

# Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen

Wolfgang Janni<sup>1</sup>

Klaus Pantel<sup>2</sup>, Brigitte Rack<sup>1</sup>

Christian Schindlbeck<sup>1</sup>

Harald Sommer<sup>1</sup>, Bernd Gerber<sup>3</sup>

Klaus Friese<sup>1</sup>

Methodik, Biologie und klinische Relevanz

## Zusammenfassung

Trotz wesentlicher Fortschritte in der systemischen Therapie des Mammakarzinoms und deutlicher Prognoseverbesserung sind Rezidive nach oft langer Latenzzeit für diese Erkrankung charakteristisch. Ausgangspunkt für eine Fernmetastasierung sind meist isolierte Tumorzellen, die bereits früh im Verlauf der Erkrankung hämatogen disseminieren. Der Nachweis dieser minimalen Tumorresiduen (MRD, „minimal residual disease“) ist mit konventionellen bildgebenden Verfahren nicht möglich. Der immunzytochemische Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark ist die am besten etablierte Methode, um Tumorresiduen zu erkennen. Die daraus gewonnenen Informationen über Prävalenz und Phänotyp der Tumorzellen lassen Rückschlüsse auf die Tumorbiologie und individuelle Prognose zu und könnten künftig in der adjuvanten Situation zu einer Optimierung der Therapie führen. Die immunzyto-

chemische Untersuchung des Knochenmarks könnte die Beantwortung der von Patientinnen häufig gestellten Frage nach dem individuellen Erfolg adjuvanter Therapien in Zukunft erleichtern und Grundlage für die Einleitung einer sekundär adjuvanten Therapie im Rahmen der onkologischen Nachsorge sein.

**Schlüsselwörter:** Mammakarzinom, Metastasierung, Krebsdiagnostik, Prognose, Krebstherapie

## Summary

### Hematogeneous Dissemination of Isolated Tumour Cells in Breast Cancer Patients

Despite significant advances in the systemic treatment of breast cancer and more favourable prognosis, the late occurrence of relapses is typical for this disease. Hematogeneous dissemination of isolated tumour cells to pe-

ripheral compartments of the body seems to be the origin for subsequent distant metastases. This type of minimal residual disease (MRD) of solid tumours cannot be detected by conventional imaging. The immunocytochemical detection of isolated tumour cells in the bone marrow represents the most established method to monitor minimal tumour residuals to date. Information about prevalence and phenotype of isolated tumour cells might characterize tumour biology, indicates individual prognosis and might facilitate the optimization of adjuvant therapy in future. The immunocytochemical detection of isolated tumour cells during the follow-up of patients might help to answer the individual patients' question about the efficacy of adjuvant treatment and might lead to 'secondary adjuvant' treatment strategies.

**Key words:** breast cancer, metastasis, cancer diagnosis, prognosis, cancer therapy

Nach einer Schätzung von Sir Richard Peto, dem Leiter der Oxford Metaanalysen (EBCTCG), aus denen die derzeit verlässlichsten Überlebensdaten beim Mammakarzinom hervorgehen, wird durch die Erkenntnisse der letzten 20 Jahre die Brustkrebssterblichkeit im Jahre 2010 um die Hälfte geringer sein, als ohne diesen Fortschritt (52). Diese erfreuliche Perspektive ist zum einen darauf zurückzuführen, dass bösartige Brusttumoren heute in einem früheren und damit prognostisch günstigeren Stadium diagnostiziert werden als noch vor einigen Jahrzehnten (31, 43, 44), und zum anderen darauf, dass die beim Mammakarzinom besonders wichtige Systemtherapie zu einer wesentlichen Verlängerung des Überlebens beigetragen hat (19).

Folgerichtig wird die Mehrheit der Brustkrebspatientinnen nach den aktuellen Therapierichtlinien neoadjuvant oder adjuvant systemisch thera-

piert (27). Prognosefaktoren wie die Tumorgöße, der axilläre Nodalstatus und das histopathologische Grading ermöglichen zwar eine grobe Risikoeinschätzung für das Auftreten eines Tumorrezidivs, lassen aber eine individuelle Diskriminierung der Therapiebedürftigkeit nicht zu. Nicht zuletzt muss die in der adjuvanten Situation von Patientinnen häufig gestellte Frage nach dem individuellen Therapieerfolg in der Regel bis zum späteren Auftreten eines Rezidivs offen bleiben. Die Entdeckung von minimalen Tumorresiduen bis hin zur Einzelzelle könnte möglicherweise künftig zu einer verbesserten Individualisierung der Therapie beim Mammakarzinom führen (45).

<sup>1</sup> I. Frauenklinik Innenstadt (Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese), Ludwig-Maximilians-Universität, München

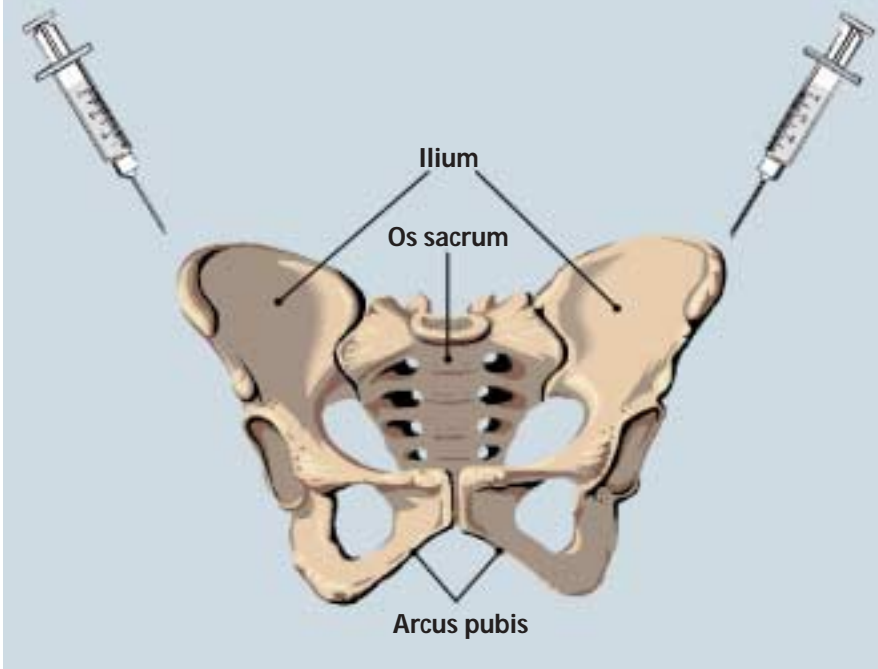
<sup>2</sup> Institut für Tumorbiologie (Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pantel), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

<sup>3</sup> Frauenklinik im Südstadtklinikum (Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Gerber), Universität Rostock

## Detektion isolierter Tumorzellen im Knochenmark

Die Genfamilie der Zytokeratine (CK), die als Marker für disseminierte Karzinomzellen im Knochenmark, Blut und in Lymphknoten eingesetzt werden, besteht aus mehr als 20 Mitgliedern. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass individuelle CK-Proteine in epithelialen Tumorzellen sehr heterogen exprimiert werden (77) und klassenspezifische Antikörper oder Gemische von Antikörpern, die so mehrere CK-Proteine erkennen, in der diagnostischen Sensitivität monospezifischen Antikörpern überlegen sind. In den Studien der Autoren wurde der monoklonale Antikörper A45-B/B3, der unter anderem gegen Heterodimere aus CK-8/18 und CK-8/19 gerichtet ist, eingesetzt (*Grafik 1, Abbildungen 1 und 2*) (8). In umfangreichen Kontrollexperimenten an

Grafik 1



Punktionsstellen beider Beckenkämme

Knochenmarkproben von fast 200 Patienten ohne nachweisbares Karzinom wurde belegt, dass normale Knochenmarkzellen in 99 Prozent der Proben nicht mit A45-B/B3 reagieren (8). Darüber hinaus wurde durch aufwendige molekulare Charakterisierungsmethoden nachgewiesen, dass es sich bei den meisten A45-B/B3-positiven Zellen im Knochenmark um Tumorzellen handelt (24, 33, 66). In einer umfassenden klinischen Verlaufskontrollstudie an mehr als 500 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom konnten die Autoren die prognostische Relevanz von A45-B/B3-positiven Zellen im Knochenmark demonstrieren.

Neben dem immunzytochemischen Ansatz ist die RT-PCR (reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) das zweite Standardverfahren, um einzelne disseminierte Tumorzellen mit einer ausreichenden Sensitivität nachzuweisen. Um die Spezifität dieser Methode zu überprüfen, wurde in vielen Laboratorien eine Reihe von Oligonukleotidpaaren (Primer) für organspezifische mRNA-Spezies auf ihre ektope Expression in Knochenmarkzellen gesunder Personen geprüft. Diese Analysen zeigten, dass einige der als tumorspezifisch publizierten mRNA-Spezies, wie

beispielsweise das „Carcinoembryonic antigen“ (CEA), erbB2-Onkogen, prostataspezifisches Membranantigen, CK18-mRNA, durchaus in „normalen“ Knochenmarkzellen nachgewiesen werden können (4, 79). Diese so genannte ektope (oder illegitime) Expression ist momentan eine der wesentlichen Limitationen beim Einsatz der hochempfindlichen RT-PCR-Methode zur Detektion einzelner, disseminierter Tumorzellen, da man im Gegensatz zur immunozytologischen Methode kein morphologisches Korrelat hat.

Ein Ausweg aus diesem Dilemma könnte die Etablierung quantitativer RT-PCR-Verfahren sein, bei denen man einen Grenzwert ermittelt, der eine Trennung zwischen der Expression in Tumorzellen und der „normalen“ ektopen Expression in den umgebenden hämatopoetischen Zellen ermöglichen soll. Darüber hinaus können hämatopoetische Zellen (beispielsweise Granulozyten), die bei bestimmten PCR-Verfahren für das störende falsch-positive Signal verantwortlich sind, mit verbesserten Trennverfahren eliminiert werden.

Für beide Nachweisverfahren gilt, dass für die Etablierung in der klini-

schen Praxis eine Reihe umfangreicher Kontrollen notwendig ist. Außerdem ist für eine Standardisierung der Verfahren eine Qualitätssicherung erforderlich. In verschiedenen internationalen Arbeitsgruppen wurden hierzu Ringexperimente, die unter anderem von einem der Autoren (Klaus Pantel) mit initiiert worden sind, durchgeführt, und es wurden dann entsprechende Richtlinien zur korrekten Anwendung der Testsysteme publiziert (2, 36). Diese hochsensitiven Testverfahren verlangen eine langjährige Expertise, die durch exzellente Publikationen und die Teilnahme an Qualitätszirkeln dokumentiert sein sollte.

Die geringe Konzentration disseminierter Tumorzellen im Knochenmark (üblicherweise ein bis zehn Tumorzellen pro  $10^6$  mononukleärer Zellen), und die damit zur Verfügung stehende geringe Anzahl von Tumorzellen, schränkt deren nachfolgende Charakterisierung erheblich ein. Unabhängig von der Analyseverfahren wäre eine möglichst große Ausbeute an Tumorzellen wünschenswert. Deshalb wurde eine Reihe neuer Anreicherungsverfahren etabliert. So gelingt unter Verwendung immunomagnetischer Partikel die Anreicherung disseminierter Tumorzellen direkt aus dem Knochenmark und Blut. Die immunomagnetischen Partikel erlauben die Kopplung eines Antikörpers oder Antikörpergemisches zur spezifischen Anreicherung eines bestimmten Zelltyps. Prinzipiell ist sowohl eine Positivanreicherung (Bindung der Tumorzellen an die magnetischen Partikel) als auch eine Abreicherung (Bindung der hämatopoetischen Zellen an die magnetischen Partikel) möglich.

### Biologische Charakteristika des Primärtumors und der isolierten Tumorzellen

Epitheliale Zellen im Knochenmark sind – so die Hypothese – ein Indikator einer hämatogenen Streuung des Primärtumors. Bei der Analyse der Tumorhistologie überrascht es nicht, dass die meisten Arbeitsgruppen einen Zusammenhang von isolierten Tumorzellen im Knochenmark mit der Tumorgroße, dem axillären Lymphknotenbe-

fall, dem Grading (8), einer Hämangio-sis carcinomatosa (21, 62) und zum Teil negativem Hormonrezeptorstatus gefunden haben, also ungünstige Eigenschaften des Primärtumors (75). Die weitere Charakterisierung des Primärtumors und der isolierten Tumorzellen könnte klären, welche tumorbiologischen Faktoren eine hämatogene Dissemination begünstigen und welche Eigenschaften hierbei weitergegeben, verloren oder neu erworben werden. Dies kann mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) und der „comparative genome hybridisation“ (CGH) genetisch untersucht werden (33). Für den klinischen Einsatz, auch im Hinblick auf die Identifikation von Risikogruppen, und die Planung entsprechender neuer Therapieoptionen, ist die Charakterisierung mittels Immunhistochemie (IHC) oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation (FISH) eine sinnvolle Alternative (55).

Ein wichtiger tumorbiologischer Faktor beim Mammakarzinom ist HER2-neu, vor allem als Angriffsziel einer Antikörpertherapie mit Trastuzumab. Die Amplifikation des HER2-Genabschnittes führt mit einer Tyrosinkinase zu vermehrter Mitoseaktivität, Zellwachstum und möglicherweise auch zu einer Disseminierung (78). Zur Frage des Zusammenhangs mit dem Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark gibt es nur wenige Untersuchungen, wobei lediglich in einer Arbeit HER2-Positivität des Primärtumors mit der Präsenz von isolierten Tumorzellen korrelierte (42).

In einer neueren Studie mit 327 Patientinnen mit bekanntem Knochenmarkbefund wurde der HER2-Status des Primärtumors mit IHC und FISH analysiert (63). Hierbei zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen Knochenmarkbefund und HER2-Status des Primärtumors. Nach einem medianen Follow-up von 43 Monaten war eine HER2-Positivität signifikant mit dem Lokalrezidivrisiko assoziiert ( $p = 0,003$ ), nicht jedoch mit dem Gesamtüberleben. Allerdings korrelierte die Anwesenheit von isolierten Tumorzellen mit Fernmetastasierung und einem letalen Krankheitsverlauf ( $p = 0,026$  beziehungsweise  $0,024$ ). Diese Ergebnisse bestätigten sich in verschiedenen adjuvanten Therapiegruppen.



Abbildung 1: Zentrifugenröhrchen nach Zentrifugation mit Dichtegradienten Ficoll-Hypaque in Gesamtansicht (links) und Detailansicht (rechts)

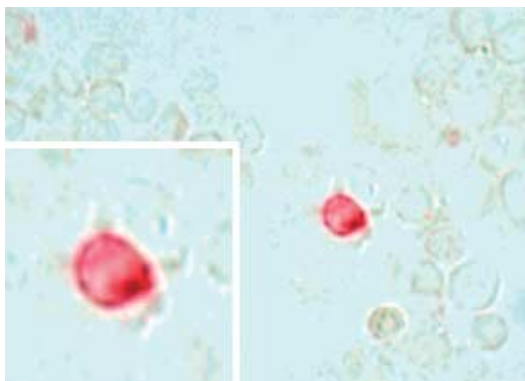


Abbildung 2: Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle im Knochenmarkspirat (mit Detailansicht)

Eine wichtige Voraussetzung für Tumor- und Metastasenwachstum ist eine entsprechende Gefäßversorgung und Neoangiogenese (35). In einer Publikation zum „platelet cell adhesion molecule“ (PECAM/CD 31) wurde festgestellt, dass dieses Merkmal in 34 Prozent der Fälle vorkam und lediglich mit dem Lymphknotenbefall, nicht jedoch mit dem Knochenmarkbefund korrelierte (60). Als weiterer Faktor wurde der Adhäsionsmarker CD44v6 untersucht. Die Zellarchitektur in einem Gewebeverband wird durch spezifische Adhäsionen zwischen Epithelzellen, myoepithelialen Zellen und extrazellulärer Matrix determiniert. Eine Veränderung dieser Architektur bietet die Voraussetzung für Zellinvasion, neoplastische Transformation und schließlich Metastasierung. (29) In einer Untersuchung an 210 Patientinnen konnte jedoch auch hier keine Korrelation zwischen CD44v6-Expression (positiv bei 72 Prozent der Fälle) und der Präsenz von isolierten Tumorzellen nachgewiesen werden (61).

Das nukleäre Enzym Topoisomerase II spielt eine wichtige Rolle bei der

DNA-Replikation sowie Mitose und ist Angriffsziel von Anthrazyklinen. Somit scheint dieser Faktor vor allem einen prädiktiven Wert für das Ansprechen anthrazyklinhaltiger Chemotherapien zu besitzen und wird in letzter Zeit untersucht (11, 37, 51, 58). Bei der Topoisomerase-II-Bestimmung mittels IHC und FISH an Tumorgewebe von 54 Patientinnen vor und nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie bestand zwar kein eindeutiger Zusammenhang mit dem Nachweis von isolierten Tumorzellen, jedoch zeigten Patienten mit Topoisomerase-II-positiven Tumoren einen Trend zu längerem rezidivfreiem Überleben (64). Weitere zurzeit untersuchte Faktoren sind der Proliferationsfaktor KI 67 sowie Mutationen des Tumorsuppressorgens p53. Insgesamt ist es aber schwierig, einen singulären Zusammenhang zwischen einzelnen tu-

morbiologischen Faktoren und dem Nachweis hämatogener Tumorzell-dissemination herzustellen. Vermutlich ist dies das Ergebnis eines multifaktoriellen Geschehens.

Erstrebenswert wäre die direkte Analyse tumorbiologischer Faktoren auf den isolierten Tumorzellen, vor allem in Hinblick auf mögliche therapeutische Konsequenzen. Dies ist aber vor allem aufgrund der geringen Zellzahl nur schwer zu realisieren. Die bisherigen immunhistochemischen Mehrfach-färbungen belegen, dass es sich bei den disseminierten Tumorzellen um ruhende, nicht proliferierende Zellen mit niedriger KI-67-Expression handelt (50). Diese Charakteristik würde die teilweise extrem langen Latenzzeiten zwischen Primärdiagnose der Krebserkrankung und Metastasierung, wie man sie vor allem beim Mammakarzinom findet, erklären (32). Die Expression bestimmter Onkogene (wie HER2/neu) scheint dagegen zum Teil höher als im Primärtumor zu sein (9, 47, 48), sodass eine Selektion beim Vorgang der Tumorzell-dissemination anzunehmen ist. Kürzlich wurde mittels cDNA-Ar-

rays gezeigt, dass die hämatogene Tumorzell dissemination im Knochenmark mit einer spezifischen Expressions signatur des Primarius assoziiert ist, die sich von Primärtumoren mit hauptsächlich lymphogener Metastasierung unterscheidet. Zudem ist diese Signatur von derjenigen, die mit einem positiven LK-Status assoziiert ist, deutlich verschieden (76). Dies könnte erklären, warum in früheren Arbeiten nur selten der Nachweis einer gleichzeitigen Disseminierung in axilläre Lymphknoten und Knochenmark erbracht werden konnte (5, 12).

Zur weiteren Charakterisierung von isolierten Tumorzellen lässt sich inzwischen die immunzytochemische Untersuchung auf Zytokeratin und FISH kombinieren, wobei derzeit hauptsächlich HER2 und Topoisomerase II untersucht werden. Mit dieser Methode sind auch Analysen weiterer tumorbiologischer Faktoren denkbar. Aufgrund methodischer Probleme und zur Erlangung repräsentativer Aussagen erscheint die Kombination mit einer Tumorzellanreicherung, zum Beispiel durch Immunomagnetabsorption, wünschenswert.

### Prognostische Relevanz isolierter Tumorzellen

Bei etwa einem Drittel nodalnegativer Patientinnen mit Mammakarzinom metastasiert im weiteren Verlauf der Erkrankung der Tumor, obwohl zum Zeitpunkt der Primärdiagnose keine Tumorzell dissemination in die axillären Lymphknoten nachgewiesen werden konnte (16, 57). Diese Metastasierung wird vermutlich von einer frühzeitig in der Erkrankung auftretenden, okkulten hämatogenen Streuung von Tumorzellen verursacht. Die Ergebnisse mehre-

Tabelle

Prognostische Bedeutung isolierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom zum Zeitpunkt der Primärdiagnose vor anthrazyklinhaltiger Chemotherapie

Publikation	Patientinnen (Anzahl)	Detektionsrate (Prozent)	Marker	Material	Technik	Prognostische Relevanz
Schlimok et al. (65)	155	18	CK18	Zytospin	ICC	DDFS
Porro et al. (53)	159	16	Glycolipid	Biopsie	ICC	nein
Salvadori et al. (59)	121	17	Glycolipid	Biopsie	ICC	nein
Mathieu et al. (59)	93	1	CK	Biopsie	ICC	nein
Courtemanche et al. (14)	50	8	Mucin	Biopsie	ICC	nein
Singletary et al. (67)	71	38	Mucin/CK	Zellausstrich	ICC	nein
Cote et al. (13)	49	37	Mucin/CK	Zellausstrich	ICC	DFS, OS
Harbeck et al. (28)	100	38	Mucin/CK	Zellausstrich	ICC	DFS, OS <sup>*1</sup>
Diel et al. (17)	727	43	Mucin	Zellausstrich	ICC	DFS, OS <sup>*1</sup>
Funke et al. (22)	234	38	CK18	Zytospin	ICC	n.d.
Molino et al. (41)	109	38	Glycolipid	Zytospin	ICC	nein
Landys et al. (34)	128	19	CK	Biopsie	ICC	DFS, OS <sup>*1</sup>
Untch et al. (70)	581	28	CK18	Zytospin	ICC	nein
Mansi et al. (38)	350	25	Mucin	Zellausstrich	ICC	DFS, OS
Braun et al. (8)	552	36	CK	Zytospin	ICC	DDFS, OS <sup>*1</sup>
Gerber et al. (26)	554	31	CK	Zytospin	ICC	DFS, OS <sup>*1</sup>
Gebauer et al. (25)	393	42	Mucin/CK	Zellausstrich	ICC	DFS <sup>*1</sup> , OS
Datta et al. (15)	34	26	CK19	–	RT-PCR	DFS
Fields et al. (20)	83	71	CK19	–	RT-PCR	DFS
Vannucchi et al. (72)	33	48	CK19	–	RT-PCR	DFS
Slade et al. (68)	23	61	CK19	–	RT-PCR	nein
Wiedswang et al. (75)	817	13	CK	Zytospin	ICC	DDFS, OS <sup>*1</sup>
Braun et al. (10)	4 199	30	CK	Zytospin	ICC	OS <sup>*1</sup>

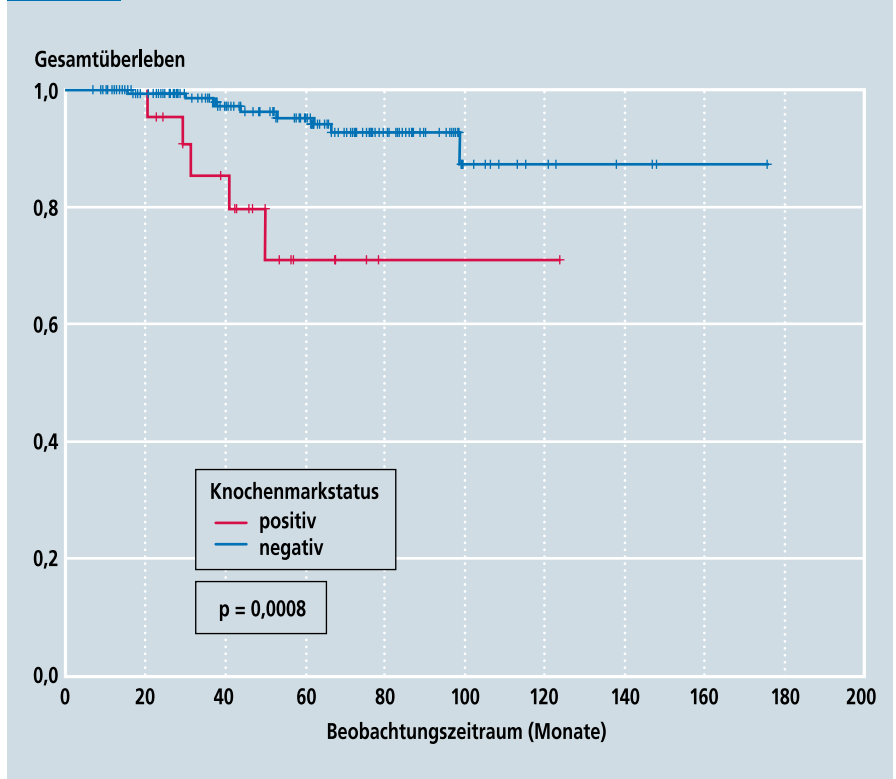
Abkürzungen: CK, Cytokeratin; DFS, rezidivfreies Überleben; DDFS, fernmetastasenfreies Überleben; ICC, Immunzytochemie; OS, Gesamtüberleben; RT-PCR, reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion; n.d., nicht bestimmt; \*<sup>1</sup> prognostische Relevanz durch multivariate Analyse bestätigt

rer Studien unterstützen die Hypothese, dass die Disseminierung isolierter Tumorzellen ins Knochenmark eine Vorstufe auf dem Weg zur klinisch evidenten Metastasierung darstellt (8, 13, 17, 25, 26, 28, 34, 38). Diese Ergebnisse deuten auf die Möglichkeit, Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko zum Zeitpunkt der Primärdiagnose durch Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zu identifizieren.

Da der Nachweis isolierter Tumorzellen mit histopathologischen Techniken nur bei wenigen Patientinnen gelingt (56), scheint diese Methode aufgrund ihrer geringen Sensitivität nicht geeignet. Daher werden in den meisten Studien immunzytochemische Nachweismethoden angewendet, wohingegen in einigen Studien auch Ergebnisse zur RT-PCR publiziert wurden (Tabelle). Die Variabilität der Ergebnisse ist dabei zumeist auf die methodischen Unterschiede der Studien zurückzuführen, bei denen unterschiedliche Antikörper und Anreicherungsverfahren, verschiedene Zellzahlen und Methoden der Knochenmarksgewinnung untersucht wurden. So zeigt die Knochenmarkbiopsie, die insbesondere in älteren Arbeiten angewendet wurde, mit ein bis 17 Prozent eine im Vergleich zur Knochenmarkaspiration niedrigere Detektionsrate. Mit immunzytochemischen Methoden, mit denen sich anhand monoklonaler Antikörper epitheliale Zellantigene nachweisen lassen, liegt die Inzidenz isolierter Tumorzellen bei metastasenfremden Patientinnen zwischen 13 und 43 Prozent (47). Jedoch wurden in diesen Studien verschiedene Antikörper zum Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark verwendet, und auch die Zahl untersuchter Knochenmarkszellen pro Patientin variierte erheblich (47). Einige neuere Studien beschäftigen sich auch mit dem Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen anhand von RT-PCR und finden dabei eine im Vergleich zum immunzytochemischen Nachweis höhere Inzidenz von 26 bis 71 Prozent.

Eine ausreichende methodische Validierung liegt bisher hauptsächlich für die immunzytochemische Detektion mit Zytokeratinantikörpern vor, die an Bestandteile des epithelialen Zellskeletts binden (7, 46). Da epitheliale

Grafik 2



Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus während der onkologischen Nachsorge

Zellen im Knochenmark natürlicherweise nicht vorkommen, ist Zytokeratin als Marker zum Nachweis von Tumorzellen geeignet, die von epithelialen Karzinomen wie dem Mammakarzinom gestreut wurden. Die Rate falschpositiver Ergebnisse liegt bei etwa einem Prozent (8). Durch eine zusätzliche morphologische Beurteilung kann der falschpositive Befund hämatopoetischer Zellen weiter reduziert werden (1, 3). Für diese Nachweismethode sprechen außerdem Arbeiten, die an Zytokeratin-positiven Zellen ähnliche phänotypische Eigenschaften beschreiben, wie sie für maligne Zellen solider Tumoren charakteristisch sind, beispielsweise die Expression von HER2/neu (50, 54). Darüber hinaus wird in einigen aktuellen Studien die maligne Natur isolierter Tumorzellen durch den Nachweis chromosomaler Aberrationen in diesen Zellen anhand von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und genomischer Einzelzellhybridisierung belegt (33, 40, 66, 69, 73).

Da der Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark nicht immer mit

etablierten prognostischen Faktoren zum Zeitpunkt der Primärdiagnose korreliert, stellt er einen Parameter dar, der unabhängig von herkömmlichen klinischen und pathologischen Kriterien zusätzliche prognostische Informationen liefern kann. Während die meisten Studien eine prognostische Relevanz isolierter Tumorzellen belegen (10, 13, 15, 18, 20, 25, 26, 28, 34, 38, 65, 72, 75), wurden auch Arbeiten publiziert, die keinen Zusammenhang mit dem rezidivfreien oder Gesamtüberleben bestätigen konnten (13, 14, 22, 39, 41, 53, 59, 67, 68, 71). Die meisten Untersuchungen, die keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben aufzeigten, sind älteren Datums. Hier wurden Knochenmarkbiopsien mit Glycolipidantikörpern oder Mucinantikörpern untersucht. Zudem waren die Fallzahlen in diesen Studien häufig klein (47). Allerdings konnte auch in einer frühen Metaanalyse mit 2 494 Patientinnen aus 20 Studien keine unabhängige prognostische Bedeutung für das rezidivfreie oder Gesamtüberleben nachgewiesen werden (23). Jedoch wurden in diese Metaanalyse viele Arbeiten

mit verschiedenen Detektionsmethoden bewertet, die einen Vergleich sehr erschweren. Daher ist die fehlende prognostische Relevanz in einigen Untersuchungen auf technische Faktoren zurückzuführen, wie die geringe Sensitivität bei der Auswertung von Knochenmarkbiopsien, eine niedrige Anzahl untersuchter Zellen, den Zeitpunkt der Knochenmarkgewinnung und die verwendeten Antikörper. So ist bekannt, dass membrangebundene Mucine auch auf hämatopoetischen Zellen

Tumorzellen im Knochenmark für das rezidivfreie und das Gesamtüberleben in der multivariaten Analyse hin (8, 26, 75). In den Untersuchungen wurde bei 2 316 Patientinnen Knochenmark mit verschiedenen Zytokeratinantikörpern untersucht. Zu demselben Ergebnis kam auch die jüngst publizierte Poolanalyse von Braun et al., in der 4 199 Patientinnen aus acht Zentren zusammenfasst wurden. Ein positiver Knochenmarkstatus wurde neben der Tumorgroße, dem Lymphknotenbefall, niedrigem Grading

niert wurde (27), erhalten etwa 80 Prozent der erstdiagnostizierten Brustkrebspatientinnen eine zytostatische und/oder endokrine Therapie im Rahmen der Primärbehandlung. Bei diesen Patientinnen sollte aufgrund der mangelnden Sensitivität der Methode nach Meinung der Autoren die nach den Leitlinien vorgeschlagene Therapie bei fehlendem Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark nicht unterlassen werden. Ein tumorzellpositiver Knochenmarkbefund bietet hingegen durchaus eine ausreichende Grundlage, die Indikation für eine adjuvante, vor allem endokrine Therapie zu stellen. Allerdings dürfte dieses Kollektiv wegen der niedrigen Prävalenz tumorzellpositiver Knochenmarkbefunde in den sehr frühen Tumorstadien unter fünf Prozent aller erstdiagnostizierten Brustkrebspatientinnen liegen. Es kann deshalb diskutiert werden, ob die prognostische Information den logistischen Aufwand der immunzytochemischen Untersuchung des Knochenmarks als Routineuntersuchung rechtfertigt.

Von wesentlich größerer Bedeutung könnte der Nachweis von persistierenden Tumorzellen nach Ende der Chemotherapie oder während der onkologischen Nachsorge sein. Bereits im Jahr 2000 wurde in einer kleineren Studie an 59 Hochrisikopatientinnen festgestellt, dass Frauen mit Nachweis von isolierten Tumorzellen im Knochenmark direkt nach Beendigung der Chemotherapie eine signifikant schlechtere Überlebensprognose hatten als jene, die zu diesem Zeitpunkt einen negativen Knochenmarkbefund aufwiesen ( $p = 0,011$ ) (6). Auf diesen Daten basierend wurde an der I. Frauenklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität, München, zwischen 1994 bis 2003 im Rahmen der onkologischen Nachsorge bei 228 Patientinnen im Median 21,3 Monate nach der Primärtherapie des Mammakarzinoms eine Knochenmarkpunktion in Lokalanästhesie durchgeführt. Bei 29 Patientinnen (12,7 Prozent) wurden persistierende Tumorzellen im Knochenmark bei der Nachpunktion festgestellt (30). Ein positiver Knochenmarkstatus war innerhalb der ersten 21 Monate nach der Primärdiagnose häufiger (15,7 Prozent) als im weiteren Verlauf der Nachsorge (9,7 Prozent). Sowohl das rezidivfreie Überleben nach der Kno-

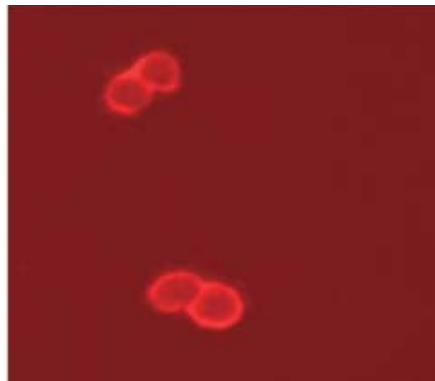
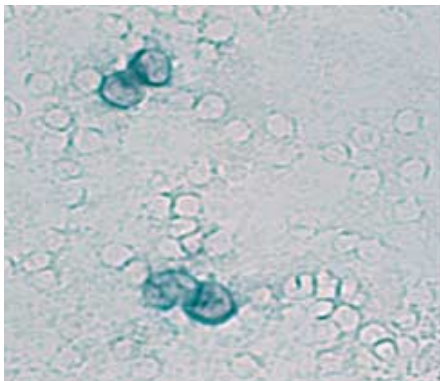


Abbildung 3: Nachweis einer HER2-neu-Überexpression an isolierten Tumorzellen im Knochenmark

exprimiert werden, und Antikörper, die gegen ein einziges Zytokeratin gerichtet sind, eine geringere Sensitivität aufweisen als Panzytokeratinantikörper (49). Mansi et al. zeigten anhand eines EMA-Antikörpers (EMA, „epithelial membrane antigen“) einen signifikanten prognostischen Einfluss des Knochenmarkstatus auf das Auftreten von Fernmetastasen und das Gesamtüberleben nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 12,5 Jahren. In der multivariaten Analyse konnte der Nachweis isolierter Tumorzellen jedoch nicht als unabhängiger prognostischer Faktor wie die Tumorgroße und der Lymphknotenstatus bestätigt werden (38). Diel et al. hingegen wiesen bei 727 Patientinnen nach, dass nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 36 Monaten der Knochenmarkstatus als prognostischer Indikator für das fernmetastasenfreie und das Gesamtüberleben sowohl dem Lymphknotenstatus als auch dem Tumorstadium und dem Grading überlegen ist (17). Darüber hinaus weisen vier große aktuelle Studien auf die unabhängige prognostische Relevanz isolierter

und negativem Hormonrezeptorstatus als negativer Vorhersagewert bestätigt (10). Damit scheint die prognostische Bedeutung isolierter Tumorzellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose weitgehend geklärt zu sein. Eine klinische Anwendung der Methode außerhalb von Studien, beispielsweise zur Entscheidungsfindung bei der adjuvanten systemischen Therapie oder zur Überwachung der Therapieeffektivität, setzt eine Standardisierung der Methode und den Einsatz validierter Antikörper voraus.

### Potenzieller Stellenwert nach der Primärtherapie

Während die prognostische Relevanz des Nachweises isolierter Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose als gesichert gilt, wird die klinische Relevanz dieser Befunde durch die derzeit übliche Therapie in der adjuvanten Situation deutlich limitiert. Nach dem gültigen Therapiestandard, der auf der Konsensuskonferenz in Sankt Gallen 2003 defi-

chenmarkpunktion als auch das Gesamtüberleben unterschieden sich signifikant zwischen Patientinnen mit negativem und positivem Knochenmarkbefund in der onkologischen Nachsorge (krankheitsfreies Überleben: 150 versus 87 Monate [p = 0,0003], Gesamtüberleben: 162 versus 99 Monate [p = 0,0008]. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse bestätigte sich der Knochenmarkstatus als unabhängiger signifikanter Prognosefaktor (relatives Risiko 5,57, p = 0,002, (Grafik 2). Die größte prognostische Aussagekraft einer Knochenmarknachpunktion wurde im Zeitraum zwischen 2 und 3,5 Jahren nach der Primärdiagnose dokumentiert.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen der norwegischen Arbeitsgruppe um B. Naume. Die Forscher präsentierten im Dezember 2003 auf dem San Antonio Breast Cancer Symposium Resul-

tate von 357 Patientinnen die jeweils drei Jahre nach der Primärdiagnose punktiert wurden (74). Auch in dieser Publikation bestätigte sich der Knochenmarkstatus als unabhängiger Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben (p < 0,0001).

Der Nachweis von persistierenden isolierten Tumorzellen im Knochenmark als Bestandteil der onkologischen Nachsorge könnte künftig als Surrogatmarker für die Notwendigkeit einer sekundär adjuvanten Therapie dienen. Diese Information könnte beispielsweise im Hinblick auf die diskutierte Verlängerung der endokrinen adjuvanten Therapie oder dem Wechsel von Tamoxifen zu einem Aromatasewirkstoff bedeutsam sein. Die Phänotypisierung der isolierten Tumorzellen könnte (Abbildung 3) bei der Auswahl der sekundär adjuvanten Therapie in Zukunft eine wichtige Rolle spielen.

Danksagung: Die Autoren bedanken sich bei Beate Zill, Sandra Schulze, Alexandra Schoberth und Nadja Prang für die wertvolle Laborarbeit und die Überlassung des Bildmaterials.

Manuskript eingereicht: 2. 9. 2004, revidierte Fassung angenommen: 25. 9. 2004

Der Autor erklärt, dass kein Interessenkonflikt im Sinne der Richtlinien des International Committee of Medical Journal Editors besteht.

Zitierweise dieses Beitrags:  
Dtsch Arztebl 2004; 101: A 3496–3502 [Heft 51–52]



Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf das Literaturverzeichnis, das beim Verfasser erhältlich oder im Internet unter [www.aerzteblatt.de/lit5104](http://www.aerzteblatt.de/lit5104) abrufbar ist.

Anschrift für die Verfasser:  
**Priv.-Doz. Dr. med. Wolfgang Janni**  
I. Frauenklinik, Innenstadt  
Ludwig-Maximilians-Universität  
Maistraße 11, 80337 München  
E-Mail: [janni@fk-i.med.uni-muenchen.de](mailto:janni@fk-i.med.uni-muenchen.de)

## MEDIZINGESCHICHTE(N)

AUSGEWÄHLT UND KOMMENTIERT VON H. SCHOTT

### Anatomie Naturalienkabinett

Aus Frederik Ruysch: Thesaurus anatomicus. Band 1, Amsterdam 1701.

Die Abbildung zeigt eine Landschaft aus Gallensteinen, Bäumchen aus injizierten Gefäßen und klagenden Kinderskeletten, im Geschmack des Barock zusammengestellt. Als Vorform naturkundlicher Sammlungen entstehen um 1700 solche Naturalienkabinette als „Wunderkammern“. Der berühmte niederländische Anatom Ruysch (1638–1731) nutzte als erster 10%-igen Alkohol als Konservierungsmittel und führte die Injektion der Organpräparate mit Wachs ein. Der russische Zar Peter der Große kaufte seine Sammlung 1717, die sich heute noch in Sankt Petersburg befindet.



### Physiologie Hirntod

**Zitat:** „Ich glaube also eine mehr als ausreichende Reihe von Beweisen beigebracht zu haben, um [...] das fundamentale Prinzip aufzustellen. 1., daß das Gehirn die Organe und die Funktionen des inneren Lebens nicht direkt beeinflußt; 2., daß infolgedessen die Unterbrechung dieser Funktionen nach großen Hirnverletzungen nicht die Wirkung dieser Verletzungen ist. Ich bin weit entfernt die Hirntätigkeit als dem organischen Leben vollständig fremd zu betrachten; aber ich halte mich für berechtigt zu behaupten, daß dieses Leben nur sekundäre, indirekte Einflüsse vom Gehirn erfährt, von welchen wir noch sehr wenig wissen.“

Xavier Bichat: Physiologische Untersuchungen über den Tod (1800). Ins Deutsche übersetzt und eingeleitet von Rudolf Boehm. Leipzig 1912 (Klassiker der Medizin; Bd. 16), S.124. – Der französische Chirurg, Anatom und Pathologe Bichat (1771–1802) wirkte ab 1794 in Paris, war Mitbegründer der experimentellen Physiologie und entwickelte seine einflussreiche Gewebelehre (Histologie). Er geht hier der Frage nach: „Bewirkt der Hirntod direkt die Unterbrechung der organischen Funktionen?“ und stellt fest, dass das vegetative (organische) Leben relativ unabhängig vom Gehirneinfluss funktioniert. Die moderne Hirntoddiagnostik entstand jedoch erst in den späten 1960er-Jahren.

Literaturverzeichnis Heft 51–52/2004:

# Isolierte disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen

Wolfgang Janni<sup>1</sup>,  
Klaus Pantel<sup>2</sup>, Brigitte Rack<sup>1</sup>,  
Christian Schindlbeck<sup>1</sup>,  
Harald Sommer<sup>1</sup>, Bernd Gerber<sup>3</sup>,  
Klaus Friese<sup>1</sup>

Methodik, Biologie und klinische Relevanz

Literatur

- Borgen E, Beiske K, Trachsel S, Nesland JM, Kvalheim G, Herstad TK, Schlichting E, Qvist H, Naume B: Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J Pathol* 1998; 185: 427–434.
- Borgen E, Beiske K, Trachsel S, Nesland JM, Kvalheim G, Herstad TK, Schlichting E, Qvist H, Naume B: Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J Pathol* 1998; 185: 427–434.
- Borgen E, Naume B, Nesland JM, Nowels KW, Pavlak N, Ravkin I, Goldbard S: Use of automated microscopy for the detection of disseminated tumor cells in bone marrow samples. *Cytometry* 2001; 46: 215–221.
- Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano A E, Cote R, Hoon DS: Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2632–2640.
- Braun S, Cevattli BS, Assemi C, Janni W, Kentenich CR, Schindlbeck C, Rjosk D, Hepp F: Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1468–1475.
- Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K: Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 80–86.
- Braun S, Pantel K: Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 201–216.
- Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G: Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342: 525–533.
- Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G, Pantel K: ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 1890–1895.
- Braun S, Vogl F, Schlimok G, Diel I, Janni W, Gerber B, Gebauer G, Coombes RC, Pierga J-Y, Naume B, Pantel K: Pooled analysis of prognostic impact of bone marrow micrometastases: 10 year survival 4199 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 67 (Suppl.): Abstract SABCS, No. 7.
- Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, Seelig S, Jacobson K, Chen S, Renta V, Fronda G, Preisler HD: Amplification and overexpression of topoisomerase II alpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1061–1067.
- Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, Gusterson B, Neville AM, Peterson HF, Chaiwun B: Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet* 1999; 354: 896–900.
- Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP: Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1749–1756.
- Courtemanche DJ, Worth AJ, Coupland RW, MacFarlane JK: Detection of micrometastases from primary breast cancer. *Can J Surg* 1991; 34: 15–19.
- Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994; 12: 475–482.
- DeVita VT Jr: Breast cancer therapy: exercising all our options. *N Engl J Med* 1989; 320: 527–529.
- Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1652–1658.
- Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M, Bastert G: Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* 1998; 339: 357–363.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Multi-agent chemotherapy for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2002: CD000487.
- Fields KK, Eifenbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Jansen WE, Moscinski LC: Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1868–1876.
- Fox SB, Leek RD, Bliss J, Mansi JL, Gusterson B, Gatter KC, Harris AL: Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1044–1049.
- Funke I, Fries S, Rolle M, Heiss MM, Untch M, Bohmert H, Schildberg FW, Jauch KW: Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. *Int J Cancer* 1996; 65: 755–761.
- Funke I, Schraut W: Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 1998; 16: 557–566.
- Gangnus R, Langer S, Breit E, Pantel K, Speicher MR: Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3457–3464.
- Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W: Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3669–3674.
- Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrning C, Jeschke U, Kundt G, Friese K: Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 2001; 19: 960–971.
- Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ: Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3357–3365.
- Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W: Tumor cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* 1994; 69: 566–571.
- Herrera-Gayol A, Jothy S: Adhesion proteins in the biology of breast cancer: contribution of CD44. *Exp Mol Pathol* 1999; 66: 149–156.
- Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S, Sommer H, Pantel K, Gerber B, Friese K: Association of persistence of isolated tumor cells (ITC) in bone marrow (BM) of breast cancer patients with risk for relapse. *Cancer* 2004, in print.
- Janni W, Sommer H, Strobl B, Rack B, Klanner E, Hantschmann P, Rammel G, Harms G, Dimpfl T: Fortschritte in der Früherkennung des Mammakarzinoms in den Jahren 1981–1990. Ergebnisse einer Longitudinalstudie. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128: 601–606.
- Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P: Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 80–85.

33. Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoeklein NH, Riethmuller G: Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002; 360: 683–689.
34. Landys K, Persson S, Kovarik J, Hultborn R, Holmberg E: Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49: 27–33.
35. Leek RD: The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 4325–4331.
36. Lugo TG, Braun S, Cote RJ, Pantel K, Rusch V: Detection and measurement of occult disease for the prognosis of solid tumors. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2609–2615.
37. MacGrogan G, Rudolph P, Mascarel-Id I, Mauriac L, Durand M, Avril A, Dilhuydy JM, Robert J, Mathoulin-Pelissier S, Picot V, Flouquet A, Sierankowski G, Coindre JM: DNA topoisomerase II alpha expression and the response to primary chemotherapy in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 89: 666–671.
38. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC: Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* 1999; 354: 197–202.
39. Mathieu MC, Friedman S, Bosq J, Caillou B, Spielmann M, Travagli JP, Contesso G: Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies for detection of occult metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 15: 21–26.
40. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford E, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LW, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J: HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9393–9398.
41. Molino A, Pelosi G, Turazza M, Sperotto L, Bonetti A, Nortilli R, Fattovich G, Alaimo C, Piubello Q, Pavanel F, Micciolo R, Cetto GL: Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 42: 23–30.
42. Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Sauer T, Kumar T, Nesland JM: Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4122–4129.
43. Nystrom L, Rutqvist LE, Wall S, Lindgren A, Lindqvist M, Ryden S, Andersson I, Bjurstam N, Fagerberg G, Frisell J et al.: Breast cancer screening with mammography: overview of Swedish randomised trials. *Lancet* 1993; 341: 973–978.
44. Nystrom L, Andersson I, Bjurstam N, Frisell J, Nordenskjold B, Rutqvist LE: Long-term effects of mammography screening: updated overview of the Swedish randomised trials. *Lancet* 2002; 359: 909–919.
45. Pantel K, Brakenhoff RH: Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 448–456.
46. Pantel K, Felber E, Schlimok G: Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J Hematother* 1994; 3: 315–322.
47. Pantel K, Muller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S: Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6326–6334.
48. Pantel K, Otte M: Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 327–337.
49. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmuller G: Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 1994; 3: 165–173.
50. Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G: Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1419–1424.
51. Park K, Kim J, Lim S, Han S: Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy. *Eur J Cancer* 2003; 39: 631–634.
52. Peto R: 2003. ECCO 12, personal communication.
53. Porro G, Menard S, Tagliabue E, Orefice S, Salvadori B, Squicciarini P, Andreola S, Rilke F, Colnaghi MI: Monoclonal antibody detection of carcinoma cells in bone marrow biopsy specimens from breast cancer patients. *Cancer* 1988; 61: 2407–2411.
54. Putz E, Witter K, Offner S, Stosiek P, Zippelius A, Johnson J, Zahn R, Riethmuller G, Pantel K: Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* 1999; 59: 241–248.
55. Rack B, Janni W, Schober A, Kantenich C, Strobl B, Klanner E, Schindlbeck C, Sommer H: Expression of HER2-neu on disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Onco* 2003; 127: 15–15.
56. Ridell B, Landys K: Incidence and histopathology of metastases of mammary carcinoma in biopsies from the posterior iliac crest. *Cancer* 1979; 44: 1782–1788.
57. Rosner D, Lane WW: Predicting recurrence in axillary-node negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 25: 127–139.
58. Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, Frahm SO, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM, Parwaresch R: Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase II alpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 55: 61–71.
59. Salvadori B, Squicciarini P, Rovini D, Orefice S, Andreola S, Rilke F, Barletta L, Menard S, Colnaghi MI: Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 1990; 26: 865–867.
60. Sapino A, Bongiovanni M, Cassoni P, Righi L, Arisio R, Deaglio S, Malavasi F: Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. *J Pathol* 2001; 194: 254–261.
61. Schindlbeck C, Janni W, Schaffer P, Shabani N, Schmitt M, Harbeck N, Sommer H, Braun S: Tumorbiologie des primären Mammakarzinoms und der minimalen Resterkrankung. *Acta Med Austriaca* 2002; 29 Suppl. 59: 27–31.
62. Schindlbeck C, Janni W, Schaffer P, Shabani N, Schmitt M, Harbeck N, Sommer H, Braun S: [Tumor biology of primary breast cancer and minimal residual disease]. *Acta Med Austriaca* 2002; 29 Suppl. 59: 27–31.
63. Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Rack B, Gerber B, Schmitt M, Harbeck N, Sommer H, Braun S, Friese K: Comparative analysis between the HER2 status in primary breast cancer tissue and the detection of isolated tumor cells in the bone marrow. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 87: 65–74.
64. Schindlbeck C, Kornmeier A, Janni W, Shabani N, Kantenich C, Braun S, Sommer H, Friese K: Isolated tumor cells in the bone marrow (ITC-BM) of breast cancer patients before and after anthracycline based therapy – Influenced by the HER2neu- and Topoisomerase II $\alpha$ -expression/amplification of the primary tumor? *Eur J Cancer Supplements* 2003; 1: 129.
65. Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koproowski H et al.: Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 8672–8676.
66. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnold H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA: From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7737–7742.
67. Singletary SE, Larry L, Tucker SL, Spitzer G: Detection of micrometastatic tumor cells in bone marrow of breast carcinoma patients. *J Surg Oncol* 1991; 47: 32–36.
68. Slade MJ, Smith BM, Sinnett HD, Cross NC, Coombes RC: Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 870–879.
69. Solakoglu U, Maierhofer C, Lahr G, Breit E, Scheunemann P, Heumos I, Pichlmeier U, Schlimok G, Oberneder R, Kollermann MW, Kollermann J, Speicher MR, Pantel K: Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2246–2251.
70. Untch M, Kahler S, Funke I: Detection of cytokeratin (CK) 18 positive cells in the bone marrow of breast cancer patients – no prediction of bad outcome. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 693a.
71. Untch M, Kahler S, Funke I, Boettcher B, Konecny G, Nestle-Kraemling C, Bauernfeind I: Detection of cytokeratin (CK) 18 positive cells in the bone marrow (BM) of breast cancer patients – no prediction of bad outcome. *Proc ASCO* 1999; 18: 693a.
72. Vannucchi AM, Bosi A, Glinz S, Pacini P, Linari S, Saccardi R, Alterini R, Rigacci L, Guidi S, Lombardini L, Longo G, Mariani MP, Rossi-Ferrini P: Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by RT-PCR for cytokeratin-19 mRNA. *Br J Haematol* 1998; 103: 610–617.
73. Weckermann D, Muller P, Wawroschek F, Krawczak G, Riethmuller G, Schlimok G: Micrometastases of bone marrow in localized prostate cancer: correlation with established risk factors. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3438–3443.
74. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Naume B: The presence of isolated tumor cells in the bone marrow three years after diagnosis in disease free breast cancer patients predicts an unfavorable outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 67.
75. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B: Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3469–3478.
76. Woelfle U, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L, Janicke F, van Diest P, Brakenhoff R, Pantel K: Molecular signa-

ture associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 5679–5684.

77. Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K: Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2670–2674.
78. Yarden Y: Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001; 61 Suppl 2: 1–13.
79. Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G, Riethmuller G, Pantel K: Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2701–2708.