

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Tanja Fehm

**Phänotypische Charakterisierung hinsichtlich des
Androgenrezeptorstatus der disseminierten Tumorzellen im
Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Martina Piperek-Jäger

2026

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

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Irene Esposito

Meiner Familie

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Krawczyk N, Jaeger B, Piperek-Jäger M, Lopez-Cotarelo Rodriguez-Noriega C, Neubacher M, Banys-Paluchowski M, Meier-Stiegen F, Neubauer H, Niederacher D, Ruckhäberle E, Mohrmann S, Hoffmann J, Kaleta T, Esposito I, Fehm T. Determination of the androgen receptor status of disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. Arch Gynecol Obstet. 2024 Apr;309(4):1525-1533. doi: 10.1007/s00404-023-07225-z. Epub 2023 Oct 30. PMID: 37902839; PMCID: PMC10894135.

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau und stellt außerdem insbesondere ab dem Stadium der Metastasierung die häufigste onkologische Todesursache der Frau dar. Als Vorläufer von Metastasen gelten unter anderem disseminierte Tumorzellen (DTCs) im Knochenmark. Da ein Teil der Mammakarzinome Androgenrezeptor (AR) – positiv ist, beschäftigt sich die aktuelle Forschung auch mit Studien zur Wirksamkeit einer zielgerichteten antiandrogenen Therapie beim Mammakarzinom. Interessant in dem Kontext ist, ob eine solche Therapie potenziell auch gegen DTCs als Surrogatmarker einer späteren Metastasierung greifen würde. Ob und wie häufig DTCs bei Patienten mit frühem Mammakarzinom den AR exprimieren, wurde allerdings bisher nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Studie wurden mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Mehrfachfärbung Knochenmark (KM) - Proben von 77 Brustkrebspatienten auf das Vorhandensein von DTCs untersucht sowie deren AR-Status bestimmt und mit jenem des Primärtumors verglichen. Darüber hinaus erfolgte eine Analyse der klassischen klinisch-pathologischen Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten. im

Von den 26 Patienten, bei denen DTCs in Rahmen dieser Arbeit gefunden werden konnten, wiesen 10 Patienten (38,5 %) mindestens eine AR-positive DTC auf. Bei Patienten mit mehr als einer detektierten DTC konnten teilweise AR-positive und -negative DTCs detektiert werden. Der AR-Status des Primärtumors konnte bei 21 Patienten bestimmt werden, acht (38,1 %) der Primärtumore waren AR-negativ und 13 (61,9 %) der Primärtumore waren AR-positiv. Es zeigte sich zwischen dem AR-Status des Primärtumors sowie der DTCs kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,203$, exakter Test nach Fisher). Ebenso zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen AR-Status der DTCs und den klassischen klinisch-pathologischen Faktoren der in die Studie eingeschlossenen Patienten.

Insgesamt konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass DTCs einen AR exprimieren können und dieser nicht mit dem AR-Status des Primärtumors

korreliert. Mögliche klinische und therapeutische Konsequenzen müssen in weiteren Studien ermittelt werden.

Abstract

Breast cancer is one of the most common types of cancer in women and is also one of the most common causes of death in women especially from the stage of metastasis. Disseminated tumor cells (DTCs) in the bone marrow are one of the precursors of metastases. As some breast carcinomas are androgen receptor (AR) - positive, current research is also focusing on studies into the effectiveness of specific anti-androgen therapy in breast carcinoma. In this context it is of interest whether such a therapy would potentially affect DTCs as surrogate markers of later metastasis. However, whether and how frequently DTCs in patients with early breast cancer express the AR has not yet been investigated.

Using immunofluorescence multiple staining, bone marrow (BM) samples of 77 breast cancer patients were analyzed for the presence of DTCs and determination of the AR status. The AR status of the DTCs was compared with that of the primary tumor. In addition, classical clinical-pathological data of patients included in this study were analyzed.

DTCs could be found in 26 patients, 10 (38.5 %) of these DTC-positive patients had at least one AR-positive DTC in bone marrow. In patients with more than one detected DTC, AR-positive and negative DTCs could be detected partially. The AR status of the primary tumor could be determined in 21 patients. Among these, 8 (38.1 %) primary tumors were AR-negative, while 13 (61.9 %) were AR-positive. There was no significant correlation between the AR status of the primary tumor and the DTCs ($p=0.203$, Fisher's exact test). There was also no significant correlation between the AR status of the DTCs and the classic clinicopathological data of the patients included in this study.

Overall, this study shows that DTCs can express the AR and that the AR status of DTCs does not correlate with the AR status of the primary tumor. Possible clinical and therapeutic implications need to be investigated.

Abkürzungsverzeichnis

AGO *Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie*

AK *Antikörper*

AR *Androgenrezeptor*

CD45 *Cluster of Differentiation 45*

CDK4/6i *Cyklin-abhängige Kinase 4/6 -Inhibitoren*

CK *Zytokeratin, Zytokeratin*

CTC *Circulating tumor cell / Zirkulierende Tumorzelle*

DAPI *4',6-Diamidin-2-phenylindol*

DTC *Disseminated tumor cell/ Disseminierte Tumorzelle*

ER *Östrogenrezeptor*

FDA *Food and Drug Administration, Food and Drug Administration*

GnRH *Gonadotropin-Releasing-Hormon*

Her2 *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

HR *Hormonrezeptor*

IRS *Immunreaktiver Score*

ISH *In-situ-Hybridisierung*

KM *Knochenmark*

MRD *Minimale Tumorresterkrankung*

NST *No special type/ ohne spezifischen Typ*

PBS *Phosphatgepufferte Salzlösung/ phosphate-buffered saline*

PD-L1 *Programmed death-ligand 1*

PD-L2 *Programmed death-ligand 2*

PEG *Polyethylenglycol*

PR *Progesteronrezeptor*

SD *Standartabweichung*

SOP *Standard Operating Procedure/ Standardvorgehensweise*

TNBC *triple-negativer Brustkrebs*

UICC-Stadium *Stadieneinteilung nach der Union internationale contre le cancer/ Internationale Vereinigung gegen Krebs*

Z.n. *Zustand nach*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Prognose.....	1
1.1.2	Risikofaktoren.....	1
1.1.3	Histologie und Klassifizierung.....	2
1.1.4	Metastasierung	3
1.1.5	Therapie	3
1.2	Disseminierte Tumorzellen.....	5
1.2.1	Epidemiologie und Prognose.....	6
1.2.2	Nachweismethoden	7
1.2.3	Charakterisierung von DTCs	8
1.2.4	Disseminierte Tumorzellen als potenzielles Therapieziel	10
1.3	Der Androgen Rezeptor	10
1.3.1	Physiologische Funktion.....	10
1.3.2	Androgen Rezeptor beim Prostatakarzinom.....	11
1.3.3	Androgen Rezeptor beim Brustkrebs.....	12
1.4	Ziele der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Geräte	16
2.2	Verbrauchsmaterialien	17
2.3	Chemikalien	18
2.4	Primäre Antikörper	20
2.5	Sekundäre Antikörper	20
2.6	Isotypkontrolle	21
2.7	Positiv- und Negativkontrollen.....	21
2.8	Kulturmedium.....	21

2.9	Software.....	22
2.10	Probenherkunft & Ethikvotum	22
2.11	Gewinnung und Verarbeitung der KM-Aspirate.....	23
2.12	Auswahl eines Patientenkollektivs	25
2.13	Herstellung der Positiv- und Negativkontrollen	27
2.14	Nachweis von DTCs.....	29
2.14.1	Immunfluoreszenzfärbung.....	29
2.14.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	33
2.15	Bestimmung des AR-Status des Primärtumors.....	37
2.16	Datenanalyse	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs	39
3.2	Detektierte DTCs	42
3.2.1	Deskriptive Statistik	42
3.2.2	AR-Status	43
3.3	Korrelation des AR-Status der DTCs mit klinisch-pathologischen Parametern	45
3.4	AR-Status des Primärtumors	47
3.5	Korrelation des AR-Status der DTCs und des Primärtumors	47
4	Diskussion	49
4.1	Diskussion der Methoden.....	50
4.1.1	Patientenkollektiv.....	50
4.1.2	Detektion von DTCs	52
4.1.3	Immunhistochemische Färbung des Primärtumors	53
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	55
4.2.1	Detektierte DTCs	55
4.2.2	AR-Status der DTCs.....	56
4.2.3	AR-Status des Primärtumors.....	58
4.2.4	Korrelation des AR-Status der DTCs und des Primärtumors.....	58
4.3	Schlussfolgerung	61
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	62

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Prognose

Brustkrebs stellt mit jährlich etwa 74.000 neuerkrankten Frauen die häufigste Tumorerkrankung der Frau in Deutschland dar [1] und ist aktuell weltweit die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen [2]. Insgesamt ist durch die Therapiefortschritte eine deutliche Verbesserung der Überlebensraten der Erkrankten zu verzeichnen, die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen in Deutschland beträgt 88 % [1]. Hierbei ist jedoch eine Verschlechterung der Überlebensraten mit steigenden Tumorstadien zu beobachten. Patienten mit UICC-Stadium IV, welches Patienten mit Fernmetastasen beschreibt, haben mit einer relativen 5-Jahresüberlebensrate von 33 % die schlechteste Prognose [1, 3].

1.1.2 Risikofaktoren

Es gibt viele verschiedene Faktoren, die die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines Mammakarzinoms beeinflussen. Insbesondere gelten hormonelle Einflüsse, wie eine frühe Menarche und eine späte Menopause, begünstigend für das Auftreten dieser Erkrankung. Multiparität und Stillen senken hingegen das Krankheitsrisiko [1].

Auch genetische Faktoren können einen Einfluss auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit haben. Insbesondere haben Patienten mit einer Mutation des BRCA1- oder BRCA2- Gens ein deutlich erhöhtes Risiko im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken [1, 4, 5].

1.1.3 Histologie und Klassifizierung

Leitliniengemäß erfolgt bei Diagnosestellung eines Mammakarzinoms in der klinischen Praxis die Bestimmung des histologischen Subtyps, des histologischen Differenzierungsgrads, des Hormonrezeptor (HR) – und des Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (Her2) - Status sowie des Ki-67-Proliferations-Index. Die histologische Einteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation [6].

Histologisch können diverse Subtypen des Mammakarzinoms unterschieden werden. Mit einem Anteil von etwa 70 % stellt das invasive Karzinom ohne speziellen Typ (Invasive carcinoma of no special type, NST) den häufigsten Subtypen dar. Daneben werden 5 % bis 20 % der Mammakarzinome als invasiv-lobuläres Karzinom klassifiziert. Ferner gibt es viele weitere Subtypen, die jedoch deutlich seltener sind [7–9]. Es werden drei Differenzierungsgrade beim Mammakarzinom unterschieden (G1: gut-differenziert, G2: mäßig-differenziert und G3: schlecht-differenziert). Der Differenzierungsgrad resultiert aus einem Score, in den die Beurteilung der tubulären Strukturen, der Kernpolymorphie und der Mitoserate einfließen [6, 10, 11].

Daneben wird Brustkrebs nach der TNM-Klassifikation eingeteilt. Dieses System erfasst Informationen über die Ausdehnung des Primärtumors (T), sowie das Vorhandensein und die Ausdehnung von Lymphknoten (N) - und Fernmetastasen (M). Die Kategorisierung erfolgt in Rahmen einer Skaleneinteilung. Hierbei beschreibt 0, dass dieses Merkmal nicht nachgewiesen werden kann, steigende Werte hingegen beschreiben eine zunehmende Ausdehnung des Tumors in der jeweiligen Kategorie [3].

Gemäß den Leitlinien soll bei jedem Mammakarzinom immunhistochemisch der Östrogenrezeptor-Status (ER-Status) und der Progesteronrezeptor-Status (PR-Status) bestimmt werden. Der Her2-Status soll ebenfalls detektiert werden, dies kann immunhistochemisch oder mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung (ISH) geschehen. Falls die bisherigen Charakteristika nicht für eine klare Therapieentscheidung ausreichen, kann leitliniengemäß darüber hinaus beim HR-positiven, HER2-negativen Mammakarzinom die Verwendung eines Multigentests erfolgen [6].

1.1.4 Metastasierung

Bei 6 % der Patienten mit der Erstdiagnose eines Mammakarzinoms können bereits Fernmetastasen nachgewiesen werden [1]. Darüber hinaus werden bei 25 % der Patienten im weiteren Verlauf, auch noch 15 bis 20 Jahren nach der Erstdiagnose, Metastasen detektiert. Hierbei werden 13 % der Fernmetastasen erst nach 10 Jahren entdeckt [12].

Eine mögliche Erklärung für die späte Metastasierung bietet das Phänomen der Tumorzell dissemination. Bei diesen disseminierten Tumorzellen (DTC) geht man davon aus, dass sie sich für Jahre bis Jahrzehnte in einer Ruhephase befinden können, bevor sie anschließend zu Metastasen heranreifen [13]. Im Kapitel „1.2 Tumorzell dissemination“ wird im Rahmen dieser Arbeit näher auf dieses Thema eingegangen.

Bezüglich des Zeitpunktes der Metastasierung werden aktuell zwei Haupttheorien diskutiert. Zum einen die Möglichkeit einer späten Metastasierung, die erst bei einem entsprechend großen Tumor erfolgt, hier wird vom linearen Modell gesprochen. Dem gegenüber steht die Möglichkeit einer Streuung von Zellen zu Beginn der Erkrankung und ein darauffolgendes paralleles Wachstum von Primärtumor und Metastase, dies wird auch als Parallelmodell bezeichnet [14]. Für das Parallelmodell spricht unter anderem die Beobachtung, dass Zellen, die den Tumor früh verlassen metastasierungsfähiger sind als Zellen, die in späteren Stadien der Erkrankung in die Blutbahn gelangen [15, 16].

1.1.5 Therapie

Mammakarzinome ohne Fernmetastasen werden grundsätzlich kurativ behandelt. Hierbei wird abhängig vom Patientenalter, der Tumorgroße, der Tumorphistologie sowie dem HR- und dem HER2-Status des Tumors eine Kombination aus operativer, systemischen sowie Radiotherapie gewählt. Ab dem Stadium der Fernmetastasierung gilt das Mammakarzinom als unheilbar und wird in der Regel ab diesem Stadium palliativ behandelt [6, 17].

Da das Mammakarzinom schon in frühen Stadien als systemische Erkrankung verstanden werden kann, spielt hier insbesondere die systemische Therapie in Form von Chemo- und Hormontherapie sowie der Einsatz von Immun- und zielgerichteten Therapien eine Rolle [18, 19].

Die Chemotherapie besteht gewöhnlicherweise aus der Gabe eines Taxans und eines Anthrazyklins. Die Hormontherapie wird nur beim HR-positiven Mammakarzinom angewendet. Hierbei hat sich bei der prämenopausalen Therapie die Gabe von Tamoxifen und bei postmenopausalen Patienten die Gabe eines Aromatasehemmers etabliert. Ebenfalls abhängig vom Rezeptorstatus ist eine gegen den Her2-Rezeptor gerichtete Therapie mit dem Antikörper (AK) Trastuzumab +/- Pertuzumab bzw. dem Antikörper-Drug-Konjugat Trastuzumab-Emtansin (T-DM1) [6, 20].

Eine signifikante Reduktion der Knochenmetastasierung bei postmenopausalen Frauen in frühen Brustkrebsstadien sowie eine Reduktion der krebsspezifischen Mortalität in dieser Patientengruppe konnte in einer Metaanalyse von randomisiert kontrollierten Studien durch die Gabe von Bisphosphonaten gezeigt werden [21].

Daneben zeigte sich durch den zusätzlichen Einsatz einer Immuntherapie mit dem „programmed cell death-1 receptor“ (PD-1) - Antikörper Pembrolizumab in einer Phase-3 Studie bei Patienten frühem TNBC eine signifikante Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit [22]. Außerdem konnte hier ein von der PD-1-Expression unabhängiges pathologisches Ansprechen beobachtet werden [23]. Die Therapie mit jenen Antikörpern basiert auf der Erkenntnis, dass PD-1-Rezeptoren in der Lage sind die T-Zell vermittelte Immunantwort zu inhibieren [24]. Die Aktivierung des PD-1, und somit auch der Immunantwort, erfolgt durch Bindung vom Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) oder dem Programmed cell death ligand 2 (PD-L2) [25, 26]. Beim TNBC empfiehlt die Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO) die Gabe von Pembrolizumab zur (neo-)adjuvanten Chemotherapie ab cT2 oder bei Lymphknotenbefall [19].

Einen weiteren zielgerichteten Therapieansatz stellen die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP-) Inhibitoren bei BRCA-mutierten Tumoren dar [27–30]. Bei

HR-positiven, HER2-negativen Mammakarzinomen sowie beim TNBC mit einer Mutation des BRCA-Gens in der Keimbahn wird die Gabe vom PARP-Inhibitor Olaparib in der Hochrisikosituation empfohlen [19]. Darüber hinaus werden die PARP-Inhibitoren Olaparib und Talazoparib zur Therapie des metastasierten Her2-negativen Mammakarzinoms bei Patientinnen mit einer BRCA-Keimbahn Mutation empfohlen [19, 31, 32].

Ferner wird beim metastasierten bzw. Hochrisiko-frühem HR-positiven und Her2-negativen Mammakarzinom die Gabe von Cyklin-abhängigen Kinase 4/6-Inhibitoren (CDK4/6i) empfohlen. Außerdem spielt die Behandlung mit Lapatinib und Neratinib beim Her2-positiven Mammakarzinom sowie die Behandlung mit Angiogenese-Hemmer Bevacizumab beim metastasierten Mammakarzinom eine Rolle [19]. Daneben haben Antikörper-Drug-Konjugate einen zunehmenden Stellenwert bei der Behandlung einiger Mammakarzinomsubgruppen. Beispielsweise ist das Antikörper Drug-Konjugat Sacitutumab Govitecan bei Patienten mit inoperablem oder metastasiertem TNBC bzw. inoperablem oder metastasiertem Her2-negativem und HR-positiven Mammakarzinom nach vorausgegangenen systemischen Therapien zugelassen [33, 34]. Darüber hinaus zeigten Phase-III-Studien beim metastasierten Her2-positiven Mammakarzinom ein erniedrigtes Risiko einer Tumorprogression und ein geringeres Sterberisiko bzw. beim Her2-low Mammakarzinom ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben durch das Antikörper-Drug-Konjugat Trastuzumab-Deruxtecan [35, 36]. Das Medikament ist für gewisse vorbehandelte Patienten mit Her2-positiven oder Her2-low Brustkrebs in der inoperablen oder metastasierten Situation zugelassen [37, 38]. Her2-low Brustkrebs bezeichnet hierbei Mammakarzinome mit einer geringen Her2-Expression, die bisher als Her2-negativ definiert worden wären [39].

1.2 Disseminierte Tumorzellen

DTCs sind vom Primärtumor ausgehende isolierte Zellen, die im Knochenmark (KM) nachgewiesen werden können und zum Teil das Potenzial besitzen als

Minimale Tumorresterkrankung (MRD) auch noch nach einer Ruhephase von bis zu Jahrzehnten zu Metastasen zu werden [13, 40, 41].

Neben den DTCs, die im KM nachgewiesen werden können, gehören auch zirkulierende Tumorzellen (CTCs) zur minimalen Resterkrankung. CTCs sind dabei vom Primärtumor ausgehende Zellen, die im Blut detektiert werden können [42].

1.2.1 Epidemiologie und Prognose

DTCs können bei 26 % bis 32 % aller primären Brustkrebspatienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nachgewiesen werden [43–46]. Daneben sind auch bei einem Teil der Patienten nach einer abgeschlossenen Chemotherapie DTZs im KM nachweisbar [47, 48].

Als MRD können DTCs auch noch nach einer Ruhephase von bis zu Jahrzehnten zu Metastasen werden [13, 40, 41]. Ihr Nachweis ist mit einer erhöhten lokalen Tumorlast und einer aggressiveren Tumorbilogie assoziiert, dies zeigt sich in einer erhöhten Rate von ER- und PR-negativen und Her2-positiven Tumoren sowie einem höheren Tumorgrad jener [46]. Außerdem stellt das Vorhandensein von DTCs einen unabhängigen prognostischen Marker beim Mammakarzinom dar. Demnach erlebten primäre Brustkrebspatienten mit DTCs zum Zeitpunkt der Erstdiagnose häufiger Rezidive und haben ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben [43–46, 49]. Gleichzeitig haben Patienten mit nach Abschluss einer adjuvanten Chemotherapie nachgewiesenen DTCs, den sog. persistierenden DTCs, ein höheres Risiko, einen Rückfall zu erleiden [48]. Ebenfalls zeigen Patienten mit nachweisbaren DTCs nach neoadjuvanter Therapie ein schlechteres Gesamtüberleben [47]. Interessanterweise konnte bei Patienten mit persistierenden DTCs, die nach einer erneuten Chemotherapie DTC-negativ geworden sind, ein Überlebensvorteil gezeigt werden [50]. Als Surrogatmarker der MRD stellen DTCs also ein potenzielles Therapieziel dar, da ihre Eradikation möglicherweise den Prozess der Metastasierung verhindern kann [51].

Daneben gibt es auch DTCs bei Patienten mit Carcinoma in situ [52, 53], obwohl das Carcinoma in situ als nicht-invasives Stadium, beim dem die Tumorzellen ihren Ursprungsort nicht verlassen, gilt [54]. Inwieweit DTCs bei dieser Patientensubgruppe klinisch relevant sind, ist aktuell unklar [52].

1.2.2 Nachweismethoden

Es gibt verschiedene Nachweisarten von DTCs im KM. So können DTCs mit Hilfe von Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz mittels AK detektiert werden. Alternativ gibt es molekulare Methoden, die auf dem Nachweis von Nukleinsäuren basieren [55–57].

Bei der Immunfluoreszenz binden spezifische AK an ein gewünschtes Merkmal einer Zelle, welches als Oberflächenantigen einer Zelle exprimiert wird und dann als Epitop bezeichnet wird. Diese AK sind bei der direkten Immunfluoreszenz direkt an ein Fluorochrom gebunden. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet ein AK, an das ein Fluorochrom gebunden ist, an den primären AK. Dieser sekundäre AK ist dabei gegen die Spezies des primären AK gerichtet [58, 59]. Fluorochrome sind in der Lage kurzwelliges Licht zu absorbieren und dadurch gleichzeitig langwelliges Licht zu emittieren, was je nach emittierter Wellenlänge Sichtbarkeit des Fluorochroms und der damit markierten Struktur beispielsweise unter einem Fluoreszenzmikroskop zur Folge hat [59]. Bei der Immunhistochemie wird zur Visualisierung der AK kein Fluorochrom verwendet, sondern andere Marker [60].

Der antikörperbasierte Nachweis von DTCs im KM von Brustkrebspatienten im Rahmen der Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz beruht meist auf dem Nachweis epithelialer Zellen im KM [46, 61]. Dieser erfolgt durch die Färbung von epithelialen Oberflächenmarkern, wie verschiedenen Zytokeratinen (CK), die das epitheliale CK-Gerüst der DTCs darstellen [57]. Bereits im Jahr 2001 beschreibt Gebauer et. al, dass epitheliale Zellen im Knochenmark mit einem schlechten klinischen Ergebnis bei Brustkrebspatienten verbunden sind [62].

Zur Vereinheitlichung des immunhistochemischen Nachweises von DTC beim Mamakarzinom wurde im Jahr 2006 ein Konsenspapier verfasst. Hiernach soll zunächst die Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe des Ficoll-Gradienten zur Anreicherung von mononuklearen Zellen erfolgen. Der Nachweis von DTCs aus diesen Zellen soll anschließend mit einer AK-basierten Färbung von CK geschehen, empfohlen wird hierbei zum Nachweis von CK die Verwendung der Anti-CK-AK A45-B/B3 oder AE1/AE3 [57]. Neben dem Nachweis von CK-positiven Zellen gibt es einige Kriterien zur Bewertung der Morphologie der Zellen, die eingehalten werden sollten. Beispielsweise gelten Zellcluster, große oder atypische Zellkerne, die zumindest partiell von der CK-Färbung bedeckt werden, und CK-Filamente als morphologisch typische Zeichen von DTCs [57, 63, 64]. Um Leukozyten bzw. kernhaltige Zellen des hämatopoetischen (blutbildenden) Systems nicht mit DTCs zu verwechseln hat sich zusätzlich die Anwendung von CD45 (Cluster of Differentiation 45) etabliert, das von allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und bei einer DTC nicht nachweisbar ist [65–67].

Für die Detektion von CTCs ist das auf dem epithelialen Adhäsionsmolekül EpCAM basierende CellSearch®-System durch die Food and Drug Administration (FDA) zugelassen und wurde bereits in einzelnen Studien zur Detektion von DTCs verwendet [68, 69].

1.2.3 Charakterisierung von DTCs

Die Charakterisierung der DTC dient zum einen der Erforschung des Ursprungs dieser Zellen [70] und zum anderen der weiteren Identifizierung mit dem möglichen Ziel ggf. eine zielgerichtete Therapie gegen DTC etablieren zu können [71–73]. Hierzu werden sowohl genotypische als auch phänotypische Charakterisierungsmethoden vorgenommen [70–72, 74–76].

Genetische Analysen zeigen, dass ein Teil, der als DTCs bezeichneten Zellen im KM tatsächlich aus dem Primärtumor stammen, ein anderer Teil der CK-positiven Zellen jedoch unbekannten Ursprungs ist [70].

Einige Charakterisierungen liefern mögliche Erklärungsansätze für das Versagen der systemischen Therapie beim Mammakarzinom [73, 75, 76]. So können sich wichtige therapeutische Zielmoleküle zwischen Primärtumor und DTCs unterscheiden. Es zeigen sich beispielsweise Diskrepanzen bei der Expression des Her2-Rezeptors und des ER [72, 74]. Da sich die zielgerichtete Therapie des frühen Mammakarzinoms nach dem Phänotyp des Primärtumors richtet, können somit die DTCs mit divergentem Phänotyp dieser Therapie entgehen. Andererseits resultieren aus diesen Diskrepanzen möglicherweise therapeutische Konsequenzen im metastasierten Setting. So konnte bereits in der prospektiv randomisierten DETECT III- Studie demonstriert werden, dass bei Patienten mit Her2-negativem Primärtumor und Her2-positiven CTCs ein Benefit im Gesamtüberleben durch eine zusätzliche gegen den Her2 gerichtete Therapie mit Lapatinib erzielt werden kann [77].

Darüber hinaus können DTCs einen Stammzellcharakter haben. Dies führt folglich zu einem Vorherrschen von Krebsstammzellen im KM, was wiederum ein möglicher Erklärungsansatz für eine nicht hinreichenden Wirkung von Chemotherapien ist [75].

Daneben gibt es Hinweise, die auf eine sogenannten Tumorruhe (Dormancy) von DTCs rückschließen lassen. Die Tumorruhe beschreibt dabei eine mögliche Ruhephase von DTCs, in welcher diese sich nicht teilen und in ihrer Umgebung, also beispielsweise dem KM, verharren bis sie - auch noch mit großer zeitlicher Latenz - aktiviert werden und ggf. zur Metastase werden können [13, 78]. Folglich bietet die fehlende Proliferation der DTCs während der Tumorruhe einen Erklärungsansatz für die fehlende Wirkung einer Chemotherapie gegen DTCs [79, 80]. Fbxw7 gilt als Tumorsuppressor, der unter anderem über eine Deaktivierung verschiedener Onkogene zu einer geringeren Zellteilungsrate führt [81–84]. Mammakarzinome, bei denen Fbxw7 gehemmt wurde, zeigen eine erhöhte Proliferation [85]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es durch eine genetische Ausschaltung von Fbxw7 und daraus folgender Beendigung der Tumorruhe zu einem deutlich besseren Ansprechen einer Chemotherapie gegen DTCs kommt [73].

1.2.4 Disseminierte Tumorzellen als potenzielles Therapieziel

Einige Interventionsstudien beschäftigen sich bereits mit Therapien, die CTCs im Rahmen der Brustkrebstherapie mit einbeziehen [86]. Die DETECT III -Studie zeigte bei Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom, dass eine Einbeziehung von CTCs in die Therapieentscheidung zu einem verbesserten Gesamtüberleben führen könnte [77]. Hierauf wurde bereits im vorangegangenen Abschnitt dieser Arbeit („1.2.3 Charakterisierung von DTCs“) näher eingegangen.

Im Rahmen der Untersuchung von DTCs konnte gezeigt werden, dass eine systemische gegen den Her2-Rezeptor gerichtete Therapie Her2-positive DTCs aus dem Knochenmark erfolgreich eradiziert [87, 88].

Ebenfalls bewirkte der Einsatz von Bisphosphonaten in einigen Studien eine DTC-Eradikation [89, 90], sowie langfristig die Verhinderung von Metastasen [91, 92]. Dies könnte die von Diel et al. in einer Langzeituntersuchung beobachtete Verlängerung des Gesamtüberlebens durch die Gabe des Bisphosphonats Clodronat bei Patienten mit DTCs erklären [93].

1.3 Der Androgen Rezeptor

1.3.1 Physiologische Funktion

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein Steroidhormonrezeptor, der sowohl bei Männern als auch bei Frauen exprimiert wird [94, 95]. Der AR kann in vielen Organen, beispielsweise der Prostata, dem Gehirn, hier insbesondere dem Hippocampus, und der Skelettmuskulatur, nachgewiesen werden [95–97].

Die Liganden des AR sind die Androgene Testosteron und Dihydrotestosteron, wobei das Dihydrotestosteron über eine höhere Affinität zum AR verfügt [98]. Androgene werden insbesondere in der Nebennierenrinde, sowie bei Männern in den Hoden und bei Frauen in den Ovarien gebildet [99–101] und bewirken beim Säugetier die Entwicklung eines männlichen Phänotyps [102, 103].

1.3.2 Androgen Rezeptor beim Prostatakarzinom

Nahezu alle Prostatakarzinome exprimieren einen AR, dies gilt auch für Prostatakarzinome, die nicht mehr auf eine antiandrogene Therapie ansprechen [104–106]. Aus diesem Grund hat die Bestimmung des AR beim Prostatakarzinom eine Bedeutung bei differentialdiagnostischen Überlegungen. Mit Hilfe des AR kann ein Prostatakarzinom beispielsweise von infiltrativ wachsenden Harnblasenkarzinomen unterschieden werden. Außerdem werden AR-positive Tumore in der Prostata, die anhand anderer Merkmale nicht eindeutig eingeordnet werden können, als Prostatakarzinom klassifiziert [107].

Auch in der Therapie des Prostatakarzinoms hat der AR einen besonderen Stellenwert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Wachstum von primären Prostatakarzinomen abhängig von Androgenen ist. Durch einen Entzug von Androgenen, der ursprünglich durch eine chirurgische Kastration erfolgte, kommt es zu einer Rückbildung dieses Karzinoms [108, 109].

Medikamentös kann man die Ausschüttung von Androgenen sowohl mit einem Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) - Analogon als auch mit einem GnRH-Antagonist verhindern. Diese Wirkung erfolgt über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse [110, 111]. Daneben gibt es AR-Blocker, die direkt am AR antiandrogen wirken [112].

Gemäß den Leitlinien zur Therapie des Prostatakarzinoms gibt es einige Patientengruppen, bei denen standardmäßig eine antiandrogene Therapie mit einem GnRH-Analogon oder einem GnRH-Antagonisten (z.B. Abarelix oder Degarelix) ggf. in Kombination mit einem AR-Blocker (z.B. Apalutamid oder Enzalutamid) empfohlen wird. Diese Empfehlung gilt beispielsweise für alle metastasierten Prostatakarzinome, solange diese hormonsensitiv sind [113]. Viele Prostatakarzinome reagieren irgendwann nicht mehr auf eine hormonablativ Therapie, weil der Tumor im Verlauf der Erkrankung aufgrund diverser Resistenzmechanismen nicht mehr hormonsensitiv ist. Ab diesem Zeitpunkt muss auf andere Therapieansätze zurückgegriffen werden [113, 114].

Typische Nebenwirkungen im Rahmen der antiandrogenen Therapiemethoden sind beispielsweise eine Gynäkomastie, eine Verminderung der Muskelmasse sowie ein Libidoverlust [115].

1.3.3 Androgen Rezeptor beim Brustkrebs

Eine routinemäßige Bestimmung des AR erfolgt beim Brustkrebs nicht [6]. In Studien konnte jedoch eine Expression des AR in 60 % bis 78 % aller frühen Mammakarzinome gezeigt werden [116, 117].

Die Häufigkeit der AR-Expression scheint stark vom molekularen Subtypen des Mammakarzinoms abhängig zu sein [116]. Insbesondere weisen ER-positive Mammakarzinome häufiger eine AR-Expression auf als ER-negative Mammakarzinome. So zeigte die Studie von Vera-Badillo et al. eine AR-Positivität bei 74,8 % der ER-positiven Mammakarzinome, gegenüber einer AR-Positivität von 31,8 % beim ER-negativen Subtyp [117]. Eine Metaanalyse mit 4703 TNBC-Patienten zeigte eine AR-Expression in 27,96 % der Fälle [118].

Die prognostische Bedeutung des AR-Status beim Mammakarzinom wurde in zahlreichen Studien mit zum Teil diskordanten Ergebnissen untersucht. Hierbei unterscheiden sich die prognostischen Aussagen jedoch abhängig von den Studien auch innerhalb einzelner Subtypen. So zeigte eine Metaanalyse, dass eine positive AR-Expression bei ER-positiven Patienten signifikant mit einem verbesserten krankheitsfreien Überleben und einem verbesserten Gesamtüberleben verbunden ist [119]. Beachtenswert ist jedoch, dass der AR/ER-Verhältnis hierbei eine Rolle spielt und ein AR/ER-Verhältnis von zwei oder mehr wiederum mit einer verschlechterten Prognose einherzugehen scheint [120]. Außerdem senken in ER-positiven Brustkrebszellen Östrogene die proliferative Aktivität einiger Androgene [121]. In präklinischen Modellen führt eine AR-Aktivierung bei ER-positiven Patienten zu einer Antitumoraktivität und AR-Agonisten führten in Kombination mit Standardtherapeutika zu einer Verstärkung des therapeutischen Ansprechens [122].

Bei Patienten mit ER-negativen Tumoren hingegen, ist die AR-Positivität mit einer schlechteren Prognose verbunden [121]. Gleichzeitig konnten bei einer Her2-positiven und ER-negativen Zelllinie durch eine antiandrogene Behandlung in Kombination mit einem Her2-Inhibitor synergistische proapoptotische Effekte beobachtet werden [123]. Auch AR-positive TNBC-Zellen scheinen durch Androgene in ihrer Invasivität gefördert zu werden [124]. In einigen Subgruppen von TNBC-Zellen bewirkt eine AR-Hemmung unter anderem eine signifikante Reduktion der Migration und Invasion sowie eine Erhöhung der Apoptose. In vivo konnte darüber hinaus eine verringerte Lebensfähigkeit AR-positiver TNBC-Zellen durch eine AR-Hemmung erreicht werden [125]. Gleichzeitig ist dabei aber die Studienlage zur Prognose von AR-positiven TNBC uneinheitlich [118, 119, 126].

Zusammengefasst scheint der AR in allen Subgruppen des Mammakarzinoms eine prognostische und prädiktive Rolle zu spielen, sodass eine antiandrogene Therapie beim Mammakarzinom einen potenziellen Stellenwert bekommen könnte. Folglich gibt es zahlreiche Studien, die den Einsatz einer androgendeprivierenden Therapie beim Mammakarzinom untersuchen. Eine beispielhafte tabellarische Zusammenstellung entsprechender stichprobenartig ausgesuchter Phase II- und Phase III - Studien befindet auf der folgenden Seite (s. Tabelle 1).

Neben der Expression des AR auf dem Primärtumor, wurde auch die AR-Expression auf CTCs untersucht. Bei Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom konnte abhängig von der Studie eine AR-Expression von 31 % bis 40,5 % der CTCs gezeigt werden [127, 128]. Gleichzeitig kann aber der AR-Status der CTCs sich von dem AR-Status des Primärtumors unterscheiden [128]. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um die Eignung von AR-positiven CTCs als prädiktiven Biomarker zu evaluieren [127].

Tabelle 1: Strichprobenartige Zusammenstellung von Phase II - und Phase III - Studien, die den Einsatz einer antiandrogenen Therapie beim Mammakarzinom untersuchen

Studien-nummer	Phase	Wirkstoff	Einschlusskriterien	Primärer Endpunkt	Sekundärer Endpunkt
NCT06099769	Phase II	Enzalutamid allein vs. mit Mifepriston vs. Chemotherapie	AR +/- TN ABC	PFS nach 2 Jahren	/ [129]
NCT02091960	Phase II	Enzalutamid mit Trastuzumab	Her2+/ AR + ABC	CBR nach 24 Wochen: 24%	PFS und Sicherheit [130]
NCT03090165	Phase I/II	Bicalutamid und Ribociclib	AR +/- TN mBC/ unresezierbar	CBR nach 16 Wochen	PFS, ORR, OS, Ansprechzeit, Sicherheit/Verträglichkeit
NCT03055312	Phase III	Bicalutamid vs. Standard-Chemotherapie	AR +/- TN mBC	CBR nach 24 Wochen	PFS
NCT04869943	Phase III	Enobosarm vs, zielgerichtete ER-Therapie	AR+ / ER + mBC	Medianer rPFS	ORR
NCT02368691	Phase II	Enobosarm mit Pembrolizumab	AR+/- TN mBC	ORS: 13%	PFS, OS, Toxizität [131]

AR+: Androgenrezeptor positiv, ABC: Fortgeschrittenes oder metastasiertes Mammakarzinom, Her2 +: HER2-positiv, HR+: Hormonrezeptor positiv, mBC: Metastasierter Mamma-Ca, ORR: Beste objektive Ansprechrate, ORS: Gesamtansprechrate, OS: Gesamtüberleben, PFS: progressionsfreies Überleben, rPFS: röntgenographisch progressionsfreies Überleben TN: Triple negativ)

1.4 Ziele der Arbeit

Der Nachweis von DTCs ist mit einer signifikanten Verschlechterung der Prognose von Mammakarzinompatienten verbunden [43–45, 49]. Diese Zellen gelten als Surrogatmarker der minimal residualen Krebserkrankung und somit als ein potenzielles Ziel systemischer Therapien. Folglich ist langfristig das Etablieren effektiver gegen DTCs gerichteter Therapien, wie sie bei CTCs bereits in einigen Studien getestet wurden [77, 86], ein wichtiges Ziel. Hierbei ist nicht nur der DTC-Nachweis, sondern auch die Geno- und Phänotypisierung dieser Zellen bezüglich der potenziellen Therapietargets von entscheidender Bedeutung.

Die Deprivation des AR stellt im Rahmen der Therapie des Prostatakarzinoms eine etablierte Therapiemethode dar [113] und wird als neues Therapieziel beim Mammakarzinom zunehmend erforscht [132–134]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des AR auf DTC bestimmt und mit dem AR-Status des Primärtumors verglichen.

Folgende Ziele sollten im Rahmen dieser Arbeit erreicht werden:

1. Phänotypische Charakterisierung des AR-Status von DTCs im KM von Patienten mit Mammakarzinom mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Mehrfachfärbung
2. Immunhistochemische Ermittlung des AR-Status des Primärtumors und Vergleich des AR-Status der DTCs mit dem Primärtumor
3. Vergleich des AR-Status von DTCs mit den klassischen klinisch-pathologischen Faktoren, der in die Studie eingeschlossenen Patienten und deskriptive Analyse

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte

Produkt	Hersteller, Ort
Eindeckautomat	Sakura Finetek GmbH, Staufen Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging mit Mikroskopkamera Axiocam 503	Zeiss, Jena
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen
Pipette (0,1-10µl, 10- 100µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer accu- jet® pro	Brand, Wertheim
Tischzentrifuge Rotofix 32A	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Universalzentrifuge Heraeus™ Megafuge™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Schlittenmikrotom HM400	Microm, Deutschland

Vollautomatisiertes Färbegerät VENTANA BenchMark ULTRA	Ventana Medical Systems (Roche), Oro Valley, Arizona, USA
Vortex REAX 2000	Heidolph instruments, Schwabach
Mikroskopkamera Axiocam 503 mono	Zeiss, Jena

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller, Ort
Deckgläser	Engelbrecht, Edermünde
Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen Cellstar® (50mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshof
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Stripette (10mL, 20mL)	Corning, New York, USA
Zellkulturflasche t75	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

2.3 Chemikalien

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Produkt	Hersteller, Ort
Antibody Diluent	Dako, Carpinteria, USA
Bluing Reagent	Ventana Medical Systems (Roche), Oro Valley, Arizona, USA
Cell Save	Janssen Diagnostics New Jersey, USA
Dako Wash Buffer 10x	Dako, Glostrup, Dänemark
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Erythrozyten-Lyse-Puffer 55 mM NH ₄ Cl 10 mM KHC03 0.1 mM EDTA	Zentralapotheke der Uniklinik Düsseldorf, Deutschland
Ez Prep Konzentrat	Ventana Medical Systems (Roche), Oro Valley, Arizona, USA
Ficoll	Biochrom, Berlin, Deutschland

Fluorescence Mounting Medium	Dako, Carpinteria, USA
Formaldehyd 4%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin	Ventana Medical Systems (Roche), Oro Valley, Arizona, USA
Isopropanol & Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Optiview dab detecion kit	Ventana Medical Systems (Roche), Oro Valley, Arizona, USA
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung/ <i>phosphate-buffered saline</i>)	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Protein Block, Serum-Free	Dako, Carpinteria, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ultra CC1 Puffer	Ventana Medical Systems (Roche), Oro Valley, Arizona, USA
Zelldissoziationspuffer	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.4 Primäre Antikörper

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten primären Antikörper

Antikörper	Spezies	Produkt	Hersteller, Ort
Anti-CD 45	Maus	CD45 35-Z6 Alexa Fluor 647	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
AR	Kaninchen	AR-AK (D6F11) # 5153	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
AR	Maus	AR AK F39.4.1	Biogenex, Fremont, USA
Zytokeratin	Maus	CK TRITC (AE1/3 & C11) Code: CKALLRMB000S	Aczon, Bologna, Italien

(AR Androgenrezeptor, AK: CD45: Cluster of Differentiation 45)

2.5 Sekundäre Antikörper

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller, Ort
Anti-Kaninchen AF 488 IgG	Esel	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA

2.6 Isotypkontrolle

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Isotypkontrolle

Isotyp	Spezies	Produkt	Hersteller, Ort
IgG	Kaninchen	DA1E	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

2.7 Positiv- und Negativkontrollen

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Kontrollzelllinien

Produkt	Herkunft
Du145	Gehirnmetastase eines Prostatakarzinoms [135]
LnCap	Metastase eines Prostatakarzinoms [136]

2.8 Kulturmedium

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Kulturmedien

Produkt	Herkunft
RPMI Medium mit L-Glutamin + fetales Kälberserum + Penicillin/ Streptomycin	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.9 Software

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software

Produkt	Hersteller, Ort
Citavi	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Excel	Microsoft, Redmond, USA
ImageJ	Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
SPSS, Version 29	IBM Corporation, Armonk, USA
Word 365	Microsoft, Redmond (USA)

2.10 Probenherkunft & Ethikvotum

Die in dieser Arbeit zu charakterisierenden KM-Proben und Primärtumoren wurden von Brustkrebspatienten entnommen, die einer Aufbewahrung der Proben im Rahmen einer Biodatenbank sowie der weiteren Verwendung für Forschungszwecke zugestimmt haben. Das für dieses Forschungsvorhaben benötigte Ethikvotum wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität unter der Aktennummer 2018-56-FmB erteilt.

2.11 Gewinnung und Verarbeitung der KM-Aspirate

Alle KM-Aspirate wurden von Mammakarzinompatienten, die in den Jahren 2014 bis 2019 an der Klinik Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Uniklinik Düsseldorf behandelt wurden, nach deren Einverständnis entnommen. Die KMP erfolgte stets intraoperativ. Das KM-Aspirat wurde anschließend von Mitarbeitern der Forschungslabore der Frauenklinik Düsseldorf, wie im Folgenden beschrieben, aufgearbeitet und bei -21°C aufbewahrt.

Die Bearbeitung der KM-Aspirate erfolgte dabei nach einer standardisierten Vorgehensweise (SOP) der Forschungslabore der Frauenklinik mittels Dichtezentrifugation über den Ficoll-Gradienten und anschließender Überführung von jeweils $1,5 \times 10^6$ mononukleare Zellen auf einen Objektträger mittels Zellzählernmittlung in der Neubauer-Kammer. Diese Objektträger wurden dann bei -21°C bis zur Färbung gelagert. Die hierbei vollzogenen einzelnen Arbeitsschritte sind in Abbildung 1 und Abbildung 2 zu entnehmen.

Routinemäßig wurden jeweils zwei der so hergestellten Objektträger von den Mitarbeitern der Forschungslabore der Frauenklinik Düsseldorf mittels einer Immunfluoreszenz-Mehrfach-Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), CK und CD45 gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch auf das Vorhandensein von DTCs untersucht. Die darüber hinaus übrigbleibenden Objektträger wurden bei -21°C im Rahmen einer Biodatenbank für weitere Forschungszwecke aufbewahrt. Die im Rahmen dieser Arbeit zur AR-Bestimmung verwendeten Proben entstammten dieser Biodatenbank.

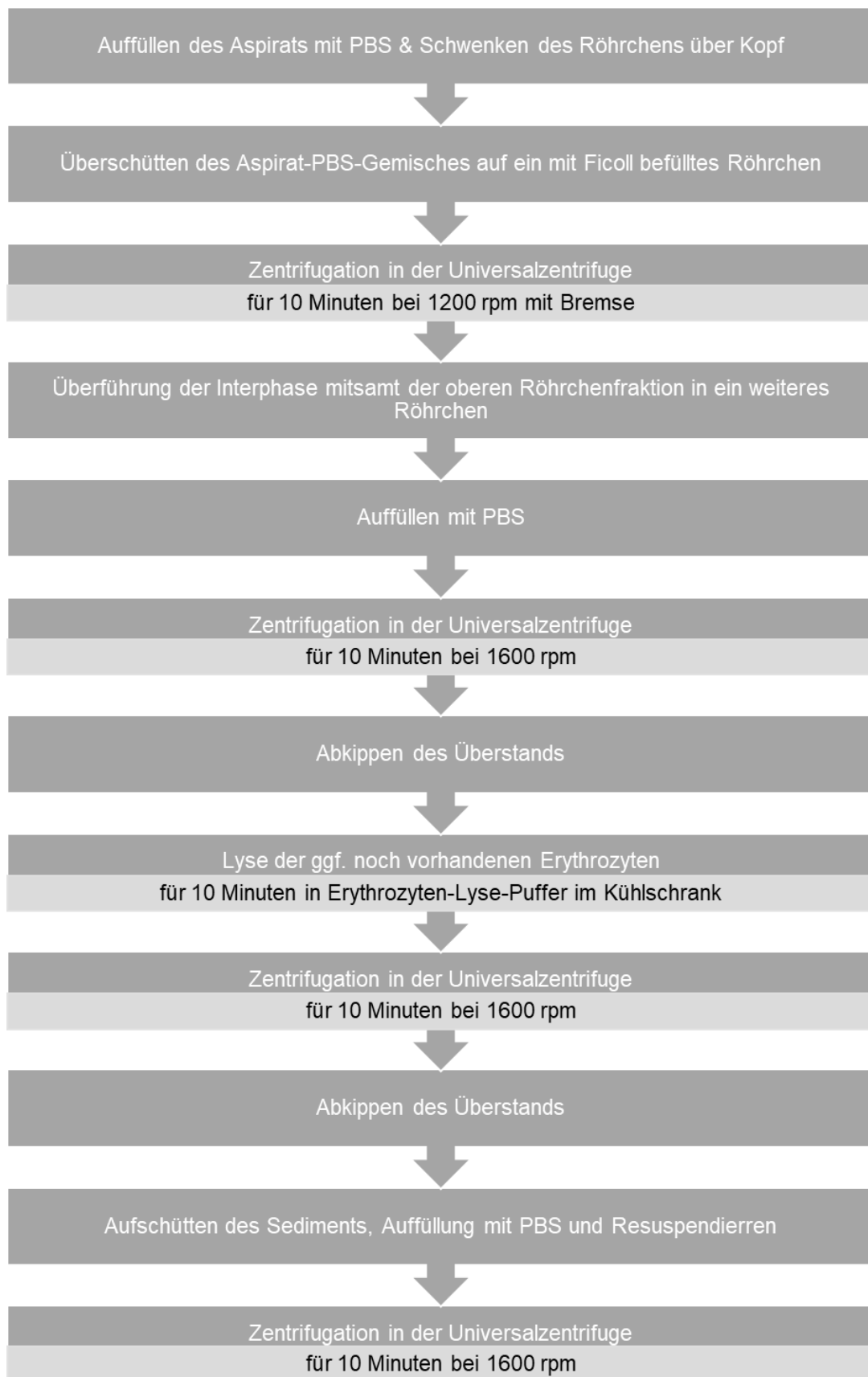


Abbildung 1: Dichtezentrifugation über den Ficoll-Gradienten zur Isolierung von mononukleären Zellen (ggf. gegebenenfalls, PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, rpm: Umdrehungen pro Minute)

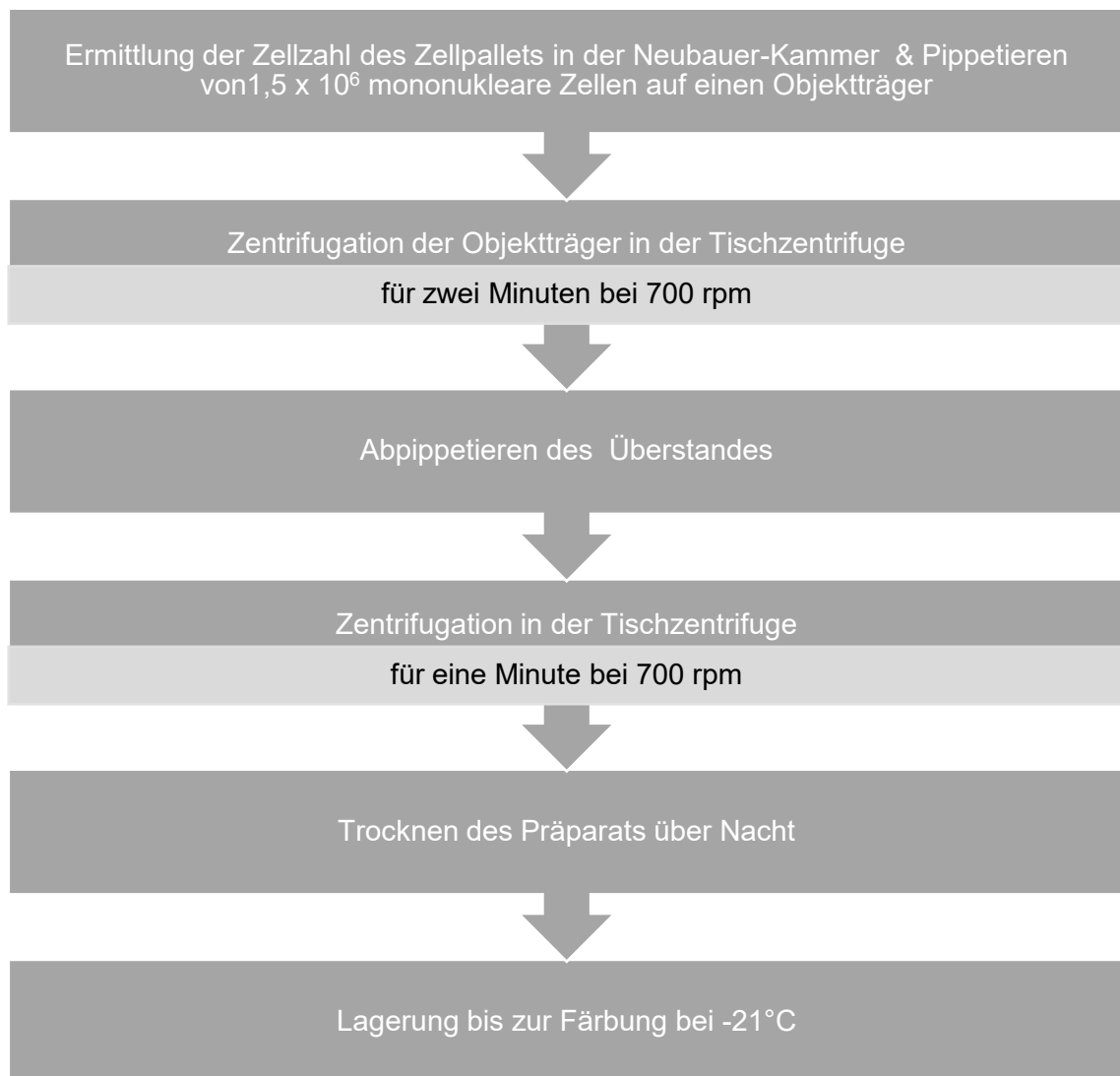


Abbildung 2: Überführung der mononukleären Zellen aus Dichtezentrifugation über den Ficoll-Gradienten auf einen Objektträger (rpm: Umdrehungen pro Minute, °C: Grad Celsius)

2.12 Auswahl eines Patientenkollektivs

Um die Wahrscheinlichkeit der Detektion von DTCs zu erhöhen, wurden in dieser Arbeit alle Patienten eingeschlossen, bei denen im Rahmen des im vorigen Abschnitt beschriebenen Ablaufs bereits mindestens eine DTC detektiert worden war. Insgesamt wurden so 137 Objektträger von 77 Patienten ausgewählt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte bei diesen Proben eine Immunfluoreszenzfärbung und eine Auswertung dieser Proben, um DTCs zu detektieren und den entsprechenden AR-Status zu bestimmen. Die Anzahl an verwendeten

Objektträgern mit KM-Aspirat je Patienten lag zwischen eins und fünf (Mittelwert $1,78 \pm SD0,719$).

Ferner wurde, falls der Primärtumor zur pathologischen Untersuchung verfügbar war, der AR-Status des Primärtumors bei allen Patienten, bei denen mindestens eine DTC im Rahmen der AR-Bestimmung gefunden worden war, bestimmt. Der Ablaufplan der Studie ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die Charakteristika der eingeschlossenen Patienten sind der Tabelle 13 unter 3.1 Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs zu entnehmen.

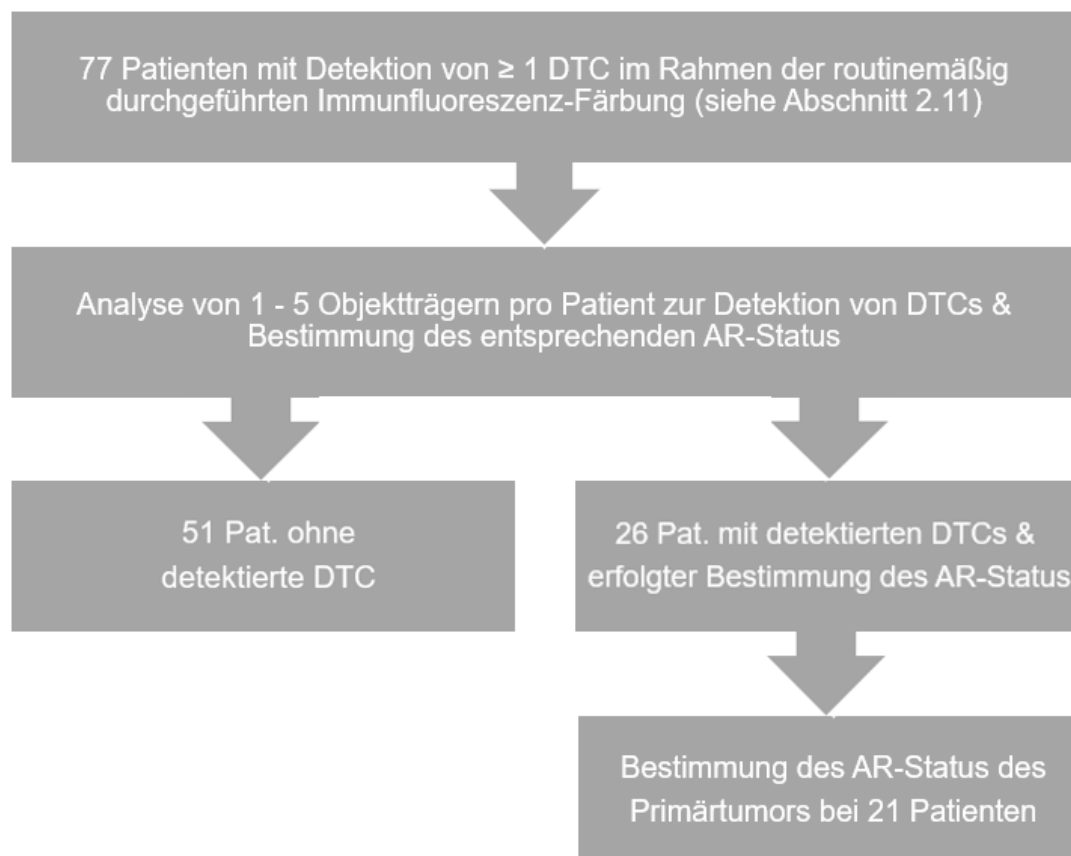


Abbildung 3: Ablaufplan der Studie (AR: Androgenrezeptor, DTC: Disseminierte Tumorzelle, Pat.: Patient)

2.13 Herstellung der Positiv- und Negativkontrollen

Als Positivkontrolle wurde die kommerziell erhältliche AR-positive Zelllinie LnCap, welche aus Metastasen eines Prostatakarzinoms stammt [136], verwendet. Die Negativkontrollen stellte die ebenfalls kommerziell erhältliche AR-negative Zelllinie DU145 dar, die aus der Gehirnmastase eines Prostatakarzinoms stammt [135].

Es erfolgte die Kultivierung der Zelllinienzellen. Danach wurde ein Gemisch aus den Zelllinienzellen und aus mononukleären Zellen, welche aus Spenderblut von gesunden Probanden gewonnen worden waren, erstellt. Dies erfolgte mit dem Ziel eine mit dem KM vergleichbare Suspension zu schaffen. Diese Mischung aus den jeweiligen Zelllinienzellen und den mononukleären Zellen wurde anschließend auf einen Objektträger überführt und konnte schließlich bei -21°C bis zur Färbung gelagert werden. Die dafür erfolgten genauen Arbeitsschritte sind Abbildung 4 zu entnehmen.

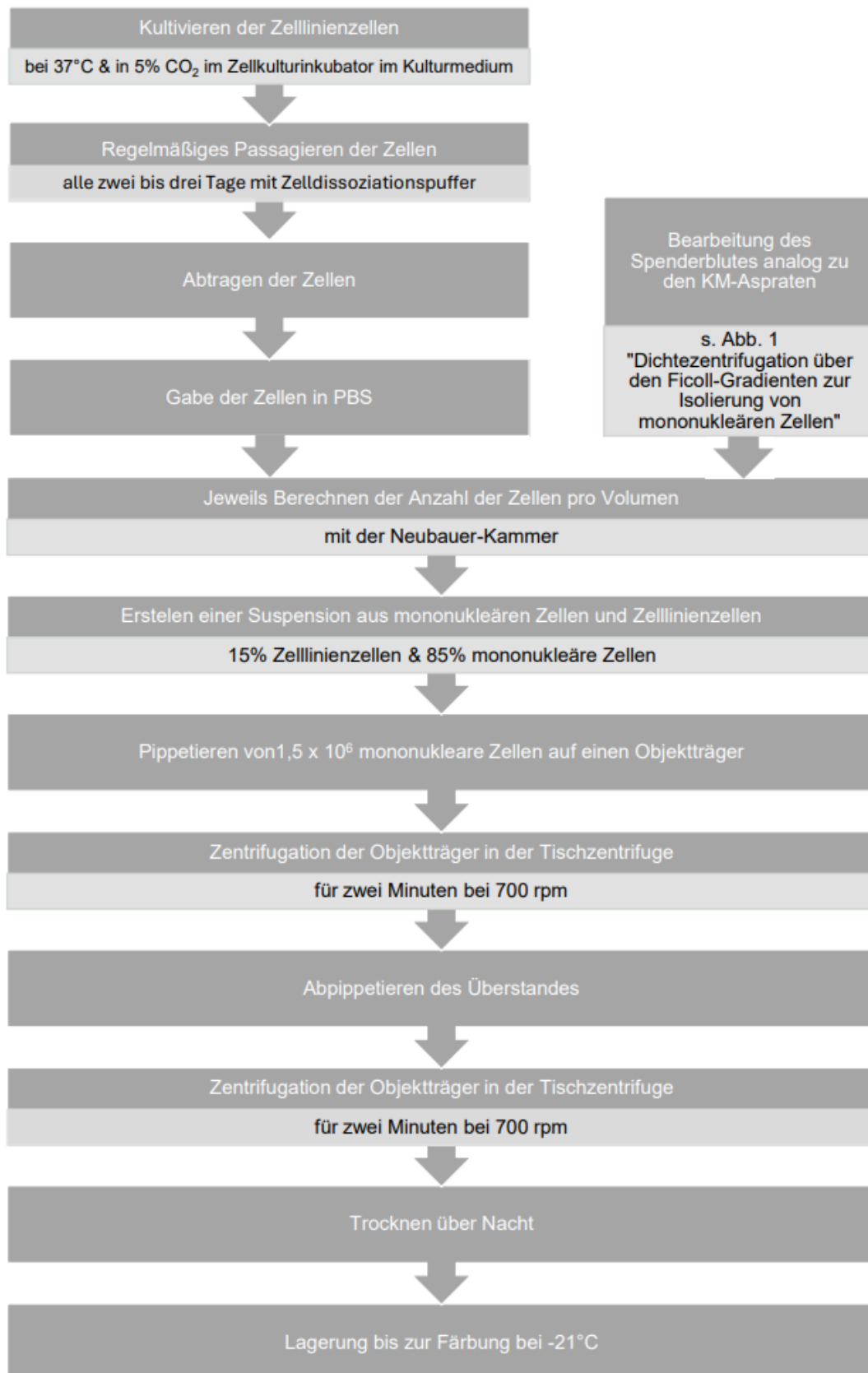


Abbildung 4: Herstellung der Kontrollen (Abb.: Abbildung, CO₂: Kohlenstoffdioxid, PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, rpm: Umdrehungen pro Minute, °C: Grad Celsius, s.: siehe)

2.14 Nachweis von DTCs

Der Nachweis von DTCs erfolgte über eine Immunfluoreszenzfärbung. Hierbei wurden Zellen mit epitheliale CK-Gerüst mit Hilfe einer CK-Färbung identifiziert [57]. Zum Nachweis eines DNA-haltigen Zellkerns wurde DAPI verwendet [137]. CD45 identifiziert Leukozyten bzw. kernhaltige Zellen des hämatopoetischen (blutbildenden) Systems und ist bei epithelialen Zellen folglich nicht vorhanden [65]. Die Expression von CD45 schließt also aus, dass es sich bei einer Zelle um eine DTC handelt. Diese Färbung dient somit der Unterscheidung von DTCs und hämatopoetischen Zellen, die sich beide im Rahmen der Dichtezentrifugation über den Ficoll-Gradienten zur Isolierung von mononukleären Zellen auf dem Objektträger befinden. CK-positive, DAPI-positive, CD45-negative Zellen mit entsprechender Morphologie (siehe Abschnitt 1.2.2 Nachweismethoden) wurden in dieser Arbeit als DTCs gewertet.

2.14.1 Immunfluoreszenzfärbung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine bereits etablierte Färbung der Forschungslabore der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf, die bereits zur Bestimmung des AR-Status bei CTCs verwendet worden war, modifiziert angewandt [127].

So wurde anstelle der CK-Färbung C11 die Färbung CK C11 AE 1/3 verwendet, was zu einer breiteren Abdeckung des CK-Spektrums führte. Um eine sonst daraus resultierende gleichzeitige Anfärbung des CK-Gerüsts und des AR im TRITC-Kanal zu umgehen, wurde ferner der sekundäre AK für die Färbung des AR angepasst (Anti-Kaninchen AF 488 IgG). Der Vergleich der verwendeten Antikörper ist in Tabelle 11 dargestellt. Daneben erfolgte eine Anpassung der Fixierung. Anstelle CellSave wurde Formalin verwendet.

Tabelle 11: Vergleich der Antikörperfärbung der vorliegenden Arbeit mit der etablierten Färbung [127]

Zelluläre Struktur		Etablierte Färbung		Färbung in dieser Arbeit	
		AK	Fluorophor (Farbe)	AK	Fluorophor (Farbe)
Zellkern		DAPI (blau)		DAPI (blau)	
AR	Primärer AK	D6F11 (Kaninchen)	/	D6F11 (Kaninchen)	/
	Sekundärer AK	Esel-Anti-Kaninchen-AK	Alexa Fluor 594 (rot)	Esel-Anti-Kaninchen-AK	Alexa Fluor 488 (grün)
CK		C11 (Maus)	FITC (grün)	C11 AE 1/3 (Maus)	TRITC (rot)
CD45		35-Z6 (Maus)	Alexa Fluor 647 (Tief-/Infrarot)	36-Z6 (Maus)	Alexa Fluor 647 (Tief-/Infrarot)

(AK: Antikörper, AR: Androgenrezeptor, CD45: Cluster of Differentiation 45, CK: Zytokeratin, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol)

Das daraus resultierende finale Färbeprotokoll ist in Abbildung 5 dargestellt. Nach dem Auftauen, Fixieren und Permeabilisieren sowie einer Proteinblockierung mit dazwischengeschalteten Waschschritten folgte die primäre Färbung.

Für diese wurden die zu färbende Präparate mit folgenden AK für 45 Minuten inkubiert:

- Monoklonaler AR-AK (D6F11) aus Kaninchen (1:50)
- CK-AK (C11 AE 1/3) aus Maus (1: 40) direkt mit TRITC konjugiert
- CD45-AK (35-Z6) aus Maus (1:20) direkt mit Alexa Fluor 647 konjugiert

Danach folgten weitere Waschschriffe. Da direkt konjugierte AK bereits mit Fluorophoren markiert sind, musste beim CK-AK und beim CD45-AK keine erneute Färbung erfolgen. Der in dieser Arbeit verwendete monoklonale AR-AK ist jedoch nicht direkt konjugiert. Zur Markierung des AR-AK mit einem Fluorophor erfolgte unter anderem die folgende Färbung für 30 Minuten:

- sekundären Esel-Anti-Kaninchen-AK, konjugiert mit Alexa Fluor 488 (1: 500) zur indirekten Markierung des AR-AK
- DAPI zur Färbung der Kern-DNA

Es folgte ein erneuter Waschschriff, bevor die Proben mit Dako Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt wurden. Simultan zur Probencharge wurde stets zur Kontrolle eine Färbung der Kontrollobjektträger mit der Zelllinie Du145 als Negativkontrolle und der Zelllinie LnCap als Positivkontrolle durchgeführt. Außerdem wurde stets eine Isotypkontrolle der LnCap-Zelllinie durchgeführt.

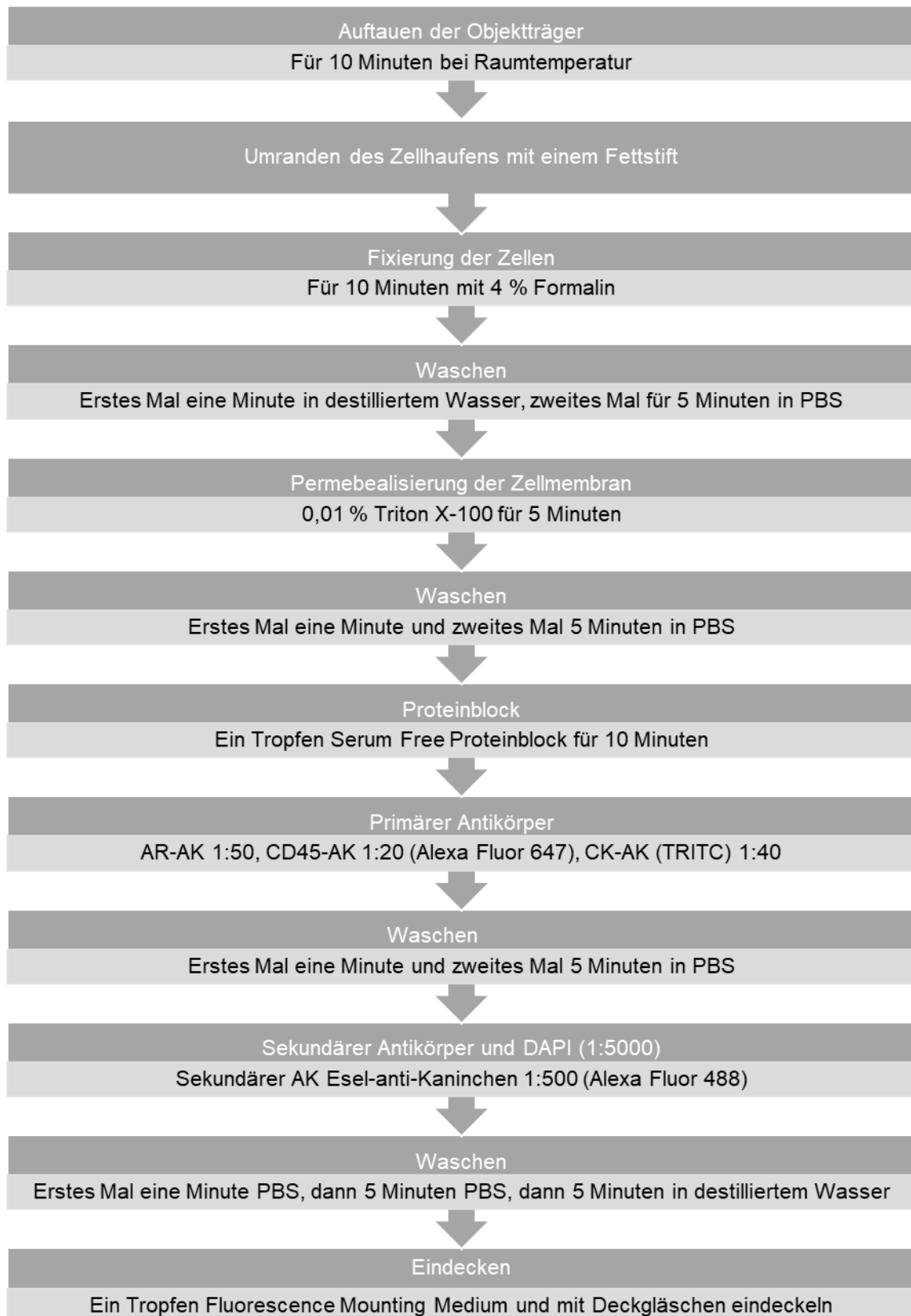


Abbildung 5: Finales Färbeprotokoll (AK: Antikörper, AR: Androgenrezeptor, CD45: Cluster of Differentiation 45, CK: Zytokeratin, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung)

2.14.2 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurden die zu untersuchenden zellulären Strukturen über eine AK-Bindung mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene Fluorophore verwendet, die durch Anregung in einem spezifischen Kanal des Fluoreszenzmikroskops auf die Ausprägung der jeweiligen zellulären Struktur zurückschließen lassen [59].

Tabelle 12 gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fluorophore, die zugeordnete Farbe sowie die damit markierten zellulären Strukturen.

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, mit Darstellung der durch diese markierten zellulären Strukturen sowie ihre farbliche Wahrnehmung in der Fluoreszenzmikroskopie

Fluorophor	Farbe	Zelluläre Struktur
DAPI	Blau	Zellkern
Alexa Fluor 488	Grün	AR
TRITC	Rot	CK
Alexa Fluor 647	Tief-/Infrarot	CD45

(AR: Androgenrezeptor, CD45: Cluster of Differentiation 45, CK: Zytokeratin, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol)

Abbildung 6 und 7 stellen die Färbung in der Immunfluoreszenzmikroskopie in allen verwendeten Kanälen mit Hilfe der Positiv- und Negativkontrollzelllinien dar.

Alle gefärbten Patientenproben wurden mit dem Immunfluoreszenzmikroskop jeweils in 10-facher und 40-facher Vergrößerung im TRITC-Kanal mäanderförmig nach CK-positiven Zellen durchsucht. Eine Zelle wurde erst dann als DTC eingestuft, wenn sie einen Zellkern hatte, um den sich das CK-Gerüst befand, und dabei kein CD45-Signal detektiert werden konnte. Das Vorhandensein jeder DTC wurde durch eine zweite Person bestätigt.

Beim Vorliegen einer DTC, also einer DAPI- & CK- positiven sowie CD45-negativen Zelle, wurde anschließend beurteilt, ob diese Zelle ein AR-Signal zeigt. Der DTC-Status eines Patienten wurde als AR-positiv bezeichnet, sobald mindestens eine AR-positive DTC detektiert wurde.

Alle so gefundenen DTC wurden in 40-facher und 63-facher Vergrößerung in allen vier Kanälen mit Hilfe der Mikroskopkamera abfotografiert und in das Tiff-Format überführt.

Die anschließende Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ.

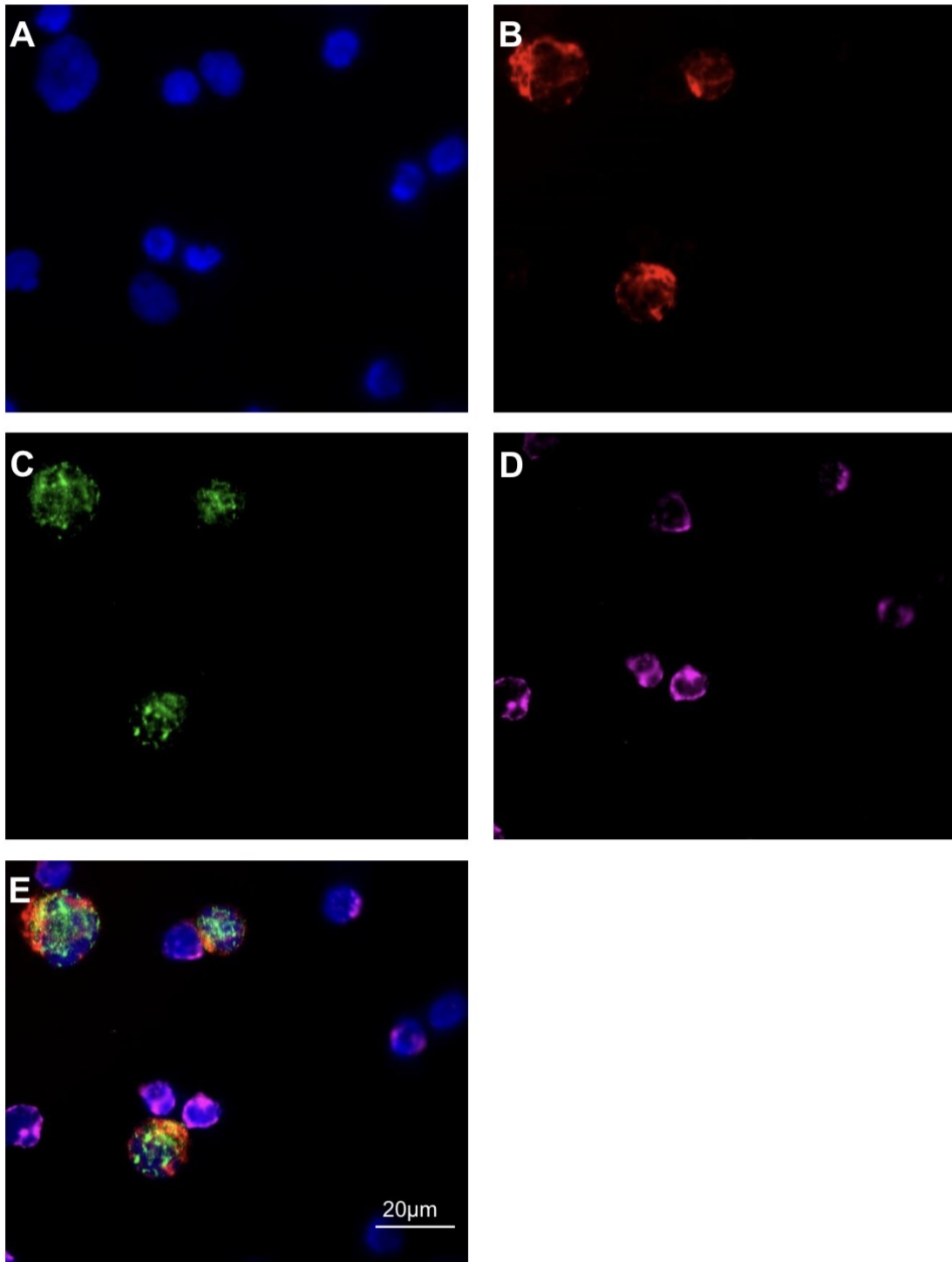


Abbildung 6: Färbung der Positivkontrolle (Zelllinie LnCap) in den verschiedenen Kanälen des Immunfluoreszenzmikroskops (Vergrößerung: 63x mit Öl). Zu sehen sind drei Zellen der Zelllinie LnCap (kernhaltige Zellen, die CK- und AR- positiv sowie CD45-negativ sind), die von mehreren Leukozyten umgeben sind (kernhaltige Zellen, die Zytokeratin-negativ sind, sowie CD45-positiv). A: DAPI-Färbung des Zellkerns; B: CK-Färbung; C: AR-Färbung; D: CD45-Färbung; E: Merge aller vier Kanäle (AR: Androgenrezeptor, CK: Zytokeratin, CD45: Cluster of Differentiation 45, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol)

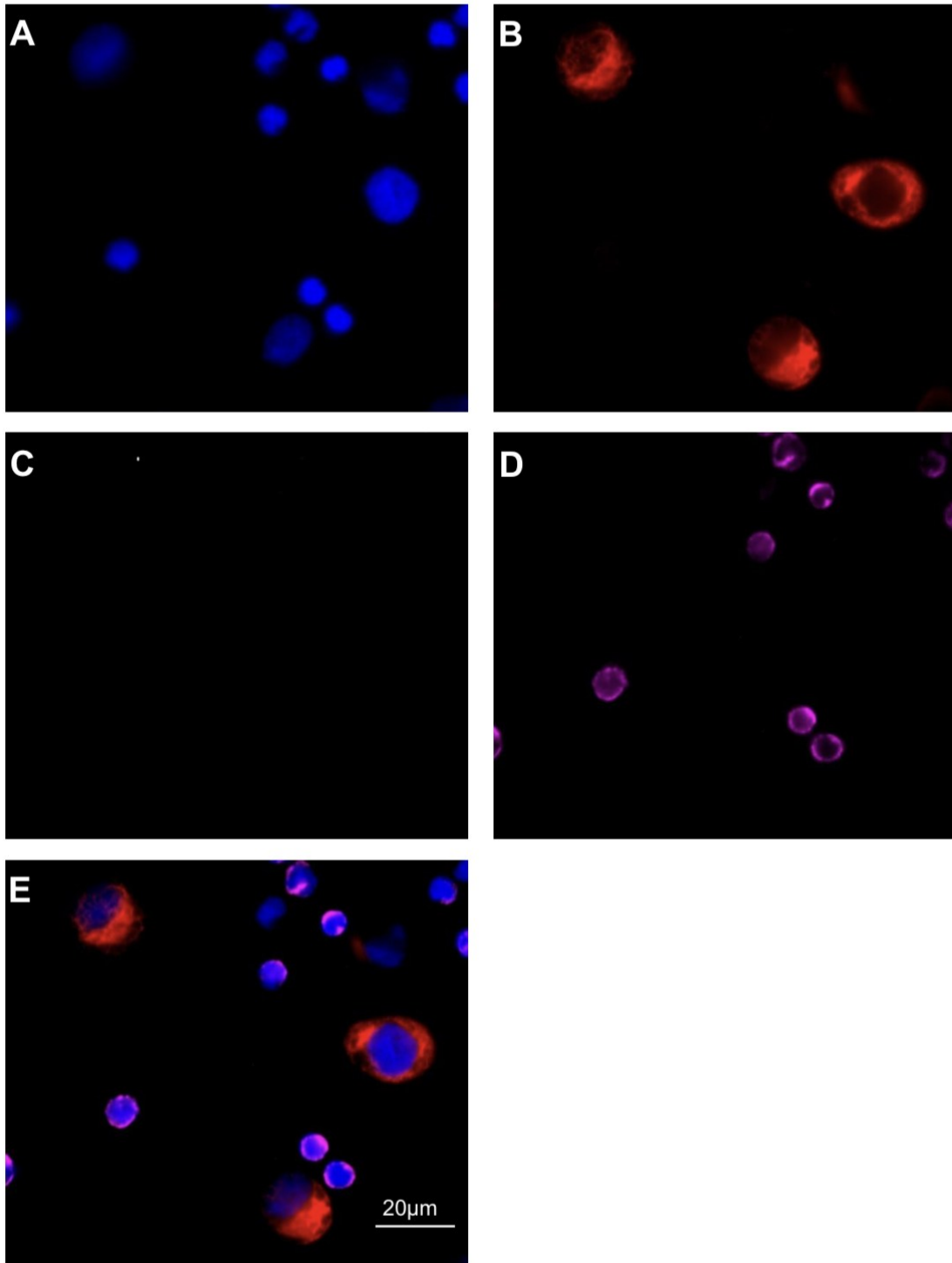


Abbildung 7: Färbung der Negativkontrolle (Zelllinie DU145) in den verschiedenen Kanälen des Immunfluoreszenzmikroskops (Vergrößerung: 63x mit Öl). Zu sehen sind drei Zellen der Zelllinie Du145 (kernhaltige Zellen, die CK-positiv und AR- sowie CD45-negativ sind), die von mehreren Leukozyten umgeben sind (kernhaltige Zellen, die CK-negativ sind, sowie CD45-positiv). A: DAPI-Färbung des Zellkerns; B: CK-Färbung; C: AR-Färbung; D: CD45-Färbung; E: Merge aller vier Kanäle (AR: Androgenrezeptor, CK: Zytokeratin, CD45: Cluster of Differentiation 45, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol)

2.15 Bestimmung des AR-Status des Primärtumors

Die Bestimmung des AR-Status erfolgte bei allen Patienten, bei denen im Rahmen der AR-Färbung mindestens eine DTC detektiert wurde, falls Tumormaterial dieser Patienten in der Biobank der Pathologie der Universitätsklinik in Paraffinblöcken vorhanden war. Dies war bei 21 von 26 DTC-positiven Patienten der Fall. Die AR-Färbung des Primärtumors erfolgte durch das Team der Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf unter der Leitung von Frau Univ. Prof. Dr. Irene Esposito und mit freundlicher Unterstützung von Dr. med. Cristina Lopez-Cotarelo im Rahmen der routinemäßigen Färbungen in der Pathologie. Untersucht wurde dafür jeweils ein 4-5 µm großer Schnitt des tumorösen Gewebes, das mit dem Schlittenmikrotom aus Paraffinblöcken hergestellt und auf Objektträgern aufgezogen worden war. Diese Paraffinschnitte trockneten bei 65 °C über Nacht. Die darauffolgende Färbung erfolgte mit dem Vollautomatisierten Färbegerät VENTANA BenchMark ULTRA. Dazu wurde zunächst unter Verwendung von „EZ Prep“ Lösung entparaffiniert. Danach wurde mit ULTRA CC1 Puffer für 56 Minuten bei 100°C eine Antigendemaskierung durchgeführt. Es folgte eine 28-minütige Inkubation des Primär-AK (AR-AK F39.4.1) aus Maus in einer Konzentration von 1:30 bei 37°C, gefolgt von einer Inkubation mit dem Sekundär-AK aus dem Optiview dab detecion kit bei 37°C. Für die Gegenfärbung wurde Hämatoxylin und Bluing Reagent für 4 Minuten verwendet. Schließlich wurden die Schnitte unter Anwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe und einem anschließenden Xylolbad entwässert sowie im Eindeckautomaten eingedeckelt. Die Bestimmung des AR-Status erfolgte dann durch eine fachärztliche Beurteilung. Im Rahmen dieser Studie wurde ein Mammakarzinom mit ≥ 1 % AR-positiven Kernen als AR-positiv klassifiziert.

2.16 Datenanalyse

Zur Sammlung der Daten wurde das Programm Excel, zur statistischen Auswertung der Daten das Programm SPSS (Version 29) verwendet. Es galt das definierte Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Zur Bestimmung der Korrelation des AR-Status der DTC und des AR-Status des Primärtumors wurde der Exakte Test nach Fisher sowie der Chi-Quadrat-Test verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit Proben von 77 Patienten untersucht. Die Patienten waren durchschnittlich 57,99 (SD 13,92) Jahre alt. Die Mehrheit der eingeschlossenen Patienten war weiblich (97%) und postmenopausal (60%). Zwei eingeschlossene Patienten (3 %) waren männlich.

35 Patienten (45 %) hatten ein T1 Stadium. Ebenfalls 35 Patienten (45 %) waren auf die T-Stadien T2 bis T4 verteilt. Dabei hatten die meisten eingeschlossenen Patienten einen ER- und PR-positiven (jeweils 88 % und 80 %) sowie einen Her2-negativen (78 %) Tumor.

Histologisch konnten 59 der Patienten (77 %) dem NST-Typen zugeordnet werden. Die übrigen Patienten hatten entweder ein invasiv-lobuläres Karzinom (neun Patienten, 12 %), ein DCIS (sieben Patienten, 9 %) oder einen anderen Typen (zwei Patienten, 3 %).

Im Rahmen dieser Studie kamen G2-Karzinome bei 47 Patienten (61 %) und somit am häufigsten vor. 23 Patienten (30 %) hatten ein G2-Karzinom und fünf Patienten (6 %) ein G1-Karzinom.

Alle klinisch-pathologischen Merkmale der eingeschlossenen Patienten und der Mammakarzinome sind in der folgenden Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Klinische Charakteristika der eingeschlossenen Patienten

			Anzahl der Patienten N (%): 77 (100) ^{abc}
Klinische Charakteristika der Patienten			
Alter in Jahren		Mittelwert ± SD	57,99 ± 13,92
		Median	58
		Min. - Max.	28-83
Geschlecht		Weiblich	75 (97)
		Männlich	2 (3)
Menopausenstatus		Prämenopausal	29 (38)
		Postmenopausal	46 (60)
		Männlicher Patient	2 (3)
Charakteristika des Tumors			
TNM-Klassifikation ^a	T-Stadium	Tis	7 (9)
		T1	35 (45)
		T2-T4	35 (45)
	N-Stadium	N neg.	54 (70)
		N pos.	23 (30)
	M-Stadium	M0	76 (99)
		M1	1 (1)

ER-Status	ER-pos.	68 (88)
	ER-neg.	8 (10)
	ER unbekannt	1 (1)
PR-Status	PR-pos.	62 (81)
	PR-neg	14 (18)
	PR unbekannt	1 (1)
Her2-Status	Her2-pos..	60 (78)
	Her2-neg.	10 (13)
	Her2 unbekannt ^d	7 (9)
Tumorhistologie	NST	59 (77)
	Invasiv lobulär	9 (12)
	DCIS	7 (9)
	Anderer Typ	2 (3)
Grading	G1	5 (6)
	G2	47 (61)
	G3	23 (30)
	Grading unbekannt	2 (3)

a: Neun Patienten mit KMP vor, sechs Patienten mit KMP nach und ein Patient mit KMP vor und nach neoadjuvanter Chemotherapie, TNM ist bei diesen Patienten cTNM. Alle anderen 61 Patienten mit primär operativer Behandlung, TNM ist bei diesen Patienten pTNM.

b: Drei Patienten mit anderen bösartigen Tumoren in der Anamnese

c: Fünf Patienten mit Mammakarzinom in der Vorgeschichte

d: Entspricht Patienten mit DCIS, bei denen der Her2-Rezeptor routinemäßig nicht untersucht wird [6]

(DCIS: Ductales Carcinoma in situ, Her2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, KMP: Knochenmarkspunktion, N: Gesamtanzahl Patienten, neg.: negativ, NST: ohne spezifischen Typ, ÖR: Östrogenrezeptor, pos.: positiv, PR: Progesteronrezeptor, TNM: T: Ausdehnung des Primärtumors, N Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, M: Vorhandensein von Fernmetastasen, [3], Tis: Carcinoma in situ)

3.2 Detektierte DTCs

3.2.1 Deskriptive Statistik

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 137 Objektträger von 77 Patienten untersucht. Die Anzahl der untersuchten Objektträger pro Patienten lag zwischen 1 und 5, der Mittelwert betrug $1,78 \pm \text{SD } 0,719$.

Insgesamt wurden bei 26 Patienten (33,8%) DTCs gefunden. Die Gesamtzahl an DTCs betrug 50. Pro Patienten wurden dabei zwischen 0 und 20 DTCs detektiert, der Mittelwert betrug 0,65 DTCs pro Patienten $\pm \text{SD } 2,338$.

Beispielbilder der detektierten DTCs sind in Abbildung 8 dargestellt.

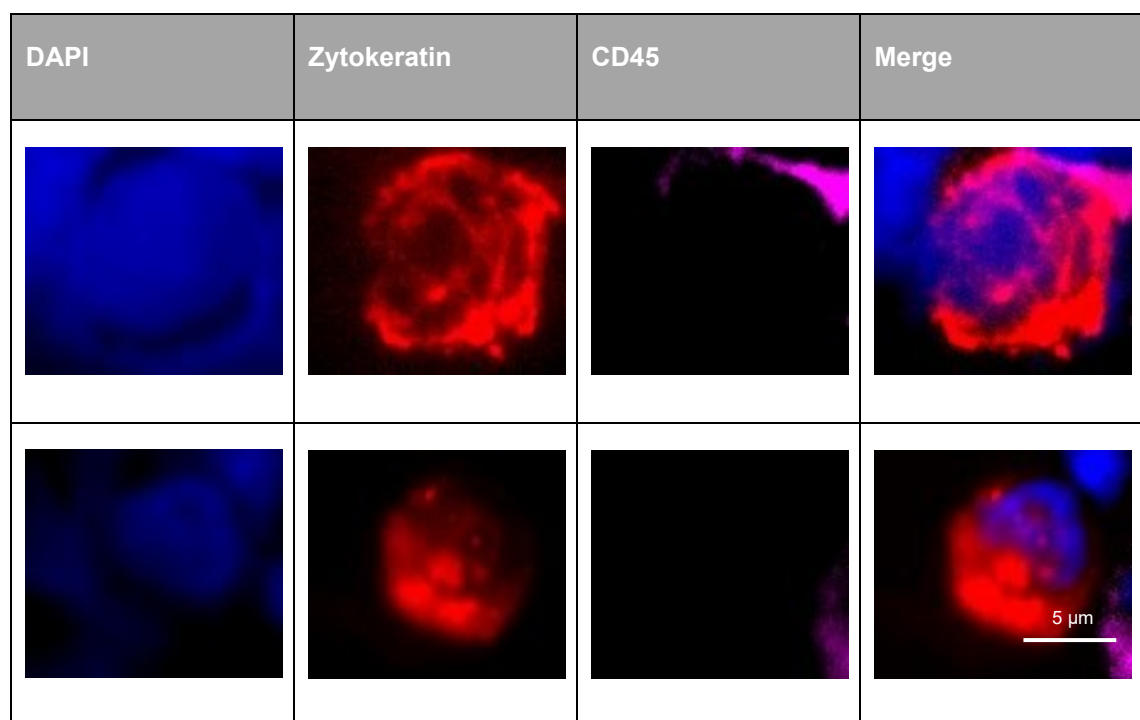


Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung von zwei detektierten DTCs aus dem Patientenkollektiv (Vergrößerung 63x mit Öl) (CD45: Cluster of Differentiation 45, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol)

3.2.2 AR-Status

Insgesamt waren 15 der 50 detektierten DTCs (30%) AR-positiv, 35 der 50 detektierten DTCs (70%) waren AR-negativ. Eine beispielhafte Darstellung der verschiedenen AR-Status befindet sich in Abbildung 9.

Von den 26 Patienten, bei denen DTCs in Rahmen dieser Arbeit gefunden werden konnten, exprimierten 10 Patienten mindestens eine AR-positive DTC (38,5%). Diese Patienten galten somit im Rahmen dieser Studie als Patienten mit AR-positivem DTC-Status. Bei 2 dieser 10 Patienten (20%) wurden mehr als eine DTC detektiert, bei beiden konnten sowohl AR-positive als auch AR-negative DTCs nachgewiesen werden. Die Heterogenität des AR-Status ist in der untersten Zeile der Abbildung 9 beispielhaft dargestellt.

Die weiteren 16 Patienten (61,5%) hatten ausschließlich AR-negative DTCs, bei einem dieser Patienten wurden mehr als eine DTC gefunden.

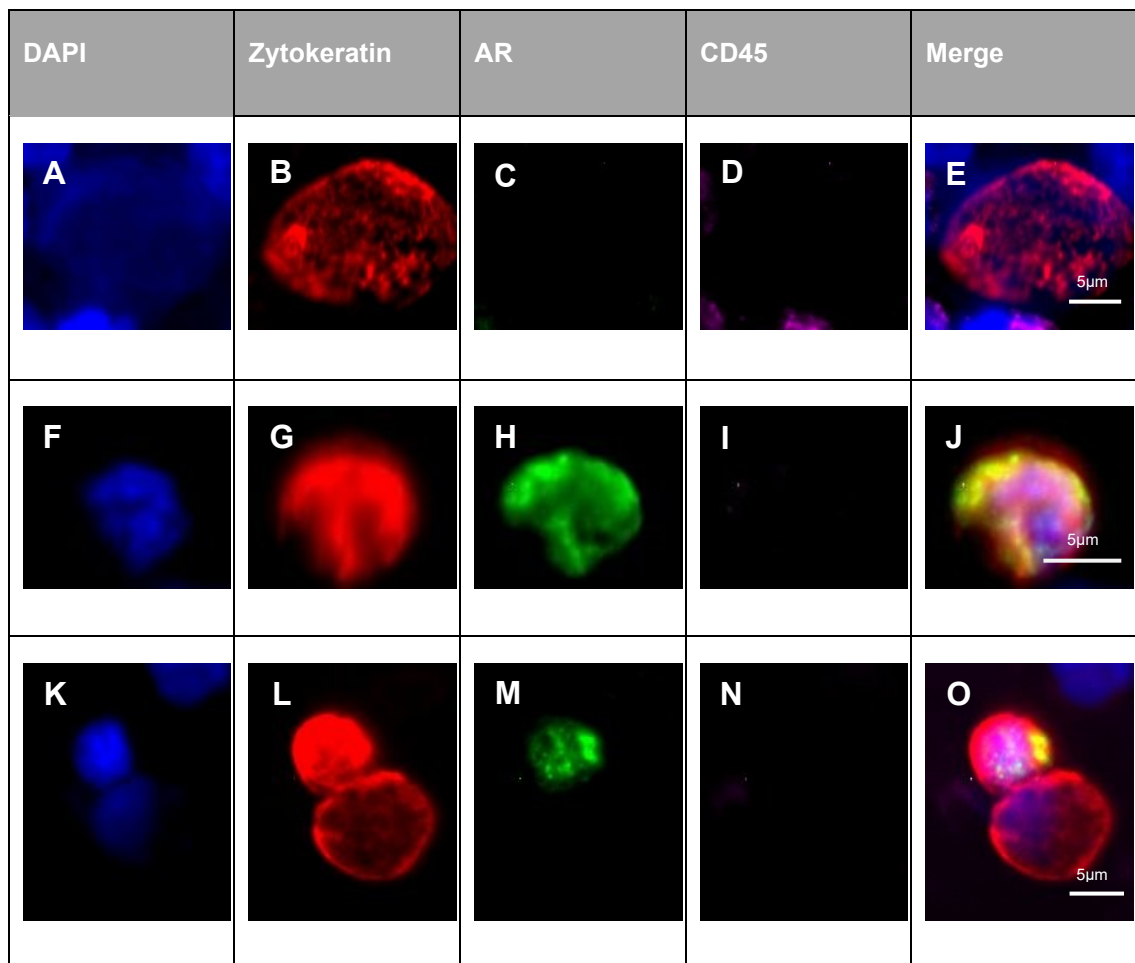


Abbildung 9 Darstellung verschiedener DTCs mit unterschiedlichem AR-Status in den verwendeten Kanälen des Fluoreszenzmikroskops. A-E: Eine AR-neg. DTC in den verwendeten Kanälen des Fluoreszenzmikroskops, 63 x Vergrößerung mit Öl. F-J: Eine AR-pos. DTC in den verwendeten Kanälen des Fluoreszenzmikroskops. 63 x Vergrößerung mit Öl. K-O: AR-positive DTC neben einer AR-negativen DTC in den verwendeten Kanälen des Fluoreszenzmikroskops, 40x Vergrößerung. (AR: Androgenrezeptor, CD45: Cluster of Differentiation 45, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DTC: Disseminierte Tumorzelle, neg: negativ, pos.: positiv)

3.3 Korrelation des AR-Status der DTCs mit klinisch-pathologischen Parametern

Es wurde bei Patienten, bei denen im Rahmen dieser Arbeit DTCs detektiert werden konnten, nach einem statistischen Zusammenhang zwischen dem AR-Status der DTCs und gängigen klinischen Parametern gesucht.

Zur Signifikanz-Testung wurde sowohl der Chi-Quadrat-Test als auch der exakte Test nach Fisher verwendet. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Aussage des Chi-Quadrat-Tests eingeschränkt ist, da stets mehr als eine Zeile Werte kleiner fünf enthielten.

Insgesamt konnten bei 26 Patienten DTCs gefunden werden, zehn dieser Patienten hatten AR-positive DTCs.

Prämenopausal waren elf der DTC-positiven Patienten, vier von diesen Patienten (36 %) hatten auch AR-positive DTCs. Postmenopausal waren 14 der DTC-positiven Patienten, sechs von diesen Patienten (43 %) hatten auch AR-positive DTCs. Ein statistischer Zusammenhang zwischen dem AR-Status von DTCs und dem Menopausenstatus konnte sowohl mit dem Chi-Quadrat-Test als auch mit dem exakten Test nach Fisher nicht gezeigt werden.

Daneben wurde der statistische Zusammenhang zwischen Tumorgroße, Lymphknoten-, Fernmetastasierungs-, ER-, PR-, Her2-Status und dem AR-Status der DTCs untersucht, dieser war ebenfalls stets nicht signifikant. Die untersuchten Korrelationen zwischen AR-Status und den gängigen klinisch-pathologischen Parametern sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Korrelation des AR-Status der DTCs und gängiger klinisch-pathologischer Parameter

		DTC-pos.	AR-pos. DTC		Signifikanztestung
		N=26	n=10	(%)	
Menopausen-status	Prä	11	4	(36)	p=1,00 (exakter Test nach Fisher) p=0,742 (Chi-Quadrat-Test)
	Post	14	6	(43)	
	Männlich	1	/	/	
Tumorgroße	Tis - T1	16	6	(38)	p=1,00 (exakter Test nach Fisher) p=0,899 (Chi-Quadrat-Test)
	T2 – T4	10	4	(40)	
Lymphknoten-status	Neg.	21	8	(38)	p = 1,00 (exakter Test nach Fisher) p = 0,937 (Chi-Quadrat-Test)
	Pos.	5	2	(40)	
Fern-metastasierung	M 0	25	10	(40)	p=1,00 (exakter Test nach Fisher) p=0,420 (Chi-Quadrat-Test)
	M 1	1	0	(0)	
ER-Status	Positiv	23	8	(35)	p=0,538 (exakter Test nach Fisher) p=0,286 (Chi-Quadrat-Test)
	Negativ	3	2	(67)	
PR-Status	Positiv	21	8	(38)	p=1,00 (exakter Test nach Fisher) p=0,937 (Chi-Quadrat-Test)
	Negativ	5	2	(40)	
Her2-Status	Negativ	20	9	(45)	p=0,259 (exakter Test nach Fisher) p = 0,090 (Chi-Quadrat-Test)
	Positiv	4	0	(0)	
	Fehlen	2 ^a	/	/	

Aussage des Chi-Quadrat-Tests eingeschränkt, da mehr als eine Zeile Werte kleiner fünf enthält.
a: Entspricht Patienten mit DCIS, bei denen der Her2-Rezeptor routinemäßig nicht untersucht wird [6]
(AR: Androgenrezeptor, ER: Östrogenrezeptor, Her2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; PR: Progesteronrezeptor, Prä: Prämenopausal, Post: Postmenopausal T,N und M nach TNM-Klassifikation (T: Ausdehnung des Primärtumors, N0-N3: Vorhandensein und Ausdehnung von Lymphknotenmetastasen, M: Vorhandensein von Fernmetastasen [3], Tis: Carcinoma in situ)

3.4 AR-Status des Primärtumors

Der AR-Status des Primärtumors wurde bei 21 der 26 Patienten, bei denen im Rahmen der AR-Färbung mindestens eine DTC gefunden wurde, bestimmt.

In dieser Kohorte befanden sich 8 AR-negative (38,1%) sowie 13 AR-positive (61,9%) Patienten (siehe Grafik 1).



Grafik 1: AR-Status der DTC-pos. Patienten, bei denen die Bestimmung des AR-Status erfolgt ist
(AR: Androgenrezeptor, DTC: disseminierte Tumorzelle, neg.: negativ, pos.: positiv)

3.5 Korrelation des AR-Status der DTCs und des Primärtumors

Bei Betrachtung des AR-Status der Primärtumore sowie der DTCs ergab sich kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,203$, exakter Test nach Fisher, siehe Tabelle 15).

Darüber hinaus wurde dieser Zusammenhang auch bei den Patienten untersucht, die zum Zeitpunkt der KMP keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten, sowie kein Mammakarzinom in der Vorgeschichte hatten. Dies ist in Tabelle 16 dargestellt. Der Zusammenhang war hier mit $p=0,377$ (exakter Test nach Fisher) ebenfalls nicht signifikant.

Tabelle 15: Korrelation des AR-Status des Primärtumors und der DTCs (Darstellung bezieht sich nur auf DTC-pos. Patienten, bei denen der AR-Status des Primärtumors bestimmt wurde)

		AR-Status Primärtumor		Gesamt
		AR.-positiv	AR-negativ	
AR-Status DTC	AR-positiv	4	5	9
	AR-negativ	9	3	12
Gesamt		13	8	21
p=0,203 (exakter Test nach Fisher); p=0,154 (Chi-Quadrat-Test)				

Aussage des Chi-Quadrat-Tests eingeschränkt, da mehr als eine Zeile Werte kleiner fünf enthält.
(AR: Androgenrezeptor, DTC: Disseminierte Tumorzelle)

Tabelle 15: AR-Status des Primärtumors und der DTCs bei Patienten ohne systematische Therapie zum Zeitpunkt der Knochenmarkspunktion (Diese Darstellung schließt Pat. mit Z.n. neoadjuvanter Chemotherapie und Mammakarzinom in der Vorgeschichte aus. Darstellung bezieht sich nur auf DTC-positive Patienten, bei denen der AR-Status des Primärtumors bestimmt wurde)

		AR-Status Primärtumor		Gesamt
		AR.-positiv	AR-negativ	
AR-Status DTC	AR-positiv	4	4	8
	AR-negativ	8	3	11
Gesamte		12	7	19
p=0,377 (exakter Test nach Fisher); p=0,311 (Chi-Quadrat-Test)				

Aussage des Chi-Quadrat-Tests eingeschränkt, da mehr als eine Zeile Werte kleiner fünf enthält
(AR: Androgenrezeptor, DTC: Disseminierte Tumorzelle)

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem übergeordneten Ziel verfasst, DTCs von Mammakarzinompatienten bezüglich des Vorhandenseins des AR zu charakterisieren und den AR-Status der DTCs mit jenem des Primärtumors zu vergleichen.

Grund für diese Untersuchung bietet die große Häufigkeit des Mammakarzinoms gepaart mit einer - insbesondere nach Metastasierung - hohen krebisbedingten Mortalität dieser Tumorentität [1]. Dabei werden Metastasen des Mammakarzinoms teilweise nicht in direktem zeitlichem Zusammenhang mit dem Primärtumor, sondern mit einer zum Teil großen zeitlichen Latenz entdeckt [12]. Eine Erklärung für diesen Umstand bietet das Phänomen der Tumorzell dissemination. DTCs können sich in einer jahrelangen Ruhephase befinden, bevor sie anschließend zu Metastasen heranreifen [13]. Das Vorhandensein von DTCs hat so einen signifikant negativen Einfluss auf die Prognose der Patienten [43–45, 49].

Da sich die phänotypischen Merkmale der DTCs jedoch von denen des Primärtumors unterscheiden können [71, 72, 74], bietet sich die phänotypische Charakterisierung von DTCs hierbei als ein wichtiger Baustein möglicher zukünftiger gegen DTCs gerichteter Therapien an.

Mehrere Studien befassen sich aktuell mit einer gegen den AR gerichteten Therapie des Mammakarzinoms [132–134] (Tabelle 1). Es gibt jedoch derzeit keine Daten zum AR-Status der DTCs beim Mammakarzinom. Mit Hilfe einer Immunfluoreszenzmehrfachfärbung erfolgte so zum einen die Detektion von DTCs sowie die Bestimmung des AR-Status dieser Zellen. Ferner erfolgte ein Vergleich des AR-Status der DTCs mit dem AR-Status des Primärtumors.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Studie wurden KM-Proben von 77 verschiedenen Patienten auf das Vorhandensein von AR-positiven DTCs untersucht. Um die Wahrscheinlichkeit der Detektion von DTCs zu erhöhen, wurden ausschließlich Proben von Patienten verwendet, bei denen in Voruntersuchungen bereits DTCs gefunden worden waren. Die Anzahl an verwendeten Objektträgern mit KM-Aspirat je Patienten lag zwischen eins und fünf (Mittelwert $1,78 \pm \text{SD } 0,719$). Das arithmetische Mittel des Alters der eingeschlossenen Patienten betrug 57,99 ($\text{SD} \pm 13,92$) Jahre. Eingeschlossen wurden sowohl Patienten ohne systemische Therapie zum Zeitpunkt der KMP als auch Patienten im Z.n. neoadjuvanter Chemotherapie und Z.n. Mammakarzinom in der Vergangenheit.

Der Vorteil dieses Patientenkollektivs stellte eindeutig die Untersuchung einer höchstmöglichen Anzahl an Patientenproben und somit die Möglichkeit möglichst viele DTCs hinsichtlich des AR-Status zu untersuchen.

Ziel dieser Studie war es jedoch nicht eine repräsentative Aussage über die Häufigkeit von DTCs bei Brustkrebspatienten zu treffen, da bereits bei allen eingeschlossenen Patienten in Voruntersuchungen DTCs gefunden worden waren. Um möglichst viele Patientenproben untersuchen zu können, wurde bei Patienten, bei denen nicht genügend Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand, auf die Einhaltung der 2×10^6 Zellen je Patient, wie im Konsenspapier zur standardisierten Detektion von DTCs von Fehm et al. vereinbart [57], verzichtet. Gleichzeitig wurden bei einigen Patienten mehr Zellen untersucht. Dies führt dazu, dass mit diesem Patientenkollektiv zwar eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob DTCs von Mammakarzinom-Patienten grundsätzlich AR-positiv oder -negativ sind, jedoch ist der DTC-Status der Patienten unter dieser Limitation zu verstehen.

Eine Schwäche dieser Studie ist der Einschluss von Patienten mit einer KMP nach einer neoadjuvanten Chemotherapie. So konnte im Rahmen einiger Studien bereits gezeigt werden, dass eine systemische gegen den Her2-Rezeptor gerichtete Therapie zu einer Eradikation von Her2-Rezeptor-positiven DTCs

führt [87, 88]. Ein vergleichbarer Einfluss durch eine systemische Therapie auf den AR-Status von DTCs ist durchaus möglich und würde zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen. Folglich erfolgte teilweise eine statistische Untersuchung der Ergebnisse unter Ausschluss dieser Patientengruppe.

Ähnlich könnte sich der Einschluss von Patienten mit Zweitkarzinomen sowie ipsilateralen Lokalrezidiven auf die Ergebnisse auswirken. So bezeichnen zum einen Zweitkarzinome einen neuen Tumor in der anderen Brust, der unabhängig vom vorherigen Tumor entsteht [138]. Darüber hinaus unterscheiden einige Autoren im Falle erneuter Erkrankung derselben Seite, zwischen einem echten Lokalrezidiv und einem neuen Primärtumor. In der Studie von Huang et al. wurden ipsilaterale Mammakarzinome als ipsilaterale Rezidive definiert, wenn sie innerhalb von 3 cm vom Primärtumorbett auftraten und der histologische Subtyp mit dem Primärtumor übereinstimmte. Alle übrigen ipsilateralen Rezidive wurden als neue Primärtumoren klassifiziert [139]. Hierbei zeigten die Lokalrezidive ein signifikant besseres Überleben als neue Primärtumoren der gleichen Seite. Gerber et al. beschreibt darüber hinaus in seiner Arbeit unter welchen Bedingungen ipsilaterale Rezidive als Zweitkarzinome bezeichnet werden können und somit, wie ein primäres Karzinom behandelt werden sollten [140].

Der Nachteil des Einschlusses von Patienten, die schon in der Vergangenheit ein Mammakarzinom hatten, ist, dass der Ursprung der DTCs in diesen Fällen im Rahmen dieser Studie nicht zu eruieren ist. Schließlich können DTCs bis zu Jahrzehnte in einer Ruhephase bleiben [13]. Der Vergleich von Merkmalen der DTCs mit den Merkmalen des aktuellen Mammakarzinoms ist also zu hinterfragen. Folglich erfolgte teilweise eine statistische Untersuchung der Ergebnisse auch unter Ausschluss dieser Patientengruppe.

Eingeschlossen in diese Studie wurden auch Patienten mit einem duktalem Carcinoma in situ (DCIS). Es wurde bereits in mehreren Studien, unter anderem durch Banyas et al., das Vorhandensein von DTCs bei Patienten mit DCIS beschrieben [52, 53], obwohl dieses Stadium als nicht-invasives Stadium, beim dem die Tumorzellen ihren Ursprungsort nicht verlassen, gilt [54]. Inwieweit DTCs bei dieser Patientensubgruppe klinisch relevant sind, ist aktuell unklar [52].

Das Patientenkollektiv dieser Studie erfolgte primär also mit dem Ziel einer möglichst großen Akquirierung von Daten, sodass einige Schwachstellen an den Einschlusskriterien des Patientenkollektivs zu finden sind. Sollte der AR-Status von DTCs tatsächlich zukünftig Einfluss auf die Therapie von Patienten mit Mammakarzinom haben, ist selbstverständlich auf die Einhaltung der Konsenskriterien zur Detektion von DTCs [57] zu achten. Die bisher stattgefundenen systemischen Therapien würden in diesem Fall jedoch wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielen, da hier am wahrscheinlichsten eine zielgerichtete Eradikation der DTC unter Berücksichtigung des aktuellen AR-Status der DTCs stattfände.

4.1.2 Detektion von DTCs

Zur Detektion von DTCs wurde im Rahmen dieser Arbeit die Mehrfachimmunfluoreszenzfärbung und -mikroskopie verwendet. Nur Zellen, die CK-positiv waren und bei denen sich im DAPI-Kanal ein Zellkern zeigte, während die CD45-Färbung negativ war, wurden als DTCs identifiziert. Die Detektion erfolgte über ein mäanderförmiges Durchmusteren der Objektträger mit dem Fluoreszenzmikroskop. Das Vorhandensein jeder DTC wurde durch eine zweite Person bestätigt.

Die im Rahmen dieser Studie verwendete Immunfluoreszenzfärbung war eine bereits etablierte Färbung, die zur Bestimmung des AR-Status bei CTCs verwendet worden war, und im Rahmen dieser Studie modifiziert angewandt wurde [127].

Die mäanderförmige Durchmusterung der Objektträger in zwei Vergrößerungen ist ein Verfahren, wodurch das Übersehen von DTCs verhindert werden sollte. Durch die Zweitbeurteilung der DTCs wurde die Wahrscheinlichkeit für eine subjektive Fehleinschätzung beim Erkennen von DTCs verringert. Jedoch stellte sich die mäanderförmige Durchmusterung als sehr zeitaufwändiges Verfahren dar.

Das für die Detektion von CTCs durch die Food and Drug Administration (FDA) zugelassene CellSearch®-System würde im Rahmen eines automatisierten

Verfahrens eine alternative Detektionsmethode anbieten und wurde bereits in einzelnen Studien zur Detektion von DTCs angewendet [68, 69]. Eine Etablierung eines solchen Systems zur Detektion von DTCs böte die Möglichkeit DTCs mit deutlich kleinerem Aufwand zu detektieren, was für die routinemäßige klinische Anwendung ein deutlicher Vorteil wäre.

In dieser Arbeit wurde zur CK-Färbung ein AE1/3- und C11-AK verwendet, wovon der AK AE1/3-AK im Konsenspapier zur Detektion von DTCs empfohlen wird [57]. Dieser AK wurde im Rahmen dieser Arbeit um den C11 - AK erweitert um die Detektionsrate zu erhöhen. Durch den Einsatz gegen verschiedene CKs gerichteter AK konnten in verschiedenen Studien unterschiedliche DTC-Populationen erkannt werden [141]. Auch eine Markierung der DTCs über andere Strukturen, wie MUC1 und EpCAM, wird in der Literatur beschrieben, dabei kann sich ebenfalls die Zahl der detektierten DTCs unterscheiden [142, 143].

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine bereits etablierte Färbung verwendet [127]. Die manuelle Suche am Fluoreszenzmikroskop stellte sich jedoch als aufwendige Detektionsmethode dar. Eine routinemäßige Untersuchung von KM-Proben könnte alternativ zukünftig über automatisierte Systeme, wie dem CellSearch®-System, erfolgen [68, 69]. Darüber hinaus gibt es verschiedene AK zur Detektion von DTCs, die zu einer unterschiedlichen Anzahl an detektierten DTCs und sogar zum Erkennen verschiedener DTC-Populationen führen könnten [141–144]. Der Nutzen des simultanen Gebrauchs mehrerer CK-Färbungen oder anderer Oberflächenantikörper zur Detektion einer größeren Anzahl an DTCs wäre möglicherweise zu evaluieren; ein Vorteil durch die möglichst umfassende Erfassung von DTCs erscheint jedoch naheliegend.

4.1.3 Immunhistochemische Färbung des Primärtumors

Falls bei einem Patienten im Rahmen dieser Studie DTCs gefunden worden waren, erfolgte bei diesen Patienten eine immunhistochemische Färbung des Primärtumors, insoweit Tumormaterial vorhanden war. Die Färbung erfolgte im Rahmen der routinemäßigen Färbungen in der Pathologie. Die mikroskopische Beurteilung des AR-Status erfolgte durch eine fachärztliche Begutachtung.

Insgesamt war so durch die hohe Kompetenz im Rahmen der Färbung und der AR-Bestimmung ein sehr hohes Qualitätsniveau der AR-Bestimmung gewährleistet, sodass dieses Vorgehen wahrscheinlich auf die klinische Routine übertragbar wäre.

Insgesamt wurde der AR-Status des Mammakarzinoms bereits in Rahmen mehrerer Studien immunhistochemisch bestimmt, jedoch wurde in diesen Studien kein einheitlicher Cut-off-Wert zur Definition eines AR-positiven Tumors verwendet. Dabei gibt es in Studien verschiedene Grenzwerte zur Definition eines AR-Positiven Mammakarzinoms, gängig ist zum Beispiel ab 1 % [116, 145, 146], 10 % [128, 147–149] oder 20 % [150] AR-positiver Kerne ein Mammakarzinom als AR-positiv zu definieren. Daneben findet eine Einteilung Verwendung, bei der - angelehnt an die HR-Bestimmung des ER und PR - der Immunreaktiver Score (IRS) und der Remmele-Score angewendet werden, bei denen sowohl die Anzahl der AR-positiven Kerne als auch die Intensität der Färbung mit in die Auswertung einbezogen werden [151]. In Rahmen dieser Arbeit wurde sich dafür entschieden, einen Tumor ab einem Anteil von 1 % AR-positiven Kernen als AR-positiv zu definieren.

Als Schwäche dieser Arbeit ist zudem zu erwähnen, dass zur AR-Bestimmung der DTCs eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem AR-AK D6F11 verwendet wurde. Zur Bestimmung des AR-Status des Primärtumors wurde hingegen eine immunhistochemische Färbung mit dem AR-AK F39.4.1 verwendet. Dieser Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass wir zur Detektion von DTCs und dem zugehörigen AR dazu gezwungen waren, eine Mehrfachfärbung vorzunehmen. Somit musste, da die direkt konjugierten CK- und CD45-AK der Spezies Maus entstammten, der indirekt konjugierte AR-AK aus einer anderen Gattung als der Spezies Maus stammen [58, 59]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete immunhistochemische Färbung des Primärtumors mit dem AK F39.4.1 stellt jedoch eine beim Prostatakarzinom in der Routine eingesetzte und etablierte Färbung der Gattung Maus dar. Beim AR-AK D6F11 handelt es sich dabei, wie beim AR-AK F39.4.1, um einen monoklonalen AK, dies verbessert im Vergleich zu polyklonalen AK die Spezifität der Bestimmung [152]. Insgesamt kann diese Studie am ehesten als proof of principle Studie verstanden werden, die untersucht, ob es möglich ist den AR-Status von DTCs zu bestimmen. Die

Wertigkeit des Vergleichs der AR-Status zwischen DTC und Primärtumor ist hierbei eingeschränkt.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten verschiedener Studien und für den Fall, dass sich die antiandrogene Therapie in der Behandlung des Mammakarzinoms durchsetzen sollte, wäre zukünftig ein einheitlicher Grenzwert zur Definition eines AR-positiven oder -negativen Mammakarzinoms sinnvoll. Denkbar wären in diesem Zusammenhang beispielsweise Studien, die die Wirkung einer antiandrogenen Therapie in Abhängigkeit zur AR-Positivität setzen und so einen sinnvollen Grenzwert ermitteln. Ferner sollte zur besseren Vergleichbarkeit des AR-Status von DTCs und Primärtumor in weiteren Arbeiten versucht werden, den gleichen AR-AK zu verwenden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Detektierte DTCs

Insgesamt wurden bei 26 der 77 (33,8%) eingeschlossenen Patienten DTCs detektiert. Pro Patienten wurden dabei zwischen 0 und 20 DTCs detektiert, der Mittelwert betrug 0,65 DTCs ($\pm$ SD 2,338) pro Patienten.

In der Literatur können DTCs bei 26 % bis 32 % aller primären Brustkrebspatienten nachgewiesen werden [43–45]. So scheint die von uns detektierte Anzahl an DTCs in diesen Bereich zu passen. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass in diese Studie nur Patienten eingeschlossen wurden, bei denen bereits in den Voruntersuchungen DTCs gefunden worden waren. Es handelt sich also um eine Re-Detektionsrate von Patienten, bei denen im Rahmen derselben Punktion auf anderen Objektträgern bereits DTCs gefunden worden waren. Somit kann diese Arbeit nicht mit den Detektionsraten aus der Literatur verglichen werden.

Diese gering erscheinende Re-Detektionsrate ist unter anderem mit der Menge des untersuchten Materials zu erklären. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 137 Objektträger von 77 Patienten untersucht. Die Anzahl der untersuchten Objektträger pro Patienten in dieser Studie lag zwischen 1 und 5,

der Mittelwert der Anzahl der untersuchten Objektträger pro Patienten betrug $1,78 \pm \text{SD } 0,719$, wobei sich auf einem Objektträger etwa $1,5 \times 10^6$ Zellen befinden. Somit wurde bei vielen Patienten in dieser Studie - auch im Gegensatz zu den Voruntersuchungen, bei denen die Standardzahl von 2×10^6 Zellen stets erfüllt worden war - die Standardanzahl von 2×10^6 untersuchten Zellen nicht erreicht oder in anderen Fällen überschritten [57].

Ein weiterer Grund für diese Diskrepanz könnte die Verwendung von eingefrorenen Präparaten aus der Biodatenbank sein. In einer Arbeit wurde beispielsweise die Qualität einer immunhistochemischen Färbung zwischen mit Methanol-fixierten und anschließend mit Polyethylenglycol (PEG) geschützten Objektträgern und Objektträgern, die nach Lufttrocknung im Gefrierschrank gelagert wurden, verglichen. Hierbei zeigte sich die Färbung bei Objektträgern, die nach der Lufttrocknung im Gefrierschrank gelagerten wurden, in einigen Aspekten sogar signifikant schlechter [153].

Sollte in eine präzise Aussage über den DTC-Status eines Patienten getroffen werden, sollten auf jeden Fall möglichst 2×10^6 Zellen untersucht werden [57]. Daneben ist möglichst eine Optimierung der Lagerbedingungen von Präparaten anzustreben, wobei natürlich die Untersuchung von neu hergestellten Präparaten die höchste Qualität verspricht.

4.2.2 AR-Status der DTCs

Unsere Studie zeigt, dass DTCs einen positiven AR-Status haben können. Insgesamt waren 30% (15 von 50) der detektierten DTCs AR-positiv. 38,5 % (10 von 26) der Patienten, bei denen in der AR-Färbung mindestens eine DTC gefunden werden konnte, hatten einen AR-positiven Rezeptorstatus, welcher als mindestens eine AR-positive DTC pro Patienten definiert wurde. Bei den Patienten, bei denen mehr als eine DTC gefunden wurde, konnte sich jedoch der AR-Status der verschiedenen DTCs voneinander unterscheiden.

Es konnte keine Arbeit gefunden werden, die sich mit dem AR-Status von DTCs *bis dato* beschäftigt hat. Arbeiten, die den AR-Status von Brustkrebsmetastasen,

deren Vorstufen DTCs sein könnten [13], untersucht haben, zeigen jedoch, dass Brustkrebsmetastasen AR-positiv sein können [154, 155]. Es gibt außerdem Untersuchungen zum AR-Status von CTCs im metastasierten Kollektiv. Dabei konnte ein positiver AR-Status bei 31 % bis 40,5 % der Patienten mit CTCs nachgewiesen werden [71, 127, 128]. Auch hier wurde eine Heterogenität des AR-Status verschiedener CTCs bei gleichen Patienten beobachtet [127, 128]. Dass sich phänotypische Merkmale mehrerer DTCs derselben Patienten unterscheiden können, wurde auch in Bezug auf andere prädiktive Biomarker, wie dem ER- oder Her2-Status, gezeigt [71, 74]. Somit sind die Ergebnisse dieser Arbeit mit den bisherigen Forschungsergebnissen in Einklang zu bringen. Ursächlich für die Heterogenität von DTCs beim gleichen Patienten könnte zum einen der Umstand sein, dass - auch bei einem im Rahmen dieser Studie als AR-positiv bezeichneten Primärtumor mit einem Cut-off-Wert von 1 % - die Möglichkeit besteht, dass ein großer Anteil der Tumorzellen AR-negativ ist. Somit besteht die Möglichkeit, dass bereits im Primärtumor eine Zellheterogenität bezüglich des AR-Status besteht. Die Zellheterogenität des Primärtumors und damit auch das Vorhandensein von eventuell nicht entdeckten Subgruppen von Zellen im Primärtumor wird dabei auch im Rahmen einer anderen Studie als mögliche Ursache von genetischen Veränderungen von DTCs gegenüber des Primärtumors gesehen [156]. Daneben wird auch diskutiert, ob es zu einer Veränderung der Zelleigenschaften während der Dissemination ins Knochenmark kommt [156, 157]. So konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass DTCs Stammzellmarker exprimieren können, die im Primärtumor nicht zu finden sind, was die Theorie der parallelen Progression unterstützt [14, 158]. Vermutet wird in diesem Zusammenhang, dass DTCs einen Klon von besonderer Aggressivität darstellen könnten [159].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DTCs bei Mammakarzinompatienten AR-positiv sein können. Dies stellt ein neues mögliches Therapieziel zur Bekämpfung von DTCs dar. Zukünftig entscheidend ist, ob die Anwendung einer Anti-AR gerichteten Therapie zur Eradikation von DTCs führt sowie die Beantwortung der Frage, ob die Eradikation von DTCs einen klinischen Nutzen, zum Beispiel bezüglich des Langzeit- oder krankheitsfreien Überlebens, für die Mammakarzinompatienten hat.

4.2.3 AR-Status des Primärtumors

Der AR-Status des Primärtumors wurde bei Patienten mit positivem DTC-Status bestimmt, bei denen Tumormaterial zur immunhistochemischen Bestimmung vorhanden war. Dies war bei 21 Patienten der Fall. 61,9 % dieser Patienten (13 von 21) hatten einen AR-positiven Tumor.

Routinemäßig wird der AR-Status des Mammakarzinoms nicht bestimmt [6]. In der Literatur wird beschrieben, dass etwa 60 % bis 78 % aller Mammakarzinome AR-positiv sind [116, 117]. Diese Zahlen sind mit unseren Ergebnissen vereinbar, obwohl im Rahmen dieser Arbeit nur der AR-Status von DTC-positiven Patienten bestimmt wurde.

Das Auswahlkriterium nur bei DTC-positiven Patienten den AR-Status des Tumors zu untersuchen hat zur Folge, dass der AR-Status von Patienten mit Mammakarzinom dieser Studie eventuell nicht auf alle Patienten mit Mammakarzinom übertragen werden kann, zumal die Stichprobengröße sehr klein ist.

4.2.4 Korrelation des AR-Status der DTCs und des Primärtumors

Bei insgesamt 21 Patienten, bei denen der AR-Status der DTCs im Rahmen dieser Studie bestimmt werden konnte, wurde auch der AR-Status des Primärtumors bestimmt. Der statistische Zusammenhang wurde unter anderem mit Hilfe des exakten Tests nach Fischer bestimmt. Dabei ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen AR-Status des Primärtumors und der DTCs ($p=0,203$). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch nach Herausnahme der Patienten, die zum Zeitpunkt der KMP bereits eine neoadjuvante Therapie erhalten hatten oder ein Mammakarzinom in der Vorgeschichte haben ($p=0,377$). Die Aussage des ebenfalls verwendeten Chi-Quadrat-Tests, der ebenfalls jeweils

keinen signifikanten Zusammenhang zeigte, ist eingeschränkt, da mehr als eine Zeile Werte kleiner fünf enthält.

Insgesamt ist das Ergebnis unter der Einschränkung einer sehr kleinen Patientenstichprobe von 21 Patienten, beziehungsweise - bei Betrachtung der Patienten ohne neoadjuvante Therapie oder ein Mammakarzinom in der Vorgeschichte - von 19 Patienten, zu verstehen.

Es konnte keine Arbeit gefunden werden, die sich bisher mit dem Vergleich des AR-Status von DTCs und dem Primärtumor beschäftigt hat. Jedoch legen andere Arbeiten, welche Merkmale von DTCs und Primärtumoren vergleichen, ebenfalls nahe, dass der Rezeptorstatus unterschiedlicher Merkmale zwischen Primärtumor und DTC unabhängig voneinander exprimiert wird [71, 72, 74]. So wurde beispielsweise in Arbeiten von Solomayer et al. und Hartkopf et al. die Expression des Her2-Status zwischen Primärtumor und DTCs verglichen, der dabei nicht signifikant miteinander korrelierte [71, 72].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte insgesamt beobachtet werden, dass DTCs seltener AR-positiv sind (15 der 50 detektierten DTCs (30 %) und 10 der 26 Patienten (38,5 %)) als der Primärtumor (13 von 21 Patienten, entspricht 61,9 %). In einer Arbeit, welche die ER-Expression zwischen Primärtumor und DTC verglich, waren 12% der DTCs ER-positiv, während 82 % der Primärtumore ER-positiv waren [74]. Eine positive Her2-Expression ist bei DTCs hingegen häufiger zu beobachten als beim Primärtumor [71, 72]. Die Beobachtungen dieser Arbeit unterstützen somit die These, dass DTCs einen besonders aggressiven Klon darstellen [159]. Gemeinsam mit der Erkenntnis, dass DTCs Stammzellmarker exprimieren können, die im Primärtumor nicht zu finden sind, wird hiermit die Theorie der parallelen Progression unterstützt [14, 158].

Der AR-Status von Primärtumor und Metastase hatte in einer Arbeit eine Konkordanz von mehr als 60 % [154]. Geht man davon aus, dass Metastasen aus DTCs entstehen, ist die Diskrepanz zwischen Primärtumor und DTCs in dieser Arbeit interessant, da dann auch eine phänotypische Ähnlichkeit zwischen DTC und Primärtumor eher naheliegend erscheinen würde. Zur genaueren Untersuchung und Klärung dieser Diskrepanz wäre weitere Forschung sinnvoll. Insbesondere würde sich anbieten phänotypische Merkmale nicht nur zwischen

Primärtumor und DTC zu vergleichen, sondern in einer Arbeit die phänotypische Charakterisierung von Primärtumor, DTC und Metastase miteinzubeziehen. So zeigte Wallwiener et. al. in einem Vergleich des Her2-Status von CTCs und Metastasen sowie dem Primärtumor eine Übereinstimmung von Primärtumor und Metastase von 83 %. Die Her2-Expression der CTCs zeigte hingegen eine Übereinstimmung von 74 % zu Metastasen, bzw. von 69 % zum Primärtumor [160].

Phänotypische Unterschiede zwischen Primärtumor und DTCs haben auch potentielle klinische Konsequenzen, falls eine gegen den AR gerichteten Therapie etabliert werden sollte. Dann wäre es zum einen möglich, dass Patienten mit AR-negativem Primärtumor und AR-positiven DTCs von einer gegen den AR-gerichteten Therapie profitieren könnten. Gleichzeitig könnte so auch eine fehlende Eradikation von DTCs bei AR-positivem Primärtumor und AR-negativen DTCs erklärt werden. Inwieweit eine systemische Therapie jedoch grundsätzlich in der Lage ist, DTCs zu eradizieren, und ob eine gegen den AR gerichtete Therapie AR-positive DTCs eradiziert, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden.

4.3 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels einer Immunfluoreszenzmehrfachfärbung gezeigt werden, dass DTCs einen AR exprimieren können. Dabei wurden bei 26 der 77 eingeschlossenen Patienten der AR-Status der DTCs bestimmt. 10 dieser 26 Patienten hatten AR-positive DTCs.

Dabei ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den klassischen klinisch-pathologischen Daten der Patienten oder dem AR-Status des Primärtumors und dem AR-Status der DTCs. In den wenigen Patientinnen mit mehr als einer DTC konnte eine Heterogenität des AR-Status festgestellt werden.

Diese Ergebnisse könnten im Rahmen des großen Interesses an antiandrogenen Therapien beim Mammakarzinom [77, 131, 133, 134] von Bedeutung sein, da sie zum einen eine fehlende Wirksamkeit bei AR-positiven Primärtumoren und AR-negativen DTCs erklären könnten sowie zum anderen einen möglichen Nutzen der gegen den AR gerichteten Therapie bei AR-negativen Tumoren mit AR-positiven DTCs bieten könnten. Die Effektivität einer gegen den AR gerichteten Therapie beim Mammakarzinom - insbesondere auch gegen DTCs – muss jedoch zukünftig noch geklärt werden.

Insgesamt stellte sich jedoch die manuelle Detektion von DTCs als zeitaufwändig dar. Zur Einführung einer spezifischen gegen DTCs gerichteten Therapie in die klinische Praxis wäre zukünftig sicher die Etablierung einer automatisierten Detektionsmethode für DTCs sinnvoll, wie sie bei CTCs mit dem durch die FDA zugelassenen CellSearch®-System durchgeführt wird und bereits in einzelnen Studien zur Detektion von DTCs angewendet wurde [68, 69].

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

Literatur

- 1 *Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft.* Krebs in Deutschland für 2019/2020. 14. Ausgabe.; Berlin, 2023
- 2 *Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A.* 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): 394 – 424
- 3 *Wittekind C (Hrsg).* TNM - Klassifikation maligner Tumoren. 8. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017
- 4 *Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR et al.* Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* 2017; 317(23): 2402
- 5 *Mavaddat N, Peock S, Frost D et al.* Cancer Risks for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results From Prospective Analysis of EMBRACE. *Journal of the National Cancer Institute* 2013; 105(11): 812 – 822
- 6 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.4, 2021, AWMF Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 20.08.2024)
- 7 *Epidemiologisches Krebsregister NRW gGmbH (Hrsg.).* Brustkrebs. Ergebnisse aus dem Reg.-Bez. Münster 1992-2004; 2007: 13 – 24
- 8 *Epidemiologisches Krebsregister Saarland und Epidemiologisches Krebsregister Rheinland-Pfalz (Hrsg.).* Brustkrebs. Daten und Trends zur Inzidenz, Mortalität und Überlebenszeiten im Saarland und in Rheinland-Pfalz. Ergebnisse der epidemiologischen Krebsregister Saarland und Rheinlandpfalz 1998-2000; 2006: 16
- 9 *Li CI, Anderson BO, Daling JR, Moe RE.* Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA* 2003; 289(11): 1421 – 1424
- 10 *Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ.* WHO Classification of Tumours of the Breast. 4th ed.Aufl. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012

- 11 *ELSTON CW, ELLIS IO.* 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): 403 – 410
- 12 *Fisher B, Anderson S, Bryant J et al.* Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *The New England journal of medicine* 2002; 347(16): 1233 – 1241
- 13 *Aguirre-Ghiso JA.* Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature reviews. Cancer* 2007; 7(11): 834 – 846
- 14 *Klein CA.* Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4): 302 – 312
- 15 *Hosseini H, Obradović MMS, Hoffmann M et al.* Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature* 2016; 540(7634): 552 – 558
- 16 *Harper KL, Sosa MS, Entenberg D et al.* Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer. *Nature* 2016; 540(7634): 588 – 592
- 17 *Pagani O, Senkus E, Wood W et al.* International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? *Journal of the National Cancer Institute* 2010; 102(7): 456 – 463
- 18 *Bernard Fisher.* The Evolution of Paradigms for the Management of Breast Cancer: A Personal Perspective. *Cancer Res* 1992; 52(9): 2371 – 2383
- 19 *Kommission „Mamma“ der Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie (AGO).* AGO e. V. in der DGGG e.V. sowie in der DKG e.V. *Guidelines Breast Version 2024.* https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2024/AGO_2024D_Gesamtdatei.pdf (abgerufen am 20.08.2024)
- 20 *Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP et al.* De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Annals of Oncology* 2017; 28(8): 1700 – 1712
- 21 *Adjuvant bisphosphonate treatment in early breast cancer: meta-analyses of individual patient data from randomised trials.* *Lancet (London, England)* 2015; 386(10001): 1353 – 1361

- 22 Schmid P, Cortes J, Dent R et al. Overall Survival with Pembrolizumab in Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. The New England journal of medicine 2024; 391(21): 1981 – 1991
- 23 Schmid P, Cortes J, Puzsai L et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. The New England journal of medicine 2020; 382(9): 810 – 821
- 24 Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. Molecular and cellular biology 2005; 25(21): 9543 – 9553
- 25 Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. The Journal of experimental medicine 2000; 192(7): 1027 – 1034
- 26 Latchman Y, Wood CR, Chernova T et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nature immunology 2001; 2(3): 261 – 268
- 27 Farmer H, McCabe N, Lord CJ et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. Nature 2005; 434(7035): 917 – 921
- 28 Bryant HE, Schultz N, Thomas HD et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. Nature 2005; 434(7035): 913 – 917
- 29 El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. Nucleic Acids Research 2003; 31(19): 5526 – 5533
- 30 Trucco C, Oliver FJ, Murcia G de, Ménissier-de Murcia J. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. Nucleic Acids Research 1998; 26(11): 2644 – 2649
- 31 Litton JK, Rugo HS, Ettl J et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. The New England journal of medicine 2018; 379(8): 753 – 763
- 32 Tutt ANJ, Garber JE, Kaufman B et al. Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer. The New England journal of medicine 2021; 384(25): 2394 – 2405
- 33 Gemeinsamer Bundesausschuss. Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie: Anlage XII – Nutzenbewertung von Arzneimitteln mit neuen Wirkstoffen nach § 35a

- des Fünften Buches Sozialgesetzbuch (SGB V) Sacituzumab govitecan (neues Anwendungsgebiet: Mammakarzinom, HR+, HER2-, mind. 3 Vortherapien). Vom 15.02.2024. https://www.g-ba.de/downloads/39-261-6474/2024-02-15_AM-RL-XII_Sacituzumab-govitecan_D-965_BAnz.pdf - abgerufen am 26.11.2024
- 34 *Gemeinsamer Bundesausschuss*. Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie: Anlage XII – Nutzenbewertung von Arzneimitteln mit neuen Wirkstoffen nach § 35a des Fünften Buches Sozialgesetzbuch (SGB V) Sacituzumab Govitecan (Mammakarzinom, triple-negativ, mindestens 2 Vortherapien). Vom 19.05.2022. https://www.g-ba.de/downloads/39-261-5437/2022-05-19_AM-RL-XII_Sacituzumab%20Govitecan_D-750_BAnz.pdf - abgerufen am 26.11.2024
- 35 *Modi S, Jacot W, Yamashita T et al*. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. The New England journal of medicine 2022; 387(1): 9 – 20
- 36 *Cortés J, Kim S-B, Chung W-P et al*. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. The New England journal of medicine 2022; 386(12): 1143 – 1154
- 37 *Gemeinsamer Bundesausschuss*. Trastuzumab-Deruxtecan (Neues Anwendungsgebiet: Mammakarzinom, HER2-low, inoperabel oder metastasiert, vorbehandelt). Beschluss vom: 20. Juli 2023/9. Januar 2024. https://www.g-ba.de/downloads/91-1385-922/2024-01-09_Geltende-Fassung_Trastuzumab-Deruxtecan_D-905.pdf - abgerufen am 26.11.2026
- 38 *Gemeinsamer Bundesausschuss*. Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie: Anlage XII – Nutzenbewertung von Arzneimitteln mit neuen Wirkstoffen nach § 35a des Fünften Buches Sozialgesetzbuch (SGB V). Trastuzumab-Deruxtecan (neues Anwendungsgebiet: Mammakarzinom, HER2+, nach 1 Vortherapie). Vom 2. Februar 2023. https://www.g-ba.de/downloads/39-261-5859/2023-02-02_AM-RL-XII_Trastuzumab-Deruxtecan_D-836_BAnz.pdf - abgerufen am 26.11.2024
- 39 *Tarantino P, Viale G, Press MF et al*. ESMO expert consensus statements (ECS) on the definition, diagnosis, and management of HER2-low breast

- cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2023; 34(8): 645 – 659
- 40 Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100(13): 7737 – 7742
 - 41 Badia-Ramentol J, Linares J, Gómez-Llonin A, Calon A. Minimal Residual Disease, Metastasis and Immunity. *Biomolecules* 2021; 11(2)
 - 42 Mohme M, Riethdorf S, Pantel K. Circulating and disseminated tumour cells - mechanisms of immune surveillance and escape. *Nature reviews. Clinical oncology* 2017; 14(3): 155 – 167
 - 43 Braun S, Vogl FD, Naume B et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *The New England journal of medicine* 2005; 353(8): 793 – 802
 - 44 Hartkopf AD, Taran F-A, Wallwiener M 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 (Oxford, England : 1990)* 2014; 50(15): 2550 – 2559
 - 45 Schindlbeck C, Pfab G, Jueckstock J et al. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer--results of a standardized follow-up. *Anticancer research* 2011; 31(9): 2749 – 2755
 - 46 Hartkopf AD, Brucker SY, Taran F-A et al. Disseminated tumour cells from the bone marrow of early breast cancer patients: Results from an international pooled analysis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2021; 154: 128 – 137
 - 47 Mathiesen RR, Borgen E, Renolen A et al. Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival. *Breast cancer research : BCR* 2012; 14(4): R117
 - 48 Janni W, Vogl FD, Wiedswang G et al. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011; 17(9): 2967 – 2976

- 49 *Domschke C, Diel IJ, Englert S 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): 1865 – 1871
- 50 *Naume B, Synnestvedt M, Falk RS et al.* Clinical outcome with correlation to disseminated tumor cell (DTC) status after DTC-guided secondary adjuvant treatment with docetaxel in early breast cancer. *JCO* 2014; 32(34): 3848 – 3857
- 51 *Goddard ET, Linde MH, Srivastava S et al.* Immune evasion of dormant disseminated tumor cells is due to their scarcity and can be overcome by T cell immunotherapies. *Cancer cell* 2024; 42(1): 119-134.e12
- 52 *Banys M, Hahn M, Gruber I 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): 531 – 538
- 53 *Sänger N, Effenberger KE, Riethdorf S et al.* Disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ductal carcinoma in situ. *International journal of cancer* 2011; 129(10): 2522 – 2526
- 54 *Allred DC.* Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* 2010; 2010(41): 134 – 138
- 55 *Riethdorf S, Pantel K.* Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 2008; 75(2): 140 – 148
- 56 *Lacroix M.* Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-related cancer* 2006; 13(4): 1033 – 1067
- 57 *Fehm T, Braun S, Muller V et al.* A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* 2006; 107(5): 885 – 892
- 58 *Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH.* An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2019; 1897: 299 – 311
- 59 *Beutner EH.* IMMUNOFLUORESCENT STAINING: THE FLUORESCENT ANTIBODY METHOD. *Bacteriological reviews* 1961; 25(1): 49 – 76

- 60 *Hussaini HM, Seo B, Rich AM.* Immunohistochemistry and Immunofluorescence. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2023; 2588: 439 – 450
- 61 *König T, Dogan S, Höhn AK, Weydandt L, Aktas B, Nel I.* Multi-Parameter Analysis of Disseminated Tumor Cells (DTCs) in Early Breast Cancer Patients with Hormone-Receptor-Positive Tumors. *Cancers* 2023; 15(3)
- 62 *Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jäger W.* Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *JCO* 2001; 19(16): 3669 – 3674
- 63 *Borgen E, Pantel K, Schlimok G et al.* A European interlaboratory testing of three well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow. Results from analysis of normal bone marrow. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 2006; 70(6): 400 – 409
- 64 *Borgen E, Naume B, Nesland JM 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): 377 – 388
- 65 *Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U.* CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology letters* 2018; 196: 22 – 32
- 66 *Schindlbeck C, Andergassen U, Hofmann S et al.* Comparison of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and disseminated tumor cells in the bone marrow (DTC-BM) of breast cancer patients. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2013; 139(6): 1055 – 1062
- 67 *Magbanua MJM, van 't Veer L, Clark AS et al.* Outcomes and clinicopathologic characteristics associated with disseminated tumor cells in bone marrow after neoadjuvant chemotherapy in high-risk early stage breast cancer: the I-SPY SURMOUNT study. *Breast Cancer Res Treat* 2023; 198(2): 383 – 390
- 68 *Swennenhuis JF, van Dalum G, Zeune LL, Terstappen LWMM.* Improving the CellSearch® system. *Expert review of molecular diagnostics* 2016; 16(12): 1291 – 1305
- 69 *Marconato L, Facchinetti A, Zanardello C et al.* Detection and Prognostic Relevance of Circulating and Disseminated Tumour Cell in Dogs with Metastatic Mammary Carcinoma: A Pilot Study. *Cancers* 2019; 11(2)

- 70 Demeulemeester J, Kumar P, Møller EK et al. Tracing the origin of disseminated tumor cells in breast cancer using single-cell sequencing. *Genome biology* 2016; 17(1): 250
- 71 Solomayer EF, Becker S, Pergola-Becker G et al. Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment* 2006; 98(2): 179 – 184
- 72 Hartkopf AD, Banys M, Meier-Stiegen F 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 research and treatment* 2013; 138(2): 509 – 517
- 73 Shimizu H, Takeishi S, Nakatsumi H, Nakayama KI. Prevention of cancer dormancy by Fbxw7 ablation eradicates disseminated tumor cells. *JCI Insight*; 4(4)
- 74 Fehm T, Krawczyk N, Solomayer E-F et al. ERalpha-status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR* 2008; 10(5): R76
- 75 Balic M, Lin H, Young L et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006; 12(19): 5615 – 5621
- 76 Borgen E, Rypdal MC, Sosa MS et al. NR2F1 stratifies dormant disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR* 2018; 20
- 77 Fehm T, Mueller V, Banys-Paluchowski M et al. Efficacy of Lapatinib in Patients with HER2-Negative Metastatic Breast Cancer and HER2-Positive Circulating Tumor Cells-The DETECT III Clinical Trial. *Clinical chemistry* 2024; 70(1): 307 – 318
- 78 Phan TG, Croucher PJ. The dormant cancer cell life cycle. *Nat Rev Cancer* 2020; 20(7): 398 – 411
- 79 Braun S, Kantenich C, Janni W 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. *JCO* 2000; 18(1): 80 – 86
- 80 Naumov GN, Townson JL, MacDonald IC et al. Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82(3): 199 – 206

- 81 *Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI.* Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* 2001; 413(6853): 316 – 322
- 82 *Yada M, Hatakeyama S, Kamura T et al.* Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *The EMBO journal* 2004; 23(10): 2116 – 2125
- 83 *Welcker M, Orian A, Jin J et al.* The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101(24): 9085 – 9090
- 84 *Yeh C-H, Bellon M, Nicot C.* FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Molecular cancer* 2018; 17(1): 115
- 85 *Xia W, Zhou J, Luo H et al.* MicroRNA-32 promotes cell proliferation, migration and suppresses apoptosis in breast cancer cells by targeting FBXW7. *Cancer cell international* 2017; 17: 14
- 86 *Bidard F-C, Fehm T, Ignatiadis M et al.* Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. *Cancer metastasis reviews* 2013; 32(1-2): 179 – 188
- 87 *Bernhard H, Neudorfer J, Gebhard K et al.* Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2008; 57(2): 271 – 280
- 88 *Rack B, Jückstock J, Günthner-Biller M et al.* Trastuzumab clears HER2/neu-positive isolated tumor cells from bone marrow in primary breast cancer patients. *Archives of gynecology and obstetrics* 2012; 285(2): 485 – 492
- 89 *Banys M, Solomayer E-F, Gebauer G 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: 480
- 90 *Hoffmann O, Aktas B, Goldnau C et al.* Effect of ibandronate on disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer: a pilot study. *Anticancer research* 2011; 31(10): 3623 – 3628
- 91 *Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD et al.* Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *The New England journal of medicine* 1998; 339(6): 357 – 363

- 92 *Powles T, Paterson A, McCloskey E et al.* Reduction in bone relapse and improved survival with oral clodronate for adjuvant treatment of operable breast cancer ISRCTN83688026. *Breast cancer research : BCR* 2006; 8(2): R13
- 93 *Diel IJ, Jaschke A, Solomayer EF et al.* Adjuvant oral clodronate improves the overall survival of primary breast cancer patients with micrometastases to the bone marrow: a long-term follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2008; 19(12): 2007 – 2011
- 94 *Gelmann EP.* Molecular biology of the androgen receptor. *JCO* 2002; 20(13): 3001 – 3015
- 95 *Beyenburg S, Watzka M, Clusmann H et al.* Androgen receptor mRNA expression in the human hippocampus. *Neuroscience Letters* 2000; 294(1): 25 – 28
- 96 *Kadi F, Bonnerud P, Eriksson A, Thornell LE.* The expression of androgen receptors in human neck and limb muscles: effects of training and self-administration of androgenic-anabolic steroids. *Histochemistry and cell biology* 2000; 113(1): 25 – 29
- 97 *Janssen PJ, Brinkmann AO, Boersma WJ, van der Kwast TH.* Immunohistochemical detection of the androgen receptor with monoclonal antibody F39.4 in routinely processed, paraffin-embedded human tissues after microwave pre-treatment. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1994; 42(8): 1169 – 1175
- 98 *Wilbert DM, Griffin JE, Wilson JD.* Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1983; 56(1): 113 – 120
- 99 *BLOCH E.* METABOLISM OF 4-14C-PROGESTERONE BY HUMAN FETAL TESTIS AND OVARIES. *Endocrinology* 1964; 74: 833 – 845
- 100 *Burger HG.* Androgen production in women. *Fertility and sterility* 2002; 77: 3 – 5
- 101 *Davison B, Large DM, Anderson DC, Robertson WR.* Basal steroid production by the zona reticularis of the guinea-pig adrenal cortex. *Journal of Steroid Biochemistry* 1983; 18(3): 285 – 290

- 102 *Wilson JD, George FW, Griffin JE.* The hormonal control of sexual development. *Science* 1981; 211(4488): 1278 – 1284
- 103 *PHOENIX CH, GOY RW, GERALL AA, YOUNG WC.* Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 1959; 65: 369 – 382
- 104 *van der Kwast TH, Schalken J, Ruizeveld de Winter JA et al.* Androgen receptors in endocrine-therapy-resistant human prostate cancer. *International journal of cancer* 1991; 48(2): 189 – 193
- 105 *Hobisch A, Culig Z, Radmayr C, Bartsch G, Klocker H, Hittmair A.* Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer research* 1995; 55(14): 3068 – 3072
- 106 *Ruizeveld de Winter JA, Janssen PJ, Sleddens HM et al.* Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *The American Journal of Pathology* 1994; 144(4): 735 – 746
- 107 *Bonkhoff H.* Differenzialdiagnose des Prostatakarzinoms. Rolle der Mustererkennung und der Immunhistochemie. *Der Pathologe* 2005; 26(6): 405 – 421
- 108 *Huggins C, Hodges CV.* Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res* 1941; 1(4): 293 – 297
- 109 *Huggins C.* STUDIES ON PROSTATIC CANCER. *Arch Surg* 1941; 43(2): 209
- 110 *Labrie F, Cusan L, Séguin C et al.* Antifertility effects of LHRH agonists in the male rat and inhibition of testicular steroidogenesis in man. *International journal of fertility* 1980; 25(3): 157 – 170
- 111 *Behre HM, Klein B, Steinmeyer E, McGregor GP, Voigt K, Nieschlag E.* Effective suppression of luteinizing hormone and testosterone by single doses of the new gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix (SB-75) in normal men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1992; 75(2): 393 – 398
- 112 *Neri RO, Monahan MD, Meyer JG, Afonso BA, Tabachnick IA.* Biological studies on an anti-androgen (SH 714). *European journal of pharmacology* 1967; 1(5): 438 – 444

- 113 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.2, 2021, AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/>(abgerufen am: 04.12.2021)
- 114 *Hirst CJ, Cabrera C, Kirby M.* Epidemiology of castration resistant prostate cancer: a longitudinal analysis using a UK primary care database. *Cancer epidemiology* 2012; 36(6): e349-53
- 115 *Nguyen PL, Alibhai SMH, Basaria S et al.* Adverse effects of androgen deprivation therapy and strategies to mitigate them. *European urology* 2015; 67(5): 825 – 836
- 116 *Collins LC, Cole KS, Marotti JD, Hu R, Schnitt SJ, Tamimi RM.* Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2011; 24(7): 924 – 931
- 117 *Vera-Badillo FE, Templeton AJ, Gouveia P de et al.* Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 2014; 106(1): djt319
- 118 *Xu M, Yuan Y, Yan P et al.* Prognostic Significance of Androgen Receptor Expression in Triple Negative Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical breast cancer* 2020; 20(4): e385-e396
- 119 *Bozovic-Spasojevic I, Zardavas D, Brohée S et al.* The Prognostic Role of Androgen Receptor in Patients with Early-Stage Breast Cancer: A Meta-analysis of Clinical and Gene Expression Data. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2017; 23(11): 2702 – 2712
- 120 *Rangel N, Rondon-Lagos M, Annaratone L et al.* The role of the AR/ER ratio in ER-positive breast cancer patients. *Endocrine-related cancer* 2018; 25(3): 163 – 172
- 121 *Andò S, Amicis F de, Rago V et al.* Breast cancer: from estrogen to androgen receptor. *Molecular and cellular endocrinology* 2002; 193(1-2): 121 – 128

- 122 *Hickey TE, Selth LA, Chia KM et al.* The androgen receptor is a tumor suppressor in estrogen receptor-positive breast cancer. *Nature medicine* 2021; 27(2): 310 – 320
- 123 *Naderi A, Hughes-Davies L.* A functionally significant cross-talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer. *Neoplasia* 2008; 10(6): 542 – 548
- 124 *Giovannelli P, Di Donato M, Galasso G, Di Zazzo E, Bilancio A, Migliaccio A.* The Androgen Receptor in Breast Cancer. *Front. Endocrinol.* 2018; 9: 492
- 125 *Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA et al.* Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* 2015; 14(3): 769 – 778
- 126 *Dieci MV, Tsvetkova V, Griguolo G et al.* Androgen Receptor Expression and Association With Distant Disease-Free Survival in Triple Negative Breast Cancer:. Analysis of 263 Patients Treated With Standard Therapy for Stage I-III Disease. *Frontiers in oncology* 2019; 9: 452
- 127 *Krawczyk N, Neubacher M, Meier-Stiegen F et al.* Determination of the androgen receptor status of circulating tumour cells in metastatic breast cancer patients. *BMC cancer* 2019; 19(1): 1101
- 128 *Kruijff IE de, Sieuwerts AM, Onstenk W et al.* Androgen receptor expression in circulating tumor cells of patients with metastatic breast cancer. *International journal of cancer* 2019;
- 129 *ClinicalTrials.gov Identifikator: NCT06099769*
- 130 *Wardley A, Cortes J, Provencher L et al.* The efficacy and safety of enzalutamide with trastuzumab in patients with HER2+ and androgen receptor-positive metastatic or locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2021; 187(1): 155 – 165
- 131 *Yuan Y, Lee JS, Yost SE et al.* A Phase II Clinical Trial of Pembrolizumab and Enobosarm in Patients with Androgen Receptor-Positive Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *The oncologist* 2021; 26(2): 99-e217
- 132 *Narayanan R, Ahn S, Cheney MD et al.* Selective androgen receptor modulators (SARMs) negatively regulate triple-negative breast cancer growth and epithelial:mesenchymal stem cell signaling. *PloS one* 2014; 9(7): e103202

- 133 *Bonnefoi H, Grellety T, Tredan O et al.* A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). *Annals of Oncology* 2016; 27(5): 812 – 818
- 134 *Traina TA, Miller K, Yardley DA et al.* Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor–Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *JCO* 2018; 36(9): 884 – 890
- 135 *Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF.* Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International journal of cancer* 1978; 21(3): 274 – 281
- 136 *Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E et al.* LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research* 1983; 43(4): 1809 – 1818
- 137 *Kapuscinski J.* DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 1995; 70(5): 220 – 233
- 138 *Hislop TG, Elwood JM, Coldman AJ, Spinelli JJ, Worth AJ, Ellison LG.* Second primary cancers of the breast: incidence and risk factors. *Br J Cancer* 1984; 49(1): 79 – 85
- 139 *Huang E, Buchholz TA, Meric F et al.* Classifying local disease recurrences after breast conservation therapy based on location and histology: new primary tumors have more favorable outcomes than true local disease recurrences. *Cancer* 2002; 95(10): 2059 – 2067
- 140 *Gerber B, Hartmann S, Stachs A.* Treatment of Ipsilateral Breast Cancer Recurrence (IBCR) after Breast Conservation Therapy (BCT). *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* 2021; 18(02): 126 – 135
- 141 *Effenberger KE, Borgen E, Eulenburger C zu 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): 729 – 738
- 142 *Schindlbeck C, Jeschke U, Schulze S et al.* Characterisation of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich tumor antigen. *Histochemistry and cell biology* 2005; 123(6): 631 – 637

- 143 *Choesmel V, Pierga J-Y, Nos C et al.* Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance. Breast cancer research : BCR 2004; 6(5): R556-70
- 144 *Pierga J-Y, Bonneton C, Vincent-Salomon A et al.* Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2004; 10(4): 1392 – 1400
- 145 *Teoh PY, Tan GC, Mahsin H, Wong YP.* Androgen receptor expression in triple negative breast carcinoma and its association with the clinicopathological parameters. The Malaysian journal of pathology 2019; 41(2): 125 – 132
- 146 *Astvatsaturyan K, Yue Y, Walts AE, Bose S.* Androgen receptor positive triple negative breast cancer: Clinicopathologic, prognostic, and predictive features. PloS one 2018; 13(6): e0197827
- 147 *Park S, Koo J, Park HS et al.* Expression of androgen receptors in primary breast cancer. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 2010; 21(3): 488 – 492
- 148 *Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ et al.* Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2013; 19(19): 5505 – 5512
- 149 *Fujii T, Reuben JM, Huo L et al.* Androgen receptor expression on circulating tumor cells in metastatic breast cancer. PloS one 2017; 12(9): e0185231
- 150 *Isola JJ.* Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. The Journal of pathology 1993; 170(1): 31 – 35
- 151 *Loibl S, Müller BM, Minckwitz G von et al.* Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Breast cancer research and treatment 2011; 130(2): 477 – 487

- 152 *Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F.* Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal* 2005; 46(3): 258 – 268
- 153 *Pinheiro C, Roque R, Adriano A et al.* Optimization of immunocytochemistry in cytology: comparison of two protocols for fixation and preservation on cytospin and smear preparations. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology* 2015; 26(1): 38 – 43
- 154 *Bronte G, Bravaccini S, Ravaioli S et al.* Androgen Receptor Expression in Breast Cancer: What Differences Between Primary Tumor and Metastases? *Translational oncology* 2018; 11(4): 950 – 956
- 155 *Gasparini P, Fassan M, Cascione L et al.* Androgen receptor status is a prognostic marker in non-basal triple negative breast cancers and determines novel therapeutic options. *PloS one* 2014; 9(2): e88525
- 156 *Møller EK, Kumar P, Voet T et al.* Next-generation sequencing of disseminated tumor cells. *Frontiers in oncology* 2013; 3: 320
- 157 *Magbanua MJM, Rugo HS, Hauranieh L et al.* Genomic and expression profiling reveal molecular heterogeneity of disseminated tumor cells in bone marrow of early breast cancer. *NPJ breast cancer* 2018; 4: 31
- 158 *Krawczyk N, Janowski K, Banys-Paluchowski M et al.* The SOX2 Status of Disseminated Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated With Neoadjuvant Chemotherapy. *Anticancer research* 2021; 41(6): 2849 – 2858
- 159 *Marsden CG, Wright MJ, Carrier L, Moroz K, Rowan BG.* Disseminated breast cancer cells acquire a highly malignant and aggressive metastatic phenotype during metastatic latency in the bone. *PLOS ONE* 2012; 7(11): e47587
- 160 *Wallwiener M, Hartkopf AD, Riethdorf S et al.* The impact of HER2 phenotype of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a retrospective study in 107 patients. *BMC cancer* 2015; 15: 403

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Personen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Tanja Fehm bedanken, deren Unterstützung ich im Rahmen dieser Arbeit stets sicher sein konnte.

Meiner Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. med. Natalia Krawczyk danke ich für die maßgebliche Unterstützung von Beginn bis zur Fertigstellung der Arbeit sowie die Erfahrung auf dem Gebiet der disseminierten Tumorzellerkrankung.

Für die Betreuung in den Forschungslaboren der Frauenklinik und die Einführung in die Laborarbeit möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Franziska-Meier-Stiegen bedanken.

Daneben gilt ein besonderer Dank dem gesamten Team der Forschungslabore der Frauenklinik, bei denen stets eine offene Tür für Fragen und Diskussionen war und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht hätte bewerkstelligt werden können. Namentlich hervorzuheben sind hier Herr Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer sowie Ulla und Dorothee.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Irene Esposito und insbesondere bei Frau Dr. med. Christina Lopez-Cotarelo möchte ich mich für die zuverlässige Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Eltern gilt ein Riesen Dank dafür, dass sie mich stets unterstützt und mich darin bestärkt haben meinen eigenen Weg zu gehen. Meinen beiden Brüdern möchte ich dafür danken, dass sie immer hinter mir stehen.

Schließlich geht ein herzliches Dankeschön an meinen Ehemann und unsere Kinder, die durch die viele Zeit, welche diese Arbeit beansprucht hat, wohl die größten Entbehrungen hatten. Trotzdem konnte ich mir bei euch stets sicher sein, dass ihr mir ein Lächeln ins Gesicht zaubert. Danke euch dafür und für so vieles, das ich nicht in Worte fassen kann.