

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Prof. Dr. med. Tanja Fehm

**Prognostische Bedeutung der Tumorzell dissemination bei
Patientinnen mit primärem Mammakarzinom in Abhängigkeit vom
immunhistochemischen Subtyp**

- retrospektive Analyse eines Patientenkollektivs aus der
Universitätsfrauenklinik der Jahre 2014-2017 -

Dissertation

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

vorgelegt von
Benjamin Moritz Haane

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Günter Niegisch

Zusammenfassung

Das primäre, nicht-metastasierte Mammakarzinom kann sich Jahre nach einer erfolgreichen Therapie des Primärtumors erneut in Form von Fernmetastasen manifestieren. Als mögliche Ursache gelten einzelne, bereits früh aus dem Primärtumor gestreute Tumorzellen, die im Knochenmark (KM) als disseminierte Tumorzellen (DTC) verweilen. In der aktuell herkömmlichen Staging-Diagnostik werden DTCs im KM nicht routinemäßig erfasst. Die Detektion von DTCs zum Zeitpunkt der Diagnose ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Die intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms korrelieren ebenfalls mit Unterschieden im klinischen Verlauf und der Prognose. Als Folge der prognostischen Aussagekraft der Subtypen und des DTC-Status wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich die Tumorzell-dissemination und ihr prognostischer Wert unter immunhistochemisch (IHC) differenzierten Subtypen unterscheidet.

Die DTC-Bestimmung im KM-Aspirat von 290 Patientinnen erfolgte mittels Immunfluoreszenz-Färbung mit dem Pan-Zytokeratin-Antikörper AE1/AE3. Assoziationen zwischen klinisch-pathologischen Parametern und dem DTC-Status wurden mittels Chi-Quadrat-Test oder exaktem Test nach Fisher auf Unabhängigkeit untersucht. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 35,9 Monate. Es erfolgte die Gruppierung in die IHC-Subtypen Luminal A, Luminal B, *human-epidermal-growth-factor-2*-positiv (HER2+) und triple-negativ (TNBC). Überlebensanalysen zum Gesamtüberleben (OS), brustkrebspezifischen Überleben (BCSS), krankheitsfreien Überleben (DFS) und metastasenfrem Überleben (DDFS) wurden mittels Kaplan-Meier-Plots dargestellt und mittels log-rank Tests verglichen. Die prognostische Aussagekraft des DTC-Status unter Hinzunahme weiterer klinisch-pathologischer Prognosefaktoren wurde anhand des proportionalen Hazardmodells nach Cox untersucht.

DTCs ließen sich bei 47/238 (19,7%) der therapienaiven Patientinnen im KM-Aspirat nachweisen. DTC-Detektion war signifikant mit höheren T-Stadien assoziiert ($p = 0,035$) und war signifikant häufiger bei Patientinnen über 60 Jahren ($p = 0,026$). DTC-positive Patientinnen mit Luminal A-Tumoren hatten ein signifikant schlechteres BCSS (log-rank Test, $p = 0,04$), DFS (log-rank Test, $p = 0,005$) und DDFS (log-rank Test, $p = 0,006$) als DTC-negative Luminal A-Patientinnen. Darüber hinaus hatten DTC-positive Patientinnen mit TNBC im Vergleich zu DTC-negativen TNBC-Patientinnen ein signifikant schlechteres OS (log-rank Test, $p = 0,012$) und BCSS (log-rank Test, $p = 0,012$). Unter Luminal B-Tumoren und unter Tumoren vom HER2-positiven Subtyp zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der beobachteten Endpunkte.

Während ein positiver DTC-Status in Abhängigkeit vom Luminal A- bzw. dem TNBC-Subtyp in dieser Studie einen signifikanten Einfluss auf das Überleben von Patientinnen mit primärem, nicht-metastasierten Mammakarzinom zeigte, so konnte er im Gegensatz zu anderen Studien nicht als von anderen Parametern unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt werden. Weitere Untersuchungen und längere Nachbeobachtungen sind nötig, um ihren prognostischen Wert unter Mammakarzinom-Subtypen zu beurteilen.

Abstract

Early breast cancer may relapse in distant sites even years after complete surgical excision of the primary tumor and adjuvant therapy. One plausible explanation is early dissemination of single tumor cells via the blood stream that may persist as disseminated tumor cells (DTC) in the bone marrow (BM) causing long latency periods between primary tumor treatment and distant metastasis. DTCs are not detected by current radiological or pathological staging methods. DTC detection in the BM at time of diagnosis is known to be associated with poor outcome. Likewise, intrinsic breast cancer subtypes correlate with differences in clinical course and prognosis. As a consequence of the prognostic value of both the DTC status and breast cancer subtype, this study aims to examine possible differences in DTC detection and its prognostic value within different breast cancer subtypes differentiated by immunohistochemistry (IHC).

DTC-Detection was performed in 290 Patients using immunofluorescent microscopy and staining of BM aspirates using the pan-cytokeratin antibody AE1/AE3.

Independence of associations between patient characteristics and DTC status was analyzed using chi square or fisher's exact test. Median follow up was 35,9 months. Patients were grouped into IHC-determined Subtypes Luminal A, Luminal B, human-epidermal-growth-factor-2 positive (HER2+), and triple negative Subtype (TNBC).

The influence of DTC status on overall survival (OS), breast cancer specific survival (BCSS), disease-free survival (DFS) and distant disease-free survival (DDFS) was determined using Kaplan-Meier estimates (log-rank test) and univariable analysis. A multivariable analysis of survival was performed using a cox proportional hazards model.

DTCs were detected in the BM of 47/238 (19.7 %) of therapy naïve patients. DTC detection was significantly associated with larger tumors ($p = 0.026$) as well as age (over 60 years old; $p = 0.026$). DTC-positive luminal A patients had significantly shorter BCSS (log-rank test, $p = 0.04$), DFS (log-rank Test, $p = 0.005$) and DDFS (log-rank Test, $p = 0.006$) when compared to DTC negative luminal A patients. Moreover, patients with TNBC and DTCs in their BM had significantly worse OS (log-rank Test, $p = 0.012$) and BCSS (log-rank Test, $p = 0.012$). Luminal B patients and HER2+ patients showed no significant differences in survival between DTC-positive and DTC-negative groups.

While DTC-positivity was significantly associated with an impaired prognosis of luminal A and TNBC patients with early breast cancer, the present study failed to show independence of this prognostic marker when other clinicopathological variables were considered. Further studies and a longer follow up interval are necessary to assess their prognostic value within breast cancer subtypes.

Abkürzungsverzeichnis

<i>BET</i>	<i>brusterhaltende Therapie</i>
<i>BRCA1</i>	<i>Breast Cancer 1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Breast Cancer 2</i>
<i>CK</i>	<i>Zytokeratin</i>
<i>CTC</i>	<i>zirkulierende Tumorzellen</i>
<i>DCIS</i>	<i>Duktales carcinoma in situ</i>
<i>DTC</i>	<i>disseminierte Tumorzellen</i>
<i>EMT</i>	<i>epithelial-mesenchymale Transition</i>
<i>ER</i>	<i>Östrogenrezeptor</i>
<i>HER2</i>	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
<i>HR</i>	<i>Hormonrezeptor</i>
<i>IRS</i>	<i>immunreaktiver Score</i>
<i>MET</i>	<i>mesenchymal-epitheliale Transition</i>
<i>NACT</i>	<i>Neoadjuvante Chemotherapie</i>
<i>NST</i>	<i>invasive Karzinome ohne speziellen Typ</i>
<i>pCR</i>	<i>pathologische Komplettremission</i>
<i>PR</i>	<i>Progesteronrezeptor</i>
<i>RT</i>	<i>Radiotherapie</i>
<i>SNLB</i>	<i>Sentinellymphknotenbiopsie</i>
<i>SRE</i>	<i>skelettassoziierte Ereignisse</i>
<i>TNBC</i>	<i>triple-negatives Mammakarzinom</i>
<i>UICC</i>	<i>Union internationale contre le cancer</i>
<i>UKD</i>	<i>Universitätsklinikum Düsseldorf</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung - Das primäre, nicht-metastasierte Mammakarzinom der Frau	6
1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	6
1.2 Klassifikation und Stadieneinteilung.....	7
1.3 Immunhistochemische Subtypisierung.....	8
1.3.1 Hormonrezeptorstatus (ER-/PR-Status).....	8
1.3.2 HER2-Status.....	9
1.3.3 Ki-67-Proliferationsindex	9
1.3.4 Molekulare und immunhistochemische Subtypen	10
1.4 Therapiemöglichkeiten	11
1.5 Prognosefaktoren.....	15
1.5.1 Die Heterogenität des Mammakarzinoms.....	15
1.5.2 Etablierte prognostische und prädiktive Faktoren.....	16
1.6 Die Tumorzell dissemination	17
1.6.1 Die minimale Tumorersterkrankung	17
1.6.2 Der Prozess der Tumorzell dissemination und Metastasierung	17
1.6.3 Prognostische Relevanz disseminierter Tumorzellen.....	21
1.7 Ziele der Arbeit	22
2 Patientinnenkollektiv und Methoden	24
2.1 Studiendesign, Einschlusskriterien und Untersuchungszeitraum	24
2.2 Datenerfassung und Ethikvotum	24
2.3 Patientinnenkollektiv	25
2.4 Immunhistochemische Subtypisierung.....	28
2.5 DTC-Nachweis.....	29
2.6 Systemische Therapie	33
2.7 Nachbeobachtung	33
2.8 Statistische Methode.....	34
3 Ergebnisse.....	37
3.1 Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark	37
3.2 Assoziationen zwischen DTC-Status und klinisch-pathologischen Parametern..	38
3.2.1 Alter	38
3.2.2 Menopausenstatus.....	38
3.2.3 Histologie	39
3.2.4 Tumorgröße.....	39
3.2.5 Nodalstatus	40
3.2.6 Grading	40
3.2.7 Ki-67-Proliferationsindex	41
3.2.8 Hormonrezeptorstatus.....	41

3.2.9	HER2-Status.....	42
3.2.10	Immunhistochemischer Subtyp	43
3.3	Überlebensanalysen.....	43
3.3.1	Beobachtete Sterbefälle, Lokalrezidive und Fernmetastasen.....	44
3.3.2	DTC-Status und Gesamtüberleben bzw. brustkrebspezifisches Überleben ...	45
3.3.3	DTC-Status und krankheitsfreies bzw. metastasenfreies Überleben.....	49
3.3.4	DTC-Status, Immunhistochemischer Subtyp und Prognose.....	53
3.3.5	Gemeinsamer Einfluss des DTC-Status und weiterer klinisch-pathologischer Parameter auf das Überleben	56
3.3.5.1	Multivariable Analyse des Gesamtüberlebens und des brustkrebspezifischen Überlebens	56
3.3.5.2	Multivariable Analyse des krankheitsfreien und metastasenfreien Überlebens	58
3.4	Bisphosphonate	61
3.5	Neoadjuvante Systemtherapie und DTC-Status.....	62
3.6	DTC-Detektion im duktalem Carcinoma in situ (DCIS).....	63
4	Diskussion.....	64
4.1	Vorbemerkung.....	64
4.2	Patientinnenkollektiv	65
4.3	DTC-Detektion im Knochenmark.....	66
4.4	DTC-Nachweis mittels pan-Zytokeratin Antikörper AE1/AE3.....	67
4.5	Diskussion der Ergebnisse einzelner Untersuchungsaspekte	69
4.5.1	DTC-Detektion im nicht-metastasierten Mammakarzinom.....	69
4.5.2	NACT und DTC-Detektion.....	71
4.5.3	Prognostischer Wert des DTC-Status in Überlebensanalysen	72
4.5.4	Disseminierte Tumorzellen in immunhistochemischen Subtypen des Mammakarzinoms.....	75
4.5.5	Bisphosphonate und DTCs.....	79
4.5.6	DTC-Detektion bei DCIS	80
4.6	Limitationen der Arbeit	81
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick.....	83
5	Literaturverzeichnis.....	85
6	Anhang	99
6.1	Überprüfung der Annahme proportionaler Hazards.....	99
6.2	Tabellenverzeichnis.....	100
6.3	Abbildungsverzeichnis	103

1 Einleitung - Das primäre, nicht-metastasierte Mammakarzinom der Frau

1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Mammakarzinom ist mit über zwei Millionen neuer Fälle im Jahr nach dem Lungenkarzinom die zweithäufigste bösartige Erkrankung weltweit und gleichzeitig die häufigste bösartige Todesursache der Frau [1]. In Deutschland gibt es rund 69.000 Neuerkrankungen pro Jahr und das Mammakarzinom ist für rund 18.000 Sterbefälle jährlich verantwortlich. Mit dieser Inzidenz lag es in Deutschland zuletzt vor dem Lungenkarzinom und war somit die am häufigsten diagnostizierte bösartige Erkrankung sowie bei Frauen die häufigste bösartige Todesursache. Die Zahl der Neuerkrankungen ist in Deutschland seit den 1980er Jahren kontinuierlich gestiegen. Nach der Einführung des Mammografie-Screenings im Jahr 2005 stieg die Detektionsrate zunächst steiler an, seit 2008 sinkt sie jedoch wieder, was am ehesten das Ende eines Prävalenz-*Peaks*, wie er für die Periode nach der Einführung einer Screening-Untersuchung typisch ist, widerspiegelt. Basierend auf den aktuellen Daten erkrankt etwa eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom.

Die Brustkrebs-Mortalität hat sich seit den 1980er Jahren konstant verringert. Während die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Mammakarzinom-Patientinnen damals noch bei ca. 69 % lag, werden derzeit Raten von ca. 88 % erzielt. [2, 3]. Grund hierfür sind ein verbessertes Brustkrebs-Screening-Programm sowie Fortschritte in der adjuvanten Therapie [3-5]. Trotzdem erleiden zwischen 25 - 30 % der Patientinnen trotz erfolgreicher chirurgischer Sanierung selbst bei negativem Lymphknotenstatus Lokalrezidive oder Fernmetastasen. [6-8]

Die Risikofaktoren für Brustkrebs lassen sich grob in extrinsische und intrinsische Faktoren unterteilen. Zu den extrinsischen Faktoren zählen u.a. Lebensstilfaktoren wie Alkoholabusus, Adipositas, körperliche Inaktivität, sowie hormonelle Risikofaktoren wie Hormonersatztherapien, Nulliparität, späte Erstschwangerschaft und kurze Stillzeit. Intrinsische Faktoren sind u.a. Geschlecht, Alter, ein langer hormonell aktiver Zeitraum (frühe Menarche und späte Menopause), die Dichte des Brustdrüsengewebes und eine positive Familienanamnese [2]. Ca. 5 - 10 % aller Brustkrebsfälle basieren auf genetischen

Dispositionen, von denen Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2 (*Breast Cancer 1 bzw. 2*) die häufigste Prädisposition darstellen. Frauen mit BRCA1- und/oder BRCA2-Mutation haben ein geschätztes Lebenszeitrisko von 50 - 80 % an Brustkrebs zu erkranken [9, 10].

1.2 Klassifikation und Stadieneinteilung

Die Brust der Frau besteht aus Brustdrüsen (*Lobulae*), die für die Milchproduktion zuständig sind, und Drüsenausführungsgängen (*Ductus*), über die die Milch zur Brustwarze (*Mamille*) transportiert wird, umgeben von Stromagewebe (Fettgewebe, Blut- und Lymphgefäße, Bindegewebe). Mammakarzinome können aus unterschiedlichen Strukturen der Brust entstehen, wobei die meisten ihren Ursprung im *Ductus*gewebe haben [11, 12].

Histopathologisch werden Mammakarzinome von der WHO in invasive Karzinome ohne speziellen Typ (NST, ehemals invasiv-duktales Karzinom), die ca. 75% der Mammakarzinome ausmachen, sowie invasive Karzinome mit speziellem Typ (u.a. invasiv-lobuläre Karzinome, tubuläre, muzinöse, und papilläre Karzinome) unterteilt. Abgegrenzt zu den invasiven Karzinomen stehen nicht-invasive Vorläuferläsionen (Präkanzerosen), u.a. das duktales Carcinoma *in situ* (DCIS) [11, 13]. Die Inzidenzen von Vorläuferläsionen sind als Ergebnis vermehrter Screeninguntersuchungen über die letzten Jahre stark angestiegen und machen bis zu 20 % der intramammären Neoplasien aus [14].

Neben der Histopathologie werden Mammakarzinome anhand der TNM-Klassifikation und des *Gradings* eingeteilt. Die von der *Union internationale contre le cancer* (UICC) eingeführte TNM-Klassifikation beschreibt das anatomische Ausmaß der Erkrankung. Der T-Status (*tumor*) gefolgt von einem Zahlenwert (0-4) beschreibt die Primärtumorgröße sowie die Infiltrationstiefe in benachbarte Strukturen, der N-Status (*node*, Werte von 0-3) beschreibt das Ausmaß an befallenen Lymphknoten, und der M-Status (*metastasis*, Werte von 0-1) gibt Informationen darüber, ob der Tumor bereits in entfernte Organe gestreut hat (z.B. Lunge oder Knochen). Gegebenenfalls kann auch das Ausmaß der peritumoralen Venen- oder Lymphgefäßinvasion (V-Status und L-Status) bestimmt werden. In den meisten Fällen gehen höhere Zahlenwerte mit einer schlechteren Prognose einher. Präfixe wie z.B. c (klinisches Stadium), p (pathologisches Stadium) und y (nach neoadjuvanter Therapie, s.u.) geben nähere Informationen zum jeweiligen T-, N- oder M-Status [15].

Das *Grading* (nach Elston und Ellis) bewertet das Aussehen der Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen des Ursprungsgewebes und wie häufig sie sich teilen. Ein niedriges *Grading* (*low-grade*, G1) deutet auf ein langsames Wachstum und eine gute Zelldifferenzierung hin, ein mittleres *Grading* (*intermediate-grade*, G2) auf eine moderate Zelldifferenzierung und ein hohes *Grading* (*high-grade*, G3) auf ein schnelles Wachstum und eine schlechte Zelldifferenzierung [16].

1.3 Immunhistochemische Subtypisierung

Neben tumoranatomischen sind heutzutage auch tumorbiologische Informationen durch den Gebrauch von Immunhistochemie (IHC) und Multigentests erfassbar. Hierzu gehören u.a. der Hormonrezeptorstatus für Östrogen und Progesteron, der HER2-Status sowie der Ki67-Proliferationsindex.

1.3.1 Hormonrezeptorstatus (ER-/PR-Status)

Östrogen und Progesteron beeinflussen das Wachstum und die Funktion des gesunden Brustdrüsengewebes [17]. Ein Großteil der Mammakarzinome behält diese Eigenschaft und exprimiert an der Zelloberfläche Östrogenrezeptoren (ER) und/oder Progesteronrezeptoren (PR), die durch hormonelle Stimulation das Tumorstadium fördern [18, 19]. Das Vorhandensein dieser Rezeptoren kann mittels IHC nachgewiesen werden: Mittels Rezeptor-spezifischer Antikörper und konsekutiver Farbreaktion werden die jeweiligen Rezeptoren auf der Zelloberfläche sichtbar markiert. Mikroskopisch wird der Prozentsatz positiver Zellkerne bestimmt. Liegt dieser oberhalb eines Schwellenwertes (ER $\geq 1\%$, niedrig-positiv bei ≥ 1 bis 9% ; PR $\geq 10\%$), wird der Tumor als ER-/PR-positiv eingestuft. Zusammenfassend spricht man auch vom Hormonrezeptorstatus (HR) der Tumoren. Zusätzlich können die Färbintensität und der 12-stufige immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner angegeben werden [20, 21]. Etwa 75% der Mammakarzinome sind ER- oder PR-positiv [22]. Diese Tumore können mit einer adjuvanten endokrinen Therapie mittels Antiöstrogenen oder Aromataseinhibitoren (siehe Kapitel 1.4) behandelt werden.

1.3.2 HER2-Status

Der *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2; auch HER2/neu oder ERBB2) ist ein Rezeptor für Wachstumsfaktoren auf epidermalen Zellen, wie sie auch im Brustdrüsengewebe vorkommen. Eine Aktivierung stimuliert die Zellvermehrung und hemmt gleichzeitig den programmierten Zelltod (Apoptose) [23]. In bis zu 20% der Mammakarzinome findet sich eine Alteration auf dem Gen des Rezeptors, sodass es zu einer Überexpression auf der Tumoroberfläche kommt und seine Wirkung vervielfacht wird [24, 25]. Die Zellen werden dadurch stärker zur unkontrollierten Vermehrung angeregt. Dies wird mit einer erhöhten Invasivität und Metastasierungstendenz und somit mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht [26].

Ob eine HER2-Überexpression vorliegt, kann ebenfalls mittels IHC-Methode ermittelt werden. Hierzu wird ein vierstufiger Score ermittelt, der sich nach der immunhistochemischen Färbeintensität im histologischen Präparat richtet. Ein Score von 0 und/oder 1+ zeigt einen negativen HER2-Rezeptorstatus an, ein Score von 3+ einen HER2-positiven Status des Tumorgewebes. Gewebe mit einem Score von 2+ wird der Testung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zugeführt, um die Positivität des Scores zu überprüfen. Hierbei wird stellvertretend für die Rezeptorüberexpression die Amplifikation des HER2-Gens gemessen. Eine HER2-Überexpression bietet einen weiteren therapeutischen Angriffspunkt: Mittels rezeptorspezifischer Antikörper (z.B. Trastuzumab, Pertuzumab) oder Inhibitoren (z.B. Lapatinib oder Neratinib) wird der Rezeptor blockiert und das wachstumsfördernde Signal bleibt aus (siehe Kapitel 1.4) [26].

1.3.3 Ki-67-Proliferationsindex

Das Protein Ki-67 wird vermehrt während der Teilungsphasen von Zellen exprimiert und stellt in Tumorzelluntersuchungen deshalb einen guten, immunhistochemisch bestimmbaren Marker für die Proliferationsrate der Tumorzellen dar [27]. Der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Ki-67 und der Prognose des Mammakarzinoms wurde umfassend untersucht und bestätigt. So zeigten mehrere Meta-Analysen, dass Tumoren mit hoher Ki-67-Positivität signifikant höhere Rezidivraten sowie ein schlechteres Gesamtüberleben haben, als Tumore mit niedriger Ki-67-Positivität [28, 29]. Angegeben wird der Index als Prozentsatz der positiven Zellen in der untersuchten Zellpopulation. International aufgestellte Richtlinien zur Bestimmung werden aktuell etabliert und validiert, es existiert jedoch noch kein validierter Schwellenwert für eine Klassifizierung in einen niedrigen bzw.

hohen Proliferationsindex. Für Therapieentscheidungen sollte der Index deswegen insbesondere bei sehr niedrigen (<10%) oder sehr hohen Werten (>30%) hinzugezogen werden [30, 31].

1.3.4 Molekulare und immunhistochemische Subtypen

Ausgedehnte Analysen von Genexpressionsprofilen deckten vier kohärente Gruppen an Karzinomen auf, die signifikante Unterschiede in ihrem Therapieansprechen und ihrem klinischen Verlauf aufweisen (Luminal A, Luminal B, HER2-positiv, Basal-ähnlich) [32-36]. Der Luminal A-Subtyp ist der häufigste Subtyp (ca. 40 %) und zeichnet sich durch eine hohe Genexpression im ER-assoziierten Gencluster sowie eine niedrige Expression in den Clustern HER2-assoziiierter und proliferationsassoziiierter Gene aus. Er geht allgemein mit der besten Prognose unter allen Subtypen einher. Der Luminal B-Subtyp (ca. 20 %) exprimiert ER-assoziierte Gene in geringerem Ausmaß, Gene aus dem HER2-Gencluster in variablem Ausmaß und in hohem Ausmaß proliferationsassoziierte Gene. Im HER2-Überexpression-Subtyp (ca. 10-15 %) findet sich eine hohe HER2-Genexpression bei fehlender Expression ER-assoziiierter und basaler Gencluster. Luminal B-Tumore und HER2-überexprimierende Tumore haben eine schlechtere Prognose als der Luminal A-Subtyp [34, 35, 37, 38]. Basal-ähnliche Tumoren (ca. 10-25 %) zeichnen sich neben Expression eines basalen Genclusters durch fehlende ER-, PR- und HER2-Expression aus und werden deswegen als „triple-negative“ Karzinome (TNBC, *triple negative breast cancer*) bezeichnet. Aufgrund des aggressiveren Verhaltens und der fehlenden Rezeptoren für spezifische Therapien haben sie unter allen Subtypen innerhalb der ersten fünf Jahre die schlechteste Prognose [34, 37, 39]. Aus Gründen der Praktikabilität (Kosten und begrenzte Verfügbarkeit der hierfür notwendigen Genexpressionstests) werden die molekularen Subtypen - unter Verwendung immunhistochemisch erfassbarer Merkmale als Surrogatmarker - für den klinischen Gebrauch in immunhistochemische Subtypen (IHC) eingeteilt (siehe Tabelle 1) Allerdings ist zu beachten, dass die IHC-Subtypen nicht in allen Fällen deckungsgleich mit den wahren molekularen Subtypen sind [35, 40, 41]. Der Gebrauch der IHC-Subtypen wurde vom Expertenpanel der St. Gallen Konsensuskonferenz als Anhaltspunkt für Therapieentscheidungen empfohlen [42].

Tabelle 1: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms mit klinisch-pathologischer Definition (nach [42])

<i>Molekularer Subtyp</i>	<i>Klinisch-pathologische Definition nach IHC</i>	
<i>Luminal A</i>	“Luminal A” ER und/oder PR positiv HER2-negativ Ki-67 niedrig	
<i>Luminal B</i>	“Luminal B (HER2-negativ)” ER und/oder PR positiv HER2-negativ Ki-67 hoch	“Luminal B (HER2-positiv)” ER und/oder PR positiv HER2 überexprimiert / amplifiziert jedes Ki-67
<i>HER2-Überexpression</i>	„HER2-positiv“ ER und PR negativ HER2 überexprimiert / amplifiziert	
<i>Basal-ähnlich</i>	„triple-negativ“ ER und PR negativ HER2-negativ	

IHC Immunhistochemie, *ER* Östrogenrezeptor, *PR* Progesteronrezeptor, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2,

Während der Rezeptorstatus von Mammakarzinomen mittels Immunhistochemie einfach und reproduzierbar erfasst werden kann, so ist bisher kein eindeutiger Schwellenwert für die Diskriminierung zwischen einem niedrigen und einem hohen Ki-67-Proliferationsindex für die Klassifizierung in Luminal A- bzw. Luminal B-Tumore definiert. Auf der internationalen St.-Gallen-Konsensus-Konferenz 2013 wurde ein Schwellenwert von 20 % empfohlen und 2015 akzeptierte die Mehrzahl des Expertenpanels einen Schwellenwert zwischen 20 % und 29 % um zwischen niedrigrisiko Luminal A- und hochrisiko Luminal B-Tumoren (HER2-negativ) zu diskriminieren und den Nutzen einer Chemotherapie zu diskutieren [30, 43]. Die AGO Kommission Mamma rät in diesem Rahmen dazu, laborinterne Standards und Schwellenwerte zu etablieren [21]. Luminal A-Tumore sprechen aufgrund verminderter Proliferationsaktivität schlechter auf die verfügbaren Chemotherapien an [5, 44], sodass in der Regel eine alleinige endokrine Therapie eingeleitet wird. Für die anderen Subtypen sollte der Nutzen einer Chemotherapie immer diskutiert werden, bei HER2-positiven Tumoren unter Hinzunahme einer Anti-HER2-Therapie [45].

1.4 Therapiemöglichkeiten

Die Therapie aller Mammakarzinome stützt sich auf die drei Therapiesäulen Operation, Bestrahlung und Systemtherapie:

Die Basis der Therapie für alle nicht-fortgeschrittenen Mammakarzinome ist die Tumorresektion *in sano* (tumorfremde Resektionsränder, R0-Resektion) [45]. Hierbei hat sich die brusterhaltende Tumorresektion (BET) mit nachfolgender Radiotherapie (RT) gegenüber der vollständigen Brustentfernung (Mastektomie) bezüglich des Überlebens als gleichwertig erwiesen [46], sodass ein brusterhaltendes Vorgehen heutzutage vorzugsweise angestrebt wird. Im Rahmen der Operation des Primärtumors erfolgt auch das axilläre Staging: Bei klinisch unauffälligem axillärem Befund (cN0) mittels Sentinellymphknotenbiopsie (SNLB), bei klinisch und/oder sonografisch auffälligen Lymphknoten (cN1) mittels ultraschallgesteuerter Biopsie. Bei histologisch nachgewiesenem Tumorbefall der Axilla kann eine operative Entfernung der axillären Lymphknoten (Axilladisektion) notwendig sein [45].

Mithilfe einer intraoperativen Radiotherapie des Tumorbetts (IORT) sowie einer postoperativen Radiotherapie des Restgewebes und evtl. befallener Lymphknoten wird eine bestmögliche lokale Tumorkontrolle angestrebt. Die Effektivität der postoperativen Bestrahlung ist mit höchster Evidenz durch zahlreiche randomisierte Studien und Metaanalysen belegt und es bleibt die wichtigste Maßnahme, um das Risiko für ein intramammäres Rezidiv zu verringern [7, 47]. Heutzutage werden bis zu 8 von 10 möglichen Rezidiven durch die Radiotherapie verhindert [48-50].

Chemotherapie

Die Wirkung von Chemotherapeutika basiert auf dem Prinzip der direkten oder indirekten Schädigung der DNA oder des Zellteilungsapparates, die zu einer Reduktion aller schnell proliferierenden Zellen führt [51]. Aktuell sollte eine (neo)adjuvante Chemotherapie bei Mammakarzinom ein Anthracyclin und ein Taxan (z.B. Epirubicin plus Paclitaxel) enthalten. Auch Platinderivate (z.B. Carboplatin) und Alkylantien (Cyclophosphamid) finden je nach Indikation Anwendung [45]. Eine Chemotherapie kann die 10-Jahres-Mortalität bei bestimmten Risikogruppen, verglichen mit einem Verzicht, um circa ein Drittel senken [5].

Endokrine Therapie

Eine endokrine bzw. antihormonelle Therapie ist bei ER- und/oder PR-positiven Tumoren indiziert. Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (z.B. Tamoxifen) blockieren den Östrogenrezeptor in der Brust und hemmen das Tumorwachstum. Aromatasehemmer senken

die körpereigenen Östrogenspiegel durch Hemmung der enzymatischen Synthese aus Androgenen und entziehen damit dem Tumor einen Wachstumsreiz. Allerdings wirken sie nicht auf die ovarielle Östrogenproduktion [52-54]. Aus diesem Grund kommen sie nur bei Frauen nach der Menopause (oder nach operativer Entfernung bzw. bei medikamentöser Blockade der Eierstöcke) zum Einsatz. Die Durchführung einer adjuvanten endokrinen Therapie kann bei Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Karzinomen signifikant die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs relativ um ca. 40% und die eines Versterbens relativ um ca. 30% reduzieren [8, 55].

Zielgerichtete Therapien („*Targeted Therapies*“)

Sogenannte *Targeted Therapies* umfassen Medikamente, die gezielt biologische Eigenschaften der Tumorzellen nutzen. Trastuzumab und Pertuzumab sind monoklonale Antikörper, die an unterschiedliche extrazelluläre Domänen des HER2-Rezeptors binden, hierdurch die Rezeptor-vermittelte Proliferation der Tumorzelle verhindern und schließlich eine Antikörper-vermittelte zytotoxische Immunantwort auslösen können [56, 57]. Bei HER2-überexprimierenden Tumoren wird Trastuzumab parallel zur Chemotherapie begonnen und über eine Behandlungsdauer von einem Jahr verabreicht. Bei *high-risk* HER2-positiven Karzinomen (nodalpositiv, Tumorgöße > 2cm) soll eine duale Therapie mit Trastuzumab und Pertuzumab erfolgen [45, 58, 59]. Darüber hinaus existiert mit T-DM1 ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat bestehend aus Trastuzumab und Emtansine, einem Mitosehemmstoff, der nach HER2-Rezeptor-vermittelter Internalisierung seine zytotoxische Wirkung spezifisch in den Tumorzellen entfalten kann [60]. Er wird bei residualer Tumormasse in der post-neoadjuvanten Situation empfohlen und kann hier im Vergleich zu alleiniger Trastuzumab-Therapie das Rezidivrisiko um ca. 50 % senken [21, 61]. Darüber hinaus hat eine Therapie mit Immuncheckinhibitoren einen wichtigen Stellenwert in der Behandlung vom TNBC, sowohl in der kurativen als auch in der metastasierten Situation. In der metastasierten Situation kommen außerdem der Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib oder Antikörper-Drug-Konjugate Trastuzumab-Deruxtecan oder Sacituzumab-Govitecan bzw. der VEGF-Antikörper Bevacizumab zum Einsatz [21, 62, 63].

Bisphosphonattherapie

Bei metastasierten Karzinomen können skelettbezogene Ereignisse (SRE, *skeletal related events*) als Folge von Knochenmetastasen auftreten. Hierzu gehören pathologische Frakturen, Spinalkanalstenosen, Hyperkalzämien und Knochenschmerzen. Bisphosphonate

und der RANK-Ligand-Inhibitor Denosumab hemmen über unterschiedliche Mechanismen die Aktivität von Osteoklasten und werden primär zur Osteoporosebehandlung postmenopausaler Frauen angewendet [64, 65]. Bei Mammakarzinompatientinnen können sie einen therapiebedingten Knochendichteverlust (Hormonentzug durch endokrine Therapien, zytotoxische Therapien) verringern und das Auftreten von SREs verhindern oder verzögern [66-69]. Darüber hinaus können Bisphosphonate in der nicht-metastasierten Situation bei postmenopausalen Frauen die (Fern-)Rezidivrate, das Auftreten von Knochenmetastasen und die Mortalitätsrate signifikant senken [67, 70].

Neoadjuvante Therapiemöglichkeiten

Hatte die neoadjuvante Chemo- bzw. Systemtherapie (NACT) einst ihren Stellenwert hauptsächlich in der Reduktion der Tumormasse fortgeschrittener Karzinome, um Operabilität zu ermöglichen, so hat sie heutzutage insbesondere bei der Beurteilung des Therapieansprechens an Bedeutung gewonnen. Während bzw. nach der NACT kann das Ansprechen des Tumors auf die gewählte Therapie beurteilt werden. Darüber hinaus führt sie auch bei primär operablen Tumoren zu einer Erhöhung der Rate möglicher brusterhaltender Therapien gegenüber Mastektomien [71-73]. Gegenüber einer adjuvanten Chemotherapie wird sie, bezogen auf die (Brustkrebs-) Mortalität und das Risiko einer Metastasierung, als gleichwertig angesehen. NACT war mit einer höheren Rate an Lokalrezidiven assoziiert, was der höheren Rate an BETs attribuiert wird [73]. Ist nach bioptischer Sicherung, pathologischer Risikostratifizierung, und Staging des Karzinoms eine Chemotherapie indiziert, so soll diese mittlerweile standardmäßig als neoadjuvante Therapie durchgeführt werden [45].

Um das Ansprechen des Tumors semiquantitativ zu messen wird der Regressionsgrad nach Sinn et al. (siehe Tabelle 2) bestimmt [74]. Lässt sich posttherapeutisch sowohl bei der Entfernung des Brustgewebes als auch in den Lymphknoten keine Resttumormasse mehr nachweisen, so spricht man von einer pathologischen Komplettremission (pCR). Insbesondere bei TNBC und HER2-positiven/hormonrezeptornegativen Subtypen geht eine pCR mit einer günstigeren Prognose einher [75-78]. Bei Ausbleiben einer pCR bestehen nach Entfernung des Resttumors postneoadjuvante Therapiemöglichkeiten (s.o.).

Tabelle 2: Klassifikation zur semiquantitativen pathologischen Beurteilung der regressiven Veränderungen nach neoadjuvanter Chemotherapie nach Sinn et al. (nach [74])

<i>Regressionsgrad</i>	<i>Definition</i>
0	kein Effekt
1	vermehrte Tumorsklerose mit herdförmiger resorptiver Entzündung und/oder deutlich zytopathische Effekte
2	weitgehende Tumorsklerose mit nur fokal noch nachzuweisendem, evtl. auch multifokalem <i>minimalem invasivem Resttumor</i> ($\leq 0,5\text{cm}$), häufig ausgedehnte intraduktale Tumorausbreitung
3	kein invasiver Resttumor
4	kein Resttumor

1.5 Prognosefaktoren

Die Verabreichung adjuvanter Therapien hat die Brustkrebsmortalität in der westlichen Welt deutlich reduzieren können [3-5]. Dennoch erhalten viele Patientinnen nicht das adäquate Therapiemaß und es kommt sowohl zur Übertherapie (wenn eine lokale Therapie zur Behandlung ausgereicht hätte) als auch zur Untertherapie (Ausbleiben einer Behandlung oder Behandlung mit Substanzen, die letztendlich keine Wirkung auf den Tumor ausüben).

Wichtig bei der Entscheidung über das Maß des Therapieregimes sind diagnostisch erfassbare Faktoren, die eine Aussage über die Prognose bzw. das Risiko eines Rezidivs ermöglichen. Per Definition erlaubt ein Prognosefaktor bereits zum Zeitpunkt der Diagnose Informationen über das klinische Ergebnis, unabhängig von der Therapie, vorherzusagen. Hierbei handelt es sich um anatomische und biologische Charakteristika, die sich als Indikatoren für das Wachstum, die Invasivität oder das Potential zur Metastasenbildung eines Tumors erwiesen haben, und somit für das Überleben entscheidend sind [79]. Darüber hinaus sollte ein Prognosefaktor möglichst einfach und sensitiv erfassbar und reproduzierbar sein.

1.5.1 Die Heterogenität des Mammakarzinoms

Während tumoranatomische Informationen weiterhin einen wichtigen prognostischen Faktor darstellen, bietet der enorm wachsende Wissensstand über die Tumorbiologie neue Prognosefaktoren, die die tumoranatomischen Informationen komplementieren oder fallabhängig sogar eine übergeordnete Rolle einnehmen können. So hat die UICC ihre initial

nur an der TNM-Klassifikation orientierte prognostische Stadieneinteilung für das Mammakarzinom im Jahr 2018 um tumorbiologische Faktoren wie das Grading, den PR-/ER-Status und den HER2-Status erweitert [80].

Aufgrund der Heterogenität des primären, nicht metastasierten Mammakarzinoms werden selektive prognostische Faktoren eingesetzt, um Erkrankte mit einem erhöhten Risiko für Rezidive zu identifizieren und sie einer geeigneten adjuvanten Therapie zuzuführen. Darüber hinaus steigt ebenfalls das Interesse an prädiktiven Faktoren, durch deren Einsatz sich das voraussichtliche Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorhersagen lässt. Sowohl prognostische als auch prädiktive Faktoren helfen im Rahmen der personalisierten Medizin, die therapieassoziierte Morbidität zu verringern und die ökonomische Belastung zu minimieren.

1.5.2 Etablierte prognostische und prädiktive Faktoren

Die aktuelle S3-Leitlinie Mammakarzinom der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) empfiehlt folgende Faktoren zur Prognoseabschätzung beim frühen Mammakarzinom zu erheben: pTNM-Klassifikation, Resektionsrandstatus, histologischer Typ, Grading nach Elston und Ellis, peritumorale Lymphgefäßinvasion, Alter und BMI. Bei HR-positiven, HER2-negativen Tumoren kann der Ki-67-Proliferationsindex bestimmt werden, um die Prognose abzuschätzen und die Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie zu treffen. Ist eine Aussage zur Prognose anhand dieser Faktoren nicht adäquat möglich, so kann ein standardisierter, validierter Multigenexpressionstest hinzugezogen werden (z.B. Oncotype DX[®], Endopredict, PAM50, Mammaprint[®]) [45]. Diese testen die Expression verschiedener prognostischer Genprofile, die mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert sind, und erlauben eine Identifizierung von HR-positiven, HER2-negativen, nodal-negativen Patientinnen, die zusätzlich zur antihormonellen Therapie von einer Chemotherapie profitieren würden. Entsprechende Studien konnten ihren prognostischen Nutzen auch bei Patientinnen mit 1 - 3 positiven Lymphknoten bestätigen, sodass ihr Einsatz unter Berücksichtigung der genannten pathologischen und tumorbiologischen Kriterien auch bei nodal-positiven Patientinnen (N1) empfohlen wird [21, 81, 82].

Derzeit erhobene prädiktive Marker für ein Therapieansprechen beinhalten den Hormonrezeptorstatus für eine endokrine Therapie, den Menopausenstatus für die Wahl der endokrinen Therapie, und den HER2-Status für eine Anti-HER2-Therapie. Um die Wahrscheinlichkeit einer pCR unter neoadjuvanter Therapie abzuschätzen, werden Alter (pCR häufiger in jungem Alter), cT- und cN-Status (pCR häufiger bei cT1-2 oder N0), der IHC-Subtyp (pCR häufiger bei TNBC / HER2-positiven / HR-negativen Subtypen), Tumorphistologie (pCR seltener bei invasiv-lobulärem Typ) und das Grading (pCR häufiger bei G3) erhoben [45].

Der Bedarf nach zusätzlichen prognostischen und prädiktiven Faktoren führte zur Entdeckung einer Vielzahl von potentiell nützlichen Markern, die gegenwärtig weiteren Validierungen unterzogen werden. Hierzu gehören weitere Multigentests, die Invasionsfaktoren uPA/PAI-1, sowie die Marker für die minimale Tumorresterkrankung – zirkulierende und disseminierte Tumorzellen.

1.6 Die Tumorzell dissemination

1.6.1 Die minimale Tumorresterkrankung

Das primäre, nicht-metastasierte Mammakarzinom kann sich auch Jahre nach einer erfolgreichen Therapie des Primärtumors erneut als Lokalrezidiv oder als Fernmetastase manifestieren [6-8]. Als Ursache hierfür gelten bereits im Frühstadium gestreute Tumorzellen, die über lange Latenzzeiten im Körper verweilen. Dabei handelt es sich um Tumorzellen, die im Blutkreislauf und Lymphsystem zirkulieren, gestreute Tumorzellen in verschiedenen Organen und Geweben, oder Tumorzellen, die eine Therapieresistenz aufweisen (lokal oder gestreut). Die Gesamtheit dieser Tumorzellen wird minimale Tumorresterkrankung (MRD, *minimal residual disease*) genannt. Es wird angenommen, dass diese den Ausgangspunkt für eine spätere Metastasierung darstellt [83, 84]. Gleichzeitig sind circa 76 % der Brustkrebstodesfälle der progressiven Metastasierung in andere Organe und nicht dem Primärtumor in der Brust geschuldet [85], weshalb das Verstehen der MRD von hohem klinischen Interesse ist.

1.6.2 Der Prozess der Tumorzell dissemination und Metastasierung

Die hämatogene Streuung von Tumorzellen solider Tumore (sog. Tumorzell dissemination) ist ein bekanntes Phänomen, das bereits im 19. Jahrhundert von Thomas Ashworth und

Stephen Paget untersucht wurde [86, 87]. Grundlegend erfolgt sie durch das Ablösen einzelner Tumorzellen aus dem Primärtumor, gefolgt vom Eindringen in die Blut- oder Lymphgefäße (Intravasation), der Zirkulation im Blutkreislauf, dem Austreten in die entfernten Zielgewebe (Extravasation) und die dortige Ansiedlung der Tumorzellen. Sie findet kontinuierlich statt, ist jedoch hoch-ineffizient, da der Großteil der Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen eliminiert wird, bevor sie zu Metastasen proliferieren können (*metastatic inefficiency*) [88-90].

Aus ihrem Zellverband herausgelöste epitheliale Zellen durchlaufen normalerweise einen programmierten Zelltod durch Verlust des Zell-Matrix-Kontaktes (Anoikis) oder des Zytoskeletts (Amorphosis) [91]. Um sich erfolgreich aus dem Primärtumor herauslösen zu können, geben Tumorzellen deshalb einige ihrer epithelialen Merkmale zugunsten eines mesenchymalen Zelltyps ab, der eine höhere Zellmotilität, verbesserte migratorische Fähigkeiten und eine höhere Proliferationsrate aufweist als epitheliale Zellen. Hierzu gehören zum Beispiel der Verlust der Zellpolarität und zellulärer Adhäsionsmoleküle (E-Cadherin, 1-Claudine). Die Regulation der Expressierung von Zytokeratinen (CK) nimmt eine weitere wichtige Rolle ein. Demgegenüber führt die vermehrte Expressierung mesenchymaler Proteine wie Vimentin und *smooth muscle actine* zu erhöhter Zellmotilität und einem flexibleren Zytoskelett. Durch diesen Prozess, der als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bekannt ist, erlangt die Tumorzelle die Fähigkeit, ins umliegende Stromagewebe des Tumors zu migrieren [92-94]. Von hier aus können die Zellen Endothelwände von Blut- oder Lymphgefäßen des Tumors penetrieren und in den Blutkreislauf eintreten (Intravasation) [95, 96]. Im Blutkreislauf angekommen bezeichnet man sie als „zirkulierende Tumorzellen“ (CTC). Ein Großteil der CTC wird durch die im Gefäßsystem vorherrschenden hämodynamischen Scherkräfte eliminiert. Außerdem können sie durch Makrophagen oder NK-Zellen des Immunsystems erkannt werden, die eine Apoptose der CTC einleiten [97-99]. Tumorzellen, die im Lymphstrom zirkulieren, können in den drainierenden Lymphknoten sistieren und hier zu Metastasen heranwachsen. Die im Blutstrom zirkulierenden Tumorzellen werden durch die Kapillaren innerhalb der Organe oder des Knochenmarks physisch gebremst. Der vom Tumor ausgehende Blutfluss bestimmt, welches Organ die Zellen zuerst erreichen. Dort führt der Größenunterschied zwischen Tumorzellen und Kapillaren zusammen mit der niedrigeren Blutflussgeschwindigkeit zum effizienten Halt der meisten CTCs im ersten Kapillarbett, welches sie erreichen. Hier lagern die Zellen sich an das Endothel der Gefäßwand an und können von hier aus in das Zielgewebe migrieren (Extravasation) [100]. Nach Extravasation

und Arrest im Zielgewebe (secondary sites) werden die Zellen als „disseminierte Tumorzellen“ (DTC) bezeichnet.

Im Zielgewebe können DTCs in eine Art Ruhezustand eintreten (*tumor dormancy*), welcher für die beim Mammakarzinom beobachteten sehr langen Latenzzeiten von bis zu 20 - 30 Jahren bis zu einem Rezidiv verantwortlich sein kann. Insbesondere der ER-Status scheint mit einer längeren Latenzzeit zu korrelieren, da ER-negative Tumore häufiger innerhalb der ersten 5 Jahre rezidivieren, wohingegen ER-positive Tumore eher nach 10 und mehr Jahren rezidivieren können [8]. Die zwei gegenwärtigen Erklärungsansätze beschreiben *tumor dormancy* zum einen bedingt durch ein Verharren einzelner Tumorzellen in einem nicht-proliferativen Zustand, der durch intrinsische Signale oder eine Unterdrückung durch die zelluläre Umgebung aufrechterhalten wird (*single cell dormancy*), und zum anderen bedingt durch ein konstantes Gleichgewicht zwischen aktiver Proliferation und aktiver Apoptose in mikrometastatischen Zellformationen (*micrometastatic dormancy*) [101-104]. Besonders die *single cell dormancy* könnte erklären, dass einzelne Zellen eine Chemotherapie, die sich aktiv-teilende Zellen als Ziel hat, überdauern könnten [105]. Auch wurde beobachtet, dass einzelne Tumorzellen stammzell-ähnliche Merkmale aufweisen, die im Verdacht stehen, deren Chemoresistenz zu erhöhen [106, 107].

Um nach Arrest im Zielgewebe oder nach Überdauern im Ruhezustand in einem neuen, stabilen Zellverband proliferieren zu können, müssen die DTCs wieder Merkmale epithelialer Zellen ausbilden (Prozess der mesenchymal-epithelialen Transition, MET). Die DTCs initiieren ein weiteres Wachstum und bilden zuerst eine prä-angiogene Mikrometastase aus. Das Wachstum muss durch das Einwachsen neuer Blutgefäße aufrechterhalten werden (Neoangiogenese), um eine makroskopische Metastase zu bilden (siehe Abbildung 1). Das Wachstumspotential der DTCs wird durch ihre molekulare Interaktion mit der zellulären Umgebung des Zielgewebes bestimmt. Dies erklärt u.a. die organspezifischen Metastasierungsmuster mancher Tumoren (organotrope Metastasierung). So metastasieren Mammakarzinome bevorzugt in den Knochen oder die Lunge. Dieses Phänomen, wurde von Paget als „*seed and soil*“ Hypothese beschrieben [86, 100]. Heutige Untersuchungen legen nahe, dass das fernliegende Gewebe bei der Einnistung der Tumorzellen nicht nur eine passive Rolle einnimmt. Der Primärtumor beeinflusst durch die Ausschüttung spezifischer chemoaktiver Faktoren ins Blut fernliegendes Gewebe und bildet eine sogenannte prämetastatische Nische (*premetastatic niche*) aus, die das Einwandern von Tumorzellen und die Proliferation zu Metastasen begünstigen kann [108].

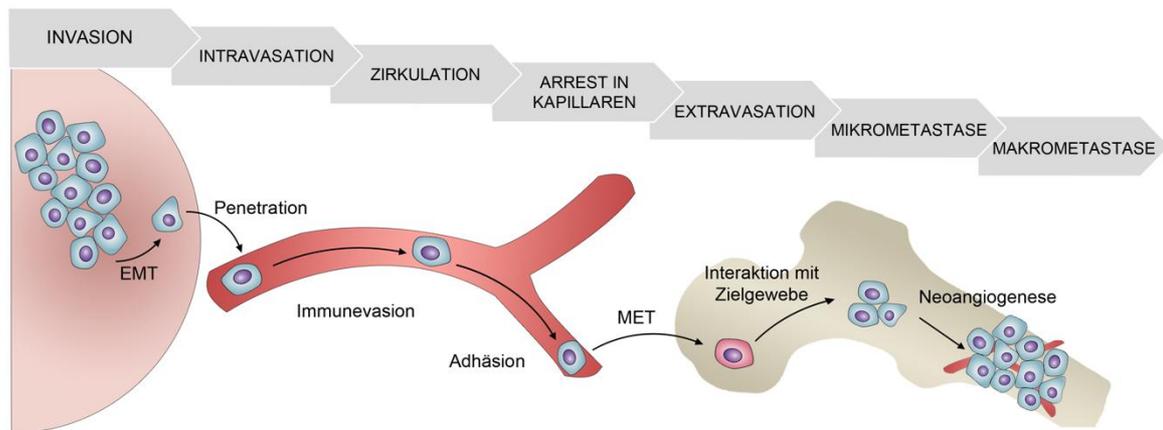


Abbildung 1: Die metastatische Kaskade. Hämatogene Metastasierung entsteht durch die Abfolge mehrerer Schritte, in denen die Dissemination maligner Zellen vom Primärtumor bis in entfernte Gewebe und Organe begünstigt wird. Jeder Schritt wird durch die Neuaneignung zellulärer Funktionen eingeleitet (schwarze Pfeile). Disseminierte Tumorzelle in Rot. *EMT* Epithelial-mesenchymale Transition, *MET* Mesenchymal-epitheliale Transition. Modifiziert nach [109].

Gegenwärtig wird untersucht, wann genau der Prozess der Tumorzell-dissemination stattfindet. Hierzu gibt es zwei Erklärungsansätze: Das Modell der linearen Progression geht davon aus, dass einzelne Tumorzellen bereits innerhalb des Primärtumors den genetischen Veränderungsprozess durchlaufen, um metastatisches Potential zu entwickeln. Erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf streuen sie hämatogen, um ektop zu Metastasen zu proliferieren. Dagegen verortet das Modell der parallelen Progression den Streuungsprozess im frühen Stadium der Erkrankung: Einzelne Tumorzellen lösen sich bereits dann aus dem Zellverband des Primärtumors und nisten sich durch hämatogene Streuung in ektopischen Zellumgebungen des Körpers ein. Hier durchlaufen sie weitere somatische Progression und entwickeln ihr metastatisches Potential unabhängig vom Primärtumor [110].

Begriffliche Abgrenzung zu Mikrometastasen

In der aktuell herkömmlichen Diagnostik während des Tumorstagings werden DTCs im Knochenmark und anderen Geweben sowie CTCs im Blut nicht routinemäßig erfasst. Ihr Nachweis ist erst seit Einführung entsprechender immunhisto- bzw. immunzytochemischer und molekularbiologischer Verfahren möglich. Es handelt sich um einzelne Tumorzellen oder Tumorzellcluster mit einer Größe von max. 0,2 mm ohne stattgefunden Proliferation oder Stromareaktion. Von einer Mikrometastase, die sich durch stattgefunden extravaskuläre Proliferation mit bereits sichtbarer Stromareaktion auszeichnet, sind DTCs

und CTCs deswegen klar abzugrenzen. Mit einer Größe zwischen 0,2 und 2 mm werden Mikrometastasen durch eine histologische Untersuchung nachgewiesen und im Tumorstaging regelhaft erfasst [111].

1.6.3 Prognostische Relevanz disseminierter Tumorzellen

Trotz Fortschritten in sowohl der molekularen Klassifikation als auch in der adjuvanten Therapie des primären Mammakarzinoms [5, 33, 42] erleiden Untergruppen von Patientinnen Lokal- oder Fernrezidive. Neue Surrogatmarker für die Erfassung der minimalen Tumorresterkrankung während oder nach der adjuvanten Therapie können zu einer weiteren Behandlungsoptimierung beitragen. Das Knochenmark stellt die häufigste Metastasierungslokalisation beim Mammakarzinom dar und repräsentiert ein Organ, in dem das Überdauern von DTCs in metastatischen Nischen ermöglicht wird [108]. Dementsprechend können über die Suche nach DTCs im Knochenmark Patientinnen mit einem erhöhten Risiko für eine zukünftige Metastasierung identifiziert werden. Dass nicht alle DTCs im Knochenmark zu Metastasen proliferieren können, spiegelt sich auch in der Beobachtung wider, dass viele Patientinnen trotz DTC-Nachweis im Knochenmark im klinischen Verlauf keine Metastasen entwickeln [112]. Dies ist auf die sog. Ineffizienz des Metastasierungsprozesses (*metastatic inefficiency*) zurückzuführen (Eradizierung durch das Immunsystem, Apoptose, *tumor dormancy*) [103]. Dennoch korreliert bei einem substantiellen Teil der DTC-positiven Patientinnen ihr DTC-Status mit einem Fernrezidiv ihrer Erkrankung, und jüngere Untersuchungen gehen davon aus, dass ca. 80 % der Metastasen aus früh disseminierten Tumorzellen entstehen [83].

In bisherigen Untersuchungen zu DTCs ließen sich bei 20 – 40 % der nicht metastasierten Mammakarzinompatientinnen DTCs im Knochenmark nachweisen [113-117]. Nach diversen unizentrischen Studien [113, 114, 117-119] ließ sich die prognostische Relevanz der DTCs beim primären, nicht-metastasierten Mammakarzinom 2005 in einer gepoolten Metaanalyse von Braun et. al. mit hoher Evidenz bestätigen (Evidenzlevel 1a) [112]. Seitdem wurde die Annahme auch in weiteren unabhängigen Studien belegt [115, 120, 121].

Obwohl adjuvante bzw. neoadjuvante Systemtherapien als Ziel die Eradizierung dieser Zellen verfolgen, können auch nach abgeschlossener Systemtherapie noch DTCs im Knochenmark auffindbar sein [122]. Der Nachweis von persistierenden DTCs nach Systemtherapie stellt ebenfalls einen Indikator für eine schlechtere Prognose dar [122-126]. Demnach besteht ebenfalls großes Interesse an der Erforschung DTC-abhängiger

Sekundärtherapieansätze zur Eradizierung der MRD. In Übereinstimmung damit, dass eine Bisphosphonattherapie das metastasenfremie Überleben postmenopausaler Mammakarzinompatientinnen verbessern kann, legen gegenwärtige Hypothesen nahe, dass dies durch eine Eradizierung der DTCs bedingt sein könnte. [115, 127-130].

Die bisherigen Untersuchungen nehmen immunhistochemische Merkmale des Primärtumors in Verbindung mit dem metastatischen Potential von DTCs nicht ausreichend in Betracht. Deshalb ist eine differenzierte Betrachtung der Mammakarzinomsubtypen im Hinblick auf den prognostischen Wert disseminierter Tumorzellen sinnvoll, um die Beurteilung des Risikos individueller Patientinnen zu verbessern.

1.7 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation erfolgt die statistische Aufarbeitung aller Patientinnen, die zwischen Januar 2014 und Dezember 2017 im Rahmen ihrer Mammakarzinombehandlung in der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf eine Knochenmarkpunktion zur DTC-Bestimmung bekommen haben. Im Mittelpunkt steht dabei die Untersuchung des Kollektivs hinsichtlich der prognostischen und prädiktiven Faktoren inklusive des DTC-Status des Knochenmarks und des immunhistochemischen Subtyps. Darüber hinaus soll im Speziellen das Gesamtüberleben und das krankheitsspezifische Überleben in Abhängigkeit vom DTC-Status des Knochenmarks analysiert werden mit dem Ziel, die prognostische Relevanz des DTC-Status zu ermitteln und mit bereits veröffentlichter Literatur zu vergleichen. Potentieller Nutzen dieser Arbeit ist darin zu sehen, dass durch die Analyse der Daten die Grundlage zur epidemiologischen Aufarbeitung des Mammakarzinoms gestärkt wird und die prognostische Relevanz der Tumorzeldissemination in einem ersten Kollektiv der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf untersucht wird. Die Identifizierung eines neuen, potentiell prognostischen Markers ist das Ergebnis von Fortschritten in der Untersuchung biologischer Mechanismen der Tumorprogression und des metastatischen Prozesses. Die vorliegende Arbeit trägt durch die klinische Beurteilung des DTC-Status als ein solcher Marker entscheidend dazu bei, wissenschaftliche Hypothesen oder experimentelle Ergebnisse zu validieren. Im Falle der Tumorzeldissemination wären dies u.a. folgende klinisch wertvolle Schlussfolgerungen:

- DTCs als entscheidender Nachweis der frühen, okkulten Streuung von Tumorzellen

- DTCs als relevanter Risikofaktor für die folgende Entwicklung einer Metastasierung und somit als Indikator einer schlechteren Prognose
- Der prognostische Wert von DTCs kann durch die Hinzunahme des IHC-Subtyps erweitert werden

In Subanalysen untersuchen wir das Patientinnenkollektiv zur Validierung weiterer Hypothesen wie der Tumorzellpersistenz nach neoadjuvanter Therapie als Ausgangspunkt für sekundäre Therapieansätze und der prä-invasiven Tumorzell dissemination bei DCIS-Läsionen.

2 Patientinnenkollektiv und Methoden

2.1 Studiendesign, Einschlusskriterien und Untersuchungszeitraum

Diese Studie wurde im Rahmen der klinischen Forschung der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe (i.F. Universitätsfrauenklinik) des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) angefertigt. Für die Darstellung wurde ein retrospektiv-prospektives Studiendesign gewählt.

Eingeschlossen wurden Frauen, die aufgrund der Erstdiagnose eines Mammakarzinoms (T1-4, N0-3, M0), die zwischen Januar 2014 und Dezember 2017 gestellt wurde, an der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf eine operative Therapie erhalten haben, und im Rahmen dieser eine Knochenmarkpunktion erhalten haben. Bei den neoadjuvant behandelten Patientinnen, die ihre Diagnose in der zweiten Jahreshälfte 2017 erhalten haben, hat die Brustoperation nach Abschluss der systemischen Therapie im Jahr 2018 stattgefunden. Die letzte Patientin des Kollektivs wurde im Juli 2018 operiert. Patientinnen mit Rezidiv-Karzinomen, Fernmetastasierung, bilateralem Auftreten, R1-Resektionsstatus oder einer anderen primären Krebserkrankung in der Vorgeschichte wurden ausgeschlossen. Eine Patientin ohne Malignomnachweis außer in der Biopsie sowie eine Patientin mit neuroendokrinem DCIS wurden ebenfalls ausgeschlossen. Alle Patientinnen willigten vorher schriftlich in die Entnahme eines Knochenmarkaspirates während der operativen Eingriffe sowie einer Weiterverarbeitung ein. Der Untersuchungszeitraum (inklusive Nachbeobachtung) umschloss die Zeit von Januar 2014 bis Januar 2020 (letztes Follow-Up).

2.2 Datenerfassung und Ethikvotum

Als Quelle zur Zusammenstellung des Datensatzes wurden die klinikinternen Datenbanken des UKD, des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik, sowie des Universitätstumorzentrum des UKD verwendet. Alle verwendeten Patientinnendaten wurden pseudonymisiert in eine Datenbank (Microsoft Excel™; Version 16.0) zusammengetragen und kodiert. Nach Durchführung der statistischen Methode (siehe Kapitel 2.8) wurden die Patientinnendaten anonymisiert.

Das Studienprotokoll wurde der federführenden Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur ethischen und rechtlichen Überprüfung vorgelegt und von dieser bewilligt (Aktenzeichen/Studiennummer 2017-6,

Datum: 05.01.2018). Ferner wurde das Vorhaben in voller Übereinstimmung mit den Prinzipien der „Deklaration von Helsinki“, in der 2013 beschlossenen revidierten Fassung, sowie den geltenden Gesetzen und Vorschriften durchgeführt.

2.3 Patientinnenkollektiv

Es konnten insgesamt 290 Patientinnen eingeschlossen werden. Das mediane Lebensalter bei Diagnosestellung betrug 54 Jahre. Klinisch-pathologische Daten des untersuchten Patientinnenkollektivs werden in Tabelle 3 dargestellt. Bei 199 adjuvant behandelten Patientinnen erfolgte die KMP im Rahmen der Brustoperation vor der systemischen Therapie. Unter 73 neoadjuvant behandelten Patientinnen wurde die KMP bei 39 Patientinnen prätherapeutisch (im Rahmen der axillären Sentinellymphnodektomie oder Portkatheter-Anlage) und bei 46 Patientinnen nach der neoadjuvanten Chemotherapie (im Rahmen der Brustoperation) durchgeführt. Von 12 Patientinnen liegt eine prä- und postneoadjuvante Bestimmung vor. Somit hatten 238 Patientinnen (199 adjuvante und 39 neoadjuvante) zum Zeitpunkt der Bestimmung des DTC-Status keine vorherige Systemtherapie erhalten. Diese werden im Folgenden als „therapienaive Patientinnen“ bezeichnet und als solche ausgewertet. 18 Patientinnen mit der Diagnose eines DCIS wurden gesondert untersucht. Abbildung 2 zeigt das klinische Vorgehen, die Punktionszeitpunkte und die daraus resultierenden Untersuchungskollektive als Flussdiagramm.

Bei Patientinnen, die eine neoadjuvante Systemtherapie erhalten haben, wurden die Tumorgröße und der Nodalstatus durch die klinische Untersuchung und bildgebende Verfahren bestimmt, bevor der erste therapeutische Zyklus eingeleitet wurde. Die Sonografie war die bevorzugte Bildgebungsmethode, aber auch Magnetresonanztomografie- und Mammografiebefunde dienten im Falle eines nicht eindeutigen Ultraschallbefundes der Bestimmung.

Ausgehend vom Gesamtkollektiv wurden Subgruppenanalysen durchgeführt, die sich wie folgt aufteilen:

- Kapitel 3.1 und 3.2: Untersuchungen am therapienaiven Kollektiv
- Kapitel 3.3: Überlebensanalysen am therapienaiven, nachbeobachteten Kollektiv
- Kapitel 3.5 Untersuchungen am neoadjuvant behandelten Kollektiv
- Kapitel 3.6: Untersuchungen am Kollektiv von Patientinnen mit DCIS

Tabelle 3: Klinisch-pathologische Daten des gesamten Patientinnenkollektivs mit Angabe von Schichtenprozent

		<i>Anzahl</i>	<i>(%)</i>
<i>Gesamt</i>		290	(100,0)
<i>Alter</i>	≤ 60 Jahre	98	(33,8)
	> 60 Jahre	192	(66,2)
<i>Menopausenstatus</i>	Prämenopausal	121	(41,7)
	Postmenopausal	179	(61,7)
<i>Histologie</i>	NST	197	(67,9)
	Invasiv-lobulär	52	(17,9)
	Andere	20	(6,9)
	DCIS	18	(6,2)
	Unbekannt	3	(1,0)
<i>Grading</i>	G1	27	(9,3)
	G2	165	(56,9)
	G3	92	(31,7)
	Unbekannt	6	(2,1)
<i>Tumorgröße*</i>	Tis	18	(6,2)
	T1	128	(44,1)
	T2	116	(40,0)
	T3	18	(6,2)
	T4	8	(2,8)
	Unbekannt	2	(0,7)
<i>Nodalstatus**</i>	N0	189	(65,2)
	N+	101	(34,8)
<i>ER-Status</i>	ER-	44	(15,2)
	ER+	246	(84,8)
<i>PR-Status</i>	PR-	73	(25,2)
	PR+	216	(74,5)
	Unbekannt	1	(0,3)
<i>HER2-Status</i>	HER2-	238	(82,1)
	HER2+	33	(11,4)
	Unbekannt***	19	(6,6)
<i>Ki-67-Proliferationsindex</i>	< 15 %	91	(31,4)
	15 – 30 %	113	(39,0)
	> 30 %	68	(23,4)
	Unbekannt	18	(6,2)
<i>IHC-Subtyp</i>	Luminal A	125	(43,1)
	Luminal B (HER2-)	85	(29,3)
	HER2+	33	(11,4)
	TNBC	30	(10,3)

	Unbekannt	17	(5,9)
<i>Endokrine Therapie</i>	Nein	68	(23,4)
	Ja	209	(72,1)
	Unbekannt	13	(4,5)
<i>HER2-gerichtete Therapie</i>	Nein	260	(89,7)
	Ja	29	(10,0)
	Unbekannt	1	(0,3)
<i>Radiotherapie</i>	Nein	69	(23,8)
	Ja	199	(68,6)
	Unbekannt	22	(7,6)
<i>Bisphosphonate</i>	Nein	228	(78,6)
	Ja	52	(17,9)
	Unbekannt	10	(3,4)
<i>Chemotherapie</i>	Keine	159	(54,8)
	Adjuvant	58	(20,0)
	Neoadjuvant	73	(25,2)

DTC disseminierte Tumorzellen, *NST* nicht-speziieller Typ, *DCIS* duktales carcinoma in situ, *ER* Östrogenrezeptor, *PR* Progesteronrezeptor, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *IHC* immunhistochemisch, *TNBC* triple-negatives Mammakarzinom. Prozentangaben in Schichtenprozent.

* bei neoadjuvant behandelten Patientinnen wurde das klinische Stadium berücksichtigt (cT)

** bei neoadjuvant behandelten Patientinnen wurde das klinische Stadium berücksichtigt (cN); DCIS-Patientinnen ohne axilläre Lymphknotenbiopsie wurden als cN0 deklariert

*** 18 DCIS-Fälle

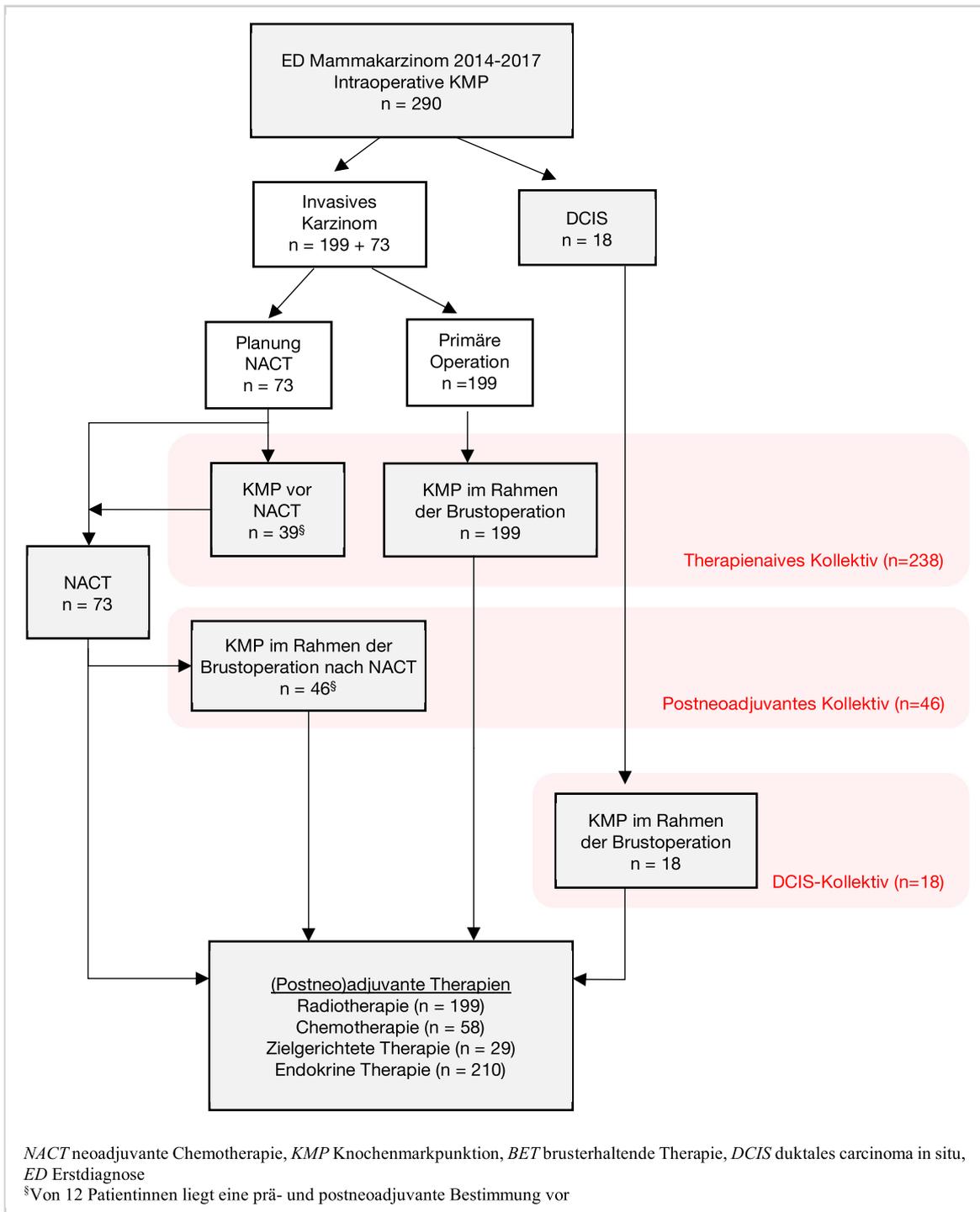


Abbildung 2: Flussdiagramm zu klinischem Vorgehen und Untersuchungskollektiven mit Zeitpunkten der Knochenmarkpunktion zur Bestimmung des DTC-Status.

2.4 Immunhistochemische Subtypisierung

Alle immunhistochemischen Bestimmungen, sowohl der HER2- und Ki-67-Expression als auch des ER- und PR-Status des Primärtumors, wurden entsprechend der Protokolle des

Institut für Pathologie des UKD angefertigt. Als HER2-positiv galten Patientinnen mit einem Score von 3+ in der immunhistochemischen Bestimmung oder Amplifikation in der FISH. Die Einteilung in immunhistochemische Subtypen erfolgte unter Verwendung der ER-, PR-, HER2- und Ki-67-Ergebnisse.

HER2-positiv Tumore (HR-negativ und -positiv) wurden als solche zusammengefasst. Ein Ki-67-Proliferationsindex $\geq 20\%$ diente als Schwellenwert zur Diskriminierung zwischen Luminal A- und Luminal B-Tumoren [30, 43].

2.5 DTC-Nachweis

Für den Nachweis von DTCs hat sich insbesondere das Knochenmark als leicht zugängliches Kompartiment etabliert. Die Knochenmarkpunktionen erfolgten unter streng aseptischen Bedingungen nach Jamshidi-Technik [131]. Nach einer kleinen Hautinzision mit einem Skalpell zur Vermeidung einer Kontamination mit epidermalen Zellen, wurde der Beckenkamm an der Spina iliaca anterior superior punktiert, bevor mit einer heparinisierten (1000IE) Spritze 10 – 20 ml Knochenmark entnommen wurden.

Die folgende Bestimmung des DTC-Status der Patientinnen wurde durch das Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik des UKD durchgeführt. Die Aufarbeitung begann unmittelbar nach Gewinnung und Transport des Zellmaterials. Zuerst erfolgte eine Übertragung in ein 50 ml Falcon-Röhrchen und ein Auffüllen auf 30 ml mit PBS (PBS phosphate buffered saline, SIGMA Aldrich Laborchemikalien GmbH, Hannover). Mittels Dichtekissen-zentrifugation mit Ficoll wurde das Zellmaterial aus dem Knochenmarkspirat in seine unterschiedlichen Zellfraktionen aufgeteilt. Hierbei werden die unterschiedlichen Dichteigenschaften der im Knochenmark vorkommenden Zellen genutzt, um sie durch Zentrifugation voneinander zu trennen: Das Ficoll-Trennmedium besitzt eine höhere Dichte als mononukleäre Zellen (Monozyten, Lymphozyten, Tumorzellen), jedoch eine niedrigere Dichte als Granulozyten und Erythrozyten, sodass nur die letzteren beiden bei der Zentrifugation durch das Trennmedium hindurchsedimentieren. Hierzu wurde das Zellmaterial nach der Pufferung über 15ml Ficoll (Dichte $1,077\text{ g/cm}^3$, Biochrom, Deutschland) geschichtet und bei 1600 min^{-1} und ausgestellter Bremse 30 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend finden sich folgende Phasen: Plasma, mononukleäre Zellen (Monozyten, Lymphozyten), Ficoll-Trennmedium, Granulozyten und Erythrozyten. Die DTCs sind, falls vorhanden, in der Phase der mononukleären Zellen auffindbar (siehe Abbildung 3). Anschließend folgte ein Waschschriff. Hierbei wurde die Interphase mit den

mononukleären Zellen abgenommen, nach Transfer in ein neues Röhrchen erneut in PBS suspendiert und darauffolgend bei 1600 min^{-1} für 7 Minuten zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde das entstandene Sediment durch Hinzugabe von 5 – 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer und anschließender 10-minütiger Inkubation im Kühlschrank von Erythrozyten gereinigt. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 1600 min^{-1} für 7 Minuten und ein Abkippen des Überstandes. Die sedimentierten mononukleären Zellen wurden in 5 – 10 ml PBS resuspendiert.

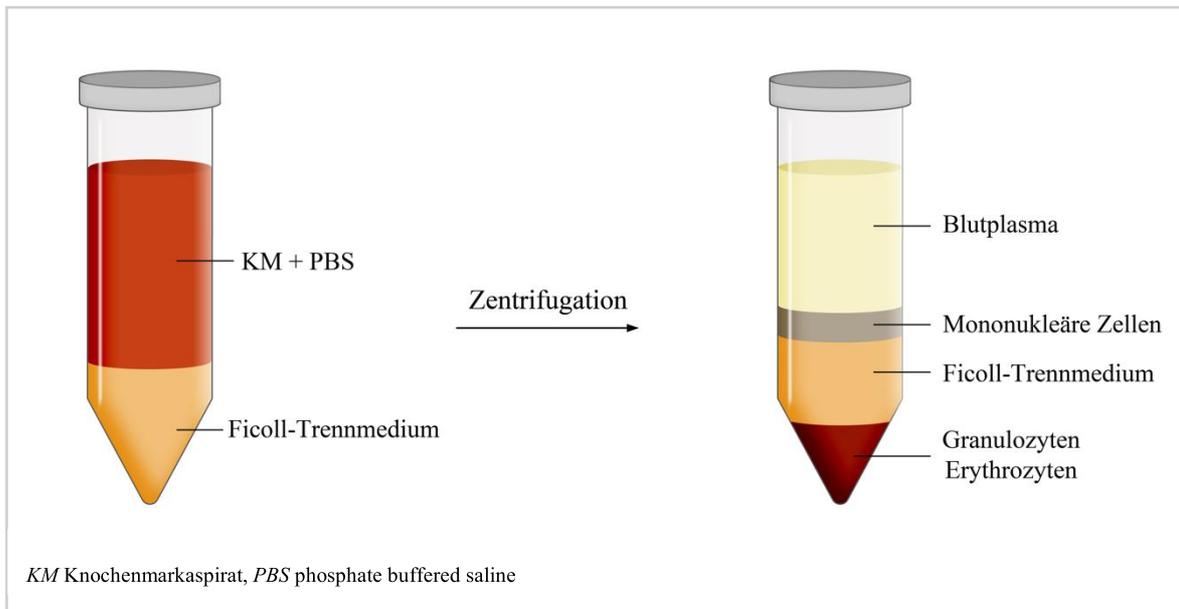


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aufarbeitung des Knochenmarkaspirates mittels Dichtekissen-zentrifugation. Eigene Darstellung.

Mithilfe einer Neubauerzählerkammer wurde die Gesamtzellzahl der Zellsuspension bestimmt. Hierzu wurde auf einer Mikrotiterplatte $100 \mu\text{l}$ einer Verdünnung ($50 \mu\text{l}$ der Zellsuspension versetzt mit $50 \mu\text{l}$ Tryptanblaulösung) angesetzt, von der $1 \mu\text{l}$ in der Neubauerzählerkammer lichtmikroskopisch untersucht wird. Da die Probenmenge sowie die Verdünnung bekannt sind, kann mithilfe der Anzahl der in der Neubauerzählerkammer ausgezählten Zellen die Gesamtzellzahl der Suspension berechnet werden. Die Suspension konnte dadurch nach erneuter Zentrifugation bei 1600 min^{-1} für 7 Minuten und Abkippen des Überstandes durch Zugabe von PBS auf eine Zellzahl von $750.000 \text{ Zellen/ml}$ verdünnt werden. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde mithilfe einer Zytocentrifuge (Universal 16A; Hettich, Deutschland) entsprechend der Herstellervorschriften auf einen Objektträger aufgetragen (Zytospin).

Die DTC-Bestimmung erfolgte mittels Mehrfachimmunfluoreszenz, welche den mikroskopischen Nachweis verschiedener Antigene mit Fluorophor-markierten Antikörpern erlaubt.

Unter Einsatz von 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA; Konzentration 1mg/ml, Verdünnung 1:1000 auf 1 µg/ml) erfolgte die Hintergrundfärbung. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet selektiv an DNA und bildet mit hoher Spezifität stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe. DAPI wird von Zellen durch eine intakte Zellmembran aufgenommen und kann damit zur Färbung der Nuklei vitaler Zellen an fixierten Präparaten eingesetzt werden. Sein Emissionsspektrum liegt im blau-violetten Bereich.

Zur Färbung und Diskriminierung der Leukozyten in der Zellsuspension wurde eine indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung von CD45-Primärantikörper (D9M8I XP Rabbit mAb, Cell Signaling Technology, Danvers, USA; Konzentration 50µg/ml, Verdünnung 1:200 auf 250 ng/ml) und Fluoreszenzfarbstoff-Sekundärantikörper (Donkey anti-Rabbit IgG H+L Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA; Konzentration 2mg/ml, Verdünnung 1:500 auf 4 µg/ml) durchgeführt. CD45 wird von allen hämatopoetischen Zellen (ausgenommen Erythrozyten und Thrombozyten) exprimiert. Von nicht-hämatopoetischen Zellen (sowohl normalen als auch malignen Ursprungs) wird es nicht exprimiert. Das Emissionsspektrum des verwendeten CD45-Antikörpers liegt im grünen Bereich.

Die anschließende DTC-Bestimmung erfolgte durch den Immunfluoreszenz-Nachweis von Zytokeratin (CK). Hierfür wurde der pan-Zytokeratin-Antikörper AE1/AE3, (Pan Cytokeratin Monoclonal Antibody AE1/AE3, eFluor™ 615, Mouse-IgG1; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA; Konzentration 200µg/ml, Verdünnung 1:40 auf 5 µg/ml) verwendet. Die zwei Antikörper AE1 und AE3 reagieren jeweils mit sauren bzw. basischen Zytokeratinen und decken ein breites Spektrum an CKs für den DTC-Nachweis ab: Eingeschlossen sind CK10, CK14 – 16 und CK19 (AE1) sowie CK1 – 8 (AE3) [132]. Das Emissionsspektrum des verwendeten pan-Zytokeratin-Antikörpers liegt im roten Bereich. Abbildung 4 zeigt die beschriebene Immunfluoreszenz-Methode beispielhaft an einer aufgearbeiteten Knochenmarksprobe.

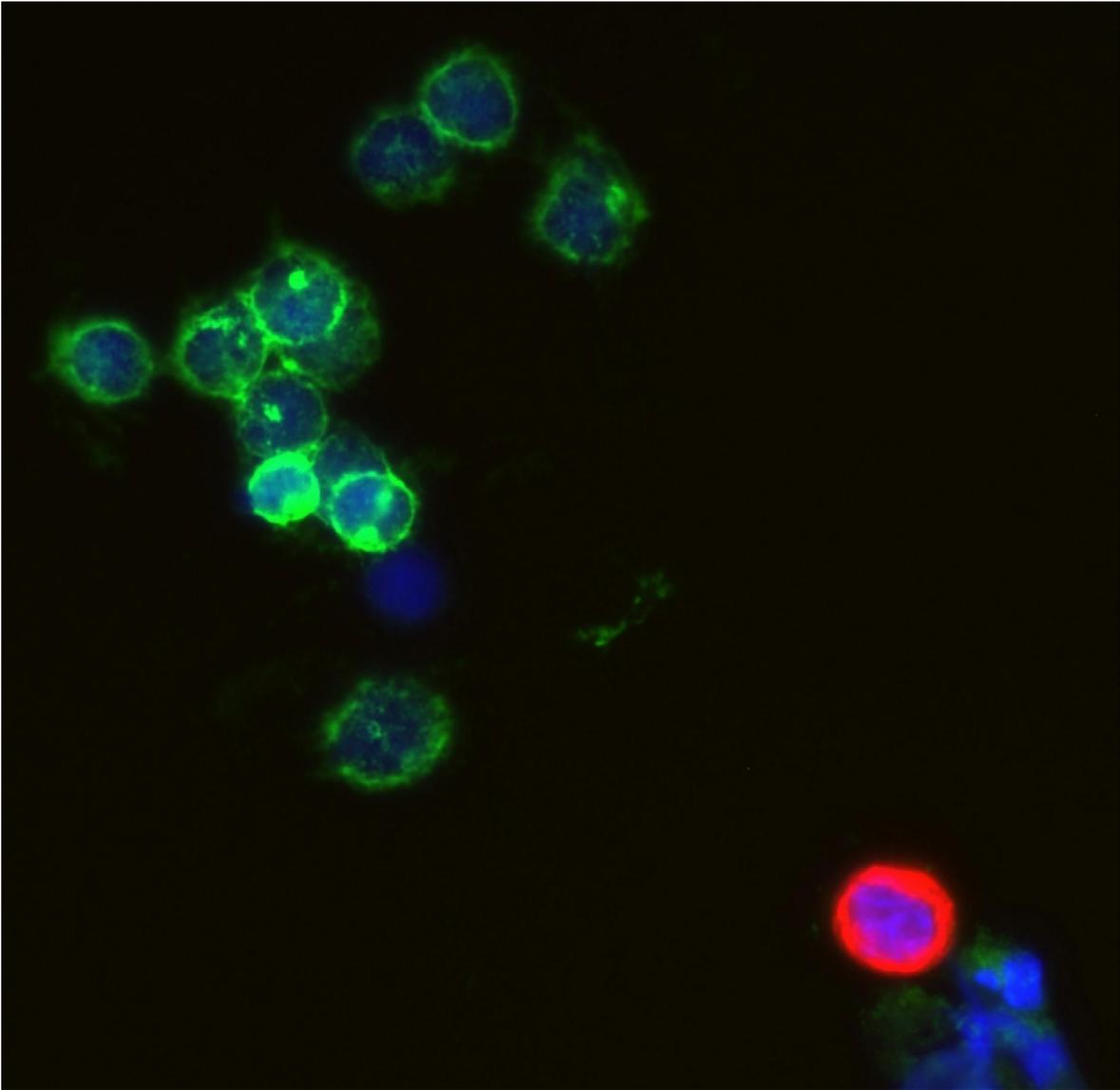


Abbildung 4: Immunfluoreszenz-Färbung des präparierten Knochenmarkspirates. Hintergrundfärbung der Nuklei mit DAPI (blau). Oberflächenantigen CD45 der Leukozyten angefärbt mit CD45-AK (grün). Epitheliales Zytokeratin einer disseminierten Tumorzelle angefärbt mit pan-Zytokeratin-Antikörper AE1/AE3 (rot). 20-fache Vergrößerung. Eigene Aufnahme.

Die Tumorzell-Morphologie wurde im Einklang mit Empfehlungen der *European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection* (Tabelle 4) und Empfehlungen des Internationalen Konsensus für den standardisierten Nachweis und die klinische Implementierung disseminierter Tumorzellen ausgewertet [133, 134]. Zur DTC-Bestimmung wurden pro Patientin mindestens zwei Objektträger mit je mindestens 750.000 Zellen (insgesamt $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Patientin) untersucht.

Als Gegenkontrolle wurden Objektträger mit Leukozyten gesunder Probandinnen mit entsprechenden Kontrollantikörpern eingesetzt (Mouse G3A1 monoclonal Antibody IgG1

Isotype Control, Alexa Flour 594 Conjugate; Cell Signaling Technology, Danvers, USA; Konzentration 100µg/ml, Verdünnung 1:20 auf 5µg/ml und Rabbit DA1E mAb IgG XP Isotype Control; Cell Signaling Technology, Danvers, USA; Konzentration 2,5mg/ml, Verdünnung 1:10.000 auf 250ng/ml).

Tabelle 4: Einteilung der disseminierten Tumorzellen nach der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection [133]

<i>Gruppe</i>	<i>Klassifikation</i>	<i>Definition</i>
1	Tumorzellen	Typische Tumorzellmorphologie (Deutliche Zellkernvergrößerung, atypischer Zellkern), Zellecluster immunopositiver Zellen
2	Wahrscheinliche Tumorzellen	Keine eindeutige Abgrenzung hämatopoetischer Zellen möglich Negative Kontrollfärbung mit einem für hämatopoetische Zellen isotypspezifischen Antikörper erforderlich
3	Keine Tumorzellen	Zellen hämatopoetischer Herkunft mit falsch positiven Signalen, Hautepithelzellen

2.6 Systemische Therapie

(Neo-)adjuvante Systemtherapien wurden Leitlinienkonform (S3-Leitlinie der AWMF [45] und Empfehlungen der AGO Kommission Mamma [21]) eingeleitet. Eine adjuvante Therapie mit Bisphosphonaten wurde basierend auf klinischer Evidenz und in Übereinstimmung mit den deutschen Leitlinien (S3-Leitnie der AWMF [45] und Empfehlungen der AGO Kommission Mamma [21]) bei einem Teil der postmenopusalen Patientinnen durchgeführt (Gabe von 4mg Zoledronat i.v. alle 6 Monate).

2.7 Nachbeobachtung

Die Nachbeobachtung (Follow-up) nach Abschluss der Primärtherapie erfolgte durch die medizinische Dokumentationsassistenz des Universitätstumorzentrums des UKD, dessen Erhebungen routinemäßig und unabhängig von dieser Studie stattfinden. Für die postoperativ am Brustzentrum der Universitätsfrauenklinik angebundenen Patientinnen wurde der Follow-up-Status mittels der klinikinternen Patientendatenbank bestimmt. Bei nicht-angebundenen Patientinnen wurde er per schriftlicher Nachfrage bei den weiterbetreuenden niedergelassenen Gynäkologinnen und Gynäkologen ermittelt. In die

Überlebensanalysen wurden Patientinnen mit einem Follow-up von mindestens 6 Monaten ab dem Zeitpunkt der (ersten) Knochenmarkpunktion eingeschlossen. Nachbeobachtungsdaten über einem Zeitraum von sechs Monaten hinaus liegen für 75,2 % der Patientinnen des Gesamtkollektivs vor. Die für die Überlebensanalysen festgehaltenen Ereignisse (s.u.) wurden getrennt beobachtet und dokumentiert. Die mediane Nachbeobachtungs-Zeit von Patientinnen ohne Ereignis zum Ende des Follow-Up lag bei 35,9 Monaten).

2.8 Statistische Methode

Die Auswertungen wurden mit der Statistik- und Analyse-Software IBM® SPSS® Statistics für Mac™ (Version 25.0.0.2) durchgeführt. Assoziationen zwischen klinisch-pathologischen Parametern der Patientinnen und dem DTC-Status wurden für dichotome und nicht-dichotome kategoriale Variablen mittels Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit untersucht. Zusammenfassungen von Kategorien eines Merkmals, um ausreichend große Untersuchungsgruppen zu bilden, sind unter den jeweiligen Tabellen gekennzeichnet. Der exakte Test nach Fisher wurde bei erwarteten Häufigkeiten < 5 in mehr als 20 % der Zellen von Kreuztabellen angewendet.

Überlebensanalysen

In die Überlebensanalysen wurden alle Patientinnen mit einer Nachbeobachtungszeit von mindestens 6 Monaten eingeschlossen. Die Patientinnen wurden in eine DTC-positive und eine DTC-negative Gruppe aufgeteilt. Um das Überleben zu beurteilen wurde die Zeit ab der Knochenmarkpunktion bis zum Eintreten unterschiedlicher Ereignisse getrennt untersucht. Als Ereignisse wurden der Tod jedweder Ursache, Tod als Folge des Mammakarzinoms, lokoregionäres Rezidiv des Mammakarzinoms, Mammakarzinom der Gegenseite (Zweitkarzinom) sowie Fernmetastasierung definiert (siehe Tabelle 5). Ein Eintreten des jeweiligen Ereignisses wurde mittels einer binären Zensierungsvariable festgehalten. Patientinnen, bei denen keines der Ereignisse eingetreten ist, wurden zum Zeitpunkt der letzten Nachsorge zensiert (*loss to follow-up*).

Tabelle 5: Überlebensanalysen und definierte Ereignisse

<i>Überleben</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Beobachtetes Ereignis</i>	<i>Zensur</i>
Gesamtüberleben <i>overall survival</i>	OS	Tod jedweder Ursache	Ende des Follow-up (01.02.2020), oder <i>loss to follow-up</i>
Brustkrebspezifisches Überleben <i>breast cancer specific survival</i>	BCSS	Tod als Folge des Mammakarzinoms	
Krankheitsfreies Überleben <i>disease free survival</i>	DFS	Lokoregionäres Rezidiv, Fernmetastasierung, Zweitkarzinom	
Metastasenfreies Überleben <i>distant disease free survival</i>	DDFS	Fernmetastasierung	

Zur Darstellung des Überlebens wurden die Kaplan-Meier-Kurven der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen für das Gesamtüberleben, brustkrebspezifische Überleben, krankheitsfreie Überleben und metastasenfreie Überleben geplottet. Unterschiede zwischen den Überlebenskurven der beiden DTC-Gruppen wurden mittels Mantels log-rank Test [135] beurteilt. Zur differenzierten Beurteilung der Überlebenskurven wurden ebenfalls Kurven für die kumulativen Häufigkeiten der Ereignisse („Eins-minus-Überleben-Kurven“) geplottet. Diese erlauben durch einen aufsteigenden Verlauf und eine angepasste Skalierung eine bessere Diskriminierung zwischen den beiden DTC-Gruppen bei niedrigen Ereignisraten [136]. Unterschiede im Überleben der beiden DTC-Gruppen in Abhängigkeit vom IHC-Subtyp wurden ebenfalls mittels log-rank Test beurteilt.

Cox-Regression

Die prognostische Aussagekraft des DTC-Status unter Hinzunahme anderer klinisch-pathologischer Prognosefaktoren wurde anhand des proportionalen Hazardmodells nach Cox [137] (auch multivariable Cox-PH-Regression genannt) untersucht. Univariable Cox-Regressions-Modelle wurden erstellt, um den Einfluss einzelner Variablen auf das Überleben zu evaluieren. In die multivariable Analyse wurden Variablen, die in der univariablen Analyse Signifikanz zum Niveau $p = 0,05$ erreichten, sowie weitere Parameter von bekannter klinischer Relevanz (Tumorgröße, Nodalstatus, Grading) eingeschlossen. Aus den Regressionskoeffizienten wurden Hazard Ratios mit 95%-Konfidenzintervallen berechnet.

Die Cox-PH-Regression erlaubt es, den Einfluss mehrerer Variablen auf die Überlebenszeit gleichzeitig zu untersuchen, um den Einfluss verzerrender Faktoren (*Confounding*) zu

minimieren und die Unabhängigkeit eines Prognoseparameters zu beurteilen. Das Hazard Ratio bietet ein deskriptives Maß für den Vergleich von zwei Gruppen und ihren Überlebenszeiten. Es wird als Quotient der Sterberaten (Hazards) zweier Gruppen berechnet und gibt an, um wie viel die Sterberate der einen Gruppe gegenüber der anderen erhöht ist [137]. Details zum Vorgang sowie die Ergebnisse der Überprüfung auf PH sind im Anhang aufgeführt. Alle in die multivariable Cox-PH-Regression aufgenommenen Kovariaten erfüllten die Annahme proportionaler Hazards.

Für die Interpretation der Ergebnisse aller oben genannten Untersuchungen wurde das in biometrischen Analysen übliche Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

In die folgenden Analysen zum DTC-Status wurden nur Patientinnen eingeschlossen, die zum Zeitpunkt der DTC-Bestimmung noch keine Systemtherapie erhalten hatten (therapienaive Patientinnen). Patientinnen mit DCIS wurden ebenfalls ausgeschlossen und gesondert untersucht (siehe Kapitel 3.6). Für die Analyse standen 238 der 290 Patientinnen (81,5 %) aus dem gesamten Kollektiv zur Verfügung. Disseminierte Tumorzellen ließen sich bei 47 der 238 therapienaiven Patientinnen (19,7 %) im Knochenmarkspirat nachweisen (Tabelle 6). Die meisten DTC-positiven Patientinnen hatten eine einzelne DTC in der Knochenmarksprobe (35 % der DTC-positiven Fälle). Die im Mittel nachgewiesene DTC-Anzahl betrug 5,5 Zellen. Die median nachgewiesene DTC-Anzahl betrug 2 Zellen. Als Maximum wurden in der Probe einer Patientin 56 DTCs nachgewiesen (Abbildung 5). Die Angaben beziehen sich auf die $1,5 \times 10^6$ pro Untersuchung analysierten Zellen.

Tabelle 6: DTC-Status der therapienaiven Patientinnen aus dem Gesamtkollektiv

		Häufigkeit	(%)
Fälle	DTC-negativ	191	80,3
	DTC-positiv	47	19,7
Gesamt n		238	100,0

DTC disseminierte Tumorzellen

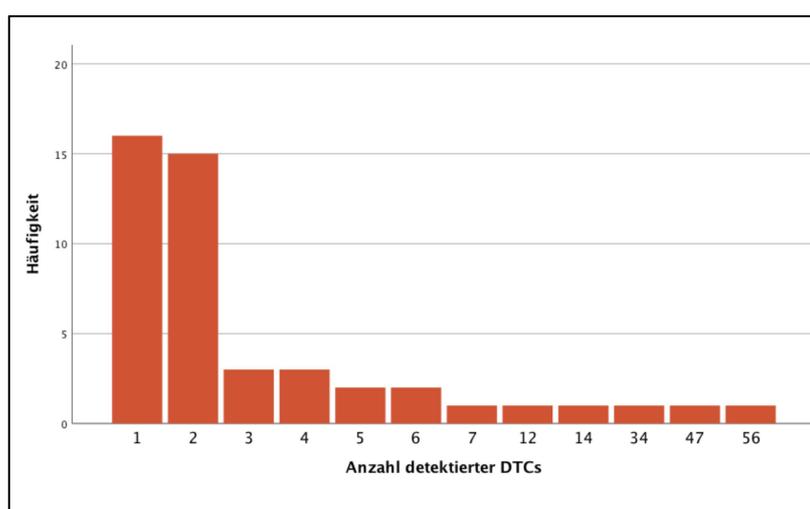


Abbildung 5: Absolute Häufigkeiten der im Knochenmarkspirat detektierten DTCs pro Patientin. Mittelwert = 5,5 Zellen; Median = 2,00 Zellen

3.2 Assoziationen zwischen DTC-Status und klinisch-pathologischen Parametern

3.2.1 Alter

DTCs im Knochenmark fanden sich bei 15,3 % der jüngeren Patientinnen bis einschließlich 60 Jahre und bei 27,3 % der Patientinnen, welche zum Zeitpunkt der Diagnose älter als 60 Jahre alt waren. Der Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit ergab, dass Patientinnen über 60 Jahre signifikant häufiger DTC-positiv waren ($p = 0,026$). Siehe Tabelle 7

Tabelle 7: Alter und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>Alter</i>	≤60 Jahre	150 (63,0)	23 (15,3)	127 (84,7)
	>60 Jahre	88 (37,0)	24 (27,3)	64 (72,7)
				<i>p = 0,026</i>

DTC disseminierte Tumorzellen. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.2.2 Menopausenstatus

146 der 238 therapienaiven Patientinnen waren zum Zeitpunkt der DTC-Bestimmung postmenopausal. Postmenopausale Patientinnen hatten mit 20,5 % eine gering höhere DTC-Prävalenz als prämenopausale Frauen mit 18,5 %. Der Chi-Quadrat Test konnte keine signifikante statistische Assoziation der beiden Merkmale nachweisen ($p = 0,696$). Siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Menopausenstatus und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>Menopausenstatus</i>	prämenopausal	92 (38,7)	17 (18,5)	75 (81,5)
	postmenopausal	146 (61,3)	30 (20,5)	116 (79,5)
				<i>p = 0,696</i>

DTC disseminierte Tumorzellen. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.2.3 Histologie

Beim den am häufigsten vorkommenden Karzinomen vom nicht-spezialen-Typ fanden sich in 20 % der Fälle DTCs im Knochenmarksausstrich. Bei invasiv-lobulären Karzinomen fanden sich in 21,3 % der Fälle DTCs. Für andere histologische Typen (medulläres, tubuläres oder muzinöses Karzinom sowie Mischtypen) ergab sich eine DTC-Positivität von 15,8 %. Der Chi-Quadrat Test ergab keine signifikante statistische Assoziation zwischen der Tumorphistologie und dem DTC-Status ($p = 0,879$). Siehe Tabelle 9.

Tabelle 9: Histologische Klassifizierung nach WHO und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>Histologie</i>	NST	170 (71,4)	34 (20,0)	136 (80,0)
	invasiv-lobulär	47 (19,7)	10 (21,3)	37 (78,7)
	andere	19 (8,0)	3 (15,8)	16 (84,2)
	unbekannt	2 (0,8)	0 (0,0)	2 (100,0)
				<i>p = 0,879</i>

DTC disseminierte Tumorzellen, *NST* nicht-spezialer Typ. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.2.4 Tumorgroße

Bei Patientinnen mit T1-klassifizierten Tumoren fanden sich in 16,8 % der Fälle DTCs im Knochenmark, bei jenen mit T2-klassifizierten Tumoren in 19,0 % der Fälle. Tumore mit einer Tumorgroße >5cm oder infiltrativem Wachstum in die Brustwand oder Haut (T3-4) zeigten in mehr als doppelt so vielen Fällen DTCs im Knochenmark (42,1 %). Patientinnen mit höheren T-Stadien waren signifikant häufiger DTC-positiv ($p = 0,035$). Siehe Tabelle 10.

Tabelle 10: Tumorgröße und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>Tumorgröße</i>	T1	119 (50,0)	20 (16,8)	99 (83,2)
	T2	100 (42,0)	19 (19,0)	81 (81,0)
	T3-4	19 (8,0)	8 (42,1)	11 (57,9)
				<i>p = 0,035*</i>

DTC disseminierte Tumorzellen. Die Tumorstadien wurden in T1, T2, T3-T4 zusammengefasst. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.2.5 Nodalstatus

157 der 238 Patientinnen (66 %) hatten im Staging keinen Tumornachweis in den Lymphknoten. Patientinnen mit tumorfreien Lymphknoten waren in 19,5 % der Fälle DTC-positiv. Patientinnen mit Tumornachweis in einem oder mehr Lymphknoten zeigten in 18,5 % der Fälle DTCs im Knochenmark. Der Nodalstatus und der DTC-Status waren statistisch nicht miteinander assoziiert ($p = 0,732$). Siehe Tabelle 11.

Tabelle 11: Nodalstatus und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>Nodalstatus</i>	N0	157 (66,0)	32 (20,4)	125 (79,6)
	N+	81 (34,0)	15 (18,5)	66 (81,5)
				<i>p = 0,732</i>

DTC disseminierte Tumorzellen. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.2.6 Grading

Low-grade-Karzinome zeigten in 12 % der Fälle DTCs im Knochenmark. Karzinome mit höherem Grading wiesen häufiger DTCs im Knochenmark auf (G2-Tumore in 20,5 % bzw. G3-Tumore in 21,9 % der Fälle). Es bestand keine signifikante statistische Assoziation zwischen den Merkmalen ($p = 0,558$). Siehe Tabelle 12.

Tabelle 12: Grading nach Elston und Ellis und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>Grading</i>	G1	25 (10,5)	3 (12,0)	22 (88,0)
	G2	146 (61,3)	30 (20,5)	116 (79,5)
	G3	64 (26,9)	14 (21,9)	50 (78,1)
	unbekannt	3 (1,3)	0 (0,0)	3 (100,0)
				<i>p = 0,558</i>

DTC disseminierte Tumorzellen. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.2.7 Ki-67-Proliferationsindex

Karzinome mit einem niedrigen Ki-67-Proliferationsindex (< 15 %) waren mit 23,5 % der Fälle häufiger DTC-positiv gegenüber 20,8 % der Karzinome mit einem hohen Ki-67-Proliferationsindex (> 30 %). Bei einem Ki-67-Proliferationsindex, der nicht sicher als niedrig oder hoch eingestuft werden kann (zwischen 15 – 30 %) waren 15,5 % DTC-positiv. Der Ki-67-Proliferationsindex und der DTC-Status waren statistisch nicht signifikant miteinander assoziiert ($p = 0,374$). Siehe Tabelle 13.

Tabelle 13: Ki-67-Proliferationsindex und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests.

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>Ki67</i>	< 15 %	85 (35,7)	20 (23,5)	65 (76,5)
	15 – 30 %	103 (43,3)	16 (15,5)	87 (84,5)
	> 30 %	48 (20,2)	10 (20,8)	38 (79,2)
	unbekannt	2 (0,8)	1 (50,0)	1 (50,0)
				<i>p = 0,374</i>

DTC disseminierte Tumorzellen. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.2.8 Hormonrezeptorstatus

DTC-Positivität war für ER-negative (18,8 %) wie ER-positive (19,9 %) Karzinome annähernd gleich. Auch im Chi-Quadrat Test zeigten sich ER-Status und DTC-Status als statistisch unabhängig voneinander ($p = 0,897$). Siehe Tabelle 14.

Beim PR-Status war ein größerer Unterschied zu beobachten. Hier ließen sich bei 26,3 % der PR-negativen Tumoren DTCs im Knochenmark nachweisen, im Vergleich zu 17,7 %

bei den PR-positiven Karzinomen. Jedoch war dieser Unterschied nicht hinreichend signifikant um eine Abhängigkeit zwischen PR-Status und DTC-Status statistisch nachweisen zu können. ($p = 0,153$). Siehe Tabelle 15.

Tabelle 14: ER-Status und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>ER-Status</i>	ER-	32 (13,4)	6 (18,8)	26 (81,3)
	ER+	206 (86,6)	41 (19,9)	165 (80,1)
				$p = 0,879$

DTC disseminierte Tumorzellen, *ER* Östrogenrezeptor. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

Tabelle 15: PR-Status und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>PR-Status</i>	PR-	57 (23,9)	15 (26,3)	42 (73,7)
	PR+	181 (76,1)	32 (17,7)	149 (82,3)
				$p = 0,153$

DTC disseminierte Tumorzellen, *PR* Progesteronrezeptor. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.2.9 HER2-Status

18,5 % der Fälle mit HER2-negativen Tumoren zeigten DTCs im Knochenmark. HER2-positive Tumore waren mit 30,8 % deutlich häufiger DTC-positiv. Der Chi-Quadrat Test konnte jedoch keine signifikante statistische Assoziation der beiden Merkmale nachweisen ($p = 0,138$). Siehe Tabelle 16.

Tabelle 16: HER2-Status und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>HER2-Status</i>	HER2-	211 (88,7)	39 (18,5)	172 (81,5)
	HER2+	26 (10,9)	8 (30,8)	18 (69,2)
	unbekannt	1 (0,4)	0 (0,0)	1 (100,0)
				<i>p = 0,138</i>

DTC disseminierte Tumorzellen, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.2.10 Immunhistochemischer Subtyp

Bei Patientinnen mit Luminal A-Tumoren zeigten mit 20,2 % eine höhere DTC-Positivität als Luminal B-Tumore (HER2-) mit 14,7 %. Triple negative Karzinome zeigten in 20,8 % der Fälle DTCs. HER2-positive Tumore gingen mit der höchsten DTC-Positivität von 30,8 % einher. Im Chi-Quadrat-Test waren DTC-Status und immunhistochemischer Subtyp statistisch nicht signifikant assoziiert ($p = 0,376$). Siehe Tabelle 17.

Tabelle 17: Immunhistochemischer Subtyp und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests

		<i>Gesamt n (%)</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>IHC-Subtyp</i>	Luminal A	119 (50,0)	24 (20,2)	95 (79,8)
	Luminal B (HER2-)	68 (28,6)	10 (14,7)	58 (85,3)
	HER2+	26 (10,9)	8 (30,8)	18 (69,2)
	TNBC	24 (10,1)	5 (20,8)	19 (79,2)
	unbekannt	1 (0,4)	0 (0,0)	1 (100,0)
				<i>p = 0,376</i>

DTC disseminierte Tumorzellen, *IHC* immunhistochemisch, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *TNBC* triple-negatives Mammakarzinom. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.3 Überlebensanalysen

Im Folgenden soll der Zusammenhang zwischen dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und der Überlebenszeit untersucht werden. Die Ergebnisse sind für das Gesamtüberleben, das brustkrebspezifische Überleben, das krankheitsfreie Überleben sowie das metastasenfrem Überleben separat aufgeführt und in Form von Kaplan-Meier-Kurven und Kurven für die kumulativen Häufigkeiten der eingetretenen Ereignisse

dargestellt. Der Vergleich der Überlebensverläufe zwischen DTC-positiv getesteten Patientinnen und DTC-negativ getesteten Patientinnen wurde mit Mantels log-rank Test durchgeführt und auf Signifikanz untersucht. Außerdem soll der Einfluss des DTC-Status auf das Überleben mittels univariabler Cox-Regression quantifiziert werden. Hier können die berechneten Hazard-Ratios und deren 95%-Konfidenzintervalle Aufschluss über das Maß des Überlebensunterschiedes der DTC-negativen und DTC-positiven Patientinnen geben. Nachbeobachtungsdaten liegen für 218 der 290 Patientinnen (75,2 %) vor. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 35,9 Monate (min. 6 Monate bis max. 65 Monate).

3.3.1 Beobachtete Sterbefälle, Lokalrezidive und Fernmetastasen

Sieben Patientinnen (3,2 %) verstarben während der Nachbeobachtungsperiode, sechs davon waren Folgen des Mammakarzinoms zuzuordnen. 14 Patientinnen (6,4 %) erlitten ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastasierung ihres Mammakarzinoms. Es traten drei lokoregionäre Rezidive, davon eins in der ipsilateralen Brust und zwei in den ipsilateralen axillären Lymphknoten, sowie ein Zweitkarzinom in der kontralateralen Brust auf. Siehe Tabelle 18.

Tabelle 18: Anzahl der Rezidive und Sterbefälle im Kollektiv

		<i>Anzahl</i>	<i>(%)</i>
<i>Rezidiv</i>	Ja	14	(6,4)
	davon Lokalrezidiv	3	(1,4)
	davon Fernrezidiv	10	(4,5)
	davon Zweitkarzinom	1	(0,5)
	Nein	204	(93,6)
<i>Verstorben</i>	Ja	7	(3,2)
	als Folge des Mammakarzinoms	6	(2,8)
	Nein	211	(96,8)

Bei 10 Patientinnen (4,6 %) ist während der Nachbeobachtungsperiode eine Fernmetastasierung diagnostiziert worden. Bei 5 dieser Patientinnen wurde eine Metastasierung in mehr als einem Organ diagnostiziert. Am häufigsten zeigten sich Metastasen in Knochen oder Leber (jeweils in 42,9 % aller Rezidivfälle), gefolgt von Metastasen im Gehirn, sowie distanten Lymphknoten (in jeweils 14,3 % aller Rezidivfälle). Tabelle 19 veranschaulicht rezidierte Patientinnen und die Lokalisationen ihrer Rezidive.

Tabelle 19: Rezidierte Patientinnen (n = 14) und Lokalisationen der Lokal- und Fernrezidive mit absoluter und relativer Häufigkeit der Lokalisation unter allen Rezidivfällen

Lokalisation	Patientin mit Rezidiv														Rezidivfälle mit Beteiligung	Relative Häufigkeit der Beteiligung
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
<i>Ipsilaterale Brust</i>	X														1	7,1%
<i>Kontralaterale Brust</i>		X													1	7,1%
<i>Ipsilaterale axilläre LK</i>				X				X							2	14,3%
<i>LK (distant)</i>					X	X									2	14,3%
<i>Knochen</i>			X		X	X	X				X	X			6	42,9%
<i>Leber</i>			X			X	X		X	X				X	6	42,9%
<i>Lunge</i>						X									1	7,1%
<i>ZNS</i>													X	X	2	14,3%

3.3.2 DTC-Status und Gesamtüberleben bzw. brustkrebsspezifisches Überleben

In der Gruppe der DTC-positiven Patientinnen zeigte sich ein schlechteres Gesamtüberleben als in der DTC-negativen Gruppe. So verstarben im Nachbeobachtungszeitraum in der DTC-positiven Gruppe 9,1 % der Patientinnen, gegenüber 1,7 % in der DTC-negativen Gruppe. Abbildung 6 zeigt das relative Gesamtüberleben der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im Vergleich. Aus dem Verlauf der Kurven ist ein Trend in Richtung kürzeren Überlebens der DTC-positiven Patientinnen zu erkennen: Die Kaplan-Meier-Kurve der DTC-positiven Patientinnen läuft ab einem Nachbeobachtungszeitraum von 15 Monaten stets unterhalb der Kurve der DTC-negativen Patientinnen. Die Kurven unterscheiden sich nach dem log-rank Test signifikant ($p = 0,014$), gleichbedeutend mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben der DTC-positiven Patientinnen. Analog dazu zeigt Abbildung 7 den kumulativen Anteil der Sterbefälle der beiden Gruppen: In der DTC-positiven Gruppe liegt die Zahl der kumulativen Sterbefälle anteilig stets über denen der DTC-negativen Patientinnen.

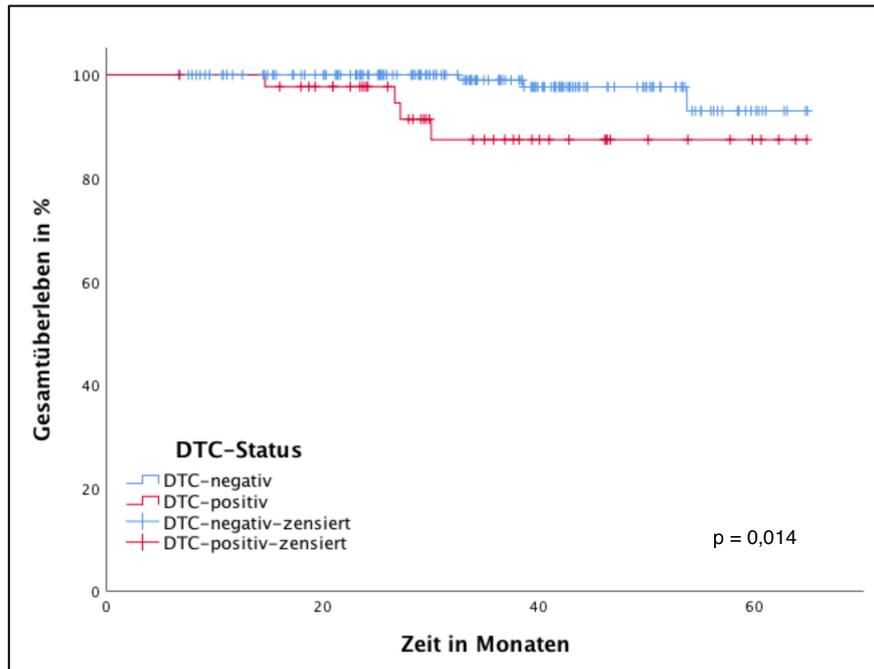


Abbildung 6: Relatives Gesamtüberleben der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 211 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle

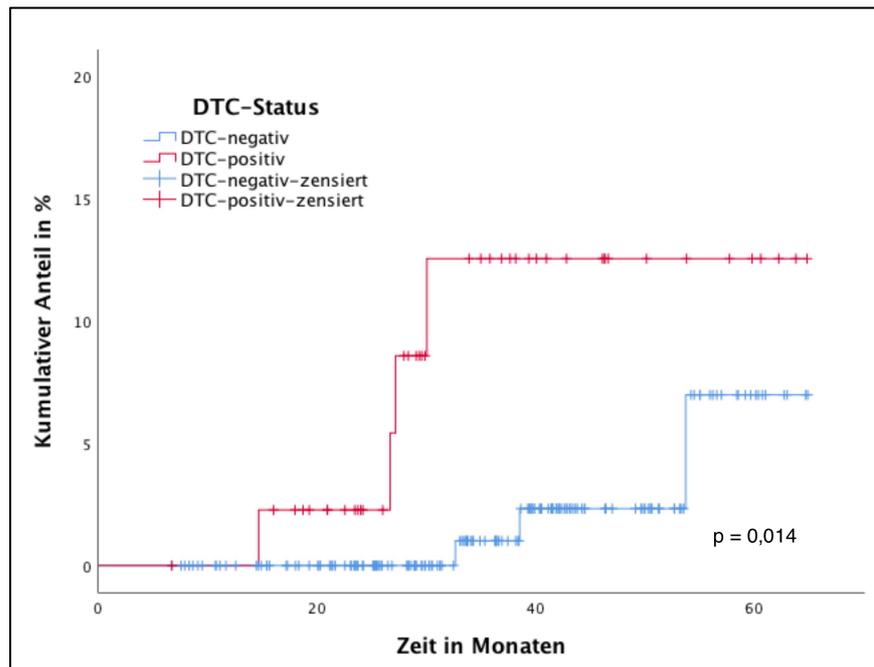


Abbildung 7: Gesamtüberleben dargestellt als kumulativer Anteil der verstorbenen Patientinnen innerhalb der DTC-positiven und DTC-negativen Gruppe im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 211 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle

Beobachtet man ausschließlich das Mammakarzinom als Todesursache zeigte sich ein geringfügig größerer Unterschied des Überlebens als beim Gesamtüberleben (durch den

Ausschluss einer DTC-negativen, nicht an Folgen des Mammakarzinoms verstorbenen Patientin). Die DTC-positiven Patientinnen verstarben innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums häufiger (9,1 % versus 1,1 %). Abbildung 8 zeigt das relative brustkrebsspezifische Überleben der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im Vergleich. Ab einem Beobachtungszeitraum von 15 Monaten verläuft die Kurve der DTC-positiven Patientinnen stets unterhalb der Kurve der DTC-negativen Patientinnen. Korrespondierend zeigt Abbildung 9 den kumulativen Anteil an Brustkrebs verstorbenen Patientinnen im Vergleich: Die Kurve der DTC-positiven Patientinnen verläuft mit größerer Steigung stets oberhalb der Kurve der DTC-negativen Patientinnen, sodass sich für DTC-positiv Patientinnen ein häufigeres Versterben ergibt. Die Unterschiede waren im log-rank Test hochsignifikant ($p = 0,005$).

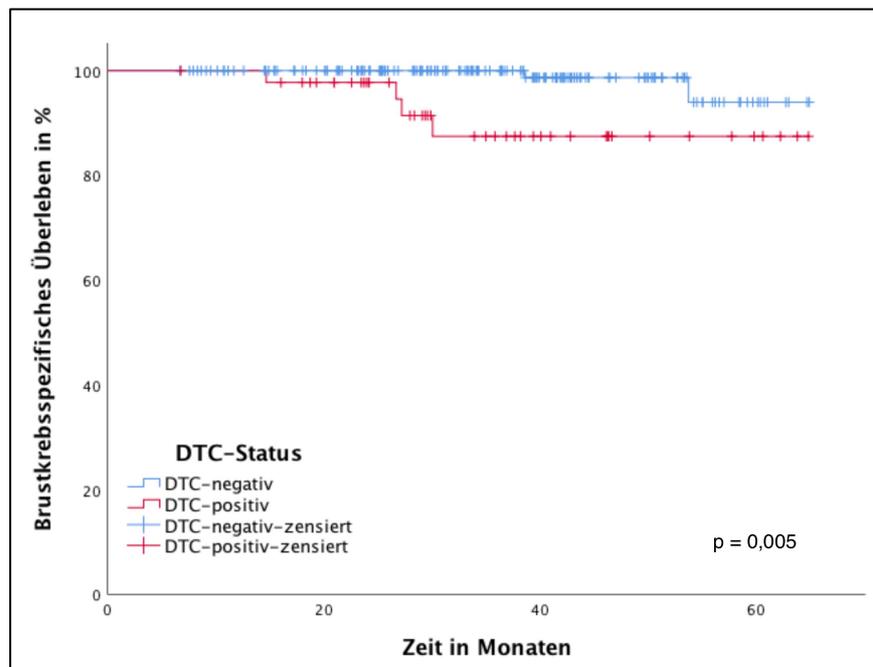


Abbildung 8: Relatives brustkrebsspezifisches Überleben der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 212 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle

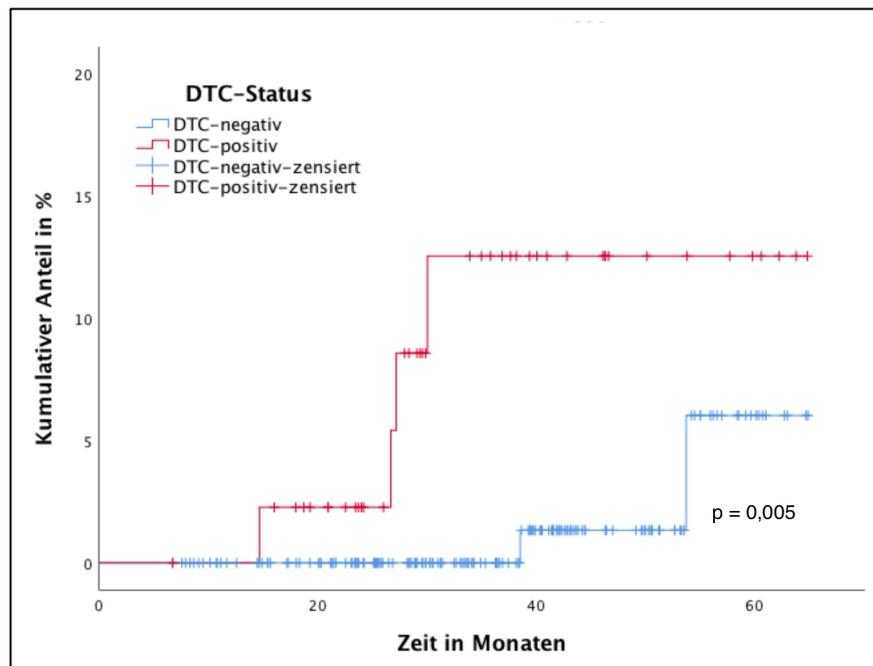


Abbildung 9: Brustkrebspezifisches Überleben dargestellt als kumulativer Anteil der an Folgen des Mammakarzinoms verstorbenen Patientinnen innerhalb der DTC-positiven und DTC-negativen Gruppe im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 212 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle

Die Ergebnisse der univariablen Cox-Regression zur Berechnung der Hazard-Ratios für das Gesamtüberleben und das brustkrebspezifische Überleben sind in Tabelle 20 aufgeführt. Die DTC-positiven Patientinnen unserer Studie hatten ein 5,43-mal höheres Risiko zu versterben (95 %-KI 1,21 - 24,38; $p = 0,027$) und ein 7,98-mal höheres Risiko, an ihrem Mammakarzinom zu versterben (95 %-KI 1,45 - 43,73; $p = 0,017$). Ein positiver DTC-Status war in der univariablen Analyse signifikant mit einem kürzeren Gesamtüberleben bzw. brustkrebspezifischen Überleben assoziiert. Die prognostische Unabhängigkeit des DTC-Status von anderen Parametern wird in der multivariablen Analyse in Kapitel 3.3.5.1 untersucht.

Tabelle 20: Ergebnisse der univariablen Cox-Regression des DTC-Status für das Gesamtüberleben (OS) und das brustkrebspezifische Überleben (BCSS). Angegeben sind Hazard Ratios (HR), 95%-Konfidenzintervalle (KI) und der Signifikanzwert des Wald-Tests (p).

	n	(%)	OS			BCSS		
			HR	95%-KI	p	HR	95%-KI	p
<i>DTC-Status</i>								
<i>Negativ</i>	174	(79,8)						
<i>Positiv</i>	44	(20,2)	5,43	1,21 - 24,38	0,027	7,98	1,45 - 43,74	0,017

DTC disseminierte Tumorzellen, *HR* Hazard Ratio, *OS* Gesamtüberleben, *BCSS* brustkrebspezifisches Überleben, *95%-KI* 95%-Konfidenzintervall

3.3.3 DTC-Status und krankheitsfreies bzw. metastasenfreies Überleben

Auch für das krankheitsfreie Überleben zeichnet sich ein Unterschied zwischen den DTC-Gruppen ab. Während DTC-negative Patientinnen in 4,6 % der Fälle ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastasierung ihres Mammakarzinoms erlitten, waren es bei den DTC-positiven Patientinnen 13,6 %. Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen das krankheitsfreie Überleben bzw. den kumulativen Anteil der Lokal- oder Fernrezidivfälle der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im Vergleich. Die Kurven unterschieden sich im log-rank Test signifikant ($p = 0,034$). Zunächst verlaufen die Kaplan-Meier-Kurven nah beieinander, gehen aber nach einem Beobachtungszeitraum von 24 Monaten weiter auseinander, sodass sich zum Zeitpunkt von 60 Monaten nach Operation deutlich unterschiedliche rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeiten ergaben.

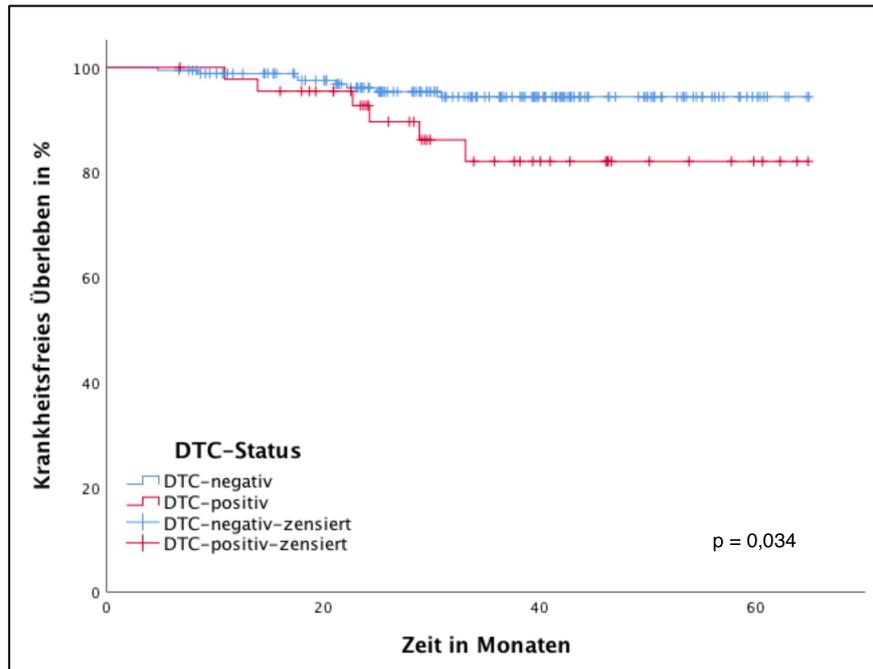


Abbildung 10: Relatives krankheitsfreies Überleben der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 204 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle

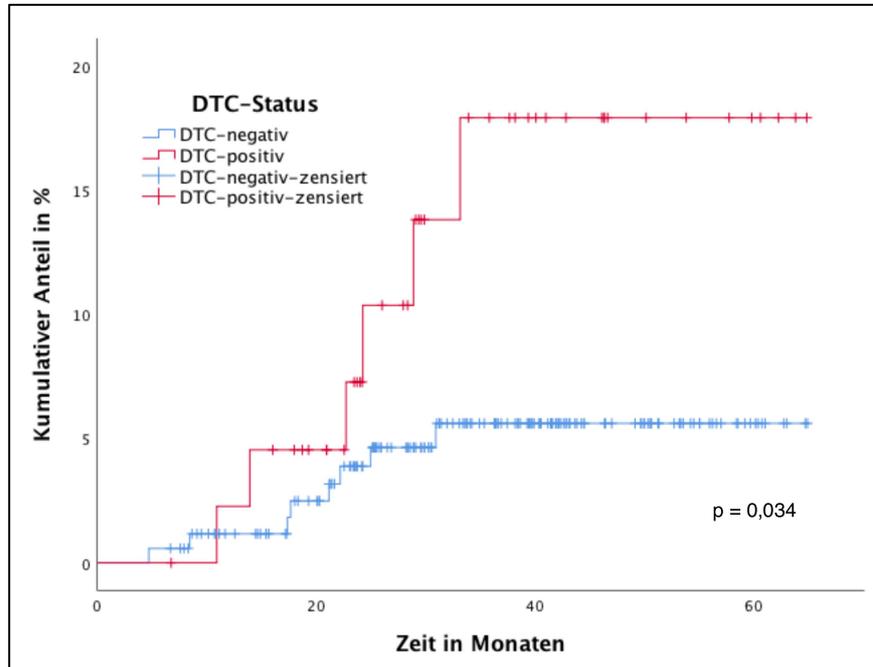


Abbildung 11: Krankheitsfreies Überleben dargestellt als kumulativer Anteil der Patientinnen mit Rezidiv innerhalb der DTC-positiven und DTC-negativen Gruppe im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 204 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle

Lässt man die Lokalrezidive und ipsilateralen Lymphknotenrezidive bei der Beobachtung außen vor, um nur das metastasenfreie Überleben zu bestimmen, so wurde innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums bei 11,4% der DTC-positiven Patientinnen eine Fernmetastasierung diagnostiziert, gegenüber 2,9% bei den DTC-negativen Patientinnen. Auch in den Kaplan-Meier-Kurven sowie den Kurven für die kumulativen Fälle mit Fernmetastasierung (Abbildung 12 und Abbildung 13) zeigt sich das schlechtere metastasenfreie Überleben der DTC-positiven Patientinnen. Das metastasenfreie Überleben unterscheidet sich für beide Gruppen im log-rank Test signifikant ($p = 0,020$).

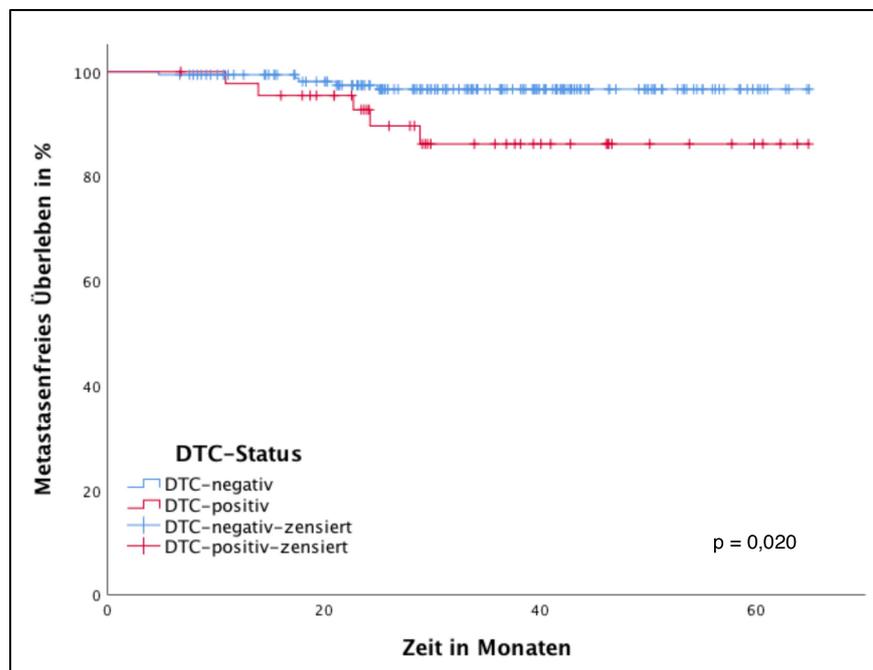


Abbildung 12: Relatives Metastasenfreies Überleben der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 208 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle

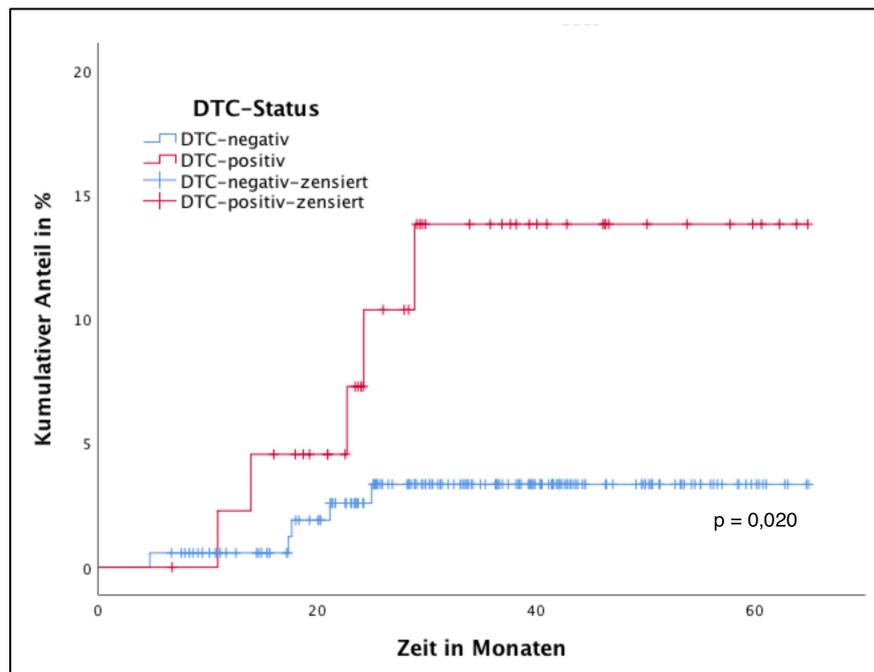


Abbildung 13: Metastasenfreies Überleben dargestellt als kumulativer Anteil der Patientinnen mit Fernmetastasierung innerhalb der DTC-positiven und DTC-negativen Gruppe im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 208 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle

Die Ergebnisse der univariablen Cox-Regression zur Berechnung der Hazard-Ratios für das krankheitsfreie und metastasenfreie Überleben sind in Tabelle 21 aufgeführt. Die Untersuchungen zum krankheitsfreien Überleben zeigten, dass DTC-positive Patientinnen in unserer Studie ein 3,03-fach höheres Risiko eines Rezidivs hatten (95%-KI 1,05 - 8,73; $p = 0,04$). Das Risiko für Fernmetastasen war 4,01-fach erhöht (95%-KI 1,16 - 13,85; $p = 0,028$). Ein positiver DTC-Status war in der univariablen Analyse signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien und metastasenfreien Überleben assoziiert. Die prognostische Unabhängigkeit von anderen Parametern wird in der multivariablen Analyse in Kapitel 3.3.5.2 untersucht.

Tabelle 21: Ergebnisse der univariablen Cox-Regression des DTC-Status für das krankheitsfreie Überleben (DFS) und das Metastasenfreie Überleben (DDFS). Angegeben sind Hazard Ratios (HR), 95%-Konfidenzintervalle (KI) und der Signifikanzwert des Wald-Tests (p).

	n	(%)	DFS			DDFS		
			HR	95%-KI	p	HR	95%-KI	p
<i>DTC-Status</i>								
<i>Negativ</i>	174	(79,8)						
<i>Positiv</i>	44	(20,2)	3,03	1,05 - 8,73	0,04	4,01	1,16 - 13,85	0,028

DTC disseminierte Tumorzellen, *HR* Hazard Ratio, *DFS* krankheitsfreies Überleben, *DDFS* metastasenfreies Überleben, *95%-KI* 95%-Konfidenzintervall

3.3.4 DTC-Status, Immunhistochemischer Subtyp und Prognose

Im Folgenden werden Auswertungen zum Überleben unter Zusammenfassung der immunhistochemisch erfassten Merkmale (ER/PR-Status, HER2-Status, Ki-67-Proliferationsindex) zu IHC-Subtypen durchgeführt. Dabei wurde das Überleben der DTC-positiven und der DTC-negativen Gruppe innerhalb der IHC-Subtypen verglichen (log-rank Test). Tabelle 22, Tabelle 23, Tabelle 24 und Tabelle 25 zeigen die Ergebnisse der Überlebensanalysen.

Als Luminal A klassifizierte, DTC-positive Patientinnen zeigten relative Häufungen der beobachteten Ereignisse gegenüber DTC-negativen Patientinnen. Diese haben zu einem signifikant schlechteren brustkrebspezifischen Überleben (93,3 vs. 100,0 %; $p = 0,04$), krankheitsfreies Überleben (79,9 vs. 98,6 %; $p = 0,005$) und metastasenfreies Überleben (89,8 vs. 100,0 %; $p = 0,006$) DTC-positiver Luminal A-Patientinnen geführt. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei Luminal B-Patientinnen in der DTC-negativen Gruppe schlechtere Überlebensraten gegenüber der DTC-positiven Gruppe (Gesamt- bzw. brustkrebspezifisches Überleben 95,5 vs. 100,0 %; krankheitsfreies bzw. metastasenfreies Überleben 92,9 vs. 100,0 %). Die Überlebensverläufe unterschieden sich in den entsprechenden log-rank Tests jedoch nicht signifikant. Bei den HER2-positiven Patientinnen zeigten sich relative Häufungen der Ereignisse in der DTC-positiven gegenüber der DTC-negativen Gruppe (Gesamt- bzw. brustkrebspezifisches Überleben 75,0 vs. 100,0 %; krankheitsfreies Überleben 75,0 vs. 85,6 %; metastasenfreies Überleben 75,0 vs. 94,1 %). Die verschiedenen Überlebensverläufe unterschieden sich in den log-rank Tests jedoch nicht signifikant. Unter TNBC-Patientinnen zeigten sich ebenfalls relative Häufungen der Ereignisse in der DTC-positiven gegenüber der DTC-negativen Gruppe. In den log-rank Tests zeigte sich ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben bzw.

brustkrebspezifisches Überleben (60,0 vs. 100,0 %; $p = 0,012$) der DTC-positiven Patientinnen.

Tabelle 22: Immunhistochemischer Subtyp, DTC-Status und Sterbefälle im Patientinnenkollektiv mit Signifikanz (p) des log-rank Tests

<i>Subtyp</i>	<i>DTC-Status</i>	<i>Gesamt</i>	<i>Sterbefälle (%)</i>	<i>Gesamtüberleben nach 4 Jahren (95%-KI)</i>	<i>p</i>
<i>Luminal A</i>	DTC-negativ	86	1 (1,2)	98,1% (0,98 - 0,99)	0,228
	DTC-positiv	22	1 (4,5)	93,3% (0,91 - 0,96)	
<i>Luminal B (HER2-)</i>	DTC-negativ	52	2 (3,8)	95,5% (0,94 - 0,97)	0,555
	DTC-positiv	9	0 (0,0)	100,0% -	
<i>HER2+</i>	DTC-negativ	17	0 (0,0)	100,0% -	0,083
	DTC-positiv	8	1 (12,5)	75,0% (0,6 - 0,9)	
<i>TNBC</i>	DTC-negativ	18	0 (0,0)	100,0% -	0,012
	DTC-positiv	5	2 (40,0)	60,0% (0,41 - 0,79)	

DTC disseminierte Tumorzellen, *HR* Hormonrezeptor, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *TNBC* triple negative breast cancer

Tabelle 23: Immunhistochemischer Subtyp, DTC-Status und brustkrebspezifische Todesfälle im Patientinnenkollektiv mit Signifikanz (p) des log-rank Tests

<i>Subtyp</i>	<i>DTC-Status</i>	<i>Gesamt</i>	<i>Brustkrebspezifische Sterbefälle (%)</i>	<i>Brustkrebspezifisches Überleben nach 4 Jahren (95%-KI)</i>	<i>p</i>
<i>Luminal A</i>	DTC-negativ	86	0 (0,0)	100,0% -	0,040
	DTC-positiv	22	1 (4,5)	93,3% (0,91 - 0,96)	
<i>Luminal B (HER2-)</i>	DTC-negativ	52	2 (3,8)	95,5% (0,94 - 0,97)	0,555
	DTC-positiv	9	0 (0,0)	100,0% -	
<i>HER2+</i>	DTC-negativ	17	0 (0,0)	100,0% -	0,083
	DTC-positiv	8	1 (12,5)	75,0% (0,6 - 0,9)	
<i>TNBC</i>	DTC-negativ	18	0 (0,0)	100,0% -	0,012
	DTC-positiv	5	2 (40,0)	60,0% (0,41 - 0,79)	

DTC disseminierte Tumorzellen, *HR* Hormonrezeptor, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *TNBC* triple negative breast cancer

Tabelle 24: Immunhistochemischer Subtyp, DTC-Status und Rezidive im Patientinnenkollektiv mit Signifikanz (p) des log-rank Tests

<i>Subtyp</i>	<i>DTC-Status</i>	<i>Gesamt</i>	<i>Rezidive (%)</i>	<i>Krankheitsfreies Überleben nach 4 Jahren (95%-KI)</i>	<i>p</i>
<i>Luminal A</i>	DTC-negativ	86	1 (1,2)	98,6% (0,98 - 0,99)	
	DTC-positiv	22	3 (13,6)	79,9% (0,75 - 0,85)	0,005
<i>Luminal B (HER2-)</i>	DTC-negativ	52	3 (5,8)	92,9% (0,92 - 0,94)	
	DTC-positiv	9	0 (0,0)	100,0% -	0,455
<i>HER2+</i>	DTC-negativ	17	2 (11,8)	85,6% (0,81 - 0,9)	
	DTC-positiv	8	1 (12,5)	75,0% (0,6 - 0,9)	0,728
<i>TNBC</i>	DTC-negativ	18	2 (11,1)	88,9% (0,85 - 0,92)	
	DTC-positiv	5	2 (40,0)	60,0% (0,41 - 0,79)	0,228

DTC disseminierte Tumorzellen, *HR* Hormonrezeptor, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *TNBC* triple negative breast cancer

Tabelle 25: Immunhistochemischer Subtyp, DTC-Status und Fernmetastasierung im Patientinnenkollektiv mit Signifikanz (p) des log-rank Tests

<i>Subtyp</i>	<i>DTC-Status</i>	<i>Gesamt</i>	<i>Fernmetastasen (%)</i>	<i>Metastasenfreies Überleben nach 4 Jahren (95%-KI)</i>	<i>p</i>
<i>Luminal A</i>	DTC-negativ	86	0 (0,0)	100,0% -	
	DTC-positiv	22	2 (9,1)	89,8% (0,87 - 0,93)	0,006
<i>Luminal B (HER2-)</i>	DTC-negativ	52	3 (5,8)	92,9% (0,92 - 0,94)	
	DTC-positiv	9	0 (0,0)	100,0% -	0,455
<i>HER2+</i>	DTC-negativ	17	1 (5,9)	94,1% (0,91 - 0,97)	
	DTC-positiv	8	1 (12,5)	75,0% (0,6 - 0,9)	0,447
<i>TNBC</i>	DTC-negativ	18	1 (5,6)	94,4% (0,92 - 0,97)	
	DTC-positiv	5	2 (40,0)	60,0% (0,41 - 0,79)	0,08

DTC disseminierte Tumorzellen, *HR* Hormonrezeptor, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *TNBC* triple negative breast cancer

3.3.5 Gemeinsamer Einfluss des DTC-Status und weiterer klinisch-pathologischer Parameter auf das Überleben

Um den DTC-Status, den IHC-Subtyp sowie die anderen klinisch-pathologischen Variablen auf Unabhängigkeit hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft zu untersuchen, wurde eine multivariable Cox-PH-Regression durchgeführt.

Um Parameter zu bestimmen, die einen statistischen Zusammenhang mit dem Überleben besitzen, und sie für eine multivariable Analyse zu selektieren, wurde für alle erhobenen klinisch-pathologischen Parameter eine univariable Cox-Regression durchgeführt. Dies beinhaltete das Berechnen von Hazard Ratios und den korrespondierenden 95%-Konfidenzintervallen aller Variablen bezogen auf das Gesamtüberleben, das brustkrebspezifische Überleben, das rezidivfreie Überleben und das metastasenfremde Überleben. Variablen, die zum Niveau $p = 0,05$ statistische Signifikanz erreichten, wurden neben prognostisch relevanten klinisch-pathologischen Parametern für den zusätzlichen Einschluss in die multivariable Analyse selektiert. Auf eine weitere Variablenselektion wurde aufgrund der Kohortengröße und der Ereignisanzahl verzichtet. Die Parameter Menopausenstatus und Histologie zeigten in der univariablen Analyse für keines der beobachteten Ereignisse signifikanten prognostischen Wert und sind in den folgenden Tabellen nicht weiter mit aufgeführt.

3.3.5.1 Multivariable Analyse des Gesamtüberlebens und des brustkrebspezifischen Überlebens

Die Ergebnisse der Cox-PH-Regression für das Gesamtüberleben und das brustkrebspezifische Überleben können Tabelle 26 und Tabelle 27 entnommen werden.

In den univariablen Analysen aller Parameter für das Gesamtüberleben zeigte sich nur für einen positiven DTC-Status ein signifikanter Einfluss in Richtung einer schlechteren Prognose ($p = 0,027$). Die IHC-Subtypen hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Die multivariable Analyse konnte die prognostische Unabhängigkeit des DTC-Status unter Hinzunahme von Tumorgröße, Nodalstatus und Grading jedoch nicht bestätigen ($p = 0,099$).

Das brustkrebspezifische Überleben betrachtet zeigten ein positiver DTC-Status ($p = 0,017$), ein höheres T-Stadium ($p = 0,049$) und ein positiver Nodalstatus ($p = 0,046$)

einen signifikanten Einfluss in der univariablen Analyse. In der multivariablen Analyse konnte keiner der Parameter als unabhängig prognostisch bestätigt werden.

Tabelle 26: Univariable und multivariable Analyse (Cox-PH-Regression) des Gesamtüberlebens mit Hazard Ratio, 95%-Konfidenzintervall und Signifikanz des Wald-Tests (p).

	n	univariable Analyse			multivariable Analyse		
		HR	95%-KI	p	HR	95%-KI	p
<u>DTC-Status</u>							
Negativ	174						
Positiv	44	5,43	1,21 - 24,38	0,027	3,67	0,79 - 17,2	0,099
<u>Tumorgröße</u>							
T1	200						
T2-4	18	5,27	0,63 - 43,81	0,124	2,41	0,25 - 22,95	0,444
<u>Nodalstatus</u>							
N0	146						
N+	72	4,34	0,84 - 22,46	0,081	3,00	0,55 - 16,47	0,205
<u>Grading</u>							
G1-2	157						
G3	58	3,85	0,86 - 17,23	0,078	2,99	0,66 - 13,82	0,162
Unbekannt	3						
<u>IHC-Subtyp</u>							
Luminal A	108			0,518			
Luminal B (HER2-)	61	1,85	0,26 - 13,16	0,538			
HER2+	25	1,81	0,16 - 20,25	0,627			
TNBC	23	4,48	0,63 - 32,04	0,135			N.i.
unbekannt	1						
<u>Alter</u>							
≤60J	142						
>60J	76	2,69	0,6 - 12,02	0,196			N.i.

DTC disseminierte Tumorzellen, *IHC* immunhistochemisch, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *TNBC* triple-negatives Mammakarzinom, *HR* Hazard Ratio, *KI* Konfidenzintervall, *N.i.* nicht inkludiert.

Tabelle 27: Univariable und multivariable Analyse (Cox-PH-Regression) des brustkrebspezifischen Überlebens mit Hazard Ratio, 95%-Konfidenzintervall und Signifikanz des Wald-Tests (p).

	n	univariable Analyse			multivariable Analyse		
		HR	95%-KI	p	HR	95%-KI	p
<u>DTC-Status</u>							
Negativ	174						
Positiv	44	7,98	1,45 - 43,74	0,017	5,48	0,91 - 32,91	0,063
<u>TumorgroÙe</u>							
T1	200						
T2-4	18	4,35	0,51 - 37,29	0,18	1,21	0,112 - 13,19	0,872
<u>Nodalstatus</u>							
N0	146						
N+	72	8,72	1,02 - 74,98	0,049	6,82	0,73 - 63,44	0,091
<u>Grading</u>							
G1-2	157						
G3	58	5,62	1,03 - 30,73	0,046	4,65	0,82 - 26,51	0,083
Unbekannt	3						
<u>IHC-Subtyp</u>							
Luminal A	108			0,363			
Luminal B (HER2-)	61	3,65	0,33 - 40,28	0,291			
HER2+	25	3,54	0,22 - 57,31	0,372			
TNBC	23	8,83	0,8 - 98,09	0,076			N.i.
unbekannt	1						
<u>Alter</u>							
≤60J	142						
>60J	76	2,04	0,41 - 10,1	0,384			N.i.

DTC disseminierte Tumorzellen, *IHC* immunhistochemisch, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *TNBC* triple-negatives Mammakarzinom, *HR* Hazard Ratio, *KI* Konfidenzintervall, *N.i.* nicht inkludiert.

3.3.5.2 Multivariable Analyse des krankheitsfreien und metastasenfrien Überlebens

Die Ergebnisse der Cox-PH-Regression für das krankheitsfreie und das metastasenfrie Überleben können Tabelle 28 und Tabelle 29 entnommen werden.

In den univariablen Analysen aller Parameter für das krankheitsfreie Überleben zeigte sich für einen positiven DTC-Status ein signifikanter Einfluss in Richtung einer schlechteren Prognose ($p = 0,027$). Des Weiteren hatten Tumorstadium ($p = 0,021$), das Alter ($p = 0,016$) und Vorliegen eines TNBC-Subtyps ($p = 0,02$; im Vergleich mit dem Luminal A-Subtyp) einen signifikanten Einfluss in der univariablen Analyse. Die multivariable Analyse konnte nur den TNBC-Subtyp ($p = 0,04$) und das Alter ($p = 0,041$) als unabhängig prognostische

Parameter bestätigen. Der DTC-Status konnte unter Hinzunahme der anderen Parameter nicht als unabhängig prognostisch bestätigt werden ($p = 0,221$).

Das metastasenfrem Überleben betrachtet zeigten ein positiver DTC-Status ($p = 0,028$) und der TNBC-Subtyp ($p = 0,03$; im Vergleich mit dem Luminal A-Subtyp) einen signifikanten Einfluss in der univariablen Analyse. Der TNBC-Subtyp bestätigte sich in der multivariablen Analyse als unabhängig prognostisch ($p = 0,027$). Der DTC-Status konnte für das metastasenfrem Überleben nicht als unabhängig prognostisch bestätigt werden ($p = 0,056$).

Tabelle 28: Univariable und multivariable Analyse (Cox-PH-Regression) des krankheitsfreien Überlebens mit Hazard Ratio, 95%-Konfidenzintervall und Signifikanz des Wald-Tests (p).

	n	univariable Analyse			multivariable Analyse		
		HR	95%-KI	p	HR	95%-KI	p
<u>DTC-Status</u>							
Negativ	174						
Positiv	44	3,03	1,05 - 8,73	0,040	1,99	0,66 - 5,99	0,221
<u>TumorgroÙe</u>							
T1	200						
T2-4	18	5,83	1,3 - 26,03	0,021	4,07	0,85 - 19,4	0,078
<u>Nodalstatus</u>							
N0	146						
N+	72	2,04	0,71 - 5,81	0,184	2,00	0,58 - 6,86	0,271
<u>Grading</u>							
G1-2	157						
G3	58	2,82	0,99 - 8,06	0,053	0,98	0,23 - 4,13	0,975
Unbekannt	3						
<u>IHC-Subtyp</u>							
Luminal A	108			0,097			0,122
Luminal B (HER2-)	61	1,37	0,30 - 6,15	0,676	0,98	0,18 - 5,27	0,983
HER2+	25	2,96	0,66 - 13,25	0,155	2,50	0,39 - 16,23	0,336
TNBC	23	5,17	1,29 - 20,7	0,02	7,10	1,10 - 45,95	0,040
unbekannt	1						
<u>Alter</u>							
≤60J	142						
>60J	76	3,82	1,28 - 11,39	0,016	3,37	1,05 - 10,78	0,041

DTC disseminierte Tumorzellen, *IHC* immunhistochemisch, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *TNBC* triple-negatives Mammakarzinom, *HR* Hazard Ratio, *KI* Konfidenzintervall, *N.i.* nicht inkludiert.

Tabelle 29: Univariable und multivariable Analyse (Cox-PH-Regression) des fernmetastasenfreien Überlebens mit Hazard Ratio, 95%-Konfidenzintervall und Signifikanz des Wald-Tests (p).

	n	univariable Analyse			multivariable Analyse		
		HR	95%-KI	p	HR	95%-KI	p
<u>DTC-Status</u>							
Negativ	174						
Positiv	44	4,01	1,16 - 13,85	0,028	3,42	0,97 - 12,09	0,056
<u>Tumorgroße</u>							
T1	200						
T2-4	18	3,86	0,08 - 18,2	0,087	2,15	0,42 - 11,00	0,357
<u>Nodalstatus</u>							
N0	146						
N+	72	3,14	0,89 - 11,21	0,077	4,05	0,94 - 17,56	0,061
<u>Grading</u>							
G1-2	157						
G3	58	2,68	0,78 - 9,26	0,119	1,09	0,26 - 4,64	0,903
Unbekannt	3						
<u>IHC-Subtyp</u>							
Luminal A	108			0,180			0,130
Luminal B (HER2-)	61	2,72	0,45 - 16,32	0,272	1,91	0,27 - 13,33	0,513
HER2+	25	3,85	0,54 - 27,36	0,178	2,62	0,30 - 23,15	0,387
TNBC	23	7,29	1,21 - 43,72	0,030	11,27	1,33 - 95,78	0,027
unbekannt	1						
<u>Alter</u>							
≤60 Jahre	142						
>60 Jahre	76	2,08	0,6 - 7,21	0,246			N.i.

DTC disseminierte Tumorzellen, *IHC* immunhistochemisch, *HER2* human epidermal growth factor receptor 2, *TNBC* triple-negatives Mammakarzinom, *HR* Hazard Ratio, *KI* Konfidenzintervall, *N.i.* nicht inkludiert.

3.4 Bisphosphonate

Die Ergebnisse der univariablen Cox-Regression für das Überleben der postmenopausalen Patientinnen (n = 134) in Abhängigkeit einer Bisphosphonat-Therapie sind in Tabelle 30 aufgeführt. Grundsätzlich zeigte sich durch die Bisphosphonattherapie hier kein protektiver Effekt in Bezug auf die untersuchten Ereignisse, die Unterschiede im Überleben waren nicht statistisch signifikant.

Tabelle 30: Ergebnisse der univariablen Cox-Regression der Bisphosphonat-Therapie unter postmenopausalen Patientinnen (n = 134) für das Gesamtüberleben (OS), das brustkrebspezifische Überleben (BCSS), das krankheitsfreie Überleben (DFS) und metastasenfrees Überleben (DDFS). Angegeben sind Hazard Ratios (HR), 95%-Konfidenzintervalle (KI) und der Signifikanzwert des Wald-Tests (p).

<i>Bisphosphonat-Therapie</i>	<i>n</i>	<i>(%)</i>	<i>OS</i>			<i>BCSS</i>		
			<i>HR</i>	<i>95%-KI</i>	<i>p</i>	<i>HR</i>	<i>95%-KI</i>	<i>p</i>
<i>Nein</i>	92	(68,7)	1,29	0,22 - 7,74	0,779	1,98	0,28 - 14,1	0,494
<i>Ja</i>	42	(31,3)						
			<i>DFS</i>			<i>DDFS</i>		
			<i>HR</i>	<i>95%-KI</i>	<i>p</i>	<i>HR</i>	<i>95%-KI</i>	<i>p</i>
			1,25	0,36 - 4,26	0,727	1,06	0,2 - 5,81	0,943

DTC disseminierte Tumorzellen, *HR* Hazard Ratio, *OS* Gesamtüberleben, *BCSS* brustkrebspezifisches Überleben, *DFS* krankheitsfreies Überleben, *DDFS* metastasenfrees Überleben, *95%-KI* 95%-Konfidenzintervall

3.5 Neoadjuvante Systemtherapie und DTC-Status

Bei insgesamt 46 Patientinnen wurde der DTC-Status nach abgeschlossener NACT im Rahmen der Primäroperation bestimmt. Nach NACT zeigte sich unter allen Patientinnen eine DTC-Detektionsrate von 10,9 %, und somit eine niedrigere DTC-Detektionsrate als unter den therapienaiven Patientinnen (19,7 %). Eine pCR (im Sinne eines Regressionsgrades III oder IV nach Sinn) zeigte sich bei 39,1 % der Patientinnen. Trotz Komplettremission zeigten sich bei 11,1 % dieser Patientinnen noch DTCs im Knochenmark. Allerdings unterschieden sich die DTC-Detektionsraten unter Patientinnen mit pCR gegenüber solchen ohne pCR kaum (11,1 vs. 10,7 %) sodass ein erfolgreiches Therapieansprechen des Primärtumors nicht auch mit einer vermehrten Eradizierung der DTCs einherging (Tabelle 31).

Tabelle 31: DTC-Positivität von Patientinnen (n = 46) und pathologische Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie

		Gesamt n (%)	DTC-positiv (%)	DTC-negativ (%)
<i>Gesamt</i>		46 (100)	5 (10,9)	41 (89,1)
<i>pCR nach NACT</i>	Keine pCR	28 (60,9)	3 (10,7)	25 (89,3)
	pCR	18 (39,1)	2 (11,1)	16 (88,9)

DTC disseminierte Tumorzellen, *pCR* pathologische Komplettremission (definiert als Regressionsgrad Sinn III o. IV), *NACT* neoadjuvante Chemotherapie. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

Bei 12 Patientinnen erfolgte eine DTC-Bestimmung sowohl vor als auch nach der neoadjuvanten Chemotherapie (Tabelle 32). Bei zwei von drei prätherapeutisch DTC-positiven Patientinnen ließen sich nach NACT keine DTCs mehr im Knochenmark nachweisen. Umgekehrt waren bei zwei der neun prätherapeutisch DTC-negativen Patientinnen nach abgeschlossener NACT DTCs im Knochenmark nachweisbar.

Tabelle 32: DTC-Status von Patientinnen (n = 12) prä- und postneoadjuvant

		Gesamt n (%)	Nach NACT DTC-negativ (%)	Nach NACT DTC-positiv (%)
<i>DTC-Status vor NACT</i>	DTC-negativ	9 (75,0)	7 (77,8)	2 (22,2)
	DTC-positiv	3 (25,0)	2 (66,7)	1 (33,3)

DTC disseminierte Tumorzellen. Prozentangaben in Spaltenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

3.6 DTC-Detektion im duktalem Carcinoma in situ (DCIS)

In unserem Gesamtkollektiv von 290 Patientinnen wurde bei 18 Patientinnen (6,2 %) ein duktales Carcinoma in situ (DCIS) diagnostiziert. Das mediane Erkrankungsalter der DCIS-Patientinnen lag bei 52 Jahren. Weitere klinisch-pathologische Parameter können Tabelle 33 entnommen werden. Auch bei diesen Patientinnen wurde eine Knochenmarkpunktion mit konsekutiver DTC-Bestimmung durchgeführt. Hier zeigten sich 5 DTC-positive Fälle, entsprechend einer DTC-Positivität von 27,8 %, und 14 DTC-negative Fälle (72,2 %). Prämenopausale Patientinnen waren signifikant häufiger DTC-positiv (50,0 vs. 0,0 %; $p = 0,036$). Patientinnen mit low-grade und intermediate-grade DCIS-Läsionen waren signifikant häufiger DTC-positiv als Patientinnen mit high-grade DCIS-Läsionen (G1: 100,0 %; G2: 40,0 %; G3: 10,0 %; $p = 0,028$). Falls bestimmt, waren die Lymphknoten der DTC-positiven Fälle tumorfrei (N0). Die DCIS-Läsionen der DTC-positiven Patientinnen waren in allen Fällen ER-positiv und in vier von fünf Fällen PR-positiv. Im Vergleich zur DTC-Positivität von 19,7 % der invasiven Karzinome des Kollektivs zeigte sich bei den DCIS-Läsionen mit 27,8 % eine höhere DTC-Positivität (siehe Tabelle 34). Diese Häufung erreichte im Chi-Quadrat-Test jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,414$).

Tabelle 33: Klinisch-pathologische Parameter der DCIS-Patientinnen, DTC-Detektionsraten sowie Signifikanzniveau (p) des exakten Tests nach Fisher

		<i>Gesamt n</i> (%)	<i>DTC-Positiv (%)</i>	<i>p</i>
<i>Menopausenstatus</i>	prämenopausal	10 (55,6)	5 (50,0)	0,036
	postmenopausal	8 (44,4)	0 (0,0)	
<i>Nodalstatus</i>	N0	10 (55,6)	3 (30,0)	1,000
	N+*	2 (11,1)	0 (0,0)	
	unbekannt	6 (33,3)	2 (33,3)	
<i>Grading</i>	G1	2 (11,1)	2 (100,0)	0,028
	G2	5 (27,8)	2 (40,0)	
	G3	10 (55,6)	1 (10,0)	
	unbekannt	1 (5,6)	0 (0,0)	
<i>ER-Status</i>	ER-	2 (11,1)	0 (0,0)	0.542
	ER+	16 (88,9)	5 (31,3)	
<i>PR-Status</i>	PR-	5 (27,8)	1 (20,0)	1,000
	PR+	12 (66,7)	4 (33,3)	
	unbekannt	1 (5,6)	0 (0,0)	

DTC disseminierte Tumorzellen, *ER* Östrogenrezeptor, *PR* Progesteronrezeptor, Prozentangaben in Schichtenprozent (Gesamt n) und Zeilenprozent (DTC-Status).

* Nodalpositiv ohne Nachweis eines invasiven Primarius

Tabelle 34: DCIS und invasive Karzinome (T1-T4) therapienaiver Patientinnen und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des exakten Tests nach Fisher

		<i>Gesamt n</i>	<i>DTC-positiv (%)</i>	<i>DTC-negativ (%)</i>
<i>Kollektiv</i>	DCIS	18 (7,0)	5 (27,8)	13 (72,2)
	Invasiv (T1-T4)	238 (93,0)	47 (19,7)	191 (80,3)
				p = 0,542

DTC disseminierte Tumorzellen, *DCIS* duktales Carcinoma in situ

Während des Nachbeobachtungszeitraums (Median 20,3 Monate, Spannweite 3 - 56 Monate) erlitt eine der DCIS-Patientinnen ein kontralaterales Zweitkarzinom. Die Patientin war DTC-negativ.

4 Diskussion

4.1 Vorbemerkung

Die Identifizierung von Patientinnen, welche nach der Komplettexzision des Primärtumors ein erhöhtes Risiko für ein Lokal- oder Fernrezidiv haben, ist der Hauptfokus im postoperativen Setting. Goldstandard für eine Prognoseabschätzung ist nach wie vor die pathologische TNM-Klassifikation.

Dennoch erleiden auch Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus nach erfolgreicher chirurgischer Entfernung des Primärtumors in 25 - 30 % der Fälle ein Lokalrezidiv oder eine Fernmetastasierung [6-8]. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass bereits vor der operativen Therapie eine Tumorzeldisseminierung stattgefunden hat, die durch die pathologische und radiologische Routinediagnostik im Staging nicht erfasst wird. Im Vergleich zu einer klinisch apparenten Metastasierung, welche ein relativ spätes Ereignis im Krankheitsprozess solider Tumore wie dem Mammakarzinom darstellt, können disseminierte Tumorzellen im Knochenmark der Patientinnen deutlich früher detektiert werden und gelten als früher Indikator einer systemischen Tumorausbreitung [83, 110, 119]. Demnach besteht ein hohes Interesse am Nachweis und der Charakterisierung dieser Zellen. In mehreren Studien hat sich bereits gezeigt, dass ein Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark mit einer schlechteren Prognose einhergeht [112, 120, 124], womit sich diese als klinisch hochrelevant erweisen. Die Validierung der prognostischen Signifikanz disseminierter Tumorzellen kann die Grundlage für diesen neuen Marker erweitern, der die Identifizierung von Patientinnen mit einem erhöhten Risiko für Rezidive oder eine Fernmetastasierung

ermöglicht. Dadurch kann die Rate an Patientinnen, die einer Über- oder Untertherapie ausgesetzt werden, verringert werden. In dieser Arbeit wurde das Patientinnenkollektiv der UFK Düsseldorf hinsichtlich ihres DTC-Status untersucht, und über den Nachbeobachtungszeitraum der prognostische Wert dieses Markers bemessen.

4.2 Patientinnenkollektiv

Das Patientinnenkollektiv, das dieser Arbeit zu Grunde lag, umfasste 290 Patientinnen mit einem medianen Lebensalter von 54 Jahren bei Diagnosestellung. Wird die Kollektivgröße in der Literatur betrachtet, so zeigt sich eine große Spannweite. In der gepoolten Analyse von Braun et. al aus dem Jahre 2005 wurden in den neun einbezogenen Studien zwischen 270 und 917 Patientinnen untersucht [112]. In folgend publizierten Studien umfassten die untersuchten Kollektive zwischen 191 und 3413 Patientinnen pro Studie. Das mediane Lebensalter lag hier zwischen 54 und 56 Jahren. [115, 121, 138, 139]. Im der vorliegenden Studie war mit 58,2% der überwiegende Teil der Patientinnen postmenopausal gegenüber 41,8% prämenopausalen Patientinnen. Auch in anderen Studien war der größere Teil der Patientinnen postmenopausal, allerdings mit zwischen 66,5 bis 70,1% in etwas höheren Verhältnissen. Für die Verteilung der T-Stadien (ausgenommen DCIS-Karzinome) ergab sich in dieser Arbeit mit Werten von 46,8% für T1-Tumore, 42,5% für T2-Tumore und 9,5% für T3-4 Tumore ein ähnliches Verhältnis von T1- zu T2-klassifizierten Tumoren. In der Literatur ließ sich in vergleichbaren Studien ein etwas höheres Verhältnis von T1-Tumoren mit 52 – 59,5 % zu T2-Tumoren mit 27 – 36 % und T3-4 Tumoren mit 7,4 – 20 % finden [112, 115, 138]. Eine Studie von Tjensvoll et al. zeigte ein noch höheres Verhältnis von T1-Tumoren mit 75,9 % zu T2-T4 Tumoren mit 24,1 % [121]. Das dieser Arbeit zugrunde liegende Kollektiv fällt mit einer Lymphknoten-Positivität von 34,6 % in den in der Literatur auffindbaren Rahmen von 30 – 52 % [112, 115, 121, 138]. Die Verteilung des Gradings innerhalb anderer Studien zeigt sich heterogen: Während intermediate-grade-Tumore mit 56,8 % in der vorliegenden Studie wie auch in anderen Studien am häufigsten eingeschlossen sind [112, 115, 121, 138], schlossen manche Studien als zweithäufigstes low-grade-Tumore und andere Studien als zweithäufigstes high-grade-Tumore ein. In dem Kollektiv der vorliegenden Arbeit wiesen 9,2 % der Patientinnen low-grade-Tumore und 31,8 % high-grade-Tumore auf. Die Studien von Hartkopf et al. sowie die gepoolte Analyse von Braun et al. zeigten eine ähnliche Verteilung von low-grade-Tumoren mit 11,2 – 14,7 % und high-grade-Tumoren mit 20,8 – 38,8 % [112, 115]. Bidard et al. sowie Tjensvoll et al.

dahingegen schlossen mit 35 – 37 % mehr low-grade-Tumore ein und nur 24 – 26 % high-grade-Tumore [121, 138].

Der Nachbeobachtungszeitraum der vorliegenden Studie liegt mit median 35 Monaten am unteren Ende der in der Literatur auffindbaren Spannweite. Die gepoolte Analyse von Braun et al. untersuchte in den neun eingeschlossenen Studien mediane Nachbeobachtungszeiträume zwischen 35 und 178 Monaten [112]. Folgende Studien beobachteten die Patientinnen median zwischen 43 und 56 Monaten nach [115, 138]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das dieser Arbeit zu Grunde gelegte Patientinnenkollektiv die klinischen Angaben in der Literatur widerspiegelt, es jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse als kleines Kollektiv mit einer kurzen Nachbeobachtungszeit einzuordnen ist.

4.3 DTC-Detektion im Knochenmark

Das Knochenmark stellt ein relativ leicht zugängliches Kompartiment für die Untersuchung dar. Da der Eingriff intraoperativ durchgeführt wurde, ging er für die Patientinnen mit einer geringen zusätzlichen Belastung einher.

Diel et al. berichteten über geringe Komplikationsraten bei Mammakarzinompatientinnen nach DTC-Bestimmung: So trat bei 2052 Punktionen intraoperativ in lediglich einem Fall eine Blutung im Stichkanal auf, die mit einer Ligatur versorgt werden musste. Auch postoperative Komplikationen waren auf ein geringes Vorkommen beschränkt [113, 140]. Domschke et al. untersuchten 254 Patientinnen mit Mammakarzinom auf postoperative Komplikationen nach und demonstrierten bei geringem Auftreten postpunktioneller Schmerzen oder Hämatome keinen signifikant verlängerten postoperativen Aufenthalt der Patientinnen mit Knochenmarkpunktion gegenüber Patientinnen ohne Knochenmarkpunktion [141]. Darüber hinaus trat in keiner der vorgenannten Untersuchungen eine Wundinfektion der Punktionsstelle auf [113, 140, 141].

Vorrangig diene zunächst das Knochenmark als Kompartiment zum Nachweis einzelner, gestreuter Tumorzellen beim primären Mammakarzinom. Ein Nachteil ist die Invasivität dieser Methode, insbesondere mit Rücksicht auf eine wiederholte Bestimmung des DTC-Status im Therapieverlauf. Mit der Zeit gelang auch das Blut als ein zugänglicheres Kompartiment für den Tumorzellnachweis in den Fokus. Die geringe Invasivität einer Blutentnahme erlaubt eine risikoarme Wiederholung der Untersuchung in verschiedenen

Abständen. Des Weiteren wurde mit dem Cell-Search®-System eine weitgehend automatisierte und somit gut reproduzierbare, kommerzielle Methode zur Bestimmung von CTCs etabliert [142]. Obwohl die Datenlage zu CTCs rasant wächst, und ihr Nachweis unter anderem in einer großen, gepoolten Untersuchung von primären Mammakarzinompatientinnen mit einem schlechteren Überleben korrelierte, erschweren niedrige Detektionsraten beim frühen Mammakarzinom den Gebrauch dieser Methode zur adäquaten Prognostizierung [143-145]. Darüber hinaus haben CTCs mit der erfolgreichen Intravasation nur die frühen Schritte des Metastasierungsprozesses durchlaufen. Unklar bleibt, inwiefern die erfassten Zellen auch die Fähigkeiten zur Extravasation und darauffolgenden MET, zwei kritischen Schritten im Metastasierungsprozess, besitzen. Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark haben diese Schritte bereits durchlaufen und bringen daher eine hohe prognostische Aussagekraft mit sich [83, 112, 115]. Ihre Datenlage verfügt darüber hinaus über lange Nachbeobachtungszeiträume.

4.4 DTC-Nachweis mittels pan-Zytokeratin Antikörper AE1/AE3

Mit nur wenigen DTCs unter Millionen von Knochenmarkszellen stellt ihre Detektion eine methodologische Herausforderung dar. Um die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises zu erhöhen, mussten Anreicherungsverfahren entwickelt werden, die die Sensitivität und Spezifität der darauffolgenden Nachweisverfahren verbessern. Für die in dieser Arbeit ausgewerteten Knochenmarkaspirate wurde die Dichtekissen-zentrifugation mit Ficoll zur Anreicherung mononukleärer Zellen verwendet. Diese wurde für den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen als Standardverfahren zur Anreicherung empfohlen [134].

Die Wahl des Detektionsmarkers für das Nachweisverfahren spielt neben der Tumorzellanreicherung eine entscheidende Rolle für die Sensitivität und Spezifität des Nachweises. In dieser Arbeit erfolgte die Detektion der DTCs über den Immunfluoreszenz-Nachweis gewebsspezifischer epithelialer Marker (Zytokeratine), deren ektopische Expression auf Zellen im mesenchymalen Gewebe des Knochenmarks untersucht wurde. Zellen epithelialer Herkunft kommen im mesenchymalen Knochenmark physiologisch nicht vor. Unter Verwendung des Pan-Zytokeratin Antikörpers AE1/AE3 erfolgte der DTC-Nachweis in den angereicherten Knochenmarkszellen. Dieser Antikörper bindet an eine Vielzahl von Zytokeratinen, wodurch der Nachweis von Zellen verbessert wird, die im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition individuelle Zytokeratine vermindert exprimieren [94,

132]. Der Nachweis unter Verwendung des Pan-Zytokeratin Antikörpers AE1/AE3 gilt als eine der am besten validierten Methoden und wird gegenwärtig als eine der Standardmethoden empfohlen [134]. Ferner wurde eine Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung mittels CD45-Antikörper zur Färbung der Leukozyten in den Knochenmarkspräparaten eingesetzt. Dies erlaubt eine Diskriminierung der Leukozyten gegenüber Zellen epithelialen Ursprungs, wie den disseminierten Tumorzellen. Die Verwendung des Doppel-Immunfluoreszenz-Verfahrens unterscheidet die vorliegende Studie von anderen Studien, die mittels Antikörper-Verfahren den prognostischen Wert der Tumorzell dissemination im Knochenmark auf das Überleben untersuchen, in denen überwiegend immunhistochemische Verfahren Anwendung fanden.

Weitere Methoden mit Potential für eine höhere Sensitivität sind andere antikörper-basierte Verfahren wie immunmagnetische Anreicherung und Flow-Zytometrie, sowie molekulare Verfahren wie PCR, Reverse-Transkriptase-quantitative PCR (RT-qPCR) und FISH. Die Untersuchungen der vielzähligen Verfahren zur DTC-Bestimmung zeigten allerdings, dass Disparitäten zwischen den etablierten Nachweismethoden bestehen. So demonstrierten Effenberger et al. in einer Studie, in der die zum immunzytochemischen DTC-Nachweis etablierten pan-Zytokeratin Antikörper AE1/AE3 und A45-B/B3 miteinander verglichen wurden, unterschiedliche DTC-Detektionsraten von 6,1% (A45-B/B3) und 10,5% (AE1/AE3). Besonders auffällig war dabei, dass die beiden Färbungen unter allen DTC-positiven Fällen in lediglich 3,2% der Fälle übereinstimmten. DTCs hormonrezeptor-positiver Fälle wurden häufiger mit dem Antikörper A45-B/B3 detektiert, wohingegen hormonrezeptor-negative Fälle häufiger DTCs in der Färbung mit dem Antikörper AE1/AE3 zeigten. Die Autoren und Autorinnen der Studie nahmen an, dass unterschiedliche Zytokeratin-Expressionsmuster, sowohl während unterschiedlicher Schritte innerhalb der Tumorzell dissemination als auch unter den verschiedenen Tumorsubtypen, für die unterschiedlichen DTC-Detektionsraten der Antikörper verantwortlich sind [146]. Daraus lässt sich schließen, dass die beiden unterschiedlichen Verfahren unterschiedliche DTC-Zellpopulationen im Knochenmark zu detektieren scheinen, was für den klinischen Gebrauch und zukünftige Studien wichtige Implikationen hat.

Gilje et al. konnten auch zwischen immunzytochemischen und molekularen Nachweisverfahren Disparitäten aufdecken: Beim Vergleich des Nachweises mittels Pan-Zytokeratin Antikörper AE1/AE3 gegenüber der Multimarker-RT-qPCR (mRNA-Marker für TWIST1, Zytokeratin 19, und Mammaglobin A) unter 313 Knochenmarkaspiraten

zeigten sich Detektionsraten von 40% (RT-qPCR) gegenüber 7% (AE1/AE3). Beide Verfahren stimmten unter allen DTC-positiven Fällen in nur 8,9% der Fälle überein [147]. Auch Becker et al. verglichen den DTC-Nachweis mittels Immunzytochemie (A45B-B3-Antikörper) gegenüber RT-qPCR (mRNA-Marker für Zytokeratin 19), und während sich unter 385 Patientinnen identische DTC-Positivitätsraten der beiden Verfahren von 35% zeigten, so zeigte sich jedoch in nur 21% der Fälle eine Übereinstimmung der positiven Ergebnisse beider Verfahren [148]. Rückblickend kompromittieren diese Erkenntnisse den Vergleich der bisher veröffentlichten Studien, in denen heterogene Nachweisverfahren Anwendung fanden. Trotz gegebener Empfehlungen für Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen bestehen nach wie vor Grenzen in der Standardisierung immunzytochemischer Verfahren, namentlich die Reproduzierbarkeit der Färbemethode an sich, als auch die Variabilität in der mikroskopischen Auswertung [134, 149]. Aus diesem Grund müssen die Nachweismethoden zukünftig sowohl innerhalb der Untersuchungsstätten als auch zwischen den Untersuchungsstätten untereinander weiter evaluiert werden, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu sichern. Darüber hinaus sollten unterschiedliche immunzytochemische und molekulare Nachweismethoden als komplementäre und nicht exklusive Untersuchungen in Betracht gezogen werden.

4.5 Diskussion der Ergebnisse einzelner Untersuchungsaspekte

4.5.1 DTC-Detektion im nicht-metastasierten Mammakarzinom

In der vorliegenden Studie zeigte sich unter 238 therapie-naiven Patientinnen mit nicht-metastasiertem Mammakarzinom eine DTC-Detektionsrate von 19,7 %. DTC-Detektion war signifikant mit höheren T-Stadien assoziiert ($p = 0,035$) und waren signifikant häufiger in Patientinnen über 60 Jahren nachweisbar ($p = 0,026$). Nodalpositive Patientinnen zeigten keine signifikante Häufung von DTCs im Knochenmark gegenüber nodalnegativen Patientinnen ($p = 0,732$). Dies suggeriert einen von den Lymphabflusswegen unabhängigen Weg der Tumorzell-disseminierung, und unterstreicht die Unabhängigkeit zwischen lymphogener und hämatogener Metastasierung.

In der Literatur wurden sowohl höhere als auch niedrigere DTC-Detektionsraten zwischen 3 % und 49 % beschrieben. In den Kollektiven, die von Braun et. al in der gepoolten Analyse zusammengefasst wurden, zeigten sich DTC-Detektionsraten zwischen 12 % und 43 %, in folgenden Veröffentlichungen zwischen 3 % und 49 % [112, 115, 138, 139, 150]. Giuliano

et al. beschrieben eine DTC-Detektionsrate von lediglich 3 % unter 3413 untersuchten Patientinnen mit Mammakarzinomen der Stadien T1 – T2 und negativem Lymphknotenstatus. Da die Tumorzell dissemination in anderen Studien, in denen sowohl T3 – T4 klassifizierte als auch lymphknotenpositive Mammakarzinome eingeschlossen wurden, mit der Tumorgröße sowie dem Lymphknotenstatus korrelierte (s.u.), ist die niedrigere Inzidenz in der Studie von Giuliano et al. plausibel. Die Autoren merkten ebenfalls an, dass Unterschiede in der Labormethode, die in Kapitel 4.4 diskutiert wurden, dazu beigetragen haben könnten [139].

Assoziationen zwischen prognostischen, klinisch-pathologischen Tumorcharakteristika und der Detektion von DTCs im Knochenmark werden vielfach diskutiert. Obwohl viele Studien eine positive Assoziation zwischen DTC-Detektion und bestimmten Tumormerkmalen demonstrierten, so blieb die Bestätigung jeglicher Korrelation in manchen Studien aus [138, 151]. Braun et. al zeigten in einem großen Kollektiv, dass DTC-positive Patientinnen signifikant häufiger größere Tumore, einen positiven Lymphknotenstatus, eine höheres Grading, sowie einen negativen Hormonrezeptorstatus des Tumors aufwiesen [112]. Auch Hartkopf et al. bestätigten einen signifikant häufigeren Nachweis von DTCs bei Patientinnen mit größeren Tumoren, positivem Lymphknotenstatus, negativem Hormonrezeptorstatus und darüber hinaus auch bei positivem HER2-Status [115].

Auch in dem vorliegenden Kollektiv bestätigte sich eine signifikante Häufung des DTC-Nachweises im Knochenmark von Patientinnen mit größeren Tumoren. Dass sich unter hormonrezeptor-negativen und HER2-positiven Patientinnen keine signifikante Häufung zeigte, kann an den absolut gesehenen geringen Fallzahlen der hormonrezeptor-negativen (ER-negativ n = 32; PR-negativ n = 57) und HER2-positiven (n = 26) Patientinnen im Gesamtkollektiv liegen.

Eine signifikante Häufung von DTCs im Knochenmark älterer gegenüber jüngerer Patientinnen, wie es in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, wird durch die Studienlage nicht regelhaft bestätigt. In der Studie von Tjensvoll et al. waren Patientinnen, die über 55 Jahre alt waren, gegenüber jüngeren Patientinnen doppelt so häufig DTC-positiv [121]. Bei Braun et al. zeigte sich wiederum ein signifikant gehäufter Nachweis von DTCs in den jüngeren gegenüber den älteren Altersgruppierungen [112]. Andere Studien zeigten keine signifikanten statistischen Assoziationen zwischen Alter und DTC-Status [138, 150], sodass die Bedeutung des Patientinnenalters im Prozess der Tumorzell dissemination weiterhin unklar bleibt.

4.5.2 NACT und DTC-Detektion

Während der letzten Jahre gewannen neoadjuvante Therapiestrategien bei der Behandlung von primären Mammakarzinompatientinnen zunehmend an Bedeutung. Insbesondere bei TNBC und HER2-positiven/hormonrezeptornegativen Subtypen geht eine pCR nach neoadjuvanter Therapie mit einer günstigeren Prognose einher [75-78]. Viele klinische Studien fokussieren sich deswegen auf das neoadjuvante Setting und nehmen das histopathologisch bestimmte Ansprechen auf die Therapie als frühen, einfach-beurteilbaren Studienendpunkt, stellvertretend für die Prognose. Obwohl eine pCR als Surrogatmarker für das Therapieansprechen betrachtet wird, lässt sich bei 15 – 20 % der Patientinnen mit pCR im Verlauf eine Fernmetastasierung beobachten [76, 77]. Dies legt nahe, dass Tumorzellen die Fähigkeit besitzen müssen, in anderen Kompartimenten des Körpers zu persistieren, und dass ein Ansprechen des Primärtumors nicht in allen Fällen mit einem Ansprechen der MRD gleichzusetzen ist.

Im neoadjuvant behandelten Kollektiv ließen sich posttherapeutisch noch bei 10,6 % der Patientinnen persistierende DTCs nachweisen. Jedoch gab sich keine signifikante Assoziation zwischen dem Ansprechen auf die NACT im Sinne einer pCR und der vermehrten Eradizierung von DTCs. Die im Vergleich zum therapienaiven Kollektiv niedrigere Detektionsrate lässt allgemein einen Therapieeffekt auf die DTC-Population vermuten. Auch vergangene Studien zeigten bei prä- und posttherapeutischer DTC-Bestimmung postneoadjuvant niedrigere DTC-Detektionsraten, jedoch ebenfalls ohne signifikante Assoziation von pCR und DTC-Eradizierung als Hinweis auf eine partielle Chemoresistenz dieser Zellen. [123, 125, 152].

In einer Subgruppe von 12 Patientinnen, die sowohl vor als auch nach NACT eine DTC-Bestimmung erhalten haben, wurden zwei von drei prätherapeutisch DTC-positiven Patientinnen nach der NACT DTC-negativ getestet. Interessanterweise ließen sich bei zwei von neun DTC-negativen Patientinnen postneoadjuvant DTCs nachweisen – ein Phänomen das bereits in einer der vorgenannten Studien beobachtet wurde. Dort wird hypothetisiert, dass diese Patientinnen möglicherweise vor der Therapie DTCs hatten, welche durch den Prozess der EMT ihren epithelialen Charakter verloren hatten und sich somit der Chemotherapie entzogen haben [152]. Allgemein wird vermutet, dass Subpopulationen von sowohl CTCs als auch DTCs chemoresistent sein können, was auf eine geringere proliferative Aktivität dieser Zellen im Sinne von *tumor dormancy* zurückgeführt wird [153-155]. Dies könnte die zum Teil ausbleibende Eradikation der DTCs durch NACT, trotz

ansprechen des Primärtumors, erklären. Ferner lässt sich in diesem Zusammenhang vermuten, dass die DTCs dieser Patientinnen nach EMT keine epithelialen Oberflächenantigene, einschließlich der Zytokeratine, exprimierten und somit von der angewendeten Nachweismethode mittels Pan-Zytokeratin-Antikörper nicht erfasst wurden.

In der Vergangenheit wurde außerdem belegt, dass ein Teil der persistierenden DTCs apoptotisch ist und kein Metastasierungspotential mehr besitzt. Gerade unter Patientinnen mit pCR zeigten sich signifikant häufiger apoptotische DTCs [156, 157]. Der Nachweis apoptotischer DTCs nach Neoadjuvant, in denen die Apoptose möglicherweise durch die Therapie induziert wurde, wurde auch als prognostisch günstiger Faktor identifiziert [158]. In der vorliegenden Studie wurde die Expression apoptotischer Marker im Rahmen einer Subtypisierung der persistierenden DTCs nicht untersucht, sodass bezüglich eines Einflusses auf das Überleben der postneoadjuvant DTC-positiven Patientinnen keine Aussage getroffen werden kann.

Es bestehen weitere Hypothesen, u.a. wird die Elimination der DTCs durch adjuvante Therapien, die Elimination oder Langzeit-Kontrolle durch das Immunsystem, oder das Vorhandensein eines biochemisch-ungeeignetes Mikro-Millieus in der Umgebung der DTCs, welches deren Progression zur Metastase langfristig unterdrücken könnte, vermutet. Die vorgenannten Aspekte stützen die Tatsache, dass auch nach NACT nicht alle Patientinnen mit persistierenden DTCs eine Fernmetastasierung entwickeln.

Zukünftig bedarf es Studien, welche eine genauere Charakterisierung der DTCs umfassen, um die hinter persistierenden DTCs stehenden Mechanismen zu untersuchen, deren prognostischen Einfluss zu bestimmen, und neoadjuvante Therapiestrategien zu optimieren. Siehe hierzu auch Kapitel 4.5.4.

4.5.3 Prognostischer Wert des DTC-Status in Überlebensanalysen

Diverse Studien haben den ungünstigen prognostischen Wert von DTCs in univariablen Analysen gezeigt.

In Übereinstimmung zu diesen Veröffentlichungen zeigte sich auch in der hier vorliegenden Arbeit für DTC-positiven Patientinnen eine schlechtere Prognose in der univariablen Analyse. Ein DTC-Nachweis war signifikant mit einem kürzeren Gesamtüberleben (HR 5,43; 95%-KI 1,21 – 24,38; $p = 0,027$), brustkrebsspezifischem Überleben (HR 7,98; 95%-KI 1,45 – 43,74; $p = 0,017$), krankheitsfreiem Überleben (HR 3,03; 95%-KI 1,05 – 8,73; $p = 0,04$)

sowie metastasenfreiem Überleben (HR 4,01; 95%-KI 1,16 – 13,85; $p = 0,028$) assoziiert. Unter Hinzunahme weiterer prognostischer Faktoren in der multivariablen Analyse verringerte sich der Einfluss des DTC-Status auf das Überleben, sodass sich die Unabhängigkeit dieses Parameters weder für das Gesamtüberleben noch für das brustkrebspezifische, das krankheitsfreie oder das metastasenfreie Überleben bestätigte. Dies ist am ehesten durch die Kollektivgröße sowie die kurze mediane Nachbeobachtungszeit zum Zeitpunkt dieser Auswertung zu erklären.

Im vorliegenden Kollektiv konnte nur der TNBC-Subtyp (für krankheitsfreies und metastasenfreies Überleben) und ein Alter über 60 Jahren (für krankheitsfreies Überleben) als prognostisch unabhängige Faktoren identifiziert werden.

Die bedeutendste prognostische Auswertung zu DTCs im Knochenmark stammt aus der zuvor genannten gepoolten Analyse von Braun et al., in der 4703 Patientinnen aus neun prospektiven Studien mit einer Nachbeobachtungszeit von 10 Jahren untersucht wurden. Die Analyse wurde durch die Hinzunahme individueller Patientinnendaten gestärkt. Der Nachweis von DTCs im Knochenmark war ein signifikanter, unabhängiger Prognosefaktor für ein kürzeres Gesamtüberleben, brustkrebspezifisches Überleben, krankheitsfreies Überleben und metastasenfreies Überleben. Bei einem medianen Follow-Up von 62 Monaten hatten DTC-positive Patientinnen gegenüber DTC-negativen Patientinnen ein mehr als zweifach erhöhtes Risiko, zu versterben (HR 2,44; 95% CI 2,08–2,86; $p < 0,001$) oder an Folgen des Mammakarzinoms zu versterben (HR 2,15 95% CI 1,87–2,47, $p < 0,001$). Auch bestand ein zweifach erhöhtes Risiko für ein kürzeres krankheitsfreies (HR 2,13; 95%-KI 1,89 – 2,39; $p < 0,001$) und metastasenfreies Überleben (HR 2,33; 95%-KI 2,04 – 2,65; $p < 0,001$) [112]. Eine weitere Bekräftigung der Datenlage lieferte die bislang größte unizentrische Studie von Hartkopf et al., welche 3141 Patientinnen über eine mediane Nachbeobachtungszeit von 43 (DFS) bis 53 (OS) Monaten untersuchte. Auch hier ergab sich für DTC-positive Patientinnen ein 1,4-fach erhöhtes Risiko, zu versterben (HR 1,44; 95%-KI 1,13 – 1,86; $p = 0,004$), und ein 1,7-fach erhöhtes Risiko eines Lokal- oder Fernrezidivs ihrer Erkrankung (HR 1,74; 95%-KI 1,34 – 2,25; $p < 0,001$). In der multivariablen Analyse bestätigte sich der DTC-Status als signifikanter, unabhängiger Prognosefaktor für das krankheitsfreie Überleben ($p < 0,001$) und das Gesamtüberleben ($p = 0,013$).

Um die prognostische Relevanz des DTC-Status weiter zu bestätigen, poolten Hartkopf et al. ihre Daten und die von zehn anderen Mammazentren in Europa und den USA für eine große Metaanalyse (PADDY). Die Auswertung von 10.307 Fällen zeigten eine DTC-

Positivität von 27,3 % sowie signifikante Häufungen DTC-positiver Fälle bei größeren Tumoren, positivem Nodalstatus, höherem Grading, ER-/PR-Negativität und HER2-Positivität (alle $p < 0,001$). Nach einem medianen Follow-Up von 7,6 Jahren war DTC-Positivität in der multivariablen Analyse signifikant mit einem schlechteren OS (HR 1,23; 95%-KI: 1,06 – 1,42; $p = 0,007$), BCSS (HR 1,38; 95%-KI: 1,11 – 1,72; $p = 0,004$), DFS (HR 1,29; 95%-KI: 1,10 – 1,50; $p = 0,001$) und DDFS (HR 1,32; 95%-KI 1,10 – 1,58, $p = 0,003$) assoziiert und bestätigte sich erneut als prognostisch unabhängig [159].

Weitere Untersuchungen berichteten über eine signifikante Assoziation zwischen DTC-Detektion und einem erhöhten Lokalrezidivrisiko. Bidard et al. und Hartkopf et al. konnten die prognostische Unabhängigkeit des DTC-Status in Bezug auf das lokalrezidivfreie Überleben bestätigen [120, 138]. Dies impliziert, dass nach vollständiger Exzision des Primärtumors möglicherweise DTCs vom Knochenmark aus zur Stelle des Primärtumors rezirkulieren können. Diese provokative Hypothese wird ebenfalls durch eine frühere experimentelle Studie gestützt, die am Tiermodell nachweisen konnte, dass sich CTCs an der Primärtumorlokalisierung ansiedeln können [160].

Der prognostische Wert persistierender DTCs nach NACT wurde mit Rücksicht auf die verfügbare Fall- und Ereigniszahl in dieser Arbeit nicht bestimmt. Jedoch sind nach NACT persistierende DTCs in der Vergangenheit ebenfalls mit einem signifikant schlechteren Überleben assoziiert worden [154, 156]. Auch DTC-Status-abhängige Sekundärtherapien wurden von Naume et al. in einer Studie untersucht, in der frühe Mammakarzinompatientinnen nach abgeschlossener Chemotherapie (Fluoruracil, Epirubicin, Cyclophosphamid) bei posttherapeutisch persistierenden DTCs zusätzlich sechs Zyklen Docetaxel verabreicht bekommen haben. Diese Patientinnen zeigten ein vergleichbares krankheitsfreies Überleben wie Patientinnen, die bei der Erstdiagnose DTC-negativ waren. Patientinnen, die wiederum nach Docetaxel-Gabe persistierende DTCs zeigten, hatten dagegen ein signifikant schlechteres krankheitsfreies Überleben [161].

Obwohl die meisten Studien den unabhängig prognostischen Wert von DTCs bereits nachweisen konnten, bleibt die klinische Bedeutung von DTCs im Knochenmark ein kontroverses Thema. Sowohl die Leitfäden der American Society of Clinical Oncology (ASCO) als auch die aktuelle S3-Leitlinie Mammakarzinom der AWMF empfehlen die routinierte Bestimmung als prognostischen Marker aufgrund einer unzureichenden Datenlage bisher nicht [45]. Auch die bereits diskutierten methodologischen Schwierigkeiten in der Standardisierung der DTC-Detektion spielen dabei eine Rolle.

4.5.4 Disseminierte Tumorzellen in immunhistochemischen Subtypen des Mammakarzinoms

Betrachtet man die gegebenen Diskrepanzen in der Effektivität von Chemotherapien sowie den rezidivfreien Überlebenszeiten zwischen verschiedenen immunhistochemischen Subtypen (insb. TNBC und Hormonrezeptor-positiven Tumoren), sowie den bekannten prognostischen Wert der Tumorzell dissemination beim Mammakarzinom, so lässt sich vermuten, dass sich DTCs in unterschiedlichem Ausmaß unter den immunhistochemischen Subtypen nachweisen lassen könnten. In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Häufung DTC-positiver Fälle innerhalb einem der IHC-Subtypen demonstriert werden. Im Gegensatz dazu zeigten frühere Untersuchungen jedoch signifikante Assoziationen zwischen DTC-Detektion und den isolierten Merkmalen aggressiverer immunhistochemischer Subtypen (negativer ER-/PR-Rezeptorstatus und positiver HER2-Rezeptorstatus) [112, 115]. Darüber hinaus betrachteten Hartkopf et al. unter 2911 Patientinnen das Auftreten von DTCs unter unterschiedlichen immunhistochemischen Subtypen (definiert als *luminal-like*: HR+ / HER2-; *HER2-type*: HR+ oder HR- / HER2+; *basal-like*: HR- / HER2-) und demonstrierten ein signifikant gehäuftes Vorkommen in *basal-like* (30 %) und *HER2-type* (28 %) gegenüber *luminal-like* (23 %) Tumoren ($p = 0,008$) [115]. Auch nach abgeschlossener NACT wurde ein signifikant gehäuftes Auftreten von persistierenden DTCs bei TNBC-Patientinnen beobachtet (verglichen mit HR+ / HER2-), wie von Kasimir-Bauer et al. berichtet [152]. Dass diese Erkenntnisse in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden konnten, muss der geringen absoluten Fallzahl nicht-luminaler Tumore (HER2+ $n = 25$; TNBC $n = 23$) in den Überlebensanalysen zugeschrieben werden.

Das Überleben in Abhängigkeit von DTC-Status und molekularem Tumorsubtyp betrachtet zeigte eine frühe Pilotstudie von Naume et al., in der die Tumorsubtypen mittels Genexpressionsanalysen ermittelt wurden, eine besonders schlechte Prognose für Luminal A-Patientinnen mit positivem DTC-Status [162]. Die hier vorliegende Studie demonstriert ebenfalls, unter Verwendung einer immunhistochemischen Surrogatklassifikation, dass DTC-positive Patientinnen mit Luminal A-Tumoren ein signifikant schlechteres brustkrebspezifisches ($p = 0,04$) krankheitsfreies ($p = 0,005$) und metastasenfreies ($p = 0,006$) Überleben hatten, als DTC-negative Luminal A-Patientinnen. Darüber hinaus hatten DTC-positive Patientinnen mit TNBC-Subtyp im Vergleich zu DTC-negativen Patientinnen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben bzw. brustkrebspezifisches Überleben ($p = 0,012$ für beide). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit jüngeren

Untersuchungen von Stefanovic et al., die 504 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom umfassten und die prognostische Relevanz des DTC-Status in immunhistochemischen Subtypen untersuchte (definiert als *Luminal A*: ER+ und/oder PR+ / HER2- / Ki67 <14 %; *Luminal B*: ER+ und/oder PR+ / HER2- / Ki67 \geq 14 %; *HER2-positiv*: HER2+; *Triple negative*: ER- / PR- / HER2-). Während auch hier keiner der Subtypen signifikant häufiger mit einem DTC-Nachweis assoziiert war, ging in den prospektiven Untersuchungen ein positiver DTC-Status bei Patientinnen mit *triple negative* Tumoren mit einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben einher ($p = 0,0326$). Bei Patientinnen mit *Luminal A/B* Tumoren war ein positiver DTC-Status signifikant mit einem schlechteren krankheitsfreien Überleben assoziiert und bestätigte sich in der multivariablen Analyse als unabhängiger prognostischer Faktor ($p = 0,0071$) [163]. Auch die o.g. PADDY-Studie von Hartkopf et al. berichtete über eine signifikante Interaktion zwischen DTC-Status und dem Luminal B-Subtyp (definiert als HR+ / HER2- / G3) beim metastasenfrem Überleben (HR 2,34; $p = 0,014$) [164]. Weitere Studien zur DTC-Detektion und ihrer prognostischen Bedeutung unter immunhistochemischen Subtypen des nicht-metastasierten Mammakarzinoms sind in Tabelle 35 zusammengefasst.

Zusammengefasst ergänzen die genannten Ergebnisse die bisherige Datenlage zum prognostischen Wert des DTC-Status mit Hervorhebung einer höheren (Fern-)rezidivrate unter luminalen Subtypen mit DTC-Positivität und einer höheren Sterberate unter TNBC-Subtypen mit DTC-Positivität.

Tabelle 35: Studien zur DTC-Detektion und prognostischer Bedeutung unter immunhistochemischen Subtypen des nicht-metastasierten Mammakarzinoms.

Studie	n	Methode	DTC-Detektion in %					Follow-Up (Median)	Unterschiede im Überleben (DTC+ vs. DTC-)	
			Gesamt	Lum A	Lum B		HER2+			TNBC
					HER2-	HER2+				
Hall et al. (2010) ^[165]	205	AE1/AE3, CAM5.2, MNF116, CK8, CK18	29	28	35	29	30	–	n.u.	
Hartkopf et al. (2014) ^[115]	3141	A45-B/B3	26	23*	28*		30*	–	n.u.	
Stefanovic et al. (2016) ^[163]	504	2E11	59	56	65	54	59	72	OS (TNBC), DFS (Lum A/B**)	
Kasimir-Bauer et al. (2016) ^[152]	525	A45-B/B3	40	38	41	58	44	59	OS (HER2+) [§] , DFS (HER2+) [§]	
Hartkopf et al. (2021) ^[159]	10320	A45-B/B3, AE1/AE3, 2E11, E29	27	23*	25*	30*	25*	91	DDFS (Lum B)	
Diese Studie (2020)	238	AE1/AE3	20	20	15	31	21	35	OS (TNBC), BCSS (Lum A, TNBC), DFS (Lum A), DDFS (Lum A)	

* signifikant im Chi-Quadrat-Test, ** unabhängig in multivariabler Analyse, [§] kürzer bei DTC-negativen Fällen, *n.u.* nicht untersucht, *Lum A* Luminal A, *Lum B* Luminal B, *HER2* human epidermal growth-factor receptor 2, *TNBC* triple negative breast cancer, *OS* overall survival, *BCSS* breast cancer specific survival, *DFS* disease free survival, *DDFS* distant disease free survival

Synnestvedt et al. untersuchten den prognostischen Wert von zytokeratin-positiven Zellen (AE1/AE3) im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen nach weiterer Einteilung dieser Zellen anhand ihrer Zellmorphologie in DTC-Subgruppen (Tumorzellen, nicht-interpretierbare Zellen, fraglich hämatopoetische Zellen und hämatopoetische Zellen). Die morphologisch distinkten Subgruppen korrelierten bei Patientinnen mit Luminal A- bzw. TNBC-Subtyp jeweils unterschiedlich mit der Prognose [166]. Somit könnte einer morphologisch differenzierteren DTC-Bestimmung, abhängig vom IHC-Subtyp, zur adäquaten Prognostizierung zukünftig eine größere Bedeutung zukommen.

Neben der Betrachtung des prognostischen Wertes von DTCs unter verschiedenen IHC-Subtypen des Primärtumors rückt auch die immunhistochemische und molekulare Charakterisierung der DTCs selbst in den Fokus. Frühere Untersuchungen zeigten, dass sich die DTCs in ihrer Rezeptorexpression auf molekularer und phänotypischer Ebene vom entsprechenden Primärtumor unterscheiden können [167-170]. Dies suggeriert Plastizität des Rezeptorstatus während der Dissemination ins Knochenmark. Gleichmaßen spiegelt der Phänotyp von Metastasen nicht immer den des Primärtumors wider [171, 172]. Als Ursachen für den Erwerb oder Verlust phänotypischer Merkmale werden u.a. selektive

Vorteile während Schritten der Dissemination diskutiert wie z.B. eine höhere Tendenz HER2-positiver Zellen, sich vom Primärtumor abzuspalten, oder ein durch Systemtherapien bedingter Selektionsdruck [173].

Sowohl für die HER2- als auch für die ER-Expression sind Diskordanzen zwischen Primärtumor und DTCs beschrieben worden, welche wichtige Implikationen für die Prognose und darüber hinaus für die Auswahl individueller Therapien mit sich bringen [167-169]. So zeigten sich in einer Studie von Rack et al. bei 24 % der Patientinnen mit HER2-negativen Primärtumoren HER2-positiv DTCs im Knochenmark. Die selbe Forschungsgruppe berichtete über eine erfolgreiche Eradizierung von persistierenden, HER2-positiven DTCs nach einer postneoadjuvanten Therapie mit Trastuzumab [167, 174].

Umgekehrt zeigten sich unter alleiniger adjuvanter Chemotherapie HER2-positiv DTCs häufiger persistierend gegenüber HER2-negativen DTCs, wie von Krawczyk et al. beschrieben [168]. Gleichzeitig zeigten Patientinnen mit HER2-positiven DTCs, welche bei HER2-negativem Primärtumor keine anti-HER2-Therapie erhalten haben, ein signifikant erhöhtes Rezidivrisiko, wie von Hartkopf et al. berichtet [169]. Die ER-Expression von Primärtumor und DTCs war in einer Studie von Fehm et al. unter 254 Patientinnen in nur in 28 % der Fälle konkordant. Die meisten ER-positiven Tumore zeigten ER-negative DTCs [175]. Diese Beobachtung deckt sich damit, dass ca. 20 – 30 % der Patientinnen mit ER-positiven Primärtumoren ER-negative Fernmetastasen entwickeln [176, 177].

Bezüglich der vorgenannten Auffälligkeiten werden DTCs zunehmend auf das Vorliegen stammzellähnlicher Charakteristika im Kontext der Stammzelltheorie untersucht. Mehrere Studien belegten eine erhöhte Persistenz von Tumorzellen mit stammzellähnlichen Charakteristika nach Systemtherapien, was einen effektiven Mechanismus zur Entwicklung einer Chemoresistenz vermuten lässt [107]. Insofern wird angenommen, dass es sich bei einem Teil nachgewiesener DTCs um Tumorstammzellen handelt. Mehrere Studien haben über DTCs mit stammzellähnlichem Phänotyp im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen berichtet [106, 178, 179]. Diese DTCs können zu phänotypisch vom Primärtumor abweichenden Metastasen differenzieren. Darüber hinaus ist deren Nachweis mit einer schlechteren Prognose assoziiert [180].

Trotz dieser zunehmenden Evidenz werden systemische Therapien bislang basierend auf der Hypothese, dass die MRD dieselben Eigenschaften wie der Primärtumor aufweist, festgelegt. Demnach wird durch die zum Teil hohe phäno- und genotypische Diskordanz

zwischen DTCs und dem Primärtumor ein potentieller therapeutischer Nutzen einer bestimmten Gruppe von Patientinnen vorenthalten. So können HR-negative DTCs durch rein endokrine Therapiestrategien nicht effektiv erreicht werden. Da nicht alle DTCs zu Metastasen proliferieren [103, 112], kann eine weitere geno- und phänotypische DTC-Charakterisierung sinnvoll sein, um das zugrundeliegende biologische Verhalten zu verstehen und Zellen mit tatsächlichem Metastasierungspotential genauer zu identifizieren.

Mit Blick auf die vorgenannten Studien stellt die fehlende Subtypisierung der DTC in der vorliegenden Studie – sowohl morphologisch, als auch immunhistochemisch – eine Limitation der Arbeit dar. Den Nutzen individueller, DTC-abhängiger (Sekundär-)Therapien gilt es in umfangreichen prospektiven Studien zu untersuchen.

4.5.5 Bisphosphonate und DTCs

Eine knochengerichtete Therapie mit Bisphosphonaten kann in der nicht-metastasierten Situation bei postmenopausalen Frauen die (Fern-)Rezidivrate, das Auftreten von Knochenmetastasen und die Mortalitätsrate signifikant senken, wie eine große Metaanalyse der Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, Group mit einem medianen Follow-Up von 67,2 Monaten belegen konnte. Für prämenopausale Patientinnen ergab sich kein Benefit einer Bisphosphonattherapie [67, 70]. In der vorliegenden Studie zeigte sich durch die Bisphosphonattherapie ein geringer protektiver Effekt unter postmenopausalen Patientinnen in Bezug auf die untersuchten Ereignisse, jedoch waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant, was durch das im Vergleich zur vorgenannten Metaanalyse kurzen medianen Follow-Ups von 35,9 Monaten liegen kann. Ferner verfügten wir nicht in allen Fällen über die Information, für wie lange die Bisphosphonattherapie nach der Initiierung durchgeführt wurde, was die Aussagekraft weiter verringert. Mit Rücksicht hierauf wurden keine Überlebensanalysen unter Einschluss beider Variablen (DTC-Status, Bisphosphonattherapie) durchgeführt.

In Bezug auf DTCs scheint der DTC-Status die Effektivität einer knochengerichteten Therapie vorherzusagen: In retrospektiven Analysen waren Bisphosphonate zur Prävention von Metastasen effektiver bei DTC-positiven Patientinnen. Ihr protektiver Effekt ist möglicherweise auf die Eradizierung von DTCs zurückzuführen [115, 181, 182]. Auch in der prospektiven MRD-1-Studie zeigte sich eine Eradikation von DTCs bei Patientinnen, die mit einem Bisphosphonat behandelt wurden [127]. Eine knochengerichtete Therapie mit Denosumab als Add-on zur neoadjuvanten Chemotherapie beim primären Mammakarzinom

hatte im Gegensatz zu Bisphosphonaten keinen signifikanten Einfluss auf DTC-Populationen im Knochenmark, wie ein Subanalyse der GeparX-Studie zeigte [183]. Die genannten Daten implizieren mögliche Konsequenzen, um adjuvante knochengerichtete Therapien individuell anzupassen.

4.5.6 DTC-Detektion bei DCIS

Frühere Hypothesen verorteten den Ursprung der Tumorzeldisseminierung in frühen, klinisch nicht-detektierbar invasiven Tumoren. Studien am Tiermodell legten jedoch nahe, dass Tumorzellen bereits aus frühesten epithelialen Veränderungen, wie dem DCIS, disseminieren können [83]. Darüber hinaus konnte in bisherigen Studien gezeigt werden, dass DTCs bereits im Knochenmark von 11 – 21% der Patientinnen mit prä-invasiven Karzinomen, dem DCIS eingeschlossen, nachweisbar sind [184-187].

Zunächst fielen zwei nodal-positive DCIS-Patientinnen auf, bei denen keine Invasion des Primärtumors nachgewiesen wurde. Diese Konstellation wird in der Literatur mit nur 1-2 % Prävalenz beschrieben, sodass das DCIS-Kollektiv mit kleinem Stichprobenumfang eine ungewöhnliche Häufung dieser Fälle zeigt [188, 189]. Ferner waren die beiden nodalpositiven Patientinnen DTC-negativ.

In unserem Kollektiv ließen sich bei 5 von 18 DCIS-Patientinnen (27,8 %) DTCs im Knochenmark nachweisen – eine höhere Prävalenz als in der aktuellen Studienlage beschrieben und am ehesten durch die Kollektivgröße bedingt. Dabei zeigten hormonrezeptorpositive low- und intermediate-grade DCIS-Läsionen mit negativem Lymphknotenstatus häufiger DTCs im Knochenmark. Ein statistisch signifikant häufigerer DTC-Nachweis ergab sich bei prämenopausalen Patientinnen ($p = 0,036$) und low-grade Tumoren ($p = 0,028$). Im Vergleich hierzu zeigten sich in größeren Kollektiven der Studien von Banys et al. ($n = 404$) und Walter et al. ($n = 627$) geringere DTC-Positivitätsraten von 16 % bzw. 11 %. Jedoch ließen sich am größeren Kollektiv keine statistisch signifikanten Assoziationen zwischen klinisch-pathologischen Parametern und dem DTC-Status bei DCIS-Patientinnen nachweisen, sodass die signifikanten Ergebnisse im vorliegenden Kollektiv der kleinen Kollektivgröße geschuldet sein könnten. [184, 185].

Ob durch die Ermittlung des DTC-Status bei DCIS-Patientinnen auch prognostische Aussagen getroffen werden können untersuchten Walter et. al in ihrer Studie über eine mediane Nachbeobachtungszeit von 49 Monaten. Hier war der DTC-Nachweis signifikant

mit einem kürzeren lokalrezidivfreien Überleben assoziiert (log-rank Test $p = 0,023$ bei Detektion von mindestens 2 DTCs pro Probe). Das fernmetastasenfreie Überleben und das Gesamtüberleben war für DTC-positive DCIS-Patientinnen nicht signifikant reduziert [184]. In der Studie von Banys et al. zeigte sich bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 45 Monaten kein reduziertes krankheitsfreies oder Gesamtüberleben [185].

Unabhängig davon unterstützen die Ergebnisse dieser Studien, sowie die der hier vorliegenden Arbeit, die Hypothese der parallelen Tumorprogression, in welcher eine zukünftige Metastasierung von vereinzelt Tumorzellen ausgeht, die von sehr frühen, zum Teil prä-invasiven Mammakarzinomen wie dem DCIS aus disseminieren [110]. Diese fordert die fortwährend bestehende Ansicht heraus, dass prä-invasive Karzinome kein Metastasierungspotential aufweisen, da sie die Basalmembran nicht durchbrochen haben und somit keinen Anschluss an Blut- oder Lymphgefäße finden. Ob diese DTCs von echten prä-invasiven Läsionen aus disseminieren, oder von einem histopathologisch nicht erfassten, mikroinvasiven Fokus innerhalb des DCIS aus, bleibt jedoch unklar. Die Beurteilung der prognostischen Relevanz von DTCs bei DCIS-Läsionen bleibt eingeschränkt, da DCIS (und mikroinvasive Karzinome) allgemein eine sehr gute Prognose aufweisen [190]. Dies macht längere Nachbeobachtungszeiträume für zukünftige Untersuchungen erforderlich. Obwohl das DCIS derzeit anhand von histopathologischen Kriterien klassifiziert wird und diese in einem gewissen Ausmaß eine Prognoseabschätzung erlauben, verbleiben weiterhin Unklarheiten über das Verhalten dieser Entität.

4.6 Limitationen der Arbeit

Die hier vorliegende Arbeit legt die prognostische Relevanz der Tumorzeldissemination im Patientinnenkollektiv der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf dar. Da der DTC-Status beim Mammakarzinom nicht routinemäßig erhoben wird, steht nur ein begrenzter Stichprobenumfang für eine Auswertung zur Verfügung. Dass sich in dieser Arbeit ein positiver DTC-Status nicht als unabhängiger Prognosefaktor in der multivariablen Analyse erweist, könnte damit im Zusammenhang stehen, dass bei dem gegebenen Stichprobenumfang und Nachbeobachtungszeitraum, in Verbindung mit der guten Prognose des frühen Mammakarzinoms, vergleichsweise erst wenige Ereignisse zur Schätzung dieses Zusammenhangs zur Verfügung standen, und sich somit nur besonders starke Zusammenhänge als statistisch signifikant herausstellen können. Dies spiegelt sich ebenfalls

in den zum Teil großen 95%-Konfidenzintervallen wieder. Ebenso können signifikante Ergebnisse dem Stichprobenumfang geschuldet sein. Gleichzeitig zeigten vergleichbar angelegte Studien in der Vergangenheit ebenfalls signifikant schlechtere Überlebenszeiten für DTC-positive Patientinnen in der univariablen Analyse, welche in der multivariablen Analyse nicht als unabhängig von anderen prognostischen Faktoren bestätigt werden konnten [151, 191]. Eine Verzerrung durch die unterschiedlichen Prävalenzen der IHC-Subtypen muss ebenfalls berücksichtigt werden, wobei die Patientinnen mit luminalen Tumoren in dieser Arbeit (77 %), ähnlich zu den in Tabelle 35 aufgeführten Studien (59 % – 76 %), den Großteil des Kollektivs ausmachten. Obwohl die höhere Fallzahl der nicht-luminalen IHC-Subtypen in der gepoolten Analyse von Hartkopf et al. die prognostische Aussagekraft der Daten erhöht, wurde ein signifikanter Einfluss des DTC-Status nur auf das metastasenfreie Überleben bei Luminal-B-Tumoren nachgewiesen [159].

Eine weitere Limitation stellt die Subtypisierung der Primärtumore anhand der immunhistochemisch erfassbaren Merkmale (ER-/PR-Status, HER2-Status, Ki67-Proliferationsindex) als Surrogatmarker für die molekularen Subtypen dar. Obwohl Genexpressionstests eine genauere Bestimmung der Subtypen erlauben, so stellt die Verwendung der immunhistochemisch erfassbaren Surrogatmarker aus Gründen der Praktikabilität und der Kosteneffizienz die aktuelle klinische Praxis dar.

Darüber hinaus kann die Inklusion der Patientinnen sowohl mit als auch ohne adjuvanter endokriner oder zytotoxischer Therapie die durch die DTC-Bestimmung gewonnene prognostische Information mindern. Einen weiteren möglichen Einfluss stellt die Bisphosphonattherapie dar, die 17,9 % der Patientinnen erhalten haben (Tabelle 3). Eine Bisphosphonattherapie hat in anderen Studien bei DTC-positiven Patientinnen einen protektiven Einfluss gezeigt [115, 127, 181, 182].

Um Regressionsmodelle zu erstellen, die reich an Informationen sind, und um anhand dieser Modelle valide Aussagen über die unabhängig prognostische Relevanz der Tumorzell dissemination treffen zu können, sollten zukünftige Studien ein umfassenderes Patientinnenkollektiv und eine möglichst lange Nachbeobachtung umfassen. Erst dann können Aussagen zur prognostischen Relevanz und Unabhängigkeit dieses Markers mit größerer Sicherheit getroffen werden. Trotz der begrenzten Anzahl Ereignisse in unseren Daten demonstriert die vorliegende Studie eindeutig eine prognostische Relevanz des DTC-Status im primären, nicht-metastasierten Mammakarzinom.

Während der DTC-Nachweis mittels Pan-Zytokeratin Antikörper AE1/AE3 als eine der empfohlenen Methoden zur DTC-Detektion gilt [134], und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Datenlage zu diesem Antikörper erweitern, so werfen die in Kapitel 4.4 diskutierten Disparitäten zwischen den verschiedenen DTC-Nachweisverfahren Fragen zur Sensitivität und Spezifität der Methode unter verschiedenen Primärtumor- und DTC-Subtypen auf. Viele der Studien basieren auf immunhistochemischen Verfahren zum DTC-Nachweis. Die Verwendung von Immunfluoreszenzverfahren zur DTC-Detektion hebt die vorliegende Studie von vorangegangenen Studien ab und gewinnt insbesondere mit Hinblick auf die phänotypische Charakterisierung der DTCs zunehmend an Bedeutung [106, 175]. So erlauben multisequentielle Immunfluoreszenzverfahren die Färbung von bis zu sechs Antigenmarkern einer einzelnen DTC und ermöglichen die Untersuchung der prognostischen und prädiktiven Relevanz unterschiedlicher DTC-Subtypen. [192]. Vor diesem Hintergrund sollte die komplementäre Anwendung mehrerer Nachweisverfahren zur genaueren Erfassung der minimalen Tumorresterkrankung diskutiert werden.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Während die Erforschung der MRD und des DTC-Status technische Herausforderungen mit sich bringt, so ist der Wissenstand zu diesem Thema innerhalb kurzer Zeit enorm angewachsen. Tumorerheterogenität, EMT, Diskordanzen zwischen Primärtumor und MRD, *tumor dormancy* und die damit verbundene Therapieresistenz tragen alle zum heutigen Verstehen des Metastasierungsprozesses bei. Die Entdeckung der intrinsischen Subtypen stellt ebenfalls einen wichtigen Meilenstein in der Aufarbeitung des Mammakarzinoms dar und ermöglicht seitdem eine differenzierte Betrachtung von Mechanismen, die dem biologischen Verhalten, der Prognose und dem Therapieansprechen des Tumors zugrunde liegen. Der prognostische Wert des DTC-Status scheint bei luminalen Subtypen am höchsten zu sein. Auch Patientinnen mit TNBC, welche im neoadjuvanten Setting am häufigsten eine pCR erreichen, könnten von einer zusätzlichen postneoadjuvanten Bestimmung des DTC-Status zur Prognosebestimmung profitieren [162-165]. Die immunhistochemische Charakterisierung der DTCs selbst kann ebenfalls Aufschluss über den Verlauf der Erkrankung geben und ihr prädiktiver Wert sollte weiter untersucht werden. In diesem Kontext wurde in der DETECT III Studie der Effekt einer Anti-HER2-Therapie (Lapatinib) auf HER2-positive CTCs und die Prognose bei Patientinnen mit HER2-negativen

Primärtumoren, jedoch in der metastasierten Situation, untersucht. Während eine Lapatinib-Therapie keinen signifikanten Einfluss auf die CTC-Population gegenüber der Kontrollgruppe zeigte, so konnte ein signifikanter Überlebensvorteil für die mit Lapatinib behandelte Patientinnengruppe demonstriert werden [193].

Das Ziel der adjuvanten Therapie bleibt das Eradizieren der MRD. Zukünftige Untersuchungen müssen den prädiktiven Wert des DTC-Status und der DTC-Charakterisierung im Zusammenhang mit der Therapieeffektivität untersuchen, um unser Verstehen zu vertiefen, warum Therapien bei manchen Patientinnen erfolgreich sind und bei anderen nicht. Die klinisch bedeutsame biologische Heterogenität von Primärtumor, CTCs und DTCs, die aus genotypischen und phänotypischen Veränderungen sowie stammzell-ähnlichen Charakteristika hervorgeht, ist ein Grund dafür, warum ein Teil der MRD trotz einer systemischen Therapie persistiert, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [124-126]. Durch die Anwendung der genannten wissenschaftlichen Erkenntnisse ergeben sich Chancen, die für die Patientinnen effektivste Therapie einzusetzen, während eine Exposition gegenüber unwirksamen Therapien vermieden werden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), *Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe*. Berlin, 2017.
3. Bertz, J., et al., *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland*. 2010.
4. de Gelder, R., et al., *The effects of population-based mammography screening starting between age 40 and 50 in the presence of adjuvant systemic therapy*. Int J Cancer, 2015. **137**(1): p. 165-72.
5. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, et al., *Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials*. Lancet (London, England), 2012. **379**(9814): p. 432-444.
6. Colzani, E., et al., *Time-dependent risk of developing distant metastasis in breast cancer patients according to treatment, age and tumour characteristics*. Br J Cancer, 2014. **110**(5): p. 1378-1384.
7. Clarke, M., et al., *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2087-106.
8. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
9. Antoniou, A.C., et al., *The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: updates and extensions*. Br J Cancer, 2008. **98**(8): p. 1457-66.
10. Goldberg, J.I. and P.I. Borgen, *Breast cancer susceptibility testing: past, present and future*. Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(8): p. 1205-14.
11. Li, C.I., D.J. Uribe, and J.R. Daling, *Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer*. Br J Cancer, 2005. **93**(9): p. 1046-52.
12. Gray, H., et al., *Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice*. 39th ed. 2005, Edinburgh ; New York: Elsevier Churchill Livingstone. xx, 1627 p.
13. Sinn, H.-P. and H. Kreipe, *A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition*. Breast Care, 2013. **8**(2): p. 149-154.
14. Sorum, R., et al., *Trends in incidence of ductal carcinoma in situ: the effect of a population-based screening programme*. Breast, 2010. **19**(6): p. 499-505.

15. Gospodarowicz, M.K., J.D. Brierley, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 8 ed. 2017: John Wiley & Sons.
16. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. *Histopathology*, 1991. **19**(5): p. 403-10.
17. Lyons, W.R., C.H. Li, and R.E. Johnson, *The hormonal control of mammary growth and lactation*. *Recent Prog Horm Res*, 1958. **14**: p. 219-48; discussion 248-54.
18. Folca, P.J., R.F. Glascock, and W.T. Irvine, *Studies with tritium-labelled hexoestrol in advanced breast cancer. Comparison of tissue accumulation of hexoestrol with response to bilateral adrenalectomy and oophorectomy*. *Lancet*, 1961. **2**(7206): p. 796-8.
19. McGuire, W.L., et al., *Hormone dependence in breast cancer*. 1974. **23**(1): p. 75-100.
20. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. *Pathologe*, 1987. **8**(3): p. 138-40.
21. AGO Breast Committee, *Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. Recommendations 2024*. www.agoonline.de. 2024.
22. Anderson, W.F., et al., *Estrogen Receptor Breast Cancer Phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2002. **76**(1): p. 27-36.
23. Olayioye, M.A., *Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members*. *Breast Cancer Research*, 2001. **3**(6).
24. DeSantis, C.E., et al., *Breast cancer statistics, 2019*. *CA Cancer J Clin*, 2019.
25. Noone, A.M., et al., *Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017. **26**(4): p. 632-641.
26. Ross, J.S., et al., *The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine*. *Oncologist*, 2009. **14**(4): p. 320-68.
27. Gerdes, J., et al., *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. *Int J Cancer*, 1983. **31**(1): p. 13-20.
28. Petrelli, F., et al., *Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. **153**(3): p. 477-91.
29. De Azambuja, E., et al., *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients*. *British Journal of Cancer*, 2007. **96**(10): p. 1504-1513.

30. Coates, A.S., et al., *Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(8): p. 1533-46.
31. Nielsen, T.O., et al., *Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group*. *J Natl Cancer Inst*, 2021. **113**(7): p. 808-819.
32. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
33. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
34. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
35. Sotiriou, C., et al., *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(18): p. 10393-8.
36. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
37. Voduc, K.D., et al., *Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(10): p. 1684-91.
38. Cheang, M.C., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(10): p. 736-50.
39. Dent, R., et al., *Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4429-34.
40. Prat, A., et al., *Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer*. *Oncologist*, 2013. **18**(2): p. 123-33.
41. Cheang, M.C., et al., *Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression*. *Oncologist*, 2015. **20**(5): p. 474-82.
42. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. *Ann Oncol*, 2011. **22**(8): p. 1736-47.
43. Goldhirsch, A., et al., *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*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(9): p. 2206-23.
44. Prat, A., et al., *Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer*. *Breast*, 2015. **24 Suppl 2**: p. S26-35.

45. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, AWMF Registernummer: 032-045OL*. 2021.
46. Veronesi, U., et al., *Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(16): p. 1227-32.
47. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., et al., *Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials*. *Lancet*, 2011. **378**(9804): p. 1707-16.
48. Kunkler, I.H., et al., *Breast-conserving surgery with or without irradiation in women aged 65 years or older with early breast cancer (PRIME II): a randomised controlled trial*. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(3): p. 266-73.
49. Hughes, K.S., et al., *Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women age 70 years or older with early breast cancer: long-term follow-up of CALGB 9343*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(19): p. 2382-7.
50. Fyles, A.W., et al., *Tamoxifen with or without breast irradiation in women 50 years of age or older with early breast cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(10): p. 963-70.
51. Malhotra, V. and M.C. Perry, *Classical Chemotherapy: Mechanisms, Toxicities and the Therapeutic Window*. *Cancer Biology & Therapy*, 2003. **2**(sup1): p. 1-3.
52. Hähnel, R., E. Twaddle, and T. Ratajczak, *The influence of synthetic anti-estrogens on the binding of tritiated estradiol-17 β by cytosols of human uterus and human breast carcinoma*. *Journal of Steroid Biochemistry*, 1973. **4**(6): p. 687-695.
53. Jordan, V.C., *Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinomata*. *European Journal of Cancer* (1965), 1976. **12**(6): p. 419-424.
54. Bhatnagar, A.S., et al., *Highly selective inhibition of estrogen biosynthesis by CGS 20267, a new non-steroidal aromatase inhibitor*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1990. **37**(6): p. 1021-1027.
55. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., et al., *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. *Lancet*, 2011. **378**(9793): p. 771-84.
56. Valabrega, G., F. Montemurro, and M. Aglietta, *Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer*. *Annals of Oncology*, 2007. **18**(6): p. 977-984.
57. Agus, D.B., et al., *Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth*. *Cancer Cell*, 2002. **2**(2): p. 127-37.
58. Gianni, L., et al., *5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast*

- cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. Lancet Oncol, 2016. 17(6): p. 791-800.*
59. von Minckwitz, G., et al., *Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med, 2017. 377(2): p. 122-131.*
 60. Lewis Phillips, G.D., et al., *Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. Cancer Res, 2008. 68(22): p. 9280-90.*
 61. von Minckwitz, G., et al., *Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med, 2019. 380(7): p. 617-628.*
 62. Willett, C.G., et al., *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. Nature Medicine, 2004. 10(2): p. 145-147.*
 63. Rusnak, D.W., et al., *The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther, 2001. 1(2): p. 85-94.*
 64. Rodan, G.A. and H.A. Fleisch, *Bisphosphonates: mechanisms of action. J Clin Invest, 1996. 97(12): p. 2692-6.*
 65. McClung, M.R., et al., *Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. N Engl J Med, 2006. 354(8): p. 821-31.*
 66. Tevaarwerk, A., et al., *Randomized trial to assess bone mineral density (BMD) effects of zoledronic acid (ZA) in postmenopausal women (PmW) with breast cancer. Journal of Clinical Oncology, 2007. 25(18_suppl): p. 19558-19558.*
 67. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., *Adjuvant bisphosphonate treatment in early breast cancer: meta-analyses of individual patient data from randomised trials. Lancet, 2015. 386(10001): p. 1353-1361.*
 68. Hadji, P., et al., *Effects of zoledronic acid on bone mineral density in premenopausal women receiving neoadjuvant or adjuvant therapies for HR+ breast cancer: the ProBONE II study. Osteoporos Int, 2014. 25(4): p. 1369-78.*
 69. Gnant, M., et al., *Adjuvant denosumab in breast cancer (ABCSG-18): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet, 2015. 386(9992): p. 433-43.*
 70. O'Carrigan, B., et al., *Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. Cochrane Database Syst Rev, 2017. 10: p. CD003474.*
 71. Jones, R.L. and I.E. Smith, *Neoadjuvant treatment for early-stage breast cancer: opportunities to assess tumour response. Lancet Oncol, 2006. 7(10): p. 869-74.*
 72. Kaufmann, M., et al., *Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. Ann Oncol, 2007. 18(12): p. 1927-34.*

73. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, *Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials*. *Lancet Oncol*, 2018. **19**(1): p. 27-39.
74. Sinn, H.P., et al., *[Histologic regression of breast cancer after primary (neoadjuvant) chemotherapy]*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 1994. **54**(10): p. 552-8.
75. Cortazar, P., et al., *Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis*. *Lancet*, 2014. **384**(9938): p. 164-72.
76. von Minckwitz, G., et al., *Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **125**(1): p. 145-56.
77. Bonnefoi, H., et al., *Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy is an independent predictive factor irrespective of simplified breast cancer intrinsic subtypes: a landmark and two-step approach analyses from the EORTC 10994/BIG 1-00 phase III trial*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(6): p. 1128-36.
78. Houssami, N., et al., *Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy*. *Eur J Cancer*, 2012. **48**(18): p. 3342-54.
79. Gasparini, G., F. Pozza, and A.L. Harris, *Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients*. *J Natl Cancer Inst*, 1993. **85**(15): p. 1206-19.
80. Giuliano, A.E., et al., *Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual*. *CA Cancer J Clin*, 2017. **67**(4): p. 290-303.
81. Poorvu, P.D., et al., *Prognostic Impact of the 21-Gene Recurrence Score Assay Among Young Women With Node-Negative and Node-Positive ER-Positive/HER2-Negative Breast Cancer*. *J Clin Oncol*, 2020. **38**(7): p. 725-733.
82. Kalinsky, K., et al., *21-Gene Assay to Inform Chemotherapy Benefit in Node-Positive Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2021. **385**(25): p. 2336-2347.
83. Hosseini, H., et al., *Early dissemination seeds metastasis in breast cancer*. *Nature*, 2016. **540**(7634): p. 552-558.
84. Tachtsidis, A., et al., *Minimal residual disease in breast cancer: an overview of circulating and disseminated tumour cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2016. **33**(6): p. 521-50.
85. Dillekas, H., M.S. Rogers, and O. Straume, *Are 90% of deaths from cancer caused by metastases?* *Cancer Med*, 2019. **8**(12): p. 5574-5576.
86. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. *The Lancet*, 1889. **133**(3421): p. 571-573.

87. Ashworth, T., *A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death.* Aust Med J., 1869. **14**: p. 146.
88. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models.* Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
89. Weiss, L., *Metastatic inefficiency: intravascular and intraperitoneal implantation of cancer cells.* Cancer Treat Res, 1996. **82**: p. 1-11.
90. Weiss, L., *Metastatic inefficiency.* Adv Cancer Res, 1990. **54**: p. 159-211.
91. Mehlen, P. and A. Puisieux, *Metastasis: a question of life or death.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 449-58.
92. Iwatsuki, M., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance.* Cancer Sci, 2010. **101**(2): p. 293-9.
93. Savagner, P., *Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition.* Bioessays, 2001. **23**(10): p. 912-23.
94. Willipinski-Stapelfeldt, B., et al., *Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(22): p. 8006-14.
95. Wyckoff, J.B., et al., *A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor.* Cancer Res, 2000. **60**(9): p. 2504-11.
96. Dua, R.S., G.P. Gui, and C.M. Isacke, *Endothelial adhesion molecules in breast cancer invasion into the vascular and lymphatic systems.* Eur J Surg Oncol, 2005. **31**(8): p. 824-32.
97. Weiss, L., et al., *Lethal deformation of cancer cells in the microcirculation: a potential rate regulator of hematogenous metastasis.* Int J Cancer, 1992. **50**(1): p. 103-7.
98. Key, M.E., *Macrophages in cancer metastases and their relevance to metastatic growth.* Cancer Metastasis Rev, 1983. **2**(1): p. 75-88.
99. Hanna, N., *Role of natural killer cells in control of cancer metastasis.* Cancer Metastasis Rev, 1982. **1**(1): p. 45-64.
100. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
101. Banys, M., et al., *Dormancy in breast cancer.* Breast Cancer (Dove Med Press), 2012. **4**: p. 183-91.
102. Clements, M.E. and R.W. Johnson, *Breast Cancer Dormancy in Bone.* Curr Osteoporos Rep, 2019. **17**(5): p. 353-361.
103. Luzzi, K.J., et al., *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases.* Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 865-73.

104. Widner, D.B., et al., *Interactions Between Disseminated Tumor Cells and Bone Marrow Stromal Cells Regulate Tumor Dormancy*. *Curr Osteoporos Rep*, 2018. **16**(5): p. 596-602.
105. Naumov, G.N., et al., *Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy*. *Cancer Res*, 2002. **62**(7): p. 2162-8.
106. Balic, M., et al., *Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(19): p. 5615-21.
107. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
108. Psaila, B. and D. Lyden, *The metastatic niche: adapting the foreign soil*. *Nature Reviews Cancer*, 2009. **9**(4): p. 285-293.
109. Gomis, R.R. and S. Gawrzak, *Tumor cell dormancy*. *Mol Oncol*, 2017. **11**(1): p. 62-78.
110. Klein, C.A., *Parallel progression of primary tumours and metastases*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(4): p. 302-12.
111. Hermanek, P., et al., *International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis*. *Cancer*, 1999. **86**(12): p. 2668-73.
112. Braun, S., et al., *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(8): p. 793-802.
113. Diel, I.J., et al., *Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status*. *J Natl Cancer Inst*, 1996. **88**(22): p. 1652-8.
114. Gebauer, G., et al., *Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(16): p. 3669-74.
115. Hartkopf, A.D., et al., *Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients – Results from a large single-centre analysis*. *European Journal of Cancer*, 2014. **50**(15): p. 2550-2559.
116. Mansi, J.L., et al., *Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study*. *Lancet*, 1999. **354**(9174): p. 197-202.
117. Wiedswang, G., et al., *Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(18): p. 3469-78.
118. Braun, S., et al., *Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(8): p. 525-33.

119. Gerber, B., et al., *Simultaneous Immunohistochemical Detection of Tumor Cells in Lymph Nodes and Bone Marrow Aspirates in Breast Cancer and Its Correlation With Other Prognostic Factors*. Journal of Clinical Oncology, 2001. **19**(4): p. 960-971.
120. Hartkopf, A., et al., *Disseminated tumor cells from the bone marrow of patients with nonmetastatic primary breast cancer are predictive of locoregional relapse*. Annals of Oncology, 2015. **26**(6): p. 1155-1160.
121. Tjensvoll, K., et al., *Detection of disseminated tumor cells in bone marrow predict late recurrences in operable breast cancer patients*. BMC Cancer, 2019. **19**(1): p. 1131.
122. Becker, S., et al., *Primary systemic therapy does not eradicate disseminated tumor cells in breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **106**(2): p. 239-43.
123. Hall, C., et al., *Disseminated tumor cells predict survival after neoadjuvant therapy in primary breast cancer*. Cancer, 2012. **118**(2): p. 342-348.
124. Janni, W., et al., *Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(9): p. 2967-76.
125. Mathiesen, R.R., et al., *Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(4): p. R117.
126. Janni, W., et al., *The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence*. Cancer, 2005. **103**(5): p. 884-91.
127. Banys, M., et al., *Influence of zoledronic acid on disseminated tumor cells in bone marrow and survival: results of a prospective clinical trial*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 480.
128. Hoffmann, O., et al., *Effect of ibandronate on disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer: a pilot study*. Anticancer Res, 2011. **31**(10): p. 3623-8.
129. Rack, B., et al., *Effect of zoledronate on persisting isolated tumour cells in patients with early breast cancer*. Anticancer Res, 2010. **30**(5): p. 1807-13.
130. Aft, R., et al., *Effect of zoledronic acid on disseminated tumour cells in women with locally advanced breast cancer: an open label, randomised, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2010. **11**(5): p. 421-8.
131. Jamshidi, K. and W.R. Swaim, *Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device*. J Lab Clin Med, 1971. **77**(2): p. 335-42.
132. Sun, T.T., et al., *Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review*. Ann N Y Acad Sci, 1985. **455**: p. 307-29.

133. Borgen, E., et al., *Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells*. *Cytotherapy*, 1999. **1**(5): p. 377-88.
134. Fehm, T., et al., *A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation*. *Cancer*, 2006. **107**(5): p. 885-92.
135. Mantel, N., *Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration*. *Cancer Chemother Rep*, 1966. **50**(3): p. 163-70.
136. Pocock, S.J., T.C. Clayton, and D.G. Altman, *Survival plots of time-to-event outcomes in clinical trials: good practice and pitfalls*. *The Lancet*, 2002. **359**(9318): p. 1686-1689.
137. Cox, D.R., *Regression models and life-tables*. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 1972. **34**(2): p. 187-202.
138. Bidard, F.C., et al., *Disseminated Tumor Cells of Breast Cancer Patients: A Strong Prognostic Factor for Distant and Local Relapse*. *Clinical Cancer Research*, 2008. **14**(11): p. 3306-3311.
139. Giuliano, A.E., et al., *Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with early-stage invasive breast cancer*. *JAMA*, 2011. **306**(4): p. 385-93.
140. Diel, I.J. and R.J. Cote, *Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2000. **26**(1): p. 53-65.
141. Domschke, C., et al., *Intraoperative bone marrow puncture in breast cancer patients: Prospective assessment of adverse side-effects*. *The Breast*, 2011. **20**(1): p. 62-65.
142. Riethdorf, S., et al., *Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 920-8.
143. Janni, W.J., et al., *Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(10): p. 2583-93.
144. Rack, B., et al., *Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients*. *J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(5).
145. Bilani, N., et al., *Prognostic and predictive effects of circulating and disseminated tumor cells in breast cancer: A National Cancer Database (NCDB) analysis*. *Journal of Clinical Oncology*, 2020. **38**(15_suppl): p. 1029-1029.
146. Effenberger, K.E., et al., *Detection and clinical relevance of early disseminated breast cancer cells depend on their cytokeratin expression pattern*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **125**(3): p. 729-38.

147. Gilje, B., et al., *Comparison of molecular and immunocytochemical methods for detection of disseminated tumor cells in bone marrow from early breast cancer patients*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 514.
148. Becker, S., et al., *Evaluation of a RT-PCR based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **117**(2): p. 227-33.
149. Riethdorf, S. and K. Pantel, *Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow and Circulating Tumor Cells in Blood of Breast Cancer Patients: Current State of Detection and Characterization*. Pathobiology, 2008. **75**(2): p. 140-148.
150. Domschke, C., et al., *Prognostic Value of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Patients with Operable Primary Breast Cancer: A Long-term Follow-up Study*. Annals of Surgical Oncology, 2013. **20**(6): p. 1865-1871.
151. Falck, A.-K., et al., *Analysis of and prognostic information from disseminated tumour cells in bone marrow in primary breast cancer: a prospective observational study*. BMC Cancer, 2012. **12**(1): p. 403.
152. Kasimir-Bauer, S., et al., *Does primary neoadjuvant systemic therapy eradicate minimal residual disease? Analysis of disseminated and circulating tumor cells before and after therapy*. Breast Cancer Research, 2016. **18**(1).
153. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 448-56.
154. Braun, S., et al., *Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients*. J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 80-6.
155. Pantel, K., et al., *Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(17): p. 1419-24.
156. Hartkopf, A.D., et al., *The presence and prognostic impact of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells in the bone marrow of primary breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(5): p. R94.
157. Fehm, T., et al., *Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(5): p. R60.
158. Krawczyk, N., et al., *Prognostic relevance of induced and spontaneous apoptosis of disseminated tumor cells in primary breast cancer patients*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 394.
159. Hartkopf, A.D., et al., *Disseminated tumour cells from the bone marrow of early breast cancer patients: Results from an international pooled analysis*. Eur J Cancer, 2021. **154**: p. 128-137.
160. Kim, M.Y., et al., *Tumor self-seeding by circulating cancer cells*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1315-26.

161. Naume, B., et al., *Clinical outcome with correlation to disseminated tumor cell (DTC) status after DTC-guided secondary adjuvant treatment with docetaxel in early breast cancer*. J Clin Oncol, 2014. **32**(34): p. 3848-57.
162. Naume, B., et al., *Presence of bone marrow micrometastasis is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer*. Molecular Oncology, 2007. **1**(2): p. 160-171.
163. Stefanovic, S., et al., *Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Patients with Operable Primary Breast Cancer: Prognostic Impact in Immunophenotypic Subgroups and Clinical Implication for Bisphosphonate Treatment*. Ann Surg Oncol, 2016. **23**(3): p. 757-66.
164. Hartkopf, A., et al., *Abstract GS5-07: International pooled analysis of the prognostic impact of disseminated tumor cells from the bone marrow in early breast cancer: Results from the PADDY study*. Cancer Research, 2019. **79**(4 Supplement): p. GS5-07-GS5-07.
165. Hall, C., et al., *Disseminated tumor cells in biologic subtypes of stage I-III breast cancer patients*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(12): p. 3252-8.
166. Synnestvedt, M., et al., *Disseminated tumour cells in the bone marrow in early breast cancer: morphological categories of immunocytochemically positive cells have different impact on clinical outcome*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **138**(2): p. 485-97.
167. Rack, B., et al., *Trastuzumab clears HER2/neu-positive isolated tumor cells from bone marrow in primary breast cancer patients*. Arch Gynecol Obstet, 2012. **285**(2): p. 485-92.
168. Krawczyk, N., et al., *HER2 status on persistent disseminated tumor cells after adjuvant therapy may differ from initial HER2 status on primary tumor*. Anticancer Res, 2009. **29**(10): p. 4019-24.
169. Hartkopf, A.D., et al., *The HER2 status of disseminated tumor cells in the bone marrow of early breast cancer patients is independent from primary tumor and predicts higher risk of relapse*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **138**(2): p. 509-17.
170. Klein, C.A., et al., *Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer*. Lancet, 2002. **360**(9334): p. 683-9.
171. Gancberg, D., et al., *Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites*. Ann Oncol, 2002. **13**(7): p. 1036-43.
172. Tanner, M., P. Jarvinen, and J. Isola, *Amplification of HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in primary and metastatic breast cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(14): p. 5345-8.
173. Meng, S., et al., *HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9393-8.

174. Rack, B., et al., *Comparison of HER2 Expression in Primary Tumor and Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Breast Cancer Patients*. *Oncology*, 2016. **90**(4): p. 232-8.
175. Fehm, T., et al., *ERalpha-status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients*. *Breast Cancer Res*, 2008. **10**(5): p. R76.
176. Karlsson, E., et al., *Discordance in hormone receptor status in breast cancer during tumor progression*. *Journal of Clinical Oncology*, 2010. **28**(15_suppl): p. 1009-1009.
177. Kuukasjarvi, T., et al., *Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy*. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(9): p. 2584-9.
178. Reuben, J.M., et al., *Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and CD44(+)CD24lo cancer stem cell phenotype*. *Eur J Cancer*, 2011. **47**(10): p. 1527-36.
179. Krawczyk, N., et al., *The SOX2 Status of Disseminated Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated With Neoadjuvant Chemotherapy*. *Anticancer Res*, 2021. **41**(6): p. 2849-2858.
180. Giordano, A., et al., *Clinical relevance of cancer stem cells in bone marrow of early breast cancer patients*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(10): p. 2515-2521.
181. Solomayer, E.F., et al., *Influence of zoledronic acid on disseminated tumor cells in primary breast cancer patients*. *Ann Oncol*, 2012. **23**(9): p. 2271-2277.
182. Kasimir-Bauer, S., et al., *Different prognostic value of circulating and disseminated tumor cells in primary breast cancer: Influence of bisphosphonate intake?* *Scientific Reports*, 2016. **6**(1): p. 26355.
183. Wimberger, P., et al., *The effect of denosumab on disseminated tumor cells (DTCs) of breast cancer patients with neoadjuvant treatment: a GeparX translational substudy*. *Breast Cancer Research*, 2023. **25**(1): p. 32.
184. Walter, V.P., et al., *Abstract P1-01-16: Detection of disseminated tumor cells in DCIS patients impacts local recurrence*. *Cancer Research*, 2018. **78**(4 Supplement): p. P1-01-16.
185. Banys, M., et al., *Detection and clinical relevance of hematogenous tumor cell dissemination in patients with ductal carcinoma in situ*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **144**(3): p. 531-8.
186. Sanger, N., et al., *Disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ductal carcinoma in situ*. *Int J Cancer*, 2011. **129**(10): p. 2522-6.
187. Husemann, Y., et al., *Systemic spread is an early step in breast cancer*. *Cancer Cell*, 2008. **13**(1): p. 58-68.
188. Kelly, T.A., et al., *Axillary lymph node metastases in patients with a final diagnosis of ductal carcinoma in situ*. *Am J Surg*, 2003. **186**(4): p. 368-70.

189. Tada, K., et al., *Ductal carcinoma in situ and sentinel lymph node metastasis in breast cancer*. World J Surg Oncol, 2010. **8**: p. 6.
190. Ernster, V.L., et al., *Mortality among women with ductal carcinoma in situ of the breast in the population-based surveillance, epidemiology and end results program*. Arch Intern Med, 2000. **160**(7): p. 953-8.
191. Mansi, J.L., et al., *Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up*. Eur J Cancer, 1991. **27**(12): p. 1552-5.
192. Konig, T., et al., *Multi-Parameter Analysis of Disseminated Tumor Cells (DTCs) in Early Breast Cancer Patients with Hormone-Receptor-Positive Tumors*. Cancers (Basel), 2023. **15**(3).
193. Fehm, T., et al., *Efficacy of Lapatinib in Patients with HER2-Negative Metastatic Breast Cancer and HER2-Positive Circulating Tumor Cells-The DETECT III Clinical Trial*. Clin Chem, 2024. **70**(1): p. 307-318.
194. Klein, J.P. and M.L. Moeschberger, *Survival analysis: techniques for censored and truncated data*. 2006: Springer Science & Business Media.

6 Anhang

6.1 Überprüfung der Annahme proportionaler Hazards

Zentrale Annahme des Cox-Modells ist, dass das Hazard Ratio zweier Gruppen über die Zeit konstant ist (Annahme der proportionalen Hazards, *proportional hazards*, PH) [137]. Um die Annahme der proportionalen Hazards zu überprüfen, wurden über die Jahre verschiedene Methoden vorgeschlagen. In der vorliegenden Studie wurden die Kovariaten der Regression mittels Einführung als zeitabhängige Kovariaten in einem Cox-Modell auf PH untersucht [194]. Hierbei wurde aus jeder Kovariate (COV) eine zeitabhängige Kovariate (T_COV) berechnet:

$$T_COV = COV * \log(t)$$

Dann wurden sowohl die Kovariate (COV) als auch die berechnete zeitabhängige Kovariate (T_COV) in das Cox-Modell aufgenommen. Der errechnete Regressionskoeffizient der zeitabhängigen Variable sollte sich Null annähern und nicht statistisch signifikant sein ($p > 0,05$), was keine zeitliche Änderung des Hazards anzeigt und die Annahme des proportionalen Hazards für die Kovariate (COV) bestätigt [194]. Dieser Schritt wurde für alle Kovariaten wiederholt, bevor sie in das Cox-Modell aufgenommen wurden (Tabelle 36).

Tabelle 36: Ergebnisse des Tests auf proportionale Hazards der Kovariaten. Angegeben sind Regressionskoeffizienten und Signifikanzwerte (p-Werte) des Wald-Tests. Die Regressionskoeffizienten aller Kovariaten nähern sich Null. Bei ebenfalls nicht signifikanten p-Werten (Wald-Test) bestätigt sich die Annahme proportionaler Hazards für alle eingeschlossenen Kovariaten für OS, BCSS, DFS und DDFS

	<i>OS</i>		<i>BCSS</i>		<i>DFS</i>		<i>DDFS</i>	
	Regressionskoeffizient	<i>p</i>	Regressionskoeffizient	<i>p</i>	Regressionskoeffizient	<i>p</i>	Regressionskoeffizient	<i>p</i>
<i>DTC-Status</i>	-0,110	0,479	-0,040	0,567	0,002	0,342	0,002	0,469
<i>Alter</i>	-0,007	0,249	-0,008	0,292	-0,001	0,822	-0,003	0,335
<i>Grading</i>	$4,2 \cdot 10^{-4}$	0,853	$3,7 \cdot 10^{-4}$	0,875	0,001	0,805	-0,003	0,382
<i>Tumorgröße</i>	$-1,7 \cdot 10^{-4}$	0,656	$-1,4 \cdot 10^{-4}$	0,689	$-1,6 \cdot 10^{-4}$	0,627	$-4,4 \cdot 10^{-4}$	0,388
<i>Nodalstatus</i>	$3,8 \cdot 10^{-4}$	0,887	0,001	0,750	$-1,5 \cdot 10^{-4}$	0,945	-0,001	0,840
<i>IHC-Subtyp</i>	-0,011	0,195	-0,002	0,196	-0,002	0,160	-0,001	0,498

DTC disseminierte Tumorzellen, *IHC* immunhistochemisch, *OS* Gesamtüberleben, *BCSS* brustkrebspezifisches Überleben, *DFS* krankheitsfreies Überleben, *DDFS* metastasenfreies Überleben

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms mit klinisch-pathologischer Definition (nach [42])	11
Tabelle 2: Klassifikation zur semiquantitativen pathologischen Beurteilung der regressiven Veränderungen nach neoadjuvanter Chemotherapie nach Sinn et al. (nach [74])	15
Tabelle 3: Klinisch-pathologische Daten des gesamten Patientinnenkollektivs mit Angabe von Schichtenprozent.....	26
Tabelle 4: Einteilung der disseminierten Tumorzellen nach der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection [133].....	33
Tabelle 5: Überlebensanalysen und definierte Ereignisse	35
Tabelle 6: DTC-Status der therapie-naiven Patientinnen aus dem Gesamtkollektiv.....	37
Tabelle 7: Alter und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests	38
Tabelle 8: Menopausenstatus und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests.....	39
Tabelle 9: Histologische Klassifizierung nach WHO und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests	39
Tabelle 10: Tumorgroße und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests.....	40
Tabelle 11: Nodalstatus und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests.....	40
Tabelle 12: Grading nach Elston und Ellis und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests.....	41
Tabelle 13: Ki-67-Proliferationsindex und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests.....	41

Tabelle 14: ER-Status und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests.....	42
Tabelle 15: PR-Status und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests.....	42
Tabelle 16: HER2-Status und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests.....	43
Tabelle 17: Immunhistochemischer Subtyp und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des Chi-Quadrat-Tests.....	43
Tabelle 18: Anzahl der Rezidive und Sterbefälle im Kollektiv	44
Tabelle 19: Rezidierte Patientinnen (n = 14) und Lokalisationen der Lokal- und Fernrezidive mit absoluter und relativer Häufigkeit der Lokalisation unter allen Rezidivfällen.....	45
Tabelle 20: Ergebnisse der univariablen Cox-Regression des DTC-Status für das Gesamtüberleben (OS) und das brustkrebsspezifische Überleben (BCSS). Angegeben sind Hazard Ratios (HR), 95%-Konfidenzintervalle (KI) und der Signifikanzwert des Wald-Tests (p).....	49
Tabelle 21: Ergebnisse der univariablen Cox-Regression des DTC-Status für das krankheitsfreie Überleben (DFS) und das Metastasenfreie Überleben (DDFS). Angegeben sind Hazard Ratios (HR), 95%-Konfidenzintervalle (KI) und der Signifikanzwert des Wald-Tests (p).....	53
Tabelle 22: Immunhistochemischer Subtyp, DTC-Status und Sterbefälle im Patientinnenkollektiv mit Signifikanz (p) des log-rank Tests	54
Tabelle 23: Immunhistochemischer Subtyp, DTC-Status und brustkrebsspezifische Todesfälle im Patientinnenkollektiv mit Signifikanz (p) des log-rank Tests.....	54
Tabelle 24: Immunhistochemischer Subtyp, DTC-Status und Rezidive im Patientinnenkollektiv mit Signifikanz (p) des log-rank Tests	55
Tabelle 25: Immunhistochemischer Subtyp, DTC-Status und Fernmetastasierung im Patientinnenkollektiv mit Signifikanz (p) des log-rank Tests	55

Tabelle 26: Univariable und multivariable Analyse (Cox-PH-Regression) des Gesamtüberlebens mit Hazard Ratio, 95%-Konfidenzintervall und Signifikanz des Wald-Tests (p).....	57
Tabelle 27: Univariable und multivariable Analyse (Cox-PH-Regression) des brustkrebspezifischen Überlebens mit Hazard Ratio, 95%-Konfidenzintervall und Signifikanz des Wald-Tests (p).	58
Tabelle 28: Univariable und multivariable Analyse (Cox-PH-Regression) des krankheitsfreien Überlebens mit Hazard Ratio, 95%-Konfidenzintervall und Signifikanz des Wald-Tests (p).	59
Tabelle 29: Univariable und multivariable Analyse (Cox-PH-Regression) des fernmetastasenfreien Überlebens mit Hazard Ratio, 95%-Konfidenzintervall und Signifikanz des Wald-Tests (p).	60
Tabelle 30: Ergebnisse der univariablen Cox-Regression der Bisphosphonat-Therapie unter postmenopausalen Patientinnen (n = 134) für das Gesamtüberleben (OS), das brustkrebspezifische Überleben (BCSS), das krankheitsfreie Überleben (DFS) und metastasenfrie Überleben (DDFS). Angegeben sind Hazard Ratios (HR), 95%-Konfidenzintervalle (KI) und der Signifikanzwert des Wald-Tests (p).....	61
Tabelle 31: DTC-Positivität von Patientinnen (n = 46) und pathologische Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie.....	62
Tabelle 32: DTC-Status von Patientinnen (n = 12) prä- und postneoadjuvant	62
Tabelle 33: Klinisch-pathologische Parameter der DCIS-Patientinnen, DTC-Detektionsraten sowie Signifikanzniveau (p) des exakten Tests nach Fisher	63
Tabelle 34: DCIS und invasive Karzinome (T1-T4) therapienaiver Patientinnen und DTC-Nachweis im Knochenmark mit Signifikanzwert (p) des exakten Tests nach Fisher	64
Tabelle 35: Studien zur DTC-Detektion und prognostischer Bedeutung unter immunhistochemischen Subtypen des nicht-metastasierten Mammakarzinoms.	77
Tabelle 36: Ergebnisse des Tests auf proportionale Hazards der Kovariaten. Angegeben sind Regressionskoeffizienten und Signifikanzwerte (p-Werte) des Wald-Tests. Die Regressionskoeffizienten aller Kovariaten nähern sich Null. Bei ebenfalls nicht	

signifikanten p-Werten (Wald-Test) bestätigt sich die Annahme proportionaler Hazards für alle eingeschlossenen Kovariaten für OS, BCSS, DFS und DDFS.....99

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die metastatische Kaskade. Hämatogene Metastasierung entsteht durch die Abfolge mehrerer Schritte, in denen die Dissemination maligner Zellen vom Primärtumor bis in entfernte Gewebe und Organe begünstigt wird. Jeder Schritt wird durch die Neuaneignung zellulärer Funktionen eingeleitet (schwarze Pfeile). Disseminierte Tumorzelle in Rot. *EMT* Epithelial-mesenchymale Transition, *MET* Mesenchymal-epitheliale Transition. Modifiziert nach [109].....20

Abbildung 2: Flussdiagramm zu klinischem Vorgehen und Untersuchungskollektiven mit Zeitpunkten der Knochenmarkpunktion zur Bestimmung des DTC-Status.28

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aufarbeitung des Knochenmarkspirates mittels Dichtekissen-zentrifugation. Eigene Darstellung.30

Abbildung 4: Immunfluoreszenz-Färbung des präparierten Knochenmarkspirates. Hintergrundfärbung der Nuklei mit DAPI (blau). Oberflächenantigen CD45 der Leukozyten angefärbt mit CD45-AK (grün). Epitheliales Zytokeratin einer disseminierten Tumorzelle angefärbt mit pan-Zytokeratin-Antikörper AE1/AE3 (rot). 20-fache Vergrößerung. Eigene Aufnahme.32

Abbildung 5: Absolute Häufigkeiten der im Knochenmarkspirat detektierten DTCs pro Patientin. Mittelwert = 5,5 Zellen; Median = 2,00 Zellen37

Abbildung 6: Relatives Gesamtüberleben der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 211 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle.....46

Abbildung 7: Gesamtüberleben dargestellt als kumulativer Anteil der verstorbenen Patientinnen innerhalb der DTC-positiven und DTC-negativen Gruppe im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 211 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle.....46

Abbildung 8: Relatives brustkrebsspezifisches Überleben der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 212 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle.....47

Abbildung 9: Brustkrebsspezifisches Überleben dargestellt als kumulativer Anteil der an Folgen des Mammakarzinoms verstorbenen Patientinnen innerhalb der DTC-positiven und DTC-negativen Gruppe im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 212 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle.....48

Abbildung 10: Relatives krankheitsfreies Überleben der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 204 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle.....50

Abbildung 11: Krankheitsfreies Überleben dargestellt als kumulativer Anteil der Patientinnen mit Rezidiv innerhalb der DTC-positiven und DTC-negativen Gruppe im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 204 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle50

Abbildung 12: Relatives Metastasenfreies Überleben der DTC-positiven und DTC-negativen Patientinnen im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 208 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle.....51

Abbildung 13: Metastasenfreies Überleben dargestellt als kumulativer Anteil der Patientinnen mit Fernmetastasierung innerhalb der DTC-positiven und DTC-negativen Gruppe im nachbeobachteten Kollektiv (218 Gesamtfälle, davon 208 zensiert). DTC disseminierte Tumorzellen, senkrechte Markierungen in den Kurven zensierte Fälle.....52