

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

Zytogenetische Veränderungen bei zirkulierenden  
Tumorzellen aus Leukapheresepräparaten von  
Mammakarzinompatientinnen

Dissertation

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

vorgelegt von

Norma Anna Margareta Schmitz-Conti geb. Schmitz

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Fischer JC, Niederacher D, Topp SA, Honisch E, Schumacher S, Schmitz N, Zacarias Föhrding L, Vay C, Hoffmann I, Kasprowicz NS, Hepp PG, Mohrmann S, Nitz U, Stresemann A, Krahn T, Henze T, Griebisch E, Raba K, Rox JM, Wenzel F, Sproll C, Janni W, Fehm T, Klein CA, Knoefel WT, Stoecklein NH (2013). “Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (41): 16580–16585.

## Zusammenfassung

Trotz frühzeitiger Diagnose und operativer sowie systemischer Therapie des Primärkarzinoms versterben viele Tumorpatienten aufgrund von Metastasen, welche sich oft erst nach langer Latenzzeit manifestieren. Eine Ursache hierfür ist die minimale residuelle Tumorerkrankung (MRD), die sich über disseminierte Tumorzellen in Knochenmark und Lymphknoten (DTC) sowie als zirkulierende Tumorzellen im Blut (CTC) nachweisen lassen. Im Rahmen einer Studie der westdeutschen Studiengruppe zur stammzellgestützten Hochdosis-Chemotherapie wurden Leukapherese-Präparate von Patientinnen mit einem nicht-metastasierten Mammakarzinom vor und nach Induktions-Chemotherapie gewonnen, wobei die Leukapherese-Produkte teilweise für Forschungszwecke kryokonserviert wurden. Für diese Arbeit ergab sich nun die Möglichkeit, einen kleinen Teil dieser Leukapherese-Produkte auf Cytokeratin-positive Zellen (CK-positiven Zellen) zu untersuchen. Um diese CK-positiven Zellen weiter zu charakterisieren, wurden diese in der vorliegenden Arbeit mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese Zellen tumortypische Aberrationsmuster aufweisen und es sich somit um CTCs handelt. Durch den Nachweis von CTCs bei Patienten ohne eine Fernmetastasierung (M0) wird belegt, dass es bereits in frühen Tumorstadien zu einer Tumorzell-Dissemination kommen kann. Darüber hinaus wiesen CTCs, die nach der Induktions-Chemotherapie gewonnen wurden, eine signifikant höhere Anzahl an Aberrationen auf als solche, die vor Induktions-Chemotherapie isoliert worden waren. Insgesamt zeigten die untersuchten CTCs als Ausdruck ihrer genetischen Instabilität das für maligne Zellen solider Tumoren typische, sehr heterogene Aberrationsmuster. Aufgrund der nachgewiesenen Persistenz von zirkulierenden Tumorzellen mit erheblichen genomischen Aberrationen, auch nach einer Induktions-Chemotherapie, bedarf es der umfassenderen Untersuchung insbesondere dieser CTCs, um molekulare Zielstrukturen für eine gezieltere und effektivere adjuvante Therapie des Mammakarzinoms identifizieren zu können, wobei sich mit der auf Leukapherese-Präparate übertragenen Methode der Tumor-Einzelzellisolation nun CTCs in eine hinreichend hohen Zahl für die dazu erforderlichen hochauflösenden Analysen gewinnen lassen.

## Conclusion

Despite early diagnosis and surgical and systemic therapy of primary carcinoma, many tumor patients die as a result of metastases, which often manifest themselves only after a long latency period. One cause for this is the minimal residual tumor disease (MRD), which can be detected by disseminated tumor cells in bone marrow and lymph nodes (DTC) as well as in circulating tumor cells in the blood (CTC). A study by the West German study group on stem cell-assisted high-dose chemotherapy has identified leukapheresis preparations from patients with non-metastatic breast cancer before and after induction chemotherapy, whereby the leukapheresis products were partially cryopreserved for research purposes. For this work, it was now possible to study a small proportion of these leukapheresis products for cytokeratin-positive cells (CK-positive cells). To further characterize these CK-positive cells, they were analyzed in the present work by comparative genomic hybridization (CGH). It could be shown that these cells have tumor-specific aberration patterns and are therefore CTCs. The demonstration of CTCs in patients without distant metastases (M0) shows that tumor cell dissemination can occur already at early tumor stages. In addition, CTCs obtained after induction chemotherapy had a significantly higher number of aberrations than those isolated prior to induction chemotherapy. Overall, the examined CTCs, as an expression of their genetic instability, showed the very heterogeneous aberration patterns typical of malignant cells of solid tumors. Due to the proven persistence of circulating tumor cells with significant genomic aberrations, even after induction chemotherapy, more extensive investigation, of these CTCs in particular, is needed to identify molecular targets structures for a more targeted and effective adjuvant therapy of breast cancer, with a focus on leukapheresis preparations transferred method of tumor single cell isolation now let CTCs in a sufficiently high number for the required high-resolution analysis win.

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromol
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>aCGH</b>	<i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>
<b>ADH</b>	atypische duktale Hyperplasie
<b>ALS</b>	atypische lobuläre Hyperplasie
<b>BAC</b>	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
<b>BET</b>	brusterhaltende Therapie
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C</b>	Celsius
<b>ca.</b>	circa
<b>CCD</b>	<i>Charge Coupled Device</i>
<b>CGH</b>	<i>Comparative Genomic Hybridization:</i> vergleichende genomische Hybridisierung
<b>CIN</b>	chromosomale Instabilität: <i>Chromosomal</i> <i>Instability In Neoplasia</i>
<b>cm<sup>2</sup></b>	Quadratzentimeter
<b>CK</b>	Zytokeratin
<b>CNV</b>	<i>Copy Number Variation:</i> Kopienzahlvarianten:
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>CTC</b>	zirkulierende Tumorzelle
<b>CTX</b>	Chemotherapie
<b>Cot</b>	<b>C<sub>0</sub></b> (initiale DNA Konzentration), t [sec] (Zeit, gemessen in Sekunden)
<b>Cy3.5</b>	Cyanin 3.5
<b>DAPI</b>	4', 6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid

---

<b>DCIS</b>	duktales Carcinoma in situ
<b>Dig</b>	Digoxigenin
<b>DLA</b>	diagnostische Leukapherese
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>dNTP</b>	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
<b>DOP-PCR</b>	<i>Degenerate Oligonucleotide-Primed Polymerase Chain Reaction</i>
<b>DTC</b>	disseminierte Tumorzelle
<b>dUTP</b>	2'-Deoxyuridin-5'-triphosphat
<b>EAT</b>	erweiterte adjuvante Therapie
<b>EDV</b>	elektronische Datenverarbeitung
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum
<b>FISH</b>	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>g</b>	Beschleunigung
<b>G</b>	Grading
<b>G-CSF</b>	Humaner Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasserstoffoxid
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HDC</b>	Hochdosis-Chemotherapie
<b>HER2</b>	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
<b>IDC</b>	invasive duktales Karzinom
<b>ILC</b>	invasive lobuläre Karzinom
<b>KCL</b>	Kaliumchlorid

---

<b>Ki67</b>	Proliferationsmarker Ki67
<b>LCIS</b>	lobuläres Carcinoma <i>in situ</i>
<b>LOH</b>	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimol
<b>Mse</b>	Micrococcus species
<b>NaAc</b>	Natriumacetat
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pg</b>	Picogramm
<b>pH</b>	pondus Hydrogenii
<b>QFISH</b>	Quantitative Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
<b>R</b>	Residualtumor-Klassifikation
<b>RKI</b>	Robert-Koch-Institut
<b>rpm</b>	<i>Revolutions Per Minute</i>
<b>sec</b>	Sekunde
<b>SSC</b>	Saline-Sodium Citrat
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>Taq</b>	Thermus aquaticus
<b>TDLE</b>	terminale duktulolobuläre Einheit

**UICC** *Union Internationale Contre Le Cancer*

**WGA** *Whole Genome Amplification*

**WGS** Westdeutsche Studiengruppe

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	DAS MAMMAKARZINOM.....	1
1.1.1	<i>Tumoren der Mamma: Gutartige Neubildungen.....</i>	1
1.1.2	<i>Tumoren der Mamma: Nicht-invasive Mammakarzinome.....</i>	2
1.1.3	<i>Tumoren der Mamma: Invasive Mammakarzinome.....</i>	2
1.1.4	<i>Klassifikation und Prognose.....</i>	3
1.1.5	<i>Therapie.....</i>	7
1.2	HOCHDOSIS-CHEMOTHERAPIE.....	9
1.3	MINIMALE RESTERKRANKUNG UND ZIRKULIERENDE TUMORZELLE.....	12
1.4	CTCs IM RAHMEN DES THERAPIEMONITORINGS UND ALS THERAPEUTISCHE ZIELSTRUKTUR ...	15
1.5	LEUKAPHERESE ALS DETEKTIONSVERFAHREN FÜR CTCs.....	16
1.6	VERGLEICHENDE GENOMISCHE HYBRIDISIERUNG AUF EINZELZELLEBENE: EINSATZ, VORTEILE, NACHTEILE, METHODE.....	17
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
2.1	PATIENTINNENKOLLEKTIV.....	21
2.2	METHODEN.....	22
2.2.1	<i>Herkunft der Amplifikationsprodukte der Cytokeratin-positiven Zellen aus historischen Leukapherese-Produkten.....</i>	23
2.2.2	<i>Zuordnung der CTCs zu den Patientinnen.....</i>	23
2.2.3	<i>Lymphozytenkulturen zur Herstellung von Metaphasen-Chromosomen.....</i>	25
2.2.4	<i>Präparation von Metaphasen-Chromosomen.....</i>	25
2.2.5	<i>Markierungs-PCR.....</i>	25
2.2.6	<i>Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH).....</i>	26
2.3	STATISTISCHE BERECHNUNGEN.....	29
2.4	CHEMIKALIEN, ENZYME, ANTIKÖRPER, GERÄTE, MATERIAL, OLIGONUKLEOTIDE UND PRIMER, PUFFER, LÖSUNGEN UND MIXE, VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	30
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>33</b>
3.1	GENOMISCHE CHARAKTERISIERUNG ZIRKULIERENDER TUMORZELLEN.....	33
3.1.1	<i>CGH-Aberrationen vor und nach Induktions-Chemotherapie.....</i>	35
3.1.2	<i>Einfluss der Induktions-CTX auf die genetischen Aberrationen.....</i>	38
3.1.3	<i>Klassifizierung der CTCs mit CGH-Veränderungen vor und nach Induktions-CTX.....</i>	38
3.1.4	<i>Klassifizierung der CGH-Veränderungen auf den Chromosomen.....</i>	40
3.2	KORRELATION ZWISCHEN GENOMISCHEN ABERRATIONEN DER CTCs UND DEM AUFTRETEN EINES TUMORREZIDIVS UND DEM GESAMTÜBERLEBEN.....	44
<b>4</b>	<b>DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>47</b>
4.1	IDENTIFIZIERUNG CK-POSITIVER ZELLEN ALS MALIGNEN TUMORZELLEN BEI M0-PATIENTINNEN 49	
4.2	PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER CTCs IN DER METASTASIIERTEN UND NICHT METASTASIIERTEN SITUATION.....	52
4.3	KONSEQUENZEN DER IDENTIFIKATION VON CTCs IN M0-PATIENTINNEN FÜR DIE AUTOLOGE STAMMZELLTRANSPLANTATION.....	53
4.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	55
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>57</b>

**6 DANKSAGUNG ..... 65**

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

In Deutschland ist Brustkrebs mit einer Inzidenz von 69.630 die am meisten vorkommende Krebserkrankung der Frau und für ca. 29,5% aller weiblichen Krebsneuerkrankungen verantwortlich (Robert-Koch-Institut 2015/2016). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren, die relativen 5-Jahres-Überlebensraten über alle Stadien betrachtet liegen bei ca. 79%. 2015 betrug die Anzahl der Krebssterbefälle für das Mammakarzinom in Deutschland 18.136, was 23,4% aller Krebssterbefälle bei Frauen ausmacht (Robert-Koch-Institut 2015/2016) und somit die häufigste krebsbedingte Todesursache der Frauen ist. Gleichwohl die Inzidenz seit 1970 zunimmt, nimmt die Mortalität seit Mitte der 1990er Jahre ab. Gründe hierfür sind, dass durch die mittlerweile flächendeckenden Diagnostik Mammakarzinome früh erkannt werden können und eine neoadjuvante und adjuvante Therapie umgehend begonnen werden kann (Engel *et al.* 2007).

### 1.1.1 Tumoren der Mamma: Gutartige Neubildungen

Es wird zwischen gut- und bösartigen Brustveränderungen unterschieden. Zu den gutartigen Veränderungen zählen unter anderem die Mastopathie und Fibroadenome. Bei der Mastopathie kommt es auf Grund von hormonaler Dysregulation zu Umbaureaktionen der mesenchymalen und epithelialen Mammastrukturen (Riede *et al.* 2004). Dies führt zu Gangektasien mit Zystenbildung, Fibrosierung des Drüsenkörpers sowie zu Proliferationen der terminalen duktulo-lobulären Einheiten (TDLE = Übergang von ca. 10 bis 20 Lobuli in einem Milchgang) (Riede *et al.* 2004). Das Fibroadenom ist mit ca. 75% der häufigste gutartige Tumor der Brust. Hierbei handelt es sich um einen Misch tumor aus proliferierten, epithelialen und mesenchymalen Anteilen der TDLEs (Riede *et al.* 2004).

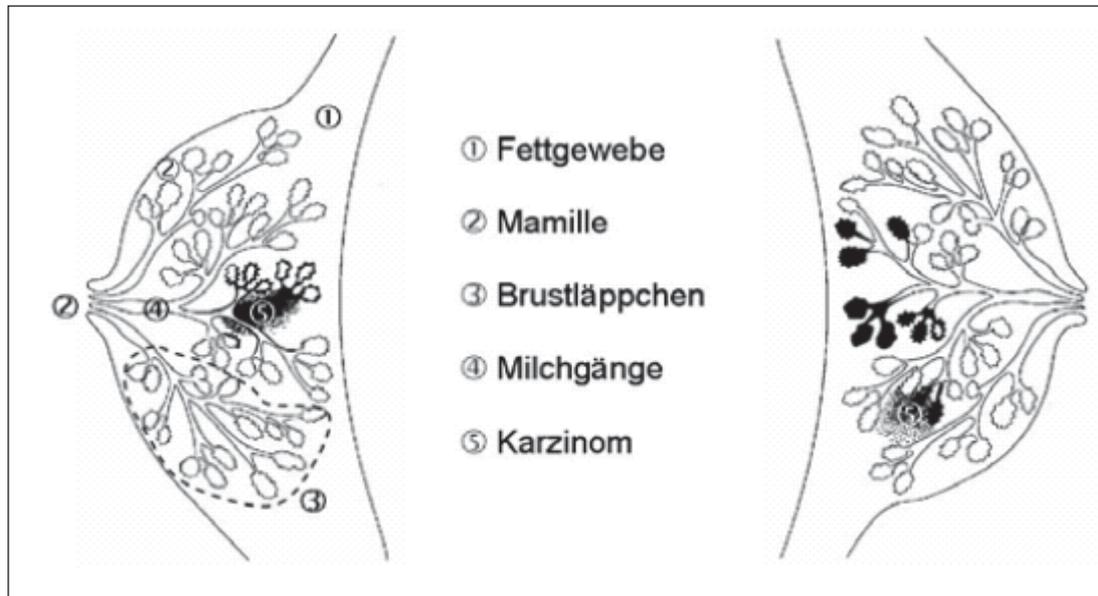
### **1.1.2 Tumoren der Mamma: Nicht-invasive Mammakarzinome**

Die Entstehung des invasiven Mammakarzinoms ist ein komplexer Prozess, dessen Ursprung in den TDLE stattfindet und sich über mehrere Phasen entwickelt, wozu die atypische Hyperplasie sowie das Carcinoma *in situ* zählen (Riede *et al.* 2004). Beim Carcinoma *in situ* unterscheidet man die lobuläre intraepitheliale Neoplasie vom duktalem Carcinoma *in situ* (DCIS) (Edler von Koch *et al.* 2007). Die lobuläre intraepitheliale Neoplasie geht von Zellen der TDLE aus, wo es über eine atypische lobuläre Hyperplasie (ALS) zu einer neoplastischen Proliferation innerhalb des Drüsenläppchens kommt (Nährig *et al.* 2007). Histologisch werden die Azini von kleinen isomorphen, locker kohäsiven Zellen ausgefüllt; eine intakte Basalmembran grenzt das Carzinoma *in situ* von den invasiven Tumortypen ab. Auch das DCIS entwickelt sich aus den TDLE, wo es über eine atypische duktales Hyperplasie (ADH) zum DCIS führt, das sich im Milchgangsystem ausbreitet, ohne die Basalmembran zu durchbrechen (Nährig *et al.* 2007). Das Risiko, an einem invasiven Mammakarzinom zu erkranken, liegt bei der lobulären intraepithelialen Neoplasie bei bis zu 35% und bei dem unbehandelten DCIS bei 30% bis 50% (Nährig *et al.* 2007).

### **1.1.3 Tumoren der Mamma: Invasive Mammakarzinome**

Im Gegensatz zu dem Carcinoma *in situ* hat das invasive Karzinom die Basalmembran durchbrochen und wächst infiltrativ in das umliegende Gewebe ein (Nährig *et al.* 2007). Auch hier unterscheidet man je nach Ursprungsort mehrere Typen. Unter anderem wird zwischen dem invasiven lobulären Karzinom (ILC), welches ca. 5 bis 15% der invasiv wachsenden Mammakarzinome ausmacht, und dem invasiven duktalem Karzinom (IDC) unterschieden, welches mit ca. 75% vertreten ist (Nährig *et al.* 2007). Dargestellt sind diese in Abbildung 1. Histologisch zeigt das IDC oft eine ausgeprägte Kernpolymorphie und weist insgesamt einen höheren Malignitätsgrad auf (Riede *et al.* 2004). Zu den IDCs zählen des Weiteren das tubuläre, papilläre, muzinöse und medulläre Karzinom, welche jeweils selten auftreten, sich durch besondere Differenzierungsformen auszeichnen, langsam wachsen und somit eine bessere Prognose haben (Riede *et al.* 2004). Das ILC zeichnet sich histologisch als relativ kleinzelliges Karzinom mit geringem Zusammenhalt der Epithelkomplexe aus sowie durch das sogenannte Gänsemarschmuster und das Schießscheibenmuster (Riede *et al.* 2004). Bei dem Gänsemarschmuster handelt es sich

um einreihige Tumorzellstränge, welche von Stroma umgeben sind. Bei dem Schießscheibenmuster umgeben einzelne Tumorzellen normale Milchgänge (Riede *et al.* 2004).



**Abb. 1: Lokalisation der Mammakarzinome**

Links wird das invasiv duktales Mammakarzinom, rechts das invasiv lobuläre Mammakarzinom dargestellt (Abbildung aus Wendt 2004 entnommen).

### 1.1.4 Klassifikation und Prognose

Zur Festlegung einer Behandlungsstrategie des Mammakarzinoms und um eine Einschätzung der Prognose abgeben zu können, bedient man sich unterschiedlicher Kriterien. Die Einteilung der Mammakarzinome erfolgt mittels TNM-Klassifikation der UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*), welche folgende Faktoren berücksichtigt: Die Größe des Primärtumors (T), die Anzahl der betroffenen Lymphknoten (N) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) (Nährig *et al.* 2007). Postoperativ wird das Präfix „p“ hinzugefügt, die TNM-Klassifikation nach neoadjuvanter Chemotherapie wird mit dem Präfix y(p) und Tumorrezidive werden mit dem Präfix r(p) bezeichnet (Tabelle 1) (Nährig *et al.* 2007). Außerdem muss bei der pTNM-Klassifikation die Residualtumor-Klassifikation (R) berücksichtigt werden (Tabelle 2) (Mayr *et al.* 2011).

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach UICC (Tabelle entnommen aus Nährig *et al.* 2007)**

<b>pT: Ausdehnung des Primärtumors</b>
pT0 kein nachweisbarer Primärtumor
pTX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pTis Carcinoma <i>in situ</i>
pTis (DCIS) duktales Carcinoma <i>in situ</i>
pTis (LCIS) lobuläres Carcinoma <i>in situ</i>
pTis (Paget) Paget-Erkrankung der Brustwarze ohne nachweisbaren Tumor
pT1 Tumor kleiner als 2 cm
pT1mic Mikroinvasion von 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1a mehr als 0,1 cm, nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung
pT1b mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung
pT1c mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
pT2 Tumor zwischen 2 bis 5cm
pT3 Tumor größer als 5 cm
pT4 Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut
pT4a mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b mit Ödem (einschließlich Apfelsinenhaut), Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT4c Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
<b>pN: Regionale Lymphknotenmetastasen</b>
pN0 Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
pNX regionale Lymphknotenstatus können nicht beurteilt werden
pNmi Mikrometastasen (maximal 2 mm)
pN1 Metastasen in 1 bis 3 beweglichen axillären Lymphknoten derselben Seite
pN1a Metastasen in 1 bis 3 axillären Lymphknoten, zumindest eine größer 2mm
pN1b Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden
pN1c Metastasen in 1 bis 3 axillären Lymphknoten und Lymphknoten der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden
pN2 Metastasen in 4 bis 9 axillären Lymphknoten derselben Seite
pN2a Metastasen in 4 bis 9 axillären Lymphknoten derselben Seite, zumindest eine größer 2 mm
pN2b Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten der A. mammaria interna derselben Seite ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3 Metastasen in 10 und mehr axillären Lymphknoten derselben Seite, oder in infraklavikulären Lymphknoten derselben Seite, oder entlang der A. mammaria interna
pN3a Metastasen in 10 und mehr axillären Lymphknoten derselben Seite, zumindest eine größer 2mm, oder in infraklavikulären Lymphknoten
pN3b Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase
pN3c Metastasen in supraklavikulären Lymphknoten
<b>pM: Fernmetastasen</b>
pM0 keine Fernmetastasen
pMX Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht bestimmt werden

pMi isolierte Tumorzellen in Knochenmark oder parenchymatösen Geweben
pM1 Fernmetastasen vorhanden

Größe des Primärtumors (T), der Anzahl der betroffenen Lymphknoten (N) und Vorhandensein von Fernmetastasen (M). p = postoperativ (Nährig *et al.* 2007)

**Tabelle 2: Residual-Tumorklassifikation (R) (Mayr et al. 2011)**

R	Kriterien
R0	keine makro- oder mikroskopischen Tumoranteile am Resektionsrand nachweisbar
R1	mikroskopische Tumoranteile am Resektionsrand nachweisbar
R2	makroskopische Tumoranteile am Resektionsrand nachweisbar

Im Rahmen der histopathologischen Begutachtung wird die Differenzierung des Mammakarzinoms untersucht. Unter Berücksichtigung der Anzahl der Mitosen und der Zellkernform des Tumors erfolgt das Grading nach Elston und Ellis (G1 bis G3) (Nährig *et al.* 2007). Gut differenzierte Tumoren zeigen weitgehend unauffällige Zellkerne und entsprechen einem Grading der Stufe G1, bei Kernpolymorphien und hohen Mitoseraten sind die Tumoren schlecht differenziert und entsprechen einem Grading der Stufe G3. G2-Tumoren sind Übergangsformen und weder G1 noch G3 zuzuordnen (Nährig *et al.* 2007). Ebenso kann das Nukleoprotein Ki67 als Proliferationsmarker komplementär zum Grading bestimmt werden.

Zur Auswahl zielgerichteter Therapien werden ergänzend molekulare Marker untersucht und je nach Merkmal in verschiedene Subtypen eingeteilt: Luminal A-Typ, Luminal B-Typ, HER-2-Typ und der Basal-Zell-Typ. Berücksichtigt werden dazu der Östrogenrezeptorstatus (ER-Status), der Progesteronrezeptorstatus (PR-Status), der HER-2-Status und Ki67. Die Einteilung erfolgt in intrinsische Subtypen (Tabelle 3) (Alizart *et al.* 2012).

**Tabelle 3: Definitionen der intrinsischen Subtypen (Tabelle entnommen aus Goldhirsch *et al.* 2013)**

intrinsischer Subtyp	klinisch-pathologische Definition
<b>Luminal A-Typ</b>	<b>Luminal A</b> ER und/oder PR positiv HER-2 negativ Ki-67 niedrig (<14%)
<b>Luminal B-Typ</b>	<b>Luminal B (HER-2 negativ)</b> ER und/oder PR positiv HER-2 negativ Ki-67 hoch <b>Luminal B (HER-2 positiv)</b> ER und oder PR positiv HER-2 überexprimiert oder amplifiziert jedes Ki-67
<b>HER-2-Typ</b>	HER-2 positiv (non luminal) HER-2 überexprimiert oder amplifiziert ER und PR negativ
<b>Basal-Zell-Typ</b>	<i>Triple</i> -negativ-Typ (ductal) ER und PR negativ HER-2 negativ

Je nach Tumorstadium kann eine Prognose über das relative 10-Jahres-Überleben abgegeben werden und wird unter Berücksichtigung des Gradings wie folgt angegeben (Engel *et al.* 2007): G1-Tumoren 96,1%, G2-Tumoren 78,0% und G3-Tumoren 58,7%. Für die pT-Klassifikation ist das relative 10-Jahres-Überleben wie folgt (Engel *et al.* 2007): pT1 81,2%, pT1a 95,2%, pT1b 95,6%, pT1c 85,7%, pT2 65,6%, pT3 42,9%, pT4 27,5%. Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor ist die Zahl der positiven Lymphknoten. Liegt das 10-Jahres-Überleben bei negativem Lymphknotenstatus noch bei 90,3%, so erreicht es bei zehn und mehr befallenen Lymphknoten 30,7% (Engel *et al.* 2007). Liegt eine Fernmetastasierung vor, so sinkt das 10-Jahres-Überleben weiter. Das Mammakarzinom metastasiert vorzugweise in Knochen, Leber sowie Lunge (Nährig *et al.* 2007).

### 1.1.5 Therapie

Bei der operativen Therapie des Mammakarzinoms unterscheidet man zwischen einer brusterhaltenden Therapie (BET) und der Mastektomie (Funke *et al.* 2007). Die Indikationen zur jeweiligen Operation sind abhängig von der Tumorgöße, da eine komplette Tumorentfernung angestrebt werden sollte und je nach Größe des Tumors nicht

immer genügend gesundes Brustgewebe verbleibt. Unter Berücksichtigung dieser Indikationen ist eine BET bei etwa 70% der Patientinnen möglich (Funke *et al.* 2007). Während des operativen Eingriffs werden simultan Lymphknoten axillär und/oder der Wächter-Lymphknoten für weitere diagnostische Maßnahmen entfernt (Schaffer *et al.* 2007). Eine postoperative Bestrahlung des Restparenchyms der Brust zur Vorbeugung von Lokalrezidiven schließt sich dem operativen Eingriff an (Schaffer *et al.* 2007). Um bei inflammatorischen und lokal weit fortgeschrittenen Mammakarzinomen eine möglichst vollständige operative Tumorentfernung zu erreichen, erfolgt vor dem Eingriff eine neoadjuvante Therapie (Schaffer *et al.* 2007). Je nach molekularem Status des Mammakarzinoms (ER-Status, PR-Status, HER-2-Status, *Triple-negative* Tumoren) wird die Therapie entsprechend angepasst (Schaffer *et al.* 2007).

Für jede Frau mit einem primären, nicht metastasierten, invasiven Mammakarzinom besteht die Indikation einer adjuvanten systemischen Therapie. Diese Therapie soll Rezidiven und einer Metastasenausbreitung vorbeugen und setzt sich aus einer Hormon- und/oder einer Chemotherapie zusammen (Goldhirsch *et al.* 2013). Welche Therapie gewählt wird, hängt von der Tumorklassifikation und dem molekularen Status ab. Aus Tabelle 4 gehen die Therapieoptionen anhand der intrinsischen Subtypen hervor (Goldhirsch *et al.* 2013). Während beim Luminal A-Typ eine alleinige endokrine Therapie indiziert ist, ist beim Luminal B-Typ eine simultane endokrine- und Chemotherapie und bei HER-2 positiven Patientinnen darüber hinaus eine Anti-HER-2-Therapie sinnvoll (Coates *et al.* 2015). Beim Basal-Zell-Typen wird eine anthrazyklin- und taxanhaltige Chemotherapie empfohlen (Coates *et al.* 2015).

**Tabelle 4: Therapieoptionen nach intrinsischen Subtypen (Tabelle entnommen aus Goldhirsch *et al.* 2013)**

<b>intrinsischer Subtyp</b>	<b>klinisch-pathologische Definition</b>	<b>Therapie</b>
<b>Luminal A-Typ</b>	<b>Luminal A</b> ER und/oder PR positiv HER-2 negativ Ki-67 niedrig (<14%)	Endokrine Therapie
<b>Luminal B-Typ</b>	<b>Luminal B (HER-2 negativ)</b> ER und/oder PR positiv HER-2 negativ Ki-67 hoch  <b>Luminal B (HER2 positiv)</b> ER und oder PR positiv HER-2 überexprimiert oder amplifiziert jedes Ki-67	<b>Luminal B (HER-2 negativ)</b> Endokrine Therapie für alle Patienten, CTX viele  <b>Luminal B (HER-2 positiv)</b> Endokrine Therapie, CTX und Anti-HER-2-Therapie
<b>HER-2-Typ</b>	HER-2 positiv (non luminal) HER-2 überexprimiert oder amplifiziert ER und PR negativ	CTX und Anti-HER-2-Therapie
<b>Basal-Zell-Typ</b>	<i>Triple</i> -negativ-Typ (ductal) ER und PR negativ HER-2 negativ	anthrazyklin- und taxanhaltige CTX

## 1.2 Hochdosis-Chemotherapie

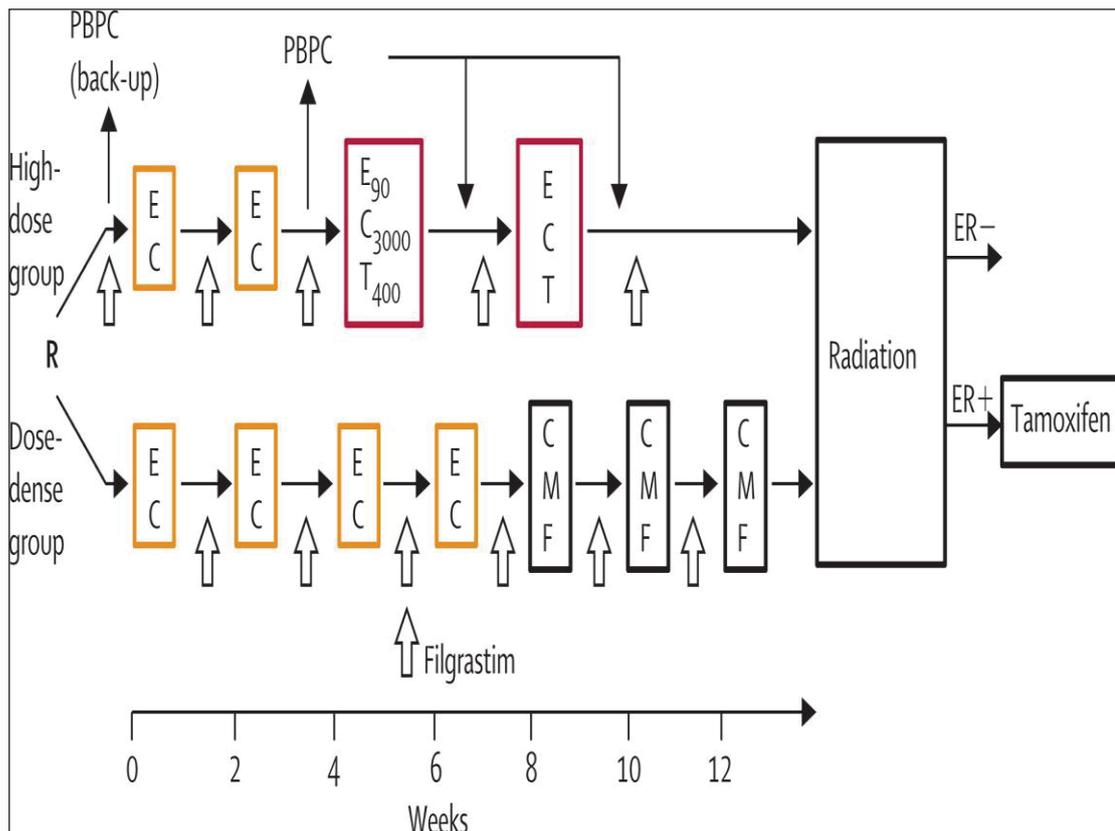
Um das Langzeitüberleben von Brustkrebspatientinnen zu erhöhen, wurde in den 1980er/90er Jahren aufgrund der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Zytostatika und Karzinomen der Fokus auf aggressivere Therapien gesetzt und als Hochdosis-Chemotherapie umgesetzt (Frei *et al.* 1980). Diese führte neben der erwünschten Tumorreduktion zu einer prolongierten Knochenmarkssuppression, wodurch, geschuldet der induzierten Leukopenie, unter anderem die Infektionsrate stieg. Um der Knochenmarkssuppression entgegen zu wirken, wurden autologe Stammzellen im Rahmen der Hochdosis-Chemotherapie transplantiert (Berry *et al.* 2011.). Berry *et al.* zeigten in einer Metaanalyse, in welcher 6.210 Patientinnen mit einem lymphogen metastasierten Mammakarzinom eingeschlossen wurden, dass durch die Hochdosis-Chemotherapie zwar das Rezidivrisiko signifikant um 13 % gesenkt werden konnte, das 6-Jahres-Gesamtüberleben jedoch nicht signifikant verlängert wurde. Patientinnen, welche nach Hochdosis-Chemotherapie ein Rezidiv erlitten, zeigten ein kürzeres Überleben, was darauf hinwies, dass diese Patientinnen eine erhöhte Therapieresistenz

entwickelten (Borges *et al.* 2011). Somit wurde insgesamt kein Vorteil durch diese Therapie erzielt.

Vor allem wurde darüber hinaus beobachtet, dass nach Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation das Rezidivrisiko signifikant höher war als nach allogener Stammzelltransplantation. Dies wurde als indirekter Hinweis gewertet, dass mit einer autologen Stammzelltransplantation auch Tumorzellen reinfundiert wurden (Shimoni *et al.* 2002). Unterstützt wird diese These durch die Arbeiten von Ross *et al.*, dessen Arbeitsgruppe bereits 1993 zeigte, dass aus Tumorzellen mit Stammzellpotential vollständige Tumoren entstehen können.

Patientinnen, die bei Diagnosestellung einen axillären Lymphknotenbefall aufwiesen, hatten auch nach adjuvanter Therapie ein erhöhtes Risiko Fernmetastasen zu entwickeln (Nitz *et al.* 2005). Bei neun und mehr befallenen Lymphknoten ergab sich eine schlechte Prognose, da sich das Risiko der Dissemination proportional zum Grad des Lymphknotenbefalls ergab (Nitz *et al.* 2005). Die westdeutsche Studiengruppe (WSG) führte eine Studie zur stammzellgestützten Hochdosis-Chemotherapie bei Patientinnen mit neun und mehr befallenen Lymphknoten ohne Fernmetastasierung durch (Nitz *et al.* 2005). Stammzellgestützte Hochdosis-Chemotherapie bedeutet, dass nach Zerstörung des Knochenmarks durch die Chemotherapie und damit aller benignen wie malignen Zellen, Stammzellen reinfundiert wurden, damit diese sich erneut im Knochenmark niederlassen und die Hämatopoese einsetzt (Nitz *et al.* 2005).

Für die Studie zur stammzellgestützten Hochdosis-Chemotherapie wurden 403 Patientinnen randomisiert, 202 in einem Standard- und 201 in einem Hochdosisarm (Abbildung 2). Im Durchschnitt betrug das Alter der randomisierten Patientinnen 47 Jahre. Es waren durchschnittlich 17,6 axilläre Lymphknoten befallen und im Mittel wiesen die in der Studie eingeschlossenen Patientinnen einen Tumordurchmesser von 3,5 cm auf (Nitz *et al.* 2005).



**Abb. 2: Darstellung des Therapieablaufs des Hochdosis- und Kontrollarms**

PBPC = *peripheral blood progenitor cells*; E = Epirubicin; C = Cyclophosphamid; T = Thiotepa; M = Methotrexat; F = Fluorouracil; ER = Östrogenrezeptor. (Abbildung aus Nitz *et al.* 2005 entnommen). Die peripheren Blutstammzellen wurden vor und nach Induktions-Chemotherapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid gewonnen.

Die Patientinnen des Hochdosisarms erhielten zunächst zwei Zyklen Epirubicin (90 mg/m<sup>2</sup>) und Cyclophosphamid (600 mg/m<sup>2</sup>) im Abstand von zwei Wochen mit Wachstumsfaktorsupport vom 2. bis 12. Tag (Filgrastim 5 µg/kg Körpergewicht: G-CSF, zur Behandlung von Neutropenien). Durch die Intervallverkürzung von drei auf zwei Wochen konnte eine Intensitätserhöhung der Dosis um den Faktor 1,5 erzielt werden (Nitz *et al.* 2005).

Vier Wochen nach Beginn der Chemotherapie erhielten die Patientinnen ihren ersten Zyklus der Hochdosis-Chemotherapie mit 90 mg/m<sup>2</sup> Epirubicin, 1000 mg/m<sup>2</sup> Cyclophosphamid und 133 mg/m<sup>2</sup> Thiotepa mit Stammzellensupport, welche nach drei Wochen wiederholt wurde. Filgrastim wurde ab dem zweiten Tag der Hochdosis-Therapie weitergegeben. Die peripheren Stammzellen wurden mittels Leukapherese sowohl vor Beginn der Chemotherapie, als auch nach den ersten beiden Zyklen Epirubicin/Cyclophosphamid und somit vor dem ersten Zyklus

Epirubicin/Cyclophosphamid/Thiotepa gewonnen. Die Stammzellprodukte wurden nach den Hochdosiszyklen reinfundiert.

Patientinnen des Standardarms erhielten vier Zyklen Epirubicin (90 mg/m<sup>2</sup>) und Cyclophosphamid (600mg/m<sup>2</sup>), gefolgt von drei Zyklen Cyclophosphamid (600 mg/m<sup>2</sup>), Methotrexat (40 mg/m<sup>2</sup>), Fluoruracil (600 mg/m<sup>2</sup>) und Mesna im Abstand von zwei Wochen inklusive Wachstumsfaktorsupport (Filgrastim 5 µg/kg Körpergewicht von Tag 5 bis 12) (Nitz *et al.* 2005).

Vier Wochen nach der Chemotherapie erhielten alle Patientinnen eine Radiotherapie im Bereich von Thoraxwand, Brust sowie supra- und infraklavikulär. Patientinnen mit einem positiven Hormonrezeptorstatus wurden ergänzend mit Tamoxifen behandelt. Die rezidivfreien Überlebensraten lagen für den Hochdosis-Chemotherapie-Arm nach vier Jahren bei 60%, für den Standardarm bei 44%. Die Überlebensraten nach vier Jahren betrugen 75% für den Hochdosis-Chemotherapie-Arm und 70% für den Standardarm. Es konnte mit der Studie belegt werden, dass mit der Hochdosis-Chemotherapie das rezidivfreie Überlebensraten zunimmt (Nitz *et al.* 2005).

### 1.3 Minimale Resterkrankung und zirkulierende Tumorzelle

Trotz frühzeitiger Diagnose und operativer Therapie des Primärkarzinoms, ggf. kombiniert mit einer systemischen Therapie, versterben viele Patienten aufgrund von Metastasen, welche sich oft erst nach langer Latenzzeit manifestieren (Weinberg 2007). Bei etwa 30% der Mamma-, Prostata- und Kolonkarzinompatienten können Mikrometastasen in Indikatororganen wie Knochenmark, Lymphknoten oder Blut nach operativer und systemischer Therapie detektiert werden (Weinberg 2007). Bei diesen Patienten spricht man von einer minimalen Resterkrankung (MRD = *minimal residual disease*). Diese wurde bereits 1981 beschrieben (Dearnaley *et al.* 1981), nachdem epitheliale Zellen im Knochenmark bei Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen wurden. Epitheliale Zellen in Knochenmark und Lymphknoten werden als disseminierte Tumorzellen (DTC) bezeichnet (Weinberg 2007). Im Blut werden sie zirkulierende Tumorzellen (CTC) genannt (Weinberg 2007). Beide Populationen sind mit klinisch-konventionellen Methoden nicht nachweisbar. Da sich epitheliale Zellen histogenetisch von mesenchymalen Geweben unterscheiden, ist es möglich, diese mittels molekularer Methoden nachzuweisen. Hierbei ist die Immunzytochemie die am häufigsten verwendete Methode, um isolierte Tumorzellen zu identifizieren. Die Tumorzellen

können mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden, die gegen Epithelzellmarker wie Zytokeratine oder das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) gerichtet sind (Deng *et al.* 2008). Verschiedene Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass das Vorhandensein von DTCs im Knochenmark bei Brustkrebspatientinnen mit einer schlechten Prognose einhergeht (Riethdorf und Pantel 2008). Dies wurde unter anderem in einer Studie an 4.703 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom durch Braun *et al.* gezeigt (2005). Hier fanden sich bei 30% aller Patientinnen DTCs im Knochenmark. Vergleichend hierzu wiesen Patientinnen ohne DTCs sowohl ein erhöhtes Rezidivrisiko als auch eine erniedrigte 10-Jahres-Überlebensrate auf (Braun *et al.* 2005) auf. Hierbei wurde auch gezeigt, dass Patientinnen mit DTCs größere Primärtumoren, ein höheres Grading, einen positiven Lymphknotenstatus und einen Rezeptor-negativen Primärtumor gemein ist (Braun *et al.* 2005).

Da es sich bei der Knochenmarkbiopsie um einen invasiven Eingriff handelt, hat sich dieser bisher nicht als Routinediagnostik zur Überprüfung des Therapieerfolges durchgesetzt. Aktuell konzentriert man sich auf CTCs im peripheren Blut, die unter anderem mit dem Microfluidic CTC Chip und dem CellSearch System nachgewiesen werden können, wobei das CellSearch System als derzeitiger Standard gilt. Beim CellSearch System handelt es sich um ein immunomagnetisches Separationsverfahren zur Detektion von EpCAM (epitheliales Zelladhäsionsmolekül) exprimierenden CTCs. Nach Isolierung der CTCs erfolgt eine Immunfärbung, wobei Zytokeratin-Positivität, positive nukleäre Färbung und CD45-Negativität als Phänotyp der CTCs festgelegt worden (Cristofanilli *et al.* 2004).

CTCs sind bei etwa 50% bis 80% der Mammakarzinompatientinnen nachweisbar, wobei der CTC-Status tendenziell mit der Präsenz von DTCs korreliert: 19% der DTC-positiven Patientinnen sind auch CTC-positiv (Fehm *et al.* 2009). Mit dem Nachweis von CTCs korreliert der Lymphknoten- und Rezeptorstatus des Primärtumors: Bei *Triple*-negativen Primärtumoren (HER-2-negativ, ER- und PR-negativ) sind in 30% der Fälle CTCs zu finden, gefolgt von ER- und/oder PR-positiven (13%) Tumoren. Dabei sind etwa 50% der CTCs negativ für HER-2, ER und PR, 21% exprimieren nur HER-2 und 29% der CTCs sind ER- und/oder PR-positiv (Fehm *et al.* 2009). Bei dem Vergleich zwischen CTCs und korrespondierenden Primärtumoren zeigte sich, dass deren Expressionsprofil hinsichtlich therapierelevanter Moleküle nicht immer übereinstimmt. Eine Übereinstimmung für ER-, PR- und HER-2-Status zwischen Primarius und CTCs war in 29%, 25% bzw. 53% zu beobachten. Bei einer Studie zeigte sich, dass 50% der CTCs

einen *Triple*-negativen Phänotypen haben, wohingegen nur 15% der Primärtumoren diese Eigenschaft aufwiesen (Fehm *et al.* 2009). CTCs schienen trotzdem zum Primärtumor eine stärkere biologische Ähnlichkeit aufzuweisen als zu DTCs (Fehm *et al.* 2009).

In weiteren Studien wurde demonstriert, dass die Proteinexpression von HER-2 sowohl auf DTCs als auch auf CTCs mit einer schlechten Prognose einherging (Wülfing *et al.* 2006, Becker *et al.* 2005). Diese Beobachtung könnte von klinischer Relevanz sein, da Patientinnen mit negativem HER-2 Primärtumor, jedoch positivem HER-2-Status der CTCs von einer gezielten Therapie gegen HER-2 profitieren würden (Fehm *et al.* 2009). CTCs werden zunehmend als Prognosemarker herangezogen. So konnte beobachtet werden, dass Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom und  $\geq 5$  CTC/7,5 ml Blut vor dem ersten Zyklus Chemotherapie sowie Patientinnen mit  $\geq 5$  CTC/7,5 ml Blut vor dem zweiten und dritten Zyklus Chemotherapie ein erhöhtes Risiko für eine frühe Tumorprogression hatten (Cristofanilli *et al.* 2005). Helissey *et al.* zeigten, dass Patientinnen, bei denen zu Beginn der Therapie  $\geq 5$  CTC/7,5 ml detektiert wurden und im Verlauf der Therapie  $< 5$  CTCs/7,5 ml Blut bzw. einen Abfall der CTC-Zahl um -70% erlangten, eine bessere Prognose aufwiesen. Nachdem sich CTCs als prognostischer Faktor bei metastasierten Mammakarzinomen bereits etabliert haben, werden diese zunehmend auch bei nicht metastasierten Mammakarzinomen untersucht. Bei diesen Patientinnen wurden nur in 24% der Fälle CTCs identifiziert, obwohl in der Studie schon  $\geq 1$  CTC/7,5 ml Blut als Grenzwert zur Positivität herangezogen wurde. Dennoch konnte auch bei diesen niedrigen CTC-Schwellenwerten bei positiven Patientinnen sowohl ein höheres Rezidivrisiko als auch ein kürzeres Gesamtüberleben beobachtet werden (Lucci *et al.*, 2012, Rack *et al.*, 2012).

Rack *et al.* (2014) untersuchten darüber hinaus 2.026 Patientinnen mit nicht-metastasiertem Mammakarzinom mittels CellSearch auf das Vorhandensein von CTCs nach operativer Therapie und vor adjuvanter Chemotherapie sowie 1.492 Patientinnen nach adjuvanter Chemotherapie: Vor adjuvanter Chemotherapie konnte bei 21,5% der Patientinnen CTCs detektiert werden, nach Chemotherapie bei 22,1% der Patientinnen. Einen Unterschied zwischen der Anzahl der CTCs vor bzw. nach Chemotherapie konnte nicht festgestellt werden (Rack *et al.* 2014).

## 1.4 CTCs im Rahmen des Therapiemonitorings und als therapeutische Zielstruktur

Zunehmend werden CTCs als therapeutische Marker genutzt. Es wird in unterschiedlichen Studien die therapeutische Rolle der CTCs untersucht. Hierzu zählen unter anderem die SUCCESS-C Studie, die TREAT CTC-Studie und die DETECT III-Studie.

Bei der SUCCESS-C Studie werden Patientinnen mit einem invasiven, nicht metastasierten, vollständig resezierten Mammakarzinom eingeschlossen. Des Weiteren müssen unter anderem folgende Kriterien erfüllt werden: HER-2-negativer Primärtumor, histologisch gesicherte axilläre Lymphknotenmetastasen oder nodal negative high-risk Patientinnen (pT >2 oder Grading 3 oder Alter < 35 Jahre) (Rack *et al.* 2010). Mit dieser Studie soll untersucht werden, ob über ein Therapiemonitoring durch CTC-Nachweis Patientinnen mit einem erhöhten Rezidivrisiko schneller identifiziert werden können, was dann eine Anpassung oder Eskalation der etablierten Therapie nach sich ziehen könnte (Rack *et al.* 2010).

Bei der TREAT CTC Studie werden allein CTC-positive Patientinnen mit einem HER2-negativen, R0-reszierten, frühen Mammakarzinom sowie einer abgeschlossen adjuvanten Chemotherapie eingeschlossen. Vor dem Hintergrund, dass Tumorzellen aufgrund einer antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität des Trastuzumab (humanisierter, monoklonaler Antikörper) therapiert werden können, soll hier überprüft werden, ob Patientinnen mit HER-2-negativem Primärtumor und gleichzeitigem CTC Nachweis ein geringeres Rezidivrisiko erlangen. Bei dieser Studie werden CTCs für die Therapieentscheidung mit herangezogen (Koch *et al.* 2014).

In die DETECT III Studie werden Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinomen, HER-2-negativen Primärtumor und gleichzeitig HER-2-positiven CTCs eingeschlossen. Hier erhalten die Patientinnen eine Chemotherapie und/oder eine endokrine Therapie. Zusätzlich erfolgt dann die Randomisierung in zwei Gruppen. Eine Patientinnengruppe wird mit dem Wirkstoff Lapatinib, eine Gruppe ohne den Wirkstoff Lapatinib therapiert. Ziel dieser Studie ist es, bei HER-2-negativem Primarius und gleichzeitig HER-2-positiven CTCs den Effekt von Lapatinib zu untersuchen. (Schramm *et al.* 2015).

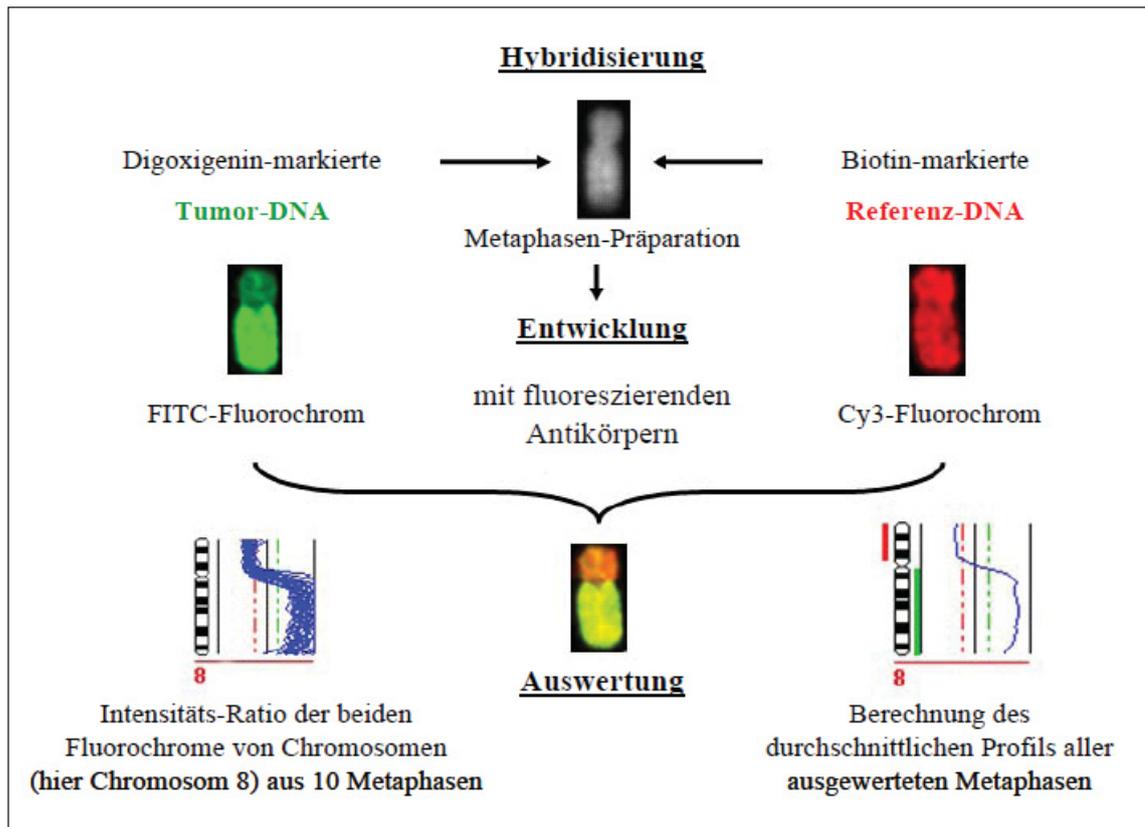
## 1.5 Leukapherese als Detektionsverfahren für CTCs

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) sind, wie bereits dargelegt, hinsichtlich der Prognose und Therapien von Relevanz. Da nur eine CTC in etwa  $10^9$  Leukozyten zu finden ist, sind CTCs bisher schwierig zu detektieren (Ross *et al.* 2009). Es existieren bereits diverse Separationsverfahren zur Detektion von CTCs, wobei etwa 1 bis 10 ml Blut untersucht werden. In unterschiedlichen Studien konnten hier zwischen 1-100.000 CTCs/ml Blut bei 5% bis 100% der untersuchten Patienten separiert werden (Fischer *et al.* 2013). In vorangegangenen Studien konnten bei nicht-metastasierten Tumoren CTCs in 5-25% der Fälle nachgewiesen werden (Lucci *et al.*, 2012). Ein Grund für die unterschiedliche CTC-Nachweisraten könnte das geringe Volumen der untersuchten Blutproben sein (Fischer *et al.* 2013). In der von der westdeutschen Studiengruppe (WSG) durchgeführten Studie zur stammzellgestützten Hochdosis-Chemotherapie bei Patientinnen mit neun und mehr befallenen Lymphknoten ohne Fernmetastasierung wurden zur Gewinnung von mononukleären Zellen von November 1995 bis April 1998 nach operativer Tumorresektion (R0, M0) sowohl vor und nach der Induktions-Chemotherapie Leukapheresen durchgeführt (Nitz *et al.* 2005).

Im Verlauf konnten die für Forschungszwecke konservierten Leukapherese-Produkte durch unsere Arbeitsgruppe auf CK-positive Zellen, welche eine ähnliche Dichte wie mononukleäre Zellen aufweisen, untersucht werden. Hierzu wurden CK-positive Zellen mittels Anti-Cytokeratin-Antikörper A45-B/B3, die gegen die Cytokeratinen 8,18 und 19 gerichtet waren, detektiert (Fischer *et al.* 2013). Mit diesem Ansatz konnten in mehr als 90% der Leukapherese-Produkte, welche aus Patientinnen mit einem lokal stark fortgeschrittenen, aber nicht metastasierten Mammakarzinom stammten, CK-positive Zellen detektiert werden (Fischer *et al.* 2013). Im Mittel konnten 0,86 CK-positive Zellen pro  $10^6$  mononukleären Zellen identifiziert werden, was einer 20fach höheren Konzentration als in bisher veröffentlichten Studien entspricht (Fischer *et al.* 2013). Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die CTC-Ausbeute effektiver ist, wenn größere Mengen Blut in die Untersuchung eingehen. Mittels der Leukapherese kann man das gesamte, zirkulierende Blut erreichen, so dass während einer Leukapherese etwa 25 l Blutvolumen in die Analyse einfließen, wohingegen andere Verfahren lediglich 1-10 ml Blut untersuchen. Mit der dargelegten Methode war es möglich, hohe Anzahlen von CK-positiven Zellen im peripheren Blut von M0-Patientinnen zu detektieren.

## 1.6 Vergleichende genomische Hybridisierung auf Einzelzellebene: Einsatz, Vorteile, Nachteile, Methode

Ein typisches Merkmal von epithelialen Malignomen ist die chromosomale Instabilität (CIN = *chromosomal instability in neoplasia*). Aufgrund dieser CIN kommt es bei Karzinomen zu Zugewinnen und Verlusten von DNA-Material, was zur Aktivierung von Onkogenen (Amplifikationen) oder zum Verlust von Tumorsuppressorgenen (Deletionen) führen kann (Sugai *et al.* 2016). Die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) ist eine Methode, mit der man Tumorgenome auf derartige chromosomale Aberrationen untersuchen kann, indem sie genomweit einen Überblick über chromosomale Zugewinne und Verluste geben (Polzer 2008). Durch Einführung der CGH kam es vor allem in der 1990er Jahren zu einem raschen Fortschritt in der Genetik solider Tumoren (Weiss *et al.* 1999; Oostlander *et al.* 2004). Bei der CGH wird die Tumor-DNA amplifiziert und eine Referenz-DNA ohne Veränderungen mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (roter bzw. grüner Fluoreszenzfarbstoff) markiert. Beide werden zu gleichen Teilen in ein Hybridisierungsgemisch gegeben und auf normale Metaphasen gesunder Spender hybridisiert (Weiss *et al.* 1999). Hierbei konkurrieren sie um ihre homologen Sequenzen auf den Chromosomen. Nach der Hybridisierung werden digital Fluoreszenzaufnahmen angefertigt und dann EDV-gestützt das Verhältnis zwischen dem roten und grünen Fluoreszenzfarbstoff entlang der Chromosomenachse gemessen (Weiss *et al.* 1999). Hierdurch können Zugewinne (Verhältnis  $>1$ ) und Verluste (Verhältnis  $<1$ ) des genetischen Materials der Tumorzelle an der spezifischen Chromosomenlokalisationen gemessen werden (Weiss *et al.* 1999). Da im gesamten Genom regelmäßig kurze repetitive DNA-Sequenzen vorkommen, wie im Bereich der Zentromere, und diese Regionen die CGH-Analyse behindern können, werden diese bei der CGH-Hybridisierung mittels  $C_{\alpha}t-1$  DNA blockiert. Bei der  $C_{\alpha}t-1$  DNA handelt es sich um eine plazentäre DNA, welche repetitive DNA-Sequenz enthält (Weiss *et al.* 1999, Polzer 2008) (Abbildung 3).



**Abb. 3: Ablauf der CGH**

Nach Markierung der Tumor- und Referenz-DNA werden diese auf normale Metaphasen hybridisiert. Das Verhältnis zwischen dem roten und grünen Fluoreszenzfarbstoff wird entlang der Chromosomenachse gemessen und gibt Aussage über Zugewinne bzw. Verluste von Tumor-DNA im Vergleich zur Referenz-DNA (Abbildung aus Polzer 2006 entnommen).

Hinsichtlich der Sensitivität der CGH-Methode ist zu berücksichtigen, dass es im Rahmen der CGH zu Verunreinigungen durch gesunde DNA (z.B. Bindegewebe oder entzündliches Gewebe) kommen kann. Da es dann bei der Messung der Fluoreszenzfarbstoffe zu einem Verhältnis von 1,0 kommen könnte, würden chromosomale Aberrationen unentdeckt bleiben (Weiss *et al.* 1999).

Um genetische Aberrationen auch an einzelnen DTCs/CTCs untersuchen zu können, wurde die Einzelzell-CGH entwickelt (Klein *et al.* 2002). Hierzu werden Zellpopulationen aus Proben wie z.B. Knochenmark oder Blut in mehreren Schritten aufgearbeitet und die Zellen auf Adhäsions-Objektträger spezifisch angefärbt (EpCAM-Färbung oder Zytokeratin-Färbung). Zunächst werden einzelne EpCAM oder CK-positive Zellen (CTCs, DTCs) durch Mikromanipulation mittels einer Glaskapillare von den Adhäsions-Objektträgern gelöst (Abbildung 4) und anschließend in ein PCR-Gefäß aufgenommen (Polzer 2008).



**Abb. 4: Isolierung einer CK- und EpCAM-positiven Zelle mittels Mikromanipulation**

Dargestellt wird eine CK-positive Zelle zwischen ungefärbten Knochenmarkszellen. Links vor der Mikromanipulation, rechts und mittig während und nach dem Ablösen der CK-positiven Zelle mittels Mikromanipulation (Abbildung aus Klein *et al.* 2002 entnommen).

Dort erfolgt nach Isolierung der DNA die Amplifikation des Genoms durch eine Einzelzell-PCR. Dies ist notwendig, da das Ausgangsmaterial einer Zelle von ca. 6-7 pg DNA für solche umfassenden genomischen Analysen wie die CGH nicht ausreichend ist, da mindestens 500 ng DNA benötigt werden. Grundlage der PCR zur repräsentativen Amplifikation des gesamten Genoms ist das Adapter-Linker-Prinzip. Zunächst erfolgt der Verdau des Genoms durch das Restriktionsenzym *MseI* in definierte Fragmente. Es werden dann Oligonukleotidadapter, die komplementär zur *MseI*-Schnittstelle sind, mit T4 DNA-Ligase ligiert. Das Hilfs-Oligonukleotid wird entfernt und das Ende entsprechend aufgefüllt, so dass alle DNA-Segmente die gleichen Enden aufweisen. Nun können mit einem entsprechenden Primer, welcher die passende Adapter-Sequenz hat, die DNA-Fragmente amplifiziert werden (Klein *et al.* 1999).

Nach der Markierungs-PCR der Tumor- und Referenz-DNA kann die vergleichende genomische Hybridisierung der Einzelzelle erfolgen (Klein *et al.* 2002).

Zu beachten ist, dass bei der CGH nur unbalancierte Aberrationen bis zu einer Auflösung von etwa 10 bis 20 Mb sichtbar gemacht werden können (Jeuken *et al.* 2002). Um Translokationen, Inversionen und kleine Aberrationen zu identifizieren, müssten ergänzende Techniken angewendet werden (Weiss *et al.* 1999). Da die CGH zudem eine sehr zeitintensive Methode ist und schwierig zu standardisieren ist, wird heute auch auf Einzelzellebene zunehmend die vergleichende genomische Hybridisierung in Array-Format (aCGH) eingesetzt (Möhlendick *et al.* 2013).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Bei der immunzytochemischen Detektion von CTCs in aufgearbeiteten Leukapherese-Produkten aus der Hochdosis-Chemotherapie Studie WSG-AM 01 (Nitz *et al.* 2005) wurden in hoher Frequenz CK-positive Zellen detektiert. Diese wurden in möglichst großer Zahl isoliert und dann mittels Adapter-Linker-PCR amplifiziert. Solche Zellamplifikate lagen nun von 19 Mammakarzinompatientinnen vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels CGH festzustellen, ob es sich bei den CK-positiven Zellen- gewonnen aus M0-Patientinnen- um CTCs handelt, indem die für maligne Zellen charakteristischen genomischen Aberrationsmuster aufgezeigt werden. Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit die CK-positiven Zellen das genetische Muster der Aberrationen vor bzw. nach Induktions-CTX ändern. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die untersuchten Zellen einen Einfluss auf das Überleben bzw. Auftreten eines Rezidivs haben.

## 2 Material und Methoden

Das Aktenzeichen der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität zur Analyse der Proben aus den Leukapherese-Produkten lautet: WSG01 1000.

### 2.1 Patientinnenkollektiv

Die Proben dieser Studie stammen aus Patientinnen, die in die WSG-AM 01-Studie zur stammzellgestützten Hochdosis-Chemotherapie eingeschlossen wurden. Die Einschlusskriterien der Studie setzten unter anderem voraus, dass ein histologisch gesichertes Mammakarzinom mit mindestens neun befallenen axillären Lymphknoten ohne Fernmetastasierung vorlag. Das Durchschnittsalter lag bei 47 Jahren. Alle Patientinnen unterzogen sich einer brusterhaltenden Operation oder einer Mastektomie, wobei mindestens zehn axilläre Lymphknoten reseziert wurden. Dem operativen Eingriff schloss sich eine stammzellgestützte Chemotherapie an. Während der Therapie erhielten die Patientinnen zunächst zwei Zyklen Induktions-Chemotherapie Epirubicin (90 mg/m<sup>2</sup>) und Cyclophosphamid (600 mg/m<sup>2</sup>) im Abstand von zwei Wochen mit Wachstumsfaktorsupport. Vier Wochen nach Beginn der Therapie erhielten sie ihren ersten Zyklus der Chemotherapie, 90 mg/m<sup>2</sup> Epirubicin, 1000 mg/m<sup>2</sup> Cyclophosphamid und 133 mg/m<sup>2</sup> Thiotepa mit Stammzellsupport, der nach drei Wochen wiederholt wurde. Die peripheren Blutstammzellen wurden mittels Leukapherese sowohl vor dem ersten Zyklus Epirubicin/Cyclophosphamid als auch vor dem ersten Zyklus Epirubicin/Cyclophosphamid/Thiotepa gewonnen und jeweils nach den Zyklen reinfundiert (Nitz *et al.* 2005).

Tabelle 5 gibt Auskunft über den HER-2-Status des Primärtumors, den Hormonrezeptorstatus des Primärtumors, der Tumorgröße sowie den Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs bzw. dem Versterben der Patientinnen.

**Tabelle 5: Darstellung der Patientinnen mit den Expressionsprofilen des Primärtumors, der TumorgroÙe und der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs bzw. bis zum Versterben**

Patientinnen	HER-2	ER	PR	Rezidiv (in Monaten)	Verstorben (in Monaten)	T-Stadium	N-Status
1	+	+	+	3	10	T1	N1
2	+	+	+	60	87	T1	N2
3	+	-	+	kein Rezidiv	nicht verstorben	T2	N2
4	-	+	+	kein Rezidiv	nicht verstorben	T2	N2
5	+	-	+	107	nicht verstorben	T4	N2
6	+	+	+	31	34	T2	N2
7	-	-	-	30	39	T2	N2
8	+	-	-	39	54	T1	N1
9	-	+	+	kein Rezidiv	nicht verstorben	T3	N1
10	+	-	-	kein Rezidiv	nicht verstorben	T2	nicht bekannt
11	-	-	-	12	16	T2	N1
12	-	+	+	32	33	T2	N1
13	nicht bekannt	-	-	69	nicht verstorben	T2	N1
14	+	+	+	98	nicht verstorben	T2	N2
15	-	+	+	36	38	T3	N2
16	-	-	+	kein Rezidiv	97	T1	N1
17	nicht bekannt	+	+	nicht bekannt	nicht bekannt	T2	N2
18	nicht bekannt	+	-	nicht bekannt	nicht bekannt	T2	N1
19	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	20	nicht verstorben	T2	N2

ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, T = TumorgroÙe, N = Nodalstatus

## 2.2 Methoden

Bei den im folgendem beschriebenen Methoden handelt es sich um standardisierte Protokolle, welche auf den Veröffentlichungen „*Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells*“ (Klein *et al.* 1999) sowie „Identifizierung und Charakterisierung metastatischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark beim Prostatakarzinom“ (Polzer 2006) beruhen.

### 2.2.1 Herkunft der Amplifikationsprodukte der Cytokeratin-positiven Zellen aus historischen Leukapherese-Produkten

Im Vorfeld dieser Untersuchung wurden historische Leukapherese-Produkte, die vor und nach Induktions-Chemotherapie (Induktions-CTX) gewonnen wurden und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, aufgearbeitet und auf Cytokeratin-positive Zellen (CK-positive Zellen) untersucht. Für diesen Versuch wurden 48 Leukapherese-Produkte von 24 Mammakarzinompatientinnen mit immunhistochemischer Färbung auf Adhäsions-Objektträgern mittels Anti-Cytokeratin-Antikörper A45-B/B3 behandelt, der gegen die CKs 8/18 und 19 der CTCs gerichtet ist. Insgesamt wurden in 91,7% der Leukapherese-Produkte (44/48) CK-positive Zellen nachgewiesen. Im Vorfeld dieser Arbeit konnten erfolgreich 65 CK-positive Zellen aus 19 Fällen isoliert und deren genomische Einzelzell-DNA mithilfe der MseI-Adapter-Linker-PCR amplifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden 45 Amplifikationsprodukte mittels CGH untersucht. Die Ergebnisse der CGH-Untersuchungen und Teile der hier dargestellten Ergebnisse wurden in der Publikation „*Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients*“ (Fischer *et al.* 2013) veröffentlicht.

### 2.2.2 Zuordnung der CTCs zu den Patientinnen

Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die Patientinnen und die analysierten CTCs: Insgesamt konnten von 19 Patientinnen CK-positive Zellen vor und/oder nach Induktions-CTX mittels CGH untersucht werden. Um diese Zellen zuordnen zu können, wurde jeder Zelle ein Code aus sechs bis sieben Buchstaben und Ziffern zugeordnet. Die ersten beiden Zeichen entsprechen der Patientinnennummer, die Abkürzung CTC steht für zirkulierende Tumorzelle. Dem schließt sich eine Ziffer für die Nummer der jeweiligen Zelle an. Ist die CTC nach Induktions-CTX gewonnen worden, so wird dies am Ende des Codes mit einem C gekennzeichnet. Die Zelle 05\_CTC1 ist demnach die erste CTC der Patientin Nummer fünf, die vor Induktions-CTX gewonnen wurde; die Zelle 17\_CTC2\_C ist die zweite CTC der Patientin Nummer 17, nach Induktions-CTX detektiert wurde.

**Tabelle 6: Zuordnung der Patientinnen zu den zirkulierenden Tumorzellen (CTC) vor (CTC) bzw. nach (CTC\_C) Induktions-Chemotherapie (Induktions-CTX)**

Patientinnenummer	CTC vor Induktions-CTX	CTC nach Induktions-CTX
1	01 CTC1	01 CTC1 C
2	keine Zellen vorhanden	02 CTC1 C
3	03 CTC1 03 CTC2	03 CTC1 C
4	04 CTC1	04 CTC1 C 04 CTC2 C
5	05 CTC1 05 CTC2	05 CTC1 C
6	06 CTC1	06 CTC1 C 06 CTC2 C
7	07 CTC1	07 CTC1 C
8	08 CTC1 08 CTC3 08 CTC2	08 CTC1 C
9	09 CTC1 09 CTC2	09 CTC1 C
10	10 CTC1	10 CTC1 C
11	11 CTC1 11 CTC2	keine Zellen vorhanden
12	12 CTC1	12 CTC1 C
13	13 CTC1	13 CTC1 C
14	14 CTC1	keine Zellen vorhanden
15	15 CTC1	keine Zellen vorhanden
16	16 CTC1	keine Zellen vorhanden
17	17 CTC1 17 CTC2	17 CTC1 C 17 CTC2 C
18	18 CTC1 18 CTC2 18 CTC3	18 CTC1 C
19	keine Zellen vorhanden	19 CTC1 C 19 CTC2 C

### **2.2.3 Lymphozytenkulturen zur Herstellung von Metaphasen-Chromosomen**

Für die Präparation von Metaphasepräparaten wurden 300 µl peripheres Blut gesunder Spender in 20 Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) mit je 5 ml Gibco PB-Max Karyotyping-Medium gefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank für 72 h. Die Zellteilung wurde 30 min vor Ende der Inkubation durch Hinzugeben von je 50 µl Colcemid in der Metaphase angehalten. Als nächstes wurden zwei Ansätze in einem 15 ml Zentrifugen-Röhrchen (Falcon) vereinigt und, um die Zellen zu pelletieren, 8 min bei Raumtemperatur und 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 500 µl verworfen, das Pellet resuspendiert. Um ein Aufquellen der Lymphozyten zu erzielen, wurden die Zellen 20 min auf 37 °C mit 5-10 ml hypotoner 75 mM KCl-Lösung behandelt. Dann wurde unter Vortexen langsam 1 ml -20 °C kalten Fixativs bestehend aus 2,5 ml Eisessig und 7,5 ml Methanol hinzu pipettiert. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte zweimaliges Zentrifugieren für 8 min bei 1.500 rpm, dann das Waschen in 5 ml -20°C kalten Fixativs zur Entfernung der lysierten Erythrozyten (Klein *et al.* 1999, Polzer 2008).

### **2.2.4 Präparation von Metaphasen-Chromosomen**

Zur Herstellung der Metaphasen-Objektträger wurden Glasobjektträger für 12 h in Küvetten mit 100%igem Ethanol gereinigt und entfettet. Vor dem Auftropfen der Metaphasen-Lymphozyten wurden die Objektträger in ddH<sub>2</sub>O 10 min bei -20 °C gekühlt. Aus ca. 0,5 m Höhe erfolgte das Auftropfen der in Methanol-Eisessig fixierten Lymphozyten. Durch Inkubation der Objektträger im Wasserdampf angereicherten Brutschrank bei 37 °C verdampfte das Fixativ. Die fertigen Metaphasen-Objektträger werden bis zu vier Wochen in 70%igem Ethanol bei 4 °C gelagert (Klein *et al.* 1999, Polzer 2008).

### **2.2.5 Markierungs-PCR**

Die vorhandenen WGA-Produkte („*Whole Genome Amplification*“) wurden im Beisein der Deoxynukleotid-Derivate (Digoxigenin-11-dUTP zur Markierung der CTC-DNA und Biotin-16-dUTP zur Markierung der Referenz-DNA) aus einem Pool von PCR-Produkten

genomischer DNA normaler weiblicher diploiden Zellen reamplifiziert, um den jeweiligen Abschnitt der Thymidinbase zu ersetzen. Im Anschluss an die Hybridisierung auf die humanen Metaphasen (siehe CGH 2.2.6) konnten die Reamplifikate mittels geeigneter Fluoreszenz-Detektionssysteme nachgewiesen und quantifiziert werden. Der Reamplifikationsansatz bestand aus:

4 µl	Expand-Long-Template Puffer 1
6 µl	Lib 1 10 µM
1,4 µl	7/8 dNTP-Mix (4,375 µl dTTP, 5 µl dATP, 5 µl dCTP, 5 µl dGTP, 30,7 µl H <sub>2</sub> O)
1,75 µl	1 mM Biotin-dUTP (Kontrolle) oder 1 mM Dig-dUTP (Tumorzelle)
0,5 µl	Taq-Polymerase 5U/µl
26,35 µl	H <sub>2</sub> O

Die Amplifikationsprodukte und die Kontroll-DNA wurden mit dem identischen Ansatz behandelt. Als Template für den Markierungsmix wurde dann 0,5 µl primäres PCR-Produkt der Einzelzell-DNA hinzugefügt und die PCR unter optimierten Bedingungen (Tabelle 7) in einem Thermocycler (Typ MJ-Research PTC 100) durchgeführt:

**Tabelle 7: PCR-Bedingungen**

Temperatur	1 Zyklus	10 Zyklen
94 °C	1 min	30 sec
60 °C	30 sec	30 sec
72 °C	2 min	2 min + 20 sec/Zyklus

Um Interferenzen während der Hybridisierung auszuschließen, wurden nach der PCR die endständigen LIB1-Primer mittels Restriktionsverdau mit Tru1 abgetrennt. Hierzu wurde dem Reamplifikationsprodukt 2 µl Puffer R und 1 µl Tru1 (50 U/µl) hinzugefügt und 3 h bei 65 °C inkubiert (Klein *et al.* 1999, Polzer 2008).

### 2.2.6 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Die mit Digoxigenin markierte Test-DNA (primäre PCR-Produkte der WGA der Tumorzell-DNA) und die mit Biotin markierte Referenz-DNA, welche aus einem Pool

von PCR-Produkten genomischer DNA normaler weiblicher diploider Zellen bestand, wurden dann bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Hierzu wurden folgende Reagenzien verwendet:

40 $\mu\text{l}$	Dig-markierte PCR-Produkte der Tumor-DNA
40 $\mu\text{l}$	Biotin-markierte PCR-Produkte Referenz-DNA
100 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ C <sub>0</sub> t-1 DNA
10 $\mu\text{l}$	Heringssperma-DNA 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
19 $\mu\text{l}$	NaAc 3 M pH 5,2
400 $\mu\text{l}$	100% EtOH ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

Im Anschluss wurde bei maximaler Drehzahl und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  die gefällte DNA für 45 min in der Tischzentrifuge ab zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 700  $\mu\text{l}$  70% EtOH gewaschen, nochmals bei maximaler Drehzahl und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 20 min zentrifugiert, das Ethanol vorsichtig ab pipettiert und dann bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Thermoblock luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 7  $\mu\text{l}$  100% Formamid aufgenommen und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 min im Thermoblock gelöst. Als nächstes wurden 7  $\mu\text{l}$  Master-Mix (4x SSC mit 20% DextranSulfat) hinzu pipettiert. Dann wurde die DNA-Probe im Heizblock 6 min bei  $78\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Zur Blockade repetitiver Sequenzen mittels C<sub>0</sub>t-1-DNA wurde nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  C<sub>0</sub>t-1 DNA für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  Zeit inkubiert.

Parallel zur Behandlung der oben genannten DNA-Proben wurde ein Metaphasen-Objektträger (beschrieben in Kapitel 2.2.4) durch Proteaseverdau von Zytoplasmaresten befreit sowie die chromosomale DNA durch PFA-Inkubation denaturiert. Zunächst wurde der Metaphasen-Objektträger für 5 min bei Raumtemperatur mit 2x SSC behandelt. Im  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad wurden 100 ml der 10 mM HCl-Lösung erhitzt und dann wurde 50  $\mu\text{l}$  Pepsin-Lösung hinzugegeben. Je nach Ausmaß der Zytoplasmareste wurde der Metaphasen-Objektträger 2-4 min inkubiert. Der Metaphasen-Objektträger wurde dann zweimal in 1x PBS für jeweils 5 min gewaschen, um den Pepsinverdau zu stoppen. Die anschließende Fixierung des Chromatingerüsts erfolgte durch die Behandlung mit 200  $\mu\text{l}$  PFA Lösung (50 mM MgCl<sub>2</sub> in DPBS mit 1% PFA). Hierdurch erlangte die Chromosomenstruktur für die anschließende Denaturierung Stabilität. Nach erneutem zweimaligem Waschen der Metaphasen-Objektträger in PBS für je 5 min wurde der Metaphasen-Objektträger in einer ansteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 100% EtOH auf Eis) dehydriert und unter dem Abzug luftgetrocknet. Über 1 min 15 sec wurden die

Metaphasen-Objektträger im 70°C warmen Wasserbad in 100 ml Formamid-Lösung (10 ml 20x SSC, 20 ml H<sub>2</sub>O, 70 ml Formamid 100%, eingestellt auf pH 7,0) denaturiert. Bevor die vorbehandelte DNA-Probe auf den Metaphasen-Objektträger aufgetragen wurde, wurde dieser erneut in einer aufsteigenden Alkoholreihe auf Eis dehydriert und unter dem Abzug luftgetrocknet. 14 µl der DNA-Probe wurde auf den Objektträger aufgetragen, das Hybridisierungsfeld wurde mittels Deckgläschen (18x18 mm) verschlossen und mit Montagekleber (Fixogum) luftdicht versiegelt. Nun erfolgte in einer feuchten Kammer im Wasserbad (37 °C) die Hybridisierung für 48 bis 72 Stunden. Im Anschluss daran wurde das Deckgläschen behutsam von dem Hybridisierungsfeld entfernt und der Objektträger 2x5 min in 4x SSC + Tween20 (pH 7,4) bei 42 °C auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift bei 42 °C für 3x5 min in Formamidlösung (120 ml ddH<sub>2</sub>O + 15 ml Formamid + 30 ml 20x SSC), dann ein weiterer Waschschrift für 3x5 min bei 42 °C in 1x SSC. Bevor die Bindungsstellen der Proteine auf dem Objektträger für 45 min bei 37 °C mit 1 ml 3%iger Blockierungslösung (3% BSA Fraktion V, 5% FCS, 1x PBS pH 7,5, 0,2% Tween) C abgesättigt wurden, wurde bei 42 °C der Objektträger in 0,2% Tween + 4x SSC equilibriert. Im Anschluss wurde die überschüssige Blockierungslösung in 0,2% + Tween 4x SSC (42 °C) weggespült. Nun wurde der Objektträger bei 37 °C 45 min mit einer Zusammensetzung aus 185 µl 1%iger Blockierungslösung (1x PBS pH 7,5, 5% FCS, 1% BSA Fraktion V, 0,2% Tween), 20 µl Anti-Digoxigenin-FITC und 2 µl Avidin-Cy3.5 abgedeckt durch ein Deckglas (24x 60 mm), bei 37 °C inkubiert. Um nichtgebundene Fluorochrome zu entfernen, wurde der Objektträger bei 42 °C insgesamt 3x5 min in 0,2% Tween + 4x SSC im Dunkeln gewaschen. Anschließend wurde die Chromosomenbänderung mit einer DAPI-Färbung (10 µg DAPI, 0,2% Tween + 1 ml 4xSSC) über 2 min sichtbar gemacht. Um beim Trocken einer Salzkristallbildung vorzubeugen, wurde der Objektträger zweimal mit destilliertem Wasser gespült, luftgetrocknet und anschließend unter Vectorshield H-1000 verschlossen.

Die CGH-Analyse erfolgte mit einer CCD Kamera eines Fluoreszenzmikroskops (Axioplan2) sowie der dazugehörigen Software (Isis, MetaSystems GmbH, Altlußheim). Im Schnitt wurden 12 geeignete Metaphasen mit dem Fluoreszenzmikroskop in den Fluoreszenzfiltern Cy3.5, DAPI und FITC abfotografiert und anschließend in Fotoserien abgespeichert. Mit der Isis-CGH Software wurden die Chromosomen in ein Chromosomenschema sortiert. Die Software vergleicht an jedem einzelnen Chromosom die Intensität der Fluoreszenz der unterschiedlichen Kanäle der Cy3.5-Referenz-DNA

und der FITC-Test-DNA. Das Mittlere Verhältnis der in die Auswertung einbezogenen Metaphasen wurde in einem CGH-Profil graphisch veranschaulicht. Ein Zugewinn im Bereich der Chromosomen lag bei einem Fluoreszenzverhältnis von FITC zu Cy3.5 ab 1,20, ein Verlust bei unter 0,80 vor. Anschließend wurden mittels eines internetbasierten Analyseprogramms „Progenetix“ (<http://www.progenetix.org/upload/?project=progenetix&genome=hg18>) Histogramme und Clusteranalysen erstellt. Um diese zu erstellen wurde nach Hochladen der Algorithmen „chromosomal CGH“ ausgewählt. Bei der Auswertung wurde das Y-Chromosom, da es sich um Patientinnen handelt, ausgeschlossen (Klein *et al.* 1999, Polzer 2008).

## 2.3 Statistische Berechnungen

### **$\chi^2$ -Test:**

Mittels  $\chi^2$ -Test wurde überprüft, in wie weit zwei Kollektive und eine Eigenschaft sich signifikant voneinander absetzen. Das verwendete Netz-basierte-Programm ist auf folgender Internetseite zu finden: <http://vassarstats.net/tab2x2.html>

### **Fischer's Exact Test**

Handelte es sich um kleine Kollektive, bei welchen bestimmte Eigenschaften zweier Kollektive näher untersucht werden sollten, wurde zur Bestimmung der Signifikanz der Fischer's Exact Test ausgewählt. Das verwendete Netz-basierte-Programm ist auf folgender Internetseite zu finden: <http://vassarstats.net/tab2x2.html>

### **Wilcoxon Rangsummentest**

Hiermit wurde getestet, ob sich die mediane Anzahl zweier Populationen signifikant unterscheidet. Der Test ist auf folgender Internetseite zugänglich: [http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Wilcoxon\\_Test.html](http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Wilcoxon_Test.html)

### **Visualisierung der Ergebnisse**

Die Darstellung der Abbildungen der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 6 (Graphpad Software, Inc).

## 2.4 Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Geräte, Material, Oligonukleotide und Primer, Puffer, Lösungen und Mixe, Verbrauchsmaterialien

### Chemikalien

Colcemid 10 mg/ml	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	GE Healthcare, Chalfont St. Giles
BSA Fraktion V	Serva
DAPI	Roche, Mannheim
DPBS	Gibco
Eisessig 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Hering Sperma DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Human C <sub>0</sub> t-1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Nukleasefreies Wasser	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd 1 %	Merck, Darmstadt
PB-Max Karyotyping-Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Potassium Chloride 75 mM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SSC	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories

### Enzyme, Antikörper

Anti-Digoxigenin-Fluorescein	Roche, Mannheim
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
Cy3.5 Conjugated Avidin	Rockland, Gilbertsville, USA
Digoxigenin-11-dUTP, alkali-stable	Roche, Mannheim
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim

Pepsin	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Tru I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### Geräte

Brutschrank	Hera cell	Heraeus Instruments
CCD-Kamera	Photometrics	Tucson, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan2	Zeiss, Jena
Feinwaage	Voyager Pro	Ohaus
Heizblock	Dry Bath System	Star lab
MJR PCR-Thermocycler	PTC 100	Bio-Rad, USA
Reagenzglasmixer	Vortex Mixer	7-2020, neoLab
Schüttelinkubator	KS 250 basic	IKA
Wasserbad	Leica HI 1200	Leica, Wetzlar

### Oligonukleotide und Primer

Lib1	5'-AGTGGGATTCCTGCT GTCAGT-3'
Mse21	5'-AGTGGGATTCCGCATGCTAGT-3'

### Puffer, Lösungen und Mixe

7/8 dNTP-Mix	4,375 µl dTTP, 5 µl dATP, 5 µl dCTP, 5 µl dGTP, 30,7 µl H <sub>2</sub> O
1%ige Blockierungslösung	1x PBS pH 7,5, 5% FCS, 1% BSA Fraktion V, 0,2% Tween
3%ige Blockierungslösung	1x PBS pH 7,5, 5% FCS, 3% BSA Fraktion V, 0,2% Tween
20xSSC (Saline-Sodiumcitrate)	15 mM NaCitrat, 150 mM NaCl; pH 7,4
100 ml Formamid-Lösung	70 ml Formamid 100%, 10 ml 20x SSC, 20 ml H <sub>2</sub> O, eingestellt auf pH 7,0
165 ml Formamid-Lösung	15 ml Formamid + 30 ml 20x SSC + 120 ml ddH <sub>2</sub> O
200 µl PFA Lösung	50 mM MgCl <sub>2</sub> in DPBS mit 1% PFA
DAPI-Färbung	1 ml 4x SSC + 0,2% Tween, 10 µg DAPI
Master-Mix	4xSSC mit 20% Dextran Sulfat

PBS (Phosphate Buffered Saline) 8,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl; pH 7,4

**Verbrauchsmaterialien**

Deckgläschen	VWR
Tubes 15 ml	Falcon
Glas-Küvetten	Roth
Montagekleber (Fixogum)	Marabu, Tamm
Objektträger (Mattrand)	Engelbrecht
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym
Pipettierhilfe „Pipetboy acu“	IBS
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Starlab
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> )	Sarstedt

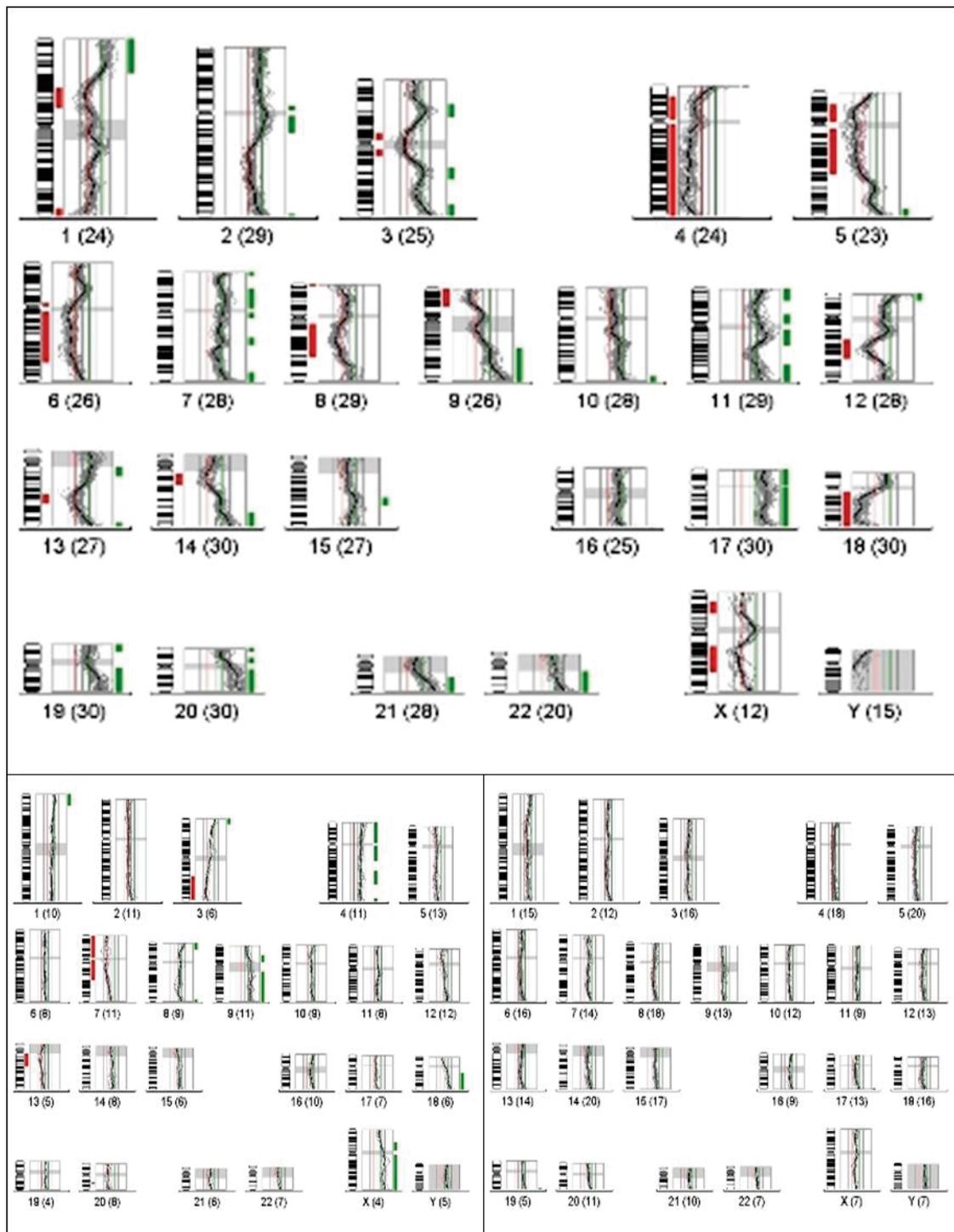
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Genomische Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen

Nachdem CTCs bislang überwiegend aus Proben von Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom isoliert wurden, sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit 45 CK-positive Zellen aus historische Leukapherese-Produkte von 19 Patientinnen mit einem nicht metastasierten Mammakarzinom mittels CGH untersucht worden. Ziel war es, die Malignität der isolierten CK-positiven Zellen nachzuweisen und deren genomische Veränderungen zu charakterisieren. Die CGH erlaubt es, das gesamte Genom zu analysieren, um tumortypische genetische Aberrationen zu identifizieren (Abbildung 5). Da die Leukapherese-Produkte sowohl vor als auch nach Induktions-CTX gewonnen worden waren, bestand zusätzlich die Möglichkeit, die isolierten Zellen hinsichtlich ihres Aberrationsverhaltens zum jeweiligen Therapiezeitpunkt zu vergleichen. Darüber hinaus wurde untersucht, in wie weit Zahl und Art der genetischen Veränderungen eine prognostische Aussage des Krankheitsverlaufes gestatten.

Die CGH als etablierte Methode ist im Kapitel „Material und Methoden“ (siehe Kapitel 2.2.6) ausführlich beschrieben worden. Als Beispiel sind die CGH-Profile von drei CTCs in Abbildung 5 dargestellt. Dabei sind die Ideogramme von CTCs mit zahlreichen sowie geringgradigen genomischen Aberrationen dem Ideogramm einer Zelle ohne genomische Veränderungen gegenübergestellt.

Insgesamt wurden 45 CTCs von 19 Patientinnen mit einem nicht metastasierten Mammakarzinom mittels CGH untersucht. Von den 45 CTCs stammten 26 (58%) CTCs aus Leukapherese-Produkten, welche vor Induktions-CTX gewonnen wurden und 19 (42%) CTCs aus Leukapherese-Produkten nach Induktions-CTX.



**Abb. 4: Darstellung der drei CTC-Ideogramme (A) 19\_CTC\_C mit zahlreichen, (B) 02\_CTC1\_C geringgradigen und (C) 3CTC\_2 fehlenden genomischen Veränderungen**

Die erste Ziffer gibt das entsprechende Chromosom (1-22, X, Y) und die in Klammern abgebildete Zahl die für die Analyse berücksichtigten Chromosomen an, wobei bis zu 20 Metaphasen je Zelle digitalisiert wurden. Beispielsweise wurde in (A) das Chromosom 4 in die Analysen 24-mal einbezogen, das Chromosom 17 30-mal. Abweichung nach links zeigen Verluste (rot) und Abweichungen nach rechts zeigen Zugewinne (grün).

### 3.1.1 CGH-Aberrationen vor und nach Induktions-Chemotherapie

Der erste Fokus der Untersuchung galt der Identifizierung von tumortypischen Veränderungen im CGH-Profil der CK-positiven Zellen. Insgesamt wurden 45 Zellen untersucht, von denen 21 Zellen (47%) keine fassbaren Veränderungen in der CGH zeigten. Demgegenüber wiesen 24 Zellen (53%) 1 bis 25 genomische Aberrationen pro Zelle auf (Tabelle 8).

Zur Abgrenzung von Gemeinsamkeiten oder Unterschieden bezüglich des Aberrationsmusters der Zellen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Therapiestandes wurden CTCs je nach dem Zeitpunkt ihrer Detektion in zwei Gruppen unterteilt: vor bzw. nach Induktions-CTX. Nach Induktions-CTX war der Anteil der Zellen mit einem CGH-Profil ohne nachweislichen genomischen Aberrationen mit 32% (6/19) geringer als vor Induktions-CTX (58%, 15/26) jedoch ohne Signifikanzniveau zu erreichen ( $\chi^2$ -Test:  $p = 0,083$ ) (Tabelle 9).

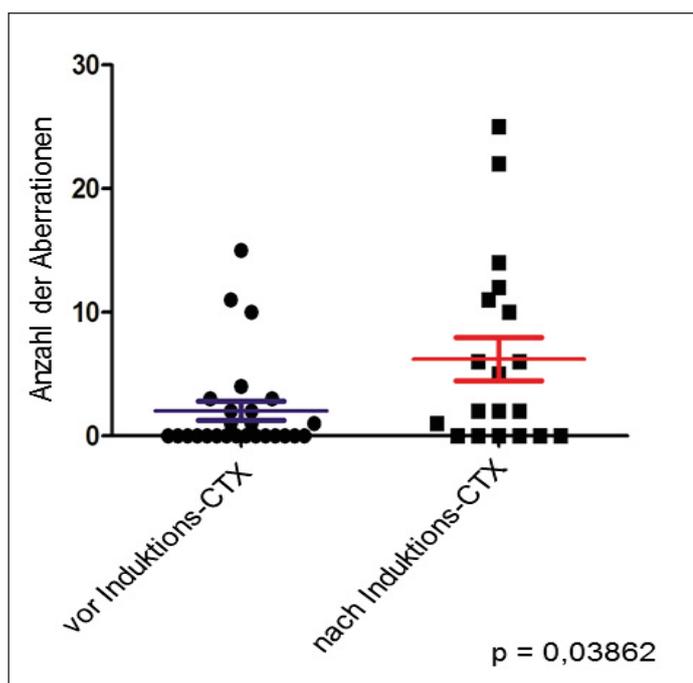
Tabelle 8: CTC vor bzw. nach Induktions-CTX mit Anzahl der Veränderungen pro Zelle

Vor Induktions-CTX				Nach Induktions-CTX			
CTC	chromo- somer Verlust	chromo- somer Zugewinn	gesamt	CTC	chromo- somer Verlust	chromo- somer Zugewinn	gesamt
01_CTC1	0	3	3	01_CTC1_C	0	2	2
2	-	-	-	02_CTC1_C	3	8	11
03_CTC1	0	0	0	03_CTC1_C	0	0	0
03_CTC2	0	0	0				
04_CTC1	0	0	0	04_CTC1_C	0	0	0
4				04_CTC2_C	0	5	5
05_CTC1	0	0	0	05_CTC1_C	0	2	2
05_CTC2	0	0	0				
06_CTC1	0	0	0	06_CTC1_C	0	0	0
6				06_CTC2_C	0	1	1
07_CTC1	0	0	0	07_CTC1_C	5	7	12
08_CTC1	2	9	11	08_CTC1_C	0	0	0
08_CTC2	0	0	0				
08_CTC3	0	0	0				
09_CTC1	2	8	10	09_CTC1_C	1	9	10
09_CTC2	0	1	1				
10_CTC1	0	1	1	10_CTC1_C	0	0	0
11_CTC1	0	0	0		-	-	-
11_CTC2	0	0	0		-	-	-
12_CTC1	0	0	0	12_CTC1_C	3	3	6
13_CTC1	0	0	0	13_CTC1_C	0	0	0
14_CTC1	0	2	2		-	-	-
15_CTC1	0	2	2		-	-	-
16_CTC1	1	3	4		-	-	-
17_CTC1	0	3	3	17_CTC1_C	1	1	2
17_CTC2	0	0	0	17_CTC2_C	5	9	14
18_CTC1	0	0	0	18_CTC1_C	2	4	6
18_CTC2	1	0	1				
18_CTC3	4	11	15				
19	-	-	-	19_CTC1_C	12	13	25
19	-	-	-	19_CTC2_C	7	15	22

**Tabelle 9: Anzahl bzw. relativer Anteil [in %] der CTCs vor bzw. nach Induktions-CTX mit bzw. ohne CGH-Veränderungen ( $\chi^2$ -Test:  $p = 0,083$ ).**

Zeitpunkt der CTC Gewinnung	CTC mit CGH-Veränderungen	CTC ohne CGH-Veränderungen	Gesamtanzahl der CTCs
vor Induktions-CTX	11 (42%)	15 (58%)	26
nach Induktions-CTX	13 (68%)	6 (32%)	19
Gesamtzahl der CTCs	24 (53%)	21 (47%)	45

Nachdem die CTCs in solche mit genomischen Veränderungen und ohne genomische Veränderungen unterteilt wurden, wurde die Anzahl der genomischen Aberrationen pro CTC (0-25 Aberrationen/Zelle) vor bzw. nach Induktions-CTX verglichen. Hierbei zeigte sich, dass bei Zellen nach Induktions-CTX die Anzahl der Aberrationen im Vergleich zu den Zellen vor Induktions-CTX signifikant erhöht war ( $p = 0,03862$ ) (Abbildung 6).



**Abb. 5: Anzahl der Aberrationen der einzelnen CTC**

Jede Zelle ist durch einen Kreis bzw. ein Quadrat dargestellt. Nach Induktions-CTX ( $n = 19$ ) stieg die Anzahl der genomischen Veränderungen/Zelle im Vergleich zu vor Induktions-CTX ( $n = 26$ ) signifikant an (Wilcoxon-Test:  $p = 0,03862$ ).

### 3.1.2 Einfluss der Induktions-CTX auf die genetischen Aberrationen

Nachdem in Kapitel 3.1.1 eine Zunahme der Anzahl der Aberrationen in den Zellen nach Induktions-CTX aufgezeigt werden konnte, wurde dies nun fallbezogen überprüft: Hierzu wurden die Aberrationen der CTCs von 13 Patientinnen vor und nach Induktions-CTX im Sinne eines Matched-Pair-Test verglichen. Eingeschlossen in diese Untersuchung wurde je eine CTC vor und eine CTC nach Induktions-CTX, bei mehreren Zellen/Patientin wurde jeweils die Zelle mit der höchsten Anzahl an genetischen Aberrationen gewählt. Bei vier Patientinnen zeigte sich nach Induktions-CTX eine Abnahme der genetischen Aberrationen/CTC, bei drei Patientinnen konnte kein Unterschied festgestellt werden und bei sechs Patientinnen kam es nach Induktions-CTX zur Zunahme der genomischen Veränderungen/CTC. Eine Signifikanz zwischen dem Aberrationsverhalten der CTCs zum jeweiligen Therapiezeitpunkt bezogen auf die einzelnen Patientinnen ergab sich nicht (Wilcoxon-Test:  $p = 0,191$ ). Dabei ist zu berücksichtigen, dass lediglich von 13 Patientinnen CTCs sowohl vor als auch nach Induktions-CTX untersucht wurden.

### 3.1.3 Klassifizierung der CTCs mit CGH-Veränderungen vor und nach Induktions-CTX

Zur Identifikation potentieller Muster der genomischen Aberrationen zwischen den CTCs wurden die CTCs mit chromosomalen Veränderungen (24/45 CTCs) für die folgenden Analysen berücksichtigt. Dabei stammten 11 CTCs aus Leukapherese-Proben vor und 13 CTCs aus Leukapherese-Proben nach Induktions-CTX.

Die Tabellen 10, 11 und 12 geben eine Übersicht über die chromosomalen Veränderungen der CTCs, unterteilt in Gesamtzahl der Veränderungen, chromosomale Zugewinne und chromosomale Verluste und in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Detektion. Bemerkenswert war hierbei eine 2,2fache Zunahme der genomischen Veränderungen nach Induktions-CTX von  $4,8 \pm \sigma 4,68$  auf  $9,1 \pm \sigma 7,4$ , wobei insbesondere die chromosomalen Verluste nach Induktions-CTX zunahmen. Nach Chemotherapie zeigte sich ein Anstieg der Deletionen um das 3,9fache, die chromosomalen Zugewinne stiegen um das 1,8fache an ohne jedoch signifikant zu sein.

**Tabelle 10: Gesamtzahl sowie mittlere Anzahl der CGH-Veränderungen vor bzw. nach Induktions-CTX (Wilcoxon-Test:  $p = 0,1396$ )**

Zeitpunkt der CTC Gewinnung	Gesamtanzahl der CGH-Veränderungen	Mittlere Anzahl an CGH-Veränderungen/Zelle
vor Induktions-CTX (n = 11)	53	$4,8 \pm \sigma 4,6$
nach Induktions-CTX (n = 13)	118	$9,1 \pm \sigma 7,4$

**Tabelle 11: Gesamtzahl sowie mittlere Anzahl der Deletionen vor bzw. nach Induktions-CTX (Wilcoxon-Test:  $p = 0,1048$ )**

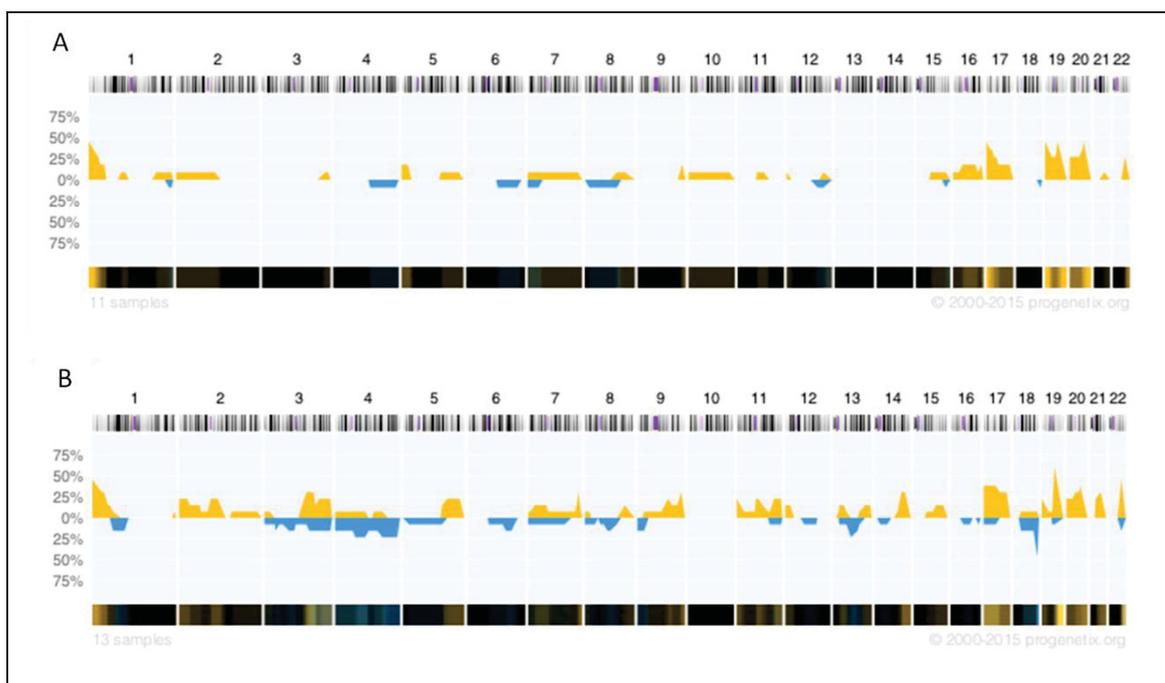
Zeitpunkt der CTC Gewinnung	Gesamtanzahl der chromosomalen Verluste	Mittlere Anzahl der chromosomalen Verluste pro Zelle
vor Induktions- CTX (n = 11)	10	$0,9 \pm \sigma 1,5$
nach Induktions-CTX (n = 13)	39	$3 \pm \sigma 3,4$

**Tabelle 12: Gesamtzahl sowie mittlere Anzahl der Amplifikationen vor bzw. nach Induktions-CTX (Wilcoxon-Test:  $p = 0,2466$ )**

Zeitpunkt der CTC Gewinnung	Gesamtanzahl der chromosomalen Zugewinne	Mittlere Anzahl der chromosomalen Zugewinne pro Zelle
vor Induktions- CTX (n = 11)	43	$3,9 \pm \sigma 3,5$
nach Induktions-CTX (n = 13)	79	$6,1 \pm \sigma 4,4$

### 3.1.4 Klassifizierung der CGH-Veränderungen auf den Chromosomen

Zur Visualisierung genomischer Veränderungen wurden mit dem Programm Progenetix ([www.progenetix.org](http://www.progenetix.org)) Histogramme aus den Zellkollektiven erstellt (Abbildungen 7), aus welchen sich die Verteilung der genomischen Aberrationen auf den einzelnen Chromosomen erfasst wurde. Hierbei wurden die genomischen Zugewinne (gelb) und die Verluste (blau) abgebildet.



**Abb. 7: Horizontales Histogramm der CTCs mit genomischen Veränderungen**

Häufigkeit chromosomaler Gewinne (gelb) und chromosomaler Verluste (blau) der CTCs entsprechend ihrer Lokalisation in %. A: CTCs aus Leukapheresaten vor Induktions-CTX (n = 11) B: CTCs aus Leukapheresaten nach Induktions-CTX (n = 13)

Aus den Histogrammen wird ersichtlich, dass es nach Induktions-CTX zu einer deutlichen Zunahme der genomischen Aberrationen gekommen ist. Vor der Induktions-CTX sind, abgesehen von Chromosomen 13 und 14, alle Chromosomen von Zugewinnen und/oder Verlusten betroffen, wobei Zugewinne vor allem an den Chromosomen 1, 17, 19 und 20 mit einer Häufigkeit von >25% zu finden sind. Nach der Induktions-CTX fand sich eine Zunahme der chromosomalen Veränderungen, welche sich unter Aussparung des Chromosoms 10 sehr heterogen verteilen. Vergleicht man die Histogramme der CTCs im Detail, so zeigte sich, dass sich die Zugewinne an den Chromosomen 1, 17, 19 und 20

vor Induktions-CTX ähnlich zu denen nach der Induktions-CTX verhalten. Für die Chromosomen 2, 20 und 21 ergaben sich hingegen weder vor noch nach Induktions-CTX Deletionen in der CGH sondern allein Amplifikationen. Für das Chromosom 6 fanden sich vor und nach Induktions-CTX allein Deletionen. Die genomischen Aberrationen der einzelnen CTCs sind in Tabelle 13 aufgeführt.

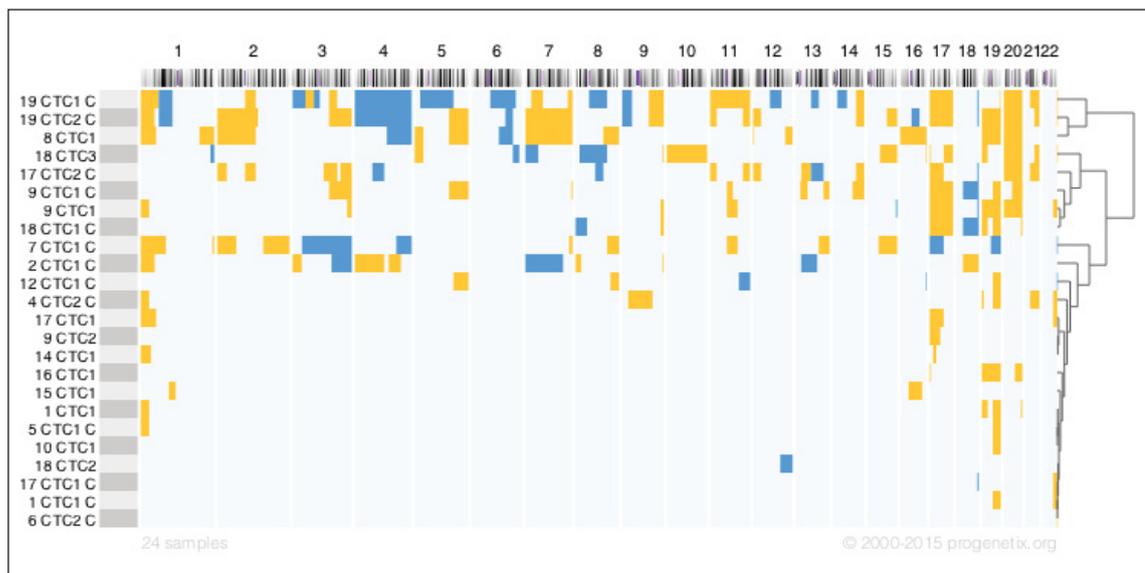
**Tabelle 13: CTCs und die Lokalisation ihrer genomischen Zugewinne (enh) und Verluste (dim) auf den einzelnen Chromosomen, p: kurzer und q langer Chromosomenarm**

CTC	Lokalisation der genomischen Aberrationen
1 CTC1	enh 1p36pter, 19p13pterq13qter, 20qter
1 CTC1 C	enh 19q13qter, 22q13qter
2 CTC1 C	dim 3q22qter, 7pterq31, 13q12q21 enh 1p34pter, 3p24pter, 4pterq22, 4q26q31, 8p22pter, 9qter, 18q12qter, Xp11qter
4 CTC2 C	enh 1p36pter, 9p21q22, 19pterq13qter, 21q21qter, 22q13qter
5 CTC1 C	enh 1p36pter, 19q13qter
6 CTC2 C	enh 22qter
7 CTC1 C	dim 3p22qter, 4q31qter, 17pterq21, 19q12q13, 22qter enh 1p31pterqter, 2p15pterq24qter, 7q36qter, 8q23qter, 11q12q14, 13q31qter, 15q15qter
8 CTC1	dim 4q25qter, 6q16q23 enh 1p33pterq32qter, 2pterq14, 5p14pterq23qter, 7pterqter, 8q22qter, 12pterq24qter, 16pterqter, 19pterqter, 20pterqter
9 CTC1	dim 15qter, 18qter enh 1p36pter, 3q27qter, 9q34qter, 11q12q14, 17pterqter, 19pterqter, 20pterqter, 22q13qter
9 CTC2	enh 17pterq12
9 CTC1 C	dim 18q12qter enh 3q21qter, 5q23qter, 7qter, 11q12q13, 13q11q13q32qter, 14q24qter, 17pterqter, 19q13qter, 20q11qter
10 CTC1	enh 19q13qter
12 CTC1 C	dim 11q22qter, 16qter, 22qter enh 5q31ter, 8q24qter, 19q13qter
14 CTC1	enh 1p35p36, 17p11p12
15 CTC1	enh 1p13p21, 16p11q22
16 CTC1	dim Xp11p22q22qter enh 17pter, 19pterqter, 20q12qter
17 CTC1	enh 1p33pter, 17pterq21, 22q13qter
17 CTC1 C	dim 18qter enh 22q13qter
17 CTC2 C	dim 4q13q22, 8q13q21, 13q21q31, 18qter, Xpterqter enh 2p23pterq11q14, 3q13q24q26qter, 11p15pterq23qter, 12p12pter, 13q12q14, 14q31qter, 17pterq21, 20pterqter, 21q21qter
18 CTC2	dim 12q22qter
18 CTC3	dim 1q43qter, 6q24q25, 7p14pter, 8p22q22 enh 5p14pter, 9qter, 10pterqter, 15q21qter, 16qter, 17pterq22qter, 19p13pter, 20pterqter, 21q22qter, 22qter, Xq25qter
18 CTC1 C	dim 8p12pter, 18q12qter enh 9q34qter, 17pterqter, 19p13pterq13qter, 20qter
19 CTC1 C	dim 1p21p31, 3p11p15, 4pterqter, 5p14q23, 6q12q24, 8q11q22, 9p21pter, 12q14q22, 13q21q22, 14q11q21, 18qter, Xq21q25 enh 1p32pter, 2q11q14, 3p14p21, 3q21q24, 7p11p15q35qter, 9q22qter, 11pterqter, 14q31qter, 17pterqter, 19qter, 20pterqter, 21q21qter, 22qter
19 CTC2 C	dim 1p21p31, 4pterqter, 6q22q23, 9p21pter, 16q11q21, 18qter, Xq21q2 enh 1p34pter, 2pterq21, 3q21qter, 5q23qter, 7pterqter, 9q22qter, 11p15pterq23qter, 12p12pter, 14q31qter, 15q23qter, 17pterqter, 19pterqter, 20pterqter, 21q22qter, 22qter

Da die untersuchten CTCs insgesamt ein sehr heterogenes Verteilungsmuster der genomischen Veränderungen zeigten, überprüften wir, inwieweit einzelne oder mehrere CTCs vergleichbare Aberrationsmuster aufzeigten. Hierzu wurden alle Zellen mit CGH-Veränderungen (n = 24) mittels Clusteranalyse durch das EDV-Programm Progenetix

(www.progenetix.org) untersucht (Abbildung 8). Hierzu wurden von 16 Patientinnen jeweils 1-3 Zellen in die Analyse eingeschlossen und der Verwandtschaftsgrad der einzelnen Zellen untereinander ermittelt und mittels Dendrogramm abgebildet. Hierbei spiegeln sowohl die Länge der Verbindungslinien bis zur jeweiligen Verzweigung als auch die Anzahl der Verzweigungen den Verwandtschaftsgrad der Zellen untereinander wider.

Das Ergebnis der Clusteranalyse unterstreicht, dass CTCs in ihren genomischen Veränderungen sehr heterogen sind. Weder Zellen, welche aus denselben Patientinnen stammten, noch der Zeitpunkt der Detektion der CTCs führten zu einem gemeinsamen oder ähnlichen Aberrationsmuster. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass lediglich 24 CTCs mit genomischen Veränderungen in der Einzelzell-CGH in die Auswertung eingeflossen sind und von denen immerhin 46% (n=11) drei oder weniger Aberrationen aufwiesen.



**Abb. 8: Ähnlichkeitsanalyse zirkulierender Tumorzellen mit genetischen Aberrationen**

CTCs mit chromosomalen Veränderungen vor (CTC) bzw. nach (CTC\_C) Induktions-CTX sind in den Zeilen dargestellt. Blau dargestellt sind chromosomale Verluste, gelb chromosomale Zugewinne. (www.progenetix.org). Oberhalb sind die Chromosomen mit ihrer Zahl angegeben. Das Dendrogramm rechtsseitig bildet durch die Länge der Verbindungslinien und die Anzahl der Aufzweigungen den Verwandtschaftsgrad der CTCs untereinander ab

### 3.2 Korrelation zwischen genomischen Aberrationen der CTCs und dem Auftreten eines Tumorrezidivs und dem Gesamtüberleben

Der Nachweis von CTCs ist ein prognostischer Faktor bei Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom. Zunehmend werden CTCs nun auch bei nicht metastasierten Mammakarzinompatientinnen untersucht. Unter anderem zeigten die Studien von Lucci *et al.* und Hall *et al.*, dass bei 24% Patientinnen, welche an einem nicht metastasierten Mammakarzinom erkrankt waren, CTCs identifiziert werden konnten. Hier zeigte sich, dass es bei  $\geq 1$  CTC/7,5 ml Blut sowohl zu einem erhöhten Rezidivrisiko als auch zu einem kürzeren Gesamtüberleben kam (Lucci *et al.* 2012, Hall *et al.* 2015). Die M0-Patientinnen, von denen die CTCs dieser Studie stammten, wurden im Rahmen der WSG-AM 01 Studie zur stammzellgestützten Hochdosis-Chemotherapie von Mai 1995 bis Juni 2002 beobachtet. Von 17 der 19 Patientinnen (89%) lagen die Nachsorgedaten bezüglich eines Tumorrezidivs und des Überlebenszeitraums vor. Von diesen 17 Patientinnen erkrankten zwölf Patientinnen an einem Tumorrezidiv (71%), fünf Patientinnen blieben rezidivfrei (29%). Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen sind in den Tabellen 14 und 15 abgebildet. Eine Signifikanz lag nicht vor.

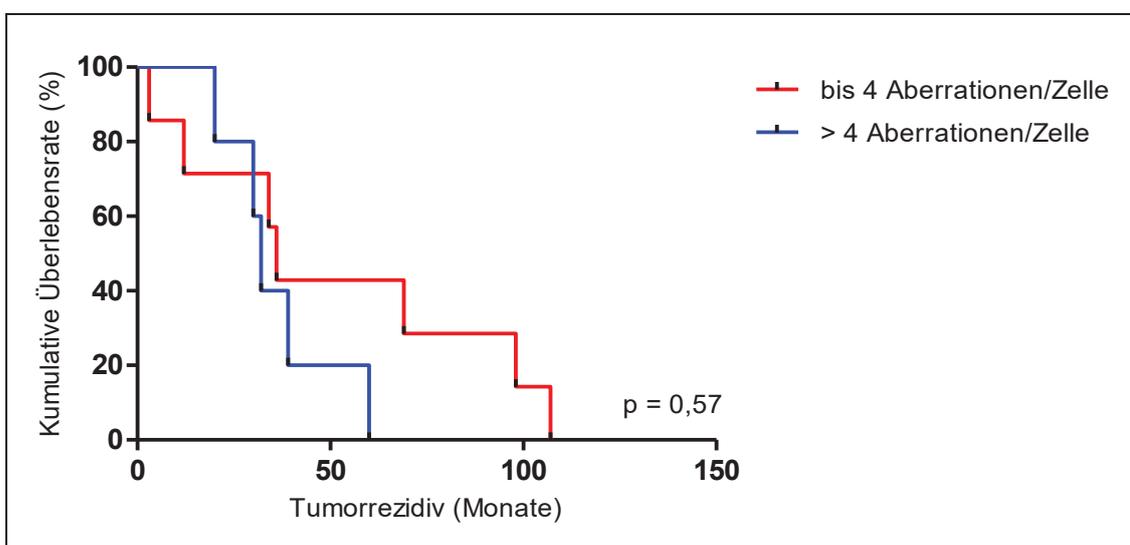
**Tabelle 14: Anzahl und relative Häufigkeit [in %] der Patientinnen mit und ohne chromosomalen Veränderungen in den CTCs bezogen auf ein Tumorrezidiv. (Fischer's Exact Test:  $p = 0,676$ )**

Tumor-Status	Patientinnen mit Veränderungen in den CTCs	Patientinnen ohne Veränderungen in den CTCs
Tumorrezidiv (n = 12)	10 (58,8%)	2 (11,8%)
kein Tumorrezidiv (n = 5)	4 (23,5%)	1 (5,9%)

**Tabelle 15: Anzahl und relative Häufigkeit [in %] der CTCs mit und ohne chromosomalen Veränderung bezogen auf ein Tumorrezidiv. (Fischer's Exact Test:  $p = 0,593$ )**

Tumor-Status	CTCs mit Veränderungen (n = 18)	CTCs ohne Veränderungen (n = 19)
Tumorrezidiv (n = 12)	12 (71%)	13 (76%)
kein Tumorrezidiv (n = 5)	6 (35%)	6 (35%)

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Nachweis chromosomaler Aberrationen in den CTCs mit dem rezidivfreien Gesamtüberleben korreliert. Zur Dichotomisierung der zwölf Patientinnen, welche an einem Tumorrezidiv erkrankten, wurden die untersuchten Zellen in zwei Gruppen randomisiert: Zellen mit bis zu 4 Aberrationen/Zelle ( $n = 7$ ) und Zellen mit mehr als 4 Aberrationen/Zellen ( $n = 5$ ). Lagen bei den Patientinnen mehr als eine Zelle vor, so wurde die Zelle mit der höchsten Anzahl an genomischen Aberrationen in die Auswertung eingeschlossen (Abbildung 9). In den Kaplan-Meyer-Analysen konnte keine Signifikanz zwischen einer erhöhten Anzahl an genomischen Veränderungen und dem Auftreten eines Tumorrezidivs nachgewiesen werden ( $p = 0,57$ ).



**Abb. 9: Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit der Anzahl der chromosomalen Veränderungen ihrer CTCs**

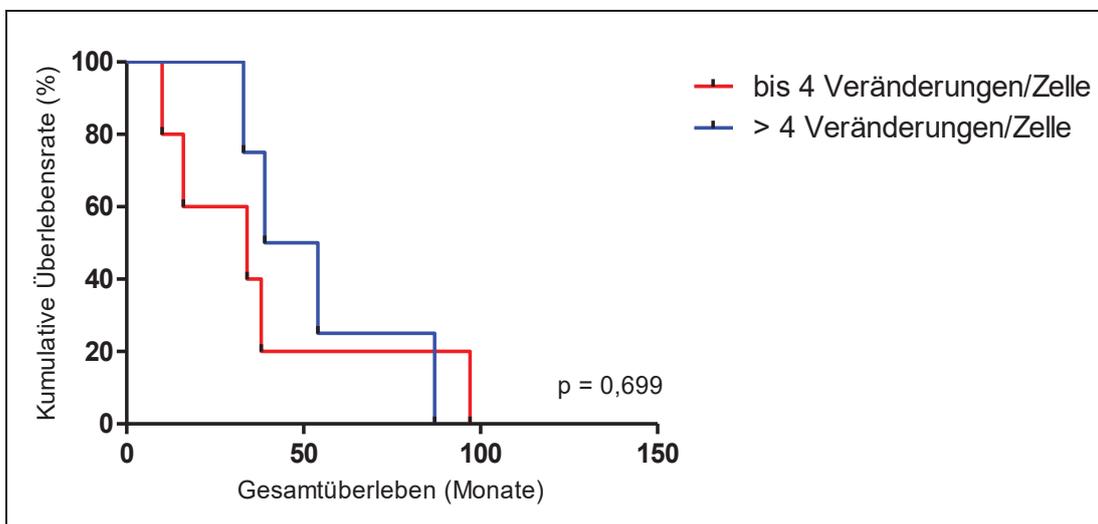
Anschließend wurde betrachtet, ob eine erhöhte Anzahl an genomischen Veränderungen mit einem kürzeren Gesamtüberleben einhergeht. Hierzu lagen die Überlebensdaten von 17 Patientinnen vor (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Zusammenhang zwischen dem Überleben und Zellen mit bzw. ohne chromosomale Veränderungen in der CGH**

Mortalität	Patientinnen mit Veränderungen in den CTCs (n = 14)	Patientinnen ohne Veränderungen in den CTCs (n = 3)
Verstorben (n = 9)	9 (52,9%)	1 (5,9%)
nicht Verstorben (n = 8)	5 (29,4%)	2 (11,8%)

Auch hier bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Versterben und dem Nachweis von CTCs mit genomischen Veränderungen.

Darüber hinaus zeigte sich kein Einfluss hinsichtlich der Anzahl der Veränderungen in den CTCs auf das Überleben. Um dies zu überprüfen wurden die untersuchten Zellen der zehn verstorbenen Patientinnen in zwei Gruppen unterteilt: Zellen mit bis zu 4 genomischen Aberrationen/Zelle ( $n = 5$ ) und Zellen mit mehr als 4 Aberrationen/Zelle ( $n = 4$ ). Lagen bei den Patientinnen mehr als eine Zelle vor, so wurde die Zelle mit der höchsten Anzahl an genomischen Aberrationen eingeschlossen (Abbildung 10). Es konnte keine Signifikanz zwischen einer erhöhten Anzahl an genomischen Veränderungen und dem Überleben der Patientinnen nachgewiesen werden ( $p = 0,699$ ).



**Abb. 10: Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit von der Anzahl der chromosomalen Veränderungen ihrer CTCs**

## 4 Diskussion und Schlussfolgerungen

In den 80er/90er Jahren wurde vor dem Hintergrund der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Zytostatika und Karzinom der Fokus auf aggressivere Therapien gesetzt (Frei *et al.* 1980) und zunehmend die Hochdosis-Chemotherapie angewandt. Diese führte neben der angestrebten Tumorzellreduktion zur prolongierten Knochenmarkssuppression, wodurch unter anderem die Rate an Infektionen, geschuldet der induzierten Leukopenie, stieg. Um der Knochenmarkssuppression entgegen zu wirken, wurden im Anschluss an die Hochdosis-Chemotherapie autologe Stammzellen transplantiert, die zuvor mittels Leukapherese gewonnen worden waren (Berry *et al.* 2011.).

Die westdeutsche Studiengruppe (WSG) führte eine Studie zur stammzellgestützten Hochdosis-Chemotherapie bei Patientinnen mit neun und mehr befallenen Lymphknoten ohne Fernmetastasierung durch (Nitz *et al.* 2005). Um mononukleäre Zellen für diese Studie zu gewinnen, wurden die Leukapheresen im Anschluss an die operative Tumorresektion (R0) und vor bzw. nach Induktions-CTX von November 1995 bis April 1998 durchgeführt (Nitz *et al.* 2005). Nachdem ein Teil der Leukapherese-Produkte für Forschungszwecke kryokonserviert worden war, hatte unsere Arbeitsgruppe die Möglichkeit, diese konservierten Leukapherese-Produkte auf CK-positive Zellen zu untersuchen, welche die gleiche Dichte wie mononukleäre Zellen aufweisen (Fischer *et al.* 2013).

Zum Nachweis potentieller CTCs waren CK-positive Zellen mithilfe des Anti-Cytokeratin-Antikörper A45-B/B3 detektiert worden, welcher gegen die Cytokeratine 8, 18 und 19 gerichtet ist (Fischer *et al.* 2013). In mehr als 90% der Leukapherese-Produkte, welche von Patientinnen mit einem nicht metastasierten Mammakarzinom gewonnen worden waren, haben wir CK-positive Zellen detektiert. Im Mittel konnten dabei 0,86 CK-positive CTCs pro  $10^6$  mononukleäre Zellen identifiziert werden, was einer 20fach höheren Konzentration als in den zuvor veröffentlichten Studien zur Einzelzell-Isolation aus dem peripheren Blut entspricht (Fischer *et al.* 2013). Beispielsweise waren in vorangehenden Studien CTCs bei etwa 60% der Patientinnen mit einem fortgeschrittenen, metastasierten Mammakarzinom detektiert worden (Li *et al.* 2014). Demgegenüber waren in einer weiteren Studie zur adjuvanten Situation beim nicht-

metastasierten Brustkrebs CTCs lediglich bei 20% der untersuchten Patientinnen nachgewiesen worden (Rack *et al.* 2014). Mit einer Ausbeute von über 90% an CK-positiven Zellen aus den Leukapheresaten konnte gezeigt werden, dass die Zellausbeute effizienter ist, wenn im Vergleich zu den genannten Studien sehr große Mengen Blut in die Untersuchung eingehen (Fischer *et al.* 2013): Mittels Leukapherese kann man das gesamte zirkulierende Blut derart filtern, dass während der Prozedur mit summarisch etwa 25 l Blutvolumen ein Vielfaches des menschlichen Blutvolumens mehrfach gefiltert wird. Mit anderen Verfahren werden in der Regel lediglich 1-10 ml Blut untersucht. Somit konnte für die vorliegende Forschungsarbeit mithilfe der Leukapherese eine deutlich höhere Anzahl von CK-positiven Zellen in M0-Patientinnen zur weiteren Charakterisierung von Merkmalen und biologischen Eigenschaften gewonnen werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, mehrfache Bestimmungen - beispielsweise zum Therapiemonitoring vor und nach Chemotherapie – zu verschiedenen Zeitpunkten vorzunehmen. Die Leukapherese liefert gegenüber den herkömmlichen Blutvolumina nicht nur eine viel größere Menge Blut zur Filtration, sondern ist im Vergleich zur alternativen Knochenmarkspunktion zur Gewinnung von disseminierten Tumorzellen für die Patientinnen auch weit weniger belastend (Fischer *et al.* 2013).

Während des Forschungsprojektes zur Untersuchung der Leukapherese-Produkte auf CK-positive Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Subgruppe der detektierten CK-positiven Zellen mittels Einzelzell-CGH untersucht. Ziel der Arbeit war es, die isolierten CK-positiven Zellen aus den Leukapherese-Produkten durch den Nachweis und die Charakterisierung chromosomaler Veränderungen als maligne Tumorzellen zu identifizieren. Da die Leukapherese-Produkte sowohl vor als auch nach Induktions-CTX gewonnen worden, konnten CK-positive Zellen im Verlauf einer systemischen Therapie zu unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden 45 CK-positive Zellen mittels CGH untersucht. Für die Publikation der Daten wurden im späteren Verlauf weitere Einzelzell-Analysen von CK-positiven Zellen durchgeführt und sind in die Auswertungen der publizierten Arbeit „*Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients*“ (Fischer *et al.* 2013) mit eingeflossen.

#### 4.1 Identifizierung CK-positiver Zellen als maligne Tumorzellen bei M0-Patientinnen

Durch die Untersuchung der historischen Leukapherese-Produkte von Patientinnen mit einem nicht metastasierten Tumorleiden (M0) bestand die Möglichkeit zu testen, ob bereits bei Patientinnen ohne Anhalt für eine Fernmetastasierung CTCs mit genomischen Aberrationen als Ausdruck der chromosomalen Instabilität im Blut vorliegen.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 45 CK-positive Zellen mittels Einzelzell-CGH untersucht, von denen 26 CK-positive Zellen vor und 19 nach Induktions-CTX isoliert werden konnten. Mittels Einzelzell-CGH konnten bei 53% der CK-positiven Zellen genomische Veränderungen nachgewiesen werden, von welchen 68% nach Induktions-CTX isoliert worden waren. Dementsprechend zeigten 47% der isolierten CK-positiven Zellen keine in der CGH fassbaren genomische Veränderungen. Von den Zellen mit einem balancierten CGH-Profil wurden 58% vor Induktions-CTX und 32% nach Induktions-CTX detektiert. Analog dazu hätte unsere Arbeitsgruppe zeigen können, dass es zu einer Reduktion der durchschnittlichen Anzahl der CK-positiven Zellen nach der Induktions-CTX kam (1,86 vs. 0,57 pro Patientin) (Fischer *et al.* 2013).

Nun lässt sich die Vermutung aufstellen, dass CK-positive Zellen ohne bzw. mit wenigen Aberrationen durch die Induktions-CTX therapiert wurden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass CTCs mit genetischen Aberrationen aufgrund von bisher nicht nachgewiesenen Resistenzmechanismen eine Chemotherapie überstehen und durch diese möglicherweise selektioniert werden. Zwar war nach Chemotherapie eine geringere Anzahl an CK-positiven Zellen nachzuweisen, jedoch zeigten diese Zellen eine signifikant höhere Zahl chromosomaler Aberrationen. Eine weitere Erklärung für die Zunahme der genomisch aberranten CTCs nach Induktions-CTX könnte sein, dass während der Induktions-CTX und der Stammzellmobilisation vermehrt hämatopoetische Stammzellen und mit diesen potenzielle Mikrometastasen aus dem Knochenmark mobilisiert (Ho *et al.* 1993) wurden. Diese These wird von Brugger *et al.* (1994) unterstützt: Die Autoren zeigten, dass nach Chemotherapie mit Stammzellsupport die Kontamination des peripheren Blutes mit zirkulierenden Tumorzellen um 30% anstieg. Dieser Hypothese zufolge müsste dann allerdings auch die Anzahl der CK-positiven Zellen nach der Induktions-CTX ansteigen, wobei die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe jedoch zeigen konnten, dass es nach der Induktions-CTX zu einer

Abnahme der CK-positiven Zellen kam (veröffentlicht in Fischer *et al.* 2013). Im Zuge der CGH-Analysen der CTCs zeigte sich darüber hinaus ein signifikanter Anstieg der Anzahl der genomischen Veränderungen in den CK-positiven Zellen, die nach Induktions-CTX isoliert worden waren (Wilcoxon-Test:  $p = 0,03862$ ). Dabei zeigte sich, dass die mittlere Anzahl der CGH-Veränderungen pro Zelle nach der Induktions-CTX - ohne Signifikanzniveau zu erreichen bei einer Fallzahl von 19 Patientinnen - von  $4,8 \pm \sigma 4,6$  auf  $9,1 \pm \sigma 7,4$  ansteigt (Wilcoxon-Test:  $p = 0.14$ ). Möglicherweise finden sich mit diesen Beobachtungen weitere Hinweise für die Vermutung, dass unter der Chemotherapie wie dargelegt behandlungsresistente zirkulierende Tumorzellen mit deutlich stärkerer chromosomaler Instabilität selektioniert werden, wie dies in der vergleichsweise hohen Anzahl der genomischen Veränderungen dieser Zellen zum Ausdruck kommt.

Schmidt-Kittler *et al.* untersuchten DTCs aus Knochenmarkaspiraten von Patientinnen mit einem Mammakarzinom in einer adjuvanten (M0) wie auch in einer metastasierten Situation (M1). Hier konnten analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in etwa 50% der untersuchten DTC von M0-Patientinnen mittels CGH keine genomischen Veränderungen detektiert werden, wohingegen mit gleicher Methodik bei 91% der M1-Patientinnen Zellen mit genomischen Veränderungen nachgewiesen wurden (Schmidt-Kittler *et al.* 2003).

Mit der Metaphasen-CGH kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den CK-positiven Zellen trotz balanciertem CGH-Profil um Tumorzellen handelt (Jeuken *et al.* 2002). Da in der CGH genomische Aberrationen lediglich bis zu einer Auflösung von etwa 10 bis 20 Mb sichtbar gemacht werden (Jeuken *et al.* 2002), können mit dieser Methode kleinere Aberrationen oder Punktmutationen nicht detektiert werden. Mit weiterentwickelten, höher auflösenden Verfahren wie z.B. der Array-CGH (Czyż *et al.* 2014) oder dem Whole-genome-sequencing (Schmidt-Kittler *et al.* 2003) wird es zukünftig möglich sein, genomische Veränderungen auf Einzelzell-Ebene nicht nur exemplarisch sondern auch in größeren Kollektiven von unter 0,1 Mb abzubilden. Dabei konnten auch beim Mammakarzinom bereits bei CGH-negativen Zellen Allelverluste bestimmter Tumorgene nachgewiesen werden und diese Zellen trotz balanciertem CGH-Profil als Tumorzellen identifiziert werden (Schmidt-Kittler *et al.* 2003). Da in dieser Arbeit CTCs nicht mit höher auflösenden Methoden untersucht werden konnten, muss zunächst offen bleiben, ob es sich im untersuchten Patientinnen-Kollektiv bei den CK-

positiven Zellen ohne nachweisbare Veränderungen in der CGH um maligne Tumorzellen handelt.

Betrachtet man die genomischen Veränderungen der Zellen insgesamt, ergeben sich aus den vorgenommenen Analysen sehr heterogene Aberrationsmuster. Beim Vergleich der Aberrationsmuster zum Zeitpunkt der Zellgewinnung, d.h. vor bzw. nach Induktions-CTX, fielen chromosomale Zugewinne vor allem an die Chromosomen 1, 17, 19 und 20 auf. Ähnliche Ergebnisse waren bereits in anderen Studien durch Analyse von primären Mammakarzinomen erhoben worden: Dabei wurden gehäufte Zugewinne auf den Chromosomen 1q, 8q, 11q, 16p, 17q, 20q und 19 sowie Verluste auf den Chromosomen 6q, 17p, 16q, 22q und 3p beschrieben (Zhang *et al.* 2015). Betrachtet man nun die Veränderungen der CTCs der vorliegenden Arbeit im Einzelnen, so waren die Zugewinne vor allem auf Chromosom 1p (11 Zugewinne in 12 untersuchten Zellen), ein einzelner Zugewinn war auf Chromosom 1q zu finden. Analog zu den o.g. Ergebnissen für die Primärtumoren zeigte sich auf den Chromosomen 17 und 20 der CTCs der q-Arm stets aberrant. Des Weiteren fiel auf, dass es sich bei den in den CTCs detektierten Veränderungen auf Chromosom 6 nur um Deletionen handelte und diese in allen Fällen auf dem q-Arm zu finden waren. Somit zeigte sich, dass bei einer insgesamt sehr heterogenen Ausprägung der genomischen Veränderungen in den CTCs der vorliegenden Studie einige der gehäuft beobachteten chromosomalen Aberrationen mit denen von Primärtumoren übereinstimmen, sodass gemeinsame tumorspezifische Alterationen zwischen Primarius und CTC denkbar wären.

Demgegenüber zeigte sich in der Ähnlichkeitsanalyse der chromosomalen Aberrationen für das vorliegende Untersuchungskollektiv, dass zwischen Zellen, welche aus derselben Patientin stammten, keine nachvollziehbare Übereinstimmung des Aberrationsmusters im Sinne einer klonalen Selektion vorlag. Dies wurde zuvor bereits in mehreren Studien auch für andere solide Tumorentitäten (Prostatakarzinome, gastrointestinale Tumoren) beschrieben, in welchen DTC aus M0-Patienten untersucht worden waren (Schmidt-Kittler *et al.* 2003, Klein *et al.* 2002). Die genetische Heterogenität von CTCs und DTCs würde ob der sich daraus potenziell ergebenden Therapieresistenzen eine Erklärung liefern, warum systemische Therapien aktuell nicht im zu erwartenden Maße greifen können mit der fatalen Folge, dass es zu letalen Tumorrezidiven und Metastasen kommt.

## 4.2 Prognostische Relevanz der CTCs in der metastasierten und nicht metastasierten Situation

Eine weitere Frage, die mit dieser Arbeit beantwortet werden sollte war, in wie weit die Anzahl der genomischen Aberrationen pro zirkulierender Tumorzelle Einfluss auf das rezidivfreie Überleben bzw. das Gesamtüberleben der Patientinnen hat. Hintergrund für die Überlegung war, dass sich bei Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom die Aberrationszahlen in DTCs im Vergleich zur M0-Situation verdoppeln (Schmidt-Kittler 2003). Die klinische Konsequenz daraus wäre, dass Patientinnen möglicherweise anhand der Anzahl der genomischen Aberrationen pro CTC als Hochrisikopatientinnen für Rezidive oder Metastase zu identifizieren und infolgedessen ggf. ergänzende Therapien oder eine engmaschigere Nachkontrolle durchzuführen wären.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein sicherer Zusammenhang zwischen der Anzahl der genomischen Veränderungen pro Zelle und dem rezidivfreien Überleben bzw. dem Gesamtüberleben der Patientinnen nachgewiesen werden. Obgleich bei 10 von 12 der Tumorrezidiv-Patientinnen bzw. 9 von 10 der verstorbenen Patientinnen deutliche genomische Veränderungen nachgewiesen wurden, erscheint das Patientinnenkollektiv (n = 19) noch zu klein, um hier einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl genomischer Aberrationen pro Zelle und dem Krankheitsverlaufs prognostisch postulieren zu können.

Entgegen der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit konnte die Arbeit von Fischer *et al.*, in welcher ein Teil der CTCs aus dieser Arbeit in die Analyse einfluss, zeigen, dass bei >10 Aberrationen pro CTC in den transplantierten Aphaeseprodukten (nach Induktions-CTX) ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben vorlag (Fischer *et al.* 2013). Diese Diskrepanz ist damit zu erklären, dass bei Fischer *et al.* 65 Einzelzellen von 19 Patientinnen untersucht wurden, in der vorliegenden Arbeit sind 45 Zellen von 19 Patientinnen in die Analyse mit eingeflossen.

Es wurde in mehreren Studien belegt, dass der prinzipielle Nachweis und die Anzahl der CTCs beim metastasierten Mammakarzinom eine prognostische Rolle spielen und bezüglich eines Therapieansprechens als Prognosemarker genutzt werden können (Cristofanilli *et al.* 2004, Nolé *et al.* 2008). Beim metastasierten Mammakarzinom hatte sich dabei für die Detektion von mehr als 5 CTC pro 7,5 ml Blut eine vergleichsweise schlechtere Prognose sowie ein kürzeres Gesamtüberleben gezeigt (Bidard *et al.* 2014,

Cristofanilli *et al.* 2004). Nachdem sich CTCs als prognostischer Faktor beim metastasierten Mammakarzinom etablieren, wird dieser Zusammenhang vermehrt auch für Mammakarzinom-Patientinnen im M0-Stadium untersucht. In der Studie von Lucci *et al.* wurde bei 24% der Patientinnen, welche an einem nicht metastasierten Mammakarzinom erkrankt waren, CTCs identifiziert. Hier zeigte sich, dass mit dem Nachweis von mehr als 1 CTC pro 7,5 ml Blut sowohl ein erhöhtes Rezidivrisiko als auch ein verkürztes Gesamtüberleben assoziiert war (Lucci *et al.* 2012, Hall *et al.* 2015).

Die Bedeutung der CTCs für die Prognose des metastasierten wie auch nicht metastasierten Mammakarzinoms wurde somit in verschiedenen Studien herausgestellt. In dieser Arbeit konnte jedoch kein sicherer Zusammenhang zwischen der Anzahl genomischer Aberrationen pro CTC und der Prognose nachgewiesen werden. Da aber das Vorhandensein von CTCs über zahlreiche Tumorentitäten hinweg mit einem erhöhten Rezidivrisiko einhergeht, bedarf es weiterer Untersuchungen an größeren Patientinnenkollektiven, um potenzielle Zielstrukturen in den CTCs zu identifizieren und diese dann individueller therapieren zu können.

### **4.3 Konsequenzen der Identifikation von CTCs in M0-Patientinnen für die autologe Stammzelltransplantation**

In dieser Arbeit wurden mittels CGH bei 53% von insgesamt 45 CK-positiven Zellen aus Leukapherese-Produkten genomische Aberrationen nachgewiesen, womit sich die isolierten Einzelzellen als CTCs erwiesen haben. Dies zeigt analog zu anderen Studien, dass im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation eine reale Gefahr der Retransfusion maligner Zellen besteht (Müller *et al.* 2012). In mehreren Studien wurde bereits belegt, dass durch Leukapherese neben mononukleären Zellen auch CTCs detektiert wurden (Negrin *et al.* 2000, Pecora *et al.* 2002, Ross *et al.* 1993). Shimoni *et al.* zeigten zusätzlich, dass es nach einer Autotransplantation hämatopoetischer Stammzellen im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie im Vergleich zu einer allogenen Transplantation zu vermehrten Tumorrezidiven kam (Shimoni *et al.* 2002). Solano *et al.* untersuchten im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie-Studie Leukapherese-Produkte von Mammakarzinompatientinnen auf CTCs. In 27,4% der Fälle konnten CTCs nachgewiesen werden. 71% der Patientinnen, welche im Rahmen der Studie CTC-positive Leukapherese-Produkte autotransplantiert wurden, erkrankten an einem Tumorrezidiv. Im Vergleich dazu erkrankten nur 27% der

Patientinnen mit CTC-negativen Leukapherese-Produkten an einem Tumorrezidiv. Das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben bei CTC-positiven Leukapherese-Produkte lag bei 23%, bei CTC-negativen Leukapherese-Produkte lag es mit 75% deutlich höher. Das rezidivfreie 5-Jahres-Überleben von Patientinnen, die CTC-positive Leukapherese-Produkte erhalten haben, betrug 42%; für Patientinnen mit negativen Leukapherese-Produkten betrug sie 83% (Solano *et al.* 2001).

Die weitere Studie von Müller *et al.* ergab, dass es zu einer Reduktion der Tumor-Rezidivrate kam, wenn Stammzellprodukte vor Autotransplantation aufgereinigt wurden (Müller *et al.* 2012). Hier wurden Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom mittels Hochdosis-Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation behandelt. Die Stammzellen wurden vor der Transplantation aufgereinigt, so dass eine Reinfusion der CTCs ausblieb. Zwölf Jahre nach Abschluss der Studie lebten noch 23% der Patientinnen. Retrospektiv wurden zusätzlich Patientinnen analysiert, die die gleiche Hochdosis-Chemotherapie erhalten haben, jedoch nicht aufgereinigte Stammzellprodukte transfundiert bekamen. In dieser Patientinnengruppe lebten lediglich noch 9% der Patientinnen und 7% waren rezidivfrei (Müller *et al.* 2012). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es sich bei den aus Leukapherese-Produkten isolierten CK-positiven Zellen um Tumorzellen handelt. Vor dem Hintergrund, dass es nach Reinfusion nicht aufgereinigter Stammzellen zu vermehrten Rezidivraten bzw. eines verkürzten Gesamtüberlebens kommt ist es von Bedeutung, dass Stammzellprodukte vor Autotransplantation aufgereinigt (*Purging*) werden.

Nach Chemotherapie mit Stammzellsupport konnte ein Anstieg der Kontamination des peripheren Blutes mit zirkulierenden Tumorzellen um 30% belegt werden (Brugger *et al.* 1994). Nach einem weiteren Zyklus Chemotherapie kam es zu einer deutlichen Abnahme zirkulierender Tumorzellen, so dass man mit diesem *in-vivo-Purging* eine Tumorzellkontamination der Leukapherese-Produkte reduzieren kann (Bock *et al.* 1998). Ähnliche Effekte wurden im hier analysierten Patientenkollektiv beobachtet. Nach Induktions-CTX kam es zu einem Abfall der CK-positiven Zellen in den Leukapherese-Produkten (veröffentlicht in Fischer *et al.* 2013). Eine weitere Möglichkeit des *Purging* ist eine Selektion der Stammzellen anhand ihrer CD34-Antigene. Dies kann durch eine Positivselektion mit Anti-CD34-Antikörpern und anschließender Immunadsorptionssäule, Magnettrennverfahren oder durchflusszytometrischer FACS-Sortierung erreicht werden (Bock *et al.* 1998). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, maligne Zellen mittels monoklonaler Antikörper gegen spezifische Oberflächenantigene

der Tumorzellen zu selektieren, indem diese beispielsweise durch Komplementeinwirkung oder Immunkonjugate zerstört werden (Bock *et al.* 1998). Zwar lässt sich mit diesen Methoden die CTC-Kontamination reduzieren, jedoch wird keine Tumorfreiheit erreicht (Bock *et al.* 1998). Führt man sich nun vor Augen, dass die CTCs dieser Arbeit nach Induktions-CTX eine höhere Anzahl an genetischen Aberrationen aufweisen, bleibt die Frage offen, ob diese Zellen im weiteren Verlauf zunehmende Resistenzmechanismen gegen eine Chemotherapie entwickeln können und es somit zu einer schnell fortschreitenden Tumorausbreitung kommen könnte. Hier sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um Zielstrukturen für eine systemische Therapie zu identifizieren.

#### 4.4 Schlussfolgerungen

Trotz frühzeitiger Diagnose und differenzierter operativer sowie systemischer Therapie von primären Mammakarzinomen versterben viele Patientinnen aufgrund der Ausbildung von Metastasen, welche sich oft erst nach langer Latenzzeit manifestieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden CK-positive Tumorzellen aus historischen Leukapherese-Produkten von metastasefreien Patientinnen (M0) vor und nach Induktions-CTX gewonnen und auf zirkulierende CK-positive Zellen untersucht. Die genomische Untersuchung des isolierten CK-positiven Zellkollektivs konnte zeigen, dass bereits bei M0-Patientinnen CTCs vorhanden sind, die in etwa 50% der Fälle die für Tumorzellen typischen, heterogenen genomischen Aberrationsmuster als Ausdruck ihrer genetischen Instabilität aufwiesen und somit als potenzielle Vorläufer späterer Metastasen betrachtet werden können. Nach Induktions-CTX konnte eine signifikant höhere Anzahl an genomisch aberranten CTCs identifiziert werden analog zu den Ergebnissen vorangehender Studien, in welchen die Untersuchung disseminierter Tumorzellen von Mammakarzinom-Patientinnen in einer adjuvanten Situation bei gleichfalls 50% der CTC genomische Veränderungen in der CGH aufwiesen.

Während bei Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom ist die prognostische Relevanz der CTCs bereits gesichert ist (Cristofanilli *et al.* 2004), fließen bei nicht-metastasierten Patientinnen derzeit zumeist allein die klinisch-pathologischen Parameter wie Tumorgröße, Lymphknoten-Status, Hormonrezeptor-Status und der HER2-Status in die Planung ihres Therapiekonzeptes ein (Banys-Paluchowski *et al.* 2015), obgleich Tumorzellen bereits im M0-Stadium bei Mammakarzinompatientinnen

prinzipiell nachgewiesen werden können (Zhang *et al.* 2012, Cristofanilli *et al.* 2004). Die vorliegende Arbeit bestätigt die Relevanz dieser CTCs für das Verständnis, die Beurteilung und die Behandlung des nicht-metastasierten Mammakarzinoms, indem es durch die Anreicherung und Isolation von zirkulierenden Tumorzellen aus diagnostischen Leukapherese-Präparaten (DLA) und deren anschließende genomischen Analyse gelungen ist, prognostisch relevante, maligne CTCs mit einer im Vergleich zu anderen Methoden signifikant höheren Sensitivität und Spezifität zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorbehandlung zu gewinnen und zu charakterisieren. Auch gelingt es mit der vorgestellten Methode, beschriebene genotypische Unterschiede zwischen den Eigenschaften des Primärtumors, der Metastasen und der CTCs zu untersuchen (Wallwiener *et al.* 2015, Banys-Paluchowski *et al.* 2015): So könnten etwa Patientinnen mit einem HER2-negativen Primärtumor und jedoch HER2-positiven CTCs durchaus von einer zielgerichteten und individuell angepassten adjuvanten Therapie profitieren. Diese Punkte sollten in die initialen Therapiefindung bei Patientinnen mit einem nicht metastasierten Mammakarzinom eingehen und könnten bei der Therapieüberwachung berücksichtigt werden, um etwa bei Progress der Erkrankung eingehen, die Therapiestrategie frühzeitig ändern zu können.

Trotz der Einteilung der Patientinnen in intrinsische Subtypen unter Berücksichtigung ihrer histopathologischen Eigenschaften und einer sich an diesen orientierender Therapiekonzeption erkrankten Patientinnen im späteren Krankheitsverlauf weiterhin häufig an Tumorrezidiven. Mit den Erfahrungen der vorliegenden Untersuchung können CTCs nun in deutlich größerer Zahl für weiterführende und noch hochauflösendere genetische Analysen gewonnen werden, wie diese zu einem besseren Verständnis der Biologie und zur weiteren Charakterisierung von Mammakarzinomen erforderlich sind. Erst mit der fortgeführten Differenzierung und Analyse der zellulären Veränderungen auf den verschiedenen Expressionsebenen zwischen Genom, Transkriptom und Proteom sowohl in den Primärtumoren als auch in den zirkulierenden Tumorzellen und Metastasen werden sich mittelfristig neue Zielstrukturen für eine gezieltere und effektivere adjuvante Therapie des Mammakarzinoms ergeben können.

## 5 Literaturverzeichnis

- Agelaki S, Kalykaki A, Markomanolaki H, Papadaki MA, Kallergi G, Hatzidaki D, Kalbakis K, Mavroudis D, Georgoulas V. (2015). “Efficacy of Lapatinib in Therapy-Resistant HER2-Positive Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer”. *PloS one*. 10 (6): e0123683.
- Alizart M, Saunus J, Cummings M, Lakhani SR (2012). “Molecular classification of breast carcinoma”. *Diagnostic Histopathology*. 18 (3): 97–103.
- Arneson N, Hughes S, Houlston R, Done, S (2008). “Whole-Genome Amplification by Degenerate Oligonucleotide Primed PCR (DOP-PCR)”. *CSH protocols*. 2008. pdb.prot4919.
- Banys-Paluchowski M, Schneck H, Blassl C, Schultz S, Meier-Stiegen F, Niederacher D, Krawczyk N, Ruckhaeberle E, Fehm T, Neubauer H (2015). “Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Molecular Subtypes of Breast Cancer”. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 75 (3): 232–237.
- Bauerfeind I (2011). *Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Manual*. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität, 13., überarbeitete Auflage, Zuckschwerdt, München.
- Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Wallwiener D, Solomayer EF (2005). “Her2 expression on disseminated tumor cells from bone marrow of breast cancer patients”. *Anticancer research*. 25 (3): 2171–2175.
- Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, Grisanti S, Generali D, Garcia-Saenz JA, Stebbing J, Caldas C, Gazzaniga P, Manso L, Zamarchi R, Lascoiti AF de, Mattos-Arruda L de, Ignatiadis M, Lebofsky Z, van Laere SJ, Meier-Stiegen F, Sandri MT, Vidal-Martinez J, Politaki Z, Consoli F, Bottini A, Diaz-Rubio E, Krell J, Dawson SJ, Raimondi C, Rutten A, Janni W, Munzone E, Carañana V, Agelaki S, Almici C, Dirix L, Solomayer EF, Zorzino L, Johannes H, Reis-Filho JS, Pantel K, Pierga JY, Michiels S (2014). “Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer. A pooled analysis of individual patient data”. *The Lancet Oncology*. 15 (4): 406–414.
- Bock TA, Scheduling S, Brugger W, Kanz L. (1998) “In-vitro und In-vivo-Manipulation hämatopoetischer Stammzellen für die Hochdosischemotherapie”. *Tumorerkrankungen*. 2. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg.: 88-102
- Böcker W, Hungermann D, Decker T (2009). “Anatomie der Brustdrüse”. *Der Pathologe*. 30 (1): 6–12.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GYC, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K

- (2005). "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer". *The New England journal of medicine*. 353 (8): 793–802.
- Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L (1994). „Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors." *Blood*. 83(3):636-40.
- Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ (2015). "Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015". *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 26 (8): 1533–1546.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen Leon WMM, Hayes DF (2004). "Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer". *The New England journal of medicine*. 351 (8): 781–791.
- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen Leon WMM (2005). "Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer". *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23 (7): 1420–1430.
- Czyż ZT, Hoffmann M, Schlimok G, Polzer B, Klein CA (2014). "Reliable single cell array CGH for clinical samples". *PloS one*. 9 (1): e85907.
- Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG, Steele K, Coombes RC, Clink HM, Powles TJ, Ford HT, Gazet JC, Neville AM (1981). "Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen". *British journal of cancer*. 44 (1): 85–90.
- Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, Burke JF (2008). "Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients". *Breast cancer research BCR*. 10 (4): R69.
- Edler von Koch F, Ataseven B, Cengic N, Delius M, Waal JC de, Engel J (2007). "Klinik der In-situ-Karzinome" in Janni W. *Mammakarzinome, Manual Tumorzentrum München*. 11. überarbeitete Auflage. Zuckschwerdt, München: 77–84.
- Engel J, Beinert T, Delius M, Hölzel D, Schubert-Fritschle, G (2007). "Epidemiologie" in Janni W. *Mammakarzinome, Manual Tumorzentrum München*, 11. überarbeitete Auflage. Zuckschwerdt, München: 1–11.
- Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, Kimmig R, Kasimir-Bauer S (2009). "Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells". *Breast cancer research BCR*. 11 (4): R59.
- Fischer JC, Niederacher D, Topp SA, Honisch E, Schumacher S, Schmitz N, Zacarias Föhrding L, Vay C, Hoffmann I, Kasprowicz NS, Hepp PG, Mohrmann S, Nitz U,

- Stresemann A, Krahn T, Henze T, Griebisch E, Raba K, Rox JM, Wenzel F, Sproll C, Janni W, Fehm T, Klein CA, Knoefel WT, Stoecklein NH (2013). “Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients”. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 110 (41): 16580–16585.
- Frick H, Leonhardt H, Starck D (1992). Allgemeine Anatomie. Spezielle Anatomie 1: Extremitäten, Rumpfwand, Kopf, Hals. Flexibles Taschenbuch Med, mit Schlüssel zum Gegenstandskatalog; Band 1, 4. überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Frick H, Leonhardt H, Starck D (1992). “Weibliche Brust” in Frick H, Leonhardt H, Starck D. Allgemeine Anatomie. Spezielle Anatomie 1: Extremitäten, Rumpfwand, Kopf, Hals, Flexibles Taschenbuch Med, 4., überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart: 558–562.
- Funke I, Anthuber C, Bauerfeind I, Waal JC de, Eiermann W, Engel J, Füger T, Gabka C, Hamann U, Heitland A, Höß C, Kolben M, Löhns B, Raab G, Weiß E, Wolf C (2007). “Operative Therapie des primären Mammakarzinoms und Rekonstruktionsverfahren” in Janni W. Mammakarzinome, ManualmTumorzentrum München, 11. überarbeitete Auflage, Zuckschwerdt, München: 104–113.
- Gainer SM, Lodhi AK, Bhattacharyya A, Krishnamurthy S, Kuerer HM, Lucci A (2012). “Invasive lobular carcinoma predicts micrometastasis in breast cancer”. The Journal of surgical research. 177 (1): 93–96.
- Gevensleben H, Serçe N, Büttner R (2010). „Hereditary breast and ovarian cancers”. Pathologe. 31(6):438-44.
- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ (2013). “Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013”. Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology ESMO. 24 (9): 2206–2223.
- Haag P, Hanhart N, Müller M, Kottler U, Menzer C, Nickenig A, Sander M, Thömmel U, Wirth S (2005). “Mamma” in Haag P, Hanhart N, Müller M. Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis: Inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Andrologie und Venerologie. Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen 2005/06. 2. Auflage, Medizinische Verlags- und Informations-Dienste. Breisach am Rhein: 82–83.
- Haag P, Hanhart N, Müller M (2005). Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis: Inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Andrologie u. Venerologie. Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen 2005/06. 2. Auflage, Medizinische Verlags- und Informations-Dienste. Breisach am Rhein.
- Hall C, Karhade M, Laubacher B, Anderson A, Kuerer H, DeSynder S, Lucci A (2015). “Circulating Tumor Cells After Neoadjuvant Chemotherapy in Stage I-III Triple-Negative Breast Cancer”, Annals of surgical oncology.

- Harbeck N, Huober J, Piccart-Gebhart M (2015). Zielgerichtete Therapien beim Mammakarzinom: Der Praxisguide ; mit 13 Tabellen, Schattauer, Stuttgart.
- Helissey C, Berger F, Cottu P, Diéras V, Mignot L, Servois V, Bouleuc C, Asselain B, Pelissier S, Vaucher I, Pierga JY, Bidard FC (2015). “Circulating tumor cell thresholds and survival scores in advanced metastatic breast cancer: the observational step of the CirCe01 phase III trial”. *Cancer letters*. 360 (2): 213–218.
- Ho AD, Glück S, Germond C, Sinoff C, Dietz G, Maruyama M, Corringham RE (1993). “Optimal timing for collections of blood progenitor cells following induction chemotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for autologous transplantation in advanced breast cancer”. *Leukemia*. 7 (11): 1738–1746.
- Huang L, Ma F, Chapman A, Lu S, Xie XS (2015). “Single-Cell Whole-Genome Amplification and Sequencing: Methodology and Applications”. *Annual review of genomics and human genetics*.
- Huober J, Salmen J, Janni W (2015) “Zielgerichtete endokrine Therapie beim Mammakarzinom” in Harbeck N, Huober J, Piccart-Gebhart M. Zielgerichtete Therapien beim Mammakarzinom: Der Praxisguide ; mit 13 Tabellen, Schattauer, Stuttgart: 11–29.
- Imle A, Polzer B, Alexander S, Klein CA, Friedl P (2009). “Genomic instability of micronucleated cells revealed by single-cell comparative genomic hybridization”. *Cytometry. Part A the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 75 (7): 562–568.
- Janni W (2007). Mammakarzinome. Manual Tumorzentrum München, 11.überarbeitete Auflage, Zuckschwerdt, München.
- Jeuken JWM, Sprenger SHE, Wesseling P (2002). “Comparative genomic hybridization: practical guidelines”. *Diagnostic molecular pathology the American journal of surgical pathology, part B*. 11 (4): 193–203.
- Kallergi G, Agelaki S, Papadaki MA, Nasias D, Matikas A, Mavroudis D, Georgoulas V (2015). “Expression of truncated human epidermal growth factor receptor 2 on circulating tumor cells of breast cancer patients”. *Breast cancer research BCR*. 17: 113.
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G (1999). “Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (8): 4494–4499.
- Klein CA, Blankenstein TJF, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmüller G (2002). “Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer”, *Lancet (London, England)*. 360 (9334): 683–689.
- Koch J, Rack B, Messina C, Müller V, Fehm T, Janni W, Sotiriou C, Pierga J, Piccart M, Ignatiadis M (2014). “Die TREAT-CTC-Studie (EORTC 90091–10093/BIG 1–12)–ein neuer Ansatz zur Therapie von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) beim frühen

- Mammakarzinom". *Senologie-Zeitschrift für Mammadiagnostik und –therapie*. 11 (02).
- Li L, Liu Y, Zhang S, Wang T, Bian L, Wu S, Song S, Liu B, Jiang Z (2014). "Detection of circulating tumor cells and its clinical value for different stages and various subtypes of breast cancer". *Zhonghua yi xue za zhi*. 94 (36): 2812–2815.
- Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, Bhattacharyya A, Anderson AE, Xiao L, Bedrosian I, Kuerer HM, Krishnamurthy S (2012). "Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study". *The Lancet. Oncology*. 13 (7): 688–695.
- Lv Q, Gong L, Zhang T, Ye J, Chai L, Ni C, Mao Y (2015). "Prognostic value of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a systemic review and meta-analysis". *Clinical & translational oncology official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*.
- Maltoni R, Fici P, Amadori D, Gallerani G, Cocchi C, Zoli M, Rocca A, Ceconetto L, Folli S, Scarpi E, Serra P, Fabbri F (2015). "Circulating tumor cells in early breast cancer: A connection with vascular invasion". *Cancer letters*. 367 (1): 43–48.
- Mayr D, Dettmar P, Högel B, Nährig J, Sotlar K (2011). "Pathologie der Mammakarzinome und der intraepithelialen Proliferationen der Mamma" in Bauerfeind I. *Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Manual Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. 13. überarbeitete Auflage. Zuckschwerdt, München: 57–83.
- Möhlendick B, Bartenhagen C, Behrens B, Honisch E, Raba K, Knoefel WT, Stoecklein NH (2013). "A robust method to analyze copy number alterations of less than 100 kb in single cells using oligonucleotide array CGH". *PloS one*. 8 (6): e67031.
- Müller AMS, Kohrt HEK, Cha S, Laport G, Klein J, Guardino AE, Johnston LJ, Stockerl-Goldstein KE, Hanania E, Juttner C, Blume KG, Negrin RS, Weissman IL, Shizuru JA (2012). "Long-term outcome of patients with metastatic breast cancer treated with high-dose chemotherapy and transplantation of purified autologous hematopoietic stem cells". *Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 18 (1): 125–133.
- Müller V, Riethdorf S, Rack B, Janni W, Fasching PA, Solomayer E, Aktas B, Kasimir-Bauer S, Pantel K, Fehm T (2012) "Prognostic impact of circulating tumor cells assessed with the CellSearch System™ and AdnaTest Breast™ in metastatic breast cancer patients: the DETECT study". *Breast cancer research BCR*. 14 (4): R118.
- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M (2007). "Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology". *Nature*. 450 (7173): 1235–1239.
- Nährig J, Högel B, Marlow S, Mayr D, Permanetter W (2007). "Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge" in Janni W. *Mammakarzinome*. Manual Tumorzentrum München, 11. überarbeitete Auflage. Zuckschwerdt, München: 49–76.

- Negrin RS, Atkinson K, Leemhuis T, Hanania E, Juttner C, Tierney K, Hu WW, Johnston LJ, Shizuru JA, Stockerl-Goldstein KE, Blume KG, Weissman IL, Bower S, Baynes R, Dansey R, Karanes C, Peters W, Klein J (2000). "Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer". *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 6 (3): 262–271.
- Nitz UA, Mohrmann S, Fischer J, Lindemann W, Berdel WE, Jackisch C, Werner C, Ziske C, Kirchner H, Metzner B, Souchon R, Ruffert U, Schütt G, Pollmanns A, Schmoll HJ, Middecke C, Baltzer J, Schrader I, Wiebringhaus H, Ko Y, Rösler S, Schwenzer T, Wernet P, Hinke A, Bender HG, Frick M (2005). "Comparison of rapidly cycled tandem high-dose chemotherapy plus peripheral-blood stem-cell support versus dose-dense conventional chemotherapy for adjuvant treatment of high-risk breast cancer: results of a multicentre phase III trial", *Lancet* (London, England). 366 (9501): 1935–1944.
- Nolé F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, Medici M, Verri E, Adamoli L, Rotmensz N, Goldhirsch A, Sandri MT (2008). "Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications", *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology ESMO*. 19 (5): 891–897.
- Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B (2004). "Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics". *Clinical genetics*. 66 (6): 488–495.
- Pecora AL, Lazarus HM, Jennis AA, Preti RA, Goldberg SL, Rowley SD, Cantwell S, Cooper BW, Copelan EA, Herzig RH, Meagher R, Kennedy M, Akard LP, Jansen J, Ross A, Prilutskaya M, Glassco J, Kahn D, Moss TJ (2002). "Breast cancer cell contamination of blood stem cell products in patients with metastatic breast cancer. Predictors and clinical relevance". *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 8 (10): 536–543.
- Polzer B (2006). „Identifizierung und Charakterisierung metastatischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark beim Prostatakarzinom“. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Rack B, Andergassen U, Neugebauer J, Salmen J, Hepp P, Sommer H, Lichtenegger W, Friese K, Beckmann MW, Hauner D, Hauner H, Janni W (2010). "The German SUCCESS C Study-The First European Lifestyle Study on Breast Cancer". *Breast care* (Basel, Switzerland). 5 (6): 395–400.
- Rack B, Andergassen U, Janni W, Neugebauer J.(2012). „CTCs in primary breast cancer (I)“. *Recent Results Cancer Res*. 2012;195:179-85.
- Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, Friedl TWP., Lorenz R, Tesch H, Fasching PA, Fehm T, Schneeweiss A, Lichtenegger W, Beckmann MW, Friese K, Pantel K, Janni W (2014). "Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients". *Journal of the National Cancer Institute*. 106 5.

- Riede UN, Bianchi L (2004). Allgemeine und spezielle Pathologie: 168 Tabellen. 5. komplett überarbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart.
- Riede UN, Werner M, Schaefer HE (2004). "Brustdrüse" in Riede UN, Bianchi L, Allgemeine und spezielle Pathologie: 168 Tabellen. 5. komplett überarbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart: 967–980.
- Riethdorf S, Pantel K (2008) "Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization". *Pathobiology journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 75 (2): 140–148.
- Robert Koch-Institut (2017). Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes-Krebs in Deutschland 2015/2016. Gesundheitsberichterstattung für Deutschland. 11. Ausgabe, neue Ausgabe. Robert Koch-Institut, Berlin.
- Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, Tallman MS, Kennedy MJ, Davidson NE, Sweet D (1993). "Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques". *Blood*. 82 (9): 2605–2610.
- Ross JS, Slodkowska EA (2009). "Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer". *American journal of clinical pathology*. 132 (2): 237–245.
- Schaffer P, Ataseven B, Herbst M, Höß C, Lindner H, Nikolajek K, Riepl M, Röper B, Sommer H, Stadler P, Wypior HJ (2007). "Radioonkologische Behandlung" in Janni W. Mammakarzinome. Manual Tumorzentrum München. 11. überarbeitete Auflage. Zuckschwerdt, München: 114–127.
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein T, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Müller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmüller G, Eils R, Klein CA (2003). "From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (13): 7737–7742.
- Schramm A, Friedl T, Jäger B, Huober J, Rack B, Trapp E, Fasching P, Taran F, Hartkopf A, Schneeweiss A, Müller V, Aktas B, Pantel K, Meier-Stiegen F, Tesch H, Wimberger P, Kümmel S, Gebauer G, Doering G, Janni W, Fehm T (2015). "Die DETECT-Studien. Zirkulierende Tumorzellen (CTC) beim metastasierten Mammakarzinom (MBC)". *Senologie-Zeitschrift für Mammadiagnostik und –therapie*. 12 (02).
- Shimoni A, Körbling M (2002). "Tumor cell contamination in re-infused stem cell autografts. Does it have clinical significance?". *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 41 (2): 241–250.
- Slamon D, Clark G, Wong S, Levin W, Ullrich A, McGuire W (1987). "Human breast cancer. Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene". *Science*. 235 (4785): 177–182.

- Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, Tejwani S, Schott AF, O'Rourke MA, Lew DL, Doyle GV, Gralow JR, Livingston RB, Hayes DF (2014). "Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500". *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 32 (31): 3483–3489.
- Solano C, Badia B, Lluch A, Marugan I, Benet I, Arbona C, Prosper F, García-Conde J (2001). "Prognostic significance of the immunocytochemical detection of contaminating tumor cells (CTC) in apheresis products of patients with high-risk breast cancer treated with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation". *Bone marrow transplantation*. 27 (3): 287–293.
- Sugai T, Habano W (2016). "Pathological Diagnosis and Its Molecular Basis in Colorectal Cancer". *Gan To Kagaku Ryoho*. 43(3):294-9.
- Wallwiener M, Hartkopf AD, Riethdorf S, Nees J, Sprick MR, Schönfisch B, Taran FA, Heil J, Sohn C, Pantel K, Trumpp A, Schneeweiss A (2015). "The impact of HER2 phenotype of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a retrospective study in 107 patients". *BMC cancer*. 15: 403.
- Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models". *Nature reviews. Cancer*. 5 (8): 591–602.
- Weinberg RA (2007). "Moving out: Invasion and Metastasis" in Weinberg RA. *The biology of cancer*. GS Garland Science, New York, NY: 587–654.
- Weinberg RA (2007). *The biology of cancer*. GS Garland Science, New York, NY.
- Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ (1999). "Comparative genomic hybridisation". *Molecular pathology MP*. 52 (5): 243–251.
- Wendt O (2004). *Entwicklung einer spulenintegrierten und automatisch gesteuerten Biopsieeinrichtung zur histologischen Abklärung von Kleintumoren in der MR Mammadiagnostik*. Dissertation. Carité Universitätsmedizin Berlin.
- Wülfing P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zänker KS, Kiesel L, Brandt B (2006). "HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients". *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research*. 12 (6): 1715–1720.
- Würstlein R, Harbeck N (2015). "Zielgerichtete Therapie bei HER2-positiven Tumoren" in Harbeck N, Huober J, Piccart-Gebhart M. *Zielgerichtete Therapien beim Mammakarzinom: Der Praxisguide mit 13 Tabellen*. Schattauer, Stuttgart: 51–83.
- Zhang J, Zhang H, Xu X, Wang M, Yu Z (2015). "Comparative genomic hybridization analysis of invasive ductal breast carcinomas in the Chinese population". *Oncol Lett*. 10(4): 2100-2106.

## 6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Knoefel bedanken, unter dessen Leitung ich diese Arbeit durchführen durfte. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für die Freiräume bedanken, die er mir zur Fertigstellung der Arbeit eingeräumt hat.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Professor Stoecklein bedanken, der das Thema dieser Arbeit gestellt und mir stets mit seiner großen Hilfsbereitschaft und Fachkunde zur Seite stand. Auch möchte ich mich bei ihm für seine Zeit und Geduld bedanken, die er mir im Rahmen der Fertigstellung entgegengebracht hat.

Bei Herrn Dr. Christian Vay möchte ich mich für das Korrekturlesen herzlich bedanken. Besonderen Dank möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe aussprechen, insbesondere Frau Dr. Sarah Schumacher, für die freundliche, konstruktive Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft.

Letztlich möchte ich besonders meinen Eltern Ulrike und Peter Schmitz sowie meiner Tante Margret Wöbel herzlichst bedanken, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet, mir dieses ermöglicht und in diesem stets unterstützt haben.