

Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

Phänotypisierung zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit primären Mammakarzinom und klinische Nachbeobachtung

Stefan Hocke

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. F. Fend

Die Dissertation wurde am 27.01.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungen	4
1 Einleitung.....	5
1.1 Metastasierung.....	6
1.2 Minimal Residual Disease bei Brustkrebs	6
1.3 Dissemination von zytokeratin-positiven Zellen in das Knochenmark	7
1.4 Nachweisprinzip zytokeratin-positiver Zellen.....	9
1.5 Färbemethoden zum Nachweis zytokeratin-positiver Zellen	9
1.6 Phänotypisierung zytokeratin-positiver Zellen	10
1.6.1 Her2-neu	12
1.6.2 Plasminogenaktivator-System.....	13
2 Zielsetzung	14
3 Material und Methoden.....	15
3.1 Knochenmarkaspiration.....	15
3.2 Aufbereitung des Knochenmarks	16
3.3 Herstellung der Cytospins	17
3.4 Vergleich der klassischen Immunzytochemie mit Immunfluoreszenzfärbung bei Doppelfärbung Zytokeratin/Her2-neu mit und ohne „Antigen retrieval“ ..	18
3.4.1 Zytokeratin - Einzelfärbung	18
3.4.2 Her2-neu Einzelfärbung	19
3.4.3 Immunzytochemie	19
3.5 Nachweis zytokeratin-positiver Zellen	20
3.5.1 Immunfluoreszente Färbetechnik	20
3.5.2 Konfokales Laserscannmikroskop.....	21
3.5.3 Nachweis zytokeratin-positiver Zellen durch Immunzytochemie	22
3.5.4 APAAP Färbetechnik	22
3.6 Patientengut.....	24
3.7 Statistische Auswertung	24
3.8 Verwendete Materialien.....	25

4	Ergebnisse	27
4.1	Vergleich zwischen der immunzytochemischen und immunfluoreszenten Färbetechnik mit und ohne „Antigen retrieval“	27
4.1.1	Zytokeratin Einfachfärbung	27
4.1.2	Her2-neu Einfachfärbung	32
4.1.3	Doppelfärbung Zytokeratin 8/18/19 und Her-2-neu	36
4.2	Zytokeratin-positive Zellen zum Zeitpunkt der Primärtherapie.....	37
4.3	Korrelation des Knochenmarksbefundes zur TNM Klassifikation und weiteren Prognosekriterien	38
4.3.1	Tumorgröße	40
4.3.2	Lymphknotenstatus	41
4.3.3	Steroidhormonrezeptorstatus	42
4.3.4	Menopausenstatus	42
4.3.5	Grading	43
4.3.6	Her2-neu Status	44
4.4	Follow-up Daten der Patientinnen	45
5	Diskussion	46
5.1	Tumorzellnachweis im Knochenmark	46
5.2	Phänotypisierung der zytokeratin-positiven Zellen	48
5.2.1	„Antigen retrieval“	48
5.2.2	Her2-neu	49
5.2.3	uPA-R.....	50
5.2.4	Klinische Relevanz	51
5.3	Patientenkollektiv	53
5.4	Ausblick.....	55
6	Zusammenfassung	56
7	Tabellenverzeichnis	58
8	Abbildungsverzeichnis.....	59
9	Literaturverzeichnis	60
10	Danksagung	70
11	Lebenslauf.....	72

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase
ACIS	„Automated Cellular Imaging System“
BSA	Bovines Serumalbumin
CK	„Cytokeratin“
CLSM	Confocales Laserscanning Mikroskop
EZM	Extrazelluläre Matrix
EMA	„Epithelial Membran Antigen“
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
MRD	„Minimal Residual Disease“
PA	Plasminogenaktivator
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PB	„Peripheral Blood“
PBL	„Peripheral Blood Lymphocytes“
PBS	„Phosphate Buffered Solution“
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
uPA	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
uPA-R	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor

1 Einleitung

Der schon seit der Antike gebräuchliche Begriff Karzinom leitet sich vom griechischen Wort Karkinos ab, das übersetzt Krebsstier heißt. Da sich das Tier ebenso schwer von seiner Beute trennen lässt, wie das Karzinom von gesundem Gewebe, wurde dieser Begriff schon damals für bösartige Tumorleiden gewählt (Theiler, E. 1999).

Heute definiert man Karzinome als bösartige Tumoren, die vom epithelialen Gewebe des Körpers ausgehen. Mit 90% aller bösartigen Tumoren ist das Karzinom die häufigste Form aller malignen Neoplasien (Riede, U.-K. et al. 1995). Karzinome können in unterschiedlichen Organen auftreten und haben bei Männern und Frauen unterschiedliche Verteilungsmuster. Während bei Männern das Prostatakarzinom als die häufigste maligne Tumorerkrankung gilt, manifestiert sich bei Frauen der Brustkrebs, der meist im fünften Lebensjahrzehnt auftritt, als häufigste bösartige Tumorerkrankung vor malignen Erkrankungen des Darmes und Leukämien. Dagegen ist Brustkrebs beim Mann eher eine Rarität (Riede, U.-K. et al. 1995). Unter dem Sammelbegriff Mammakarzinom werden diejenigen bösartigen Tumoren subsumiert, die von den epithelialen Zellen mit Merkmalen von Milchgängen (duktales Karzinom) oder von lobulären Drüsenendstücken (lobuläres Karzinom) des Brustgewebes ausgehen (Riede, U.-K. et al. 1995).

In Deutschland muss statistisch jede 10. Frau im Laufe ihres Lebens damit rechnen, an Brustkrebs zu erkranken (Riede, U.-K. et al. 1995). Jährlich gibt es zirka 45.000 Frauen, die an einem Mammakarzinom erkranken (Tumorzentrum München 2001). Mit 19.000 Todesfällen pro Jahr ist das Mammakarzinom nach Herz-Kreislaufversagen die zweithäufigste, bei malignen Tumorerkrankungen die häufigste Todesursache bei Frauen (Black, R. J. et al 1997).

1.1 Metastasierung

Der als schicksalsentscheidend anzusehende Schritt der Metastasierung des Mammakarzinoms geschieht entweder lymphogen oder hämatogen (Pantel, K. et al 1999).

Die Streuung kann innerhalb der Brust stattfinden, aber auch lymphogen in die regionären Lymphknoten metastasieren (Schmidt-Mathiesen, H. H. H. 1998). Am häufigsten metastasiert Brustkrebs hämatogen und hier bevorzugt ins Skelettsystem (Galasko, C. 1986), (Theriault, R. L. et al 1992) .

Etwa 75% aller Frauen, die am Mammakarzinom versterben, weisen autoptisch Knochenmetastasen auf (Diel, I. J. et al 1994).

Trotz Fortschritte in der Tumorchirurgie tritt bei mehr als 45% der Frauen mit primären Mammakarzinom, die sich unter kurativen Gesichtspunkten einer Primärtherapie unterzogen haben, in den ersten fünf Jahren nach Therapie ein Rezidiv auf (Diel, I. J. et al 1992).

Dies lässt vermuten, dass die Letalität durch eine frühzeitige, meist schon zum Zeitpunkt der Primärdiagnose stattfindende, systemische Metastasierung bestimmt wird (Pantel, K. et al 1996a).

1.2 Minimal Residual Disease bei Brustkrebs

Eingeführt wurde der Begriff „minimal residuale Erkrankung“ (englisch „minimal residual disease“ = MRD) im Zusammenhang mit malignen hämatologischen Erkrankungen (Brisco, M. J. et al 1994), (Yokota, S. et al 1991). Er definiert ursprünglich, dass nach einer therapeutischen Intervention noch einzelne maligne Zellklone nachgewiesen werden können, so dass eine weitere Therapie erfolgen muss.

Der Begriff MRD wurde später auch für solide epitheliale Tumoren übernommen.

Bei Brustkrebs haben sich Forschergruppen mit der Detektion einzelner Tumorzellen in Lymphknoten beschäftigt (Wong, S. L. et al 2001). Von besonderem Interesse ist hierbei die Untersuchung von „Sentinel“ Lymphknoten, den so genannten Wächterlymphknoten. Die endgültige Bedeutung einzelner Tumorzellen im Lymphknoten ist derzeit noch nicht endgültig geklärt (Kowolik, J. H. et al 2000).

Die meisten Arbeitsgruppen legten ihr Augenmerk auf disseminierte Tumorzellen im Knochenmark, die durch die Expression von Zytokeratinen nachweisbar sind und deren weitere Charakterisierung (Cote, R. J. et al 1991), (Molino, A. et al 1999).

Gerber und Mitarbeiter (Gerber, B. et al 2001) und Braun et al (Braun, S. et al 2001a) stellten nur eine geringe Korrelation zwischen der Anwesenheit zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark und in den Lymphknoten dar, so dass von einer unabhängigen frühen lymphogenen und hämatogenen Dissemination auszugehen ist.

1.3 Dissemination von zytokeratin-positiven Zellen in das Knochenmark

Mehrere Studien (Mansi, J. L. et al 1999), (Landys, K. et al 1998), (Braun, S. et al 2000b), (Harbeck, N. et al 1994) haben gezeigt, dass ungefähr 35% aller Patientinnen mit Mammakarzinom, die zum Zeitpunkt der Primärtherapie durch konventionelle Untersuchungen als metastasenfrem gelten, bereits vereinzelte zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark haben. Dies bedeutet, dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt eine Streuung der Tumorzellen stattgefunden haben muss. Um diese systemische Disseminierung von Tumorzellen möglichst frühzeitig zu erkennen, wurden in den letzten Jahren verschiedene Verfahren entwickelt, diese Zellen bei den Patientinnen nachzuweisen.

Bereits 1967 forderten Slager und Reilly (Slager, U. T. et al 1967) dazu auf, den Knochenmarksbefund zur Diagnose, zur Prognoseabschätzung und zur Therapiewahl mit zu berücksichtigen. Rein histologische Untersuchungen brachten nur geringe Erfolge. Ende der siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurden erste Untersuchungen am Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen durchgeführt

(Ridell, B. et al 1979), jedoch wurden mittels konventioneller Histologie nur in 4% der Knochenmarkbiopsien disseminierte Tumorzellen gefunden.

Am Ludwig Cancer Institute in London gelang es erstmals mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das epitheliale Membran Antigen (EMA) bei 20% der Patientinnen Zellen epithelialen Ursprungs im Knochenmark zu finden (Redding, W. H. et al 1983).

Ende der achtziger Jahre wiesen Schlimok, G. et al mit einem monoklonalen Zytokeratin-Antikörper CK2, der gegen die epitheliale Zytokeratinkomponente 18 gerichtet ist, epitheliale Tumorzellen im Knochenmark nach. Zytokeratin 18 weist im Vergleich zum EMA-Antigen weniger Kreuzreaktionen mit lymphoiden Zellen, insbesondere Plasmazellen, auf (Schlimok, G. et al 1987).

Mit dem Panzytokeratinantikörper A45-B/B3 gegen die Zytokeratine 8/18/19 konnte eine sehr geringe Rate falsch-positiver Ergebnisse bei der Detektion zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark erreicht werden (Braun, S. et al 1999c). Um dies als diagnostischen Test für die klinische Routine etablieren zu können, müssen zunächst internationale Standards geschaffen werden. Neben standardisierten Färbetechniken müssen auch einheitliche morphologische und zytologische Kriterien gefunden werden, um die Qualität und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu verbessern (Borgen, E. et al 1999), (Pantel, K. et al 1996a).

Durch die Anwendung automatischer Zellerkennungssysteme, wie zum Beispiel des ACIS („automated cellular image analysis system“, ChromaVision Medical Systems Inc., San Juan Capistrano, CA, USA), konnte gezeigt werden, dass die Geräte eine hervorragende Sensitivität bezüglich der Detektion zytokeratin-positiver Zellen haben (Bauer, K. D. et al 2000).

1.4 Nachweisprinzip zytokeratin-positiver Zellen

Das Nachweisprinzip beruht auf der Tatsache, dass Tumorzellen epithelialen Ursprungs Zytokeratine exprimieren. Zytokeratine sind Intermediärfilamente in Epithelzellen und daher charakteristisch für epitheloide Zellen (Riede, U.-K. et al. 1995). In den mesenchymalen Zellen des Knochenmarkes lässt sich dieses Protein des Zytoskelettes nicht finden (Schlimok, G. et al 1987). Die Identifizierung von zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen scheint aufgrund des äußerst seltenen Vorkommens dieser Zellen bei Patientinnen ohne Karzinom (Pantel, K. et al 1996b) von Interesse.

1.5 Färbemethoden zum Nachweis zytokeratin-positiver Zellen

Viele Arbeitsgruppen benützen zur Detektion von zytokeratin-positiven Zellen immunzytochemische Methoden (vgl. Tab. 1). Es stehen ihnen dabei eine Vielzahl von Färbetechniken zur Verfügung. Hierbei werden Gewebsantigene spezifisch mit Antikörpern markiert, welche mit Farbstoffen versetzt sind, oder mit Hilfe eines mit Farbstoff versehenen Sekundärantikörpers, der an den Primärantikörper bindet, detektiert. Die Auswertung erfolgt lichtmikroskopisch.

Bei der Immunfluoreszenz nutzt man ebenfalls die Eigenschaft von Antikörpern, um bestimmte Moleküle zu erkennen und an diese gezielt zu binden. Bereits Mitte des letzten Jahrhunderts gelang es Albert Coons (Coons, A. C. J. et al 1941) erstmals bakterielle Erreger mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die fluoreszierend markiert waren, darzustellen.

Zur Detektion des Antigens wird ein Primärantikörper verwendet, der spezifisch an das Antigen bindet. Mit Hilfe eines Sekundärantikörpers, an dem ein fluoreszierender Farbstoff gebunden ist, kann dieser Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht werden. Abhängig von dem Farbstoff werden die gebundenen Komplexe durch einen Lichtstrahl, zum Beispiel durch die Quecksilberlampe, angeregt, ihrerseits Licht einer

bestimmten Wellenlänge auszusenden. Auf diese Weise entsteht im Fluoreszenzmikroskop ein hell leuchtendes Bild (Stelzer, E. H. et al 1991).

Zur Detektion zytokeratin-positive Zellen durch eine Immunfluoreszenzfärbung wurde an der Frauenklinik der der TU München wurde eine Methode entwickelt, bei der mit Hilfe eines Konfokalen Laserscannmikroskops zytokeratin-positive Zellen detektiert werden und gleichzeitig auch der uPA-Rezeptor (uPA-R, CD 87) phänotypisiert werden kann (Noack, F. et al 1999).

1.6 Phänotypisierung zytokeratin-positiver Zellen

Auch nach Abschluss einer adjuvanten systemischen Therapie können zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen gefunden werden (Mansi, J. L. et al 1989), (Molino, A. et al 1999), (Janni, W. et al 2001). Es wird beschrieben, dass diese Zellen in einem Ruhezustand, dem so genannten „Dormancy“ Zustand verharren (Pantel, K. et al 1997). Aber nur ein gewisser Prozentsatz der zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark weist auch maligne Charakteristika auf, so dass darüber diskutiert wird, dass nicht alle disseminierten Zellen malignes Potential haben.

Daher ist neben der Detektion auch die Phänotypisierung der Zellen von besonderem klinischem Interesse.

Es wurden verschiedene Antigene auf disseminierten epithelialen Zellen (siehe Tab.1) untersucht. Braun und Mitarbeiter (Braun, S. et al 2001c) konnten zeigen, dass Patientinnen mit Her2-neu positiven Tumorzellen im Knochenmark beim primären Mammakarzinom eine schlechtere Prognose haben als Patientinnen mit Her2-neu negativen Tumorzellen im Knochenmark.

Für einige Antigene werden bereits Therapeutika entwickelt, wie ein synthetisches Peptid gegen uPA (Wilex AG MG 2001), das vor der Einführung in klinische Studien steht. Andere befinden sich bereits in der Phase der klinischen Studien, wie Edrecolomab bei Kolonkarzinomen (Riethmüller, G. et al 1998) oder Trastuzumab beim metastasierten Mammakarzinom (Slamon, D. et al 2001).

Ziel ist es weitere Zelloberflächenantigene zu phänotypisieren, um unabhängig von adjuvanten Chemotherapieschemata weitere therapeutische Ansätze, die individuell

auf die einzelne Patientin zugeschnitten werden können, zu etablieren (Zhang, J. et al 2003).

Tab.1: Phänotypisierung zytokeratin-positiver Zellen bei Mammakarzinompatientinnen, durch immunzytochemische Färbungen; eine Darstellung der verschiedenen Autoren, deren verwendete Marker und die dazugehörigen Ergebnisse.

Gewebe	Marker	Phänotypisierung	Patienten mit Phenotypisch positiven Zellen (%)	Autor (Jahr)
KM	CK 18	erbB2	31/52(60%)	Braun (Braun, S. et al 2001c)
KM	CK 8/18/19	erbB2	13/15(87%)	Braun (Braun, S. et al 1999a)
KM	CK 18	erbB2	48/71(68%)	Pantel (Pantel, K. et al 1993b)
KM	CK 8/18/19	uPA-R	10/15(67%)	Tögel ('Togel, F. et al' 2001)
PB	CK 8/18/19	uPA-R	7/10(70%)	Tögel ('Togel, F. et al' 2001)
KM	CK 18	MHC-I	22/30(73%)	Zia (Zia, A. et al 2001)
KM	CK 18	MHC-I	9/26(35%)	Pantel (Pantel, K. et al 1991)
KM	CK 18	Transferrin	17/59 (29%)	Schlimok (Schlimok, G. et al 1990)
KM	CK 18	Ki-67	1/12(8,3%)	Pantel (Pantel, K. et al 1993a)
KM	CK 18	p120	1/11(9,7%)	Pantel (Pantel, K. et al 1993a)
KM	CK 8/18/19	17-1A	14/18 (78%)	Braun (Braun, S. et al 1999b)
KM	CK 8/18/19	MUC-1	11/14 (79%)	Braun (Braun, S. et al 1999b)
KM	CK 8/18/19	Lewis Y	11 / 14(79%)	Braun (Braun, S. et al 1999b)

1.6.1 Her2-neu

Her2-neu, auch c-erbB-2 genannt, ist ein transmembranöser Glykoproteinrezeptor (p185^{erbB2}) von 185kD. Das mit einer Tyrosinkinaseaktivität ausgestattete, Rezeptorprotein weist homologe Sequenzen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor („epidermal growth factor receptor“) auf. Dieses Protein hat eine intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität und eine extrazelluläre Bindungsstelle (Schechter, A. L. et al 1984), (Coussens, L. et al 1985).

In normalem Mammagewebe ist das Her2-neu Protein, im Gegensatz zu Myokardzellen (Ferrari, E. et al 2004), immunhistochemisch nicht nachweisbar.

Patientinnen mit primärem Mammakarzinom haben in 15-30% der Fälle eine Überexpression von Her2-neu im Primärtumorgewebe (Slamon, D. J. et al 1987b), (Pauletti, G. et al 2000). Bei dieser Überexpression ist nun oft auch eine membranständige Reaktion des Her2-neu Proteins nachweisbar.

Slamon und Mitarbeiter (Slamon, D. J. et al 1987a) zeigten erstmals, dass eine Überexpression von Her2-neu am Primärtumorgewebe mit einer schlechteren Prognose der Patientinnen korreliert.

Auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurde eine Überexpression von Her2-neu in über 60% der Fälle festgestellt (Pantel, K. et al 1993a). Dies korreliert mit einer schlechteren klinische Prognose als bei Patientinnen ohne Überexpression (Braun, S. et al 2001c).

1.6.2 Plasminogenaktivator-System

Das Plasminogenaktivator System (PA) mit seinen Komponenten uPA-Rezeptor (uPAR, CD87), den Serinproteasen Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und „Tissue“ Plasminogen Aktivator (tPA) sowie Plasmin(ogen), und den Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2, spielt eine zentrale Rolle in Abbau und Reorganisation der extrazellulären Matrix (EZM) und übernimmt somit eine Schlüsselrolle in der Tumorinvasion und der Metastasierung solider maligner Tumoren (Schmitt, M. et al 1997), (Andreasen, P. A. et al 1997), (Reuning, U. et al 1998). CD87 ist durch eine Glycosylphosphatidylinositol Einheit (GPI) auf der Zelloberfläche verankert und ist der Oberflächenrezeptor für die extrazelluläre Serinprotease uPA. Bei der Anbindung des enzymatisch gering aktiven uPA von pro-uPA an uPA-R wird uPA aktiviert, katalysiert den Umbau von Plasminogen zu Plasmin und fördert dadurch den Abbau extrazellulärer Matrix. Die beiden natürlichen Inhibitoren des PA-Systems, PAI-1 und PAI-2, regulieren den Aktivierungsvorgang.

In verschiedenen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2 im Primärtumorgewebe von Krebspatienten von prognostischer Relevanz ist. Das gilt für Krebserkrankungen der Brust, des Ovars, der Cervix Uteri, aber auch für Tumore der Blase, der Niere, des Halses, des Gehirns, des Magens, des Pankreas, des Ösophagus und der Leber (Reuning, U. et al 1998).

Ein Zusammenhang zwischen uPA-R Expression und Aggressivität des Primärtumors wurde in verschiedenen Studien gezeigt (Grondahl-Hansen, J. et al 1995).

Bei Mammakarzinompatientinnen wurde eine uPA-R Expression auf disseminierten Zellen im Knochenmark gefunden (Togel, F. et al 2001), (Sinz, S. et al 2001).

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom zu phänotypisieren.

Dabei sollte gezeigt werden, dass es möglich ist, sowohl zytokeratin-positive als auch Her2-neu positive Zellen durch immunzytochemische und immunfluoreszente Färbung nach einem „Antigen retrieval“ zu detektieren und zu phänotypisieren. Dieses Verfahren wurde zunächst an Kulturzellen getestet und anschließend auf Patientenmaterial übertragen.

Des Weiteren sollte die routinemäßige Auswertung von Knochenmarksaspiraten bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom durch eine standardisierte Methode in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Zytologie am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie eingeführt werden. Um die Morphologie der Zellen besser begutachten zu können, war es notwendig, die etablierte Immunfluoreszenzfärbung durch eine immunzytochemische Färbung zu ersetzen. Die Auswertung der Knochenmarkaspirate geschah zunächst durch manuelle Untersuchung der Präparate und wurde durch ein computergesteuertes System ersetzt.

Als Untersuchungsmaterial dienten Knochenmarksaspirate von 143 an primärem Mammakarzinom erkrankten Patientinnen. Es sollte der immunzytochemische Nachweis zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark erbracht werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden mit den beim Mammakarzinom etablierten Prognosefaktoren verglichen und statistisch ausgewertet. Das Patientenkollektiv selbst wurde einer klinischen Nachbeobachtung unterzogen.

3 Material und Methoden

3.1 Knochenmarkaspiration

Vor der geplanten Knochenmarkspunktion wurden alle Patientinnen über den Eingriff aufgeklärt und nur nach unterzeichneter Einverständniserklärung durch die Patientinnen wurde die Punktion durchgeführt.

Bei den meisten Patientinnen erfolgte die Aspiration im Operationssaal vor der Operation des Primärtumors. Die Patientinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Entnahme bereits in Narkose. Bei einigen wenigen Patientinnen wurde die Aspiration ambulant in Lokalanästhesie durchgeführt. Bei allen Aspirationen wurde auf eine streng aseptische Arbeitsweise geachtet.

Punktiert wurde anfangs an der Spina iliaca posterior superior, später an beiden Cristae iliacae. Für die Qualität der Aspirate ergab sich dadurch kein Unterschied. Um eine Infiltration von Keratinozyten und Epithelzellen zu vermeiden, wurde die Haut über der Aspirationsstelle mit einem Skalpell inzidiert. Im Anschluss daran wurden mit einer Biopsienadel der Größe 15 G aus jeder Punktionsstelle 5-10 ml Knochenmark entnommen.

Die Aspirate wurden in mit Heparin benetzten 10 ml Spritzen entnommen und sofort in 50 ml Reaktionsgefäße gefüllt, die mit 5 ml Heparin versetzt waren. Zur Überprüfung der Qualität des Aspirates wurde ein Teil des Aspirates durch Hämatologen der III. Medizinischen Klinik der TU München begutachtet und auf seinen Knochenmarksgehalt überprüft.

Das verbleibende Aspirat wurde zur sofortigen Bearbeitung ins Forschungslabor der Frauenklinik gebracht.

3.2 *Aufbereitung des Knochenmarks*

Das Aspirat wird in einem Reaktionsgefäß (50 ml Fa. Falcon) mit PBS – Puffer 1:1 versetzt und vorsichtig vermischt. Anschließend werden 7 ml des Aspirats, vorsichtig auf 7 ml Separiermedium (Ficoll) aufgetragen.

Die relative Dichte (1,077) des Separiermediums bewirkt, dass sich Erythrozyten und Granulozyten, nach einer Zentrifugationszeit von 20 min (400 x g, 4°C), niederschlagen, und das noch übrige Plasma im PBS der Probe über der Trennlösung verbleibt. Die Interphase, zwischen Trennlösung und Plasma/PBS, in welcher sich die mononuklearen Zellen befinden, wird abpipettiert.

In zwei anschließenden Waschzentrifugationsschritten (7 min, 250 x g und 4 °C) werden die Interphasenzellen mit 3 ml PBS gewaschen und der PBS – Überstand dekantiert. Danach werden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert.

Die Fixation erfolgt durch Zugabe von 1 ml 1% Paraformaldehyd in PBS für 30 min. bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Suspension zweimal mit 3 ml PBS gewaschen (5 min, 300 x g), schließlich in 1 ml PBS aufgenommen und resuspendiert.

3.3 Herstellung der Cytospins

5 µl der Zellsuspension werden mit 495 µl PBS zusammengegeben, wodurch eine 1:100 Verdünnung der Zellsuspension entsteht. Mit Hilfe einer Neubauerzählkammer wird die Zellzahl in dieser Suspension bestimmt. Es werden jeweils die vier Eckquadranten ausgezählt, der Mittelwert berechnet und anschließend die Gesamtzahl nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gesamtzahl} = \text{Mittelwert der Zellzahl aus Eckquadranten} \times 10.000 \times 100$$

Der Faktor 10.000 ergibt sich aus dem Volumen der Eckquadranten der Neubauer Zählkammer, der Faktor 100 aus der Verdünnung.

Anschließend wird mittels eines Dreisatzes errechnet, welche Menge Knochenmarkssuspension verwendet werden muss, um die Anzahl zu untersuchenden zwei Millionen Zellen auf 10 Objektträgern, zu bekommen.

Es werden immer zehn Objektträger zu je 200.000 Zellen hergestellt.

Jeweils 300 µl der errechneten Zellmenge, die durch einen Spezialfilter (Fa. Shandon) getrennt auf den Objektträgern liegen, werden in Probekammern gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur in der Zytozentrifuge zentrifugiert (450 U/min).

Die Objektträger werden dann 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Nun werden die Objektträger entweder sofort weiterbearbeitet oder bei -80 Grad Celsius tief gefroren und aufbewahrt.

3.4 Vergleich der klassischen Immunzytochemie mit Immunfluoreszenzfärbung bei Doppelfärbung Zytokeratin/Her2-neu mit und ohne „Antigen retrieval“

Der Versuch für den Vergleich wurde mit der zytokeratin-positiven und Her-2-neu-positiven Mammakazinomzelllinie SKBR3 und peripheren Lymphozyten (PBL) einer gesunden Versuchsperson durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, ob es einen Unterschied in der Färbequalität der Antikörper mit und ohne vorangehendes „Antigen retrieval“ im Wasserbad (30 min, bei 96,2 °C in Citratpuffer bei pH 6,0) gibt. Dazu wurden Zellpräparate in den Verhältnissen SKBR3 zu PBL von 1:1, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ und 1:10⁶ angefertigt. Es wurden sowohl eine immunzytochemische und eine immunfluoreszente Färbung durchgeführt. Die Doppelfärbung wurde wie unter 3.5. beschrieben durchgeführt.

3.4.1 Zytokeratin - Einzelfärbung

Sowohl unbehandelte als auch die im Wasserbad vorbehandelten Zellpräparate der oben genannten Verdünnungen werden mit dem monoklonalen Antikörper A45B/B3 (1,0 mg/ml;) gegen Zytokeratin 8/18/19 (Verdünnung 1:100 für 1h; RT), gefolgt von Ziege-anti-Maus Antikörper, an den das Fluorochrome ALEXA 488 gekoppelt ist (Verdünnung 1:100 für 30 min; RT) als Sekundärantikörper versetzt.

Die Auswertung der immunzytochemisch gefärbten Präparate wurde lichtmikroskopisch, die Auswertung der immunfluoreszent gefärbten Präparate wurde mit Hilfe des CLSM durchgeführt.

3.4.2 Her2-neu Einzelfärbung

Die Objektträger, der oben genannten Verdünnungen werden zunächst mit dem c-erb-b2 Primärantikörper (Fa. Dako) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend der Ziege-anti-Kaninchen Antikörper mit Fluorochrome ALEXA 568 (Verdünnung 1:100 für 30 min; RT) als Sekundärantikörper hinzugegeben.

Die Auswertung der immunzytochemisch gefärbten Präparate wurde lichtmikroskopisch, die Auswertung der immunfluoreszent gefärbten Präparate wurde mit Hilfe des CLSM durchgeführt.

3.4.3 Immunzytochemie

Die Immunzytochemische Färbung aller Zellpräparate wurde in den Routinelabors des Institutes für Pathologie, Abteilung für Zytologie der Technischen Universität München, zusammen mit der routinemäßigen Färbung von Tumorschnitten durchgeführt.

Hier wurden die Zytokeratineinzelpräparate, Her2-Einzelpräparate, in den oben genannten Verdünnungen mit und ohne „Antigen retrieval“ Behandlung durch die Arbeitsgruppe angefertigt. Die Auswertung wurde von zwei unabhängigen Untersuchern bestätigt.

3.5 Nachweis zytokeratin-positiver Zellen

3.5.1 Immunfluoreszente Färbetechnik

Um zytokeratin-positive Tumorzellen im Knochenmark von Krebspatientinnen detektieren zu können, bedient man sich der Tatsache, dass im mesenchymalen Gewebe des Knochenmarks nur epitheliale Zellen Zytokeratin enthalten, somit auch Karzinomzellen.

So wird für die Erkennung von zytokeratin-positiven Epithelzellen der monoklonale Antikörper A45B/B3, der gegen Zytokeratine 8/18/19 (ZK 8/18/19) gerichtet ist verwendet (Kasper, M. et al 1987). Als Brückenantikörper gegen den Mausantikörper wird ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 konjugierter anti-Maus- Antikörper eingesetzt. Dies bewirkt, dass nach Bindung dieses Antikörpers Zytokeratin 8/18/19 positive Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 488nm durch die Farbe Grün sichtbar gemacht werden. Alle Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um die Doppelfärbung für Zytokeratin 8/18/19 und Her2-neu optimal zu gestalten, werden die Objektträger mit den Aspiraten vor der Antikörperreaktion 30 Minuten im Wasserbad bei 96,2 °C in Citratpuffer (pH 6,0) einem „Antigen retrieval“ unterzogen. Anschließend werden die Objektträger 20 Minuten mit kaltem Citratpuffer abgekühlt und dann in der weiteren Färbung bearbeitet.

Als Positivkontrollen dienen die Her2-positive Zelllinie SKBR3, sowie Spikes aus Knochenmark von gesunden Spendern und Zellen der Zelllinie SKBR3. Die Negativkontrolle ist wiederum Patientenmaterial mit benignen Läsionen der Mamma. Des Weiteren wird noch eine Isotypenkontrolle durchgeführt.

Die weiteren Färbeschritte wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Im ersten Schritt der Doppelfärbung wird der monoklonale Antikörper A45B/B3 (1,0 mg/ml) gegen Zytokeratin 8/18/19 eingesetzt. In der Verdünnung 1:100 wird der Antikörper für 60 Minuten aufgetragen. Die Verdünnung besteht aus dem Antikörper und einer Antibody Diluent Lösung (Fa. Dako). Nach jeweils dreimal dreiminütigem Waschen mit TRIS-Puffer wird der Brückenantikörper Ziege-anti-Maus Antikörper, an den das

Fluorochrom ALEXA 488 gekoppelt ist, zugegeben. Die Verdünnung beträgt 1:100 und die Inkubationszeit 30 Minuten. Die Lösung enthält den Antikörper und Antibody Diluent Lösung (Fa. Dako). Es folgen drei Waschschriffe á 3 Minuten. Im dritten Schritt wird der Antikörper gegen Her2-neu, ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Fa. DAKO) in einer Verdünnung von 1:300 bei einer Inkubationszeit von 1 Stunde zugegeben. Die Verdünnung besteht aus dem Antikörper und Antibody Diluent Lösung.

Als Sekundärantikörper wird ein Ziege–anti-Kaninchen Antikörper, der mit dem Fluorochrome ALEXA 568 gekoppelt ist (Ausgangskonzentration 2 mg/ml) in der Verdünnung 1:100 für 30 Minuten beigemischt. Abschließend werden die Präparate noch 3 mal in TRIS-Puffer á 3 Minuten gewaschen.

Die Objektträger werden mit einem Deckglas, auf dessen Unterseite sich 8 µl TRIS – Puffer befinden abgedeckt und mit Fixogumm umrandet. Die Objektträger können nun wie bei der oben beschriebenen Färbung binnen einer Woche am CLSM ausgewertet werden.

3.5.2 Konfokales Laserscannmikroskop

Die Analyse des Probenmaterials erfolgt mit Hilfe eines konfokalen Laserscannmikroskops. Dies ist eine Kombination aus einem Mikroskop und einem Argon/Krypton-Laserscanner (Fa. Leica). Die Software ist von der Fa. Leica, Heidelberg erworben.

Mindestens 10 Cytospins mit je 200.000 Zellen (Gesamtzellzahl 2×10^6), pro Patientin werden auf zytokeratin-positive Zellen hin untersucht. Bei der Zytokeratin-Her2-neu Färbung dient die Zelllinie SKBR3 als Positivkontrolle.

3.5.3 Nachweis zytokeratin-positiver Zellen durch Immunzytochemie

Im Laufe dieser Arbeit wurde mit dem Institut für Pathologie der Technischen Universität München eine Zusammenarbeit eingeführt. Die gewonnenen Knochenmarksaspirate wurden in den zytologischen Routinelabors aufgearbeitet und immunzytochemisch mit Hilfe der APAAP-Färbung hinsichtlich zytokeratin-positiver Zellen untersucht. Hierbei wurden ebenfalls 2 Millionen Zellen pro Patientin werden auf zytokeratin-positive Zellen hin untersucht.

3.5.4 APAAP Färbetechnik

Der Nachweis von zytokeratin-positiven Zellen kann auch durch die konventionelle Immunzytochemie erfolgen. Dabei wird die APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) Färbung eingesetzt (Cordell, J. L. et al 1984).

Die Präparate werden beschriftet und der Zytospin-„Spot“ wird mit einem Fettstift umrandet. Anschließend spült man die Objektträger zwei Mal mit TRIS-Puffer für 5 Minuten. Dann werden die Objektträger in eine feuchte Kammer gegeben, der Primärantikörper A45B/B3 (1,0 mg/ml) gegen Zytokeratine 8/18/19 in einer Verdünnung von 1:500 (1h) aufgetragen, gefolgt von Waschschritten von zwei mal fünf Minuten mit TRIS-Puffer. Anschließend wird der Brückenantikörper Kaninchen-anti-Maus Antikörper (20µg/ ml, Verdünnung 1:20; 30 min.) aufgetragen. Nach zweimaligem Waschen (je 5 min in TRIS-Puffer) wird der monoklonale Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase Komplex (160 µg/ml; Verdünnung 1:100) aufgetragen und 30 Minuten inkubiert. Es folgen 2 weitere Waschschriffe mit TRIS-Puffer je 5 Minuten.

Als nächster Schritt wird die an den Antikörper spezifisch gebundene alkalische Phosphatase mit Hilfe einer Entwicklungslösung aus 0,2 mg/ml Naphtol-AS-BI-Phosphat, 1% Fast-Blue Salz, 0,1 M TRIS-Puffer und 0,25 mg/ml Levamisol, welches zur Inaktivierung der endogene alkalische Phosphatase dient, sichtbar gemacht. Die

Inkubationszeit beträgt 15 Minuten. Es folgt Spülen mit Leitungswasser, eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxin (10-20 Sekunden) anschließend noch das Eindeckeln der Objektträger. Die Objektträger können nun lichtmikroskopisch ausgewertet werden.

3.5.4.1 Auswertung durch das Automated Cellular Imaging System (ACIS)

Die immunzytochemisch gefärbten Zellen können mit Hilfe eines Lichtmikroskops und damit verbundenem Computersystems schnell und in großer Menge automatisch aufgefunden werden. Das dafür geeignete Automated Cellular Imaging System (ACIS) besteht aus einem automatischen Lichtmikroskop und einem über einen Prozessor angeschlossenen Computer, der die Zellen automatisch analysiert und bildlich darstellt (Bauer, K. D. et al 2000). Mit Hilfe eines auf dem Betriebssystem Microsoft basierendem Programms kann das analoge Bild digitalisiert und ausgewertet werden.

3.6 Patientengut

Zwischen März 2001 und August 2002 wurde bei 143 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom, die in der Frauenklinik der Technischen Universität München im Klinikum Rechts der Isar behandelt wurden, eine Knochenmarksaspiration im Rahmen der Primärtherapie durchgeführt. Anschließend wurden die Aspirate aufgearbeitet und die oben beschriebenen immunzytochemische Färbung durchgeführt. Diese Präparate wurden analysiert und die Daten ausgewertet.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes Graph-Pad-Prism Version 4.0 und mit Unterstützung des Institutes für Medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE) der Technischen Universität München. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch den Exakte Fisher Test und dem Binominaltest.

Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt und bei p-Werten kleiner 0,05 von statistischer Signifikanz gesprochen.

3.8 Verwendete Materialien

Automated Cellular Imaging System, ACIS, Chroma Vision Medical Systems, San Juan Capistrano, CA, USA

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

CLSM Software Scanware 3.61, Fa. Leica, Heidelberg, Deutschland

Cytoclips stainless steel slide clip, Fa. Shandon, Pittsburgh, PA, USA

Cytofunnel, Fa. Shandon, Pittsburgh, PA, USA

Cytozentrifuge: Cytospin 2, Fa. Shandon, Pittsburgh, PA, USA

Deckgläschen 18 x 18 mm, Fa. Marienfeld, Bad Mergentheim, Deutschland

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

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

Reaktionsgefäße 1000 μ l, Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland

Fettstift Dako Pen, Fa. DAKO, Hamburg, Deutschland

Filter cards 5991022, Fa. Shandon, Pittsburgh, PA, USA

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

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

Laser-Einheit des CLSM CS 40, Fa. Leica, Heidelberg, Deutschland

Lichtmikroskop, Fa. Leitz, Wetzlar, Deutschland

Mikroskop Axiovert 35, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland

Neubauer-Zählkammer Nr. 916 1079, Fa. Bender & Hobein, Bruchsal, Deutschland

Objektträger 76 x 26 mm, Menzel-Gläser, Darmstadt, Deutschland

Pasteurpipetten 150 mm, 230 mm, Fa. Volac, Wertheim, Deutschland

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

Pipettierhelfer Macro, Fa. Brand GmbH, Wertheim, Deutschland

Präzisionswaage FX-40, Fa. AND, Japan

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

Zentrifuge 4K15, Fa. Sigma, Osterode am Harz, Deutschland

3.8.1.1 Antikörper

Anti-Zytokeratin 8/18/19 A45-B/B3, Klasse IgG1, Spezies Maus, monoklonaler Antikörper, 1,0 mg/ml in PBS pH 7,4, Fa. Micromed GmbH, München

Anti - c-erb-b2 (Her-2-neu) , Spezies Kaninchen, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland

Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus IgG, 2 mg/ml, Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland

ALEXA 568 Ziege-anti-Kaninchen IgG 2 mg/ml, Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland

3.8.1.2 Reagenzien

Bovines Albumin Fraction V (pH 7), Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland

Antibody Diluent, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland

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

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

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

Paraformaldehyd pur, Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland

PBS Pufferlösung, Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland

Saponin, Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich zwischen der immunzytochemischen und immunfluoreszenten Färbetechnik mit und ohne „Antigen retrieval“

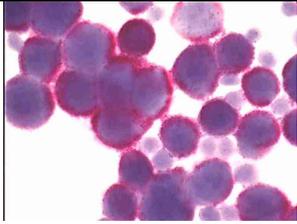
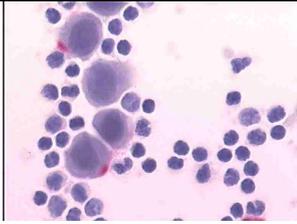
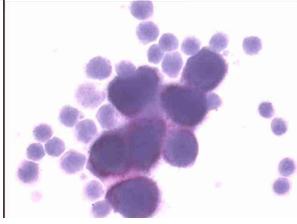
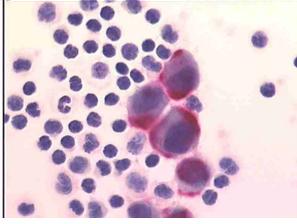
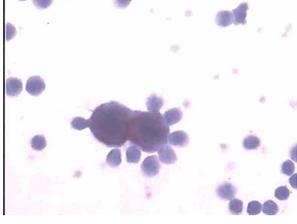
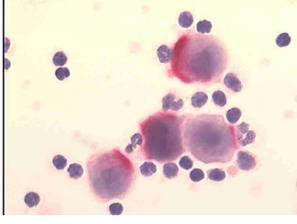
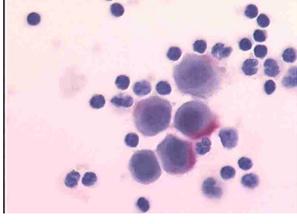
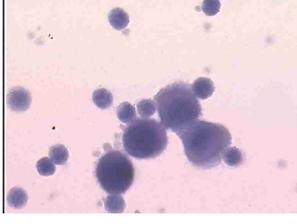
Es wurde untersucht ob es bei unterschiedlichen Färbetechniken, der Immunzytochemie und Immunfluoreszenz einen Unterschied in der Färbequalität der Antikörper bei Zytokeratin und Her2-neu positiven Zellen mit und ohne „Antigen retrieval“ gibt. Dabei wurden Verdünnungen zwischen Tumorzellen der Zellreihe SKBR3 und peripheren Lymphozyten bis zu einem Verhältnis 1 Tumorzelle zu 1 Mio. Lymphozyten hergestellt.

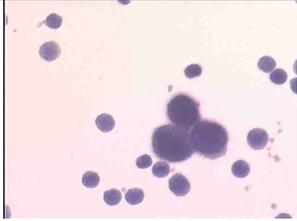
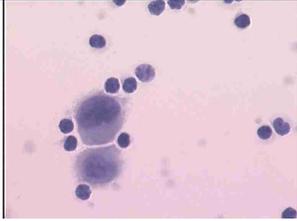
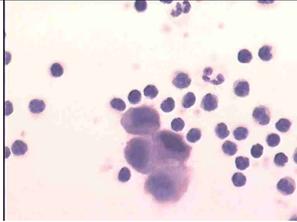
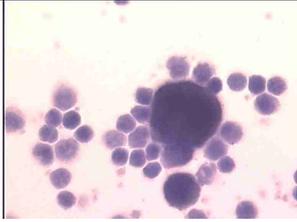
4.1.1 Zytokeratin Einfachfärbung

Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung und eine immunzytochemische Färbung an den hergestellten Verdünnungen aus SKBR3 Zellen und peripheren Lymphozyten einer gesunden Versuchsperson mit A45B/B3 gegen die Zytokeratine 8/18/19 durchgeführt.

In der nachfolgend dargestellten Abbildung 1 zeigte sich bei der immunzytochemischen Färbung, dass zytokeratin-positive und Her-2 neu positive Kulturzellen der Tumorzellreihe SKBR3 in peripheren Lymphozyten bis zu einem Verhältnis 1:10⁶ zu nachweisbar sind.

Abb. 1: Immunzytochemische Zytokeratin-Einfachfärbung mit A 45 B/B3 gegen Zytokeratine 8/18/19 bei der Tumorzelllinie SKBR3 in Verdünnung mit peripheren Lymphozyten, mit und ohne „Antigen retrieval“

Verdünnung	„Antigen retrieval“	Kein „Antigen retrieval“
1:10 ¹		
1:10 ²		
1:10 ³		
1:10 ⁴		

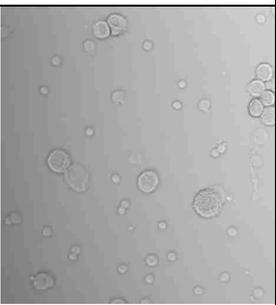
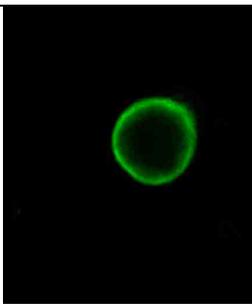
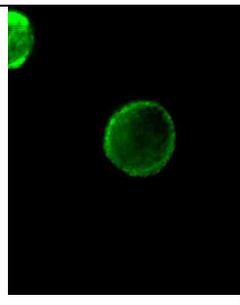
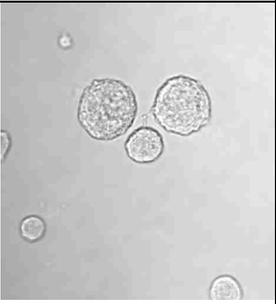
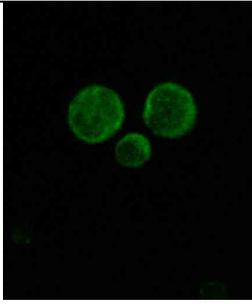
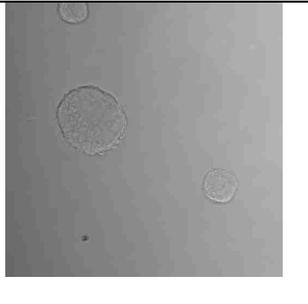
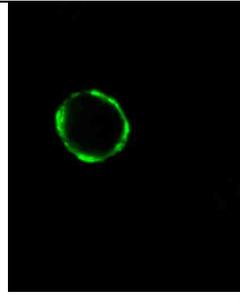
1:10 ⁵		
1:10 ⁶		

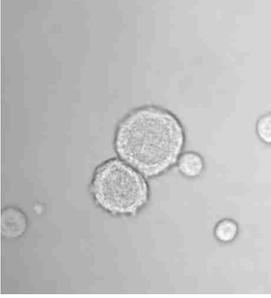
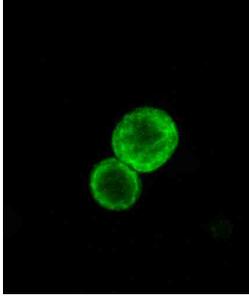
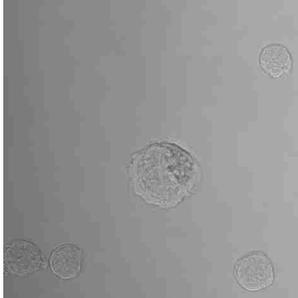
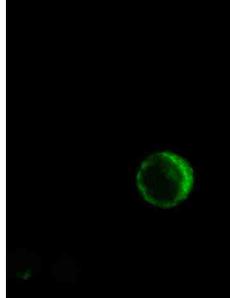
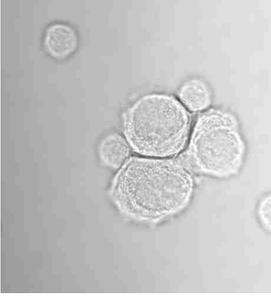
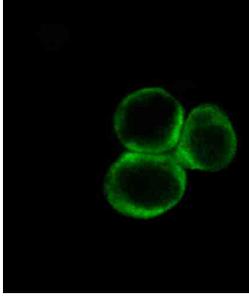
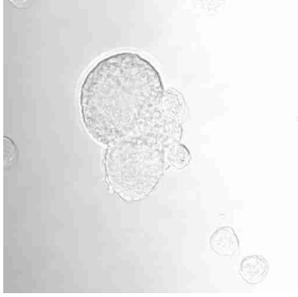
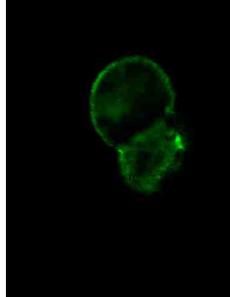
Bis zu einer Verdünnung von 1:10⁶ (SKBR3: peripheren Lymphozyten) konnten zytokeratin-positive Zellen, manche in schwacher Anfärbung, sowohl in den Präparaten mit „Antigen retrieval“ als auch in den Präparaten ohne „Antigen retrieval“ immunzytochemisch nachgewiesen werden.

Bei der Zytokeratin Einzelfärbung machte es keinen Unterschied, ob die Präparate vorher einem „Antigen retrieval“ unterzogen werden oder nicht. Die Ergebnisse wurden von zwei unabhängigen Untersuchern bestätigt.

Mit der Immunfluoreszenzfärbetechnik, wie in Abbildung 2 dargestellt, gelang ebenfalls bis zu einer Verdünnung von $1:10^6$ der Nachweis zytokeratin-positiver Zellen. Bei der Verdünnung $1:10^5$ konnte technischen Gründen keine Immunfluoreszenzfärbung angefertigt werden. Es wurden „Scans“ von den Zellen in vielen verschiedenen Ebenen aufgenommen, welche immer im gleichen Abstand von $0,2\mu\text{m}$ genommen wurden. Die Bilder wurden optisch übereinander gelegt und die gesamte Fluoreszenz der Zelle wurde erhalten. Die der Qualität der Zytokeratin Färbungen ist durch das „Antigen retrieval“ nicht beeinträchtigt. Die Ergebnisse wurden von zwei unabhängigen Untersuchern bestätigt.

Abb. 2.: Immunfluoreszente Zytokeratin Einfachfärbung mit A 45 B/B3 gegen Zytokeratine 8/18/19 bei der Tumorzelllinie SKBR3 in Verdünnung mit peripheren Lymphozyten, mit und ohne „Antigen retrieval“; mit Transmissionsbild und Fluoreszenzbild im Querschnitt der Zelle

	Mit „Antigen retrieval“		Ohne „Antigen retrieval“	
1:10	Transmissionbild	Fluoreszenzbild	Transmissionbild	Fluoreszenzbild
				
1:10 ²				
				

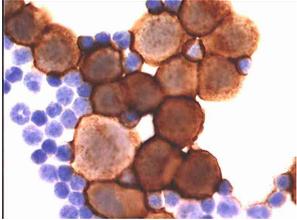
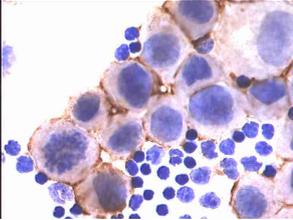
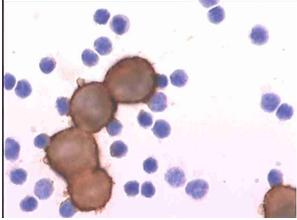
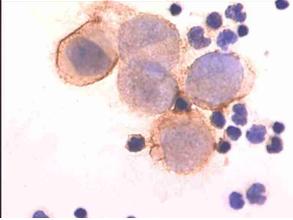
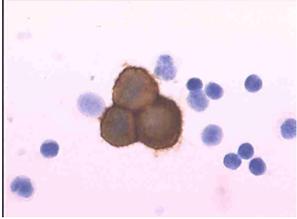
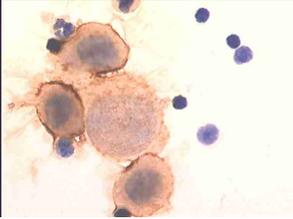
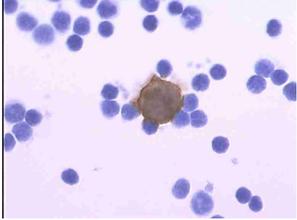
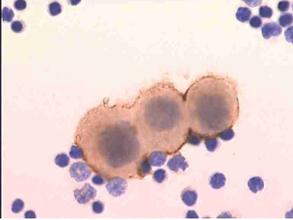
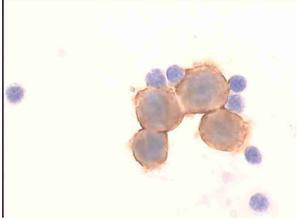
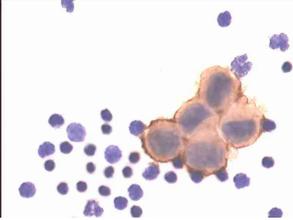
$1:10^4$				
				
$1:10^6$				
				

4.1.2 Her2-neu Einfachfärbung

Bei dieser Färbung wurde nach den oben beschriebenen Färbeprotokollen ein Vergleich zwischen durch „Antigen retrieval“ vorbehandelten und nicht vorbehandelten Präparaten und zwischen der immunfluoreszenten und immunzytochemischen Färbetechnik bei Her2-neu durchgeführt. Es wurden ebenfalls Verdünnungen aus Zellen der Tumorzelllinie SKBR3 und peripheren Lymphozyten, bis zu einem Verhältnis 1:10⁶ angefertigt.

In Abbildung 3 ist die immunzytochemische Her-2-neu Einzelfärbung dargestellt. Es konnten Her-2-neu positive Zellen bis zu einem Verhältnis von 1:1Mio Zellen nachgewiesen werden. Bei der Verdünnung 1:10⁵ war aus technischen Gründen keine Aufnahme möglich. Bei dem Vergleich der Präparate zeigt sich, dass die durch „Antigen retrieval“ vorbehandelten Präparate eine intensivere und kräftigere Färbung zeigen als die nicht vorbehandelten. Die Ergebnisse wurden ebenfalls von zwei unabhängigen Untersuchern bestätigt.

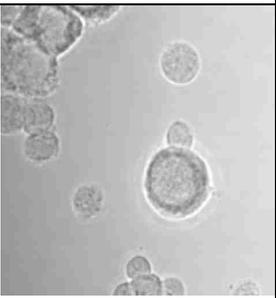
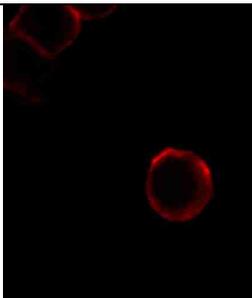
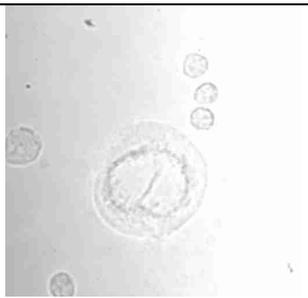
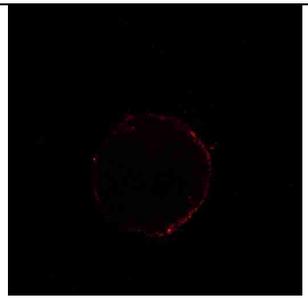
Abb. 3: Immunzytochemische Her-2-neu Einfachfärbung mit c-cerb-B2 gegen Her-2-neu bei der Tumorzelllinie SKBR3 in Verdünnung mit peripheren Lymphozyten, mit und ohne „Antigen retrieval“

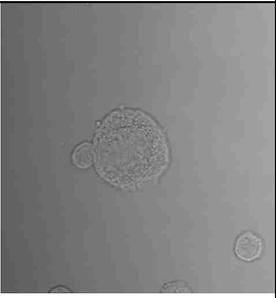
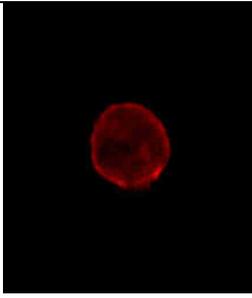
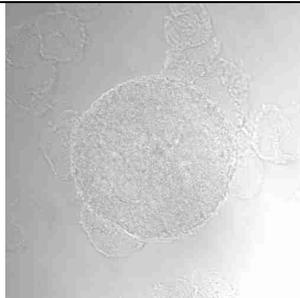
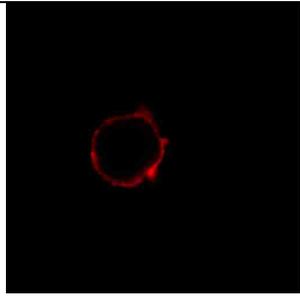
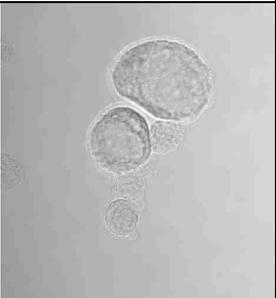
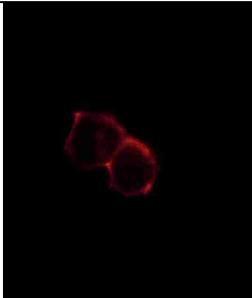
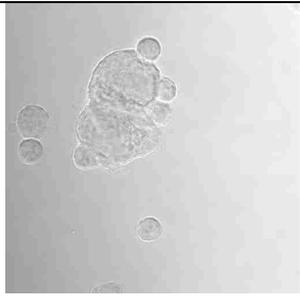
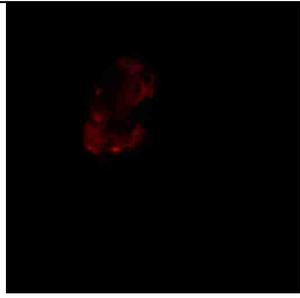
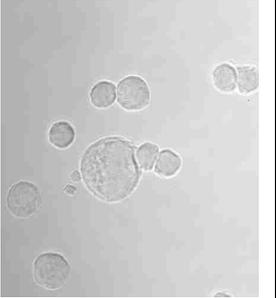
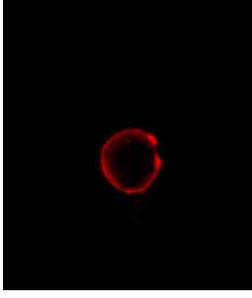
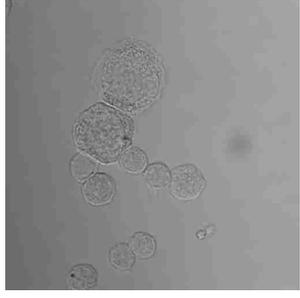
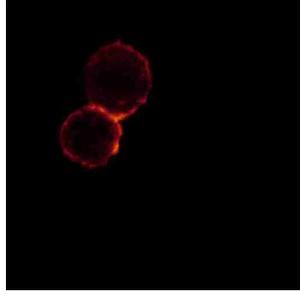
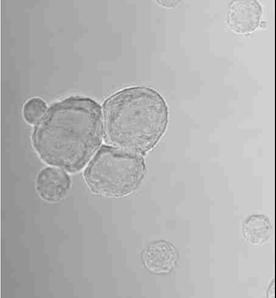
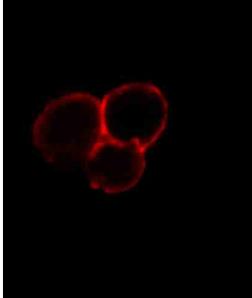
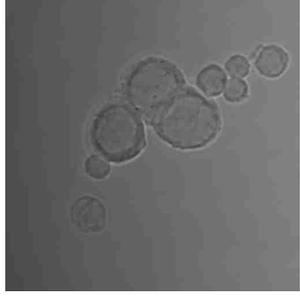
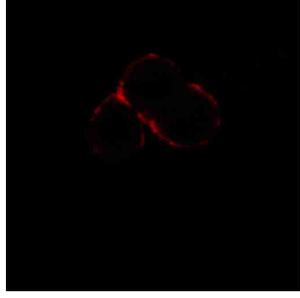
Verdünnung	„Antigen retrieval“	Kein „Antigen retrieval“
1:10 ¹		
1:10 ²		
1:10 ³		
1:10 ⁴		
1:10 ⁶		

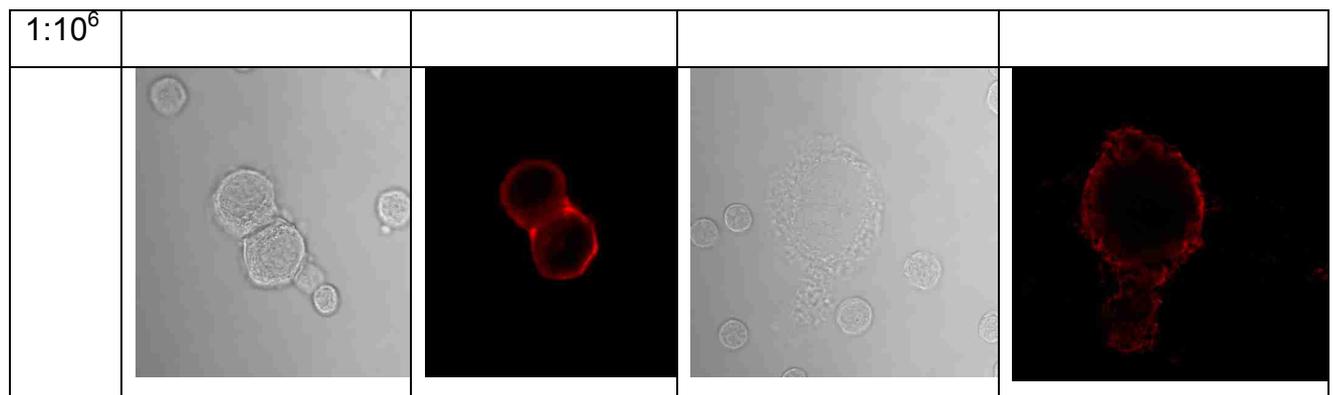
Bei der immunfluoreszenten Färbetechnik wurden bis zu einer Verdünnung von $1:10^6$ (SKBR3 zu peripheren Lymphozyten) sowohl bei den behandelten als auch bei den nicht behandelten Präparaten noch Her-2-neu positive Zellen gefunden. Jedoch sind die Präparate, die vorbehandelt wurden, deutlicher und kräftiger dargestellt als die unbehandelten.

Durch „Antigen retrieval“ entstand eine bessere Signalintensität der Präparate. Von den Zellen wurden „Scanns“ in vielen verschiedenen Ebenen aufgenommen, welche immer im gleichen Abstand von $0,2\mu\text{m}$ genommen wurden. Die Bilder wurden optisch übereinander gelegt und die gesamte Fluoreszenz der Zelle wurde erhalten. Dabei zeigte sich ebenso eine bessere Qualität der Färbungen bei Präparaten die einem „Antigen retrieval“ unterzogen wurden. Die Ergebnisse wurden von zwei unabhängigen Untersuchern bestätigt.

Abb.4: Immunfluoreszenz Her-2-neu Einfachfärbung mit c-cerb-B2 gegen Her-2-neu bei der Tumorzelllinie SKBR3 in Verdünnung mit peripheren Lymphozyten, mit und ohne „Antigen retrieval“

	Mit Antigen retrieval		Ohne Antigen retrieval	
1:10	Transmissionbild	Fluoreszenzbild	Transmissionbild	Fluoreszenzbild
				

1:10 ²				
1:10 ³				
1:10 ⁴				
1:10 ⁵				



4.1.3 Doppelfärbung Zytokeratin 8/18/19 und Her-2-neu

Bei der Doppelfärbung wurde eine immunfluoreszente Färbung mit Zytokeratin 8/18/19 und Her-2-neu mit und ohne „Antigen retrieval“ durchgeführt. Diese Färbung ergab auch eine Identifikation der Zellen bis zu einer Verdünnung der SKBR3 Zellen zu peripheren Lymphozyten von 1:10⁶. Jedoch war hier ein deutlicher Vorteil der vorbehandelten Präparate gegenüber den nicht vorbehandelten Präparaten zu erkennen.

Die gefundenen Zellen wurden in kleinen Schichten im Abstand von 0,2µm durchgescannt. Die Bilder wurden optisch übereinander gelegt und die gesamte Fluoreszenz der Zelle wurde erhalten. Dabei wurde eine Zelle am Computer im Imaris Programm in der Doppelfärbung dargestellt und festgehalten.

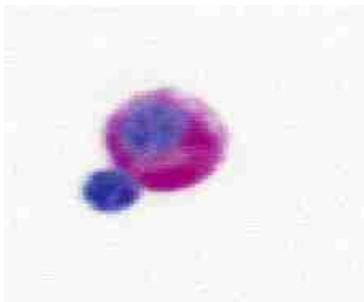
Die Vorbehandlung der Tumorkulturzellen durch ein „Antigen retrieval“ ist in keinsten Weise hinderlich für die Detektion zytokeratin-positiver Zellen. Auch diese Ergebnisse wurden durch zwei unabhängige Untersucher bestätigt.

4.2 Zytokeratin-positive Zellen zum Zeitpunkt der Primärtherapie

Von Februar 2001 bis Juni 2002 wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie, Abteilung Zytologie, eine routinemäßige immunzytochemische Färbung an Knochenmarkspräparaten eingeführt. Die Auswertung der Präparate erfolgte zunächst manuell, dann durch ein computergesteuertes Auswertesystem in den pathologischen Labors. Die Abbildung 5 zeigt ein Beispiel einer zytokeratin-positiven Zelle in der APAAP-Färbung bei einer Patientin mit primärem Mammakarzinom. Das Zytoplasma der Zelle ist rot angefärbt, der Kern ist mit Hämatoxilin blau gefärbt.

Bei den immunzytochemisch untersuchten Patientinnen hatten 9 von 143 Patientinnen zytokeratin-positive Zellen im Knochenmarksaspirat. Dies entspricht einem relativen Anteil von 6%. Auch diese Zellen wurden durch zwei unabhängige Untersucher bestätigt.

Abb. 5: zytokeratin-positive Zelle aus dem Knochenmarksaspirat einer Patienten mit primärem Mammakarzinom durch APAAP-Färbung dargestellt. Rot angefärbt zeigt sich das Zytoplasma der Zelle, der Zellkern ist blau angefärbt.



4.3 Korrelation des Knochenmarksbefundes zur TNM Klassifikation und weiteren Prognosekriterien

In der nachfolgenden Tabelle wird die Beziehung des Knochenmarkbefundes mit verschiedenen etablierten Prognosekriterien wie Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Hormonrezeptorstatus, Menopausenstatus und Grading des Karzinoms dargestellt. Insgesamt wurde das Material von 143 Patientinnen immunzytochemisch nach Zytokeratin 8/18/19 untersucht.

Der Median betrug 59,8 Jahre, die jüngste Patientin war 28 Jahre, die älteste war im 83. Lebensjahr. Das Durchschnittsalter der Patientinnen mit einem positiven Nachweis zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark betrug 55 Jahre (Minimum 32- Maximum 78 Jahre), das der Patientinnen mit einem negativen Nachweis zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark betrug 57,8 (28-83 Lebensjahr) Jahre. In der folgenden Tabelle sind die klinischen Daten übersichtlich dargestellt. Bei 11 Patientinnen wurde ein benigner Tumor festgestellt.

Tab. 2: Daten der Patientinnen mit primären Mammakarzinom mit und ohne zytokeratin-positiven Knochenmarkszellen, nach Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Steroidhormonrezeptorstatus, Grading und Her-2-neu-Status geordnet

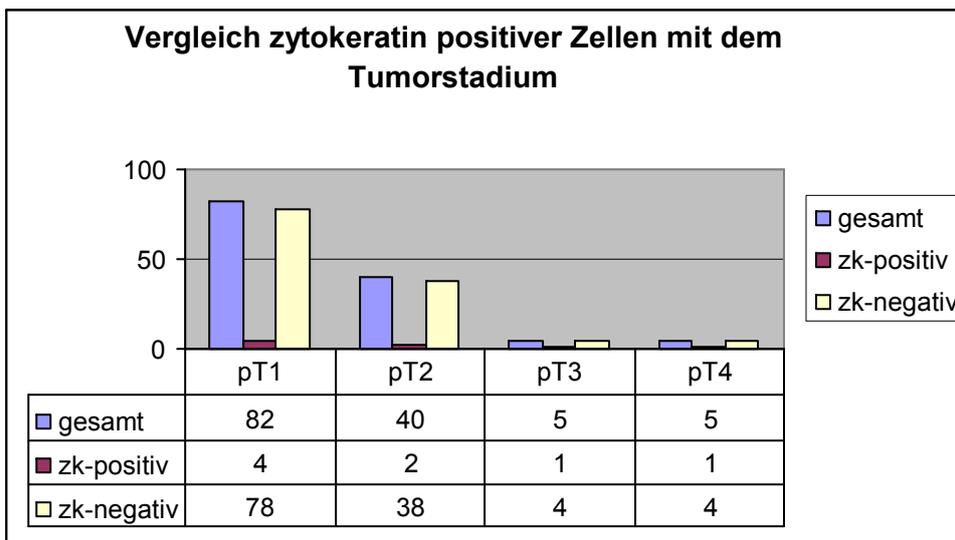
		Alle Patientinnen	CK-Positiv	CK-Negativ
Alter (Median)		59,8	60	60,1
Menopausaler Status				
	prä	32	1	31
	post	101	7	94
	peri	10	1	9
Tumorstadium				
	Benigne	11	1	10
	pT1	82	4	78
	pT2	40	2	38
	pT3	5	1	4
	pT4	5	1	4
Lymphknotenstatus				
	N0	87	4	83
	N1	43	3	40
	N2	2	1	1
	benigne	11	1	10
Hormonrezeptorstatus				
	positiv	106	7	99
	negativ	26	1	25
	benigne	11	1	10
Grading				
	G1	12	0	12
	G2	57	1	56
	G3	62	7	55
	G4	1	0	1
	benigne	11	1	10
Her 2				
	1+	35	2	33
	2+	19	0	19
	3+	37	3	34
	0	41	3	38
	nicht bestimmt	11	1	10

4.3.1 Tumorgroße

Die Tabelle 3 zeigt die Verteilung der Patientinnen nach ihren Tumorstadien. Unter den 143 Patientinnen waren 11, bei denen sich in der Histologie kein Tumor nachweisen ließ. Sie sind in der unten dargestellten Tabelle nicht berücksichtigt.

Insgesamt 82 Patientinnen hatten ein Mammakarzinom der Größe pT1. Bei 4 Patientinnen dieses Tumorstadiums konnten zytokeratin-positive Zellen in ihren Knochenmarksaspiraten gefunden werden.

Tab. 3: Vergleich zwischen der Tumorgroße des Primärtumors und dem Nachweis zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark



Von 40 Befunden bei Patientinnen mit einem Tumor pT2 wiesen im immunzytochemischen Färbepreparat zwei Patientinnen zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark auf.

In den Stadien pT3 und pT4 hat jeweils eine von fünf Patientinnen einen zytokeratin-positiven Befund der Knochenmarksaspirate in der immunzytochemischen Färbung.

In der statistischen Berechnung mit Hilfe eines Exakte Fisher Tests ergab sich zwischen Tumorstadium und dem Nachweis zytokeratin-positiver Zellen keine statistische Signifikanz ($p=0,1783$). Das bedeutet, die Tumorgroße keinen Einfluss auf die Anwesenheit zytokeratin-positiver Zellen hat.

4.3.2 Lymphknotenstatus

In dieser Arbeit hatten, wie in Tabelle 4 sichtbar, 87 Patientinnen das Stadium N0. Davon hatten 83 keinen Nachweis zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark.

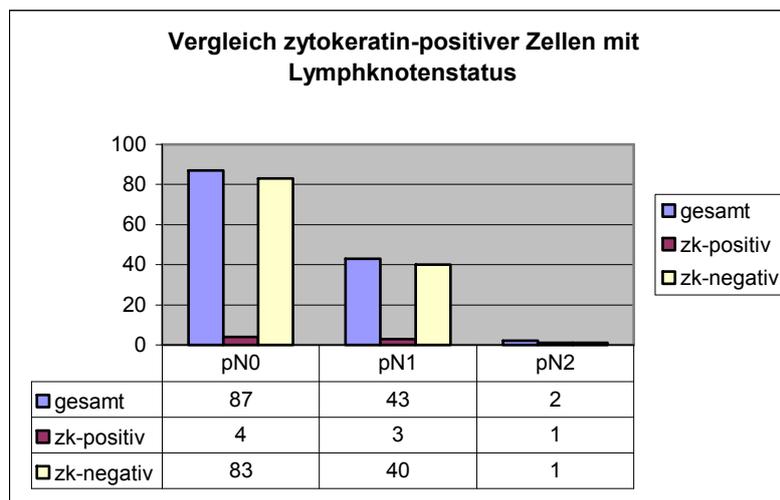
Beim Stadium N1 ließen sich bei 40 von 43 Patientinnen keine zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärtherapie nachweisen.

Im Stadium N2 hatte von zwei Patientinnen eine Patientin zytokeratin-positive Zellen im Knochenmarksaspirat aufzuweisen.

Bei 11 Patientinnen wurde kein Lymphknotenstatus erhoben, da es sich um benigne Läsionen handelte.

Der hier ebenfalls angewandte Exakte Fisher-Test ergab keine Signifikanz zwischen den beiden Parametern, dem Lymphknotenstatus und dem Vorhandensein von zytokeratin-positiven Zellen ($p=0,067$).

Tab. 4: Lymphknotenstatus der Patientinnen mit primärem Mammakarzinom im Vergleich mit zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark



4.3.3 Steroidhormonrezeptorstatus

Beim Steroidhormonrezeptorstatus waren 106 der Patientinnen positiv und 26 negativ auf Östrogen oder Progesteronrezeptoren am Primärtumor. Von den Steroidhormonrezeptor positiven Patientinnen hatten 7 zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark. Dies entspricht knapp 16% der Patienten. Bei den Steroidhormonrezeptor negativen Patientinnen hatte 1 von 26 zytokeratin-positive Zellen in ihrem Knochenmark.

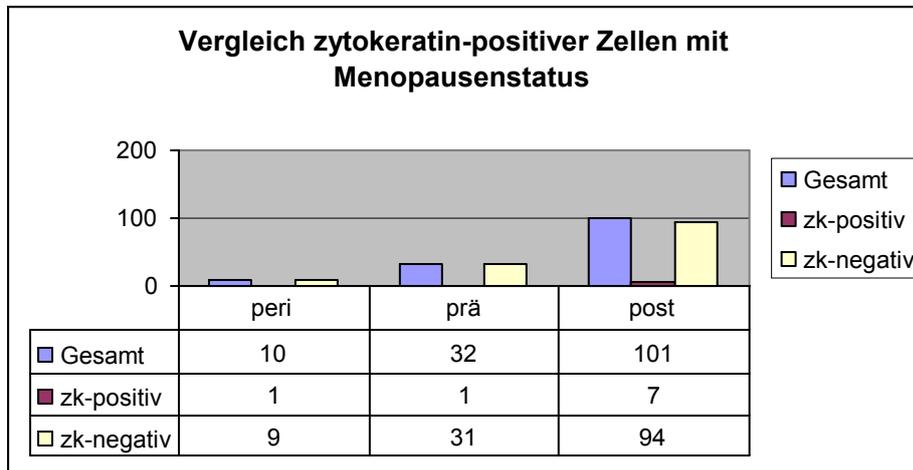
In der statistischen Auswertung mit Hilfe des Binominaltestes konnte kein Signifikanzniveau erreicht werden ($p= 0,5755$). Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark und dem Hormonrezeptorstatus.

4.3.4 Menopausenstatus

Beim der Untersuchung des Menopausenstatus waren 32 Patientinnen prämenopausal, wobei davon eine einen Nachweis zytokeratin-positiver Zellen hatte. Bei den Patientinnen in der Perimenopause hatten von 10 Patientinnen eine Patientin zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark. In der Postmenopause hatten von 101 Patientinnen 7 Patientinnen einen positiven Knochenmarksbefund.

Es konnte bei der statistischen Berechnung mit dem Exakte Fisher Test ein Signifikanzniveau ($p= 0,0337$) erreicht werden. Dies bedeutet, dass Patientinnen, die in der Peri- oder Postmenopause sind, einer höheren Wahrscheinlichkeit unterliegen, zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark zu haben, als Damen in der prämenopausalen Phase.

Tab. 5: Vergleich des Menopausenstatus der Patientinnen mit primären Mammakarzinom und zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark



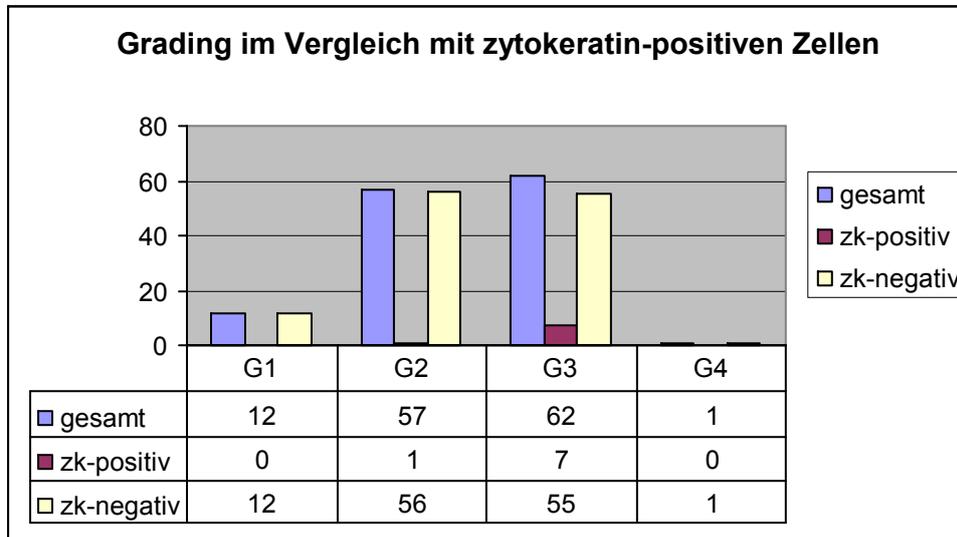
4.3.5 Grading

Unter Grading wird die histopathologische Differenzierung maligner Tumorzellen nach der Definition der UICC verstanden. Je höher dabei die Gradzahl ist, desto weniger differenziert ist der Tumor, was einen höheren Malignitätsgrad nach sich zieht. In dieser Arbeit hatten 12 Patientinnen einen G1 Tumor, keine davon jedoch eine zytokeratin-positive Zelle im Knochenmark.

Bei den G2 Tumoren (n=57) hatte eine Patientin eine zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark. Die meisten Patientinnen (n=62) hatten einen Tumor der Differenzierungsstufe G3, 7 davon einen positiven Knochenmarksbefund. Eine Patientin hatte einen G4-Tumor, diese wies im Knochenmarksaspirat keine zytokeratin-positive Zellen auf.

Die elf gutartigen Befunde wurden keiner Differenzierung unterzogen. Mit Hilfe eines Exakte Fisher Testes wurde das Vorhandensein zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark mit dem Grading verglichen. Die beiden Parameter verhielten sich nicht signifikant ($p= 0,15$) zueinander. Somit ist keine Aussage über einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit zytokeratin-positiver Zellen im Vergleich zum Grading machbar.

Tab. 6: Vergleich zwischen Grading des Primärtumors der Patientinnen und zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark



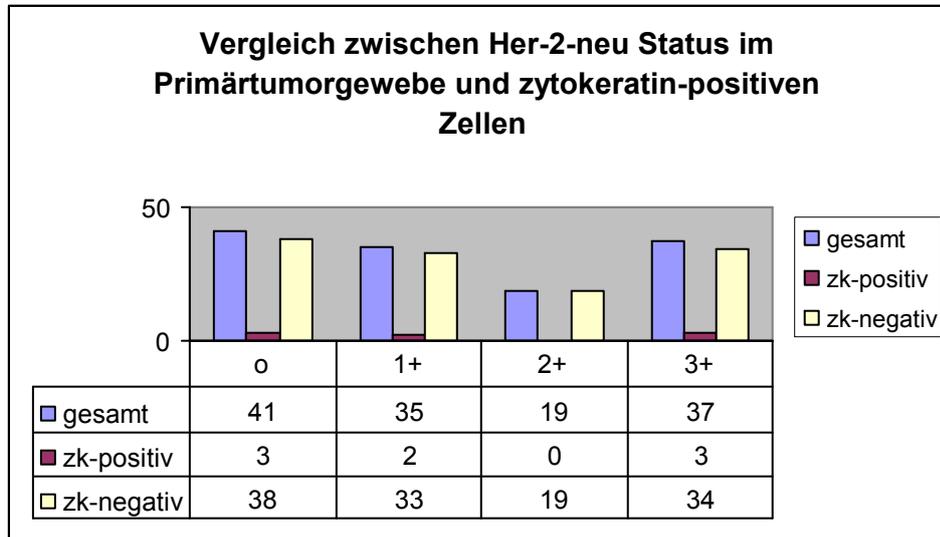
4.3.6 Her2-neu Status

Es wurde auch der der Her2-neu Status des Primärtumors der Patientinnen mit zytokeratin-positiven Zellen in den Knochenmarksaspiraten verglichen. Mit dem „Dako Hercept Test®“ wurde der so genannte Dako-Score, der dem Gehalt von Her2-neu im Primärgewebe bestimmt. Her2-neu negativ im Primärtumor waren 41 Patientinnen, 3 von ihnen hatten einen zytokeratin-positiven Befund im Knochenmarksaspirat. 35 Patientinnen hatten einen einfach positiven Befund im Primärtumor für Her2-neu, davon hatten 2 Patientinnen zytokeratin-positive Zellen im Knochenmarksaspirat.

Keine der 19 Patientinnen mit einem 2+ Befund auf Her-2-neu im Primärtumor hatte eine zytokeratin-positive Zelle in ihrem Knochenmarksbefund, während bei den 37 Patientinnen der Stufe 3+ drei Aspiratsbefunde positiv ausfielen. Bei den elf benignen Befunden wurde kein Her2-neu Status im Primärtumorgewebe bestimmt.

Es wurde kein Signifikanzniveau erreicht ($p= 0,81$), so dass keine Korrelation der Her2-neu Konzentration im Primärtumor mit dem Vorhandensein eher zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark erreicht.

Tab. 7: Vergleich des Her2-neu-Status des Primärtumorgewebes und zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark



4.4 Follow-up Daten der Patientinnen

Bei allen Patientinnen wurde mindestens 1 Jahr nach der Primärtherapie eine Nachbeobachtungserhebung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hatten 137 von 143 Patientinnen kein Neuauftreten der Erkrankung, 6 Patientinnen wiesen ein Rezidiv auf. Davon wiederum hatten 3 ein lokales Rezidiv, 1 viscerale Filiae, 2 Patientinnen ossäre Fernmetastasen. Die Patientinnen mit benignen Läsionen hatten ebenfalls keine Neuerkrankungen aufzuweisen.

Keine der Patientinnen war zum Zeitpunkt der Nachbeobachtung verstorben. Daher liegt das Überleben zum Zeitpunkt des Follow ups bei 100%.

Keine der Patientinnen mit einem Rezidiv wies zum Zeitpunkt der Primärtherapie zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark auf.

Bei den acht Patientinnen, bei denen zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark nachweisbar waren, ist bis jetzt noch kein Rezidiv aufgetreten.

5 Diskussion

5.1 *Tumorzellnachweis im Knochenmark*

Obwohl die onkologische Therapie in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte im Bereich der Tumorchirurgie verzeichnen konnte, scheint die Disseminierung einzelner Tumorzellen, welche durch konventionelle histopathologische Stagingmethoden nicht nachzuweisen sind (Hepp, F. et al 2000), (Schlimok, G. et al 1987), ein limitierender Faktor für das rezidivfreie Überleben zu sein (von Knebel Doeberitz, M. et al 1996).

Diese überwiegend nicht mitotisch aktiven Zellen könnten Ursachen dafür darstellen, dass es trotz eines klinisch metastasenfreien Stadiums zum Zeitpunkt der Primärtherapie zu einem langfristigen Versagen lokoregionärer sowie systemischer Therapien kommt (Pantel, K. et al 1997).

Einzelanalysen ergaben, dass die Mehrzahl der disseminierten Tumorzellen nicht proliferiert. Es ist jedoch weiterhin unbekannt, welche Faktoren ursächlich sind, um von der Tumorzellstreuung in die klinische Manifestation einer Metastase überzugehen (Pantel, K. et al 1993b).

Daher ist es sinnvoll, einzelne zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark, peripheren Blut oder in Lymphknoten als Beweis für die MRD zu finden und zu analysieren.

Mehrere Studien beschreiben verschiedenste Techniken zum Nachweis disseminierter Tumorzellen. Neben dem immunzytochemischen hat sich auch der immunfluoreszente Nachweis etabliert. Ein Hauptproblem besteht noch in der geringen Menge der gefundenen Zellen. Eine Verbesserung der Situation lässt sich über methodische Optimierung der Zellseparation und der Aufbereitung erreichen.

Die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen Zytokeratine als zuverlässige Marker für epitheliale Zellen im mesenchymalen Gewebe ermöglichte es mit Hilfe immunzytochemischer Techniken, einzelne zytokeratin-positiven Zellen zu entdecken (Dearnaley, D. P. et al 1983), (Schlimok, G. et al 1987), (Pantel, K. et al 1996b). Die Immunzytochemie wurde im Laufe der letzten Dekade immer weiter vorangetrieben und verbessert. Das Problem bei dieser Technik bestand in den unterschiedlichen, noch nicht standardisierten Verfahrensweisen, die zu verschiedenen Ergebnissen führten.

Bei Brustkrebspatientinnen wurden verschiedene Marker-Proteine verwendet, wie EMA (Salvadori, B. et al 1990), (Harbeck, N. et al 1994), (Mansi, J. L. et al 1999), (Gebauer, G. et al 2001), Zytokeratine 8/18/19 (Braun, S. et al 2000b), (Gerber, B. et al 2001) und Zytokeratine CAM 5.2, KL1, AE1-AE3, DC 10 und BA 17 (Landys, K. et al 1998), die durch die Antikörper dargestellt wurden. Eine Limitation der immunzytochemischen Analysen ist die subjektive Auswertung der zytologischen Präparate, die eine große Fehlerquelle darstellt. Objektivierbare Kriterien wurden von der ISHAGE-Gesellschaft (International Society of Hematotherapy Ad Graft Engenieering) in einer Studie für die immunhistochmische Beurteilung disseminierter Tumorzellen dargestellt (Borgen, E. et al 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die immunzytochemische Einzelfärbung von Knochenmarksaspiraten, mit dem monoklonalen Antikörper A45/B-B3 gegen Zytokeratin 8/18/19, routinemäßig bei Mammakarzinompatientinnen eingeführt. Ziel war es, mit Hilfe einer schnellen Detektionsmethode, zum Beispiel ACIS, zytokeratin-positiv Zellen zu finden und dann mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Färbung die Zellen zu phänotypisieren.

Erste Studien (Borgen, E. et al 2001), (Bauer, K. D. et al 2000) haben gezeigt, dass computergesteuerte, automatische Mikroskopiersysteme mit gleicher Sensitivität arbeiten wie menschliche Untersucher. Der Vorteil der maschinell gestützten Detektion besteht in der Möglichkeit, die Präparate schneller auszuwerten, als es das menschliche Auge vermag. Auch können größere Präparatmengen verarbeitet werden, womit eine enorme Ökonomisierung des Prozesses erreicht wird.

5.2 Phänotypisierung der zytokeratin-positiven Zellen

Einzelne disseminierte Tumorzellen im Knochenmark weisen nicht immer die gleichen charakteristischen Eigenschaften wie Tumorzellen im Primärgewebe auf. Umso wichtiger ist es, die einzelnen Zellen zu finden und zu charakterisieren.

Schon von vielen Autoren wurde die Phänotypisierung von zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark bei Patienten mit malignen epithelialen Tumoren beschrieben. Die Zellen sind charakterisiert durch eine Expression des uPA-Rezeptors (Heiss, M. M. et al 1995), (Allgayer, H. et al 1997b), (Togel, F. et al 2001), (Sinz, S. et al 2001), durch das Fehlen von p53-Mutationen (Offner, S. et al 1999) und dem Verlust des MHC I Antigens (Pantel, K. et al 1991), (Zia, A. et al 2001) .

In der Arbeitsgruppe an der TU München wurden, die gefundenen zytokeratin-positiven Zellen für uPA-R durch Immunfluoreszenzfärbung phänotypisiert. Die uPA-R Phänotypisierung für Patientinnen mit primären Mammakarzinom wurde nach einem bereits entwickelten Protokoll (Noack, F. et al 2000) weitergeführt. Ziel dieser Arbeit war es eine Phänotypisierung der zytokeratin-positiven Zellen für Her2-neu mit zu etablieren.

5.2.1 „Antigen retrieval“

Unter „Antigen retrieval“ versteht man die Vorbehandlung von Gewebe durch hohe Temperaturen, um Antigene, die durch die durch Fixation maskiert wurden, wieder zu demaskieren und so die Signale einer immunzytochemischen oder immunfluoreszenten Färbung zu verstärken (Shi, S. R. et al 2001).

Ziel der Versuche war es, einen Überblick darüber zu gewinnen, ob es einen Unterschied zwischen der immunzytochemischen und der immunfluoreszenten Färbetechnik mit und ohne „Antigen retrieval“, gibt (Shi, S. R. et al 1991).

Die Problemstellung für die Versuche ergab sich durch die ungenügende Qualität vorangegangener immunfluoreszenten Färbungen und aus der Fragestellung, ob der Antikörper gegen Her-2-neu, der Firma Dako, ein „Antigen retrieval“ im Wasserbad mit Citratpuffer gut verträgt. Dieser Versuch wurde durchgeführt, da bereits zur

immunhistochemischen Bestimmung des Her2-neu Gehaltes im Primärtumorgewebe „Antigen retrieval“ angewandt wurde (Oyaizu, T. F. et al 1996).

Die Versuche, deren Ergebnisse in den Abbildungen im Kapitel 4.1. zu sehen sind zeigten, dass die durch ein „Antigen retrieval“ vorbehandelten Präparate eine durchweg bessere und kräftigere Färbung, sowohl bei der immunfluoreszenten Färbetechnik als auch bei der immunzytochemischen Färbemethode aufweisen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass durch die Demaskierung die Antigenstrukturen auf den Zellen für die Immunzytochemische Färbung besser bereitgestellt werden.

Abschließend ist festzuhalten, dass ein vorangegangenes „Antigen retrieval“ die Qualität der Färbungen verbessert und als Methode für die Doppelfärbung mit zytokeratin-positiven und Her-2neu positiven Zellen gerechtfertigt ist.

5.2.2 Her2-neu

Bei Brustkrebspatientinnen weisen nur ungefähr 25% der Patientinnen eine Überexpression von Her2-neu im Primärgewebe auf (Ross, J. S. et al 1998), während bei 60% der disseminierten Zellen im Knochenmark eine Her2-neu Überexpression zeigen (Braun, S. et al 2001c). Eine eindeutige Korrelation zwischen der Her2-neu Expression auf Tumorzellen des Primärgewebes und auf disseminierten Zellen findet sich nicht, jedoch ist die Anwesenheit von sowohl zytokeratin-positiver als auch Her2-neu positiven Tumorzellen im Knochenmark mit einer schlechteren Prognose der Patientinnen verbunden (Braun, S. et al 2001c).

Da Her2-neu auch im Knochenmark von Patientinnen gefunden wurde, die nachweisbar kein Karzinom hatten (Zippelius, A. et al 1997), ist eine Doppelfärbemethode wichtig, um mit Hilfe der Zytokeratine den epithelialen Ursprung der Zelle zu untermauern.

In unserer Arbeitsgruppe wurde an Hand von Kulturzellen (SKBR3) eine Immunfluoreszenz Färbemethode entwickelt, die es wie bei der Doppelimmunfluoreszenzfärbung für uPA-R möglich macht (Noack, F. et. al 2000), zytokeratin-positive Zellen nach Her2-neu zu phenotypisieren. Diese Färbung kann nun angewendet werden.

Für die Prognoseabschätzung und die tumorbiologische Therapieplanung ist jedoch neben der Detektion der Tumorzelle eine Quantifizierung ihres Her2-neu Gehaltes in der Zukunft wünschenswert, um eine individuell optimale Therapieerfolg zu ermöglichen.

5.2.3 uPA-R

Das Plasminogenaktivator-System spielt eine wichtige Rolle im Abbau und der Reorganisation der extrazellulären Matrix und nimmt eine Schlüsselrolle in der Tumorinvasion und der Metastasierung ein (Schmitt, M. et al 1995). Im kontinuierlichen Zusammenspiel zwischen uPA, PAI-1 und dem Oberflächenrezeptor uPA-R werden diese Vorgänge gefördert.

Eine hohe Konzentration von uPA oder PAI-1 im Primärtumor bei Patientinnen mit Mammakarzinom führt zu einem erhöhtem Metastasierungsrisiko und zu einem geringeren Gesamtüberleben (Harbeck, N. et al 2000) (Janicke, F. et al 2001). Die Bestimmung von uPA und PAI-1 im Gewebe des Primärtumors wird mit Hilfe von biologischen ELISA Tests durchgeführt und ist standardisiert (Sweep, C. G. et al 1998). Auch ein erhöhter Gehalt an uPA-R Primärtumorgewebe von Krebspatienten ist von prognostischer Relevanz (Bianchi, E. et al 1994).

Die uPA-R Expression auf zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark ist unter anderem für das Magenkarzinom (Heiss, M. M. et al 1995) (Allgayer, H. et al 1997a) und das Mammakarzinom (Sinz, S. et al 2001), (Togel, F. et al 2001) beschrieben worden.

Eine niedrige Intensität von uPA-R auf der Zelle, die durch das Dormancy Stadium der Zellen erklärt werden (Yu, W. et al 1997) kann, könnte eine geringere Malignität dieser Zellen nach sich ziehen (Togel, F. et al 2001). Dagegen bedeutet eine Überexpression von CD87 auf zytokeratin-positiven Zellen eine schlechtere Prognose bei den Patientinnen (Stephens, R. W. et al 1998).

Somit ist neben der Qualität an uPA-R auch die Quantität der einzelnen zytokeratin-positiven Zelle interessant.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz kann die Quantifizierung von uPA-R auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma bestimmt werden. Dies wurde sowohl für

zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Mammakarzinom (Sinz S. et al 2001) als auch bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom (Bosl, M. 2005) in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Dies könnte Rückschlüsse auf die Aggressivität des Tumors bringen und könnte in der Zukunft helfen, die Prognoseabschätzung bei der Tumorerkrankung zu verbessern. Ob sich dies als zusätzlicher Prognosefaktor eignet müssen noch zukünftige Studien zeigen. Hierbei bietet sich ein Zusammenspiel aus qualitativer immunzytochemischer Detektion gepaart mit immunfluoreszenter Phänotypisierung und Quantifizierung an, um eine optimale Therapieplanung, durch den Einsatz zielgerichteter Antikörper, für die Patientinnen zu erreichen.

5.2.4 Klinische Relevanz

Schlechte Prognosen bei Brustkrebspatientinnen, die zytokeratin-positive Zellen in ihrem Knochenmark hatten, werden in mehreren Studien beschrieben (Gebauer, G. et al 2001), (Zia, A. et al 2001), (Funke, I. et al 1998). Daher muss es Ziel und Aufgabe sein, aufgrund weiterer Analysen der disseminierten Tumorzellen und deren Antigenstruktur neue Therapiekonzepte zu entwickeln, denn trotz Fortschritten in der Chirurgie und in der Entwicklung neuer Chemotherapeutika ist die Mortalität in den letzten Jahren nicht wesentlich gesunken.

Bei der Chemotherapie werden nur mitotisch aktive Zellen und nicht die Zellen, die sich im nicht proliferativen G₀-Zustand befinden (Pantel, K. et al 1993b), beseitigt. Deshalb muss die Frage nach neuen Therapiekonzepten, die Zellen im G₀ Zustand bekämpfen, erörtert werden.

Disseminierte Tumorzellen beinhalten eine Vielzahl von klinischen Möglichkeiten. Sie geben Auskunft über die Prognose des Patienten, Informationen über die individuelle Tumorbilologie und sie dienen für zielgerichtete Therapien mit z.B. monoklonalen Antikörpern. Um jedoch die Antikörpertherapie für jeden Patienten individuell effektiv durchführen zu können, muss das Antigenmuster der einzelnen Zellen bekannt sein.

Die Heterogenität der Antigenstrukturen differiert oft und muss daher für jede einzelne Patientin abgestimmt werden (Klein, C. A. et al 2002).

Studien berichten über erste Ansätze in der Therapie mit monoklonalen Antikörpern, wie der Herceptin® bei Her2-neu (Slamon, D. J. et al 2001) , die für die Zukunft erfolgsversprechend sein dürften. Auch die Entwicklung eines synthetischen Peptides (WX-UK 1) gegen uPA ist in der Phase II der klinischen Prüfung (Wilex AG MG 2001).

Es sollten noch weitere Antigene auf den Zellen charakterisiert werden, um die Strukturen der Zelloberflächen genauer aufzuschlüsseln.

So könnte ein hoffnungsvoller Ansatz gefunden werden, vielleicht in Zukunft die Mortalitätsrate bei Brustkrebspatientinnen mit Hilfe zielgerichteter Therapien zu senken.

Auch die Quantität der einzelnen Antigenstrukturen ist für die Therapieplanung, zum Beispiel in Hinsicht der Menge des zu verwendenden Antikörpers, von therapeutischer Bedeutung.

Ein Zusammenspiel der beiden Techniken, Immunfluoreszenz und Immunzytochemie ist in Zukunft wünschenswert, um individuelle Strategien für die Therapie optimieren zu können. Um dies zu erreichen müssen aber internationale Standards geschaffen werden, die eine bessere Objektivierbarkeit und eine bessere Reproduzierbarkeit der Nachweismethoden ermöglichen.

5.3 Patientenkollektiv

Bei dem Patientenkollektiv handelte es sich um eine Population von 143 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom. Das zu untersuchende Knochenmark von 143 Patientinnen wurde einer immunzytochemischen Färbung unterzogen. Von diesen 143 Patientinnen wiesen 11 benigne Läsionen auf.

Frühere Studien mit einer Langzeitbeobachtung von maximal 20 Jahren (Landys, K. et al 1998), (Mansi, J. L. et al 1999) konnten zeigen, dass Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark eine schlechtere Prognose haben als Patientinnen ohne.

Für unser Kollektiv, das von März 2001 bis Juni 2002 einer Knochenmarkaspiration unterzogen und bis August 2003 einer Nachbeobachtung unterzogen wurde, ist wegen der noch zu kurzen Zeitspanne keine Langzeitanalyse möglich.

Für die sechs Patientinnen, die in der Nachbeobachtungszeit ein Rezidiv erlitten, konnten initial keine zytokeratin-positiven Zellen in den Tumorzellen nachgewiesen werden. So kann eine schlechtere Prognose, wie sie in den oben genannten Studien gezeigt wurde, noch nicht bestätigt werden.

Da bei der Analyse der Daten gezeigt wurde, dass im Verlauf die Rezidivrate bei Knochenmarkspositiven Patientinnen nicht höher ist als die der zellfreien Patientinnen, können nur spätere Nachuntersuchungen zeigen, ob auch bei diesem Kollektiv in der Zukunft eine schlechtere Prognose für diese Patientinnen sich ergibt.

Auch konnte in dieser Arbeit nicht, wie in anderen Studien (Janni, W. et al 2001), (Naume, B. et al 2001) (Hinterberger, W. et al 2002) gezeigt werden, dass Patientinnen mit höheren Tumorstadien oder einem undifferenzierterem Tumor statistisch signifikant eine höhere Anzahl an zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark haben.

Es zeigt sich aber dennoch eine Tendenz, dass ein fortgeschrittener Lymphknotenstatus mit einer höheren Nachweisrate zytokeratin-positiver Zellen zusammenhängt. Ein Signifikanzniveau konnte nicht erreicht werden.

Bei der Tumorgroße konnte im Gegensatz zu anderen Studien ein Signifikanzzusammenhang zwischen zytokeratin-positiven Zellen und Tumorgroße nicht ermittelt werden.

Als Ursachen für diese Daten sind mehrere Faktoren diskutierbar. So ist die Umstellung auf die immunzytochemischen Färbemethode sowie die zytologische Beurteilung, die während der Arbeit eingeführt wurde, sicherlich ein wichtiges Indiz für die niedrige Anzahl von Patientinnen mit zytokeratin-positiven Zellen. Es ist auch zu bedenken, dass die bessere Beurteilung der morphologischen Strukturen der Zellen durch das unabhängige zytologische Labor zu einer Verminderung der Zahl an falsch positiven Ergebnissen führte.

Die bei der Untersuchung der zytokeratin-positiven Zellen mit dem menopausalen Status gefundene Signifikanz lässt sich mit mehreren anderen Arbeiten vergleichen (Diel, I. J. et al 1992).

Auch für andere solide Tumoren wurden signifikante Ergebnisse zwischen Tumorstadium und dem Nachweis von zytokeratin-positiven Zellen dargestellt.

Bei anderen gynäkologischen Tumoren, wie dem Ovarialkarzinom konnte gezeigt werden, dass eine Anwesenheit zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark zu einer schlechteren Prognose führt (Braun, S. et al 2001b). Kleinere Studien zum Zervixkarzinom wiesen ebenfalls ein schlechteres prognostisches Ergebnis beim Nachweis zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark für das Gesamtüberleben auf (Hepp, F. et al 2000).

Auch konnten signifikante Ergebnisse beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (Pantel, K. et al 1993a), beim Ösophaguskarzinom (Thorban, S. et al 1996) und beim Magenkarzinom (Heiss, M. M. et al 1997) erzielt werden.

Eine prognostische Aussage über das Überleben der Patientinnen der Patientinnen mit zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark in dieser Doktorarbeit ist wegen des geringen zeitlichen Verlaufes nicht möglich.

Auch die Anzahl der Rezidiverkrankungen hat im Rahmen dieses Patientenkollektives noch keine eindeutige prognostische Aussagekraft, da bei bisher nur 6 Rezidiven keine der Patientinnen mit positivem Knochenmarksbefund ein Rezidiv erlitten hatte.

5.4 Ausblick

Um die potentiell systemische Erkrankung des Mammakarzinoms möglichst schnell und effektiv behandeln zu können und das frühe Versterben eines Großteils der Patientinnen verhindern zu können, ist es wichtig, dass die bestmögliche individuelle Therapie angewendet wird. Neben den bereits etablierten Prognosefaktoren werden in Zukunft auch die biologischen Faktoren eine Rolle in der Therapieplanung spielen. Dabei haben sich bis jetzt als einzige die tumorassoziierten Proteolysefaktoren uPA und PAI-1, unabhängig von den etablierten Prognosefaktoren, prognostisch sehr bedeutsam gezeigt. (Harbeck et al 2001).

In wiefern die Anwesenheit zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark in eine individuelle Therapie einzubeziehen ist, lässt sich jetzt noch schwer abschätzen. Aufgrund der technischen Möglichkeiten, auch einer computergesteuerten Analyse der Zellen, ist es durchaus vorstellbar, dass sich zytokeratin-positive Zellen in Zukunft als Prognosefaktor etablieren. Es fehlen immer noch standardisierte Protokolle und einheitliche Methoden, um objektiv einheitliche Ergebnisse erzielen zu können.

Auch könnten die disseminierten Tumorzellen zur Therapiekontrolle angewandt werden, da sie einerseits zum Teil nicht auf adjuvante Chemotherapie ansprechen (Braun, S. et al 2000a), andererseits während und nach spezifischer Antikörpertherapie gegebenenfalls einen therapeutischen Effekt belegen können.

Mit Hilfe der tumorbiologischen Faktoren könnte es in der Zukunft geschafft werden, die insgesamt unbefriedigende Situation des Gesamtüberlebens bei Patientinnen mit Mammakarzinom allein anhand der herkömmlichen Prognosefaktoren zu verbessern und eine individuell abgestimmte Therapie zu ermöglichen (Hosch, S. B. et al 2001). Dafür kann die Kombination der immunzytochemischen mit der Immunfluoreszenzfärbung eine Möglichkeit sein zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark zu detektieren und anschließend zu quantifizieren und phänotypisieren. Aufgrund der Heterogenität der einzelnen Tumorzellen wäre im Anschluss eine individuelle, zielgerichtete Therapie vorstellbar und erstrebenswert.

6 Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Phänotypisierung zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen und die Beschreibung der klinischen Nachbeobachtung des ausgewählten Patientenkollektivs.

Im experimentellen Teil wurde am konfokalen Laserscannmikroskop eine Methode zur immunfluoreszenten Doppelfärbung zytokeratin-positiver Zellen mit Her2-neu mit etabliert.

Dabei konnte gezeigt werden, dass ein „Antigen retrieval“ im Wasserbad das Bindungsverhalten der Antikörper gegenüber Zytokeratinen 8/18/19 und Her2-neu nicht stört sondern begünstigt. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Doppelfärbemethode bei Knochenmarksaspiraten Erfolg versprechend angewendet werden kann.

Das weitere Ziel, die Etablierung der Methode der immunzytochemischen Routinefärbung der Knochenmarksaspirate von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und deren Auswertung, in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Zytologie am Pathologischen Institut der Technischen Universität, München wurde erreicht. Die Auswertung erfolgte zunächst durch manuelle Untersuchung und wurde durch ein computergesteuertes Analysegerät ersetzt.

Die klinische Analyse wurde an 143 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom, die sich einer Knochenmarkaspiration unterzogen hatten und deren Knochenmark immunzytochemisch untersucht worden war, durchgeführt. Die Zahl der gefundenen zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark lag mit sechs Prozent erheblich unter den aus der Literatur bekannten Durchschnittszahlen, die dort bei zirka 30 Prozent liegen.

Die vergleichende statistische Auswertung zwischen zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark und den etablierten Prognosefaktoren ergab bei Grading ($p=0,15$), Her2-neu Status ($p= 0,81$) und den TNM Stadien keine Signifikanz. Einzig beim Menopausenstatus konnte ein Signifikanzniveau ($p= 0,0337$) erreicht werden.

Die Follow up Untersuchung der Patientinnen besitzt noch keine generalisierbare Aussagekraft, da die Zeitspanne zwischen Entnahme der Aspirate und dem Zeitpunkt der Nachuntersuchung noch zu kurz ist. Es muss sich nach einer

signifikant längeren Nachbeobachtungszeit zeigen, ob das durch den immunzytochemischen Nachweis festgestellte Vorhandensein zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark einen statistisch nachweisbaren Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei Mammakarzinompatientinnen zulässt.

7 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Phänotypisierung zytokeratin-positiver Zellen bei Mammakarzinompatientinnen, durch immunzytochemische Färbungen; eine Darstellung der verschiedenen Autoren, deren verwendete Marker und die dazugehörigen Ergebnisse.	11
Tab. 2: Daten der Patientinnen mit primären Mammakarzinom mit und ohne zytokeratin-positiven Knochenmarkszellen, nach Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Steroidhormonrezeptorstatus, Grading und Her-2-neu-Status geordnet	39
Tab. 3: Vergleich zwischen der Tumorgröße des Primärtumors und dem Nachweis zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark	40
Tab. 4: Lymphknotenstatus der Patientinnen mit primärem Mammakarzinom im Vergleich mit zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark	41
Tab. 5: Vergleich des Menopausenstatus der Patientinnen mit primären Mammakarzinom und zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark	43
Tab. 6: Vergleich zwischen Grading des Primärtumors der Patientinnen und zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark	44
Tab. 7: Vergleich des Her2-neu-Status des Primärtumorgewebes und zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark	45

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Immunzytochemische Zytokeratin-Einfachfärbung mit A 45 B/B3 gegen Zytokeratine 8/18/19 bei der Tumorzelllinie SKBR3 in Verdünnung mit peripheren Lymphozyten, mit und ohne „Antigen retrieval“ 28

Abb. 2.: Immunfluoreszente Zytokeratin Einfachfärbung mit A 45 B/B3 gegen Zytokeratine 8/18/19 bei der Tumorzelllinie SKBR3 in Verdünnung mit peripheren Lymphozyten, mit und ohne „Antigen retrieval“; mit Transmissionsbild und Fluoreszenzbild im Querschnitt der Zelle 30

Abb. 3: Immunzytochemische Her-2-neu Einfachfärbung mit c-cerb-B2 gegen Her-2-neu bei der Tumorzelllinie SKBR3 in Verdünnung mit peripheren Lymphozyten, mit und ohne „Antigen retrieval“ 33

Abb.4: Immunfluoreszenz Her-2-neu Einfachfärbung mit c-cerb-B2 gegen Her-2-neu bei der Tumorzelllinie SKBR3 in Verdünnung mit peripheren Lymphozyten, mit und ohne „Antigen retrieval“ 34

Abb. 5: zytokeratin-positive Zelle aus dem Knochenmarksaspirat einer Patienten mit primären Mammakarzinom durch APAAP-Färbung dargestellt. Rot angefärbt zeigt sich das Zytoplasma der Zelle, der Zellkern ist blau angefärbt. 37

9 Literaturverzeichnis

1. Allgayer, H., Heiss, M. M., Riesenberger, R., Babic, R., Jauch, K. W., and Schildberg, F. W. 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, (1997a) 203-212.
2. Allgayer, H., Heiss, M. M., Riesenberger, R., Grutzner, K. U., Tarabichi, A., Babic, R., and Schildberg, F. W. Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R): one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease. *Cancer Res.*, 57, (1997b) 1394-1399.
3. Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., and Duffy, M. J. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int.J.Cancer*, 72, (1997) 1-22.
4. Bauer, K.D., 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., and Harrington, D. S. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res*, 9, (2000) 3552-3559.
5. Bianchi, E., Cohen, R. L., Thor, A. T., Todd, R. F., III, Mizukami, I. F., Lawrence, D. A., Ljung, B. M., Shuman, M. A., and Smith, H. S. The urokinase receptor is expressed in invasive breast cancer but not in normal breast tissue. *Cancer Res*, 4, (1994) 861-866.
6. Black, R.J., Bray, F., Ferlay, J., and Parkin, D. M. Cancer incidence and mortality in European Union : cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer*, 33, (1997) 1075-1107.
7. Borgen, E., Naume, B., Nesland, J. M., Kvalheim, G., Beiske, K., Fodstad, O., Diel, I., Solomayer, E. F., Theocharous, P., Coombes, R. C., Smith, B. M., Wunder, E., Marolleau, J. P., Garcia, J., and Pantel, K. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy*, 1, (1999) 377-388.
8. Borgen, E., Naume, B., Nesland, J. M., Nowels, K. W., Pavlak, N., Ravkin, I., and Goldbard, S. Use of automated microscopy for the detection of disseminated tumor cells in bone marrow samples. *Cytometry*, 4, (2001) 215-221.

9. Bosl, M. Dissertationsschrift , TUM, (2005)
10. Braun, S., Cevatli, B. S., Assemi, C., Janni, W., Kantenich, C. R., Schindlbeck, C., Rjosk, D., and Hepp, F. Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J.Clin.Oncol.*, 19, (2001a) 1468-1475.
11. Braun, S., Hepp, F., Kantenich, C. R., Janni, W., Pantel, K., Riethmuller, G., Willgeroth, F., and Sommer, H. L. 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, (1999a) 3999-4004.
12. Braun, S., Hepp, F., Sommer, H. L., and Pantel, K. Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease. *Int.J.Cancer*, 84, (1999b) 1-5.
13. Braun, S., Kantenich, C., Janni, W., Hepp, F., de Waal, J., Willgeroth, F., Sommer, H., and Pantel, K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J.Clin.Oncol.*, 18, (2000a) 80-86.
14. Braun, S. and Pantel, K. Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance. *Med.Oncol.*, 16, (1999c) 154-165.
15. Braun, S., Pantel, K., Muller, P., Janni, W., Hepp, F., Kantenich, C. R., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmuller, G., and Schlimok, G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N.Engl.J.Med.*, 342, (2000b) 525-533.
16. Braun, S., Schindlbeck, C., Hepp, F., Janni, W., Kantenich, C., Riethmüller, G., and Pantel, K. Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J.Clin.Oncol.*, 19, (2001b) 368-375.
17. Braun, S., Schlimok, G., Heumos, I., Schaller, G., Riethdorf, L., Riethmuller, G., and Pantel, K. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res.*, 61, (2001c) 1890-1895.
18. Brisco, M.J., Condon, J., Hughes, E., Neoh, S. H., Sykes, P. J., Seshadri, R., Toogood, I., Waters, K., Tauro, G., and Ekert, H. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet*, 343, (1994) 196-200.
19. Coons, A.C.J.a.J.R. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 47, (1941) 200-207.

20. Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K. A., Stein, H., and Mason, D. Y. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J.Histochem.Cytochem.*, 32, (1984) 219-229.
21. Cote, R.J., Rosen, P. P., Lesser, M. L., Old, L. J., and Osborne, M. P. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J.Clin.Oncol.*, 9, (1991) 1749-1756.
22. Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y. C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P. H., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and Francke, U. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 6, (1985) 1132-1139.
23. Dearnaley, D.P., Ormerod, M. G., Sloane, J. P., Lumley, H., Imrie, S., Jones, M., Coombes, R. C., and Neville, A. M. Detection of isolated mammary carcinoma cells in marrow of patients with primary breast cancer. *J R Soc Med*, 5, (1983) 359-364.
24. Diel, I.J., Kaufmann, M., and Bastert, G. Metastatic bone disease. 1, (1994)
25. Diel, I.J., Kaufmann, M., Goerner, R., Costa, S. D., Kaul, S., and Bastert, G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J Clin Oncol*, 10, (1992) 1534-1539.
26. Ferrari, E., Benhamou, M., and Baudouy, M. [Cardiotoxicity associated with trastuzumab (herceptin). An undesired effect leads towards a model of cardiac insufficiency]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 97, (2004) 333-337.
27. Funke, I. and Schraut, W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J.Clin.Oncol.*, 16, (1998) 557-566.
28. Galasko, C. Skeletal metastases. *Clin.Orthop.*, 210, (1986) 18-30.
29. Gebauer, G., Fehm, T., Merkle, E., Beck, E. P., Lang, N., and Jager, W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 19, (2001) 3669-3674.
30. Gerber, B., Krause, A., Muller, H., Richter, D., Reimer, T., Makovitzky, J., Herrnring, C., Jeschke, U., Kundt, G., and Friese, K. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J.Clin.Oncol.*, 19, (2001) 960-971.

31. Grondahl-Hansen, J., Peters, H. A., van Putten, W. L., Look, M. P., Pappot, H., Ronne, E., Dano, K., Klijn, J. G., Brunner, N., and Foekens, J. A. Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer. *Clin Cancer Res.*, 10, (1995) 1079-1087.
32. Harbeck, N., Alt, U., Berger, U., Kates, R., Kruger, A., Thomssen, C., Janicke, F., Graeff, H., and Schmitt, M. Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer. *Int.J.Biol.Markers*, 15, (2000) 79-83.
33. Harbeck, N., Untch, M., Pache, L., and Eiermann, W. 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, (1994) 566-571.
34. Heiss, M.M., Allgayer, H., Gruetzner, K. U., Babic, R., Jauch, K. W., and Schildberg, F. W. Clinical value of extended biologic staging by bone marrow micrometastases and tumor-associated proteases in gastric cancer. *Ann.Surg.*, 226, (1997) 736-744.
35. Heiss, M.M., Allgayer, H., Gruetzner, K. U., Funke, I., Babic, R., Jauch, K. W., and Schildberg, F. W. 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, (1995) 1035-1039.
36. Hepp, F., Kentenich, C., Janni, W., Kindermann, G., and Braun, S. Prognostische Bedeutung Cytokeratin (Ck)-positiver Knochenmarkmikrometastasen (KMM) bei Patientinnen mit Zervixkarzinom (CC) im Stadium Figo I-II. *Gut*, (2000) 37
37. Hinterberger, W., Buxhofer, V., Ogris, E., Zelenka, P., Kier, P., Ruckser, R., Dorner, S., Habertheuer, K. H., Vedovelli, H., Schindler, S., and Hinterberger-Fischer, M. [Significance of minimal residual disease for the estimation of the prognosis and for therapeutic decisions in solid tumors]. *Acta Med Austriaca*, 59, (2002) 2-8.
38. Hosch, S.B., Braun, S., and Pantel, K. Characterization of disseminated tumor cells. *Semin Surg Oncol*, 20, (2001) 265-271.
39. Janicke, F., Pechtl, A., Thomssen, C., Harbeck, N., Meisner, C., Untch, M., Sweep, C. G., Selbmann, H. K., Graeff, H., and Schmitt, M. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J.Natl.Cancer Inst.*, 93, (2001) 913-920.
40. Janni, W., Hepp, F., Rjosk, D., Kentenich, C., Strobl, B., Schindlbeck, C., Hantschmann, P., Sommer, H., Pantel, K., and Braun, S. The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer*, 92, (2001) 46-53.

41. Kasper, M., Stosiek, P., Typlt, H., and Karsten, U. Histological evaluation of three new monoclonal anti-cytokeratin antibodies. 1. Normal tissues. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23, (1987) 137-147.
42. Klein, C.A., Blankenstein, T. J., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N. H., and Riethmuller, G. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet*, 360 (2002) 683-689.
43. Kowolik, J.H., Kuhn, W., Nahrig, J., Werner, M., Obst, T., Avril, N., Schmitt, M., and Graeff, H. Detection of micrometastases in sentinel lymph nodes of the breast applying monoclonal antibodies AE1/AE3 to pancytokeratins. *Oncol Rep*, 7, (2000) 745-749.
44. Landys, K., Persson, S., Kovarik, J., Hultborn, R., and Holmberg, E. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res.Treat.*, 49, (1998) 27-33.
45. Magdolen, V., Rettenberger, P., Lopens, A., Oi, H., Lottspeich, F., Kellermann, J., Creutzburg, S., Goretzki, L., Weidle, U. H., and Wilhelm, O. 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, (1995) 813-816.
46. Mansi, J.L., Berger, U., McDonnell, T., Pople, A., Rayter, Z., Gazet, J. C., and Coombes, R. C. The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. *J.Clin.Oncol.*, 7, (1989) 445-449.
47. Mansi, J.L., Gogas, H., Bliss, J. M., Gazet, J. C., Berger, U., and Coombes, R. C. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet*, 354, (1999) 197-202.
48. Molino, A., Pelosi, G., Micciolo, R., Turazza, M., Nortilli, R., Pavanel, F., and Cetto, G. L. Bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.Treat.*, 58, (1999) 123-130.
49. Naume, B., Borgen, E., Kvalheim, G., Karesen, R., Qvist, H., Sauer, T., Kumar, T., and Nesland, J. M. Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin Cancer Res*, 7, (2001) 4122-4129.
50. Noack, F., Helmecke, D., Rosenberg, R., Thorban, S., Nekarda, H., Fink, U., Lewald, J., Stich, M., Schutze, K., Harbeck, N., Magdolen, V., Graeff, H., and Schmitt, M. CD87-positive tumor cells in bone marrow aspirates identified by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Int.J.Oncol.*, 15, (1999) 617-623.

-
51. Noack, F., Schmitt, M., Bauer, J., Helmecke, D., Kruger, W., Thorban, S., Sandherr, M., Kuhn, W., Graeff, H., and Harbeck, N. A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications. *Int.J.Biol.Markers*, 15, (2000) 100-104.
 52. Offner, S., Schmaus, W., Witter, K., Baretton, G. B., Schlimok, G., Passlick, B., Riethmüller, G., and Pantel, K. p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1999) 6942-6946.
 53. Oyaizu, T.F., Arita S FAU - Hatano, Hatano, T. F., and Tsubura, A. Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors performed with an antigen-retrieval technique on methacarn-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues. *Journal of Surgery Research*, 60 (1996) 69-73.
 54. Pantel, K., Cote, R. J., and Fodstad, O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J.Natl.Cancer Inst.*, 91, (1999) 1113-1124.
 55. Pantel, K., Izbicki, J., Passlick, B., Angstwurm, M., Häussinger, K., Thetter, O., and Riethmüller, G. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet*, 347, (1996a) 649-653.
 56. Pantel, K., Izbicki, J. R., Angstwurm, M., Braun, S., Passlick, B., Karg, O., Thetter, O., and Riethmüller, G. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 53, (1993a) 1027-1031.
 57. Pantel, K. and Riethmüller, G. Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 213 (Pt 3), (1996b) 1-18.
 58. Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S., Kutter, D., Lindemann, F., Schaller, G., Funke, I., Izbicki, J. R., and Riethmüller, G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J.Natl.Cancer Inst.*, 85, (1993b) 1419-1424.
 59. Pantel, K., Schlimok, G., Kutter, D., Schaller, G., Genz, T., Wiebecke, B., Backmann, R., Funke, I., and Riethmüller, G. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res*, 51, (1991) 4712-4715.
 60. Pantel, K., von Knebel, D. M., Izbicki, J. R., and Riethmüller, G. Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien. *Chirurg*, 68, (1997) 1241-1250.

61. Pauletti, G., Dandekar, S., Rong, H., Ramos, L., Peng, H., Seshadri, R., and Slamon, D. J. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 18, (2000), 3651-3664.
62. 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., and Powles, T. J. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet*, 2, (1983) 1271-1274.
63. Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H., and Schmitt, M. Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol*, 13, (1998) 893-906.
64. Ridell, B. and Landys, K. Incidence and histopathology of metastases of mammary carcinoma in biopsies from the posterior iliac crest. *Cancer*, 44, (1979) 1782-1788.
65. Riede, U.-K., Schaefer, .H.-E. Mammakarzinom in "Allgemeine und spezielle Pathologie" Thieme-Verlag, Stuttgart- New York, 1995, 4.Auflage, 955-961
66. Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Höffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J., and Pichlmayr, R. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J.Clin.Oncol.*, 16, (1998) 1788-1794.
67. Ross, J.S. and Fletcher, J. A. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist*, 3, (1998) 237-252.
68. Salvadori, B., Squicciarini, P., Rovini, D., Orefice, S., Andreola, S., Rilke, F., Barletta, L., Menard, S., and Colnaghi, M. I. Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients. *Eur.J.Cancer*, 26, (1990) 865-867.
69. Schechter, A.L., Stern, D. F., Vaidyanathan, L., Decker, S. J., Drebin, J. A., Greene, M. I., and Weinberg, R. A. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 312, (1984) 513-516.
70. Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Gottlinger, G., Schmidt, G., Hauser, H., Swierkot, S., Warnecke, H. H., Schneider, B., and Koprowski, H. 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 U S A*, 84, (1987) 8672-8676.

71. Schlimok, G. and Riethmuller, G. Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow. *Semin.Cancer Biol.*, 1, (1990) 207-215.
72. Schmidt-Mathiesen, H.H.H. Gynäkologie und Geburtshilfe Lehrbuch für Studium und Praxis. 9. Auflage, (1998)
73. Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Hofler, H., Janicke, F., and Graeff, H. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb.Haemost.*, 78, (1997) 285-296.
74. Schmitt, M., Wilhelm, O., Janicke, F., Magdolen, V., Reuning, U., Ohi, H., Moniwa, N., Kobayashi, H., Weidle, U., and Graeff, H. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (CD87): a new target in tumor invasion and metastasis. *J Obstet Gynaecol*, 21, (1995) 151-165.
75. Shi, S.R., Cote, R. J., and Taylor, C. R. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem*, 49, (2001) 931-937.
76. Shi, S.R., Key, M. E., and Kalra, K. L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 39, (1991) 741-748.
77. Sinz, S., Rutke, S., Späthe, K., Hocke, S., Roggel, F., Sandherr, M., Werner, M., Braun, S., Kuhn, W., Schmitt, M., and 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)
78. Slager, U.T. and Reilly, E. B. Value of examining bone marrow in diagnosing malignancy. *Cancer*, 20, (1967) 1215-1220.
79. Slamon, D. and Pegram, M. Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol* ., 28, (2001) 13-19.
80. Slamon, D.J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235, (1987a) 177-182.
81. 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., and Ullrich, A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244, (1989) 707-712.

-
82. Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., and Norton, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344, (2001) 783-792.
 83. Stelzer, E.H., Wacker, I., and De Mey, J. R. Confocal fluorescence microscopy in modern cell biology. *Semin Cell Biol*, 2, (1991) 145-152.
 84. Stephens, R.W., Brunner, N., Janicke, F., and Schmitt, M. The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 52, (1998) 99-111.
 85. Sweep, C.G., Geurts-Moespot, J., Grebenschikov, N., de Witte, J. H., Heuvel, J. J., Schmitt, M., Duffy, M. J., Janicke, F., Kramer, M. D., Foekens, J. A., Brunner, N., Brugal, G., Pedersen, A. N., and Benraad, T. J. External quality assessment of trans-European multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts. *Br J Cancer*, 78, (1998) 1434-1441.
 86. Theiler, E. Die operative Behandlung des *Brustkrebses* im 18. Jahrhundert. (1999), www.gesch.med.uni-erlangen.de/messer/katalog/t_brus18.rtf
 87. Theriault, R.L. and Hortobagyi, G. N. Bone metastasis in breast cancer. *Anticancer Drugs*, 3, (1992) 455-462.
 88. Thorban, S., Roder, J. D., Pantel, K., and Siewert, J. R. Epithelial tumour cells in bone marrow of patients with pancreatic carcinoma detected by immunocytochemical staining. *Eur.J.Cancer*, 32A, (1996) 363-365.
 89. Togel, F., Datta, C., Badbaran, A., Kroger, N., Renges, H., Giesecking, F., Janicke, F., Zander, A. R., and Kruger, W. Urokinase-like plasminogen activator receptor expression on disseminated breast cancer cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 10, (2001);141-145.
 90. Togel, F., Datta, C., Badbaran, A., Kroger, N., Renges, H., Giesecking, F., Janicke, F., Zander, A. R., and Kruger, W. Urokinase-like plasminogen activator receptor expression on disseminated breast cancer cells. *J Hematother Stem Cell Res* 10, (2001);141-145.
 91. Tumorzentrum München. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. Sauer, H.(Hrsg.). W.Zuckschwerdt Verlag, München, (2001) 8. Auflage
 92. von Knebel Doeberitz, M., Gebert, J., and Herfarth, C. Der Einfluß molekularer Diagnostikverfahren auf die chirurgische Therapie maligner Erkrankungen, *Der Chirurg*, 67 (1996) 967

-
93. Willex AG MG. Willex starts phase I trial with anti-metastatic unrokinase inhibitor drug. press release, www.willex.de, (2001)
 94. Wong, S.L., Chao, C., Edwards, M. J., Simpson, D., and McMasters, K. M. The use of cytokeratin staining in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Am.J.Surg.*, 182, (2001) 330-334.
 95. Yokota, S., Hansen-Hagge, T. E., Ludwig, W. D., Reiter, A., Raghavachar, A., Kleihauer, E., and Bartram, C. R. Use of polymerase chain reactions to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood*, 77, (1991) 331-339.
 96. Yu, W., Kim, J., and Ossowski, L. Reduction in surface urokinase receptor forces malignant cells into a protracted state of dormancy. *J.Cell Biol.*, 137, (1997) 767-777.
 97. Zhang, J., Shen, K. W., Liu, G., Zhou, J., Shen, Q., Shen, Z. Z., and Shao, Z. M. Antigenic profiles of disseminated breast tumour cells and microenvironment in bone marrow. *Eur J Surg Oncol*, 29, (2003) 121-126.
 98. Zia, A., Schildberg, F. W., and Funke, I. MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in R0M0 breast cancer patients. *Int J Cancer*, 93, (2001) 566-570.
 99. Zippelius, A., Kufer, P., Honold, G., Kollermann, M. W., Oberneder, R., Schlimok, G., Riethmuller, G., and Pantel, K. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J Clin Oncol*, 15, (1997) 2701-2708.

10 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt:

Frau Prof. Dr. Marion Kiechle, Direktorin der Frauenklinik der Technischen Universität München für die Möglichkeit die Doktorarbeit an der Frauenklinik durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt, Leiter der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik, für die Möglichkeit die Forschungsarbeiten in den Labors seines Forschungsbereiches durchführen zu können

Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck für die Möglichkeit die Promotion in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Frau Anita Welk, Herrn Dominik Helmecke und Frau Sonja Vehling, den medizinisch technischen Assistenten, für die große Mithilfe bei der Durchführung der Laborarbeit und für die sehr gute Atmosphäre im Labor.

Meinen Mitdoktoranden Sonja und vor allem Frigga, die für alle Probleme ein Ohr hatte. Ein besonderer Dank gilt Elke, die immer für mich da war und ist.

Der Fakultät für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, Herrn Prof. Dr. med. Höfler, Herrn Prof. Dr. med. Schenk und seinen Mitarbeitern in den zytologischen Labors für die Durchführung der Zellaufarbeitung und der immunzytochemischen Färbungen.

Frau Dipl. math. Busch für die statistische Beratung.

Bei den Assistenzärzten der Frauenklinik der TU München für die Durchführung der Knochenmarksaspirationen.

Schließlich möchte ich mich noch bei allen nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe, die es mir möglich gemacht haben die Arbeit durchzuführen bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen lieben Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung ich es niemals geschafft hätte.

11 Lebenslauf

Am 21. Januar 1976 wurde ich als zweites Kind des Lehrers Dieter Hocke und der Lehrerin Anna Hocke in Regensburg geboren. Meine Kindheit verlebte ich in Laaber.

1982-1986	Grundschule Laaber
1986-1995	Gymnasium Parsberg
Juni 1995	Absolvierung der allgemeinen Hochschulreife
August 1995- September 1996	Zivildienst am Universitätsklinikum Regensburg
November 1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Regensburg
August 1998	Ärztliche Vorprüfung
Oktober 1998	Wechsel an die Technische Universität München
August 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002 - März 2003	Praktisches Jahr (Klinikum „Rechts der Isar“, Städt. Krankenhaus München Bogenhausen)
Mai 2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juli 2003- Oktober 2004	Tätigkeit als AiP in der Abteilung für Chirurgie an der Kreisklinik München-Perlach
Seit Oktober 2004	Assistenzarzt in der Abteilung für Chirurgie an der Kreisklinik München-Perlach