

Aus dem  
Institut für Onkologische Chemie  
Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Bojar

**Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen bei  
Mammakarzinom**

**Evaluation etablierter und innovativer Markergene**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

Burak Dogan

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Bojar

Korreferent: PD Dr. med. Edwin Boelke



---

3.1.4	THERAPIEPROFIL DES KOLLEKTIVS	37
3.1.4.1	OPERATIVE THERAPIE	38
3.1.4.2	STRAHLENTHERAPIE	39
3.2. METHODEN		40
3.2.1	BLUTENTNAHME	41
3.2.2	DAS IMMUNOMAGNETISCHE VERFAHREN	41
3.2.2.1	DIE ERFASSUNG NICHT-HÄMATOGENER ZELLEN IM BLUT	41
3.2.2.2	ISOLIERUNG ERFASSTER ZELLEN AUS DEN BLUTPROBEN	42
3.2.2.3	DIE ISOLATION DER NUKLEINSÄUREN AUS DEN ZELLEN	43
3.2.3	ANREICHERUNG DER MRNA AUS ZELLYSATEN	43
3.2.3.1	ERFASSUNG GESUCHTER MRNA IM ZELLYSAT	43
3.2.3.2	ISOLIERUNG UND REINIGUNG ERFASSTER MRNA - SPEZIES AUS DEM ZELLYSAT	44
3.2.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE BEARBEITUNG DER GEREINIGTEN MRNA – SPEZIES	45
3.2.4.1	REVERSE TRANSKRIPTION (RT)	45
3.2.4.2	POLYMERASE KETTEN REAKTION (PCR)	45
3.2.4.2.1	MULTIPLEX POLYMERASE KETTEN REAKTION (MULTIPLEX-PCR) ALS NACHWEISVERFAHREN FÜR DIE GENE C-ERBB2, MGB-1, SPDEF UND MMP-11	46
3.2.4.2.2	REALTIME POLYMERASE KETTEN REAKTION (REALTIME-PCR) ALS NACHWEISVERFAHREN FÜR DIE GENE C-ERBB2, MGB-1, SPDEF, MMP-11	49
3.2.5	SYSTEMATIK DER REKODIERUNG	52
3.2.6	WEITERBEARBEITUNG REGISTRIERTER ERGEBNISSE	52
3.2.6.1	DATENSAMMLUNG UND REKODIERUNG DER ERGEBNISSE	52
3.2.6.2	VERFAHREN DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG	53
<b>4. ERGEBNISSE</b>		<b>55</b>
<hr/>		
4.1	EXPRESSIONSFREQUENZ DER KONTROLLGENE	55
4.1.2	$\beta$ – GLUKURONIDASE (GUSB)	55

4.2 GENEXPRESSIONSHÄUFIGKEITEN IM MULTIPLEX PCR – VERFAHREN	55
4.2.1 GA733.2	55
4.2.2 MUC-1	56
4.2.3 EXPRESSIONSFREQUENZ DES GENS C-ERBB2 IN MULTIPLEX-PCR-, REALTIME-PCR- VERFAHREN UND IMMUNHISTOCHEMIE	57
4.3 GENEXPRESSIONSHÄUFIGKEITEN IM REALTIME-PCR – VERFAHREN	61
4.3.1 HUMANES MAMMAGLOBIN (MGB-1)	61
4.3.2 SPDEF	62
4.3.3 MMP-11	63
4.4 BETRACHTUNG MEHRFACH POSITIVER PATIENTINNEN	64
4.4.1 BETRACHTUNG DER GENKOMBINATION GA733.2*MUC-1	65
4.5 ANALYSEN DER PCR – ERGEBNISSE IM KONTEXT VERSCHIEDENER MERKMALE UND PROGNOSEKRITERIEN DES MAMMAKARZINOMS	67
4.5.1 EXPRESSIONSVERGLEICH ZWISCHEN GESUNDEM UND ERKRANKTEM KOLLEKTIV	67
4.5.2 REZIDIVIERTE UND ERSTDIAGNOSTIZIERTE FÄLLE DES MAMMAKARZINOMS	69
4.5.3 BETRACHTUNG DES STAGING DES MAMMAKARZINOMS BEI EXPRESSIONSPOSITIVITÄT	70
4.5.4 BETRACHTUNG DES NODAL-STATUS DES MAMMAKARZINOMS BEI EXPRESSIONSPOSITIVITÄT	72
4.5.5 BETRACHTUNG DES M-STATUS DES MAMMAKARZINOMS BEI EXPRESSIONSPOSITIVITÄT	74
4.5.6 DIFFERENZIERUNGSGRAD DES MAMMAKARZINOMS BEI EXPRESSIONSPOSITIVITÄT	76
4.6 SERUM-CA 15-3 – TUMORMARKER - SPIEGEL BEI EXPRESSIONSPOSITIVITÄT	78
4.7 BETRACHTUNG DER EXPRESSIONSPOSITIVITÄT IM KONTEXT ZUR KUMULIERTEN BESTRAHLUNGSDOSIS DER PATIENTINNEN	79
4.8 VERTEILUNG DER EXPRESSIONSPOSITIVITÄT IM HINBLICK AUF DEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN HER-2/NEU-STATUS	81

<b>5. DISKUSSION</b>	<b>82</b>
6. ZUSAMMENFASSUNG	98
7. LITERATURVERZEICHNIS	98
8. ANHANG	103
9. LEBENSLAUF	108
10. DANKSAGUNG	109
11. ERKLÄRUNG	110

**Abkürzungsverzeichnis:**

ALND:	axilläre Lymphnodektomie
ABCD:	Adnagen Breast Cancer Detect Kit
ABCS:	Adnagen Breast Cancer Select Kit
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
BET:	brusterhaltende Therapie
Bp:	Basenpaare
c-erbB2:	cellular avian erythroblastosis homologue B2
Ca15-3:	Bezeichnung des Transkriptionsproduktes des Gens Muc-1
cDNA:	komplementäre (complementary) DNA
CMF:	Kombinationstherapie aus Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluoruracil
Ct:	Schwellenzyklusanzahl
CTX:	Chemotherapie
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleinacid)
DTC:	disseminierte Tumorzellen (engl. disseminated tumor cells)
EC:	Kombinationstherapie aus Epirubicin und Cyclophosphamid
ED:	Erstdiagnose
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EGF:	epidermal growth factor
EGFR:	epidermal growth factor receptor
EpCAM:	Bezeichnung des Transkriptionsproduktes des Gens Ga733.2
ET :	Kombinationstherapie aus Epirubicin und Taxane
FEC :	Kombinationstherapie aus 5-Fluoruracil+ Epirubicin+ Cyclophosphamid

---

G :	Differenzierungsgrad einer malignen Entität (engl. Grading)
Ga733.2:	Major gastrointestinal tumor-associated protein
Gus-b:	beta-Glukuronidase
Gy:	Gray, Einheit der Strahlendosis
Her2/neu:	Bezeichnung des Transkriptionsproduktes des Gens c-erbB2
ICC:	Immunzytochemie
IHC:	Immunhistochemie
IMP:	immunomagnetische Partikel
M-Status:	Status der Fernmetastasierung;
MGB-1:	Mammaglobin-Typ1
MMP-11:	Matrix-Metalloproteinase-Typ11
MRM:	modifizierte radikale Mastektomie
mRNA:	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
Muc-1:	Mucin-1
N-Status:	Nodal-Status; Klassifikation des Lymphknotenbefalles
PCR:	Polymerase Kettenreaktion
PBS:	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
REZ:	Rezidiv
rfe:	relative Fluoreszenzeinheit
RNA:	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleinacid)
RT:	Reverse Transkriptase
SPDEF:	SAM pointed domain containing ets transcription factor
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences

T-Status:	Status des Primärtumors
Tax:	Ein Präparat der Wirkstoffgruppe der Taxane
UICC:	Union international contre le Cancer
VEGF-R:	Vascular endothelial growth factor receptor 1
XRT:	Bestrahlung bzw. Strahlentherapie
Z:	Zyklusanzahl

**Materialliste:**

- Adnagen Breast Cancer Select Kit (ABCS; Adnagen AG, Langenhagen, Deutschland):
  - IMP: an magnetische Partikel angekoppelte Antikörper
  - PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphat-buffered saline)
  - Lyse-/Bindungspuffer: Lyse der Zellmembran und Bindung des intrazellulären mRNA
- Adnagen Breast Cancer Detect Kit (ABCD; Adnagen AG, Langenhagen, Deutschland):
  - 25-Oligo-dT-Suspension: eisengekoppelte Polydesoxythymidin-Partikel zur Erfassung von mRNA
  - Puffer A: Reinigungspuffer
  - Puffer B: Reinigungspuffer
  - Tris-HCl: Reinigungspuffer (Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
  - RNase-freies Wasser
  - RT-Puffer: Reverse-Transkriptase Puffer

- 
- dNTP: desoxy-Nukleotid-Triphosphat, Nukleotide: Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin
  - Oligonukleotid – Mix (Breast Detect Primer Mix): Suspension aus 20-  
mere, zur multiplex-PCR
  - Sensiscript RT Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland):
    - PBS: Phosphat-gepufferte Salze (phosphat-buffered saline), pH 7,2
    - Reverse Transkriptase: Enzym Reverse Transkriptase
    - Recombinant RNAsin: RNase-Inhibitor
    - RT<sup>-</sup> – Kontrollsuspension
    - destilliertes Wasser: multiplex-PCR-Negativkontrolle
    - Positivkontrolle (multiplex-PCR): verdünnte Mischung des spezifischen  
PCR Amplikons
  - Hotstar Taq Mastermix Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland):  
Suspension Puffer dNTPs, DNA-abhängige DNA – Polymerase
  - TaqMan (Assay on Demand, Applied Biosystems, Kalifornien, USA):  
Primer-/Sondengemisch:
    - Hs00171829\_m1: MMP-11;
    - Hs00267190\_m1: MGB-1;
    - Hs00170433\_m1: c-erbB2;
    - Hs00171942\_m1: SPDEF;
    - Hs99999908\_m1: gus-b.

- TaqMan Universal PCR Master Mix:
  - enthält dNTP, Puffer, ROX als Referenzfarbstoff und das Enzym AmpliTaqGold (Applied Biosystems, Kalifornien, USA)
- 7 ml EDTA-Röhrchen: Asservierung der Blutprobe
- 15 ml Röhrchen (Falcon Röhrchen – konisch, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- 1,5 ml Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- 0,2 ml PCR-Gefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Flockeneis, Temp 0°C

**Geräteliste:**

- Magnetstab System – klein: für 1,5ml Röhrchen (DynaL MPC-S, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Magnetstab System – groß: für 15 ml Röhrchen (DynaL MPC-L, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Überkopf-Rotator (DYNAL Sample Mixer, Invitrogen GmbH, Hamburg)
- Thermomixer (Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- PCR – Thermocycler (PE 2400 SL, Perkin Elmer GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland)
- Nukleinsäuretrennung (Bioanalyzer 2100: Agilent Technologies GmbH, Böblingen, Deutschland)

- Realtime – PCR – Gerät (ABI Prism 7900HT Cycler, Applied Biosystems, Kalifornien, USA)
- Personal Computer:
  - Betriebssystem: Microsoft Windows XP
  - Software: Microsoft Word 2002, Microsoft Excel 2002, SPSS Version 11.5.1.

## **1. Einleitung**

Jährlich erkranken etwa 130 von 100.000 Frauen an Mammakarzinom. Somit weist es unter allen malignen Neoplasien der Frau die weltweit größte Inzidenzrate auf, die von dem Bronchialkarzinom und Kolonkarzinom mit einer Inzidenzrate von 15,7 bzw. 18,3 gefolgt wird [1]. Bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose werden bei ca. 7% der Patientinnen Fernmetastasen des Mammakarzinoms nachgewiesen [2]. Darüber hinaus entwickeln ca. 21% aller Mammakarzinomfälle in einem mittleren Zeitraum von etwa 28 Monaten ab der Erstdiagnose manifeste und nachweisbare Fernmetastasen [3]. Auch von den Todesursachen entfallen etwa 45% auf die Fernmetastasierung und auf das daraus resultierende Versagen befallener Organe [4]. Hierzu zählen vor allem der metastatische Befall der Lungen (47-64%), der Leber (36%-42%) und des Zentralnervensystems (24-26%) mit daraus resultierendem respiratorischem (26%) und hepatischem Versagen (14%) bzw. Hirntod (9%) [5]. Während weitere Todesursachen in ca. 24% an granulozytopenischen, akuten Infektionen einhergehend mit schwerer Sepsis liegen, ist die thrombozytopenische, akute Hämorrhagie bei etwa 9% aller Patienten für den Tod ausschlaggebend. Es wird ersichtlich, dass die vielfältigen Folgen der hämatogenen Generalisierung des Mammakarzinoms eine maßgebliche Rolle in der Prognoseeinschränkung für die Patienten spielen. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bewegt sich für Patienten ohne klinischen bzw. diagnostischen Nachweis von Fernmetastasen zwischen 49-70%, wohingegen Patienten mit evidenten Fernmetastasen eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von 17-30% aufweisen [6-8]. Da die Fernmetastasierung trotz modernster

Therapieoptionen weiterhin mit erheblicher Reduktion der Lebenserwartung der Patienten einhergeht, bedarf dieser Aspekt des Mammakarzinoms eingehender wissenschaftlicher Forschung.

## **2. Hintergrund der Metastasenforschung**

### **2.1. Die Anfänge der Metastasenforschung**

Die Tumorforschung befasst sich seit über mehr als einem Jahrhundert mit zirkulierenden Tumorzellen in der Blutstrombahn. Im Jahre 1869 erschien in der Fachzeitschrift „Australian Medical Journal“ ein Fallbericht über einen verstorbenen Patienten mit multiplen Hauttumoren am gesamten Körper. Der Anstaltarzt Ashworth, T. R. berichtete in dieser Schrift über seine Befunde aus der Autopsie des Patienten und versuchte plausible Erklärungen für die disseminierte Vielzahl dieser Tumore zu finden. In den Venen des Leichnams beobachtete er mikroskopisch atypische Zellen und veranschaulichte ihre morphologische Ähnlichkeit mit den Zellen, die aus den kutanen Tumoren stammten. Die Parallelitäten seien in Form und Größe erfassbar. Bei der Mutmaßung einer Dissemination dieser Zellen von einem ursprünglichen Hautgeschwulst postulierte Ashworth, dass diese Zellen im Blutkreislauf kursiert haben müssten [9].

1891 legte von Recklinghausen das Konzept der venösen Provenienz ossärer Metastasen vor. Er beschrieb seinen mikroskopischen Befund als „Krebsthromben in präformierten Gefäßen, wahrscheinlich Venen“. Er widerlegte zudem als einer der ersten Pathologen die Notwendigkeit des embolischen Verschlusses der Venen zur metastatischen Organmanifestation [10].

Von Recklinghausen schrieb: „Eine derartige Fixierung der Krebskeime braucht nicht als richtige Verstopfung der eigentlichen Capillaren ... zu geschehn. Vielmehr würde ich der

Theorie den Vorzug geben, dass ... die Bildung der wandständigen Thromben innerhalb der Venen stattfindet.“

Hinweise über die eigentliche Herkunft der „Krebskeime“ waren zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht eindeutig. Während Recklinghausen einerseits die Vermutung der „ersten Krebszellentwicklung innerhalb der Bahn der kleinen Venen des Markes“ ausspricht, tritt an weiterer Stelle seiner Schrift „die Gefäßbahn als erste Ansiedlungsstelle der Krebskeime“ mit der wahrscheinlichen Vermutung einer unbekanntenen Eintrittspforte in Erscheinung.

1893 gelang es letztendlich Kantorowicz die Metastasierung via Blutstrombahnen bei einem Fall des Mammakarzinoms unmittelbar post mortem durch Autopsie mikroskopisch festzustellen. Dabei sei die Vena axillaris der Patientin durch Zellen eines fortgeschrittenen Mammakarzinoms invadiert. Ferner sei im gleichen Kasus eine pulmonale Metastase mit Einzug in eine Pulmonalvene, Übergang in den großen Blutkreislauf und der Folge zahlreicher metastatischer Neubildungen in den meisten Viszeralorganen feststellbar [11].

Mit den Erklärungsversuchen zum kausalen Zusammenhang zwischen den malignen Entitäten und dem sekundären Organbefall begann auch die zielgerichtete Betrachtung verstorbener krebserkrankter Patienten hinsichtlich der makroskopischen Metastasenverteilung im gesamten Körper. Paget beschrieb 1889 nach den durchgeführten 735 Autopsiefällen mit bekanntem Mammakarzinom die bemerkenswerte Häufigkeit des sekundären Befalles der Leber, der Lunge, des Skelettsystems, der Ovarien, der Nieren und der Milz und formulierte den Begriff der „Prädisposition“ dieser Organe in der Präferenz des sekundären Tumorwachstums [12].

Zur gleichen Fragestellung nahm Recklinghausen 1891 Stellung und konzentrierte sich vor allem auf den häufigen Knochenmarksbefall bei verschiedenen Krebskrankheiten. Er sammelte seine Befunde über den Knochenmarksbefall unter dem Begriff der

„metastasierenden, osteoplastischen Carcinomatose“ im Bereich des Beckens, der Rippen, des Schädels, des Femurs, des Humerus und der Wirbelsäule. Er behauptete, dass hiermit diejenigen „Theile des Skeletts“ bevorzugt werden, die den häufigsten mechanischen und thermischen Reizen unterworfen sind, welches zu „Arteriencontractionen, Ischämien und Ansiedlung der Krebskeime“ führe [10].

Ewing baute 1919 die Theorie auf, dass die Hämodynamik in den jeweiligen Organen den ausschlaggebenden Faktor im Sinne einer Hämostase sowie Einnistung der stagnierenden Tumorzellen durch ein Zell-Lumen-Missverhältnis im Metastasierungsprozess darstellt [13]. In Anbetracht der diversen Theorien in der Geschichte kann man heute postulieren, dass eine gute Vaskularisation und somit ein hoher Durchblutungsumsatz der sekundären Organe, die verlängerte Aufenthaltsdauer zirkulierender Tumorzellen, sowie bestimmte Prädispositionsfaktoren jeweiliger Organe die wichtigsten Voraussetzungen zur ungehinderten Fernmetastasierung sind.

### **2.2. Die „Metastasibilität“ und ihre histologisch-molekularbiologischen Grundlagen**

Die „Metastasibilität“, ein von Sträuli (1964) erstmals determinierter Begriff, kennzeichnet die Fähigkeit eines Karzinoms Metastasen hervorzurufen. Die Erlangung dieser Fähigkeit ist ein multifaktorieller Vorgang, der nicht in seinen Einzelheiten geklärt ist. Eine systematische Annäherung an diese Problematik ergab die Aufteilung des Vorganges der Metastasierung in vier Phasen [14]:

### A. Tumorzellabspaltung vom Primarium

Im Rahmen des interzellulären Adhäsionsverhaltens spielen nach aktueller Literatur die Glykoproteinfamilien der Katherine, Integrine, Selektine und Lektine eine wichtige Rolle. Hinsichtlich der initialen Abspaltung der Tumorzellen vom Primarium zeigte Oka et al. (1993), dass vor allem die Expressionsabnahme bestimmter Subtypen der Katherine und somit die Reduktion der interzellulären Adhäsionen mit bedeutendem metastatischen Fortschritt einhergeht [15].

### B. Motilität und Lokomotion im Stroma

In Bezug auf die Migration tumoröser Zellen im Stroma wird in der Literatur die stromale Degradation durch Matrix-Metalloproteinasen hervorgehoben [16, 17]. Die proteolytische Wirkung dieser Enzyme auf die extrazelluläre Matrix dient der so genannten Pfadbildung [16]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass Matrix-Metalloproteinasen eine grundlegende, raumverschaffende Rolle für die lokale Expansion maligner Zellverbände besitzen [17].

Tumorzellen weisen auch Prozesse aktiver Lokomotion auf. Sie besteht vor allem aus den Phasen der Membranprotrusion, Aktinfilament-Kontraktion und Traktion durch Adhäsionen an der Umgebung. Diese Vorgänge rufen letztendlich eine amöboide Fortbewegung der Zellen hervor [18, 19].

### C. Tumoreigene Angiogenese und Intravasation der Tumorzellen

Als *conditio sine qua non* fungiert die Angiogenese zur Aufrechterhaltung der Nutrition einer schnell wachsenden tumorösen Entität. Andererseits stellen Gefäßneubildungen auch neue Eintrittspforten für die Tumorzellen zur Fernmetastasierung dar [20]. Gerade beim

Mammakarzinom konnte nachgewiesen werden, dass unter den entarteten Zellen dieser Malignität eine zusätzliche Wirkung auf die Promotion der Angiogenese bereits im Frühstadium des Carcinoma-In-situs besteht [21]. Die Korrelation der Angiogenese mit der Fernmetastasierung und der Lebenserwartung konnte anhand der mikroskopisch evaluierten Dichte der Kapillaren im Karzinomgewebe und der 5-Jahres-Überlebensrate nachgewiesen werden. Auf molekularbiologischer Ebene wird der vascular endothelial growth factor (VEGF) sowie die entsprechenden Rezeptoren im Mechanismus der Angiogenese hervorgehoben [20, 22]. Während eine Überexpression des VEGF als Induktor der Angiogenese gilt und VEGF seitens der Tumorzellen synthetisiert werden kann, wird eine Inhibition der Angiogenese durch die abnehmende Expression der entsprechenden Rezeptoren VEGF-R und damit verbundener Senkung der Signaltransduktion erreicht [22].

### D. Ferne Organinvasion und Organotropismus der Tumorzellen

Während 1919 Ewing eine Extravasation der Tumorzellen auf eine Verlangsamung dergleichen durch ein Missverhältnis zwischen dem Zell- und Lumenquerschnitt zurückführte [13], legen heutige molekulare Kenntnisse dar, dass auch die Arretierung der Tumorzellen in der Blutzirkulation durch Adhäsion derselben mit Thrombozyten bzw. mit Endothelien mittels Integrin- und Katherinrezeptoren als Ursache für eine solche Extravasation ausreichen [23, 24]. Zudem wurde eine signifikante Überexpression der Integrine bei Mammakarzinomfällen mit nachgewiesenen ossären Metastasen beschrieben [25].

Eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen sind die Selektine, die überwiegend im vasalen Endothel exprimiert werden und als wichtiger Initialrezeptor für die Extravasation

zirkulierender Tumorzellen fungieren. Außerdem wird angenommen, dass Tumorzellen selbst eine Selektinexpression im Metastasierungsprozess induzieren [26, 27]. Raz et al. (1981) zeigten, dass durch eine weitere Glykoproteinfamilie, die Lectine, die Möglichkeit einer intravasalen Aggregation der Tumorzellen unter sich, Verlangsamung der Aggregate und ggf. Kolonisation der entsprechenden Organe gegeben ist [28].

Eine weitere Erklärung für den Organotropismus zirkulierender Tumorzellen fand sich in der Arbeit von Müller et al. (2001), die das System der Chemokine und Chemokin-Rezeptoren für die Chemotaxis und Migration der Leukozyten verantwortlich halten. Hier wird angenommen, dass auch die Invasion und Migration der Tumorzellen in Richtung höherer Chemokinkonzentrationen im Gewebe durch die erhöhte Expression entsprechender Chemokin-Rezeptoren in den Tumorzellen hervorgerufen wird. Dabei exprimieren die Tumorzellen des Mammakarzinoms vor allem jene Rezeptoren, deren entsprechende Chemokine in den Lymphknoten, der Lunge, dem Knochenmark und der Leber produziert werden. Während die entarteten Zellen vor allem die Rezeptoren CCR7 und CXCR4 synthetisieren, werden in den o. g. Organen die dazu affinen Chemokine CXCL12 und CCL21 produziert [29].

Letztendlich stellt das Wachstum und die Vermehrung der entarteten Zellen und somit die Erhöhung der Anzahl an potenziell metastasierenden Karzinomzellen eine ebenso grundlegende Voraussetzung der fernen Streuung dar. Hierbei ist in den letzten Jahren vor allem ein Mechanismus in den Vordergrund getreten. In den 1980er Jahren wurde in zahlreichen Studien die Existenz einer Variante der Rezeptorfamilie der epidermalen Wachstumsfaktoren (epidermal growth factor receptor; EGFR) beschrieben [30, 31]. King et

al. (1985) beschrieben für diese c-erbB2 bezeichnete Variante der EGFR-Familie, erstmals eine Assoziation mit dem humanen Mammakarzinom [32]. Der biochemische Mechanismus und somit die kausale Bedeutung des Her2/*neu*-Rezeptors c-erbB2 für die Entstehung eines Karzinoms wurde erst in den Folgejahren deutlich. Die Aktivierung des extrazellulären Anteils der EGF-Rezeptoren leitet eine Kaskade von intrazellulären Signalwegen ein, die letztendlich in Transkription und Proteinbiosynthese und somit in Wachstum münden [33]. Es wird deutlich, dass die Aktivierung der Oberflächenproteine der EGF-Rezeptoren einer sehr feinen Regulation bedarf, damit ein unkontrolliertes Wachstum verhindert werden kann. Her2/*neu* stellt eine EGF-Rezeptorvariante dar, welche der physiologischen Wachstumskontrolle auf zellulärer Ebene ausweicht und bei Überexpression eine dysregulierte Initialisierung der intrazellulären Reaktionskaskaden verursacht [34]. Dies wiederum kann ein entartetes Wachstum und sogar die Entstehung karzinomatösen Gewebes zur Folge haben.

### **2.3. Erste Versuche zur Erfassung zirkulierender Tumorzellen**

In der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurden erste Versuche konzipiert, welche die Auslese entarteter Zellen aus dem peripheren Blut bezweckten. Diese Tendenz entstand insbesondere deshalb, weil die Evaluation nativer Blutproben nur in einzelnen, weit fortgeschrittenen Karzinomfällen den Nachweis zirkulierender Tumorzellen erbrachte [9, 35, 36]. Eines der ersten Versuche zur Anreicherung von Tumorzellen begann im Jahre 1934 mit Pool und Dunlop (1934). Ihre Ansätze beinhalteten die Hämolyse kernloser, roter Zellreihen mittels Essigsäure um anschließend erhaltene kernhaltige Zellen darzustellen. Aufgrund der

nichtselektiven Erfassung kernhaltiger Zellen und der vermutlichen säurebedingten Verformung derselben mit der Folge der erschwerten Identifikation, ergaben die Erprobungen keine überzeugenden Resultate [37].

Tullis et al. beschrieben 1952 die Möglichkeit der Zentrifugation und Auftrennung verschiedener Zellreihen des Blutes auf Grund ihres unterschiedlichen spezifischen Gewichtes. Hierbei konnten Leukozyten und Tumorzellen ohne gravierende Deformationen von Erythrozyten getrennt werden [38]. Da die Tumorzellsuche dennoch durch die verhältnismäßig hohe Anzahl an Leukozyten erschwert war, wurde diese Methode durch weitere Maßnahmen modifiziert (s. u.).

In den Folgejahren wurden erste Reagenzien eingesetzt, die die Konzentration der Blutprodukte auf Leukozyten und vermutlichen Tumorzellen versprachen. Sandberg et al. wandten hierfür 1957 Fibrinogen zur Aggregation von Erythrozyten an. Nach weiterer Sedimentation der Aggregate konnten sie in 36 Fällen von Mammakarzinomen 18 positive Nachweise für Tumorzellen erbringen [39].

Roberts et al. beschrieben 1958 eine zweistufige Methode der Zellseparation. Diese beinhaltete zunächst die Fibrinogengabe und Zentrifugation des Blutes, womit eine Aggregation und Sedimentation der Erythrozyten beabsichtigt wurde. Der Plasmaüberstand mit vermutlicher Existenz von Leukozyten und Tumorzellen wurden entnommen und auf eine Albuminbeschichtung übertragen. Bei der zweiten Zentrifugation erfolgte die Sedimentation der Leukozyten auf Grund ihres höheren spezifischen Gewichtes unter die Albumingrenze. Die Tumorzellen wurden an der Albumingrenzfläche festgehalten. Die zytologische Beurteilung der Produkte ergab bei 25 Blutproben von Patienten mit Mammakarzinom sechs positive Tumorzellnachweise [40].

In Folgestudien wurde Streptolysin-O, ein hämolysierendes Gift, ebenfalls zum Ziel der Tumorzellseparation eingesetzt. 1959 setzten Long et al. das Streptolysin-O zur Lyse von Erythrozyten und polymorphkernigen Leukozyten unter Verschonung mononukleärer Zellen, Megakaryozyten und vermeintlichen Tumorzellen im Blut ein. Die Evaluation der Blutprodukte erfolgte wiederum mittels zytologischer Untersuchung. Diese erbrachte den positiven Tumorzellnachweis in fünf von 20 Mammakarzinomfällen [41, 42].

Ein weiterer Versuch der Tumorzellselektion wurde von Pruitt et al. 1958 unter Einsatz von Milliporefilter beschrieben. Dabei erfolgte nach einer ähnlichen Streptolysin-O-Anwendung die Passage der Blutprodukte durch diese Filter [43].

1959 stellten dann Seal et al. ein weiteres Konzept der Zellseparation bestehend aus zentrifugaler Sedimentation der Erythrozyten und einer Formalinfixierung dar. Sie erreichten bei mikroskopischer Untersuchung der Blutprodukte einen positiven Tumorzellbefund bei 33% der Mammakarzinomfälle im peripheren Blut [44].

Kuper et al. (1961) stellten ein weiteres Versuchsmodell vor, das die Zugabe von Eisenpulver beinhaltete. Die Phagozytose des Eisens durch die polymorphkernigen Blutzellen sowie die folgende Aussetzung der Blutprodukte an einem magnetischen Feld diente dann zur Elimination eisenhaltiger Zellen. Anschließende Zentrifugation, Entfernung des Überstandes und die Passage durch einen Milliporefilter führten dann zur weiteren Zellelimination und Erhaltung der Tumorzellen. Bei Fünf von 29 Patienten mit nachgewiesenem Bronchialkarzinom konnten so Tumorzellen im peripheren Blut nachgewiesen werden [45].

In diesen Untersuchungsmodellen wurden die Blutprodukte entweder in unspezifischen gefärbten oder nicht gefärbten Präparaten mikroskopisch und somit beobachterabhängig evaluiert. In den Folgejahren wurden diese Forschungsarbeiten durch Entwicklung

immunzytochemischer Methoden (ICC) weiterentwickelt. Damit wurde die Markierung bestimmter tumorassoziierter Proteine (z. B. Zytokeratine) mittels Antikörper möglich. Ein Beispiel für einen immunzytochemischen Versuchsansatz anhand peripheren Blutes von Patienten mit Mammakarzinom ist die Arbeit von Ross et al. (1993) [46]. Die Ergebnisse jedoch waren vor allem aufgrund des damals nicht genügenden Wissens über spezifischere Markerproteine nicht überzeugend. Bei einem Kollektiv von Mammakarzinom-Patienten mit ossären Metastasen kamen Ross et al. bei 18,7% der Patienten zu einem Tumorzellnachweis im peripheren Blut. Sie setzten zum immunzytochemischen Nachweis von Tumorzellen monoklonale Antikörper, wie MAS-385, SB-3, TSF-2 ein, die bis heute keine Bedeutung in der Forschung von Mammakarzinom fanden.

Somit begann nunmehr die Beurteilung der Markerantigene und ihrer Tumorspezifität für die jeweiligen Entitäten, z.B. Mammakarzinom. Im Falle der karzinomatösen Entartung, z. B. der Brustdrüse, werden aufgrund ihres epithelialen Ursprungs, den heutzutage bekannten epithelzell-spezifischen Antigenen große Bedeutung zugeschrieben. Zu dieser Gruppe von Antigenen zählen vor allem die Zytokeratin-Familie und das „epitheliale zelluläre Adhäsionsmolekül (EpCAM)“ [47-49]. Die Anfärbung solcher Antigene der Zelloberflächen im Blut bedeutet demzufolge der Nachweis von Zellen epithelialen bzw. nicht hämatogenen Ursprungs. Die immunzytochemische Nachweismethode ist laborintensiv und zeitbeanspruchend.

Die Entwicklung der Polymerasekettenreaktion in den 80er Jahren gestattete die Vervielfältigung (Amplifikation) des menschlichen Erbgutes DNA bis hin zu der Möglichkeit die Expression auch seltener Boten-RNA Transkripte (mRNAs) nachzuweisen [50]. Es begann die Identifikation mutmaßlicher Markerproteine, die zuvor nur immunzytochemischen

Methoden zugänglich waren, auf der Ebene ihrer genetischen Kodierung. Die Identifikation der Gene wurde in Form von DNA bzw. mit der Entdeckung der reversen Transkriptase auch in Form von mRNA möglich. Ein vorrangiger Unterschied zu den vorangegangenen Nachweistechiken besteht bei den verschiedenen PCR-Methoden darin, dass die Auswertung nunmehr nicht auf mikroskopischer Beurteilung basiert. Die bei der PCR gewonnenen Genamplifikate werden nach Färbung zur späteren Detektion auf Agarosegelen aufgetrennt. Dabei erfolgt die Identifikation der einzelnen Gene aufgrund der Größe der Amplifikate, die in direkter Korrelation zur Laufstrecke im Agarosegel stehen. Neben der Evaluation der einzelnen PCR-Methoden begann auch hier die Beurteilung der Expression verschiedener, mutmaßlicher Markergene hinsichtlich ihrer Tumorspezifität.

Die Nachweisverfahren mittels PCR-Technik unterlagen in den letzten Jahren ebenfalls vielfältiger Weiterentwicklung. Dazu zählt, dass die bestenfalls semiquantitative Analyse der PCR-Endpunktbestimmung durch quantitative Verfahren (qPCR) zunehmend ersetzt wird. Die Identifikation der einzelnen Gene in Form von Banden in PCR-Endpunktbestimmungen wies auf die Existenz dieser Genexpressionen hin. Heute können nunmehr durch automatisierte, computerunterstützte Verfahren die Fluoreszenz dieser Gen-Banden registriert und somit sensitiver erkannt und sogar quantifiziert werden.

Auch bei der modernen Realtime-Technik handelt es sich um ein qPCR-Verfahren. Hier wird die Fluoreszenzstärke der cDNA-Amplifikation bereits während des Verfahrens registriert und unterscheidet sich maßgeblich von anderen qPCR-Verfahren, da hierdurch das Risiko einer Kontamination im Vergleich zu Verfahren der PCR-Endpunktbestimmungen wesentlich geringer ausfällt. Eine kontinuierliche Messung des Amplifikationssignals ermöglicht zudem positive abnormale Kurvenverläufe zu identifizieren und als falsch-positive Befunde

auszuschließen [51]. Die Bedeutung dieser molekularbiologischen Verfahren konnten in zahlreichen Studien in den letzten Jahren belegt werden. Jotsuka et al. (2004) untersuchten 100 Brustkrebspatientinnen im N0-Stadium und bestimmten die Existenz des CEA-mRNA mittels Realtime-Technik im peripheren Blut unmittelbar vor und nach einer operativen Therapie [52]. Es konnte eine signifikant kürzere krankheitsfreie Zeit für Patientinnen mit Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CEA-mRNA positiv) dargestellt werden. Die Patientinnen, die zu beiden Befunderhebungen positiv ausfielen, hatten die schlechteste Prognose.

Seit einigen Jahren werden zunehmend auch immunomagnetische Anreicherungsverfahren mit PCR-Untersuchungen kombiniert. Eine solche Methode nutzt die spezifischen Oberflächeneigenschaften von Tumorzellen, um sie von gesunden Zellen zu unterscheiden. Die Technik basiert darauf, dass die membranständigen Antigene dieser Tumorzellen mittels an magnetische Partikel angekoppelter Antikörper erkannt werden. Die anschließende Magnetseparation führt letztendlich zur Anreicherung der Tumorzellen. Die PCR-Methode nach Wahl kann ohne weitere Modifikation im Anschluss an eine solche Auftrennung und einigen Waschschritten auf das Probengut angewandt werden [53]. Die ersten in-vitro Versuche von immunomagnetischen Anreicherungsverfahren wurden durch Berois et al. (1997) mit monoklonalen Antikörpern gegen CK-19 an Mammakarzinom-Zelllinien durchgeführt [54]. Mittlerweile werden solche Auftrennungsverfahren auch in klinischen Studien angewendet, wie sie in einer Studie über Kolonkarzinom mit 94 Darmkrebspatienten von Hardingham et al. (2000) durchgeführt wurde [55]. Der Nachweis von Tumorzellen im Blut anhand immunomagnetischer Aufbereitung und einer Realtime-PCR-Methode zeigte in ihrer Arbeit eine hoch-signifikante Korrelation zum verkürzten krankheitsfreien Intervall.

Bei der Untersuchung einzelner Gene hinsichtlich Ihrer Markereigenschaften muß die Balance zwischen der Spezifität und Sensitivität des mutmaßlichen Markergens abgewogen werden [56]. Aufgrund der Heterogenität des Mammakarzinoms genügt in den Analysen bisher kein Einzelgen dem Kriterium eines spezifischen, universellen Markers. Eine Möglichkeit dieser Problematik zu begegnen, ist die Evaluation von multiplen Markergenen innerhalb eines Probengutes. Die Effektivität im Sinne der Verbesserung von Sensitivität und Spezifität zugleich durch diese Vorgehensweise (multiplex-PCR) wurde bereits von Gilbey et al. (2004) beschrieben [57].

Die aktuelle Studie beinhaltet ebenfalls einen Versuchsansatz basierend auf einer immunomagnetischen Anreicherungs-methode und anschließender multiplex- bzw. Realtime-PCR-Technik.

Die jüngste Entwicklung zeigt zudem Automatisierungsverfahren, wie sie von Allard et al. (2004) beschrieben wurde. Ihr automatisierter Versuchsansatz basiert auf der immunomagnetischen Selektion mutmaßlicher, zirkulierender Tumorzellen mittels Anti-EpCAM-Antikörper. Die Selektion wird zudem durch die spezifische Färbung von Karzinomzellen mit Anti-CK-19 und der Gegenfärbung hämatogener (nicht-karzinomatöser) Zellen mit Anti-CD45 unterstützt. In ihrer Studie bestätigten sie die Validität einer immunomagnetischen Anreicherungsautomatik [58]. In 37% der 1316 untersuchten Patientinnen konnte das Vorhandensein von zirkulierenden Tumorzellen im Blut nachgewiesen werden.

Smirnov et al. (2005) benutzten dieses Automatisierungsverfahren zur Selektion von zirkulierenden Tumorzellen bei metastasierten Karzinomen und charakterisierten durch Analyse der mRNA-Expressionsprofile weitere tumorspezifische Gene [59].

Bezüglich der mutmaßlichen Markergene bei Mammakarzinom wurde aktuell eine umfangreiche Zusammenfassung durch Lacroix (2006) erstellt. Beim Mammakarzinom sind die häufigsten Marker für die Antikörper-basierten Techniken die Zytokeratine, c-erbB2, Muc-1 und EpCAM [56].

### **2.4. Jüngste Fragestellung in der Forschung zirkulierender Tumorzellen und die Zielsetzung der aktuellen Arbeit**

Die Erfassung des Zeitpunktes der Generalisierung eines Mammakarzinoms ist der heutigen Diagnostik nicht zugänglich. Somit wird eine Fernmetastasierung entweder zu vorsorglichen Restaging-Terminen oder erst nach klinischer Manifestation diagnostiziert und therapiert. Ein solcher Therapieansatz besitzt nur selten kurative Ansprüche und stellt zumeist eine palliative Maßnahme dar. Obwohl heute zahlreiche, reproduzierbare biochemische Vorgänge (s. o.) bezüglich der Fernmetastasierung bekannt sind, verhindern einerseits die Vielfältigkeit andererseits die fehlende Entitätsspezifität dieser Vorgänge ihren molekularbiologischen Nutzen im Sinne einer Screeningmethode für das Mammakarzinom. Bei heutigem Wissensstand bedarf es nunmehr der molekularbiologischen Evaluation der Gene hinsichtlich ihrer Karzinomspezifität. Das periphere Blut bietet daher nicht zuletzt durch die verhältnismäßig schmerzarme Probengewinnung ein ideales Medium zur Erforschung dieser Thematik. Eine Befunderhebung durch Analyse des peripheren Blutes kann zudem in

häufigeren Abständen durchgeführt werden, so dass eine engmaschigere Beobachtung der Patienten gewährleistet werden kann. Die Möglichkeit der mehrmaligen Probengewinnung innerhalb kurzer Zeit begegnet außerdem dem Verdacht, dass eine Streuung der Tumorzellen aus dem Primarius in die Zirkulation intermittierend stattfinden kann [56].

Vor diesem Hintergrund beinhaltet die Forschung zirkulierender Tumorzellen heute folgende Ziele bzw. Fragestellungen:

1. Früherkennung und sekundäre Prävention einer Fernmetastasierung
2. Ihr Voraussagewert hinsichtlich der Entitätsprognose
3. Ihre Aussagekraft hinsichtlich des Therapieerfolges.

Ziel dieser Arbeit ist die Validierung eines kommerziellen Systems zur Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen aus dem Vollblut von Mammakarzinompatientinnen. Der Problematik der Heterogenität der Expressionsprofile beim Mammakarzinom und der Variabilität der Ergebnisse in der Isolation und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen im peripheren Blut soll dabei durch Erweiterung der Gruppe untersuchter Markergene Rechnung getragen werden.

Das kommerzielle System beruht auf einem immunomagnetischen Verfahren zur Isolation und einer multiplex-PCR-Analyse der disseminierten Tumorzellen aus peripherem Blut.

Die Arbeit wird zudem durch Hinzunahme weiterer Gene, die mittels eines Realtime-PCR Verfahrens analysiert wurden, erweitert. Somit wird die Bedeutung innovativer Gene evaluiert und zur Bildung neuer Genprofile benutzt.

Die Expression tumorassoziierter Gene und ihr prognostischer Wert für den Status des Mammakarzinoms sollen bewertet werden. Anhand bereits vorhandener Geneexpressionsprofile werden zusätzliche Genkandidaten ermittelt und deren, über das bestehende Testsystem hinausgehender Beitrag, an einem Testkollektiv geprüft. Das Resultat der DTC-Charakterisierung wird den klinisch-pathologischen Parametern gegenübergestellt.

### **3. Patientinnen und Methoden**

#### **3.1. Das Kollektiv**

Alle teilnehmenden Patientinnen und gesunden Probandinnen haben nach ausführlicher Aufklärung hinsichtlich des Studienablaufs und -Zieles, ihr Einverständnis zur Teilnahme kundgegeben (Studiennummer bei der Ethikkommission der Medizinischen Universität Düsseldorf: 2394 / 2004). Die Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Teilnahme unter adjuvanter bzw. neoadjuvanter Bestrahlungstherapie an der Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf.

Das Gesamtkollektiv umfasst 77 Frauen, die aus 63 Patientinnen mit gesicherter Diagnose eines Mammakarzinoms und 14 gesunden Probandinnen besteht. Lediglich für die Untersuchung zweier Gene (MGB-1 und SPDEF) konnten weitere elf gesunde Probanden hinzugezogen werden. In der Vorgeschichte der gesunden Probandinnen waren keine Malignome der Brustdrüsen eruierbar. Das Patientinnenkollektiv wurde zusätzlich in erstdiagnostizierte (n=50) und rezidierte Fälle (n=13) des Mammakarzinoms eingeteilt.

#### **3.1.2 Altersmerkmale des Studienkollektiv**

Das Altersspektrum der Patientinnen streckt sich von 33 Jahren bis 81 Jahren mit einem Median von 60 Jahren, während das Alter der gesunden Probandinnen zwischen 24 Jahren und 61 Jahren variiert und einen Medianwert von 41,5 Jahren hat. Die Patientinnen mit erstdiagnostizierter Krankheit waren zwischen 33 und 81 Jahre alt mit einem Median von 57

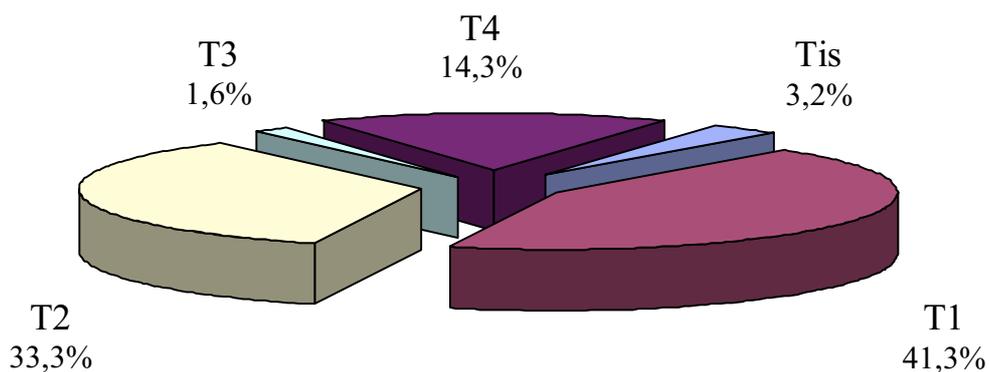
Jahren, wohingegen die Gruppe der rezidierten Fälle eine Spanne von 44 Jahren und 75 Jahren mit einem Median von 63,5 Jahren aufwies.

### 3.1.3 Histopathologische Merkmale der Karzinomfälle

Die malignen Entitäten im Brustgewebe der Patientinnen wurden nach der TNM - Klassifikation durch die Union internationale contre le Cancer (UICC) näher charakterisiert [60].

#### 3.1.3.1 T – Status der Patientinnen

Alle Klassen der T-Klassifikation bis auf die Stufe 4c waren im Kollektiv vertreten. Insgesamt waren 2/63 der Patientinnen mit Tis, 26/63 der Patientinnen mit T1, 21/63 der Patientinnen mit T2, 1/63 der Patientinnen mit T3 und 9/63 der Patientinnen mit T4 diagnostiziert. Bei vier Patientinnen war aufgrund der neoadjuvanten Bestrahlung oder einer Rezidiv- bzw. primären Metastasenbestrahlung der aktuelle T-Status nicht eruiertbar.

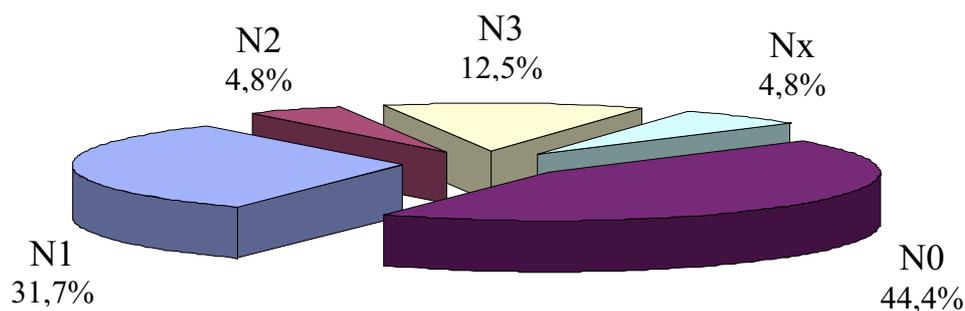


**Tabelle 1** Übersicht des T-Status der Patientinnen (ED: Erstdiagnose; REZ: Rezidiv)

<i>T</i>	<i>is</i>	<i>Ia</i>	<i>Ib</i>	<i>Ic</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4a</i>	<i>4b</i>	<i>4c</i>	<i>4d</i>	<i>x</i>	$\Sigma$
<b>ED</b>	2	1	4	16	16	1	1	5	0	1	3	50
	4%	2%	8%	32%	32%	2%	2%	10%	0%	2%	6%	100%
<b>REZ</b>	0	1	1	3	5	0	1	1	0	0	1	13
	0%	7,7%	7,7%	23,1%	38,5%	0%	7,7%	7,7%	0%	0%	7,7%	100%

### 3.1.3.2 N – Status der Patientinnen

44,4% des erkrankten Gesamtkollektives wies keinen Lymphknotenbefall auf. Unter den N-positiven Fällen befanden sich 13/63 im Stadium N1a, 7/63 im Stadium N1b, 3/63 im Stadium N2 und 8/64 im Stadium N3. In 3/63 der Fälle wurde aufgrund fehlender histopathologischer Befunde kein N-Status ermittelt.



**Tabelle 2** Übersicht des N-Status der Patientinnen (ED: Erstdiagnose; REZ: Rezidiv)

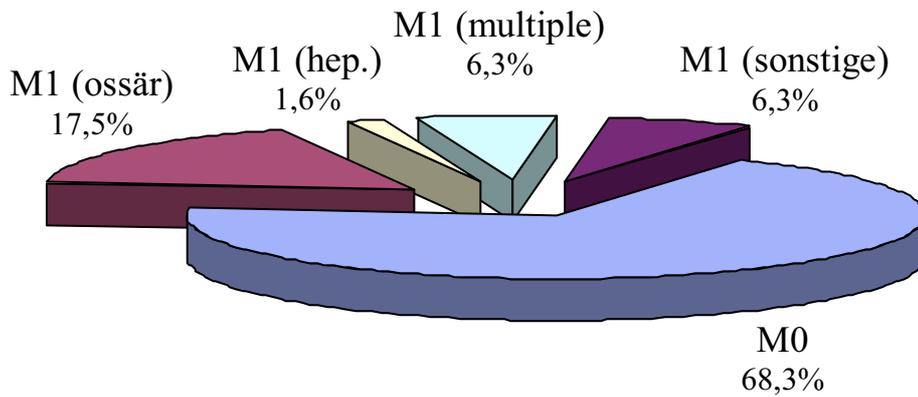
<i>N</i>	<i>0</i>	<i>1a</i>	<i>1b</i>	<i>2a</i>	<i>2b</i>	<i>3a</i>	<i>3b</i>	<i>3c</i>	<i>x</i>	$\Sigma$
<b>ED</b>	24	11	3	2	0	7	0	0	3	50
	48%	22%	6%	4%	0%	14%	0%	0%	6%	100%
<b>REZ</b>	4	2	4	1	0	0	0	1	1	13
	30,8%	15,4%	30,8%	7,7%	0%	0%	0%	7,7%	7,7%	100%

Unter den sechs von sieben Fällen mit einem Nodalstatus von 1b wurde die weiterführende Unterteilung abhängig von der Anzahl der befallenen Lymphknoten bzw. deren Größe bestimmt. Dabei wurde ein Fall aus der Gruppe der erstdiagnostizierten Fälle mit insgesamt drei befallenen Lymphknoten der Untergruppe N1bi und ein Fall mit insgesamt sieben befallenen Lymphknoten der Untergruppe N1bii zugeteilt. Ein weiterer Fall aus dieser Patientengruppe mit dem Nodalstatus N1b wurde nach Anzahl der angegriffenen Lymphknoten nicht beurteilt. Die Studie schließt keinen Fall ein, der der dritten Stufe N1biii mit Durchbruch der Lymphknotenkapsel per definitionem entsprach. In der Gruppe der Rezidivfälle gehörten ein Fall mit zwei maligne besetzten Lymphknoten der Untergruppe N1bi, ein Fall mit vier befallenen Lymphknoten der Untergruppe N1bii und zwei Fälle mit vier bzw. 20 auffälligen Lymphknoten und mit zusätzlichem Kapseldurchbruch dem Stadium N1biii an.

### 3.1.3.3 M – Status der Patientinnen

Bei ca. 31,7% aller Patientinnen wurde die Fernmetastasierung nach radiologischen und sonographischen Untersuchungen festgestellt. Die übrigen Patientinnen wiesen keinen Anhalt

für eine Fernmetastasierung auf. Patientinnen mit ossären und hepatischen Metastasen wurden lediglich unter der Gruppe der multiplen metastasierten Fälle aufgeführt.

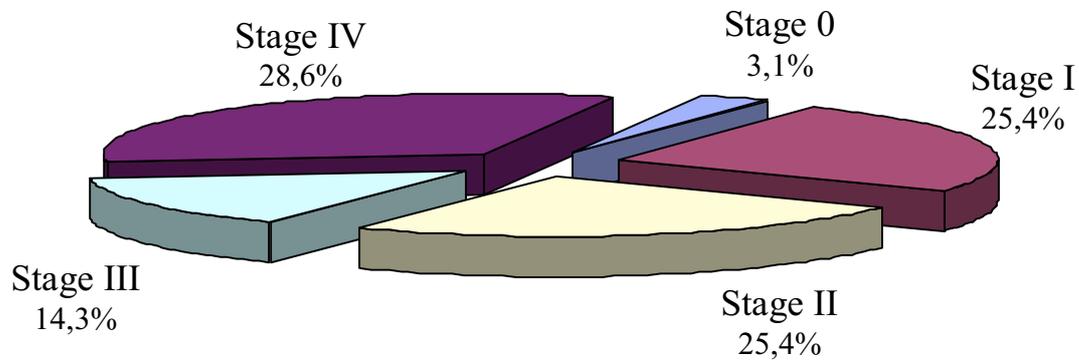


**Tabelle 3** Übersicht des M-Status der Patientinnen (ED: Erstdiagnose; REZ: Rezidiv)

<i>M</i>	<i>0</i>	<i>1 (ossär)</i>	<i>1 (hepatisch)</i>	<i>1 (multiple)</i>	<i>1 (sonstige)</i>	$\Sigma$
<b>ED</b>	41	6	1	0	2	50
	82%	12%	2%	0%	4%	100%
<b>REZ</b>	2	5	0	4	2	13
	15,4%	38,5%	0%	30,8%	15,4%	100%

### 3.1.3.4 Einteilung des Mammakarzinoms nach den Vereinbarungen des American Joint Committee on Cancer (AJCC)

Eine international anerkannte Erweiterung der TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms in Anlehnung an AJCC, die auch Staging-Klassifikation genannt wird, zeigt folgende Systematik auf [61]:



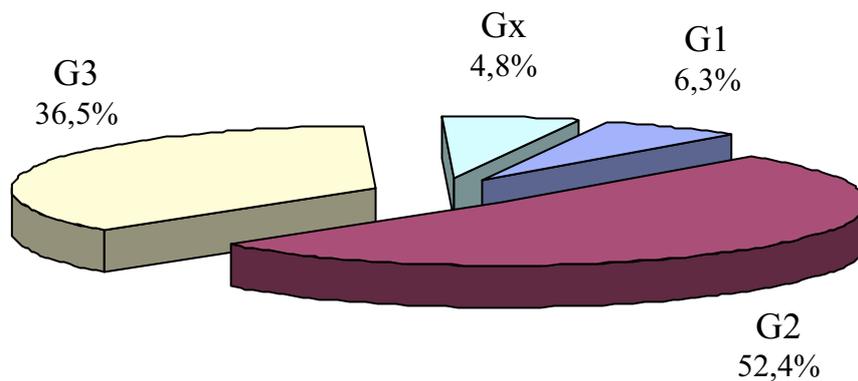
**Tabelle 4** Betrachtung der AJCC-Klassifikation des Kollektivs (ED: Erstdiagnose; REZ: Rezidiv)

<i>AJCC</i>	<i>TNM-Klassifikation</i>			<i>ED</i>	<i>REZ</i>	$\Sigma$
<b>Stage 0</b>	Tis	N0	M0	2		2
<b>Stage I</b>	T1	N0	M0	14	2	16
<b>Stage IIa</b>	T1	N1	M0	9	1	10
	T2	N0	M0			
<b>Stage IIb</b>	T2	N1	M0	6		6
	T3	N0	M0			
<b>Stage IIIa</b>	T1/T2	N2	M0	1		1
	T3	N1/N2	M0			
<b>Stage IIIb</b>	T4	jedes N	M0	7	1	8
	jedes T	N3	M0			
<b>Stage IV</b>	jedes T	jedes N	M1	9	9	18

Das Staging konnte bei zwei Patientinnen aufgrund nicht ausreichender Datenlage zur Bestimmung des Staging-Status nicht festgelegt werden.

### 3.1.3.5 Differenzierungsgrad des Mammakarzinoms

Der G-Status wurde in 95,2% der Patientinnen bestimmt. Im Falle der erstdiagnostizierten Patientinnen waren alle Stadien der Differenzierungsabstufung vertreten, wohingegen die Rezidivfälle kein hochdifferenziertes Mammakarzinom aufwiesen.



**Tabelle 5** Übersicht des Differenzierungsgrad der Patientinnen (ED: Erstdiagnose; REZ: Rezidiv)

<i>G</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>X</i>	$\Sigma$
<b>ED</b>	4	25	19	2	50
	8%	50%	38%	4%	100%
<b>REZ</b>	0	8	4	1	13
	0%	61,5%	30,8%	7,7%	100%

### 3.1.4. Therapieprofil des Kollektivs

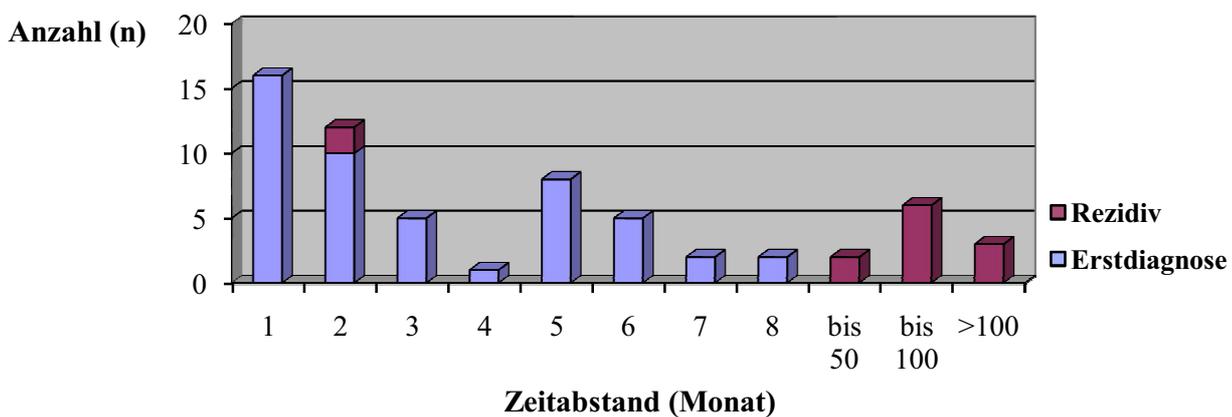
Erkrankte Studienteilnehmerinnen wurden vor der aktuellen Bestrahlung mit verschiedenen Therapieoptionen behandelt. Dazu gehören die operative Intervention, adjuvante und

neoadjuvante Chemotherapie und die Strahlentherapie in vorangegangenen Jahren bei rezidierten Fällen.

### 3.1.4.1. Operative Therapie

Zu den wichtigsten, chirurgischen Eingriffen in Fällen eines Mammakarzinoms gehören die radikale Mastektomie (MRM), die brusterhaltende Therapie (BET) und die axilläre Lymphnodektomie (ALND), wobei das letztere bei suspekten Axillabefunden zusätzlich zu MRM bzw. BET durchgeführt wird. 96,8% der teilnehmenden Patientinnen erfuhren in einer Zeitspanne von einem Monat bis 18 Jahren vor der aktuellen Bestrahlung eine Operation der Brustdrüse. Drei von 63 Fällen wurden ohne chirurgische Behandlung entweder neoadjuvant oder palliativ bestrahlt bzw. chemotherapeutisch behandelt.

### Zeitabstand zwischen operativer Therapie und aktueller Bestrahlung



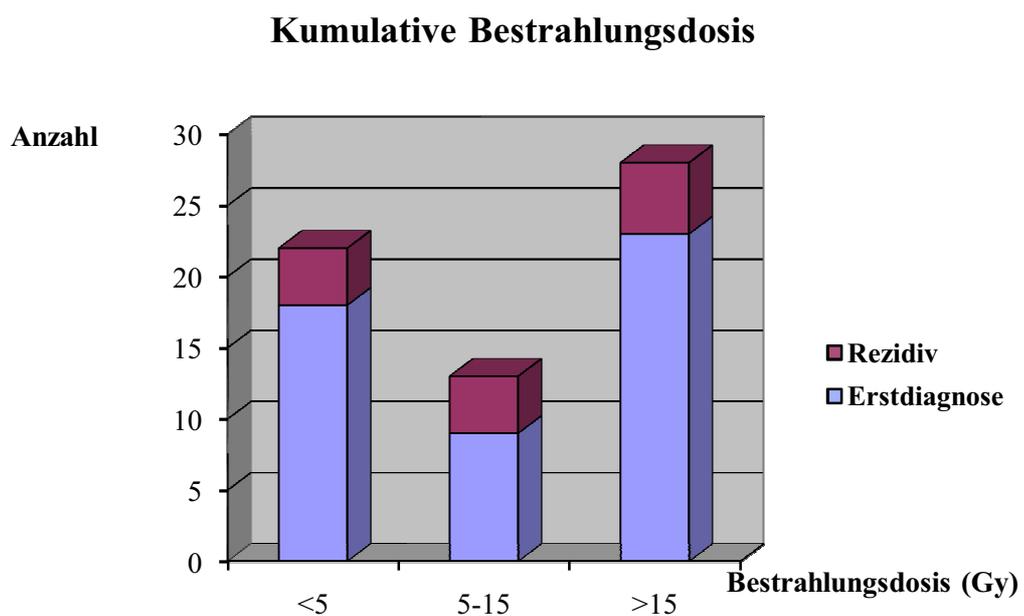
**Tabelle 6** Operationsstatus der Patientinnen (ED: Erstdiagnose; REZ: Rezidiv)

<i>OP</i>	<i>minimaler Zeitabstand</i>	<i>maximaler Zeitabstand</i>	<i>Median</i>	<i>nicht operiert</i>
<b>Erst Diagnosen</b>	1 Monat	8 Monate	2,5 Monate	3
<b>Rezidive</b>	2 Monate	216 Monate	60 Monate	0

Die Gruppe der konservativ behandelten Erst Diagnosen setzte sich aus einem Fall mit fortgeschrittenem Mammakarzinom der Klassifikation T4a,N1b,M1oss unter palliativer Chemotherapie und aus zwei neoadjuvant zytostatisch therapierten Fällen zusammen.

### 3.1.4.2. Strahlentherapie

Alle Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt ihrer Teilnahme an dieser Studie während oder zu Beginn einer Strahlentherapie.



### 3.1.4.3. Chemotherapie

Das chemotherapeutische Profil des Patientinnenkollektivs weist abhängig von der aktuellen Vielzahl der empfohlenen Therapieschemata eine hohe Heterogenität auf.

**Tabelle 7** Übersicht der zytostatischen Therapie der Patientinnen (EC: Epirubicin+Cyclophosphamid; FEC: 5-Fluoruracil+Epirubicin+Cyclophosphamid; ET: Epirubicin+Taxane; CMF: Cyclophosphamid+Methotrexat+5-Fluoruracil; Tax: Ein Präparat der Wirkstoffgruppe der Taxane)

	<i>EC</i>	<i>FEC</i>	<i>ET</i>	<i>CMF</i>	<i>Tax</i>	<i>EC</i> <i>+ET</i>	<i>EC</i> <i>+CMF</i>	<i>EC</i> <i>+Tax</i>	<i>EC+Tax</i> <i>+CMF</i>	$\Sigma$
<b>n</b>	5	9	2	1	3	1	3	5	1	30
	16,7%	30%	6,7%	3,3%	10%	3,3%	10%	16,7%	3,3%	100%

### 3.2. Methoden

Der methodische Aufbau der Studie setzte sich aus der Probenentnahme aus dem peripheren venösen Blut der Patientinnen, der Tumorzellerkennung und – separation sowie der darauf folgenden Isolierung von gesuchten mRNA-Spezies aus diesen Zellen zusammen. Anschließend wurden Reverse Transkription (RT) und multiplex- bzw. Realtime-Polymerasekettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction; PCR) zum Nachweis dieser Gene angewendet.

### **3.2.1 Blutentnahme**

Das periphervenöse Blut wurde mit Hilfe eines Schmetterling-Adapter-Systems aus den antekubitalen Venen, der Unterarmvenen oder dem Rete venosum des Handrückens entnommen. Die Blutentnahmen verliefen sowohl in der Gruppe der erkrankten als auch der gesunden Teilnehmer unauffällig und komplikationslos.

Bis zur weiteren Aufarbeitung unter sterilen und standardisierten Laborbedingungen wurde das Patientenblut mit einer Menge von mindestens fünf ml im EDTA Röhrchen mit Hilfe von Flockeneis bei einer Temperatur von 0°C aufbewahrt. Der weitere Prozess wurde in allen Fällen spätestens nach zwei Stunden fortgesetzt.

### **3.2.2. Das immunomagnetische Verfahren**

#### **3.2.2.1 Die Erfassung nicht-hämatogener Zellen im Blut**

Die vermeintlich vorhandenen Tumorzellen im periphervenösen Blut der Patientinnen wurden in dieser Phase des experimentellen Ablaufes mittels Antikörper erfasst. Dazu wurde das Erfassungssystem Adnagen Breast Cancer Select Kit (Adnagen AG, Langenhagen, Deutschland) eingesetzt. Die Technik besteht darin, im Blut zirkulierende und somit auch im Patientengut vermutlich vorhandene Karzinomzellen mit Hilfe von magnetisch beladenen Antikörpern (immunomagnetische Partikel, IMP) zu erkennen. Während diese Antikörper auf der einen Seite gegen Zellen epithelialen und somit nicht – hämatologischen Ursprungs gerichtet sind, besitzen sie auf der anderen Seite eine mit Eisenpartikeln behaftete Oberfläche, die ihnen eine magnetische Eigenschaft verleiht. Die Antikörper zur epithelialen Zellerfassung wurden herstellerseitig in Anlehnung an früher veröffentlichten Publikationen

ausgewählt und validiert. Sie bestehen aus einer Kombination aus zwei Antikörpern gegen verschiedene Epitope des Muc-1 und einem Antikörper gegen EpCAM.

Bevor die Anwendung am Patientengut erfolgen konnte, wurden die gelösten IMP in einem dreistufigen Prozess gewaschen und vom Lösungsmittel getrennt. Pro Blutprobe wurden 100 µl dieser Suspension angewendet. Mit Hilfe eines Magnetstab – Systems (MPC-S) wurde der Überstand entfernt und die beibehaltenen IMP einem ml einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (phosphat buffered saline: PBS; Invitrogen, Kalifornien, USA) mit einem pH-Wert von 7,2 hinzugefügt und resuspendiert. Die Lösung wurde dem MPC-S – System erneut ausgesetzt. Dieser Ablauf wurde insgesamt dreimal wiederholt, wobei die Anwendung des MPC-S jeweils eine Minute andauerte. Die Menge der letzten PBS – Zugabe wurde nach der Anzahl der zu verarbeitenden Blutproben mit 100 µl pro Probe festgelegt.

#### **3.2.2.2 Isolierung erfasster Zellen aus den Blutproben**

Nachdem fünf ml einer EDTA-Blutprobe in 15 ml Röhrchen (BD Becton Dickinson Vacutainer Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) ohne Zusatz übernommen wurde, erfolgte der Zusatz von 100 µl der IMP – Lösung und anschließende, gleichmäßige Mischung der Blut-IMP-Suspension in einem Überkopf-Rotator (DYNAL Sample Mixer, DYNAL Biotech, Hamburg) bei Raumtemperatur für zwei Stunden mit einer Geschwindigkeit von 20 Runden pro Minute.

Unter Einsatz eines großen Magnetstab – Systems (MPC-L) für drei Minuten, wurden entsprechende Zellen, die mit IMP beladen sind, in dem selben Röhrchen akkumuliert, der Überstand wiederum entfernt und fünf ml der PBS – Lösung hinzugefügt. Dieser Ablauf

wurde zweimal wiederholt. Zuletzt wurden die angereicherten IMP-beladenen Zellen in einem ml PBS resuspendiert und in 1,5 ml Röhrchen überführt.

### **3.2.2.3 Die Isolation der Nukleinsäuren aus den Zellen**

Nach erneuter Aussetzung im MPC-S für eine Minute wurde der Überstand entfernt und 200 µl eines Lyse-/Bindungspuffers hinzugegeben, wodurch die Zellmembran zerstört und die zellulären Nukleinsäuren freigesetzt wurden. Die jetzige Suspension wurde erneut dem MPC-S für eine Minute ausgesetzt. Im Anschluss wurde diesmal der Überstand (Zelllysate) bestehend aus mRNA der lysierten Zellen in ein steriles 1,5 ml Röhrchen überführt und der verbliebene Rest mit den IMPs verworfen. Zelllysate wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -20 °C zur späteren Verarbeitung aufbewahrt.

### **3.2.3 Anreicherung der mRNA aus Zelllysaten**

Für den weiteren Prozess wurde das Bearbeitungssystem Adnagen Breast Cancer Detect Kit (Adnagen AG, Langenhagen, Deutschland) eingesetzt.

#### **3.2.3.1 Erfassung gesuchter mRNA im Zelllysate**

Die mRNA weist an ihrem 3' Ende eine variable Anzahl an Adenin-Basen auf (Poly-A-Ende), wodurch sie sich im Zelllysate von anderen Ribonukleinsäuren unterscheidet. Eine Suspension (ABCD, Adnagen Breast Cancer Detect Kit, Adnagen AG, Langenhagen, Deutschland) bestehend aus eisengekoppelten und zusätzlich mit Polythyminbasen behafteten Partikeln [25-Oligo(dT) Partikel] wurde zur Anreicherung und Isolierung aller poladenylierter RNA – Spezies aus der Lysatlösung eingesetzt. Es erfolgten zwei Waschschrte zur Entfernung der

Konservierungslösung. Dafür wurden 20 µl dieser Suspension pro Lysatprobe in ein steriles 1,5 ml Röhrchen übertragen und in das MPC-S für eine Minute eingesetzt. Nach magnetischer Auftrennung der Oligo(dT) Partikel wurde der Überstand entfernt. Die aufgetrennten Oligo(dT) Partikel wurden in dem Lyse/Bindungspuffer resuspendiert. Dabei entsprach das Volumen des Puffers dem Volumen vor der Auftrennung. Nach einmaliger Wiederholung dieser Waschphase wurden alle Lysatproben in jeweils 20 µl dieser Suspension versetzt. Jede Mischung aus Zelllysaten und Oligo(dT) Partikeln wurde in einen Rotator für zehn Minuten und mit 20 rpm rotiert.

### **3.2.3.2 Isolierung und Reinigung erfasster mRNA - Spezies aus dem Zelllysate**

Die Proben wurden für eine Minute ins MPC-S eingesetzt und der Überstand anschließend entfernt. Die mit Oligo(dT) Partikeln beladenen mRNA wurden somit in dem Röhrchen belassen. Es erfolgte erneut Waschschrte der mRNA – Probe mit dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer A, Puffer B und Tris-HCl-Lösung. 100 µl des Puffers A wurden der mRNA – Probe zugegeben und resuspendiert. Nach einminütigem Einsetzen ins MPC-S wurde der Überstand entfernt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die Reinigung der Probe mit Puffer B im gleichen Ablauf und ebenfalls wiederholt. Es erfolgte die letzte Reinigungsphase mit Tris-HCl ohne Wiederholung. Nach jeder erneuten Puffer oder Tris-HCl-Gabe wurden die Suspensionen in neue sterile Röhrchen übertragen. Nach Entfernung des Überstandes im letzten Schritt wurde die Probe in RNase – freiem Wasser resuspendiert und in einem Thermomixer für fünf Minuten bei 50 °C und 650 rpm inkubiert. Anschließend wurden die mRNA – Proben für mindestens zwei Minuten auf Eis gelagert.

### **3.2.4 Molekularbiologische Bearbeitung der gereinigten mRNA – Spezies**

#### **3.2.4.1 Reverse Transkription (RT)**

29,5 µl einer mRNA – Probe wurde in ein 200 µl Gefäß transferiert. Die notwendigen Reagenzien der RT wurden zunächst in einem sterilen ein-ml-Röhrchen vorbereitet. Pro 29,5 µl mRNA – Probe wurden jeweils vier µl eines zehnfachen RT-Puffers, vier µl Desoxynukleotid – Triphosphat (dNTP; Ausgangskonzentration fünf mM), zwei µl des Enzyms Reverse Transkriptase (Sensiscript Reverse Transcription Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) und 0,5 µl eines RNase – Inhibitors (recombinant RNAsin, Promega, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Zusätzlich zu den mRNA – Proben der Patientinnen wurde eine RT - Kontrollprobe aus RNase – freiem Wasser zur Überwachung der laboratoriumsinternen Probenkontamination mit mRNA angefertigt. Die Kontrollprobe wurde ebenfalls mit den notwendigen Reagenzien der RT resuspendiert und mitbearbeitet.

Die RT erfolgte mittels eines Thermocyclers und bestand aus folgenden Phasen:

37 °C für 60 Minuten      RT-Reaktion  
93 °C für fünf Minuten      Stoppen der RT-Reaktion  
4 °C .

Die entstandenen cDNA – Produkte wurden auf Eis aufbewahrt und möglichst unmittelbar weiterbearbeitet.

#### **3.2.4.2 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)**

Es erfolgte die PCR zur Amplifikation der spezifischen cDNA. Dazu wurden zwei verschiedene Techniken eingesetzt.

#### **3.2.4.2.1 Multiplex Polymerase Ketten Reaktion (multiplex-PCR) als Nachweisverfahren für die Gene c-erbB2, MGB-1, SPDEF und MMP-11**

Hauptbestandteil der multiplex-PCR war die Adnagen Breast Cancer Detect Ausstattung mit der Breast Detect PrimerMix – Suspension. Die darin beinhalteten Primer bestehen aus spezifischen, kurzen DNA – Strängen von ca. 20 Basen, die zu der Anfangssequenz und Endsequenz der gesuchten cDNA – Spezies komplementär sind. Die Breast Detect Primer – Suspension ist eine Zusammensetzung aus den Primern für die gesuchten Gene Ep-CAM [ga733.2 (383 bp Amplikongröße)], CA15-3 [muc-1 (293 bp Amplikongröße)], Her2/*neu* [cerb-B2 (270 bp Amplikongröße)]. Hinzu kam das Gen beta-Aktin [ $\beta$ -actin (114 bp Amplikongröße)], welches als Kontrollgen fungiert und in allen Proben nachweisbar sein sollte.

Die multiplex-PCR wurde durch Einsatz von 25  $\mu$ l Hotstar Taq Mastermix (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), zwölf  $\mu$ l destilliertes Wasser, vier  $\mu$ l PrimerMix Breast Detect (ABCD) und je acht  $\mu$ l der cDNA – Proben der Patientinnen durchgeführt. Das Hotstar Taq Mastermix beinhaltet Puffer, dNTPs und eine DNA-abhängige DNA – Polymerase. Zusätzlich zu den cDNA – Proben der Patientinnen wurden auch die RT(–) – Kontrolle, destilliertes Wasser als PCR – Negativkontrolle und die Positivkontrolle der ABCD-Ausstattung mitbearbeitet. Die Positivkontrolle bestand aus einer verdünnten Mischung des spezifischen PCR Amplikons. Bei mangelndem Nachweis des  $\beta$ -actins, wurden diese Proben vom weiteren Studienablauf ausgeschlossen.

Das gesamte Reaktionsvolumen von 50 µl pro cDNA – Probe wurde für die multiplex-PCR im Thermocycler mit Temperaturwechsel von 2°C/Sekunde und mit folgendem Programm eingesetzt.

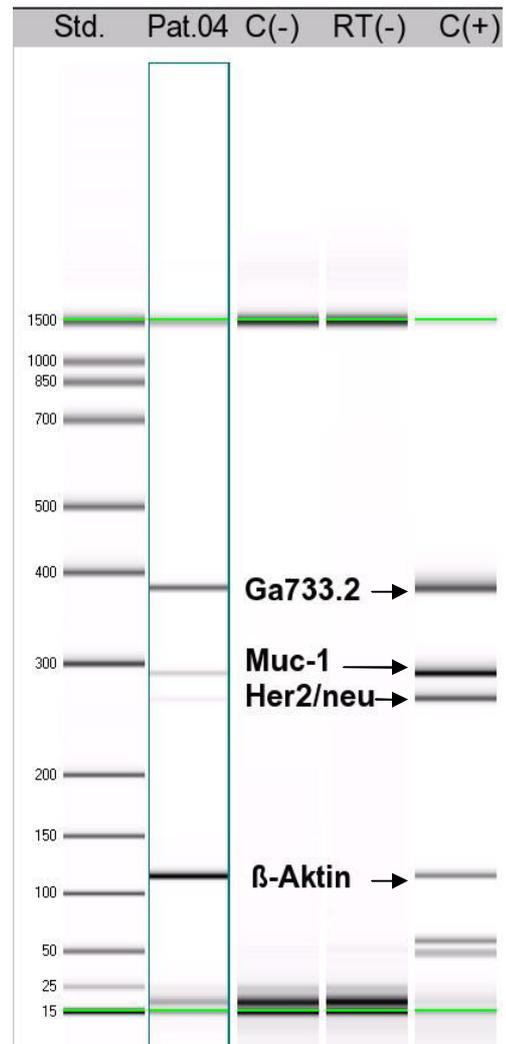
1. 95°C für 15 Minuten	Aktivierung des Hot Star Taq-Enzymes	} 35 Zyklen
2. 94°C für eine Minute	Denaturierung der DNA Doppelstränge	
3. 60°C für eine Minute	Annealing der Primer	
4. 72°C für 1 Minute	Elongation	
5. 72°C für zehn Minuten	Komplettieren der Elongation	
6. 4°C		

Die Schritte 2 bis 4 wurden 35mal wiederholt. Während der erste Schritt zur Aktivierung des Enzyms diente, erfolgte in den Schritten 2 bis 4 die exponentielle Amplifikation der Primer – besetzten cDNA. Der vierte Schritt diente der DNA - Elongation mit Verlängerung der Primer entlang der vorliegenden DNA – Matrize. Die DNA – Produkte wurden mit entsprechenden Verfahren zum Gennachweis benutzt und bei -20°C aufbewahrt.

#### **3.2.5.1. Nachweisverfahren für die Ga733.2, Muc-1 und c-erbB2**

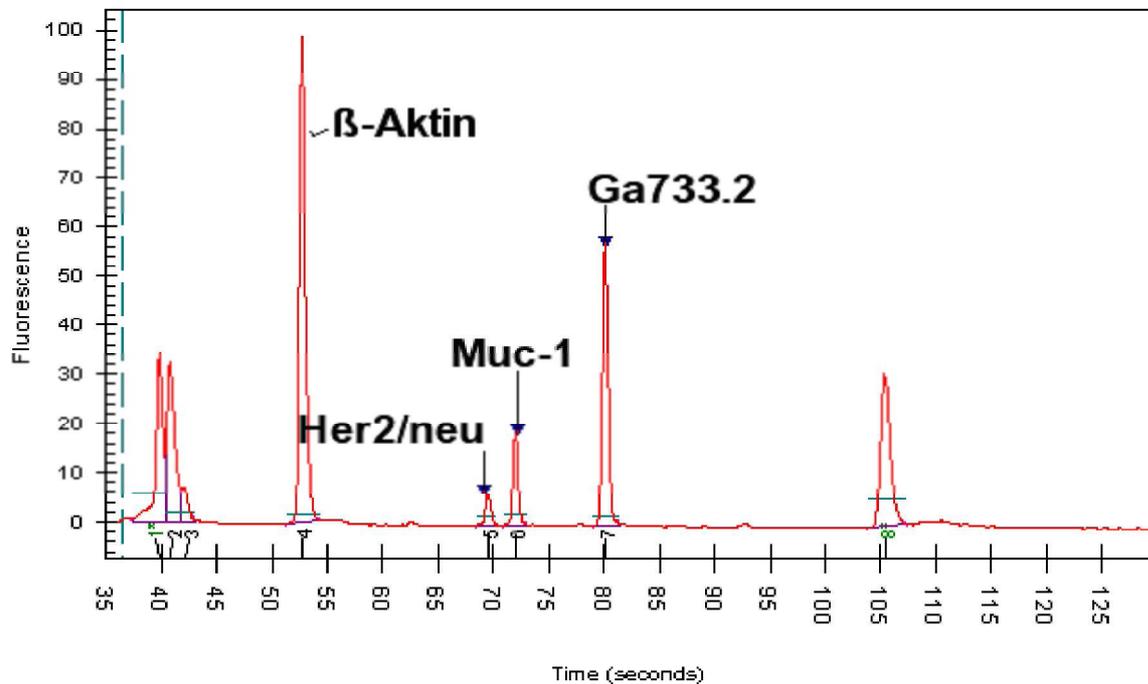
Die Endprodukte der multiplex-PCR wurden auf einem Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies GmbH, Böblingen, Deutschland) mittels eines DNA Chips (Typ 25-1000bp) gemäß Protokoll des Herstellers aufgetrennt und quantifiziert.

Der computerunterstützte Nachweis der cDNA-Banden erfolgte an Hand ihrer Fluoreszenz (s. Abb 1 und 2) und wurde in absolute cDNA-Konzentrationen (ng/µl) gemäß dem Umrechnungsprotokoll des Assay-Herstellers Adnagen umgerechnet.



**Abbildung 1** Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung analysierter cDNA-Banden im multiplex PCR-Verfahren

**Abbildung 2** graphische Darstellung der Fluoreszenzstärke während der elektrophoretischen Auftrennung der cDNA im multiplex-PCR-Verfahren.



### 3.2.4.2.2 Realtime Polymerase Ketten Reaktion (Realtime-PCR) als Nachweisverfahren für die Gene c-erbB2, MGB-1, SPDEF, MMP-11

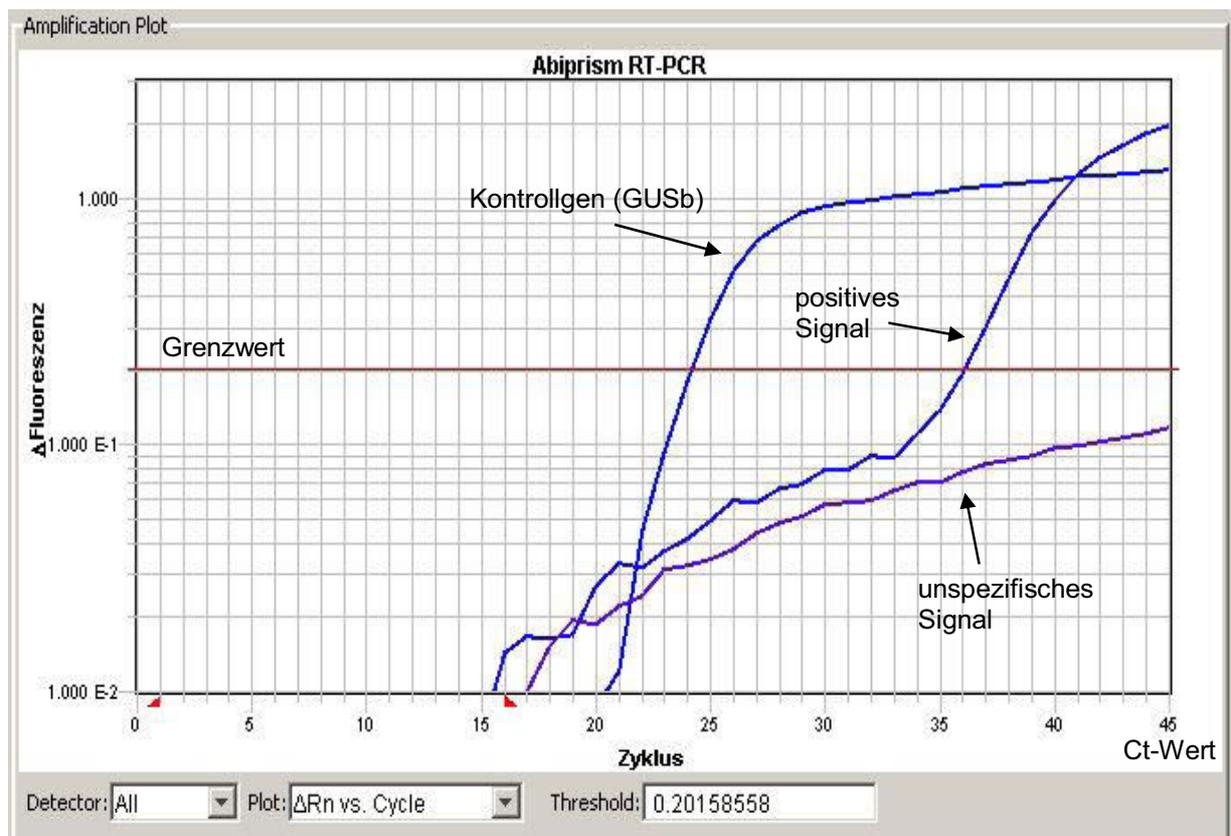
Mittels Realtime-PCR wurden c-erbB2 und drei weitere Mammakarzinom-assoziierte Gene untersucht. Diese wurden durch auf Affymetrix-Plattform basierenden Genexpressionsdaten durch Vergleich von 171 Mammakarzinomen mit fünf mRNAs aus Brustnormalgewebe ermittelt (unveröffentlichte Daten). Ausgewählt wurden 1.) das humane Mammaglobin (MGB-1), 2.) Prostataepithelium – spezifisches ETS Transkriptionsfaktor (SPDEF) und 3.) Matrixmetalloproteinase – 11 (MMP-11). Für die Realtime-PCR wurde das Kontrollgen  $\beta$ -Glucuronidase (GUSb) eingesetzt (Primer-/Sondengemisch siehe Tab 8). Die quantitative Bestimmung der Expression der Zielgene erfolgte durch Hochdurchsatz-Echtzeit-RT-PCR auf

dem ABI PRISM® 7900HT Cycler. Im Gegensatz zu den multiplex-PCR – Produkten wurden die Gene hier einzeln amplifiziert und direkt im Abiprism 7900 nachgewiesen. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus ("Real Time") durchgeführt und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden (Endpunktbestimmung). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht erforderlich, die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist gering.

Die Primer und Sonden wurden als „Assay-on-Demand“ von Applied Biosystems bezogen. Jeder Assay enthält ein Amplifikationsprimer-Paar und eine zusätzliche TaqMan-MGB-Oligonukleotidsonde mit einem 6-FAM Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende, sowie einen Quencher am 3'-Ende mit einem „Minor-groove“-Bindungsprotein zur Senkung der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Sonde. Je 2  $\mu$ l der cDNA wurden pro Reaktion eingesetzt. Der PCR-Assay wurde in einer Platte mit 384 Vertiefungen in einem Gesamtvolumen von je 15  $\mu$ l durchgeführt. Verwendet wurde das System TaqMan Universal PCR Master Mix (mit dNTP, Puffer, ROX als Referenzfarbstoff und das Enzym AmpliTaqGold; Applied Biosystems; CA, USA). Die von Applied Biosystems empfohlene Voreinstellung des Thermozyklierungsprogramms wurde für die drei Zielgene sowie für das Referenz-Gen verwendet. Die Voreinstellung umfasst einen Schritt von 15 Minuten bei 95 °C zur Aktivierung der Taq Polymerase. Anschließend erfolgt ein Amplifikationszyklus von 15 Sekunden bei 95 °C und eine Minute bei 60 °C über 45 Zyklen. Die Gene wurden durch

Ermittlung des Schwellenzyklus (Ct) - Wert quantifiziert. Als endogene Kontrolle wurde das Gen des Humanproteins beta-Glukuronidase GUS-b verwendet.

Die Ergebnisse wurden in Anzahl der Zyklen (Ct) registriert. Als positiv wurde ein Gennachweis unterhalb von 41 Zyklen ( $Ct < 41$ ) gewertet (Abb. 3).



**Abbildung 3** Typische und unspezifische Fluoreszenzsignalkurven im Verlauf der Amplifikation während des Realtime-PCR-Verfahrens.

Die genauen Primer-/Sonden-Sequenzen werden von Applied Biosystems nicht offen gelegt. Zur Orientierung sind aber Context Sequenzen des Amplikons und Zielexone bekannt gegeben.

**Tabelle 8** Identifikationsnummer, Name, Chromosomlokalisierung, spezifische Nukleotidsequenz, Zielexon des jeweiligen Primer-/Sondengemisches

<i>Assay ID</i>	<i>Gene</i>	<i>Chr.</i>	<i>Context Sequenz</i>	<i>Target Exon</i>
Hs00171829_m1	<b>MMP11</b>	22	GCCTTCCAGGATGCTGATGGCTATG	7
Hs00267190_m1	<b>SCGB2A2 (MGB1)</b>	11	GCAATGTTGAGGTGTTTATGCAATT	2
Hs00170433_m1	<b>cerbB2</b>	17	TGCACCCACTCCTGTGTGGACCTGG	15
Hs00171942_m1	<b>SPDEF</b>	6	ACATCACCGCAGATCCCATGGACTG	2
Hs99999908_m1	<b>GUS-B</b>	7	ATGACTGAACAGTCACCGACGAGAG	1

### 3.2.5 Systematik der Rekodierung

Die absoluten cDNA-Konzentrationen wurden nach den Validierungsergebnissen des Assay Herstellers Adnagen dichotom rekodiert. Für die Rekodierung diente der Wert von 0,1 ng/ $\mu$ l als Grenze, wobei Ergebnisse unterhalb dieses Wertes als negativ, oberhalb als positiv gekennzeichnet wurden.

Die Realtime-PCR – Ergebnisse wurden ebenfalls dichotom umgewandelt. Der Grenzwert dazu wurde bei 41,0 Ct festgelegt. Dabei wurden Werte unterhalb dieser Grenze als positiv und oberhalb als negativ angesehen. Für die weitere statistische Auswertung wurde das rekodierte Format der Ergebnisse verwendet.

### 3.2.6. Weiterbearbeitung registrierter Ergebnisse

#### 3.2.6.1 Datensammlung und Rekodierung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der multiplex-PCR - und Realtime-PCR – Versuche wurden computerunterstützt an Hand des Anwendungsprogrammes Superior Performance Software

System (SPSS) 11.5 für das Betriebssystem Windows registriert. Spezifische Amplifikationen wurden für jedes Gen und jede Patientin separat gespeichert.

### **3.2.6.2 Verfahren der statistischen Auswertung**

Die Analyse und statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Software Programms SPSS Version 11.5 für Windows. Es wurde nach signifikanten Korrelationen der Rekodierungen zu Fällen der Erstdiagnose, der Rezidive und der gesunden Kontrollen gesucht. Neben Einzelgen – Analysen, wurden auch Genkombinationen hinsichtlich ihrer Korrelationen evaluiert. Eine einfache Positivität bedeutet, dass die Fälle zumindest in einem der analysierten Gene eine Positivität aufweisen. Zweifache Positivität bezeichnet den Nachweis von mindestens zwei positiven Genexpressionen pro Fall.

Die Resultate wurden außerdem hinsichtlich ihrer Korrelation zur TNM – Klassifikation der Fälle ausgewertet. Das TNM – System wird heute als etablierte Methode zur individuellen Spezifikation der malignen Entitäten flächendeckend angewendet. Es wurde von der Union internationale contre le Cancer (UICC) aufgebaut und von American Joint Committee on Cancer (AJCC) um die Staging-Klassifikation erweitert. Die Genexpressionen wurden zusätzlich mit der kumulierten Strahlungs dosis, welche die Patientinnen durch die Bestrahlungstherapie erhalten haben, verglichen. Es wurde die kumulierte Dosis zum Zeitpunkt der Blutentnahme an Hand des Bestrahlungsplanes bestimmt. Die Kumulation wurde in drei Kategorien mit den Schwellenwerten fünf Gy und 15 Gy eingeteilt. Abschließend wurde die Korrelation zwischen PCR – Ergebnissen und immunhistochemisch bestimmten Her-2/*neu*-Status bzw. ELISA – bestimmten Tumormarker Ca 15-3 – Status der Patientinnen ermittelt. Der Ca 15-3-Status galt ab einer Serumkonzentration von 31 U/ml als

positiv. Die Signifikanzanalysen wurden entweder mit Hilfe des zweiseitigen  $\chi^2$ -Test nach Pearson für die dichotomen oder mit der bivariaten Korrelation nach Pearson für die trichotomen Werte durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant bezeichnet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Expressionsfrequenz der Kontrollgene**

#### **4.1.1. $\beta$ -actin**

Für das multiplex-PCR-Verfahren wurde das  $\beta$ -actin als Kontrollgen eingesetzt.  $\beta$ -actin war in allen 63 Karzinomfällen und in allen 14 Kontrollproben positiv, so dass alle Probenergebnisse hinsichtlich der Expression der Gene Ga733.2, Muc-1 und c-erbB2 ohne Probandenausschluss analysiert werden konnten.

#### **4.1.2. $\beta$ – Glukuronidase (Gusb)**

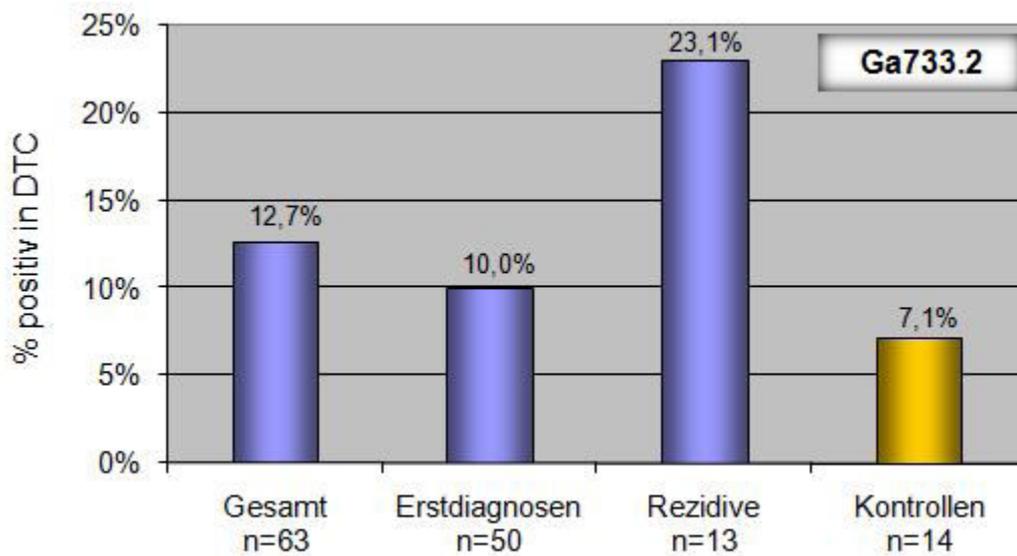
Für das Realtime - PCR Verfahren wurde Gusb als Kontrollgen eingesetzt. Gusb konnte während des Realtime - PCR – Verfahrens in zwei Proben nicht nachgewiesen werden. Diese Proben, die ausschließlich den erstdiagnostizierten Mammakarzinomen angehören, wurden von weiteren Analysen und Statistiken ausgeschlossen. Die Analyse der folgenden Gene MGB-1 und SPDEF wurden also mit 61 Patientinnen fortgesetzt.

### **4.2. Genexpressionshäufigkeiten im multiplex-PCR – Verfahren**

#### **4.2.1. Ga733.2**

Die Ga733.2 –Ergebnisse bewegten sich zwischen 0,10 ng/ml bis 8,4 ng/ml. Ein spezifischer Nachweis des Ga733.2 wurde in acht von 63 (12,7 %) Karzinomfällen festgestellt. Während fünf (5/50, 10%) Proben mit positivem Ergebnis aus dem Kollektiv der erstdiagnostizierten Fälle stammen, wurden drei (3/13, 23,1%) Proben in der Gruppe der Rezidivfälle gefunden. Gesunde Kontrollproben wiesen lediglich einen positiven Fall mit 0,1 ng/ml (1/14, 7,1%) auf.

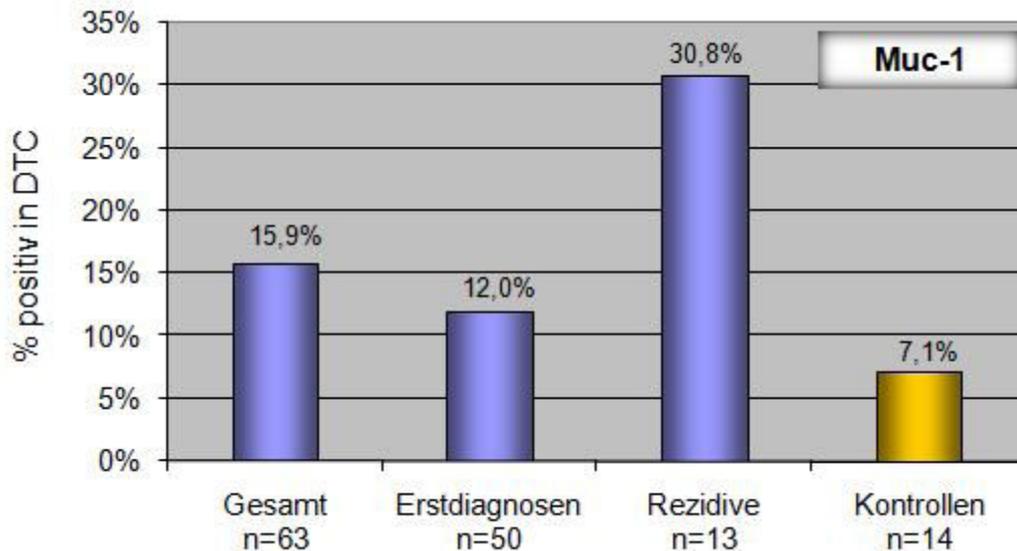
**Abbildung 4** Expressionshäufigkeit des Gens Ga733.2 in den Gruppen des Studienkollektivs. Die Gesamt-Bewertung bezieht sich auf das erkrankte Kollektiv ohne Kontrollpersonen.



#### 4.2.2. Muc-1

Die Konzentration der Muc-1-Expression lag zwischen 0,12 ng/ml und 6,3 ng/ml. Der Nachweis wurde in zehn von 63 (15,9%) Patientinnen festgestellt. Sechs (12%) der positiven Ergebnisse waren in der Gruppe der Erstdiagnosen und vier (30,8%) in der Gruppe der Rezidivfälle lokalisiert. Die Kontrollproben zeigten erneut einen positiven Fall unter 14 Proben.

**Abbildung 5** Expressionshäufigkeit des Gens Muc-1 in den verschiedenen Gruppen des Studienkollektivs. Die Gesamt-Bewertung bezieht sich auf das erkrankte Kollektiv ohne Kontrollpersonen.



#### 4.2.3. Expressionsfrequenz des Gens c-erbB2 in multiplex-PCR-, Realtime-PCR-Verfahren und Immunhistochemie

Im Falle der multiplex-PCR lag die Ergebnisspanne für die Expression des c-erbB2 in einem Konzentrationsspektrum zwischen 0,13 ng/ml und 1,1 ng/ml. Insgesamt wurden 15 positive Fälle festgestellt wobei Erstdiagnosen sieben, Rezidive einen und Kontrollen wieder sieben positive Ergebnisse aufwiesen.

Die c-erbB2-Untersuchung mittels Realtime-PCR erbrachte 26 positive Fälle wobei sich die Zykluszahl der positiven Ergebnisse zwischen 39,9 und 33,5 Zyklen bewegte. Im Vergleich zum multiplex-PCR-Verfahren fielen hier die Ergebnisse mit elf in der erstdiagnostizierten Gruppe, fünf in der Rezidivgruppe und zehn in der Kontrollgruppe häufiger positiv aus.

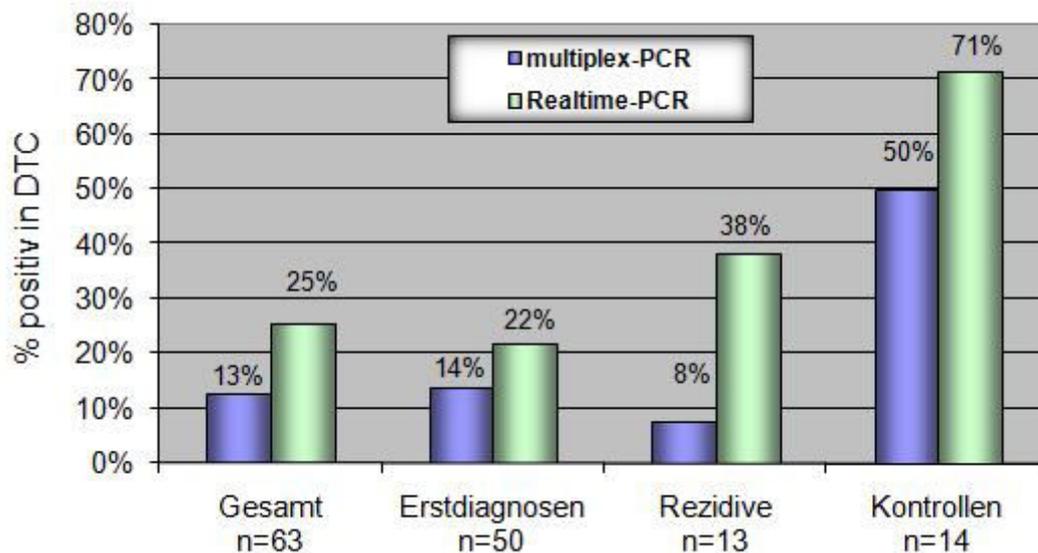
Bei 53 Patientinnen konnte aufgrund der Datenlage der immunhistochemische Her-2/*neu*-Status des Karzinomgewebes eruiert werden. Danach haben 16 von 41 erstdiagnostizierten Fällen und vier von zwölf Rezidivfällen eine signifikante (2+ und höher) c-erbB2-Expression im Karzinom aufgewiesen.

Die Details zur genaueren Verteilung der c-erbB2 – Expression ist in Tab. 9 dargestellt.

**Tabelle 9** c-erbB2-Expressionshäufigkeiten nach verschiedenen Methoden und Probandengruppen aufgeteilt

	<i>multiplex-PCR</i>	<i>Realtime-PCR</i>	<i>IHC</i>
<b>Erstdiagnosen</b>	7/50 14%	11/50 22%	16/41 39%
<b>Rezidive</b>	1/13 7,7%	5/13 38,5%	4/12 33,3%
<b>Kontrollen</b>	7/14 50%	10/14 71,4%	<i>n. B.</i>

**Abbildung 6** Vergleich der Expressionshäufigkeit des Gens c-erbB2 mittels multiplex-PCR sowie Realtime-PCR. Die Gesamt-Bewertung bezieht sich auf das erkrankte Kollektiv ohne Kontrollpersonen.



Aufgrund der fehlenden Sensitivität der c-erbB2-Ergebnisse für das erkrankte Kollektiv sowohl in multiplex-PCR als auch in Realtime-PCR-Verfahren, wurde dieses Gen von weiteren statistischen Analysen ausgeschlossen.

#### 4.2.4. Vergleich der c-erbB2-Expressionshäufigkeit durch multiplex-PCR, Realtime-PCR-Verfahren und Immunhistochemie

Die drei verschiedenen Verfahren zur Bestimmung der c-erbB2-Expression wurden mittels Kreuztabellen miteinander verglichen.

Bei 50 Fällen mit Mammakarzinom lag das c-erbB2-Ergebnis in allen drei Verfahren vor. Das c-erbB2-Ergebnis mittels multiplex-PCR und Realtime-PCR lag bei allen Studienteilnehmern (n=77) vor. Dementsprechend konnte der Vergleich des multiplex-PCR- bzw. Realtime-PCR-Verfahrens mit Immunhistochemie bei 50 Fällen verglichen werden.

**Tabelle 10** Immunhistochemischer Her-2/*neu*-Status im Vergleich zur c-erbB2-Bestimmung in zirkulierenden Tumorzellen mittels Realtime-PCR. ( $\chi^2$ -Test nach Pearson;  $p > 0,05$ )

		<i>Realtime - PCR</i>		$\Sigma$
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	
<b>Immunhistochemie</b>	negativ (< 2+)	25	7	32
	positiv ( $\geq$ 2+)	12	6	18
$\Sigma$		37	13	50

**Tabelle 11** Immunhistochemischer Her-2/*neu*-Status im Vergleich zur c-erbB2-Bestimmung in zirkulierenden Tumorzellen mittels multiplex-PCR. ( $\chi^2$ -Test nach Pearson;  $p > 0,05$ )

		<i>multiplex - PCR</i>		$\Sigma$
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	
<b>Immunhistochemie</b>	negativ (< 2+)	30	2	32
	positiv ( $\geq$ 2+)	15	3	18
$\Sigma$		45	5	50

**Tabelle 12** Gegenüberstellung der c-erbB2-Bestimmung in zirkulierenden Tumorzellen durch multiplex- und Realtime-PCR. ( $\chi^2$ -Test nach Pearson;  $p = 0,001$ )

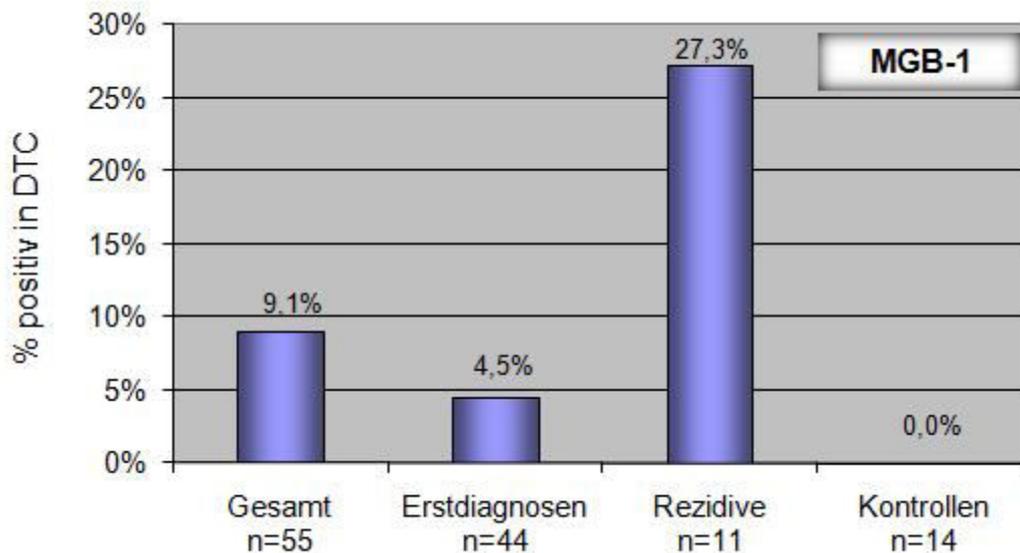
		<i>multiplex - PCR</i>		$\Sigma$
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	
<b>Realtime - PCR</b>	negativ	47	4	51
	positiv	15	11	26
$\Sigma$		62	15	77

### 4.3 Genexpressionshäufigkeiten im Realtime-PCR – Verfahren

#### 4.3.1. Humanes Mammaglobin (MGB-1)

Die spezifischen Expressionssignale für das MGB-1-Gen wurden in einem Bereich zwischen 28,0 und 39,5 Zyklen registriert. Das Signal während der Realtime-PCR-Messung konnte bei sechs Proben (vier Erstdiagnosen, zwei Rezidive) nicht nachgewiesen werden, so dass diese Proben hinsichtlich der Analyse des Gens MGB-1 ausgeschlossen wurden. Die Fortsetzung der Analyse erfolgte daher mit 55 Proben. Positive Ergebnisse zeigten sich bei fünf Proben (5/55, 9,1%), wobei zwei Proben der Gruppe der erstdiagnostizierten (2/44, 4,5%) und drei (3/11, 27,3%) Proben der Gruppe der rezidierten Fälle zugehören. Kontrollproben wiesen keine positiven Ergebnisse auf.

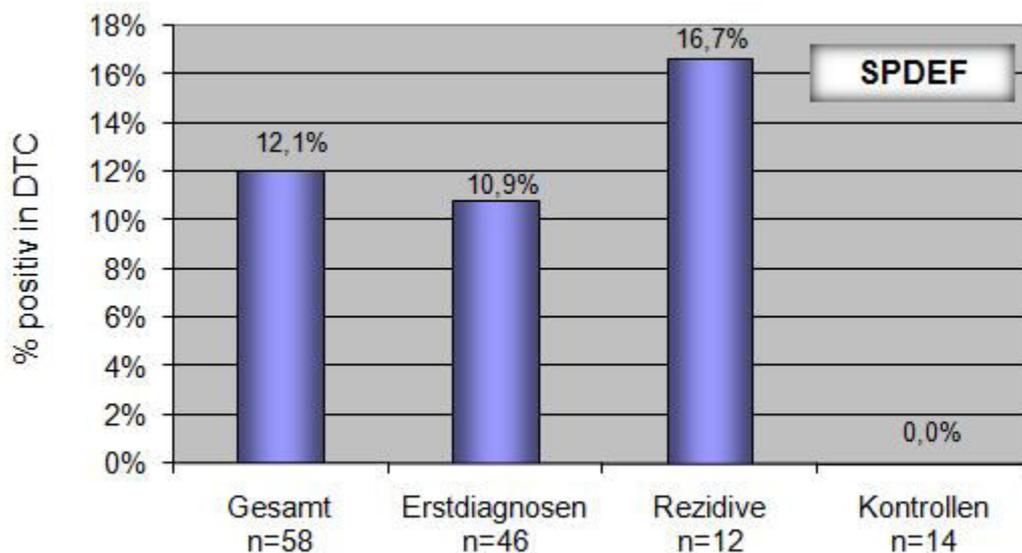
**Abbildung 7** Expressionshäufigkeit des Gens MGB-1 innerhalb der Gruppen des Studienkollektivs. Die Gesamt-Bewertung bezieht sich auf das erkrankte Kollektiv ohne Kontrollpersonen.



### 4.3.2. SPDEF

Drei Patientenproben (zwei Erstdiagnosen, ein Rezidiv) wiesen kein expressionsspezifisches Signal auf, so dass diese Proben ebenfalls von weiteren Analysen ausgeschlossen wurden. Bei der Expressionsanalyse des SPDEF ergaben sich sieben positive Proben, die aus fünf erstdiagnostizierten (5/46, 10,9%) und zwei rezidierten Fällen (2/12, 16,7%) stammten. Die Anzahl an Zyklen zur Erlangung eines spezifischen Expressionssignals befand sich bei den positiven Proben zwischen 29,4 und 40,9 Zyklen. Kontrollproben wiesen keine positiven Ergebnisse auf.

**Abbildung 8** Expressionshäufigkeit des Gens SPDEF innerhalb der Gruppen des Studienkollektivs. Die Gesamt-Bewertung bezieht sich auf das erkrankte Kollektiv ohne Kontrollpersonen.

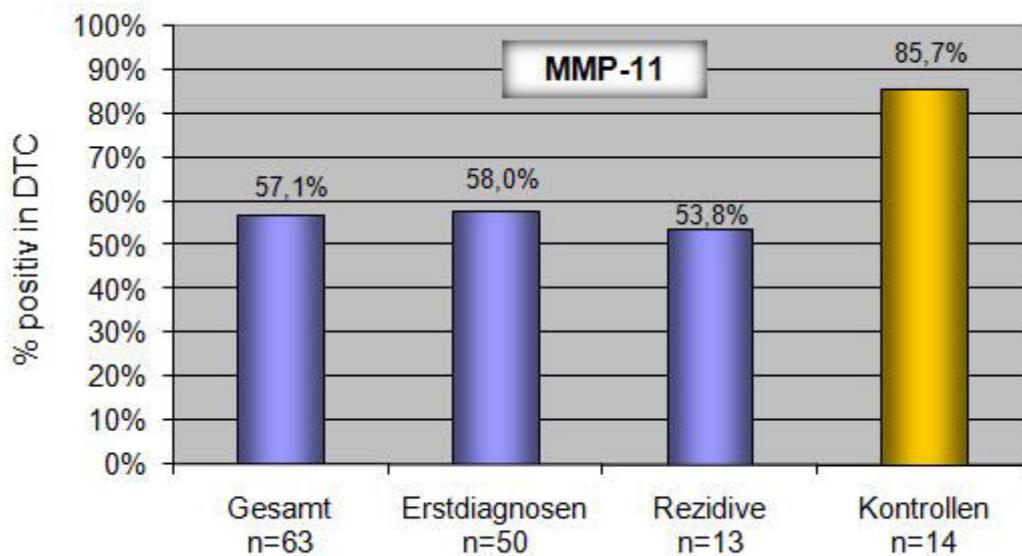


### 4.3.3 MMP-11

MMP-11-positive Proben zeigten ihre Expressionssignale in einem Bereich von 32,5 bis 39,1 Zyklen. 29 von 50 (58%) erstdiagnostizierten Fällen, sieben von 13 (53,8%) rezidierten Fällen und zwölf von 14 (85,7%) gesunden Kontrollproben wiesen eine spezifische Expression des Genes auf.

Bei MMP-11 konnte keine ausreichende Spezifität für das erkrankte Kollektiv eruiert werden, so dass dieses Gen von weiteren Analysen ausgeschlossen wurde.

**Abbildung 9** Expressionshäufigkeit des Gens MMP-11 innerhalb der verschiedenen Gruppen des Studienkollektivs. Die Gesamt-Bewertung bezieht sich auf das erkrankte Kollektiv ohne die Kontrollpersonen.



#### 4.4. Betrachtung mehrfach positiver Patientinnen

Bei der gleichzeitigen Beobachtung aller vier Gene Ga733.2, Muc-1, SPDEF und MGB-1 stellten sich insgesamt 15 Fälle dar, die zumindest in einem dieser Gene eine Positivität aufwiesen. Die MGB-1-Ergebnisse lagen bei lediglich 55 Patientinnen und 14 Kontrollen vor, so dass die jetzige Analyse auf dieses Kollektiv beschränkt werden sollte.

Die 15 positiven Fälle (15/55, 27,3%) teilten sich in neun (9/44, 20,5%) erstdiagnostizierte und sechs (6/11, 54,5%) rezidierte Fälle auf.

Der Gesamtüberblick über die zumindest einfach positiven Fälle wird in Tab. 13 dargestellt.

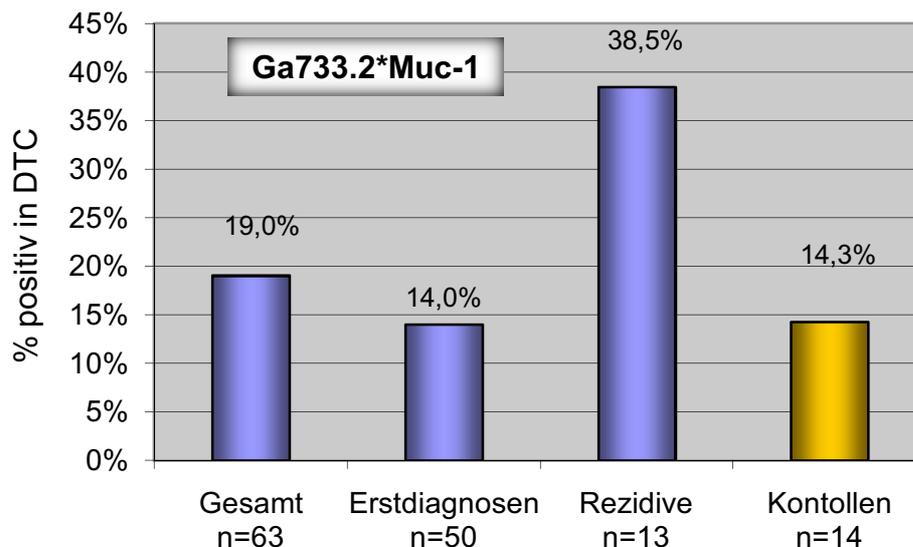
**Tabelle 13** Übersicht der Patientinnen mit positiver tumorassoziierter Genexpression unter Zusammenschluss der Gene GA733.2, Muc-1 (+:  $\geq 0,1$  ng/ $\mu$ l;  $\emptyset$ :  $< 0,1$  ng/ $\mu$ l), MGB-1, SPDEF (+:  $\leq 41$  Zyklen;  $\emptyset$   $> 41$  Zyklen)

	<i>Pat.-Nr.</i>	<i>GA733.2</i>	<i>Muc-1</i>	<i>MGB-1</i>	<i>SPDEF</i>
ED	4	+	+	$\emptyset$	+
	7	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	+
	8	+	+	$\emptyset$	$\emptyset$
	17	$\emptyset$	+	$\emptyset$	$\emptyset$
	28	+	+	$\emptyset$	+
	34	$\emptyset$	$\emptyset$	+	$\emptyset$
	36	+	$\emptyset$	$\emptyset$	+
	52	+	+	$\emptyset$	$\emptyset$
	55	$\emptyset$	+	+	+
REZ	37	$\emptyset$	+	$\emptyset$	$\emptyset$
	40	+	$\emptyset$	$\emptyset$	+
	44	+	+	$\emptyset$	$\emptyset$
	45	$\emptyset$	+	+	$\emptyset$
	50	$\emptyset$	$\emptyset$	+	$\emptyset$
	60	+	+	+	+

#### 4.4.1. Betrachtung der Genkombination Ga733.2\*Muc-1

Hinsichtlich dieser Genkombination wiesen zwölf Patientinnen eine positive Expression auf (12/63; 19%). Sieben dieser Fälle befanden sich in der Gruppe der Erstdiagnosen und stellten hierunter einen Anteil von 14% dar (7/50), wobei fünf Fälle aus der Gruppe der Rezidiven stammen und dabei einen Anteil von ca. 38% darstellen. Zwei von 14 Kontrollprobanden wiesen ebenso eine positive Expression auf (2/14).

**Abbildung 10** Verteilung der Fälle mit einer positiven Expression in dem Genprofil Ga733.2\*Muc-1 innerhalb der Gruppen des Studienkollektivs. Die Gesamt-Bewertung bezieht sich lediglich auf das erkrankte Kollektiv.

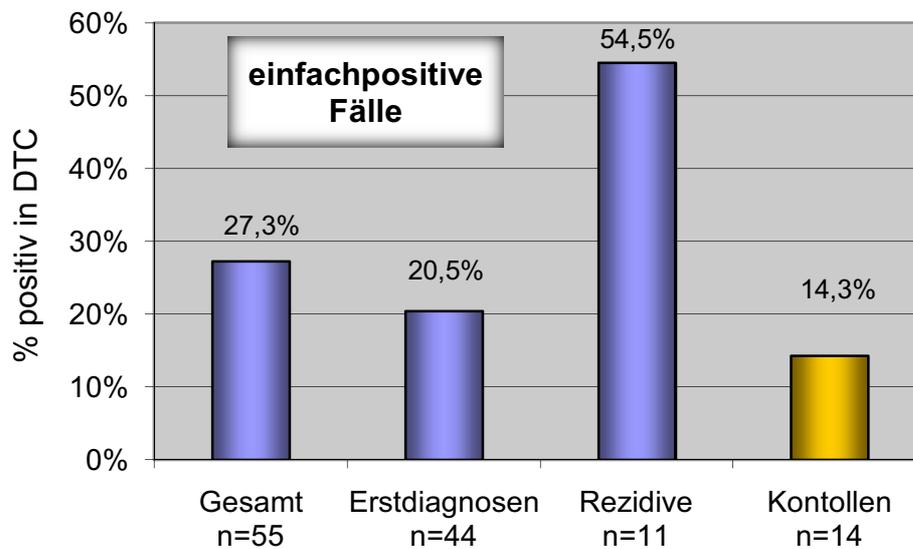


#### 4.4.2. Betrachtung der Einfachpositivität innerhalb des Genprofils Ga733.2\*Muc-1\*MGB-1\*SPDEF

15 Studienteilnehmer aus der Gruppe der Patientinnen wiesen zumindest in einem der o.g. Gene eine positive Expression dar (15/63; 19%). Sie verteilen sich mit sieben Fällen in die Gruppe der Erstdiagnosen (7/50; 14%) und mit fünf Fällen in die Gruppe der Rezidivfälle

5/13; 38,5%). Zwei Fälle aus der Gruppe der Kontrollprobanden wiesen ebenfalls einfachpositive Ergebnisse auf und stellen ca. 14% ihres Kollektivs dar.

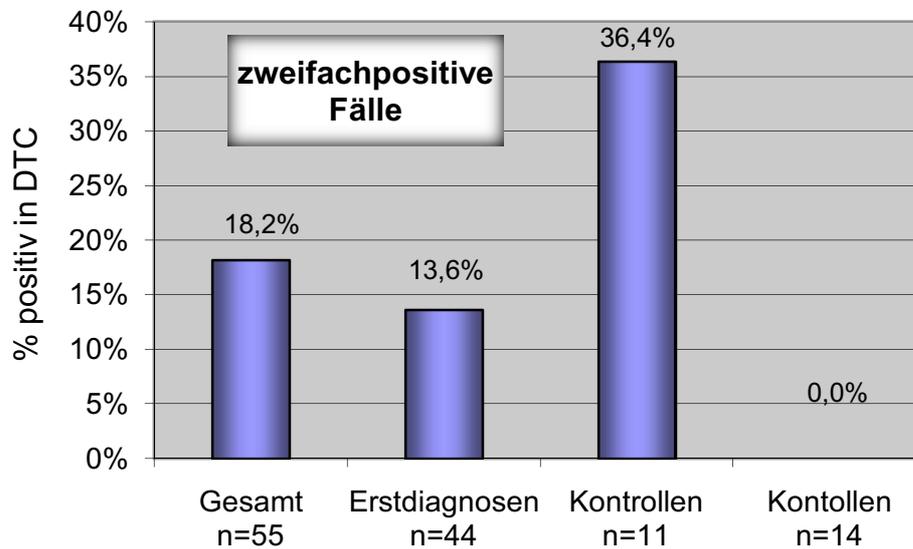
**Abbildung 11** Verteilung der Fälle mit einer positiven Expression in dem Genprofil Ga733.2\*Muc-1\*MGB-1\*SPDEF mit mindestens einfacher Positivität. Die Gesamt-Bewertung bezieht sich lediglich auf das erkrankte Kollektiv.



#### 4.4.3. Betrachtung der Zweifachpositivität innerhalb des Genprofils Ga733.2\*Muc-1\*MGB-1\*SPDEF

Nach dem Kriterium der zweifachen Positivität innerhalb des o.g. Genprofils konnten zehn Patientinnen hervorgehoben werden (10/55; 18,2%). Sie kamen mit sechs Fällen als Erstdiagnosen (6/44; 13,6%) und mit vier Fällen als Rezidive vor (4/11; 36,4%). Kontrollpersonen wiesen diesmal keine entsprechenden Fälle auf, da kein Fall dieser Gruppe eine zweifache Positivrate aufwies.

**Abbildung 12** Verteilung der Fälle mit einer positiven Expression in dem Genprofil Ga733.2\*Muc-1\*MGB-1\*SPDEF mit mindestens zweifacher Positivität. Die Gesamtbewertung bezieht sich lediglich auf das erkrankte Kollektiv.



#### 4.5 Analysen der PCR – Ergebnisse im Kontext verschiedener Merkmale und Prognosekriterien des Mammakarzinoms

Im Folgenden werden die tumorassoziierten Genexpressionen in Korrelation zu verschiedenen Merkmalen und Prognosekriterien des Mammakarzinoms analysiert. Zudem werden auch mehrfach-positive Genexpressionen in dieser Analyse mitberücksichtigt.

##### 4.5.1 Expressionsvergleich zwischen gesundem und erkranktem Kollektiv

Es erfolgte die Analyse der Aussagekraft der multiplex-PCR – und der Realtime-PCR – Ergebnisse bezüglich gesundem und erkranktem Kollektiv. Weder Einzelgenanalysen noch Mehrfachkombinationen wiesen nach dem asymptotischen  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson

eine Korrelation hinsichtlich der Erkrankung auf. Am ehesten lag das SPDEF mit einem p-Wert von 0,069 an der Signifikanzgrenze.

**Tabelle 14** Gegenüberstellung der Genexpressionshäufigkeiten innerhalb des erkrankten und des gesunden Kollektivs. Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (asymptotischer  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson)

	<i>gesund</i>	<i>krank</i>	<i>p-Wert</i>
<b>GA733.2</b>	1/14 7,1%	8/63 12,7%	0,558
<b>Muc-1</b>	1/14 7,1%	10/63 15,9%	0,398
<b>SPDEF</b>	0/25 0%	7/58 12,1%	0,069
<b>MGB-1</b>	0/25 0%	5/55 9,1%	0,318
<b>GA733.2*Muc-1</b>	2/14 14,3%	12/63 19%	0,676
<b>Einfach positiv</b>	2/14 14,3%	15/55 27,3%	0,314
<b>Zweifach positiv</b>	0/14 0%	10/55 18,2%	0,084

#### **4.5.2 Rezidierte und erstdiagnostizierte Fälle des Mammakarzinoms**

Es erfolgte die Analyse der Aussagekraft der multiplex-PCR – und der Realtime-PCR – Ergebnisse bezüglich einer Erstdiagnose bzw. eines Rezidives. In univariaten Analysen zeigten die Genexpressionshäufigkeiten bis auf das MGB-1 keine signifikanten Beziehungen zu der Einordnung der Fälle als Erstdiagnose bzw. als Rezidiv. Die Verteilung der MGB-1 – Expression beruhend auf dem zweiseitigen  $\chi^2$ -Test nach Pearson zeigte eine Signifikanz von  $p = 0,019$ . Die positive Muc-1-Expression folgte mit einem p-Wert von 0,099 und war somit bereits nicht signifikant.

Analysen der Genprofile wurden zur Beurteilung der signifikanten Korrelationen zur Gruppierung der Fälle als Erstdiagnosen bzw. Rezidive durchgeführt. Die Verknüpfung des multiplex-PCR – amplifizierten Gene GA733.2 und Muc-1 zu dem Genprofil GA733.2\*Muc-1 zeigte mit sieben von 50 erstdiagnostizierten und fünf von 13 rezidierten Fällen ein Signifikanzniveau von  $p = 0,045$  nach dem zweiseitigen  $\chi^2$ -Test nach Pearson.

Es erfolgte nun die Betrachtung der Patientinnen nach jeweils einfacher und zweifacher Positivität unter den Genen GA733.2, Muc-1, MGB-1 und SPDEF. Dabei stellte sich die signifikante Differenzierung der erstdiagnostizierten und der rezidierten Gruppe bei Gegenüberstellung der einfach-positiven Fälle dar.

**Tabelle 15** Gegenüberstellung der Genexpressionsfrequenzen innerhalb der erstdiagnostizierten und der rezidierten Gruppe. Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (asymptotischer  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson)

	<i>Erstdiagnosen</i>	<i>Rezidive</i>	<i>p-Wert</i>
<b>GA733.2</b>	5/50 10%	3/13 23,1%	0,207
<b>Muc-1</b>	6/50 12%	4/13 30,8%	0,099
<b>SPDEF</b>	5/46 10,9%	2/12 16,7%	0,538
<b>MGB-1</b>	2/44 4,5%	3/11 27,3%	<b>0,019</b>
<b>GA733.2*Muc-1</b>	7/50 14%	5/13 38,5%	<b>0,045</b>
<b>einfach positiv</b>	9/44 20,5%	6/11 54,5%	<b>0,023</b>
<b>zweifach positiv</b>	6/44 13,6%	4/11 36,4%	0,080

#### 4.5.3 Betrachtung des Staging des Mammakarzinoms bei Expressionspositivität

Der Staging – Status der Patientinnen wurde in Anlehnung an die Klassifikation des AJCC spezifiziert. Da bei zwei Patientinnen der Staging-Status nicht eruiert werden konnte, wurden sie in dieser Analyse ausgeschlossen. Desweiteren reduziert sich das Kollektiv um die Anzahl der Patientinnen, deren Proben hinsichtlich der Gene SPDEF und MGB-1 kein Ergebnis erbrachten.

Hohe Signifikanz wurde nach Pearson's Test für GA733.2 mit  $p=0,009$  und für Muc-1 mit  $p=0,002$  nachgewiesen.

Dabei stellte sich die Mehrheit der positiven Fälle für die Gene GA733.2 (7/8; 87,5%) und Muc-1 (9/10; 90%) in den höheren Stufen des Stagings ( $\geq$  IIIa) dar.

Expressionsergebnisse der Gene MGB-1 und SPDEF basierend auf dem Realtime-PCR – Technik erzielten Signifikanzstufen von  $p > 0,5$  und waren grenzwertig nicht mehr signifikant.

Die Genkombination aus GA733.2 und Muc-1 zeigte eine überwiegende Positivität in höheren Staging-Stufen mit zehn von zwölf positiven Fällen (83,3%). Einfachpositivität innerhalb der Gene Ga733.2\*Muc-1\*SPDEF\*MGB-1 offenbarten elf von 15 positiven Ergebnissen in der höheren Staging-Stufen (73,3%). Die Fälle mit mindestens zweifacher Positivität innerhalb dieser Genkombination zeigten sich ebenfalls überwiegend in der höheren Staging-Stufen (9/10; 90%).

**Tabelle 16** Gegenüberstellung der Genexpressionsverteilung innerhalb der verschiedenen Gruppen der Staging-Klassifikation; signifikante Verteilungen sind hervorgehoben. Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (bivariate Korrelation nach Pearson)

<i>Staging</i>	<i>0-I</i>	<i>IIa-IIb</i>	<i>≥ IIIa</i>	<i>p-Wert</i>
<b>GA733.2</b>	0/18 0%	1/16 6,3%	7/27 25,9%	<b>0,009</b>
<b>Muc-1</b>	0/18 0%	1/16 6,3%	9/27 33,3%	<b>0,002</b>
<b>SPDEF</b>	0/17 0%	2/15 13,3%	5/25 20%	0,057
<b>MGB-1</b>	0/16 0%	1/15 6,7%	4/23 17,4%	0,063
<b>GA733.2*Muc-1</b>	0/18 %	2/16 12,5%	10/27 37%	<b>0,001</b>
<b>einfach positiv</b>	0/16 0%	4/15 26,7%	11/23 47,8%	<b>0,001</b>
<b>zweifach positiv</b>	0/16 0%	1/15 6,7%	9/23 39,1%	<b>0,001</b>

#### 4.5.4 Betrachtung des Nodal-Status des Mammakarzinoms bei Expressionspositivität

Die Eruierung des Nodal-Status war bei vier Patientinnen nicht möglich, so dass das Kollektiv in dieser Analyse um die Anzahl dieser Patientinnen reduziert wurde. Zusätzlich wurden ebenso die Fälle mit fehlenden Ergebnissen für die Gene SPDEF- und MGB-1

ausgeschlossen. Die Korrelation wurde nach dem bivariaten Signifikanztest nach Pearson durchgeführt.

Bei der Analyse der PCR – Befunde in Korrelation zum Nodalstatus der erstdiagnostizierten Fälle, wurde der N – Status dreistufig, das heißt als N0, N1 und N2 rekodiert.

Dabei zeigten die Expressionshäufigkeiten des GA733.2 mit einem Signifikanzwert nach Pearson von  $p = 0,042$  und des Muc-1 mit einem Signifikanzwert von  $p = 0,039$  die höchste Korrelation unter allen Einzelgenanalysen. Dabei verzeichneten wir unter acht positiven GA733.2-Fällen drei (37,5%) im N1-Stadium und vier (50%) im N2-Stadium. Die Analyse der Gene SPDEF und MGB-1 erbrachte keine signifikante Verteilung der positiven Fälle (s. Tab 17). Die Analyse der Genkombination GA733.2\*Muc-1 mit elf positiven Fällen zeigte eine signifikante ( $p=0,034$ ) Verteilung hinsichtlich des Nodalstatus mit fünf Fällen im N1-Stadium (45,5%) und vier Fällen im N2-Stadium (36,4%). Während die einfache Positivitätsanalyse unter den Genen Ga733.2\*Muc-1\*SPDEF\*MGB-1 in der Verteilung lediglich eine Signifikanz von  $p = 0,143$  erbrachte, zeigte die Analyse der Zweifachpositivität einen p-Wert von 0,016 mit fünf positiven Fällen im N1-Stadium (55,6%) und drei positiven im N2-Stadium (33,3%). Die Gesamtanzahl der zweifach-positiven Fälle betrug neun (s. Tab. 17).

**Tabelle 17** Gegenüberstellung der Genexpressionsverteilung innerhalb der verschiedenen Gruppen des Nodal-Status; signifikante Verteilungen sind hervorgehoben. Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (asymptotischer  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson)

<i>Nodal-Status</i>	<i>N0</i>	<i>N1</i>	$\geq$ <i>N2</i>	<i>p-Wert</i>
<b>GA733.2</b>	1/28 3,6%	4/19 21,1%	3/12 25%	<b>0,042</b>
<b>Muc-1</b>	2/28 7,1%	3/19 15,8%	4/12 33,3%	<b>0,039</b>
<b>SPDEF</b>	1/27 3,7%	3/18 16,7%	2/10 20%	0,107
<b>MGB-1</b>	2/26 7,7%	2/17 11,8%	0/9 0%	0,640
<b>GA733.2*Muc-1</b>	2/28 7,1%	5/19 26,3%	4/12 33,3%	<b>0,034</b>
<b>einfach positiv</b>	5/26 19,2%	5/12 41,7%	4/9 44,4%	0,143
<b>zweifach positiv</b>	1/26 3,8%	5/17 29,4%	3/9 33,3%	<b>0,016</b>

#### 4.5.5 Betrachtung des M-Status des Mammakarzinoms bei Expressionspositivität

Messwerte beider PCR – Methoden wurden in ihrer Aussagekraft mit dem M – Status der Patientinnen verglichen. Das Kollektiv reduzierte sich in dieser Analyse um die Anzahl der Proben, die hinsichtlich MGB-1 und SPDEF nicht vollständig untersucht wurden. Die Signifikanz wurde wiederum nach dem asymptotischen  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson analysiert.

Es war ein signifikanter Zusammenhang zum Fernmetastasen – Status in der Häufigkeit der Muc-1 – Expression zu verzeichnen. Dabei waren sechs von zehn positiven Muc-1-Proben in fernmetastasierten Fällen aufzufinden gewesen. Die Verteilung erbrachte einen p – Wert von 0,025. Ebenso signifikant zeigte sich die MGB-1-Expression in Korrelation zum M-Status mit einem p-Wert = 0,018. Dabei waren vier von fünf positiven Proben auf metastasierte Fälle zurückzuführen. Sieben von 13 Proben, die zumindest eine einfache Positivität in der Genkombination GA733.2\*Muc-1 aufwiesen, befanden sich unter den M+-Fällen (53,8%) und wurden mit einem p-Wert = 0,018 als signifikant eingeordnet. Die zumindest einfache Positivität unter Einbeziehung aller vier Gene war grenzwertig signifikant ( $p = 0,046$ ), wobei acht von 15 positiven Proben aus Patientinnen stammten, die eine gesicherte Fernmetastasierung aufwiesen (s. Tab. 18).

**Tabelle 18** Gegenüberstellung der Genexpressionsverteilung innerhalb der verschiedenen Gruppen des M-Status; signifikante Verteilungen sind hervorgehoben. Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (asymptotischer  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson)

<i>M-Status</i>	<i>pM0</i>	<i>pM+</i>	<i>p-Wert</i>
<b>GA733.2</b>	4/44 9,1%	4/19 21,1%	0,197
<b>Muc-1</b>	4/44 9,1%	6/19 31,6%	<b>0,025</b>
<b>SPDEF</b>	3/39 7,7%	4/19 21,1%	0,148
<b>MGB-1</b>	1/37 2,7%	4/18 22,2%	<b>0,018</b>
<b>GA733.2*Muc-1</b>	5/44 11,4%	7/19 36,8%	<b>0,018</b>
<b>Einfach positiv</b>	7/37 18,9%	8/18 44,4%	<b>0,046</b>
<b>Zweifach positiv</b>	4/37 10,8%	6/18 33,3%	0,063

#### 4.5.6 Differenzierungsgrad des Mammakarzinoms bei Expressionspositivität

Aufgrund des fehlenden Differenzierungsgrades bei drei Patientinnen verminderte sich die Gesamtzahl des Kollektivs auf 60 Patientinnen. Im Hinblick auf den Differenzierungsgrad der Karzinome manifestierten sich keine statistisch signifikanten Verteilungen der

Expressionshäufigkeiten. Ebenso wiesen einfache und zweifache Positivität von verschiedenen Genprofilen keine signifikanten Verteilungen (s. Tab. 19).

Der p – Wert wurde hier nach dem asymptotischen  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson bestimmt.

**Tabelle 19** Gegenüberstellung der Genexpressionsverteilung innerhalb der verschiedenen Gruppen des Differenzierungsgrades; signifikante Verteilungen sind hervorgehoben. Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (asymptotischer  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson)

<i>Differenzierungsgrad</i>	<i>G1 + G2</i>	<i>G3</i>	<i>p-Wert</i>
<b>GA733.2</b>	3/37 8,1%	4/23 17,4%	0,276
<b>Muc-1</b>	3/37 8,1%	5/23 21,7%	0,131
<b>SPDEF</b>	2/34 5,9%	4/22 18,2%	0,146
<b>MGB-1</b>	3/33 9,1%	1/20 5%	0,585
<b>GA733.2*Muc-1</b>	4/37 10,8%	6/23 26,1%	0,123
<b>einfach positiv</b>	6/33 18,2%	7/20 35%	0,168
<b>zweifach positiv</b>	3/33 9,1%	5/20 25%	0,117

#### **4.6 Serum-Ca 15-3 – Tumormarker - Spiegel bei Expressionspositivität**

Der Nachweis des Tumormarkers Ca 15-3 im Patienten-Serum ist ein bereits etablierter sowie prognoserelevanter Parameter des Mammakarzinoms. Entsprechend wurde eine Korrelationsanalyse zwischen den untersuchten Genexpressionen und dem Ca 15-3-Wert der Patienten durchgeführt. Aus der Aktenlage und auch anamnestisch konnten bei vier Patientinnen der Serumspiegel des Tumormarkers Ca 15-3 nicht eruiert werden. Das Gesamtkollektiv verringerte sich um die Anzahl dieser Patientinnen sowie um die Anzahl der fehlenden SPDEF - und MGB-1-Werte.

Es war eine überwiegende Verteilung der positiven Expressionen in Richtung der Ca 15-3 – positiven Fälle zu verzeichnen. Die Analyse erbrachte hoch-signifikante Ergebnisse im Hinblick auf alle Einzelgen- sowie Mehrfachanalysen.

Folgende Signifikanzhöhen wurden für die einzelnen Gene bzw. Genkombinationen im Vergleich zum Ca 15-3-Status wurden festgestellt (s. Tab. 20):

**Tabelle 20** Gegenüberstellung der Genexpressionsverteilung innerhalb der Ca 15-3 - positiven und -negativen Fälle; signifikante Verteilungen sind hervorgehoben. Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (asymptotischer  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson)

<i>Ca 15.3 – Tumormarker (Serum)</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>p-Wert</i>
<b>GA733.2</b>	3/50 6%	4/9 44,4%	<b>0,001</b>
<b>Muc-1</b>	4/50 8%	5/9 55,6%	<b>&lt; 0,001</b>
<b>SPDEF</b>	2/46 4,3%	4/8 50%	<b>&lt; 0,001</b>
<b>MGB-1</b>	1/43 2,3%	3/8 37,5%	<b>0,001</b>
<b>GA733.2*Muc-1</b>	5/50 10%	6/9 66,7%	<b>&lt; 0,001</b>
<b>einfach positiv</b>	7/43 16,3%	7/8 87,5%	<b>&lt; 0,001</b>
<b>zweifach positiv</b>	3/43 6,9%	6/8 75%	<b>&lt; 0,001</b>

#### **4.7 Betrachtung der Expressionspositivität im Kontext zur kumulierten Bestrahlungsdosis der Patientinnen**

Die Entnahme des peripheren Blutes bei Mammakarzinom Patientinnen erfolgte während oder unmittelbar vor Beginn eines Zyklus der Bestrahlungstherapie. So konnte analysiert werden, ob sich die Effektivität der Therapie in der Expressionshäufigkeit verschiedener Gene und der kumulierten Dosis der Bestrahlung widerspiegelt.

Die Einzelgen-Analyse erbrachte bis auf GA733.2 mit sieben von acht positiven Fällen im Bereich der niedrigen Kumulation (87,5%;  $p = 0,05$ ) keinen signifikanten Effektivitätsnachweis (s. Tab 21).

Die Analyse des Genprofils GA733.2\*Muc-1 sowie die Analyse der Einfach- und Zweifachpositivität im Genprofil Ga733.2\*Muc-1\*SPDEF\*MGB-1 erbrachten keine aussagekräftigen Verteilungen.

**Tabelle 21** Gegenüberstellung der Genexpressionsverteilung innerhalb der zwei Gruppen der kumulativen Bestrahlungsdosis; signifikante Verteilungen sind hervorgehoben. Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (asymptotischer  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson)

<i>Bestrahlungsdosis</i>	<i>&lt; 15 Gy</i>	<i>≥ 15 Gy</i>	<i>p-Wert</i>
<b>GA733.2</b>	7/35 20%	1/28 3,6%	<b>0,05</b>
<b>Muc-1</b>	7/35 20%	3/28 10,7%	0,316
<b>SPDEF</b>	5/34 14,7%	2/24 8,3%	0,463
<b>MGB-1</b>	2/33 6%	3/22 13,6%	0,338
<b>GA733.2*Muc-1</b>	9/35 25,7%	3/28 10,7%	0,132
<b>einfach positiv</b>	11/33 33,3%	4/22 18,2%	0,216
<b>zweifach positiv</b>	8/33 24,2%	2/22 9,1%	0,154

#### 4.8. Verteilung der Expressionspositivität im Hinblick auf den immunhistochemischen Her-2/*neu*-Status

Die Analyse der Expressionsergebnisse erbrachten keine aussagekräftigen Verteilungen weder der Einzelgene noch der Mehrfachpositivitäten unter immunhistochemisch nachgewiesener Her-2/*neu*-Positivität (s. Tab. 22). Der Signifikanztest wurde hier ebenfalls nach Pearson's asymptotischer  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

**Tabelle 22** Gegenüberstellung der Genexpressionsverteilung innerhalb der c-erbB2-negativen (< 2+) und -positiven ( $\geq 2+/3+$ ) Gruppe. Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (asymptotischer  $\chi^2$ -Signifikanztest nach Pearson)

<i>c-erbB2</i> (IHC)	< 2+	$\geq 2+/3+$	<i>p-Wert</i>
<b>GA733.2</b>	2/32 6,3%	4/18 22,2%	0,095
<b>Muc-1</b>	4/32 12,5%	3/18 16,7%	0,684
<b>SPDEF</b>	3/29 10,3%	2/17 11,8%	0,881
<b>MGB-1</b>	2/27 7,4%	0/16 %	0,265
<b>GA733.2*Muc-1</b>	5/32 15,6%	4/18 22,2%	0,560
<b>einfach positiv</b>	6/27 22,2%	4/16 25%	0,835
<b>zweifach positiv</b>	3/27 11,1%	4/16 25%	0,233

## **5. Diskussion**

Neben lokalem Differenzierungsgrad, regionaler Progression und lymphogener Dissemination des Mammakarzinoms bestimmt vor allem die Fernmetastasierung der entarteten Zellen über die Blutbahnen und ferner Organbefall die Prognose der Krankheit maßgeblich. Hierfür ist das Vorhandensein von zirkulierenden Tumorzellen eine fundamentale Voraussetzung. Folglich ist die mögliche Erfassung und Identifikation zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut ein wichtiger Maßstab zu Ermittlung einer individuellen Krankheitsprognose [62-64].

Die ersten in den fünfziger und sechziger Jahren entworfenen Methoden der Tumorzellidentifikation weisen eine hohe Sensitivität auf. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Patientenkollektive dieser Versuchsansätze im Vergleich zu heutigen Studien, aus nicht näher beschriebenen Krebsfällen bestehen. Die Möglichkeit einer systematischen Klassifikation der Karzinome, wie z. B. der TNM-Klassifikation, war damals nicht etabliert. Zum Teil wurden sogar mehrere Karzinomentitäten zur mikroskopischen Suche von Tumorzellen im Blut zu einem Kollektiv zusammengefasst [39, 41]. Bei bemerkenswert hohen richtig-positiven Nachweisen in diesen Studien ist ein hoher Anteil massiv-fortgeschrittener und sogar präfinaler Fälle nicht auszuschließen. Heutige Studien jedoch beherbergen aufgrund systematischer Früherkennungsmaßnahmen bereits sehr frühe Stadien einer Karzinomentität. Dies hat zur Folge, dass den heutigen Versuchsansätzen bereits eine sehr hohe Sensitivität vorausgesetzt wird. Zudem werden heute bei suffizienten Fallzahlen Kollektive gebildet, in denen durch die Kenntnis des TNM-Status frühe Stadien

selektiert werden, um die Sensitivität des evaluierten Versuchsansatzes zusätzlich herauszufordern.

Chelly et al. postulierten 1989 mit ihrem PCR-Ansatz die Möglichkeit des Nachweises jedes mutmaßlich existierenden Gens aus beliebigen Zellen des Menschen [50]. Somit entstand die Möglichkeit, die zirkulierenden Zellen im Blut auf genetischer Ebene zu differenzieren und ihren Ursprung zu identifizieren. In dieser Studie wurden Proben vom peripher-venösen Blut radiotherapierter Patientinnen mit gesichertem Mammakarzinom untersucht. Das Ziel war es, verschiedene Methoden zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen zu evaluieren und die Aussagekraft der erfassten Tumorzellen über Verlauf und Prognose der Krankheit zu beurteilen. Es wurden passende Techniken zur Erfassung von Tumorzellen und zur Amplifikation von DNA-Abschnitten vorausbestimmter Gene ausgewählt, die möglicherweise in karzinomatösen Zellen überexprimiert werden [64, 65].

Ross et al. (1993) postulierten, dass disseminierte Tumorzellen im peripheren Blut mit einer Frequenz von eins zu  $10^{5-7}$  Zellen vorkommen [46]. Daher wurden Anreicherungsverfahren zur Begegnung dieser Herausforderung entwickelt. Die Zentrifugation des Probenmaterials wurde zur Anreicherung mononukleärer - und somit auch Karzinomzellen eingesetzt [38]. Gaforio et al. (2003) erweiterten den Ansatz zuletzt durch die Anwendung einer Ficoll-Lösung [66]. Dabei handelt es sich um eine Dichtegradiententrennung, bei der mononukleäre von granulozytären Zellen getrennt werden. Aufgrund des nahezu gleichen spezifischen Gewichtes karzinomatöser Zellen und mononukleärer Zellen wird dabei eine Anreicherung der gesuchten Zellen in der mononukleären Schicht des zentrifugierten Probenmaterials erwartet. Aufgrund überzeugender Ansätze neuester Studien haben wir eine immunomagnetische Technik zur Erfassung und Anreicherung kursierender Karzinomzellen

angewendet [67]. Es wurden an magnetische Partikel gekoppelte Antikörper eingesetzt, die gegen epitheliale bzw. karzinomatöse Zellen gerichtet sind, um mutmaßliche Tumorzellen im peripheren Blut zu erfassen und durch Magnetseparation anzureichern. Eine manipulierende Wirkung der direkten immunomagnetischen Bearbeitung auf die Genexpression der erfassten Zellen wurde bereits in früheren Forschungsarbeiten ausgeschlossen [68]. Obwohl auch immunhistochemische Untersuchungen heutzutage mittels elektronischen Bildanalysemöglichkeiten automatisiert und somit beobachterunabhängig durchgeführt werden können, entschieden wir uns wegen der sensitiveren Ergebnissen im Vergleich von immunhistochemischen und PCR-Methoden für die zweite Variante [69]. Zudem werden immunomagnetische Separationsverfahren zunehmend in Automatisierungsverfahren integriert und somit unter standardisierten Bedingungen durchgeführt [70].

Aufgrund von überzeugenden Sensitivitäts- und Spezifitätsnachweisen in vorgehenden Untersuchungen wurde die multiplex-PCR- und Realtime-PCR-Methoden im Anschluss an eine reverse Transkription zur Detektion mutmaßlicher Gene mit Markereigenschaften für Karzinomzellen durchgeführt [71-73]. Die multiplex-PCR – Technik hat den Vorteil, dass die benötigte Menge an cDNA unabhängig von der Anzahl der verschiedenen Primer und folglich unabhängig der Anzahl verschiedener Gene stets konstant bleibt (s. Kapitel 3.2.4.2.1.). Amplikongrößen und Primersequenzen müssen aber besser aufeinander abgestimmt sein und bedürfen einer aufwendigeren Evaluation. Dagegen wird zur Durchführung der Realtime-PCR jeweils 2µl der cDNA-Suspension je Zielgen benötigt (s. Kapitel 3.2.4.2.2.). Eine Erweiterung des Untersuchungsumfangs im Sinne von der Hinzunahme zusätzlicher Gene zur Analyse bedarf somit einer größeren Menge des Ausgangsmaterials.

Zunächst wurden beide Methoden der PCR-Technik anhand desselben Genes, c-erbB2, miteinander verglichen. Unter Mitberücksichtigung der gesunden Probanden erbrachte der zweiseitige  $\chi^2$ -Test nach Pearson für die Frage nach der Anwendbarkeit beider Tests eine hohe Signifikanz mit  $p=0,001$ . Das Realtime-PCR-Verfahren zeigt dabei allerdings eine deutlich höhere Sensitivität, allerdings eine schlechtere Spezifität.

Einen Zusammenhang zwischen multiplex- bzw. Realtime-PCR an zirkulierenden Tumorzellen und der immunhistochemische Her-2/*neu*-Status im Tumorgewebe fanden wir dagegen nicht. Die zweiseitige  $\chi^2$ -Analyse nach Pearson zeigte keine Signifikanz ( $p = 0,375$  bzw.  $0,239$ ). Diese Ergebnisse entsprechen nicht den vorhergehenden Ergebnissen von Zieglschmid et al. (2007). Ihre Arbeit zeigte, dass 85% der Fälle ( $n=48$ ) mit immunhistochemisch negativem bzw. schwach positivem Her-2/*neu*-Expression, ebenso eine fehlende c-erbB2-Expression der zirkulierenden Tumorzellen mittels multiplex-PCR aufwies. Zugleich sei eine 50%ige Übereinstimmung des positiven Her-2/*neu*-Status (IHC) mit positivem multiplex-PCR-Ergebnis vorhanden [74].

In früheren Forschungsarbeiten wurden bestimmte Gene überwiegend in ihrer Expressionshäufigkeit bei malignen Entitäten überprüft. Hierzu zählen die auch in dieser Studie untersuchten Gene Muc-1, c-erbB2 und MGB-1. In dieser Studie wies das hinsichtlich des Tumorstadiums breit gestreute Kollektiv aus Mammakarzinomen für die Gene Muc-1 (10/63; 15,9%) und c-erbB2 (multiplex-PCR: 8/63 (12,7%); Realtime-PCR: 16/63 (25,4%)) verhältnismäßig niedrigere Gesamthäufigkeiten der positiven Expression auf [75, 76].

Die Ergebnisse der aktuellen Studie ergaben allerdings für MGB-1 übereinstimmende Häufigkeiten (5/55; 9,1%) mit einer früheren Studie von Grunewald et al. (2000) mit elf von 133 Patientinnen (8,3%) [77]. Andererseits beschrieben Lin et al. (2003) eine höhere MGB-1-

Frequenz in allen Stadien des Mammakarzinoms im Vergleich zur gesunden Population (41/112; 36,6%) [78].

Zusätzlich wurden in unserer Probenerhebung die seltener erforschten Gene GA733.2 und SPDEF miteinbezogen. Vermeintliche Markereigenschaften wurden für diese Gene früher ebenfalls beschrieben [79-83]. GA733.2 und SPDEF waren mit Gesamtfrequenzen von 12,7% (8/63) bzw. 12,1% (7/58) im aktuellen Kollektiv annähernd so häufig wie Muc-1, c-erbB2 und MGB-1. Eine Erforschung des SPDEF im peripheren Blut durch immunomagnetische Aufbereitung, reverse Transkription und Realtime-PCR – Schritten wurde bislang nicht beschrieben. GA733.2 hat in vergangenen Studien aufgrund der Sensitivität für epitheliale Tumorzellen eine große Anwendung im Bereich der immunomagnetischen Aufarbeitung gefunden. Die Verwendung dieses Gens wird allerdings aufgrund seiner geringen Basalexpression in hämatopoetischen Blutzellen kontrovers diskutiert [79, 83]. Dabei stand das Transkriptionsprodukt des GA733.2 (TACSTD1), der Oberflächenrezeptor Ep-CAM als Erkennungspunkt der epithelialen Zellen im Blut im Vordergrund [58, 84]. Im aktuellen Studiendesign wird das Gen sowohl auf der Ebene seines Transkriptes während der immunomagnetischen Aufarbeitung sowie des RNA-Korrelates durch multiplex-PCR gleichzeitig untersucht.

Die Bedeutung der spezifischen Genexpressionen zeigt sich auch dann, wenn ihre Häufigkeiten bei Patienten mit malignen Entitäten und bei gesunden Kontrollpersonen gegenübergestellt werden. So ergibt sich in der Gegenüberstellung der prozentualen Häufigkeiten bis auf die Gene c-erbB2 und MMP-11 (s.u.) eine Frequenzsteigerung der Genexpression bei karzinomerkrankten Patienten für die Gene GA733.2 (8/63 vs 1/14), Muc-1 (10/63 vs 1/14), SPDEF (7/58 vs 0/25) und MGB-1 (5/55 vs 0/25). Die Signifikanzanalyse

der Häufigkeitsverteilung zwischen gesunden und erkrankten Probanden erreicht mit p – Werten von maximal 0,069 bei der aktuellen Studienlage keine signifikante Aussagekraft. Lediglich die Expressionsrate der Gene c-erbB2 und MMP-11 wiesen im Vergleich des gesunden und erkrankten Kollektivs eine umgekehrte Häufigkeitsverteilung (s.u.).

Während für GA733.2, das ausschließlich in epithelialen Geweben exprimiert wird, kein vergleichbarer Versuchsansatz eruiert werden konnte, zeigte die Studie von Zhong et al. (1999) einen hohen Positivitätsnachweis für gesunde Kontrollpersonen 40% (16/40) [79]. Allerdings fehlte in ihrem Versuchsansatz eine immunomagnetische Aufarbeitungskomponente. Ein Vergleich der Expressionsstärke von GA733.2 zwischen peripherem Blut und lokalem Karzinomgewebe ist in unserer Studie nicht möglich gewesen. Hinsichtlich dieser Frage zeigte Rao et al. (2005), dass es im peripheren Blut im Vergleich zum Karzinomgewebe zu einer Abnahme der GA733.2-Positivität kommt, die auf einem Suppressionsmechanismus in den zirkulierenden Tumorzellen beruhe [85].

Muc-1 wird als ein weitgehend in epithelialen Geweben exprimiertes Gen beschrieben. Das Vorkommen wird vor allem in Brustdrüsen-, bronchialen-, Pankreas-, uterinen- und intestinalen Geweben beschrieben. In der Literatur werden für dieses Gen kontroverse Ergebnisse festgestellt. Raynor et al. (2002) zeigten, dass Muc-1 ein Oberflächenmolekül kodiert, das ebenso in nicht-malignen mononukleären Zellen des Menschen exprimiert wird. In ihrer Studie schrieben sie diesem Gen aufgrund dieses Nachweises keine Tumormarkereigenschaften zu [86]. Felton et al. (2004) wiesen allerdings in ihrer Studie in neun fortgeschrittenen Fällen mit Mammakarzinom acht positive Muc-1-Expressionen und nur einen positiven Fall in elf Kontrollproben nach. Sie zeigten aber auch die malignitätsunabhängige Muc-1-Expression in gesunden, peripheren Lymphozyten [49]. Die

Gegenüberstellung dieser Ergebnisse mit unseren Muc-1-Ergebnissen (15,9% Positivität im erkrankten Kollektiv und 7% im gesunden Kollektiv) wird durch die fehlende Anwendung immunomagnetischer Anreicherung sowie nicht-selektive Kollektivbildung in ihren Studien begrenzt.

SPDEF ist ein Transkriptionsfaktor, der in Prozessen wie der Zellproliferation, Differenzierung und Invasion involviert ist. Er wird ausschließlich in Geweben mit hohem epithelialen Anteil exprimiert. Ghadersohi et al. (2001) beschrieben eine signifikant höhere Expression des Genes SPDEF (SAM pointed domain-containing ETS transcription factor, Synonym PDEF) in RT-PCR-Untersuchungen der Gewebeproben von Mammakarzinomen und schwächere, allerdings vorhandene Expression im gesunden Brustdrüsengewebe [80]. Unsere Ergebnisse zeigen im Gegensatz dazu keine positiven Befunde im gesunden Kollektiv für dieses Gen. Zudem unterscheidet sich unser Studienansatz wiederum durch die Anwendung immunomagnetischer Verfahren und durch das Vorhandensein selektiver Frühstadien des Mammakarzinoms. Eine weitere Studie der gleichen Arbeitsgruppe (2004) zeigte zudem eine signifikant höhere Tumorassoziation der SPDEF-Genexpression im Vergleich zu anderen Genen, wie z.B. c-erbB2 oder CA-125 [87]. Dies deckt sich mit unseren Daten von 177 Mammakarzinomfällen und fünf Normalgeweben, die uns im Vorfeld zur Auswahl dieses Gens bewogen haben. Zuletzt stellten Gunawardane et al. (2005) dar, dass das gleichzeitige Vorhandensein von SPDEF- und c-erbB2-Überexpression die Invasivität eines tumorösen Geschehens fördert und ihrer Koevaluation große prognostische Bedeutung beizumessen ist [88].

Watson et al. (1996 und 1998) dokumentierten eine Überexpression des Gens MGB-1 (Mammaglobin 1; SCGB2A2), ein Polypeptid-Mitglied der Uteroglobulin-Familie, in

karzinomatösen Brustdrüsengeweben [89, 90]. Lin et al. (2003) empfahlen die RT-PCR-Untersuchung dieser Genexpression im Blut aufgrund der schwachen Sensitivität dieses Gens nur in Kombination mit etablierten Serum-Tumormarkern [78]. Cerveira et al. (2004) zeigten allerdings sowohl eine erhöhte Expressionsrate des MGB-1 innerhalb des erkrankten Kollektivs mit 22 von 54 Mammakarzinom Fällen (41%), sowie eine gute Korrelation der MGB-1-Expression mit den Tumorstadien der jeweiligen Fällen des Mammakarzinoms. Dagegen konnte bei 38 gesunden Kontrollpersonen keine MGB-1-Expression nachgewiesen werden [91]. Auch unsere Studie zeigt eine erhöhte Häufigkeit dieses Gens im erkrankten Kollektiv mit fünf von 55 Mammakarzinom Fällen, während für 25 gesunde Probanden kein Expressionsnachweis erbracht werden konnte.

Wassermann et al. wiesen 1999 auf vermutliche Markereigenschaften einer vorhandenen c-erbB2-Expression hin. Die Häufigkeitsverteilung zeigte dabei, dass null von 33 Personen, die keinen Anhalt für ein Mammakarzinom zeigten, eine Überexpression des Gens besaß. Dagegen wurde eine Positivität des Gens bei zehn von 17 (59%) Patientinnen mit bekanntem Mammakarzinom nachgewiesen [92]. Ihre Untersuchungsmethode bestand dabei aus einer Kombination aus reverse-Transkriptase und Endpunkt-Polymerase-Ketten-Reaktion. Die aktuelle Studie dagegen zeigt, dass eine c-erbB2-Expression bei gesunden Probanden mit einer Häufigkeit von 50 % in multiplex-PCR (64,3% in Realtime-PCR) auftrat, während in den erkrankten Fällen nur 12,7% Positivität in multiplex-PCR (25,4% in Realtime-PCR) nachgewiesen werden konnte. Nach unserer Studie zeigt es somit keine aussagekräftige Verteilung innerhalb der erkrankten Fälle. Daraus schlussfolgern wir, dass ein positiver c-erbB2-Nachweis im Blut nicht als Markereigenschaft in der Diagnostik des

Mammakarzinoms fungieren kann. Allerdings verdeutlichten frühere Studien die Tatsache, dass die Her-2/neu-Überexpression im Tumorgewebe die Prognose des Mammakarzinoms deutlich verschlechtert. Der membranständige Rezeptor Her2-neu, der das Transkriptionsprodukt des Genes c-erbB2 darstellt, wird in der modernen Therapie des Mammakarzinoms unter der Anwendung des humanisierten Antikörpers Herceptin behandelt [93]. Er kann somit in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten als unabhängiger prädiktiver Wert in Prognose eines Mammakarzinoms angesehen werden [94]. Der Herceptin-Immunotherapie liegt die Blockade des Rezeptors Her2-neu durch den o. g. Antikörper zugrunde. Die Folge ist eine Inhibition der Tumorproliferation durch die Rekrutierung von Immunzellen, Zellzerstörung sowie die Inhibition intrazellulärer Signalkaskaden und der Angiogenese und bedeutet somit für Patienten mit c-erbB2-Überexpression eine Verbesserung der Krankheitsprognose [95].

Basset et al. (1990) beschrieben in einer Endpunkt-PCR-Methode eine signifikant höhere Expression des Gens Matrix Metalloproteinase MMP-11 in stromaler Umgebung karzinomatöser Geweben (100% Positivität in 30 Proben) im Vergleich zu gesunden Geweben [96]. Dagegen war in unserer Studie der Nachweis desselben Gens im peripheren Blut karzinomatöser Fälle mit 62,9% sogar seltener anzutreffen als in Kontrollproben mit einer Nachweishäufigkeit von 85,7%. Schlussendlich wird eine stromale Überexpression des MMP-11 bei Mammakarzinom nicht im peripheren Blut widerspiegelt. Unter anderem wird in vorhergehenden Untersuchungen auch beschrieben, dass zwar eine Korrelation der MMP-11-Expression mit malignen Geweben besteht, allerdings ihre Expression auf die Fibroblasten in der unmittelbaren Umgebung der Karzinomzellen beschränkt ist [97]. Ein Korrelat für die aktuelle Studie im Sinne einer MMP-11-Expressionsuntersuchung im peripheren Blut konnte

in der Literatur nicht eruiert werden. Zusammenfassend konnten wir darstellen, dass das Gen MMP-11 eine ausgeprägt geringe Spezifität für zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut aufweist und somit in diesem methodischen Zusammenhang nicht verwertbar ist.

Van't Veer et al. (2005) beschrieben den Bedarf an Verknüpfungen multipler Gene zur Etablierung eines verlässlichen Markerprofils zur individuellen Beurteilung der Prognose eines Mammakarzinoms. Nach den Ergebnissen unserer Studie können wir diese These durch Kombination der zur Verfügung stehenden Expressionsergebnisse bestätigen [71].

In unserem Kollektiv an Mammakarzinomfällen zeigte die Kombination aus den multiplex-PCR – amplifizierten Genen GA733.2, Muc-1 und c-erbB2 eine Positivrate 23,8% (15/63). Dieser Wert lag bei gesunden Probanden bei 57% (8/14). Die hohe Rate an Positivfällen in der Gruppe der Kontrollpersonen war ein Ergebnis der Tatsache, dass sieben von 14 Probanden eine alleinige positive c-erbB2 – Expressionen aufwiesen. Ein Ausschluss dieses Gens aus dem Profil führte zu einer Abnahme der Positivrate in der Kontrollgruppe auf 7% (1/14), während sich bei den erkrankten Fällen eine Reduktion lediglich auf 19% (12/63) ergab. Methodenübergreifende Gruppierung der vier Gene GA733.2, Muc-1, SPDEF und MGB-1 zeigten 23,8% Expressionshäufigkeit im Bezug auf die diagnostizierten Karzinomfälle. Dasselbe vierfache Genprofil blieb in der Gruppe der gesunden Probandinnen auf dem Wert von 14,3% konstant. Die in dieser Studie aufgeführten Genkombinationen sind in keinen früheren Publikationen anzutreffen. Zur Validierung der Reproduzierbarkeit dieser deutlichen Vergleichsunterschiede beider Kollektive, bedarf es in Folgestudien größerer Teilnehmerzahlen.

Zur weiteren Analyse wurde die Aussagekraft der untersuchten Genexpressionen im Kontext zu bereits anerkannten, prognostischen Merkmalen der Malignität abgewogen. Nach Empfehlung von van't Veer et al. wurde auf der einen Seite die Genkombination GA733.2\*Muc-1 und auf der anderen Seite die Einfachpositivität sowie die Zweifachpositivität der Genkombination GA733.2\*Muc-1\*SPDEF\*MGB-1 evaluiert [71]. Bei fehlender Vergleichsliteratur können wir feststellen, dass die hier untersuchten Gene und Genprofile signifikante Korrelationswerte zum Staging, N-Status sowie M-Status aufwiesen. Alle Gene und Genprofile waren ausnahmslos signifikant korrelierend mit dem Kriterium Ca-15-3-Tumormarker.

GA733.2 wurde in früheren Studien nicht im peripheren Blut bestimmt. Bei anderen Bestimmungslokalisationen, wie z. B. im Knochenmark, wurden zudem keine statistischen Untersuchungen im Kontext der o. g. Tumormerkmale erhoben.

Das Kollektiv der erkrankten Fälle bestand ausschließlich aus Patientinnen, die sich vor bzw. während einer Strahlentherapie befanden. Anhand der dosisabhängigen Beobachtung der PCR-Ergebnisse wurde der individuelle therapeutische Benefit für die Patientinnen beurteilt. Genanalysen erfolgten hierbei im Zusammenhang zur aktuell verabreichten Gesamtdosis der Strahlendosis. Die Analyse der Expressionsergebnisse in diesem Kontext ergab eine Abnahme der Expressionshäufigkeit bei zunehmender kumulierter Gesamtdosis der Bestrahlung. Allerdings zeigte nur GA733.2 sowohl in der Einzelgenanalyse als auch im Vergleich zu Genkombinationen eine grenzwertig signifikante Verteilung der Expressionshäufigkeit (zweiseitiger  $\chi^2$ -Test nach Pearson;  $p = 0,05$ ).

Die Ergebnisse dieser Studie ergeben, dass bemerkenswerte Parallelitäten in der Aussagekraft von Überexpressionen bestimmter Gene in erfassten Tumorzellen auf der einen Seite und der

Präsenz tumoröser sowie metastatischer Prozesse auf der anderen Seite bestehen. Es soll betont werden, dass es hierbei keineswegs um die Untersuchung kausaler Korrelationen handelt. Des Weiteren werden infolge der Kombination der Gene zu verschiedenen Genprofilen Häufigkeitsverteilungen bestätigt. Der Vorteil eines solchen Studiendesigns besteht im Übrigen in der geringen Invasivität bei der Gewinnung des Probengutes, während bei früheren Untersuchungen auch Verfahren wie die Knochenmarkspunktion eine Anwendung fanden [75, 79, 86].

Li et al. (2005) wiesen in ihrer Studie auf die Notwendigkeit von multiplen Genverknüpfungen hin, da Einzelgen- bzw. Doppelgen-Analysen nicht die erhoffte Präzision der Prediktion ergaben [98]. Genprofile wiesen im Vergleich zu Einzelgenen eine Zunahme des prediktiven Wertes und der Sensitivität auf. Auf der anderen Seite führte die zunehmende Anzahl an Genen, die in einem solchen Genprofil untersucht werden zur nicht überzeugenden Reliabilität [99]. Eine statistische Approximation in der Suche nach der geeigneten Anzahl an Genen in einem Genprofil verdeutlichte, dass eine Kombination von mehr als zehn Genen ebenfalls zu einer Abnahme der Aussagepräzision führt. Die Grenzwerte für die Anzahl an verschiedenen Genen in einem Profil lägen bei sechs und zehn [98]. Da die maximale Genanzahl eines Genprofils in dieser Studie bei vier (GA733.2\*Muc-1\*SPDEF\*MGB-1) liegt, mag es außerdem einer Erweiterung dieses Studiendesigns um weitere aussagekräftige Einzelgene bedürfen. Dies birgt allerdings das Risiko eines Spezifitätsverlustes. Die Hinzunahme von SPDEF und MGB-1 hat in unseren Fällen zu einer höheren Sensitivität geführt, ohne die Spezifität zu beeinträchtigen. Der unabhängige Beitrag dieser Gene zeigte sich in einem Anstieg der Anzahl der positiven Fälle von zwölf auf 15 ohne weitere falsch-positive Fälle darzustellen.

Aufgrund der minimalen Anzahl an zirkulierenden und metastasenfähigen Tumorzellen im peripheren Blut [100, 101], sowie ihrer fehlenden flächendeckenden Erfassung, bedarf die Kombination aus immunomagnetischer Selektion dieser Tumorzellen und diversen, etablierten PCR-Ansätzen weiterhin an Optimierung. Die aktuelle Literatur weist in der Hinsicht eine ausgeprägte Heterogenität auf. Die Heterogenität bezieht sich auf das untersuchte Studienkollektiv, das hinsichtlich der TNM-Stadieneinteilung in den meisten Arbeiten keine Standardisierung aufweist. Vielmehr werden alle Patienten einer malignen Entität zu einem Kollektiv zusammengefasst. Hsieh et al. (2006) beschrieben jedoch, dass bereits die absolute Anzahl der disseminierten Tumorzellen in Abhängigkeit vom Staging des Patienten ansteigt [102]. Zudem sollten auch die Mannigfaltigkeit hinsichtlich der verschiedenen Lokalisationen der Fernmetastasierung und die Möglichkeit einer Fehlklassifikation innerhalb des TNM-Stadiums zur Bildung neuer Kollektive mitberücksichtigt werden.

Eine weitere Heterogenität besteht im Aufbau des Versuchsansatzes und der Auswahl der Markergene und der Genprofile verschiedener Arbeiten. Die fehlende Standardisierung der Versuchsansätze limitiert die Vergleichbarkeit der Studien miteinander.

Systematische Fehlerquellen der Verfahrenstechniken der PCR sind zudem einerseits das Vorhandensein von Pseudogenen, deren Unterscheidung von mutmaßlichen Markergenen oft nicht gelingt und somit falsch-positive Ergebnisse verursacht. Andererseits kann eine Kontamination mit gesund-epithelialen Zellen, z.B. iatrogen während der Probengewinnung, vorkommen und ebenso falsch-positive Ergebnisse verursachen.

Es existieren zahlreiche Ansatzpunkte, um eine immer präzisere Erfassung von zirkulierenden Tumorzellen im Blut zu ermöglichen. Das wichtigste Ziel dabei sollte es sein, das

Zeitintervall vom Beginn der Dissemination metastasenfähiger Tumorzellen im Körper bis zur Diagnose der Fernmetastasierung weiter zu minimieren. Mit der Entwicklung verschiedener molekularbiologischer Nachweismethoden sollte weiterhin versucht werden, dieser Problematik zu begegnen.

**6. Zusammenfassung:**

Zirkulierende Tumorzellen spielen eine zunehmende Rolle in der Prognose des Mammakarzinoms. Der Nachweis bestimmter Genexpressionen kann zur Erfassung zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut eingesetzt werden. In dieser Studie wurde ein immunomagnetisches Anreicherungsverfahren mit multiplex-PCR und Realtime-PCR-Verfahren kombiniert, um okkulte Tumorzellen im peripheren Blut nachzuweisen. Das periphere Blut von 63 Patientinnen mit nachgewiesenem Mammakarzinom und 14 Kontrollproben von gesunden Probanden wurden analysiert. Nach immunomagnetischer Anreicherung der Tumorzellen und einer reversen Transkription wurde das multiplex-PCR-Verfahren zum Nachweis der Gene GA733.2, muc-1 und c-erbB2 eingesetzt. Weitere für das Mammakarzinom relevante Gene (MGB-1, SPDEF und MMP-11) wurden aus unseren auf Microarray-Plattform-basierenden Genexpressionsdaten von Mammakarzinomfällen selektiert und mittels Realtime-PCR im aktuellen Kollektiv analysiert. GA733.2 wurde in 12,7% unserer Mammakarzinomfälle, muc-1 in 15,9%, MGB-1 in 9,1% und SPDEF in 12,1% nachgewiesen. Aufgrund fehlender Spezifität und starker Hintergrundexpression im peripheren Blut wurden die Gene c-erbB2 und MMP-11 von weiteren Analysen ausgeschlossen. Dem als unabhängiger Prognosefaktor eingestuften c-erbB2-Status können nach unseren Ergebnissen keine Markereigenschaften zugeschrieben werden. Auch eine Korrelation der multiplex- und Realtime-PCR-ermittelten c-erbB2-Expression im peripheren Blut zum immunhistochemisch-ermittelten Her2/neu-Status konnte nicht beobachtet werden. Neben Einzelgenanalysen wurden ebenso Genprofile in Ihrer Aussagekraft beurteilt. In Einzelgenanalysen zeigten GA733.2 und muc-1, in Mehrfachanalysen GA733.2\*muc-1 und

GA733.2\*muc-1\*MGB-1\*SPDEF hochsignifikante Korrelationen zum Staging des Mammakarzinoms. Weitere signifikante Korrelationen der Einzelgene und Genkombinationen wurde im Zusammenhang mit dem T-, N- und M-Status aufgefunden, wobei der Differenzierungsgrad in keinem Zusammenhang zu unseren Expressionsergebnissen stand. Hochsignifikante Korrelationen fanden sich auch zwischen Expressionsergebnissen der Einzelgene und der Genkombinationen mit dem Ca 15-3-Status. Die geschickte Kombination verschiedener Einzelgene kann nach meinen Ergebnissen die Positivitätsrate bei nur geringem Spezifitätsverlust verbessern. Besonders der Marker SPDEF hat sich für in solchen Kombinationen als attraktiver, zusätzlicher Marker erwiesen.

**Literaturverzeichnis:**

1. Bertz J., G.K., Haberland J., Hentschel S., Kaatsch P., Katalinic A., Stabenow R., Stegmaier C., Ziegler H., *Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends*. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut (RKI), 2006.
2. Sant, M., et al., *Stage at diagnosis is a key explanation of differences in breast cancer survival across Europe*. Int J Cancer, 2003. **106**(3): p. 416-22.
3. Engel, J., et al., *Determinants and prognoses of locoregional and distant progression in breast cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **55**(5): p. 1186-95.
4. Hagemeister, F.B., Jr., et al., *Causes of death in breast cancer: a clinicopathologic study*. Cancer, 1980. **46**(1): p. 162-7.
5. Gottwald, G., I. Szakolczai, and K. Szemenyei, *Metastases and causes of death in breast cancer*. Radiobiol Radiother (Berl), 1983. **24**(4): p. 501-6.
6. Schairer, C., et al., *Probabilities of death from breast cancer and other causes among female breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(17): p. 1311-21.
7. Grosclaude, P., et al., *Survival of women with breast cancer in france: variation with age, stage and treatment*. Breast Cancer Res Treat, 2001. **70**(2): p. 137-43.
8. Olivotto, I.A., et al., *Long-term survival of patients with supraclavicular metastases at diagnosis of breast cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(5): p. 851-4.
9. Ashworth, T.R., *A Case of Cancer in which cells similar to those in the Tumours were seen in the blood after death*. Australian Medical Journal, 1869: p. 146-148.
10. Recklinghausen, v., F. D., *Osteoplastische Carcinose in ihren gegenseitigen Beziehungen*. Festschrift für Rudolf Virchow. Berlin, Georg Reimer Verlag, 1891.
11. Kantorowicz, L., *Zur Pathogenese der acuten allgemeinen Carcinomatose und zur Casuistik seltener Krebsmetastasen*. Centralblatt für Allgemeine Pathologie u. Pathologische Anatomie, 1893. **No. 20., IV. Band:** p. 817-826.
12. Paget, S., *Distribution of secnodary growths in cancer of the breast*. The Lancet, 1889: p. 571-573.
13. Ewing, J., *Neoplastic diseases: A Textbook on Tumors*. Philadelphia, W. B. Saunders, and London, 1919.
14. Sträuli, P., *Bedingungen der Entwicklung und Implantation der metastatischen Tumorzellen*. Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften, 1964. **20**(Sonderausgabe von Fasc. 1-3): p. 75-91.
15. Oka, H., et al., *Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis*. Cancer Res, 1993. **53**(7): p. 1696-701.
16. Nelson, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications*. J Clin Oncol, 2000. **18**(5): p. 1135-49.
17. Chambers, A.F. and L.M. Matrisian, *Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(17): p. 1260-70.
18. Wolf, K., et al., *Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 267-77.
19. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
20. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
21. Weidner, N., et al., *Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(24): p. 1875-87.
22. Elkin, M., A. Orgel, and H.K. Kleinman, *An angiogenic switch in breast cancer involves estrogen and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(11): p. 875-8.
23. Hazan, R.B., et al., *Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis*. J Cell Biol, 2000. **148**(4): p. 779-90.
24. Felding-Habermann, B., et al., *Integrin activation controls metastasis in human breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1853-8.

25. Liapis, H., A. Flath, and S. Kitazawa, *Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases*. *Diagn Mol Pathol*, 1996. **5**(2): p. 127-35.
26. Matsuura, N., et al., *Increased level of circulating adhesion molecules in the sera of breast cancer patients with distant metastases*. *Jpn J Clin Oncol*, 1997. **27**(3): p. 135-9.
27. Matsuura, N., et al., *Increased concentration of soluble E-selectin in the sera of breast cancer patients*. *Anticancer Res*, 1997. **17**(2B): p. 1367-72.
28. Raz, A. and R. Lotan, *Lectin-like activities associated with human and murine neoplastic cells*. *Cancer Res*, 1981. **41**(9 Pt 1): p. 3642-7.
29. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
30. Coussens, L., et al., *Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene*. *Science*, 1985. **230**(4730): p. 1132-9.
31. Yamamoto, T., et al., *Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor*. *Nature*, 1986. **319**(6050): p. 230-4.
32. King, C.R., M.H. Kraus, and S.A. Aaronson, *Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma*. *Science*, 1985. **229**(4717): p. 974-6.
33. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 211-25.
34. Olayioye, M.A., et al., *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. *Embo J*, 2000. **19**(13): p. 3159-67.
35. Kantorowicz-sw, *Zur Pathogenese der acuten allgemeinen Carcinomatose und zur Casuistik seltener Krebsmetastasen*. 1893.
36. Finkel, G.C. and G.H. Tishkoff, *Malignant cells in a peripheral blood smear: report of a case*. *N Engl J Med*, 1960. **262**: p. 187-8.
37. Pool, *Cancer cells in the blood stream*. 1934.
38. Tullis, J.L., *Separation and purification of leukocytes and platelets*. *Blood*, 1952. **7**(9): p. 891-6.
39. Sandberg, A.A. and G.E. Moore, *Examination of blood for tumor cells*. *J Natl Cancer Inst*, 1957. **19**(1): p. 1-11.
40. Roberts, S., et al., *Technique and results of isolation of cancer cells from the circulating blood*. *AMA Arch Surg*, 1958. **76**(3): p. 334-46.
41. Long, L., et al., *Cancer cells in blood. Results of a simplified isolation technique*. *Arch Surg*, 1960. **80**: p. 910-9.
42. Long, L., et al., *Cancer cells in the blood stream*. *Arch Surg*, 1960. **80**: p. 639-45.
43. Pruitt, J.C., A.W. Hilberg, and R.F. Kaiser, *Malignant cells in peripheral blood*. *N Engl J Med*, 1958. **259**(24): p. 1161-4.
44. Seal, S.H., *Silicone flotation: a simple quantitative method for the isolation of free-floating cancer cells from the blood*. *Cancer*, 1959. **12**(3): p. 590-5.
45. Kuper, S.W., J.R. Bignall, and E.D. Luckcock, *A quantitative method for studying tumour cells in blood*. *Lancet*, 1961. **1**: p. 852-3.
46. Ross, A.A., et al., *Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques*. *Blood*, 1993. **82**(9): p. 2605-10.
47. Witzig, T.E., et al., *Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(5): p. 1085-91.
48. Fellowes, V.S., et al., *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): p. 861-7.
49. Felton, T., et al., *Identification of carcinoma cells in peripheral blood samples of patients with advanced breast carcinoma using RT-PCR amplification of CK7 and MUC1*. *Breast*, 2004. **13**(1): p. 35-41.
50. Chelly, J., et al., *Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(8): p. 2617-21.
51. Zieglschmid, V., C. Hollmann, and O. Bocher, *Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2005. **42**(2): p. 155-96.

- 
52. Jotsuka, T., et al., *Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer*. *Surgery*, 2004. **135**(4): p. 419-26.
  53. Eaton, M.C., et al., *Immunobead RT-PCR: a sensitive method for detection of circulating tumor cells*. *Biotechniques*, 1997. **22**(1): p. 100-5.
  54. Berois N., et al., *Detection of rare human breast cancer cells. Comparison of an immunomagnetic separation method with immunocytochemistry and RT-PCR*. *Anticancer Res*, 1997. **17**(4A): p. 2639-46.
  55. Hardingham, J.E., et al., *Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease*. *Int J Cancer*, 2000. **89**(1): p. 8-13.
  56. Lacroix, M., *Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13**(4): p. 1033-67.
  57. Gilbey, A.M., et al., *The detection of circulating breast cancer cells in blood*. *J Clin Pathol*, 2004. **57**(9): p. 903-11.
  58. Allard, W.J., 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): p. 6897-904.
  59. Smirnov, D.A., et al., *Global gene expression profiling of circulating tumor cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(12): p. 4993-7.
  60. Wittekind, C., H.-J. Meyer, and F.H. Bootz, *UICC: TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage*. Springer, Berlin Heidelberg New York. 2002.
  61. Greene, F., et al., *AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed*. New York: Springer, 2002.
  62. Kahn, H.J., et al., *Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage*. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **86**(3): p. 237-47.
  63. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(8): p. 781-91.
  64. Beitsch, P.D. and E. Clifford, *Detection of carcinoma cells in the blood of breast cancer patients*. *Am J Surg*, 2000. **180**(6): p. 446-8; discussion 448-9.
  65. Hu, X.C., et al., *Immunomagnetic tumor cell enrichment is promising in detecting circulating breast cancer cells*. *Oncology*, 2003. **64**(2): p. 160-5.
  66. Gaforio, J.J., et al., *Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis*. *Int J Cancer*, 2003. **107**(6): p. 984-90.
  67. Bauernhofer, T., 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): p. 179-84.
  68. Woelfle, U., E. Breit, and K. Pantel, *Influence of immunomagnetic enrichment on gene expression of tumor cells*. *J Transl Med*, 2005. **3**(1): p. 12.
  69. Smith, B.M., et al., *Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(7): p. 1432-9.
  70. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(7): p. 1420-30.
  71. van't Veer, L.J., S. Paik, and D.F. Hayes, *Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(8): p. 1631-5.
  72. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. *J Mol Endocrinol*, 2000. **25**(2): p. 169-93.
  73. Datta, Y.H., et al., *Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction*. *J Clin Oncol*, 1994. **12**(3): p. 475-82.
  74. Zieglschmid, V., et al., *Heterogeneous expression of tumor-associated genes in disseminated breast cancer cells*. *Anticancer Res*, 2007. **27**(4A): p. 1769-76.
  75. Zippelius, A. and K. Pantel, *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**: p. 110-23.
  76. Ghossein, R.A. and S. Bhattacharya, *Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours*. *Eur J Cancer*, 2000. **36**(13 Spec No): p. 1681-94.
-

- 
77. Grunewald, K., et al., *Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19*. Lab Invest, 2000. **80**(7): p. 1071-7.
  78. Lin, Y.C., et al., *Lack of correlation between expression of human mammaglobin mRNA in peripheral blood and known prognostic factors for breast cancer patients*. Cancer Sci, 2003. **94**(1): p. 99-102.
  79. Zhong, X.Y., et al., *Evaluating GA733-2 mRNA as a marker for the detection of micrometastatic breast cancer in peripheral blood and bone marrow*. Arch Gynecol Obstet, 1999. **263**(1-2): p. 2-6.
  80. Ghadersohi, A. and A.K. Sood, *Prostate epithelium-derived Ets transcription factor mRNA is overexpressed in human breast tumors and is a candidate breast tumor marker and a breast tumor antigen*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(9): p. 2731-8.
  81. Feldman, R.J., et al., *Pdef expression in human breast cancer is correlated with invasive potential and altered gene expression*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4626-31.
  82. Feldman, R.J., V.I. Sementchenko, and D.K. Watson, *The epithelial-specific Ets factors occupy a unique position in defining epithelial proliferation, differentiation and carcinogenesis*. Anticancer Res, 2003. **23**(3A): p. 2125-31.
  83. Bostick, P.J., 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): p. 2632-40.
  84. Racila, E., et al., *Detection and characterization of carcinoma cells in the blood*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4589-94.
  85. Rao, C.G., et al., *Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors*. Int J Oncol, 2005. **27**(1): p. 49-57.
  86. Raynor, M., et al., *Optimisation of the RT-PCR detection of immunomagnetically enriched carcinoma cells*. BMC Cancer, 2002. **2**: p. 14.
  87. Ghadersohi, A., et al., *Prostate derived Ets transcription factor shows better tumor-association than other cancer-associated molecules*. Oncol Rep, 2004. **11**(2): p. 453-8.
  88. Gunawardane, R.N., et al., *Novel role for PDEF in epithelial cell migration and invasion*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11572-80.
  89. Watson, M.A., et al., *Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13*. Oncogene, 1998. **16**(6): p. 817-24.
  90. Watson, M.A. and T.P. Fleming, *Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(4): p. 860-5.
  91. Cerveira, N., et al., *Highly sensitive detection of the MGB1 transcript (mammaglobin) in the peripheral blood of breast cancer patients*. Int J Cancer, 2004. **108**(4): p. 592-5.
  92. Wasserman, L., et al., *A seminested RT-PCR assay for HER2/neu: initial validation of a new method for the detection of disseminated breast cancer cells*. Mol Diagn, 1999. **4**(1): p. 21-8.
  93. Emens, L.A., R.T. Reilly, and E.M. Jaffee, *Breast cancer vaccines: maximizing cancer treatment by tapping into host immunity*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(1): p. 1-17.
  94. Winstanley, J., et al., *The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer*. Br J Cancer, 1991. **63**(3): p. 447-50.
  95. Albanell, J., et al., *Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4*. Adv Exp Med Biol, 2003. **532**: p. 253-68.
  96. Basset, P., et al., *A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas*. Nature, 1990. **348**(6303): p. 699-704.
  97. Wolf, C., et al., *Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumor progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1843-7.
  98. Li, W., *How many genes are needed for early detection of breast cancer, based on gene expression patterns in peripheral blood cells?* Breast Cancer Res, 2005. **7**(5): p. E5.
  99. Weigelt, B., et al., *Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients*. Br J Cancer, 2003. **88**(7): p. 1091-4.
  100. Butler, T.P. and P.M. Gullino, *Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma*. Cancer Res, 1975. **35**(3): p. 512-6.
-

101. Fidler, I.J., *Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with <sup>125</sup>I-5-iodo-2'-deoxyuridine*. J Natl Cancer Inst, 1970. **45**(4): p. 773-82.
102. Hsieh, H.B., et al., *High speed detection of circulating tumor cells*. Biosens Bioelectron, 2006. **21**(10): p. 1893-9.

**Anhang:**

**Tabelle 23** Übersicht über das Kollektiv und ihrer wesentlichen Parameter. Ca 15-3 wurde als Serum-Tumormarker bestimmt und ist ab einem Wert von 31 U/ml als positiv anzusehen. Die Dosis bezieht sich auf die kumulative Bestrahlungsdosis zum Zeitpunkt der Probenentnahme und besitzt die Einheit Gray (Gy).

<i>Pat.</i>	<i>Rezidiv</i>	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>G</i>	<i>Staging</i>	<i>Ca 15-3</i>	<i>Dosis</i>
<b>1</b>	Rezidiv	4a	1	1	3	6	16,3	0
<b>2</b>	Erstdiagnose	1c	1a(1/1)	0	2	3	13,5	16
<b>3</b>	Erstdiagnose	2	1a(3/38)	0	2	3	6,5	0
<b>4</b>	Erstdiagnose	4b	3a(11/20)	0	3	5	46,1	0
<b>6</b>	Erstdiagnose	2	1a(1/21)	0	3	3	14,3	14
<b>7</b>	Erstdiagnose	2	0(0/17)	0	3	2	19,2	0
<b>8</b>	Erstdiagnose	1c	2a(5/17)	0	2	4	9,3	11
<b>9</b>	Erstdiagnose	1c	0/11	0	3	1	20,2	0
<b>11</b>	Erstdiagnose	1c	0(0/20)	0	2	1	5,7	45
<b>12</b>	Erstdiagnose	1c	x	0	x	x	22,1	16
<b>13</b>	Rezidiv	1c	3c	1	3	5	90,4	20
<b>14</b>	Erstdiagnose	1a	1a(1/12)	0	3	2	21,6	5
<b>15</b>	Erstdiagnose	1c	1a	0	1	2	15,4	32
<b>16</b>	Rezidiv	1b	0	0	2	1	20,8	2
<b>17</b>	Erstdiagnose	2	0(0/12)	0	2	2	19,3	2
<b>18</b>	Erstdiagnose	2	3a 14/50)	0	3	5	22,1	20
<b>19</b>	Rezidiv	2	1bi(2/21)	1	2	6	22,8	24
<b>20</b>	Erstdiagnose	2	1a(1/23)	0	2	3	x	54
<b>21</b>	Erstdiagnose	1b	0	0	3	1	15	40

<b>22</b>	Erstdiagnose	2	3a 12/19)	1	3	6	20,5	25
<b>23</b>	Erstdiagnose	2	3a(16/16)	0	2	5	24	36
<b>24</b>	Erstdiagnose	2	3a 17/21)	1	3	6	11,6	29
<b>25</b>	Erstdiagnose	1b	0	0	2	1	26,6	25
<b>26</b>	Erstdiagnose	4a	1b	1	2	6	21,4	3
<b>27</b>	Erstdiagnose	1b	0 (0/9)	0	1	1	7,2	20
<b>28</b>	Erstdiagnose	3	3a 11/15)	1	3	6	33,7	5
<b>29</b>	Erstdiagnose	2	0 (0/28)	0	2	2	14,7	40
<b>30</b>	Erstdiagnose	2	1 (1/4)	0	2	3	19,1	60
<b>31</b>	Erstdiagnose	x	yN0	0	3	x	11	40
<b>32</b>	Erstdiagnose	2	0(0/20)	1	2	6	16,7	11
<b>33</b>	Erstdiagnose	1c	0(0/20)	0	1	1	19,5	5
<b>34</b>	Erstdiagnose	2	0(0/19)	0	2	2	12,8	36
<b>35</b>	Erstdiagnose	1c	1a(1/22)	0	2	2	22,4	4
<b>36</b>	Erstdiagnose	1b	1bii(7/14)	0	3	2	14,3	2
<b>37</b>	Rezidiv	2	2(5/9)	1	3	6	24,3	20
<b>38</b>	Erstdiagnose	is	0	0	3	0	11,9	18
<b>39</b>	Erstdiagnose	y1c	N0	0	2	1	10,6	36
<b>40</b>	Rezidiv	y1a	y1b(4/4)	1	2	6	239,6	9
<b>41</b>	Erstdiagnose	2	1(1/11)	0	2	3	20,5	58
<b>42</b>	Erstdiagnose	4d	0	0	2	5	10,2	4
<b>43</b>	Erstdiagnose	1c	0(0/16)	0	3	1	13,6	18
<b>44</b>	Rezidiv	1	0	1	x	6	55,6	14
<b>45</b>	Rezidiv	2	1b(4/20)	1	3	6	121,4	6

<b>46</b>	Erstdiagnose	is	x	0	2	0	13,3	9
<b>47</b>	Rezidiv	2	0	1	2	2	6,4	3
<b>48</b>	Erstdiagnose	1c	0 (0/3)	0	2	1	14,7	20
<b>49</b>	Erstdiagnose	4b	2a (5/12)	0	2	5	11,9	2
<b>50</b>	Rezidiv	1c	0	1	2	6	33,4	4
<b>51</b>	Erstdiagnose	y1c	0	0	3	1	15,9	0
<b>52</b>	Erstdiagnose	4b	1b (3/5)	0	3	5	7,7	2
<b>53</b>	Erstdiagnose	4b	0(0/1)	0	2	5	8,5	5
<b>54</b>	Erstdiagnose	4b	3a	1	3	6	54,9	30
<b>55</b>	Erstdiagnose		x	1	x	6	42,8	30
<b>56</b>	Rezidiv	1c	x	0	2	1	19,4	32
<b>57</b>	Erstdiagnose	1c	0(0/12)	0	2	1	15,9	4
<b>58</b>	Erstdiagnose	1c	0(0/11)	0	2	1	5	2
<b>59</b>	Erstdiagnose	1c	0(0/16)	0	1	1	19,2	4
<b>61</b>	Erstdiagnose	2	1a	1	2	6	18,6	3
<b>62</b>	Erstdiagnose	1c	0(0/10)	0	2	1	10,3	7
<b>63</b>	Erstdiagnose	2	0	0	3	2	7,7	0
<b>65</b>	Rezidiv	4b	+	1	2	6	x	14
<b>66</b>	Rezidiv	2	1b(20/2)	1	2	6	x	36
<b>67</b>	Erstdiagnose	1c	2a	1	3	6	x	0

**Tabelle 24** Zusammenfassung der Korrelationen der Genhäufigkeiten zum erkrankten Kollektiv, zur Rezidivität und zu den Tumormerkmalen Staging und Nodalstatus (N) mit einer Signifikanzgrenze von  $p=0,05$ . Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (ns: nicht-signifikant)

	<i>Karzinom</i>	<i>Rezidivität</i>	<i>Staging (Pearson)</i>	<i>N-Status (Pearson)</i>
<b>GA733.2</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<b>0,009</b>	<b>0,042</b>
<b>Muc-1</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i> (0,099)	<b>0,002</b>	<b>0,039</b>
<b>SPDEF</b>	<i>ns</i> (0,069)	<i>ns</i>	<i>ns</i> (0,057)	<i>ns</i>
<b>MGB-1</b>	<i>ns</i>	<b>0,019</b>	<i>ns</i> (0,063)	<i>ns</i>
<b>GA733.2*Muc-1</b>	<i>ns</i>	<b>0,045</b>	<b>0,001</b>	<b>0,034</b>
<b>einfach positiv</b>	<i>ns</i>	<b>0,023</b>	<b>0,001</b>	<i>ns</i>
<b>zweifach positiv</b>	<i>ns</i> (0,084)	<i>ns</i> (0,080)	<b>0,001</b>	<b>0,016</b>

**Fortsetzung Tabelle 24** Zusammenfassung der Korrelationen der Genhäufigkeiten zu den Tumormerkmalen Fernmetastasierung (M), Differenzierungsgrad (G), immunhistochemischer Her-2/*neu*-Status, Tumormarker Ca15-3 mit einer Signifikanzgrenze von  $p=0,05$ . Einfache Positivität bedeutet positive Genexpression in einem der vier Gene (Ga733.2, Muc-1, SPDEF, MGB-1), zweifache Positivität bedeutet positive Genexpression in mindestens zwei der genannten Gene. (ns: nicht-signifikant)

	<i>M-Status</i>	<i>G-Status</i>	<i>Her-2/neu (IHC)</i>	<i>Ca- 15-3</i>
<b>GA733.2</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i> (0,095)	<b>0,001</b>
<b>Muc-1</b>	<b>0,025</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<b>0,000</b>
<b>SPDEF</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<b>0,000</b>
<b>MGB-1</b>	<b>0,018</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<b>0,001</b>
<b>GA733.2*Muc-1</b>	<b>0,018</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<b>0,000</b>
<b>einfach positiv</b>	<b>0,046</b>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<b>0,000</b>
<b>zweifach positiv</b>	<i>ns</i> (0,063)	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<b>0,000</b>

**Lebenslauf:**

**Name, Vorname:** Dogan, Burak  
**geboren am:** 04.06.1980 **in:** Köln  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch  
**Sprachkenntnisse:** Deutsch, Englisch, Türkisch, Französisch

**Schullaufbahn:**

**1986 – 1991** Astrid-Lindgren Grundschule und Dietrich-Bonhoeffer Gymnasium,  
Ratingen  
**1991 – 1994** Antalya College, Antalya Türkei  
**1994 – 1999** Fabritianum Gymnasium, Krefeld  
**05/1999** Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

**Studium:**

**10/1999 – 10/2006** Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität,  
Düsseldorf  
**03/2001** ärztliche Vorprüfung (Note „3“)  
**03/2003** erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note „3“)  
**09/2005** zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note „2“)  
**09/2006** dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

**Famulaturen und Praktika:**

**07/1999 – 08/1999** Pflegedienstpraktikum an der Klinik für Herz-Thorax Chirurgie,  
Universitätsklinikum Cerrahpasa, Istanbul, Türkei  
**08/2003 – 10/2003** Famulatur in der Abteilung für Radiologie, Brigham And Women's  
Hospital, akademisches Lehrkrankenhaus der Harvard University  
Boston MA, USA

- 02/2004 – 04/2004** Famulatur in der Tagesklinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum  
Düsseldorf
- 09/2004** Famulatur in der Klinik für Allgemeine Chirurgie des St. Luke's  
Hospital, Malta
- 10/2005 – 09/2006** Praktisches Jahr, Evangelisches Krankenhaus, Mülheim a. d. Ruhr,  
akademisches Lehrkrankenhaus der Heinrich – Heine – Universität,  
Düsseldorf
- 10/2005 – 01/2006** 1. Terial an den Kliniken für Gefäßchirurgie, Allgemeine,  
Viszeralchirurgie und Unfallchirurgie
- 02/2006 – 05/2006** 2. Terial an der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
- 06/2006 – 09/2006** 3. Terial an der Klinik für Gynäkologie

**Beruflicher Werdegang:**

- Seit 11/2006** Assistenzarzt in der Klinik für Allgemeine, Viszeral- und  
Gefäßchirurgie, Marienhospital – Katholische Kliniken Essen-  
Nordwest, Essen

Düsseldorf, den 21.07.2008

---

Burak Dogan

### **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. H. Bojar, Direktor des Instituts für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und das fortwährende Vertrauen welches er mir bei dem selbstständigen Arbeiten stetig entgegenbrachte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H.-B. Prisack für die langjährige gute Zusammenarbeit, für die freundliche, kompetente und jederzeit motivierte Betreuung und konstruktive Kritik während der Durchführung der Arbeit und für die Durchsicht des Manuskripts.

Dr. G. Röder danke ich für den guten Start in meine praktische Arbeit, für die umfassende und kompetente Einarbeitung in den Laboralltag und das kritische Lesen der Dissertation.

Ich bedanke mich beim Herrn PD Dr. med. E. Bölke und den Mitarbeitern der MNR-Klinik für die freundliche Einarbeitung und Betreuung in der Tagesklinik der Strahlenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf sowie bei den untersuchten Patientinnen und den gesunden Probanden, die mit ihrer Einwilligung zur Verwendung ihrer Blutproben für die Forschung diese Arbeit ermöglichten.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Arbeitsgruppen-Mitgliedern und Angehörigen des Instituts für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die freundliche Zusammenarbeit und vielen Hilfestellungen im besonderen Maße bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und Aytan Palu, die mir mit Rücksichtnahme und Verständnis bei der Verwirklichung dieser Arbeit zur Seite standen.

**ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, Burak Dogan, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen angefertigt habe.

Ich erkläre, dass nur ein Antrag eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist. Die Dissertation wurde an keiner Universität oder Hochschule vorgelegt. Die Ergebnisse wurden bis zum Zeitpunkt des Einreichens nicht publiziert. Es wurde bisher kein weiteres Promotionsverfahren eröffnet.

Düsseldorf, den 21.07.2008

---

Burak Dogan