

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

(Frauenklinik rechts der Isar, Direktorin Univ.- Prof. Dr. M. B. Kiechle)

**Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark
von Mammakarzinompatientinnen und deren
Charakterisierung mittels konfokaler
Laserscanmikroskopie**

Sonja Marika Sinz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. N. Harbeck
2. Univ.- Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 05.09.2008 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 18.03.2009 angenommen.

„ Habent Sua Fata Libelli....“
(Terentianus Maurus)

für meine Lieben

INHALTSVERZEICHNIS

3-7

1. EINLEITUNG

8-30

1.1 Gedanken zu Epidemiologie und Forschung beim Mammakarzinom

1.2 Etablierte prognostische- und prädiktive Faktoren und potentiell neue Faktoren beim primären Mammakarzinom

1.3 Theoretische Überlegungen zum Prozess der Metastasierung solider Tumoren- die disseminierte Tumorzelle als Einheit des Gesamten

1.4 MRD- Definition, Historie, Gegenwart und Zukunft

1.5 Zytokeratine 8/18/19 und ihre Rolle in der MRD beim Mammakarzinom

1.6 u-PA-Rezeptor und das Urokinasesystem im tumorbiologischen Kontext

1.7 Her2: Onkogen mit klinischer Relevanz beim Mammakarzinom

1.8 Zielsetzung der Arbeit

2. MATERIAL UND METHODEN

31-59

2.1 Patientengut

2.2 Knochenmarksaspirat

2.2.1 Gewinnung und Technik

2.2.2 Aufarbeitungsschritte und Herstellung von Zytospins

2.3 Detektion und Charakterisierung Ck-positiver Zellen mittels CLSM nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung

2.3.1 Prinzip und Standardisierung der Doppelimmunfluoreszenz (Antikörper, Kontrollen, Sensitivität)

2.3.1.1 Zytokeratin (ck), Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPA-R) und Her-2-neu (c-erb/B2)

2.3.1.2 Färbeschemata- und Protokolle

2.3.2 Optimierung des technischen Prinzips

2.3.2.1 Aufarbeitungszeit und Lagerung

2.3.2.2 Zelldichte

2.3.2.3 Fixierungsversuche

2.3.2.4 Qualitätskontrolle

2.3.3 Auswertung mit dem konfokalen Lasermikroskop

2.3.3.1 Prinzip des CLSM

2.3.3.2 Auswertung der Präparate mit CLSM und Befunddokumentation

2.3.3.3 Quantifizierung des uPA-R

2.4. Verwendete Materialien

2.4.1 Mikroskope und andere technische Hilfsmittel

2.4.2 Antikörper, Lösungen und weitere Agentien

3. ERGEBNISSE UND RESULTATE

60-99

3.1 Charakterisierung des Patientenguts

3.2 Ergebnisse und Auswertung der IF- Färbung am CLSM

3.2.1 technischen Optimierung

3.2.1.1 Aufarbeitungszeit und Lagerung

3.2.1.2 optimale Zelldichte

3.2.1.3 Zellfixierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Aufarbeitungsprozess

3.2.1.4 Qualitätskontrolle

3.2.2 Darstellung der Zellmorphologie zytokeratinpositiver Zellen und von Megakaryozyten in der May-Grünwald-Giemsafärbung

3.2.2.1 Darstellung der Zellmorphologie zytokeratinpositiver Zellen mittels May-Grünwald-Giemsafärbung

3.2.2.2 Megakaryozyten: Morphologische Darstellung in der May-Grünwald-Giemsafärbung und Färbungsverhalten in der indirekten Immunfluoreszenz

3.2.3 Detektion und Phänotypisierung zytokeratinpositiver Zellen am eigenen Patientengut

3.2.3.1 Detektion zytokeratinpositiver (8,18,19) Einzelzellen

3.2.3.2 Phänotypisierung und Quantifizierung für uPA-R bei zytokeratinpositiven Zellen

3.2.3.3 Phänotypisierung für Her2 bei zytokeratinpositiven Zellen

3.2.4 Weitere technische Möglichkeiten und eigene Resultate

3.2.4.1 Laserdissektion und Genotypisierung mittels single-cell PCR

3.2.4.2 3-D-Visualisierung nach Doppelscan mit IMARIS

3.0

3.3 Statistische Auswertung von Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus

3.3.1 Statistische Methoden

3.3.2 Korrelation des Knochenmarkstatus mit TNM-Stadium und weiteren Prognosefaktoren

3.3.3 Korrelation des Knochenmarkstatus mit Überleben

3.3.4 Korrelation der uPA-R Quantifizierung mit dem TNM-Stadium und weiteren Prognosefaktoren

3.3.5 Korrelation der uPA-R Quantifizierung mit dem klinischen Verlauf

3.4 Morbidität an der Entnahmestelle

4. DISKUSSION

100-123

4.1 Diskussion des experimentellen Teils

4.1.1 Diskussion der Doppelimmunfluoreszenzfärbung zur Detektion, Phänotypisierung und Quantifizierung zytokeratinpositiver Zellen versus Doppelimmunhistochemiefärbung

4.2 Diskussion des statistischen Teils

4.2.1 Tumorzellnachweis im Knochenmark und Phänotypisierung

4.2.2 Tumorzellnachweis und andere Prognosefaktoren

4.3 Klinische Bedeutung der MRD im Kontext anderer Arbeitsgruppen

5. AUSBLICK

124-134

5.1 Neue technische Ansätze für Isolierung und Detektion

5.1.1 PCR

5.1.2 Anreicherungstechniken

5.1.3 Vereinfachung des Screenings durch automatisierte
Mikroskopie

5.2 Klinische Relevanz der MRD

5.2.1 Therapiemonitoring

5.2.2 Antikörpertherapie gegen Targetmoleküle auf DTC

5.2.2.1 Herceptin TM

5.3.2.2 Das uPA-System und mögliche therapeutische
Angriffspunkte

5.3.3 Bisphosphonate

6. ZUSAMMENFASSUNG **135-136**

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **137**

8. LITERATURVERZEICHNIS **138-157**

9 DANKSAGUNG **158-159**

10. LEBENSLAUF **160-163**

1. Einleitung

1.1 Gedanken zu Epidemiologie und Forschung beim Mammakarzinom

Das häufigste Karzinom der Frau in der westlichen Welt ist und bleibt das Mammakarzinom! Jede 8. Frau muss im Laufe ihres Lebens mit diesem Krebsleiden rechnen. Aufgrund seiner Komplexität und kontinuierlichen Inzidenzsteigerung- pro Jahr muss in Deutschland mit mehr als 40.000 Neuerkrankungen und 18.000 Sterbefällen gerechnet werden- stellt es eine große Herausforderung für die interdisziplinäre Onkologie dar. Der Altersgipfel liegt zwischen 50 und 70 Jahren. Unter dem 50. Lebensjahr erkranken immerhin ca. 20% der Frauen. Die relative Fünfjahresüberlebensrate liegt für das Gesamtkollektiv bei aktuell 76%, für 10 Jahre bei knapp 60% und für 15 Jahre bei 47%. Trotzdem erkranken 30-40% innerhalb von 10 Jahren nach Primärtherapie an einem systemischen Rezidiv. Schlüsselt man die relativen Überlebensdaten für die jeweiligen pT-Kategorien auf, dann kann ein Viertel aller brustkrebsbedingten Sterbefälle auf pT3/4 Tumoren zurückgeführt werden. Laut Tumorregister Bayern ist die pT-Verteilung mit einem Anteil von 52% pT1 Tumoren und einer 5-bzw. 10 Jahreüberlebensrate von 91% bzw. 82% relativ günstig, doch der gesicherte Nutzen systemischer Therapie von absolut mehr als 5% Verbesserung der Überlebensrate lässt sich an den regionalen Daten stadienspezifisch nicht belegen. (nach Engel J 2003, S.3-7, Tumormanual Mammakarzinom)

Die Anzahl der Risikofaktoren ist groß und ihr biologischer Wirkmechanismus weitgehend unverstanden. Sie können in nur 55% der Fälle die Brustkrebserkrankung ursächlich erklären. (Brinton, 1996, S. 167). Aus diesen Gründen ist es schwierig Prävention zu betreiben.

Daher müssen laut Bastert, 1997, S.2 die Forschungsschwerpunkte moderner Onkologie die Modifikation systemischer Therapien und die Evaluierung prädiktiver und prognostischer Faktoren sein.

Inwiefern etablierte prädiktive und prognostische Parameter sowie neue Biomarker zur optimierten bzw. individualisierten Therapieplanung herangezogen werden können, ist Gegenstand aktueller Forschung.

Von besonderem Interesse dabei ist der Tumorzellnachweis im Knochenmark als Hinweis auf eine minimalresiduale Tumorerkrankung.

Disseminierte maligne Zellen stellen ein ungelöstes Problem dar, da sie der konventionellen Chemotherapie entgehen können. Vielleicht schließen hier monoklonale Antikörper, Tumorstabilisatoren oder Bisphosphonate eine therapeutische Lücke.

So wie die radikale Operation durch die brusterhaltende Therapie in Ergänzung mit Chemotherapie und Bestrahlung abgelöst worden ist, so könnte die Chemotherapie der Zukunft auf multimodale Therapieschemata ausgerichtet sein.

1.2 Etablierte prognostische-und prädiktive Faktoren und potentiell neue Faktoren beim primären Mammakarzinom

Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren dienen dazu, den Krankheitsverlauf prospektiv individuell abzuschätzen und Patientinnen zu identifizieren, die von einer Therapie X profitieren und von denen abzusondern, die entweder keine Therapie oder eine Therapie Y benötigen, Harbeck, 2003, S. 67

Beim Mammakarzinom gibt eine Fülle von Prognosefaktoren. Um sie in der Praxis einzusetzen müssen nach McGuire, 1991, S. 154 bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein: einfache Bestimmungsmethode, optimierter cut-off-Wert, statistische Evaluierung sowie Validierung der klinischen Relevanz für die Therapieentscheidung.

Der wichtigste Prognosefaktor laut Manual des Tumorzentrums München 2003 für Rezidiv und Überleben beim Mammakarzinom ist der Lymphknotenstatus. Mit der Anzahl der befallenen Lymphknoten sinkt die relative 5-Jahresüberlebenszeit (95% bei N0 vs. 48% bei mehr als 10

Lymphknoten). Er spielt eine zentrale Rolle in der Indikation zur Strahlen- und Chemotherapie.

Die Größe des Primärtumors korreliert stark mit dem Lymphknotenstatus. Therapieentscheidend wird die Größe allerdings beim nodalnegativen Mammakarzinom.

Alle invasiven Karzinome werden histologisch klassifiziert, da sich unterschiedliche morphologische Typen mit unterschiedlichen klinischen Verläufen assoziiert sind. Mit 75 % ist das invasiv duktales Mammakarzinom die häufigste Subgruppe, gefolgt vom invasiv lobulären Karzinom mit 15%. Prognostisch sind beide als gleich zu bewerten. Die restlichen 10% setzen sich aus Subgruppen zusammen, die zum Teil eine signifikant bessere Prognose haben. Harbeck, 2003, S.63.

Das Grading korreliert mit anderen Prognosefaktoren. Univariat kann aber eine deutliche Abnahme des relativen 5-Jahresüberlebens bei Zunahme des Gratings verzeichnet werden (G1 99% vs. G2 87% vs. G3/4 70%). Engel, 2003, S.7

Im Tumormanual der Münchner Arbeitsgruppe ist als weiterer klassischer Prognosefaktor das Alter bzw. der Menopausenstatus bei Diagnosestellung zu finden. Alter und Rezidivrisiko hängen zwar nicht direkt proportional zusammen. Frauen mit Mammakarzinom unter 35 Jahren werden aber aufgrund des Alter zu den high-risk Fällen gerechnet und chemotherapiert, während bei biologisch älteren Patientinnen eher auf eine toxische Therapie verzichtet wird.

Der Hormonrezeptorstatus spielt eine wesentliche Rolle in der Prädiktion des Ansprechens auf eine endokrine Therapie und auf eine primäre Chemotherapie. In den ersten sechs bis acht Jahren nach Operation zeigt sich eine prognostische Trennung zwischen Rezeptorpositivität und Negativität, welche im Langzeitverlauf unbedeutend wird. (Harbeck, 2003, S.69)

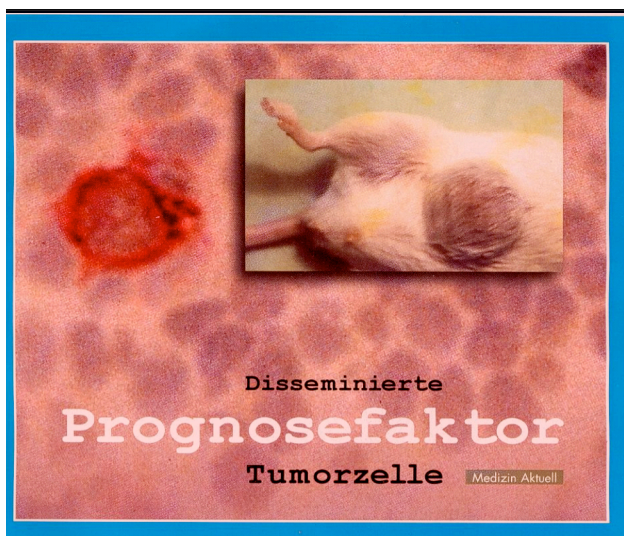
Zum Her-2-Status als Prognosefaktor lassen sich keine validierten Aussagen treffen. Anerkannt ist er als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab. In Diskussion

ist seine Bedeutung als prädiktiver Faktor im Ansprechen auf konventionelle Therapien. So sollen Her-2 positive Tumoren schlecht auf CMF ansprechen und resistent gegen Tamoxifen sein (Harbeck, 2003, S.69).

Von den zahlreichen neueren Faktoren, die o.g. Kriterien erreicht haben, um als Prognosefaktor in Therapieentscheidungen außerhalb von Studien einzugehen, sind nur die tumorassoziierten Proteolysefaktoren (uPA und PAI) übrig geblieben. Deren tumorbiologische Bedeutung wird unter 1.6 erklärt. Hohe Konzentrationen an uPA und PAI gehen mit einem erhöhtem Metastasierungsrisiko und einem kürzeren Gesamtüberleben einher. Hinsichtlich der Therapie scheinen nodalnegative Patientinnen mit hohen Proteasen von einer adjuvanten Chemotherapie zu profitieren. Eine seit 2002 laufende prospektive Studie (NNBC-3) soll nun zeigen, welche adjuvante Therapie für Patientinnen mit nodalnegativem Mammakarzinom und hohen Proteasen optimal ist. (Harbeck, 2003, S.70)

Auf der Suche nach weiteren neuen Prognosefaktoren gibt es verschiedene Ansätze, die vor allem darauf abzielen das individuelle Metastasierungsrisiko zu einem Zeitpunkt abzuschätzen, an dem die Patientin rein klinisch-apparativ als metastasenfrei gilt. Genau dieses Konzept wird bei der Suche nach disseminierten Tumorzellen im Knochenmark oder Blut aufgegriffen.

Derzeit wird das Vorliegen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark



oder Blut in Studien getestet und ist im Klinikalltag noch nicht etabliert. Harbeck, 2003, S.70. Ob disseminierte Tumorzellen ein aggressiveres therapeutisches Vorgehen rechtfertigen muss derzeit offenbleiben.

Abb 1: Ausschnitt aus dem Titelblatt des Deutschen Ärzteblatt von 06/2000

Die Bewertung der prognostischen Relevanz in Bezug auf Rezidivfreies – und Gesamtüberleben soll anhand eigener Daten in Kapitel 4.2 und 4.3 eingehend diskutiert werden.

1.3 Theoretische Überlegungen zum Prozess der Metastasierung solider Tumoren- die disseminierte Tumorzelle als Einheit des Gesamten

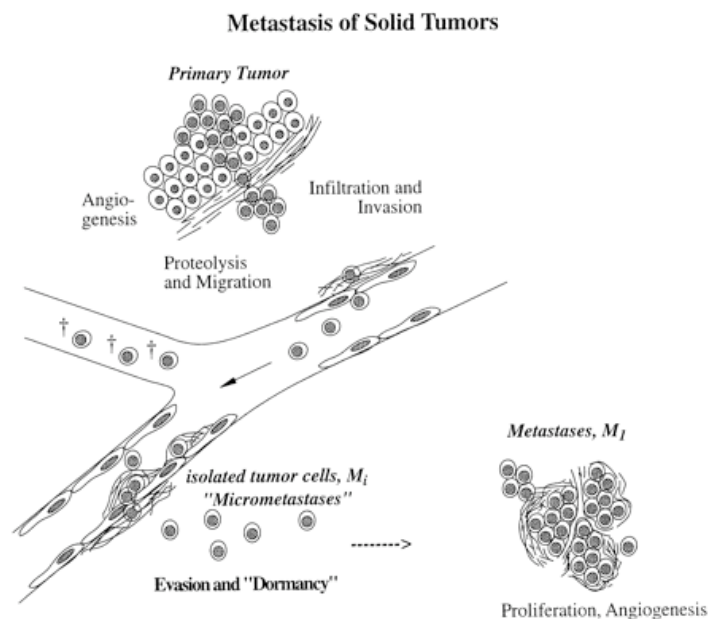


Abb 2: Disseminierte Tumorzellen und ihre Rolle bei der Bildung solider Metastasen, (Bild aus Pantel, 1999, S. 1114)

Das Auftreten von Metastasen abseits von der primären Lokalisation des Tumors ist ein lebensbedrohlicher Zustand und fordert die meisten durch Krebs verursachten Todesfälle. Als Steven Paget 1889 seine „seed and soil“ Theorie veröffentlichte, war die Idee von der hämatogenen Metastasierung geboren. Was muss aber molekularbiologisch passieren, dass sich bösartige Zellen von einer Geschwulst lösen, in den Gewebsverband einwandern, über Blutgefäße und Lymphe streuen, um danach in benachbarte Gewebe einzudringen? Und welche Rolle spielen dabei isolierte Tumorzellen?

Für diesen komplexen Vorgang der Ablösung und Streuung benötigen Tumorzellen proteolytische Enzymsysteme, welche das Gewebe auflösen. Mühlenweg, 2001, S. 683-88 beschreibt als die vier wichtigsten Proteasen: Serinproteasen (Plasminogen-Aktivator-System, siehe unter 1.6), Cysteinproteasen (CathepsinB/L), Matrixmetalloproteasen (Kollagenasen) und Aspartylproteasen (Kathepsin D). Mit ihrer Hilfe kann Zellwanderung=Dissemination und Invasion stattfinden. Um sich an einem entfernten Ort wieder Anzulagern (=Adhäsion), werden Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle benötigt. Damit ein sekundärer Tumor heranwächst (=Implantation), müssen die streuenden Zellen in der Lage sein, Wachstumsfaktoren und Hormone zu produzieren, die die Zellteilung unterstützen, oder durch Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren an der Zelloberfläche, die von den umgebenden Zellen physiologisch gebildeten Wachstumsfaktoren für sich zu nutzen.

Dafür sind vielfältige Interaktionen (=cross-talk) zwischen den Tumorzellen und ihrem kongenialem Milieu (=Mikroenvironment) nötig. Selbiges gilt für die Tumorneovaskularisation (Fidler I. 1995, S. 1588-90). Hermanek 1999, S. 2771 hält fest, dass nur ein winziger Teil der zirkulierenden Tumorzellen überlebt, Mikrometastasen bildet und zu einer Makrometastase heranwächst.

Die Kenntnis der Metastasierungskaskade (siehe Abb.2) und ihre Durchbrechung werfen angesichts therapieresistenter Tumore spannende Therapieansatzpunkte auf.

Dabei ist nach Diel 1994, S. 1167 vor allem die isolierte aus einem genetisch heterogenen Zellpool stammende Tumorzelle (z.B. für Immunotherapie) zusammen mit ihrem Mikroenvironment (z.B. für Antiangiogenesetherapie) als Therapietarget zu betrachten.

Tumorzellen disseminieren meist vor Diagnosestellung und Operation des Primärtumors, sollten also schon zu diesem Zeitpunkt untersucht werden.

Ob die isolierte Tumorzelle tatsächlich der missing link (Diel 1998, S. 9) zwischen Primärtumor und der Frühphase der Metastasierung ist, wie sie genetisch und phänotypisch (=the seed) beschaffen sein soll und mit

Ihrem Umfeld (=the soil) kommunizieren muss, um eine metastatische Potenz zu bekommen, soll im Folgenden diskutiert werden. Dabei soll nicht unterschieden werden, ob sie aus dem Kompartiment Blut oder Knochenmark gewonnen wurde.

Dabei müssen zunächst folgende 3 Grundfragen gestellt werden:

Sind im Körper zirkulierende epitheliale Zellen (=CEC) überhaupt neoplastisch oder handelt es sich um normale epitheliale Zellen?

Dazu konnten Fehm 2002, S. 2073-84 und wenige weitere Studien für CEC verschiedener Tumoren eine Aneusomie nachweisen. Die Muster der genetischen Aberrationen korrespondierten dabei mit den Veränderungen im Primärtumor. Dabei handelte es sich in der durchgeführten FISH Analyse hauptsächlich um Zuwachs an Chromosomen oder Genen weniger um einen Verlust. CEC sind somit als neoplastisch zu werten.

Was ist gemeint mit dem Zustand der cell dormancy und welche Bedeutung hat er?

Dieser beschreibt nach Riethmüller, 1992, S. 204 ein Ruhestadium zwischen Proliferation und Apoptose. Die Zelle verharrt dabei in der G₀-Phase und kann auf diese Weise lange klinisch latent bleiben. Von „außen“ getriggert wird sie dann entweder apoptotisch oder beginnt sich zu teilen und einen Zellklon zu formen. Meng 2004, S. 8152-62 konnte anhand von 36 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom zeigen, dass 7-22 Jahre nach der Diagnose und ohne Krankheitszeichen immer noch Tumorzellen im Knochenmark nachzuweisen sind. Zwischen Zelltod und Tumorzellerneuerung muß es bei Patienten mit disseminierten Tumorzellen im „dormancy“ Stadium also eine Art stabiles Gleichgewicht geben.

Weitere wichtige zu klärende Begriffe sind die genomische Tumorzellinstabilität- und Heterogenität.

Isolierte Tumorzellen zeigen chromosomale Aberrationen verschiedenster Art, was wie oben gezeigt die maligne Natur der Zellen beweist. Dabei divergieren beim gleichen Patienten die gefundenen Aberrationen von Zelle zu Zelle. (Riethmüller 1999, S. 294-5).

Phänotypisch, d.h. auf dem Proteinlevel und damit in der Funktionalität der Zelle, liegt ebenfalls eine Heterogenität der Tumorzellen vor.

Tumorzellen zeigen nach Riethmüller 1994 und 1999 somit eine erhöhte Variabilität, welche im Gegensatz zu normal regulierten Zellen in Zellklonen resultieren kann, die bezüglich ihres Wachstums einen Selektionsvorteil in folgendem Sinne haben:

1. Unabhängigkeit von Wachstumsstimuli, unbegrenztes Proliferationspotential, Resistenz gegenüber Apoptose und Wachstumsinhibition sowie Fähigkeit zur Induktion von Angiogenese und Zellinvasion. Da diese Eigenschaften stadienunabhängig sind, kann eine Tumorzell dissemination zu jedem Zeitpunkt der Tumorentwicklung stattfinden

2. Wird der Primärtumor reseziert, bleiben die zuvor sich losgelösten und je nach Zellklon verschieden genetisch ausgestatteten Tumorzellen unberührt. Sie können dann absterben, in den Zustand der cell dormancy übergehen oder sich weiterentwickeln.

In dem von Klein, 2003, S.35-67 entworfenen Metastasierungsmodell tendieren Tumorzellen dazu, losgelöst vom oder im Primärtumor, im Lauf ihrer Entwicklung von einem genetisch instabilen in einen stabilen Zustand überzugehen. Der Großteil der Metastasen soll von disseminierten instabilen Zellen ausgehen und nur ein kleiner Teil von den stabilen Formen des Primarius. Diese instabilen Zellen erreichen teilweise durch spezifische Mutationen einen stabilen und an die Umgebung adaptierten Zustand bis sie genotypisch so ausgestattet sind, dass sie potent genug sind, eine Metastase zu formieren. Der Logik des Darwinschen Prinzips folgend werden dabei nach Klein die aggressivsten und „fittesten“ Genotypen selektioniert.

Teilweise aber sind die Zellen so wenig ausgereift und empfindlich, dass bei der Dissemination wichtige tumorzellbiologische Eigenschaften verloren haben oder in eine Art Dämmerzustand (=cell dormancy) übergehen.

Ob letztendlich nach dem Kleinschen Metastasierungsmodell eine Metastase entsteht, ist nicht nur von der genetischen Stabilität und dem Ausreifungsgrad der Zelle (=seed) abhängig, sondern auch vom Einfluß und Selektionsdruck der externen Gegebenheiten, des sog. microenvironment (=soil); d.h. die Tumorzelle muss so ausgestattet sein, dass sie sich einerseits vor Attacken durch Immuneffektorzellen (B-Zellen und T-Zellen) schützen kann, aber andererseits in dem neuen Milieu anwachsen und sich vermehren kann.

Die Einzelzelle an sich stellt somit nicht das eigentliche therapeutische Problem dar, sondern ihre sich auf dem Weg zur Metastase ändernde genetische Ausstattung bzw ihr Phänotyp.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass nach o.g. Modell disseminierte Tumorzellen als Vorläufer von Metastasen zu betrachten sind, welche aus einem Pool genetisch variabler Zellen selektioniert wurden und auf ihrem Weg zur Metastase noch näher zu erforschende genotypische und phänotypische Voraussetzungen erfüllen müssen. Ob eine Einzelzelle in Apoptose oder Dormancy übergeht oder Ausgangspunkt einer Metastasierung wird, ist für das Patientenschicksal entscheidend.

In dieser Arbeit soll daher ein Hauptaugenmerk auf der Phänotypisierung zytokeratinpositiver Zellen liegen. Eine Präzisierung der Prognose und der damit implizierten Therapie scheint erst durch eine differenziertere Betrachtung der Tumorbiologie möglich.

Der Prozess der Metastasierung ist vom heutigen Standpunkt aus gesehen ein sehr komplexes und wohl auch frühes Geschehen, das nicht eindimensional betrachtet werden kann, sondern in mehreren parallelen Schritten abläuft. Sicher bedarf es weiterer Forschung zum Verständnis der Tumorzell dissemination und der Formation von Metastasen, um durch effiziente adjuvante Therapien die disseminierten Tumorzellen abzutöten.

1.4 MRD- Definition, Historie, Gegenwart, Zukunft

Minimal Residual Disease ist nach Definition von Diel 1998, S.1 die Bezeichnung eines neuen Forschungszweigs der Onkologie, der sich mit dem Nachweis mikroskopischer und submikroskopischer Tumorresiduen in unterschiedlichen Körpergeweben, Flüssigkeiten und Transplantaten beschäftigt.

Neben dem Blut als transitorisches Reservoir und den Lymphknoten hat sich das Knochenmark als interessantestes und am meisten beforschtes „Filterorgan“ herauskristallisiert.

Der Nachweis von Tumorzellen im Blut wurde erstmals von Sanson 1834 als diathèse cancéreuse und von Ashworth 1869 beschrieben. Dies als Routineuntersuchung zu etablieren, war wegen des enormen zeitlichen und technischen Aufwands und der Seltenheit eine solche Zelle nachzuweisen ausgeschlossen. Engell entwickelte 1955 eine spezielle Blocktechnik, mit der zirkulierende Tumorzellen nachweisbar waren. Jedoch war die Spezifität aufgrund der Verunreinigung durch Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ziemlich niedrig.

Der „Durchbruch“ für die MRD-Forschung gelang Sloane und Dearnaley vom Royal Marsden Hospital und Ludwig Institute for Cancer Research in London erst 1980-82. Sie führten immunzytologische Arbeitstechniken ein und konnten durch Einsatz von Antikörpern gegen Epithelmembranen eine Detektion von Tumorresiduen in einer Größenordnung von 20-30% nachweisen (Dearnaley 1983, S. 359).

Neben der IHC als der am häufigsten verwandten Technik, geht laut Diel, 1998, S.2-3 heute der Forschungstrend in Richtung molekularbiologischer Nachweismethoden (PCR, FISH). Durchflusszytometrie, ELISA und Zellkultur haben eigentlich klinisch keinerlei Bedeutung.

Leider herrscht auch unter den Zellforschern, die sich mit MRD beschäftigen eine babylonische Begriffsverwirrung:

Während Braun und mehrere angloamerikanische Forscher gerne den Begriff Mikrometastasierung oder okkulte Metastasierung verwenden, hat sich die Arbeitsgruppe um Harbeck vorsichtigerweise auf den Begriff

disseminierter Tumorzellen bzw. zytokeratinpositiver Zellen geeinigt. Weitere Synonyme sind epitheliale Zellen, mikrometastatische Zellen, extrinsische Zellen etc.

Die UICC empfiehlt optional den Nachweis solcher Zellen mit (i) zu kennzeichnen im Gegensatz zu (mi) für mikroinvasive Läsionen <2mm. Mikrometastasen sind stromahaltige Zellverbände, die Anschluss ans Kapillarsystem gefunden haben, was bei Einzelzellen nicht der Fall ist.

Diese Einzelzellen könnten nach den zahlreichen Arbeiten von Diehl 1994-1999 der missing link zwischen Primärtumor und Mikrometastasen sein.

Jedoch ist es nach ihrer Detektion wie unter 1.3. beschreiben bisher nicht möglich zu unterscheiden, ob die Zelle nach der Latenzphase der „cell dormancy“ (=Ruhephase) in eine aggressive Zelle mit metastatischer Potenz übergeht oder durch Apoptose und Nekrose „verdämmert“.

Dies aufzudecken muss nach Allgayer und Heiss, 2001, S.1-4 die Zukunft weiterer MRD-Forschung sein, um Eingang in die Klinik über neue molekulare Staging Modelle zu finden und chirurgisch-biologisch-multimodale Therapieansätze zu konzipieren.

Der Nachweis von MRD bietet demnach viele Chancen:

1. Neben dem Einsatz als Prognosefaktor, ob als unabhängiger oder abhängiger Faktor ist bisweilen noch Gegenstand heftiger Diskussionen (siehe 4.3), können mittels Phänotypisierung des Proteinlevels neue Therapietargets definiert werden unabhängig vom Primärtumor. In Zukunft kann dann eventuell mittels single cell PCR auf die genetische Ausstattung geschlossen werden und sich so neue Wege für genbasierte Therapieformen öffnen. (Allgayer 2001, S.1-4)

2. Sobald neue therapeutische Wege beschritten werden, steht mit dem Knochenmark ein Kompartiment zur Verfügung, das leicht und komplikationslos für ein Therapiemonitoring und auch ein Restaging in der Tumornachsorge (Braun 2000, S.82-85) zugänglich ist.

Um diese Chancen wahrzunehmen, sollten die Assays zum Nachweis disseminierter TZ standardisiert sein und multizentrische prospektive

randomisierte Studien anlaufen wie in diversen Arbeiten (Pantel, Naume, Borgen, Braun) gefordert wird.

Bei all den klinischen Implikationen darf man nicht die weiteren Forschungsmöglichkeiten vergessen:

MRD wurde einst begonnen, um eine Zellstreuung nachzuweisen noch bevor dies apparativ möglich ist und damit frühe metastatische Abläufe im Organismus Mensch zu untersuchen und aufzuklären. (Diel 1998, 8)

1.5 Zytokeratine 8/18/19 und ihre Rolle in der MRD beim Mammakarzinom

Frühe Stadien der Metastasierung können auch im Zeitalter des PET bisher apparativ noch nicht detektiert werden. Ziel der Suche und Charakterisierung disseminierter Tumorzellen ist die Identifikation von Hochrisikopatienten und deren auf die individuelle Tumorbilologie zugeschnittene Therapie. (Diel, 1998, S. 8)

Das Knochenmark als gut zugängliches Filterorgan für hämatogene Metastasen und Hauptsitz von Fernmetastasen unterschiedlichster Tumorentitäten ist normalerweise Reservoir für Zellen der Lympo- und Erythropoese, welche mesenchymalen Ursprungs sind. Es eignet sich also bestens auf Tumorzellen, welche epithelialen Ursprungs sind, untersucht zu werden. (Diel, 1998, S.7, Pantel, 1997, S. 1241)

Am häufigsten werden in immunzytochemischen Verfahren monoklonale Antikörper gegen Zytokeratine, als Hauptbestandteil des Zytoskeletts, oder Membranantigene (epithelial membran antigen=EMA, tumor-associated glycoprotein 12=TAG 12, human epithelial antigen-125=HEA 125) benutzt. Letztgenannte sind wenig zuverlässig, da sie mit hämatopoetischen Zellen häufig kreuzreagieren. (Pantel 1998, S. 521-523).

Zytokeratine gehören zur Familie der Intermediärfilamente (7-11nm Dicke) und setzen sich aus 20 bisher bekannten Keratinen zusammen, (Moll 1990, S.567-80).

Alle Zellen in vivo bestehen aus Zytokeratin. Mit ihrem spezifischen Expressionsmuster lassen sich nicht nur verschiedene Epithelien klassifizieren, sondern auch Proliferation und Differenzierung charakterisieren. Primärtumoren und deren Metastasen exprimieren ein charakteristisches Zytokeratinmuster, so dass sie als Markerproteine vor allem bei der histopathologischen Zuordnung metastatischer oftmals entdifferenzierter Zellen zu einem Primärtumor eine große Rolle spielen. (Fuchs 1988, S.277).

Physiologischerweise werden in Zellen des luminalen Brustdrüsenepithels Keratin 7/8/18/19 nachgewiesen, in Basalzellen des Brustdrüsenepithels hingegen Keratin 5/14/17. Dieses Expressionsmuster ist relativ stabil, kann sich allerdings bei der malignen Transformation verändern. (Moll 1990, S. 568).

Trask 1990, S.2322 konnte mittels Gelelektrophorese zeigen, dass normales Brustdrüsengewebe vor allem Keratin 5/6/7/14/17 exprimiert. Dieses Profil verschiebt sich bei Tumorzellen in Richtung Expressionsmuster für luminale Brustdrüsenzellen. Sie exprimieren hauptsächlich Keratin 8/18/19 bei sinkendem Keratin 5/14/17. Diese Ergebnisse konnte Tsubura 1991, S.520 mittels Immunhistochemie bestätigen: 80% der Mammakarzinomzellen exprimieren Keratin 8/18/19 und 96% exprimieren mindestens eines dieser Keratine. Mehrere Arbeiten (Brotherick, 1998, S. Malzahn, 1998, S. 119) weisen darauf hin, dass eine Profilverchiebung und damit phänotypische Veränderungen der Keratine mit einer Veränderung der Tumorbiologie und Tumorprogression korrelieren.

Aus diesem Grunde bieten sich nach den Arbeiten von Pantel, 1997, S.1242 und Riethmüller, 1992, S. 204 Färbungen für das Panel Keratin 8/18/19 zur Suche nach disseminierten Tumorzellen an. Durch Einsatz von monoklonalen Antikörpern, welche die gewünschten Zytokeratinepitope

erkennen, können in der Immunzytochemie die gesuchten Zellen spezifisch detektiert werden. Eine ektope oder unspezifische Expression von Zytokeratinen in mesenchymalen Zellen ist nicht ganz auszuschliessen. Zahlreiche negative Befunde an Patienten ohne Karzinom zeigen aber, dass Knochenmarkzellen nur selten zytokeratinpositiv sind. (Pantel 1997, S. 1242)

Die Gruppe um Riethmüller war 1985 eine der ersten, die monoklonale Antikörper gegen Keratin 8/18/19 in der Suche nach disseminierten Tumorzellen einsetzte, mit dem Vorteil einer gegenüber anderen Epitopen erhöhten Spezifität und Sensitivität bei fehlenden Kreuzreaktionen mit umgebenden nicht-epithelialen Zellen.

Im Zuge der Notwendigkeit standardisierte Protokolle zur Methodik in der MRD-Forschung einzuführen, wird international die Detektion der Keratine 8/18/19 mit monoklonalen Antikörpern gefordert, was die Bedeutung dieses Zytokeratinpanels in der Tumorzellforschung unterstreicht, Braun 2001 S. 286-87.

1.6 Der uPA-Rezeptor und das Urokinasesystem im tumorbiologischen Kontext

Tumorassoziierte Proteasen, ihre Rezeptoren und Inhibitoren sind wie unter 1.3 beschrieben durch Umbau der extrazellulären Matrix bei Tumorinvasion und Metastasierung maßgeblich beteiligt.

Die klinische Forschung konzentriert sich dabei vor allem auf das Urokinasesystem.

Zu diesem System gehören nach Mühlenweg, 2001, S.683 uPA (=Plasminogen-Aktivator vom Urokinasetyp), sein Rezeptor uPA-R und sein Inhibitor PAI-1/2.

Nach Schmitt, 1995, S.155-157 ist uPA-R ein 45-50 kDa schweres Glykoprotein. Es ist mittels eines Glycolipidankers (GPI) kovalent, d.h. mobil mit der Zellmembran verbunden. Das Epitop zur Bindung von uPA befindet sich innerhalb seiner ersten 87 Aminosäuren, der N-terminalen Domäne. An die anderen beiden Bindungsstellen kann Vitronektin, ein

Bestandteil der extrazellulären Matrix, binden. uPA liegt in verschiedenen Zustandsformen vor:

1. als einkettiges Proenzym,
2. als hochmolekulares enzymatisch wirksames doppelkettiges HMW-uPA (52kDA),
3. als niedermolekulares enzymatisch wirksames doppelkettiges LMW-uPA (34kDA) und
4. als sog. enzymatisch inaktives aminoterminales Fragment =ATS (16kDA), welches auch die uPA-R Bindungsdomäne (=Growth-Faktorlike-Domain) enthält.

Der C-Terminus trägt die eigentliche Proteinase, welche Plasminogen in Plasmin umsetzt.

Die Struktur von uPA und uPA-R und ihre Interaktion soll anhand von Abb.3 dargestellt werden.

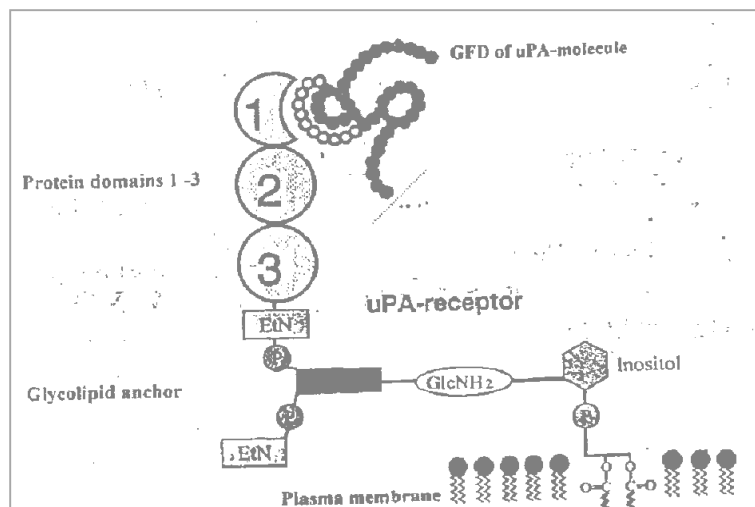


Abb 3: Interaktion und Struktur von uPA-R und uPA, aus Schmitt, J.Obstet.Gynaecol, 1995, S.156

uPA und seinen Rezeptor findet man in und auf Tumorzellen sowie normalen Zellen (Tubuluszellen der Niere, Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten, Trophoblastzellen, Pneumozyten, Nervenzellen) Diese Zellen setzen Plasminogen-Aktivatoren als Vorstufen sog. pro-uPA frei. Durch verschiedene Enzyme wie z.B. Plasmin, Cathepsin B und L,

Kallikrein, etc. wird pro-uPA in die aktive Form uPA überführt, welches die enzymatische Umsetzung von inaktivem Plasminogen in Plasmin bewirkt. (Schmitt, 1992, S.3-4).

Plasmin ist als Serinprotease ein zentrales Molekül der zellulären Proteolyse. Diese geschieht entweder direkt an der Zelloberfläche durch Bindung an den uPA-R oder in der Zellumgebung durch aktiviertes uPA. Normalerweise bewirkt uPA beim Menschen den kontrollierten Abbau und Umbau von Geweben bei Prozessen wie Ovulation, Trophoblastinvasion und Wundheilung. (Mühlenweg, 2001, S. 685)

Bei der Tumorzelle führt die Bindung von uPA an die Oberfläche seines Rezeptors uPA-R ebenfalls zu aktivem Plasmin, wodurch die Zelle die sie umgebende Matrix sowie die Basalmembran abbauen kann (Proteolyse), sich loslösen und in Gewebe eindringen kann (Migration und Invasion). Ferner ist die Fähigkeit Proteine abzubauen während der Entwicklung den Tumor versorgender Blutgefäßen essentiell (Angiogenese), (Graeff, 1991 S.93-94, Blasi, 1997, S. 417).

Zwei weitere wichtige Faktoren neben vielen anderen greifen in das Plasminogenaktivierungssystem ein:

1. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 kurz PAI-1 hat nach Harbeck 2001; S. 239, vielfältige und teilweise seinem Namen nicht gerechtfertigte Funktionen:

Produziert wird er von Endothelzellen, Granulosazelle, Thrombozyten und Tumorzellen. Er inhibiert an uPA-R gebundenes uPA, indem die Zelle nach Bindung von PAI an den uPA/uPA-R Komplex alle drei Moleküle aufnimmt, uPA und PAI-1 abbaut und den uPA-Rezeptor an der Zelloberfläche wieder exprimiert. Dadurch kommt es einerseits zu einer Verminderung der proteolytischen Aktivität, andererseits aber auch zum Anschalten einer intrazellulären Signaltransduktionkette, welche die Zellproliferation fördert. Die Tumorzelle ist so nach initialer Loslösung aus dem Zellverband im Rahmen der Reimplantation und Metastasenbildung fähig, neues Stroma zu bilden. Zusammen mit Plasmin kann uPA auch

Wachstumsfaktoren aktivieren; d.h. uPA wirkt in direkter und indirekter Hinsicht wie ein Wachstumsfaktor. (Mühlenweg, 2001, S.684-5)

2. Vitronectin wird beim Prozess des Anheftens von Zellen an Gewebe benötigt. Die Bindungsstelle von Vitronectin an uPA-R ermöglicht damit Tumorzellen sich festzusetzen und Zell-Zellkontakte knüpfen zu können (Zelladhäsion). (Schmitt, 1997, S.286)

Wird Vitronectin an PAI gebunden, passiert genau das Gegenteil, nämlich ein Ablösen von Zellen aus dem Gewebsverband. (Blasi, 1997, S. 417).

Die Tumorzelle ist darüber hinaus in der Lage, nicht nur die Menge an aktivem Enzym, sondern auch seine Lokalisation auf der Zelloberfläche zu regulieren. Die topischen Gegebenheiten an den verschiedenen Oberflächenbereichen der Zelle sind für proteolytisch aktive und inaktive Zustände gegeben, so dass wesentliche tumorzellbiologische Funktionen reguliert werden können. (Schmitt, 1997, S.285)

Die Art des Zusammenspiels von uPA, uPA-R und PAI-1 bestimmt die Vorgänge Proteolyse, Migration, Invasion, Adhäsion und letztendlich die Metastasierung, was folgende Abbildung verdeutlichen soll:

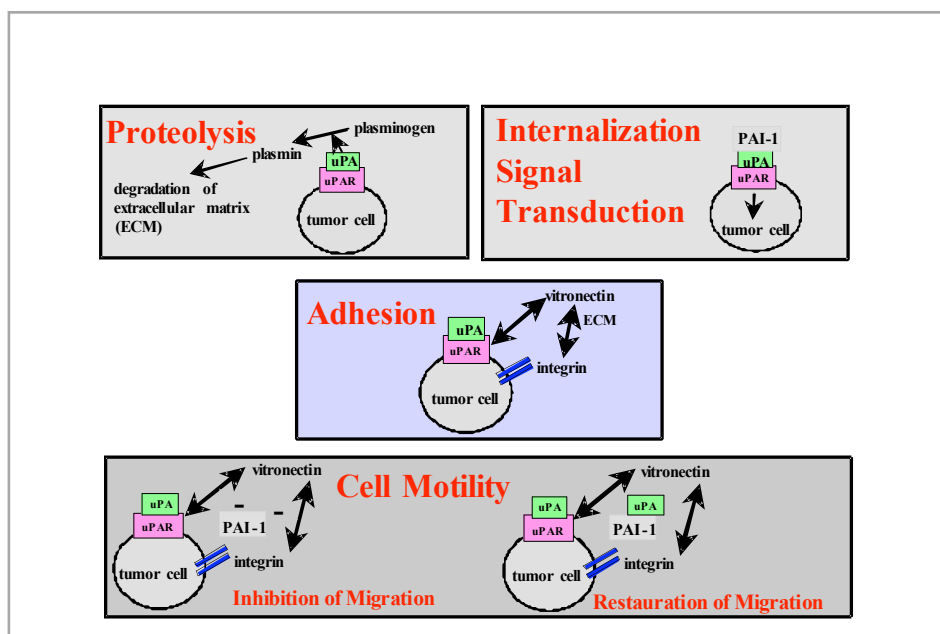


Abb.4: Biologische Bedeutung von uPA und PAI-1 aus Harbeck Onkologie 2001, S.240

Der uPA-Rezeptor ist somit hinsichtlich Tumorzellaggressivität ein zentrales Oberflächenprotein. In der vorliegenden Arbeit sollen zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen auf dessen Expression und Gehalt näher untersuchen wollten

1.7 Her2: Onkogen mit klinischer Relevanz beim Mammakarzinom

Her2 ist ein 185-kDa schwerer Glycoproteinrezeptor für Wachstumshormone, der sich an der Zelloberfläche verschiedener Körperzellen unter anderem auch gesunder Brustzellen befindet (siehe Abb.5).

Er gehört zur Familie der EGF-Rezeptoren (= **E**pidermal **G**rowth **F**actor Receptor), welche 4 strukturell verwandte Tyrosinkinaserzeptoren (Her1-4) umfasst, und wird auf dem Chromosom 17 kodiert. (Revillion, 1998, S. 791)

Wachstumsfaktoren werden von sog. Protoonkogenen kodiert, welche mit sog. Tumorsuppressorgenen und deren Produkte interagieren und eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung spielen. Kommt es zu einer Transformation dieser Gene, verliert die normale Zelle ihr Gleichgewicht und entartet. (Silwkowski, 1999, S.60).

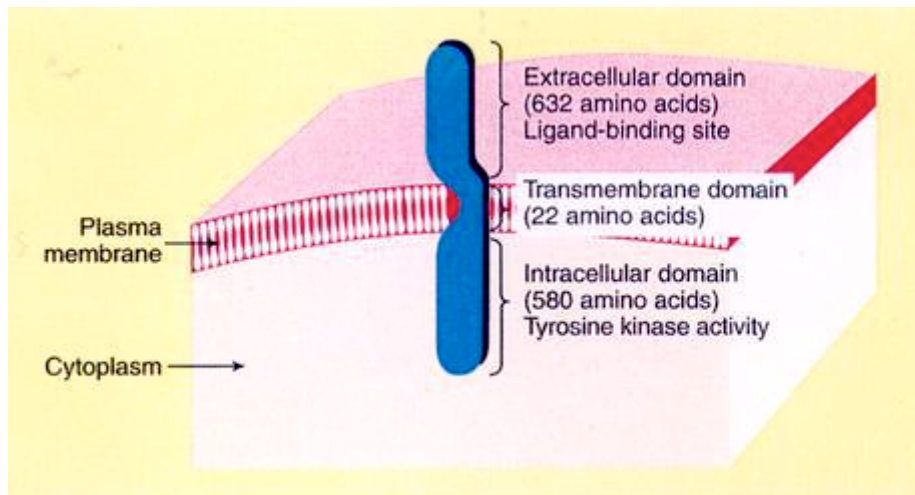


Abb.5: Schematische Darstellung des Her2 Rezeptors, Quelle: modifizierte Internetpräsentation der Firma Roche zu Herceptin™, <http://www.roche.com>, Stand 18.4.2004

Jeder Her-Rezeptor besteht aus einer extrazellulären, transmembranösen und intrazellulären Domäne, welche bei Her2 die Tyrosinkinase beinhaltet. Beim Her2 Rezeptor ist der Oberflächenligand bisher nicht identifiziert, jedoch ist der Rezeptor wie in Abb.6 gezeigt in der Lage Homodimere (Her2 mit Her2) zu bilden oder eine Dimerisierung mit anderen EGF-Rezeptoren einzugehen (=Heterodimere) (Silwkowski, 1999, S.60-61).

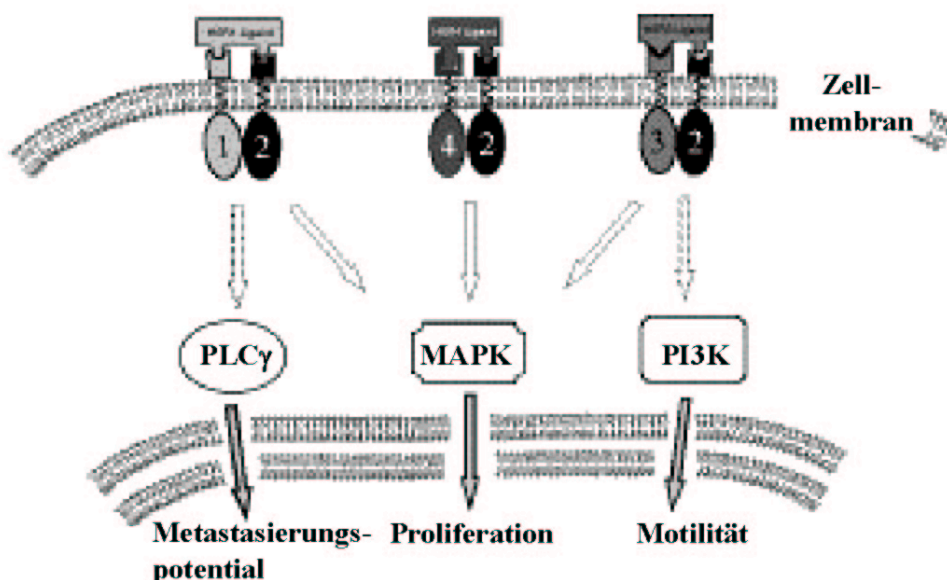


Abb.6: Dimerisierung von Rezeptoren der EGFR-Familie, Quelle: mit freundlicher Genehmigung von Dr. Lüftner, Berlin, aus ihrem Vortrag zu Herceptin anlässlich des Kurses zur gynäkologischen Zertifizierung in Kassel, 2004

Eine Bindung von unbekanntem Wachstumshormonen an den Rezeptorkomplex oder bei hoher Rezeptordichte eine Homo-/Heterodimerisierung alleine hat eine Aktivierung intrinsischer Kinasen (Tyrosinkinase, Mitogen-activated-pathway-kinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase, etc.) zur Folge; d.h. über komplexe Signaltransduktionswege werden Gene für Motilität, Proliferation und Metastasierung aktiviert (siehe Abb.7). (Konecny, 1999, S. 624-31). Eine erhöhte Aktivität der Tyrosinkinase kann Konecny nach in einem unkontrolliertem Zellwachstum und Zellteilung resultieren und impliziert ein gesteigertes Metastasierungspotential. Ist die Zahl der Her2 Rezeptoren auf der Zelle überexprimiert, so kann sie vermehrt Wachstumssignale empfangen und über den o.g. Mechanismus aus dem unkontrolliert sich teilenden Zellklon ein aggressiver Tumor entstehen (Dowsett 2000, S.170-76)

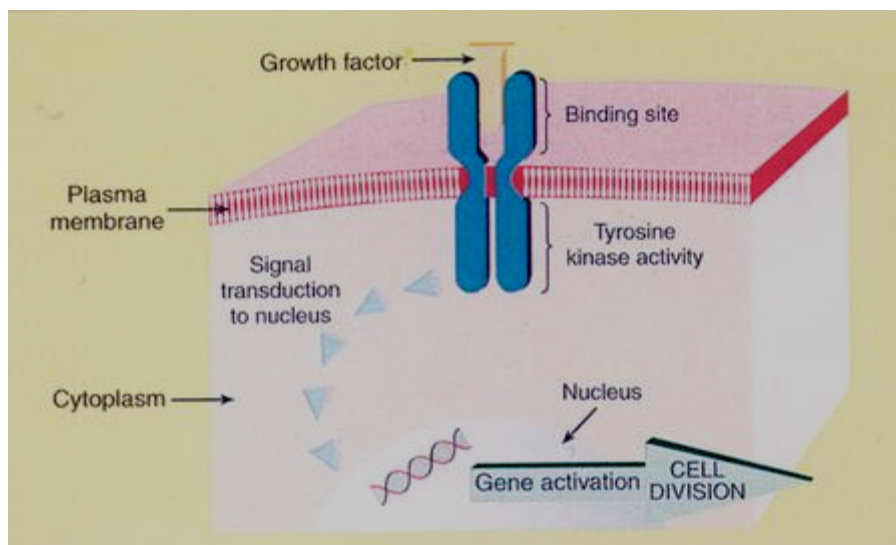


Abb.7: Her2 und seine Signaltransduktion

Quelle: modifiziert nach einer Internetpräsentation der Firma Roche zu Herceptin™, <http://www.roche.com>, Stand: 18.4.2004

In 25-30% findet man im Primärtumor bei Brustkrebspatienten Her2 amplifiziert (Slamon 1987, S. 177-182). Die Überexpression von Her2 ist Indikator für aggressives Tumorwachstum und eine ungünstigere Prognose hinsichtlich Krankheitsfreiem- und Gesamtüberleben, was Abb.8 verdeutlichen soll.

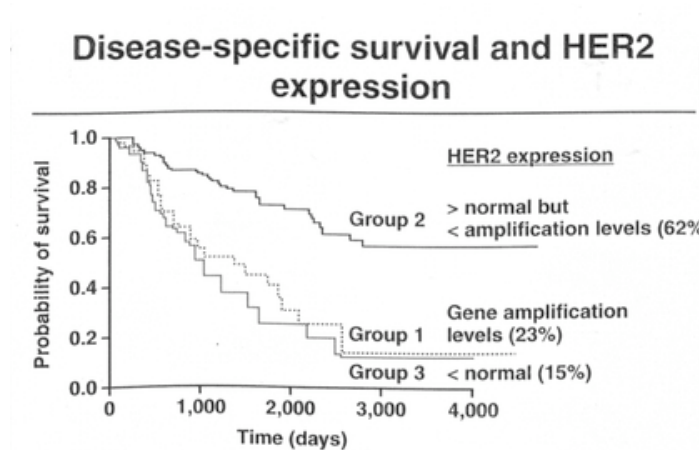


Abb.8: Gesamtüberleben und Her-2 Expression modifiziert nach Cooke, Abstract zur European Cancer Conference, 1999

Das Wissen um die Wichtigkeit von Her2 im Prozess der malignen Transformation eines Tumors führte zu zahlreichen Studien mit dem Ziel in die Kaskade der Her2 Signaltransduktion einzugreifen und Ansätze zur therapeutischen Intervention zu finden. (Bacus, 1992, S. 2580, Slamon, 1987, S.177, Ross, 1999, S.125)

Mit der Entwicklung des humanisierten Antikörpers Herceptin™ (siehe auch Kapitel 5.3.1.1) gegen Her2 steht ein gut verträgliches Remissions – und Überlebenszeit verlängerndes Medikament zur Mono- oder Kombinationstherapie zur Verfügung (Eisenhauer, 2001, S.841-42), das angesichts der kürzlich abgeschlossenen HERA Studie an Bedeutung zunehmen und zukünftig auch in der adjuvanten Therapie routinemäßig eingesetzt wird.

Eine Untersuchung der Expression von Her2 auf zytokeratinpositiven Einzelzellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen erschien uns daher im Kontext eines gezielten „Therapietailorings“ sinnvoll.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Einzelne Tumorzellen können schon in sehr frühen Stadien - sogar beim Carcinoma in situ - einer Krebserkrankung verstreut werden. (Klein, 1999, S.4494-9). Diese zirkulierenden Zellen unterscheiden sich wie in 1.3. gezeigt in ihrem tumorbiologischen Verhalten:

1. Ein Teil der Zellen scheinen passiv verstreute, sog. shed tumor cells zu sein und können durch das körpereigene Immunsystem eliminiert werden, so dass eine Heilung der Tumorerkrankung möglich ist.
2. Andere jedoch besitzen einen aggressiven Charakter und sind trotz Primärtherapie für den weiteren Krankheitsverlauf (Rezidiv, Metastasen) von Bedeutung. Kennzeichnend für ihre Aggressivität sind bestimmte Zelloberflächen-Determinanten.

Heiss konnte 1995, S. 1035-1039 an Magenkarzinomzellen im Knochenmark zeigen, dass disseminierte Zellen mit uPA-R Besatz beim Magenkarzinom mit einer signifikant schlechteren Prognose für die Patienten korrelieren.

Eine andere spannende Zelloberflächendeterminante ist der Her-2 Rezeptor. Seine Überexpression auf zirkulierenden Brustkrebszellen ist ebenfalls mit einem schlechteren Überleben und höheren Frequenz an Fernmetastasen verbunden (Braun 1999, S.79).

Die meisten Studien in der MRD-Forschung wurden bisher an Knochenmark mittels Immunzytologie durchgeführt.

Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde eine immunzytologische Detektionsmethode etabliert und die klinische Bedeutung von zirkulierenden Mammakarzinomzellen dargestellt (Harbeck 1997, S. 387-92).

Zur Detektion und weiteren Phänotypisierung wurde eine neue hochsensitive Doppelimmunfluoreszenzmethode entwickelt. Sie erlaubt mittels konfokaler Laserscanmikroskopie Tumorzellantigene wie uPA-R oder Her-2 nicht nur qualitativ zu erfassen, sondern auch zu quantifizieren. (Noack 1999, S. 617-623)

Dieser völlig neuartige Ansatz zur Detektion und Phänotypisierung zirkulierender Tumorzellen, seine Verbesserung und klinische Implementierung sind Gegenstand dieser Arbeit.

Hierfür wurden an der Frauenklinik rechts der Isar bei Patientinnen mit Brustkrebs die Entnahme von Knochenmark, Aufarbeitung und methodologische Auswertung etabliert.

Ziel des experimentellen Teils der Arbeit ist:

1. Zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen mit der neuen Methode zu detektieren (Überprüfung der Detektionsrate in der IF) und bezüglich ihrer Proliferations- und Metastasierungsfähigkeit zu charakterisieren (Phänotypisierung).
2. Der Gehalt an uPA-R und Her-2 soll auf Proteinebene mittels quantitativer konfokaler Laserscan-Mikroskopie untersucht werden. Dabei soll schwerpunktmäßig auf Methodik und Verfeinerung der Zellaufarbeitung eingegangen werden. Weiterführende und vorbereitende technische Möglichkeiten im Hinblick auf Genotypisierung und 3D-Visualisierung der detektierten Zellen sollen aufgezeigt werden.

Im theoretisch-statistischen Teil der Arbeit soll folgendes gezeigt werden:

1. Die Korrelation des Knochenmarksstatus mit den etablierten Prognosefaktoren.
2. Die Expression von uPA-R bzw. Her-2 auf disseminierten Tumorzellen in Korrelation mit den klinischen Verlaufsdaten.

2. Material und Methoden

2.1 Patientengut

An der Frauenklinik rechts der Isar wurde von der Klinischen Forschergruppe in Anlehnung an laufende Studien beim Ovarial- und Ösophaguskarzinom im Rahmen dieser Promotionsarbeit folgendes Pilotprojekt bei Mammakarzinompatientinnen initiiert:

Bei Patientinnen mit Brustkrebs wurden im Rahmen der klinischen Routineversorgung Knochenmarksaspirate entnommen, aufgearbeitet und auf disseminierte Tumorzellen und deren tumorbiologischen Eigenschaften untersucht.

Von Februar 2000 bis Februar 2001 wurden insgesamt 111 Patientinnen mit Verdacht auf Mammakarzinom am Beckenkamm biopsiert. Alle Stenzen wurden präoperativ in Intubationsnarkose und vor Beginn einer evtl. Chemotherapie entnommen. 5 Patientinnen waren allerdings im Rahmen einer primär systemischen Therapie vorbehandelt.

Die Rekrutierung der Patientinnen erfolgte im Sinne eines „informed consent“; d.h. jede Patientin wurde im Rahmen der Operationsaufklärung über Art und Umfang des geplanten Eingriffs sowie über etwaige Risiken und Nebenwirkung (Nachblutung, Infektion, Hämatom) der Punktion informiert und auf die Freiwilligkeit des Eingriffs hingewiesen.

Punktiert wurden Patientinnen mit primärem Mammakarzinom ohne Zweitmalignom, ohne Blutungsrisiken und ohne Hinweis auf gravierende Komorbiditäten.

Die Auswertung der Aspirate erfolgte verblindet, in Unkenntnis der endgültigen Mammahistologie.

Die weitere Charakterisierung des Patientenguts soll im Kapitel Ergebnisse und Resultate unter 3.1 detailliert beschrieben werden.

2.2 Knochenmarksaspirat

2.2.1 Gewinnung und Technik

Die Aspiration wurde nach schriftlicher Einwilligung der Patientin in Vollnarkose präoperativ entnommen. Um das Infektionsrisiko zu minimieren, wurde im OP unter sterilen Kautelen gearbeitet. Nach Rechtsseitenlagerung, Desinfektion und sterilem Abdecken mit einem Lochtuch erfolgte die Punktion mit einer Hohlnadel (Durchmesser 15 g, Länge 43mm, siehe Materialliste) unilokulär an der linken Spina iliaca posterior superior.

Im Gegensatz zu anderen Studiengruppen entschieden wir uns wegen des höheren Verletzungsrisikos, der geringeren Ausbeute und niedrigeren Knochenmarksqualität gegen die Spina iliaca anterior superior als Biopsieort.

Um eine Verunreinigung des Aspirats mit zytokeratinpositiven Keratozyten zu vermeiden, wurde die Haut mit einem spitzen Skalpell inzidiert und dann mit der Hohlnadel in die Substantia compacta des Beckenkamms eingegangen. In der Substantia spongiosa angekommen wurden fächerförmig insgesamt ca. 14-18 ml Markraumflüssigkeit aspiriert.

Die ersten 2 ml wurden mit 0,5 ml Na-EDTA versetzt und zur Qualitätskontrolle gegeben (siehe 2.3.2.4).

Die restlichen 12-16 ml wurden in 2 Fraktionen an unterschiedlichen Knochenpunktionsorten entnommen.

Um eine Koagulation des Knochenmarkaspirats zu vermeiden, wurden die Einwegsspritzen heparinisiert, die Transportgefäße mit 2,0 ml Heparin versehen und mit dem Aspirat gut vermischt.

Nach der Punktion wurde die Entnahmestelle mit einem sterilen Pflaster abgeklebt und die Patientin für die folgende OP auf den Rücken gelagert.

Der zeitliche Aufwand betrug ca. 10 min.

Anschliessend wurde das Material auf Eis gekühlt ins Labor transportiert und sofort aufgearbeitet (siehe 2.2.2).

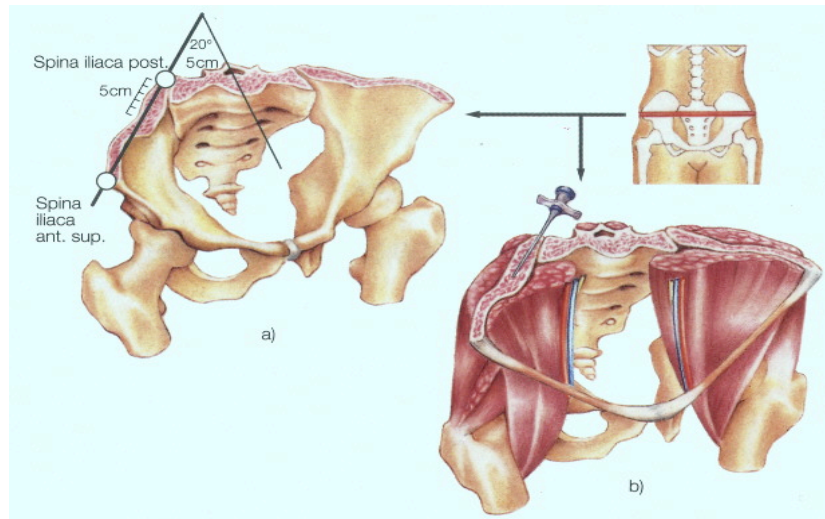


Abb.9: Schematische Darstellung einer Beckenkammpunktion, Abbildung modifiziert nach einer Produktbroschüre der Firma Gallini, Italien, 2000, S.3

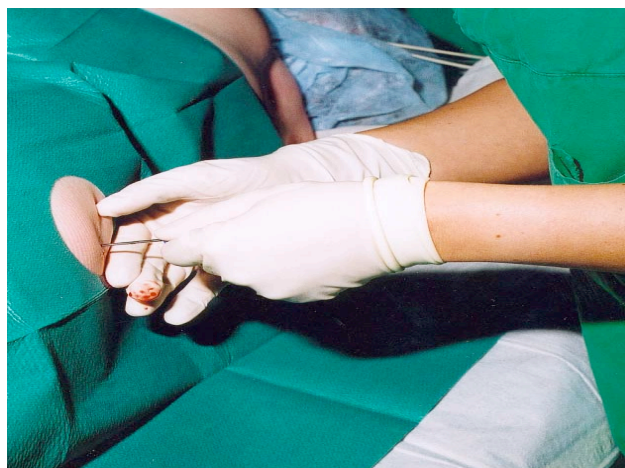


Abb.10: Lagerung und Punktion im OP, Quelle: eigenes Foto

2.2.2 Aufarbeitungsschritte und Herstellung von Zytospins

Die Aufarbeitung des heparinisierten Aspirats erfolgte optimaler Weise sofort, spätestens jedoch nach 2 Stunden. Das Material wurde dabei konsequent auf Eis gekühlt und nach der von Boyum 1968, S.7 und Loos und Roos 1974, S.333-341 entwickelten Methode bearbeitet.

Ziel ist die Isolation von mononukleären Zellen mittels Dichtezentrifugation.

Das Punktat wurde im Verhältnis 1:2 mit Gibco PBS (w/o Mg, Ca) (Phosphate Buffered Saline) verdünnt und langsam über das Trennmedium Ficoll™ (Dichte 1,077g/cm) geschichtet. Um eine saubere Auftrennung zu erhalten, wurden in mehreren 15 ml Falconröhrchen auf 7 ml Ficoll™ 8 ml Knochenmarksuspension langsam pipettiert. Ein Durchschlagen des Flüssigkeitsspiegels konnte weitgehend vermieden werden.

Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 400 x g und 4°C konnte man durch die unterschiedlichen Dichtegradienten von oben nach unten folgende Schichten abgrenzen: 1. Plasmaüberstand, 2. mononukleäre Zellen (=Interphase oder buffy coat), 3. Ficollmedium und Erythrozyten (siehe Abb. 11).

Die Interphase wurde mit einer langen Pasteurpipette abgesaugt und über 2 Waschschrte von jeweils 7 min. mit 3 ml PBS aufgereinigt.

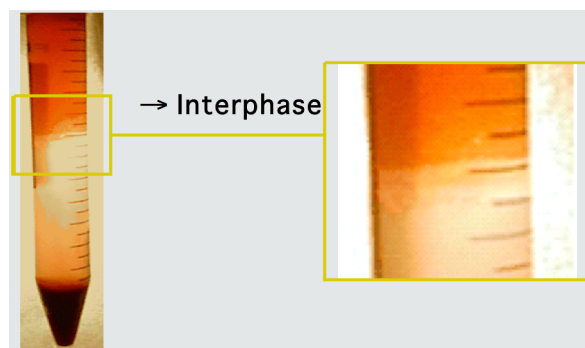


Abb.11: Isolierung mononukleärer Zellen durch Ficollgradienten

Ab etwa der Hälfte der Knochenmarkaspirate wurde das Zellpellet zwischen den beiden Waschschrritten 30 min bei Raumtemperatur mit PFA 1% (Paraformaldehyd) fixiert.

Anschließend wurde die Zellsuspension 1:100 verdünnt und die absolute Zellzahl der enthaltenen mononukleären Zellen in einer Neubauerzählkammer ermittelt.

Die Zytospins (Aufbringung von Einzelzellen auf einen Objektträger) sollten auf eine Zellzahl von etwa 2×10^5 Zellen pro Spot eingestellt werden.

Dazu wurde die berechnete Zellzahl in PBS aufgenommen und in einem Volumen von jeweils 300 μ l pro Spot über spezielle Zytospinkammern und Filter (Firma Shandon) auf ethanolgereinigte Glasobjektträger mittels einer Zytozentrifuge (Firma Shandon) aufgetragen (450 rpm, 5 min).

Die Zytospintechnik hat den Vorteil der exakten Zellzahl, die eine Quantifizierung der Tumorzellen erlaubt und der einschichtigen Zelllage, welche Voraussetzung für eine qualitativ hochwertige Färbung ist. (Diel, Onkologie 1998:2).

Im Durchschnitt wurden ca. 24-48 Objektträger hergestellt, über Nacht luftgetrocknet und dann gefärbt oder bei -80°C bzw. bei rascher Färbung im Intervall bei -20°C eingefroren.

Je nach Erfahrung des Untersuchers dauerte die Herstellung von Zytospins ca. 3 Stunden.

Knochenmarkaspiration im OP (30 min) → Dichtegradientenzentrifugation (30 min) → Isolation mononukleärer Zellen (15 min) → Waschen mit PBS und Fixation mit PFA 1% (45min) → Einstellen der Zellzahl auf 200.000 Zellen/Spin (30 min) → Lufttrocknen der Zytospins (24h) → Färbung oder Lagerung bei -80°C

Abb.12: Flußschema zur Gewinnung und Aufarbeitung des Knochenmarks

2.3 Detektion und Charakterisierung CK-positiver Zellen mittels CLSM nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung

2.3.1 Prinzip und Standardisierung der Doppelimmunfluoreszenz (Antikörper, Kontrollen, Sensitivität)

Zum Nachweis disseminierter Tumorzellen wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz-Färbung=IF gewählt.

Dabei wird ein unkonjugierter, monoklonaler bzw polyklonaler Primärantikörper verwendet, der an eine definierte Zielstruktur bindet. Sichtbar gemacht wird die Bindung in einem zweiten Schritt über Sekundärantikörper. Dieser ist fluoreszenzgelabelt und erkennt spezifisch die Tierspezies des Primärantikörper. Die ursprüngliche direkte Bindung wird indirekt durch einen Zweitantikörper markiert. Zur Vermeidung von Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper wurden Primärantikörper verschiedener Tierspezies verwendet.

Der fluoreszierende Antikörper absorbiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, das dann als Licht einer längeren Wellenlänge (Fluoreszenzemissionspektrum) abgestrahlt wird. Durch Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome und durch genau definierte Filtereinstellungen können die gewünschten Zielstrukturen am selben Präparat über ein Fluoreszenzmikroskop getrennt voneinander dargestellt oder alternativ mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden (Noack, 1999, S. 617-23).

2.3.1.1 Zytokeratin (ck), Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPA-R) und Her-2-neu (c-erb/B2)

Knochenmarksständige Tumorzellen sollten durch die Anfärbung von Zytokeratinen gefunden und von Zellen mesenchymaler Herkunft diskriminiert werden. Zytokeratine gehören zur Familie der Intermediärfilamente (zelluläre Strukturproteine von 7-11 nm Dicke,

Entdeckung 1969) und werden in epithelialen Zellen, epithelialen Tumoren und deren Metastasen exprimiert, Moll 1982, S.11. Ramaekers 1983, S. 2621 zeigte mittels IF, dass solide epitheliale Tumoren durch Zytokeratin charakterisiert sind während Tumorzellen mesenchymaler Herkunft wie auch normale Blutzellen negativ für Zytokeratin sind. Als Marker für glanduläre und duktale Epithelien wie man sie beim Adenokarzinom der Brust findet soll sich im Folgenden auf die Darstellung der spezifischen Zytokeratine 8,18,19 beschränkt werden. Trask 1990, S. 2322 und Tsubura 1991, S. 520 konnten zeigen, dass normale Brustdrüsenzellen hauptsächlich K 5,6,7,14, 17 produzieren, während maligne Brustzellen unabhängig von Ihrem Ursprung K 8, 18,19 exprimieren. Diese können nach Kasper 1987, S. 137 zytoplasmatisch durch den monoklonalen Mausantikörper für Panzytokeratin A45-B/B3 sowohl mittels IF, als auch der PAP-Technik detektiert werden. A45B/B3 (Firma Micromet GmbH, München) färbt spezifisch epitheliale und mesotheliale Zellen und reagiert nicht mit anderen Zelltypen, so dass neben den morphologischen Kriterien für Tumorzellen eine Zuordnung nach dem histogenetischen Ursprung möglich ist, Osborn 1984, S.191

Einen Katalog zu den bisher bekannten 20 Zytokeratinen findet man bei Moll, 1990, S. 567-80.

Zur Visualisierung wurde die primäre Bindungsstelle (Fc-Fragment) mit einem fluoreszenzgelabelten goat- anti- mouse IgG (Firma Melecular Probes, USA) gekoppelt. Der Farbstoff Alexa Fluor 488 hat sein Exzitation/Emissionsmaximum bei ~495/519 nm, welches über das CLSM sichtbar gemacht werden kann und die Farbe grün zugeordnet bekam. Noack 1999, S. 617

Alexa Fluor 488

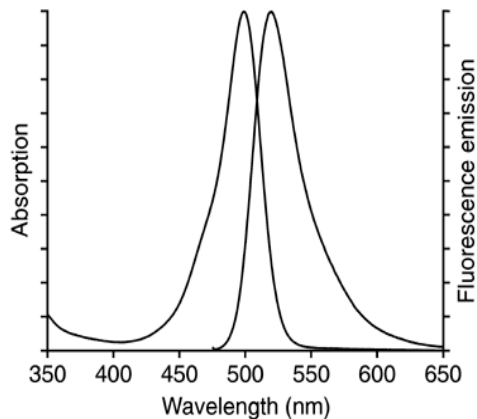


Abb. 13: Absorption und Fluoreszenzemissionsspektrum von Alexa Fluor 488 aus Internetseite www.probes.com, Stand 1.3.2002

Zusätzlich sollten die Zellen in dieser Arbeit auf die Expression weiterer klinisch wichtiger Oberflächenproteine (uPA-R, Her2) untersucht werden.

Der uPA-R (CD87) ist ein 55-65 kDalton schwerer glycosylierter Rezeptor, welcher über einen GIP (Glycosylphosphatidylinositol) Anker in der Plasmamembran befestigt ist. In der Arbeit wurde HU 277 der Klasse IgY zur Lokalisation von CD87 im Zytoplasma und an der Zelloberfläche von Tumorzellen benutzt.

Der Antikörper wurde in der Arbeitsgruppe von V. Magdolen 1994 getestet: rekombinantes lösliches uPA-R vom Menschen wurde in chinesischen Hamstereizellen hergestellt, gereinigt und in Hühnchen injiziert. 50 Tage nach Immunisierung konnte der Antikörper aus dem Eiweiß isoliert und angereichert werden. Im Western Blot wurde gezeigt, dass HU 277 mit menschlichem zelloberflächenassoziiertem uPA-R reagiert und damit zu Einzelzellanalysen bezüglich des uPA-R Besatzes auf disseminierten TZ herangezogen werden kann. (Magdolen 1994, 813-816). Die gute Sensitivität und Spezifität des polyklonalen Antikörpers wurde von Hildenbrand, 1998, S. 27-32 in der konventionellen IHC an Mammatumoren gezeigt.

Visualisiert wurde die Bindung mit Alexa 568 goat- anti- chicken IgY (Firma Molecular Probes, USA). Der Farbstoff Alexa Fluor 568 hat sein

Exzitation/Emissionsmaximum bei ~578/603 nm, welches über das CLSM sichtbar gemacht werden kann und die Farbe orange zugeordnet bekam. Noack, 1999, S.617

Die Phänotypisierung des Her2 Rezeptor wurde im Gegensatz zu der übernommenen und teilweise modifizierten uPA-R Färbung neu etabliert. Es sollten Antikörper verwendet werden, die sich bereits in der Routinefärbung von primärem Mammakarzinomgewebe bewährt haben. Die Präparate wurden nach folgenden 2 alternativen Färbungen ausgewertet:

1. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Mausantikörper IgG1 NCL-CB11-Biotin (Firma Novocastra Labs, UK) verwendet, welcher die internal domain des c-erbB-2 Onkoproteins detektiert.

Visualisiert wurde die Bindung mittels Alexa 568 Streptavidin (Firma Molecular Probes, USA). Nach Produktinformation der Firma Molecular Probes, Stand 20.3.2003, S.1-3 ist Avidin ein Eiweissprotein, hat eine hohe Affinität zu Biotin und wird seit den 70iger Jahren in der Immunhistochemie eingesetzt. Sein Verwandter das Streptavidin (von *Streptomyces avidinii* gewonnen) ist ein nichtglycosiliertes 52.800 Dalton Protein, welches weniger unspezifische Bindungen zeigt als Avidin und wie dieses routinemässig zur Färbung eingesetzt wird. Das mit dem Farbstoff Alexa Fluor 568 gelabelte Protein wird zur Lokalisation des biotinylierten Primärantikörpers eingesetzt. Es hat sein Exzitation/Emissionsmaximum bei ~578/603 nm, welches über das CLSM sichtbar gemacht werden kann und die Farbe orange zugeordnet bekam.

2. Als weiteren Primärantikörper wurde der polyklonale Hasenantikörper c-erb-B2 DAKO A 0485 (Firma DAKO, Dänemark) der Klasse Ig G verwendet. Er erkennt ein Epitop auf dem zytoplasmatischen Teil des Zellmembran gebundenen Her2 Onkoprotein (internal domain).

Visualisiert wurde die Bindung mit Alexa 568 goat-anti-rabbit (Firma Molecular Probes, USA). Der Farbstoff Alexa Fluor 568 hat sein Exzitation/Emissionsmaximum bei ~578/603 nm, welches über das CLSM sichtbar gemacht werden kann und die Farbe orange zugeordnet bekam.

Weitere Informationen über die benutzten Antikörper sind auch unter <http://www.probes.com>, Stand 1.3.2002 und <http://micromet.de>, Stand 1.3.2002 abzufragen.

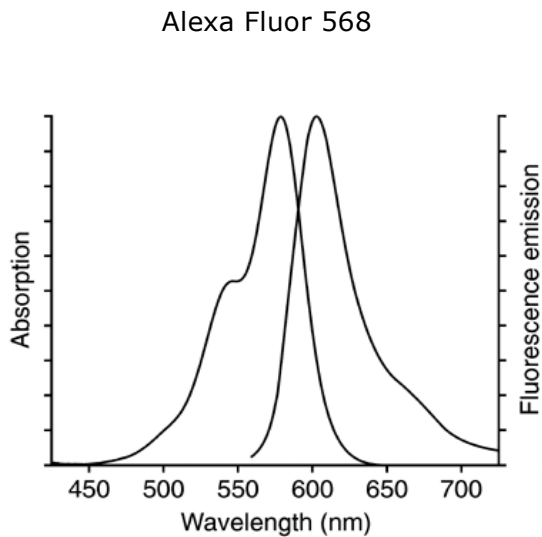


Abb. 14: Absorption und Fluoreszenzemissionsspektrum von Alexa Fluor 568 aus Internetseite www.probes.com, Stand 1.3.2002

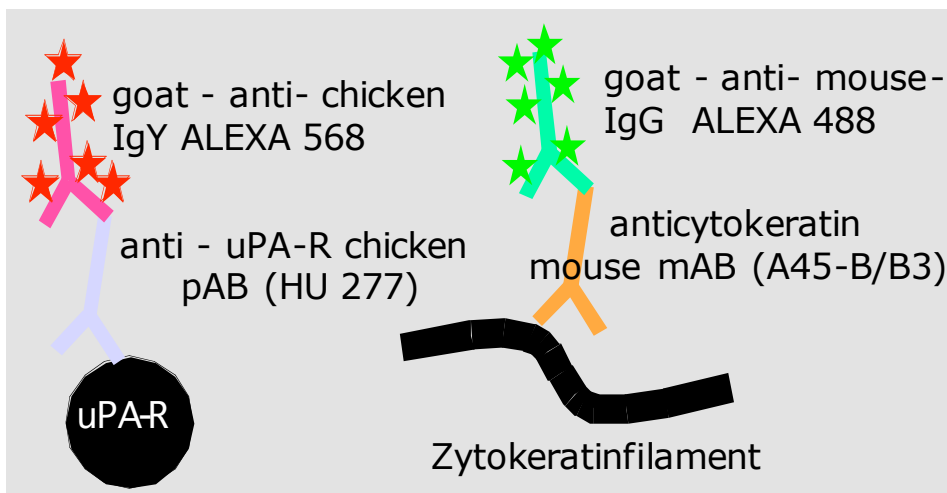


Abb.15: Prinzip der Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Zytokeratin und uPA-R

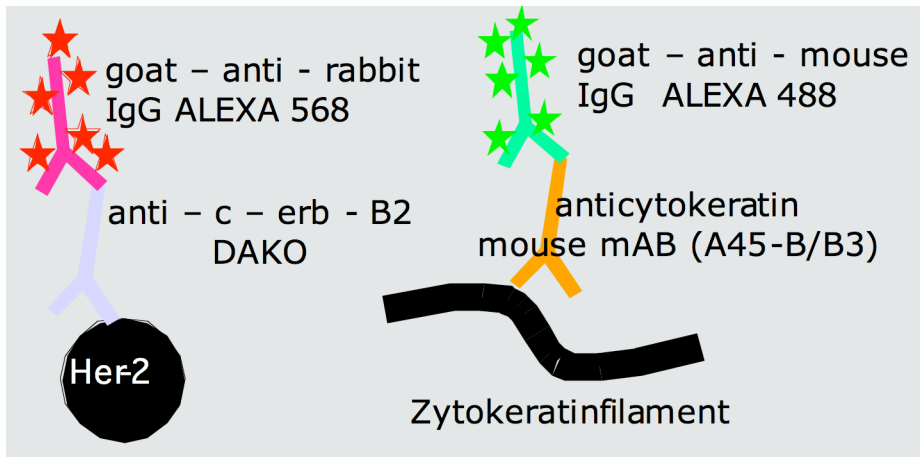


Abb.16: Prinzip der Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Zytokeratin und Her2 nach Protokoll 2

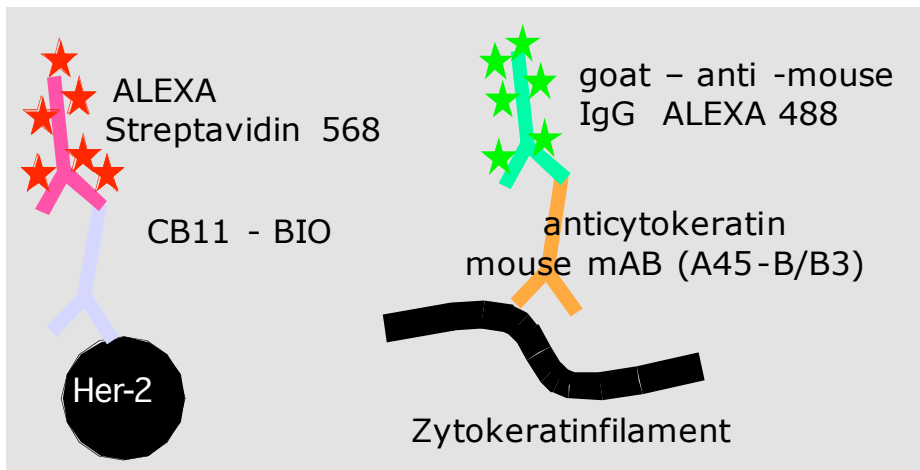


Abb.17: Prinzip der Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Zytokeratin und Her2 nach Protokoll 1

2.3.1.2 Färbeschemata-und Protokolle

Auf der I. International Conference of tumor cell dissemination in breast cancer 2003 in Tübingen forderten Pantel und Borgen nach den Vereinbarungen der European ISHAGE Working Group pro Patientin 2×10^6 mononukleäre Zellen (=MNC) aufzuarbeiten. Nach den vergleichenden Untersuchungen von Pantel, 1994, S. 169 ist bei hoher methodischer Sensitivität und Spezifität eine Zellzahlerhöhung nicht sinnvoll. 2-4 Tumorzellen (=TZ) auf 10×10^6 Knochenmarkszellen können im Modellversuch immunhistochemisch (=IHC) entdeckt werden. Extrapoliert man diese Zahlen, so kann mit 95% Wahrscheinlichkeit 1 TZ auf 2×10^6

MNC gefunden werden. Little konnte in Cytometry 1996, S. 348 eine Sensitivität von 1 TZ in $1,65 \times 10^6$ immunfluoreszenzgefärbten MNC zeigen. Beide Veröffentlichungen zeigen: die Detektionsrate ist technikabhängig und älteren Methoden überlegen. Für die Immunfluoreszenz (= IF) konnte Noack, 1999, S. 620 ebenfalls eine hohe Sensitivität demonstrieren. Dazu wurden ZR-75 (=Mammakarzinomzelllinie) in bekannter Anzahl (1-500) mit 100.000 PBL (=periphere Lymphozyten) vermischt, Zytospins (=CS) angefertigt, gefärbt mittels IF und am konfokalen Lasermikroskop (=CLSM) ausgezählt. Von 10/100 zugegebenen ZR75 waren noch 1/ 200 im Spot zu finden. Damit garantiert die Kombination aus IF und CLSM eine der IHC ähnlich hohe Wiederfindungsrate und wurde im Rahmen dieser Arbeit angewandt.

Es wurden jeweils 1×10^6 Zellen für Zytokeratin (=ck) und Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (=uPA-R) und 1×10^6 Zellen für ck und Herceptin (=Her2) gefärbt.

Als Positivkontrolle wurden bei jeder Färbung CS von Mammakarzinomzellen der Zelllinien ZR-75 (ck, uPA-R) und SKBR-3 (ck, Her2) mitgeführt.

ZR-75 sind epitheliale, zytokeratinpositive Karzinomzellen angezüchtet aus malignem Aszites, die für uPA-R eine gute membranständige Färbung zeigen.

SKBR-3 sind epitheliale, zytokeratinpositive Karzinomzellen angezüchtet aus malignem Pleuraerguss, die für Her2 eine spezifische membranständige Färbung zeigen. Im DAKO Hercept-Test an SKBR-3 spikes (=Knochenmarkzellen mit SkBR-3 vermischt im Verhältnis 1:1000) zeigten sie einen Score von 1+ bis 2+ (siehe Abb. 18). Weitere Informationen über die verwendeten Zelllinien sind unter <http://www.atecc.org> erhältlich.

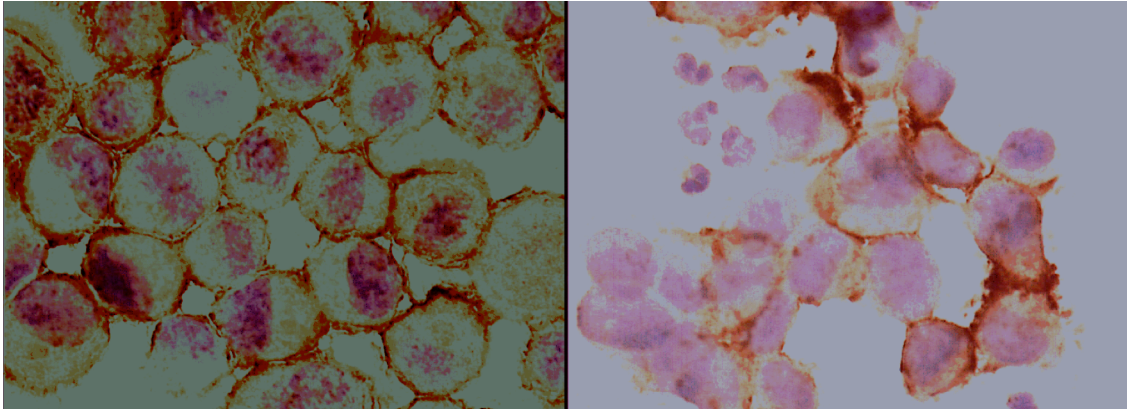


Abb.18: SKBR-3 Immunhistologie mit DAKO A 0485

Als Negativkontrolle wurden CS von Patientinnen mit benignen Brusttumoren mitgeführt

Eine Isotypenkontrolle wurde bei der Austestung der benutzten Antikörper mitgeführt. Da sie stets negativ war, wurde sie im Weiteren weggelassen. Ausnahme war das Färbeprotokoll 2 für Her2. Hier wurde immer eine Isotypenkontrolle durchgeführt. Als Antikörper wurde ein monoklonaler Maus-MAb, Klasse IgG1 der Firma Caltag, Hamburg verwendet.

Die CS wurden frisch oder bei Raumtemperatur aufgetaut mit permanent Markern und einem DAKO-Fettstift-Pen markiert, um die Zellen nach der Färbung unter dem Mikroskop leichter zu finden und ein Auslaufen der applizierten Flüssigkeit zu verhindern. Die folgenden Arbeitsschritte wurden in einer selbstgebauten feuchten Kammer durchgeführt. Ein Austrocknen der CS sollte so verhindert werden.

1. Schritt: Die noch unfixierten MNC wurden mit 1% PFA für 30 min bei Raumtemperatur (=RT) fixiert und 1x mit PBS/BSA 1% für 3 min gewaschen. Für die bereits bei der Aufarbeitung fixierten MNC war dieser Schritt nicht mehr nötig.

2. Schritt: Um ein Eindringen der Antikörper zur Anfärbung zytoplasmaler Strukturen zu ermöglichen, wurden die Zellen mit Saponin 0,025 % für 45 min permeabilisiert und anschliessend 1x mit PBS-BSA 1% gewaschen.

3. Schritt: Die oben beschriebenen Antikörper wurden nach Protokoll in angegebener Verdünnung und Zeit inkubiert. Dazwischen wurde immer wieder mit PBS/BSA 1% für 3x3 min gewaschen.

Tab. 1: Färbeprotokoll der Doppelimmunfluoreszenzfärbung für ck und uPA-R

| Erster Primär-antikörper 1h, RT, Saponin 0,025% | Zweiter Primär-antikörper 1h, RT | Erster Sekundär-antikörper 30 min, RT | Zweiter Sekundär-Antikörper 30 min, RT |
|--|---|---|--|
| A45B/B3 1:100µl | HU 277 2:123µl | Goat-anti- mouse Alexa 488 1:100µl | Goat-anti- chicken Alexa 568 2:80µl |

Pro Spot wurde ein Flüssigkeitsvolumen von ~100 µl pipettiert. Die Färbung wurde bei Raumtemperatur und ab Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zum Schutz vor Ausbleichen im Dunkeln durchgeführt.

4. Schritt: Am Ende der Färbung wurden die Spots mit 8µl PBS 1% befeuchtet, eingedeckelt und mit Fixogumm luftdicht verschlossen.

Der zeitliche Aufwand der Färbung betrug etwa 6 h. Die CS wurden sofort oder innerhalb von 2-5 Tagen unter dem CLSM ausgewertet.

Für die Doppelimmunfluoreszenzfärbung ck und Her2 wurde bis auf wenige folgende Modifikationen ähnlich verfahren:

In Vorversuchen wurden verschiedene Antikörper (CB11-FITC, CB11-Biotin, c-erbB/B2 von DAKO, K5204 von DAKO) an Positiv-, Negativ- und Isotypenkontrollen getestet.

Insbesondere für c-erbB/B2 von der Firma DAKO, Dänemark waren in eigenen Versuchsreihen die CS aus SKBR-3 und Knochenmarkszellen (=Spikes) negativ.

Um den etablierten Ablauf des Färbens und der Mikroskopie für ck bei $\lambda=488\text{nm}$ beibehalten zu können, entschieden wir uns für die Kombination

von CB11-Biotin (Firma Novocastra, UK)/Alexa568-Streptavidin (Firma Molecular Probes, USA).

Bei dem Protokoll mussten die CS vor der eigentlichen Färbung mit Ziegennormalserum und Antibiotin vorbehandelt werden. Mit dem Antibiotin sollte natürlicherweise an der Zelloberfläche vorkommendes Biotin abgepuffert werden. Mit dem Normalserum sollten Interferenzen zwischen dem 1. Sekundärantikörper und dem 2. Primärantikörper verhindert werden. Ziel war es Quellen für unspezifische Signale zu eliminieren. Sowohl in der Einfach- als auch in der Doppelfärbung konnte so bei getrennten Filtereinstellungen keine unspezifische Färbung (=Hintergrundsrauschen) beobachtet werden. Die Inkubation von CB11-Biotin muss bei 4°C erfolgen.

Nach Anfertigung von Doppelimmunfluoreszenzfärbungen an SKBR-3 Spikes und Doppelscans (Technik unter 2.3.3.3 erklärt) für die Wellenlängen 488nm und 568nm konnte mit dem Bildverarbeitungsprogramm IMARIS 3.0 eine intrazytoplasmatische Färbung für ck und eine membranständige Färbung für Her2 nachgewiesen werden.

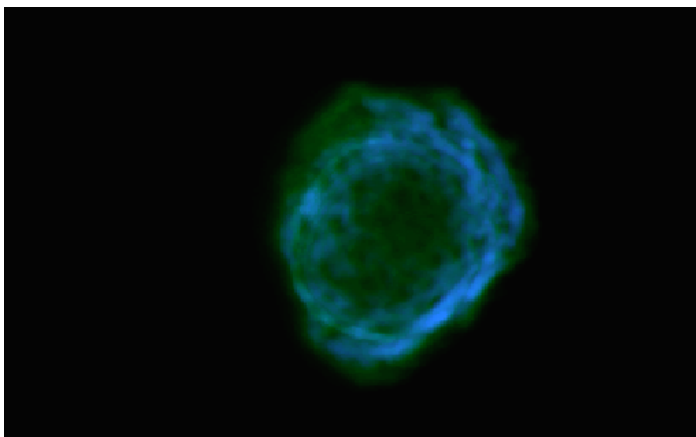


Abb.19: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von ck (grün) / Her2 (blau) mit CB11-BIO an SKBR-3

| Erster Primär-Antikörper 1h, RT, Saponin 0,05% | Erster Sekundär-antikörper 30 min, RT | Zweiter Primär-Antikörper 1h, 4°C | Zweiter Sekundär-Antikörper 30 min, RT |
|---|--|--|---|
| A45B/B3 1:100µl | Goat-anti-mouse Alexa 488 1:100µl | CB11-BIO 1:10µl | Alexa-Streptavidin 568 1:100µl |

Tab. 2: Färbeprotokoll 1 Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit ck/ Her2

Aufgrund des großen Zellverlusts im Protokoll 1 durch diverse Waschschrte und aufgrund des beim primären Mammkarzinom etablierten Herceptest™ von Dako, Dänemark, sollte ein alternatives Färbesystem mit dem Antikörper c-erbB-2 A0485 von DAKO entwickelt werden.

Nach Optimierung und Austestung der Antikörper wurde das Protokoll wie folgt festgelegt.

Vorbehandlung:

Kochen mit Citratpuffer bei 96°C für 20 min, dann in Puffer abkühlen lassen

| Erster Primär-Antikörper 1h, RT | Zweiter Primär-antikörper 1h, RT | Erster Sekundär-Antikörper 30 min, RT | Zweiter Sekundär-Antikörper 30 min, RT |
|--|---|--|---|
| A45B/B3 1:100µl | c-erb-B2 DAKO 1:300µl | Goat-anti-mouse Alexa 488 1:100µl | Goat-anti-rabbit Alexa 568 1:100µl |

Tab.3: 2. Färbeprotokoll 2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung für ck/Her2, aus Frigga Roggel, Nachweis und Charakterisierung zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark von Ovarialkarzinompatientinnen, 2005, S. 30

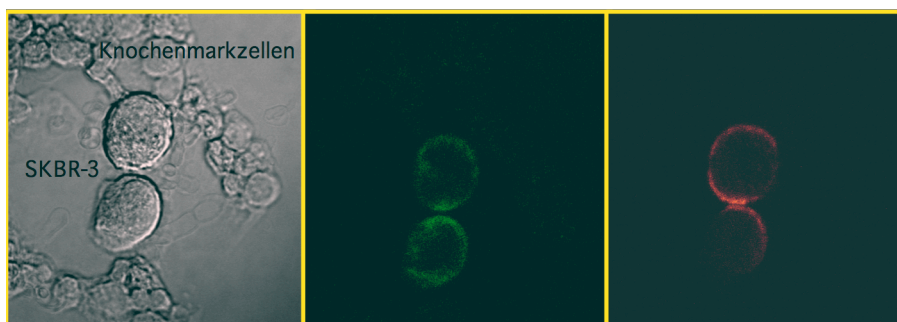


Abb.20: Doppelimmunfluoreszenzfärbung für ck und Her2

2.3.2 Optimierung des technischen Prinzips

In den folgenden 4 Punkten soll auf die Verfeinerung der Aufarbeitungstechniken eingegangen werden, welche über eine Verbesserung des Zellbildes eine präzisere Auswertung zum Ziel hat.

2.3.2.1 Aufarbeitungszeit und Lagerung

Im folgenden Versuch wurde der optimale Zeitpunkt für die Knochenmarkspräparation erarbeitet.

Dazu wurden die Knochenmarkspunktate sequentiell sofort, nach 1h, nach 2h, nach 4h und nach 24 h aufgearbeitet und Zytospins hergestellt.

2 Spots wurden jeweils frisch, nach dem Trocknen und nach dem Einfrieren bei -80°C nach der oben beschriebenen May-Grünwald-Färbung zur Erfassung der Zellmorphologie gefärbt.

Die Ergebnisse hierzu werden in Kapitel 3.2.1.1 dargestellt.

2.3.2.2 Zelldichte

In Anlehnung an die gängige Literatur zur Auswertung von Zytospins mittels IHC wurden insgesamt 2×10^6 MNC nach IF ausgewertet. Um die für die Auswertung mittels CLSM optimale Zelldichte pro Spot zu ermitteln wurden CS mit 1×10^6 , 2×10^5 , 1×10^5 Zellen hergestellt, IF gefärbt und unter dem Mikroskop bezüglich Auswertbarkeit, Zelldichte und Zellmorphologie miteinander verglichen.

Die Ergebnisse hierzu werden in Kapitel 3.2.1.2 ausgeführt.

2.3.2.3 Fixierungsversuche

Um ein möglichst klares Zellbild mit wenig „Zelldetritus“ zu erhalten, wurde folgendes getestet: Die Zellen wurden einmal sofort bei der Herstellung von CS und einmal erst bei der IF mit PFA 1% (30min bei Raumtemperatur) fixiert. Das Ergebnis bezüglich Zellbild und Zellerhaltungszustand wird in Kapitel 3.2.1.3 dargestellt.

2.3.2.4 Qualitätskontrolle

Wie oben bereits erwähnt, wurden die Knochenmarksaspirate einer Qualitätsprüfungs- und Sicherung durch einen Hämatologen (III. Medizinische Klinik) unterzogen. In den nach Pappenheim gefärbten Ausstrichen sollte man ein buntes Zellbild mit Knochenbälkchen (blau), Fettmark (Vakuolen) und blutbildendem Mark finden. Wichtig für ein gutes Aspirat sind die ausgewogene Relation des Fettanteils zu den Zellen der Myelo- und Granulopoese sowie eine geringe Verunreinigung mit Erythrozyten. Nebenbefundlich lassen sich hämatoonkologische Erkrankungen, welche ebenfalls zum Nachweis zytokeratinpositiver Zellen führen, ausschließen.

Die Ergebnisse der Qualitätskontrolle werden unter 3.2.1.4 dargestellt.

2.3.3 Auswertung mit dem konfokalen Lasermikroskop

2.3.3.1 Prinzip des CLSM

Die Theorie des CLSM soll nur kurz abgehandelt werden. Insbesondere soll auf praktische Aspekte des CLSM hingewiesen werden. Die Informationen hierzu stammen im wesentlichen aus dem Handbook of Biological Confocal Microscopy, 1995, dem Artikel von Stelzer aus Biologie in unserer Zeit 1991, S. 161-171 und dem laboreigenen Handbuch zum CLSM.

Das benutzte CLSM besteht aus einem Zeiss Axiovert 35 Mikroskop kombiniert mit einer Leica Laserscanningeinheit TCS 40. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Scanware 3.61, Leica. Die Visualisierung der Bildserien zu 3-D Objekten ist unter 3.2.4.2 beschrieben.

Um Gewebe oder Zellen zu analysieren, müssen zur Betrachtung unter dem Lichtmikroskop dünne Schnitte hergestellt werden. Informationen

über die räumliche Anordnung gehen dadurch verloren. Wie kann man sich ein Bild über die Dreidimensionalität einer Zelle machen, von der man keine Dünnschnitte anfertigen kann?

Betrachtet man eine „dicke Probe“ unter einem konventionellen Mikroskop, so kann keine scharfe Einstellung erzielt werden, da das Bild von Informationen oberhalb und unterhalb der Fokussierungsebene gestört wird. Mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop können solche optisch komplexe biologische Objekte untersucht werden. Elektronische Bildverarbeitung ermöglicht eine gewählte Ebene zu fokussieren, während Licht von ausserhalb dieser Ebene ausgeblendet wird. Eine einzelne Ebene im Präparat kann also durch die Anfertigung von „optischen Schnitten“ betrachtet werden, da Emissionen ausserhalb des Fokus diskriminiert werden. Aus einer Serie von solchen Schnitten (=Scans) lässt sich wie in 3.2.4.2 gezeigt ein 3-D Bild rekonstruieren.

Ein einzelner fluoreszenzmarkierter Punkt in einer bestimmten Tiefe wird durch einen Laserstrahl, der durch eine winzige Öffnung (1. Lochblende) geschickt wird, beleuchtet. Die emittierte Fluoreszenz trifft auf einen speziellen Spiegel. Dieser reflektiert Licht eines bestimmten Spektralbereichs, welches gesammelt wird und zu einem Bild im Eingangsbereich eines Lichtdetektors zusammengesetzt wird. Über eine 2. Lochblende am Detektor, die sich genau am Brennpunkt der von der Probe emittierten Strahlen befindet (konfokal), wird Licht aus einer bestimmten Ebene fokussiert und durch den Detektor erfasst. Dieser erzeugt entsprechend der Intensität des Lichtsignals ein elektrisches Signal. Emissionen ausserhalb der Fokussierungsebene werden durch die Lochblende nicht fokussiert und nicht bildlich erfasst.

Die unterschiedlichen Fluoreszenzen werden über verschiedene Spiegel- und Filtereinstellungen erfasst.

Um ein 2-D Bild aufzubauen, werden über einen PC für jeden Punkt in der Fokussierungsebene Daten gesammelt und berechnet. Dabei werden die elektrische Signale in Zahlen umgewandelt und als Farbe oder Grauwert

auf einem Bildschirm wiedergegeben. In dieser Arbeit wurde der CS vor einem starren Laser bewegt und abgetastet.

Das Prinzip des CLSM hat Marvin Minsky als Postdoktorand an der Harvard University entwickelt, technisch realisiert wurden konfokale Fluoreszenzmikroskope aber erst 1984 durch die Arbeit von Brakenhoff, Wijnaendts, van Resandt und Carlsson.

Limitierend auf die Anwendung wirkt sich das Ausbleichen der Fluoreszenz (=Photobleaching) aus. Die CS können nicht lange gelagert werden und immer wieder reproduzierbare Ergebnisse liefern. Zum anderen können die Objekte während längerer Bearbeitung ausbleichen.

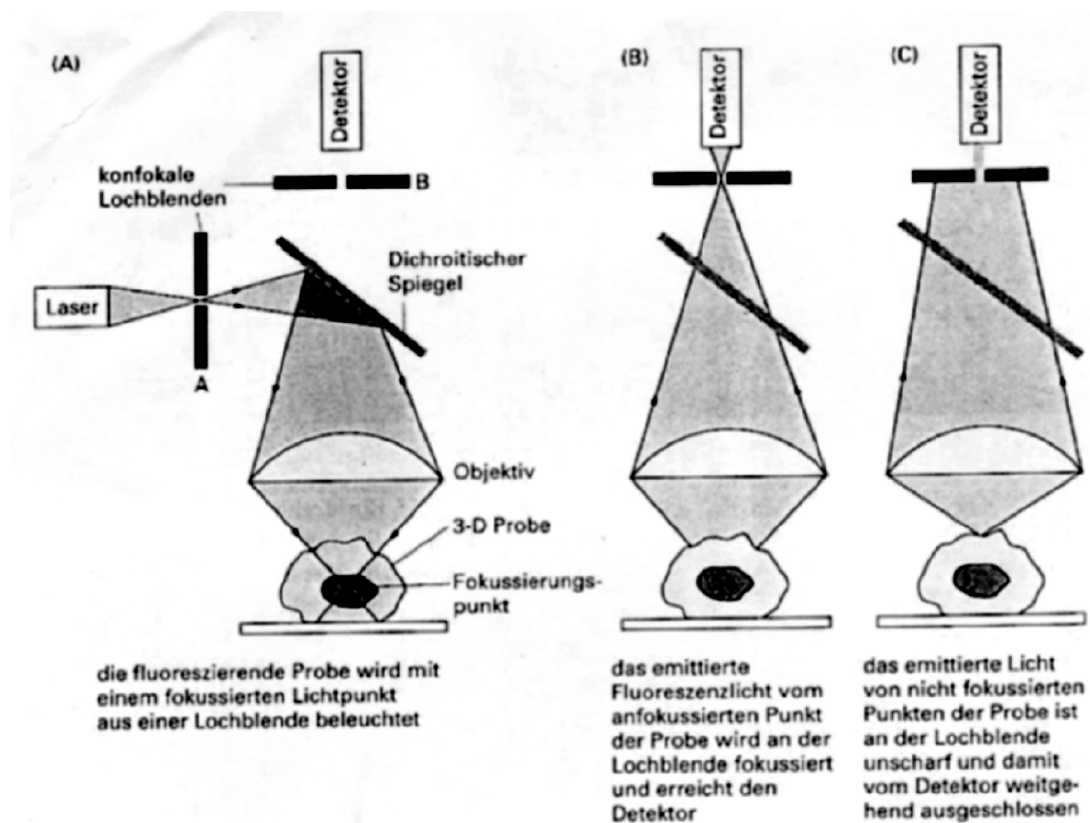


Abb. 21: Das konfokale Raster-Fluoreszenzmikroskop, aus Methoden der Zellforschung, S.171

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden Einstellungen mikroskopiert:

Pinhole:* 50, *Offset*:* -30, *Voltage*:* 400-600
Exzitationsfilter: Position 3 für 488, Position 2 für 568
Beam Splitter: unten für 488, mittlere Position für 568
Barrierefilter 1 (rot): Position 2 für FITC, Position 3 für TRITC
Barrierefilter 2 (blau): Position 2 für FITC

Abb.22: Einstellungen CLSM (Pinhole*: Schärfe, Offset*: Hintergrund, Voltage*: Stärke des Lasers)

2.3.3.2 Auswertung der Präparate mit CLSM und Befunddokumentation

Das Gelingen der Färbung wurde über Positiv- und Negativkontrollen verifiziert. Zellen der Positivkontrolle (ZR 75 für ck und uPA-R, SKBR-3 für ck und Her2) sollten unter dem Mikroskop hell aufleuchten. Die jeweiligen Einstellungen wurden notiert und zur Bewertung der Negativkontrolle beibehalten. Die hierfür gewonnenen MNC von Spendern mit benignen Tumoren sollten nicht aufleuchten.

Pro Patientin wurden 10 Objektträger mit insgesamt 2×10^6 Zellen meanderförmig bei 20-facher Vergrößerung mit dem CLSM untersucht und bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 488\text{nm}$ nach zytokeratinpositiven Zellen gesucht. Die Beurteilung erfolgte anonymisiert und in Unkenntnis der Histologie durch 3 unabhängige Untersucher (Verfasserin, Prof. Dr. med. Harbeck, Dr. med. Noack, Dr. med. Braun (ab Juni 2000)).

Bei positivem Signal für Zytokeratin wurde die Zelle zusätzlich im Transmissionsbild (=Schwarzweißfoto) nach der Zellmorphologie begutachtet. Folgende von Noack, 1999, S. 618 festgelegten Kriterien wurden zur Klassifikation als Tumorzelle angewandt:

1. Die Zelle sollte intakt sein
2. Sie sollte keine Überlagerung mit umgebenden Zellen zur exakten Beurteilung der Zellmembran zeigen.
3. Sie sollte grösser als die umgebenden Zellen sein, einen runden und grossen Nukleus besitzen. Die Kern-Plasma-Relation sollte zugunsten des Kerns verschoben sein.

4. Das Fluoreszenzsignal der Zelle für Zytokeratin sollte deutlich gegenüber den im Hintergrund unspezifisch angefärbten Knochenmarkszellen aufleuchten.

Waren diese Kriterien erfüllt, wurde auf den TRITC-Kanal umgeschaltet und die Signalgebung bei $\lambda = 568\text{nm}$ überprüft. Pro Patientin wurden auf dem 2. Kanal 1Mio. Zellen auf die Expression von uPA-R und 1Mio. Zellen auf die Expression von Her2 untersucht.

Die als Tumorzellen klassifizierten Zellen wurden bei 63x Vergrößerung aufgenommen (Transmissionsbild, FITC-Kanal, TRITC-Kanal) gescannt und archiviert. Der Arbeitsaufwand pro CS lag bei 30-60 min.

Zur Befunddokumentation wurde den Zellen ein Identifikationscode zugeordnet.

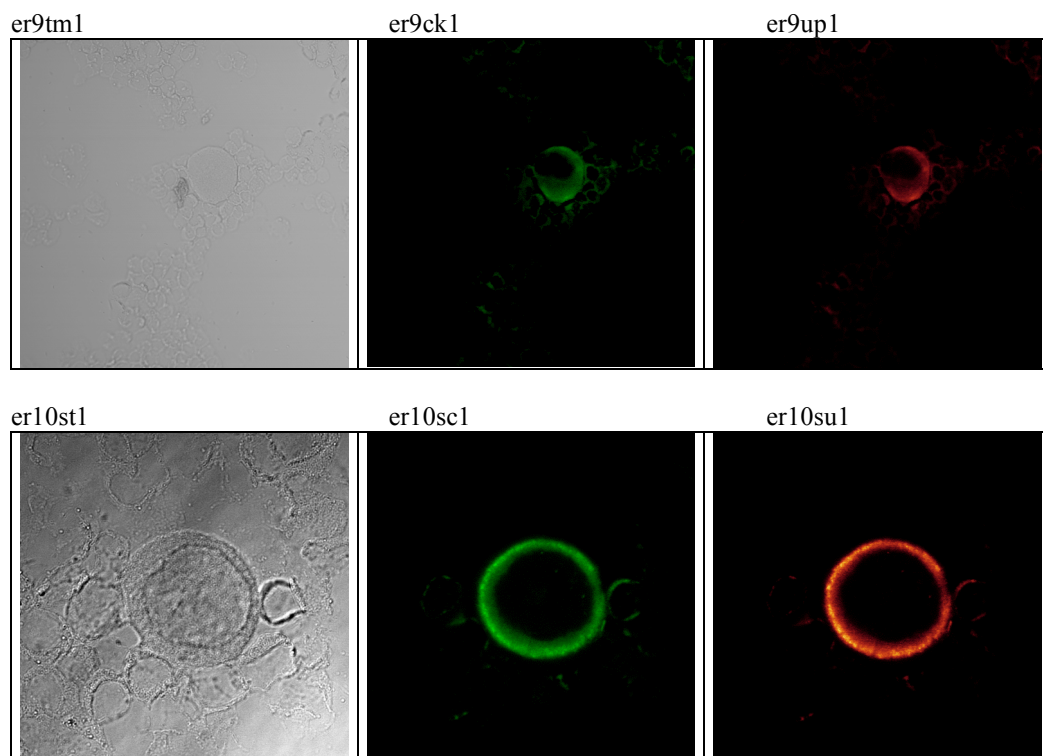


Abb.23: Beispiel einer Befunddokumentation

2.3.3.3 Quantifizierung des uPA-R

Mittels IF können ck-positive Zellen bezüglich interessanter Targetmoleküle weiter charakterisiert werden.

Durch die verwandte Technik ist es zum einen möglich zu sehen, ob eine Zelle das gesuchte Antigen an der Oberfläche bzw. im Zellinneren exprimiert. Zum anderen kann semiquantitativ der Gehalt an tumorassoziiertem Protein gemessen werden. Noack, 1999, S. 617-623.

Dazu wurden von der Zelle bei 63x Vergrößerung und den Filtereinstellungen für den TRITC-Kanal ($\lambda=568\text{nm}$) von oben nach unten Schnittbilder aufgenommen, d.h. die gesamte Zelle wurde in viele Einzelbilder sog. Scans „zerlegt“ und abgespeichert.

Summiert man den Fluoreszenzgehalt der Einzelbilder, so erhält man die Gesamtfluoreszenz der Zelle. Dazu werden die Fluoreszenzen der Einzelbilder übereinandergelegt und zu einem Gesamtfluoreszenzbild aufsummiert.

Dieses Bild wird kurz als extended focus bezeichnet und über die CLSM Software berechnet. Je nach „Dicke“ der Zellen wurden Abstände von 0,2 bis 1,0 μm gewählt. Optimaler Weise erhält man zwischen 30-50 Einzelbilder (Abb.25, 27, 28).

Um den uPA-R Gehalt der Zellen untereinander vergleichen zu können und in Zellen mit hohem und niedrigem Proteinlevel zu klassifizieren, mussten die Werte auf eine Referenzfluoreszenz bezogen werden.

Als Referenz dienten fluoreszenzgelabelte Latexbeads InSpeck™ Red (580/605) der Firma Molecular Probes. Diese werden in verschiedenen nominalen Fluoreszenzintensitäten (100%, 30%, 10%, 3%, 1% 0,3%) angeboten, welche dann von Charge zu Charge leicht differieren (= tatsächliche Intensität).

Beispielsweise werden statt den angestrebten 3% relativer Intensität beads mit 2,8% geliefert. 100% Intensität ist das stärkste im FACS gemessene Signal und entspricht einem bestimmten absoluten Fluoreszenzwert (=raw value). Die anderen Signale werden auf diese Intensität prozentual bezogen.

Damit sind die verschiedenen Chargen bezüglich der raw values über die Berechnung der relativen Intensitäten vergleichbar.

Bei der Wahl der relativen Intensität muß die ursprüngliche Einstellung des CLSM beim Zellscan berücksichtigt werden (Minimal- und Maximalwerte). Ansonsten kann es passieren, dass die beats je nach Intensität gar nicht sichtbar sind oder zu stark leuchten.

Zur Auswertung aller in dieser Arbeit vermessenen Zellen wurde eine relative Intensität von 2,8% gewählt. Der Prozentsatz der Intensität bezieht sich auf einen absoluten Fluoreszenzwert von 3429 aus der Charge 6971.

Die beads wurden im verdunkelten Labor auf einen Objektträger pipettiert, getrocknet und mit einem Prolong Antifade Kit, Molecular Probes, eingedeckelt. Die Quantifizierung erfolgte in einem nicht festgelegten Zeitintervall nach Färbung, spätestens jedoch nach 6 Monaten.

Für jede ck-positive Zelle wurde der entsprechende Latexbead unter den gleichen Einstellungen (63x Vergrößerung, Voltage, Pinhole, Offset, Scansteps) vermessen, so dass sich für die relative Intensität der ausgewerteten Zelle folgende Rechnung ergibt:

$$\text{Intensität der Tumorzelle} = \frac{\text{Summe der Intensität TZ} \times \text{Scale TZ}}{\text{Summe der Intensität beat} \times \text{Scale beat}}$$

Abb. 24: Berechnung relative Intensität einer TZ

Die ausgewerteten Zellen zeigten relative Intensitäten von 4,05-22,08. Durch diese Technik kann zwar keine Aussage über die absolute Rezeptordichte gemacht werden. Der Vergleich des Rezeptorbesatzes unter ausgewerteten Zellen ist jedoch möglich.

Beispiel: Hat eine Zelle einen Wert von 6 und eine andere einen Wert von 12, so hat die zweite Zelle bezogen auf einen Latexbead mit 2,8% den doppelten Gehalt an uPA-R.

Das Prinzip des „Scannens“

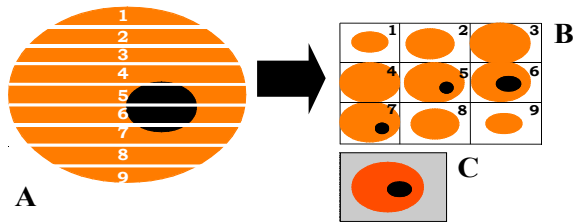


Abb.25: Das schematische Prinzip der Zellvermessung und Quantifizierung: A Scan
B Fotogallery, C extended focus mit freundlicher Genehmigung von Noack F. 1999, S.621

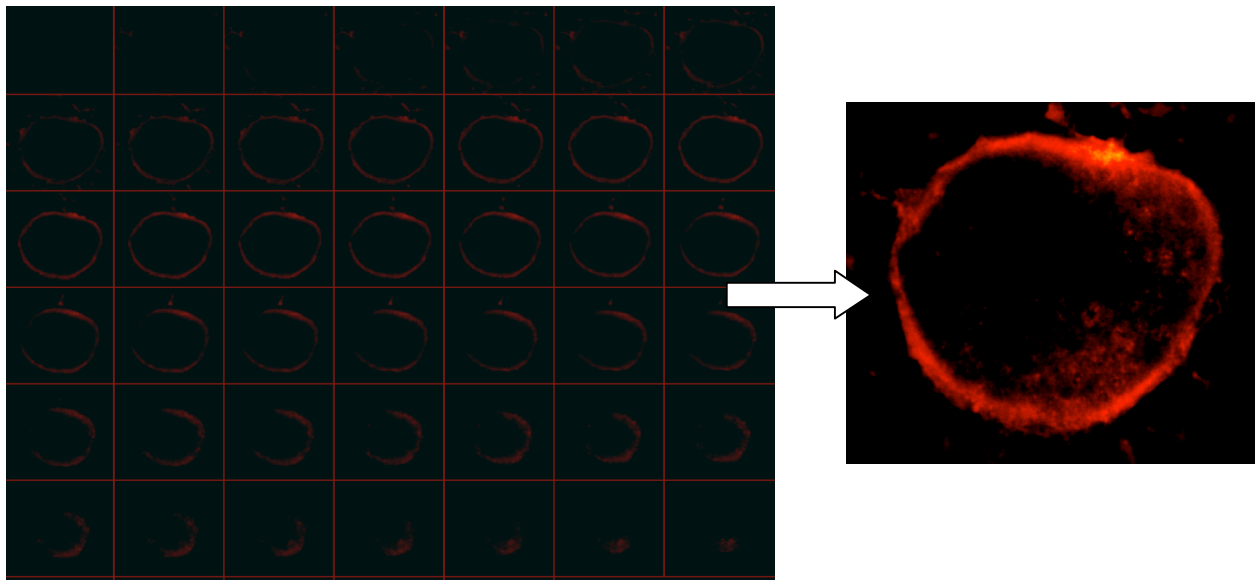


Abb.26,27: Fotogalerie nach Scan und extended Focus

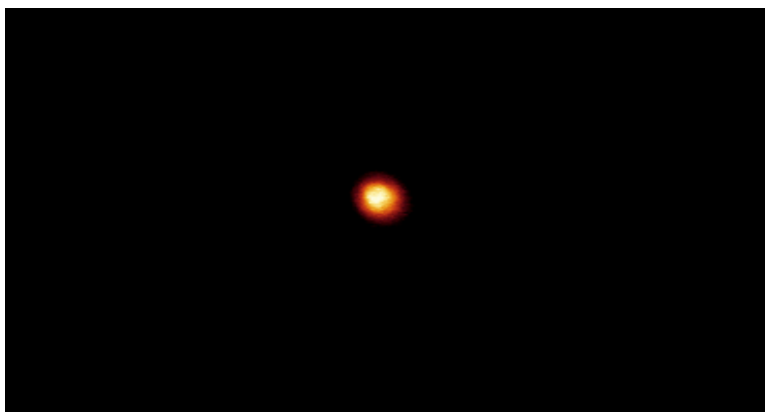


Abb.28: Quantifizierung
uPA-R mit Latexbead

2.4 Verwendete Materialien

2.4.1 Mikroskope und andere technische Hilfsmittel

Laser-Mikroskop TCS 40, Fa. Leica, Wetzlar

Mikroskop Axiovert 35, Fa. Zeiss, Jena

Lichtmikroskop, Fa. Leitz, Wetzlar

CLSM Software Scanware 3.61, Fa. Leica, Wetzlar

Imaris™ 3.0 Irix (Software zur 3D Bildverarbeitung), Fa. Bitplane, Zürich,
Schweiz

Zytozentrifuge: Zytospin 2, Fa. Shandon, Frankfurt

Neubauer Zählkammer Nr. 916 1079, Fa. Bender & Hobein, Ismaning

Zentrifuge 4K15, Fa. Sigma, Taufkirchen

Präzisionswaage FX-40, Fa. AND, Japan

Zytoclips stainless steel slide clip, Fa. Shandon, Frankfurt

Zytofunnel, Fa. Shandon, Frankfurt

Filter cards 5991022, Fa. Shandon, Frankfurt

Objektträger 76 x 26 mm, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig

Röhrchen 1 ml, 5 ml (352096), 50 ml (352070), Fa. Falcon, Liverpool,
Australia

Pasteurpipetten 150 mm, 230 mm, Fa. Volac, Essex, England

Einwegpipetten 5 ml (356543), 10 ml (356551), Fa. Falcon, Liverpool,
Australia

Kolbenhubpipette 0,5 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 50 - 200 μ l, 100 - 1000 μ l, Fa. Eppendorf, Hamburg

Pipettierhelfer Macro, Fa. Brand GmbH, Wertheim

Pipettenspitzen 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l, Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf

Eppendorfcups 1000 μ l, Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf

Deckgläschen 18 x 18 mm, Fa. Marienfeld, Lauda-Königshofer

Fettstift Dako Pen, Fa. DAKO, Dänemark

Eindeckelmedium Fixogumm, Fa. Marabu, Bad Bodenteich

Einmalspritze 5 ml, 10 ml, Fa. Braun AG, Melsungen

Biopsy needle, Fa. Gallini s.r.l., Mantova, Italien

Foliodrape Lochtuch 50 x 60cm, Fa. Paul Hartmann AG, Heidenheim

2.4.2 Antikörper, Lösungen und weitere Agentien

Anti-Cytokeratin A45-B/B3, Klasse IgG1, Spezies Maus, monoklonaler Antikörper, 0,2 mg/ml in PBS pH 7,4, Fa. Micromed GmbH, Martinsried

Anti-uPA-Rezeptor HU277, Klasse IgY, Spezies Huhn, polyklonaler Antikörper, Victor Magdolen, Frauenklinik Rechts der Isar, TUM

Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, 2 mg/ml, Molecular Probes, Eugene, USA

Alexa Fluor 568 goat anti-chicken IgY, 2 mg/ml, Molecular Probes, Fa. Micromed GmbH, Martinsried

Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG, 2 mg/ml, Molecular Probes, Fa. Micromed GmbH, Martinsried

Alexa Streptavidin 568, lyophilized powder, 1,0 mg/ml, Molecular Probes Eugene, USA

Anti c-erbB-2 NCL-CB11-BIOTIN, Klasse IgG1, Spezies Maus, monoklonaler Antikörper, Novocastra Labs, Newcastle, UK

c-erb-B2 A0485, Klasse IgG1, Spezies Hase, polyklonaler Antikörper, 0,5 g/L, Firma DAKO, Dänemark

Kontrollantikörper Maus MAb, Klasse IgG1, Firma Caltag, Hamburg

Red Beads (580/605) (Latex, Fluoreszenzintensität 2,8 %), InSpeck™, Molecular Probes, Eugene, USA

Prolong Anti Fade Kit, Fa. Molecular Probes, Eugene, USA

Blocking Kit, Vector Labs, SP-2001, Peterborough, UK

Ziegenserum, Code No.X 0910, Fa. DAKO, Dänemark

TRIS/TWEEN-Puffer: selbst hergestellt: 10 mM TRIS+8,8g NaCL+1 ml TWEEN 20 (FA.Sigma),

Antibody Diluent der Firma DAKO, Dänemark

Giemsa-Färbung, Fa. Merck KgaA, Darmstadt
PBS Pufferlösung, Fa. Gibco, Carlsbad, California

Biocoll (density 1.077), Fa. Biochrom KG, Berlin

Albumine bovine fraction V (pH 7), Fa. Serva, Heidelberg

Paraformaldehyd pure, Fa. Serva, Heidelberg

Saponin, Fa. Serva, Heidelberg

Di-Natrium-EDTA 1,107 %, Fa. Delta-Pharma GmbH, Pfullingen

Liquemin N 25000 IE (5ml), Fa. Roche, Grenzach-Whylen

Zelllinien :

ZR-75

SKBR-3

3. Ergebnisse und Resultate

3.1 Charakterisierung des Patientenguts

Zwischen Februar 2000 und Februar 2001 wurden bei 111 Patientinnen mit V. a. Mammakarzinom Stanzbiopsien im Bereich des Beckenkamms entnommen.

Nach Entblindung der Histologie ließ sich die Patientinnengruppe mit n=111 wie folgt unterteilen:

| Anzahl der Stenzen | Primäres Mammakarzinom | Sonstige |
|--------------------|---|---|
| n=111 | n=92 71 invasiv 14 invasiv lobulär 4 muzinös 2 tubulär 1 papillär, davon 7 nach PST | n=19 9 benigne Befunde 1 DCIS 3 prim. Metastasen 2 Lokalrezidiv 3 Rezidiv kontralateral 1 Zweitkarzinom |

Tab.4: Patientenkollektiv und Histologie

Von den 111 Patientinnen hatten 92 ein primär invasives Mammakarzinom. Davon war übereinstimmend mit der Literatur das invasiv duktales Karzinom bei 71 Patientinnen der häufigste pathologische Subtyp. In der Häufigkeit folgend war bei 14 Patientinnen ein invasiv lobuläres Karzinom, bei 4 ein muzinöses, bei 2 ein tubuläres und bei einer ein papilläres Karzinom nachweisbar.

7 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom waren im Rahmen einer primären Chemotherapie vorbehandelt worden.

Insgesamt wurden 19 Patientinnen biopsiert, die kein primäres Mammakarzinom hatten und sich wie folgt aufteilen:

3 Patientinnen hatten bereits zum Zeitpunkt der Primärtherapie Metastasen, 5 wurden mit lokoregionärem -oder kontralateralem Rezidiv eingeschlossen. 1 Patientin hatte ein Endometriumkarzinom in der Vorgeschichte, 1 Patientin mit DCIS und 9 Patientinnen (Mastopathie, Fibroadenom, Zyste) mit benignen Befunden wurden bioptiert.

Das Kollektiv der n=102 Mammakarzinompatientinnen stellte sich wie folgt dar:

Der Altersmedian lag zum Zeitpunkt der Stanzbiopsie bei 56 Jahren. Die jüngste Patientin war 32,9 Jahre alt, die Älteste 82,1 Jahre. Davon waren 68 Patientinnen in der Postmenopause, 2 Patientinnen perimenopausal und 32 Patientinnen prämenopausal.

Der Anteil an mastektomierten Patientinnen lag bei n=53 versus 49 brusterhaltend therapierten Frauen. 21 von 102 Karzinomen waren multizentrisch bzw. multifokal.

Der Großteil der primären Mammakarzinome waren T1 und T2-Tumoren (77%). Bezüglich des Lymphknotenbefalls waren knapp mehr als die Hälfte nodalnegativ. Beim Grading herrschte mit 60% vor allem G3 vor. 83% der Karzinome zeigten einen positiven Hormonrezeptorstatus und zu 28% wurde Her-2-neu überexprimiert.

In der IF zeigten 50 Patientinnen versus 52 einen positiven Knochenmarksstatus; d.h. bei 49% des Gesamtkollektivs fanden sich zytokeratinpositive Zellen.

Bei 58 Patientinnen wurden aus dem Primärtumor der Gehalt an uPA und PAI bestimmt. Dabei zeigten 31 Mammakarzinome hohe Werte.

Die mediane Nachbeobachtungszeit lag bei 24 Monaten (Spannweite:18-30 Monate). Die Datenerhebung erfolgte vom Datum der Operation bis einschließlich 31.8.2002 entweder über ein telefonisches Interview oder in der klinikinternen Tumornachsorgesprechstunde.

96% der Patientinnen waren zu diesem Zeitpunkt noch am Leben.

3.2 Ergebnisse und Auswertung der IF -Färbung am CLSM

3.2.1 Technischen Optimierung

3.2.1.1 Aufarbeitungszeit und Lagerung

Wie in Abb.28 gezeigt, sollte das Punktionsmaterial innerhalb von 2h aufgearbeitet werden, um ein gleichmässiges und qualitativ hochwertiges Zellbild zu erhalten.

Es zeigte sich bezüglich der Zellmorphologie kein gravierender Unterschied zwischen frisch gefärbten, luftgetrockneten oder eingefrorenen Präparaten.

Aufgrund der Ergebnisse wurden die Knochenmarksstanzen sofort nach Punktion aufgearbeitet und zeitnah gefärbt, um einen hohen Qualitätsstandart einzuhalten.

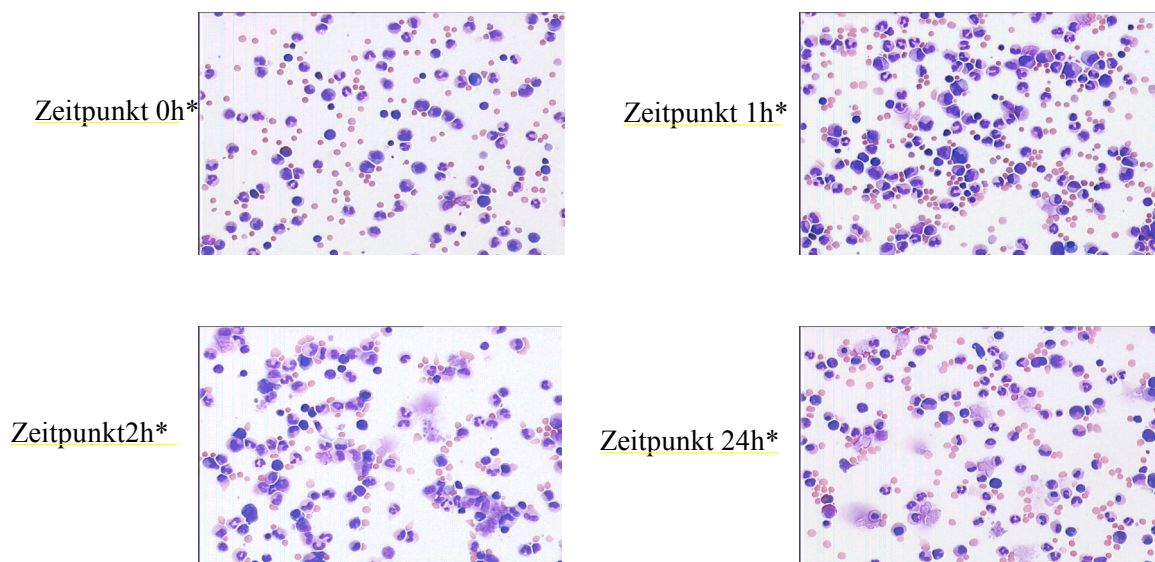


Abb. 28 Herstellung von Zytospins zu verschiedenen Zeitpunkten

3.2.1.2 Optimale Zelldichte

Es zeigte sich, dass eine Zelldichte von 1 Mio. für eine schnelle Auswertung vorteilhaft, jedoch bezüglich ihrer Genauigkeit aufgrund der Bildung von Zellnestern limitiert ist.

Die CS mit 200.000 Zellen hingegen zeigten ein lockeres, gut auswertbares Verteilungsmuster, welches gegenüber den 100.000 Zellenspots den Vorteil der rascheren Auswertung und des geringeren Färbeaufwands bot.

Aus diesen Gründen wurde es für optimal erachtet die CS auf eine Zellzahl von 2×10^5 einzustellen und auszuwerten (siehe Abb. 29).

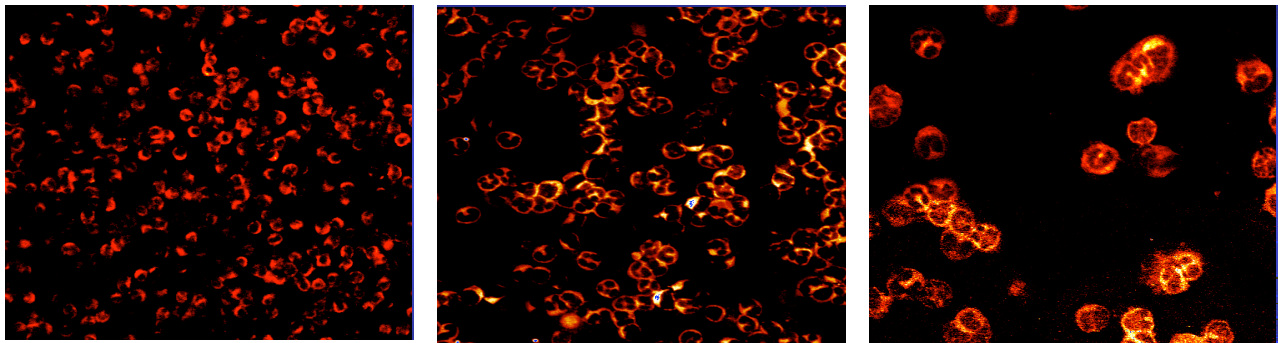


Abb.29.: Zytospins mit unterschiedlicher Zelldichte

3.2.1.3 Zellfixierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Aufarbeitungsprozess

Zellbild und Zellerhaltungszustand waren bei sofortiger Fixierung mit 1% PFA (30 min bei Raumtemperatur) deutlich besser. Abb. 30 zeigt ein deutlich optimiertes Zellbild gegenüber unfixierten Knochenmarkszellen durch die Reduktion unspezifischer Anfärbung. Zellverluste durch sofortige Fixierung und zusätzlich erforderliche Waschschriffe waren vernachlässigbar gering.

Vorteilhaft wirkte sich die Fixierung auch auf die Verlängerung der Lagerungszeit (bis zu 2 Jahren) aus; d.h. wertvolles Zellmaterial steht für weitere wissenschaftliche Fragestellung längere Zeit zur Verfügung. 1,5 Jahre nach Lagerung der CS bei -80°C konnte dies durch eine erfolgreiche Färbeserie bestätigt werden.

Daher wurden ab Knochenmarksstanze Nummer 44 bei ausreichend grosser Zellzahl die MNC der Interphase sofort fixiert.

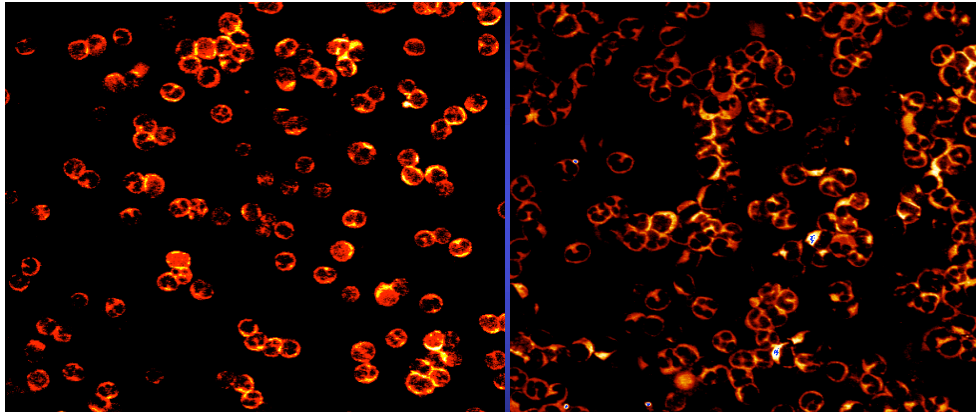


Abb.30: CS zu unterschiedlichen Fixierungszeitpunkten

3.2.1.4 Qualitätskontrolle

Die Knochenmarksaspirate wurden zusammen mit der III. Medizinischen Klinik (Dr. M. Sandherr) im Rahmen einer Qualitätsprüfung unter dem Lichtmikroskop nach Pappenheimfärbung beurteilt. Bezüglich der unter 2.3.2.4 beschriebenen Qualitätsmarker waren alle Aspirete aussagekräftig und von guter bis sehr guter Qualität. Keine der Patientinnen hatte einen Hinweis auf eine Erkrankung des blutbildenden Knochenmarks.

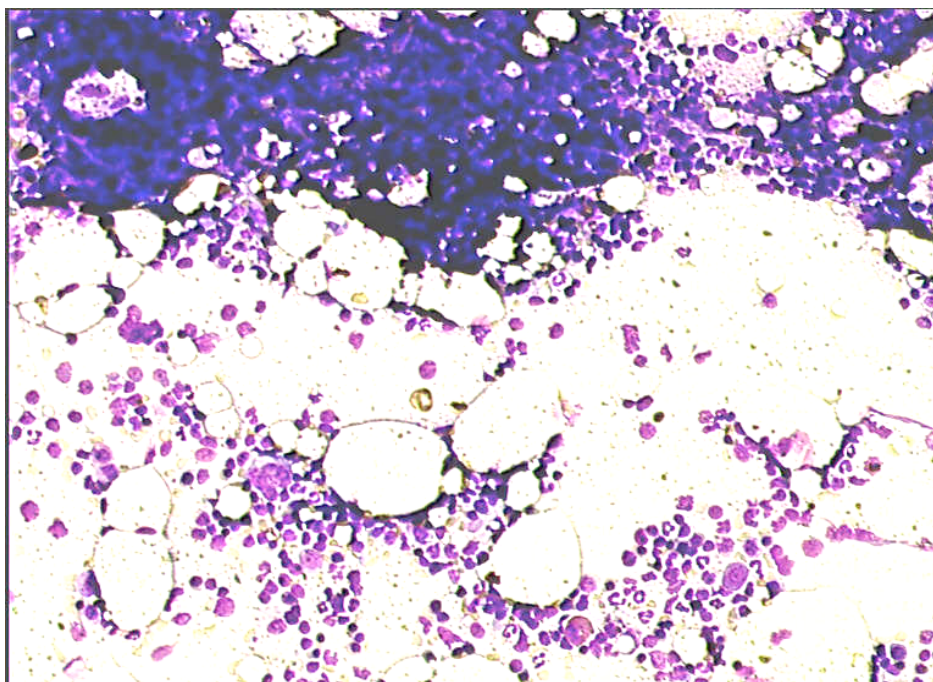


Abb.31: Qualitätskontrolle Knochenmark

3.2.2 Darstellung der Zellmorphologie zytokeratinpositiver Zellen und von Megakaryozyten in der May-Grünwald-Giemsa-Färbung

3.2.2.1 Darstellung der Zellmorphologie zytokeratinpositiver Zellen mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Die exakte Beurteilung der Zellmorphologie und damit die Klassifizierung einer Einzelzelle als Tumorzelle im histomorphologischen Sinn ist bei der CLSM-Auswertung schwierig.

Die Pappenheim-Färbung (=May-Grünwald-Giemsa-Färbung) eignet sich zur Färbung von Blut- und Knochenmarkausstrichen sowie von Aspirationsbiopsien, Ergüssen und Sputum. Sie ist eine panoptische Färbung, welche die May-Grünwald-Färbung und die Giemsa-Färbung kombiniert. Diese Kombination hat den Vorteil, dass die Farben deutlicher zur Geltung kommen als bei den Einzelfärbungen. Kerne färben sich violett, der Nukleolus blau und das Zytoplasma lachsrot. In der Histopathologie wird sie zur Beurteilung der Zellmorphologie herangezogen.

| Färbeschritt | Dauer |
|--------------------------------|---------------------------------|
| May-Grünwald Stammlsg. | 4 min |
| May-Grünwald-Lsg (1:1)+ Puffer | 5 min |
| Leitungswasser + 3ml Puffer | 10x in Lösung eintauchen |
| Giemsa-Stammlsg + Puffer | 15 min |
| Leitungswasser +3ml Puffer | 5x in Lösung eintauchen + 3 min |
| Leitungswasser +3ml Puffer | 5x in Lösung eintauchen + 3 min |
| Leitungswasser +3ml Puffer | 5x in Lösung eintauchen + 3 min |

Tab.5 Schema der May-Grünwald-Giemsa-Färbung:

Die Auswertung einer Kombination aus Pappenheimfärbung mit IF ist, wie mehrere Versuche gezeigt haben, am CLSM nicht möglich.

Um exemplarisch eine positive Korrelation zwischen tumorzellspezifischer Zellmorphologie und zytokeratinpositiven Einzelzellen herzustellen, wurde folgende Versuchsreihe aufgestellt:

Die in der IF zytokeratinpositiv Zellen wurden auf dem Objektträger markiert, vermessen, in den üblichen Einstellungen fotografiert und archiviert. Danach wurde der CS vorsichtig entdeckelt und nach Pappenheim gefärbt.

Die markierten Zellen wurden mit dem Lichtmikroskop aufgesucht und dokumentiert.

Aufgrund des hohen Zeitaufwands wurden nicht alle ck-positiven Zellen nach Pappenheim gegengefärbt.

Wenige Zellen konnten jedoch exemplarisch gefunden und durch die Pathologie des Hauses (Prof. Dr. med. H. Höfler) als disseminierte Tumorzellen befundet und verifiziert werden:

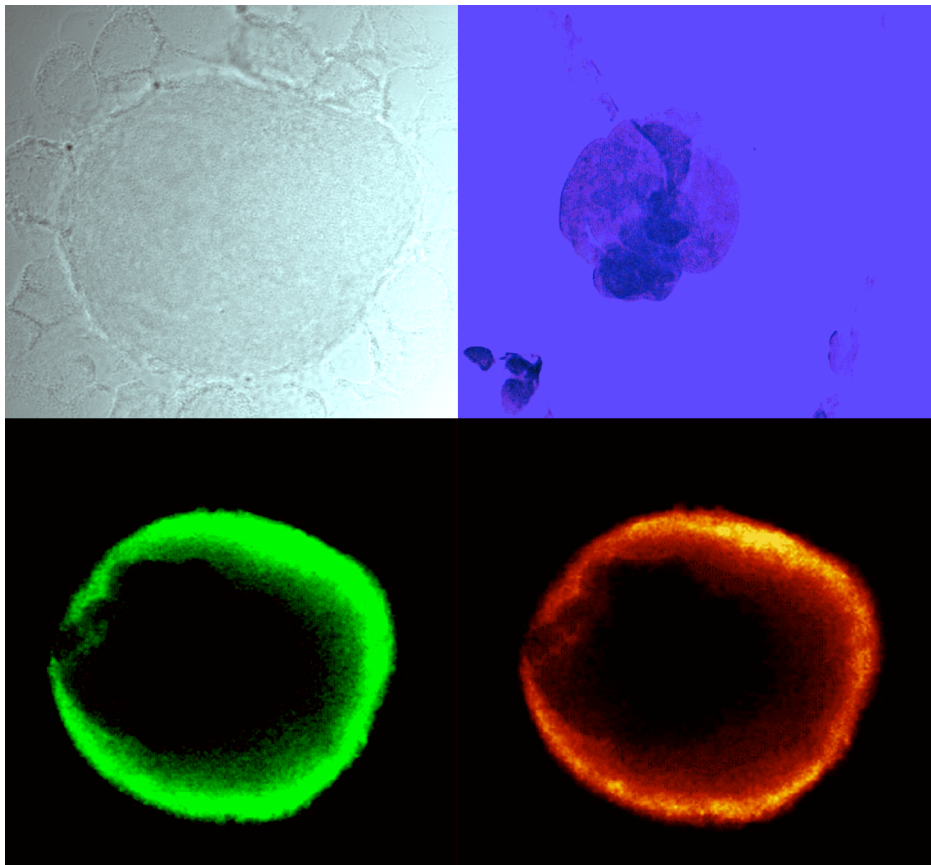


Abb.32: Disseminierte Tumorzelle nach Entdeckeln und Gegenfärbung nach May-Grünwald-Giemsa, aus Sinz, 2001, S. 40

3.2.2.2 Megakaryozyten: Morphologische Darstellung in der May-Grünwald-Giemsa-Färbung und Färbungsverhalten in der indirekten Immunfluoreszenz

In der Literatur (Järvinen, 1990, S. 310) ist die ektopische Expression von CK 18 auf mesenchymalen Zellen beschrieben. Pantel, 1994 S. 168 konnte durch Verwendung von zytokeratinspezifischen MAb Ck2 oder MAb A45B/B3 in der IHC mit APPAP die Rate an falsch positiven Zellen im Vergleich zu Mab, die muzinähnliche Antigene auf der Zelloberfläche detektieren, drastisch senken (5% versus 26%).

In der gleichen Arbeit wurde eine Kreuzreaktivität zu hämatopoetischen Zellen durch Doppelmarkierung mit CD45 (Leukozytenantigen) bzw. Vimentin (Intermediärfilament in mesenchymalen Zellen) ausgeschlossen. Bei Borgen, 1998, S.427 wurden die in der APPAP-Färbung mit A45B/B3 falsch positiven hämatopoetische Zellen weiter analysiert: der Grossteil zeigte in der Doppelfärbung das Profil von Plasmazellen (CD 45 negativ, positiv für humanes Ig κ/λ), wenige das Profil von lymphoiden Zellen, polymorphonuklearen Granulozyten und Makrophagen (CD45 positiv). Die direkte Reaktion zwischen alkalischer Phosphatase und humanem Ig κ/λ scheint für die Anfärbung und damit für eine falsch positive Rate von 5,6% in der APAAP- Färbung verantwortlich zu sein.

Plasmazellen und Megakaryozyten müssen folglich von disseminierten Tumorzellen anhand morphologischer Kriterien unterschieden werden. Alternativ sind Färbetechniken so zu modifizieren, dass ein möglichst geringer Anteil falsch positiver Anfärbungen resultiert.

Im Rahmen der in dieser Arbeit verwendeten Technik sind hauptsächlich Megakaryozyten morphologisch schwierig von zytokeratinpositiven Zellen zu diskriminieren. Daher wurde anhand einer angezüchteten Megakaryozytenzelllinie und Knochenmarksausstrichen folgendes gezeigt: Megakaryozyten sind zytokeratinnegativ. Es findet sich keine spezifische Anfärbung mit dem Antikörper A45B/B3. Eine Kreuzreaktivität zum Primärantikörper ist somit ausgeschlossen. Als Kontrollen wurden CS aus Knochenmarkszellen (Negativkontrolle), ZR-75 (zytokeratinpositive, uPA-R

positive humane Tumorzellen) und SKBR-3 (zytokeratinpositive, Her-2 positive humane Tumorzellen) verwendet. Das Versuchsprotokoll ist aus Tab. 6 ersichtlich.

Anhand von zellmorphologischen Zusatzkriterien konnten zweifelhafte Befunde, wie von Borgen angeregt, ausgeschlossen werden (siehe Abb.33, 34).

Die Megakaryozyten wurden auch bezüglich uPA-R und Her2 mittels IF getestet.

UPA-R wird laut Literatur (Plesner, 1994, S. 835, Jardi, 1996, S.1009) auf den verschiedensten Körperzellen, unter anderem Megakaryozyten exprimiert. Mittels IF konnten wir sowohl an Zytospins mit Megakaryozyten als auch im Blutaussstrich eine schwach-positive Anfärbung für uPA-R nachweisen (siehe Abb.33).

In Korrelation dazu ließen sich auch im ELISA geringe Mengen an uPA-R Extrakt nachweisen. (Das Ergebnis des ELISA wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. Sanner aus der klinischen Forschergruppe der TU-München übernommen).

Über die Expression von Her2 auf Megakaryozyten gibt es derzeit keine Literatur.

Die Megakaryozyten und der Knochenmarksausstrich wurden auf die Expression von Her2 mittels IF überprüft. Dabei zeigte sich keine spezifische membranständige Färbung für Her2 (siehe Abb.33).

Zusammenfassend lassen sich mit A45B/B3 in der indirekten IF mit hoher Spezifität zytokeratinpositive Zellen finden und über Morphologie und Färbereigenschaften von Megakaryozyten abgrenzen.

Über die unter 2.3.1.3 beschriebene Pappenheimfärbung Abb.34 gelingt eine weitere Differenzierung.

| Cytospin | 1.Primäranti- körper 1h | 2.Primäranti- körper 1h | 1.Sekundär- antikörper 30 min | 2.Sekundär- antikörper 30 min |
|---|--|--|---|--|
| KM | A45B/B3 1:100µl | HU 277 2:123µl | Goat-anti- mouse Alexa 488 1:100µl | Goat-anti- chicken Alexa 568 2:80µl |
| ZR 75 | A45B/B3 1:100µl | HU 277 2:123µl | Goat-anti- mouse Alexa 488 1:100µl | Goat-anti- chicken Alexa 568 2:80µl |
| Mega- karyozyt | A45B/B3 1:100µl | HU 277 2:123µl | Goat-anti- mouse Alexa 488 1:100µl | Goat-anti- chicken Alexa 568 2:80µl |
| Aus- strich Mega- karyozyt | A45B/B3 1:100µl | HU 277 2:123µl | Goat-anti- mouse Alexa 488 1:100µl | Goat-anti- chicken Alexa 568 2:80µl |
| KM | A45B/B3 1:100µl | CB11-Bio 1:10µl, 4°C | Goat-anti- mouse Alexa 488 1:100µl | Alexa- Streptavidin 568 1:100µl |
| SKBR-3 | A45B/B3 1:100µl | CB-11-Bio 1:10µl, 4°C | Goat-anti- mouse Alexa 488 1:100µl | Alexa- Streptavidin 568 1:100µl |
| Mega- Karyozyt | A45B/B3 1:100µl | CB-11-Bio 1:10µl, 4°C | Goat-anti- mouse Alexa 488 1:100µl | Alexa- Streptavidin 568 1:100µl |
| Aus- strich Mega- karyozyt | A45B/B3 1:100µl | CB-11-Bio 1:10µl, 4°C | Goat-anti- mouse Alexa 488 1:100µl | Alexa- Streptavidin 568 1:100µl |
| Mega- karyozyt | May- Grünwald- Giemsa | | | |

Tab.6 Färbeprotokoll

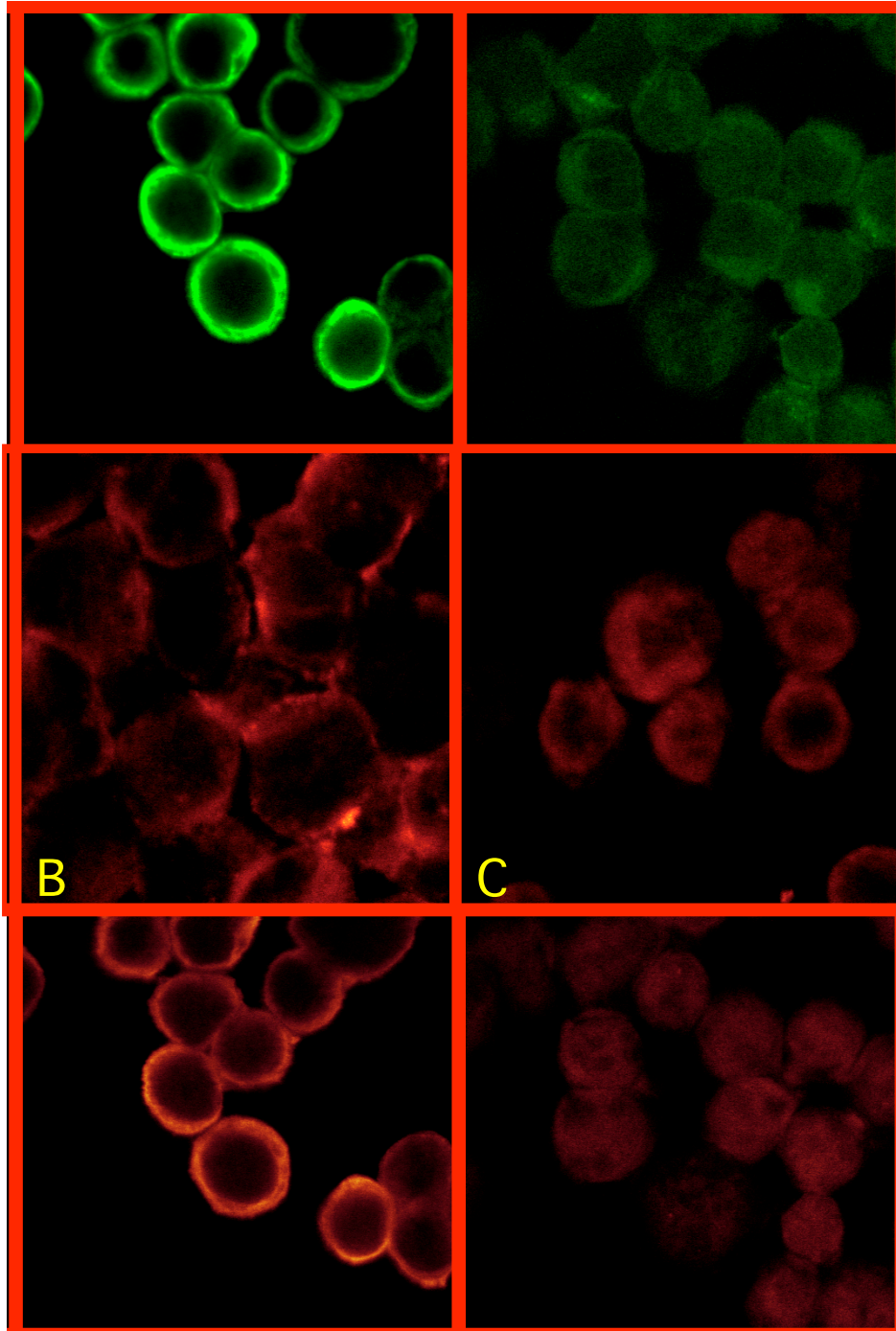


Abb.33: Tumorzellen links (SKBR-3/ZR-75) und Megakaryozyten rechts in der Doppelimmunfluoreszenzfärbung (A45B/B3, HU 277, CB-11-Bio)

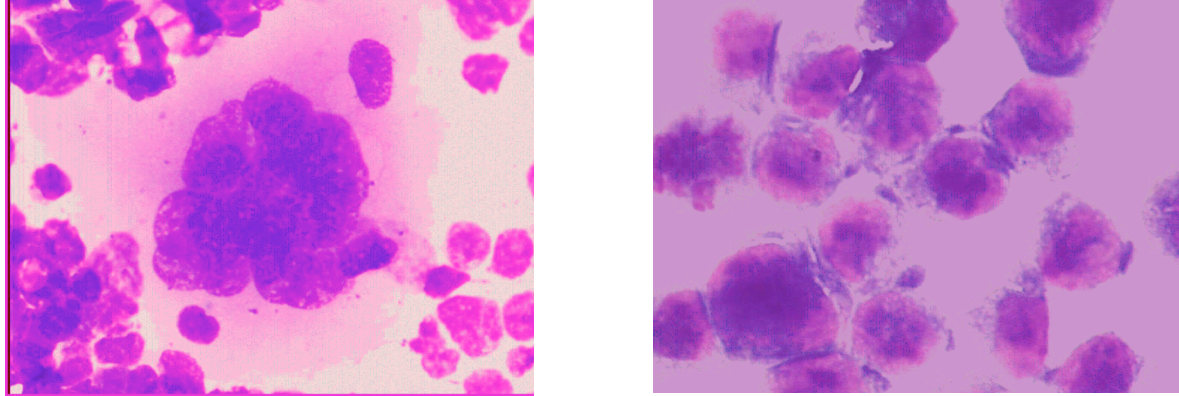


Abb 34: Morphologische Darstellung (May-Grünwald-Färbung) von Megakaryozyten im Blutausstrich und im Zytospin

3.2.3 Detektion und Phänotypisierung zytokeratinpositiver Zellen am eigenen Patientengut

Im Folgenden werden 111 Knochenmarksaspirate bezüglich ihrer Färbung für Zytokeratin 8,18,19, uPA-R und Her2 ausgewertet.

Die Stanzbiopsien, welche bei benignen Befunden entnommen wurden oder bei Patientinnen im M1-Stadium bzw. in der Rezidivsituation, werden gesondert betrachtet.

Entsprechend den Forderungen der European ISHAGE Working Group wurden pro Patientin 2×10^6 MNC aufgearbeitet und auf zytokeratinpositive Zellen untersucht.

Gleichzeitig wurden jeweils 1×10^6 MNC auf die Expression von uPA-R und Her2 überprüft.

3.2.3.1 Detektion zytokeratinpositiver (8,18,19) Einzelzellen

Die unter 2.3.1.2 beschriebene Färbemethode ermöglichte bei einem Gesamtkollektiv von $n=111$ in 45% (d.h. 50 Patientinnen) zytokeratinpositive Zellen zu detektieren.

2 Patientinnen waren positiv bei primär benignem Mammabefund (Fibrom, DCIS). Die Rate an falsch positiven Befunden lag damit bei 1,8%.

Weitere 2 Patientinnen mit positiven Knochenmarksbefund gehörten zur Gruppe ($n=3$) der primär metastasierten Mammakarzinompatientinnen. In der Gruppe mit Rezidivtumor und Zweitkarzinom waren ebenfalls 3 von 6 Patientinnen positiv. Bei 4 von 7 zunächst primär systemisch behandelten Patientinnen konnten präoperativ zytokeratinpositive Einzelzellen nachgewiesen werden.

Die Detektionsrate zytokeratinpositiver Zellen für Patientinnen mit primärem Mammakarzinom $n=92$ lag somit bei 46,7% (d.h. 43 Patientinnen).

Nach Auswertung von 1×10^6 MNC wurden bereits 43,4% (d.h. 40 Patientinnen) der Patientinnen als zytokeratinpositiv diagnostiziert. Wurden insgesamt 2×10^6 MNC ausgewertet, konnte der Prozentsatz zytokeratinpositiver Knochenmarksbefunde um absolut 3,3% auf 46,7% (Abb. 35) gesteigert werden (d.h. nur 3 Patientinnen von 92 wurden bei der Auswertung der zweiten Million MNC positiv)

Die Anzahl nachgewiesener zytokeratinpositiver Zellen variierte von minimal 1 bis maximal 12. Die mittlere Zellzahl lag bei 2,9 pro Patient. Bei 37,2% der Patientinnen konnten 1, bei 18,6% 2, bei 23,2% 3, bei 6,9% 4 und bei 9,3% 5 zytokeratinpositive Zellen nachgewiesen werden. Mehr als 5 bzw. 10 Zellen konnten in jeweils 2,3% gefunden werden (Abb. 36). Ein Schwellenwert ließ sich aufgrund des kleinen Kollektivs und klinisch nur kurzer Nachbeobachtungszeit nicht definieren. Bei keiner Patientin konnten Zellcluster (=Verband von zytokeratinpositiven Zellen)

nachgewiesen werden. Zytokeratin färbte sich bei allen Zellen in der IF vor allem intrazytoplasmatisch an.

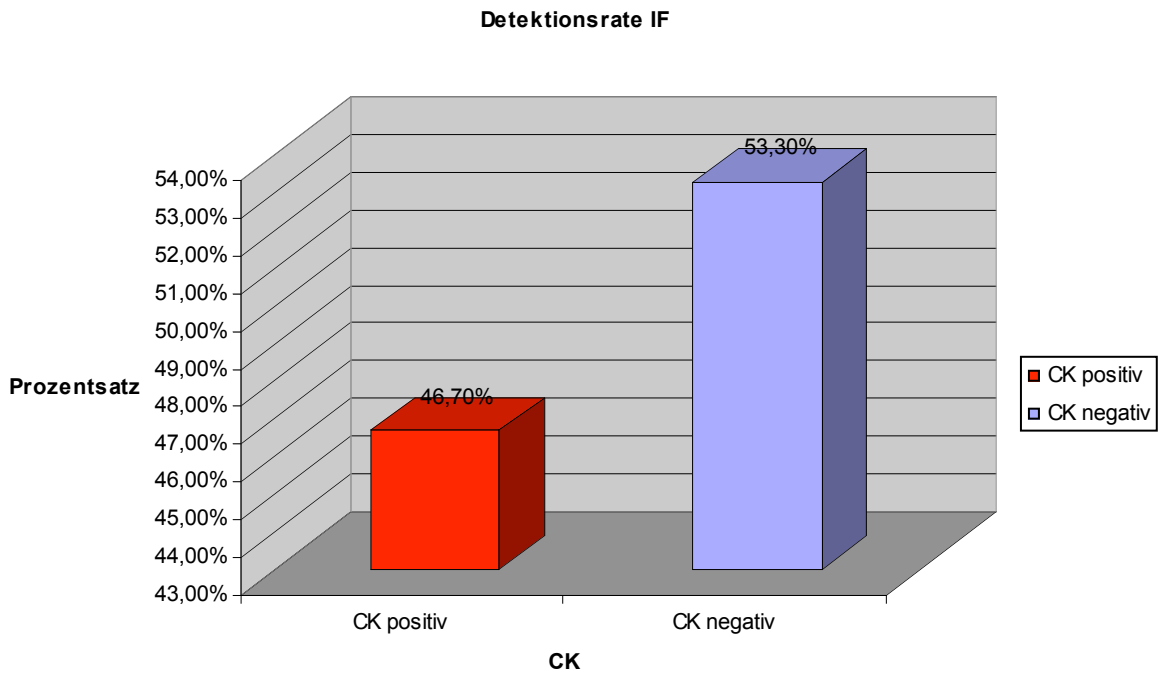


Abb.35: Detektionsrate der IF für zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom, n=92

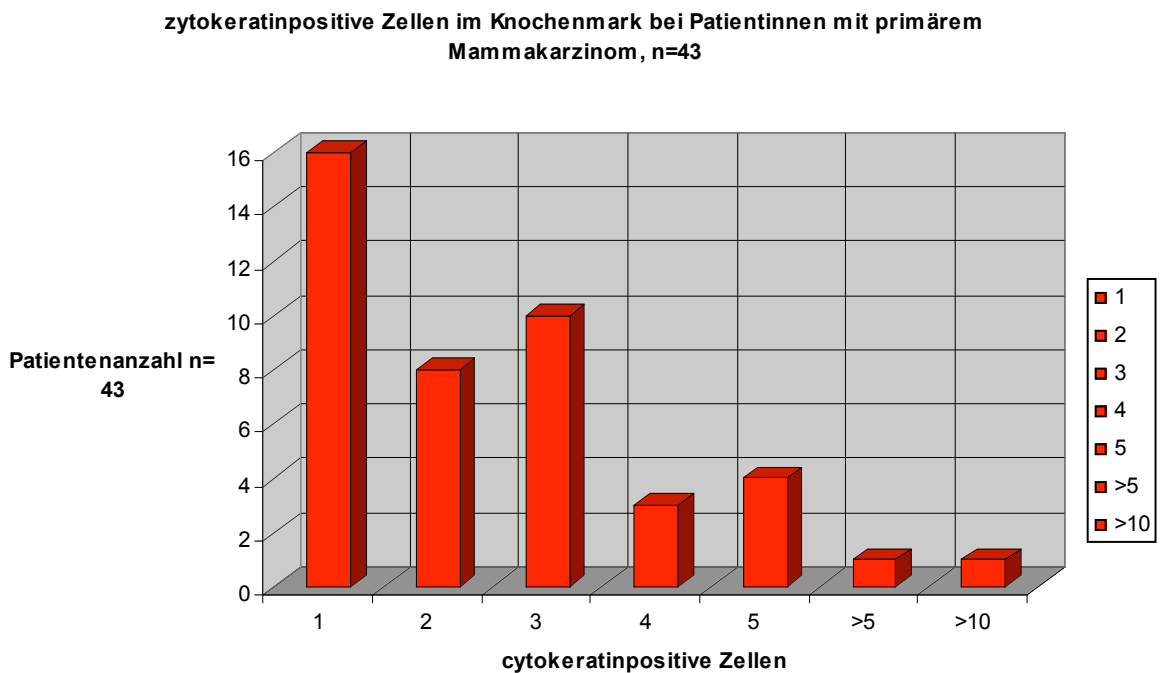


Abb. 36: Verteilung der Anzahl zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark von 43 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

3.2.3.2 Phänotypisierung und Quantifizierung für uPA-R bei zytokeratinpositiven Zellen

Die Phänotypisierung für uPA-R wurde an allen zytokeratinpositiven Zellen einheitlich nach dem unter 2.3.1.2 beschriebenen Färbeprotokoll vorgenommen.

Insgesamt wurden mittels IF alle 111 Patientinnen auf Zytokeratin- und uPA-R-Positivität im Knochenmark überprüft.

Ausgewertet wurden 48 Patientinnen mit Mammakarzinom und zytokeratinpositivem Knochenmarkstatus. 2 Patientinnen hatten ein primär metastasiertes Mammakarzinom, 2 Patientinnen ein Rezidiv und 1 Patientin ein Zweitkarzinom in der Vorgeschichte. 43 Patientinnen hatten ein primäres Mammakarzinom, wovon 4 primär systemisch vorbehandelt waren. Insgesamt wurden pro Patientin 1×10^6 MNC auf uPA-R-Positivität untersucht. Bei 45 Aspiraten konnte stadienunabhängig uPA-R nachgewiesen werden. Bei 3 Patientinnen (primäre Mammakarzinome) konnte trotz Zytokeratinpositivität kein uPA-R nachgewiesen werden; d.h. 93,8 % der zytokeratinpositiven Zellen waren auch für uPA-R positiv. Die Anzahl uPA-R positiver Zellen variierte von minimal 1 bis maximal 5. Die mittlere Anzahl uPA-R positiver Zellen lag somit bei 2,3.

uPA-R konzentrierte sich in unserer Färbung bei allen Zellen hauptsächlich im Bereich der Zellmembran und weniger intrazytoplasmatisch.

Für 28 Patientinnen konnte der uPA-R Gehalt über die in Kapitel 2.3.3.3 beschriebene Technik bestimmt werden.

In Abb. 37 sind die Anzahl ausgewerteter Zellen pro Patientin und deren uPA-R Gehalt in Form von verschiedenfarbigen Säulendiagrammen dargestellt.

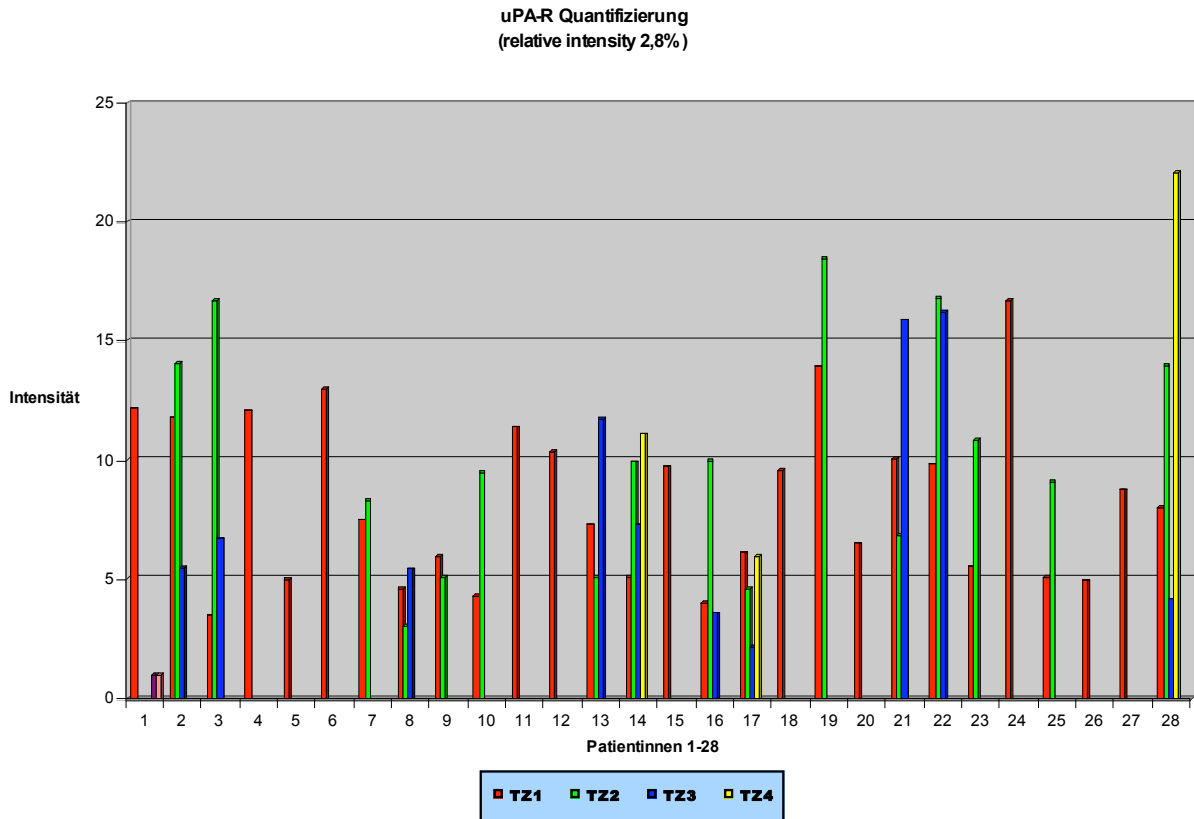


Abb. 37: uPA-R Quantifizierung für 28 Patientinnen

Von den 28 ausgewerteten Patientinnen hatten 26 ein primäres Mammakarzinom, wobei 3 Patientinnen mit einer Chemotherapie vorbehandelt waren. 2 Patientinnen hatten ein Lokalrezidiv.

Insgesamt kamen 58 Zellen zur Auswertung.

Die auswertbare Zellzahl pro Patientin lag bei 1-5 Zellen, d.h. die mittlere Zellzahl betrug 2,07.

Bezogen auf Latex Beads mit einer relativen Intensität von 2,8% als Referenzfluoreszenz konnten für unsere Zellen Intensitäten zwischen 3,58 und 22,08 berechnet werden. Die mittlere Intensität lag bei 9,17 pro Patientin.

3.2.3.3 Phänotypisierung für Her2 bei zytokeratinpositiven Zellen

Die Phänotypisierung für Her2 wurde für alle zytokeratinpositiven Patientinnen nach den beiden unter 2.3.1.2 beschriebenen Färbeschemata vorgenommen. Insgesamt wurden die CS aller 111 Patientinnen hinsichtlich der Expression von Zytokeratin und Her2 überprüft. Dabei wurden 89 Aspiate nach dem Protokoll 2 und 22 nach dem Protokoll 1 gefärbt.

Ausgewertet wurden wie oben beschrieben 48 Patientinnen mit Mammakarzinom und zytokeratinpositivem Knochenmarksstatus. Insgesamt wurden pro Patientin 1×10^6 MNC auf Her2-Positivität untersucht. 36 Proben wurden nach Protokoll 2 ausgewertet und 12 nach dem Protokoll 1.

Bei keiner Patientin konnte mittels IF (Protokoll 1 und 2) Her2 nachgewiesen werden; d.h. 100% der zytokeratinpositiven Zellen waren für Her2 negativ (Abb.38). Die Zellen wurden in verschiedenen Ebenen „gescannt“, um die vor allem membranständige und teilweise diskontinuierliche Färbung für Her2 nachzuweisen.

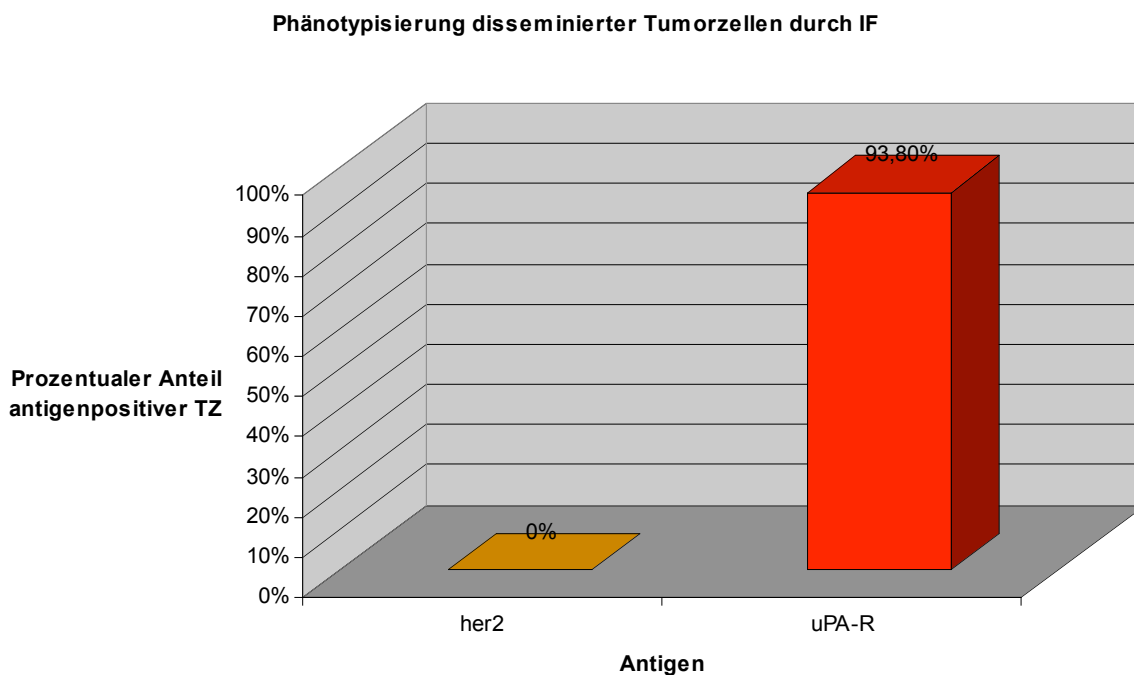


Abb 38: Phänotypisierung ck-positiver Knochenmarkszellen durch IF bei 48 Patientinnen mit Mammakarzinom

3.2.4 Weitere technische Möglichkeiten und eigene Resulte

3.2.4.1 Laserdissektion und Genotypisierung mittels single-cell PCR

Weitere Möglichkeiten zur Untersuchung von Einzelzellen mittels CLSM werden in den Publikationen von Schütze, 1997, S.1-8 und 1998, S. 735-46, gegeben. Sie beschäftigte sich vor allem mit Laserzellmikrodissektion. Mit einem UV-Laser Microbeam (LMM) wird durch einen gezielten Laserimpuls eine markierte Zelle präzise „herausgeschossen“; die extrem hohe Photonendichte im Laserstrahl bewirkt eine Photolyse des eingegrenzten Zellmaterials. Durch die Vaporisation des Lasers (laser pressure catapulting=LPC), welche sich wiederum durch hohe Photonendichte des LMM unter der Glasfläche entwickelt, lässt sich die Zelle in einem Eppendorfcup auffangen und steht so weiteren Analysen (z.B. single-cell PCR) zur Verfügung.

Durch den starken Photonenstrom können die Zellen mehrere Millimeter weit gebracht werden. Mit der Methode können Einzelzellen ohne Kontamination mit umgebendem Material ausgeschnitten werden. Dies erlaubt eine unverfälschte Genanalyse. Durch die Ablation mit einer Wellenlänge von 337 nm wird genetisches Material nicht zerstört. Dies soll in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt werden:

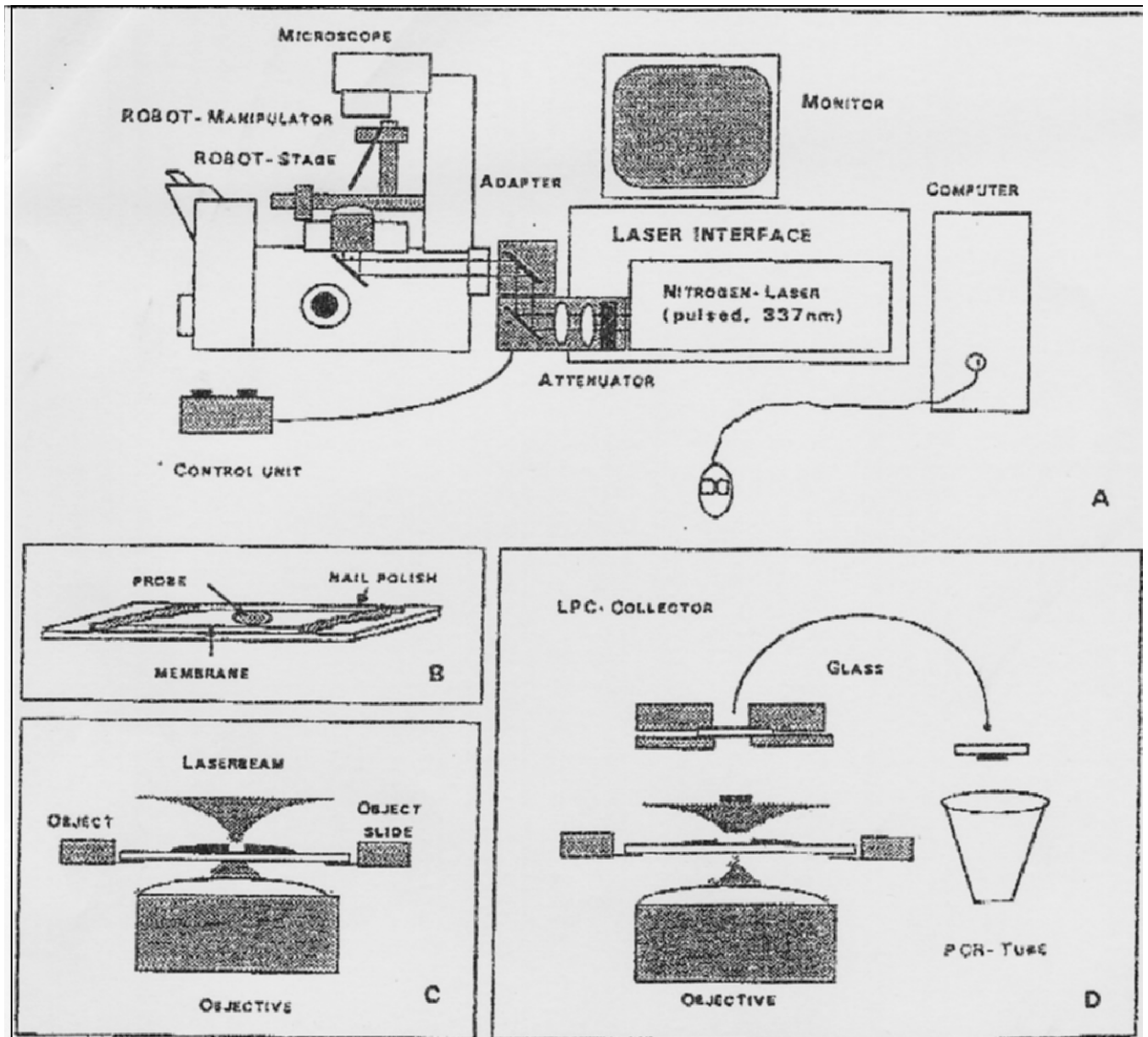


Abb. 39: PALM Robot Micro Beam, B: Membranbeschichtete Glasslides, C: Laser Microbeam, D: Laser Catapultierung und Auffangmechanismus, aus Publikation Schütze, 1998:740

Die Firma P.A.L.M.-Microlaser-Technologies AG, Bernried, ermöglichte im Rahmen dieser Arbeit die Durchführung einzelner Versuche zur Laserzellmikrodissektionen: Zytospins der Zelllinien SKBR-3 und ZR-75 sowie zytokeratinpositive Knochenmarksaspirate von Mammakarzinompatientinnen wurden mit APAAP (A 45B/B3 Fab) gefärbt. Die CS wurden nach zytokeratinpositiven Zellen durchsucht. Bei 2 zytokeratinpositiven Zellen aus Patientinnenmaterial ist die Dissektion und Asservierung gelungen (siehe Abb.40).

Diese und weitere Zellen wurden nach Paris ans Institut Curie geschickt und mittels single-cell-PCR ausgewertet:

In Korrelation zur Doppelimmunfluoreszenzfärbung wies die quantitative PCR ebenfalls eine heterogene CD87 Expression nach (Noack, 2000, S.1).

Die Arbeitsgruppe um Cremoux und Pierga zeigte weiterhin, dass eine quantitative real-time RT-PCR zur Phänotypisierung isolierter Tumorzellen zuverlässig eingesetzt werden kann. In 76% wurde bei zytokeratinpositiven Zellen uPAR mRNA nachgewiesen. Davon konnten in 50% sehr hohe Level an uPAR mRNA gefunden werden, was mit einem aggressiven Primärtumor assoziiert war.

Weitere Daten sind notwendig, um die Rolle von uPA-R auf Tumorzellen zur Risikoeinschätzung und Subgruppenanalyse heranzuziehen (Pierga 2005, S. 291-98).

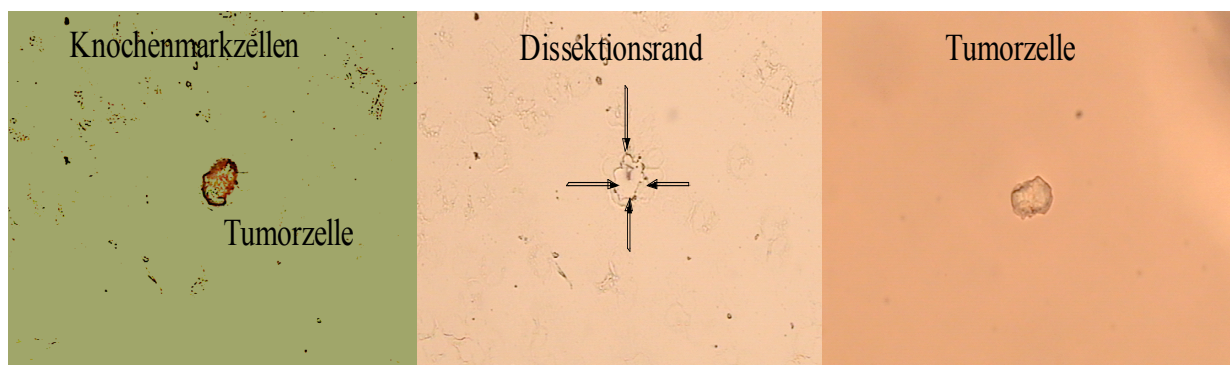


Abb. 40: Lasermikrodissektion nach APAAP-Färbung mit A45B/B3, Fab

3.2.4.2 3-D-Visualisierung nach Doppelscan mit IMARIS 3.0

Neben der Möglichkeit am CLSM Zielstrukturen zu quantifizieren, können mittels geeigneter Software (IMARIS 3.0) Einzelschnittbilder einer Zelle so zusammengesetzt werden, dass 3-dimensionale Bilder oder Filme entstehen. Die Verteilung bestimmter Proteine im Raum kann näher studiert werden.

Anhand von Tumorzelllinien und zytokeratinpositiven Zellen aus Knochenmarksaspiraten konnten 3-D Bilder angefertigt werden (siehe Abb. 41 und 42).

Dazu wurden zunächst „Doppelscans“ hergestellt. Bei genau definierten Filtereinstellungen (Barrierefilter Channel 2 auf Position 2 Barrierefilter Channel 1 auf Position 3, Drehschalter nach rechts, Beamsplitter ganz ausfahren und Exzitationsfilter auf Position 4) wurden Einzelbilder für den FITC Kanal (Wellenlänge 488nm, Kanal für Zytokeratindarstellung) und zeitgleich für den TRITC Kanal (Wellenlänge 568nm, Kanal für uPA-R bzw. Her2 Darstellung) angefertigt und abgespeichert. Die Schichtdicke wurde je nach Zellgrösse gewählt (0,2-0,4 μm).

Über die Software IMARIS 3.0 der Firma Bitplane AG, Schweiz und einen SGI-Rechner mit IRIX6.5 wurden die „Scans“ zu 2 und 3 D-Bildern sowie Filmen verarbeitet.

In Messerli 1993, S. 725-35 wird das Schattenwurfverfahren nach dem IMARIS die 3D Abbildungen erstellt näher beschrieben. Folgende Abbildungen sollen die technischen Möglichkeiten veranschaulichen.

Weitere Informationen zur IMARIS Software finden sich unter support@bitplane.ch.

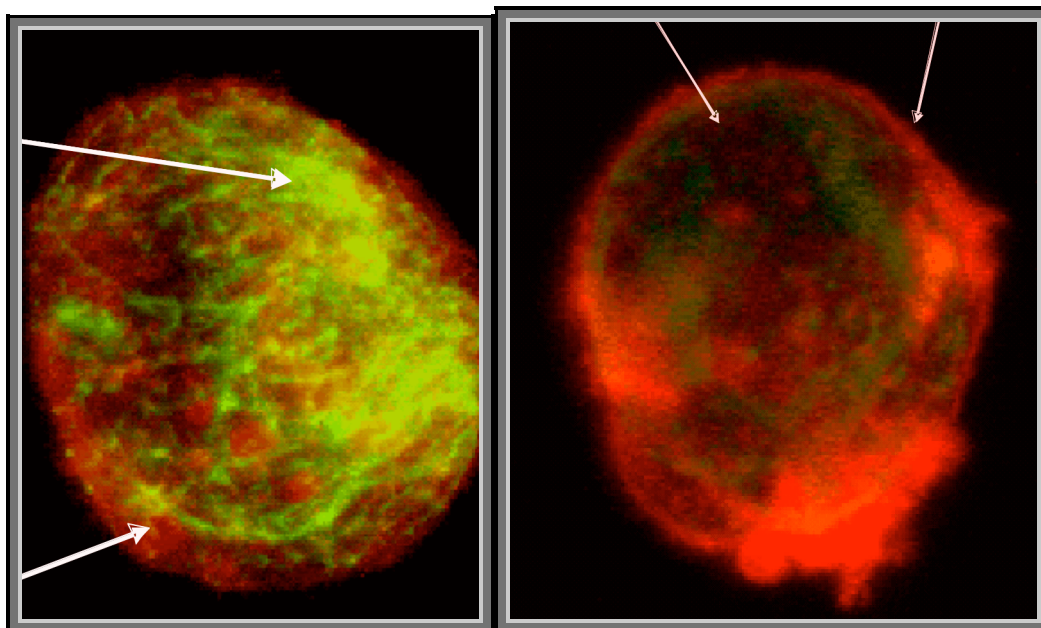


Abb. 41: 3-D Zytokeratin (A45B/B3), uPA-R (HU 277) und Her2 (A 0485)

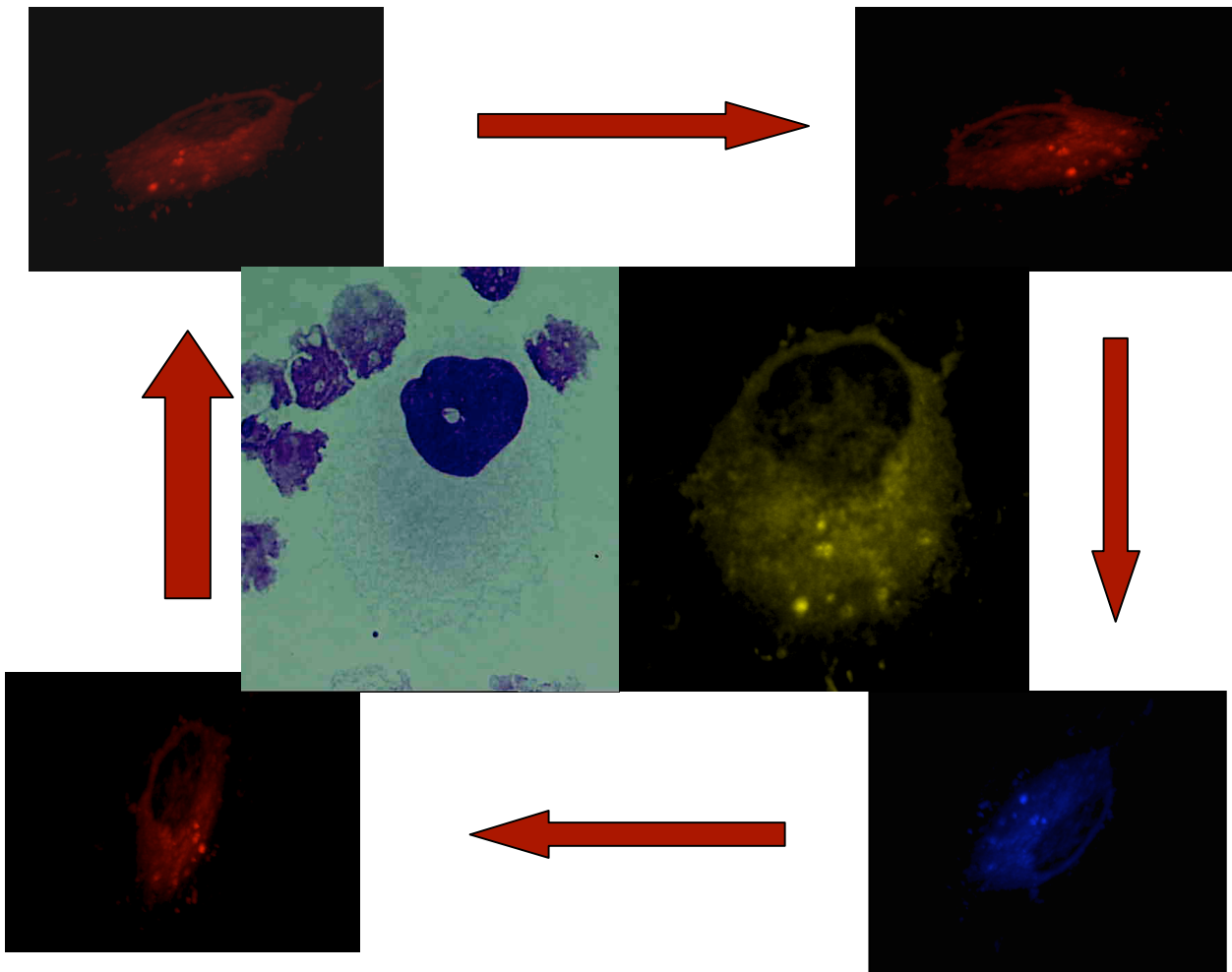


Abb. 42: 3-D Animationsbild einer zytokeratinpositiven Zelle mit A 45B/B3

3.3 Statistische Auswertung von Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus

3.3.1 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Patientendaten zum Zeitpunkt der Knochenmarkaspiration wurde mit der Software SPSS, Version 13.0 für Windows (Firma SPSS Inc., USA) vorgenommen.

Um die Korrelation zwischen Tumorzellnachweis bzw. uPA-R und den jeweiligen Prognoseparametern sowie dem klinischen Verlauf zu berechnen, wurden der Chi-Quadrat-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% entsprechend $p < 0,05$ verwendet. Die univariate graphische Darstellung der Überlebenszeiten erfolgte über eine Kaplan-Meier-Kurve.

3.3.2 Korrelation des Knochenmarkstatus mit TNM-Stadium und weiteren Prognosefaktoren

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Auswertungsergebnisse beziehen sich auf Patientinnen mit primärem Mammakarzinom (n=92)

In Tabelle 8 ist der Tumorzellnachweis in Beziehung zu den etablierten (TN-Stadien, Grading, Hormonrezeptorstatus, Menopausenstatus, Multizentrität) und neuen Prognosekriterien (Proteolysefaktoren uPA, PAI und Her2-Status) dargestellt:

Bei keinem der Faktoren konnte eine statistisch signifikante Korrelation zum positiven Knochenmarksstatus nachgewiesen werden (siehe Tab. 7).

Lediglich im Bezug auf Grading, Her2-Status, Nodalstatus und Multizentrität ließ sich folgender Trend ablesen:

Ein positiver Knochenmarkstatus scheint öfter mit hohem Grading (G3), multizentrischen Tumoren und einer Überexpression von Her-2 auf dem Primärtumor einherzugehen. Am ehesten implizieren somit schlechtes Grading, Multizentrität und positiver Her2 Status einen positiven Nachweis von disseminierten Tumorzellen=DTC. Nodalnegative Patientinnen hatten eher einen negativen Knochenmarksstatus.

Die Verteilung zytokeratinpositiver Zellen hinsichtlich der genannten Prognosefaktoren ist im Einzelnen in Abb. 43-50 graphisch dargestellt.

| Prognosefaktor | Tumorzellnachweis | Signifikanz |
|-------------------|--------------------------|-------------|
| T-Stadium | Chi ² = 0,925 | n.s |
| N-Stadium | Chi ² =0,574 | n.s |
| Grading | Chi ² = 4,241 | n.s |
| Hormonrezeptoren | Chi ² =0,988 | n.s |
| Her-2 | Chi ² =2,023 | n.s |
| Menopausenstadium | Chi ² =0,83 | n.s |

Tab.7: Korrelation zwischen Tumorzellnachweis und Prognosefaktoren (Chi²-T)

| Variable | Tumorzell- positiv (n =43) | Tumorzell-negativ (n =49) |
|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| pT | | |
| yTX | 4 | 3 |
| 1 | 20 (49%) | 21 (51%) |
| 2 | 15 (43%) | 20 (57%) |
| 3 | 1 | 2 |
| 4 | 3 | 3 |
| Multizentrisch/Multifokal | | |
| Ja | 12 (60%) | 8 (40%) |
| Nein | 31 (43%) | 41 (57%) |
| Grading | | |
| G1 | 1 | 1 |
| G2 | 11 (33%) | 22 (66%) |
| G3 | 31 (54%) | 26 (45%) |
| pN | | |
| N0 | 18 (43%) | 24 (57%) |
| N1 | 22 (51%) | 21 (49%) |
| N2 | 0 | 1 |
| Nx | 3 | 3 |
| ER/PR | | |
| Positiv | 36 (47%) | 41 (53%) |
| Negativ | 7 | 8 |
| Her2 | | |
| 0 | 11 | 11 |
| 1+ | 10 (38%) | 16 (62%) |
| 2+ | 09 (47%) | 10 (53%) |
| 3+ | 13 (54%) | 11 (46%) |
| Unbekannt | 0 | 1 |
| Menopausenstatus | | |
| Praemenopausal | 13 | 15 |
| Perimenopausal | 1 | 2 |
| Postmenopausal | 29 | 32 |
| uPA/PAI | tz-positiv n=27 | tz-negativ n=26 |
| High | 14 (50%) | 14 (50%) |
| Low | 13 (52%) | 12(48%) |

Tab. 8: Tumorzellnachweis im Knochenmark und Prognosekriterien

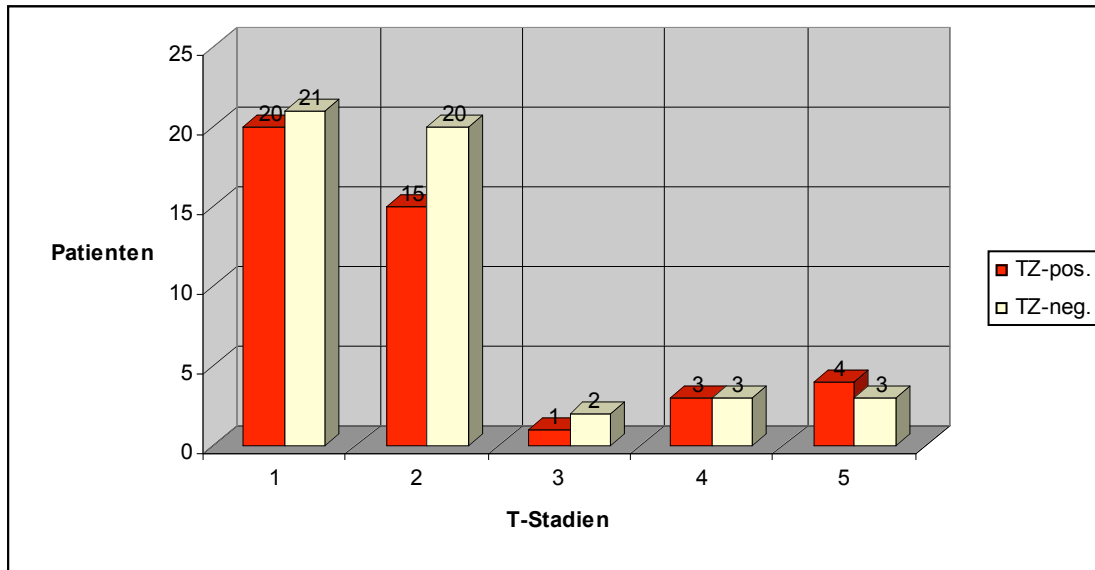


Abb. 43: Verteilung zytokeratinpositiver Zellen über die T-Stadien, 5 entspricht yTX

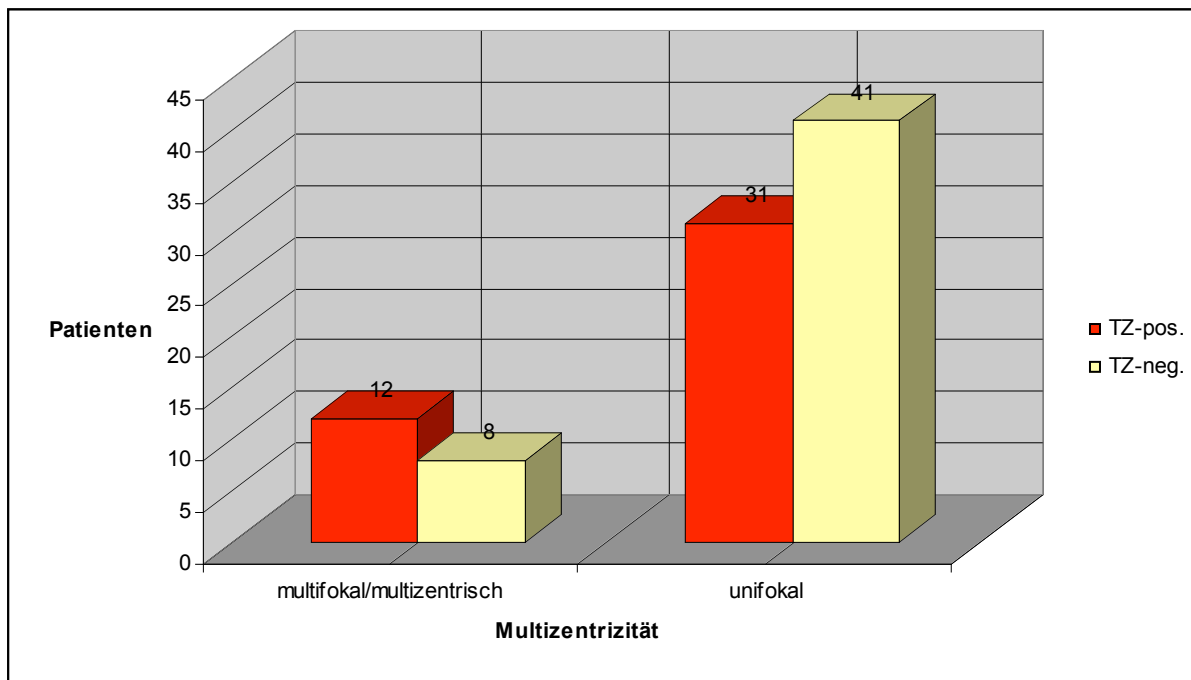


Abb. 44: Beziehung Multizentrität und zytokeratinpositiver Knochenmarksbefund

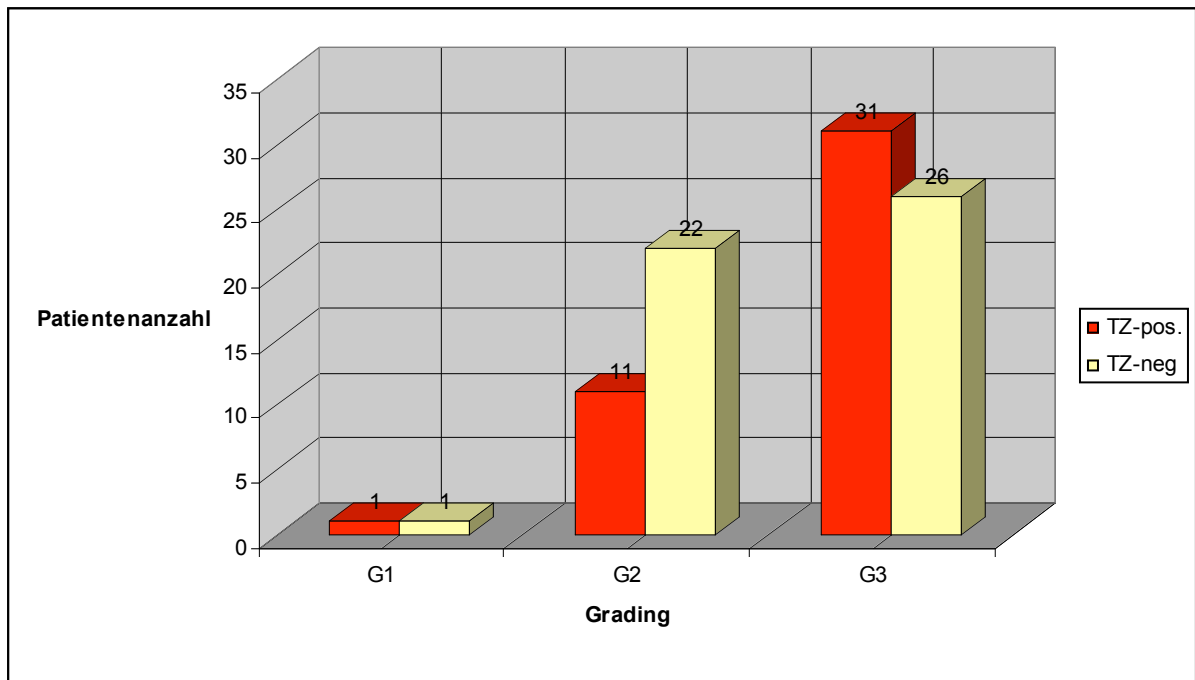


Abb. 45: Grading im Primärtumor und die Verteilung zytokeratinpositiver Zellen

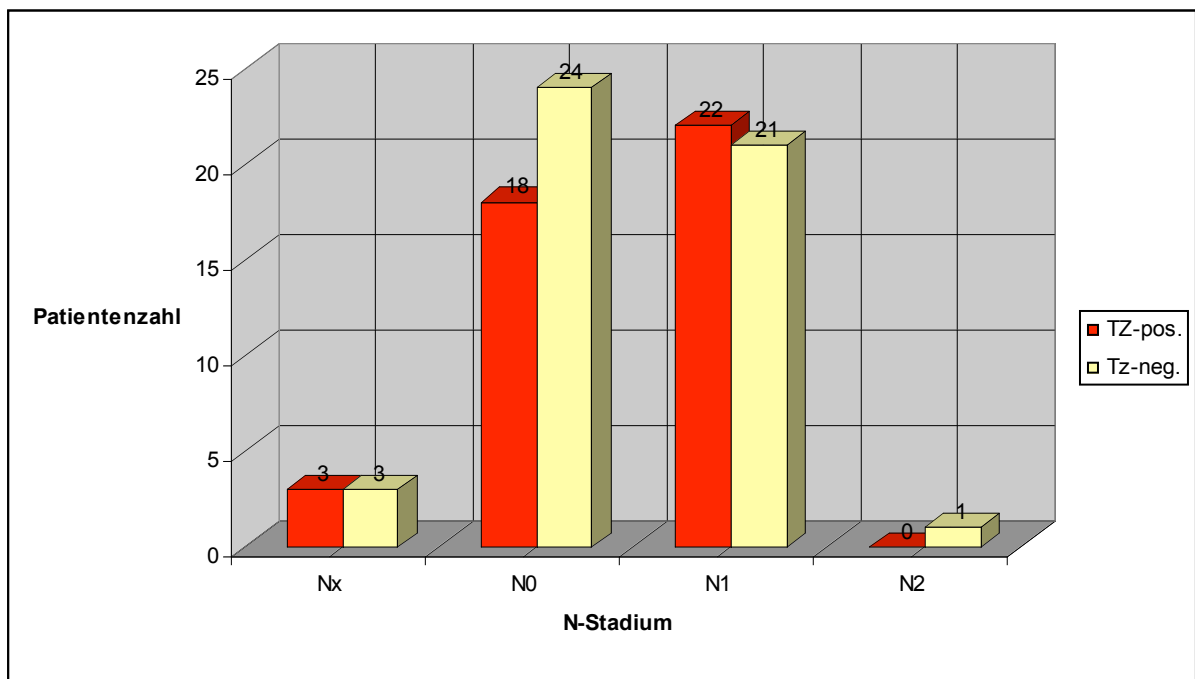


Abb. 46: N-Stadium und Verteilung zytokeratinpositiver Zellen

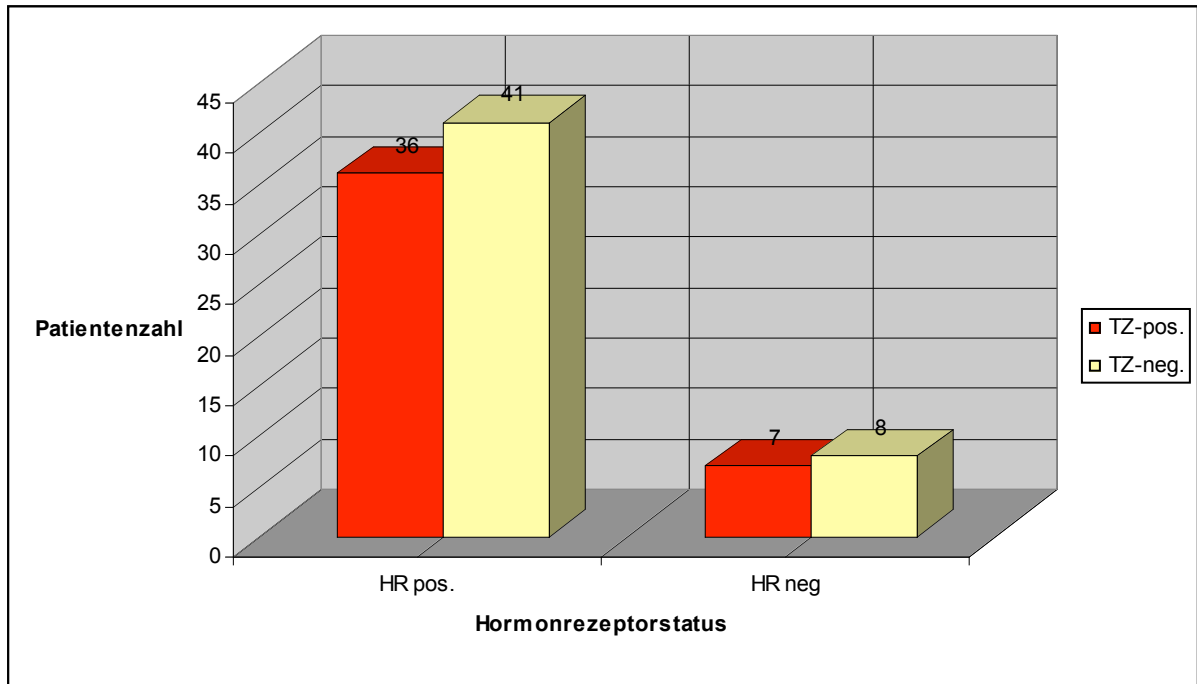


Abb. 47: Hormonrezeptorstatus und Verteilung zytokeratinpositiver Zellen

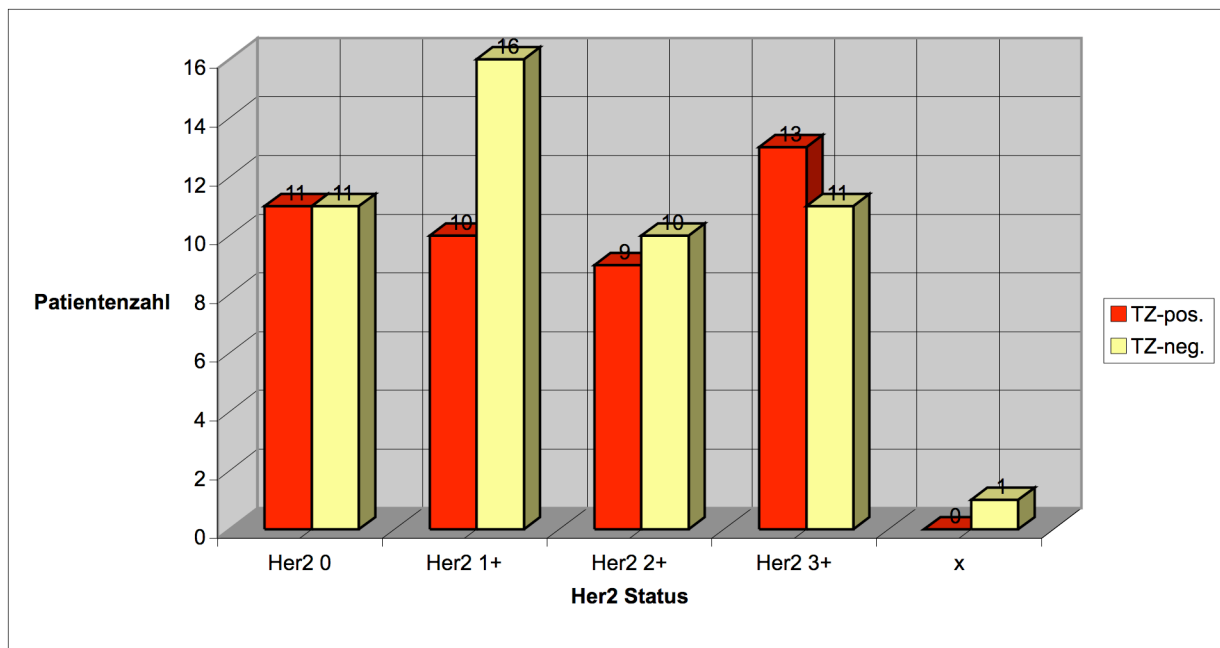


Abb. 48: Her2 Status und Verteilung zytokeratinpositiver Zellen

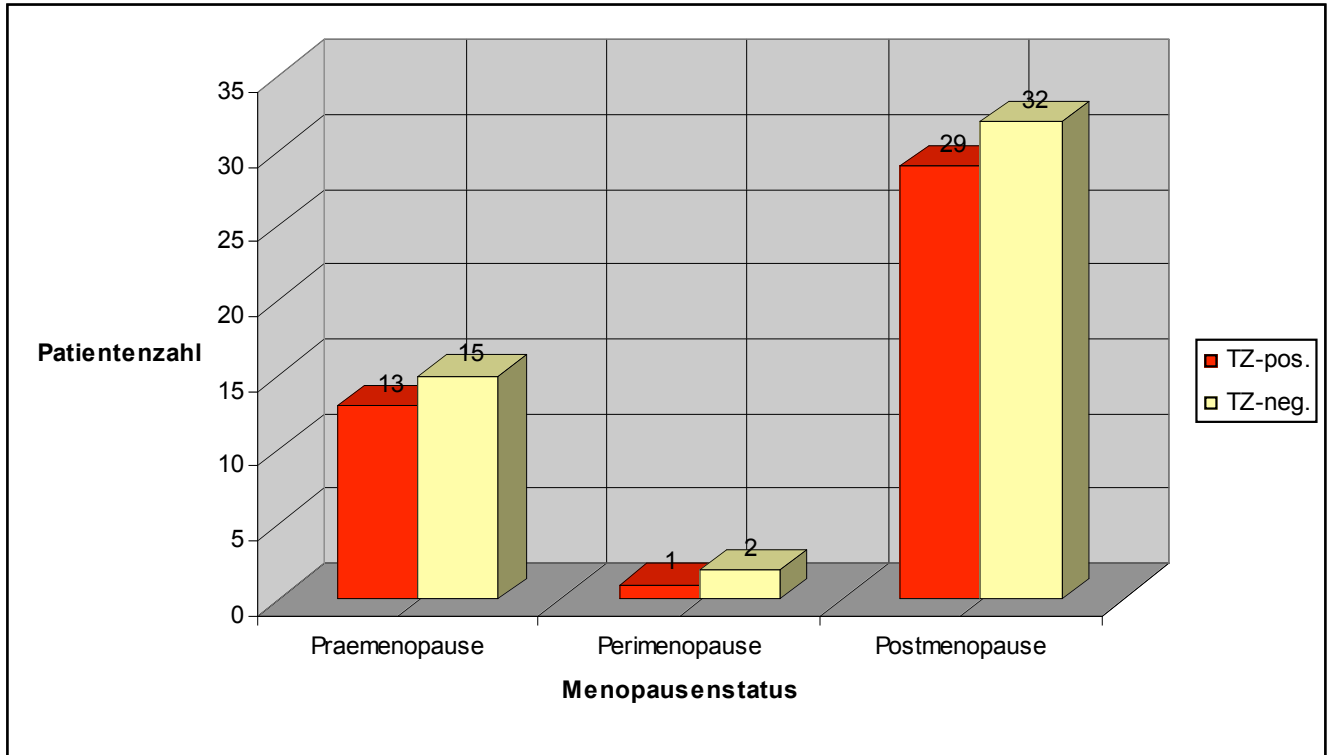


Abb. 49: Menopausenstatus und Verteilung zytokeratinpositiver Zellen

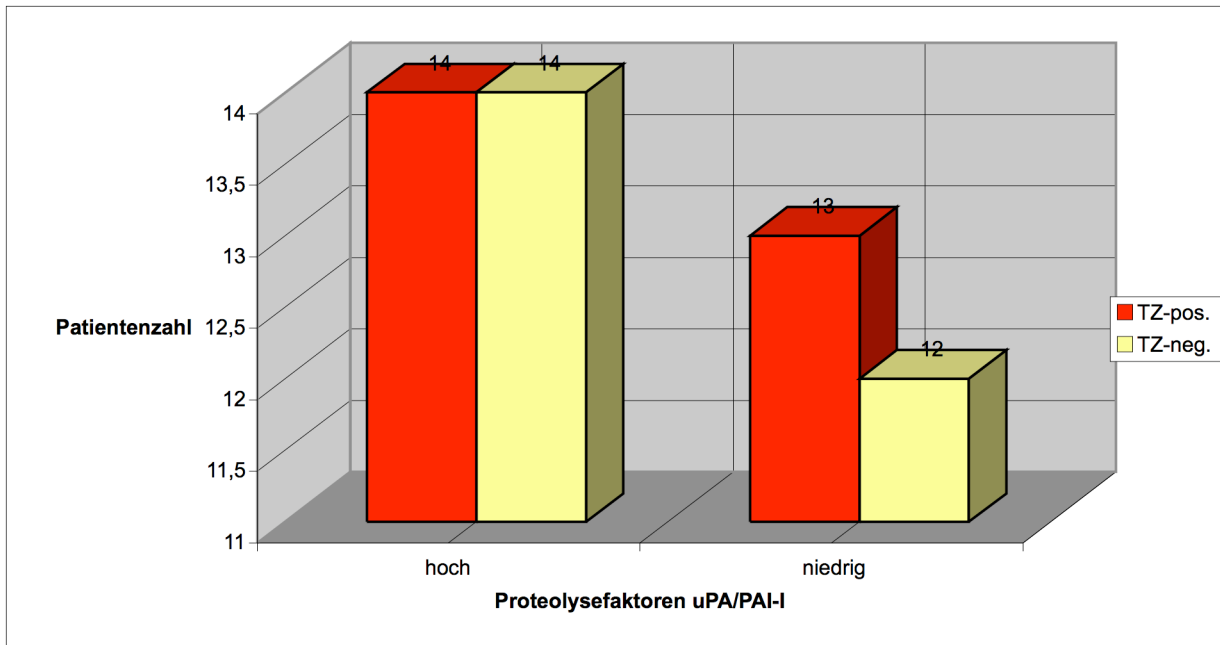


Abb. 50: Proteolysefaktoren uPA/PAI-I und zytokeratinpositive Zellen

3.3.3 Korrelation des Knochenmarkstatus mit Überleben

Tabelle 9 und Abb. 51 zeigen die Beziehung zwischen Tumorzellnachweis und Rezidiv (lokoregionäres Rezidiv, Fernmetastasierung) sowie dem Überleben. Innerhalb eines Zeitraums von 2 Jahren hatten 9 Patientinnen ein Rezidiv entwickelt, 3 Patientinnen waren verstorben. 3 der 9 Frauen (33%) waren zytokeratinpositiv, eine der 3 verstorbenen Frauen war zytokeratinpositiv.

Eine Korrelation zwischen positivem Knochenmarksstatus und Rezidiv/Tod oder Metastasenlokalisierung ließ sich nicht erkennen.

Bei kleiner Fallzahl und kurzer Nachbeobachtungszeit war univariat keine statistisch signifikante Aussage über den klinischen Verlauf möglich (Chi-Quadrat 0,927), siehe Abb. 52. Auf eine multivariate Analyse wurde daher verzichtet.

| Variable | Tumorzell- positiv (n =43) | Tumorzell-negativ (n =49) |
|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Rezidiv/Metastase | | |
| Ja | 3 | 6 |
| Nein | 39 | 41 |
| Tod | | |
| Ja | 1 | 2 |
| Nein | 39 | 41 |

Tab. 9: Rezidiv/Metastase und zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark

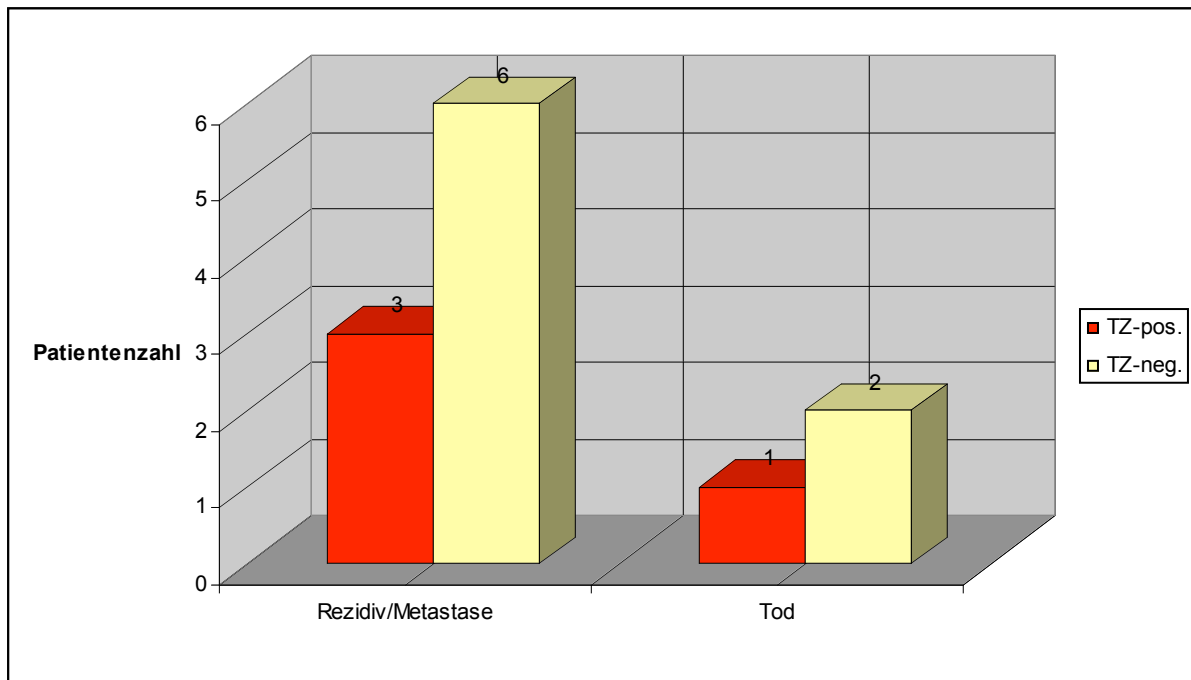


Abb. 51: Rezidiv/Tod und zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark

Überlebens
wahrschein-
lichkeit

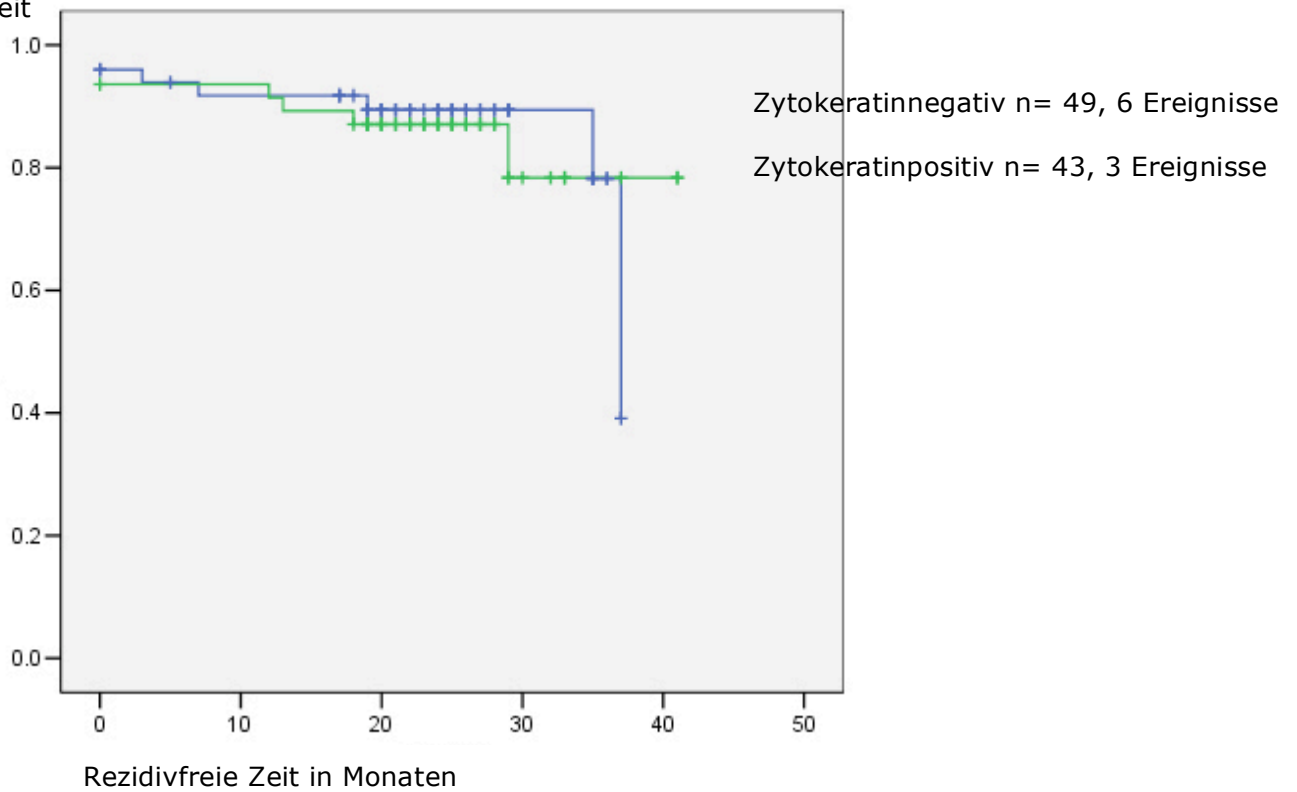


Abb. 52: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark

3.3.4 Korrelation der uPA-R Quantifizierung mit dem TNM-Stadium und weiteren Prognosefaktoren

| Patient | TN-Stadium, Grading Rezeptoren Her2-score | *R | Intensität uPA-R Tumorzelle | Patient | TN-Stadium, Grading Rezeptoren Her2-score | *R | Intensität uPA-Tumorzelle |
|---------|---|----|--|---------|---|----|-------------------------------|
| 1 | PT4,N1bi, G3, Rp+,3+ | | 12,2 | 16 | PT4,N1,G3,Rp+,1+ | *R | 4,05 10,0 3,58 |
| 2 | PT2,N1bi, G3,Rp+,1+ | | 11,8 14,1 5,5 | 17 | PT1c,Nx,G3,Rp+,3+ | | 6,15 4,59 2,20 5,99 |
| 3 | YT0,N1a,G3, Rp-,3+ | | 3,5 16,74 6,72 | 18 | PT2,,N1biv,Rp+,3+ | | 9,58 |
| 4 | PT4,N1,G3,Rp+,3+ | | 12,1 | 19 | RpT1c,Nx,G2,Rp+,1+ | | 13,94 18,5 |
| 5 | PT2,N0,G3,Rp-,3+ | | 5,0 | 20 | YpT1a(m),N1biii, G3, Rp+,3+ | *R | 6,53 |
| 6 | PT2,N1biii,G3,Rp+,1+ | | 13,0 | 21 | PT2,N0,G3,Rp-,3+ | | 10,09 6,87 15,88 |
| 7 | PT1c(m),N1,G3, Rp+,0 | | 7,49 8,3 | 22 | PT1c(m), N0,G3,Rp+,1+ | | 9,82 16,84 16,24 |
| 8 | PTx,Nx,G3,Rp+,2+ | | 4,6 3,03 5,46 | 23 | YpT2(m), N1bi,G3, Rp-,0 | *R | 5,54 10,88 |
| 9 | PT2,N1bi,G3,Rp-,3+ | | 6,0 5,1 | 24 | PT1c(m), N0,G3,Rp+,3+ | | 16,70 |
| 10 | PT1c,N0,G3,Rp+,2+ | | 4,3 9,5 | 25 | Fehlt | | 5,13 9,12 |
| 11 | PT1c,N0,G2,Rp+,1+ | | 11,40 | 26 | PT2,N1biv,G3,Rp-,0 | | 4,97 |
| 12 | PT2,Nx,Gx,Rp+,1+ | | 10,39 | 27 | PT1c(m), Nx,G2,Rp+,0 | | 8,77 |
| 13 | PT1c,N0,G2,Rp+,3+ | | 7,3 5,10 11,77 | 28 | Fehlt | | 8,02 14,0 4,17 22,08 |
| 14 | PT1c,N1biv,G3, Rp+,2+ | | 5,10 9,92 7,29 11,13 11,66 | 15 | PT1c,N0,G2,Rp+,2+ | | 9,73 |

Tab. 10: Aufstellung 28 tumorzellpositiver Mammakarzinompatientinnen (ck, uPA-R), Quantifizierung des uPA-R mit Latexbeads (relative intensity 2,8%), *R=Rezidiv

93,8% der zytokeratinpositiven Zellen waren für uPA-R positiv. In Tab. 10 sind von 28 auswertbaren Mammakarzinompatientinnen die TN-Stadien, die jeweiligen Intensitäten der nach uPA-R quantifizierbaren DTC sowie das rezivdivfreie Überleben aufgelistet.

Werden die uPA-R Intensitäten der Einzelzellen bzw. die mittleren Intensitäten in Beziehung zu den üblichen oder neueren Prognosefaktoren (TN-Stadien, Grading, Rezeptorstatus, Multizentrität, uPA/PAI, Her2) gestellt, lässt sich folgendes nachweisen:

Zu keinem der genannten Faktoren lässt sich hinsichtlich des Ausmaßes der uPA-R Expression auf DTC eine statistisch signifikante Korrelation finden.

Weder Tumorgöße noch schlechtes Grading oder Rezeptornegativität gehen mit signifikant erhöhten uPA-R Leveln auf DTC einher. Die meisten ausgewerteten Patientinnen hatten kleine hormonrezeptorpositive G3 Tumoren. G1 Tumoren waren nicht vertreten.

Insbesondere die Subgruppe nodalnegativer Patientinnen zeigte hinsichtlich der uPA-R Einzelzellintensitäten eine ähnliche Verteilung wie nodalpositive Patientinnen.

Eine Überexpression von Her2 impliziert keine erhöhte uPA-R Expression auf DTC.

Die Beziehung zwischen erhöhten Proteolysefaktoren im Primärtumor und der mittleren Expression von uPA-R zeigte ebenfalls keine statistische Signifikanz. Patientinnen mit niedrigem uPA/PAI-I Level im Mammakarzinom haben DTC mit hoher uPA-R Expression. Umgekehrt können hohe Proteolysefaktoren im Primärtumor mit niedrigen uPA-R Werten einhergehen.

Beim multizentrischen Mammakarzinoms scheinen sich höhere uPA-R Level auf den DTC zu finden. Dieser Trend ist allerdings nicht statistisch signifikant. Abb. 53-59 stellen die Verteilung der uPA-R Intensitäten in Bezug auf die genannten Prognosefaktoren graphisch dar.

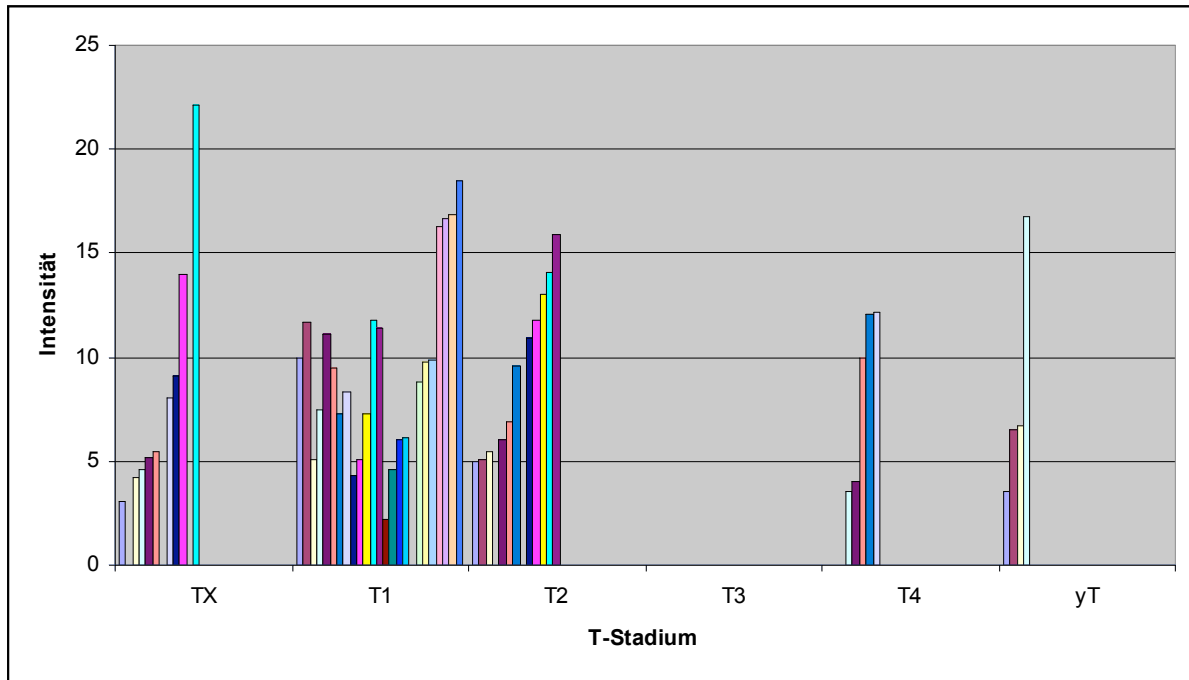


Abb. 53: uPA-R Intensität und T-Stadien, Tx=T unbekannt, n =58

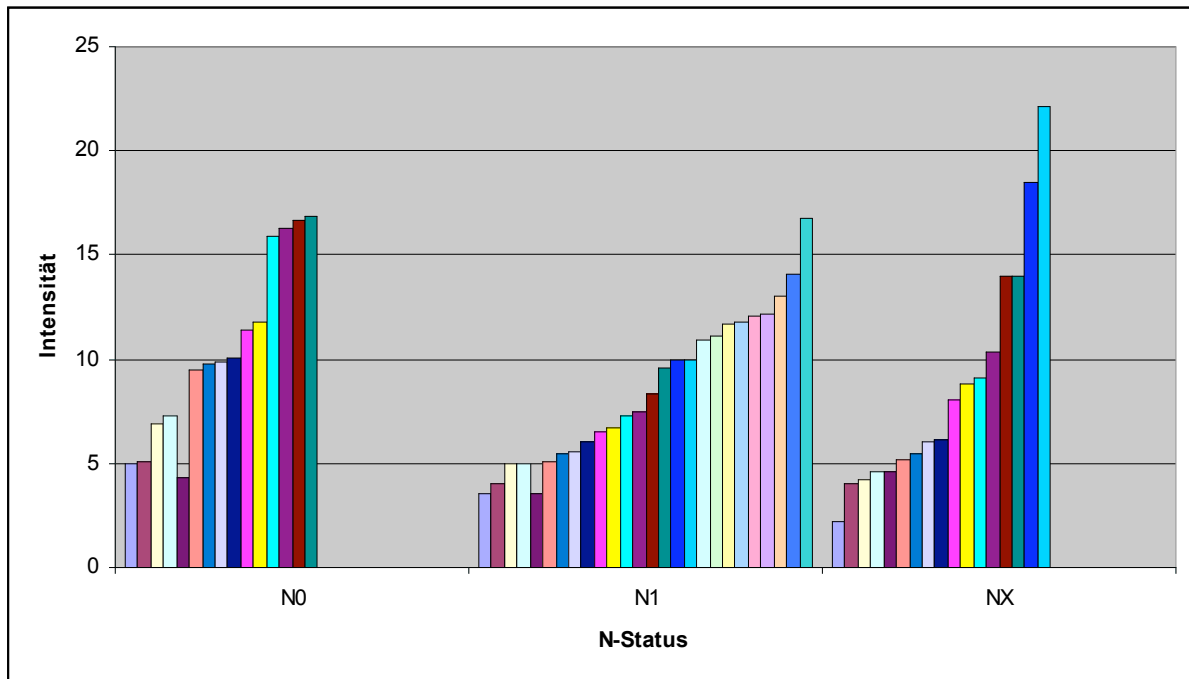


Abb. 54: N-Status und Intensität uPA-R, NX= N unbekannt, n=58

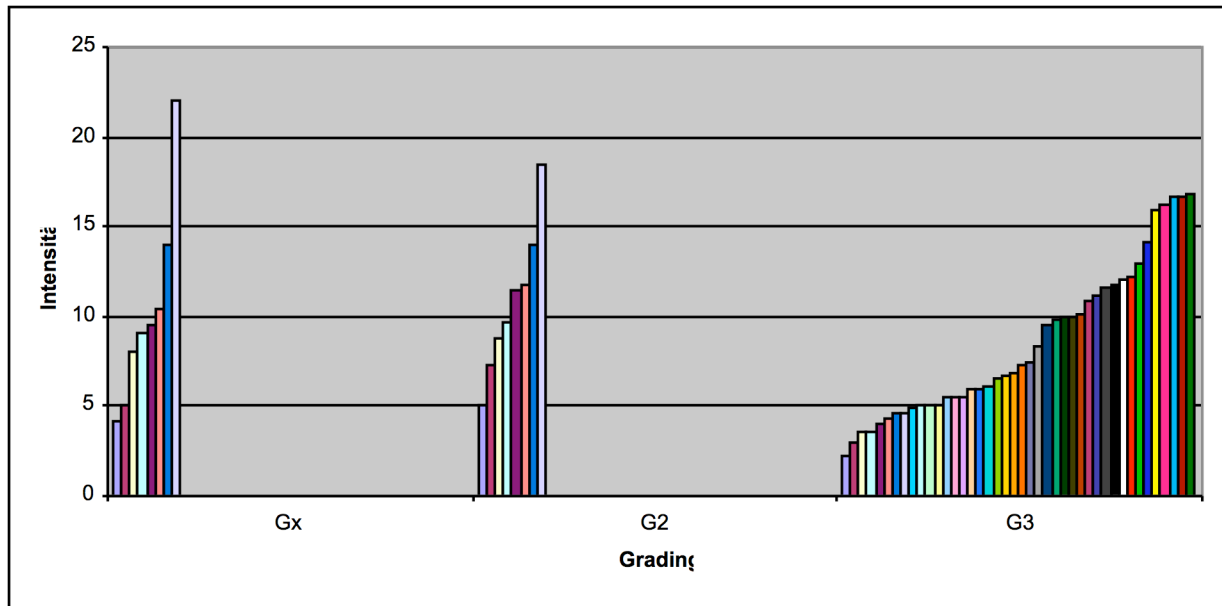


Abb. 55: Grading und uPA-R Intensität, Gx =G unbekannt, n=58

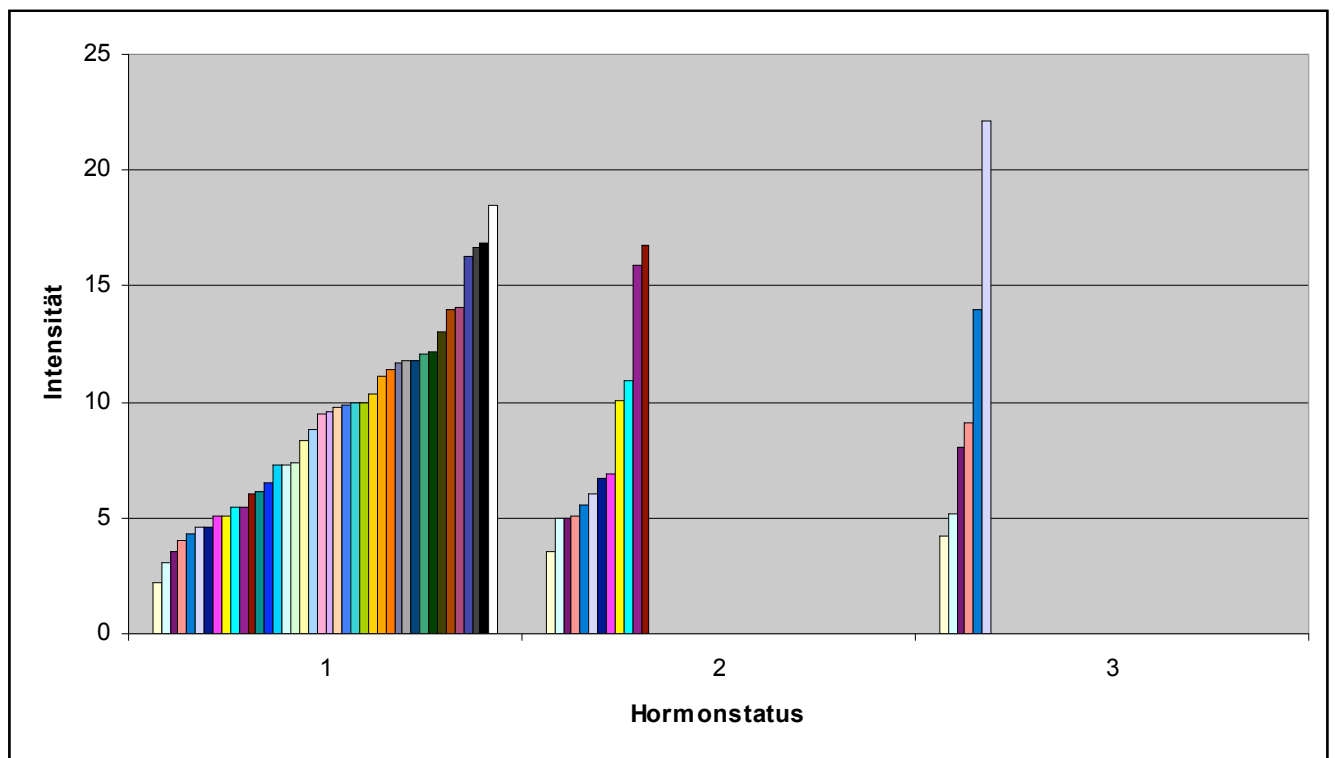


Abb. 56: Hormonstatus =HR und uPA-R Intensität, HR pos=1, HR neg=2, HRX=unbekannt=3, n=58

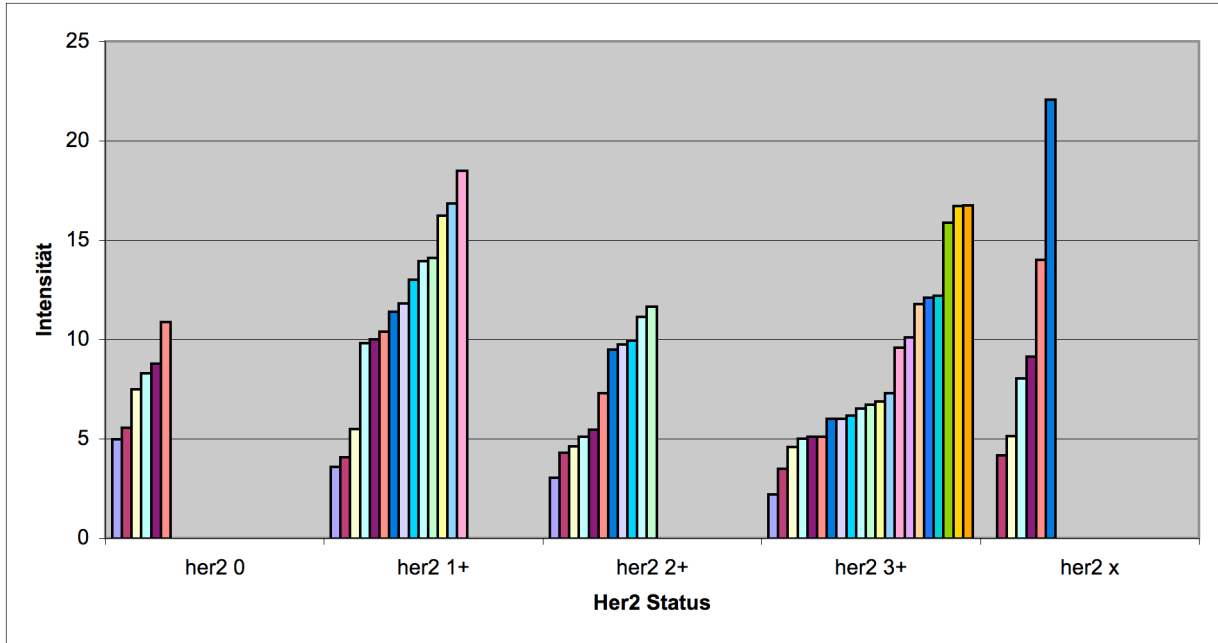


Abb. 57: Her2-Status und Intensität uPA-R, her2x= unbekannt, n=58

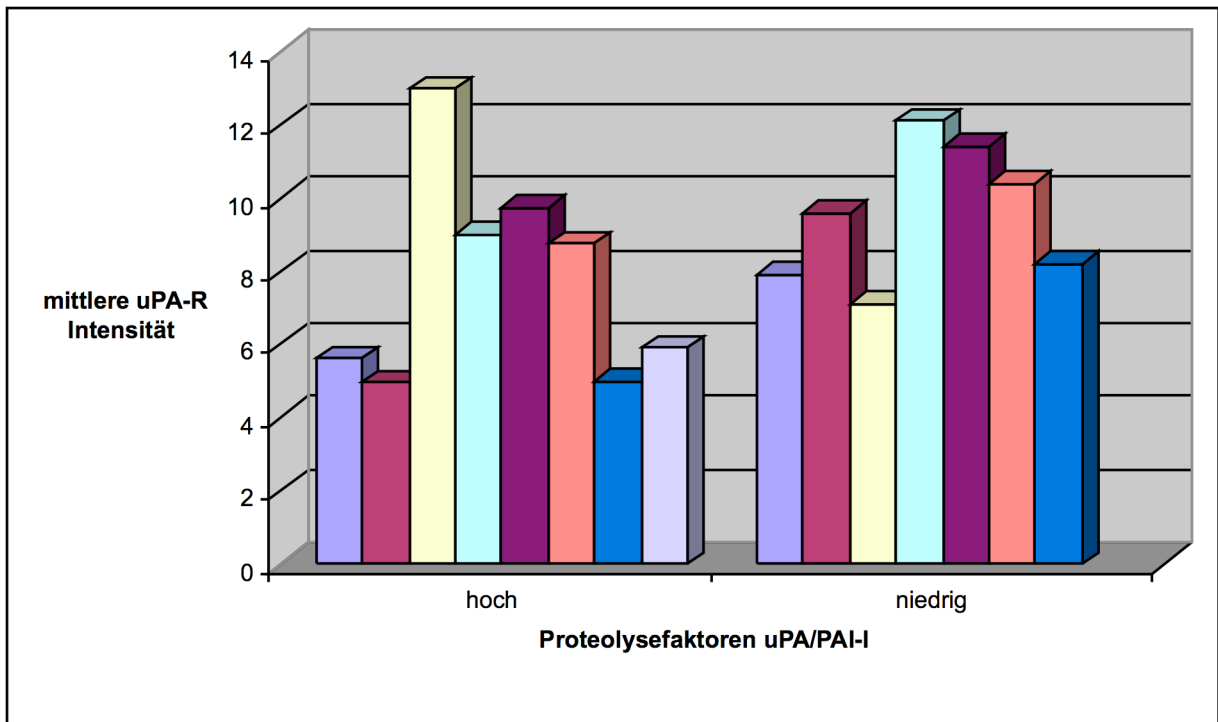


Abb. 58: Proteolysefaktoren uPA-R/PAI-I des Primärtumors und mittlere uPA-R Intensitäten, n=15

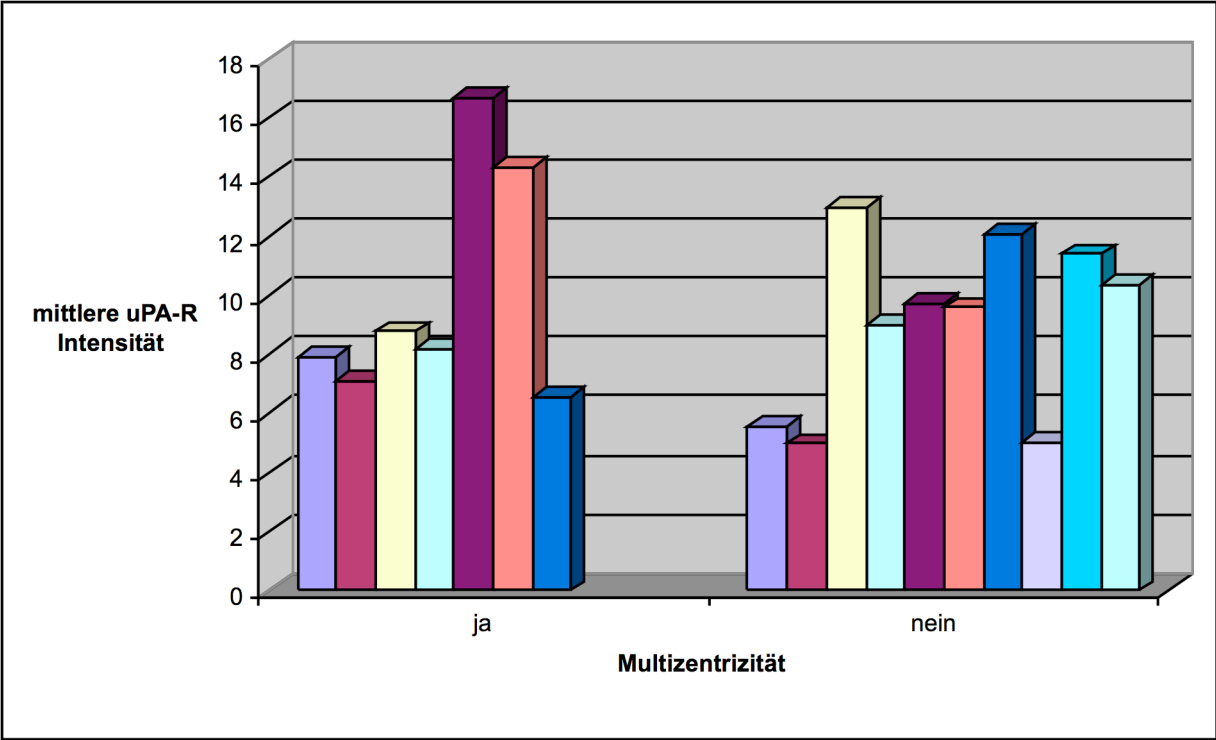


Abb. 59: Multizentrische Mammakarzinome und mittlere uPA-R Intensitäten, n=17

3.3.5 Korrelation der uPA-R Quantifizierung mit dem klinischen Verlauf

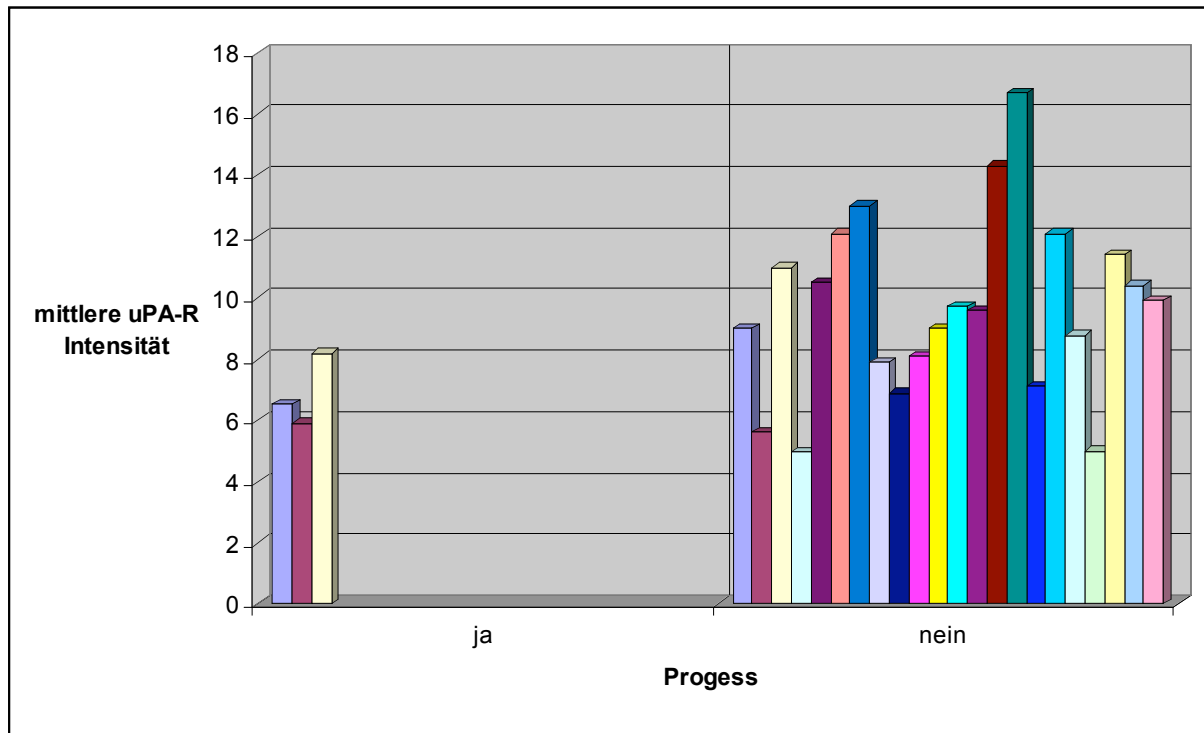


Abb. 60: Korrelation der mittleren uPA-R Intensität mit dem klinischen Verlauf, n=25

Von 25 Patientinnen mit uPA-R quantifizierten DTC waren 3 Frauen (12%) im Verlauf von 2 Jahren klinisch progredient.

Abb. 60 zeigt die Verteilung der mittleren uPA-R Intensitäten in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf.

Dabei ergibt sich univariat keine statistisch signifikante Korrelation zwischen uPA-R Intensitäten und Krankheitsverlauf. Der Einfluss des Ausmaßes der uPA-R Expression für die weitere individuelle Prognose kann derzeit bei begrenztem Patientengut und kurzer Nachbeobachtungszeit nicht verwertet werden.

Die Streudiagramme Abb. 61 und 62 verdeutlichen, dass uPA und PAI-I Expression im Primärtumor entscheidend sind für den weiteren klinischen Verlauf, jedoch unabhängig von der mittleren uPA-R Intensität auf DTC. Patientinnen mit Rezidiv zeigten alle eine hohe Proteolyseaktivität im Primärtumor. Die mittleren uPA-R Intensitäten waren dabei hoch oder

niedrig; d.h. hohe uPA-R Intensitäten waren bei normaler Proteolyseaktivität nicht mit erhöhtem Rezidiv verbunden. Niedrige Intensitäten schlossen bei erhöhtem uPA/PAI-I ein Rezidiv nicht aus.

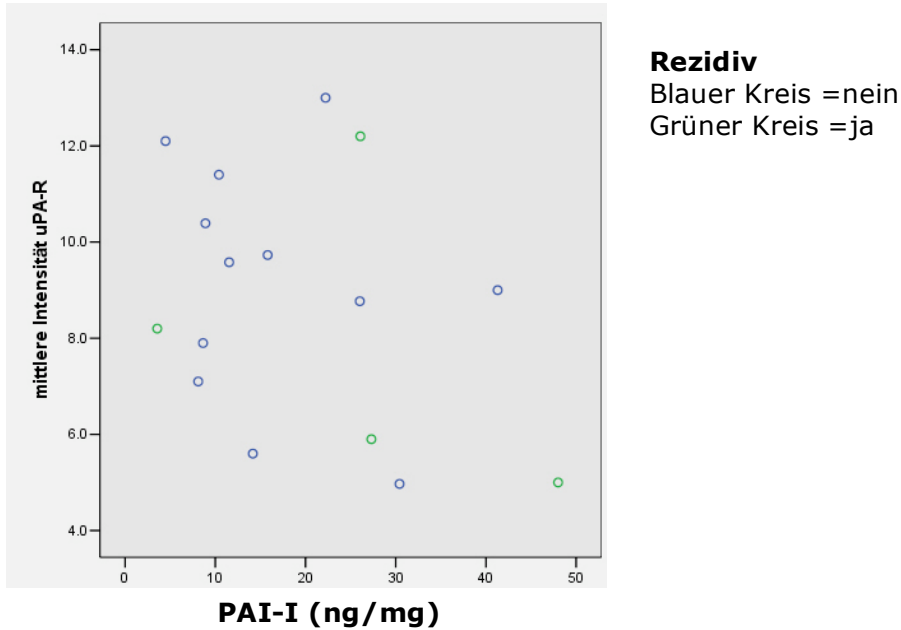


Abb. 61: Streudiagramm zum klinischen Verlauf in Abhängigkeit der mittleren uPA-R Intensität auf DTC und PAI-I im Primärtumor

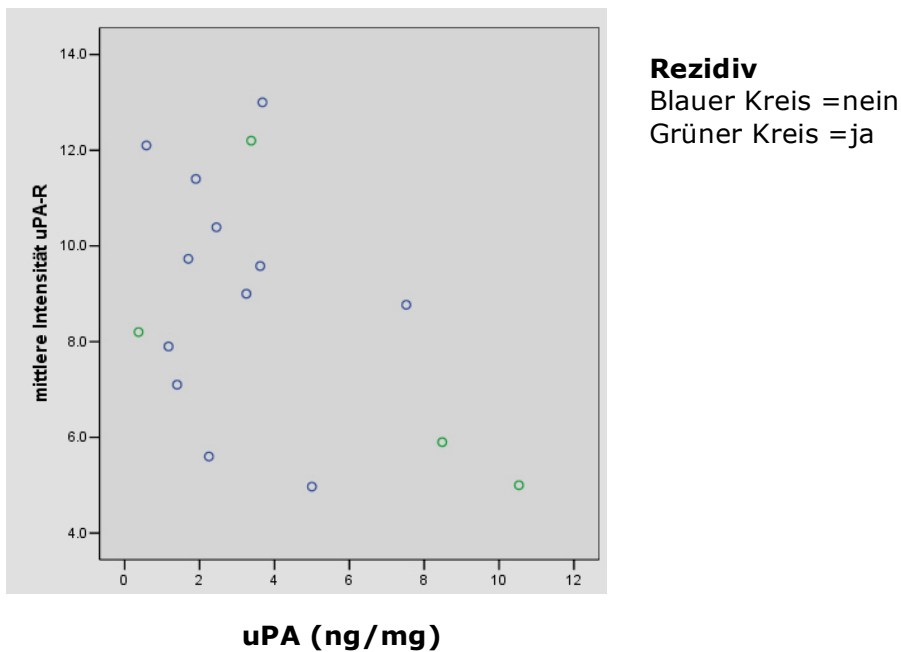


Abb. 62: Streudiagramm zum klinischen Verlauf in Abhängigkeit der mittleren uPA-R Intensität auf DTC und uPA im Primärtumor

3.4 Morbidität an der Entnahmestelle

Bei der unilokulären und unter sterilen Kautelen durchgeführten Knochenmarkspunktion an der linken Spina iliaca posterior traten bei 111 Patientinnen intraoperativ keine Komplikationen (Nachblutung, Fehlpunktion, Probleme beim Entfernen der Hohlnadel, etc.) auf.

Nach Aktendurchsicht wurden perioperativ keine gravierenden Beschwerden wie Schmerzen an der Einstichstelle, Nachblutung, Hämatom, Infektion oder neurologische Einschränkungen dokumentiert.

Im August 2002 wurden alle Patientinnen zur Morbidität an der Punktionsstelle telefonisch nachbeobachtet: keine Frau gab dabei persistierende Probleme an der Einstichstelle an (Abb. 63).

2 Patientinnen hatten Schmerzen innerhalb der ersten 24 h nach Punktion, welche sich aber auf Gabe von Schmerzmedikamenten besserten.

1 Patientin würde eine Knochenmarkspunktion schmerzunabhängig nicht mehr durchführen lassen. Gründe hierfür wurden nicht genannt.

70 % der Patientinnen konnten sich primär an den Eingriff nicht mehr erinnern. Keine Patientin hat eine Narbe oder ein neurologisches Defizit erlitten.

Somit ist die Spina iliaca posterior superior eine sichere und nebenwirkungsarme Punktionsstelle. Neben der großen Zellausbeute und der einfachen Durchführung kann die Punktion auch vom ungeübten Operateur schnell erlernt werden.

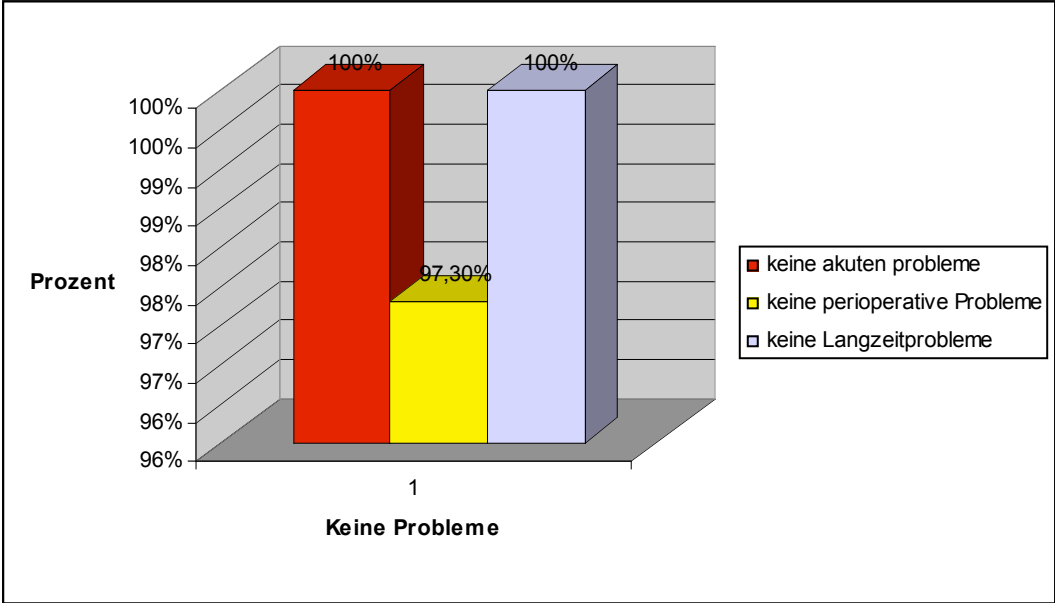


Abb. 63: Morbidität nach KM-Punktion Spina iliaca posterior

4. Diskussion

4.1 Diskussion des experimentellen Teils

4.1.1 Diskussion der Doppelimmunfluoreszenzfärbung zur Detektion, Phänotypisierung und Quantifizierung zytokeratinpositiver Zellen versus Doppelimmunhistochemiefärbung

Seit Erstbeschreibung der Londoner Arbeitsgruppe um Coombes vor 20 Jahren werden methodische Zuverlässigkeit und Standardisierbarkeit sowie klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen kontrovers diskutiert. Zu Beginn standen vor allem diagnostische und klinische Aspekte im Vordergrund. Im Lauf der Zeit jedoch rückte die Tumorbiologie der disseminierter Einzelzelle in den Vordergrund.

Mit der herkömmlichen und gebräuchlichsten Detektionsmethode, der Immunzytochemie, ist dies begrenzt möglich.

Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation eine Doppelimmunfluoreszenztechnik entwickelt und verfeinert, die folgendes erlaubt: 1. Detektion, 2. Phänotypisierung, 3. Antigenquantifizierung und 4. 3-D Visualisierung zur räumlichen Darstellung gesuchter Zielstrukturen. Ein zusätzlicher Gewinn ist 5. die Möglichkeit der Laserzelldissektion. Die detektierten Zellen können so auf dem Genlevel mittels PCR untersucht werden, Noack, 2000, S. 100.

Die Nachweismethode ist allerdings für den routinemäßigen Einsatz sehr aufwendig. 1-2 Arbeitstage sind nötig, um die Knochenmarksaspirate aufzuarbeiten und auszuwerten. Werden weiterführende Techniken eingesetzt, so müssen weitere Arbeitstage eingerechnet werden.

Ebenso können fluoreszenzgefärbte Präparate schlecht gelagert werden, so dass eine spätere Überprüfung der Ergebnisse nur über gespeichertes Bildmaterial möglich ist.

Um zytokeratinpositive Zellen von hämatopoetischer Zellen abzugrenzen müssen unabhängig von der Färbemethode zytomorphologische Kriterien herangezogen werden (Borgen 1999, ISHAGE S. 378). Im Gegensatz zur

IHC ist dies nur eingeschränkt im Transmissionsbild des CLSM möglich. Zur sicheren Interpretation der unter dem Mikroskop gefundenen Zellen bedarf es daher einer gewissen Lernkurve. Um diesen Mangel auszugleichen, wurden sämtliche Zellen von einem Zweitbegutachter bewertet und in 2 Gruppen klassifiziert: tumorzellpositiv und tumorzellnegativ. Eine intermediäre Gruppe wie bei Borgen wurde nicht gebildet. Unter 3.2.2 konnte durch eine konventionelle Kerngegenfärbung exemplarisch gezeigt werden, dass die gefundenen Zellen tatsächlich histomorphologische Kriterien von Tumorzellen aufweisen.

Überlegen ist die Fluoreszenzmethode der Immunhistochemie bei der zeitgleichen Markierung verschiedener Antigene auf einer Zelle. Die Zielstrukturen können durch unterschiedliche Fluoreszenzkanäle in getrennten Bildern dargestellt werden. Damit gelingt eine bessere Antigidiskriminierung und Phänotypisierung. Mittels geeigneter Bildverarbeitung können in einem zweiten Schritt die Fluoreszenzbilder übereinandergelegt werden und alle gefärbten Strukturen in ihrer räumlichen Beziehung zueinander studiert werden. Somit erlaubt die IF im Vergleich zu anderen Methoden über geeignete Bildverarbeitungsprogramme, Mehrfachfärbungen zu verifizieren und im Vorfeld falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Mehrfachfärbungen können sicherer, schneller und kostengünstiger etabliert werden.

Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit zur Quantifizierung gesuchter Antigene. Die IHC hingegen zeigt nur, ob ein Protein vorhanden ist.

Keine der im methodischen Teil der Arbeit vorgestellten Modifikationen konnte die Aufarbeitungszeit der Aspirate wesentlich verkürzen oder die routinemäßige Auswertung der Einzelzellen hinsichtlich der Zellmorphologie verbessern.

Dennoch sind erhebliche qualitative Verbesserungen erzielt worden, die anhand der von Borgen, 1999, S.378 geforderten Qualitätskriterien (ISHAGE) diskutiert werden sollen:

1. Eine rasche Aufarbeitung des Knochenmarksaspirats mit sofortiger Fixierung führte zu einem optimalen Zellerhaltungszustand. Wie nach den

ISHAGE Kriterien gefordert, wurden 2×10^6 MNC innerhalb 24-48 h ausgewertet. Die Entnahme von 10ml Knochenmarkaspirat erfolgte fächerförmig unilokulär an der Spina iliaca posterior superior anstelle der von der ISHAGE empfohlenen beidseitigen Punktion der Spina iliaca anterior superior.

2. Trotz höherem Färbevolumen entschieden wir uns statt 500.000 Zellen 200.000 Zellen pro CS zu beurteilen. Dies wirkte sich vorteilhaft auf die Zellbeurteilung aus, da Überlagerungen vermieden wurden.

3. Als Primärantikörper kam der von den meisten Arbeitsgruppen verwandte A45B/B3 aus der hochspezifischen Familie der Antikörper gegen Keratine des Zytoskeletts (CAM 5.2, AE 1-3, CK2 etc) zum Einsatz. Wie Tab. 11 zeigt, wird im Gegensatz zu Oberflächenantikörpern (2E11, HMFG, E 29) die Gefahr von Kreuzreaktionen reduziert. Falsch positive Fälle liegen für A45B/B3 (IHC) in der Literatur zwischen 0 und 8% (Braun 2000, Manzoni 2002, Gebauer 2001, Naume 2001, Pantel 1994, Schlimok 1990) im Gegensatz zu 26,7-42,7 % bei Oberflächenantikörpern (Pantel, 1994, S.165). In unserer eigenen Färbeserie lag sie bei 1,8% und ist mit der internationalen Literatur vergleichbar.

Um diesen als gering einzuschätzenden Prozentsatz weiter zu senken bzw. eine fehlerhafte Färbung zu erkennen, wird pro Färbegang die Mitführung von Isotypen-, Positiv- und Negativkontrollen empfohlen, Borgen 1998, S. 431. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Isotypenkontrollen verzichtet, da sie in Vorversuchen stets negativ waren. Dies ist an der angewandten Methode zu kritisieren. Ob die Forderung allerdings auf die IF übertragbar ist, bleibt unklar, da es über den Prozentsatz unspezifischer Bindungen keine Angaben gibt. Unspezifische Färberesultate in der IHC werden vor allem durch die Interaktion der Plasmazelle und ihres Ig κ/λ mit der alkalischen Phosphatase erklärt, Borgen 1998, S.431. Dennoch erscheint der Einsatz von Isotypenkontrollen auch in der Fluoreszenzfärbung sinnvoll, im Hinblick auf den Einsatz mehrerer verschiedener Antikörper und der damit resultierenden Gefahr der Kreuzreagibilität. Positiv- und Negativkontrolle wurden stets mitgeführt.

Im methodischen Teil der Arbeit konnte für die IF exemplarisch eine Kreuzreaktion hämatologischer Zellen (Plasmazellen, Megakaryozyten) 1. durch die Verwendung von A45B/B3 2. den Verzicht auf APPAP/Immunoperoxidase und 3. Beurteilung der Morphologie ausgeschlossen werden. Wie bei Litle, 1996, S. 346 beschrieben, fluoreszieren hämatopoetische Zellen geringgradig und sind kleiner als DTC. Falls es zu einer falschpositiven Anfärbung kommt, können sie zudem visuell unterschieden werden.

| Antikörper | Antigen | Anteil pos. Patienten |
|-------------------|------------------------------------|------------------------------|
| • CK2 | Cytokeratin 18 | 2,8% |
| • A45B/B3 | Pan-Cytokeratin | 1,1% |
| • E29 | Epithelial membrane antigen | 26,7% |
| • 2E11 | tumor -assoz. Glycoprotein | 62,9% |
| • HMFG1 | human milk fat globule | 62,9% |

Tab. 11: Immunzytochemische Spezifitätskontrolle der Detektionsantikörper im Knochenmark bei Kontrollpatienten ohne soliden bekannten Primärtumor, nach Braun, 2000, S. 1238

Insgesamt entspricht die etablierte Methode, wie in den Arbeiten von Noack 1999 und 2000 gezeigt, bezüglich Sensitivität (1/200 pro Zytospin), Reproduzierbarkeit, Qualität, Zeitpunkt, Menge des entnommenen Materials, Zellaufarbeitung und Lagerung den international geforderten Standards (ISHAGE-Kriterien).

Darüber hinaus wurde ein weiterer Qualitätsmarker eingeführt: die Beurteilung der Knochenmarksaspirate durch einen Hämatologen hinsichtlich Verwertbarkeit, Verunreinigung durch Erythrozyten oder epitheliale Hautzellen und hämatoonkologischer Erkrankungen.

Dennoch bleibt bei immunzytochemischen Methoden eine gewisse Restunsicherheit bezüglich der Interpretation der Untersuchungsergebnisse bestehen. Weiterführende Automatisierung der Färbung und ihrer Auswertung oder molekularbiologische Analysen

beschleunigen nicht nur Arbeitsprozesse, sondern sind ein weiterer wichtiger Schritt in Richtung Qualitätssicherung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (siehe 5.1.3).

Als weiterer Teil dieser Arbeit ist die Tumorzellcharakterisierung mittels IF zu diskutieren. Es wurden die Expression von uPA-R als Invasions- und Her2 als Wachstumsfaktor untersucht. Mit dem CLSM konnte nachgewiesen werden, dass weder die Primärantikörper (A45B/B3, HU 277, CB11, c-erb-B2 DAKO) noch die zur Visualisierung benutzen Antikörper Alexa 488 bzw. Alexa 568 interferieren; d.h. sowohl für ck als auch für uPA-R bzw. Her2 wurden getrennte Signale bei entsprechenden Wellenlängen (488nm und 568 nm) gefunden. Falsch positive Ergebnisse durch Interferenzen, wie bei der IHC-Doppelfärbung, konnten so vermieden werden.

Die Färbung ck/uPA-R wurde von Noack 1999, S. 617 entwickelt. Das CD 87 Antigen (uPA-R) wurde mit dem spezifischen Antikörper HU 277 vor allem membranständig und auf 94 % der Zellen gefunden. Im Gegensatz zu Bastholm, 1994, S. 61, der eine unterbrochene und polarisierte Anfärbung auf Zellkulturzellen (MDA-MB-231) beobachtete, war sie meist kontinuierlich darstellbar. Paranukleäre Färbung wurde nicht nachgewiesen.

Eine ck/Her2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurde im Rahmen eigener Experimente und in Kooperation mit Frau Roggel (siehe 2.3.1.2) in zwei verschiedenen Färbeprotokollen etabliert. Bei der Auswertung der Knochenmarksaspirate konnten jedoch 1. weniger ck-positive Zellen gefunden werden und 2. auf keiner ck-positiven Zelle Her2 detektiert werden. Positiv- und Negativkontrollen wiesen ein korrektes Ergebnis nach. Auf SKBR-3 war ein Her2 Nachweis ohne Interferenzen für die Exzitationsfrequenzen von ck und Her2 möglich. Zytokeratin färbte sich intrazytoplasmatisch an, während Her2 an der Zellmembran nachweisbar war. Für die Doppelfärbung des Protokoll 1 gelang eine räumliche Darstellung: die Zytokeratine 8,18,19 und Her2 waren deutlich voneinander getrennt darstellbar (siehe Abb.19 und 41).

Gründe für die diskrepanten Färbeergebnissen sollen im Folgenden diskutiert werden:

Nach Protokoll 1 waren viele Waschschrte zur Reduktion von Interferenzen bei Primärantikörpern vom gleichen Tier (Maus) nötig. Zusätzlich erforderte ein biotinbasiertes Detektionssystem die Pufferung von natürlichem Biotin. Dadurch kam es in den 22 durchgeführten Knochenmarksfärbungen mit 1×10^6 MNC pro Patientin zu großen Zellverlusten. Bei grundsätzlich geringer Anzahl vorhandener Tumorzellen im Knochenmark können kleine Fallzahlen und niedrige Zellzahlen bei zusätzlichem Zellverlust zu keinem positiven Färbeergebnis am Patientenmaterial geführt haben. Andererseits könnte es sich auch um Serien tatsächlich negativer Präparate gehandelt haben.

Protokoll 2 führte zwar zu einem geringen Zellverlust, aber auch hier wurden bei 36 ck/uPA-R positiven Proben nur 1×10^6 MNC für Her2 ausgewertet. Bei zunächst erfolglosen Vorversuchen mit dem Antikörper c-erb-B2 (DAKO, Dänemark) wurde ein Epitop-Retrieval durchgeführt. Es sollte: 1. die Immunreaktivität durch eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembranen gesteigert werden. Zuvor maskierte zelluläre und nukleäre Antigene sind in Folge der Vorbehandlung besser zugänglich. 2. der durch die Formalinfixierung verursachte Verlust der Immunreaktivität vieler Antigene durch wesentliche Konformationsänderungen (=Maskierung) durch Erhitzen im Wasserbad mit Pufferlösung rückgängig gemacht werden. Möglicherweise bewirkte die Hitzevorbehandlung Veränderungen an Tumorzellen im Knochenmark, die zu einer Abschwächung ihrer Reaktivität führte. SKBR-3 könnten diesem Einfluss gegenüber resistent sein.

Ob beide Protokolle sensitiv genug sind, eine Her2 Expression zu detektieren oder nur dessen Überexpression anzuzeigen, ist unklar. Die Testreihen wurden an Her2 positiven SKBR-3 (2+/3+ nach DAKO-Score) durchgeführt; d.h. wahrscheinlich können nur überexprimierende Zellen nachgewiesen werden. Ein ausführliches Durchmustern der Einzelzellen schließt ein Übersehen der oftmals diskontinuierlichen Her-2-Färbung aus.

Abschließend soll die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Technik der Antigenquantifizierung kritisch beleuchtet werden.

Aufgrund von Zellzerstörung nach Lagern oder Suchen, Ausbleichen oder Nichtwiderauffinden markierter Zellen können nicht alle Zellen diesem Verfahren unterworfen werden; d.h. eine Quantifizierung des uPA-R Gehalts ist gar nicht oder nur repräsentativ für 1 Zelle möglich.

Die Aufarbeitung der Zellen (Scan, extended focus) ist zeitintensiv (1-2 h). Weitere 1-2 h Stunden beansprucht das Vermessen der Zellen mittels Latex Beads.

Um verschiedene Zellen untereinander in ihrer Antigenexpressivität vergleichen zu können, muss eine gemeinsame relative Intensität gesucht werden, die eine breite Spanne von Fluoreszenzwerten abdeckt. Gelegentlich gibt es so stark oder schwach leuchtende Zellen, dass eine Vermessung bei vorgegebener Intensität nicht möglich ist.

Latex Beads sind teuer und nur begrenzt haltbar; d.h. eine Zellvermessung ist erst nach Sammeln von mindestens 10 Zellen sinnvoll. Das Ansetzen der Beads ist schwierig. Liegen sie zu dicht, verstärken sie sich gegenseitig in ihrer Intensität. Ist die Konsistenz des Einbettmediums zu flüssig, können sie „weschwimmen“ und zur Vermessung ebenfalls nicht genutzt werden.

Fazit: Es gibt verschiedene Möglichkeiten des Tumorzellnachweises. Molekularbiologische (PCR, RT-PCR siehe auch 5.1.1) und immunologische (IHC, IF, FISH, FACS) Methoden stehen zur Verfügung. Bisher gelingt der Nachweis am besten aus Knochenmarksaspiraten, welche technisch einfach und komplikationsarm zu gewinnen sind. Ein einfacher zugängliches Kompartiment als Knochenmark ist Blut. Die biologische Relevanz ist derzeit noch unklar und die technische Isolierung problematisch. In Anbetracht der geringen Tumorzellfrequenz stoßen neue Nachweistechiken (PCR) auf großes Interesse. Die Auswahl geeigneter Markerantigen bereitet hier noch Schwierigkeiten.

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten IF konnte eine Methode etabliert werden, welche mit hoher Sensitivität disseminierte Tumorzellen aus

Knochenmarksaspiraten detektieren kann. Darüber hinaus bietet sie zahlreiche weiterführende technische Möglichkeiten zur simultanen Phänotypisierung, Antigenquantifizierung, Genotypisierung und Visualisierung von Einzelzellen. Durch den großen zeitlichen Aufwand, die höheren technisch-apparativen Kosten und den geringen Vereinfachungsmöglichkeiten ist die Methode für den klinischen Alltag ungeeignet.

4.2 Diskussion des statistischen Teils

4.2.1 Tumorzellnachweis im Knochenmark und Phänotypisierung

Nach Durchsicht der Literatur variiert die Detektionsrate für DTC wie in Tab. 12 gezeigt zwischen 10-60%, je nach Tumorentität.

| | | |
|---------------------------|----------------|---------------------|
| Mammakarzinom | 13-43% | (11 Studien) |
| Kolorektalkarzinom | 32 % | (1 Studie) |
| Magenkarzinom | 35-60 % | (3 Studien) |
| Ösophaguskarzinom | 41% | (1 Studie) |
| Bronchialkarzinom | 40-60% | (3 Studien) |
| Zervixkarzinom | 31% | (1 Studie) |
| Ovarialkarzinom | 18-43% | (6 Studien) |
| Prostatakarzinom | 34% | (1 Studie) |
| Nierenzellkarzinom | 16% | (1 Studie) |
| Blasenkarzinom | 23% | (1 studie) |

Tab. 12: Detektionsraten MRD bei unterschiedlichen Tumoren, modifiziert nach Pantel, 1997, S. 1242

Speziell beim Mammakarzinom lassen sich für die Prävalenz okkulten Tumorzellen kontroverse Angaben zwischen 20%-40% finden (siehe Tab. 13). Ein Erklärungsansatz hierfür mögen Tumorentität, Tumorstadium sowie individuelle Tumor- und Patientencharakteristika sein. Der Hauptgrund für unterschiedliche Detektionsraten liegt jedoch in der uneinheitlichen angewandten Methodik der Gewinnung, Aufarbeitung und Auswertung von Knochenmarksaspiraten. Wichtige Punkte hierbei sind die Wahl des Antikörpers, der Färbetechnik, Qualitätskontrollen, Lokalisation

der Punktionsstelle sowie die Menge an Aspirat und Anzahl der untersuchten Zellen.

Diese beispielhaft aufgeführten Punkte der ISHAGE Kriterien sollten bei der Bewertung von Detektionsraten für DTC und letztendlich ihrer Relevanz für Prädiktion und Prognoseeinschätzung berücksichtigt werden. Der Prozentsatz tumorzellpositiver Knochenmarksaspirate in unserem Patientengut lag mit 46% in der IF über den in Tab. 13 aufgeführten immunhistochemisch gefundenen Detektionsraten.

In der Tabelle wurden ältere und neuere Arbeiten(*) berücksichtigt. Eine hohe Detektionsrate zwischen 31-43% lässt sich bei allen neueren Arbeiten zum Mammakarzinom finden, welche mit hochspezifischen Antikörpern (A45B/B3 oder AE1/AE3)) und in Anlehnung an die ISHAGE Kriterien gearbeitet haben, so dass die gefundene Detektionsrate mit dem internationalen Zahlen vergleichbar ist bzw. im oberen Level liegt. Zwei Arbeiten fallen durch eine sehr hohe bzw. sehr niedrige Detektionsrate auf und sollen daher näher erläutert werden:

Die von Kasimir-Bauer 2003 gezeigte Detektionsrate von 69% muss vorsichtig betrachtet werden. In der Arbeit wurden $15-20 \times 10^6$ MNC über immunomagnetische Anreicherungstechnik (=IET) allein oder kombiniert mit IHC oder mit IHC allein bei einem kleinen Patientenkollektiv $n=58$ analysiert. Werden die einzelnen Gruppen getrennt, so ergibt sich für die IHC eine Detektionsrate von 31%, für die IET von 28% und für die Kombination eine Rate von 42%. Folglich sind die Detektionsraten untereinander vergleichbar und zeigen, dass die Kombination von IET und IHC nicht wesentlich zu deren Steigerung beiträgt bzw. mit IET sogar im unteren Level liegt.

Naume 2001, S. 4122 hingegen findet mit IHC bei einem großen Kollektiv $n=920$, adäquatem Antikörper (AE1/AE3) und Zellvolumen zu 13,4% DTC. In der negativen immunomagnetischen Anreicherung kommt er auf eine Detektionsrate von 63% bei 637 Patienten und einem Zellvolumen von 10×10^6 . Die relativ niedrige Detektionsrate der IHC lässt sich durch das zu 75% aus T1 und T2 Tumoren im Stadium N0 bestehende Patientengut

erklären. Im Gegensatz zu Kasimir-Bauer konnte Naume eine Steigerung der Detektionsrate über IET zeigen.

Im Folgenden soll diskutiert werden, warum die von uns gefundene Detektionsrate im oberen Normbereich liegt verglichen mit der IHC ohne IET. Die IET soll wegen o.g. kontroverser Resultate und fehlender klinischer Signifikanz in der weiteren Diskussion nicht mehr berücksichtigt werden.

Mit einer falsch-positiv Färberate von 1,8% liegt die IF weit unter dem internationalen Grenzwert und ist der Arbeit von Braun 2001 mit 2% vergleichbar. Die IF ist somit weniger anfällig für falsch-positive Färbungen als die IHC und schließt so falsch hohe Detektionsraten aus.

Ein Erklärungsansatz für gute Detektion ist laut Noack 1999, S. 622, die Möglichkeit des so genannten Zellscans, so dass auch ein minimaler Antigengehalt identifiziert werden kann.

Coombes 1983, S. 320 konnte belegen, dass die Detektionsrate mit der Anzahl der Punktionsstellen zunimmt, was für diese Arbeit nicht zutreffen kann, da nur unilokulär punktiert wurde.

Ähnlich der RT-PCR mit Raten zwischen 30-70% und der IET mit knapp 70% (siehe Tab.14) ist bei der etablierten Methode von einer guten Sensitivität auszugehen. Im Gegensatz zur PCR kann aber durch zytomorphologische Einzelzellbegutachtung eine Fehlinterpretation (mRNA-Expressionslevel) nahezu ausgeschlossen werden. Ein Verlust an „rare DTC“ wie bei der alleinigen IET ist nahezu ausgeschlossen. Einschränkend für die in dieser Arbeit gefundene Detektionsrate von 46 % ist die relativ kleine Fallzahl mit 100 Patientinnen.

In der Subgruppenanalyse der nodalnegativen Patientinnen liegt nach Harbeck 1997, S. 389 der mittlere Prozentsatz tumorzellpositiver Patientinnen bei 25% (10-49%). Salvadori 1990, S. 865 und Harbeck 1994, S. 566 berichten über eine erhöhte Detektionsrate in dieser Gruppe. In anderen verfügbaren Studien liegt sie mindestens gleich oder niedriger. Im Vergleich dazu waren in dieser Arbeit ck+ Zellen über N0- und N1-Stadium etwa gleich verteilt. Bei N1 Patientinnen konnten DTC etwas

häufiger nachgewiesen werden. Die absolute Detektionsrate für nodalnegative Patientinnen lag bei 43%, für nodalpositive bei 51%.

Fazit: Die Sensitivität erhöht sich in der IF nicht auf Kosten der Spezifität. Damit ist die IF der IHC bezüglich ihrer Sensitivität vergleichbar bzw. überlegen und wesentlich spezifischer als die RT-PCR.

| Autor | Rate | Patienten | follow-up (Monate) |
|---------------------------------|-------------|------------------|---------------------------|
| • Salvadori | 17% | 121 | 48 |
| • Cote | 37% | 49 | 30 |
| • Harbeck | 38% | 100 | 34 |
| • Merkle | 46% | k.A. | k.A. |
| • Diel* | 43% | 727 | 36 |
| • Landys | 13% | 128 | 240 |
| • Mansi | 25% | 350 | 150 |
| • Molino* | 31% | 125 | 48 |
| • Braun* | 36% | 552 | 38 |
| • Gebauer* | 42% | 393 | 75 |
| • Gerber* | 31% | 484 | 54 |
| • Funke | 27% | 1045 | 52 |
| • Braun* | 31% | 4703 | 62 |
| • Kasimir-Bauer* | 34% | 128 | 24 |
| • Kasimir-Bauer* ^{1ET} | 69% | 58 | k.A. |
| • Fehm* ^{IF} | 38% | 123 | k.A. |
| • Schindlbeck | 26% | 327 | 49 |
| • Tögel* | 43% | 60 | k.A. |
| • Naume | 13,4% | 920 | k.A. |
| • Naume ^{1ET} | 63% | 637 | k.A. |

Tab. 13: Detektionsraten DTC beim Mammakarzinom, IHC, modifiziert nach Sinz 2001, S. 40 und Roggel 2003, S. 91

| Autor | Rate | Patienten | follow-up (Monate) |
|--------------|-------------|------------------|---------------------------|
| • Datta | 26% | 34 | k.A. |
| • Fields | 71% | 83 | k.A. |
| • Vannucchi | 48% | 33 | k.A. |
| • Slade | 61% | 23 | k.A. |

Tab. 14: Detektionsraten DTC beim Mammakarzinom, RT-PCR, Braun 2003, S. 398

Zur Phänotypisierung wurde im Rahmen eigener Färbungen die Expression von uPA-R und Her2 auf den gefundenen DTC untersucht.

In 94% konnte uPA-R gefunden werden, während Her2 auf keiner Zelle nachzuweisen war; d.h. zu 100% negativ war. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den bisherigen Untersuchungen und sollen diskutiert werden.

Die Arbeitsgruppen um Heiss und Allgayer konnten bei Magenkarzinomen mit uPA-R Expression auf DTC einen Marker der Dissemination definieren; d.h. uPA-R beeinflusst, ob DTC im Knochenmark überleben und zu einem späteren Zeitpunkt disseminieren können. Allgayer 1997, S. 203 sah mit einer modifizierten Immunogold-/alkalische Phosphatasedoppelfärbung (CK2 und IgG2a) an 29 von 61 ck+ positiven Zellen eine spezifische uPA-R Färbung. Dies entspricht einer Expressionsrate von 48%. Mit derselben Technik fand Heiss, 1995 bei 44 Patienten und 2002 bei 81 Patienten vergleichbare Raten von 45% und 58%.

Tögel 2001, S. 143 konnte im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen mittels o.g. Technik 66,7% uPA-R exprimierende DTC detektieren. Allerdings war die Anzahl der ausgewerteten Knochenmarksaspirate mit n=15 sehr niedrig.

Bei einem Kollektiv von 280 Patientinnen zeigte Diel, 1994, S. 1167, dass in 35% der Fälle uPA auf Tumorzellen nachweisbar war. Bezogen auf eine Detektionsrate von 47% für DTC bedeutet dies, dass bei 75 % der Patientinnen uPA nachgewiesen werden konnte. Als Antikörper wurde der hochspezifische HD-UK 9 verwendet, welcher die B-Kette von hochmolekularem uPA erkennt und zu einer Anfärbung von Zellmembran und Zytoplasma führt. Im Gegensatz zu der von uns etablierten Doppelfärbung handelte es sich um eine Parallelfärbung. Damit ist unsicher, ob es sich bei den uPA positiven Zellen tatsächlich um Tumorzellen handelte. Übereinstimmend mit dem Nachweis von 94% uPA-R bedeuten 75% uPA, dass Zellen, die bereits das Stadium der Extravasion durchlaufen haben, über erhöhte proteolytische Aktivität verfügen und damit die Voraussetzung, das Tumorstroma aufzulösen und invasiv zu werden, in sich tragen. Welcher Teil des Urokinasesystems gefärbt werden sollte (uPA-R versus uPA) bleibt bei fehlender Vergleichsmöglichkeit offen.

Roggel, 2003, S. 94 konnte mittels der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methode beim Ovarialkarzinom uPA-R zu 100% auf DTC finden.

Technik, Tumorentität und Punktionszeitpunkt können zum einen den Unterschied zu der in dieser Arbeit gefundenen Rate erklären. Mit der neu etablierten IF ist vor allem eine sensitivere Analyse denkbar. Geringe Expressionsgrade können über die Möglichkeit des Zellscans sichtbar gemacht werden.

Im Gegensatz zu eigenen Resultaten konnte Pantel 1993, S. 1419 an 71 Mammakarzinompatientinnen bei 60-70% der DTC Her2 nachweisen. Es wurde eine immunenzymatische Doppelfärbung durchgeführt. Als Her2 Antikörper wurde MAb 9G6 eingesetzt. Mit dem gleichen Antikörper konnte Braun 2001, S. 1890 bei 52 Patientinnen eine ähnliche Rate nachweisen. Die Expression von Her2 erscheint damit höher als auf dem Primärtumor (20-30%).

In einer älteren Arbeit von Braun 1999, S. 1 mit 20 Mammakarzinompatientinnen wird für Her2 eine Expression von 87% in fortgeschrittenen Stadien gefunden. Für die Darstellung wurden die Antikörper 1E2 und 7C1 benutzt.

Beide Autoren führten die erhöhte Expression von Her2 auf einen im Rahmen der Tumorzellausbreitung stattfindenden positiven Selektionsprozeß innerhalb des Primärtumors zurück, welcher zu einer kleinen metastatische Subpopulation mit erhöhtem Malignitätspotential führt. Die gesteigerte Expression in fortgeschrittenen oder metastasierten Stadien lässt vermuten, dass Überleben oder Anwachsen von DTC im Knochenmark über Her2 beeinflusst wird.

Das in dieser Arbeit vorliegende diskrepante Ergebnis mit fehlendem Her2 Nachweis hat vielfältige methodische Ursachen (siehe 4.1). Zudem wurde ein Patientengut mit überwiegenden frühen Tumorstadien (T1 und T2) untersucht.

Becker (2004 Poster DGGG Hamburg) wies bei 92 ck+ Mammakarzinompatientinnen immunzytochemisch bzw. durch RT-PCR Expressionsraten von 11% bzw. 14% für Her2 nach.

Aus derselben Arbeitsgruppe kam Fehm (2005 Poster Senologie Stuttgart) bei 47 zytokeratinpositiven Mammakarzinompatientinnen mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf 51% Her2 positive DTC. Als Antikörper wurde dem Protokoll 1 entsprechend CB11 gewählt.

Kasimir-Bauer konnte 2003, S. 973 mittels IET und IET/IHC eine Koexpression von Her2 auf CK+ Zellen in nur 8% nachweisen.

Die unterschiedlichen Expressionsraten zeigen, dass Her2 sowohl auf den Primärtumoren als auch DTC mittels einheitlicher Antikörper (internal versus external domain) darzustellen ist. Weniger anfällige Techniken (IF versus IHC) und größere Studienpopulationen zur Objektivierung der gefundenen Prozentzahlen sind nötig (Braun 2001, S. 1893).

Fazit: hinsichtlich des Einsatzes tumorbiologischer Therapien und der möglichen Änderung des Phänotyps beim Tumorzellshedding ist die Charakterisierung der DTC von klinisch relevanter Bedeutung. Mit der vorgestellten IF konnte eine hilfreiche Methode zur Bestimmung und Quantifizierung tumorbiologisch relevanter Antigene gefunden werden.

| Autor: | Tumor : | Anteil positiver DTC: |
|----------------------|------------|-----------------------|
| Her-2: | | |
| Braun, 2001 | Mamma | 60% |
| Braun, 1999 | Mamma | 87% |
| Pantel, 1993 | Mamma | 68% |
| Pantel, 1993 | Intestinum | 28% |
| Becker, 2004 | Mamma | 11% |
| Kasimir -Bauer, 2003 | Mamma | 8% |
| uPA-R: | | |
| Togel, 2001 | Mamma | 67% |
| Allgayer, 1997 | Magen | 48% |
| Heiss, 1995 | Magen | 45% |
| Roggel, 2001 | Ovar | 100% |

Tab. 15: Phänotypisierung DTC verschiedener Tumoren für Her-2 und uPA-R, modifiziert nach Roggel, 2003, S. 94

4.2.2 Tumorzellnachweis und andere Prognosefaktoren

Die Angaben über die Korrelation DTC mit etablierten Prognoseparametern sind widersprüchlich. Folgende Arbeiten sollen in Zusammenschau mit den eigenen Ergebnissen diskutiert werden:

Diel 1996, S. 1652-58 und Braun, 2000 S. 525-33 fanden eine signifikante Korrelation zwischen positivem Knochenmarksstatus und Tumorgröße (Diel und Braun), Nodalstatus (Diel und Braun), Grading (Diel) und Menopausenstatus (Diel). Dies gilt auch für die Untergruppe der uPA-positiven DTC, Diel 1994, S. 1175. Solomayer 1997, S. 812 bestätigte die Resultate von Diel bei längerem Follow-up. In der neueren pooled analysis von Braun, 2005, S. 796 wurde neben o.g. Korrelationen noch eine Assoziation zu hormonrezeptornegativen Tumoren gefunden.

Weitere ältere Arbeitsgruppen bestätigen eine Korrelation von DTC mit Lymphknotenbefall, Tumorgröße und Gefäßinvasion (Berger, 1988 S. 1-6, Cote 1988, S. 333-340, Mansi, 1991 S. 1552-55). Fox 1997, S. 1044 konnte in dem Vorliegen von Tumorangiogenese und Gefäßinvasion ein Indiz für die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von DTC finden.

2 Arbeitsgruppen (Harbeck und Salvadori) berichten über eine erhöhte Detektionsrate bei nodalnegativen gegenüber nodalpositiven Patientinnen, was für die Theorie getrennter Metastasierungswege spräche. Eine Korrelation zu bekannten Prognosefaktoren konnte nicht nachgewiesen werden.

Während bei Braun, 2000 und Diel, 1999 im bifaktoriellen Vergleich Patientinnen mit DTC ohne Lymphknotenbefall eine ähnliche Prognose hatten, wie Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen aber ohne DTC, konnte Borgen 2004, S. 3094 zeigen, dass nodalnegative Patientinnen unabhängig vom Knochenmarksstatus eine günstige Prognose haben. Die prognostische Signifikanz von DTC beschränkt sich hier vor allem auf Patientinnen mit positiven Lymphknoten.

Weitere 2 Studien bei nodalnegativen Patientinnen (Braun 2001 S. 1468-75 und Gerber 2001, S. 960-71), welche die Korrelation von Mikrometastasen in Lymphknoten und Knochenmark untersuchten, kamen zu folgendem Ergebnis: 1. bei beiden Autoren gab es keine Koinzidenz von Mikrometastasen in Lymphknoten und Knochenmark. 2. DTC sind nach Gerber unabhängig von ihrer Lokalisation mit einer schlechten Prognose verbunden und einem N1-Stadium gleichzustellen. 3. bei Braun war der

Knochenmarksstatus und nicht der Lymphknotenstatus mit einem reduzierten Rezidiv- und Gesamtüberleben assoziiert. Dies unterstreicht zum einen die Unabhängigkeit des Knochenmarksstatus vom Lymphknotenstatus und zum anderen die unterschiedlichen Metastasierungswege.

Die Korrelation mit neuen tumorbiologischen Prognosefaktoren (Her2, uPA, PAI-1) wurde bisher von wenigen Arbeitsgruppen untersucht:

Naume 2001, S. 4122 fand an 920 Patientinnen eine Korrelation von Her2 positiven Primärtumoren und der Präsenz isolierter Tumorzellen. Zusätzlich war der Nachweis von DTC mit der T-Kategorie, dem Nodal- und Hormonrezeptorstatus sowie der Anzahl betroffener Lymphknoten und einer stattgehabten Gefäßinvasion assoziiert. Menopausenstatus, Grading, histologischer Subtyp korrelierten nicht mit einem positiven Knochenmarksstatus. Interessanterweise konnte Naume bei Steigerung der Detektionsrate durch IET eine verminderte Korrelation zu T- und N-Stadium beobachten. Dies wurde auf die Steigerung der Detektionsrate bei frühen Tumorstadien zurückgeführt.

Eine Korrelation erhöhter uPA- und PAI-1-Level im Primärtumor zum Nachweis von DTC konnte bisher nur Gerber 2001, S. 967-8 für das Mammakarzinom erbringen. Ein positiver Knochenmarkstatus war mit größeren Tumoren, Lymphknotenbefall, Lymph- und Gefäßinvasion, negativem Östrogenrezeptor und hohem Grading assoziiert. Zum Her2 Status konnte keine Korrelation aufgezeigt werden.

Weitere im Folgenden aufgeführte Arbeiten haben keinerlei Assoziation zu den klassischen Prognosefaktoren festgestellt:

In der Analyse von Merkle 1994, S. 666 zeigte sich der Knochenmarksbefund als weitgehend unabhängig von der Tumorgröße und anderen Prognoseparametern.

Eine Verbindung zwischen alten wie neuen Prognosefaktoren und dem Knochenmarksstatus konnte auch Molino bei 109 Patienten 1997, S. 23 nicht finden.

Schindelbeck 2004, S. 65-74 zeigte bei 327 Patientinnen weder eine Korrelation zwischen Knochenmarksbefund und etablierten Prognosefaktoren (Tumorgröße, Lymphknotenstatus) noch zum Her2 Status des Primärtumors.

Fehm 2004, S. 4211 zeigte an 508 Mammakarzinompatientinnen, dass der Nachweis von DTC unabhängig von Tumorgröße und Lymphknotenstatus war. Vielmehr korrelierten tumorbiologische Faktoren (p53, Her2, Ki-67, Hormonrezeptorstatus) mit dem Knochenmarkstatus und wiesen so auf ihre wichtige Rolle als Disseminationsfaktoren hin.

Die zuletzt genannten 4 Arbeiten stimmen mit den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit überein: eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis DTC und etablierten bzw. neueren Prognosefaktoren konnte nicht gefunden werden. Beim Grading, Her2 Status sowie Multizentrität und Multifokalität zeichnete sich ein nicht signifikanter Trend ab: tumorzellpositive Patientinnen hatten eher ein schlechteres Grading, eine Überexpression von Her2 und multizentrische bzw. multifokale Tumoren. In der N0 Gruppe konnte im Gegensatz zu Harbeck keine erhöhte Detektionsrate festgestellt werden. Der quantitative Nachweis von uPA-R auf DTC und dessen Korrelation zu den genannten Prognosefaktoren war ebenfalls negativ. Für eine abschließende Auswertung muss ein längeres Follow-up an einem größeren Kollektiv gefordert werden.

4.3 Klinische Bedeutung der MRD im Kontext anderer Arbeitsgruppen

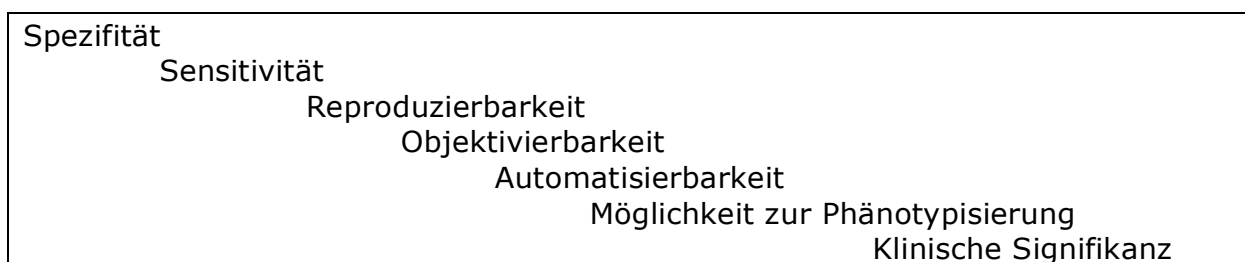


Abb. 64: Kriterien einer optimalen Screeningmethode zur Detektion DTC nach Borgen, 1999, S. 387

Trotz methodischer Unterschiede, Braun 2001, S. 2-4 und differierender Patienteneinschlusskriterien kommen einzelnen Arbeitsgruppen zu vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von DTC, nämlich die signifikante Prognoseverschlechterung bei positivem Knochenmarkstatus (siehe Tab. 16 und 17, Nummer 9-18). Es muss nicht nur bezüglich unterschiedlicher Detektionsraten, sondern auch bezüglich der klinischen Verwertbarkeit des Markers Knochenmarksstatus eine einheitliche und standardisierte Aufarbeitung und Auswertung sowie Validierung in prospektiven Studien gefordert werden. Die prognostische Signifikanz von DTC basiert bisher vor allem auf immunhistochemischen Analysen. Molekulare Assays müssen derzeit noch in klinischen Studien validiert werden und bezüglich Sensitivität und Spezifität mit dem bisherigen Goldstandard IHC verglichen werden.

| Autor: | Antigen: | signifikante prog. Bedeutung: |
|--|---|---|
| Kolorektum : Lindemann, 1992 Leinung, 2000 | Cytokeratin /CK2 Cytokeratin A45B/B3 | DFS, OS (mv) DFS(mV), OS(mv) |
| Magen: Schlimok, 1991 Heiss, 1995 Jauch, 1996 Heiss,2002 De Manzoni, 2002 Broll, 1996 | Cytokeratin , CK2 Cytokeratin , CK2 Cytokeratin , CK2 Cytokeratin /uPA-R, CK18 Cytokeratin , CAM 5.2 Cytokeratin , CK2 | DFS DFS(mv) DFS DFS,OS(mv) none OS |
| Ösophagus: Izbicki , 1997 Thorban, 2000 | Cytokeratin , A45B/B3 Cytokeratin , A45B/B3 | none OS(mv) |
| Bronchialkarzinom: Pantel, 1996 Poncelet , 2001 | Cytokeratin , CK2 Cytokeratin , CAM 5.2 | DFS(mv) none |
| Ovarialkarzinom : Braun, 2001 Marth , 2002 Roggel , 2001 | Cytokeratin , A45B/B3 EpCAM , MOC -31 Cytokeratin , A45B/B3 | DFS(mv),OS(mv) none none |
| Prostatakarzinom: Weckermann, 1999 Weckermann, 2001 Bianco , 2001 Lilleby , 2003 | Cytokeratin , CK2 Cytokeratin , A45B/B3 Cytokeratin , A45B/B3 Cytokeratin , AE1/3 | none DFS(mv) DFS(mv) DFS |

Tab. 16:Prognostische Signifikanz MRD anderer Tumoren, none= keine Signifikanz, DFS= rezidivfreies Überleben, OS= Gesamtüberleben, DDFS= fernmetastasenfreies Überleben, mv= multivariat bestätigte Signifikanz, modifiziert nach Klein, 2003, S. 47

| Autor: | Antigen/AK: | signifikante prog. Bedeutung: |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1.Porro,1988 | Glycolipid , Biopsy | none |
| 2.Salvadori, 1990 | Glycolipid/CaMBr1, Biopsy | none |
| 3.Mathieu, 1990 | Cytokeratin , Biopsy | none |
| 4.Courtemanche,1991 | EMA/LICR -LON -M8, Biopsy | none |
| 5.Singletary,1991 | Mucin /CK, cell smear | none |
| 6.Molino,1999 | Glycolipid , CS | none |
| 7.Untch,1999 | Cytokeratin , CK18, CS | none |
| 8.Funke, 1996 | CK18, CS | not determined |
| 9.Cote, 1991 | Mucin, CK, cell smear | DFS,OS |
| 10.Mansi, 1999 | Mucin, cell smear | DFS,OS |
| 11.Landys,1998 | Cytokeratin , biopsy | DFS(mv),OS(mv) |
| 12.Harbeck, 1994 | Cytokerati/EMA/TAG12, cell smear | DFS(mv),OS(mv) |
| 13.Diel, 1996 | TAG12, cell smear | DFS(mv),OS(mv) |
| 14.Braun,2000 | Cytokeratin , A45B/B3, CS | DDFS(mv),OS(mv) |
| 15.Gebauer,2001 | Cytokeratin,EMA , cell smear | DFS(mv),OS |
| 16.Gerber,2001 | Cytokeratin,A45B/B3, CS | DFS(mv),OS(mv) |
| 17.Wiedswang,2002 | Cytokeratin , AE1 /3, CS | DDFS(mv),OS(mv) |
| 18.Braun, 2002 | Cytokeratin , CS | OS(mv) |

Tab. 17: Prognostische Signifikanz MRD Mammakarzinom, none= keine Signifikanz, DFS= rezidivfreies Überleben, OS= Gesamtüberleben, DDFS= fernmetastasenfreies Überleben, mv= multivariat bestätigte Signifikanz, modifiziert nach Klein, 2003, S. 2956 und Janni, 2004, S. 2956

Trotzdem hat der Nachweis disseminierter Tumorzellen bei Brustkrebspatientinnen zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Ältere und aktuelle Studien (Tab. 17) konnten im Follow-up für tumorzellpositive Patienten ein signifikant verkürztes krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben zeigen. In uni- und multivariaten Analysen wurde bestätigt, dass ein positiver Knochenmarksstatus Prädiktor für eine schlechte Prognose ist. 60-80% der Patientinnen mit positiver Knochenmarkszytologie entwickeln im Verlauf Fernmetastasen. Die Ergebnisse wurden von der pooled-analysis der Collaborative Group Bone Marrow Micrometastasis anhand der Auswertung der Überlebensdaten von 4700 Patientinnen an 9 Zentren über ein Follow-up von 62 Monaten bestätigt. Zudem ist die Tumorzell dissemination der stärkste unabhängige prognostische Marker für das rezidivfreie Überleben neben Tumorgröße und Lymphknotenstatus. Es konnte keine Subgruppe

identifiziert werden, bei der die Mikrometastasen keine Rolle spielten (Braun, 2005, S. 798).

Die Arbeitsgruppe um Diel, 1999 kam mit 727 Patienten und einer medianen Beobachtungszeit von 36 Monaten zu ähnlichen Resultaten. Weitere 4 große aktuelle Studien weisen auf die unabhängige prognostische Relevanz von DTC für das rezidivfreie und das Gesamtüberleben in einer multivariaten Analyse hin (Schindlbeck 2004, S. 74, Wiedswang 2003, S. 3469-78, Gerber, 2001, S. 960-71, Braun 2000, S. 525-33). In der Arbeit von Landys 1998, S. 31 mit der wohl längsten medianen Nachbeobachtungszeit von 20 Jahren sind disseminierte Tumorzellen ebenfalls ein unabhängiger prognostischer Faktor.

Arbeitsgruppen mit deutlich abweichender Methodik berichten über widersprüchliche Ergebnisse. So konnten Salvadori 1990, S. 865 und Molino 1999, S. 123 keinen Effekt von DTC auf Rezidiv oder Überleben beobachten. Weitere „Negativarbeiten“ sind unter Tab. 17, 1-7 aufgelistet. In älteren Arbeiten von Harbeck, 1994 S. 566-71 und Mansi, 1999 S. 197-202 wird eine deutliche Reduktion des rezidivfreie Überlebens und auch des Gesamtüberlebens gesehen. Jedoch haben etablierte Prognosefaktoren nach Mansi bei einem Langzeitfollow-up von 10 Jahren eine stärkere prognostische Bedeutung als DTC; d.h. DTC ist über lange Zeit gesehen kein unabhängiger Prognosefaktor mehr. Harbeck konnte für das rezidivfreie Überleben die Tumorgröße als wichtigsten Prognosefaktor multivariat bestätigen. Wurde die Analyse ohne T-Stadium durchgeführt, war der Knochenmarksstatus stärkster Prognosefaktor. Solomayer, 2001 S. 4107 hingegen konnte in der Nachbeobachtung der von Diel 1994 publizierten Studie dies nicht bestätigen: bei einem Median von 6,5 Jahren zeigte ein positiver Knochenmarkstatus einen konstanten Effekt auf das Überleben unabhängig von der Zeit.

Borgen 2004, S. 3091-97 fand bei mehr als 800 Patienten ebenfalls eine Verschlechterung der Prognose und schlüsselte das klinische Resultat nach Morphologie und Anzahl positiver Tumorzellen weiter auf: 1. Die morphologische Evaluation ist wichtig zur Klassifikation ihrer

prognostischen Relevanz. 2. nur 1 DTC verschlechterte die Prognose (21,3% Fernmetastasierung, 18,5% Tod). Bei mehr als 3 DTC stieg die Häufigkeit für Fernmetastasierung bzw. Tod auf 42,5% bzw. 32,5%. Cote 1991, S. 1749 stellte bei 49 Patientinnen mit mehr als 10 DTC ebenfalls eine signifikant erhöhte Rezidivrate fest, während Braun 2000 keinen Einfluß der Anzahl nachgewiesener DTC auf die Rezidivwahrscheinlichkeit fand.

Insgesamt sind die Daten zur Prognose sind nicht konsistent. Eine ältere Metaanalyse von Funke, 1998, S. 557-66 mit 2494 Patienten aus 20 verschiedenen Studien konnte den Knochenmarkstatus als unabhängigen prognostischen Faktor für Rezidivfreies- oder Gesamtüberleben nicht bestätigen. Kritiker schreiben das negative Ergebnis der Zusammenfassung von Studien mit nicht vergleichbaren und inhomogenen Detektionsmethoden zu. Merkle, 1994, S. 662 sieht die prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen vor allem für die Entwicklung von Frührezidiven und Knochenmetastasen. Gebauer, 2001, S. 3669 konnte multivariat den Knochenmarksstatus als unabhängigen Prognosefaktor bestätigen, jedoch waren Tumorgröße und Lymphknotenstatus deutlich überlegenere Prognosefaktoren.

Nachbeobachtungsdaten für die klinisch interessante Subgruppe der nodalnegativen Patientinnen werden nur von wenigen Arbeitsgruppen vorgelegt. Wiedswang 2003, S. 3474 fand für N0 Patientinnen, die keine adjuvante Therapie bekamen, eine signifikante Reduktion des Überlebens, wenn bei ihnen ein positiver Knochenmarksstatus nachgewiesen war. Die Arbeit von Diel 1996, S. 1657 folgerte, dass bei negativem Knochenmark der Lymphknotenstatus keine zusätzliche Information zur Prognose liefert; In der Subgruppenanalyse zu low-risk Tumoren der Collaborative Group 2005, S. 353 wird dies bestätigt: Das Mortalitätsrisiko und Metastasierungsrisiko war um den Faktor 3,65 bzw. 2,0 erhöht.

Im Gegensatz dazu zeigte Gebauer 2001, S. 3673 bei nodalnegativen Patientinnen keinen Unterschied im Rezidivfreien- oder Gesamtüberleben unabhängig davon, ob sie DTC im Knochenmark hatten oder nicht.

Nur ein Teil der nachgewiesenen Zellen besitzen metastastisches Potential. Nach Klein 2003, S. 45 und Solomayer 2001, S. 4108 entwickeln 30-70% der Patienten keine manifesten Metastasen. Eine weitere Charakterisierung auf dem Gen- oder Proteinlevel ist notwendig, um herauszufinden, welche Einzelzellen Metastasen bilden können. Verschiedene Arbeitsgruppen um Pantel, Braun, Heiss und Harbeck überprüften die Expression tumorbiologisch relevanter Proteine und konnten so erste Einblicke in Biologie disseminierter Tumorzellen bekommen (Tab. 18).

| Publikation : | Phänotyp: | pos.DTC: |
|----------------------|--------------------|-----------------|
| Zia,2001 | MH CI | 73% |
| Pantel,19 91 | MH CI | 35% |
| Schlimok,1990 | Transfer in | 29% |
| Pantel,19 93 | Ki-67 | 8% |
| Pantel,19 93 | p120 | 9,7% |
| Pantel,20 03 | EGF-R | 27% |
| Pantel,20 03 | EPCAM | 64,5% |
| Pantel,20 03 | EMMPRI N | 100% |
| Braun, 1999 | 17-1A | 78% |
| Braun, 1999 | MUC-1 | 79% |
| Braun, 1999 | LewisY | 79% |

Tab. 18: weitere Phänotypsierung DTC beim Mammakarzinom, modifiziert nach Roggel, 2003, S. 94 und Pantel 2003, S. 6329

Die Rationale zur uPA-R Detektion und Quantifizierung geht auf folgende Beobachtung zurück (Yu 1997, S. 767): reduzierte uPA-R Zelllevel gehen reversibel mit einer signifikanten Reduktion der Invasionsfähigkeit einher und versetzen die Zelle in das Stadium der sogenannten dormancy. Zukünftige Arbeiten sollten zeigen, ob uPA-R in Zusammenspiel mit weiteren Zelloberflächenmarkern als Schalter zwischen Proliferation und Dormancy fungiert und ob diese Funktion und damit die prognostische Relevanz mit gefundenen Antigenleveln korrelieren.

Heiss 1995, S. 1035 und 2002, S. 2005, sowie Allgayer 1997, S. 1394 konnten zeigen, dass der Phänotyp einer DTC beim Magenkarzinom die entscheidende Rolle für ihre Proliferation, Invasion und spätere Metastasierungsfähigkeit hat. Gegenätzlich zur pooled analysis von Braun belegte Heiss, dass der alleinige Nachweis von DTC kein Indikator für eine schlechtere klinische Prognose war. Patienten mit Expression von uPA-R auf DTC hatten uni- und multivariat ein schlechteres krankheitsfreies - und Gesamtüberleben als Patienten mit uPA-R negativen DTC. Roggel 2003, S. 89 konnte diese Beobachtung beim Ovar nicht bestätigen. Auf allen DTC wurde in unterschiedlicher Intensität uPA-R nachgewiesen. Weder der Nachweis uPA-R positiver DTC noch das Ausmaß der Expression hatten Einfluss auf Rezidivfreies- bzw. Gesamtüberleben. Diel 1994, S. 1175 beobachtete in 280 Mammakarzinomfällen und einem Follow-up von 14 Monaten 16 Fälle mit Fernmetastasen. Davon hatten 56% zytokeratin- und uPA-positive DTC. Dieses Ergebnis deutet an, dass die prognostische Einschätzung von DTC durch den Nachweis von uPA verbessert werden kann. Dieser Trend bestätigte sich in einem längeren Follow-up (44 Monate) multivariat (Solomayer 1997, S. 5).

Eine signifikant schlechtere Prognose konnte auch bei Patientinnen mit Mammakarzinom und Her2 positiven DTC von Braun, 2001 S. 1890 gefunden werden. Nach einem Follow-up von 64 Monaten hatten die Patientinnen häufiger Metastasen entwickelt. Her2 auf DTC bestätigte sich multivariat als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben. Die unter 4.2.1 zitierten Arbeiten von Fehm, Becker, Kasimir-Bauer liefern aufgrund kurzen Follow-up keine Daten zur Prognose, so dass die Daten von Braun derzeit die einzigen zur Her2 Expression auf DTC und Prognose sind. Trotz der interessanten Resultate sind weitere prospektive Studien zur Objektivierung des Ergebnisses erforderlich.

Eine negative Knochenzytologie schließt jedoch eine spätere Metastasierung nicht aus. Bei 30 % mit negativem Befund kann es zu einer Fernmetastasierung kommen. Umgekehrt liegt die Detektionsrate bei späterer Fernmetastasierung ebenfalls bei ca. 30%. Mögliche

Erklärungsansätze variieren von der Verschiebung der DTC in eine anderes Kompartiment bis hin zur Nichtnachweisbarkeit aufgrund Zurückregulation der Zytokeratine oder Abfall der DTC unter die Nachweisgrenze, Becker 2005, S. 122. Welche Prozesse die Transformation der DTC vom Ruhestadium zur Proliferation und Bildung von Metastasen triggern, bleibt ebenso unklar wie die Präferenz der unterschiedlichen Metastasenlokalisationen (seed and soil). Die Antwort auf die Frage nach der Drehscheibe bzw. dem Schlüsselantigen zur Metastasierung von DTC und damit dem molekularbiologischen Faktor ihrer prognostischer und prädiktiver Relevanz muss auch nach ausführlicher Diskussion offen bleiben und Bedarf weiterer prospektiver Studien.

5. Ausblick

5.1 Neue technische Ansätze für Isolierung und Detektion

5.1.1 PCR

Seit 1987 wird die PCR zur Identifikation zirkulierender Tumorzellen bei verschiedenen Tumorentitäten herangezogen. Der wesentliche Vorteil der PCR-Technik ist die leichte Automatisierung des Prozesses. Die Sensitivität liegt bei einer „Tumorzelle“ auf 10^7 Knochenmarkszellen, also höher als bei der IHC (1 TZ auf 10^6 Zellen) (Ghossein 1996, S.10, Zhong 1999, S.289). Es ist jedoch unklar, ob damit tatsächlich „zirkulierende Tumorzellen“ oder lediglich Nukleinsäuren aus dem Primärtumor nachgewiesen werden, weil ein morphologisches Korrelat und ideale tumorzellspezifische Marker-Gene fehlen. Die Spezifität ist als eher gering einzuschätzen. Das System ist durch mögliche Verunreinigung und Inhibitoren in der Probe anfällig für falsche positive Resultate (Ghossein, 1996, S.12). Die diagnostische Verwertbarkeit wird daher kontrovers diskutiert: 1. prognostische Aussagen aufgrund unzureichender Korrelation zwischen PCR und Klinik sind derzeit unsicher. 2. zur Korrelation von PCR und IHC gibt es nur wenige Daten. Je nach Literatur findet man Detektionsraten von ~42% für PCR versus ~36% für IHC (Diel 1998, S.7, Zhong 1999, S.286)

Fazit: die PCR muss erst standardisiert (Primer, Temperatur, Zyklen), zeitsparend (real-time PCR) und mit weiteren prospektiven Studien und Ringversuchen untermauert werden, um zukünftig auch in der klinischen Onkologie eine Rolle zu spielen (Ghossein 1996, S.10). Derzeit bleibt die IHC die Methode der Wahl zur Erfassung von DTC (Zhong 1999, S. 290).

5.1.2 Anreicherungstechniken

Um die Sensitivität der IHC oder PCR zu erhöhen, bietet sich eine Anreicherung von Tumorzellen basierend auf einer direkten oder

indirekten Separation mittels Immunobeats an. Dabei werden Tumorzellen mit speziellen magnetischen Antikörpern gelabelt und über ein magnetisches Zellsortiersystem angereichert. Die so gewonnene Zellfraktion kann dann mit den üblichen Methoden weiter aufgearbeitet werden.

Sinnvoll scheint dies vor allem bei rare cell detection zu sein, da die Detektionsrate mit 10^{-8} sehr hoch ist. Jedoch findet gleichzeitig auch ein großer Verlust an Tumorzellen statt. Teilweise ist durch die Microbeats die weitere Aufarbeitung und Charakterisierung der Zellen erschwert, so dass in der vorliegenden Arbeit nach eigenen Tests dieses Verfahren nicht eingesetzt wurde. Kasimir-Bauer 2002, S.1030 konnte bei 70 Patienten die Detektionsraten nach Zellanreicherung im Vergleich zur konventionellen IHC nicht steigern. Ein Erklärungsansatz könnte die von Klein und Riethmüller beschriebene Antigenheterogenität von Tumorzellen sein. Expressieren Tumorzellen andere Epitope als durch den Antikörper vorgegeben, so können sie nicht detektiert werden. Anreicherungstechniken spielen daher vor allem in der Hämatonkologie eine wichtige Rolle.

5.1.3 Vereinfachung des „Screenings“ durch automatisierte Mikroskopie

Das manuelle „Screening“ auf DTC ist zeitaufwendig und macht eine Automatisierung zwingend notwendig. Mittels automatisierter Mikroskopie (Abb. 65) kann 1 Tumorzelle in 10^8 Zellen gefunden werden. Dazu wird eine Software benutzt, die schnell und hochsensitiv Farben detektiert und zusätzlich verschiedene morphometrische Kriterien (Größe, Kern, Form) berücksichtigt. In einem ersten Schritt werden die Objektträger bei 10x Vergrößerung abgegriffen und dann auffällige Strukturen in einem zweiten Schritt bei 40-60x Vergrößerung erneut durchmustert. Auf diese Weise sollen Zellklumpen, Zelldetritus oder mononukleäre Blutzellen aussortiert werden. Die gefundenen Zellen werden als Bild abgespeichert und stehen zur endgültigen Beurteilung durch den Untersucher zur

Verfügung. Sie sind auf dem Zytospin durch ein Koordinatensystem lokalisierbar, so dass der Untersucher immer wieder zur Originalzelle zurückkehren kann (Bauer 2000, S. 3552-3559).

Borgen, 2001 215-21 bestätigte den Vorteil automatisierter Mikroskopie bezüglich höherer Sensitivität und Reproduzierbarkeit gegenüber manueller Auswertung. Dabei wurden 120 CS von 2 Pathologen im Vergleich zu automatisierter Mikroskopie ausgewertet. Während das manuelle System eine falschnegativ Rate von 38% hatte, betrug die falschnegativ Rate für die automatisierte Mikroskopie 3,8%. Falsch positive Ereignisse konnten durch die Kombination automatische und manuelle Mikroskopie beinahe ausgeschlossen werden.

Es steht somit eine sensitive, reproduzierbare und zuverlässige Methode zur Detektion von disseminierten Tumorzellen zur Verfügung, die in weiteren prospektiven Studien ihre Signifikanz für die Klinik unter Beweis stellen muss.



Abb. 65: ACIS™, aus Internetseite Firma Chromavision (www.chromavision.de), Stand März 2001

5.2 Klinische Relevanz der MRD

5.2.1 Therapiemonitoring

Die korrekte Einschätzung der individuellen prognostischen Situation bei Therapieplanung ist wichtig. Entscheidend ist, ob 1. die Prognose eine Chemotherapie überflüssig macht oder ob 2. sie durch

Therapieintensivierung verbessert werden kann oder 3. spezielle risikoadaptierte Behandlungsmodalitäten erforderlich sind.

Die Detektion zytokeratinpositiver Zellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose eröffnet die Möglichkeit eine mögliche systemische Disseminierung frühzeitig zu erfassen und individualisiert zu therapieren. Ein Knochenmarkmonitoring nach Primärtherapie scheint nach den Ergebnissen von Janni 2001, S. 46-53 ebenfalls prognostisch relevant zu sein. Patienten mit durchgehend negativem Knochenmarkstatus hatten im Langzeitverlauf ein signifikant längeres Überleben als Patienten mit Konversion oder Persistenz. Weitere prospektive Studien sollen zeigen, ob sich der Nachweis isolierter Tumorzellen aus Knochenmark als Surrogatmarker zum Therapiemonitoring im klinischen Alltag eignet (Braun 2003, S. 397-404).

Braun 2000, S.80-86 konnte zeigen, dass unter Chemotherapie Konversionen des Knochenmarkstatus von positiv nach negativ und umgekehrt möglich sind. Verantwortlich hierfür ist die geringe Zellproliferationsrate (=dormancy) der DTC im Knochenmark (Pantel 1993, S. 1419-1424). Bei Persistenz nach Chemotherapie muss laut Multivarianzanalyse von einem verringerten Gesamtüberleben ausgegangen werden. Diese Hypothese wird von Kasimir-Bauer 2002, S.1027-34 und Cristofanilli 2004, S. 781-91 für die lokal fortgeschrittene und metastasierte Situation bestätigt.

Die Chemotherapie kann einen therapeutischen Effekt auf isolierte Tumorzellen ausüben. Dennoch können sie trotz Therapie persistieren. Anhand o.g. Ergebnisse ist im folgenden Kapitel der Einsatz multimodaler Therapieansätze zu diskutieren.

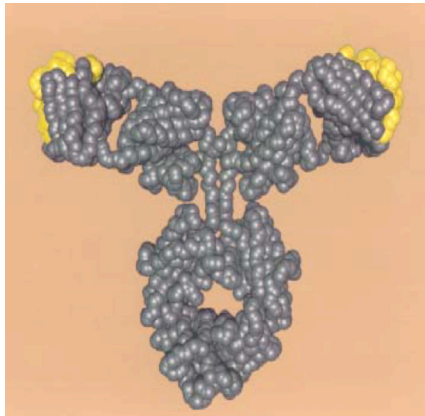
5.2.2 Antikörpertherapie gegen Targetmoleküle auf DTC

Die Idee Krebs mit spezifischen Antikörpern („magic bullets“) zu therapieren, wurde schon vor 100 Jahren durch Paul Ehrlich geboren. DTC sollten als prämetastastische Formationen und bei geringer Tumorlast theoretisch ein gutes Angriffsziel sein mit dem Anspruch auf Heilung oder

Progressionsverzögerung. 2 kleine Pilotstudien (Braun 1999, S.3999-4004 und Schlimok 1995, S.1799-1803) konnten nach Antikörperbehandlung und Knochenmarkspunktionen im Intervall eine Reduktion bzw. ein Verschwinden von DTC zeigen. Limitierender Faktor antikörperbasierter Therapien ist die genetische Zellheterogenität. Die in dieser Arbeit untersuchten „targets“ Her2 und uPA-R auf DTC eröffnen folgende Therapieoptionen:

5.2.2.1 Herceptin®

Abb.66: Trastuzumab (Internetseite Firma Roche, www.roche.com, Stand März 2004)



Die Wirksamkeit von Herceptin® ist nicht ganz geklärt und scheint nach Ergebnissen von Sliwkowski 1999, S. 60-70 multidimensional zu sein:

Der Antikörper blockiert den Her2 Wachstumsfaktorrezeptor und stört so seine Dimerisierung und Signaltransduktion.

Er wirkt zytostatisch, indem er die Anzahl der Zellen, die sich in der S-Phase befinden reduziert. Durch Reduktion von Her2 kommt es zu einer Transformation des vormals aggressiven Phänotyps. Natürliche Killerzellen werden durch die Interaktion von Herceptin® und seiner humanen Fc Domäne mit dem Immunsystem aktiviert und führen zu zellvermittelten Zytotoxizität. Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist ein antiangiogener Effekt durch die reduzierte Produktion an VEGF (vascular endothelial growth factor) (Abb.67).

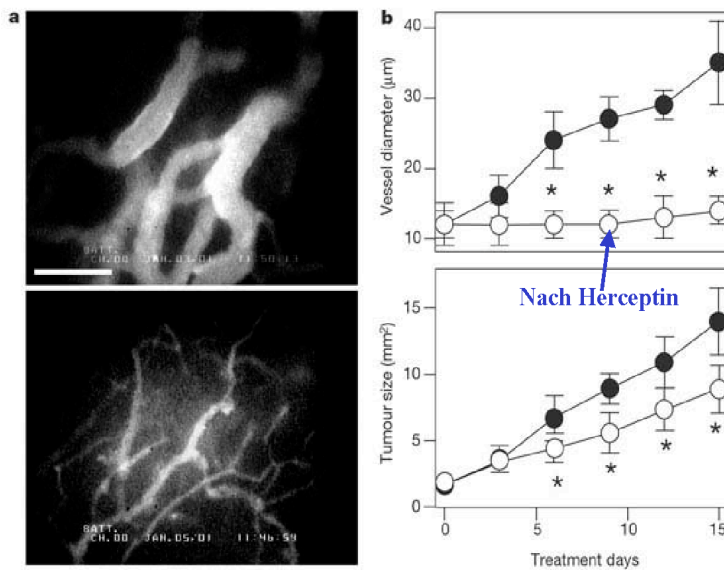


Abb.67: Antiangiogenese unter Herceptin (Bilder wurden freundlicherweise von Dr. Lüftner, Berlin, anlässlich eines Vortrags zur Gynäkoonkologischen Zertifizierung in Kassel 2004 zur Verfügung gestellt)

Durch Suppression von DNA Reparaturvorgängen wird die Sensitivität gegenüber zytotoxischen Chemotherapeutika erhöht, so dass sich Kombinationstherapien in ihrer Wirksamkeit addieren und synergistisch zu einem verminderten Zellwachstum führen (Pietras 1994, S. 1829-38).

Derzeit wird der humanisierte Antikörper Herceptin® gegen Her2 routinemässig in der adjuvanten und metastasierten Situation eingesetzt. Voraussetzung hierfür ist die Überexpression des Her2 Proteins an der Zelloberfläche, was in ca. 25% (Slamon 1987, S. 177) der invasiven Mammakarzinome der Fall ist.

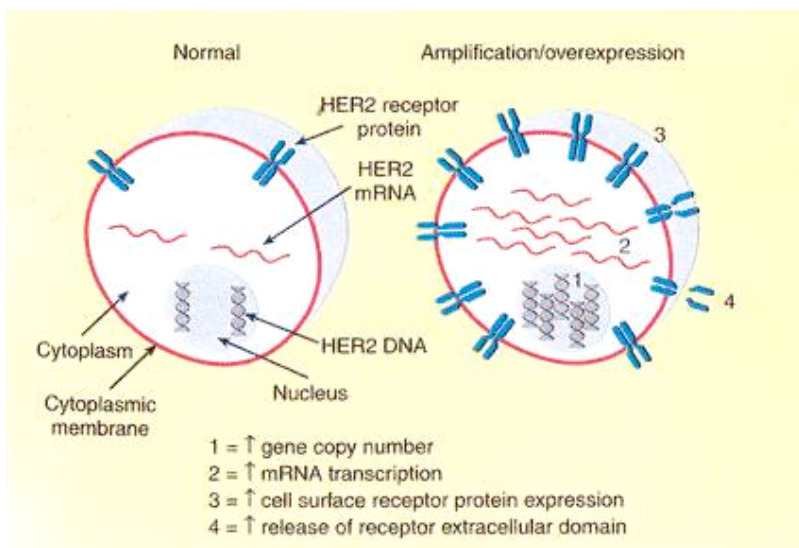


Abb.68 Her-2 Status: DNA Amplifikation und Proteinüberexpression, (Internetseite Firma Roche, www.roche.com, Stand März 2004)

Trotzdem gibt es Patientinnen mit überexprimierenden Tumoren, die keinen Nutzen aus der Therapie ziehen können, oder Patientinnen, die untertherapiert bleiben. Daher müssen für Antikörpertherapien geeignete Patienten identifiziert werden, um eine undifferenzierte, nebenwirkungsträchtige, kosten- und zeitaufwendige Anwendung zu vermeiden.

Vergleicht man den Her2 Status zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen, so ist die Expression von Her2 auf den Geweben zu 80% ziemlich konsistent und kann die Diskrepanz von Her2 Positivität und fehlendem Therapieansprechen nicht hinreichend erklären (Simon 2001, S. 1141-45). Ungefähr 50-60% der DTC zeigen eine Her2 Überexpression (Pantel 1993, S. 1424, Fehm 2005; 2, S.159), was mit einer signifikant schlechteren Prognose korreliert (Abb. 69).

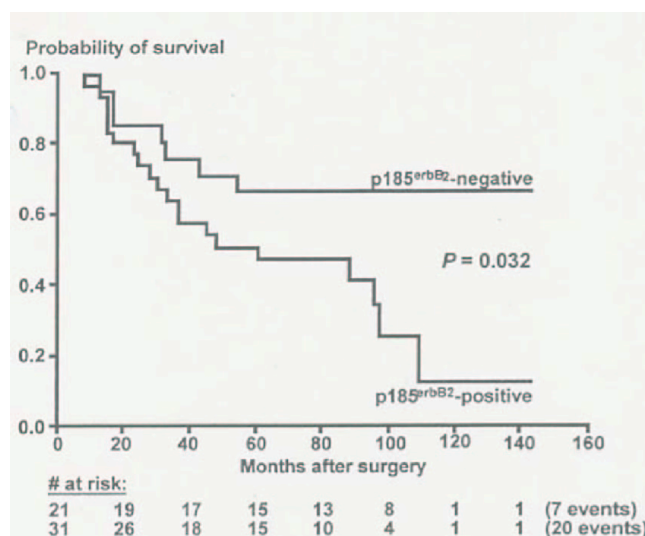


Abb.69: Braun, Cancer Research, 2001 S.1893: Phänotyp der residualen Tumorerkrankung als Prognosefaktor

Der Phänotyp einer einzelnen, disseminierten Tumorzelle scheint nicht nur ausschlaggebend für ihr Metastasierungspotential zu sein, sondern kann auch vom Primärtumor (25% versus 68%) abweichen.

Impliziert man einen Wechsel im Antigenbesatz vom Primärtumor zur Organmetastase (Thor 2001 S.1121, Hayes 2002, S.1117) und damit eine Veränderung der Tumorbiologie, so ist der Nachweis und die

Charakterisierung disseminierter Tumorzellen für die Therapieplanung auch aus ökonomischer Sicht essentiell.

5.2.2.2 Das uPA-System und mögliche therapeutische Angriffspunkte

Heiss 2002, S. 2005-16 konnte in einer klinischen Studie an Magenkarzinompatienten zeigen, dass der Nachweis von uPA-R auf DTC zum Zeitpunkt der Primäroperation eine signifikant ungünstigere Prognose und ein Tumorrezidiv vorhersagt. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit für Mammakarzinompatientinnen noch nicht bestätigt werden. Trotzdem bietet sich das uPA-System im Wissen um seine Bedeutung für Tumorwachstums- und Metastasierungsprozesse als vielversprechendes Therapietarget an. Im Tierversuch bringt das Ausschalten des uPA-Systems keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit, Fertilität und Gesundheit mit sich; d.h. Nebenwirkungen sind kaum zu erwarten.

Es gibt zahlreiche theoretische Ansätze (Antikörper, Inhibitoren, Antisensoligonucleotide, rekombinante oder synthetische uPA und uPA-R Analoga), die auf dem Gen- oder Proteinlevel die Bildung von uPA und PAI-1 oder deren Interaktion mit dem uPA-R stören können.

Im Folgenden soll exemplarisch auf den in klinischer Testung befindlichen WX-UK1 eingegangen werden: WX-UK1 ist ein niedermolekulares, synthetisches Derivat aus der Gruppe der 3-Aminophenylalanine (=small molecule). Es inhibiert eine Reihe von Serinproteasen (uPA, Plasmin, Thrombin). Normalerweise bindet uPA an den Rezeptor uPA-R auf der Tumorzelloberfläche. Zur Aktivierung bindet der uPA-Inhibitor PAI-1 an diesen Binärkomplex. Der trimäre Komplex kann nun internalisiert werden, was zur Stimulation der Zelle (Migration, Zellteilung, Angiogenese, etc.) führt. WX-UK1 blockiert die uPA/uPA-R Aktivität, womit eine Internalisierung des Komplexes und damit eine Zellstimulation vereitelt werden. Im Tiermodell führte dies zu einer deutlichen Reduktion der Tumorlast sowohl beim Primärtumor, als auch bei den Metastasen (Abb. 70).

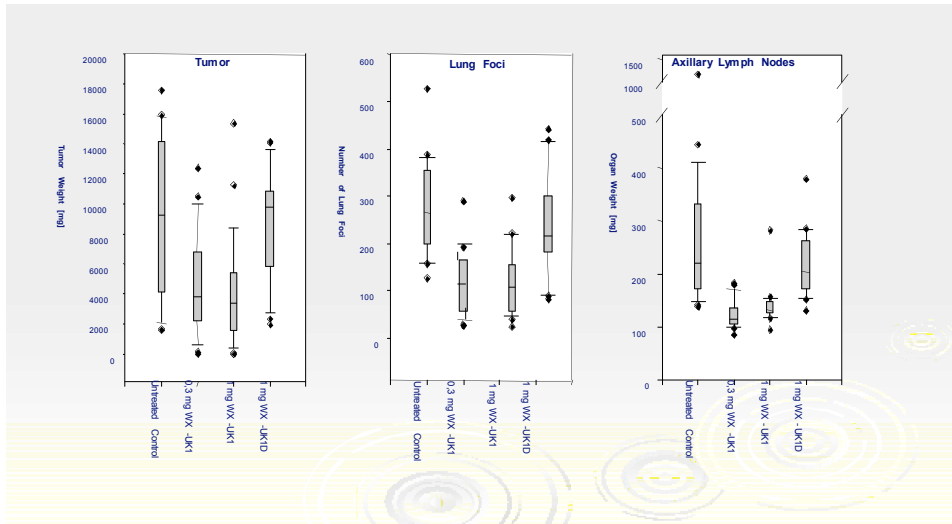


Abb. 70: Reduktion von Tumorwachstum und Metastasierung (modifiziert nach Reijerkerk A, 2000; Duffy, 1996; Schmitt, M, Wilhelm, O. 1995)

Im klinischen Alltag ist die Anwendung von WX-UK1 in Kombination mit konventioneller Chemotherapie oder als Erhaltungstherapie mit additivem oder synergistischem Effekt vorstellbar.

Zitate und weitere Informationen zu WX-UK1 können unter www.wilex.de abgerufen werden.

5.2.3 Bisphosphonate

Knochenmetastasen sind mit 40-50% die häufigste Erstmanifestation von Fernmetastasen beim Mammakarzinom. Eine Selektion von Hochrisikopatientinnen für eine spätere ossäre Metastasierung erscheint daher sinnvoll. Bei vielen Autoren (Diehl, Braun, Mansi) korrelieren DTC signifikant mit dem späteren Auftreten von Knochenmetastasen. Eine erweiterte präventive Behandlung bei positivem Knochenmarksstatus sollte daher angedacht werden. Bisphosphonate haben sich bereits in der manifesten Knochenmetastasierung bewährt. In der adjuvanten Behandlungssituation von Hochrisikopatientinnen stellen sie neue Hoffnungsträger dar.

Bisphosphonate (=BP) sind seit über 100 Jahren bekannt und wurden früher vor allem industriell eingesetzt. Mit dem Einsatz bei der heterotopen Ossifikation, beim M. Paget und bei der Osteoporose begann

die rasche Weiterentwicklung dieser Substanzgruppe in der Medizin. Es handelt sich hierbei um Pyrophosphatanaloga, die resistent gegen den Abbau durch körpereigene Phosphatasen sind und die auf verschiedenen Wegen in den Knochenstoffwechsel eingreifen können. Angriffspunkt der BP sind hauptsächlich die Osteoklasten, indem sie sich an das Hydroxylapatit knöcherner Oberflächen haften. Tumorzellen produzieren osteolytische Faktoren wie PTHrP, welche Osteoklasten aktivieren. Beim Knochenabbau werden dann Wachstumsfaktoren(EGF; TGF; IGF; etc.) gebildet, welche wiederum die Teilung von Tumorzellen fördern und diesen Circulus vitiosus weiter anheizen. BP wirken durch Hemmung der Farnesylierung im Syntheseweg des Cholesterins apoptotisch auf reife Osteoklasten und in vitro auch auf Tumorzellen, verhindern die Chemotaxis der Osteoklasten zu den Orten aktiver Knochenresorption und hemmen die Rekrutierung und Differenzierung von Osteoklastenvorstufen. (Fleisch 2000, S. 88-111). Die BP wirken auch direkt auf die Osteoblasten, welche einen osteoklastenhemmenden Faktor produzieren. Labordaten zeigen, dass BP die Adhäsion von Tumorzellen an der Knochenmatrix beeinflussen und durch Veränderung des Mikromilieus die Interaktion zwischen Tumorzellen und Knochenzellen stören (Diel 1998, S. 361-62). Das bedeutet, dass durch die Reduktion der aus dem Knochen freigesetzten Wachstumsfaktoren dem Tumor ein proliferationssteigernder Stimulus entzogen wird.

Theriault 2000, S. 1082 konnte am Rattenmodell zeigen, dass der frühe Einsatz von Clodronat die Inzidenz von neuen Knochenmetastasen reduzieren kann. Elomaa 1987, S.53-56 und Kanis, 1994, S. 713-31 behandelten Frauen mit fortgeschrittenem bzw. ossär metastasiertem Mammakarzinom mit Clodronat oral und stellten eine verminderte Anzahl von neuen Knochenmetastasen fest. Auf der Grundlage dieser Tatsachen startete Diehl (1998, S. 357-63) eine prospektiv, randomisierte Studie: 157 primäre Mammakarzinompatientinnen mit positivem Knochenmarksstatus erhielten für 2 Jahre 1600mg Clodronat/d oral. Eine vergleichbare Kontrollgruppe mit 145 Patientinnen erhielt randomisiert

keine Medikation. Es konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz von Knochen- und viszeralen Metastasen in der Clodronatgruppe signifikant vermindert war. Die Mortalitätsrate konnte signifikant gesenkt werden. Powles 2002, S. 3219-24 konnte den positiven Effekt einer adjuvanten Clodronattherapie bezüglich einer signifikanten Reduktion von Knochenmetastasen und Mortalität bestätigen. Diese Ergebnisse sind kontrovers zu den prospektiven Studien von van Holten 1996, S. 450 bei lokal fortgeschrittenem oder extraskelletal metastasiertem Mammakarzinom und Saarto, 2001, S.10-17 bei nodalpositivem primärem Mammakarzinom. Beide konnten keinen präventiven Effekt bzw. eine Verzögerung des Auftretens von Knochenmetastasen zeigen. Im Juni 2008 präsentierte Gnant auf dem ASCO Daten aus der Studie 12 der Austrian Breast & Colorectal Cancer Study Group. Die Gabe von Zometa® bei hormonrezeptorpositiven prämenopausalen Mammakarzinompatientinnen zusätzlich zu einer hormonellen Therapie (Tamoxifen oder Anastrozol) verlängerte signifikant sowohl das krankheitsfreie Überleben als auch das rezidivfreie Überleben. Zudem sank das Risiko von Ereignissen bezüglich des krankheitsfreien Überlebens – welches Todesfälle aller Ursachen einschließt – um 36 Prozent ($p=0,01$) im Vergleich zu einer alleinigen hormonellen Therapie. Ebenfalls sank das Risiko von Ereignissen bezüglich des rezidivfreien Überlebens um 35 Prozent ($p=0,015$) (Gnant 2008, abstr. LBA4)

Fazit: Die Wirksamkeit von Bisphosphonaten in der Prävention von Knochen- und eventuell Organmetastasen klingt vielversprechend, sollte aber auf Hochrisikopatienten beschränkt bleiben. DTC könnten dabei zur Risikostratifizierung hilfreich sein.

6.0 Zusammenfassung

Da eine „Tumorzell dissemination“ früher als bislang angenommen einsetzt, müssen Konsequenzen für Forschung und Klinik gezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden bei 111 Patientinnen mit V.a. Mammakarzinom an der Spina iliaca posterior superior unilokulär ca. 14-18 ml Knochenmark aspiriert. Bei 43 von 92 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom konnten mittels konfokaler Laserscanmikroskopie DTC im Knochenmark nachgewiesen werden (46%). Zur Detektion zytokeratinpositiver Zellen mittels indirekter Doppelimmunfluoreszenz wurde der Antikörper A45B/B3 angewandt. Pro Patientin wurden 2×10^6 Zellen gesichtet und jeweils 1×10^6 auf die Expression von uPA-R (HU 277) und Her2 (CB-11/c-erb-B2) überprüft. Bei 93,8% der ck-positiven Zellen konnte gleichzeitig ein uPA-R-Besatz nachgewiesen werden. Eine Quantifizierung des uPA-R-Gehalts war bei 28 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom möglich. Bei keiner Patientin mit CK-positiven Zellen konnte Her2 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen positivem Knochenmarksstatus oder uPA-R-Expressionslevel auf DTC und klassischen Prognosefaktoren sowie der weiteren klinischen Entwicklung der Erkrankung konnte nicht gefunden werden. Allenfalls konnte ein Trend zu aggressiverem Grading, Multizentrität und Her2-Überexpression bei tumorzellpositiven Patientinnen aufgezeigt werden.

Mit der im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelten und für das Mammakarzinom erstmals etablierten Immunfluoreszenztechnik lassen sich Tumorzellen mit hoher Sensitivität und Spezifität nachweisen und auf Protein- und Genebene näher untersuchen. Eine prospektive Studie auf Grundlage des vorgestellten Pilotprojekts ist nötig, um statistisch signifikante Aussagen bezüglich prädiktiver und prognostischer Wertigkeit phänotypisierter DTC machen zu können.

Der Tumorzellnachweis ist derzeit noch kein klinisch etablierter Prognosefaktor.

Dennoch bietet er sich im Einzelfall als zusätzlicher Parameter zur Erleichterung der Selektion von Hochrisikopatientinnen und Vermeiden von „Übertherapien“ an. Die Phänotypisierung der DTC ermöglicht auf die individuelle Tumorbilogie der Patientin zugeschnittene Therapieformen zu entwickeln. Der technische Aufwand jedoch lässt einen routinemässigen Einsatz kaum zu. Schnellere standardisierte und praktikable Detektionssysteme sind in Entwicklung.

... Now is not the end. It's not even the beginning of the end. But it is, perhaps, the end of the beginning. (W. Churchill)

Abkürzungsverzeichnis:

PBS= Phosphat Buffer

PBS/BSA= Phosphat Buffer mit Bovine Albumine

PFA= Paraformaldehyd

CK= Zytokeratin

uPA-R=Urokinase-Plasminogen-Aktivator

her2= her-2-neu= c-erb-B2= Herceptin

MNC= mononucleäre Zellen

DTC= disseminierte Tumorzelle

MRD= minimal residual disease

TZ= Tumorzelle

CEC= zirkulierende epitheliale Zellen

BM+= bone marrow positiv

CK+= zytokeratinpositiv

IF= Immunfluoreszenzfärbung

IHC= Immunhistochemische Färbung

IET= Immunomagnetische Anreicherungsverfahren

CS= Zytospin

BP= Bisphosphonate

LITERATURVERZEICHNIS:

Allgayer H, Heiss M, Riesenberg R, Immunocytochemical phenotyping of disseminated tumor cells in bone marrow by uPA receptor and CK 18: Investigation of sensitivity and specificity of an immunogold/alkaline phosphatase double staining protocol. *J of Histochemistry and Cytochemistry*, 1997, 45: 203-12.

Allgayer H, Heiss M, Riesenberg R, uPA-R: one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease. *Canc Res*, 1997, 57: 1394-99.

Allgayer H, Heiss M. MRD in solid cancer. Prognostic value and therapeutic consequences, *Fortschr Med Orig* 2001;119(1):1-4.

Bastert G, Wallwiener D, *Onkologie Service*, 1997, 1: 2

Bastholm L, Nielsen M, Mey J, Confocal fluorescence microscopy of urokinase plasminogen activator receptor and cathepsin D in human MDA-MB-231 breast cancer cells migrating in reconstituted basement membrane. *Biotechnic and Histochemistry*, 1994, 69:61-67.

Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ, Hawes D, Decker WJ, Priddy C, Bossy B, Ludmann S, Yamamoto K, Masih AS, Espinoza FP, Harrington DS. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res*. 2000 Sep; 6(9):3552-9.

Becker S, Fehm T, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Solomayer E, *Senologie* 2005, S. 120-123

Becker S, Pergola G, Fehm T, Nachweis Her2 positiver Zellen in Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen. Poster DGGG Hamburg 2004.

Berger U, Bettelheim R, Mansi J, Easton D, Coombes R, Neville A, The relationship between micrometastasis in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis, Am J Clin Path.1988, 90:1-6

Blasi F uPA, uPAR, PAI I: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways. Immunology today, 9 (18):415-17.

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 Aug;185(4):427-34.

Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, Diel I, Solomayer E, Theocharous P, Coombes RC, Smith BM, Wunder E, Marolleau JP, Garcia J, Pantel K; Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells, ISHAGE 1999, S. 377-388

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 Aug 15; 46(4):215-21.

Boyum A Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968;97:7

Braun S, Harbeck N. Molecular markers of metastasis in breast cancer: current understanding and prospects for novel diagnosis and prevention, expert reviews, 2001, S.1-14

Braun S, Harbeck N. Recent advances in technologies for the detection of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients, Breast Cancer Research, 2001:285-88

Braun S, Hepp F, Kantenich CRM, Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. Clin Cancer Res 1999;5:3999-4004.

Braun S, Hepp F, Sommer H, Pantel K Tumorantigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease. Int. J. Cancer 1999, 84: 1-5

Braun S, Kantenich CRM, Janni W, 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, Müller P, 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, Pantel K, Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. Cancer Metastasis Rev. 1999;18(1):75-90. Review

Braun S, Schlimok G, Heumos I, ErbB2 Overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. Cancer Res 2001, 61: 1890-95.

Braun S, Vogl F, Janni W, Marth C, Schlimok G, Pantel K, Evaluation of bone marrow in breast cancer patients: prediction of clinical outcome and response to therapy, *The breast* 2003; 12: 397-404

Braun S, Vogl F, Naume B, Janni W, Osborne M, Coombes C, Schlimok G, Diel I, Gerber B, Bebauer G, Pierga J, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer E, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong G, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K, A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer, *N Engl J Med* 2005; 353:793-802

Braun S. et al, 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, 1468-75

Brinton LA, Devesa S, Incidence, Demographics and environmental factors, in: *Diseases of the breast*, Harris J, Lippman M, Morrow M, Hellmann S, Lippincott Raven, Philadelphia-New York, 1996, 159-167

Brotherick I, Robson C, Browell D, Shenfine J, White M, Cunliffe W, Shenton B, Egan M, Webb L, Lunt L, Young J, Higgs M, Cytokeratin expression in breast cancer: phenotypic changes associated with disease progression, *Cytometry*, 1998, 32:301-8

Cote RJ, Rosen PP, Hakes TB, Monoclonal antibodies detect occult breast carcinoma metastases in the bone marrow of patients with early stage disease. *Am J Surg Pathol* 1988; 12:333-340.

Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9:1749-1756.

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19; 351(8):781-91.

Dearnaley D, Sloane J, Imprie S, Coombes R, Ormerod M, Lumley H, Jones M, Neville M. Detection of isolated mammary carcinoma cells in marrow of patients with primary breast cancer. *J Roy Soc Med* 1983;76:359-364.

Diel I, Bastert G Minimal Residual Disease beim Mammakarzinom *Onkologie* 1998, 4:1-13.

Diel I, Costa S, Kaufmann M, Solomayer E, Bastert G. Immunozytochemische Erkennung und prognostische Bedeutung einzelner Tumorzellen im Knochenmark beim Mammakarzinom. *Klein. Lab.*1994, 40: 1167-1178.

Diel I, Kaufmann M, Solomayer E, Prognostische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark im Vergleich zum Nodalstatus beim primären mammakarzinom. *Geburtsh u. Frauenheilk.* 1997, 57: 333-41.

Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 652-1664.

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 Aug 6; 39(6):357-63.

Diel I, Meta-analysis of prognostic significance of tumor cell demonstration in the bone marrow or: "Looking for an independent prognostic factor"
"Strahlenther Onkol. 1999 Jan; 175(1):45-6

Di Giovanna M, Clinical Significance of Her2 Overexpression, Updates
Principels and Practise of Oncology, 1999, 13(9): 1-10.

Dowsett M, Cooke T, Ellis I Assessment of HER2 status in breast cancer:
why, when and how? Eur J Cancer. 2000 Jan;36(2):170-6. Review

Eisenhauer E From the molecule to the clinic-inhibiting HER2 to treat
breast cancer. N Engl J Med, 2001, 344 (11):841-842.

Engel J., Hölzel D., Kerr J., Schubert-Fritschle G. Epidemiologie. In:
Manual Mammakarzinome, Sauer H, W. Zuckschwerdt Verlag, München,
Wien, New York, 2003, 9. Auflage, 3-10

Elomaa I, Blomqvist C, Porkka L, Lamberg-Allardt C, Borgstrom GH.
Treatment of skeletal disease in breast cancer: a controlled clodronate
trial. Bone. 1987; 8 Suppl 1:S53-6.

Fehm T, Becker S, Pergola G, Influence of tumor biologicka factors on
tumor cell dissemination in primary breast cancer. Anticancer Res 2004,
24: 4211-16.

Fehm T, Pergola G, Bachmann R, Bachmann C, Becker S, Wallwiener D,
Vogel U Solomayer E, Vergleich der Her2 Expression zwischen
disseminierter Tumorzelle und Primärtumor, Senologie 2005;2:147-205

Fehm T, Segalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Hossein S, euhus D, Meng S,
Morrison L, Tucker T, Lane N, Ghadimi B, Heselmeyer-Haddad K, Ried T,
Rao C, Uhr J, Cytogenetic Evidence that Circulating Epithelial Cells in

Patients with Carcinoma are Malignant, Clin. Cancer Res. 2002; 8: 2073-84

Fleisch, H. Bisphosphonates in bone disease, Academic Press, San Diego, 2000, 4. Auflage

Fiedler I, Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis, J Natl Cancer Inst. 1995; 87: 1588-1591.

Fox S, Leek R, Bliss J, Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer. J Natl Cancer Inst, 1997, 89: 1044-49.

Fuchs E, Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation. Trends Genet. 1988 Oct; 4(10):277-81

Funke I, Fries S, Rolle M, Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. Int J Cancer, 1996;65:755-761 remains to be substantiated. J Clin Oncol 1998; 16:557-566

Funke I, Schraut W. Meta-analysis of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact. Clin Oncol 1998; 16:557-566.

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 Aug 15; 19(16):3669-74.

Gerber B, Krause A, Muller H, 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: 960-71

Ghossein R, Rosei J Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer* 1996; 78:10-16

M. Gnant, B. Mlineritsch, W. Schippinger, G. Luschin-Ebengreuth, S. Poestlberger, C. Menzel, R. Jakesz, E. Kubista, C. Marth, R. Greil, Adjuvant ovarian suppression combined with tamoxifen or anastrozole, alone or in combination with zoledronic acid, in premenopausal women with hormone-responsive, stage I and II breast cancer: First efficacy results from ABCSG-12, *J Clin Oncol* 26: 2008 (May 20 suppl; abstr LBA4)

Graeff H, Jänicke F, Schmitt M. Klinische und prognostische Bedeutung tumorassoziierter Proteasen in der gynäkologischen Onkologie, *Geburtsh. u. Frauenheilk.*, 1991; 51:90-99

Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Janni W, Lebeau A, Permanetter W, Raab G, Untch M, Zenz I. Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom. In: *Manual Mammakarzinome*, Sauer H, W. Zuckschwerdt Verlag, München, Wien, New York, 2003, 9. Auflage, 67-70.

Harbeck N, Krüger A, Sinz S, Kates RE, Thomsen C, Schmitt M, Jänicke F. Clinical Relevance of the Plasminogen Activator Inhibitor Type 1-a Multifaceted Proteolytic Factor, *Onkologie* 2001; 24: 238-44

Harbeck N, Abdulsalam A, Jänicke F, Clinical relevance of detection of tumor cells in the bone marrow of primary breast cancer patients: A review. *Onkologie* 1997; 20: 387-92.

Harbeck N, Untch M, Pache L, Tumour 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

Hayes D, Walker T, Singh B, Monitoring expression of Her-2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int J Onc* 2002, 21:1111-17.

Hayes DF. Arbitrator. Do we need better prognostic factors in node-negative breast cancer? *Eur J Cancer* 2000; 36:293-306.

Heiss M, Allgayer H, Gruetzner K, Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumor cells in bone marrow: A reference to early systemic disease in solid cancer. *Nature Medicine*, 1995, 1: 1035-39.

Heiss M, Simon E, Bianca C Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. *J of Clin Onc*, 2002, 20: 2005-16.

Hermanek P. Disseminated tumor cells versus Micrometastasis: Definitions and Problems, *Anticancer Research* 1999; 19: 2771-2774.

Hildenbrand R, Glienke W, Magdolen V, Graeff H, Stutte HJ, Schmitt M. Urokinase receptor localization in breast cancer and benign lesions assessed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*. 1998 Jul;110(1):27-32.

Janni W, Hepp F, Rjosk D, Kentenich C, Strobl B, Schindlbeck C, Hantschmann P, Sommer H, Pantel K, Braun S. The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast

carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer*. 2001 Jul 1; 92(1):46-53.

Jardi M, Ingles-Esteve J, Burgal M, Azqueta C, Velasco F, Lopez-Pedrerera C, Miles LA, Felez J, Distinct patterns of urokinase receptor (uPAR) expression by leukemic cells and peripheral blood cells. *Thromb Haemost*. 1996 Dec; 76(6):1009-19.

Jarvinen M, Andersson LC, Virtanen I, K562 erythroleukemia cells express cytokeratins 8, 18, and 19 and epithelial membrane antigen that disappear after induced differentiation. *J Cell Physiol*. 1990 May;143(2):310-20.

Kanis JA, O'Rourke N, McCloskey EV, Consequences of neoplasia induced bone resorption and the use of clodronate. *Int J Oncol* 1994; 5: 713-31

Jung R, Petersen K, Kruger W, Wolf M, Wagener C, Zander A, Neumaier M. Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *Br J Cancer*. 1999 Nov; 81(5):870-3.

Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Schindler A, Seeber S, A Summary of two clinical studies on tumor cell dissemination in primary and metastatic breast cancer: methods, prognostic significance and implication for alternative treatment protocols, *Int J Oncol*, 2002, 20:1027-34

Kasimir-Bauer S, Otterbach F, Oberhoff C, Schmid K, Kimmig R, Seeber S. Rare Expression of target antigens for immunotherapy on disseminated tumor cells in breast cancer patients without overt metastases. *Int J Mol Med* 2003, 12: 969-75.

Kasper M, Stosiek P, Typlt H, Karsten U. histological evaluation of three new monoclonal anti-cytokeratin antibodies, *EJC*, 1987, 23, 137-47

Klein A, The systemic Progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell-the unit of selection, *Adv Cancer Res*; 2003, 89: 35-67

Krüger W, Tögel F, Rössing S, Kröger N, Zander AR. Improvement of breast cancer cell detection by immunomagnetic enrichment. *Cytotherapie* 1999, 1: 135-39

Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G, Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 13;96(8):4494-9.

Landys K, Persson S, Kovarik J, 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

Lipton A, Theriault RL, Hortobagyi GN, Simeone J, Knight RD, Mellars K, Reitsma DJ, Heffernan M, Seaman JJ. Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases: long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. *Cancer*, 2000 Mar 1; 88(5):1082-90

Litle V, Lockett S, Pallavicini M, Genotype/ Phenotype analyses of low frequency tumor cells using computerized image microscopy, *Cytometry* 1996, 23:344-49

Loos J A, Roos D, Ficoll-isopaque gradients for the determination of density distributions of human blood lymphocytes and other reticulo-endothelial cells. *Exp Cell Res*. 1974 Jun;86(2):333-41

Magdolen V, Rettenberger P, Lopens A, Hidekazu O, Lottspeich F, Kellermann J, Creutzburg S, Goretzki L, Weidle U, Wilhelm O, Schmitt M, Graeff H Expression of the human urokinase-type plasminogen activator receptor in E. coli and Chinese hamster ovary cells: purification of the recombinant proteins and generation of polyclonal antibodies in chicken, Electrophoresis 1994, 16: 813-16.

Malzahn K, Mitze M, Thoenes M, Moll R, Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas, Virchows Arch 1998, 433:199-29

Mansi JL, Berger U, McDonnell T, Pople A, Rayter Z, Gazet JC, Coombes RC. The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. J Clin Oncol. 1989 Apr; 7(4):445-9.

Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up. Lancet 1999;354: 197-202

Manzoni G, Pelosi G, Pavanel F, Di Leo A, Pedrazzani C, Durante E, Cordiano C, Pasini F, The presence of bone marrow cytokeratin-immunoreactive cells does not predict outcome in gastric cancer patients, Br J Cancer. 2002 Apr 8;86(7):1047-51.

Mc Guire WL Breast cancer prognostic factors:evaluation guidelines. J Natl Cancer Inst 83:154-55.

Meng S, Tripathy D, Frenkel EP Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy, Clin Cancer Res.2004 Dec 15;10(24):8152-62

Merkle E, Bähr J, Henke A et al, Immunzytochemischer Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark als Prognosefaktor beim Mammakarzinom. Geburtsh Frauenheik 1994, 54: 662-669

Messerli J, Voort H, Rungger-Brändle E, Perriard J, Three-dimensional visualization of multi-channel volume data: the amSFP Algorithm, *Cytometry*, 1993, 14: 725-35

Molino A, Bone marrow micrometastases in breast cancer patients, *Breast Cancer Research and Treatment*, 1999, 58: 123-30

Molino A, Pelosi G, Turazza M. Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Canc Res and Treat* 1997, 42:23-30.

Moll R, Franke W, Schiller D. The catalogue of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell*, 1982, 31:11-24

Moll R, Schiller DL, Franke WW. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns, *J Cell Biol.* 1990 Aug;111(2):567-80.

Mühlenweg B, Sperl S, Magdolen V, Schmitt M, Harbeck N. Interference with the urokinase plasminogen activator system: a promising therapy concept for solid tumors, *Expert Opin Biol Ther*, 2001; 1(4), 683-88

Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin Canc Res*, 2001, 7: 4122-29.

Naume B, Wiedswang G, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Harbitz T, Nesland J, The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast: Evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells, *Clin.Cancer Res.*, 2004, 10: 3091-97

Noack F, Helmecke D, Rosenberg R, Thorban S, Nekarda H, Fink U, Lewald J CD87-positive tumor cells in bone marrow aspirates identified by confocal laser scanning fluorescence microscopy *Int J Oncol.* 1999 Oct; 15(4):617-23.

Noack F, Schmitt M, Bauer J A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications *Int J Biol Markers.* 2000 Jan-Mar;15(1):100-4. Review

Osborn M, Altmannsberger M, Debus E, Weber K, Conventional and monoclonal antibodies to intermediate filament proteins in human tumor diagnosis. *Cancer Cells* 1984, 1: 191-99.

Pantel K, Schlimok G, Braun S, Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1419-1424

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 Fall; 3(3):165-73.

Pantel K, Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85: 1419-24

Pantel K, Ahr A. Immunocytochemical and molecular strategies for the detection of micrometastases in patients with solid epithelial tumors: a review, *Nuclear Medicine Communications*, 1998, 521-27

Pantel K, Knebel M, Izbicki J, Riethmüller G. Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien, *Der Chirurg*, 1997, 68: 1241-50

Pantel K, Cote RJ, Fodstad O Detection and clinical Importance of micrometastatic disease, *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91: 1113-24

Pawley J E, *Handbook of biological confocal microscopy*, Springer-Verlag 1995

Pierga JY, Bonneton C, Magdelenat H, Vincent-Salomon A, Nos C, Boudou E, Pouillart P, Thiery JP, de Cremoux P, Real-time quantitative PCR determination of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression of isolated micrometastatic cells from bone marrow of breast cancer patients, *Int J Cancer*. 2005 Mar 20; 114(2):291-8.

Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ., Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. 1994 Jul; 9(7):1829-38.

Plesner T, Ralfkiaer E, Wittrup M, Johnsen H, Pyke C, Pedersen TL, Hansen NE, Dano K. Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue, *Am J Clin Pathol*. 1994 Dec; 102(6):835-41.

Powles T, Paterson S, Kanis JA, McCloskey E, Ashley S, Tidy A, Rosenqvist K, Smith I, Ottestad L, Legault S, Pajunen M, Nevantaus A, Mannisto E, Suovuori A, Atula S, Nevalainen J, Pylkkanen L. Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Aug 1; 20(15):3219-24

Ramaekers F, Haag D, Kant A, Moesker O, Jap P, Vooijs G. Coexpression of keratin-and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells, Proc. Natl. Acad.Sci.USA, 1983, 80:2618-22

Revillion F, Bonneterre J, Peyrat JP ERBB2 Oncogene in human breast cancer and ist clinical significance, Eur J Cancer 1998, 34 (6):791-808.

Riethmüller G, Klein A, Pantel K. Hunting down the seminal cells of clinical metastasis. Trends in immunology today, 1999; 20(7): 294-96.

Riethmüller G, Schlimok G, Pantel K, Metastasis formation in human solid tumors: phenotypic characteristics of early metastatic cells. Behring Inst. Mitt. 1992, 91: 204-9

Roggel F, Hocke S, Lindemann K, Sinz S, Minimal residual disease in breast cancer an gynecological malignancies: Phenotype and clinical relevance, Recent Results in Cancer Research,2003, 162: 89-100

Ross J, Fletcher JA The Her-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. Cancer Biology, 1999; 9: 125-38

Salvadori B, Squicciarini P, Rovini D, Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients. Eur J Cancer 1990;26: 865-867

Saarto T, Blomqvist C, Virkkunen P, Elomaa I. Adjuvant clodronate treatment does not reduce the frequency of skeletal metastases in node-positive breast cancer patients: 5-year results of a randomized controlled trial.J Clin Oncol. 2001 Jan 1; 19(1):10-7.

Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Comperative analysis between the Her2 status in primary breast cancer tissue and the detection of isolated

tumor cells in the bone marrow. *Breast Canc Res and Treat*, 2004, 87: 65-74.

Schlimok G, Riethmüller G. Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow, *cancer biology*, 1990, 1: 207-15.

Schlimok G, Pantel K, Loibner H, Reduction of metastatic carcinoma cells in bone marrow by intravenously administered monoclonal antibody: towards a novel surrogate test to monitor adjuvant therapies of solid tumours. *Eur J Cancer* 1995;31 A: 1799-1803.

Schmitt M, Jänicke F, Graeff H Tumor-associated Proteases, Fibrinolysis, 1992, 6(4):3-26.

Schmitt M, Wilhelm O, Jänicke F, Magdolen V, Reuning U, Ohi Hidekazu, Moniwa Nobuhiko, Kobayashi Hiroshi, Weidle Ulrich, Graeff Henner. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor: a new target in tumor invasion and metastasis, *J Obstet Gynaecol*, 1995, 21(2):151-165

Schütze K, Becker I, Becker K, Thalhammer S, Stark R, Heckl W, Böhm M, Pösl H, Cut out or poke in-the key to the world of single genes: laser micromanipulation as a valuable tool on the look-out for the origin of disease, *Genetic Analysis* 1997, 14:1-8.

Schütze K, Pösl H, Lahr G, Laser micromanipulation systems as universal tools in cellular and molecular biology an in medicine, *Cell.mol.Biol.*, 1998, 44(5):735-46.

Simon R, Nocito A, Hubscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P, Bubendorf L, Mihatsch MM, Moch H, Wilber K, Schotzau A, Kononen J, Sauter G. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in

primary and metastatic breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2001 Aug 1; 93(15):1141-6.

Sinz S, Braun S, Sandherr M, Werner M, Harbeck N, Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark: Prognostische und prädiktive Relevanz beim Mammakarzinom, Geburtsh Frauenheilk 2001, 61:M 39-43

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, Mc Guire WL Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene Science 1987 Jan 9; 235(4785):177-82.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med. 2001 Mar 15; 344(11):783-92.

Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). Semin Oncol. 1999 Aug; 26(4 Suppl 12):60-70. Review

Solomayer E, Diel I, Salanti G, Time independence of prognostic impact of tumor cell detection in bone marrow of primary breast cancer patients. Clin Cancer Res 2001, 7: 4102-8.

Solomayer E, Diel I, Wallwiener D, Prognostic relevance of uPA detection in micrometastatic cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer. Brit J of Canc; 1997, 76: 812-18.

Stelzer E. Methoden der Zellforschung. In: „Biologie in unserer Zeit“, Copyright © 1991 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, S. 161-171

Thor A, Are patterns of HER-2/neu amplification and expression among primary tumors and regional metastases indicative of those in distant metastases and predictive of Herceptin response? *J Natl Cancer Inst.* 2001 Aug 1; 93(15):1120-1.

Tögel F, Datta C, Badbaran A, Urokinase-like plasminogen activator receptor expression on disseminated breast cancer cells. *J of Hem and Stem Cell Res* 2001; 10:141-45.

Trask D, Band V, Zajchowski D, Yaswen P, Suh T, Sager R. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1990 (87):2319-23

Tsubura A, Okada H, Senzaki H, Hatano T, Morii S. Keratin expression in the normal breast and in breast carcinoma, *Histopathology* 1991,18:517-22

Wiedswang G, Borgen E, Karesen R: Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2003; 21: 3469-78

van Holten-Verzantvoort AT, Hermans J, Beex LV, Blijham G, Cleton FJ, van Eck-Smit BC, Sleetboom HP, Papapoulos SE. Does supportive pamidronate treatment prevent or delay the first manifestation of bone metastases in breast cancer patients? *Eur J Cancer.* 1996 Mar; 32 A(3):450-4

Yu W and Ossowski L. Reduktion in surface urokinase receptor forces malignant cells into protracted state of dormancy. *J of Cell Biol*, 1997, 137: 767-777.

Zhong X, Kaul S, Diel I, Eichler A, Bastert G. Analysis of sensitivity and specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase/ polymerase chain reaction for detection of occult breast cancer in bone marrow and leukapheresis products. J cancer Res Clin Onc 1999; 125: 286-291

DANKSAGUNG

Ich möchte allen seelisch, moralisch und geistig beteiligten Mitarbeitern, Bekannten und Freunden von ganzen Herzen danken für die direkte und indirekte Unterstützung meiner Promotionsarbeit auch und vor allem denen, die namentlich hier nicht erwähnt werden sollen.

Was lange währt, wird endlich gut!

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich immer wieder motiviert und unterstützt haben, die Arbeit zu Ende zu führen.

Auch meinen Freunden insbesondere Birgit, Gabi und Thorsten möchte ich Danke sagen, für die gegenseitige mentale Unterstützung während der häufigen Tiefen der Arbeit.

Des Weiteren danke ich dem Labor insbesondere Prof. Schmitt und der KKF- Forschergruppe sowie den Ärzten- und Ärztinnen der Frauenklinik rechts der Isar für die Zusammenarbeit. Vielen Dank an Frau Anita Welk (MTA), Herrn Dominik Helmecke (BTA) und meinen anfänglichen geistigen Mentor Dr. med. Frank Noack. Für die weitere klinische Begleitung der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Stefan Braun meinen speziellen Dank aussprechen ebenso Dr. M. Sandherr (III. Medizinischen Abteilung), der die qualitative Auswertung der Knochenmarkspunktate durchführte. Neben Dr. Nährig aus der Pathologie erhielt ich vom Chef der Pathologie Prof. Dr. Höfler bei der Auswertung meiner Zellen geistige Unterstützung und Motivation. Dr. Schütze von der Firma P.A.L.M., Bernried, möchte ich für die Möglichkeit danken, im Testlabor für einen Tag die neueste

Technologie zur Laserzellmikrodissektion kennenzulernen und eigene Versuche durchzuführen mit Gips.

Für das lustige Klima im Labor und die gegenseitige Unterstützung in der Arbeitsgruppe trotz Dunkelheit und mancher technischer Mängel bedanke ich mich bei meinen Mitdoktoranden Martina Pabst, Judith Bauer, Frigga Roggel, Martin Bosl und Stefan Hocke.

Abschliessend gilt mein Dank ganz besonders herzlich meiner „Doktormutter“ Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck, ihrem Mann Dr. Ronald Kates und meiner Chefin Frau Prof. Kiechle. Neben der freundlichen Überlassung des Themas und der fachlichen Betreuung dieser Arbeit habe ich Frau Prof. Harbeck auch die Unterstützung durch ein HSP-Stipendium der TUM zu verdanken. Dr. Kates war so freundlich, mich im statistischen Teil zu unterstützen.

Gerne werde ich mich an so manche Laborstunde mit und ohne Gipsarm zurückerinnern!

DANKE!

-CURRICULUM VITAE-

| | |
|--------------------------------|---|
| NAME: | SONJA SINZ |
| Geburtsdatum: | 28.Juli.1970 |
| Geburtsort: | Memmingen |
| Nationalität: | Deutsch |
| Familienstand: | ledig |
| Adresse: | Fraunhoferstrasse 30 e 80469 München Fon: ++49-89-29161374 Mobil: 0171-46 40 63 8 E-MAIL: sonia.sinz@t-online.de |
| Ausbildung: | |
| 1976-1980 | Grundschule Ottobeuren |
| 1980-1981 | Hauptschule Ottobeuren |
| 1981-1987 | „Rupert-Ness-Gymnasium“, Ottobeuren |
| 1987-1990 | „Bernhard-Strigel-Gymnasium“, Memmingen, Abitur (Note: 1,2) |
| 1991-1994 | Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg |
| 1994-1997 | Studium der Humanmedizin, Technische Universität München |
| 1997 | PJ am Städtischem Krankenhaus Bogenhausen (Innere), Klinikum rechts der Isar (Gynäkologie) und Kreisspital Winterthur, Schweiz (Chirurgie) |
| November 1997 | 3.Staatsexamen (Note: sehr gut) |
| 1998-1999 | ÄIP in Gynäkologie und Geburtshilfe am Städtischem Krankenhaus Neuperlach (Chefin:Prof. Dr.G.Debus) |
| August 1999 | Approbation als Ärztin |
| November 1999-Dezember 2000 | Promotionsstipendium an der Technischen Universität München Thema: Detektion disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen und Charakterisierung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie |

| | |
|--------------------|---|
| Seit Februar 2001 | Assistenzärztin an der Frauenklinik rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktorin: Prof. Dr. M. Kiechle) |
| April 2004 | Nachweis zur Erlangung der Kompetenz zur psychosomatischen Grundversorgung |
| Mai 2005 | DEGUM- Stufe I für das Gebiet Gynäkologie und Geburtshilfe |
| Seit Juni 2006 | Sprechstunde für Urogynäkologie an der Frauenklinik rechts der Isar |
| Januar 2008 | Fachärztin für Frauenheilkunde und Geburtshilfe |
| August 2008 | Oberärztin an der Frauenklinik rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktorin: Prof. Dr. M. Kiechle) |
| Weitere Kenntnisse | Sprachkenntnisse: englisch und französisch PC Grundkenntnisse 1998 Beginn Akupunkturausbildung(DÄGfA) |
| Studienbetreuung | AGO Ovar 5, 7, 8, 9, 10, 15, AGO Ovar 2.3,2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 2.10, 2.11, AGO GYN3 und Gyn 4 Studie, dEFEND Studie (Novartis), EPCAM Studie (Fresenius), AGO Zervixkarzinomstudie Radiochemotherapie, WX UK-1 Studie (Willex), Alimta Studie (LILLY) Phase II und III, Zervix-1-Studie der AGO, DESKTOP-Protokoll |

Publikationen und Abstracts:

Noack F, **Sinz S**, Bosl M, Bauer J, Pabst M, Helmecke D, Welk A, Schmitt M, Harbeck N, Characterisation of disseminated tumor cells in breast cancer patients using doublefluorescent phenotyping, lasermicrodissection and genotyping, EuroConference Microdissection and iistDownstream Tools, Bonn, 2000

Noack F, Bauer J, **Sinz S**, Bosl M, Pabst M, Helmecke D, Welk A, Schmitt M, Harbeck N, A new approach to phenotype and genotype disseminated tumor cells in bone marrow aspirates of breast cancer patients, EJ Pathology 6.3, 2000

Sinz S, Braun S, Werner M, Harbeck N, Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark: Prognostische und prädiktive Relevanz beim Mammakarzinom, Geburtsh Frauenheilk 2001;61:M1-M5

Harbeck N, Krüger A, **Sinz S**, Kates RE, Thomssen C, Schmitt M, Jänicke F. Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) - A multifaceted proteolytic factor, Oncology 2001;24:238-244

Späthe K, Bosl M, Rutke S, Schmalfeldt B, Sandher M, **Sinz S**, Helmecke D, Noack F, Schmitt M, Graeff H, Kuhn W, Harbeck N. Charakterisierung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Abstract eingereicht zum Vortrag bei der bayerischen Gynäkologentagung in Landshut, Oktober 2000

Sinz S, Schmitt M, Späthe K, Rutke S, Kuhn W, Noack F, Harbeck N. Phänotypisierung von Tumorzellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Mammakarzinom. Abstract eingereicht zum Vortrag bei der bayerischen Gynäkologentagung in Landshut, Oktober 2000

Sinz S, Bosl M, Späthe K, Schmitt M, Noack F, Harbeck N. Phänotypisierung von Tumorzellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Mamma-und Ovarialkarzinom. Abstract, eingereicht zum Vortrag der 7. Tagung des Arbeitskreises für Molekularbiologie in der Frauenheilkunde, August 2000

Sinz S, Späthe K, Helmecke D, Welk A, Rutke S, Bosl M, Hocke S, Braun S, Noack F, Harbeck N, Phenotyping of disseminated tumor cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer and it`s clinical relevance. Abstract, eingereicht für das MRD-Meeting in Hamburg im Februar 2001

Braun S, Prang N, **Sinz S**, Zehentner B. Mammaglobin RT-PCR for the detection of bone marrow micrometastasis: analysis of preanalytical variables and comparison with benchmark anti-cytokeratin immunostaining. Abstract, eingereicht zum AACR Annual Meeting in Toronto 2003

Pildner von Steinburg S, **Sinz S**, Pfeifer K, du Bois A, Belau A, Wagner U, Pfisterer J, Jakisch C, Kiechle M, Schmalfeldt B, Kombination aus Paclitaxel, Carboplatin und Gemcitabine in der Primärtherapie des epithelialen Ovarialkarzinoms: Vorläufige Ergebnisse einer Phase II- Studie der AGO Studiengruppe Ovarialcarcinom, Abstract eingereicht für die 77. Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe

Roggel F; Hocke S, Lindemann K, **Sinz S**, Welk A, Bosl M, Pabst M, Nusser N, Braun S, Schmitt M, Harbeck N, Minimal residual disease in breast cancer and gynecological malignancies: phenotype and clinical relevance, Recent Results in Cancer Research, 2003, 162: 89-100

Sinz S, K. Pfeifer, R. Bartz, M. Kiechle, B. Schmalfeld, Einsatz des Serinproteaseninhibitors WX-UK-1-ein vielversprechendes tumorbiologisches Therapiekonzept beim Ovarialkarzinom. Abstract eingereicht zum Vortrag der "Best of the Best" für die 78. Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde vom 17.bis 19. Juni 2004.

Sinz S, von Steinburg St., Ostermayer E, Schneider KTM, Fischer T, Konservatives versus invasives Vorgehen beim HELLP-Syndrom mit infauster fetaler Prognose-ein Fallreport, Abstract eingereicht für die 55.Tagung der Deutschen Gesellschaft für Geburtshilfe und Gynäkologie vom 14.9-17.9.2004, Hamburg

Sinz S, von Steinburg St., Schneider KTM, Management der Symphysendehnung in der Schwangerschaft und Geburtsmodus, Beitrag für die Zeitschrift gynäkologische praxis Band 29, 2005, Hans Marseille Verlag GmH München

München, im August 2008

Sonja Sinz



*„...er war sich tiefst bewusst, wie öde alle intellektuelle
Spekulation ist, wenn sie losgelöst wird vom Handeln
und Experimentieren ...“*

(aus Oscar Wilde, Das Bildnis des Dorian Gray)