

Frauenklinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar
Technische Universität München
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

**Nachweis und Charakterisierung zytokeratin (CK)-positiver Zellen im
Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom**

Frigga Roggel

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. M. Schmitt

Die Dissertation wurde am 30.06.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 14.09.2005 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis | 2 |
| 1. Einführung | 4 |
| 1.1 Minimale residuale Tumorerkrankung | 4 |
| 1.1.1 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark bei soliden Tumoren | 4 |
| 1.1.2 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark beim Ovarialkarzinom | 10 |
| 1.2 Das Ovarialkarzinom | 12 |
| 1.2.1 Epidemiologie des primären Ovarialkarzinoms | 12 |
| 1.2.2 Etablierte und neue Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom | 12 |
| 1.2.2.1 uPA-Rezeptor und Plasminogenaktivator-System | 13 |
| 1.2.2.2 HER-2/neu | 14 |
| 1.2.3 Therapiestrategien | 16 |
| 1.2.3.1 Konventionelle Therapie des Ovarialkarzinoms | 16 |
| 1.2.3.2 Neoadjuvante Chemotherapie | 16 |
| 2. Zielsetzung | 18 |
| 3. Material und Methoden | 20 |
| 3.1 Patientenkollektiv | 20 |
| 3.2 Methoden | 21 |
| 3.2.1 Knochenmarkaspiration | 21 |
| 3.2.2 Bearbeitung des Knochenmarks | 22 |
| 3.2.3 Zellanalyse und Nachweis CK+-Zellen mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen am CLSM | 23 |
| 3.2.3.1 CK-/uPA-R-Doppelimmunfluoreszenzfärbung | 25 |
| 3.2.3.2 Auswertung der Doppelfärbung am CLSM | 27 |
| 3.2.3.3 Quantifizierung des uPA-R-Gehalts | 28 |
| 3.2.3.4 CK-HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung | 29 |
| 3.3 Verwendete Hilfsmittel und Reagenzien | 33 |
| 3.4 Statistik | 35 |
| 4. Ergebnisse | 36 |
| 4.1 Kollektiv | 36 |
| 4.2 Nachweis von CK+-Zellen im Knochenmark durch Immun- fluoreszenzdoppelfärbung | 40 |
| 4.2.1 Knochenmarkstatus vor Primärtherapie | 40 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.2.2 | Knochenmarkstatus nach neoadjuvanter Chemotherapie..... | 44 |
| 4.2.3 | Knochenmarkstatus bei 13 Patientinnen vor und nach neoadjuvanter Chemotherapie | 47 |
| 4.2.4 | Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt des Rezidivs | 48 |
| 4.2.5 | Knochenmarkstatus der Patientinnen mit benigner Erkrankung | 49 |
| 4.3 | Charakterisierung durch Phänotypisierung der CK-positiven Zellen | 50 |
| 4.3.1 | Phänotypisierung uPA-R | 50 |
| 4.3.2 | Phänotypisierung HER-2/neu | 54 |
| 4.4 | Entwicklung der CK-/HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung..... | 55 |
| 5. | Diskussion..... | 58 |
| 5.1 | Methodik..... | 58 |
| 5.1.1 | Immunfluoreszenz vs. Immunzytochemie..... | 58 |
| 5.1.2 | Doppelimmunfluoreszenzfärbung CK / uPA-R..... | 59 |
| 5.1.3 | Etablierung der CK-/HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung | 60 |
| 5.2 | Bedeutung von CK+-Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom..... | 62 |
| 5.2.1 | Lokales Tumorwachstum und systemische Tumorzellausbreitung beim Ovarialkarzinom..... | 62 |
| 5.2.2 | Knochenmarkstatus und etablierte Prognosefaktoren..... | 63 |
| 5.3 | Einfluss einer neoadjuvanten Chemotherapie auf den Knochenmarkstatus von Patientinnen mit Ovarialkarzinom | 64 |
| 5.4 | Möglichkeit des Therapie-Monitoring | 65 |
| 6. | Zusammenfassung..... | 67 |
| 7. | Literaturverzeichnis..... | 68 |
| 8. | Abbildungsverzeichnis | 82 |
| 9. | Abkürzungsverzeichnis | 84 |
| 10. | Danksagung | 85 |
| 11. | Lebenslauf..... | 86 |

1. Einführung

1.1 Minimale residuale Tumorerkrankung

1.1.1 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark bei soliden Tumoren

Den Nachweis einzelner maligner Zellen nach einer erfolgten Primärtherapie bezeichnet man als minimal residuale Tumorerkrankung („minimal residual disease“, MRD). Der Begriff wurde ursprünglich bei malignen hämatologischen Neoplasien verwendet, findet heute aber auch bei epithelialen Tumoren Verwendung.

Inzwischen weiss man, dass diese frühe und systemische Ausbreitung von Krebszellen bei Patienten, bei denen durch gegenwärtige konventionelle diagnostische Maßnahmen keine Metastasierung nachgewiesen werden konnte (durch klinische Untersuchung, Labor, bildgebende Diagnostik etc.), der späteren symptomatischen Krankheitsprogression zugrunde liegt. Die Mehrzahl der Tumorpatienten stirbt an Metastasen, die auf klinisch okkulte und im Verlauf therapierefraktäre Disseminierung von Tumorzellen zurückzuführen sind. Daher ist die Erforschung der klinischen Relevanz und die biologische Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen notwendig, um evtl. neue Therapieansätze, die an diesen Zellen angreifen, zu finden.

Das Knochenmark, als extrem gut durchblutetes und durch Punktion leicht zugängliches Organ, bietet sich für Untersuchungen auf disseminierte Tumorzellen an, da hier ein intensiver Zellaustausch zwischen dem zirkulierenden Blut und dem mesenchymalen Interstitium stattfindet. In diesem Gewebe können einzelne Tumorzellen identifiziert werden, die Disseminierung ist aber potentiell auch in jedes andere Sekundärorgan möglich [Cote et al., 1991]. Das Knochen-/Knochenmark-System ist dabei nicht unbedingt der Ort der späteren Metastasenentstehung. Vielmehr geht man davon aus, dass die Tumorzellen im Knochenmark zunächst nicht proliferieren, sondern als sog. „dormant cells“ in einer Art Ruhezustand im Knochenmark verweilen [Pantel et al., 1993]. Dennoch können disseminierte Tumorzellen im Knochenmark als Indikator für das metastatische Potential des Primärtumors gesehen werden

[Schlimok et al., 1987]. Ein Teil dieser zirkulierenden Zellen überlebt und kann später Metastasen bilden [Mansi et al., 1989; Janni et al., 2001].

Die Untersuchungen auf dem Gebiet der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark begannen beim Mammakarzinom. Forscher des Londoner Ludwig Institute for Cancer Research zeigten, dass bei mehr als 20% der Patientinnen Tumorzellen im Knochenmark gefunden werden konnten [Dearnaley et al., 1981; Redding et al., 1983]. Die Zellen wurden in diesen ersten Arbeiten immunzytochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen das epitheliale Membranantigen (ein Zelloberflächenmucin, EMA) identifiziert.

Heute werden die ins Knochenmark disseminierten Tumorzellen bevorzugt durch den Nachweis von Zytokeratinepitopen detektiert. Zytokeratine sind charakteristische Bestandteile der Stützfilamente epithelialer Zellen [Moll et al., 1982]. Sie stellen stabil exprimierte Merkmale in Tumorzellen dar, die in einzelnen Karzinomzellen eindeutig nachweisbar sind, während sie in mesenchymalen Zellen nicht zu finden sind. Auf diese Weise lassen sich einzelne epitheliale Tumorzellen zuverlässig von mesenchymalen Knochenmarkzellen differenzieren [Pantel et al., 1997; Pantel et al., 1999]. Nur in wenigen Ausnahmefällen ist bei gesunden, nicht an einem Karzinom erkrankten Personen der Nachweis von zytokeratinhaltigen Zellen im Knochenmark erbracht worden [Pantel und Riethmüller, 1996; Braun et al., 2000b]. Eine Kontaminierung durch epitheliale Zellen bei der Punktion kann auch für CK-positive Befunde verantwortlich sein.

Prinzipiell kann der Zytokeratinnachweis über unterschiedliche Methoden erfolgen. Zum einen werden molekularbiologische Techniken wie die reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) angewendet (Übersichtsarbeit von [Lacroix und Doeberitz, 2001]). Das andere weit verbreitete Nachweisverfahren ist die Immunzytochemie. Hierauf wird im folgenden näher eingegangen, da die in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzmethoden auf den immunzytochemischen Prinzipien basieren. Zellantigene, in diesem Fall Zytokeratinkomponenten, werden durch einen Primärantikörper markiert, dessen Lokalisation durch die Zugabe eines Sekundärantikörpers und anschließende optische Darstellung sichtbar gemacht werden. Dazu werden enzymatische Methoden wie die APAAP-Färbung angewendet [Cordell et al., 1984; Pantel et al., 1994] oder es wird, wie in unserem Labor, mit gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet [Noack et al., 2000; Noack et al., 1999]. Der 1987 erstmals eingesetzte Anti-Zytokeratin-Antikörper CK2 richtete sich

gegen Zytokeratin 18 [Schlimok et al., 1987]. Mittlerweile gilt der monoklonale Antikörper A45-B/B3, ein sogenannter „Panzytokeratinmarker“ als anerkannter Standard. Er richtet sich gegen die Zytokeratinkomponenten 8, 18 und 19 [Kasper et al., 1987] und zeigt eine nur sehr geringe Rate falsch positiver Ergebnisse [Braun et al., 2000b]. Die Nachweisgrenze dieser immunzytochemischen Methoden liegt bei 1 je $10^5 - 10^6$ Zellen [Braun und Pantel, 1998].

Die meisten Studien zu disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurden bisher bei Mammakarzinompatientinnen durchgeführt. Im Mittel wurden hier zum Zeitpunkt der Primärtherapie bei 32% der Patientinnen disseminierte Tumorzellen immunzytochemisch nachgewiesen [Sinz et al., 2001a]. In prospektiven Studien zeigten sich Korrelationen zwischen dem Vorhandensein isolierter Tumorzellen im Knochenmark und einer schlechteren klinischen Prognose. Uneinheitlich ist jedoch die Bewertung, ob diese disseminierten Tumorzellen einen unabhängigen Prognosefaktor darstellen [Funke und Schraut, 1998]. Diese Tatsache, bezogen auf die Gesamtüberlebenszeit bzw. das krankheitsfreie Überleben der Patientinnen, ergibt sich nur aus einem Teil der durchgeführten Studien [Harbeck et al., 1994; Mansi et al., 1999; Diel et al., 1996; Braun et al., 2000b] (siehe Tab.1). Die unterschiedlichen Ergebnisse resultieren aus verschiedenen angewandten Methoden, die sich vor allem in den verwendeten Primärantikörpern und der Anzahl der analysierten Zellen unterscheiden. Deswegen erscheint ein standardisiertes Vorgehen sinnvoll. Eine Untersuchung von mindestens 2×10^6 Knochenmarkszellen aus zwei Aspirationsstellen werden als Minimalanforderung ebenso gestellt wie eine enge Zusammenarbeit zwischen Grundlagenforschern, Pathologen, Zytologen und Klinikern [Borgen et al., 1999].

Für zahlreiche weitere Karzinome existieren Studien über disseminierte Tumorzellen im Knochenmark, wobei sich in vielen Fällen eine prognostische Relevanz abzeichnet. Allerdings sind auch hier die Unterschiede bezüglich der methodischen Vorgehensweise zu beachten. Eine Übersicht der bisherigen Ergebnisse ist in Tabelle 1 aufgeführt. Gerade die Resultate der Studien zum kolorektalen Karzinom und zum Zervixkarzinom sind beachtenswert, da hier – anders als beim Mammakarzinom, dafür ähnlich wie beim Ovarialkarzinom – nur selten eine Metastasierung ins Knochengewebe stattfindet. Für das kolorektale Karzinom zeigte sich prognostisch unabhängig ein verkürztes krankheitsfreies Intervall. Das Rezidiv trat jedoch nur in wenigen Fällen im Knochen oder im Knochenmark auf [Lindemann et al., 1992]. Beim Zervixkarzinom, das ebenso wie das Ovarialkarzinom ein

vorwiegend lokoregionäres Progressionsmuster aufweist, haben Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen eine kürzere metastasenfreie Überlebenszeit [Janni et al., 2003].

Tabelle 1: Übersicht über immunzytochemische Studien zur prognostischen Relevanz von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit soliden malignen Tumoren (Ovarialkarzinom, siehe 1.1.2, Tabelle 2)

| Karzinomart | Marker | Detektionsrate | prognost. Relevanz | Autor |
|-------------|----------------------|--|--------------------|-------------------------|
| Mamma | CK, C26, T16 | 18 / 49 (37%) | DFS | Cote et al., 1991 |
| | TAG 12 | 315 / 727 (43%) | DFS* | Diel et al., 1996 |
| | CK, EMA, TAG 12 | 38 / 100 (38%) | DFS, OS* | Harbeck et al., 1994 |
| | CK 18, 19 | 25 / 128 (19%) | DFS, OS* | Landys et al., 1998 |
| | CK 8,14,15, 16,18,19 | 27 / 71 (38%) | Keine | Singletary et al., 1991 |
| | EMA | 89 / 350 (25%) | DFS, OS | Mansi et al., 1999 |
| | CK 18 | 165 / 581 (28%) | Keine | Untch et al., 1999 |
| | CK 8,18,19 | 199 / 552 (36%) | DDFS, OS* | Braun et al., 2000b |
| | CK 8,18,19 | 126 / 484 (31%) | DFS, OS* | Gerber et al., 2001 |
| | CK, EMA | 230 / 508 (45%) | DFS, OS | Gebauer et al., 2004 |
| Lunge | CK 18 | 83 / 139 (54%) | DFS* | Pantel et al., 1996 |
| | CK 18 | 27 / 58 (47%) | OS | Sugio et al., 2002 |
| Ösophagus | CK 8,18,19 | 29 / 75 (39%) | OS* | Thorban et al., 2000 |
| | CK 18 | 23 / 55 (42%) ¹ 34 / 51 (67%) ² | nicht untersucht | Ryan et al., 2004 |
| Magen | CK 18 | 34 / 97 (35%) | DFS | Schlimok et al., 1991 |
| | CK 18 | 95 / 180 (53%) | DFS | Jauch et al., 1996 |
| | CK 18/uPA-R | 97 / 156 (62%) | DFS*, OS* | Heiss et al., 2002 |
| | CK | 114 (29%) | nicht untersucht | de Manzoni et al., 2002 |
| | CEA | 8 / 26 (31%) | OS | Jonas et al., 2004 |
| Kolo-Rektum | CK 18 | 42 / 156 (27%) | DFS | Schlimok et al., 1990 |
| | CK 18 | 28 / 88 (32%) | DFS* | Lindemann et al., 1992 |
| Zervix | CK 8,18,19 | 38 / 130 (29%) | DDFS* | Janni et al., 2003 |

C 26 und T 16 = epitheliale Zelloberflächenantigene ; EMA = epitheliales Membranantigen ; TAG 12 = tumorassoziiertes Glykoprotein ; NSCLC = nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom ; DFS = signifikante Korrelation zwischen positivem Knochenmarkstatus und rezidivfreiem Überleben; * = prognostischer Wert durch multivariate Analyse bestätigt; DDFS = signifikante Korrelation zwischen positivem Knochenmarkstatus und fernmetastasenfreies Überleben; OS = signifikante Korrelation zwischen positivem Knochenmarkstatus und Gesamtüberleben; ¹ = nach neoadjuvanter Chemotherapie; ² = bei Primär-OP

Neben der Eigenschaft als Prognosefaktor interessieren zusätzliche Aussagen über die spezifische biologische Beschaffenheit der disseminierten Tumorzellen. Einsichten in funktionelle Eigenschaften der disseminierten Tumorzellen können entscheidende Informationen über deren Aggressivität liefern. Durch immunzytochemische Doppelfärbungen kann das Antigenprofil der Zellen – ihr Phänotyp – näher charakterisiert werden. In Hinblick auf das maligne Potential der Tumorzellen sind Antigene, die im Zentrum des Metastasierungsprozess stehen, von besonderem Interesse. Der uPA-Rezeptor (siehe 1.2.2.1) eignet sich als Marker für Proliferation und Invasionsfähigkeit und das HER-2/neu-Protein (siehe 1.2.2.2) als Marker für onkogen-induzierte Wachstumsfaktor-Stimulation. Zudem könnten diese Antigene Zielstrukturen für neue zielgerichtete Antikörpertherapien darstellen. Diese Therapeutika sind ein zusätzlicher Pfeiler in einem multimodalen, individualisierten Therapiekonzept, unabhängig von dem Einsatz adjuvanter Chemotherapie. Gerade da Chemotherapeutika zwar gut gegen stark proliferierende Tumorzellen wirken, weniger bis kaum aber gegen Zellen in der G₀-Phase, hätten spezifische, zielgerichtete Antikörper vor allem an den „dormant cells“ der MRD ihren Angriffspunkt (Übersichtsarbeiten von [Pantel und Riethmüller, 1996; Dillman, 1994]). Therapeutische Antikörper wie Trastuzumab (HerceptinTM), ein humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen das HER-2/neu-Onkoprotein, sind beim metastasierten Mammakarzinom bereits im klinischen Einsatz [Slamon et al., 2001]. Andere Antikörper, z.B. gegen uPA, sind noch im Erprobungsstadium [Wilex AG, 2004]. Auch bei Patienten mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sind erste Antikörpertherapiestudien nach Phänotypisierung durchgeführt worden. Dazu kam Edrecolomab, ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen EpCAM, ein epitheliales Zelladhäsionsmolekül, bei Mammakarzinompatientinnen mit lokoregionärem Rezidiv bzw. Fernmetastasierung zum Einsatz. Nach der Antikörperbehandlung waren in allen Fällen weniger CK-/EpCAM-positive Zellen im Knochenmark nachzuweisen [Braun et al., 1999]. Bereits 1987 ergaben sich bei Patienten mit Mamma- und Kolonkarzinom ähnliche Resultate [Schlimok et al., 1987]. Ein weiterer Ansatz ist die Kombination von Chemotherapie und Antikörpertherapie. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme disseminierter Tumorzellen nach der Kombinationstherapie bei Hochrisikopatientinnen mit Mammakarzinom [Hempel et al., 2000]. Alle drei genannten Studien sind allerdings an extrem kleinen Patientenkollektiven erhoben.

1.1.2 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark beim Ovarialkarzinom

Patientinnen mit Ovarialkarzinom versterben meist eher an lokal progredientem Tumorwachstum als an Fernmetastasen. Autopsiestudien belegen trotzdem eine okkulte hämatogene Metastasierung beispielsweise als maligne Pleuraergüsse, in der Leber, in der Lunge und auch im Skelettsystem [Abdul-Karim et al., 1990; Dauplat et al., 1987; Rose et al., 1989]. Bisher wurden beim Ovarialkarzinom nur wenige Untersuchungen auf disseminierte Tumorzellen im Knochenmark durchgeführt. In einer größeren Studie konnten bei 30% der Patientinnen isolierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Die Disseminierung fand bereits zu einem frühen Krankheitszeitpunkt statt und trat in allen FIGO-Stadien auf. Das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen im Knochenmark korrelierte mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit [Braun et al., 2001a].

Zu einem anderen Ergebnis kommt eine Studie, die zirkulierende Tumorzellen im Knochenmark und auch im peripheren Blut untersuchte. Methodisch unterschied sich die Arbeit in der Detektion der Zellen durch einen Antikörper gegen das pancarcinoma / epithelial glycoprotein (EPG-2) und der positiven Anreicherung mittels antikörpergekoppelter Magnetbeads. Marth et al. fanden keine Assoziation zwischen Tumorzellnachweis und einer schlechteren Prognose für die Patientinnen [Marth et al., 2002].

In weiteren Untersuchungen, die mit anderen Primärantikörpern als dem etablierten Panzytokeratin-Antikörper A45-B/B3 durchgeführt wurden, wurden bei 18 - 47% der Patientinnen isolierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen. Bei z.T. kleinen Fallzahlen wurde eine prognostische Relevanz nicht untersucht bzw. war nicht zu belegen [Roggel et al., 2003; Gabriel et al., 2000; Ross et al., 1995; Cain et al., 1990].

Die bisherigen Arbeiten zur Tumorzelldisseminierung im Knochenmark beim Ovarialkarzinom sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom

| Marker | Detektionsrate | Prognostische Relevanz | Autor |
|---------------------------------|----------------|------------------------|----------------------------------|
| CK 8/18/19 | 18 / 60 (30%) | nicht untersucht | Roggel et al., 2003 ¹ |
| EGP-2 | 15 / 73 (20%) | nicht signifikant | Marth et al., 2002 |
| CK 8/18/19 | 32 / 108 (30%) | DDFS* | Braun et al., 2001a |
| CK, CA 125 | 9 / 49 (18%) | nicht signifikant | Gabriel et al., 2000 |
| TFS-4, OV-632, TFS-2, SB-3** | 9 / 19 (47%) | nicht untersucht | Ross et al., 1995 |
| CK | 12 / 53 (23%) | nicht signifikant | Cain et al., 1990 |

¹ vorveröffentlichte Zwischenergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit

* signifikante Korrelation zwischen positivem Knochenmarkstatus und metastasenfreiem Überleben als unabhängiger Parameter in multivariater Analyse

** Antikörper-Cocktail gegen Ovar- oder Drüseneithelstrukturen

DDFS = metastasenfreies Überleben

1.2 Das Ovarialkarzinom

1.2.1 Epidemiologie des primären Ovarialkarzinoms

Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms liegt in Deutschland bei 17,7 neu diagnostizierten Fällen pro 100 000 pro Jahr, das sind z.B. 7437 Neuerkrankungen für das Jahr 1998. Im Jahr 1999 verstarben 5847 Patientinnen an ihrer Erkrankung [Tumorzentrum München, 2004; RKI, 2002; Statistisches Bundesamt, 2000]. Damit steht in Deutschland Eierstockkrebs an siebter Stelle der malignen Tumorerkrankungen bei Frauen und ist somit nach dem Endometriumkarzinom der zweithäufigste Genitaltumor. Auch bei den durch Krebs bedingten Todesursachen steht das Ovarialkarzinom an siebter Stelle. Unter den gynäkologischen Malignomen stellt es die Haupttodesursache dar [Holschneider und Berek, 2000].

Aufgrund fehlender Krankheitszeichen in den frühen Stadien werden 70% der Ovarialkarzinome erst nach einem längeren symptomlosen Intervall in den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III oder IV entdeckt. Dies ist die wesentliche Ursache für die niedrige Gesamt-Fünfjahres-Überlebensrate von 40%.

1.2.2 Etablierte und neue Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom

Der entscheidende Prognosefaktor ist die Tumorausbreitung bei Erstdiagnose. Patientinnen mit Ovarialkarzinom haben im Stadium FIGO I eine Fünfjahres-Überlebensrate von 89%, im Stadium FIGO II von 57%, im Stadium FIGO III liegt sie bei 24%, im Stadium IV nur mehr bei 12% [Nguyen et al., 1993; Holschneider und Berek, 2000]. Innerhalb des fortgeschrittenen Tumorstadiums FIGO III ist der postoperativ verbliebene Tumorrest als stärkster unabhängiger Prognosefaktor entscheidend. Patientinnen, die tumorfrei operiert werden können, leben signifikant länger als Patientinnen, bei denen Tumorreste in situ zurückbleiben. Je größer der verbleibende Tumorrest ist, umso ungünstiger ist die Prognose zu bewerten [Brun et al., 2000; Makar et al., 1995].

Neuere Prognoseparameter berücksichtigen diejenigen biologischen Eigenschaften eines Tumors, die eine wichtige Bedeutung bei der Entstehung und Progression von Karzinomen haben. Mit ihrer Etablierung begann beim Mammakarzinom die Entwicklung weg von starren Therapieschemata, die auf alle Patientinnen in gleicher Weise angewendet werden, hin zu individualisierten, risikoadaptierten Therapiekonzepten [Harbeck et al., 1999]. Auch beim Ovarialkarzinom beginnt man nun, noch nicht in gleicher Intensität, eine Individualisierung in der adjuvanten Therapie einzuführen [Eisenhauer et al., 1999]. Möglicherweise könnte in Zukunft auch der Knochenmarkstatus eine Hilfe zur Therapieentscheidungen bei speziellen Subgruppen darstellen.

1.2.2.1 uPA-Rezeptor und Plasminogenaktivator-System

In den letzten Jahren wurde der Stellenwert von Faktoren der tumorassoziierten Proteolyse bei der Progression solider Tumoren erkannt. Die Metastasierung beim Ovarialkarzinom erfolgt durch die Tumorausdehnung in Becken und Bauchhöhle mit Nachweis von Tumorzellen im Aszites und durch lokale Invasion ins Peritoneum. Fernabsiedlungen sind auch in fortgeschrittenen Tumorstadien selten. Dieses Ausbreitungsverhalten deutet darauf hin, dass Proteolysemechanismen bei der Progression des Ovarialkarzinoms eine entscheidende Rolle spielen.

Ein wichtiger Schritt bei der Entstehung eines invasiven Karzinoms aus benignem Gewebe ist die Fähigkeit einzelner Tumorzellen, die Basalmembran zu durchsetzen und das umliegende Stroma und die extrazelluläre Matrix abzubauen. Die Protease uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp), ihr Zelloberflächenrezeptor uPA-R (CD 87), sowie Plasmin(ogen) und die Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 spielen hierbei eine zentrale Rolle. uPA katalysiert die Umsetzung von Plasminogen zu Plasmin, das den Abbau der extrazellulären Matrix bewirkt. Zusätzlich zur proteolytischen Aktivität besitzt uPA zytokinartige, mitogene und adhäsive Eigenschaften [Reuning et al., 1998]. Im Zentrum des Plasminogenaktivator-Systems steht der erstmals 1985 beschriebene uPA-R. Um seine Aktivität zu entfalten, muss uPA an einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor uPA-R gebunden sein. So wird die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin katalysiert und der Abbau extrazellulärer Matrix bewirkt [Vassalli et al., 1985]. Durch zwei spezifische Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 wird die uPA-Aktivität reguliert.

Untersuchungen bei verschiedenen Karzinomarten konnten eine erhöhte Konzentration von uPA, uPA-R und PAI-1 im Tumorgewebe feststellen [Schmitt et al., 1997]. Das gilt auch für das Ovarialkarzinom. Hier erwiesen sich der uPA- und PAI-1-Gehalt als starke unabhängige Prognosefaktoren. Gerade auch innerhalb der Gruppe der tumorfrei operierten Patientinnen kann so die Prognose differenziert werden [Kuhn et al., 1999]. Auch für uPA-R wurde ein Zusammenhang zwischen uPA-R-Expression und Aggressivität des Tumors gezeigt. Schmalfeldt et al. fanden signifikant erhöhte Werte für uPA-R in Ovarialkarzinomgewebe verglichen mit benignen Ovarialtumoren. Neben Primärtumorgewebe wurden in dieser Arbeit auch Lymphknoten- und Netzmetastasen untersucht, die einen tendenziell höheren uPA-R-Gehalt aufwiesen [Schmalfeldt et al., 1995].

Auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurde uPA-R erstmals von der Arbeitsgruppe Heiss, Allgayer et al. nachgewiesen. Diese Phänotypisierung wurde bei Patienten mit Magenkarzinom durchgeführt [Heiss et al., 1995; Allgayer et al., 1997b; Allgayer et al., 1997a]. In einer neueren Arbeit wurde dabei die uPA-R-Expression auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Magenkarzinompatienten als unabhängiger Prognosefaktor für rezidivfreies Überleben sowie Gesamtüberlebenszeit festgestellt [Heiss et al., 2002]. Auch für das Mammakarzinom ist die uPA-R-Expression auf disseminierten Tumorzellen untersucht worden [Krüger et al., 2001].

1.2.2.2 HER-2/neu

Ein weiterer tumorbiologischer Faktor ist das Proto-Onkogen HER-2/neu (c-erbB-2). Es ist auf Chromosom 17q lokalisiert und kodiert für einen transmembranösen Glykoproteinrezeptor vom Tyrosinkinase-Typ („Human Epithelial Growth Factor Receptor 2“). Er weist eine Homologie zum epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, c-erbB-1) auf. Das Molekül besteht aus drei Untereinheiten, einer extrazellulären Domäne, einem kurzen transmembranösen Anteil und der intrazellulären Einheit. Die Aktivierung des HER-2/neu Proto-Onkogens wird durch Gen-Amplifikation verursacht und führt zur Protein-Überexpression. Zur Bestimmung der HER-2/neu-Gen-Amplifikation werden molekularbiologische Methoden wie Southern Blot, Polymerasekettenreaktion (PCR) und die

Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) angewendet. Die Protein-Überexpression kann mittels Immunhistochemie dargestellt werden [Lebeau et al., 2001; Yeh, 2002].

Eine Amplifikation des HER-2/neu-Onkogens oder die Überexpression des HER-2/neu-Proteins wird in etwa 20 - 35% der Ovarialkarzinome beschrieben [Agus et al., 2000]. Aufgrund der verschiedenen angewendeten Methoden zum Nachweis einer HER-2/neu-Gen-Amplifikation bzw. -Überexpression ist die Beurteilung der prognostischen Information uneinheitlich. Während mehrere Arbeitsgruppen eine signifikante Korrelation zwischen HER-2/neu-Überexpression und aggressiverem Verlauf der Tumorerkrankung fanden [Slamon et al., 1989; Berchuck et al., 1990; Felip et al., 1995; van Dam et al., 1994; Meden et al., 1998], konnten andere Autoren diese Ergebnisse nicht bestätigen [Scambia et al., 1993; Rubin et al., 1993; Fajac et al., 1995; van der Zee et al., 1995].

Auch auf disseminierten Tumorzellen wurde bei Patientinnen mit Mammakarzinom eine Überexpression von HER-2/neu gefunden [Pantel et al., 1993]. Braun et al. konnten ebenfalls bei Mammakarzinom-Patientinnen zeigen, dass eine HER-2/neu-Überexpression auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mit einer schlechteren klinischen Prognose einhergeht [Braun et al., 2001b].

Neben der Eigenschaft als möglicher prognostischer Parameter verspricht man sich in letzter Zeit auch weitergehende Aussagen von HER-2/neu. So wurde eine HER-2/neu-Überexpression mit einer möglichen Chemotherapieresistenz in Zusammenhang gebracht [Meden et al., 1998]. Zum anderen steht mit Trastuzumab (HerceptinTM), einem humanisiertem, monoklonalen Antikörper, der gegen das HER-2/neu-Onkoprotein gerichtet ist, eine zusätzliche Behandlungsoption in einem multimodalen Therapiekonzept zur Verfügung. Erste Therapiestudien bei Patientinnen mit rezidiviertem bzw. therapierefraktärem Ovarialkarzinom wurden bereits durchgeführt, die Ansprechraten waren allerdings niedrig [Bookman et al., 2003].

1.2.3 Therapiestrategien

1.2.3.1 Konventionelle Therapie des Ovarialkarzinoms

Das heutige Therapiekonzept des Ovarialkarzinoms besteht aus zwei wesentlichen Komponenten:

1. eine möglichst radikale Tumorentfernung mittels Operation (Tumor-Debulking)
2. eine postoperative platin- und / oder paclitaxelhaltigen Polychemotherapie (siehe Übersichtsarbeit von [Christian und Thomas, 2001]).

Durch zunehmende Radikalität bei der primären Laparotomie und die darauffolgende adjuvante Chemotherapie verlängerten sich die Überlebenszeit bzw. die progressionsfreie Zeit im Vergleich zu früheren Jahren. Hierbei ist die möglichst vollständige Tumorentfernung die beste Voraussetzung für die Wirkung der folgenden Chemotherapie. Der postoperative Tumorrest ist der wichtigste Prognosefaktor hinsichtlich des Überlebens beim Ovarialkarzinom (siehe 1.2.2) [Le et al., 1997; Bristow et al., 2002]. Zur Prognoseverbesserung sollte daher die Primärtherapie in einem operativen Zentrum mit Erfahrung auf diesem Gebiet erfolgen.

1.2.3.2 Neoadjuvante Chemotherapie

Der Begriff „neoadjuvante Chemotherapie“ bezeichnet eine (Induktions-) Chemotherapie mit dem nachfolgenden Versuch der Entfernung der Resttumoren. Man spricht auch von „präoperativer“ oder „primärer Chemotherapie“. Man geht von der Tatsache aus, dass Patientinnen mit ungünstigen operativen Ausgangskriterien (u.a. diffuse Peritonealkarzinose) nur wenig vom konventionellen Vorgehen (Tumor-Debulking gefolgt von Chemotherapie) profitieren. Es gibt jedoch Hinweise, dass diese Patientinnen von einer präoperativen, neoadjuvanten Chemotherapie profitieren. Dazu erfolgt nach histologischer Diagnosesicherung durch Laparoskopie eine platin-/taxanhaltige Chemotherapie über drei Zyklen, anschliessend wird das operative Tumor-Debulking durchgeführt, gefolgt von erneuten drei Zyklen der oben genannten Chemotherapie. Im Vergleich zu konventionell

behandelten Patientinnen konnte bei der neoadjuvanten Chemotherapie eine signifikant höhere Tumorresektionsrate und ein signifikant längeres medianes Überleben erreicht werden [Kuhn et al., 2001; Ansquer et al., 2001]. Bisher wird diese Art der Therapie aber ausschließlich unter Studienbedingungen vorgenommen. Für die Einzelheiten der Chemotherapieprotokolle wird auf das Tumormanual „Maligne Ovarialtumoren“ des Tumorzentrums Münchens 2001 verwiesen [Tumorzentrum München, 2001].

Welche Wirkung eine (neoadjuvante) Chemotherapie auf disseminierte Tumorzellen im Knochenmark hat, ist beim Ovarialkarzinom bislang nicht untersucht worden. Bei Mammakarzinompatientinnen ergab eine Studie keinen Einfluss einer Chemotherapie auf das Vorhandensein einzelner Tumorzellen im Knochenmark [Braun et al., 2000a]. Eine Untersuchung, die das Auftreten minimal residueller Tumorerkrankung im Knochenmark vor und nach einer Chemotherapie beurteilte, zeigte – ebenfalls beim Mammakarzinom – zwar eine Reduktion der Anzahl der disseminierten Tumorzellen, allerdings keine vollständige Elimination [Krüger et al., 2001]. Selbst nach der Behandlung mit Hochdosis-Chemotherapien persistieren einzelne Tumorzellen im Knochenmark [Hohaus et al., 1996].

2. Zielsetzung

Seit 1998 wird in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München auf dem Gebiet der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark gearbeitet. Noack et al. entwickelten Immunfluoreszenztechniken, die es erlauben, die Analyse einzelner Zellen an einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (CLSM) durchzuführen [Noack et al., 2000]. Folgende Fragestellungen und Zielsetzungen ergaben sich für diese Arbeit:

1. Zu welchem Prozentsatz und bei welchen FIGO-Stadien kann der Nachweis von zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom erbracht werden?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom und etablierten Prognosefaktoren?
3. Wie beeinflusst eine neoadjuvante Chemotherapie das Vorhandensein von zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark?
4. Wie sind die gefundenen CK-positiven Zellen bezüglich uPA-R-Expression qualitativ und quantitativ näher zu charakterisieren? Ist das Ausmaß der Expression des uPA-R auf zytokeratin-positiven Zellen mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung assoziiert?
5. Kann eine neue Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Zytokeratin und HER-2/neu zur weiteren Phänotypisierung und Charakterisierung der zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark entwickelt werden?

Zusammenfassend sollte also zum einen eine methodische Erweiterung durch die Entwicklung einer neuen Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Zytokeratin und HER-2/neu eingeführt werden. Weiterhin sollte der Zusammenhang des Nachweises zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark mit etablierten Prognosefaktoren sowie mit

dem Krankheitsverlauf geprüft werden. Auch der Einfluss einer Chemotherapie auf disseminierte zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark war Ziel der Untersuchungen.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Zwischen November 1998 und Juni 2001 wurde bei 84 Patientinnen, die mit Ovarialkarzinom an der Frauenklinik am Klinikum rechts der Isar der TU München behandelt wurden, während der Operation eine Knochenmarkaspiration durchgeführt. Der Altersmedian der Patientinnen lag bei 61 Jahren (28 – 81). Die Knochenmarkspunktion war Teil der klinischen Diagnostik. Alle Patientinnen gaben ihr schriftliches Einverständnis.

In allen Fällen mit potentiell kurativer therapeutischer Zielsetzung wurde ein radikales Tumordebulking mit Adnektomie beidseits, Hysterektomie, Omentektomie, Lymphknotendisektion und Entfernung aller makroskopisch erkennbarer Tumorknoten angestrebt. Dabei wurden zum Teil auch Darmanteile reseziert. Nach der Operation erfolgte die adjuvante Therapie grundsätzlich nach den Empfehlungen für maligne Ovarialtumoren des Tumorzentrum Münchens [Tumorzentrum München, 2001].

Im Rahmen einer laufenden Studie „Primäre Chemotherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom“ (Leitung: Prof. Dr. W. Kuhn) wurde bei einer Subpopulation des Patientinnenkollektivs mit einer schlechten Ausgangssituation für eine mögliche RO-Resektion zunächst durch eine Laparoskopie histologisch die Diagnose verifiziert. Danach erhielten sie drei Zyklen einer platinhaltigen neoadjuvanten Chemotherapie. Anschliessend erfolgte die Laparotomie mit Tumordebulking. Postoperativ folgten erneut drei Zyklen Chemotherapie. Bei 13 Patientinnen wurden zum Zeitpunkt der Laparoskopie, also vor der neoadjuvanten Chemotherapie, und auch bei der nachfolgenden Laparotomie, nach der neoadjuvanten Chemotherapie, Knochenmarkaspirate entnommen.

Die Klassifikation des Tumors, des Tumorstadiums und des histopathologischen Grades wurde vom Institut für Pathologie der TU München (Prof. Dr. H. Höfler) nach der Klassifikation der WHO und der Stadieneinteilung nach dem TNM-System der UICC vorgenommen, die sich mit der Einteilung der FIGO deckt [Scully, R. E. et al., 1999; UICC, 1997].

Im gleichen Zeitraum wurde im Rahmen der Diagnostik bei Ovarialtumoren bei 23 Patientinnen mit benignen Erkrankungen ebenfalls eine Knochenmarkaspiration vorgenommen. Diese Patientinnen stellten das Vergleichskollektiv dar.

3.2 Methoden

3.2.1 Knochenmarkaspiration

Alle Patientinnen wurden vor dem Eingriff ausführlich über das Ziel der Untersuchung, die Durchführung, Risiken und eventuelle Komplikationen einer Knochenmarkpunktion aufgeklärt. Nur bei schriftlich vorliegender Einverständniserklärung wurde Knochenmark entnommen.

Die Knochenmarkaspiration erfolgte bei allen Patientinnen unmittelbar präoperativ in Intubationsnarkose. 80 Aspirationen wurden in Rechtsseitenlage am linken Beckenkamm von dorsal an der Spina iliaca posterior superior punktiert. Nach Erweiterung der Untersuchungen am gewonnenen Knochenmark wurden 17 Patientinnen in Rückenlage an beiden Beckenkämmen von ventral an der Spina iliaca anterior superior punktiert, um mehr Knochenmark zu gewinnen. Nach sterilem Abwaschen und Abdecken des Punktionsgebietes wurde eine Stichinzision der Haut durchgeführt, um einer Verunreinigung des Untersuchungsmaterials mit zytokeratinhaltigen Keratinozyten entgegen zu wirken. Mit einer grosslumigen Punktionskanüle wurden ca. 2 ml Knochenmark stossweise in eine mit 1 ml EDTA gefüllte 5 ml-Einwegspritze aspiriert. Dieses Knochenmark wurde von der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar, TU München als Qualitätskontrolle untersucht. Für unsere Untersuchungen wurden in heparinisierte 10 ml-Einwegspritzen je 5 - 7 ml Knochenmark entnommen. An jeder Punktionsstelle wurde die Hohlnadel nach dieser Aspiration wieder zurückgezogen, die Haut wurde über dem Beckenkamm ca. 0,5 cm verschoben und durch dieselbe Stelle der Hautinzision noch eine weitere Knochenmarkaspiration an benachbarter Stelle durchgeführt. Nach Entfernen der Kanüle wurde über den Punktionsstellen ein steriler Verband angelegt und 10 min komprimiert. Das entnommene Knochenmark wurde sofort nach der Gewinnung in zwei sterile, mit je 3 ml Heparin gefüllte 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Der Transport sowie die sofort im

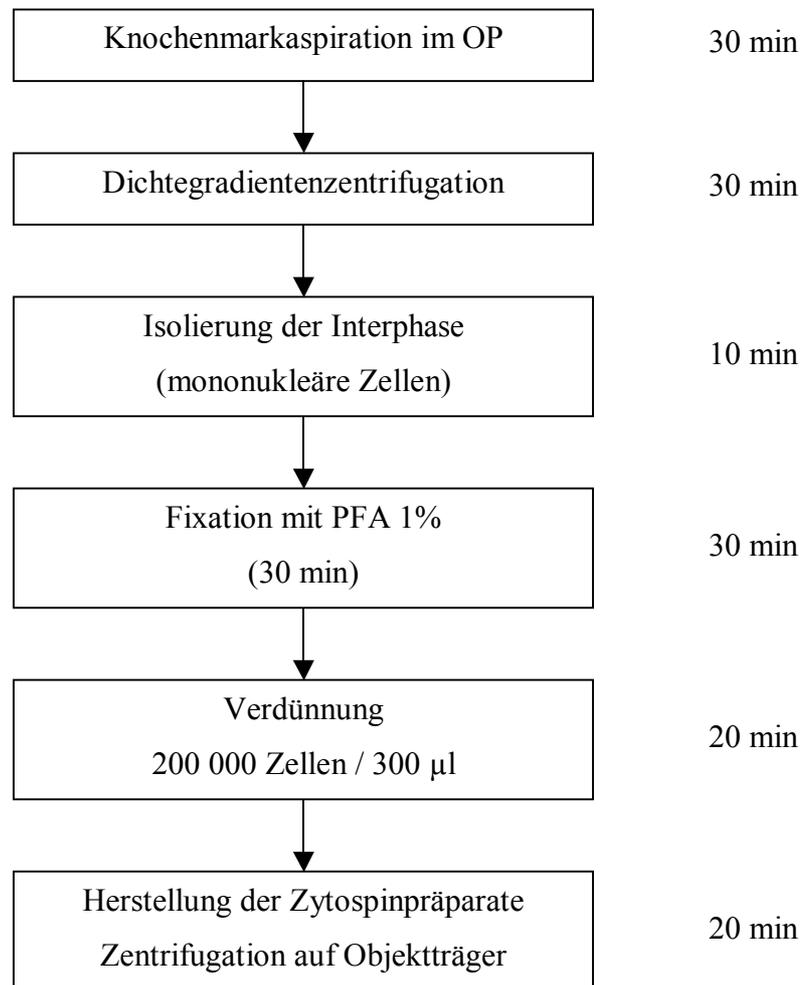
Anschluss daran begonnene weitere Verarbeitung des Knochenmarks erfolgte ab diesem Zeitpunkt auf Eis.

3.2.2 Bearbeitung des Knochenmarks

Die Präparation erfolgte sofort im Anschluss an die Punktion gemäß der von Loos und Roos 1974 erstmals beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll (relative Dichte 1.077). Diese Methode ermöglicht die selektive Isolierung der Fraktion mononukleärer Zellen [Loos und Roos, 1974].

Das heparinisierte Knochenmarkspirat wurde zunächst 1:1 mit PBS-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,96 mM KH₂PO₄, pH 7,4) verdünnt. Dann wurde in mehreren 15 ml-Falcon-Röhrchen je 7 ml Lymphozytenseparationsmedium vorgelegt, auf das vorsichtig je 8 ml des verdünnten Knochenmarks überschichtet wurden. Anschließend wurde 20 min eine Dichtezentrifugation bei 400 x g und 4°C durchgeführt, um die mononukleären Zellen (Knochenmarkzellen, Tumorzellen und Leukozyten aus der peripheren Blutbeimengung) in der Interphase zu isolieren. Die Interphase wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in zwei Waschzentrifugationsschritten mit 3 ml PBS gereinigt. Danach erfolgte eine 30-minütige Fixierung der Zellen mit 1% Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur. Wieder folgten zwei Waschschrte mit PBS. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der in der Suspension vorhandenen mononukleären Zellen bestimmt. Danach erfolgte eine Verdünnung mit PBS-Puffer auf eine Konzentration von 200 000 Zellen pro 300 µl Zellsuspension. Pro Knochenmarkspirat wurden mit einer Shandon Cytospin 2 Zentrifuge (450 rpm, 5 min) 24 Zytospinpräparate à 200 000 Zellen angefertigt. Die Präparate wurden staubgeschützt bei Raumtemperatur über Nacht luftgetrocknet und am folgenden Tag bei -80°C eingefroren. Der zeitliche Aufwand von der Knochenmarkaspiration bis zur Fertigstellung der Zytospins betrug etwa 3 Stunden (siehe Abb.1).

Abb.1: Bearbeitung des Knochenmarks

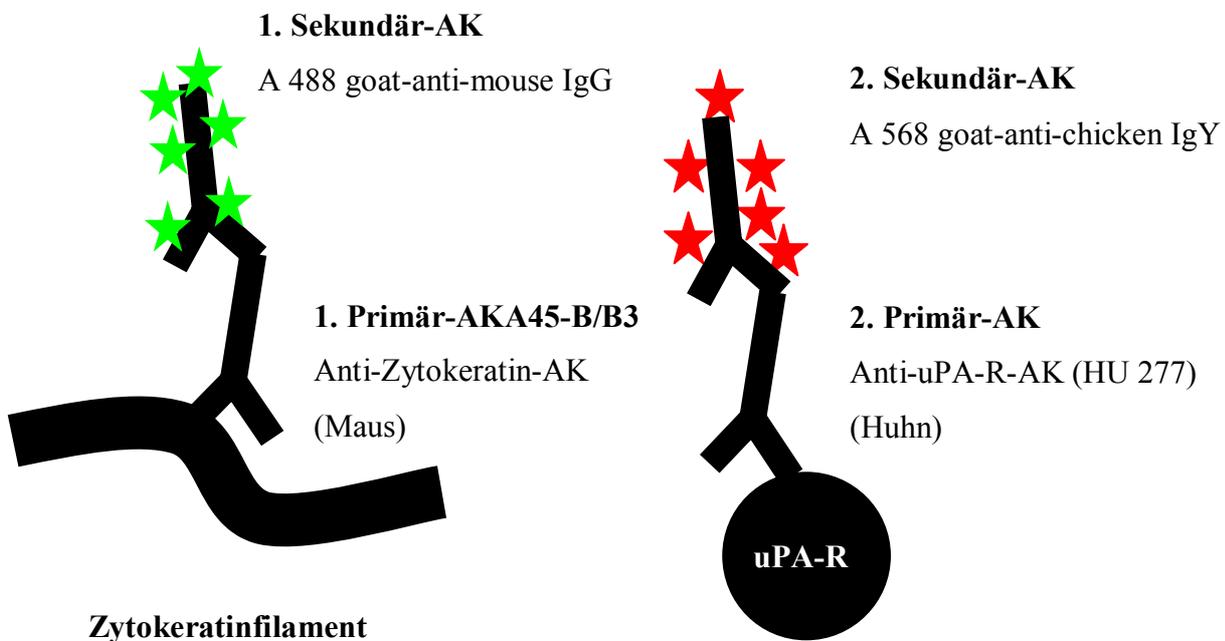


3.2.3 Zellanalyse und Nachweis CK+-Zellen mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen am CLSM

Der Tumorzellnachweis im Knochenmark erfolgte durch eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen Zytokeratinstrukturen und den uPA-Rezeptor. So wurden durch die Zytokeratinmarkierung knochenmarksständige Karzinomzellen (CK+) von Zellen des mesenchymalen Knochenmarkgewebes (CK-) unterschieden. Die Färbung des uPA-R diente zur weiteren Charakterisierung dieser Zellen [Noack et al., 2000].

Bei dieser Art der Färbung handelt es sich um eine indirekte immunzytochemische Methode mit monoklonalen bzw. polyklonalen Antikörpern. Ein unkonjugierter, monoklonaler Primärantikörper bindet gezielt an das gesuchte Antigen. Anschliessend bindet ein zweiter fluoreszenzmarkierter Antikörper an das F_c-Fragment des Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Fluochrom konjugiert [Noll, S. und Schaub-Kuhnen, S., 2000] (siehe Abb. 2). Für die Doppelmarkierung wurden zwei Primärantikörper aus unterschiedlichen Tierspezies ausgewählt, um Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper zu vermeiden. Außerdem unterschieden sich die an die Sekundärantikörper gekoppelten Fluochrome in ihrem Absorbitions- und Emissionsspektrum. So war durch entsprechende Einstellung der Filter am Mikroskop, mit denen unterschiedliche Anregung und Abstrahlung festgelegt wurden, eine getrennte Darstellung und somit ein Vergleich der Anfärbung zweier verschiedener Antigene am selben Präparat möglich.

Abb.2: Prinzip der Doppelimmunfluoreszenzfärbung: Beispiel für eine Doppelmarkierung von CK und uPA-R (nach [Noack et al., 2000])



3.2.3.1 CK-/uPA-R-Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Die Zytospinpräparate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einem Fettstift umkreist. In diesen Kreis wurden je 150 µl der verdünnten Antikörper pipettiert. Um ein Eintrocknen der Antikörperlösungen auf den Präpaten zu verhindern, erfolgten alle Arbeitsschritte in einer feuchten Kammer.

Alle in dieser Routinefärbung verwendeten Antikörper wurden in PBS/BSA 1% auf ihre in unserem Labor ausgetesteten optimalen Konzentrationen verdünnt. Der Lösung mit dem ersten Primärantikörper wurden zusätzlich noch 0,025% Saponin zugesetzt, um die Permeabilität der Zellmembranen zu erhöhen.

Folgende Antikörper wurden in der angegebenen Reihenfolge verwendet:

A45-B/B3 (Fa. Micromet GmbH, München): Klasse IgG₁, Spezies Maus, Verdünnung 1:100
Dieser murine monoklonale Antikörper ist ein sogenannter "Panzytokeratin-Antikörper". Er erkennt ein gemeinsames Epitop mehrerer Zytokeratinkomponenten (CK8, CK18 und CK19). Die Anfärbung der Zellen erfolgt zytoplasmatisch, denn Zytokeratine sind charakteristische Bestandteile der Stützfilamente epithelialer Zellen.

HU 277 (PD Dr. V. Magdolen, Frauenklinik der TU München): Klasse IgY, Spezies Huhn, Verdünnung 2:123

Dieser polyklonale Antikörper wurde 1994 in der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München entwickelt [Magdolen et al., 1995]. Er richtet sich gegen spezifische Strukturen des uPA-R. Die Anfärbung erfolgt vorwiegend membranbetont. Es bestehen Erfahrungen in der Anwendung an fixierten Gewebeschnitten wie auch bei disseminierten Tumorzellen.

Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse (Fa. Molecular Probes, Eugene, USA): Klasse IgG, Spezies: Ziege, Verdünnung 1:100

Der erste fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper erkennt und bindet an das mausspezifische F_c-Fragment des Primärantikörpers A45-B/B3.

Alexa Fluor® 568 goat anti-chicken (Fa. Molecular Probes, Eugene, USA): Klasse IgG, Spezies: Ziege, Verdünnung 1:40

Dieser zweite Sekundärantikörper erkennt und bindet den Primärantikörper der Spezies Huhn, HU 277. Seine Fluoreszenzmarkierung unterscheidet sich in Absorptions- und Emissionsspektrum vom ersten Sekundärantikörper.

Die Primärantikörper inkubierten 1 Stunde lang, die Sekundärantikörper 30 Minuten. Nach den Inkubationszeiten wurden die Präparate jeweils 3 x 3 Minuten mit PBS/BSA 1% gewaschen. Zum Schluß wurden die Präparate mit 8 µl PBS/BSA 1% benetzt und mit einem Deckgläschen bedeckt, das mit Fixogum befestigt wurde. Vom Zeitpunkt der Zugabe des ersten fluoreszierenden Sekundärantikörpers hin bis zur Auswertung war ein Arbeiten in abgedunkelter Umgebung notwendig. Die Auswertung der Präparate am CLSM erfolgte in der Regel unverzüglich im Anschluss an die Färbung. Bis zum Zeitpunkt der Beurteilung lagerten sie jedoch höchstens drei Tage in Dunkelheit im Kühlschrank bei 6°C. Eine Zusammenfassung des Färbeprotokolls gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Protokoll der CK-/uPA-R-Doppelimmunfluoreszenzfärbung

| 1. Primär-AK 1 h | 2. Primär-AK 1 h | 1. Sekundär-AK 30 min | 2. Sekundär-AK 30 min |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| A45-B/B3 | HU 277 | Alexa 488 Goat-anti-mouse | Alexa 568 Goat-anti-chicken |
| 1:100 µl | 2:123 µl | 1:100 µl | 1:40 µl |

In gleicher Weise wurden bei jeder Färbung Kontrollpräparate mitgefärbt, um eine korrekte Färbung zu garantieren. Als Negativkontrollen wurden Knochenmark-Zytospinpräparate von Patientinnen ohne maligne Tumorerkrankung verwendet [Braun et al., 2000b]. Die Positivkontrollen waren Zellkultur-Zytospinpräparate aus CK- und uPA-R-positiven OvMz 10-Zellen (Ursprung humanes Ovarialkarzinom) und ZR 75-Zellen (Ursprung humanes duktales Mammakarzinom). Nach dieser Methode wurden pro Patientin 10 Präparate, d.h. 2×10^6 Zellen gefärbt und ausgewertet. Nach der Entwicklung einer weiteren Färbetechnik für CK und HER-2/neu (siehe 2.2.3.4) wurden bei 16 Patientinnen 1×10^6 Zellen auf bewährte Weise und 1×10^6 Zellen nach der neuen Methode analysiert.

3.2.3.2 Auswertung der Doppelfärbung am CLSM

Die Analyse des Probenmaterials erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops. In unserem Labor wurde eine Kombination aus einem Mikroskop (Fa. Zeiss, Axiovert 35) und dem Argon/Krypton-Laserscanner (Fa. Leica, TCS 40) verwendet. Die dazugehörige Software Scanware 3.61 wurde ebenfalls von der Fa. Leica bezogen.

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ist eine Form der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie, die es ermöglicht, „optische Schnitte“ durch dreidimensionale Objekte zu legen. Dazu kann der Objektisch mit einer Auflösung von 40 nm auf der z-Achse bewegt werden. Mit einem konventionellen Lichtmikroskop ist es nicht möglich, eine einzelne Ebene des Präparates zu beobachten. Hier tragen Fluoreszenzsignale von ober- und unterhalb der Fokusebene liegenden Strukturen teilweise zu dem mikroskopischen Bild bei und legen sich unscharf über das eigentliche Bild. Mit der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie lassen sich diese Überlagerungen deutlich verringern. Das CLSM (Confocal Laserscanning-Microscope) diskriminiert Emissionen außerhalb des Fokus, d.h. Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, wird ausgeblendet. So können auch komplex aufgebaute Strukturen in ihrer dreidimensionalen Struktur quantitativ und qualitativ analysiert werden. Dieses Prinzip wurde 1957 von Minsky entwickelt und von Egger und Petran 1967 erstmals am Mikroskop angewandt [Egger und Petran, 1967; Davidovits und Egger, 1969]. Verschiedene monochromatische Laser dienen als Anregungslicht. Wellenlänge und Leistung können individuell verändert werden. In dieser Doktorarbeit wurden die Zytospins bei einer Wellenlänge von 488 nm in 400facher Vergrößerung systematisch durchgemustert. Bei dieser Anregung konnten vorhandene zytokeratin-positive Zellen durch ihre helle Fluoreszenz erkannt werden. Bei Zytokeratin-Positivität wurde auf dem zweiten Kanal des CLSMs ein Fluoreszenzbild bei einer Anregung mit 568 nm erstellt und damit die uPA-R-Expression auf der jeweiligen Zelle überprüft. Zugleich wurden alle CK-positiven Zellen immer auch im Transmissionsbild beurteilt. Dies brachte zusätzlich zur Fluoreszenzfärbung einen morphologischen Informationsgewinn.

Die Beurteilung und Bewertung erfolgte anonymisiert ohne Kenntnis des Patientinnennamens bzw. des klinischen Verlaufs durch die Verfasserin sowie durch zwei weitere Beobachter

(Prof. Dr. med. N. Harbeck und Dr. med. S. Braun). Als Kriterien für die Einstufung als Tumorzelle galten:

1. Die Zelle musste gegenüber dem Hintergrund der Knochenmarkszellen ein deutliches Fluoreszenzsignal, welches die Zytokeratinpositivität anzeigt, aufweisen.
2. Die betreffende Zelle musste unverletzt sein (keine geplatzen oder zerquetschten Zellen, kein Zelldetritus).
3. Die Zellen sollten nicht von anderen Knochenmarkszellen überlagert sein, damit eine Beurteilung der gesamten Zelle und ihrer Membran möglich war.
4. Im Transmissionsbild wurde noch die zugunsten des Kerns verschobene Kern-Plasma-Relation als Malignitätszeichen bewertet sowie das Größenverhältnis der Tumorzelle gegenüber den meist kleineren Knochenmarkszellen.
5. Die im selben Färbeporgang mitgeführten Kontrollen zeigten eine regelrechte Färbung an, d.h. bei der Negativkontrolle waren keine unspezifischen Fluoreszenzsignale zu erkennen und die Positivkontrolle zeigte intensive Fluoreszenz (zytoplasmatische Anfärbung bei 488 nm für Zytokeratin und vorwiegend membranständige Signale bei 568 nm für den uPA-R)

Als Tumorzellen klassifizierte Zellen wurden bei verschiedenen Vergrößerungen (400fach, 630fach) als Transmissionsbild sowie auf beiden Kanälen der Doppelimmunfluoreszenzfärbung getrennt aufgenommen. Da die Immunfluoreszenzmethode keine langfristige Aufbewahrung der Präparate ermöglicht, wurde den Zellen eine Identifikationsnummer zugeordnet und die Bilder auf Datenträger gespeichert. In einem Fall wurde eine Gegenfärbung einer CK-positiven Zelle nach May-Grünwald angeschlossen, um die tumormorphologischen Eigenschaften im Vergleich zu umliegenden Knochenmarkszellen genauer zu erkennen. Dazu wurde nach der Routinemethode im Pathologischen Institut, Klinikum rechts der Isar, TU München, verfahren.

3.2.3.3 Quantifizierung des uPA-R-Gehalts

Um die detektierten CK-positiven Zellen näher zu charakterisieren, wurde eine Analyse ihres uPA-R-Gehaltes erstellt [Noack et al., 2000]. Dazu wurden die Zellen in 630facher Vergrößerung bei einer Wellenlänge von 568 nm im Abstand von 0,2 μm „scheibchenweise“

gescannt Auf diese Weise wurden 20 - 50 Einzelbilder pro Zelle gespeichert. Durch Übereinanderlegen der Einzelbilder zu einem Gesamt-Intensitätsbild (extended focus) errechnete sich die Summe aller Einzelintensitäten. Als Vergleichgröße für die Quantifizierung des uPA-R-Gehaltes dienten standardisierte, fluoreszierende Latex-Beads (InSpeck Red). Die Fluoreszenzintensitäten der Beads wurden durchflußzytometrisch bestimmt. Die stärkste Signalantwort wurde als Bezugsgröße 1 (100%) gesetzt und alle anderen Signalantworten der einzelnen Beads relativ zur Bezugsgröße prozentual bewertet. Zur Abschätzung des uPA-R-Gehalts der Zellen wurden standardisierte Latex-Beads mit einer Fluoreszenzintensität von 1,6% verwendet.

Für jede uPA-R-positive Zelle wurde ein Latex-Bead (1,6%) in exakt derselben Weise in 0,2 µm-Schritten gescannt und ebenfalls dessen Gesamtfluoreszenz (extended focus) berechnet. Die Mikroskopeinstellungen mussten dabei ebenso wie beim Scan der betreffenden Zelle gewählt sein. Die Gesamtfluoreszenzen der uPA-R-positiven Zellen und des zugehörigen Latex-Beads wurden zueinander in Relation gesetzt. Somit ist keine Aussage über die absolute Rezeptordichte einer Zelle möglich. Man erhält durch diese Technik aber einen Vergleichswert, über den man die uPA-R-Dichte der Zellen untereinander in Beziehung setzen kann.

3.2.3.4 CK-HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Um neben einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung für CK und uPA-R eine weitere Färbung für einen zweiten Marker zu entwickeln, wurden zahlreiche Experimente zur Etablierung einer Doppelmarkierung von CK und HER-2/neu durchgeführt. Zielvorstellung hierbei war, die unterschiedliche Lokalisation der Antigene CK und HER-2/neu darzustellen. Es sollte die zytoplasmatische Anfärbbarkeit von CK und die membranständige Darstellung des HER-2/neu-Antigen gezeigt werden.

Die Versuche wurden an Zytospinpräparaten aus HER-2/neu-positiven (3+) SKBR-3-Zellen (Ursprung: humanes adenoides Mammakarzinom) und als Negativkontrolle an Knochenmarkpräparaten von Patientinnen mit nicht malignen Erkrankungen durchgeführt. Hierbei kamen auch sogenannte „spikes“ zum Einsatz, Mischpräparate, die aus SKBR-3-Zellen und dem o.g. Knochenmark angefertigt wurden. Mit einem definierten

Mischungsverhältnis von 1000 SKBR-3-Zellen auf 100 000 Knochenmarkzellen pro Spot sollte die Konstellation der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark simuliert werden.

Für die Zytokeratinfärbung konnte auf den ersten Teil der bewährten CK-/uPA-R-Doppelfärbung (modifiziert nach [Noack et al., 1999]) zurückgegriffen werden. Zur HER-2/neu-Darstellung wurden zunächst mehrere Primärantikörper in verschiedenen Konzentrationen erprobt (CB11-biotin, CB-11-FITC, c-erb-B2 A 0485). Es zeigte sich jedoch, dass mit keinem der Antikörper die Färbung von HER-2/neu auf den SKBR-3-Zellen ohne weiteres gelang. Gerade das entscheidende Merkmal der Membranständigkeit ließ sich nicht optimal demonstrieren. Als nächster Schritt wurde eine sogenannte Antigendemaskierung ausgetestet, auch „Antigen Retrieval“ genannt. Zur bestmöglichen Darstellung bestimmter Antigene ist es notwendig, eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung vorzunehmen. Die durch die Formalinfixierung mit PFA 1% verursachte Proteinvernetzung wird durch das Kochen der Präparate in einer kalzium-präzipitierenden Lösung (Zitratpuffer pH 6,0) wieder aufgehoben. So kann der Antikörper „sein“ spezifisches Epitop wieder erkennen [Noll, S. und Schaub-Kuhnen, S., 2000]. Die Hitzeinduktion mittels Kochen im Dampfkochtopf, in der Mikrowelle und im Wasserbad wurde verglichen.

Nach dieser Optimierung wurde die Austestung der Primärantikörper fortgeführt.

Nach einer Feineinstellung der Färbung durch das Verwenden von verschiedenen Waschpuffern und den Vergleich der Färbeergebnisse mit der etablierten Methode zur immunhistochemischen Färbung von Gewebeschnitten, legten wir das Protokoll folgendermaßen fest (siehe Tab. 4):

Tabelle 4: Protokoll der CK-/HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung

(Vorbehandlung zur Antigendemaskierung siehe Text)

| 1. Primär-AK 1 h | 1. Sekundär-AK 30 min | 2. Primär-AK 1 h | 2. Sekundär-AK 30 min |
|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| A45-B/B3 | Alexa A488 goat-anti-mouse | c-erbB-2 A0485 | Alexa 568 Goat-anti- rabbit |
| 1:100 | 1:100 | 1:300 | 1:100 |

Die Zytospinpräparate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Zur Antigendemaskierung wurden die Präparate 30 min im Wasserbad bei 96°C in Zitratpuffer pH 6,0 gekocht. Danach kühlten sie in Zitratpuffer pH 6,0 20 min auf Raumtemperatur ab. Es folgte die Umkreisung der Zytospins mit einem Fettstift. In diesen Bereich wurden die Antikörperlösungen bzw. Waschpuffer mit einem Volumen von je 150 µl aufgetragen. Nach einem 3-minütigen Waschschrift in TRIS-Puffer begann der eigentliche Färbevorgang.

Folgende Antikörper wurden in der angegebenen Reihenfolge verwendet:

A45-B/B3 (Fa. Micromet GmbH, München): Klasse IgG₁, Spezies Maus, Verdünnung 1:100 (Einzelheiten siehe 2.2.3.1)

Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse (Fa. Molecular Probes, Eugene, USA): Klasse IgG, Spezies: Ziege, Verdünnung 1:100 (Einzelheiten siehe 2.2.3.1.1)

c-erbB-2 Oncoprotein rabbit anti-human A0485 (Fa. DAKO): Klasse IgG, Spezies Kaninchen, Verdünnung 1:300

Der zweite Primärantikörper markiert das membranständige c-erbB2-Onkoprotein HER-2/neu.

Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit (Fa. Molecular Probes, Eugene, USA): Klasse IgG, Spezies: Ziege, Verdünnung 1:100

Dieser zweite Sekundärantikörper erkennt und bindet den Primärantikörper der Spezies Kaninchen c-erb-B2 A0485. Seine Fluoreszenzmarkierung unterscheidet sich im Absorptions- und Emissionsspektrum vom ersten Sekundärantikörper.

Für die Antikörperverdünnungen wurde Antibody diluent verwendet. Die Inkubationszeiten betragen eine Stunde für die Primär- und 30 min für die Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Nach jeder Antikörperinkubation wurden drei dreiminütige Waschschriffe mit TRIS-Puffer unternommen. Sobald der erste fluoreszierende Sekundärantikörper zum Einsatz kam, wurde im abgedunkelten Raum gearbeitet.

Abschließend wurden die Präparate unter Zugabe von 8 µl TRIS-Puffer mit einem Deckgläschen bedeckt, das mit Fixogum befestigt wurde. Die Präparate wurden im Anschluss

unverzöglich am CLSM ausgewertet oder bis zum Zeitpunkt der Beurteilung höchstens drei Tage in Dunkelheit im Kühlschrank bei 6°C gelagert.

Bei jeder Färbung von Patientenmaterial wurden folgende Kontrollpräparate mitbearbeitet: Als Positivkontrollen dienten die SKBR-3-Präparate mit definiertem Expressionsmuster für CK und das HER-2/neu-Onkoprotein sowie „spike“-Präparate aus SKBR-3-Zellen und Knochenmark. Als Negativkontrolle wurden Knochenmarkpräparate von Patientinnen ohne malignen Befund verwendet. Zusätzlich wurde pro Patientin ein Objektträger, das entspricht 200 000 Zellen als Isotyp-Kontrolle mitgefärbt. Hierzu wurde als Primärantikörper statt A45/B-B3 ein Maus IgG₁-Antikörper verwendet. Damit wurde die speziesabhängige, immunglobulinspezifische Kreuzreaktivität des Primärantikörpers kontrolliert.

Weiterhin wurden Verdünnungsversuche zur Sensitivität der Färbung ausgearbeitet, um herauszufinden, unter wie vielen Knochenmarkzellen sich noch eine einzelne CK- bzw. HER-2/neu-positive Zelle wiederfinden lässt. Diese Versuche wurden sowohl als Doppelfärbung nach obigem Protokoll als auch als Einzelfärbung durchgeführt. Für die HER-2/neu-Einzelfärbung wurden die Inkubationsschritte mit A45/B-B3 und Alexa A488 goat-anti-mouse weggelassen.

Die Auswertung der Zytospins am CLSM erfolgte in gleicher Weise wie bei der Doppelimmunfluoreszenzfärbung für CK-/uPA-R. (siehe 2.2.3.2) Als zusätzliche Negativkontrolle wurde hier die Färbung der Isotypkontrolle für das Auftreten von unspezifischen Antikörperbindungen beurteilt.

Nach dieser neuen Methode wurden Knochenmark-Zytospins von 16 Patientinnen (19 Aspiate) des Gesamtkollektivs gefärbt. Die geforderte Gesamtzahl von 2×10^6 zu analysierenden Zellen wurde in diesen Fällen aufgeteilt: 1×10^6 Zellen wurden mit der CK-/HER-2-Doppelfärbung und 1×10^6 Zellen mit der CK-/uPA-R-Färbung ausgewertet.

3.3 Verwendete Hilfsmittel und Reagenzien

Apparative Einrichtungen

Laser-Mikroskop TCS 40, Fa. Leica

Mikroskop Axiovert 35, Fa. Zeiss

CLSM Software Scanware 3.61, Fa. Leica

Lichtmikroskop SM Lux, Fa. Leitz

Cytozentrifuge Cytospin 2, Fa. Shandon

Cytoclips stainless steel slide clip, Fa. Shandon

Cytotunnel, Fa. Shandon

Filter cards 5991022, Fa. Shandon

Zentrifuge 4K15, Fa. Sigma

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

Objektträger 76 x 26 mm Menzel-Gläser

Deckgläschen 18 x 18 mm, Fa. Marienfeld

Fixogum Kleber, Fa. Marabu

Zentrifugenröhrchen 1 ml, 5 ml (352096), 50 ml (352070), Fa. Falcon

Pasteurpipetten 150 mm, 230 mm, Fa. Volac

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

Kolbenhubpipetten 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 50 - 200 µl, 100 - 1000 µl, Fa. Eppendorf

Pipettierhilfe Macro, Fa. Brand GmbH

Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl, Fa. Biozym Diagnostik GmbH

Eppendorfcups 1000 µl, Fa. Biozym Diagnostik GmbH

Präzisionswaage FX-40, Fa. AND

Japan Fettstift Dako Pen, Fa. DAKO

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

Biopsy needle, 15 G, Fa. Gallini s.r.l., Italien

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

Dampfkochtopf

Mikrowelle

Wasserbad, Typ 1002, Gesellschaft für Labortechnik mbH

Antikörper

Anti-Zytokeratin A45-B/B3, Klasse IgG1, Spezies Maus, monoklonaler Antikörper, 0,2 mg/ml, Fa. Micromet GmbH

Anti-uPA-Rezeptor HU277, Klasse IgY, Spezies Huhn, polyklonaler Antikörper, PD Dr. rer. nat. V. Magdolen, Frauenklinik rechts der Isar, TU München

c-erbB-2 Oncoprotein, A 0485, Rabbit Anti-Human, Klasse IgG, Spezies Kaninchen, monoklonaler Antikörper, 1,0 mg/ml, Fa. Dako, Dänemark

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, Eugene, USA

Isotyp-Kontrolle IgG1, 0,1 mg/ml, Spezies Maus, Fa. Caltag

NCL-CB11-Biotin, Klasse IgG1, Spezies Maus, monoklonaler Antikörper, Fa. Novocastra, U.K.

Alexa Fluor 488 streptavidin conjugate, Molecular Probes, Eugene, USA

Reagenzien

Red Beads (Latex, Fluoreszenzintensität 1,6%), Fa. InSpeck

Giemsa-Färbung, Fa. Merck KGaA

PBS-Pufferlösung, pH 7,4, eigene Herstellung (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,96 mM KH₂PO₄, Fa. Merck)

Biocoll (Dichte 1.077), Fa. Biochrom KG

Lymphozyten-Separationsmedium (Dichte 1,077), Fa. PAA Laboratories, Österreich

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

Paraformaldehyd pure, Fa. Serva

Saponin, Fa. Sigma

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

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

TRIS-Puffer, pH 7,6 eigene Herstellung: 60,5 g Trizma-Base, Fa. Sigma und Aqua dest. ad 1000 ml mit 90 g NaCl, Fa. Merck; Stocklösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

Zitratpuffer, pH 6,0, eigene Herstellung: 2,1 g Zitronensäuremonohydrat, Fa. Merck ad 1000 ml Aqua dest.

Avidin / Biotin-Blocking-Kit, Fa. Vector, USA

Antibody Diluent, Fa. Dako, Dänemark

Mausserum (normal), Fa. Dako, Dänemark

Ziegenserum (normal), Fa. Dako, Dänemark

Zelllinien

OvMz 10

ZR 75

SKBR-3

3.4 Statistik

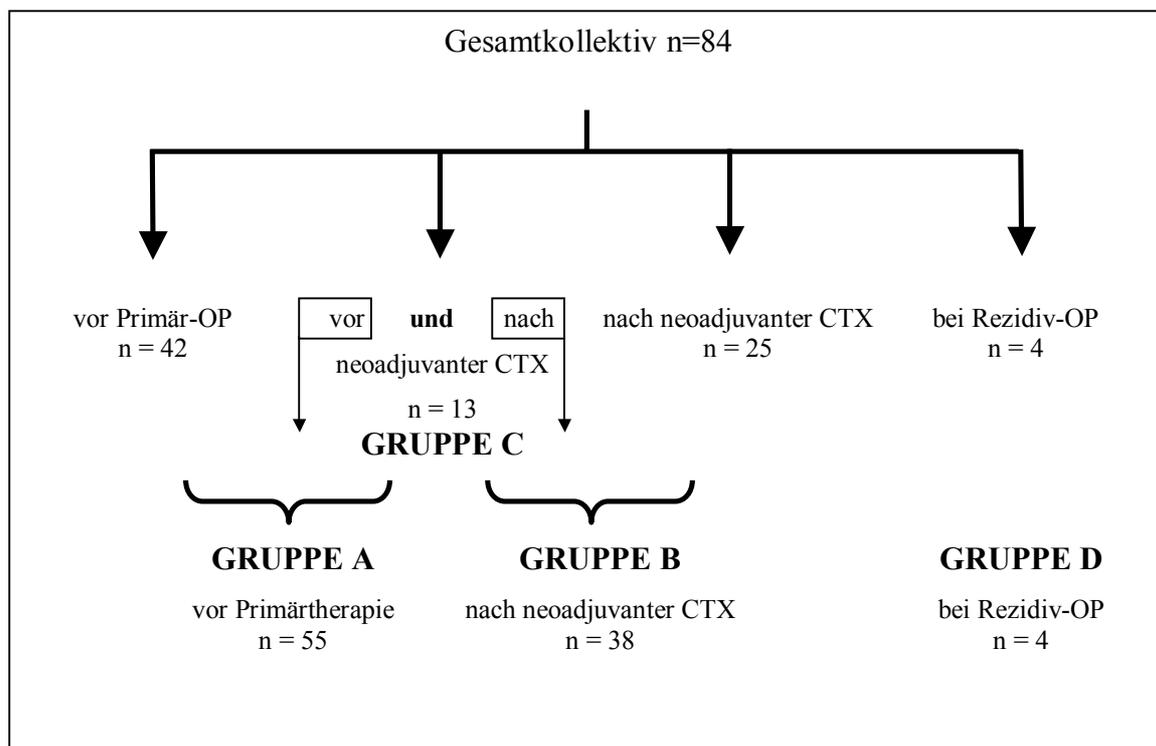
Alle Daten, die die Patientinnen bzw. ihre Tumorerkrankung beschreiben, beziehen sich auf Befunde, wie sie sich zum Zeitpunkt der Knochenmarkaspiration darstellten. Für die 13 Patientinnen, die vor und nach einer neoadjuvanten Chemotherapie untersucht wurden, wurde der Zustand bei der ersten Knochenmarkpunktion zugrundegelegt. Die statische Analyse der Patientinnendaten wurde mit dem Programm SPSS 10.0 für Windows (Fa. SPSS Inc., USA) erstellt. Stetige Variablen werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Für diskrete Variablen werden absolute und relative Häufigkeiten angegeben. Für die Berechnung des Zusammenhangs zwischen dem Nachweis CK-positiver Zellen und anderen Prognosefaktoren wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Die Überlebensanalysen wurden mit der Methode nach Kaplan-Meier erstellt. Zur Überprüfung des Einflusses der neoadjuvanten Chemotherapie bei den davor und danach untersuchten Patientinnen kam der McNemar-Test für zwei verbundene Stichproben zum Einsatz. Der Einfluss des Ausmaßes der uPA-R-Expression auf die Gesamtüberlebenszeit bzw. die rezidivfreie Überlebenszeit wurde durch das Cox-Regressions-Modell überprüft. Für alle Tests wurde ein Konfidenzintervall von 95% festgelegt, d.h. p-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Kollektiv

Von November 1998 bis Juni 2001 wurden 84 Patientinnen mit Ovarialkarzinom auf CK-positive Zellen im Knochenmark untersucht. Dabei wurden insgesamt 97 Knochenmarkaspirate ausgewertet. Die unterschiedlichen Ausgangssituationen der Patientinnen zum Zeitpunkt der Knochenmarkaspiration sind in Abbildung 3 dargestellt.

Abb.3 Zeitpunkt der Knochenmarkaspirationen und Verteilung des Gesamtkollektivs



55 Patientinnen befanden sich dabei zum Zeitpunkt der Primärtherapie. Diese stellte für 37 Patientinnen die Debulking-Operation und für 18 Patientinnen eine primäre Chemotherapie dar. Von diesen 18 Patientinnen wurden 13 vor und nach dieser neoadjuvanten Chemotherapie untersucht, ihnen wurde also zweimal Knochenmark entnommen.

25 Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Knochenmarkaspiration bereits durch eine neoadjuvante Chemotherapie vorbehandelt, zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war aber kein Knochenmark entnommen worden.

Bei 4 Patientinnen erfolgte die Knochenmarkuntersuchung bei Auftreten eines Rezidivs.

Im gleichen Zeitraum wurde bei 23 Patientinnen mit benignen Erkrankungen Knochenmark entnommen und auf gleiche Weise auf CK-positive Zellen untersucht.

In der statistischen Analyse wurden die Patientinnen zum Zeitpunkt der Primärtherapie und die Gruppe nach neoadjuvanter Chemotherapie getrennt analysiert. Auch die Untergruppe der 13 Patientinnen mit Knochenmarkentnahme vor und nach neoadjuvanter Chemotherapie wurde näher untersucht.

Das mediane Alter aller Patientinnen betrug 61 Jahre (Spannweite: 28 - 81). Die Patientinnen, deren Knochenmark vor der Primärtherapie untersucht wurde, hatten ein medianes Alter von 62 Jahren (Spannweite: 28 - 81). Bei den nach der neoadjuvanten Chemotherapie analysierten Patientinnen lag der Altersmedian bei 62 Jahren (Spannweite: 31 - 79) alt.

Die mediane Nachbeobachtungsdauer lag bei 31 Monaten (Spannweite: 1 - 57).

Im Gesamtkollektiv befanden sich 8 Patientinnen (9,5%) im Stadium FIGO I, 5 (6,0%) im Stadium II, 51 (60,7%) im Stadium III und 16 (19,0%) im Stadium IV. Bei 4 Patientinnen (4,8%) wurde ein LMP-Tumor diagnostiziert.

Bei 21 Patientinnen (25,0%) wurden Lymphknotenmetastasen festgestellt. 28 Patientinnen (33,3%) hatten tumorfreie Lymphknoten. In 49 Fällen (58,3%) wurde der Nodalstatus nicht erhoben. Fernmetastasen hatten 16 Patientinnen (19,0%).

Bei den Tumoren handelte es sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle um seröse Ovarialkarzinome (70 Patientinnen, 83,3%). Die weitere Verteilung der histologischen Subtypen ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

6 (7,1%) Ovarialkarzinome wurden als G1, 18 (21,4%) als G2, 55 (65,5%) als G3 und 1 (1,2%) als undifferenziert eingeordnet. In 4 Fällen (4,8%) handelte es sich um LMP-Tumore.

35 Patientinnen (41,7%) konnten tumorfrei operiert werden, bei 31 Patientinnen (36,9%) blieb ein Tumorrest < 1 cm, bei 13 (15,5%) ein Tumorrest von 1 - 2 cm zurück. In 4 Fällen (4,8%) betrug der in situ verbliebene Tumorrest > 2 cm.

Die klinischen Daten und Tumoreigenschaften der Patientinnen in den verschiedenen Untergruppen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Charakterisierung des Patientinnenkollektivs - Untergruppen

| | | A | B | C | D |
|--|------------------|-----------------------------------|--|--|----------------------|
| | Gesamt n = 84 | vor Primär- therapie n = 55 | nach neo- adjuvanter CTX n = 38 | vor und nach neoadju- vanter CTX n = 13 | bei Rezidiv n = 4 |
| Alter (in Jahren) | | | | | |
| Median | 61 | 62 | 62 | 63 | 49 |
| Spannweite | 28 - 81 | 28 - 81 | 31 - 79 | 55 - 77 | 44 - 53 |
| Nachbeobachtungszeit (in Monaten) | | | | | |
| Median | 31 | 33 | 31 | 30 | 12 |
| Spannweite | 1 - 57 | 1 - 57 | 6 - 51 | 9 - 51 | 7 - 30 |
| FIGO-Stadium | | | | | |
| I | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| II | 5 | 3 | 1 | 0 | 1 ^a |
| III | 51 | 31 | 25 | 8 | 3 ^a |
| IV | 16 | 9 | 12 | 5 | 0 |
| LMP | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| pT | | | | | |
| pT1 | 12 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| pT2 | 5 | 3 | 1 | 0 | 1 ^a |
| pT3 | 67 | 40 | 37 | 13 | 3 ^a |
| pN | | | | | |
| N0 | 28 | 20 | 9 | 3 | 2 ^a |
| N1 | 21 | 15 | 11 | 6 | 1 ^a |
| Nx | 35 | 20 | 18 | 4 | 1 ^a |
| Fernmetastasen | | | | | |
| M0 | 67 | 45 | 26 | 8 | 4 ^a |
| M1 | 16 | 9 | 12 | 5 | 0 |
| Mx | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Grading | | | | | |
| G1 | 6 | 6 | 2 | 2 | 0 |
| G2 | 18 | 12 | 6 | 1 | 1 |
| G3 | 55 | 32 | 30 | 10 | 3 |
| undifferenziert | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| LMP | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Histologie | | | | | |
| serös | 70 | 45 | 33 | 12 | 4 |
| muzinös | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| endometroid | 5 | 5 | 1 | 1 | 0 |
| klarzellig | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Müller-Misch.* | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| niedrig diff. ⁺ | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| Operationsergebnis | | | | | |
| tumorfrei | 35 | 27 | 9 | 3 | 2 ^a |
| Rest ≤ 1 cm | 31 | 18 | 21 | 8 | 0 |
| Rest 1 - 2 cm | 13 | 6 | 7 | 2 | 2 ^a |
| Rest > 2 cm | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| keine Angabe | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Ascitesmenge | | | | | |
| kein | 24 | 19 | 2 | 0 | 3 ^a |
| wenig | 11 | 10 | 2 | 1 | 0 |
| > 500 ml | 43 | 21 | 32 | 11 | 1 ^a |
| keine Angabe | 6 | 5 | 2 | 1 | 0 |

* Müller'scher Misch tumor

⁺ niedrig differenziert^a zum Zeitpunkt der Primärdiagnose

4.2 Nachweis von CK⁺-Zellen im Knochenmark durch Immunfluoreszenzdoppelfärbung

In dieser Arbeit wurde Knochenmark von 84 Patientinnen untersucht. 13 Patientinnen wurden zweimal punktiert, jeweils vor und nach einer neoadjuvanten Chemotherapie. Insgesamt ergeben sich also 97 ausgewertete Knochenmarkaspirate.

Komplikationen im Zusammenhang mit der Knochenmarkaspiration traten bei keiner der Patientinnen auf.

Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 6 zusammengestellt. Bei 26 der 84 Patientinnen wurden CK-positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen (siehe Abb. 8 und 9), das entspricht einer relativen Häufigkeit von 31,0%.

Tabelle 6: CK-positive Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom

| | | A | B | C | D |
|---|------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| | Gesamtkollektiv | vor Primärtherapie | nach neoadjuvanter CTX | vor und nach neoadjuvanter CTX | bei Rezidiv |
| Anteil CK-positiver Patientinnen | 26 / 84 | 17 / 55 | 13 / 38 | 5 / 13 | 1 / 4 |
| | 31,0% | 30,9% | 34,2% | 38,5% | 25,0% |

4.2.1 Knochenmarkstatus vor Primärtherapie

Bei 17 von 55 Patientinnen (30,9%), die vor der Primärtherapie untersucht wurden, wurden CK-positive Zellen im Knochenmark aufgefunden.

Mit dem exakten Test nach Fisher wurde ein Zusammenhang etablierter Prognosefaktoren mit dem Knochenmarkstatus überprüft. Hierbei unterschieden sich die Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus signifikant von denen mit negativem Knochenmarkstatus in der Verteilung der FIGO- ($p = 0,036$) bzw. der pT-Stadien ($p = 0,009$). Die Patientinnen in den

frühen Tumorstadien FIGO I bzw. pT1 weisen häufiger als erwartet CK-positive Zellen im Knochenmark auf. Bezüglich des Lymphknotenstatus, der Fernmetastasierung, des Gratings, der Histologie, des Operationsergebnisses und der Aszitesmenge unterschieden sich die CK-positiven Patientinnen nicht signifikant von den CK-negativen (siehe Tab. 7).

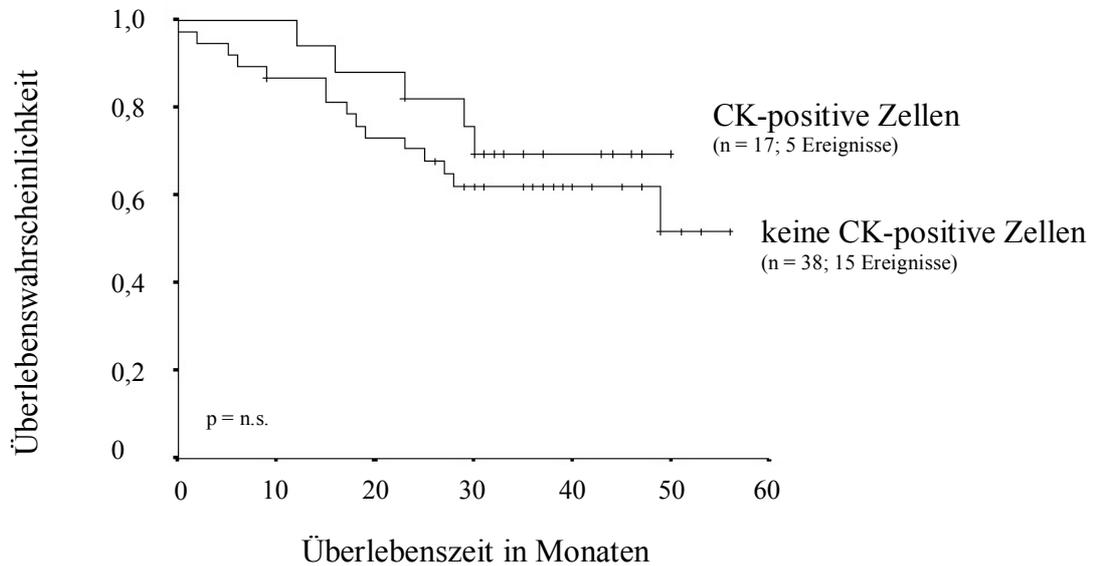
Die prognostische Bedeutung des Nachweises CK-positiver Zellen im Knochenmark wurde durch Überlebensanalysen der Patientinnen beurteilt. Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode wurden die Patientinnen mit CK-positiven Zellen im Knochenmark mit den Patientinnen mit negativen Knochenmarkstatus hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit und der rezidivfreien Überlebenszeit verglichen (siehe Abb. 4 und 5).

Tabelle 7: Vergleich der Patientinnen mit CK-positiven Zellen mit Patientinnen ohne CK-positiven Zellen im Knochenmark (zum Zeitpunkt der Primärtherapie)

| Patientinnen vor Primärtherapie Gruppe A n = 55 | CK-positive Zellen n = 17 | keine CK-positiven Zellen n = 38 | p ^a |
|---|------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Alter | | | |
| Median | 60 | 63 | p = n.s. (0,526) |
| Spannweite | 36 – 81 | 28 – 79 | |
| Mittel ± SD | 59,1 ± 12,8 | 61,3 ± 11,6 | |
| Nachbeobachtungszeit (in Monaten) | | | |
| Median | 33 | 35 | p = n.s. (0,515) |
| Spannweite | 13 – 51 | 1 – 57 | |
| Mittel ± SD | 33,5 ± 11,4 | 31,3 ± 15,8 | |
| FIGO-Stadium | | | |
| I | 6 (35,3%) | 2 (5,3%) | p = 0,036 |
| II | 0 | 3 (7,9%) | |
| III | 8 (47,1%) | 23 (60,5%) | |
| IV | 2 (11,8%) | 7 (18,4%) | |
| LMP | 1 (5,9%) | 3 (7,9%) | |
| pT | | | |
| pT1 | 8 (47,1%) | 4 (10,5%) | p = 0,009 |
| pT2 | 0 | 3 (7,9%) | |
| pT3 | 9 (52,9%) | 31 (81,6%) | |
| Lymphknotenstatus | | | |
| N0 | 9 (52,9%) | 11 (28,9%) | p = n.s. (1,0) |
| N1 | 6 (35,3%) | 9 (23,7%) | |
| Nx | 2 (11,8%) | 18 (47,4%) | |
| Fernmetastasen | | | |
| M0 | 15 (88,2%) | 30 (78,9%) | p = n.s. (0,703) |
| M1 | 2 (11,8%) | 7 (18,4%) | |
| Mx | 0 | 1 (2,6%) | |
| Grading | | | |
| G1 | 2 (11,8%) | 4 (10,5%) | p = n.s. (0,820) |
| G2 | 5 (29,4%) | 7 (18,4%) | |
| G3 | 9 (52,9%) | 23 (60,5%) | |
| undifferenziert | 0 | 1 (2,6%) | |
| LMP | 1 (5,9%) | 3 (7,9%) | |
| Histologie | | | |
| serös | 13 (76,5%) | 32 (84,2%) | p = n.s. (0,556) |
| muzinös | 0 | 1 (2,6%) | |
| endometroid | 2 (11,8%) | 3 (7,9%) | |
| klarzellig | 1 (1,8%) | 1 (2,6%) | |
| Müller-Mischtumor | 0 | 1 (2,6%) | |
| niedrig differenziert | 1 (1,8%) | 0 | |
| Operationsergebnis | | | |
| tumorfrei | 12 (70,6%) | 15 (39,5%) | p = n.s. (0,144) |
| Tumorrest ≤ 1 cm | 5 (29,4%) | 13 (34,2%) | |
| Tumorrest 1 - 2 cm | 0 | 6 (15,8%) | |
| Tumorrest > 2 cm | 0 | 3 (7,9%) | |
| keine Angabe | 0 | 1 (2,6%) | |
| Aszitesmenge | | | |
| kein | 6 (35,3%) | 13 (34,2%) | p = n.s. (0,259) |
| wenig | 4 (23,5%) | 6 (15,8%) | |
| > 500 ml | 4 (23,5%) | 17 (44,7%) | |
| keine Angabe | 3 (17,6%) | 2 (5,3%) | |

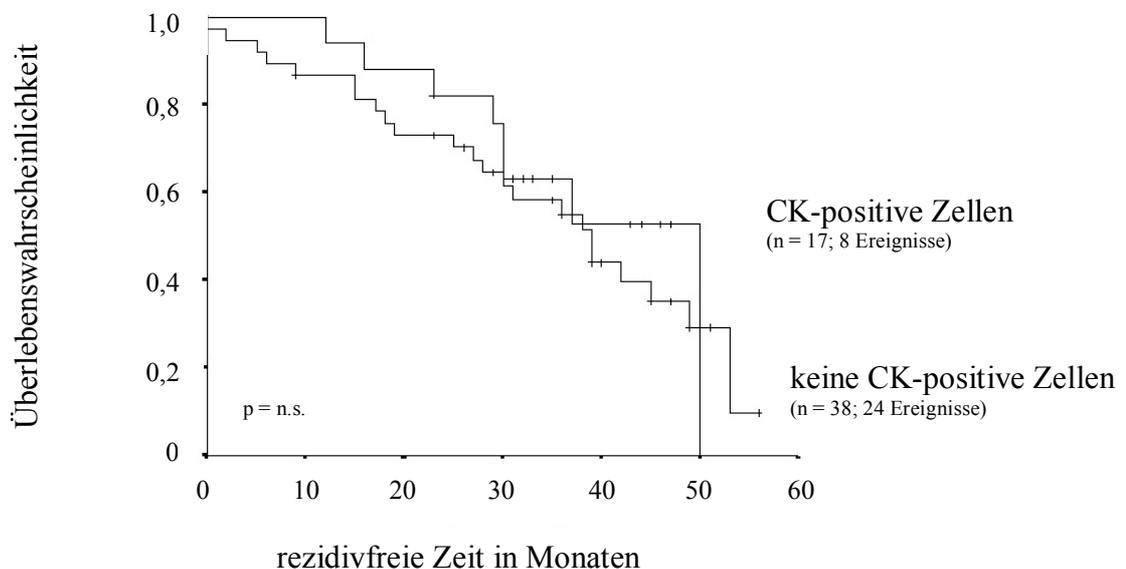
^a für Alter und Nachbeobachtungszeit: t-Test bei unabhängigen Stichproben; sonst: exakter Test nach Fisher

Abb. 4 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus Patientinnen vor Primärtherapie n = 55



Die mittlere Gesamtüberlebenszeit betrug bei Patientinnen ohne positiven Tumorzellnachweis im Knochenmark 40 Monate. Patientinnen mit nachgewiesenen CK-positiven Zellen im Knochenmark lebten im Mittel 42 Monate. Die Überlebenskurven unterscheiden sich im Log-Rank-Test nicht signifikant ($p = 0,436$).

Abb. 5 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus Patientinnen vor Primärtherapie n = 55



Die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit betrug bei Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus 39 Monate, bei Patientinnen ohne Tumorzellen im Knochenmark waren es 35 Monate. Die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,573$).

4.2.2 Knochenmarkstatus nach neoadjuvanter Chemotherapie

34,2% (13 / 38) der nach neoadjuvanter Chemotherapie untersuchten Patientinnen wiesen CK-positiv Zellen im Knochenmark auf.

Der exakte Test nach Fisher zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der FIGO- und der pT-Stadien, dem Lymphknotenstatus, der Fernmetastasierung, dem Grading, der Histologie, dem Operationsergebnis und der Aszitesmenge zwischen Patientinnen mit positivem bzw. negativem Knochenmarkstatus (siehe Tab. 8).

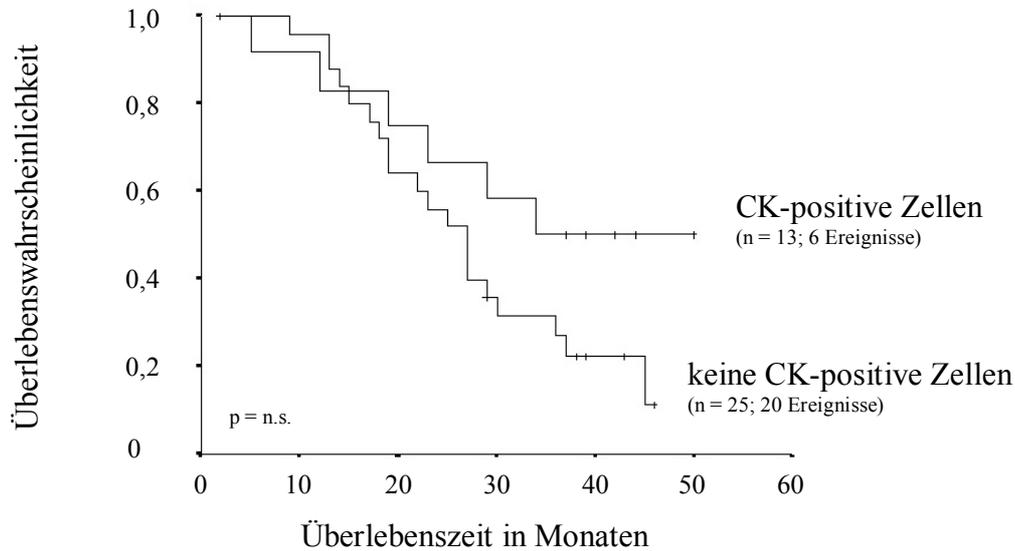
Tabelle 8: Vergleich der Patientinnen mit CK-positiven Zellen mit Patientinnen ohne CK-positiven Zellen im Knochenmark (nach neoadjuvanter Chemotherapie)

| Patientinnen nach neoadjuvanter CTX Gruppe B n = 38 | CK-positive Zellen n = 13 | keine CK-positiven Zellen n = 25 | p ^a |
|--|------------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Alter | | | |
| Median | 63 | 62 | p = n.s. (0,338) |
| Spannweite | 41 – 79 | 31 – 76 | |
| Mittel ± SD | 63,5 ± 10,8 | 59,2 ± 11,3 | |
| Nachbeobachtungszeit (in Monaten) | | | |
| Median | 38 | 30 | p = n.s. (0,633) |
| Spannweite | 6 – 51 | 9 – 51 | |
| Mittel ± SD | 30,8 ± 14,5 | 29,6 ± 11,4 | |
| FIGO-Stadium | | | |
| II | 1 (7,7%) | 0 | p = n.s. (0,134) |
| III | 10 (76,9%) | 15 (60,0%) | |
| IV | 2 (15,4%) | 10 (40,0%) | |
| pT | | | |
| pT2 | 1 (7,7%) | 0 | p = n.s. (0,342) |
| pT3 | 12 (92,3%) | 25 (100,0%) | |
| Lymphknotenstatus | | | |
| N0 | 3 (23,1%) | 6 (24,0%) | p = n.s. (1,0) |
| N1 | 4 (30,8%) | 7 (28,0%) | |
| Nx | 6 (46,1%) | 12 (48,0%) | |
| Fernmetastasen | | | |
| M0 | 11 (84,6%) | 15 (60,0%) | p = n.s. (0,158) |
| M1 | 2 (15,4%) | 10 (40,0%) | |
| Grading | | | |
| G1 | 0 | 2 (8,0%) | p = n.s. (0,561) |
| G2 | 3 (23,1%) | 3 (12,0%) | |
| G3 | 10 (76,9%) | 20 (80,0%) | |
| Histologie | | | |
| serös | 10 (76,9%) | 23 (92,0%) | p = n.s. (0,141) |
| endometroid | 0 | 1 (4,0%) | |
| Müller-Mischtumor | 1 (7,7%) | 1 (4,0%) | |
| niedrig differenziert | 2 (15,4%) | 0 | |
| Operationsergebnis | | | |
| tumorfrei | 4 (30,8%) | 5 (20,0%) | p = n.s. (0,871) |
| Tumorrest ≤ 1 cm | 7 (53,8%) | 14 (56,0%) | |
| Tumorrest 1 - 2 cm | 2 (15,4%) | 5 (20,0%) | |
| Tumorrest > 2 cm | 0 | 1 (4,0%) | |
| Aszitesmenge | | | |
| kein | 1 (7,7%) | 1 (4,0%) | p = n.s. (1,0) |
| wenig | 1 (7,7%) | 1 (4,0%) | |
| > 500 ml | 10 (76,9%) | 22 (88,0%) | |
| keine Angabe | 1 (7,7%) | 1 (4,0%) | |

^a für Alter und Nachbeobachtungszeit: t-Test bei unabhängigen Stichproben; sonst: exakter Test nach Fisher

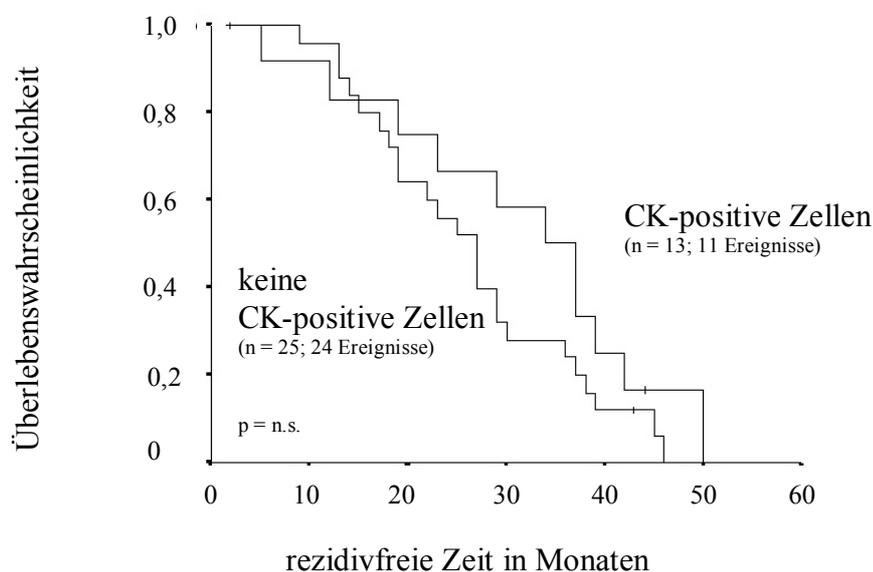
Die Ergebnisse der Nachbeobachtung für die Patientinnen nach neoadjuvanter Chemotherapie sind in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt.

Abb. 6 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus Patientinnen nach neoadjuvanter Chemotherapie n = 38



Die mittlere Gesamtüberlebenszeit betrug 35 Monate für Patientinnen mit CK-positiven Zellen im Knochenmark gegenüber 28 Monaten bei Patientinnen ohne Tumorzellnachweis im Knochenmark (siehe Abb. 6). Der Unterschied im Verlauf beider Kurven ist im Log-Rank-Test nicht signifikant ($p = 0,126$).

Abb. 7 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus Patientinnen nach neoadjuvanter Chemotherapie n = 38



Die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit betrug 31 Monate bei den Patientinnen mit CK-positiven Zellen im Knochenmark gegenüber 26 Monaten bei den Patientinnen ohne Tumorzellnachweis. Die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,193$).

4.2.3 Knochenmarkstatus bei 13 Patientinnen vor und nach neoadjuvanter Chemotherapie

13 Patientinnen des Gesamtkollektivs erhielten vor und nach einer neoadjuvanten Chemotherapie eine Knochenmarkpunktion. Die Untersuchung auf CK-positive Zellen zeigte bei sechs Patientinnen weder vor noch nach der Chemotherapie Tumorzellen im Knochenmark. Bei zwei Patientinnen waren vor der Chemotherapie CK-positive Zellen vorhanden, nach der Chemotherapie waren jedoch keine malignen Zellen mehr im Knochenmark zu finden. Zwei Patientinnen hatten vor der Chemotherapie keine disseminierten Tumorzellen, nach der neoadjuvanten Therapie waren aber CK-positive Zellen im Knochenmark vorhanden. In drei Fällen war der Knochenmarkstatus mit CK-positiven Zellen vor und nach der Chemotherapie positiv. In neun Fällen stimmte also der Knochenmarkstatus vor und nach der Chemotherapie überein. (siehe Tab. 9)

Tabelle 9: Knochenmarkstatus vor und nach adjuvanter Chemotherapie bei 13 Patientinnen
Gruppe C

| Patientin | CK-positive Zellen vor neoadjuvanter CTX ^a | CK-positive Zellen nach neoadjuvanter CTX ^a | Rezidiv | DFS ^b (Monate) | verstorben | Beobachtungszeit (Monate) |
|-----------|---|--|---------|---------------------------|------------|---------------------------|
| C.Z. | 0 | 0 | ja | 7 | ja | 9 |
| A.P. | + | + | ja | 13 | nein | 50 |
| G.K. | 0 | 0 | ja | 18 | ja | 27 |
| I.B. | + | 0 | ja | 11 | ja | 29 |
| E.B. | 0 | + | ja | 33 | nein | 42 |
| C.W. | 0 | 0 | ja | 9 | ja | 17 |
| T.K. | + | 0 | nein | 43 | nein | 43 |
| K.P. | 0 | 0 | ja | 10 | ja | 18 |
| M.R. | 0 | + | ja | 18 | nein | 39 |
| A.P.-S. | 0 | 0 | ja | 4 | nein | 38 |
| M.A. | + | + | ja | 22 | nein | 37 |
| I.S. | 0 | 0 | ja | 11 | ja | 19 |
| I.B. | + | + | ja | 10 | ja | 12 |

^a 0 = kein Nachweis von CK-positiven Zellen im Knochenmark
+ = Nachweis CK-positiver Zellen im Knochenmark

^b DFS = rezidivfreie Überlebenszeit

Zur Überprüfung des Einflusses der neoadjuvanten Chemotherapie auf das Vorhandensein von CK-positiven Zellen im Knochenmark der Patientinnen nach erfolgter Chemotherapie wurde der McNemar-Test angewendet. Hierbei ergab sich, dass die Chemotherapiebehandlung keinerlei Einfluss auf den Knochenmarkstatus nimmt ($p = 1,000$).

4.2.4 Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt des Rezidivs

Zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose war der Knochenmarkstatus bei einer von 4 Patientinnen (25,0%) positiv (siehe Tab. 10). Diese Patientin verstarb 9 Monate nach der Untersuchung. Eine weitere Patientin aus dieser Gruppe ohne CK-positive Zellen im Knochenmark ist 14 Monate nach der Knochenmarkuntersuchung verstorben. Die beiden anderen Patientinnen mit negativem Knochenmarkstatus sind nach einer Beobachtungszeit von 6 bzw. 42 Monaten am Leben.

Tabelle 10: Vergleich der Patientinnen mit CK-positiven Zellen mit Patientinnen ohne CK-positiven Zellen im Knochenmark (zum Zeitpunkt der Rezidiv-OP)

| Patientinnen bei Rezidiv-OP n = 4 | CK-positive Zellen n = 1 | keine CK-positiven Zellen n = 3 |
|--|---|--|
| Alter | | |
| Median | 53 | 48 |
| Spannweite | - | 44 – 50 |
| Mittel ± SD | 53 ± 0 | 47,3 ± 3,1 |
| Nachbeobachtungszeit (in Monaten) | | |
| Median | 9 | 15 |
| Spannweite | - | 7 – 30 |
| Mittel ± SD | 9 ± 0 | 17,3 ± 11,7 |
| FIGO-Stadium^a | | |
| II | 0 | 1 |
| III | 1 | 2 |
| pT^a | | |
| pT2 | 0 | 1 |
| pT3 | 1 | 2 |
| Lymphknotenstatus^a | | |
| N0 | 1 | 1 |
| N1 | 0 | 1 |
| Nx | 0 | 1 |
| Fernmetastasen^a | | |
| M0x | 1 | 3 |
| Grading^a | | |
| G2 | 0 | 1 |
| G3 | 1 | 2 |
| Histologie^a | | |
| serös | 1 | 3 |
| Operationsergebnis^a | | |
| tumorfrei | 0 | 2 |
| Tumorrest ≤ 1 cm | 0 | 1 |
| Tumorrest 1 - 2 cm | 1 | 0 |
| Aszitesmenge^a | | |
| kein | 1 | 2 |
| wenig | 0 | 0 |
| > 500 ml | 0 | 1 |

^a zum Zeitpunkt der Primärdiagnose

4.2.5 Knochenmarkstatus der Patientinnen mit benigner Erkrankung

Bei der Auswertung der 23 Patientinnen mit benigner Erkrankung war in einem Fall eine CK-positive Zelle nachzuweisen. Bei dieser Patientin wurde ein Ovarialkystom diagnostiziert. Die restlichen 22 Patientinnen hatten keine CK-positiven Zellen im Knochenmark. Damit lag die Rate falsch-positiver Ergebnisse bei 4,3% (siehe Tab. 11).

Tabelle 11: Knochenmarkstatus der Patientinnen mit benigner Erkrankung

| n = 23 | Patientinnen mit benigner Erkrankung |
|---|---|
| Anteil CK-positiver Patientinnen | 1 / 23 |
| | 4,3% |

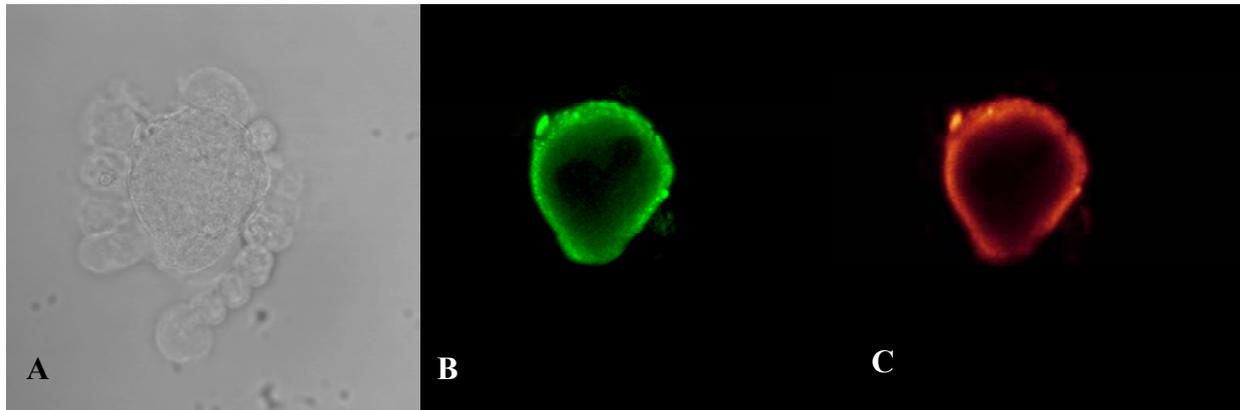
4.3 Charakterisierung durch Phänotypisierung der CK-positiven Zellen

Bei 68 Patientinnen (78 Knochenmarkaspiraten) wurden 2×10^6 Zellen mit der CK-/ uPA-R-Doppelimmunfluoreszenzfärbung ausgewertet. Bei 16 Patientinnen (19 Knochenmarkaspiraten) erfolgte die Auswertung an 1×10^6 Zellen mit der CK-/ uPA-R-Doppelimmunfluoreszenzfärbung und an 1×10^6 Zellen mit der CK-/HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung.

4.3.1 Phänotypisierung uPA-R

Alle in der CK-/uPA-R-Färbung gefundenen CK-positiven Zellen erwiesen sich auch als positiv für uPA-R (siehe Abb. 8 und 9). Das Ausmaß der uPA-R-Expression wurde bei 20 der 26 Patientinnen mit CK-positiven Zellen durch den Vergleich mit standardisierten Latexbeads weiter untersucht (siehe Tab. 12).

Abb. 8: CK- und uPA-R-positive Zelle im Knochenmark einer Patientin mit Ovarialkarzinom



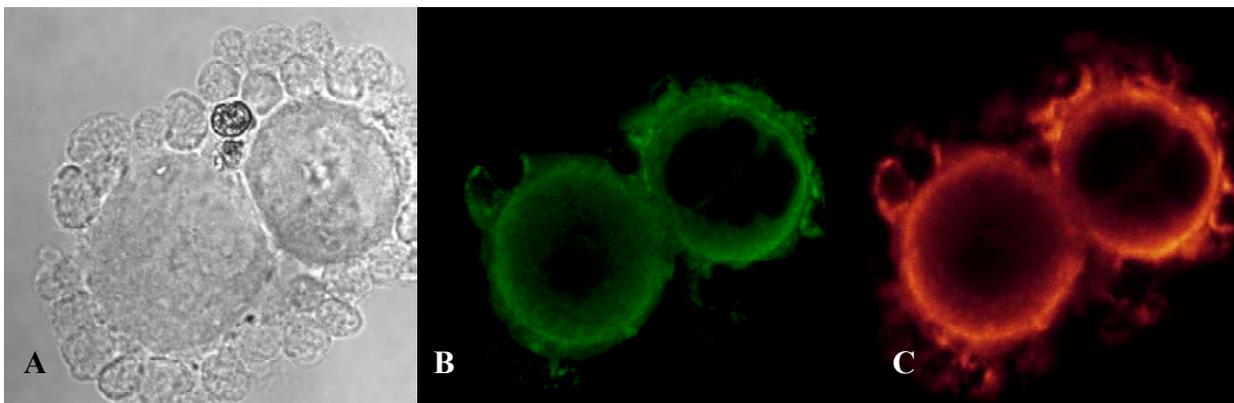
Doppelimmunfluoreszenzfärbung CK-/uPA-R, 630fach

A: Transmissionsbild

B: CK-Färbung
488nm

C: uPA-R-Färbung
568nm

Abb. 9: Zwei nebeneinander liegende CK- und uPA-R-positive Zellen im Knochenmark einer Patientin mit Ovarialkarzinom



Doppelimmunfluoreszenzfärbung CK-/uPA-R, 630fach

A: Transmissionsbild

B: CK-Färbung
488nm

C: uPA-R-Färbung
568nm

Tabelle 12: uPA-R-Quantifizierung auf CK-positiven Zellen

| Patientin | uPA-R | | Rezidiv | DFS ^a (Monate) | ver- storben | Beobachtungs- zeit (Monate) | | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|-----------------|--------------------------------|------|----|
| | Mittelwert | Maximalwert | | | | | | |
| zum Zeitpunkt der Primärtherapie | | | | | | | | |
| M.G. | 15,65 | 21,58 | nein | 36 | nein | 36 | | |
| R.E. | 7,57 | 7,57 | nein | 35 | nein | 35 | | |
| R.E. | 30,75 | 33,17 | nein | 32 | nein | 32 | | |
| B.I. | 15,49 | 15,49 | ja | 10 | ja | 12 | | |
| S.A. | 24,01 | 24,01 | ja | 23 | nein | 30 | | |
| R.R. | 12,32 | 19,96 | nein | 31 | nein | 31 | | |
| B.H. | 11,33 | 11,33 | ja | 10 | ja | 23 | | |
| S.E. | 19,92 | 19,92 | ja | 12 | ja | 16 | | |
| B.I. | 11,03 | 11,03 | ja | 11 | ja | 29 | | |
| G.C. | 1,91 | 1,91 | nein | 47 | nein | 47 | | |
| K.T. | 41,85 | 41,85 | nein | 43 | nein | 43 | | |
| nach neoadjuvanter Chemotherapie | | | | | | | | |
| R.M. | 6,25 | 6,25 | ja | 18 | nein | 39 | | |
| U.B. | 12,69 | 12,69 | ja | 20 | nein | 37 | | |
| W.I. | 18,45 | 36,74 | ja | 3 | ja | 23 | | |
| H.B. | 15,63 | 39,78 | ja | 24 | ja | 34 | | |
| D.M. | 3,26 | 11,16 | nein | 44 | nein | 44 | | |
| B.E. | 4,52 | 4,52 | ja | 33 | nein | 42 | | |
| B.E. | 16,87 | 25,20 | ja | 15 | ja | 19 | | |
| vor und nach neoadjuvanter Chemotherapie | | | | | | | | |
| A.M. | 15,62 ^v | 10,30 ⁿ | 27,00 ^v | 11,30 ⁿ | ja | 22 | nein | 37 |
| P.A. | 9,51 ^v | 4,90 ⁿ | 10,24 ^v | 6,79 ⁿ | ja | 13 | nein | 50 |

^v Werte vor neoadjuvanter CTX

ⁿ Werte nach neoadjuvanter CTX

^a DFS = rezidivfreie Überlebenszeit

Der Einfluss des Ausmaßes der uPA-R-Expression auf die Gesamtüberlebenszeit bzw. die rezidivfreie Überlebenszeit wurde durch das Cox-Regressions-Modell überprüft (siehe Tab. 13).

Tabelle 13: Einfluss der uPA-R-Expression auf rezidivfreie Überlebenszeit bzw. Gesamtüberlebenszeit (Cox-Regressionsmodell)

| | uPA-R-Mittelwert bzgl. DFS ^a | uPA-R-Mittelwert bzgl. OS ^b | uPA-R-Maximalwert bzgl. DFS ^a | uPA-R-Maximalwert bzgl. OS ^b |
|----------------------------------|---|--|--|---|
| zum Zeitpunkt der Primärtherapie | p = 0,568 | p = 0,642 | p = 0,441 | p = 0,378 |
| nach neoadjuvanter Chemotherapie | p = 0,265 | p = 0,156 | p = 0,578 | p = 0,068 |

^a DFS = rezidivfreie Überlebenszeit

^b OS = Gesamtüberlebenszeit

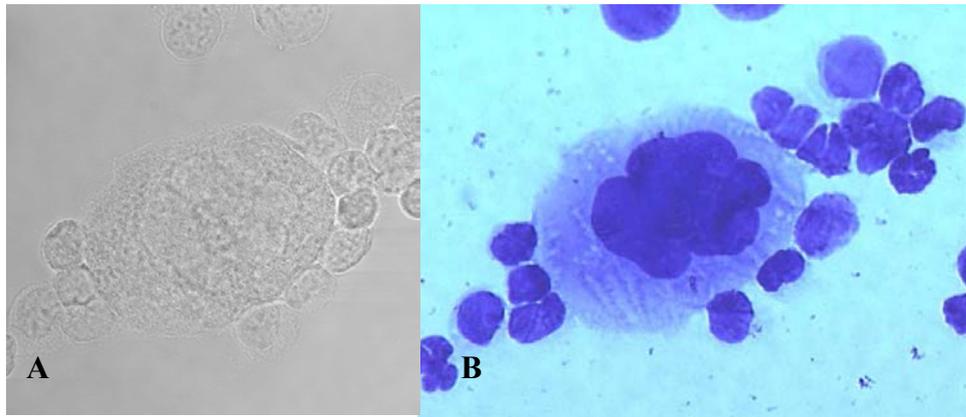
Ein statistisch signifikanter Einfluss des Ausmaßes der uPA-R-Expression auf die rezidivfreie Überlebenszeit bzw. Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen ergab sich weder zum Zeitpunkt der Primärtherapie noch nach einer neoadjuvanter Chemotherapie.

Die uPA-R-Expression auf den CK-positiven Zellen der zwei Patientinnen, die sowohl vor als auch nach neoadjuvanter Chemotherapie einen positiven Knochenmarkstatus aufwiesen, nahm in beiden Fällen nach der Therapie um mehr als 1/3 ab (siehe Tab. 12).

In dem einen Fall der durchgeführten May-Grünwald-Gegenfärbung konnte die CK-positive Zelle im Präparat nicht wieder aufgefunden werden. Sie wurde vermutlich beim zweiten Färbvorgang zerstört oder vom Objektträger abgewaschen. Möglich war hier jedoch die Beurteilung der Knochenmarkzellen, vor allem der Megakaryozyten, die differentialdiagnostisch wegen ihrer Größe von Tumorzellen unterschieden werden müssen. Dabei waren die Megakaryozyten negativ für CK und uPA-R (siehe Abb. 10).

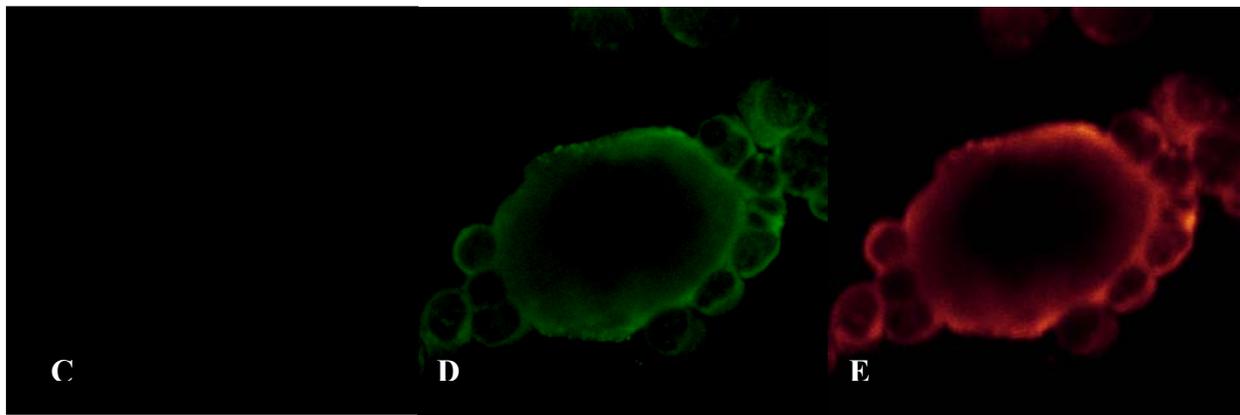
Die CK-positive Zelle der Patientin mit benigner Erkrankung (falsch-positives Resultat) erwies sich auch als positiv für den uPA-R.

Abb.10: Doppelimmunfluoreszenzfärbung CK-/uPA-R und May-Grünwald-Gegenfärbung eines Megakaryozyten, 630 fach



A: Transmissionsbild

B: May-Grünwald-Färbung



C und D: CK-Immunfluoreszenzfärbung, 448nm

E: uPA-R-Immunfluoreszenzfärbung, 568nm

Die Abbildungen D und E wurden bei extrem hoher Laserintensität aufgenommen, um die unspezifische Reaktion zu dokumentieren; auch die den Megakaryotyten umgebenden hämatopoietischen Zellen reagieren in gleicher Weise unspezifisch. Bei den üblicherweise verwendeten Laserintensitäten (Abbildung C) waren weder für CK noch für uPA-R Fluoreszenzsignale zu erkennen.

4.3.2 Phänotypisierung HER-2/neu

Die Phänotypisierung von disseminierten Tumorzellen auf ihren HER-2/neu-Gehalt musste entfallen, da auf sämtlichen nach CK-/HER-2/neu gefärbten Präparaten der 16 Patientinnen keine CK-positiven Zellen aufgefunden wurden. Bei 9 dieser 16 Patientinnen (bzw. 11 der 19 Knochenmarkaspirate) wurden bei der Beurteilung der 1×10^6 Zellen in der CK-/uPA-R-Doppelfärbung CK-positiv Zellen festgestellt. 7 Patientinnen (bzw. 8 Knochenmarkaspirate) wiesen in beiden Färbungen keine CK-positiven Zellen auf.

4.4 Entwicklung der CK-/HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Der nach dem in 2.2.3.4 beschriebenen Protokoll entwickelten Doppelimmunfluoreszenzfärbung für CK und HER-2/neu gingen zahlreiche Experimente voraus. Es stellte sich heraus, dass zur HER-2/neu-Darstellung eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung erforderlich war. Die aussichtsreichsten Färbeergebnisse ergab die Vorbehandlung durch Kochen im Wasserbad. Zugleich war diese Methode dadurch, dass sich weniger Zellen während des Kochvorgangs vom Objektträger lösten, die schonendere verglichen mit Hitzinduktion in Mikrowelle bzw. Wasserbad dar. Am günstigsten erwies sich eine Kochzeit im Wasserbad von 30 min, an die sich eine stufenweise Abkühlung der Präparate in Zitratpuffer pH 6,0 anschloss.

Unter den ausgetesteten Primärantikörpern für HER-2/neu zeigte der c-erbB-2 A0485 (Fa. Dako) mit einer deutlich membranständigen Färbung das beste Färbeergebnis.

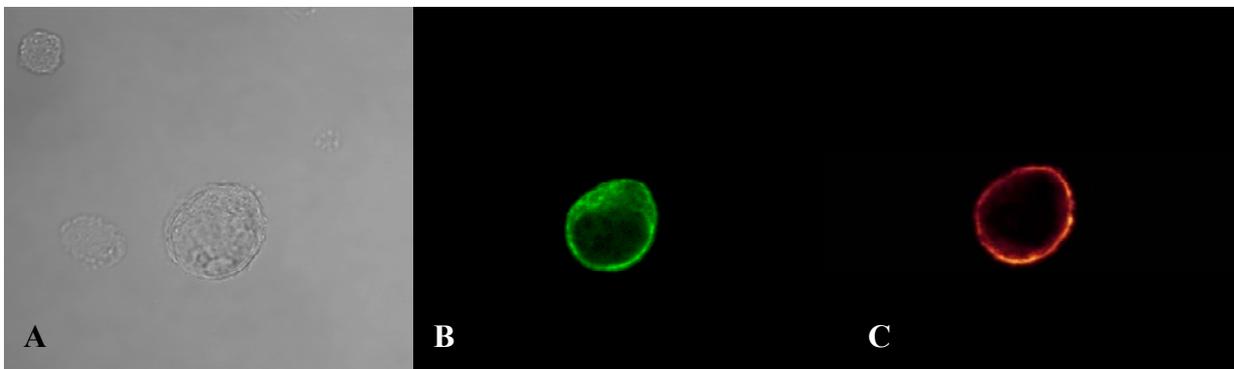
Zum Ausschluss einer unspezifischen Färbereaktion wurden Präparate aus den CK-positiven / uPA-R-positiven Zelllinien OvMz 10 und ZR 75 als Negativkontrolle gefärbt. An diesen Präparaten war kein spezifisches Fluoreszenzsignal für HER-2/neu nachzuweisen. In der Doppelfärbung zeigten sie wie erwartet eine zytoplasmatische Färbung für Zytokeratin, aber keine Anfärbbarkeit von HER-2/neu.

Die entwickelte Doppelimmunfluoreszenzfärbung nach dem in 2.2.3.4 beschriebenen Protokoll erfüllte die notwendigen Kriterien hinsichtlich Spezifität und Sensitivität. In der Negativkontrolle kam es bei gleichen Anregungsbedingungen nicht zu unspezifischen Signalen. Die Positivkontrollen zeigten eine zytoplasmatische Verteilung der CK-Komponente der Färbung in den Zellen, die HER-2/neu-Färbung stellte sich membranbetont dar. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 11 an einer Tumorzelle im „spike“-Präparat zu erkennen. Die SKBR-3-Tumorzellen konnten noch in einer Verdünnung von $1:10^6$ detektiert werden [Hocke, 2005] (siehe Abb. 12).

Diese Ergebnisse waren für die Anfärbbarkeit von HER-2/neu nur durch die hitzeinduzierte Antigendemaskierung zu erreichen. Unterblieb diese Vorbehandlung, war eine unverhältnismäßig hohe Laserintensität nötig, um überhaupt Signale zu erhalten. Zudem war das Färbeergebnis unscharf und unspezifisch über die Zellen verteilt (siehe Abb. 13).

In der Anwendung der Färbung am Patientinnenmaterial konnte in 16 Fällen auf keinem der Knochenmarkpräparate eine CK-positive Zelle gefunden werden, somit unterblieb die Charakterisierung dieser Zellen bezüglich der HER-2/neu-Expression.

Abb.11: Etablierung der CK-/HER-2/neu Doppelimmunfluoreszenzfärbung am „spike“-Präparat (SKBR-3)



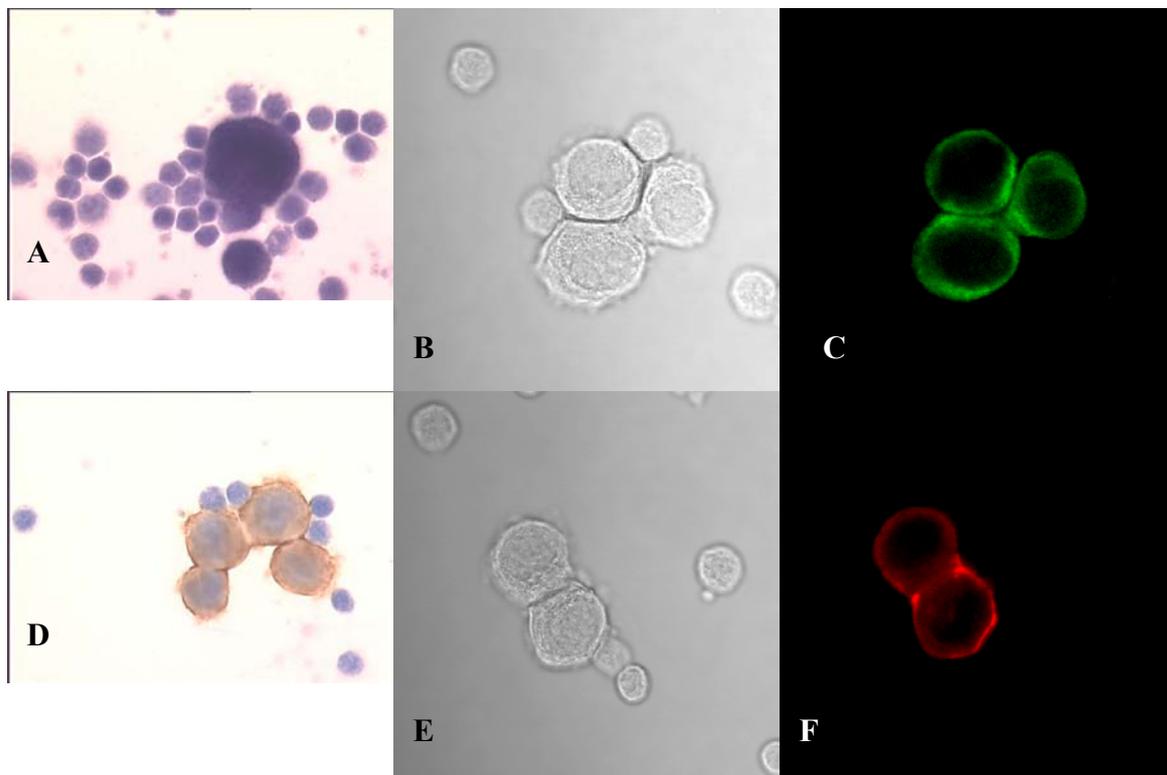
Doppelimmunfluoreszenzfärbung CK-/HER-2/neu, 630fach

A: Transmissionsbild

B: CK-Färbung
488nm

C: HER-2/neuFärbung
568nm

Abb.12: Immunzytochemie und Immunfluoreszenzfärbungen für CK bzw. HER-2/neu einer SKBR-3 : PBL-Verdünnung (1: 10⁶) mit hitzeinduzierter Demaskierung, 630fach (nach [Hocke, 2004])



A – C: CK-Färbungen

A: Immunzytochemie

B: Transmissionsbild

C: Immunfluoreszenz CK,
488 nm

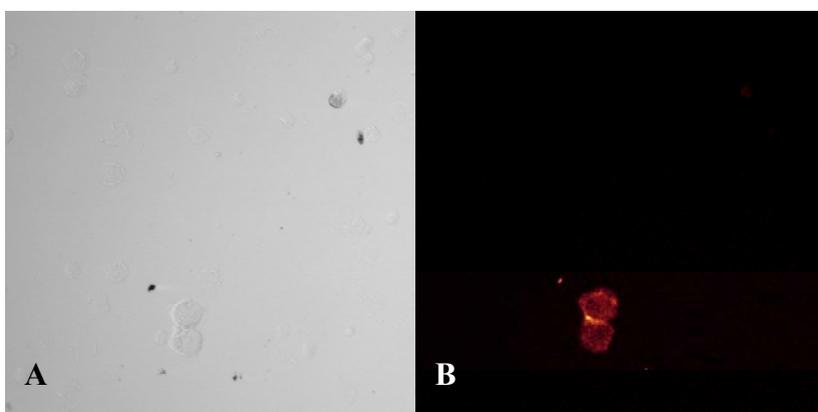
D – F: HER-2/neu-Färbungen

D: Immunzytochemie

E: Transmissionsbild

F: Immunfluoreszenz HER-2/neu,
568 nm

Abb.13: HER-2/neu-Einzelfärbung ohne Antigendemaskierung



Immunfluoreszenzfärbung HER-2/neu, 400fach

A: Transmissionsbild

B: HER-2/neu-Färbung
568nm

5. Diskussion

5.1 Methodik

5.1.1 Immunfluoreszenz vs. Immunzytochemie

Im Gegensatz zu den meisten Gruppen, die mit der APAAP-Färbung arbeiten, wurde in unserem Labor als immunzytochemische Methode die indirekte Immunfluoreszenz angewendet. Auf dem Gebiet der disseminierten Tumorzellen wurde sie aber auch bereits von der Arbeitsgruppe Cote et al. eingesetzt [Cote et al., 1991; Osborne et al., 1989]. Diese Technik bietet durch ihre hohe Selektivität deutliche Vorteile: Es werden hier nur die gesuchten, durch Antikörper markierten Strukturen sichtbar gemacht. Das geht auf Kosten der Aussagekraft bezüglich anderer zellmorphologischer Kriterien und ihrer räumlichen Beziehung zum angefärbten Antigen. Diese Mängel wurden durch die Bewertung eines Bildes im „Transmissions“-Modus des CLSM abgeschwächt. Das Transmissionsbild ersetzt nicht die konventionelle Gegenfärbung der Zellen, stellt aber eine Möglichkeit dar, Größe und Form sowohl der gesamten Zelle, wie auch Größe, Lage und Form des Zellkerns zu beurteilen.

Um eine optimale Aussagekraft zu erreichen, wäre eine Gegenfärbung mit konventionellen zytologischen Techniken denkbar. In einzelnen Fällen wurden in unserer Arbeitsgruppe nach der CK-/uPA-R-Immunfluoreszenzfärbung die Präparate entdeckelt und zusätzlich eine Gegenfärbung nach May-Grünwald angefertigt, um die Kriterien zum Tumorzellnachweis auch auf der morphologischen Ebene zu erbringen. Hierbei stimmten deutliche CK-Positivität und zytologische Malignitätsmerkmale in der May-Grünwald-Färbung überein [Sinz et al., 2001b]. Nach dem Entdecken des Präparats und der Neuanfärbung traten jedoch regelmäßig Schwierigkeiten beim Wiederauffinden der gesuchten Zellen auf oder die Zellen wurden während der Bearbeitung zerstört. Aus diesen Gründen und dem enormen zusätzlichen Arbeitsaufwand erwies sich dieses Procedere als nicht geeignet, um es in den routinemäßigen Ablauf im Labor zu integrieren.

Die Vorteile der Fluoreszenzmethode liegen in der Möglichkeit der gleichzeitigen Markierung zweier verschiedener Antigene, die in zwei getrennten Bildern analysiert werden können

[Noack et al., 1999]. Bei immunzytochemischen Doppelmarkierungsverfahren treten z.B. Probleme bei der Diskriminierung zweier Farbreaktionen auf. Besonders wenn die markierten Zielstrukturen im selben Zellkompartiment liegen, bietet die Immunfluoreszenz Vorteile. Eine spätere Bildbearbeitung ermöglicht auch das Betrachten von zwei übereinandergelegten Fluoreszenzbildern. Gegenüber den immunzytochemischen Doppelfärbungsmethoden bietet die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung am CLSM die Option der Antigenquantifizierung, die einer subjektiven Einschätzung überlegen ist [Noack et al., 2000]. Nachteilig ist der hohe zeitliche Aufwand beim Durchmustern der per Immunfluoreszenz gefärbten Zytospins am CLSM. Es gibt jedoch für beide Färbemethoden Geräte, die die Präparate automatisch untersuchen und auswerten [Bauer et al., 2000; Mehes et al., 2000]. Ebenso ist darauf hinzuweisen, dass bei fluoreszenzgefärbten Präparaten ein Archivieren des Materials wegen der nachlassenden Fluoreszenz nicht möglich ist. Spätere Überprüfungen können nur anhand der auf Datenträger gespeicherten Bilder stattfinden.

5.1.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung CK / uPA-R

Die CK-/uPA-R-Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurde in unserem Labor von Noack et al. entwickelt und kommt routinemäßig an Knochenmarkpräparaten von Patientinnen mit Ovarial- bzw. Mammakarzinom zum Einsatz [Noack et al., 1999]. Der Prozentsatz gefundener CK-positiver Zellen liegt mit 31,0% beim Ovarialkarzinom in dem Bereich, auf den andere Arbeitsgruppen kommen, die die APAAP-Technik anwenden [Braun et al., 2001a]. Bei 100 Patientinnen mit Mammakarzinom fanden sich nach unserer Methode CK- positive Zellen bei 49% der Untersuchten [Sinz, 2005]. Verglichen mit anderen Studien liegen die Ergebnisse hier im oberen erwarteten Bereich (siehe Tab.1).

Die Spezifität der Färbung ist ebenso wie bei der APAAP-Methode von dem verwendeten ersten Primär-Antikörper A45/B-B3 abhängig, der in nur etwa 1% falsch-positive Resultate aufweist [Braun et al., 2000b]. Auch in dieser Arbeit wurde bei einer von 23 Patientinnen (4,3%) mit benigner Erkrankung CK- positive Zellen im Knochenmark gefunden. In diesem Fall war die Patientin unter der Verdachtsdiagnose Ovarialkarzinom operiert worden, der histologische Befund ergab jedoch ein benignes Ovarialkystom.

Für den zweiten Primärantikörper HU 277 gegen uPA-R geben Magdolen et al. keine unspezifischen Reaktionen gegenüber anderen Proteinen an [Magdolen et al., 1995]. In dieser Arbeit wiesen alle aufgefundenen CK-positiven Zellen auch eine vorwiegend membranständige Expression des uPA-R auf. Eine Studie mit parallelem Untersuchungsaufbau bei Mammakarzinompatientinnen unserer Arbeitsgruppe ergab ähnliche Resultate [Sinz et al., 2001b]. Diese Ergebnisse unterscheiden sich somit von bisherigen Untersuchungen zur uPA-R-Phänotypisierung disseminierter Tumorzellen. Die Arbeitsgruppe Allgayer, Heiss et al. führte CK-/uPA-R-Doppelfärbungen an disseminierten Tumorzellen bei Magenkarzinompatienten durch. Sie konnten nur auf einem Teil (48% bzw. 58%) der disseminierten Tumorzellen die Expression von uPA-R zeigen [Allgayer et al., 1997a; Heiss et al., 2002]. Für diese uPA-R-positive Subgruppe wurde ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben beobachtet. Bei Mammakarzinompatientinnen kamen Tögel et al. auf einen Anteil von 52% an disseminierten Tumorzellen, die zugleich uPA-R exprimierten [Tögel et al., 2001]. Die Doppelmarkierung in den genannten Arbeiten fand mit der Immunogold-/ Alkalische Phosphatase-Methode statt, bei der eine Abschätzung des Grades der Antigenquantität kaum bzw. nur nach subjektiven Kriterien zu erheben ist. Als Ergebnis kann nur „uPA-R-Expression vorhanden“ und „uPA-R-Expression nicht vorhanden“ ermittelt werden. Mit unserer Immunfluoreszenzmarkierung ist eine sensitivere Analyse denkbar, die bereits geringere Expressionsgrade als positives Resultat zur Auswertung bringt, wodurch die 100% an positiv für uPA-R phänotypisierten CK-positiven Zellen zu erklären sind. In der statistischen Analyse zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss des Ausmaßes der uPA-R-Expression auf die rezidivfreie Überlebenszeit bzw. Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen. Eine Fortführung der Untersuchung könnte mit dann größeren Fallzahlen eine statistisch zuverlässigere Aussage bringen. Langfristig besteht nach der Untersuchung größerer Patientenkollektive und damit umfassenderen Erfahrungen in der Antigenquantifizierung auf disseminierten Tumorzellen die Möglichkeit, „cut-off“-Werte zu ermitteln und auf diese Weise das Risiko für die Patientinnen individueller einzuschätzen.

5.1.3 Etablierung der CK-/HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Die Experimente dieser Arbeit führten zu einer Etablierung der CK-/HER-2/neu Doppelimmunfluoreszenzfärbung in unserem Labor. Im Laufe der durchgeführten Versuche zeichnete sich ab, dass für die mit PFA 1% fixierten Präparate eine Demaskierung des

Antigens erforderlich war [Shi et al., 2001]. Dazu wurden die Zytospins bei 96°C im Wasserbad vorbehandelt. So konnte an CK-/HER-2/neu-positiven Zelllinienpräparaten (SKBR-3) eine wie in der Literatur beschriebene Anfärbbarkeit der Antigene CK und HER-2/neu demonstriert werden. Die Zytokeratinfärbung erstreckte sich über das Zytoplasma, hier wurde im Vergleich mit dem Transmissionsbild die Aussparung des Zellkerns deutlich [Moll et al., 1982]. Die HER-2/neu-Färbung erfolgte an der Zellmembran [Slamon et al., 1989] (siehe Abb. 11).

Bei der Auswertung von Präparaten mit 1×10^6 Zellen von 16 Patientinnen wurde allerdings keine CK-positive Zelle gefunden. Somit konnte auch der Nachweis von HER-2/neu auf den untersuchten Patientenpräparaten nicht geführt werden. Die Tatsache, dass bei 9 dieser 16 Patientinnen unter den anderen 1×10^6 Zellen in der CK-uPA-R-Färbung durchaus Tumorzellen gefunden wurden, lässt Fragen bezüglich der Gültigkeit der neuen Färbemethode aufkommen. Positiv-, Negativ-, sowie Isotypkontrollen wiesen in allen diesen Fällen ein korrektes Ergebnis auf. In den mitgeführten Positivkontrollpräparaten in Form von „spikes“ wurde die Situation der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark simuliert. Hier waren Anfärbung, Auffinden und Beurteilung der Tumorzellen zwischen den Knochenmarkzellen gut möglich. Verdünnungsversuche zur Überprüfung der Sensitivität zeigten, dass es mit der neu eingeführten CK-HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung möglich ist, noch unter 10^6 Knochenmarkszellen einzelne Tumorzellen zu detektieren. Die Unterschiede in den Färbeergebnissen können zum einen in der verschiedenen Handhabung der Präparate bei beiden Färbungen liegen. Möglicherweise bewirkt die zur HER-2/neu-Darstellung notwendige Hitzevorbehandlung zur Antigendemaskierung Veränderungen an den Tumorzellen im Knochenmark, die eine Abschwächung der Reaktivität der CK-Bestandteile dieser Zellen bewirkt. Die im „spike“ vereinzelt Tumorzellen stammen aus gezüchteten SKBR-3-Zelllinien. Sie könnten sich diesem Einfluss gegenüber robuster als disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen verhalten. Eine andere Erklärung für die diskrepanten Resultate ist die grundsätzlich geringe Anzahl der eventuell vorhandenen Tumorzellen im Knochenmark. In den meisten Fällen von CK-positiven Zellen wurde auch bei der Auswertung von 2×10^6 Knochenmarkszellen mittels der CK-/uPA-R-Doppelimmunfluoreszenzfärbung nur eine Tumorzelle nachgewiesen. Daher kann es sich auch um eine Serie tatsächlich negativer Präparate handeln, bei der die zufällige Verteilung der insgesamt 2×10^6 Zellen auf 10 Objektträger, von denen je eine Hälfte nach CK/uPA-R-Färbung bzw. CK-HER-2/neu-Färbung beurteilt wurden, eine Rolle spielt. Diese

Schwierigkeiten sind vergleichbar bei Studien zur Phänotypisierung disseminierter Tumorzellen, bei denen zunächst mit der APAAP-Methode ein Screening auf CK-positive Zellen durchgeführt wird, und bei positiven Resultaten eine Doppelfärbung mit einer anderen Technik angefertigt wird. Hier wird im zweiten Färbedurchgang ebenfalls nicht die ursprüngliche Zahl an tumorzellpositiven Präparaten erreicht [Heiss et al., 2002].

5.2 Bedeutung von CK⁺-Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom

5.2.1 Lokales Tumorwachstum und systemische Tumorzellausbreitung beim Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom metastasiert typischerweise nicht in das Knochenmark und den Knochen. Die Tatsache, dass zum Zeitpunkt der Diagnose bei nahezu einem Drittel der Patientinnen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark zu finden sind, auch und besonders in frühen Krankheitsstadien, weist auf das frühe Ausbreitungspotential des Tumors hin. Die Vorgänge der Tumorausbreitung per continuitatem in Becken- und Bauchhöhle scheinen dabei parallel zur systemischen Tumorzellaussaat abzulaufen. Während das lokoregionäre Wachstum durch konventionelle diagnostische Möglichkeiten überprüft werden kann, erfolgt die systemische Ausbreitung zunächst unbemerkt. Die Eigenschaften dieser Zellen sind Gegenstand intensiver Forschung. Sie befinden sich vorwiegend in einem „schlafähnlichen“, persistierenden Zustand, in dem keine Proliferation erfolgt [Pantel et al., 1993]. Welche Zellen aus dem Primärtumor disseminiert sind, durch welche Einflüsse und zu welchem Zeitpunkt die Zellteilung wieder aufgenommen wird und eine Expansion stattfindet ist ebenso wenig geklärt, wie die Frage, welche der Tumorzellen überhaupt fähig sind, Metastasen zu bilden. Die Phänotypisierung einzelner, disseminierter Tumorzellen mag hier einen Beitrag leisten, um diese Vorgänge besser zu verstehen. Auch können die Bemühungen, geeignete adjuvante Therapien zu entwickeln, mit weiteren Informationen über mögliche Zielstrukturen weiter vorangebracht werden. Mit derselben Absicht wird inzwischen auch die molekulare Analyse disseminierter Tumorzellen angewendet [Klein, 2002].

5.2.2 Knochenmarkstatus und etablierte Prognosefaktoren

In dieser Untersuchung konnten bei 31,0% der Patientinnen mit Ovarialkarzinom CK-positive Zellen im Knochenmark detektiert werden. Zum Zeitpunkt der Primärtherapie waren es 30,9%. Insgesamt bestätigt das Resultat bereits bestehende Studien, die bei 18% bis 43% der Patientinnen Tumorzellen im Knochenmark fanden (siehe Tab. 2). Die Ergebnisse weisen einen ähnlichen Prozentsatz CK-positiver Zellen wie die Arbeit von Braun et al. auf. In dieser bisher größten Studie wurden bei 30% der Patientinnen disseminierte Tumorzellen nachgewiesen [Braun et al., 2001a]. Auffallend an unseren Ergebnissen ist, dass 6 von 8 Patientinnen (75%) bereits im frühen Krankheitsstadium FIGO I CK-positive Zellen aufwiesen. Braun et al. finden im Stadium I bei 20% der Patientinnen Tumorzellen im Knochenmark. Hierdurch ist auch zum Zeitpunkt der Primärtherapie der statistisch signifikante Unterschied in der Verteilung der FIGO-Stadien ($p = 0,036$) bzw. der pT-Stadien ($p = 0,009$) zu erklären, da den frühen Stadien auffällig viele Patientinnen einen positiven Knochenmarkstatus haben. Für die übrigen untersuchten Faktoren wie Lymphknotenstatus, Operationsergebnis, Fernmetastasierung, Grading, Aszitesmenge und Histologie liess sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zum Knochenmarkstatus erkennen. Bei den nach neoadjuvanter Chemotherapie untersuchten Patientinnen gilt dies ebenso wie auch für FIGO- bzw. pT-Stadium.

Die Analyse der Nachbeobachtungsdaten des Patientinnenkollektivs erbrachte in der Gruppe der zum Zeitpunkt der Primärtherapie wie auch der nach einer neoadjuvanten Chemotherapie untersuchten Patientinnen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens. Auch die Arbeit von Marth et al., die mit EGP-2 einen anderen epithelialen Marker als unsere Arbeitsgruppe verwendeten, konnte zeigen, dass der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und im peripheren Blut nicht mit einem kürzerem rezidivfreien oder Gesamtüberleben assoziiert ist [Marth et al., 2002]. Damit kommt die vorliegende Untersuchung, bei einer etwas kürzeren Nachbeobachtungsdauer der Patientinnen und anderer Nachweismethode zu einem anderen Ergebnis als Braun et al., die mit dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen eine klinische Relevanz verbinden. Ein positiver Knochenmarkstatus war hier mit einem signifikant kürzerem rezidivfreien Überleben und auch kürzerem Gesamtüberleben assoziiert [Braun et al., 2001a].

5.3 Einfluss einer neoadjuvanten Chemotherapie auf den Knochenmarkstatus von Patientinnen mit Ovarialkarzinom

Das Knochenmark von 13 Patientinnen wurde vor und nach einer neoadjuvanten platinhaltigen Chemotherapie auf disseminierte CK-positive Zellen untersucht. Hierbei zeichnete sich ab, dass die neoadjuvante Therapie keinen wesentlichen Einfluss auf das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen ausübt. Neben Fällen, die weder vor noch nach der Chemotherapie CK-positive Zellen aufwiesen ($n = 6$), waren vor allem die Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus vor neoadjuvanter Therapie interessant ($n = 5$). Hier waren in drei Fällen nach der Therapie ebenfalls CK-positive Zellen vorhanden, während in zwei Fällen keine CK-positiven Zellen mehr gefunden wurden. Bei zwei Patientinnen war der Ausgangsbefund vor der Chemotherapie negativ, danach waren jedoch CK-positive Zellen vorhanden.

In einer Untersuchung bei Mammakarzinompatientinnen, deren Knochenmark vor und nach einer adjuvanten Chemotherapie untersucht wurde, kommen Braun et al. zu ähnlichen Schlussfolgerungen [Braun et al., 2000a]. Eine weitere Studie belegt, dass eine Hochdosischemotherapie beim Mammakarzinom zwar eine signifikante Abnahme der Anzahl disseminierter Tumorzellen bewirkt, eine vollständige Elimination jedoch nicht zu leisten vermag [Krüger et al., 2001]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass disseminierte Tumorzellen im Knochenmark in den wenigsten Fällen aktiv proliferieren, sondern sich in einem persistierenden Zustand (dormancy) befinden [Pantel et al., 1993] und damit von einer konventionellen Chemotherapie schwer zu erreichen und zu eliminieren sind. Hier sehen Mehes et al. die Möglichkeit, durch funktionelle Charakterisierung unter zellkinetischen Gesichtspunkten eine Unterscheidung zwischen Zellen in aktiver Proliferation, persistierendem Zustand (dormancy) und Zelltod (Apoptose) durchzuführen [Mehes et al., 2002].

5.4 Möglichkeit des Therapie-Monitoring

In dieser Untersuchung wurde bei 13 Patientinnen zu verschiedenen Krankheits- und Therapiezeitpunkten – vor und nach einer primären Chemotherapiebehandlung – Knochenmark auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Durch die wiederholten Knochenmarkpunktionen im Krankheits- und Therapieverlauf konnte so der Verlauf einer minimal residualen Tumorerkrankung verfolgt werden. Die Zahl der untersuchten Patientinnen war zwar gering, die neoadjuvante Chemotherapie scheint jedoch keinen Einfluss auf den Knochenmarkstatus zur Folge zu haben (siehe 4.3.). Neben der Durchführung von Studien mit größeren Patientenzahlen können durch weitere Knochenmarkaspirationen auch einzelne Krankheitsverläufe verfolgt werden. Die Punktion ist in Lokalanästhesie und ambulant durchführbar, so dass sie unter Studienbedingungen auch im Rahmen der Tumornachsorge bzw. Rezidivtherapie zum Einsatz kommen könnte. So kann der Knochenmarkstatus der Patientin neben dem Zeitpunkt der Primärtherapie auch nach dem Abschluss der primären Behandlung (nach Operation und adjuvanter Chemotherapie) oder z.B. bei Auftreten eines Rezidivs und einer erneuten Chemotherapiebehandlung beurteilt werden.

In einer Arbeit zum Mammakarzinom zeigte sich, dass Hochrisikopatientinnen, bei denen nach Abschluss der adjuvanten Chemotherapie Tumorzellen im Knochenmark vorlagen, verglichen mit tumorzellfreien Patientinnen eine deutlich schlechtere klinische Prognose aufweisen [Braun et al., 2000a]. Möglicherweise kann ein positiver Tumorzellnachweis nach Abschluss der Primärtherapie mit dazu beitragen, die weitere Behandlungsbedürftigkeit zu erkennen. Diese Therapie könnte dann vorteilhaft zu einem früheren Krankheitszeitpunkt erfolgen, nicht erst bei Erkennen des Rezidivs durch klinische oder konventionelle diagnostische Untersuchungen im Rahmen der Nachsorge.

Gerade auch zur Beurteilung des Ansprechens zukünftiger Therapien mit monoklonalen Antikörpern, die disseminierte Tumorzellen eliminieren sollen, können wiederholte Knochenmarkanalysen erforderlich werden [Braun et al., 1999].

Einige Studien zur Therapie mit monoklonalen Antikörpern, deren Zielstrukturen durch Phänotypisierung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark ermittelt wurden, zeigten

erste Erfolge. So wurde bei Mammakarzinompatientinnen, die mit einem monoklonalen Lewis Y-Antikörper therapiert wurden, bestätigt, dass nur im Falle von disseminierten Tumorzellen mit Lewis Y-positivem Phänotyp eine Abnahme der Tumorzellen erwartet werden konnte. Die Überprüfung des Behandlungserfolgs erfolgte durch wiederholte Knochenmarkuntersuchungen [Schlimok et al., 1995]. Eine weitere Arbeit zeigte, dass die Expression von EpCAM auf disseminierten Tumorzellen als Angriffspunkt für Edrecolomab, einen monoklonalen EpCAM-Antikörper, dienen kann. In dem folgenden Therapie-Monitoring durch erneute Knochenmarkpunktion war die mittlere Anzahl der disseminierten Tumorzellen bei allen Patientinnen reduziert. In 4 von 10 Fällen konnte eine komplette Elimination der Tumorzellen nachgewiesen werden [Braun et al., 1999]. Hempel et al. untersuchten den Erfolg einer Kombination von Hochdosis-Chemotherapie und Antikörpertherapie. Dabei ergaben die Nachuntersuchungen eine signifikante Abnahme disseminierter Tumorzellen nach der Kombinationstherapie bei Hochrisikopatientinnen mit Mammakarzinom [Hempel et al., 2000].

Falls sich in Studien bestätigt, dass auch beim Ovarialkarzinom eine Antikörpertherapie bzw. andere zielgerichtete Therapien gewinnbringend eingesetzt werden können, könnte auch hier der Therapieerfolg durch Untersuchung des Knochenmarks auf CK-positive Zellen überprüft werden. Dabei können durch Doppelfärbungen gewonnene Erkenntnisse über den Phänotyp der disseminierten Zellen für die Auswahl und Weiterentwicklung der eingesetzten Medikamente von Nutzen sein.

6. Zusammenfassung

In einer prospektiven Untersuchung wurde bei 84 Patientinnen mit Ovarialkarzinom das Knochenmark auf zytokeratin (CK)-positive Zellen gescreent. Von 13 Patientinnen wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Knochenmark entnommen, jeweils vor und nach einer neoadjuvanten Chemotherapiebehandlung. Der Nachweis CK-positiver Zellen erfolgte durch Immunfluoreszenzdoppelfärbungen, die an einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (CLSM) ausgewertet wurden. Neben dem Nachweis von CK, der im mesenchymalen Organ Knochenmark die Zellen als epitheliale Tumorzellen detektierte, wurden diese Zellen auf das Vorhandensein von uPA-R, einem tumorassoziierten Proteolysefaktor überprüft. Um die Phänotypisierung der CK-positiven Zellen zu erweitern, wurde eine neue Doppelimmunfluoreszenzfärbung für CK und HER-2/neu, einem weiteren tumorbiologischen Faktor, erarbeitet. Bei 26 der 84 Patientinnen (31,0%) konnten CK-positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Die Patientinnen mit CK-positiven Zellen im Knochenmark unterschieden sich hinsichtlich der rezidivfreien Überlebenszeit und dem Gesamtüberleben nicht signifikant von den Patientinnen mit negativem Knochenmarkstatus. Ein Einfluss einer neoadjuvanten Chemotherapie auf das Vorhandensein von CK-positiven Zellen im Knochenmark konnte nicht gezeigt werden. Auf allen mit der CK-/uPA-R-Doppelimmunfluoreszenzfärbung identifizierten CK-positiven Zellen war auch in unterschiedlicher Intensität uPA-R nachzuweisen. Das Ausmaß der uPA-R-Expression hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die rezidivfreie Überlebenszeit bzw. Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen. Eine CK-/HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung konnte an Zelllinienpräparaten erfolgreich entwickelt werden. Ihr Einsatz muss nun noch in großer Fallzahl an Knochenmarkzytospins erfolgen. Die Phänotypisierung der gefundenen CK-positiven Zellen ist Voraussetzung für erfolgreiche, zukünftige Therapieoptionen mit humanisierten, monoklonalen Antikörpern oder anderen zielgerichteten Therapien, die an disseminierten Tumorzellen angreifen.

7. Literaturverzeichnis

1. Abdul-Karim, F. W., Kida, M., Wentz, W. B., Carter, J. R., Sorensen, K., Macfee, M., Zika, J., Makley, J. T. (1990):
Bone metastasis from gynecologic carcinomas: A clinicopathologic study.
Gynecol. Oncol., 39 (2): 108-114
2. Agus, D. B., Bunn, P. A., Jr., Franklin, W., Garcia, M., Ozols, R. F. (2000):
HER-2/neu as a therapeutic target in non-small cell lung cancer, prostate cancer, and ovarian cancer.
Semin. Oncol., 27 (6 Suppl 11): 53-63
3. Allgayer, H., Heiss, M. M., Riesenberger, R., Babic, R., Jauch, K. W., Schildberg, F. W. (1997a):
Immunocytochemical phenotyping of disseminated tumor cells in bone marrow by uPA receptor and CK18: Investigation of sensitivity and specificity of an immunogold/alkaline phosphatase double staining protocol.
J. Histochem. Cytochem., 45 (2): 203-212
4. Allgayer, H., Heiss, M. M., Riesenberger, R., Grützner, K. U., Tarabichi, A., Babic, R., Schildberg, F. W. (1997b):
Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R): One potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease.
Cancer Res., 57 (7): 1394-1399
5. Ansquer, Y., Leblanc, E., Clough, K., Morice, P., Dauplat, J., Mathevet, P., Lhommé, C., Scherer, C., Tigaud, J. D., Benchaib, M., Fourme, E., Castaigne, D., Querleu, D., Dargent, D. (2001):
Neoadjuvant chemotherapy for unresectable ovarian carcinoma: A French multicenter study.
Cancer, 91 (12): 2329-2334
6. Bauer, K. D., de la Torre-Bueno, J., Diel, I. J., Hawes, D., Decker, W. J., Priddy, C., Bossy, B., Ludmann, S., Yamamoto, K., Masih, A. S., Espinoza, F. P., Harrington, D. S. (2000):
Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging.
Clin. Cancer Res., 6 (9): 3552-3559
7. Berchuck, A., Kamel, A., Whitaker, R., Kerns, B., Olt, G., Kinney, R., Soper, J. T., Dodge, R., Clarke-Pearson, D. L., Marks, P. (1990):
Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer.
Cancer Res., 50 (13): 4087-4091

8. Bookman, M. A., Darcy, K. M., Clarke-Pearson, D., Boothby, R. A., Horowitz, I. R. (2003):
Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: A phase II trial of the Gynecologic Oncology Group.
J. Clin. Oncol., 21 (2): 283-290
9. Borgen, E., Naume, B., Nesland, J. M., Kvalheim, G., Beiske, K., Fodstad, O., Diel, I., Solomayer, E. F., Theoharous, P., Coombes, R. C., Smith, B. M., Wunder, E., Marolleau, J. P., Garcia, J., Pantel, K. (1999):
Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells.
Cytotherapy, 1 (5): 377-388
10. Braun, S., Hepp, F., Kentenich, C. R., Janni, W., Pantel, K., Riethmüller, G., Willgeroth, F., Sommer, H. L. (1999):
Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: Monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow.
Clin. Cancer Res., 5 (12): 3999-4004
11. Braun, S., Kentenich, C., Janni, W., Hepp, F., de Waal, J., Willgeroth, F., Sommer, H., Pantel, K. (2000a):
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., 18 (1): 80-86
12. Braun, S., Pantel, K. (1998):
Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement.
Breast Cancer Res. Treat., 52 (1-3): 201-216
13. Braun, S., Pantel, K., Müller, P., Janni, W., Hepp, F., Kentenich, C. R., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmüller, G., Schlimok, G. (2000b):
Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.
N. Engl. J. Med., 342 (8): 525-533
14. Braun, S., Schindlbeck, C., Hepp, F., Janni, W., Kentenich, C., Riethmüller, G., Pantel, K. (2001a):
Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse.
J. Clin. Oncol., 19 (2): 368-375
15. Braun, S., Schlimok, G., Heumos, I., Schaller, G., Riethdorf, L., Riethmüller, G., Pantel, K. (2001b):
ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients.
Cancer Res., 61 (5): 1890-1895

16. Bristow, R. E., Tomacruz, R. S., Armstrong, D. K., Trimble, E. L., Montz, F. J. (2002):
Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: A meta-analysis.
J. Clin. Oncol., 20 (5): 1248-1259
17. Brun, J. L., Feyler, A., Chêne, G., Saurel, J., Brun, G., Hocké, C. (2000):
Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer.
Gynecol. Oncol., 78 (1): 21-27
18. Cain, J. M., Ellis, G. K., Collins, C., Greer, B. E., Tamimi, H. K., Figge, D. C., Gown, A. M., Livingston, R. B. (1990):
Bone marrow involvement in epithelial ovarian cancer by immunocytochemical assessment.
Gynecol. Oncol., 38 (3): 442-445
19. Christian, J., Thomas, H. (2001):
Ovarian cancer chemotherapy.
Cancer Treat. Rev., 27 (2): 99-109
20. Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K. A., Stein, H., Mason, D. Y. (1984):
Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).
J. Histochem. Cytochem., 32 (2): 219-229
21. Cote, R. J., Rosen, P. P., Lesser, M. L., Old, L. J., Osborne, M. P. (1991):
Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases.
J. Clin. Oncol., 9 (10): 1749-1756
22. Dauplat, J., Hacker, N. F., Nieberg, R. K., Berek, J. S., Rose, T. P., Sagae, S. (1987):
Distant metastases in epithelial ovarian carcinoma.
Cancer, 60 (7): 1561-1566
23. Davidovits, P., Egger, M. D. (1969):
Scanning laser microscope.
Nature, 223 (208): 831
24. de Manzoni, G., Pelosi, G., Pavanel, F., Di Leo, A., Pedrazzani, C., Durante, E., Cordiano, C., Pasini, F. (2002):
The presence of bone marrow cytokeratin-immunoreactive cells does not predict outcome in gastric cancer patients.
Br. J. Cancer, 86 (7): 1047-1051

-
25. Dearnaley, D. P., Sloane, J. P., Ormerod, M. G., Steele, K., Coombes, R. C., Clink, H. M., Powles, T. J., Ford, H. T., Gazet, J. C., Neville, A. M. (1981):
Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen.
Br. J. Cancer, 44 (1): 85-90
 26. Diel, I. J., Kaufmann, M., Costa, S. D., Holle, R., von Minckwitz, G., Solomayer, E. F., Kaul, S., Bastert, G. (1996):
Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: Prognostic value in comparison with nodal status.
J. Natl. Cancer Inst., 88 (22): 1652-1658
 27. Dillman, R. O. (1994):
Antibodies as cytotoxic therapy.
J. Clin. Oncol., 12 (7): 1497-1515
 28. Egger, M. D., Petran, M. (1967):
New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells.
Science, 157 (786): 305-307
 29. Eisenhauer, E. A., Gore, M., Neijt, J. P. (1999):
Ovarian cancer: should we be managing patients with good and bad prognostic factors in the same manner?
Ann. Oncol., 10 Suppl. 1: 9-15
 30. Fajac, A., Benard, J., Lhomme, C., Rey, A., Duvillard, P., Rochard, F., Bernaudin, J. F., Riou, G. (1995):
c-erbB2 gene amplification and protein expression in ovarian epithelial tumors: evaluation of their respective prognostic significance by multivariate analysis.
Int. J. Cancer, 64 (2): 146-151
 31. Felip, E., Del Campo, J. M., Rubio, D., Vidal, M. T., Colomer, R., Bermejo, B. (1995):
Overexpression of c-erbB-2 in epithelial ovarian cancer. Prognostic value and relationship with response to chemotherapy.
Cancer, 75 (8): 2147-2152
 32. Funke, I., Schraut, W. (1998):
Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: An independent prognostic impact remains to be substantiated.
J. Clin. Oncol., 16 (2): 557-566
 33. Gabriel, M., Obrebowska, A., Spaczynski, M. (2000):
Nachweis von Epithelzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen unter Anwendung von immunhistochemischen Methoden.
Gynäkol. Geburtshilfliche Rundsch., 40 (3-4): 140-144

34. Gebauer, G., Fehm, T., Maul, H., Baier, P., Scharf, A., Sohn, C., Jaeger, W. (2004):
Cytokeratin positive cells in bone marrow, tumor biologic parameters of the primary tumor and survival in breast cancer patients.
J. Clin. Oncol. , ASCO Annual Meeting Proceedings, 22 (14S): 9517
35. Gerber, B., Krause, A., Müller, H., Richter, D., Reimer, T., Makovitzky, J., Herrring, C., Jeschke, U., Kundt, G., Friese, K. (2001):
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., 19 (4): 960-971
36. Harbeck, N., Dettmar, P., Thomssen, C., Berger, U., Ulm, K., Kates, R., Höfler, H., Jänicke, F., Graeff, H., Schmitt, M. (1999):
Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up.
Br. J. Cancer, 80 (3-4): 419-426
37. Harbeck, N., Untch, M., Pache, L., Eiermann, W. (1994):
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, 69 (3): 566-571
38. Heiss, M. M., Allgayer, H., Gruetzner, K. U., Funke, I., Babic, R., Jauch, K. W., Schildberg, F. W. (1995):
Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: A reference to early systemic disease in solid cancer.
Nat. Med., 1 (10): 1035-1039
39. Heiss, M. M., Simon, E. H., Beyer, B. C., Gruetzner, K. U., Tarabichi, A., Babic, R., Schildberg, F. W., Allgayer, H. (2002):
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. Clin. Oncol., 20 (8): 2005-2016
40. Hempel, D., Müller, P., Oruzio, D., Behr, W., Brockmeyer, C., Wochner, M., Ehnle, S., Riethmuller, R., Schlimok, G. (2000):
Combination of high-dose chemotherapy and monoclonal antibody in breast-cancer patients: a pilot trial to monitor treatment effects on disseminated tumor cells.
Cytotherapy, 2 (4): 287-295

41. Hocke, S. (2005):
Phänotypisierung zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen -
Klinische Beobachtung.
Dissertation, TU München
42. Hohaus, S., Funk, L., Brehm, M., Abdallah, A., Murea, S., Kaul, S., Haas, R. (1996):
Persistence of isolated tumor cells in patients with breast cancer after sequential high-dose therapy with
peripheral blood stem cell transplantation (PBSC).
Blood, 88 (Suppl.10): 128a (abstract)
43. Holschneider, C. H., Berek, J. S. (2000):
Ovarian cancer: Epidemiology, biology, and prognostic factors.
Semin. Surg. Oncol., 19 (1): 3-10
44. Janni, W., Hepp, F., Rjosk, D., Kentenich, C., Strobl, B., Schindlbeck, C., Hantschmann, P., Sommer, H.,
Pantel, K., Braun, S. (2001):
The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast
carcinoma between primary treatment and recurrence.
Cancer, 92 (1): 46-53
45. Janni, W., Hepp, F., Strobl, B., Rack, B., Rjosk, D., Kentenich, C., Schindlbeck, C., Hantschmann, P.,
Pantel, K., Sommer, H., Braun, S. (2003):
Patterns of disease recurrence influenced by hematogenous tumor cell dissemination in patients with
cervical carcinoma of the uterus.
Cancer, 97 (2): 405-411
46. Jauch, K. W., Heiss, M. M., Gruetzner, U., Funke, I., Pantel, K., Babic, R., Eissner, H. J., Riethmueller,
G., Schildberg, F. W. (1996):
Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer.
J. Clin. Oncol., 14 (6): 1810-1817
47. Jonas, S., Weinrich, M., Tullius, S. G., Al Abadi, H., Steinbrich, R., Radke, C., Klupp, J., Neuhaus, P.
(2004):
Microscopic tumor cell dissemination in gastric cancer.
Surg. Today, 34 (2): 101-106
48. Kasper, M., Stosiek, P., Typlt, H., Karsten, U. (1987):
Histological evaluation of three new monoclonal anti-cytokeratin antibodies. 1. Normal tissues.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 23 (2): 137-147
49. Klein, C. A. (2002):
Die direkte molekulare Analyse einzelner disseminierter Tumorzellen: Eine Voraussetzung für die
Entwicklung adjuvanter Therapien?
Acta Med. Austriaca, 29 Suppl 59: 10-13

-
50. Krüger, W. H., Kröger, N., Tögel, F., Renges, H., Badbaran, A., Hornung, R., Jung, R., Gutensohn, K., Giesecking, F., Jänicke, F., Zander, A. R. (2001):
Disseminated breast cancer cells prior to and after high-dose therapy.
J. Hematother. Stem Cell Res., 10 (5): 681-689
51. Kuhn, W., Rutke, S., Späthe, K., Schmalfeldt, B., Florack, G., von Hundelshausen, B., Pachyn, D., Ulm, K., Graeff, H. (2001):
Neoadjuvant chemotherapy followed by tumor debulking prolongs survival for patients with poor prognosis in International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage IIIc ovarian carcinoma.
Cancer, 92 (10): 2585-2591
52. Kuhn, W., Schmalfeldt, B., Reuning, U., Pache, L., Berger, U., Ulm, K., Harbeck, N., Späthe, K., Dettmar, P., Höfler, H., Jänicke, F., Schmitt, M., Graeff, H. (1999):
Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc.
Br. J. Cancer, 79 (11-12): 1746-1751
53. Lacroix, J., Doeberitz, M. K. (2001):
Technical aspects of minimal residual disease detection in carcinoma patients.
Semin. Surg. Oncol., 20 (4): 252-264
54. Landys, K., Persson, S., Kovarik, J., Hultborn, R., Holmberg, E. (1998):
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., 49 (1): 27-33
55. Le, T., Krepart, G. V., Lotocki, R. J., Heywood, M. S. (1997):
Does debulking surgery improve survival in biologically aggressive ovarian carcinoma?
Gynecol. Oncol., 67 (2): 208-214
56. Lebeau, A., Deimling, D., Kaltz, C., Sendelhofert, A., Iff, A., Luthardt, B., Untch, M., Löhrs, U. (2001):
Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: Comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization.
J. Clin. Oncol., 19 (2): 354-363
57. Lindemann, F., Schlimok, G., Dirschedl, P., Witte, J., Riethmüller, G. (1992):
Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients.
Lancet, 340 (8821): 685-689
58. Loos, J. A., Roos, D. (1974):
Ficoll-isopaque gradients for the determination of density distributions of human blood lymphocytes and other reticulo-endothelial cells.
Exp. Cell Res., 86 (2): 333-341

-
59. Magdolen, V., Rettenberger, P., Lopens, A., Oi, H., Lottspeich, F., Kellermann, J., Creutzburg, S., Goretzki, L., Weidle, U. H., Wilhelm, O. (1995):
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, 16 (5): 813-816
60. Makar, A. P., Baekelandt, M., Tropé, C. G., Kristensen, G. B. (1995):
The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer.
Gynecol. Oncol., 56 (2): 175-180
61. Mansi, J. L., Berger, U., McDonnell, T., Pople, A., Rayter, Z., Gazet, J. C., Coombes, R. C. (1989):
The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer.
J. Clin. Oncol., 7 (4): 445-449
62. Mansi, J. L., Gogas, H., Bliss, J. M., Gazet, J. C., Berger, U., Coombes, R. C. (1999):
Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study.
Lancet, 354 (9174): 197-202
63. Marth, C., Kisic, J., Kaern, J., Trope, C., Fodstad, O. (2002):
Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis.
Cancer, 94 (3): 707-712
64. Meden, H., Marx, D., Roegglen, T., Schauer, A., Kuhn, W. (1998):
Overexpression of the oncogene *c-erbB-2* (HER2/neu) and response to chemotherapy in patients with ovarian cancer.
Int. J. Gynecol. Pathol., 17 (1): 61-65
65. Mehes, G., Ladenstein, R., Gadner, H., Ambros, P. F. (2002):
Zellproliferation und Zelltod in disseminierten Tumorzellen.
Acta Med. Austriaca, 29 Suppl 59: 62-64
66. Mehes, G., Lorch, T., Ambros, P. F. (2000):
Quantitative analysis of disseminated tumor cells in the bone marrow by automated fluorescence image analysis.
Cytometry, 42 (6): 357-362
67. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., Krepler, R. (1982):
The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.
Cell, 31 (1): 11-24

-
68. Nguyen, H. N., Averette, H. E., Hoskins, W., Sevin, B. U., Penalver, M., Steren, A. (1993):
National survey of ovarian carcinoma. VI. Critical assessment of current International Federation of
Gynecology and Obstetrics staging system.
Cancer, 72 (10): 3007-3011
69. Noack, F., Helmecke, D., Rosenberg, R., Thorban, S., Nekarda, H., Fink, U., Lewald, J., Stich, M.,
Schütze, K., Harbeck, N., Magdolen, V., Graeff, H., Schmitt, M. (1999):
CD87-positive tumor cells in bone marrow aspirates identified by confocal laser scanning fluorescence
microscopy.
Int. J. Oncol., 15 (4): 617-623
70. Noack, F., Schmitt, M., Bauer, J., Helmecke, D., Krüger, W., Thorban, S., Sandherr, M., Kuhn, W.,
Graeff, H., Harbeck, N. (2000):
A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: Methodological advances and clinical
implications.
Int. J. Biol. Markers, 15 (1): 100-104
71. Noll, S., Schaub-Kuhnen, S. (2000):
Hitzeinduzierte Demaskierung.
In: Höfler, H. Müller K. M. Hrsg. *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Auflage
Urban & Fischer Verlag, 44-51
72. Osborne, M. P., Asina, S., Wong, G. Y., Old, L. J., Cote, R. J. (1989):
Immunofluorescent monoclonal antibody detection of breast cancer in bone marrow: sensitivity in a
model system.
Cancer Res., 49 (9): 2510-2513
73. Pantel, K., Cote, R. J., Fodstad, O. (1999):
Detection and clinical importance of micrometastatic disease.
J. Natl. Cancer Inst., 91 (13): 1113-1124
74. Pantel, K., Izbicki, J., Passlick, B., Angstwurm, M., Häussinger, K., Thetter, O., Riethmüller, G. (1996):
Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-
small-cell lung cancer without overt metastases.
Lancet, 347 (9002): 649-653
75. Pantel, K., Riethmüller, G. (1996):
Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 213 (Pt 3): 1-18

-
76. Pantel, K., Schlimok, G., Angstwurm, M., Weckermann, D., Schmaus, W., Gath, H., Passlick, B., Izbicki, J. R., Riethmüller, G. (1994):
Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow.
J. Hematother., 3 (3): 165-173
77. Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S., Kutter, D., Lindemann, F., Schaller, G., Funke, I., Izbicki, J. R., Riethmüller, G. (1993):
Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells.
J. Natl. Cancer Inst., 85 (17): 1419-1424
78. Pantel, K., von Knebel, D. M., Izbicki, J. R., Riethmüller, G. (1997):
Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien.
Chirurg, 68 (12): 1241-1250
79. Redding, W. H., Coombes, R. C., Monaghan, P., Clink, H. M., Imrie, S. F., Dearnaley, D. P., Ormerod, M. G., Sloane, J. P., Gazet, J. C., Powles, T. J. (1983):
Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer.
Lancet, 2 (8362): 1271-1274
80. Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H., Schmitt, M. (1998):
Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review).
Int. J. Oncol., 13 (5): 893-906
81. RKI (2002):
Krebskrankheiten.
Robert-Koch-Institut: <http://www.rki.de>, Berlin 2002
82. Roggel, F., Hocke, S., Lindemann, K., Sinz, S., Welk, A., Bosl, M., Pabst, M., Nusser, N., Braun, S., Schmitt, M., Harbeck, N. (2003):
Minimal residual disease in breast cancer and gynecological malignancies: phenotype and clinical relevance.
Recent Results Cancer Res., 162: 89-100
83. Rose, P. G., Piver, M. S., Tsukada, Y., Lau, T. S. (1989):
Metastatic patterns in histologic variants of ovarian cancer. An autopsy study.
Cancer, 64 (7): 1508-1513

-
84. Ross, A. A., Miller, G. W., Moss, T. J., Kahn, D. G., Warner, N. E., Sweet, D. L., Louie, K. G., Schneidermann, E., Pecora, A. L., Meagher, R. C. (1995):
Immunocytochemical detection of tumor cells in bone marrow and peripheral blood stem cell collections from patients with ovarian cancer.
Bone Marrow Transplant., 15 (6): 929-933
85. Rubin, S. C., Finstad, C. L., Wong, G. Y., Almadrones, L., Plante, M., Lloyd, K. O. (1993):
Prognostic significance of HER-2/neu expression in advanced epithelial ovarian cancer: A multivariate analysis.
Am. J. Obstet. Gynecol., 168 (1 Pt 1): 162-169
86. Ryan, P., McCarthy, S., Kelly, J., Collins, J. K., Dunne, C., Grogan, L., Breathnach, O., Shanahan, F., Carey, P. D., Walsh, T. N., O'Sullivan, G. C. (2004):
Prevalence of bone marrow micrometastases in esophagogastric cancer patients with and without neoadjuvant chemoradiotherapy.
J. Surg. Res., 117 (1): 121-126
87. Scambia, G., Benedetti, P. P., Ferrandina, G., Battaglia, F., Baiocchi, G., Di Stefano, P., Tinari, N., Coronetta, F., Piantelli, M., Natali, P., Iacobelli, S., Mancuso, S. (1993):
Expression of HER-2/neu oncoprotein, DNA-ploidy and S-phase fraction in advanced ovarian cancer.
Int. J. Gynecol. Cancer, 3 (5): 271-278
88. Schlimok, G., Funke, I., Bock, B., Schweiberer, B., Witte, J., Riethmüller, G. (1990):
Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: Immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance.
J. Clin. Oncol., 8 (5): 831-837
89. Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Göttlinger, G., Schmidt, G., Hauser, H., Swierkot, S., Warnecke, H. H., Schneider, B., Koprowski, H., Riethmüller, G. (1987):
Micrometastatic cancer cells in bone marrow: In vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 (23): 8672-8676
90. Schlimok, G., Funke, I., Pantel, K., Strobel, F., Lindemann, F., Witte, J., Riethmüller, G. (1991):
Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: Methodological aspects of detection and prognostic significance.
Eur. J. Cancer, 27 (11): 1461-1465
91. Schlimok, G., Pantel, K., Loibner, H., Fackler-Schwalbe, I., Riethmüller, G. (1995):
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, 31A (11): 1799-1803

-
92. Schmalfeldt, B., Kuhn, W., Reuning, U., Pache, L., Dettmar, P., Schmitt, M., Jänicke, F., Höfler, H., Graeff, H. (1995):
Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors types 1 and 2.
Cancer Res., 55 (18): 3958-3963
93. Schmitt, M., Thomssen, C., Ulm, K., Seiderer, A., Harbeck, N., Höfler, H., Jänicke, F., Graeff, H. (1997):
Time-varying prognostic impact of tumour biological factors urokinase (uPA), PAI-1 and steroid hormone receptor status in primary breast cancer.
Br. J. Cancer, 76 (3): 306-311
94. Scully, R. E., Sobin, L. H., (WHO) (1999):
Histological typing of ovarian tumours.
In: International histological classification of tumours.
Springer, Berlin Heidelberg
95. Shi, S. R., Cote, R. J., Taylor, C. R. (2001):
Antigen retrieval immunohistochemistry and molecular morphology in the year 2001.
Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol., 9 (2): 107-116
96. Singletary, S. E., Larry, L., Tucker, S. L., Spitzer, G. (1991):
Detection of micrometastatic tumor cells in bone marrow of breast carcinoma patients.
J. Surg. Oncol., 47 (1): 32-36
97. Sinz, S. (2005):
persönliche Mitteilung, unveröffentlichte Dissertationsarbeit, TU München
98. Sinz, S., Braun, S., Sandherr, M., Werner, M., Harbeck, N. (2001a):
Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark: Prognostische und prädiktive Relevanz beim Mammakarzinom.
Geburtsh. Frauenheilk., 61: M39-M43
99. Sinz, S., Rutke, S., Späthe, K., Hocke, S., Roggel, F., Sandherr, M., Werner, M., Braun, S., Kuhn, W., Schmitt, M., Harbeck, N. (2001b):
Phenotyping of disseminated tumor cells in bone marrow aspirates of breast cancer patients.
3rd International Symposium on Minimal Residual Cancer, 2001, Hamburg, Germany (abstract #63)
100. Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. (1989):
Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.
Science, 244 (4905): 707-712

-
101. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L. (2001):
Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.
N. Engl. J. Med., 344 (11): 783-792
102. Statistisches Bundesamt, 1997-2000 (2000):
Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4: Todesursachenstatistik in Deutschland.
Metzler Poeschel, Stuttgart
103. Sugio, K., Kase, S., Sakada, T., Yamazaki, K., Yamaguchi, M., Ondo, K., Yano, T. (2002):
Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and beta-catenin: risk assessment by immunohistochemistry.
Surgery, 131 (1 Suppl): S226-S231
104. Thorban, S., Rosenberg, R., Busch, R., Roder, R. J. (2000):
Epithelial cells in bone marrow of oesophageal cancer patients: a significant prognostic factor in multivariate analysis.
Br. J. Cancer, 83 (1): 35-39
105. Tögel, F., Datta, C., Badbaran, A., Kröger, N., Renges, H., Giesecking, F., Jänicke, F., Zander, A. R., Krüger, W. (2001):
Urokinase-like plasminogen activator receptor expression on disseminated breast cancer cells.
J. Hematother. Stem Cell Res., 10 (1): 141-145
106. Tumorzentrum München (2001):
Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Maligne Ovarialtumoren.
Kuhn, W.(Hrsg.) 6. Auflage.
W. Zuckschwerdt Verlag, München
107. Tumorzentrum München (2004):
Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Maligne Ovarialtumoren.
Schmalfeldt, B.(Hrsg.) 7. Auflage.
W. Zuckschwerdt Verlag, München
108. UICC (1997):
TNM Classification of malignant tumors. Sobin, L. H., Wittekind, C (eds)
Wiley-Liss, New York
109. Untch, M., Kahlert, S., Funke, I., Boettcher, B., Konecny, G., Nestle-Kraemling, C., Bauerfeind, I. (1999):
Detection of Cytokeratin (CK) 18 Positive Cells in the Bone Marrow (BM) of Breast Cancer Patients - No Prediction of Bad Outcome (abstract #2472).
Proceedings of ASCO, 18: 639a

-
110. van Dam, P. A., Vergote, I. B., Lowe, D. G., Watson, J. V., van Damme, P., van der Auwera, J. C., Shepherd, J. H. (1994):
Expression of c-erbB-2, c-myc, and c-ras oncoproteins, insulin-like growth factor receptor I, and epidermal growth factor receptor in ovarian carcinoma.
J. Clin. Pathol., 47 (10): 914-919
111. van der Zee, A. G., Hollema, H., Suurmeijer, A. J., Krans, M., Sluiter, W. J., Willemse, P. H., Aalders, J. G., de Vries, E. G. (1995):
Value of P-glycoprotein, glutathione S-transferase pi, c-erbB-2, and p53 as prognostic factors in ovarian carcinomas.
J. Clin. Oncol., 13 (1): 70-78
112. Vassalli, J. D., Baccino, D., Belin, D. (1985):
A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase.
J. Cell Biol., 100 (1): 86-92
113. Wilex AG, M. G. (2004):
Willex und Fox Chase Cancer Center starten klinische Studie mit neuem anti-Krebs Wirkstoff WX-UK1 in den USA.
Presseerklärung 25. 05. 2004, www.willex.de
114. Yeh, I. T. (2002):
Measuring HER-2 in breast cancer. Immunohistochemistry, FISH, or ELISA?
Am. J. Clin. Pathol., 117 Suppl: S26-S35

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

- Abb. 1 Bearbeitung des Knochenmarks
- Abb. 2 Prinzip der Doppelimmunfluoreszenzfärbung: Beispiel für eine Doppelmarkierung von CK und uPA-R
- Abb. 3 Zeitpunkt der Knochenmarkaspirationen und Verteilung des Gesamtkollektivs
- Abb. 4 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus: Patientinnen vor Primärtherapie n = 55
- Abb. 5 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus: Patientinnen vor Primärtherapie n = 55
- Abb. 6 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus: Patientinnen nach neoadjuvanter Chemotherapie n = 38
- Abb. 7 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus: Patientinnen nach neoadjuvanter Chemotherapie n = 38
- Abb. 8 CK- und uPA-R-positive Zelle im Knochenmark einer Patientin mit Ovarialkarzinom
- Abb. 9 Zwei nebeneinander liegende CK- und uPA-R-positive Zellen im Knochenmark einer Patientin mit Ovarialkarzinom
- Abb. 10 Doppelimmunfluoreszenzfärbung CK-/uPA-R und May-Grünwald-Gegenfärbung eines Megakaryozyten, 630 fach
- Abb. 11 Etablierung der CK-/HER-2/neu Doppelimmunfluoreszenzfärbung am „spike“-Präparat (SKBR-3)
- Abb. 12 Immunzytochemie und Immunfluoreszenzfärbungen für CK bzw. HER-2/neu einer SKBR-3 : PBL-Verdünnung (1: 10⁶) mit hitzeinduzierter Demaskierung, 630fach
- Abb. 13 HER-2/neu-Einzelfärbung ohne Antigenmaskierung

Tabellen

- Tabelle 1 Übersicht über immunzytochemische Studien zur prognostischen Relevanz von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit soliden malignen Tumoren
- Tabelle 2 Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom
- Tabelle 3 Protokoll der CK-/uPA-R-Doppelimmunfluoreszenzfärbung
- Tabelle 4 Protokoll der CK-/HER-2/neu-Doppelimmunfluoreszenzfärbung
- Tabelle 5 Charakterisierung des Patientinnenkollektivs - Untergruppen
- Tabelle 6 CK-positive Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom
- Tabelle 7 Vergleich der Patientinnen mit CK-positiven Zellen mit Patientinnen ohne CK-positiven Zellen im Knochenmark (zum Zeitpunkt der Primärtherapie)
- Tabelle 8 Vergleich der Patientinnen mit CK-positiven Zellen mit Patientinnen ohne CK-positiven Zellen im Knochenmark (nach neoadjuvanter Chemotherapie)
- Tabelle 9 Knochenmarkstatus vor und nach adjuvanter Chemotherapie bei 13 Patientinnen Gruppe C
- Tabelle 10 Vergleich der Patientinnen mit CK-positiven Zellen mit Patientinnen ohne CK-positiven Zellen im Knochenmark (zum Zeitpunkt der Rezidiv-OP)
- Tabelle 11 Knochenmarkstatus der Patientinnen mit benigner Erkrankung
- Tabelle 12 uPA-R-Quantifizierung auf CK-positiven Zellen
- Tabelle 13 Einfluss der uPA-R-Expression auf rezidivfreie Überlebenszeit bzw. Gesamtüberlebenszeit (Cox-Regressionsmodell)

9. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| AK | Antikörper |
| APAAP | alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin) |
| CD | Oberflächenmarker (Cluster of differentiation) |
| CK | Zytokeratin |
| CLSM | konfokale(s) Laser-Scan-Mikroskop(ie) |
| DFS | rezidivfreies Überleben (disease-free survival) |
| DDFS | fernmetastasenfreies Überleben (distant disease-free survival) |
| EDTA | Ethylendiamidtetraacetat |
| EGP-2 | epitheliales Glykoprotein 2 |
| EMA | epitheliales Membranantigen |
| EpCAM | epitheliales Zelladhäsionsmolekül |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| KM | Knochenmark |
| NSCLC | nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (non-small cell lung cancer) |
| OS | Gesamtüberleben (overall survival) |
| PAI | Plasminogenaktivatorinhibitor |
| PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline) |
| PFA | Paraformaldehyd |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| uPA | Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (urokinase-type plasminogen activator) |
| uPA-R | Urokinase-Rezeptor (urokinase-type plasminogen activator receptor), CD 87 |
| TAG 12 | tumorassoziertes Glykoprotein (tissue antigen 12) |
| TRIS | Trihydroxymethylaminomethan |

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Prof. Dr. med. M. Kiechle für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit an ihrer Klinik durchzuführen und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. M. Schmitt für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung durch die Klinische Forschergruppe.

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck für die Überlassung des Themas und für die wissenschaftliche Anregung und hervorragende Betreuung bei der Durchführung meiner Promotionsarbeit, sowie für die Verbesserungsvorschläge bei der schriftlichen Abfassung.

Frau Prof. Dr. med. B. Schmalfeldt für die gute Zusammenarbeit zwischen Labor und Klinik bei der Durchführung der Knochenmarkpunktionen sowie für die Nutzung der erhobenen klinischen Patientendaten für diese Untersuchung.

Frau A. Welk und Frau D. Hellmann für ihre fachkundige und hilfreiche Unterstützung bei der praktischen Arbeit im Labor und nicht zuletzt auch für die gute Arbeitsatmosphäre.

Frau A. Wölfel-Hofmann, die mir bei der Erfassung der klinischen Patientinnendaten jederzeit zur Seite gestanden hat.

Frau R. Hollweck vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München für ihre kompetente statistische Beratung und die Hilfe bei der Datenanalyse.

Frau Dr. med. K. Späthe für die Anleitung beim Erlernen der Knochenmarkpunktion sowie für die Einführung in das klinische Verständnis der Ovarialkarzinomerkrankung und –therapie.

Meinen Mitdoktoranden Martina Pabst, Martin Bosl, Sonja Sinz und Stefan Hocke für die gute Zusammenarbeit, die viel Spaß gemacht hat.

11. Lebenslauf

| | |
|---------------|-----------------------------|
| Name | Frigga Roggel |
| Geburtsdatum | 04. Februar 1977, München |
| Familienstand | ledig |
| Kind | Erik Bo Roggel, *18.12.2002 |

AUSBILDUNG / UNIVERSITÄT

| | |
|---------------|---|
| 1983 – 1987 | Grundschule an der Flurstrasse, München |
| 1987 – 1994 | Theresien-Gymnasium, München |
| 1994 – 1996 | St.-Anna-Gymnasium, München |
| 06 / 1996 | Allgemeine Hochschulreife |
| 1996 – 2003 | Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg (vorklinischer Studienabschnitt) und an der TU München (klinischer Studienabschnitt) |
| 07 / 2000 | Beginn der Forschungstätigkeit in der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik, Klinikum rechts der Isar, TU München, Betreuung durch Prof. Dr. med. N. Harbeck |
| 2002 – 2003 | Praktisches Jahr (Chirurgie, Innere Medizin, Gynäkologie und Geburtshilfe), Klinikum rechts der Isar, TU München |
| 11 / 2003 | Drittes Staatsexamen Humanmedizin |
| seit 3 / 2004 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pathologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München (Prof. Dr. med. U. Löhrs) |

VERÖFFENTLICHUNGEN

- 2003 **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, Vol. 162, 89-100, 2003
- 2001 **Roggel, F.**, Späthe, K., Sinz, S., Braun, S., Hocke, S., Rutke, S., Bosl, M., Schmalfeldt, B., Sandherr, M., Werner, M., Kuhn, W., Schmitt, M., Harbeck, N.
Characterization of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with ovarian carcinoma.
3rd International Symposium on Minimal Residual Cancer, 2001, Hamburg, Germany (abstract #62), 2001
- 2001 Sinz, S., Rutke, S., Späthe, K., Hocke, S., **Roggel, F.**, Sandherr, M., Werner, M., Braun, S., Kuhn, W., Schmitt, M., Harbeck, N.
Phenotyping of disseminated tumor cells in bone marrow aspirates of breast cancer patients.
3rd International Symposium on Minimal Residual Cancer, 2001, Hamburg, Germany (abstract #63), 2001