a tissue-specific marker for the detection of malignant epithelial cells in the blood of colorectal cancer patients. *Int J Surg Investig* **2000**; 2(1): 49-57.
35. Champelovier P, Mongelard F, Seigneurin D. CK20 gene expression: technical limits for the detection of circulating tumor cells. *Anticancer Res* **1999**; 19(3A): 2073-8.
36. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**; 86(8): 2617-21.
37. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **1987**; 162(1): 156-9.
38. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* **2004**; 351(8): 781-91.
39. Dandachi N, Balic M, Stanzer S, Halm M, Resel M, Hinterleitner TA, et al. Critical evaluation of real-time reverse transcriptase-polymerase chain

- reaction for the quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA in colorectal cancer patients. *J Mol Diagn* **2005**; 7(5): 631-7.
40. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* **1994**; 12(3): 475-82.
 41. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* **1996**; 88(22): 1652-8.
 42. Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* **1998**; 339(6): 357-63.
 43. Dingemans AM, Brakenhoff RH, Postmus PE, Giaccone G. Detection of cytokeratin-19 transcripts by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in lung cancer cell lines and blood of lung cancer patients. *Lab Invest* **1997**; 77(3): 213-20.
 44. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **2005**; 365(9472): 1687-717.
 45. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* **2000**; 355(9217): 1757-70.
 46. Engel H, Kleespies C, Friedrich J, Breidenbach M, Kallenborn A, Schondorf T, et al. Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics. *Br J Cancer* **1999**; 81(7): 1165-73.
 47. Fehm T. Tumorzell dissemination beim Mammakarzinom - Nachweismethoden, klinische Bedeutung und Konsequenzen. *Med Welt* **2006**; 57(10): 431-36.
 48. Fehm T, Becker S, Becker-Pergola G, Sotlar K, Gebauer G, Durr-Storzer S, et al. Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* **2006**; 8(5): R60.
 49. Fehm T, Becker S, Pergola-Becker G, Kramer B, Gruber I, Sotlar K, et al. Influence of tumor biological factors on tumor cell dissemination in primary breast cancer. *Anticancer Res* **2004**; 24(6): 4211-6.
 50. Fehm T, Braun S, Müller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* **2006**; 107(5): 885-92.
 51. Fehm T, Morrison L, Saboorian H, Hynan L, Tucker T, Uhr J. Patterns of aneusomy for three chromosomes in individual cells from breast cancer tumors. *Breast Cancer Res Treat* **2002**; 75(3): 227-39.
 52. Fehm T, Müller V, Janni W, Braun S, Gebauer S, Marth C, et al. Konsensusempfehlungen zu methodischen Aspekten und zur klinischen Relevanz des Nachweises disseminierter Tumorzellen (DTZ) im

- Knochenmark (KM) von patientinnen mit primärem Mammakarzinom. Ergebnisse des Konsensustreffens im Rahmen der Dreiländertagung Senologie, Stuttgart, Sept. 2005. *Geburtsh Frauenheilk* **2007**; 67: 1-7.
53. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* **2002**; 8(7): 2073-84.
 54. Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J, et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy* **2005**; 7(2): 171-85.
 55. Fehm TN, Krawczyk N, Solomayer E, Becker-Pergola G, Durr-Storzer S, Neubauer H, et al. ER alpha-status of disseminated tumor cells in bone marrow of primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res* **2008**; 10(5): R76.
 56. Fellowes VS, Husebekk A, Gress RE, Vance BA. Minimal residual disease detection in breast cancer: improved sensitivity using cytokeratin 19 and epidermal growth factor receptor RT-PCR. *Int J Oncol* **2004**; 24(4): 861-7.
 57. Fidler IJ. Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-Iodo-2'-desoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* **1970**; 45: 773-82.
 58. Fox SB, Leek RD, Bliss J, Mansi JL, Gusterson B, Gatter KC, et al. Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* **1997**; 89(14): 1044-9.
 59. Funke I, Fries S, Rolle M, Heiss MM, Untch M, Bohmert H, et al. Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. *Int J Cancer* **1996**; 65(6): 755-61.
 60. Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer* **2003**; 107(6): 984-90.
 61. Gangnus R, Langer S, Breit E, Pantel K, Speicher MR. Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(10): 3457-64.
 62. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* **2001**; 19(16): 3669-74.
 63. Goeminne JC, Guillaume T, Salmon M, Machiels JP, D'Hondt V, Symann M. Unreliability of carcinoembryonic antigen (CEA) reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in detecting contaminating breast cancer cells in peripheral blood stem cells due to induction of CEA by growth factors. *Bone Marrow Transplant* **1999**; 24(7): 769-75.
 64. Group EBCTC. Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* **2000**; 355(9217): 1757-70.
 65. Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W. Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* **1994**; 69(3): 566-71.

66. Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol* **2004**; 5(5): 292-302.
67. Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* **1999**; 86(12): 2668-73.
68. Hu XC, Wang Y, Shi DR, Loo TY, Chow LW. Immunomagnetic tumor cell enrichment is promising in detecting circulating breast cancer cells. *Oncology* **2003**; 64(2): 160-5.
69. Ismail MS, Wynendaele W, Aerts JL, Paridaens R, Gaafar R, Shakankiry N, et al. Detection of micrometastatic disease and monitoring of perioperative tumor cell dissemination in primary operable breast cancer patients using real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(1 Pt 1): 196-201.
70. Jamshidi K, Swaim WR. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. *J Lab Clin Med* **1971**; 77(2): 335-42.
71. Ji XQ, Sato H, Tanaka H, Konishi Y, Fujimoto T, Takahashi O, et al. Real-time quantitative RT-PCR detection of disseminated endometrial tumor cells in peripheral blood and lymph nodes using the LightCycler System. *Gynecol Oncol* **2006**; 100(2): 355-60.
72. Jung R, Kruger W, Hosch S, Holweg M, Kroger N, Gutensohn K, et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer* **1998**; 78(9): 1194-8.
73. Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* **1999**; 91(1): 80-5.
74. Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Schindler AE, Seeber S. A summary of two clinical studies on tumor cell dissemination in primary and metastatic breast cancer: methods, prognostic significance and implication for alternative treatment protocols (Review). *Int J Oncol* **2002**; 20(5): 1027-34.
75. Kaufmann M, Rody A. Long-term risk of breast cancer recurrence: the need for extended adjuvant therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **2005**; 131(8): 487-94.
76. Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* **2002**; 360(9334): 683-9.
77. Ko Y, Grunewald E, Totzke G, Klinz M, Fronhoffs S, Gouni-Berthold I, et al. High percentage of false-positive results of cytokeratin 19 RT-PCR in blood: a model for the analysis of illegitimate gene expression. *Oncology* **2000**; 59(1): 81-8.
78. Koch M, Kienle P, Kastrati D, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, et al. Prognostic impact of hematogenous tumor cell dissemination in patients with stage II colorectal cancer. *Int J Cancer* **2006**; 118(12): 3072-7.
79. Kowalewska M, Chechlinska M, Markowicz S, Kober P, Nowak R. The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes. *Eur J Cancer* **2006**; 42(16): 2671-4.

80. Kraeft SK, Ladanyi A, Galiger K, Herlitz A, Sher AC, Bergsrud DE, et al. Reliable and sensitive identification of occult tumor cells using the improved rare event imaging system. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(9): 3020-8.
81. Kraeft SK, Sutherland R, Gravelin L, Hu GH, Ferland LH, Richardson P, et al. Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system. *Clin Cancer Res* **2000**; 6(2): 434-42.
82. Krag DN, Ashikaga T, Moss TJ, Kusminsky RE, Feldman S, Carp NZ, et al. Breast Cancer Cells in the Blood: A Pilot Study. *Breast J* **1999**; 5(6): 354-58.
83. Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seeber S, et al. Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol* **1995**; 13(11): 2769-75.
84. Kruger W, Datta C, Badbaran A, Togel F, Gutensohn K, Carrero I, et al. Immunomagnetic tumor cell selection--implications for the detection of disseminated cancer cells. *Transfusion* **2000**; 40(12): 1489-93.
85. Kruger WH, Jung R, Detlefsen B, Mumme S, Badbaran A, Brandner J, et al. Interference of cytokeratin-20 and mammaglobin-reverse-transcriptase polymerase chain assays designed for the detection of disseminated cancer cells. *Med Oncol* **2001**; 18(1): 33-8.
86. Larson CJ, Moreno JG, Pienta KJ, Gross S, Repollet M, O'Hara S M, et al. Apoptosis of circulating tumor cells in prostate cancer patients. *Cytometry A* **2004**; 62(1): 46-53.
87. Leitlinie. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Deutsche Krebsgesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 1. Aktualisierung **2008**, <http://www.senologie.org/leitlinien.html>
88. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* **1999**; 354(9174): 197-202.
89. Mehes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol* **2001**; 159(1): 17-20.
90. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(24): 8152-62.
91. Molino A, Pelosi G, Turazza M, Sperotto L, Bonetti A, Nortilli R, et al. Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat* **1997**; 42(1): 23-30.
92. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **1982**; 31(1): 11-24.
93. Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sreter L, Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* **2001**; 7(12): 4080-5.
94. Mueller P, Carroll P, Bowers E, Moore D, 2nd, Cher M, Presti J, et al. Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate

- carcinoma patients are cytogenetically aberrant. *Cancer* **1998**; 83(3): 538-46.
95. Muller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* **2005**; 11(10): 3678-85.
 96. Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Sauer T, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin Cancer Res* **2001**; 7(12): 4122-9.
 97. Naume B, Borgen E, Tossvik S, Pavlak N, Oates D, Nesland JM. Detection of isolated tumor cells in peripheral blood and in BM: evaluation of a new enrichment method. *Cytotherapy* **2004**; 6(3): 244-52.
 98. Naume B, Wiedswang G, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, et al. The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(9): 3091-7.
 99. Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Detection of Mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin Biochem* **2006**; 39(9): 879-87.
 100. Paget S. Distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* **1889**; 1: 571.
 101. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* **2004**; 4(6): 448-56.
 102. Pantel K, Felber E, Schlimok G. Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J Hematother* **1994**; 3(4): 315-22.
 103. Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* **1996**; 347(9002): 649-53.
 104. Pantel K, Otte M. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, and phenotyping. *Recent Results Cancer Res* **2001**; 158: 14-24.
 105. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* **1994**; 3(3): 165-73.
 106. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* **1993**; 85(17): 1419-24.
 107. Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, et al. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res* **1991**; 51(17): 4712-5.

108. Pelkey TJ, Frierson HF, Jr., Bruns DE. Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors. *Clin Chem* **1996**; 42(9): 1369-81.
109. Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H, Vincent-Salomon A, Nos C, Boudou E, et al. Real-time quantitative PCR determination of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression of isolated micrometastatic cells from bone marrow of breast cancer patients. *Int J Cancer* **2005**; 114(2): 291-8.
110. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(4): 1392-400.
111. Powles T, Paterson S, Kanis JA, McCloskey E, Ashley S, Tidy A, et al. Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol* **2002**; 20(15): 3219-24.
112. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**; 95(8): 4589-94.
113. Reimers N, Zafrakas K, Assmann V, Egen C, Riethdorf L, Riethdorf S, et al. Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(10): 3422-8.
114. Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, Smith IE, Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer* **2005**; 92(5): 906-12.
115. Rohr K. HR. Tumorzellen im Sternalpunktat. *Deutsch Arch Klein Med* **1936**; 179: 61-79.
116. Ruud P, Fodstad O, Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer* **1999**; 80(1): 119-25.
117. Sarkar G, Sommer SS. Access to a messenger RNA sequence or its protein product is not limited by tissue or species specificity. *Science* **1989**; 244(4902): 331-4.
118. Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H, et al. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**; 84(23): 8672-6.
119. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100(13): 7737-42.
120. Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnott HD, Gazet JC, Sacks N, et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer* **1997**; 33(6): 854-61.

121. Schoenfeld A, Luqmani Y, Sinnett HD, Shousha S, Coombes RC. Keratin 19 mRNA measurement to detect micrometastases in lymph nodes in breast cancer patients. *Br J Cancer* **1996**; 74(10): 1639-42.
122. Schön D, Bertz J, Görsch B, Haberland J, Ziegler H, Stegmaier C, et al. Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland: Gesundheitsberichterstattung für Deutschland. Berlin: Robert Koch-Institut, 2002.
123. Schroder CP, Ruiters MH, de Jong S, Tiebosch AT, Wesseling J, Veenstra R, et al. Detection of micrometastatic breast cancer by means of real time quantitative RT-PCR and immunostaining in perioperative blood samples and sentinel nodes. *Int J Cancer* **2003**; 106(4): 611-8.
124. Sielens W, Mecklenburg I, Dango S, Ehrhardt P, Kirschbaum A, Passlick B, et al. Detection of MAGE-A transcripts in bone marrow is an independent prognostic factor in operable non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **2007**; 13(13): 3840-7.
125. Simonds HM, Miles D. Adjuvant treatment of breast cancer: impact of monoclonal antibody therapy directed against the HER2 receptor. *Expert Opin Biol Ther* **2007**; 7(4): 487-91.
126. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* **2002**; 20(17): 3628-36.
127. Singletary SE, Greene FL, Sobin LH. Classification of isolated tumor cells: clarification of the 6th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual. *Cancer* **2003**; 98(12): 2740-1.
128. Slade MJ, Smith BM, Sinnett HD, Cross NC, Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* **1999**; 17(3): 870-9.
129. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnett HD, et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* **2000**; 18(7): 1432-9.
130. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* **2007**; 369(9555): 29-36.
131. Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, Breit E, Scheunemann P, Heumos I, et al. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**; 99(4): 2246-51.
132. Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G, Bachmann R, Kramer B, Vogel U, et al. Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **2006**; 98(2): 179-84.
133. Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bode S, Wallwiener D, et al. Prognostic relevance of cathepsin D detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **1998**; 49(2): 145-54.

134. Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schutz F, et al. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2001**; 7(12): 4102-8.
135. Solomayer EF, Diel IJ, Wallwiener D, Bode S, Meyberg G, Sillem M, et al. Prognostic relevance of urokinase plasminogen activator detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. *Br J Cancer* **1997**; 76(6): 812-8.
136. Stathopoulos EN, Sanidas E, Kafousi M, Mavroudis D, Askoxylakis J, Bozionelou V, et al. Detection of CK-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients with histologically and immunohistochemically negative axillary lymph nodes. *Ann Oncol* **2005**; 16(2): 240-6.
137. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res* **2003**; 9(14): 5145-51.
138. Stathopoulou A, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Mavroudis D, Malamos N, et al. A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Int J Cancer* **2006**; 119(7): 1654-9.
139. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* **2002**; 20(16): 3404-12.
140. Taubert H, Blumke K, Bilkenroth U, Meye A, Kutz A, Bartel F, et al. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gynecol Oncol* **2004**; 92(1): 256-61.
141. Traweek ST, Liu J, Battifora H. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. *Am J Pathol* **1993**; 142(4): 1111-8.
142. Tumorzentrum München. Manual Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. München Wien New York: W. Zuckschwerdt Verlag, 2005.
143. Van de Steene J, Soete G, Storme G. Adjuvant radiotherapy for breast cancer significantly improves overall survival: the missing link. *Radiother Oncol* **2000**; 55(3): 263-72.
144. Vanin EF. Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu Rev Genet* **1985**; 19: 253-72.
145. Vlems FA, Diepstra JH, Cornelissen IM, Ruers TJ, Ligtenberg MJ, Punt CJ, et al. Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: expression in controls and downregulation in tumour tissue. *Mol Pathol* **2002**; 55(3): 156-63.

146. Wang ZP, Eisenberger MA, Carducci MA, Partin AW, Scher HI, Ts'o PO. Identification and characterization of circulating prostate carcinoma cells. *Cancer* **2000**; 88(12): 2787-95.
147. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* **2003**; 21(18): 3469-78.
148. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Naume B. Detection of isolated tumor cells in BM from breast-cancer patients: significance of anterior and posterior iliac crest aspirations and the number of mononuclear cells analyzed. *Cytotherapy* **2003**; 5(1): 40-5.
149. Witzig TE, Bossy B, Kimlinger T, Roche PC, Ingle JN, Grant C, et al. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res* **2002**; 8(5): 1085-91.
150. Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K. Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res* **2004**; 10(8): 2670-4.
151. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr* **2001**; (30): 96-102.
152. Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS, Segall JE. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* **2000**; 60(9): 2504-11.
153. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, et al. 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* **2006**; 24(23): 3756-62.
154. Xenidis N, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Stathopoulou A, Malamos N, et al. Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann Oncol* **2003**; 14(6): 849-55.
155. Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* **1999**; 17(7): 2015-9.
156. Zach O, Kasparu H, Wagner H, Krieger O, Lutz D. Prognostic value of tumour cell detection in peripheral blood of breast cancer patients. *Acta Med Austriaca Suppl* **2002**; 59: 32-4.
157. Zhang Z, Harrison PM, Liu Y, Gerstein M. Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome Res* **2003**; 13(12): 2541-58.
158. Zhong XY, Kaul S, Diel I, Eichler A, Bastert G. Analysis of sensitivity and specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase/polymerase chain reaction for detection of occult breast cancer in bone marrow and leukapheresis products. *J Cancer Res Clin Oncol* **1999**; 125(5): 286-91.

159. Zigeuner RE, Riesenberg R, Pohla H, Hofstetter A, Oberneder R. Immunomagnetic cell enrichment detects more disseminated cancer cells than immunocytochemistry in vitro. *J Urol* **2000**; 164(5): 1834-7.
160. Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G, et al. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol* **1997**; 15(7): 2701-8.
161. Zippelius A, Pantel K. RT-PCR-based detection of occult disseminated tumor cells in peripheral blood and bone marrow of patients with solid tumors. An overview. *Ann N Y Acad Sci* **2000**; 906: 110-23.

Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichsten Dank.

An erster Stelle danke ich Frau Professor Dr. med. Tanja Fehm für das mir entgegengebrachte Vertrauen und ihre kontinuierliche kompetente Unterstützung. Die von ihr geleistete Arbeit ging weit über das normale Maß einer akademischen Betreuung hinaus, weshalb sie nicht nur auf professioneller, sondern auch auf persönlicher Ebene von großer Bedeutung für mich war und ist. Von ihr gingen in zahlreichen Gesprächen fundierte Empfehlungen, aber auch die nötige konstruktive Kritik und Motivation aus, die dieser Arbeit zu einem erfolgreichen Ende verholfen haben.

Ebenfalls danken möchte ich dem Direktor der Universitäts-Frauenklinik Tübingen, Herrn Professor Dr. med. Diethelm Wallwiener, für seine Hilfe nicht nur im Bereich der Promotion, sondern auch bei meinem Universitäts-Wechsel. Seiner freundlichen Unterstützung verdanke ich es, dass ich die Promotion in Tübingen durchführen konnte.

Herrn PD Dr. med. Sven Becker und Frau Graziella Pergola-Becker danke ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor und vor allem für die stetige Bereitschaft, meine methodologischen Fragen zu beantworten und zu diskutieren.

Großen Dank schulde ich weiterhin Herrn Professor Dr. med. Erich-Franz Solomayer für sein hohes Interesse an der Forschung im Bereich der Tumorzell dissemination und Herrn Doktor Hans Neubauer für die sorgfältige Durchsicht der Doktorarbeit und die vielen Anregungen.

Herrn Doktor Raffael Kurek spreche ich meinen besonderen Dank aus für die Anregung zur Doktorarbeit und Forschung im Allgemeinen, für seine große Hilfsbereitschaft und gute Ratschläge.

Ich danke zudem der wunderbaren Arbeitsgruppe, die sich durch eine sehr sympathische Atmosphäre auszeichnete und mir sowohl fachlich als auch zwischenmenschlich eine gute Arbeitsgrundlage bot. Besonders möchte ich mich bei Frau Doktor Tina Neuburger für ihre immer kompetente Hilfe bedanken. Frau Ute Hilcher, Frau Beate Kootz und Frau Silke Dürr-Störzer gilt mein großer Dank für die freundliche Aufnahme und den Spaß während der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Doktor Karim-Maximilian Niyazi, der zu jeder Zeit bei allen Problemen und insbesondere bei statistischen Fragestellungen ein kompetenter und geduldiger Ansprechpartner war.

Meiner Labor-Kollegin und Kommilitonin Natalia Krawczyk danke ich für die optimale Zusammenarbeit, für die langen gemeinsamen Stunden im „Glaskasten“, die Korrektur der Arbeit und vor allem für ihre Freundschaft.

Last but not least bedanke ich mich bei meiner lieben Familie für alles, was sie für mich getan hat.

Lebenslauf

Name: Malgorzata Joanna Banys
 Geburtsdatum und -ort: 22.01.1984, Wrocław (Breslau)
 Staatsangehörigkeit: Polnisch

Universitärer Werdegang

6.11.2008 Staatsexamen, Note: sehr gut
 08/2007 – 07/2008 Praktisches Jahr: Universität Tübingen (Chirurgie, Gynäkologie)
 Universidad Autónoma de Madrid (Innere Medizin)
 Universidad De Monterrey, Mexiko (Geburtshilfe)
 09/2006 – 02/2007 Universidad de Alcalá de Henares, Madrid; Erasmus-Stipendium
 2004 – 2008 Eberhard-Karls-Universität Tübingen
 2002 – 2004 Medizinische Universität Breslau, Polen; Vorklinik

Famulaturen und berufsrelevante Erfahrungen

03/2007 Anästhesie, University of Glasgow, UK
 08/2005 Gynäkologie, Universidad de la Habana, Havana, Kuba
 Seit 11/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft in den Arbeitsgruppen Tumorprogression,
 Tumordissemination, Universitäts-Frauenklinik Tübingen
 08/2004 Chirurgie, Kasr El Aini Hospital, Cairo, Ägypten
 2002-2004 Tätigkeit als „Public Health Officer“ im Rahmen der Organisation IFMSA
 (International Federation of Medical Students' Associations)

Auszeichnungen

Seit 10/2006 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
 06/2004 Auszeichnung als beste Studentin der Medizinischen Universität in
 Breslau mit dem Titel „Primus inter pares“
 04/2005 III. Preis auf der X Nationalen Konferenz der Studentischen
 Forschungsgruppen, Breslau 2005