

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

Nachweis des uPA-Rezeptors auf disseminierten
zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark bei
Patientinnen mit Ovarialkarzinom:

Korrelation zu klinischen Parametern und
Krankheitsverlauf

Martin Bosl

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

Nachweis des uPA-Rezeptors auf disseminierten
zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark bei Patientinnen
mit Ovarialkarzinom:

Korrelation zu klinischen Parametern und Krankheitsverlauf

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 23.12.2004 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
 - 1.1 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms
 - 1.2 Prognosefaktoren und Therapiestrategien
 - 1.3 Neue Prognosefaktoren
 - 1.4 Disseminierte zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark
 - 1.5 Der u-PA-Rezeptor und seine Bedeutung in der Tumorbiologie

2. Zielsetzung

3. Material und Methoden
 - 3.1 Patientengut
 - 3.2 Statistische Methoden
 - 3.3 Knochenmarkaspirate
 - 3.3.1 Aufarbeitung des Knochenmarkes
 - 3.3.2 Qualitätskontrolle und zytologische Befundung des Knochenmarkaspirats durch Hämatologen
 - 3.3.3 Verbesserungen der Methodik
 - 3.4 Doppelimmunfluoreszenzfärbung
 - 3.4.1 Verwendete Antikörper
 - 3.4.2 Immunfluoreszenzfärbetechnik

- 3.4.3 Kerngegenfärbung
- 3.5 Präparatauswertung und Befunddokumentation
 - 3.5.1 Untersuchung der Präparate mittels konfokaler Laserscanmikroskopie
 - 3.5.2 Quantifizierung des uPA-Rezeptors mit Hilfe von Latex Beads

4. Ergebnisse

- 4.1 Methodische Verbesserungen
- 4.2 Ergebnisse klinischer Daten
 - 4.2.1 Beschreibung des Patientengutes
 - 4.2.2 Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark bei Patientinnen vor Therapiebeginn
 - 4.2.3 Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark bei Patientinnen nach präoperativer Chemotherapie
 - 4.2.4 Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark vor und nach präoperativer Chemotherapie
 - 4.2.5 Nachweis zytokeratinpositiver Zellen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomrezidiv
- 4.3 uPA-Rezeptor auf zytokeratinpositiven Zellen

5. Diskussion

- 5.1 Diskussion des experimentellen Teils

- 5.1.1 Nachweis zytokeratinpositiver Zellen
- 5.1.2 Nachweis von u-PA-R auf zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark
- 5.2 Klinische Bedeutung zytokeratinpositiver Zellen beim Ovarialkarzinom
 - 5.2.1 Zytokeratinpositive Zellen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom – Vergleich mit anderen Prognosefaktoren und mit dem Krankheitsverlauf
 - 5.2.2 Expression des u-PA-Rezeptors auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark
- 5.3 Ausblick und klinische Konsequenzen

- 6. Zusammenfassung

- 7. Literaturverzeichnis

- 8. Liste verwendeter Materialien

- 9. Danksagung

- 10. Lebenslauf

Für meine Eltern Frau Roswitha Bosl und Herrn Dr. med. Günther Bosl

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms

Maligne Ovarialtumore stehen in der Europäischen Union derzeit mit einer Inzidenz von etwa 26 000 Neuerkrankungen pro Jahr an fünfter Stelle aller Malignome der Frau. Mit jährlich etwa 17 000 Todesfällen, entsprechend 5% der krebbedingten Mortalität, nehmen sie nach dem Mamma-, dem Bronchial-, dem kolorektalen und dem Magenkarzinom ebenfalls die fünfte Position ein. Bei allen 1987 – 1989 weltweit mit einem Ovarialkarzinom behandelten Frauen betrug die Fünf-Jahres-Überlebensrate 39,1%. Damit ist das Ovarialkarzinom der aggressivste bösartige Tumor unter den Malignomen der Frau.

Die Inzidenz der malignen Ovarialtumore ist mit 15 – 20 Neuerkrankungen/100 000/Jahr in den Industrieländern Westeuropas, in Skandinavien und in den USA vergleichbar hoch. Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter an. Neunzig Prozent aller Erkrankungen werden erst nach dem 40. Lebensjahr diagnostiziert. Frauen unter 30 Jahren erkranken nur selten. In der Altersgruppe der 40 – 44-jährigen Frauen beträgt die Rate bereits 15 Neuerkrankungen pro 100 000 Frauen/Jahr und steigt in der Altersgruppe der 75 – 79-jährigen auf 54 Neuerkrankungen pro 100 000 Frauen/Jahr an.

Ein charakteristisches Merkmal maligner Ovarialtumore ist deren tumorbiologische und morphologische Inhomogenität. Die häufigste Gruppe bilden sogenannte epitheliale Ovarialtumore (FIGO 1998), nach der WHO

Klassifikation 1999 als Oberflächenstromatumore bezeichnet. Unter diesen wird zwischen Borderline-Tumoren, auch Karzinome von Low-Grade-Malignität ("tumors of low malignant potential", LMP-Tumoren) genannt, und invasiven Karzinomen unterschieden. Die FIGO (1998) (Fédération International de Gynécologie et d'Obstétrique) führt darüber hinaus eine Untergruppe sogenannter extraovarieller, peritonealer Karzinome; hierbei handelt es sich um intraperitoneale Karzinome, bei denen das Ovar mitbefallen ist, aber nicht den primären Ausgangsort darstellt. Weitere maligne, jedoch seltene Tumore des Ovars sind Keimzelltumoren und maligne Keimstrangstromatumoren.

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist unklar. Als Risikofaktoren gelten zunehmendes Lebensalter, familiäres Vorkommen, Nulliparität/Infertilität, ständiger Wohn- und Lebensraum in West- und Nordeuropa oder Nordamerika. Bei 90% aller Ovarialkarzinome ist bisher keine Genveränderung (Keimbahnmutation) bekannt. Sie werden als "sporadische" Ovarialkarzinome den ca. 10% familiär-erblichen gegenübergestellt, die bei jüngeren Frauen auftreten. Die überwiegende Mehrzahl der familiären Fälle weisen Mutationen in Genen auf, die klinisch mit dem Mamma-Ovarialkarzinomsyndrom (Breast-Ovarian-Cancer; BOC) oder wesentlich seltener mit dem HNPCC-Syndrom (Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer) assoziiert sind. Bei 80 – 90% der BOC-Familien finden sich Mutationen im BRCA-1-Gen auf Chromosom 17q21, bei den Übrigen treten diese im BRCA-2-Gen auf Chromosom 13q12-13 auf. Beide Gene sind Tumorsuppressorgene. Das Lebenszeitrisiko für die

Manifestation eines Ovarialkarzinoms beträgt für Mutationsträgerinnen 87% (BRCA-1) bzw. 63% (BRCA-2). Die BRCA-1-Carrier-Frequenz beträgt in den USA und Europa etwa 1:800; die von BRCA-2 ist etwa halb so hoch.

Als protektive Faktoren gelten Schwangerschaft, lange Stillperioden, die Einnahme oraler Kontrazeptiva (Ovulationssuppression), die Hysterektomie, Adnektomie und die Sterilisation durch Tubenligatur. Die Risikoreduktion bei langfristiger Einnahme von Kontrazeptiva wird in einer Größenordnung von etwa 40% eingeschätzt (29).

Aufgrund des häufig symptomarmen Krankheitsverlaufs in den Frühstadien erfolgt die Diagnosestellung in 70% der Fälle erst in den fortgeschrittenen Stadien FIGO III und IV. Hierdurch lässt sich die niedrige Gesamt-Fünf-Jahres-Überlebensrate (20 bis 40%) erklären. Die Prognose in frühen Tumorstadien ist demgegenüber günstiger. Eine Früherkennung und eine frühzeitige, individualisierte Therapie könnte somit zu einer erheblichen Verbesserung der Gesamtprognose führen. Hierbei würden besonders Risikogruppen von Früherkennungsmaßnahmen profitieren. Für die Mehrzahl gesunder Frauen mit erhöhtem Erkrankungsrisiko für ein Ovarialkarzinom ist die Zuordnung zu einer Risikogruppe aufgrund der zur Zeit zur Verfügung stehenden Daten jedoch nicht möglich (108). Auch die Individualisierung der Therapie ist wegen der bis dato noch mangelnden Kenntnis über die Genexpression der Tumorzellen und deren Korrelation mit dem Krankheitsverlauf und dem Therapieansprechen, sowohl der einzelnen aus dem Tumorzellverband gelösten disseminierten, als auch der

im Verband lebenden, noch nicht möglich. Ein Ansatz dazu ist, zum Beispiel, Eigenschaften von Tumorzellen mit der Durchflußzytometrie zu charakterisieren, welche Zellgröße, interne Struktur (z.B. Granularität), DNA und RNA Gehalt, Zellform, Proteinzusammensetzung, und eine Vielfalt von intrazellulären Molekülen und Oberflächenmarkern detektieren kann.

Seitdem es möglich ist, multiple Analysen an einzelnen Zellen durchzuführen, erlaubt die Durchflußzytometrie eine genaue Beschreibung der zellulären Heterogenität eines Tumors. Mit der Möglichkeit von durchflußzytometrischer DNA-Analyse, gibt es jetzt eine Methode zur Etablierung von neuen Prognosefaktoren vieler solider Karzinome (42).

Anders als bei der Durchflußzytometrie werden bei der Doppelimmunfluoreszenzfärbung die Zellen und deren Antigene, wie zum Beispiel Panzytokeratin von epithelialen Tumoren oder der u-PA-Rezeptor (o.a. CD87), mit spezifischen Antikörpern (z.B. A45-B/B3 oder HU277) gebunden und können mit Hilfe der Immunfluoreszenz sogar optisch dargestellt werden. So können verschiedene Antigenstrukturen in einer einzigen Zelle visualisiert werden. Hierbei kann man mehrere Antigene einer Zelle gleichzeitig markieren und erlangt so verschiedene Informationen über eine Zelle zum selben Zeitpunkt. Diese Antigenstrukturen können dann in Schichtbildern dreidimensional geschnitten, auch zur Quantifizierung von Antigenen herangezogen werden. Auf diesem Wege ist es möglich, den Gehalt von Zell-Rezeptoren, wie den CD87, auf der Zellmembran bzw. im Zytoplasma von

einzelnen aus einem Tumorzellverband disseminierten, zytokeratinpositiven Zellen zu untersuchen und diese Ergebnisse mit dem Krankheitsverlauf von Karzinompatienten zu vergleichen, um so das uPA-System bei Tumorerkrankungen besser zu verstehen. So ist es durch das Phänotypisieren einzelner disseminierter zytokeratinpositiver Zellen möglich, das invasive Potential einzelner Zellen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einer Tumorthherapie und im Verlauf der Erkrankung zu monitoren.

1.2 Prognosefaktoren und Therapiestrategien

Prognosefaktoren:

Die Prognose von Patientinnen mit Ovarialkarzinom wird durch klinische Indikatoren, Stadium der Erkrankung, Histologie des Primärtumors und insbesondere den postoperativ verbliebenen Tumorrest bestimmt. Auf der anderen Seite gewinnen tumorbiologische Prognosefaktoren, die direkt auf den malignen Eigenschaften der Tumorzelle, wie Proliferation, Invasion und Metastasierung beruhen, zunehmend an Bedeutung (108).

Das Tumorstadium (FIGO - TNM) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hat eine wesentliche prognostische Bedeutung und stellt weiterhin die Basis für Therapieentscheidungen dar (siehe Tabelle 1).

	Stadium										
	Ia	Ib	Ic	IIa	IIb	IIc	IIIa	IIIb	IIIc	IV	Insgesamt
5-JÜR (%)	86,9	71,3	79,2	66,6	55,1	57,0	41,1	24,9	23,4	11,1	41,6

Tabelle 1: 5-Jahres-Überlebensraten (5-JÜR) in Abhängigkeit vom Tumorstadium aus „Diagnostische und therapeutische Standards beim Ovarialkarzinom.“ (ICD 183). Deutsche Krebsgesellschaft und die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (2000).

1975 konnte C. T. Griffiths erstmals zeigen, dass der wichtigste prognostische Faktor für das Überleben die maximale Größe des verbliebenen Tumorrestes nach der Primäroperation darstellt. Griffiths konnte nachweisen, dass auch bei fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung die Prognose signifikant verbessert wurde, wenn der postoperative Resttumor auf mindestens 1,6 cm reduziert werden konnte. Heute ist diese Erkenntnis Grundlage des weitgehend standardisierten therapeutischen Vorgehens beim Ovarialkarzinom (51, 100), und bildet somit einen für das weitere Schicksal der Patientin entscheidenden Prognosefaktor. Hierbei weisen solche Patientinnen die beste Prognose auf, bei denen weder makroskopische noch mikroskopische erkennbare intraabdominelle Tumorresiduen zurückblieben (siehe Tabelle 2).

	Tumorrest			
	mikroskopisch negativ	makroskopisch negativ	< 2 cm	> 2 cm
5-JÜR (%)	56,5	38,2	32,5	13,1

Tabelle 2: 5-Jahres-Gesamtüberlebensraten (5-JÜR) und postoperativer Tumorrest aus „Diagnostische und therapeutische Standards beim Ovarialkarzinom.“ (ICD 183). Deutsche Krebsgesellschaft und die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (2000).

Die histologische Typisierung eines Ovarialkarzinoms erscheint bei univariater Betrachtungsweise in zahlreichen Studien als prognostisch relevant. Multivariate Analysen lassen die prognostische Signifikanz des histologischen Typs des Ovarialkarzinoms allerdings etwas in den Hintergrund treten (29).

Weiterhin stellen retroperitonealer Lymphknotenstatus, das Lebensalter und der präoperative Allgemeinzustand der Patientin wichtige Indikatoren für den weiteren Verlauf der Erkrankung dar.

Der Verlauf des Tumormarkers CA 12-5 gibt sowohl postoperativ als Ausdruck des Ansprechens auf die systemische Therapie als auch in der neoadjuvanten Situation während einer Induktions-Chemotherapie Hinweise für die Wirksamkeit der präoperativen Chemotherapie und ist so ein sehr wichtiger Monitoringparameter beim Ovarialkarzinom (108).

Weniger etablierte Prognosefaktoren sind der Steroidrezeptorstatus, die Aneuploidie der DNA, Onkogene, Tumorsuppressorgene, Wachstumsfaktoren, Wachstumsrezeptoren u.a. (33, 98).

Therapiestrategien:

Das Ziel des operativen Vorgehens ist die möglichst vollständige Entfernung jeglichen makroskopisch sichtbaren Tumorgewebes. Das übliche Vorgehen bei der operativen Therapie besteht zunächst aus der Eröffnung des Abdomens durch Längsschnitt und die sofortige histologische Schnellschnittuntersuchung, ferner Peritonealbiopsien und Peritonealspülzytologie.

Als Operationsmethode der Wahl wird eine Hysterektomie mit beidseitiger Adnektomie, die Omentektomie, die Appendektomie, bei Befall des Beckenperitoneums die Peritonektomie, Lymphadnektomie pelvin und paraaortal durchgeführt. Bei vorhandenem Darmbefall ist die Darmresektion erforderlich, um möglichst makroskopische Tumorfreiheit bzw. weitgehende Tumorreduktion zu erzielen. Letzteres ist gleichzeitig die wesentliche Voraussetzung für die Wirkung der anschließenden adjuvanten firstline Chemotherapie, die heute abgesehen von FIGO Ia, b G1 durchgeführt wird (108).

Die gesteigerte Radikalität beim Primäreingriff und die möglichst vollständige Entfernung allen makroskopisch sichtbaren Tumorgewebes schafft die Voraussetzung für eine bestmögliche Wirkung der platin- und paclitaxelhaltigen Kombinations-Chemotherapie. Der Sinn einer radikalen Primärchirurgie konnte sowohl hinsichtlich der Verlängerung der Überlebenszeit, der progressionsfreien Zeit als auch der daraus resultierenden verbesserten Lebensqualität in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden (35, 41, 50, 89). Das mediane Überleben von Patientinnen ohne Residualtumor nach Primäroperation wird mit 40 – 60 Monate angegeben (35, 41, 50). Die mediane Überlebenszeit von Patientinnen mit einem Residualtumor von 0,5 bis 1,5 cm ist 18 Monate. Dagegen ist bei Patientinnen mit einem Residualtumor größer als 1,5 cm eine mediane Überlebenszeit von nur 6 Monate zu erwarten (35). Scarabelli et al. (2000) zeigte an 66 Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom

geschätzte Zweijahresüberlebensraten. 24 Patientinnen ohne Residualtumor nach Primäroperation zeigten eine Zweijahresüberlebensrate von 100%. 28 Patientinnen mit Residualtumor kleiner als 1 cm hatten eine Zweijahresüberlebensrate von 77,3%. Keine der 14 Patientinnen mit einem Residualtumor größer als 1 cm überlebte die Zeitspanne von zwei Jahren (89).

Ist die Resektabilität des Ovarialtumors absehbar erschwert, kann möglicherweise eine präoperative Chemotherapie von Vorteil sein. In Studien wurde in Kollektiven mit initial nicht möglicher R0-Resektion nach präoperativer Chemotherapie weitgehende oder makroskopische Tumorfreiheit in 45 bis 55% der Fälle erzielt (69). Bei fortgeschrittenen Karzinomfällen (FIGO III/ IV) bzw. bei schwer absehbarer Resektabilität kann so zur Diagnosesicherung eine Laparoskopie mit histologischer Untersuchung des Ovarialkarzinoms und anschließend eine präoperative Chemotherapie von 3 Zyklen zur Tumorreduktion vor Durchführung des Tumordebulkings vorgenommen werden.

1.3 Neue Prognosefaktoren

Als neuere prognostische Faktoren sind sowohl Faktoren der Zellproliferation und Apoptose als auch Indikatoren der invasiven und metastatischen Kapazität bekannt.

Proteasen spielen bei dem Abbau der extrazellulären Matrix, Invasion und Destruktion in umgebendes, gesundes Gewebe und bei der Metastasierung von malignen Tumoren in entferntes Gewebe eine entscheidende Rolle. Die einzelne Tumorzelle, die aus dem Tumorzellverband gelöst wird, muss, um in entfernte Organe zu gelangen und eine Tochtergeschwulst zu bilden, erst die physiologische Barriere, bestehend aus Basallamina und extrazellulärer Matrix überwinden. Die extrazelluläre Matrix ist ein dicht gepacktes Netzwerk, bestehend aus verschiedenen Komponenten wie Kollagen, Glykoproteinen (Fibronectin, Laminin), Proteoglykanen und Glukosaminoglykanen (Hyaluronsäure) (59). Die Basalmembran, die eine Trennung verschiedener Gewebekompartimente schafft, ist hauptsächlich aus Kollagen Typ IV und Glykoproteinen aufgebaut, wobei das Typ IV Kollagen das strukturelle Rückgrat der Basalmembran bildet (19, 105).

Als Parameter der Invasivität und Metastasierungsneigung sind die Tumorproteasen zu nennen, die von malignen im Vergleich zu benignem Ovarialgewebe vermehrt gebildet werden (52). Verschiedene Proteasen unterschiedlicher Herkunft, wie Serinproteasen (z.B. Plasmin, uPA und tPA), Metalloproteasen (Kollagenasen, Gelatinasen), Cysteinproteasen (Kathepsin B, H, L) und Aspartylproteasen (Kathepsin D) ermöglichen es der Tumorzelle, diese physiologischen Barrieren zu überwinden (97). So stellen der Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ (uPA) und sein spezifischer Inhibitor (PAI-1) im Primärtumorgewebe starke unabhängige Prognosefaktoren beim

Ovarialkarzinom, auch für tumorfrei operierte Patientinnen dar (52). Für MMP-9, eine Matrix-Metalloprotease konnte ebenfalls eine prognostische Relevanz beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom nachgewiesen werden (53).

Die Aktivität dieser Proteolysefaktoren unterliegt einem fein regulierten Gefüge, an dem Aktivatoren gleichsam wie Inhibitoren beteiligt sind.

Das Plasminogen-Plasmin-System besteht aus einem inaktiven Proenzym, Plasminogen, das durch zwei physiologische Plasminogenaktivatoren (Urokinase-type- bzw. Tissue-type plasminogen activator (uPA, tPA)) in Plasmin umgewandelt wird. tPA wird vorwiegend von Endothelzellen in Form von einkettigen sc(single-chain)-tPA sezerniert und bindet mit hoher Affinität an Fibrin. uPA, welcher als pro-uPA sezerniert wird, ist durch die Bindung an seinen zellmembranständigen und zum Teil zytoplasmatischen Rezeptor (uPA-R) entscheidend an der perizellulären Plasminogenaktivierung beteiligt.

Die Inhibierung des fibrinolytischen Systems kann auf der Plasminebene durch vor allem 2-Antiplasmin, auf der Plasminogenaktivatorebene durch spezifische Plasminogenaktivatorinhibitoren, PAI-1/ 2, erfolgen (95). Mechanismen, die eine Hemmung des uPA-Systems und damit die Inhibition der Tumorinvasivität ermöglichen, werden ausführlich in den folgenden Kapiteln (siehe auch Kapitel 5.3) behandelt.

1.4 Der u-PA-Rezeptor und dessen Bedeutung in der Tumorbiologie

Der uPA-Rezeptor (uPA-R, CD87) wurde erstmals 1985 von Vassalli et al. auf humanen Monozyten und den promyeloischen Leukämiezellen U937 beschrieben. 1992 stellte sich dann heraus, dass das von Todd et al. (1985) charakterisierte Oberflächenantigen aktivierter Monozyten Mo3 identisch mit uPA-R ist (60, 82).

Das uPA-R-Gen – kodierend für eine 1,5 kb m-RNA – wurde auf dem Chromosom 19 lokalisiert (8), es setzt sich aus sieben Exons zusammen und ist annähernd 25 kb groß (20).

Der uPA-Rezeptor ist ein stark glykosyliertes Protein mit einer relativen Masse von 55 000 – 60 000 Dalton. Der reine Proteinanteil beträgt 35 000 Dalton. Das Protein besteht aus 313 Aminosäuren und besitzt fünf N-Glykosylierungsstellen (Asn52, Asn162, Asn172, Asn200, und Asn233). Es ist mittels eines Glykosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI), der posttranslationell eine C-terminale hydrophobe Sequenz des Primärtranskripts ersetzt, an die Zellmembran gebunden (78).

Die ligandenbindende Region des uPA-R befindet sich innerhalb der N-terminalen Domäne des Rezeptors. Sobald eine Tumorzelle einen Plasminogenrezeptor präsentiert, wird ein oberflächenassoziiertes Proteasensystem, in Anwesenheit von Plasminogen, Plasminogenaktivatoren (z.B. uPA und tPA) und Plasminogenaktivatorinhibitoren (z.B. PAI-1/2)

aktiviert. Dieses System treibt sehr effektiv die Auflösung des Tumorstromas und der Basalmembran voran. Zahlreiche Studien haben bewiesen, dass durch die Hemmung der Ligandenbindung von uPA an den uPA-R, z.B. mit monoklonalen Antikörpern direkt gegen uPA, mit uPA-Peptiden, welche der ligandenbindenden Region des uPA-R entsprechen, oder mit löslichen uPA-R als Scavenger-Protein für uPA, die Ausbreitung von Tumorzellen im Gewebe *in vitro* vermindert (57). Die Ergebnisse von Billström et al. (1995) und Rabbani et al. (1995), welche die Effekte von spezifisch und unspezifischen Serinproteasen-Inhibitoren *in vitro* und im Tiermodell untersuchten, weckten das Interesse an der Entwicklung an selektiven uPA-Inhibitoren. Der niedermolekulare Serinproteasen-Inhibitor WX-UK1 (Firma Wilex www.willex.com) befindet sich zur Zeit in einer klinischen Phase-I-Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit bei soliden Karzinomen (Mamma-, Ovarial- und Magenkarzinom) als WX-UK1-Monotherapie sowie in Kombination mit dem 5-FU-Prodrug Capecitabine (Xeloda – www.xeloda.com). Auch auf Translationsebene konnte durch eine Hemmung der uPA-R-Expression mit Antisense-Oligonukleotide eine Reduktion der Tumorinvasivität bzw. eine Metastasierung von Ovarialkarzinomzellen in Mäusen erreicht werden (107, 110).

Resultate von Studiengruppen, die eine Hemmung des uPA/uPA-R-Systems und deren Auswirkung auf Tumorinvasivität und Metastasierung prüften, werden in Kapitel 5.3 gezeigt.

Leicht nachvollziehbar ist, dass tumorassoziiertes uPA somit von klinischer und prognostischer Relevanz sein muss. Es ist ein wichtiger prognostischer Faktor für das rezidivfreie und für das Gesamtüberleben bei Patienten mit Brust-, Ovarial-, Kolon-, Ösophagus- und Magenkarzinom, was in einer Vielzahl von Untersuchungen bewiesen werden konnte (3, 32, 34, 39, 43, 52, 63, 64, 65, 77, 94). Bei einer prospektiven Studie unter Kuhn et al. (1999) zeigte sich der uPA- und PAI-1-Gehalt im Primärtumorgewebe der Patientinnen mit Ovarialkarzinom als prognostisch signifikanter Faktor. Mit Hilfe des PAI-1-Gehalts war es auch möglich Ovarialkarzinompatientinnen in Niedrig- und Hoch-Risiko-Patientinnen einzuteilen (52).

Die Untersuchung des uPA-Rezeptors auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark wurde bislang nur von wenige Studiengruppen durchgeführt (2, 37, 38, 86, 106). Heiss et al. (1995) beschrieb als erster Autor auch die Expression von uPA-R auf detektierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark von Magenkarzinompatienten mit Hilfe einer immunozytochemischen Doppel-Färbung als signifikant prognostischen Faktor für rezidivfreies und für das Gesamtüberleben (37). Dies wurde später durch Allgayer et al. (1997) und Heiss et al. (2002) bestätigt (2, 38). Tögel et al. (2001) konnte den uPA-Rezeptor auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen von Mammakarzinompatientinnen nachweisen (106). Teile der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden von Roggel et al. (2003) veröffentlicht, welche die ersten Ergebnisse der uPA-Rezeptordichte auf disseminierten

zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom beschreibt (86). Ergebnisse dieser Studiengruppen werden in den folgenden Kapiteln genauer erörtert.

1.5 Tumorzellnachweis im Knochenmark

Es wird angenommen, dass die minimal residuale Erkrankung (minimal residual disease – MRD), d.h. das Zurückbleiben von lebensfähigen disseminierten Tumorzellen im Körper nach Entfernung des Primärtumors, eine Ursache ist für ein Erkrankungsrezidiv bei soliden malignen Tumoren ist (85). So muss von einer systemischen Tumorerkrankung ausgegangen werden.

Ist eine Fernmetastase aufgetreten, kann bei Tumorerkrankungen in den meisten Fällen eine Therapie in kurativer Absicht mit den heutigen therapeutischen Möglichkeiten nicht mehr erreicht werden. Aus diesem Grund ist seit dem letzten Jahrzehnt die Detektion und Therapie der minimal residualen Erkrankung zu einem Brennpunkt der klinisch orientierten Krebsforschung geworden.

Die Detektionsraten disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit soliden Tumoren ohne klinisch manifeste Metastasen liegen bei 25 – 60%, unabhängig davon ob die Tumorerkrankung bevorzugt in das Skelettsystem metastasiert (z.B. Mammakarzinom (24, 30, 36, 58)) oder ob eine Skelettmetastasierung selten ist (z.B. Colonkarzinom (54)). Viele

Studiengruppen konnten bei soliden Karzinomen (Mammakarzinom, kolorektales Karzinom, Magenkarzinom, Ösophaguskarzinom und nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom) den prognostischen Wert von disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark für das rezidivfreie Überleben (23, 24, 30, 36, 39, 44, 54, 58, 68, 71, 91, 104) und für das Gesamtüberleben (30, 36, 58, 71, 104) nachweisen. Bei den jedoch noch nicht ausreichend großen Fallzahlen ($n = 43 - 727$) der verschiedenen Studiengruppen ist eine eindeutige Aussage über zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark als Prognosefaktor noch nicht möglich.

Beim Ovarialkarzinom konnte für das metastasenfreie Überleben der prognostisch prädiktive Wert nachgewiesen werden (11). Bei 108 untersuchten Ovarialkarzinompatientinnen und einer medianen Nachbeobachtungszeit von 45 Monaten werden auch hier weitere Studien mit höheren Fallzahlen und längeren Nachbeobachtungszeiten zeigen müssen, dass das alleinige Auftreten von disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark einen prognostisch prädiktiven Wert für das rezidivfreie oder das Gesamtüberleben beinhaltet.

Bis zu diesem Zeitpunkt ist nicht geklärt, ob der Nachweis dieser disseminierten zytokeratinpositiven Zellen – im Knochenmark als Indikatororgan – das Bestehen einer systemischen Tumorerkrankung aufzeigt oder ob es sich um schlafende Zellen, sogenannte „Dormant Cells“, handelt, die sich in einer G0-Phase befinden und später ihr malignes Potential wiedererlangen, um eine Fernmetastase oder ein Karzinomrezidiv zu initiieren. Vielmehr als der alleinige

Nachweis zytokeratinpositiver Zellen werden weitere Studien zeigen, dass durch die Charakterisierung zytokeratinpositiver Zellen das maligne Potential der Einzelzellen detektiert werden kann und so schließlich eine genauere prognostische Aussage zulässt (38). Daneben können hierbei neue Möglichkeiten geschaffen werden, neuartige und individualisierte Therapiestrategien zu entwickeln.

2. Zielsetzung

Vor allem um neue Therapienstrategien für Karzinomerkrankungen zu entwickeln, ist die Krebsforschung bemüht neue Ziele (Targets) und deren Bedeutung in der Tumorbiologie für eine individualisierte Therapie für Krebspatienten zu entwickeln.

In dieser Arbeit sollte, aufbauend auf früheren Methoden, etabliert in der Frauenklinik der Technischen Universität München, der Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark aller Patientinnen mit Ovarialkarzinom, die an der Frauenklinik der TU München vom November 1999 bis Oktober 2000 operiert wurden und ihr Einverständnis gegeben haben, erbracht werden.

Es sollte der Nachweis von uPA-R-positiven und gleichzeitig zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom durchgeführt werden, um so die Möglichkeit zu bekommen, neue individualisierte Therapiemodelle zu entwickeln. Hier wird insbesondere der Einsatz neuer Therapiemöglichkeiten, z.B. Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern, zunehmend diskutiert.

Ziel war es, Informationen über ein repräsentatives Patientenkollektiv von Ovarialkarzinompatientinnen zu erlangen, bei denen Knochenmark aspiriert wurde und die Korrelation von Auftreten zytokeratinpositiver Zellen im

Knochenmark und deren uPA-Rezeptorgehalt mit dem Krankheitsverlauf zu untersuchen.

Ferner sollte geprüft werden, ob bei dem zytokeratinpositiven Nachweis im Knochenmark eine Korrelation mit klinischen Parametern besteht:

- FIGO und pT-Stadium
- Nodalstatus
- Grading
- Metastasenstatus
- Histologie des Primärtumors
- CA 12-5 – Werte
- Aszites – Menge bei Operation
- Spülzytologie bei Operation

Außerdem sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang besteht zwischen dem Krankheitsverlauf und dem zytokeratinpositiven Knochenmarksbefund:

- Operationsergebnis (tumorfrei bzw. intraoperativer Resttumor)
- Ansprechen der präoperativen Chemotherapie
- Rezidivhäufigkeit
- Prognose und Todesfälle

3. Material und Methoden

3.1 Patientengut

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde von November 1999 bis Oktober 2000 bei insgesamt 85 Patientinnen, aufbauend auf früheren Ergebnissen und Methoden, etabliert in der Frauenklinik der Technischen Universität München, bei Verdacht auf Ovarialkarzinom nach erfolgter Einwilligung unmittelbar vor der Operation Knochenmark entnommen:

60 Patientinnen hatten davon ein primäres Ovarialkarzinom,

6 Patientinnen andere Malignome,

19 Patientinnen einen benignen Befund (Negativkontrolle)

Von den 60 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom, bei denen unmittelbar vor einer Operation Knochenmark entnommen wurde, erhielten 21 Patientinnen eine präoperative Chemotherapie. Dagegen hatten 30 Patientinnen zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion keine präoperative systemische Therapie erhalten. Diese Patientinnen (n = 51) bilden die Patientengruppe B.

Zwei der 60 Patientinnen mit Ovarialkarzinom bekamen zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnosestellung das Knochenmark aspiriert. Hierbei wurde eine Patientin primär operiert, eine Patientin erhielt präoperativ eine Chemotherapie

und wurde zum Zeitpunkt der Laparotomie untersucht. Diese Patientinnen (n = 2) bilden die Patientengruppe C (Kapitel 4.2.5).

Bei 7 Patientinnen konnte vor und nach einer präoperativen Chemotherapie Knochenmark entnommen werden, einmal bei Diagnosestellung in Vollnarkose unmittelbar vor der laparoskopischen Histologiesicherung und dann nach drei Zyklen primärer Chemotherapie unmittelbar vor Debulkingoperation. Diese Patientengruppe A (n = 7) wird separiert in Kapitel 4.2.4 besprochen.

Knochenmarksaspiration bei 60 Patientinnen mit Ovarialkarzinom	
bei Operation <u>ohne</u> präoperative Chemotherapie	30 Patientinnen
bei Operation <u>nach</u> präoperativer Chemotherapie	21 Patientinnen
bei Operation aufgrund einer Rezidivdiagnose	2 Patientinnen
<u>vor und nach</u> präoperativer Chemotherapie	7 Patientinnen

Tabelle 3: Überblick über Aufteilung der Patientengruppen der Ovarialkarzinompatientinnen zum Zeitpunkt der Knochenmarksaspiration. Sieben der 60 Patientinnen konnten vor und nach der präoperativen Chemotherapie untersucht werden und werden deshalb in dieser Arbeit separiert behandelt.

3.2 Statistische Methoden

Überelebensanalysen sowie die Untersuchung der rezidivfreien Überlebenszeit in Abhängigkeit vom Zytokeratinbefund im Knochenmark in Kapitel 4.2.2 und

4.2.3 wurde in den Kaplan-Meier-Analysen mittels Log-Rank-Test berechnet. Korrelationsanalysen vom rezidivfreien Intervall mit relativen uPA-R-Intensitätswerten in Kapitel 4.3 wurden mittels t-Test vorgenommen.

Der χ^2 -Test, und im Fall von nicht genügend hoher Zelhäufigkeit bzw. Beobachtungshäufigkeit der Fischer-Exakt-Test, wurde im Rahmen der Korrelationsanalysen der klinisch erfassten Daten wie FIGO-Stadium, pT-Stadium, Grading des Primärtumors, Nodalstatus, Metastasenstatus, Aszitesmenge und CA 12-5-Werte (Kapitel 4.2.2 und 4.2.3) durchgeführt. Alle statistischer Berechnung wurden mit dem Statistikprogramm SPSS Version 11.5 vorgenommen. Nach Berechnung wurden die Daten durch das Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München kontrolliert.

3.3 Knochenmarkaspirate

Das Knochenmark wurde unmittelbar präoperativ im Operationssaal in Vollnarkose gewonnen. Die Aspiration wurde im rechtsseitig gelagerten Zustand der Patientin am linken Beckenkamm, an der spina iliaca posterior superior, vorgenommen (siehe Abbildung 1). Die Punktionsstellung der Aspirationsnadel ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Punktion am posterioren Beckenkamm gilt als die am wenigsten mit Komplikationen behaftete und repräsentativste Stelle für Knochenmarkhistologie und Knochenmarkaspiration (Prof. Bartels, LMU München, persönliche Mitteilung). Zur Vermeidung einer

Kontamination des Aspirats mit epithelialen Zellen aus der Haut, wurde der Beckenkamm erst nach einer Stichinzision punktiert. Es wurden aus einer Punktionsstelle einmal 2 ml (für die Qualitätskontrolle mit EDTA 0.5 ml) und zweimal 6 – 8 ml Knochenmark in mit Heparin vorbenetzte Einwegspritzen aspiriert. Dann wurde das Aspirat sofort in ein Falcongefäß mit 5 ml Heparin gegeben und auf Eis gekühlt.

Alle Patientinnen wurden für die Knochenmarkaspiration und die weitgehende Analyse des Knochenmarks aufgeklärt und hatten schriftlich eingewilligt.



Abbildung 1: Knochenmarkaspiration bei einer rechtsseitig gelagerten Patientin. Die Punktion erfolgt nach Desinfektion und sterilen Abdecken im Bereich der Spina iliaca posterior superior sinistra.

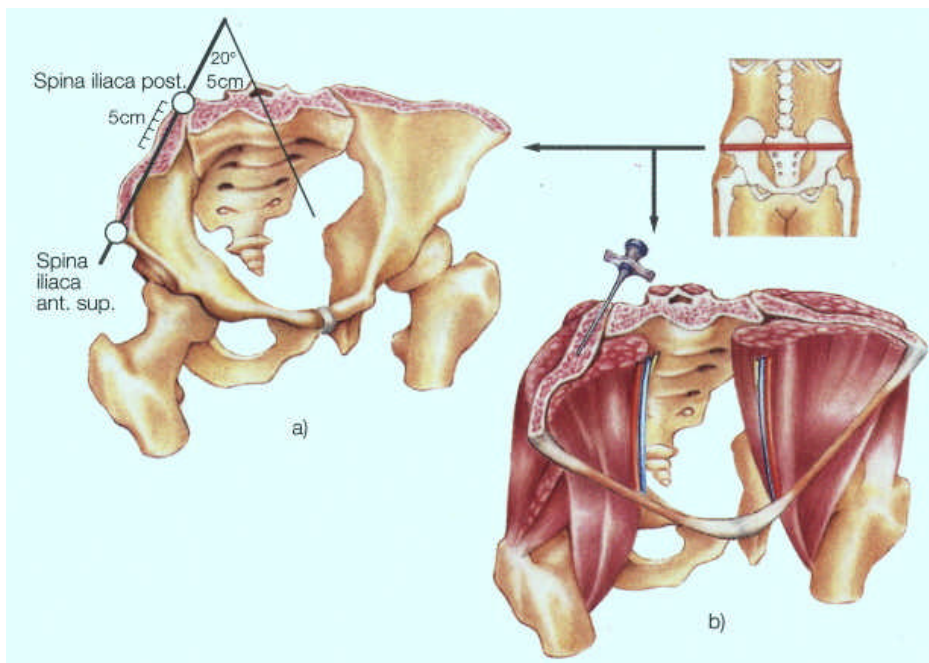


Abbildung 2: Darstellung der Punktionsstellung und Punktionsrichtung der Aspirationsnadel im Beckenkamm.

3.3.1 Aufarbeitung des Knochenmarkes

Die Isolierung zytokeratinpositiver Zellen erfolgte nach der von Böyum (1968) beschriebene Methode. Der Arbeitsaufwand der Knochenmarkaufarbeitung betrug ungefähr drei bis vier Stunden.

Die Knochenmarksuspension wurde mit der gleichen Menge PBS (Phosphate Buffered Saline) verdünnt. Daraufhin wurde die Zellsuspension in mehrere 15 ml Röhrchen (Fa. Falcon) auf Biocoll (Fa. Biochrom KG), das eine Dichte von $1,077 \text{ g/cm}^2$ besitzt, aufgeschichtet und 20 min lang bei $400 \times g$ und 4° C ohne Bremsung der Zentrifuge nach dem Dichtezentrifugationsgradienten aufgetrennt. Die Interphasenschicht, enthaltend mononukleäre Zellen, wurde anschließend isoliert, zwei Waschzentrifugationsschritten (7 min, $250 \times g$, 4° C , ohne Bremsung der Zentrifuge) unterzogen und dann in einer Neubauer Zählkammer mit einer 1:100 Verdünnung ausgezählt. Je 200 000 Zellen wurden mit Hilfe von Filterpapierchen (Shandon filter cards, Fa. Shandon) auf 24 gesäuberte Objektträger mittels einer Zytospin-Zentrifuge (Fa. Shandon) aufgetragen, 24 Stunden luftgetrocknet und dann bei -80° C eingefroren. Deutlich bessere Färberesultate wurden jedoch erzielt, wenn die Zytospins am Tag, unmittelbar nach der Knochenmarkaspiration und anschließender Verarbeitung fixiert wurden (30 min Fixation in 1% PFA bei 21° C) und erst danach eingefroren wurden.

3.3.2 Qualitätskontrolle und zytologische Befundung des Knochenmarkspirats durch Hämatologen

Alle Knochenmarkspirate wurden in der III. Medizinischen Klinik für Hämatologie und Onkologie der Technischen Universität München einer Qualitätskontrolle und Befundung durch einen Hämatoonkologen unterzogen. Hierzu wurde eine Pappenheim-Färbung angewendet, welche für die übliche Knochenmarkdiagnostik verwendet wird. Es handelte sich bei allen Aspiraten um ein aussagekräftiges Knochenmark mit guter Qualität, das nicht mit Blut kontaminiert worden war.

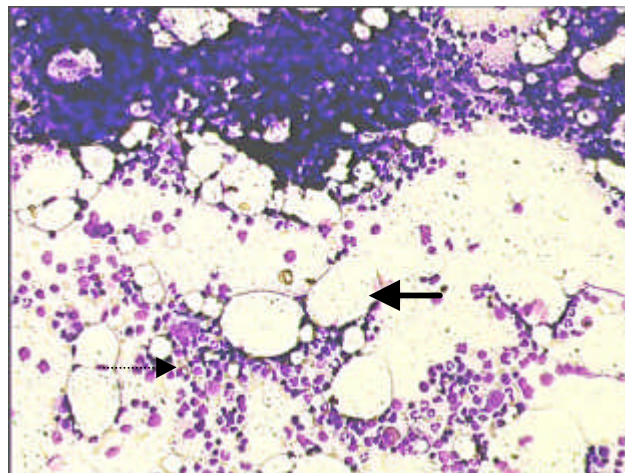


Abbildung 3: Ausschnitt aus einer Qualitätskontrolle eines Knochenmarkpunkts in Pappenheim-Färbung einer Patientin mit Ovarialkarzinom. Man sieht die üblichen Immunzellen des Knochenmarks (.....▶), außerdem ausgewaschene Fettzellen(→▶).

3.3.3 Verbesserungen der Methodik

In der Zeit von 1998 bis Mai 2000 wurde nur an einer Stelle des Beckenkamms Knochenmark punktiert. Knochenmarkaspirationen ab dem 15.5.2000 (Patientin n = 56) wurden am linken Beckenkamm, an der spina iliaca posterior superior, mit nur einer Stichinzision in der Haut, jedoch mit zwei Knochenpunktionsstellen vorgenommen, um eine höhere Zellzahl pro Punktion und einen höheren Zellgehalt pro Patientin zu erreichen.

Bis zum 19.7.2000 (Aspirat n = 70) wurde erst am Tag der Färbung mit 1% PFA fixiert. Ab dem 31.7.2000 (Aspirat n = 71) wurde das Knochenmark am Tag der Aufarbeitung mit 1% PFA, 30 min bei Raumtemperatur vor der Zellzählung fixiert, abzentrifugiert (5 min, 500xg, 21°C), und einem Waschschrift (5 min, 500xg, 21°C) unterzogen, um so eine bessere Qualität der Präparate zu erreichen, die unter dem Gefrieren bei -80°C litten und daraus Zellschäden entstanden (siehe auch Abbildung 9 und 10).

3.4 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

3.4.1 Verwendete Antikörper

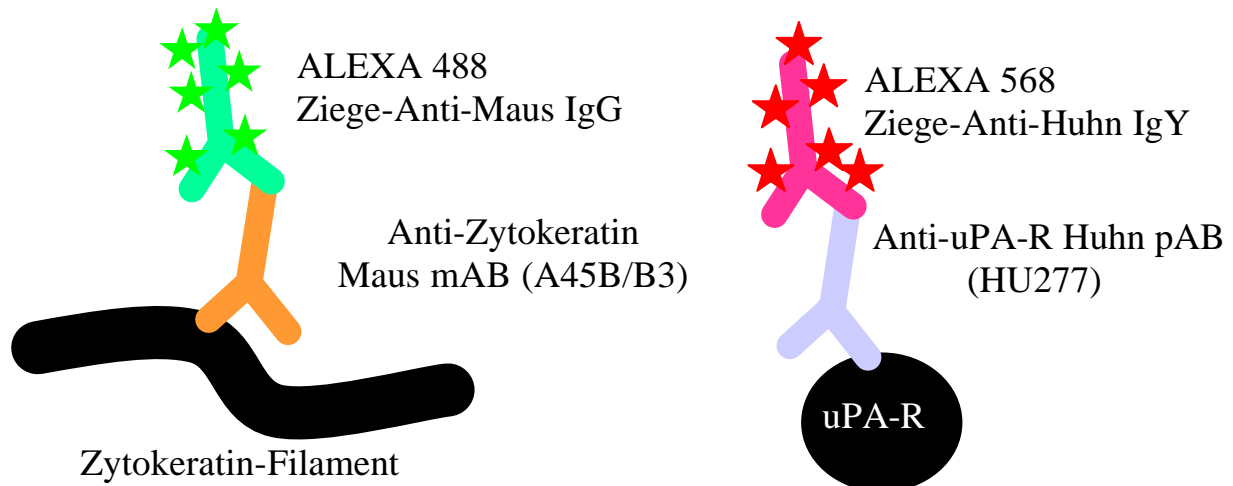


Abbildung 4: Darstellung der Doppelimmunfluoreszenzfärbung. Links die Darstellung der Bindung des A45B/B3-Antikörpers, der Zytokeratin 8,18 und 19 bindet; diesen wiederum bindet der fluoreszierende Antikörper ALEXA 488 Ziege-Anti-Maus IgG. Rechts die Darstellung der Bindung des HU277-Antikörpers, der den uPA-R bindet; dieser wird wiederum vom fluoreszierenden Antikörper ALEXA 568 Ziege-Anti-Huhn IgY markiert.

Nachdem die Objektträger mit dem aufgespinnnten Knochenmarkpräparat mit einem Fettstift (DAKO Pen) umrahmt wurden, wurden zuerst die Zytospins mittels 1%iger PFA 30 Minuten fixiert, und danach mit 0,025 %igen Saponin (Fa. Serva) in PBS permeabilisiert, um den Antikörpern die Diffusion zu den intrazellulären Antigenen zu erleichtern.

Für die Detektion und Identifizierung der disseminierten, zytokeratinpositiven epithelialen Zellen im Knochenmark und deren gleichzeitige Charakterisierung, also Nachweis des uPA-R und dessen Gehalt wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung der Präparate durchgeführt. Dies geschah

zunächst durch A45B/B3, einem Antikörper gegen Zytokeratin 8, 18 und 19, in einem Mischverhältnis von 1:99 in PBS und im zweiten Färbeschritt durch HU277, einen Antikörper gegen den uPA-Rezeptor in einem Mischverhältnis von 2:123 in PBS. Bei den jeweiligen Färbeschritten betrug die Inkubationszeit eine Stunde. Dann wurden, wie in Tabelle 4 dargestellt, und wie von Noack et al. (2000) beschrieben, für die Visualisierung der markierten Zellen die Präparate mittels den Fluorochromen ALEXA 488 Ziege-Anti-Maus IgG (gegen A45B/B3) und ALEXA 568 Ziege-Anti-Huhn IgY (gegen HU277) – beides von Molecular Probes, Eugene, OR, USA – für jeweils 30 Minuten inkubiert. Nach den jeweiligen Färbeschritten wurde drei mal mit BSA (Albumin bovine Fraction V, pH 7.0, Fa. Serva) in PBS 3 Minuten gewaschen. Auf jedes Präparat wurde jeweils 125 µl Suspension der Antikörperlösung pipettiert. Die gesamte Färbung wurde in einer Feuchtkammer bei 21°C in einem verdunkelten Labor durchgeführt. Die gefärbten Knochenmarkpräparate wurden mit einem Deckgläschen versehen und mittels Fixogumm (Fa. Marabu) versiegelt. Anschließend wurden die Präparate kühl und dunkel bei 4°C gelagert. Angestrebt wurde die sofortige Mikroskopie der Präparate, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

Erster Primärantikörper A45B/B3 (Maus)	Zweiter Primärantikörper HU277 (Huhn)	Erster Sekundärantikörper Alexa 488 Ziege-Anti-Maus	Zweiter Sekundärantikörper Alexa 568 Ziege-Anti-Huhn
1h	1h	30 min	30 min

Tabelle 4: Färbeprotokoll für die Doppelimmunfluoreszenzfärbung der Knochenmarkpräparate.

Bei dem Antikörper A45B/B3 handelt es sich um einen gereinigten monoklonalen Mausantikörper gegen humanes Panzytokeratin (Zytokeratin 8, 18 und 19) (Fa. Micromet, Martinsried). Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen wurde dieser Antikörper verwendet. Die Tumor Cell Detection Committee of the International Society of Haematotherapy and Graft Engineering empfiehlt für die Markierung von zytokeratinhaltigen Tumorzellen und für Immunoassays den Antikörper A45B/B3 (46, 101). Es wurde bewiesen, dass der mAB A45B/B3 ein sensitiver und spezifischer Marker ist, disseminierte epitheliale Zellen im Knochenmark von Karzinompatienten zu detektieren (9). Pantel et al. beschreibt in einem Review (1999) den Antikörper A45B/B3 für Immunassays als Antikörper mit höchster Spezifität. Analysen von einer großen Patienten-Kontrollgruppe ohne Karzinom zeigten, dass die Spezifität von Antikörpern gegen Zytokeratin höher ist als die von Antikörpern gegen Muzine (15). Die Kreuzreaktivität der Antimuzin-Antikörper mit normalen Knochenmarkzellen könnte für die beschränkte Reproduzierbarkeit von muzinbasierenden Immunassays beim Nachweis von Tumorzellen im

Knochenmark verantwortlich sein. CK2, ein Antikörper gegen Zytokeratin 18, und A45B/B3 hatten in Bezug auf die unspezifische Anfärbung von immunreaktiven Knochenmarkzellen die besten Ergebnisse (15). Um eine ausreichende Sensitivität für die Diagnose einer minimalresidualen Erkrankung zu erreichen, empfehlen Pantel et al. die Analyse von 2×10^6 mononukleäre Knochenmarkzellen mittels eines quantitativen Nachweisverfahrens (Antikörper A45B/B3, alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) Färbemethode) (15). Der Antikörper A45B/B3 wurde in einem Konzentrationsgemisch von 5,2 mg/ml in PBS (Phosphate Buffered Saline) geliefert, und zur Lagerung auf 1,0 mg/ml in PBS verdünnt. Er wurde bei -20°C in Aliquots aufbewahrt und kurz vor der Färbung in einem Mischverhältnis von 1:99 mit PBS verdünnt.

Der Antikörper HU277 wurde am Frauenklinikum rechts der Isar der Technischen Universität durch V. Magdolen im Jahre 1994 zum ersten Mal hergestellt (nach dem Protokoll von Gassmann et al. 1990) (57). Um den polyklonalen uPA-R-Antikörper vermehrt produzieren zu können, wurde, wie von Magdolen et al. 1994 beschrieben, je 200 – 300 μg gereinigter uPA-Rezeptor in den Brustmuskel von Hühnern injiziert. Aus den Eidotter der Hühner wurde dann der Antikörper (HU277) durch eine 1:5-Verdünnung in 10 mM Tris-HCl und 140 mM NaCl, pH 7,4 (TBS) und durch anschließende Zentrifugation (20 min, 7000 xg) gereinigt und der Überstand nach Trennung der Lipoproteine mit Dextransulfat (Konzentration 0,6%) und CaCl_2

(Konzentration: 150 mM) gewonnen. Die Immunglobuline vom Huhn (IgY) wurden daraufhin mit zwei weiteren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Perzipitationsschritten (erster Schritt: 20%; zweiter Schritt: 14%) gereinigt. Das sich ergebende Pellet wurde wieder aufgelöst und mit TBS (Tris buffered saline) dialysiert. So konnte man einen hohen Ertrag von mehr als 80% reiner Fraktion des HU277-Antikörpers erlangen (57).

Dieser Antikörper wurde bei -20°C in Aliquots aufbewahrt und kurz vor der Färbung in einem 2:123 Mischverhältnis mit PBS verdünnt.

3.4.2 Immunfluoreszenzfärbetechnik

Wie in Abbildung 5 dargestellt, bindet – nach Inkubation mit Saponin (0,025 g Saponin auf 100 ml PBS (Phosphate Buffered Saline)) für 45 Minuten – im ersten Färbeschritt der monoklonale Maus-Antikörper A45B/B3 gegen intrazelluläres Zytokeratin. Die Inkubationszeit beträgt hier in einer Feuchtkammer 60 Minuten. Daraufhin bindet, nach drei Waschschritten jeweils 3 Minuten mit PBS/BSA 1% (1,0 g bovines Albumin auf 100 ml PBS), im zweiten Färbeschritt der Sekundärantikörper Alexa 488 Ziege-Anti-Maus IgG an den Fc-Teil des monoklonalen Antikörpers A45B/B3 (Inkubationszeit: 30 Minuten in Feuchtkammer). Dadurch ist nun das Zytokeratin in allen Zellen des angefertigten Knochenmarkpräparates mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert. Diese zytokeratinpositiven Zellen können so mit Hilfe der

konfokalen Laserscanmikroskopie detektiert und von den übrigen im Präparat befindlichen Zellen unterschieden werden.

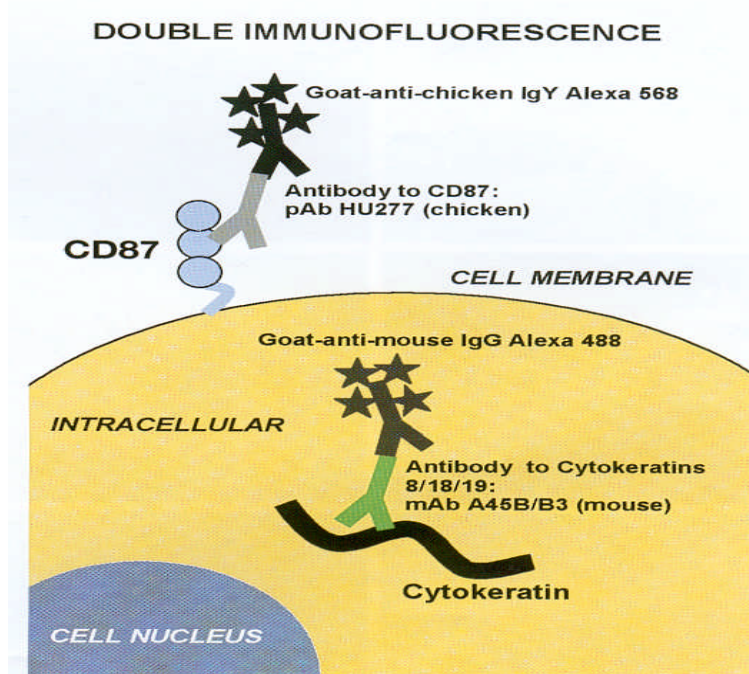


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Tumorzelle und die für die Technik der Doppelimmunfluoreszenzfärbung verwendeten, sowie die, für die Detektion von disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark, genutzten Antikörper. Intrazelluläre Bindung des monoklonalen Antikörpers (mAb) A45 B/B3 (Maus) mit Zytokeratin 8/ 18/ 19; dieser wiederum gebunden von Alexa 488 Ziege-Anti-Maus IgG. Der zellmembranständige uPA-Rezeptor (CD87) wird von dem polyklonalen Antikörper (pAb) HU 277 (Huhn) markiert; dieser wiederum in Bindung mit Alexa 568 Ziege-Anti-Huhn IgY. Abbildung aus „A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: Methodological advances and clinical implications“ von F. Noack et al. 2000 (67).

Der für die Metastasierung und Invasivität einer Tumorzelle mitverantwortliche u-PA-Rezeptor wurde von dem polyklonalen Huhn-Antikörper HU 277 markiert (Inkubationszeit 60 Minuten in Feuchtkammer) und dann, nach drei Waschschritten mit PBS/BSA 1% (siehe oben), mittels Fluoreszenzmarkierung, durch Bindung des zweiten Sekundärantikörpers Alexa 568 Ziege-Anti-Huhn

IgY (Inkubationszeit 30 Minuten in Feuchtkammer), an den Fc-Bereich des Antikörpers HU 277 für das Lasermikroskop sichtbar gemacht. Durch die Bindung des Antikörpers HU 277 und Alexa 568 Ziege-Anti-Huhn IgY wurde so außerdem die Quantifizierung durch Intensität der Fluoreszenz des markierten u-PA-Rezeptors möglich. (siehe Kapitel 3.4.2)

3.4.3 Kerngegenfärbung

Um eine Verifizierung der zytokeratinpositiver Zellen als disseminierte Zellen eines primären Karzinoms zu erreichen, wurde im Anschluss an Detektion und Scannen der zytokeratinpositiven Zellen in Schichtbildern versucht eine May-Grünwald-Giemsa-Färbung (Pappenheim-Färbung) durchzuführen, um eine zytologische Beurteilung zu erreichen. Die Pappenheim-Färbung eignet sich für Färbung von Blut- und Knochenmarkausstrichen, sowie von Aspirationszytologien, Ergüssen und Sputum. Die Pappenheim-Färbung ist eine panoptische Färbung, welche die May-Grünwald-Färbung und die Giemsa-Färbung kombiniert. Diese Kombination hat den Vorteil, dass die Farben deutlicher zur Geltung kommen als bei einer Einzelfärbung. Das Durchführen der Pappenheim-Färbung erwies sich jedoch, wegen der dazu notwendigen Entdeckung des Objektträgers nach der Immunfluoreszenzfärbung, als technisch schwierig. Durch wiederholte Wasch- und Färbeschritte der

Pappenheim-Färbung (May-Grünwald Stammlösung 4 min, May-Grünwald-Lösung + Puffer 5 min, Leitungswasser + 3 ml Puffer 10mal eintauchen 3 min, Giemsa Stammlösung + Puffer 15 min, Leitungswasser + 3 ml Puffer 5x eintauchen 3 min, Leitungswasser + 3 ml Puffer 5x eintauchen 3 min, Leitungswasser + 3 ml Puffer 5x eintauchen 3 min) wurden die schon detektierten zytokeratinpositiven Zellen vermutlich abgewaschen und waren dann nicht mehr auffindbar. Dieser wichtige zytologische Beweis konnte somit bei den Knochenmarkpräparaten von Patientinnen mit Ovarialkarzinom nicht erbracht werden.

3.5 Präparatauswertung und Befunddokumentation

3.5.1 Untersuchung der Präparate mittels konfokaler Laserscanmikroskopie

Die Präparate wurden in einem verdunkelten Labor mittels eines konfokalen Laserscanmikroskops zunächst mäanderförmig nach zytokeratinhaltigen Zellen abgesucht. Dies geschah mit einem Laser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488 \text{ nm}$ bei möglichst geringer Intensität des Lasers, um die Reflexionsintensität der mit Fluoreszenz beladenen Antikörper nicht zu schwächen. Ebenfalls wurde immer auf eine kühle und dunkle Aufbewahrung der Objektträger geachtet. Bei Auffinden einer reflexintensiven Zelle wurde diese zunächst in einem Transmissionsbild (siehe Abbildung 6), dann bei einer Wellenlänge des Lasers

von $\lambda = 488 \text{ nm}$ und anschließend bei einer Wellenlänge von $\lambda = 568 \text{ nm}$ fotografiert und in einen Computer gespeichert (Abbildung 7 und 8). Das Auffinden der Zelle wurde schriftlich dokumentiert: Datum der Detektion, Datum der Färbung, Präparat-Nummer, Dokumentation der Koordinaten auf dem Objektträger, Aufnahme-Intensität (Voltage) bei 488 nm und bei 568 nm . Danach wurde die Stelle mit einem feinen, wasserfesten Stift markiert und es wurden weitere signalintensive Zellen gesucht. Nach Abschluss des Suchvorgangs wurde der markierte Ort mit 63facher Vergrößerung erneut aufgesucht und die Zelle mit einem Transmissionsbild und einem Bild bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488 \text{ nm}$ aufgenommen. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des u-PA-Rezeptors. Dies geschah durch Einstellen des Mikroskops auf eine Wellenlänge von $\lambda = 568 \text{ nm}$ und der Erstellung von Schichtbildern der ganzen Zelle in einer Schichtdicke von $0,2 \mu\text{m}$. Hierbei wurden die umliegenden Knochenmarkzellen ausgeblendet, d.h. die Intensität des Lasers wurde verringert bis nur noch die signalintensiven Zellen sichtbar waren. Nun war es wichtig, die nötige Voltage (die Stärke des Laserstrahls), die Pinhole (die Auflösung), das Offset (den Kontrast), die Scanstep (die Stärke der Schichtbilder in μm) und die extended Focus/Scale (die Aufnahme-Intensität) zu notieren, um später bei der Vermessung (Quantifizierung des u-PAR) der Zellen, unter Verwendung der Latex beads, die identischen Parameter verwenden zu können. Man erhält also mittels Eichung der Detektionskamera mit Latex beads (Intensität der Latex beads = 1), nach Addition der Schichtbilder der gescannten

Zellen, einen Referenzwert, der die Intensität des uPA-Rezeptors angibt (siehe Kapitel 3.4.2).

So konnte man die Intensität und damit die semiquantitative Expression der auf und in der Zelle befindlichen uPA-Rezeptoren erfassen.

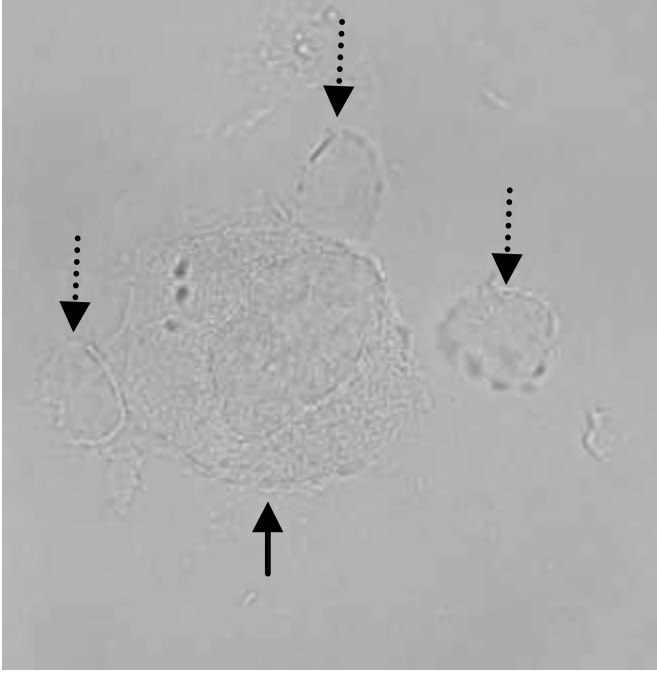


Abbildung 6

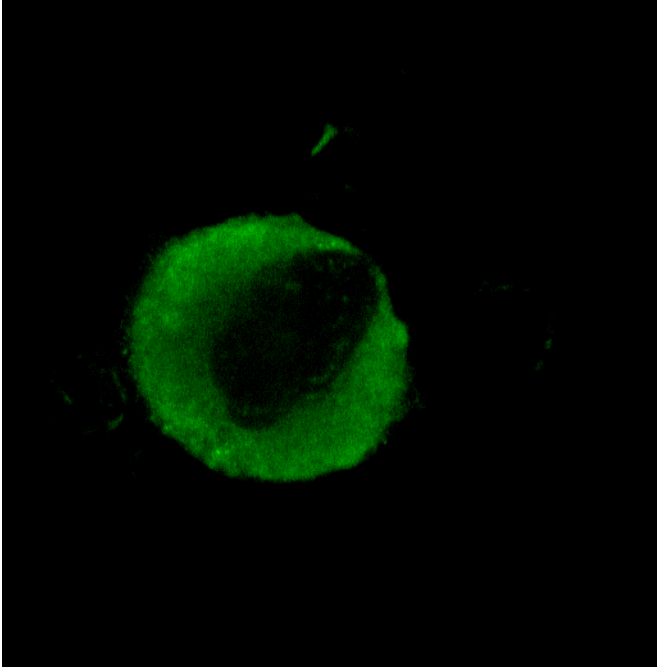


Abbildung 7 (CK)

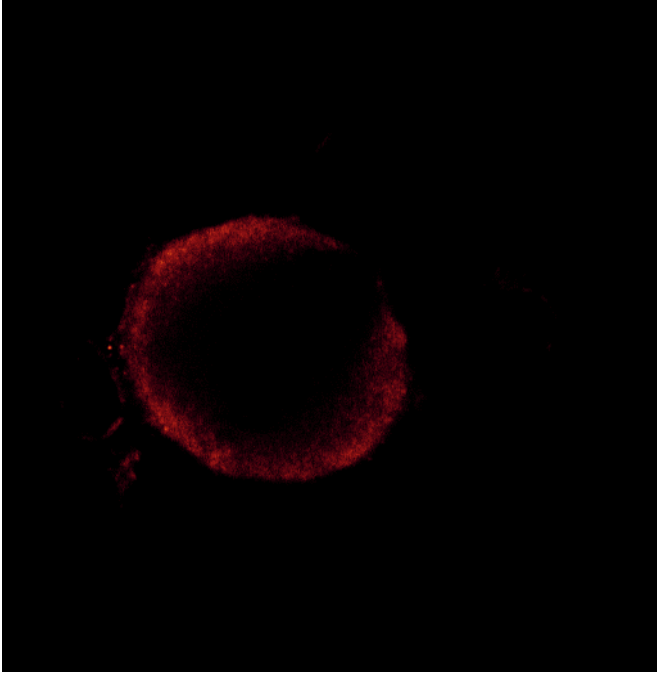


Abbildung 8 (uPA-R)

Abbildung 6, 7 und 8 zeigen eine disseminierte epitheliale zytokeratinpositive (CK) Zelle im Knochenmark einer Patientin mit Ovarialkarzinom bei 63facher Vergrößerung. Hierbei handelt es sich bei allen Aufnahmen um die selbe Zelle in verschiedenen Aufnahmetechniken: Abbildung 6 zeigt ein Transmissionsbild mit dem Laserscanmikroskop. Man kann Zelle und Zellkern der zytokeratinpositiven Zelle (→), sowie umliegende Knochenmarkszellen (...▶) morphologisch beurteilen. Abbildung 7 zeigt die Zytokeratindarstellung (grün) der selben Zelle im Fluoreszenzbild bei einer Wellenlänge von ? = 488. Abbildung 8 stellt das Verteilungsmuster des u-PA-Rezeptors (rot) der selben Zelle bei einer Wellenlänge von ? = 568 dar.

3.5.2 Quantifizierung des uPA-Rezeptors mit Hilfe von Latex Beads

5µl von InSpeck™ Red (580/605) Microscope Image Intensity Calibration Kit, 6µm (Molecular Probes, Leiden in Holland) wurden auf einen Objektträger pipettiert. Diese Latex Beads wurden danach bei Zimmertemperatur in einem dunklen Raum getrocknet. In der Zwischenzeit wurde das Medium zum Eindeckeln angemischt (Prolong Antifade Kit, Molecular Probes). Auf die getrockneten Beads wurde 7 µl dieser Mischlösung gegeben. Hierauf wurde der Objektträger ohne Fixogumm eingedeckelt. Die fertig hergestellten Latex Beads sollten nun 24h bei Raumtemperatur im Dunkeln trocknen.

Die Vermessung mit den Kalibrations-Beads wurde in 63facher Vergrößerung durchgeführt. Die Beads wurden mit den gleichen Einstellungen wie die zuvor die aufgenommene Zelle, bei identischen Parametern wie Voltage, Offset, Pinhole und Scanstep ebenfalls in Schichtbildern gescannt und dies, wie auch die Aufnahme-Intensität (extended Focus/Scale) schriftlich dokumentiert. (siehe Kapitel 3.4.1). Durch Summation der einzelnen Schichtbilder erhält man – wie auch bei den aufgenommenen Zellen eine Intensitätssumme (sum of intensity).

Es wurden die „Scale“ und „sum of intensity“ notiert, und dann wie folgt mit den einzelnen zytokeratinpositiven Zellen verrechnet:

$$\text{Intensität der TZ} = \frac{\text{sum of intensity TZ} \times \text{scale TZ}}{\text{sum of intensity bead} \times \text{scale bead}}$$

Bei der Intensitätsberechnung wird die Intensität der Kalibrationsbeads gleich 1 gesetzt. Somit erhält man für die uPA-Rezeptorverteilung auf den einzelnen detektierten zytokeratinpositiven Zellen einen Referenz- bzw. Vergleichswert zu den einzelnen Zellen einer Patientin, wie auch zu Zellen verschiedener Patientinnen. Die Bedeutung bzw. klinische Relevanz des uPA-R-Verteilungsmusters auf disseminierten zytokeratinpositiven Knochenmarkzellen kann nun mit dem Vergleich von klinischen Parametern untersucht werden.

4. Ergebnisse

4.1 Methodische Verbesserungen

Die ab dem 15.5.2000 (n = 56) operierten Patientinnen wurden mit einer neuen Punktionstechnik, mit mehrmaliger Punktion des Beckenkamms, bei nur einer Stichinzision und nur einem Zugangsweg durch die Haut untersucht. Die Absicht war eine quantitative Verbesserung des Aspirationsmaterials. Auf die Zellzahl wurde durch Vergleich der angesetzten Verdünnungen rückgeschlossen, um Zellzahlen von 200 000 Zellen pro Cytospin zu erreichen. Mit einer Verdünnung (Interphaseschicht : PBS) von durchschnittlich 1 : 36,88 (n = 55 Asperate) vor dem 15.5.2000 (n < 56) war die Verdünnung der Interphaseschicht mit PBS deutlich höher als die nach dem 15.5.2000 (1 : 18,75; n = 25 Asperate). Um die gleich Anzahl von Zellen pro Objektträger (200 000 pro Zytospin) zu erreichen, musste man folglich nach der Aspiration n = 56 eine durchschnittlich größere Menge der Interphaseschicht in PBS verdünnen. Die durchschnittlich gezählte Zellzahl (Neubauer Zählkammer) war vor dem 15.5.2000 27,8 (n = 55 Asperate), nachher 15,8 (n = 25 Asperate). Insgesamt konnte mit dieser Punktionstechnik keine vermehrte Zellzahl pro Knochenmarkaspirat und Patientin erreicht werden.

Ab dem 31.7.2000 bei Aspiration n = 71 wurde das Knochenmark am Tag der Aufarbeitung mit 1% PFA (30 min bei Raumtemperatur) vor der Zellzählung

fixiert, abzentrifugiert (5 min, 500xg, 21°C), und einem Waschschrift (5 min, 500xg, 21°C) unterzogen. Diese neue Technik bei der Verarbeitung des Aspirationsmaterials ergab ein besseres Bild der Zellen in den angefertigten Präparaten. So entstanden weniger Zelltrümmer und somit weniger unspezifische Färbeergebnisse. Die Morphologie der physiologischen Knochenmarkzellen im Präparat verbesserte sich ebenso (siehe Abbildung 9 und 10). Durch die sofortige Fixation des Knochenmarks wurde eine längere Haltbarkeit des Materials erreicht. Das Gefrieren der Präparate bei -80°C war ebenfalls schonender für das Zellbild.

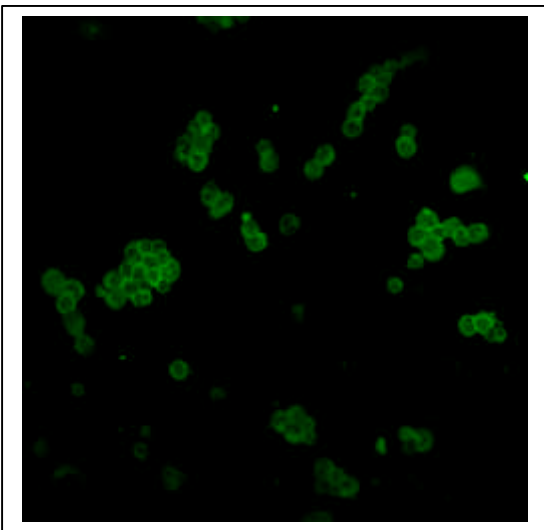


Abbildung 9: Fluoreszenzaufnahme eines Knochenmarkpräparates. Darstellung der uPA-Rezeptoren auf physiologischen Knochenmarkzellen. Fixation des Knochenmarks mit PFA während der Knochenmarkverarbeitung und vor der Immunfluoreszenzfärbung.

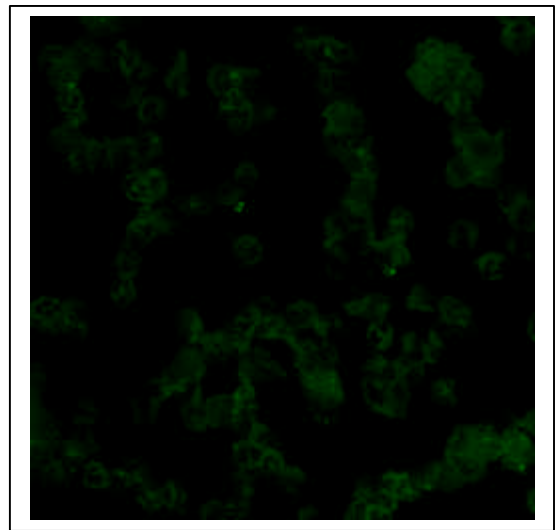
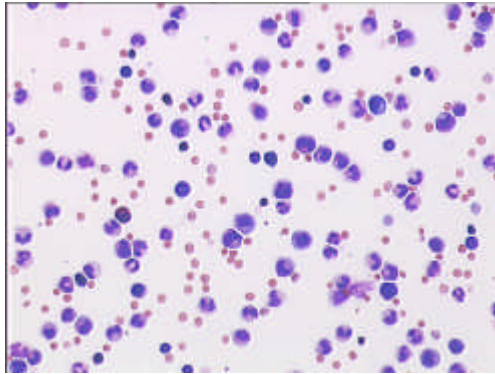


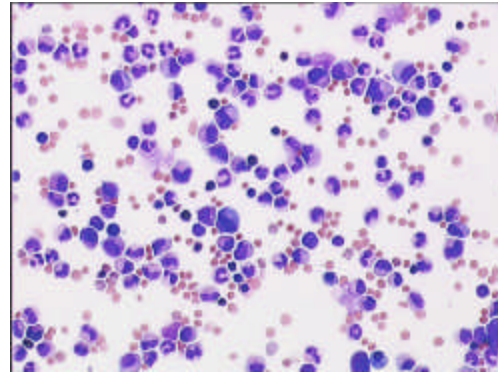
Abbildung 10: Fluoreszenzaufnahme eines Knochenmarkpräparates. Darstellung der uPA-Rezeptoren auf physiologischen Knochenmarkzellen.. Fixation des Knochenmarks mit PFA kurz vor der Färbung, d.h. nach Verarbeitung des Knochenmarks, nach Lufttrocknung und nach Einfrieren bei -80°C.

Es wurde in der vorliegenden Doktorarbeit immer eine möglichst rasche Verarbeitung des aspirierten Materials angestrebt. Als Qualitätskontrolle wurden

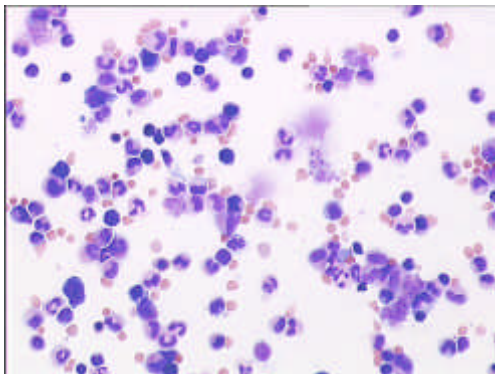
verschiedene Startzeiten für die Verarbeitung des Knochenmarks gewählt, dieses mittels einer für Knochenmark üblichen Pappenheimfärbung gefärbt und die Präparatbeschaffenheit der verschiedenen Verarbeitungszeiten geprüft.



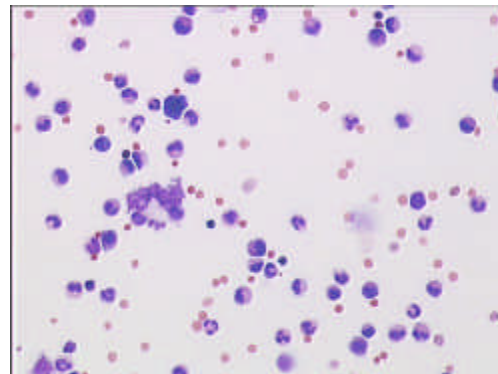
Zeitpunkt 0 Stunden



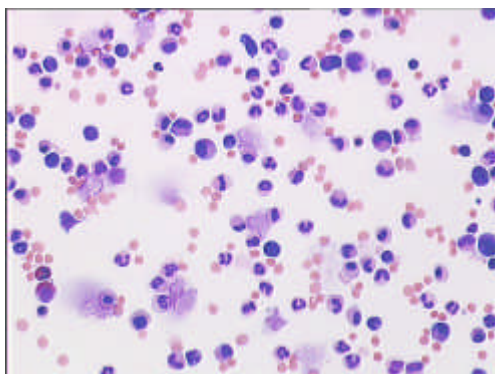
Zeitpunkt 1 Stunde



Zeitpunkt 2 Stunden



Zeitpunkt 4 Stunden



Zeitpunkt 24 Stunden

Abbildung 11: Darstellung der qualitativen Verschlechterung des Knochenmarkpräparats in Zeitabhängigkeit mit dem Zeitpunkt der Knochenmarkverarbeitung ab dem Zeitpunkt 0, welcher dem Zeitpunkt der Knochenmarkaspiration entspricht. Zum Zeitpunkt 1 Stunde kann man noch kaum qualitative Mängel, zum Zeitpunkt 2 Stunden bereits erste Zelluntergänge und zu späteren Zeitpunkten vermehrte Apoptosen mit Zelldetritus erkennen. (In Zusammenarbeit mit Frau Sonja Sinz; Frauenklinik TU München).

Man kam zu dem Ergebnis, dass spätestens innerhalb von zwei Stunden nach der durchgeführten Knochenmarkaspiration das Knochenmark verarbeitet werden muss, um keine qualitativen Einbußen, wie vermehrt apoptotische Zellen, Zelldetritus und dadurch unspezifische Anfärbungen im Präparat in Kauf nehmen zu müssen (siehe Abbildung 11).

4.2 Ergebnisse klinischer Daten

4.2.1 Beschreibung des Patientengutes

Insgesamt wurde bei 60 Patientinnen mit Ovarialkarzinom Knochenmark gewonnen (siehe auch Kapitel 3.1). Zum Zeitpunkt der Primärtherapie wurden 58 Ovarialkarzinompatientinnen auf zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark untersucht. Zwei Patientinnen wurden bei Stellung der Rezidivdiagnose untersucht.

Sieben der 58 Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Primärtherapie in die Untersuchung aufgenommen wurden, hatten vor und nach einer primären Chemotherapie eine Knochenmarkaspiration (siehe Tabellen 3 und 5). Diese sieben Patientinnen bilden die Patientengruppe A und werden in dieser Dissertationsarbeit separat behandelt (siehe Kapitel 4.2.4). Das mediane Alter dieser Patientengruppe war zum Zeitpunkt der ersten Knochenmarkpunktion

62 Jahre (57 – 73 Jahre), bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 21 Monaten (4 – 23 Monate). Wie in Tabelle 5 dargestellt, hatten von 7 Patientinnen 3 vor primärer Chemotherapie, zum Zeitpunkt der laparoskopischen Histologiesicherung, einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund. Vier Patientinnen zeigen zum selben Zeitpunkt einen negativen Befund. Nach primärer Chemotherapie haben 2 Patientinnen ein zytokeratinpositives Knochenmark. Fünf der 7 Patientinnen weisen nach präoperativer Chemotherapie einen zytokeratinnegativen Knochenmarkbefund auf. Die ausführliche Besprechung der Ergebnisse der Patientengruppe A folgt in Kapitel 4.2.4.

Zwei der 60 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, die zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnosestellung untersucht wurden, bilden die Patientengruppe C (n = 2). Bei einem Alter von 50 und 53 Jahren und einer Nachbeobachtungszeit von 72 und 116 Monaten hatte eine Patientin vor ihrer Secondline-Operation eine präoperative Chemotherapie und eine Patientin wurde primär bei Rezidivdiagnosestellung operiert. Beide Patientinnen hatten unmittelbar vor der Laparotomie die Knochenmarkuntersuchung. Die ausführliche Beschreibung dieser Patientinnen folgt in Kapitel 4.2.5.

51 Patientinnen, die vor Operations- bzw. vor einem Therapiebeginn (n = 30), oder nach primärer Chemotherapie (n = 21), unmittelbar vor ihrer Laparotomie, das Knochenmark aspiriert bekamen, bilden die Patientengruppe B (n = 51).

Das mediane Alter der Patientengruppe B (n = 51) betrug zum Zeitpunkt der Knochenmarkuntersuchung 61 Jahre (28 – 81 Jahre), die mediane Nachbeobachtungszeit 19 Monate (1 – 39 Monate). Das mediane Alter der Patientinnen mit zytokeratinpositivem Knochenmarkbefund (n = 13) der Patientengruppe B war zum Zeitpunkt der Knochenmarkuntersuchung 58 Jahre (38 – 81 Jahre) und entsprach etwa dem medianen Alter von 60 (28 – 79) Jahren der zytokeratinnegativen Patientinnen (n = 38). Der Median der mittleren Nachbeobachtungszeit war in der Gruppe der zytokeratinpositiven Patientinnen 17 Monate (4 – 33 Monate) und in der Gruppe der zytokeratinnegativen Patientinnen 21 Monate (1 – 39 Monate).

Insgesamt wurden bei 13 von 51 Patientinnen der Patientengruppe B mit Ovarialkarzinom zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um eine Häufigkeit von 25%.

Die Patientinnen der Patientengruppe B, die vor Therapiebeginn (n = 30) untersucht wurden, hatten bei einem medianen Alter von 56 Jahren (28 – 81 Jahre) eine mediane Nachbeobachtungszeit von 16 Monaten (1 – 35 Monate). Dabei hatten 7 von 30 Patientinnen (23%) einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund.

21 Patientinnen der Patientengruppe B, die nach einer präoperativen Chemotherapie im Bereich der *spina iliaca posterior superior* punktiert wurden, hatten bei einem medianen Alter von 63 Jahren (49 – 79 Jahre) und einer

medianen Nachbeobachtungszeit von 21 Monaten (6 – 39 Monate) in 6 von 21 Fällen (28%) einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund.

Bei keiner der Patientinnen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit einer Knochenmarkaspiration unterzogen wurde, trat weder akut noch im weiteren Verlauf Komplikationen auf.

Patientengruppe A (n = 7)	Zytokeratinpositive Knochenmarkzellen	Zytokeratinnegative Knochenmarkzellen
vor und (n = 7)	3	4
nach primärer Chemotherapie (n = 7)	2	5

Patientengruppe B (n = 51)	Zytokeratinpositiv (n = 13)	Zytokeratinnegativ (n = 38)
vor Therapiebeginn (n = 30)	7	23
nach primärer Chemotherapie (n = 21)	6	15

Patientengruppe C (n = 2)	Zytokeratinpositive Knochenmarkzellen	Zytokeratinnegative Knochenmarkzellen
bei Rezidivdiagnose (n = 2)	1	1

Tabelle 5: Ergebnis der Knochenmarksuntersuchung in Bezug auf den Therapie- oder Punktionszeitpunkt. Patientengruppe A (n = 7) wurde vor und nach primärer Chemotherapie Knochenmark punktiert. In der Patientengruppe B (n = 51) wurden 30 Patientinnen vor Operations-/Therapiebeginn, 21 nach primärer Chemotherapie untersucht. Zwei Patientinnen wurden bei Stellung der Rezidivdiagnose untersucht und bilden die Patientengruppe C.

4.2.2 Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark bei Patientinnen vor Therapiebeginn

Vor Therapiebeginn, d.h. vor der Debulkingoperation, also auch vor der postoperativen chemotherapeutischen Behandlung, wurde bei 30 Patientinnen der Patientengruppe B Knochenmark aspiriert. Dabei hatten 7 von 30 (23%)

Patientinnen mit der Diagnose eines Ovarialkarzinom einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund. 25 der 30 Patientinnen wurden unmittelbar vor der Längsschnittlaparotomie punktiert. Hier wurde intraoperativ die Diagnose durch eine histopathologische Schnellschnittuntersuchung gestellt. Fünf der 30 Patientinnen wurden zum Zeitpunkt der laparoskopischen Histologiesicherung untersucht, wobei vier von fünf Patientinnen darauf eine präoperative Chemotherapie vor Laparotomie erhielten. Eine der fünf Patientinnen hatte, aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustands, nach der laparoskopischen Histologiesicherung als einzige Therapie eine Chemotherapie, ohne nachfolgende Laparotomie.

Nach der Operation erfolgte bei 20 von 25 primär laparotomierten Patientinnen eine postoperative, adjuvante Chemotherapie. Bei 5 Patientinnen wurde aufgrund von Komplikationen postoperativ (tiefe Beinvenenthrombose, Verschlechterung des Allgemeinzustandes) oder wegen des histologischen Befundes eines LMP-Ovarialkarzinoms keine Chemotherapie durchgeführt. Eine Patientin verstarb bereits einen Monat postoperativ.

Variable	zytokeratinpositiv (n = 7)	zytokeratinnegativ (n = 23)
Medianes Alter in Jahren (Spannweite)	51 (36 – 81)	57 (28 – 79)
Mediane Nachbeobachtungszeit in Monaten (Spannweite)	16 (5 – 28)	16 (1 – 35)
FIGO-Stadien		
I	5	1
II	-	2
III	1	13
IV	1	4
LMP	-	3

Tabelle 6: Medianes Alter und mediane Nachbeobachtungszeit der Patientengruppe B ohne präoperative Chemotherapie (n = 30). Darstellung der zytokeratinpositiven und zytokeratinnegativen Gruppe in bezug auf das FIGO-Stadium. Das FIGO-Stadium wurde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ermittelt.

Prognosefaktoren, wie das histopathologische Tumorstadium FIGO (Fédération International de Gynécologie et d'Obstétrique), das etwa der UICC (International Union against Cancer) entspricht, und das Operationsergebnis wurden untersucht (siehe Tabelle 6 und 7). Diese und ähnliche „etablierte“ Prognosefaktoren sollen nun in diesem Kapitel dargestellt werden:

Sechs Patientinnen im Tumorstadium FIGO I, wobei der Tumor noch auf die Ovarien begrenzt ist, wurden untersucht. Fünf von sechs (83%) Patientinnen im FIGO-Stadium I fielen durch einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund auf. Nur zwei Patientinnen waren im FIGO-Stadium II, mit einer Ausbreitung des Tumors im Bereich des Beckens. Beide Patientinnen waren zytokeratinnegativ. 14 Patientinnen befanden sich im FIGO-Stadium III (d.h.: Befall des Tumors einer oder beider Ovarien mit histologisch nachgewiesenen

Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder Lymphknotenmetastasen). Hier zeigte sich im Knochenmarkbefund nur eine von 14 (7%) Patientinnen zytokeratinpositiv. Im FIGO-Stadium IV – im Stadium der Fernmetastasierung – war im Knochenmarkbefund eine von 5 (20%) Patientinnen zytokeratinpositiv. Alle untersuchten Fälle (n = 3) von Tumoren mit niedrig-malignem Potential (LMP-Tumore) waren zytokeratinnegativ. Die histopathologische Tumorausbreitung hatte hierbei einmal eine Tumordinvasionstiefe pT3a und zweimal das Tumorstadium pT1a.

Es zeigte sich eine statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark und dem FIGO-Stadium ($p = 0,004$). Dies liegt vorwiegend an der unerwartet hohen Anzahl zytokeratinpositiver Patientinnen (n = 5) im Stadium FIGO I, sowie an der nicht zu erwartend niedrigen Anzahl an zytokeratinpositiven Patientinnen (n = 1) im FIGO-Stadium III. Zu beachten ist jedoch die niedrige Patientenzahl und damit die nur geringe Aussagekraft dieser Ergebnisse.

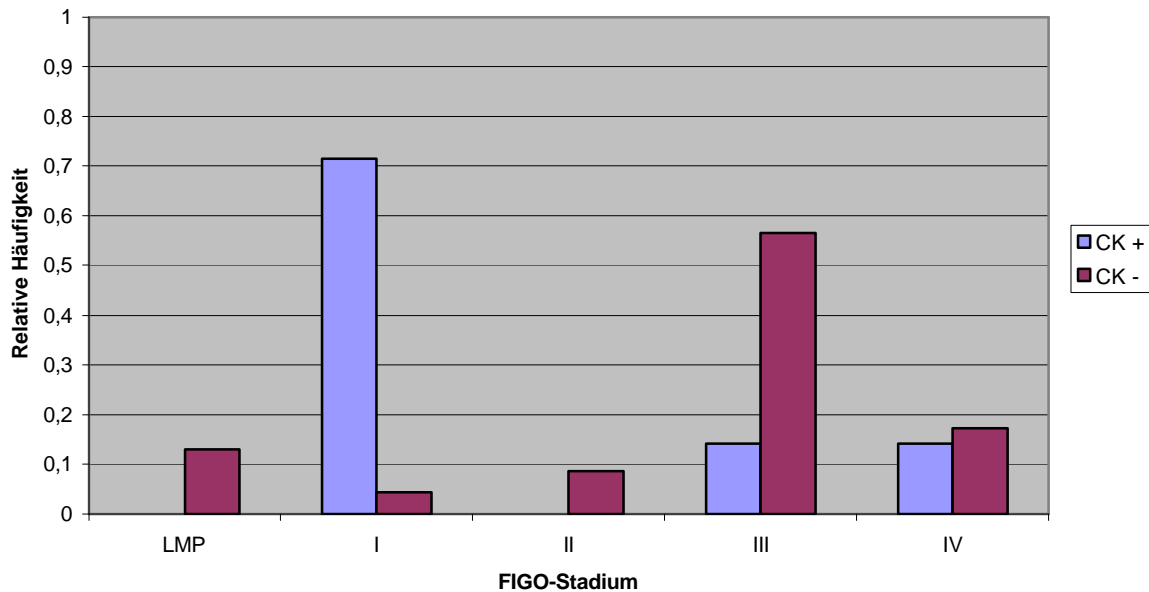


Abbildung 12: Relative Verteilung zytokeratinpositiver (CK+) und zytokeratinnegativer (CK-) Knochenmarkbefunde in Bezug auf das FIGO-Stadium bei Patientinnen, untersucht vor Therapiebeginn (n = 30).

Bei Untersuchung des Residualtumors nach erfolgter Laparotomie zeigten sich bei sechs von 19 (31%) Patientinnen, ohne Residualtumor nach Operation, zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark. Bei 10 Patientinnen war der Resttumor nach der erfolgten Operation kleiner als 2 cm. Eine von 10 (10%) Patientinnen hatte einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund. Nur eine Patientin hatte einen Residualtumor größer als 2 cm. Sie hatte ein zytokeratinnegatives Knochenmarkaspirat. Bei keiner Patientin war der Tumor inoperabel.

Statistisch stellte sich zwischen Residualtumor nach erfolgter Operation und Knochenmarkbefund kein signifikanter Unterschied dar ($p = 0,515$).

	Tumorzellpositiv (7 Patientinnen)	Tumorzellnegativ (23 Patientinnen)
Operationsergebnis		
tumorfrei	6	13
Resttumor ≤ 2cm	1	9
Resttumor > 2cm	-	1
inoperabel	-	-
pT-Stadium		
pT1	6	3
pT2	-	2
pT3	1	18
pT4	-	-
pN-Stadium		
pN0	6	8
pN1	-	2
pNx	1	13
Grading		
G1	2	2
G2	4	7
G3	1	10
G4	-	1
LMP	-	3
Metastasierung		
M0	6	19
M1	1	4

Tabelle 7: Verteilung zytokeratinpositiver und zytokeratinnegativer Knochenmarkbefunde von Patientinnen (n = 30) mit Ovarialkarzinom in Bezug auf den Residualtumor (Operationsergebnis), histopathologische Tumordinvasionstiefe (pT), Nodalstatus (pN), Grading (G) und Status der Metastasierung (M) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Die lokale Tumorausbreitung wird nach der UICC-Klassifikation im pathologischen pT-Tumorstadium ausgedrückt. Man kam zu folgendem

Ergebnis: 9 Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Operation im lokalen Tumorstadium pT1. Dabei waren 6 von 9 (66%) Patientinnen zytokeratinpositiv. Zwei der zytokeratinnegativen Patientinnen mit lokaler Tumorausbreitung pT1 hatten jedoch einen Tumor mit niedrig malignem Potential (LMP-Tumor). Eine Patientin im Tumorstadium pT1 und mit einem zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund wurde in der histopathologischen Tumorklassifikation wegen einer Fernmetastase im Leberparenchym in das Stadium FIGO IV eingestuft. Das heißt, wenn man die Patientinnen mit Borderline-Tumor und mit Fernmetastasierung nicht berücksichtigen würde, besteht bei den pT1-Tumoren ein Verhältnis zytokeratinpositiver zu zytokeratinnegativer Knochenmarkbefunde von 5 zu 1. In diesen Fall wären 83% (5 von 6 Patientinnen) im pT1-Stadium zytokeratinpositiv. Im UICC-Stadium pT2 befanden sich zum Operationszeitpunkt 2 Patientinnen. Beide hatten einen zytokeratinnegativen Knochenmarkbefund. Eine von 19 Patientinnen (5%) hatte im pT3-Stadium ein zytokeratinpositives Knochenmarkaspirat. Hierbei hatte eine Patientin mit zytokeratinnegativen Knochenmarkaspirat im Stadium pT3a einen Ovarialtumor mit niedrig-malignem Potential. Ohne Berücksichtigung des LMP-Tumors war einer von 18 (5%) Knochenmarkbefunden zytokeratinpositiv. Bei statistischer Analyse der Ergebnisse zeigte sich, vor allem wegen 66% positiver Befunde im Knochenmark im Stadium pT1, eine signifikante Abweichung der Detektion zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark vom pT-Stadium ($p = 0,001$).

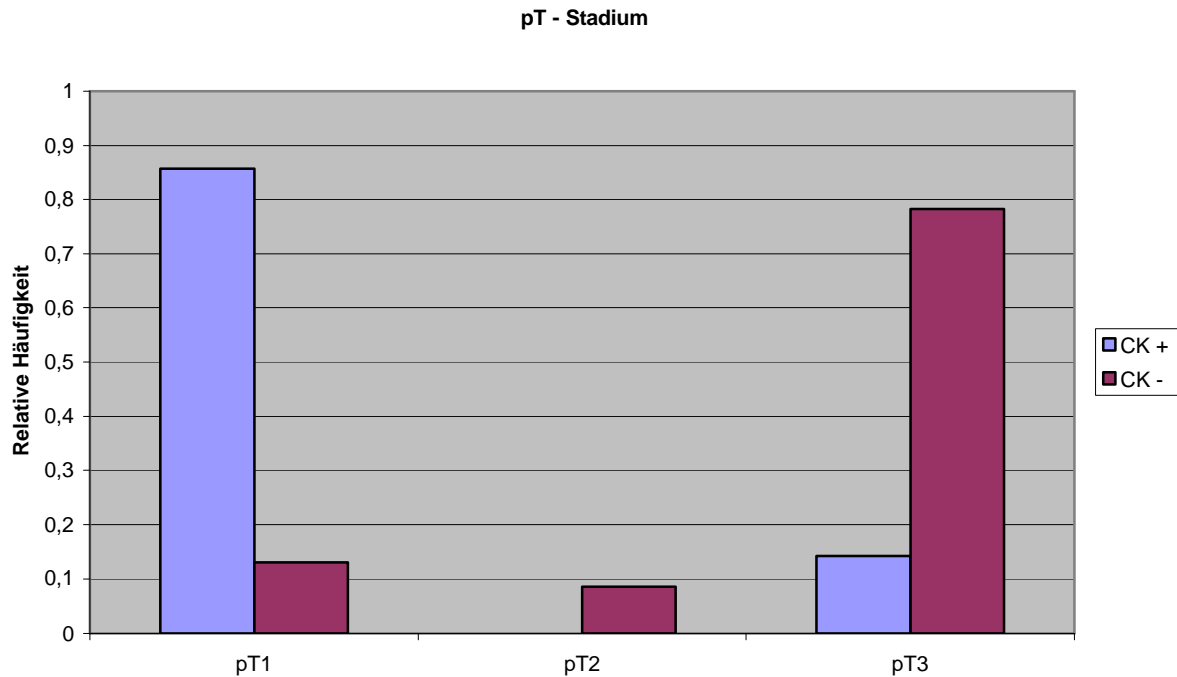


Abbildung 13: Relative Verteilung zytokeratinpositiver (CK+) und zytokeratinnegativer (CK-) Knochenmarkbefunde in Bezug auf das pT-Stadium bei Patientinnen, untersucht vor Therapiebeginn (n = 30).

Der pathologische Nodalstatus, der beim Ovarialkarzinom – wie auch bei anderen Karzinomen – von entscheidender prognostischer Bedeutung ist, ist auch in Tabelle 7 dargestellt. Nur bei 16 der 30 Patientinnen, untersucht vor einer systemischen Therapie, wurde im Rahmen der Laparotomie ein histopathologischer Nodalstatus erhoben. 14 Patientinnen befanden sich im Stadium pN0, 2 Patientinnen im Stadium pN1. Sechs von 14 Patientinnen (43%) ohne Nachweis einer Lymphknotenmetastasierung hatten einen zytokeratinpositiven Befund im Knochenmark. Beide Patientinnen im Stadium pN1 hatten keinen Nachweis von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark. Die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,099$).

Das Grading, das Maß für die Entartung maligner Zellen im Karzinomgewebe, stellt sich bezüglich des Knochenmarkbefundes wie folgt dar: Patientinnen mit Grading G1 hatten in 50% der Fälle (2 von 4 Patientinnen) einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund. Von 11 Patientinnen mit Grading G2 zeigten 4 (36%) einen positiven Befund im Knochenmark. Von 11 Patientinnen mit Grading G3 hatte eine (9%) Patientin ein zytokeratinpositives Aspirat. Die Patientin mit Grading G4 wies ein zytokeratinnegativen Knochenmarkbefund auf. Wie bereits oben beschrieben, zeigten alle drei Fälle eines LMP-Ovarialtumors einen zytokeratinnegativen Knochenmarkbefund. Statistische Tests zeigten keine Divergenz von Ergebnissen zwischen Grading und Knochenmarkuntersuchung ($p = 0,303$).

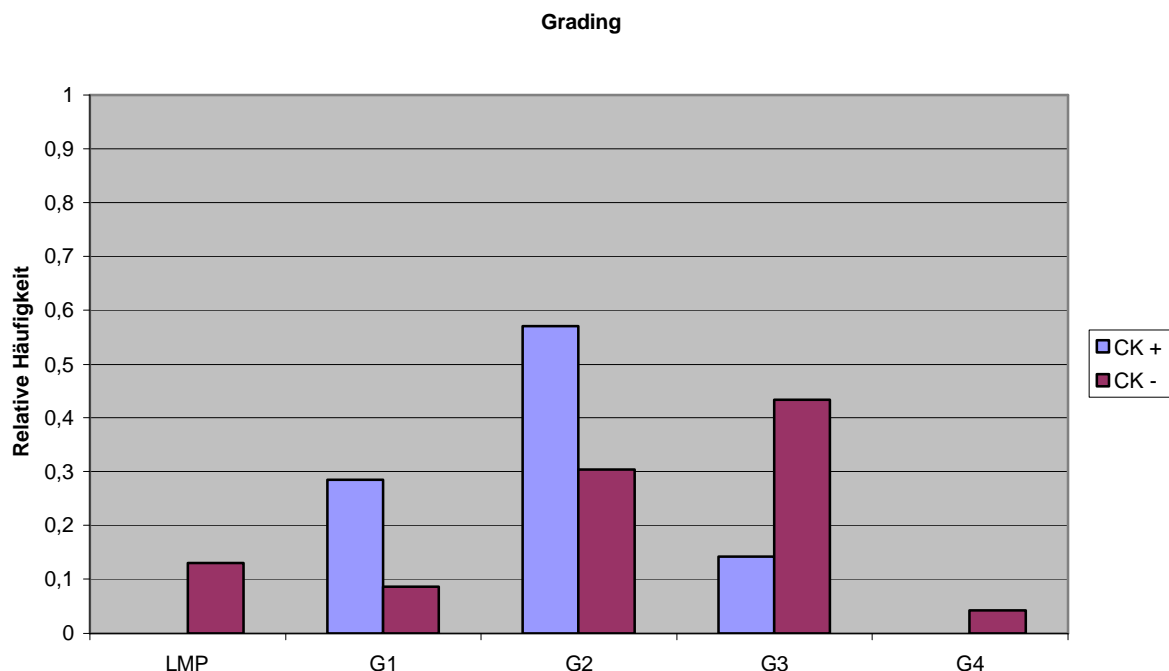


Abbildung 14: Relative Verteilung zytokeratinpositiver (CK+) und zytokeratinnegativer (CK-) Knochenmarkbefunde in bezug auf das Grading bei Patientinnen, untersucht vor Therapiebeginn (n = 30).

Bei 5 Patientinnen zeigte sich zum Zeitpunkt der Operation bereits eine Fernmetastasierung (M1), wobei nur eine von 5 (20%) Patientinnen einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund hatte. Im Stadium M0, ohne Fernmetastasierung, waren 25 Patientinnen. Sechs der 25 (24%) Patientinnen hatten einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund.

Auch hier war ebenfalls in der statistischen Untersuchung der Ergebnisse keine Divergenz zwischen der minimal residualen Erkrankung und dem makroskopischen Nachweis einer Fernmetastasierung nachzuweisen ($p = 0,671$).

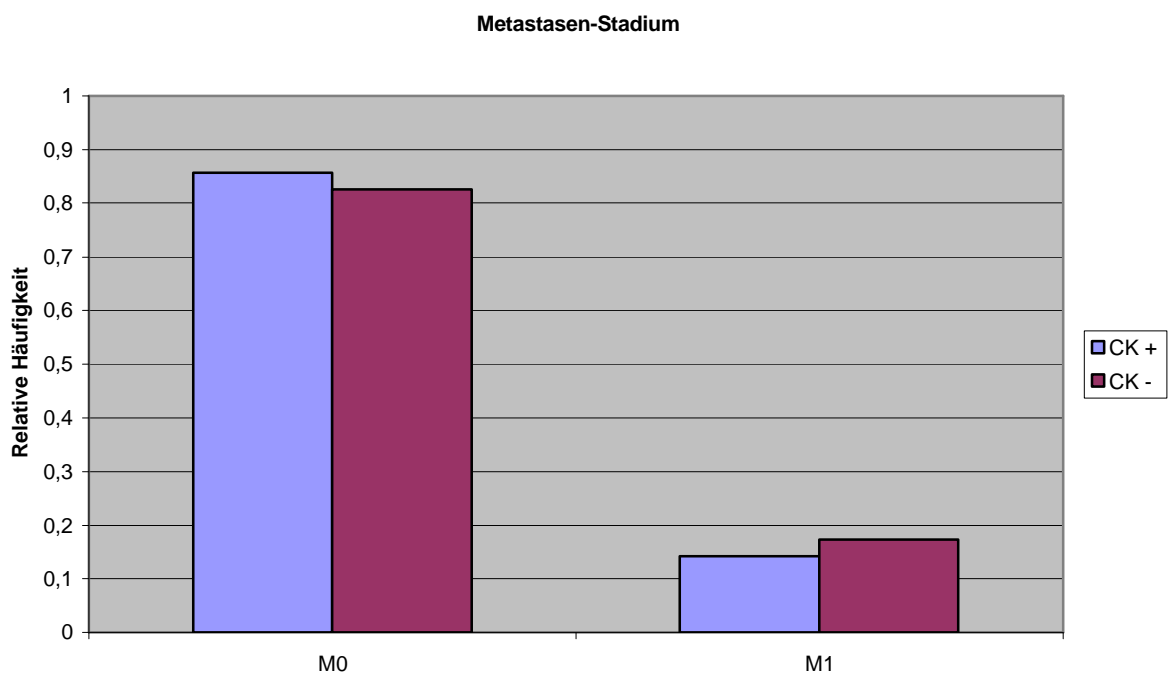


Abbildung 15: Relative Verteilung zytokeratinpositiver (CK+) und zytokeratinnegativer (CK-) Knochenmarkbefunde in bezug auf den Metastasenstatus bei Patientinnen, untersucht vor Therapiebeginn (n = 30).

	Tumorzellpositiv (7 Patientinnen)	Tumorzellnegativ (23 Patientinnen)
Histologie		
Serös	4	20
Muzinös	-	1
Endometroid	1	1
Klarzellig	1	-
Karzin Sarkom	-	1
niedrig differenziert	1	-
CA 12-5		
≤ 35 U/ml	2	0
35 – 500 U/ml	4	15
500 – 1000 U/ml	1	2
≥ 1000 U/ml	-	6
Aszites		
Kein	5	9
≤ 500 ml	1	4
> 500 ml	1	10

Tabelle 8: Darstellung des Knochenmarkbefundes zytokeratinpositiver (n = 7) und zytokeratinnegativer (n = 23) Patientinnen, untersucht vor Therapiebeginn in bezug auf Histologie, Tumormarkerwerte CA 12-5, und Aszitesmenge. Alle Befunde wurden erhoben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Der häufigste histologische Typ in den postoperativ histopathologisch erstellten Befunden war der seröse Subtyp des Ovarialkarzinoms (n = 24). 4 von 24 (16%) Patientinnen mit einem serösen Karzinom hatten zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark. Eine Patientin hatte ein muzinöses Karzinom. Sie hatte ebenso wie die Patientin mit einem Karzin Sarkom kein Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark. Zwei Patientinnen hatten histologisch ein endometroides Ovarialkarzinom, wobei eine von 2 Patientinnen zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark zeigte. Zudem wies eine Patientin

ein klarzelliges und eine Patientin ein niedrigdifferenziertes Ovarialkarzinom auf. Bei beiden Patientinnen wurden in der Knochenmarkuntersuchung zytokeratinpositive Zellen detektiert.

Bei statistischer Analyse der Ergebnisse ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Nachweis von zytokeratinhaltigen Zellen und dem histologischen Typ des Ovarialkarzinoms ($p = 0,120$).

Der zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhobene Tumormarker CA 12-5 wurde in vier Stufen eingeteilt (siehe Tabelle 8). Noch im Normbereich ($< 35\text{U/l}$) waren 2 Patientinnen. Beide Patientinnen hatten zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark. Einen leicht erhöhten Tumormarkerwert ($35 - 500\text{ U/l}$) hatten 19 Patientinnen. Vier von 19 (21%) Patientinnen hatten hierbei zytokeratinpositive Zellen bei der Knochenmarkpunktion. Eine von 3 (33%) Patientinnen mit stark erhöhten CA 12-5-Werten ($500 - 1000\text{ U/l}$) war ebenfalls zytokeratinpositiv. Alle 6 Patientinnen mit Tumormarkerwerten über 1000 U/l hatten keinen Nachweis von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark.

Bei statistischer Analyse konnte man eine signifikante Abweichung zwischen dem Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark und einem erhöhten CA 12-5-Tumormarkerwert feststellen ($p = 0,044$).

Die Aszitesmenge (ml) wurde im Rahmen der Operation gemessen. Keinen Nachweis von Aszites hatten 14 Patientinnen. Fünf von 14 (35%) Patientinnen hatten bei negativem Aszitesnachweis zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark. Ebenfalls zytokeratinpositive Zellen zeigte eine von 5 (20%)

Patientinnen mit einer Aszitesmenge kleiner als 500 ml. Von 11 Patientinnen mit einer Aszitesmenge mehr als 500 ml hatte eine Patientin (9%) einen Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark.

Es besteht keine Signifikanz bei statistischer Analyse der Ergebnisse ($p = 0,120$).

Die Untersuchung der rezidivfreien Überlebenszeit zeigte für die Patientengruppe mit Ovarialkarzinom, punktiert vor Therapiebeginn mit zytokeratinnegativem Knochenmarkbefund ($n = 23$) keine längeren Überlebenszeiten ohne Rezidiv. Die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit von Patientinnen mit zytokeratinnegativem Knochenmarkbefund ($n = 23$) war 24 Monate bei einem Median von 21 Monaten. Nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 16 (5 – 28) Monaten hatten 20% der Patientinnen mit zytokeratinpositivem Zellenachweis ($n = 7$) im Knochenmark ein Rezidiv (Abbildung 16). In der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier sieht man bei zytokeratinpositiven Zellenachweisen im Knochenmark eine verlängerte rezidivfreie Überlebenszeit. Dies ist jedoch statistisch nicht von Relevanz ($p = 0,3346$). Hier ist das günstigere FIGO-Stadium der zytokeratinpositiven Patientengruppe, die insgesamt nur kurze mediane Nachbeobachtungszeit von 16 (1 – 35) Monaten sowie die niedrige Fallzahl zu beachten.

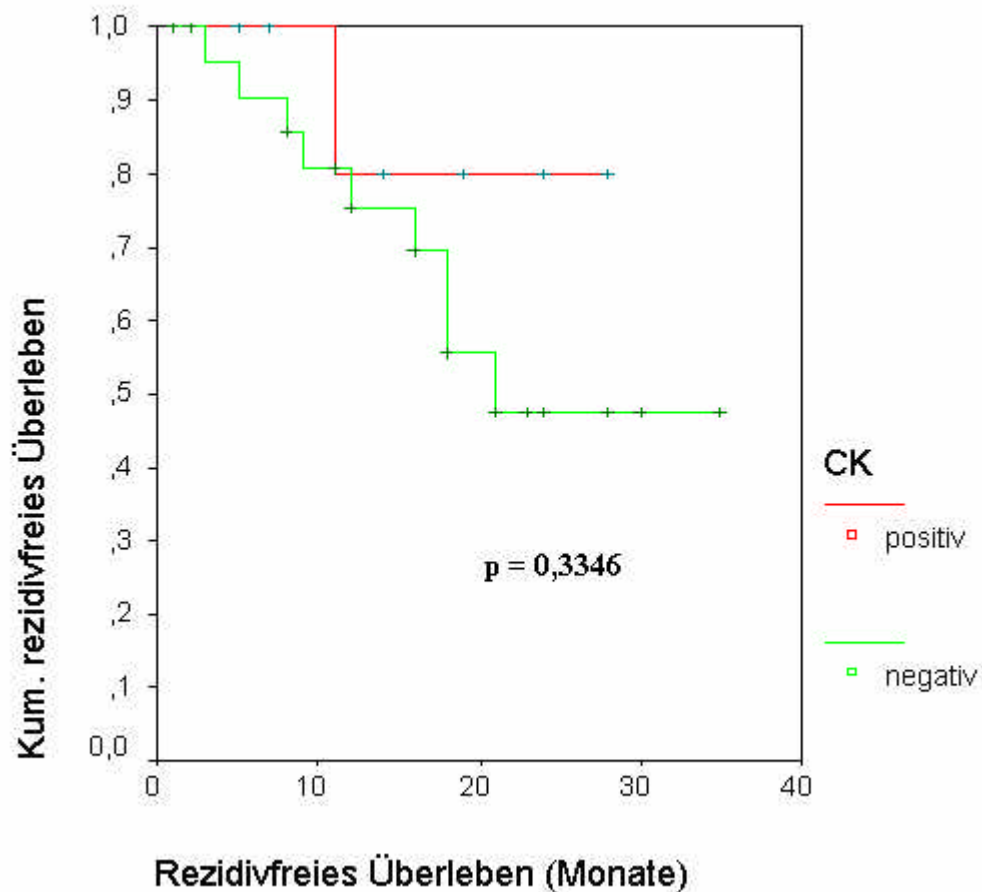


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Analyse der rezidivfreien Überlebenszeit für 30 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, untersucht vor Therapiebeginn. Patientinnen mit zytokeratin-(CK)-positiven Zellen (rot) im Knochenmark (n = 7) zeigen bei einer mittleren rezidivfreien Überlebenszeit von 25 Monaten ein ähnliches Ergebnis wie die zytokeratinnegative (grün) Patientengruppe (n = 23) bei einer mittleren rezidivfreien Überlebenszeit von 24 Monaten (p = 0,3346). Mit (+) markierte Beobachtungsbeendigung ohne Ereignis.

Betrachtet man die Analyse des Gesamtüberlebens der Patientinnen mit Ovarialkarzinom, untersucht vor Therapiebeginn (n = 30), zeigen die Patientinnen mit Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark ein längeres Gesamtüberleben als zytokeratinnegative. Hier konnte aufgrund der Patientenzahl noch nicht bewiesen werden, dass ein signifikanter Unterschied vorlag (p = 0,2258). Bei dieser Überlebensanalyse muss man die nur kurze mediane Nachbeobachtungszeit von 16 (5 – 28) Monaten beachten. In dieser Zeit zeigt sich in der Überlebenskurve für die zytokeratinpositive

Patientengruppe (n = 7) kein Ereignis, folglich überlebten bis zu diesen Zeitpunkt alle untersuchten, zytokeratinpositiv befundeten Patientinnen. Die zytokeratinnegative Patientengruppe (n = 23) hatte bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 16 (1 – 35) Monaten eine mittlere Gesamtüberlebenszeit von 29 Monaten. Nach 35 Monaten überlebten noch mehr als 75% der Patientinnen (Abbildung 17).

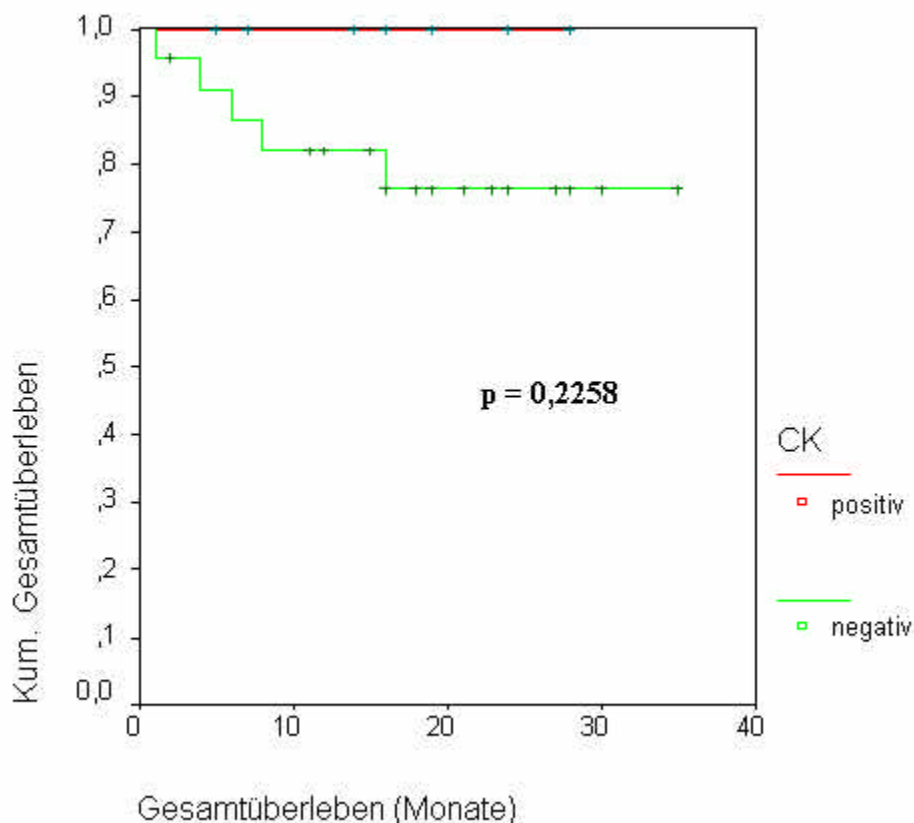


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit für 30 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, untersucht vor Therapiebeginn. Patientinnen mit zytokeratin-(CK)-positiven Zellen (rot) im Knochenmark (n = 7) überleben alle in einer medianen Nachbeobachtungszeit von 16 (5 – 28) Monaten (kein Ereignis). Patientinnen mit zytokeratinnegativen (grün) Knochenmarkbefund (n = 23) zeigen ein mittleres Gesamtüberleben von 29 Monaten (p = 0,2258). Mit (+) markierte Beobachtungsbeendigung ohne Ereignis.

Im weiteren Verlauf des Kapitels soll nun die Korrelation disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark mit dem Krankheitsverlauf der Patientinnen mit Ovarialkarzinom untersucht werden. Um den Krankheitsverlauf

von Patientengruppen vergleichen zu können, ist es nötig, homogene Gruppen zu bilden, die ein gleiches oder zumindest ähnliches Therapieschema erhielten. Da die Patientinnen der Patientengruppe B, die vor einer Therapiemaßnahme untersucht wurden (n = 30), nicht alle nach ihrer Operation eine adjuvante Chemotherapie erhielten, war es nötig, eine neue Patientengruppe zu bilden.

Bei 5 Patientinnen war postoperativ eine chemotherapeutische Therapie geplant, jedoch wurde auf diese aus verschiedenen Gründen (Komplikationen postoperativ, perioperative Mortalität, postoperative Histologie: LMP-Ovarialkarzinom) verzichtet. Diese Patientinnen (n = 5) wurden in diese Patientengruppe nicht aufgenommen. Weitere 5 Patientinnen wurden zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn, unmittelbar vor der laparoskopischen Histologiegewinnung mit einer Probeexzision des Tumors untersucht. Vier der 5 Patientinnen erhielten nach Laparoskopie eine präoperative Chemotherapie vor einer Laparotomie und sind somit nicht dieser Patientengruppe (Patientinnen mit ausschließlich postoperativer Chemotherapie) zuzuordnen. Eine der 5 Patientinnen wurde nach Histologiesicherung durch eine Laparoskopie, als einzige Therapiemaßnahme, einer Chemotherapie zugeführt, ohne operiert zu werden und ist somit ebenfalls nicht dieser Patientengruppe zuzuordnen.

	Chemotherapeutika	CK-positiv (n = 7)	CK-negativ (n = 13)
Adjuvante Chemotherapie		7	13
	Carboplatin/Cyclophosphamid	3	1
	Carboplatin	1	3
	Taxol/Carboplatin	3	7
	Taxol/Carboplatin/Epirubicin	-	2

Tabelle 9: Darstellung der postoperativen chemotherapeutischen Behandlung der zytokeratinpositiven (CK-positiv) (n = 7) und zytokeratinnegativen (CK-negativ) (n = 13) Patientengruppe. Hierbei erhielten die Patientinnen dieser Gruppe präoperativ keine systemische chemotherapeutische Behandlung.

In diesem Kapitel soll jetzt auf die Patientengruppe (n = 20), behandelt mit adjuvanter Chemotherapie, postoperativ nach medianer Laparotomie und nach Resektion des Ovarialtumors, eingegangen werden. Keine der Patientinnen dieser Patientengruppe (n = 20) erhielt eine präoperative Chemotherapie.

In Tabelle 9 sind die verschiedenen Chemotherapien der Patientengruppe, der zytokeratinpositiven (n = 7) und der zytokeratinnegativen (n = 13) Gruppe, dargestellt. 20 Patientinnen wurden vor einer Chemotherapie, d.h. zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, kurz vor einer durchgeführten Laparotomie in Vollnarkose, einer Knochenmarkaspiration unterzogen und auf zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark untersucht.

Von 7 Patientinnen in der Patientengruppe mit positivem Zytokeratinbefund, bei Knochenmarkaspiration vor der Chemotherapie, befanden sich 5 Patientinnen im FIGO-Stadium I, eine im FIGO-Stadium III und eine Patientin im Stadium der Fernmetastasierung, FIGO IV. Bei einem mittleren Alter von 55 (36 – 81)

Jahren waren sechs Patientinnen postoperativ tumorfrei und eine Patientin hatte einen Resttumor von kleiner als 2cm.

Nur eine Patientin entwickelte 10 Monate nach Operation ein Rezidiv (postoperative histopathologische Klassifikation pT1a, G2, pN0, M0, R0). Nach Operation und tumorfreiem Operationsergebnis wurde bei ihr nach 10-monatiger Rezidivfreiheit eine Second-Line-Therapie mittels einer weiteren Operation durchgeführt. Seither ist die Patientin subjektiv beschwerdefrei und hat keinen Hinweis auf ein Rezidiv. Das statistisch ermittelte mittlere progressionsfreie Intervall lag bei 25 (5 – 28) Monaten. Die mittlere Nachbeobachtungszeit der Patientengruppe mit zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund (n = 7) war 16 (7 – 28) Monate. Keine der sieben Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Primärdiagnostik untersucht wurden, verstarb im Verlauf der Nachbeobachtungszeit.

Die Patientengruppe mit zytokeratinnegativem Knochenmarkbefund (n = 13) hatte ein mittleres Alter von 53 (28 – 79) Jahren, bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 19 (4 – 35) Monaten. Eine von 13 Patientinnen war zum Zeitpunkt der Operation im FIGO-Stadium I, eine Patientin im FIGO-Stadium II, 8 Patientinnen im FIGO-Stadium III und drei Patientinnen FIGO IV, im Stadium der Fernmetastasierung. Sechs von 13 Patientinnen waren postoperativ tumorfrei, weitere 6 Patientinnen hatten nach Operation einen Resttumor von kleiner als 2 cm. Eine von 13 Patientinnen hatte einen 2,5 cm großen Residualtumor nach Operation. Das mittlere progressionsfreie Intervall

betrug bei dieser Patientengruppe (n = 13) 25 (3 – 35) Monate. Insgesamt entwickelten 6 von 13 Patientinnen dieser Gruppe ein Ovarialkarzinomrezidiv.

Bei der rezidivfreien Überlebenszeit bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der zytokeratinpositiven (n = 7) und der zytokeratinnegativen (n = 13) Patientengruppe (p = 0,4718).

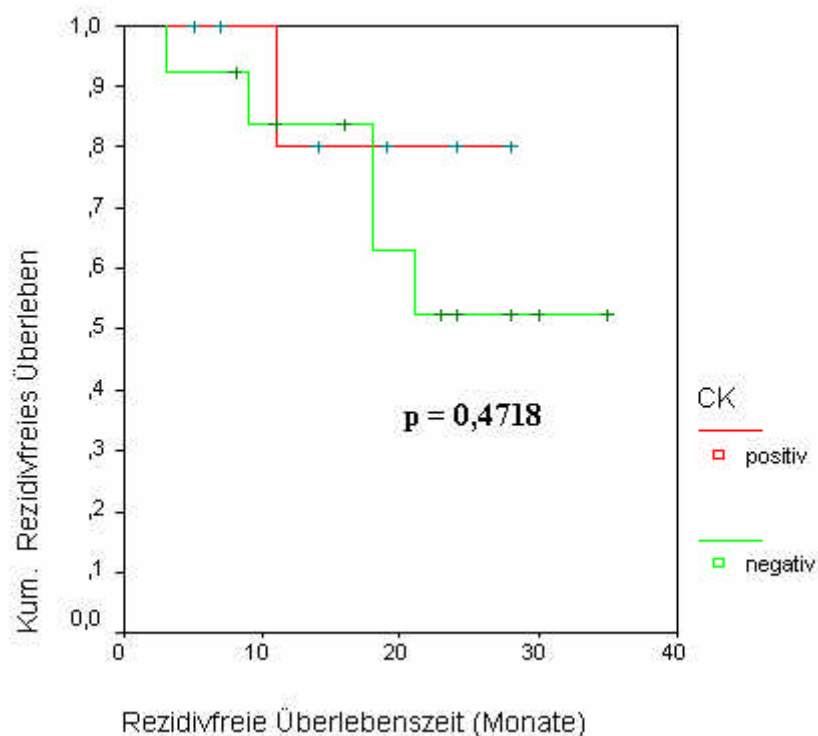


Abbildung18: Kaplan-Meier-Analyse der rezidivfreien Überlebenszeit für 20 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, behandelt mit einer adjuvanten Chemotherapie nach Operation, untersucht vor Therapiebeginn. Patientinnen mit zytokeratin-(CK)-positiven Zellen (rot) im Knochenmark (n = 7) zeigen bei einer mittleren rezidivfreien Überlebenszeit von 25 Monaten ein ähnliches Ergebnis wie die zytokeratinnegative (grün) Patientengruppe (n = 13) bei einer mittleren rezidivfreien Überlebenszeit von 25 Monaten (p = 0,4718). Mit (+) markierte Beobachtungsbeendigung ohne Ereignis.

Vier von 13 Patientinnen verstarben an den Folgen der Tumorerkrankung. Die mittlere Überlebenszeit der zytokeratinnegativen Patientengruppe (n = 13) war 29 (4 – 35) Monate. Hierunter befindet sich auch eine Patientin mit FIGO-

Stadium I mit der postoperativen histopathologische Klassifikation pT1c, pN0, M0, R0, die nach einer Nachbeobachtungszeit von acht Monaten ihrer Erkrankung erlag. Es konnte aufgrund der Patientenzahl noch nicht bewiesen werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der zytokeratinpositiven (n = 7) und der zytokeratinnegativen (n = 13) Patientengruppe vorlag (p = 0,2371).

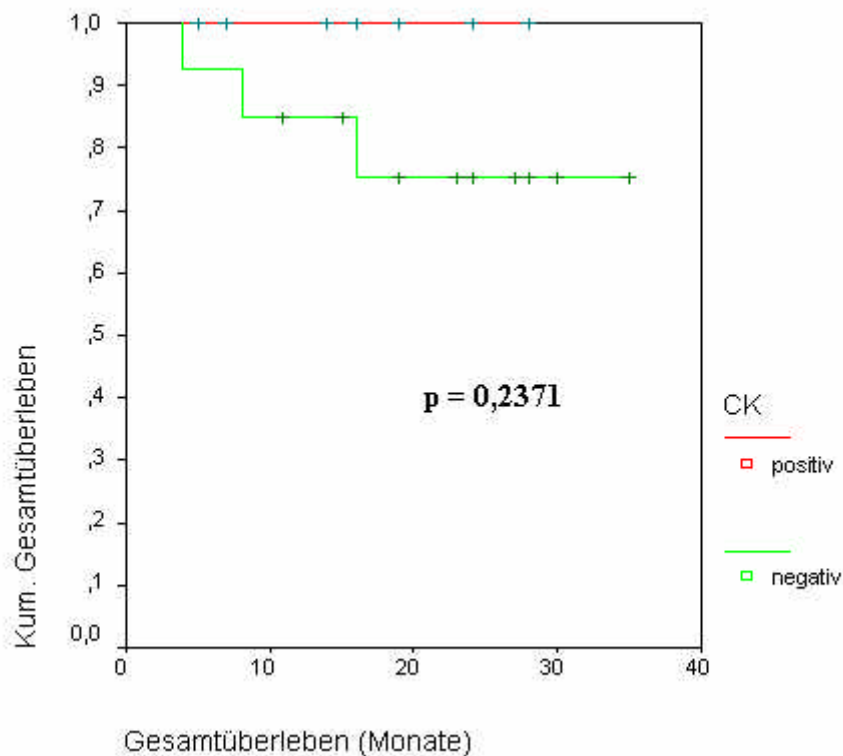


Abbildung 19: Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit für 20 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, behandelt mit einer adjuvanten Chemotherapie nach Operation, untersucht vor Therapiebeginn. Patientinnen mit zytokeratin-(CK)-positiven Zellen (rot) im Knochenmark (n = 7) überleben alle in einer medianen Nachbeobachtungszeit von 16 (5 – 28) Monaten (kein Ereignis). Patientinnen mit zytokeratinnegativem (grün) Knochenmarkbefund (n = 13) zeigen ein mittleres Gesamtüberleben von 29 Monaten (p = 0,2371). Mit (+) markierte Beobachtungsbeendigung ohne Ereignis.

4.2.3 Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark bei Patientinnen nach präoperativer Chemotherapie

	Chemotherapeutika	CK-positiv (n = 6)	CK-negativ (n = 15)
Präoperative Chemotherapie		6	15
	Taxol/Carboplatin	1	5
	Carboplatin	4	10
	ETC	1	-
Adjuvante Chemotherapie		6	15
	Carboplatin/Cyclophosphamid	-	-
	Carboplatin	1	1
	Taxol/Carboplatin	3	13
	Taxol/Carboplatin/Epirubicin	-	-
	Taxol mono	-	1
	Topotecan	1	-
	Andere	1	-

Tabelle 10: Darstellung der prä- und postoperativen chemotherapeutischen Behandlung der Patientinnen, die eine primäre Chemotherapie erhielten. Einteilung in zytokeratinpositive (CK-positiv) (n = 6) und zytokeratinnegative (CK-negativ) (n = 15) Patientengruppe.

Bei 21 der 51 Patientinnen mit Ovarialkarzinom der Patientengruppe B wurde nach einer präoperativen Chemotherapie und unmittelbar vor einer Laparotomie in Vollnarkose eine Knochenmarkaspiration durchgeführt. Eine Knochenmarkpunktion konnte hier vor einer primärer Chemotherapie nicht vorgenommen werden, da sich die Sicherung der Diagnosestellung durch Histologiegewinnung mit anderen Techniken, wie z.B. der computertomographisch gesteuerten Feinnadelpunktion, oder durch Voroperationen außerhalb der Abteilung ereignete. Nach der histologischen

Sicherung der Diagnose erhielten alle Patientinnen nach dem klinikinternen Studienschema "Primäre Chemotherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom" unter Kuhn et al. jeweils drei präoperative Zyklen Chemotherapie (siehe Tabelle 10) (51). Von diesen 21 Patientinnen erhielten 6 Patientinnen präoperativ drei Zyklen Taxol/Carboplatin, 14 Patientinnen erhielten dreimal Carboplatin Monotherapie und eine Patientin erhielt sechs Zyklen Epirubicin/Taxol/Carboplatin.

Nach der präoperativ durchgeführten Chemotherapie wurden anschließend alle 21 Patientinnen operiert und zu diesem Zeitpunkt auf zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark untersucht. Sechs der 21 (28%) Patientinnen hatten einen zytokeratinpositiven Zellenachweis im Knochenmark. Nach Operation wurden bei allen Patientinnen weitere drei Zyklen postoperative Chemotherapie durchgeführt (siehe Tabelle 10). Von den 21 Patientinnen erhielten 16 Patientinnen in drei Zyklen Carboplatin/Taxol, zwei erhielten in drei Zyklen Carboplatin mono, eine Patientin erhielt drei Zyklen Topotecan, eine Patientin erhielt Taxol mono und eine Patientin wurde unter "andere" Chemotherapie deklariert.

Variable	zytokeratinpositiv (n = 6)	zytokeratinnegativ (n = 15)
Medianes Alter in Jahren (Spannweite)	64 (51 – 79)	63 (49 – 76)
Mediane Nachbeobachtungszeit in Monaten (Spannweite)	18 (6 – 33)	21 (13 – 39)
FIGO-Stadien		
I	-	-
II	-	-
III	6	12
IV	0	3

Tabelle 11: Medianes Alter und mediane Nachbeobachtungszeit der Patientengruppe B, behandelt mit präoperativer Chemotherapie (n = 21). Darstellung der zytokeratinpositiven (n = 6) und zytokeratinnegativen (n = 15) Gruppe in Bezug auf das FIGO-Stadium. Das FIGO-Stadium wurde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ermittelt.

Die 21 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, die eine präoperative Chemotherapie erhielten, waren alle in einem fortgeschrittenen Stadium ihrer Tumorerkrankung (siehe Tabelle 11). Betrachtet man das klinische FIGO-Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, befanden sich 18 von 21 Patientinnen im Stadium FIGO III und 3 von 21 Patientinnen im Stadium FIGO IV. Sechs von 18 (33%) Patientinnen im FIGO-Stadium III hatten zum Zeitpunkt der Laparotomie nach der präoperativen Chemotherapie zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark. Alle Patientinnen (n = 3) im Stadium FIGO IV waren im Knochenmark, trotz Fernmetastasierung und lokalem Tumorstadium pT3, zytokeratinnegativ. Hierbei zeigte sich statistisch keine Signifikanz (p = 0,342).

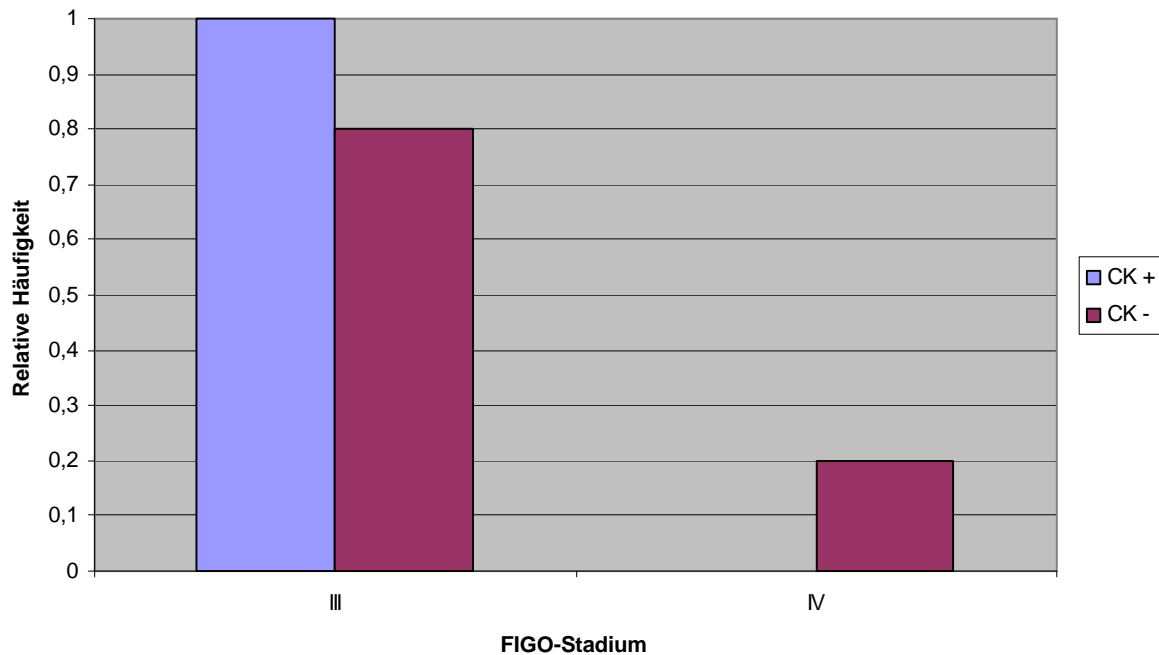


Abbildung 20: Relative Verteilung zytokeratinpositiver (CK+) und zytokeratinnegativer (CK-)Knochenmarkbefunde, untersucht bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom nach durchgeführter präoperativer Chemotherapie in Bezug auf das FIGO-Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Die Größe des Residualtumors nach erfolgter primärer Chemotherapie und nach Debulkingoperation ist von entscheidender prognostischer Bedeutung für die Patientinnen mit Ovarialkarzinom (50, 51, 100). Vier Patientinnen waren nach primärer Chemotherapie und nach Operation tumorfrei. Hierbei wurde bei einer von 4 (25%) Patientinnen zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark detektiert. Vier von 13 (30%) Patientinnen, mit einem Resttumor, kleiner als 2 cm, hatten einen positiven Knochenmarkbefund nach erfolgter Chemotherapie. Nur 4 Patientinnen hatten einen Resttumor größer als 2 cm, wobei eine von 4 (25%) Patientinnen zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark hatte.

	Tumorzellpositiv (6 Patientinnen)	Tumorzellnegativ (15 Patientinnen)
Operationsergebnis		
tumorfrei	1	3
Resttumor ≤ 2cm	4	9
Resttumor > 2cm	1	3
inoperabel	-	-
ypT-Stadium		
ypT1	-	-
ypT2	-	-
ypT3	6	15
ypT4	-	-
ypN-Stadium		
ypN0	1	3
ypN1	1	6
ypNx	4	6
Grading		
G1	-	-
G2	3	1
G3	2	14
G4	1	-
Metastasierung		
M0	6	12
M1	0	3

Tabelle 12: Verteilung zytokeratinpositiver und zytokeratinnegativer Knochenmarkbefunde von Patientinnen (n = 21) mit Ovarialkarzinom in Bezug auf den Residualtumor (Operationsergebnis), histopathologische Tumortiefeninvasion (ypT), Nodalstatus (ypN), Grading (G) und Status der Metastasierung (M) zum Zeitpunkt der Operation nach erfolgter präoperativer Chemotherapie.

In dem histopathologischen Stadium der lokalen Tumorausdehnung nach primärer Chemotherapie ypT wiesen alle Patientinnen (n = 21) ein ypT3-Stadium auf. Sechs (28%) von diesen 21 Patientinnen waren zytokeratinpositiv.

Der pathologische Nodalstatus ypN nach erfolgter präoperativer Chemotherapie wurde bei 11 von 21 Patientinnen erhoben. Hierbei hatte eine von 4 (25%) Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen, im Stadium ypN0, zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark. Bei Nachweis von Lymphknotenfilialisierung (ypN1) hatte eine von 7 (14%) Patientinnen zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark.

Es zeigte sich keine statistische Signifikanz bei Analyse dieser Ergebnisse ($p = 0,698$).

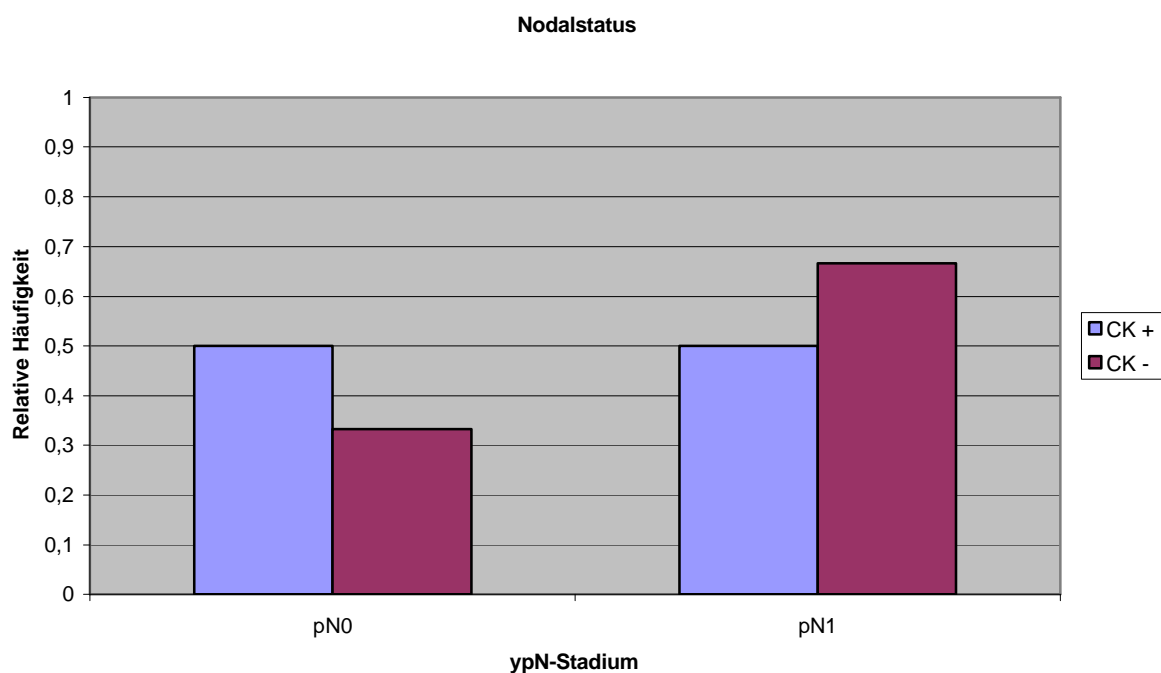


Abbildung 21: Relative Verteilung zytokeratinpositiver (CK+) und zytokeratinnegativer (CK-) Knochenmarkbefunde in Bezug auf das UICC-Stadium ypN. Die Erhebung des Nodalstatus erfolgte bei insgesamt 11 Patientinnen nach einer präoperativen Chemotherapie zum Zeitpunkt der Laparotomie.

Nach erfolgter präoperativer Chemotherapie hatten in der histopathologischen Untersuchung des Operationspräparates nach Laparotomie 4 Patientinnen einen G2-Tumor, 16 Patientinnen einen G3- und eine Patientin ein G4-

Ovarialkarzinom. Drei der 4 (75%) Patientinnen mit einem G2-Karzinom nach Chemotherapie wiesen zytokeratinpositive Zellen auf. Bei 2 von 16 (12%) Patientinnen mit Grading G3 waren zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark nachweisbar. Die Patientin mit Grading G4 hatte ebenfalls zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark.

Es resultierte bei statistischer Analyse der Ergebnisse eine signifikante Abweichung des Nachweises zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark mit dem Grading des Ovarialkarzinoms nach erfolgter Chemotherapie ($p = 0,011$).

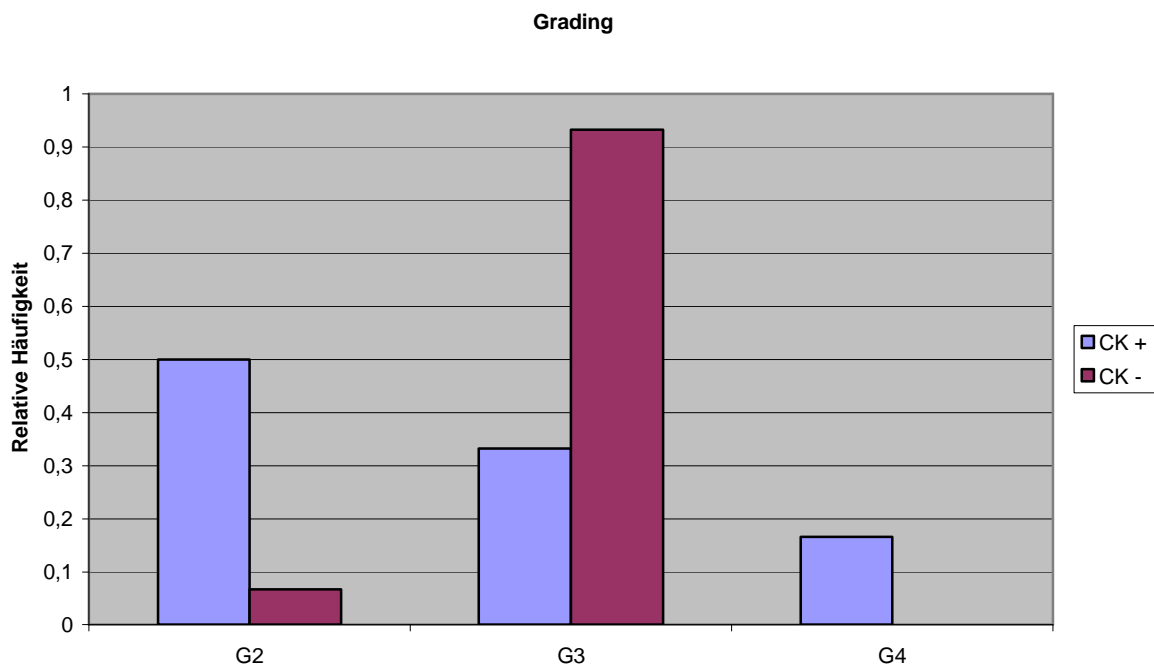


Abbildung 21: Relative Verteilung zytokeratinpositiver (CK+) und zytokeratinnegativer (CK-) Knochenmarkbefunde bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ($n = 21$) mit Bezug auf das Grading des Primärtumors nach erfolgter präoperativer Chemotherapie zum Zeitpunkt der Operation.

Eine Fernmetastasierung (M1) bestand bei 3 der 21 untersuchten Patientinnen.

Alle 3 Patientinnen hatten ein zytokeratinnegatives Knochenmark. Sechs der 18

(33%) Patientinnen ohne Fernmetastasierung (M0) hatten einen zytokeratinpositiven Zellaachweis.

Eine signifikanter Unterschied zwischen Fernmetastasierung und dem Knochenmarkbefund bestand nicht ($p = 0,342$).

	Tumorzellpositiv (6 Patientinnen)	Tumorzellnegativ (15 Patientinnen)
Histologie		
Serös	4	13
Muzinös	-	-
Endometroid	-	-
Klarzellig	-	-
Karzinom	1	1
undifferenziert	1	1
CA 12-5		
≤ 35 U/ml	-	-
35 – 500 U/ml	4	4
500 – 1000 U/ml	-	3
≥ 1000 U/ml	2	8
Aszites		
Kein	-	-
≤ 500 ml	-	-
≥ 500 ml	6	15

Tabelle 13: Darstellung der Knochenmarkbefunde zytokeratinpositiver ($n = 6$) und zytokeratinnegativer ($n = 15$) Patientinnen untersucht nach erfolgter Chemotherapie bei Operation in Bezug auf Histologie, Tumormarkerwerte CA 12-5, und Aszitesmenge. Alle Befunde wurden erhoben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Der histologische Typ des Ovarialkarzinoms wurde bei Diagnosestellung, bzw. Histologiesicherung ermittelt. Der Hauptteil der Patientinnen (17 von 21) hatte ein seröses Adenokarzinom. Vier der 17 (23%) Patientinnen mit serösem

Ovarialtumor hatten zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark. Undifferenzierte Karzinome und Karzinosarkome konnten jeweils 2 festgestellt werden. Je eine von 2 Patientinnen hatte den Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark.

Hier konnten keine statistisch signifikanten Ergebnisse registriert werden ($p = 0,316$).

Der Tumormarker CA 12-5 (U/l) wurde zum Diagnosezeitpunkt bestimmt und hier ebenfalls in vier Stufen eingeteilt (siehe auch Kapitel 4.2.2). Im Normbereich (<35 U/l) befand sich keine Patientin. Bei 8 Patientinnen war ein leicht erhöhter Tumormarker ($35 - 500$ U/l) zu verzeichnen, wobei 4 von 8 (50%) Patientinnen zytokeratinpositiven Zellenachweis im Knochenmark hatten. Drei Patientinnen hatten einen stark erhöhten CA 12-5-Wert ($500 - 1000$ U/l) und dabei keinen Nachweis von zytokeratinpositiven Zellen. Dies zeigten jedoch 2 von 10 (20%) Patientinnen mit einem Tumormarkerwert größer als 1000 U/l.

Die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,280$).

Die Aszitesmenge von mehr als 500ml – eines der Einschlusskriterien des klinikinternen Studienschemas "Primäre Chemotherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom" unter Kuhn et al. (51) – wurde von allen 21 Patientinnen erfüllt. Wie o.g. wurden bei 6 von 21 Patientinnen zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark detektiert.

Das rezidivfreie Überleben der Patientinnen, untersucht nach einer präoperativen Chemotherapie, scheint ein kürzeres progressionsfreies Intervall

für Patientinnen mit zytokeratinpositivem Zellenachweis im Knochenmark zu ergeben (siehe Abbildung 22). Dies ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,310$). Bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 18 (6 – 33) Monaten ist die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit 13 Monate. Die mediane Überlebenszeit beträgt 10 Monate. Nach 19 Monaten hatten alle zytokeratinpositiv befundenen Patientinnen ($n = 6$) ein Rezidiv. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befanden sich alle sechs Patientinnen im FIGO-Stadium III, wobei eine Patientin postoperativ tumorfrei war, vier Patientinnen einen Residualtumor von kleiner als 2 cm hatten und eine Patientin einen Resttumor größer als 2 cm. Das erste Karzinomrezidiv wurde nach 7 Monaten diagnostiziert. Die Patientinnen ($n = 15$) mit zytokeratinnegativem Knochenmarkbefund hatten bei einer Nachbeobachtungszeit von 21 (13 – 39) Monaten eine mittlere rezidivfreie Überlebenszeit von 17 Monaten, bei einer medianen progressionsfreien Intervall von 14 Monaten. 80 % der Patientinnen mit negativem Knochenmarkbefund ($n = 15$) hatten nach 20 Monaten ein Rezidiv. Das erste Ovarialkarzinomrezidiv dieser Patientengruppe ($n = 15$) wurde bereits nach 4 Monaten diagnostiziert.

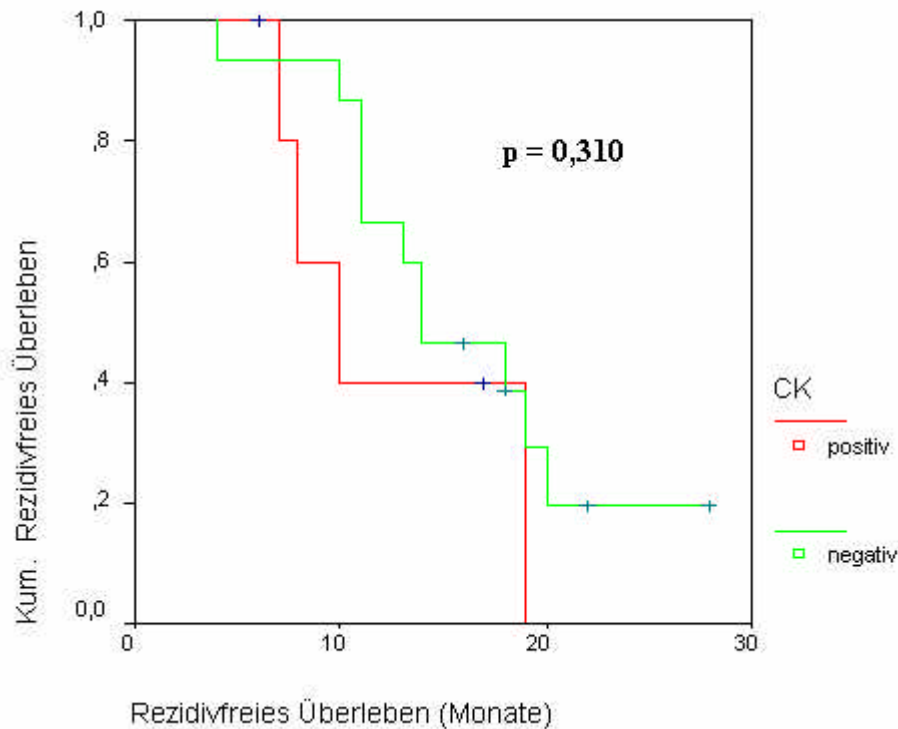


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Analyse der rezidivfreien Überlebenszeit von 21 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, untersucht nach präoperativer Chemotherapie. Patientinnen mit zytokeratin-(CK)-positiven Zellen (rot) im Knochenmark (n = 6) hatten nach einer medianen rezidivfreien Überlebenszeit von 10 Monaten ein Rezidiv. Die zytokeratinnegative (grün) Patientengruppe (n = 15) wies nach einer medianen progressionsfreien Intervall von 14 Monaten ein Ovarialkarzinomrezidiv auf ($p = 0,310$). Mit (+) markierte Beobachtungsbeendigung ohne Ereignis.

Die Analyse des Gesamtüberlebens nach Kaplan-Meier der 21 Patientinnen, untersucht zum Zeitpunkt der Operation nach präoperativer Chemotherapie, zeigt insgesamt ein erkennbar kürzeres Gesamtüberleben für Patientinnen (n = 6) mit zytokeratinpositivem Zellenachweis im Knochenmark als bei Patientinnen (n = 15) ohne positivem Nachweis (Abbildung 23). Diese Aussage ist jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,2237$). Bei einer mittleren Überlebenszeit von 22 Monaten und nach einem Median von 23 Monaten verstarben 3 der 6 zytokeratinpositiv befundenen Patientinnen. Eine Patientin verstarb bereits nach 6 Monaten. In der zytokeratinnegativen Patientengruppe

(n = 15) erlagen insgesamt 4 Patientinnen ihrem Tumorleiden. Nach 14 Monaten verschied bereits die erste Patientin. Das mittlere Gesamtüberleben für die zytokeratinnegative Patientengruppe (n = 15) war 32 Monate.

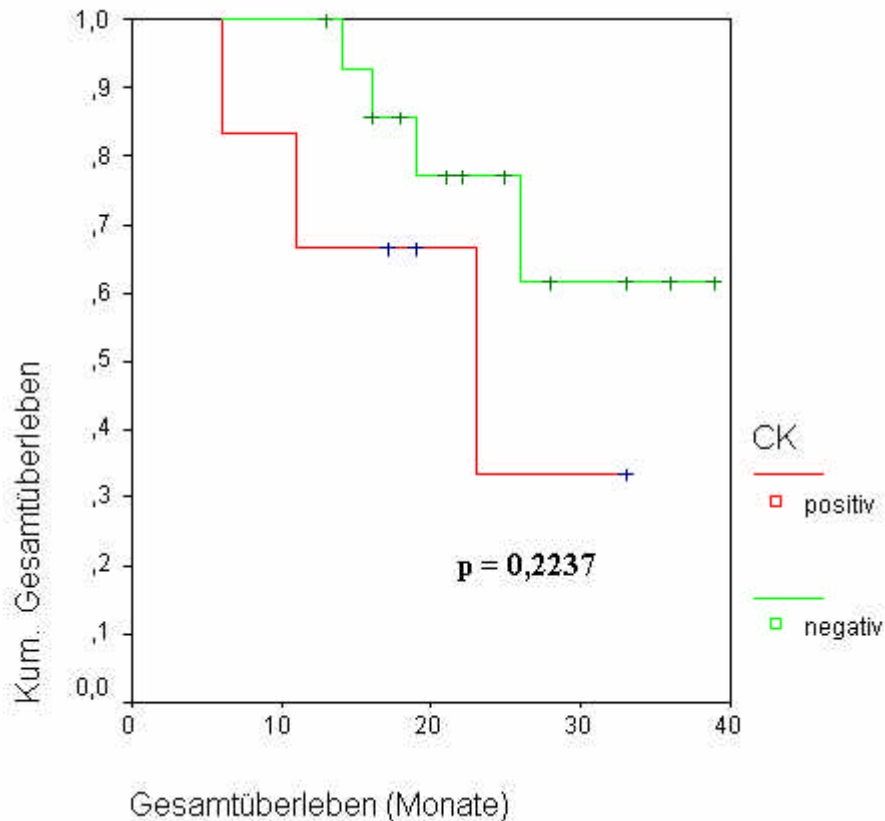


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenszeit von 21 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, untersucht nach präoperativer Chemotherapie. Patientinnen mit zytokeratin-(CK)-positiven Zellen (rot) im Knochenmark (n = 6) zeigten nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 18 (6 – 33) Monaten ein medianes Gesamtüberleben von 23 Monaten. Patientinnen mit zytokeratinnegativem (grün) Knochenmarkbefund (n = 15) hatten ein mittleres Gesamtüberleben von 32 Monaten (p = 0,2237). Mit (+) markierte Beobachtungsbeendigung ohne Ereignis.

4.2.4 Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark vor und nach präoperativer Chemotherapie

In der Patientengruppe A hatten 7 Patientinnen eine Knochenmarkaspiration vor und nach einer präoperativen Chemotherapie. So konnte man den Verlauf und den Einfluss einer Chemotherapie auf den Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark analysieren. Wegen der vielfältigen Ergebnisse ist die Diagnose –zytokeratinpositiver oder zytokeratinnegativer Knochenmarkbefund – der Patientinnen ausführlich in Tabelle 6 dargestellt.

Name	FIGO-Stadium	Tumorstadium	präoperative Chemotherapie	CK vor CTx	CK nach CTx
Z. C.	FIGO IV	ypT3c, ypN1, M1, G3	3 x Carboplatin	-	-
P. A.-E.	FIGO III	ypT3b, ypN0, M0, G3	3 x Carboplatin	+	+
K. G.	FIGO III	ypT3c, ypN0, M0, G3	3x Carboplatin/ Taxol	-	-
B. I.	FIGO III	ypT3c, ypNx, M0, G3	3x Carboplatin/ Taxol	+	-
B. E.	FIGO III	ypT3c, ypN1, M0, G3	3 x Carboplatin	-	+
W. C.	FIGO III	ypT3a, ypN1, M0, G3	3 x Carboplatin	-	-
K. T.	FIGO III	ypT3c, ypN1, M0, G3	3 x Carboplatin	+	-

Tabelle 14: Knochenmarkbefunde der Patientengruppe A (n = 7) zum Zeitpunkt vor und nach präoperativer Chemotherapie (CTx). (“CK + / -“ = zytokeratinpositiv / zytokeratinnegativ). Das FIGO-Stadium wurde erhoben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Unter „Tumorstadium“ ist das postoperativ histopathologische Tumorstadium nach erfolgter präoperativer Chemotherapie aufgeführt.

Bei einer Patientin wurde vor und nach Chemotherapie ein positiver Befund erhoben. Drei Patientinnen hatten vor und nach einer präoperativen Chemotherapie einen negativen Knochenmarkbefund. Vorher positiv und nach präoperativer Chemotherapie negativ war der Befund bei zwei Patientinnen. Eine Patientin war vor systemischer Therapie zytokeratinnegativ und zytokeratinpositiv nach präoperativer Chemotherapie.

Das Studienprotokoll "Primäre Chemotherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom" (51) hatte als ein Einschlusskriterium eine Aszitesmenge von mehr als 500 ml. Fünf Patientinnen erhielten vor der Operation drei präoperative Zyklen Carboplatin mono und zwei Patientinnen eine Kombination von drei Zyklen Carboplatin/Taxol (Tabelle 14). Postoperativ wurde nochmals eine Chemotherapie mit jeweils drei Zyklen durchgeführt. Fünf Patientinnen erhielten Carboplatin/Taxol und zwei Patientinnen Carboplatin mono.

Es wurden die Patientinnen, die vor und nach der präoperativen Chemotherapie untersucht wurden, in vier Gruppen aufgeteilt: Zytokeratinpositiv vor und nach primärer Chemotherapie (G +/+), zytokeratinpositiv vor und zytokeratinnegativ nach primärer Chemotherapie (G +/-), zytokeratinnegativ vor und zytokeratinpositiv nach präoperativer systemischer Therapie (G -/+) und zytokeratinnegativ vor und nach primärer systemischer Behandlung (G -/-). Das im Text und in Tabelle 14 angegebene FIGO-Stadium entspricht dem Stadium der Erkrankung bei Diagnosestellung.

In der Patientengruppe – zytokeratinnegativ vor und nach präoperativer Chemotherapie (G -/-) – waren drei Patientinnen mit einem mittleren Alter von 60,6 Jahren bei einem medianen Alter von 62 (57 – 63) Jahren. Zwei Patientinnen dieser Gruppe (G -/-) entwickelten nach einem mittleren progressionsfreien Intervall von 8 (7, 9) Monaten ein Rezidiv. Hierbei hatte eine Patientin die Primärdiagnose FIGO IV – also bereits Fernmetastasen – und eine Patientin FIGO III. Beide Patientinnen verstarben nach einer mittleren Überlebenszeit von 13 (9, 17) Monaten. Das progressionsfreie Intervall der gesamten Gruppe beträgt im Mittel 12,6 (7 – 22) Monate. Dabei beträgt die mittlere Überlebenszeit 16 (7 – 22) Monate.

Einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund vor und nach primärer Chemotherapie (G +/+) hatte eine Patientin. Mit einem Alter von 63 Jahren hatte auch sie ein fortgeschrittenes Ovarialkarzinom FIGO III, ohne Fernmetastasierung, bei Primärdiagnosestellung. Die Patientin entwickelte nach einem progressionsfreien Intervall von 14 Monaten ein Rezidiv und hatte zum Zeitpunkt des Abschlusses der Nachbeobachtung eine Überlebenszeit von 23 Monaten.

Eine Gruppe (G +/-) bildeten zwei Patientinnen, die zytokeratinpositiv vor und -negativ nach der präoperativen Chemotherapie waren. Diese Patientinnen hatten ein mittleres Alter von 67,5 (62, 73) Jahren bei einem Median von 68 Jahren. Beide Patientinnen hatten die Primärdiagnose FIGO III, wobei eine Patientin nach einem progressionsfreien Intervall von 11 Monaten ein Rezidiv

entwickelte. Keine der beiden Patientinnen verstarb bei einer Nachbeobachtungszeit von 12,5 (4, 21) Monaten.

Zytokeratinnegativ vor und -positiv nach einer primären Chemotherapie G (-/+)
war eine Patientin mit einem Alter von 61 Jahren. Bei der Primärdiagnose wurde bei der Patientin das Stadium FIGO III diagnostiziert. Die Patientin überlebte bis Abschluss des Follow-up ohne Rezidiv, bei einer Nachbeobachtungszeit von 21 Monaten.

4.2.5 Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomrezidiv

Zwei Patientinnen wurden zum Zeitpunkt der Stellung der Rezidivdiagnose auf zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark untersucht. Die beiden Patientinnen bilden die Patientengruppe C und werden von den anderen Patientengruppen A und B in diesem Kapitel separiert beschrieben. Das mittlere Alter der Patientinnen war zum Zeitpunkt der primären Diagnosestellung 51,5 (50, 53) Jahre. Die mittlere Nachbeobachtungszeit seit primärer Diagnosestellung war 94 (72, 116) Monate. Im Rahmen der Knochenmarkuntersuchung wurde eine Patientin als zytokeratinpositiv und eine als -negativ befundet.

Die Patientin mit zytokeratinnegativen Knochenmarkbefund hatte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Ovarialkarzinoms ein Alter von 50 Jahren. Das primäre Stadium ihrer Tumorerkrankung war nach der klinischen

Klassifikation ein FIGO III-Adenokarzinom. Nach ihrer primären Operation hatte die Patientin ohne Residualtumor bei einem histopathologischen Tumorstadium pT3, G3, pNx, M0 und nach einer postoperativen Chemotherapie (6 Zyklen Carboplatin mono) ein progressionsfreies Intervall von mehr als 8 Jahren (98 Monate). Daraufhin entwickelte die Patientin ein Rezidiv. Nach der Diagnose des Ovarialkarzinomrezidivs wurde eine präoperative Chemotherapie und anschließend eine zweite Operation als Second-Line-Therapie durchgeführt. Im Rahmen dieser Second-Line-Operation wurde die Knochenmarkaspiration unternommen, die ein zytokeratinnegatives Ergebnis brachte. Seither hat die Patientin bei einem progressionsfreien Intervall nach der zweiten Operation von 18 Monaten, insgesamt bei einer Nachbeobachtungszeit von 116 Monaten, keine Zeichen eines Rezidivs.

Die Patientin mit zytokeratinpositivem Zellenachweis im Knochenmark war zum primären Diagnosezeitpunkt ihres Ovarialkarzinoms (FIGO III) 53 Jahre alt. Nach erfolgter primärer Operation (pT3, G3, pN0, M0) wurde bei einem Residualtumor von 2 cm eine postoperative, adjuvante Chemotherapie mit sechs Zyklen Carboplatin/Cyclophosphamid durchgeführt. Die Patientin entwickelte dann nach einem progressionsfreien Intervall von 62 Monaten ein Rezidiv und wurde einer Second-Line-Therapie in Form einer zweiten Operation zugeführt. Im Rahmen dieser Operation wurde eine Knochenmarkaspiration mit o.g. zytokeratinpositiven Ergebnis vorgenommen. 10 Monate nach der Operation

verstarb die Patientin bei einer Nachbeobachtungszeit von insgesamt 72 Monaten an den Folgen ihrer Tumorerkrankung.

4.3 uPA-Rezeptor auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen (Nachweis und Quantifizierung im Vergleich mit den primären Tumorstadien)

Alle im Knochenmark detektierte zytokeratinpositiven Zellen zeigten eine uPA-R-Expression, deren Intensität jedoch variierte. Nicht alle gefundenen disseminierten Einzelzellen konnten auf Quantifizierung des uPA-Rezeptors untersucht werden, da sich das Wiederauffinden der Zellen nach dem Durchsuchen des Präparates in größerer, 63facher Vergrößerung als technisch schwierig herausstellte. Teilweise konnte die gesuchte Zelle, wegen ungenauer Markierung nicht mehr aufgefunden werden, teilweise durch Fehler der Eindeckelung oder durch falsche Handhabung des Präparats mit konsekutiver Deformierung oder Deplazierung der zu untersuchenden Zellen.

Insgesamt konnten von 31 gefundenen uPA-Rezeptor tragenden zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark nur 23 disseminierte Einzelzellen von 11 Patientinnen auf eine Quantifizierung des Plasminogenaktivator-Rezeptors untersucht werden. Hierbei konnte von einer Patientin (N°4) (siehe Tabelle 15) vor einer präoperativen Chemotherapie von zwei zytokeratinpositiven Zellen und nach der durchgeführten präoperativen

Chemotherapie von drei zytokeratinpositiven Zellen die uPA-R-Intensität ermittelt werden.

Die Quantifizierung zeigte, wie in Tabelle 10 dargestellt, sehr unterschiedliche Werte sowohl zwischen den Patienten, als auch unter den verschiedenen disseminierten Einzelzellen einer Patientin.

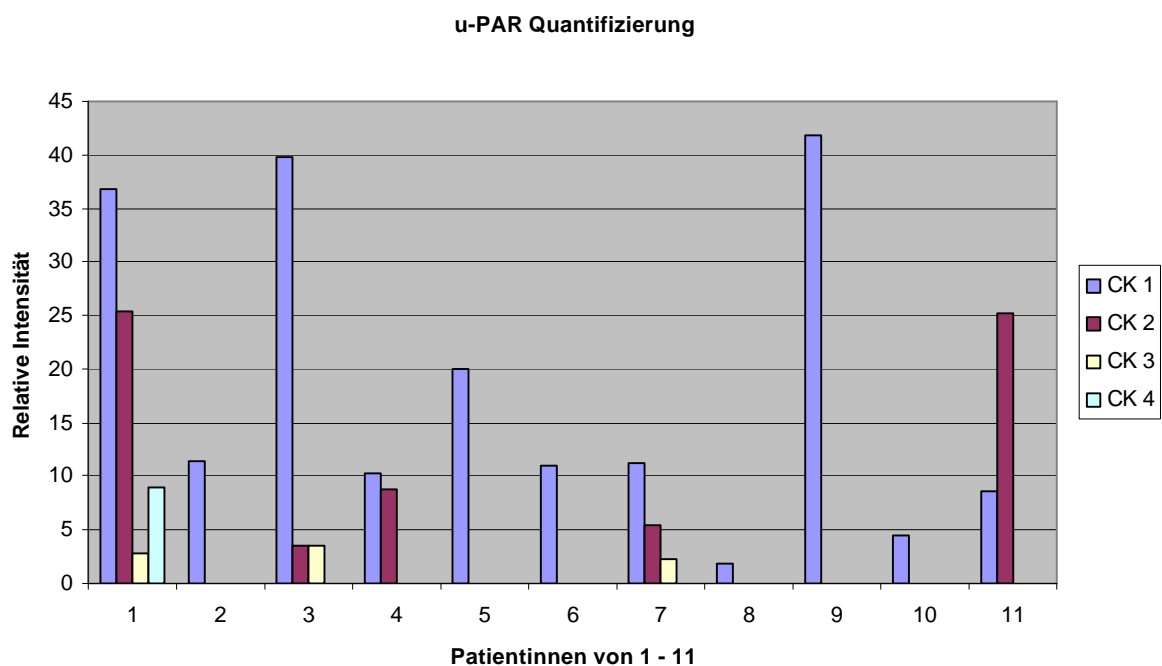


Abbildung 24: Graphische Darstellung der relativen u-PAR-Intensitätswerte der einzelnen zytokeratinpositiven Zellen (CK 1-4) von Ovarialkarzinompatientinnen (n = 11). Die Ermittlung der u-PAR-Werte nach Referenzwert (Referenzwert der Indikatorbeads = 1) wird in Kapitel 3.4.2 erläutert.

Patientin	Figo	Diagnose	u-PAR Quantifizierung (Berechnung in Kapitel 3.4.2)				Rezidiv	Progressionsfreies Intervall in Monaten	Verstorben	Überlebenszeit in Monaten
			36,7	25,3	2,7	8,9				
N° 1	Figo IIIc	pT3c, pNx, M0, G2				ja	7	ja	25	
N° 2	Figo Ia	pT1a, pN0, M0, G2	11,3			ja	10	nein	-	
N° 3	Figo IIIa	pT3c, pNx, M0, G2	39,7	3,5	3,5	ja	8	nein	-	
N° 4	Figo III	(vor CTx) cT3, cN0, M0, G3	10,2	8,7		ja	14	nein	-	
N° 5	Figo IV	pT1a, N0, M1, G3	19,9			nein	19	nein	-	
N° 6	Figo IIIc	pT3c, Nx, M0, G3	11,0			ja	11	nein	-	
N° 7	Figo IIIb	pT3b, N0, M0, G3	11,1	5,3	2,3	nein	17	nein	-	
N° 8	Figo Ic	pT1c, N0, M0, G2	1,9			nein	24	nein	-	
N° 9	Figo IIIc	ypT3c, pN1, M0, G3	41,8			nein	8	nein	-	
N° 10	Figo IIIc	ypT3c, pN1, M0, G3	4,5			nein	21	nein	-	
N° 11	Figo IIIc	pT3c, pNx, M0, G2	8,5	25,2		ja	19	nein	-	

Tabelle 15: Intensitätswerte des u-PA-Rezeptors der zytokeratinpositiven Zellen von Patientinnen (n = 11) mit Ovarialkarzinom in verschiedenen Erkrankungsstadien. Darstellung des rezidivfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens in Monaten in Abhängigkeit vom u-PAR-Intensitätswert. Berechnung des u-PAR-Intensitätswertes ist in Kapitel 3.4.2 ausführlich erläutert.

Betrachtet man die gemittelten u-PAR-Werte und das progressionsfreie Intervall der Patientinnen (siehe Tabelle 15), kann man in einzelnen Fällen eine Tendenz einer Korrelation des längeren progressionsfreien Intervalls mit niedrigen u-PAR-Intensitätswerten vermuten. Patientin N° 8 hatte bei einem u-PAR-Intensitätswert von 1,9 im FIGO-Stadium Ic ein progressionsfreies Intervall von 24 Monaten. Patientin N° 1 dagegen hatte im Stadium FIGO IIIc bei einem mittleren u-PAR-Intensitätswert von 18,4 und einer maximalen uPA-R-Intensität von 36,7 nach einem progressionsfreien Intervall von 7 Monaten ein Rezidiv und verstarb nach einem Gesamtüberleben von 25 Monaten. Die im Tumorstadium FIGO Ia klassifizierte Patientin N° 2 hatte bereits nach 10 Monaten ein Rezidiv bei einem u-PAR-Wert 11,3. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich hatte Patientin N° 3 nach 8 Monaten progressionsfreien Intervalls bereits ein Rezidiv bei einem gemittelten u-PAR-Wert von 15,6 und einem Maximalwert von 39,7. Das Ergebnis der histopathologischen Untersuchung war hierbei pT3c, G2, M0. Patientin N° 4 konnte vor und nach einer präoperativen Chemotherapie auf uPA-R-tragende zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark untersucht werden. Das klinische Stadium nach der laparoskopischen PE-Entnahme war vor Chemotherapie FIGO III, G3, M0. Vor der primären Chemotherapie zeigte sich ein mittlerer uPA-R-Intensitätswert von 9,5 bei einem Maximalwert von 10,2. Nach erfolgter präoperativer Chemotherapie konnten drei zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark auf den uPA-R-Intensitätswert (6,787; 5,009; 2,912) untersucht werden. Bei einer maximalen

uPA-R-Intensität von 6,787 nach Chemotherapie war die gemittelte uPA-R-Intensität 4,9. Dabei war das endgültige Operationsergebnis nach primärer Chemotherapie ypT3b, G3, ypN0, M0. Die Patientin entwickelte bei einem initialen FIGO III Stadium bereits 14 Monate nach Diagnosestellung ein Rezidiv. Patientin N° 6 im Stadium FIGO IIIc, G3, M0 hatte nach einem progressionsfreien Intervall von 11 Monaten bei einem u-PAR-Wert von 11,0 ein Rezidiv. Patientin N° 10 konnte ebenfalls vor und nach präoperativer Chemotherapie (3 Zyklen Carboplatin mono) untersucht werden. Vor der Chemotherapie war der Knochenmarkbefund negativ. Postoperativ zeigte sich im Stadium ypT3c, G3, ypN1, M0 dagegen bei einem geringen u-PAR-Wert von 4,5 ein progressionsfreies Intervall von 21 Monaten. Die Patientin N°11 (FIGO IIIc, G2, M0) (Tabelle 15) hatte postoperativ, vor adjuvanter Chemotherapie bei einem mittleren u-PAR-Wert von 16,8 und einer maximalen uPA-R-Intensität von 25,2 nach einem progressionsfreien Intervall von 19 Monaten ein Rezidiv. Ein längeres progressionsfreies Intervall ohne Rezidiv bei niedrigen u-PAR-Intensitäten (1,9) dagegen zeigte sich bei Patientin N° 8 im FIGO-Stadium Ic (pT1c, N0, G2, M0) bei einer Nachbeobachtungszeit von 24 Monaten.

Insgesamt ist bei dieser geringen Patientenzahl (n = 11) jedoch noch keine signifikante Korrelation der uPA-Rezeptordichte auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark mit dem früheren Eintreten eines Rezidivs oder dem Gesamtüberleben beim Ovarialkarzinom zu erkennen. Bei medianen Nachbeobachtungszeit von 17 (8 – 25) Monaten und einer nur

geringen Patientenzahl ist es schwierig, zuverlässige Aussagen über das rezidivfreie und das Gesamtüberleben zu treffen. Bei statistischer Analyse der Ergebnisse zeigt sich, wie in Abbildung 26 veranschaulicht, zumindest der Trend eines kürzeren progressionsfreien Intervalls bei hohen gemittelten uPA-R-Intensitätswerten. Die Ergebnisse für gemittelte uPA-R-Intensitäten waren jedoch nicht signifikant ($p = 0,077$; Korrelationskoeffizient $R = -0,554$). Die Ergebnisse für maximale uPA-R-Intensitätswerte (Abbildung 25) zeigten einen signifikanten Zusammenhang mit dem rezidivfreien Überleben der untersuchten Patientinnen ($p = 0,018$; Korrelationskoeffizient $R = -0,695$). Die nur geringe Patientenzahl ($n = 11$) muss jedoch beachtet werden.

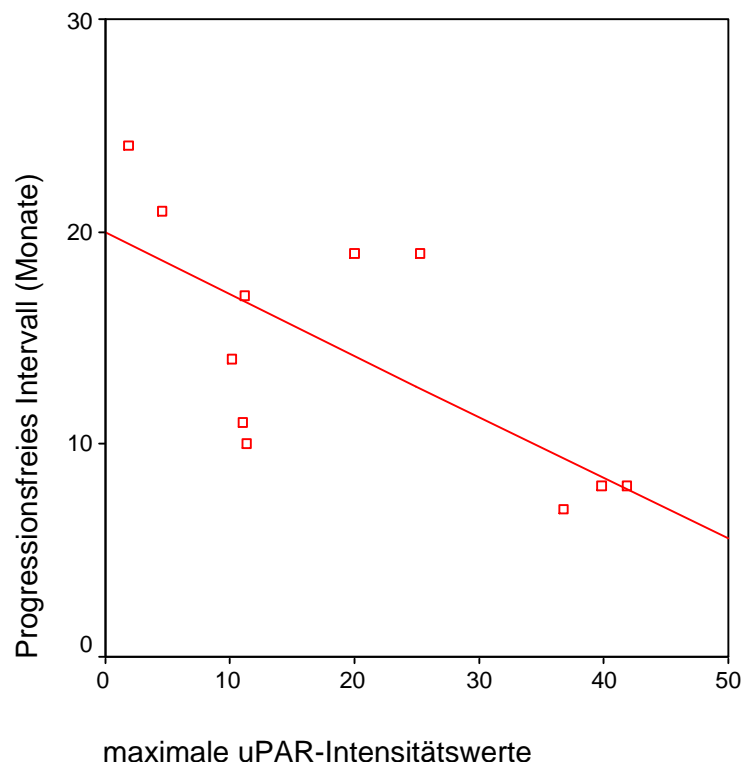


Abbildung 25: Darstellung maximaler uPA-R-Intensitätswerte zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark in Abhängigkeit zu dem progressionsfreien Intervall in Monaten. Es lässt sich ein kürzeres progressionsfreies Intervall bei hohen maximalen uPA-R-Intensitäten feststellen. Die Ergebnisse sind signifikant ($p = 0,018$; Korrelationskoeffizient $R = -0,695$).

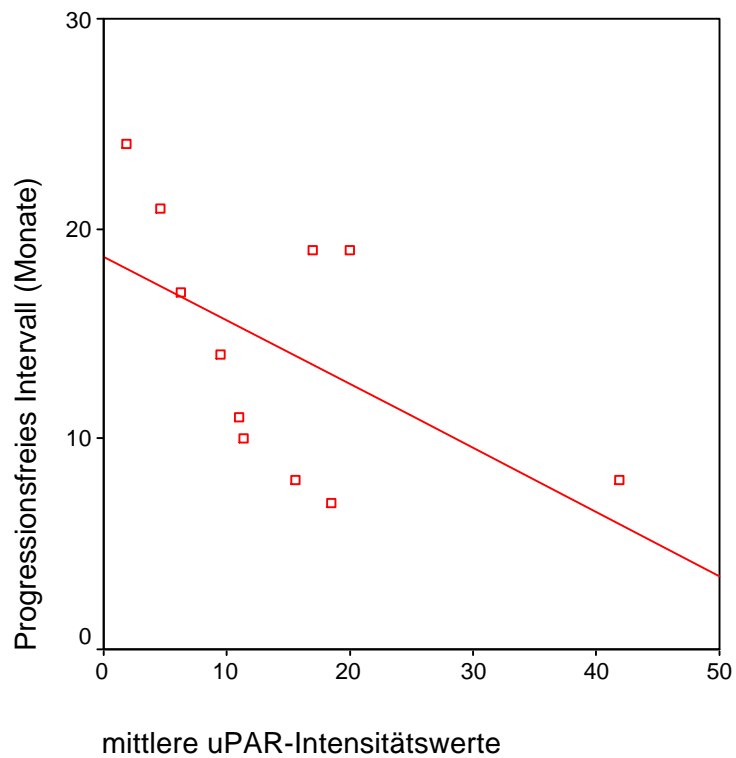


Abbildung 26: Darstellung gemittelter uPA-R-Intensitätswerte zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark in Abhängigkeit zu dem progressionsfreien Intervall in Monaten. Es lässt sich ein Trend eines kürzeren progressionsfreien Intervalls bei hohen gemittelten uPA-R-Intensitäten feststellen. Die Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant ($p = 0,077$; Korrelationskoeffizient $R = -0,554$).

5 Diskussion

5.1 Diskussion des experimentellen Teils

5.1.1 Nachweis disseminierter Tumorzellen

Der Nachweis einzelner disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark oder in Lymphknoten – als Indikatororgane – ist im Rahmen eines erweiterten Tumorstaging durch immunzyto- bzw. immunhistochemische oder molekulare Methoden möglich und hat sich in einer Vielzahl von Studien beim Mammakarzinom (24, 30, 36, 58), Kolonkarzinom (54), Magenkarzinom (37, 44, 91), Ösophaguskarzinom (104) und beim Bronchialkarzinom (23, 68, 71) als klinisch relevanter und vom Tumorstadium unabhängiger Prognosefaktor erwiesen.

Eine Übersicht über die Detektion disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark verschiedener Karzinome zeigt Tabelle 16.

Tumortyp	Markerproteine	Detektionsraten	Prognostischer Wert	Quellenangabe
Mammakarzinom	EMA	89/350 (25%)	Rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben	Mansi et al. 1999
	EMA, TAG12, CK	38/100 (38%)	Rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben	Harbeck et al. 1994
	CK	18/49 (37%)	Rezidivfreies Überleben	Cote et al. 1991
	TAG12	315/727 (43%)	Rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben	Diel et al. 1996
Kolorektales Karzinom	CK-18	28/88 (32%)	Rezidivfreies Überleben	Lindemann et al. 1992
Magenkarzinom	CK-18	34/79 (35%)	Rezidivfreies Überleben	Schlimok et al. 1991
	CK-18	47/78 (60%)	Rezidivfreies Überleben	Heiss et al. 1995
	CK-18	95/180 (53%)	Rezidivfreies Überleben	Jauch et al. 1996
Ösophaguskarzinom	CK	37/90 (41%)	Rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben	Thorban et al. 1996
Bronchialkarzinom (NSCLC)	CK	17/43 (40%)	Rezidivfreies Überleben	Cote et al. 1995
	CK-18	83/139 (60%)	Rezidivfreies Überleben, Gesamtüberleben	Pantel et al. 1996
	CK-18	15/39 (39%)	Rezidivfreies Überleben	Ohgami et al. 1997
Ovarialkarzinom	CK-8/18/19	32/108 (30%)	Fernmetastasenfreies Überleben	Braun et al. 2001

Tabelle 16: Immunzytochemische Studien von der prognostischen Relevanz disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark. EMA = epithiales Membran Antigen; CK = Zytokeratin; TAG12 = tumor-assoziiertes Glykoprotein 12; NSCLC = non-small-cell lung cancer.

Patientinnen mit fortgeschrittenem epitheliales Ovarialkarzinom sterben im allgemeinen an der lokal intraperitoneal gelegenen Tumorprogression und nicht an einer Fernmetastasierung. Dennoch zeigen einige Autopsiestudien von Patientinnen, verstorben am Ovarialkarzinom, eine häufige okkulte hämatogene Fernmetastasierung in Organen wie Leber, Lunge und Skelett (1, 27). Dies lässt darauf schließen, dass sich maligne Tumorzellen öfter als erwartet in klinisch nicht typischen Metastasierungsorten wie im Knochenmark aufhalten (11). Die

gegenwärtig verfügbaren Daten zeigen, dass mikrometastatische Zellen im Knochenmark eine Population von schlafenden Tumorzellen darstellen und einen beträchtlichen Grad an Heterogenität aufweisen (16). Ein Großteil der disseminierten zytokeratinpositiven Zellen befindet sich in diesem tumorbiologisch frühen Zeitpunkt der Metastasierung in Ruhe und nicht in Proliferation und wird das vollständig maligne Potential erst im weiteren Verlauf des Metastasierungsprozesses erwerben (16). Analysen von mikrometastatischen Zellen im Knochenmark werden neue Wege zeigen, den entscheidenden Faktor für die frühe Tumorzellaussaat und die nachfolgende Metastasenentstehung zu verstehen (13), und dadurch neue Möglichkeit zu erlangen, die Therapie einzelner Tumorpatientinnen zu individualisieren.

Zunächst soll in der Diskussion der prozentuale Anteil zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark mit anderen Arbeitsgruppen verglichen werden. Die Anzahl an vergleichbaren, durchgeführten Studien von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark beim Ovarialkarzinom ist zu diesem Zeitpunkt beschränkt. Die Ergebnisse werden im Vergleich mit dieser Doktorarbeit im Folgenden dargestellt:

Der Prozentsatz an zytokeratinpositiven Knochenmarkbefunden im Zeitraum von 1998 bis 2000 an der Frauenklinik der Technischen Universität München bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom lag bei 25% (13 von 51 Patientinnen der Patientengruppe B). Davon hatten 23% (7 von 30) der Patientinnen einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund vor Therapiebeginn und 28%

(6 von 21) der Patientinnen einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund nach präoperativer Chemotherapie. Zwei Patientinnen wurden zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnosestellung (Patientengruppe C) untersucht, wobei jeweils eine Patientin einen zytokeratinpositiven und eine Patientin einen zytokeratinnegativen Knochenmarknachweis hatte. Sieben Patientinnen (Patientengruppe A) bekamen vor und nach einer präoperativen Chemotherapie das Knochenmark untersucht. Drei von 7 Patientinnen hatten vor und nach präoperativer Chemotherapie einen zytokeratinnegativen und eine von 7 Patientinnen vor und nach Chemotherapie einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund. Zwei von 7 Patientinnen waren vor systemischer, primärer Chemotherapie zytokeratinpositiv und nach systemischer Therapie negativ, eine von 7 Patientinnen waren vor Therapie negativ und nach der präoperativen Chemotherapie vor der Operation zytokeratinpositiv.

Andere Arbeitsgruppen, wie die um Cain JM (1990) hatte eine positive Detektionsrate von 12 (23%) der insgesamt 53 evaluierbaren Knochenmarkaspirationen, die von 58 Patientinnen entnommen wurden (18). Die etwas niedrigere Detektionsrate mag an den verschiedenen Antikörpern liegen, die in dieser Untersuchung verwendet wurden. Für die Detektion zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark wurden die Anti-Zytokeratin-Antikörper 35 β H11 und 34 β E12 verwendet, obwohl die Markierung von disseminierten zytokeratinpositiven Zellen mit Antikörpern gegen Zytokeratin

8, 18 und 19 wie der Anti-Zytokeratin-Antikörper A45B/B3 mittlerweile als Standard anzusehen sind (73). Außerdem wurde die Mehrzahl der Knochenmarkuntersuchungen bei Cain JM et al. zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnosestellung im Rahmen einer Second-line Therapie durchgeführt, wobei hier 7 von 19 (36,8%) Patientinnen zytokeratinpositiv waren (18). Insofern zeigt diese Untersuchung für Ovarialkarzinompatientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und somit zu einem frühen Stadium der Erkrankung nicht ausreichende Ergebnisse über das Auftreten von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark. Cain JM et al. konnte disseminierte zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark nicht als signifikant prognostischen Faktor werten.

In einer weiteren Studie, die von Ross AA et al. (1994) publiziert wurde, ist eine Detektion von autologem Knochenmark und peripheren Stammzell-Autografts auf disseminierte Tumorzellen, das vor einer Hochdosis-Chemotherapie Ovarialkarzinompatientinnen entnommen, um es nach der systemischen Behandlung den Patientinnen wieder zuzuführen, untersucht worden. In dieser Veröffentlichung sollte die Kontamination von Knochenmark, das autolog gespendet und nach Hochdosischemotherapie wieder verabreicht wurde, mit disseminierten zytokeratinpositiven Zellen dargestellt werden. Ross AA et al. (1994) zeigen, dass 9 von 19 Patientinnen (47%) einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund aufwiesen. Keine von 7 Proben der Stammzellisolierungen aus peripherem Blut beinhaltete zytokeratinpositive Zellen. So zeigt sich hier die

Stammzellisolierung aus dem peripheren Blut als die weniger tumorzellkontaminierte Quelle für autologe Stammzelltransplantationen nach Hochdosischemotherapie (88). Die hohe Detektionsrate von 47% scheint an den relativ fortgeschrittenen Krankheitsstadien des Patientenkollektivs zu liegen. 14 von 19 Patientinnen befanden sich im FIGO-Stadium III, 3 im FIGO-Stadium IV und nur 2 Patientinnen im FIGO-Stadium II. D.h. 73% der Patientenguts hatten bereits eine peritoneale Aussaat außerhalb des kleinen Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Detektionsraten von Ross AA et al. (1994) zu der vorliegenden Doktorarbeit (47% versus 25% zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark) können die verschieden verwendeten Antikörper sein. Anders als in dieser Dissertationsarbeit wurde in der Studie von der Arbeitsgruppe um Ross (1994) ein monoklonaler Antikörper Cocktail, bestehend aus TFS-4 (gegen ein zelluläres Adhäsionsmolekül; der Antikörper ist reaktiv gegen Gewebetypen wie Ovarial-, Brust- und kleinzelliges Bronchialkarzinom), OV-632 (gegen das Ovarialkarzinom assoziierte Antigen), TFS-2 (gegen ein 39 KDa Membran Protein; der Antikörper ist reaktiv gegen Gewebetypen wie Ovarial-, Brust- und kleinzelliges Bronchialkarzinom) und SB-3 (gegen Zytokeratin 8,18 und 19; reaktiv gegen alle epithelialen Zellen) angewendet (88). In der vorliegenden Arbeit wurde der gereinigte monoklonale Maus-Antikörper gegen Panzytokeratin (Zytokeratin 8, 18 und 19) zum

Nachweis zytokeratinhaltiger Zellen im Knochenmark benutzt. (siehe auch Kapitel 3.3.1 – Verwendete Antikörper)

Ross AA et al. konnte disseminierte zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark nicht als signifikant prognostischen Faktor werten.

In der bislang größten vergleichbaren Studie wurde 2001 durch Braun S et al. ein großes Patientenkollektiv von 108 Ovarialkarzinompatientinnen untersucht. 32 von 108 (29,6%) Patientinnen hatten zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark (25% vs. 29,6%). Der hier verwendete monoklonale Antikörper A45B/B3 ist der von Pantel et al. (1998) empfohlene Anti-Zytokeratin-Antikörper mit vergleichbar höchster Spezifität für die Markierung epithelialer Zellen (73). Die mediane Nachbeobachtungszeit bei Braun S et al. (2001) von 45 Monaten ist bei dem schnell progressiven Ovarialkarzinom ein ausreichend langer Zeitraum, um einen prognostischen Effekt von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark für den Erkrankungsverlauf der untersuchten Patientinnen abschätzen zu können. Das gewählte Patientenkollektiv von Braun (2001) stellte sich aus allen FIGO-Stadien zusammen: 20 Patienten mit FIGO I, davon war bei 4 Patientinnen (20%) ein zytokeratinpositiver Knochenmarkbefund. Im FIGO-Stadium II wurden 10 Patientinnen untersucht, davon waren 2 Knochenmarkbefunde (20%) zytokeratinpositiv. 78 Patientinnen hatten ein FIGO-Stadium III, wobei 22 Patientinnen (33,3%) Tumorzellen im Knochenmark hatten (11). In dieser Veröffentlichung wurde der zytokeratinpositive Knochenmarkbefund mit fernmetastasenfreier

Überlebenszeit und dem Gesamtüberleben untersucht. Hierauf wird aber in Kapitel 5.2 noch näher eingegangen.

Die Anzahl von detektierten zytokeratinpositiven Zellen einzelner Patientinnen wurde in der vorliegenden Doktorarbeit nicht mit dem Krankheitsverlauf oder mit anderen prognostischen Faktoren verglichen. Ohnehin wurde bei der Mehrheit (8 von 13) der Patientinnen jeweils nur eine zytokeratinpositive Zelle gefunden. Braun et al. (2001) hatte bei der Anzahl von Tumorzellen einer Patientin eine Spannweite von 1 bis 31 zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark bei 2×10^6 mononuklearen Zellen pro Patientin. Trotzdem wurden bei Braun et al. (2001) ähnliche Ergebnisse bezüglich der Rate der tumorzellpositiven Patientinnen (29%) wie in den vergleichbaren Studien (23% Cain JM et al., 47% Ross AA et al., 25% in dieser Arbeit) für Ovarialkarzinom erzielt.

Für die Diskussion der Spezifität der Doppelimmunfluoreszenz-Färbung, die primär von Noack et al. (1999) veröffentlicht wurde, welcher mit den Antikörpern A45B/B3 und HU277 für die Markierung und Charakterisierung disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark arbeitete, soll auf Kapitel 3.3.1 verwiesen werden. Die unspezifische Zytokeratinfärbung lymphoider Knochenmarkzellen wurde auch während der Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit wiederholt diskutiert. Es wurde der Versuch unternommen, im Knochenmark detektierte disseminierte zytokeratinpositive Zellen nach der Untersuchung der Präparate mit einer Kerngegenfärbung (May-

Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim – eine von der Pathologie anerkannte zytologische Färbung für den morphologischen Nachweis von Knochenmark- oder Tumorzellen) nachzuweisen und auf Grund ihrer morphologischen Malignitätskriterien die Zytokeratinpositivität als Tumorzelle zu bewerten. Da nach der Untersuchung des mit Antikörpern markierten Präparats, das zum Schutz eingedeckelt war, wieder entdeckelt wurde und dann drei Färbe- und vier Waschschriffe (Pappenheim-Färbung: siehe Kapitel 3.3.3) durchlaufen musste, war die zu suchende und markierte Zelle oft so stark beschädigt, dass sie nicht mehr auswertbar oder im Präparat nicht mehr auffindbar war. In der vorliegenden Dissertationsarbeit war eine Darstellung einer zytokeratinpositiven Zelle mit Kerngegenfärbung leider nicht durchführbar (0 von 8 Präparationen).

Eine Untersuchung, die parallel zu der Ovarialkarzinomuntersuchung von Frau Sonja Sinz erarbeitet wurde, war der Nachweis disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark beim Mammakarzinom. Hier gelang es in einzelnen Fällen, zytokeratinpositive Zellen mittels May-Grünwald-Färbung gegenzufärben und morphologisch darzustellen. So wurde in Zusammenarbeit mit den Pathologen der Technischen Universität München in einzelnen Fällen die Zytokeratinpositivität einer Zelle als Nachweis für das Vorliegen einer Tumorzelle im Knochenmark bewertet. Der morphologische Charakter einer Knochenmark- oder Tumorzelle wird an Zellkern, Nukleolus, Zytoplasma, Zellmembran und Zellkern-Zytoplasma-Relation bestimmt. Diese

Faktoren können durch die May-Grünwald-Giemsa-Färbung gut beurteilt werden. In einem Transmissionsbild eines Laserscanmikroskops sind Strukturen wie Zellkern, Nukleolus, Zytoplasma und Zellmembran einer Zelle ebenfalls gut zu erkennen und es ist ähnlich gut für die Beurteilung von Tumorzellen im Knochenmark geeignet (vgl. Abbildung 6). Eine kritische morphologische Auswertung war notwendig, um nicht falsch-zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark in die Untersuchung mit aufzunehmen.

In einer Studie von Stimpfl et al. (1999) wurden Ovarialkarzinomzelllinien (Caov-3, OVCAR-3, SK-OV-3, PA-1, ES-2, A2780ADR, A2780) auf zytoplasmatische Expression von Muzin (MUC-1) und Zytokeratine (CK 7, CK 8, CK7/8, CK8/18/19) mittels FACScan-Flowzytometrie (Durchflußzytometrie) untersucht. MUC-1, ein Transmembranprotein normaler epithelialer Zellen, welches in erhöhter Expression in epithelialen Tumorzellen zu finden ist, wurde in allen Zelllinien exprimiert. Eine Expression von CK 7 war in drei von sieben Zelllinien nicht vorhanden (PA-1, A2780, A2780ADR). CK 8 wurde ebenfalls in drei von sieben Zelllinien nicht exprimiert (ES-2, A2780ADR, A2780). Die Expression von CK 7/8 dagegen war in allen, und stark in vier Zelllinien (Caov-3, OVCAR-3, SK-OV-3, PA-1) vorhanden. Für den Nachweis von CK 8/18/19 in den o.g. Ovarialkarzinomzelllinien wurde der FITC-markierte monoklonale Antikörper A45-B/B3 (Miltenyi Biotec, Auburn, USA) verwendet. In vier von sieben Zelllinien (Caov-3, OVCAR-3, SK-OV-3, PA-1) zeigte sich eine starke CK 8/18/19-Intensität. In zwei von sieben zeigte sich eine

normale Intensität (PA-1, A2780ADR) und in einer Zelllinie (A2780) zeigte sich kein Nachweis von CK8/18/19. Von allen getesteten Anti-Zytokeratin-Antikörpern, ergaben anti-CK7/8 und anti-CK 8/18/19 (A45-B/B3) durchschnittlich die besten Färbungen der Zelllinien Caov-3, OVCAR-3, SK-OV-3, PA-1 und ES-2. Diese Zellen wurden homogen positiv mit CK 7/8- und CK 8/18/19-Antikörpern angefärbt, außer in Zelllinien A2780 und A2780ADR. Diese Ergebnisse erlauben eine Auswahl von geeigneten Markern für die Detektion von disseminierten Ovarialkarzinomzellen (102).

Anhand des Mammikarzinoms, das auf dem Gebiet der minimal residualen Erkrankung intensiv untersucht wurde, soll in Tabelle 17 gezeigt werden, wie die Detektionsrate und ihr prognostischer Wert sich bei verschiedenen Verarbeitungstechniken des Knochenmarks unterscheiden. Die gegensätzlichen Detektionsraten (1 – 48%), welche von den verschiedenen Autoren beschrieben wurden, sind auf die uneinheitlichen Methoden der Präparatverarbeitung (Biopsie, Knochenmarkzellausstrich, Cytospin), der Detektionsmethode (Lichtmikroskop, ACIS – automatisierte computergesteuerte Tumorzellsuche) und auf die verschiedenartigen Detektionsantikörper (Muzin, Muzin/CK, CK, CK 18) zurückzuführen.

Die temporäre Erfahrung auf dem Gebiet der Tumorzelldetektion im Knochenmark zeigt, dass Zytokeratine als integrale Komponenten des Zytoskeletts epithelialer Zellen stabil exprimierte Charakteristika von Tumorzellen sind, die mit monoklonalen Antikörpern identifiziert werden

können (5, 62). Muzine – tumorassoziierte, integrale Zellmembranproteine mit einer großen extrazellulären Domäne sind ebenfalls geeignete Marker für die Knochenmarkanalyse. Obwohl dieses Protein selten und aberrant auch in hämatopoetische Zellen von Patienten, die an einem Lymphomen erkrankt sind, exprimiert wird, wurde es bisher nicht in peripheren Blutzellen detektiert. Dagegen sind Zytokeratine, welche eine Subgruppe von Intermediär-Filamenten darstellen, Teile des Zytoskeletts. 20 verschiedene Zytokeratin-Isotypen sind bekannt, wovon zum Beispiel CK7 und CK20 in histopathologischen Präparationen verwendet werden, um einen unbekanntem Primärtumor zwischen Ovarialkarzinom und Colonkarzinom unterscheiden zu können. Die meisten Ovarialkarzinomzellen sind CK7-positiv und CK20-negativ (5). Zytokeratin 8 (CK8) ist weit verbreitet in epithelialen Mukosazellen. Zytokeratin 18 (CK18) ist ein Marker für einfache epitheliale Zellen und Zytokeratin 19 (CK19) wurde beschrieben als Marker für Mammakarzinomzellen, kann aber auch in einer Anzahl von einfachen epithelialen Zellen gefunden werden (17, 26, 62).

Auch aufgeführt sind in Tabelle 17 die unterschiedlichen Entnahmetechniken (Zellausstrich einer Knochenmarkaspiration, Knochenmarkbiopsie oder Cytospin nach Knochenmarkaspiration) der jeweiligen Studiengruppen. Immunzytochemische Analysen von Knochenmarkbiopsien zeigten, dass zytokeratinpositive Zellen sich oft im interstitiellen Gewebe aufhalten, außerhalb der sinusoidalen Gefäße und dadurch schlecht erreichbar sind für die biopsische Knochenmarkuntersuchung (74). Zudem kann bei Biopsien nur eine

geringere Zellzahl im Vergleich zu einer Knochenmarkaspiration erreicht werden. Insofern ist die Methodik der Knochenmarkaspiration aus dem Beckenkamm sicherlich die geeignetere für die Detektion von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark. Ebenfalls überlegen ist die Zellzahl des Cytospins der Zellzahl des Ausstrichpräparates, welches sicher die geeignete Methode der Knochenmarkverarbeitung nach Knochenmarkaspiration darstellt. Die Identifikation von einzelnen disseminierten Tumorzellen in Knochenmarkausstrichen durch zytomorphologische Differenzierung ist wegen der niedrigen Sensitivität schwierig, und nicht praktikabel.

Erstaunlich jedoch ist, dass Redding et al. als erste Arbeitsgruppe für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen einen Primärantikörper gegen epitheliales Membranantigen (EMA) verwendete und dabei eine Detektionsrate von 28% bei Mammakarzinompatientinnen ohne Zeichen für Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Primäroperation hatte (80). Obwohl dieser Marker sehr unspezifisch war, wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen diese ersten Ergebnisse mit einer Detektionsrate von 20% - 45% bestätigt (28, 40, 76, 92, 103).

Marker	Präparation	Patientenzahl	Detektionsrate	Prognostischer Wert	Autor
Mucin	Biopsie	159	16%	Keiner	Porro et al. 1988
Mucin	Biopsie	121	17%	Keiner	Salvadori et al. 1990
Mucin/CK	Biopsie	93	1%	Keiner	Mathieu et al. 1990
Mucin	Zellausstrich	25	48%	Keiner	Kirk et al. 1990
Mucin	Biopsie	50	8%	Keiner	Courtemanche et al. 1991
Mucin/CK	Zellausstrich	71	38%	Keiner	Singletary et al. 1991
Mucin/CK	Zellausstrich	49	37%	Rezidivfreies Überleben/ Gesamtüberleben	Cote et al. 1991
Mucin/CK	Zellausstrich	100	38%	Rezidivfreies Überleben/ Gesamtüberleben	Harbeck et al. 1994
Mucin	Zellausstrich	727	43%	Rezidivfreies Überleben/ Gesamtüberleben	Diel et al. 1996
CK 18	Cytospins	234	38%	n.d.	Funke et al. 1996
CK	Biopsie	128	19%	Rezidivfreies Überleben/ Gesamtüberleben	Landys et al. 1998
CK 18	Cytospins	581	28%	Keiner	Untch et al. 1999
Mucin	Zellausstrich	350	25%	Rezidivfreies Überleben/ Gesamtüberleben	Mansi et al. 1999
CK	Cytospins	552	36%	Metastasenfreies Überleben/ Gesamtüberleben	Braun et al. 2001

Tabelle 17 : Übersicht über Detektionsraten zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark bei Mammakarzinompatientinnen. (aus S. Braun, K. Pantel: Clinical significance of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients. The Oncologist 2001;6:125-132)

5.1.2 Nachweis von u-PA-R auf zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark

Einige Arbeitsgruppen konnten in ihren Analysen zeigen, dass der Plasminogen Aktivator vom Urokinase-Typ (uPA), sein Inhibitor (PAI-1) und sein Rezeptor (uPA-R) an dem komplexen Geschehen, sowohl bei der Tumordinvasion und

Metastasierung, als auch von entscheidend prognostischer Relevanz bei verschiedenen Karzinomen, wie Magen-, Colon-, Brust- und ösophagealem Karzinom eine wichtige Rolle spielen (3, 32, 34, 39, 43, 63, 64, 65, 77). 1995 wies Schmalfeldt et al. die höchste uPA-R-Expression in Metastasen des Ovarialkarzinoms im Vergleich zum uPA-R-Gehalt des Primärtumors nach. Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf den erhöhten Anteil des fibrinolytischen Systems auf der Seite der Tumorfiliae hin, wobei uPA, uPA-R und die Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 zu dem aggressiven Potential von Karzinomzellen beitragen dürften, indem sie an der Reimplantation und/oder an der Konsolidierung eines neuen Tumorstromas beteiligt sind (94). Schmalfeldt et al. zeigte 2001 in einer weiteren Studie eine Erhöhung der Expression von uPA und PAI-1 und anderer Metalloproteasen (MMP-2 und MMP-9) im Ovarialkarzinomgewebe in Abhängigkeit von dessen Malignitätsgrad. Die Proteinexpression war niedrig in benignen Ovarialtumoren, stieg jedoch signifikant an bei Low-Malignant-Potential Tumoren bis hin zu Ovarialkarzinomen höheren Malignitätsgrades. Die höchsten Werte proteolytischer Faktoren wurden in Metastasen des Omentum majus gemessen. Diese Ergebnisse sind von besonderer Relevanz für die Entwicklung von Proteaseninhibitoren als neue therapeutische Möglichkeit auf dem Gebiet des Ovarialkarzinoms (93). In einer prospektiven Studie von Kuhn W et al. (1999) wurden Extrakte von primärem Tumorgewebe von 86 Patientinnen mit Ovarialkarzinom Stadium FIGO IIIc auf uPA- und PAI-1-Gehalt in Bezug auf

die prognostische Relevanz und auf das Gesamtüberleben untersucht. Bei allen Patientinnen waren der u-PA- und PAI-1-Gehalt, wie auch die traditionellen prognostischen Parameter (Residualtumor, Nodalstatus, Grading und Aszitesmenge) univariat von prognostischer Signifikanz für das Gesamtüberleben. Sogar bei Patientinnen mit Residualtumor (n = 43) erlaubte der statistisch unabhängige prognostische Einfluss von PAI-1 eine weitere Unterscheidung zwischen Niedrig- und Hoch-Risiko-Patientinnen (52).

Die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppen richteten sich hauptsächlich auf den resezierten Primärtumor oder dessen Metastasen. Nur wenige Studien wurden bislang über das Urokinase Plasminogen Aktivator System (uPA, uPA-R, PAI-1) auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen veröffentlicht (2, 37, 38, 86, 106).

Ob disseminierte zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark in frühen Stadien von soliden Karzinomen auf eine Komponente einer subklinischen systemischen Erkrankung hinweisen ist unklar. Das reine Detektieren dieser Zellen ist nicht imstande, die biologische Heterogenität, und damit die Metastasenfähigkeit oder die Fähigkeit zur Bezwingung des Immunsystems wiederzuspiegeln (38). So wurde zur Differenzierung zwischen irrelevanten, abgestoßenen Zellen und solchen disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark, die später ein Rezidiv oder eine Mikrometastasierung mit späterer Metastasenbildung verursachen könnten, verschiedene Ansätze zur Phänotypisierung unternommen. Unter anderem wurden Marker auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen

wie erbB2 beim Mammakarzinom (10, 70) und Colon-/Magenkarzinom (70), MHC-I beim Mammakarzinom (72, 112) und Colon-/Magenkarzinom (72), Transferrin beim Mamma- und Colonkarzinom (90), 3Ki-67, Ki-67 und pI20 beim Mamma- und Colonkarzinom (70), außerdem 17-1A, MUC-1 und Lewis Y beim Mammakarzinom (10) nachgewiesen. Durch die Untersuchung des uPA-Rezeptors auf zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark sollte die Metastasierungs- und Invasionsfähigkeit derer nachgewiesen werden (2, 37, 38, 86, 106).

Die Arbeitsgruppe um Heiss erforscht seit 1995 intensiv neben uPA-, uPA-R- und PAI-1-Gehalt in Primärtumorgewebe, auch die Expression von uPA-R auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von operierten Magenkarzinompatienten. Nachdem Riesenberg et al. 1993 eine Kombination einer Immungoldfärbung mit der immunzytochemischen alkalischen Phosphatase-Technik für die Detektion von zytokeratin-18-positiven Zellen im Knochenmark von Prostatakarzinompatienten (84) vorstellte, wurde 1995 unter Heiss aus dieser Methode zur Doppelfärbung von disseminierten Einzelzellen ein neues Färbeprotokoll zur gleichzeitigen Identifikation des Plasminogen Aktivator Rezeptors (uPA-R) und Zytokeratin 18 erstellt (37). Die immunzytochemische Doppel-Färbung disseminierter Zellen wurde, nach der Knochenmarkpräparation, mittels eines monoklonalen Maus-Antikörpers gegen zellmembranständigen und intrazellulären uPA-Rezeptor (10µg/ml, IgG2a, American Diagnostic Inc., New York) für 60 Minuten in einer Zytozentrifuge

inkubiert, in Folge von einem Ziege-Anti-Maus-Antikörper markiert mit 1-nm-grossen Goldpartikeln (Auroprobe, Amersham, Braunschweig, Deutschland). Nach der Inkubation mit PBS (Mausserum 10% - 20 min), um Kreuzreaktivität zu vermeiden, wurde der zweite Teil der Färbung mittels des monoklonalen Antikörpers CK2 (10 µg/ml, 45 min, IgG1, Boehringer Mannheim), gerichtet gegen Zytokeratin 18, ein Teil des Zytoskeletts von einfachen epithelialen Zellen und disseminierten Karzinomzellen, durchgeführt. Alkalisches Phosphatase-gebundenes Streptavidin 1:100 (Jackson Immuno Research, West Grove, Pennsylvania) wurde für 30 Minuten hinzugefügt. Die Enzymreaktion wurde mit einer Fuchsinfärbung und Naphthol-AS-BI-Phosphat-Färbung (Sigma) dargestellt. Schließlich wurde die uPA-Rezeptor-Expression mit einem Silber-Enhancement-Kit (Amersham) visualisiert, indem es schwarz gefärbte Granulationen als uPA-Rezeptor-positive Strukturen zeigt. Die Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop ausgewertet. Hierbei wurden die ersten 106 Knochenmarkzellen mittels einer APAAP-Färbung gegen Zytokeratin 18 auf zytokeratinpositive Zellen untersucht. Falls bei der Auswertung ein positiver Befund detektiert wurde, hat die Arbeitsgruppe bei weiteren 106 Knochenmarkzellen die oben beschriebene doppelimmunzytochemische Färbung durchgeführt und die disseminierten Zellen auf den uPA-Rezeptor untersucht (37). Allgayer et al. zeigte 1997 die Reproduzierbarkeit dieser Methode der gleichzeitigen Zelldetektion und Identifizierung uPA-R-tragender Zellen. Insgesamt zeigte sich bei quantitativer Analyse der detektierten Zellzahl

(Ergebnisse der APAAP-Methode versus Ergebnisse der Doppel-Immunzytochemischen Färbung CK18/uPA-R) eine relative Reproduzierbarkeit von 97%. Die Korrelation der Methoden war signifikant ($p < 0,001$, lineare Regression). Die Sensitivität der Färbung, getestet in logarithmischer Tumorzellverdünnung, war eine CK18-positive Zelle in 300000 Knochenmarkzellen. Hier zeigte sich auch wie in der vorliegenden Dissertationsarbeit, nicht nur eine uPA-R-Markierung zytokeratinpositiver Zellen, sondern auch üblicher zytokeratinnegativer Knochenmarkzellen (2). Dies wird ebenfalls in der Literatur bestätigt. uPA-R wird auch auf Leukozyten im Blut, wie Monozyten, neutrophilen Granulozyten und aktivierten T-Zellen exprimiert (7, 49).

Eine weitere Arbeitsgruppe um Tögel (2001) detektierte disseminierte zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark, im peripheren Blut und in G-CSF-mobilisierten peripheren Stammzellblut von Patientinnen, erkrankt am Mammakarzinom, mit einer immunzytochemischen Doppelfärbung (37) zum Zeitpunkt der Gabe einer Hoch-Dosis Chemotherapie. Insgesamt wurden 150 Proben von 73 Patientinnen, bestehend aus Knochenmark ($n = 60$), G-CSF mobilisierten Stammzellen im peripheren Blut ($n = 41$), in peripheren Blutproben ($n = 48$) und einer Aszitespunktion ($n = 1$) untersucht. Zytokeratinpositive Zellen, detektiert mit dem Antikörper A45B/B3, konnten im Knochenmark in 43% der Fälle, in Leukaphereseproben in 29% und im peripheren Blut bei 25% der untersuchten Patientinnen nachgewiesen werden.

Die Aszitespunktion war ebenfalls zytokeratinpositiv. Insgesamt konnte bei 10 von 15 (67%) zytokeratinpositiver Befunde uPA-R auf disseminierten Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden. In 7 von 10 (70%) Fällen konnte auf zytokeratinpositiven Zellen im peripheren Blut der uPA-Rezeptor nachgewiesen werden. Drei der 9 (33%) untersuchten Leukaphereseproben waren uPA-R-positiv. Die Aszitesprobe war uPA-R-positiv in 82% der detektierten epithelialen Zellen. Eine Korrelation der aufgeführten Ergebnisse mit den verschiedenen Erkrankungsstadien der Mammakarzinompatientinnen (n = 73) konnte jedoch nicht gezeigt werden. Ebenfalls konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der verschieden verwandten Untersuchungsmaterialien gezeigt werden (106).

Weitere Ergebnisse der dargestellten Untersuchungen von uPA-R auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark von Tögel, Allgayer und Heiss werden in Kapitel 5.2.2 gezeigt.

Die beiden dargestellten Detektions- und Markierungsverfahren zeigen nur eine Unterscheidung zwischen uPA-R-positiver oder uPA-R-negativer Zelle. Es ist unklar, ab welcher Rezeptordichte auf der Zellmembran oder im Zytoplasma die immunzytochemische Methode ein positives Ergebnis liefert. Dabei liegt nahe, dass die Metastasierungsfähigkeit der einzelnen disseminierten Zellen nicht nur durch eine qualitative Analyse (uPA-R-positiv/uPA-R-negativ), sondern vor allem durch eine Quantifizierung des uPA-R-Gehalts auf einzelnen Tumorzellen dargestellt werden kann.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde der uPA-Rezeptorgehalt auf den detektierten, disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark durch eine Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung semiquantitativ untersucht. Die Detektionstechnik war ein Schichtbildaufnahmeverfahren mittels einer Schichtdicke von 2 - 5 μm bei 63facher Vergrößerung. Später wurde dann mit Hilfe von Addition der gemessenen Intensitäten der einzelnen Schichtbilder der Gehalt an zellulären uPA-Rezeptor ermittelt (siehe auch Kapitel 3.4.2). So konnte nicht nur eine strukturelle dreidimensionale Darstellung der Zelle erreicht werden, sondern auch das Verteilungsmuster des uPA-Rezeptors visualisiert werden. In den digitalen Aufnahmen der Zellen (Abbildungen 8) kann man deutlich die Verteilung des Rezeptors im Zytoplasma (suPA-R) und an der Zellmembran erkennen (66).

Von 31 insgesamt detektierten zytokeratinpositiven Zellen konnte nur bei 22 Zellen der uPA-R-Gehalt bestimmt werden. Der Grund hierfür waren Probleme beim Wiederauffinden der zytokeratinpositiven Zellen, nach Markierung und Dokumentation der Koordinaten auf dem Objektträger bei 63facher Vergrößerung. Fehlerquellen waren eine ungenaue Markierung, Mängel bei der Eindeckelung oder das Beschädigen von Zellen nach verstärktem Objektivdruck auf das Präparat. Insgesamt konnte auf 23 von 23 (100%) untersuchten Zellen von insgesamt 11 Patientinnen mit Ovarialkarzinom der uPA-Rezeptor nachgewiesen werden. Im Vergleich konnte Tögel et al. (2001) beim Mammakarzinom mit der immunzytochemischen Doppelfärbung (s.o.) bei

10 von 15 (67%) Patientinnen einen uPA-Rezeptor auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark nachweisen (106). Heiss zeigte 2002 bei 47 von 81 (58%) am Magenkarzinom erkrankte Patienten einen uPA-R-Nachweis mit immunzytochemischem Nachweis (s.o.), ohne die Möglichkeit einer Quantifizierung des Rezeptors auf den disseminierten zytokeratinpositiven Zellen (38). Diese Möglichkeit war in der vorliegenden Doktorarbeit gegeben. Jedoch wurde auf jeder untersuchten zytokeratinpositiven Zelle eine unterschiedlich starke Ausprägung des uPA-R-Gehalts mit einer Spannweite von 1,914 bis 41,847 (Berechnung der uPA-R-Intensitätswerte wird ausführlich in Kapitel 3.4.2 dargestellt) nachgewiesen (siehe Tabelle 15, Abbildung 24). Der uPA-R-Gehalt schwankte sehr stark, sowohl bei den verschiedenen Patientinnen, als auch bei den verschiedenen gefundenen zytokeratinpositiven Zellen einer Patientin. Der uPA-R-Gehalt auf zytokeratinpositiven Zellen war deutlich höher als der anderer Knochenmarkzellen. Es war möglich, bei der digitalen Aufnahme der zytokeratinpositiven Zellen die anderen, umliegenden Immunzellen und knochenmarksständigen Zellen, vollständig aus dem Bild auszublenden, indem man die Stärke der Aufnahmeintensität herabsetzte. Dessen ungeachtet konnte der uPA-Rezeptor auch auf Immunzellen des Knochenmarks, wie Monozyten, Lymphozyten oder Granulozyten gefunden werden (siehe auch oben). uPA-R wird auf verschiedenen Immunzellen wie Makrophagen, Plasmazellen oder anderen Leuko- und Lymphozyten beschrieben (7, 66). Zytokeratin-18-negative Knochenmarkzellen zeigten bei

Allgayer et al. (1997) ebenfalls eine schwache spezifische Anfärbung für uPA-R in 6,5%, wobei der uPA-Rezeptor im Knochenmark aller Patienten detektiert werden konnte (2). Die Unterscheidung zwischen Immunzellen und Tumorzellen war vor allem ermöglicht durch die gleichzeitige Zytokeratinpositivität der Zelle, aber auch durch die morphologischen Merkmalsunterschiede wie Zellgröße, Zellmorphologie, Kerngröße und Kernmorphologie. Hier möchte ich nochmals auf die Arbeiten von Moll R. et al. (62) und Stimpfl M. et al. (102) hinweisen, welche die Zytokeratinpositivität als einen Marker für Ovarialkarzinomzelllinien und disseminierte Tumorzellen des Ovarialkarzinoms beschreiben.

Die Ergebnisse der Quantifizierung des uPA-Rezeptors und deren klinische Relevanz wie auch die Resultate der dargestellten Studien sollen später in Kapitel 5.2.2 diskutiert werden.

5.2 Klinische Bedeutung disseminierter zytokeratinpositiver Zellen beim Ovarialkarzinom

5.2.1 Disseminierte zytokeratinpositive Zellen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom – Vergleich mit anderen Prognosefaktoren und mit dem Krankheitsverlauf

Wie in Kapitel 4.2.1 dargestellt, wurde die Patientengruppe B (n = 51) in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde untersucht nach Applikation einer präoperativen Chemotherapie (n = 21). Eine zweite Patientengruppe hatte eine Knochenmarkuntersuchung zum Zeitpunkt der Primäroperation, also vor Therapiebeginn, ohne Vorbehandlung in Form einer systemischen Chemotherapie (n = 30) (siehe auch Kapitel 4.2.2 und Kapitel 4.2.3).

Der Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark im FIGO-Stadium I bei 5 von 6 Patientinnen ist das beeindruckende Ergebnis bei Analyse des Erkrankungsstadiums, untersucht vor Therapiebeginn (siehe Tabelle 6). Vor allem die relativ hohe Anzahl zytokeratinpositiver Befunde im Knochenmark im Stadium FIGO I ist ausschlaggebend für das signifikante divergente Resultat ($p = 0,004$) beim Vergleich des klinischen FIGO-Stadiums mit dem Knochenmarkbefund. Eine der 5 zytokeratinpositiven Patientinnen im Stadium FIGO I hatte nur eine minimale Tumortiefeninvasion pT1a. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass bereits in frühesten Stadien der

Erkrankung eine hämatogene Aussaat stattfindet und schon dann eine systemische Erkrankung bestehen muss.

Im Gegensatz zum frühen Stadium FIGO I wurden im fortgeschrittenen Stadium der Tumorerkrankung FIGO III nur in einem von 14 Fällen zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark vor Therapiebeginn nachgewiesen. In der Patientengruppe, untersucht nach erfolgter präoperativer Chemotherapie (n = 21) war der Knochenmarkbefund bei 6 von 18 Patientinnen positiv (siehe Tabelle 11). Im Stadium der Fernmetastasierung FIGO IV konnte nur bei einer von 5 Patientinnen bzw. bei 0 von 3 Patientinnen zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark festgestellt werden. Dies zeigt die Unabhängigkeit des Auftretens zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark ungebunden an das Stadium der Tumorerkrankung und autonom vom Zustand einer Fernmetastasierung.

Cain JM et al. (1990) konnte die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation mit den Resultaten ihrer Arbeit (FIGO I: 2/5 (40%); FIGO II: 0/4; FIGO III: 7/22 (32%); FIGO IV: 3/9 (33%)) bestätigen.

Obwohl Ross AA et al. (1995) in seiner Arbeit mit Ovarialkarzinompatientinnen in hauptsächlich fortgeschrittenen Tumorstadien einen prozentual höheren Nachweis von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark (47%) veröffentlichen konnte, wurden die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation durch die Resultate von Braun et al. (2001) ebenfalls bestätigt. Auch hier zeigen sich zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark in jedem Erkrankungsstadium des Ovarialkarzinoms (siehe Kapitel 5.2.1). Bei Braun et al. ist allerdings eine

homogenere Verteilung positiver Fälle (FIGO I: 4/20 (20%); FIGO II: 2/10 (20%); FIGO III: 22/78 (33%)) zu verzeichnen. Eine signifikante Abweichung des FIGO-Stadiums zum Nachweis von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark konnte die Arbeitsgruppe um Braun nicht erkennen ($p = 0,39$). Dies gilt ebenfalls für die anderen Arbeitsgruppen, die den Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark beim Ovarialkarzinom untersuchten (18, 88).

In der vorliegenden Dissertationsarbeit stellte sich bei Patientinnen, erkrankt an einem Ovarialtumor mit niedrig malignem Potential ($n = 3$), im Knochenmarkbefund ein zytokeratinnegatives Ergebnis heraus. Man könnte so vermuten, eine hämatogene Aussaat finde frühestens ab einem Stadium FIGO Ia oder einer Tumordifferenzierung von mindestens G1 statt. Jedoch ist die Patientenzahl der Fälle mit LMP-Ovarialtumor zu gering, um daraus Schlussfolgerungen ziehen zu können. Es konnte dennoch gezeigt werden, dass zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark in allen Stadien der Erkrankung – außer bei Borderline-Tumoren – des Ovarialkarzinoms auftreten. Cain JM et al. (1990) konnte eine Patientin mit einem Borderline-Tumor beschreiben, die einen zytokeratinnegativen Knochenmarkbefund hatte. Andere Arbeitsgruppen veröffentlichten bislang keine Daten über zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit LMP-Ovarialtumoren.

Bei Analyse des Nodalstatus bestand sowohl bei Braun et al. (2001) ($p = 0,52$) als auch in der vorliegenden Dissertation ($p = 0,099$ bzw. $p = 0,698$) kein

signifikant abweichendes Ergebnis zwischen dem Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark und einer Lymphknotenfilialisierung. Eine Untersuchung des Lymphknotenstatus wurde bis zu diesem Zeitpunkt von anderen Arbeitsgruppen nicht veröffentlicht.

Das histopathologische Grading beim Ovarialkarzinom zeigt ebenfalls keine Divergenz zum Auftreten zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark in der vor Therapiebeginn untersuchten Patientengruppe ($p = 0,303$). Eine signifikante Abweichung der histopathologischen Tumordifferenzierung ist allerdings in der nach einer erfolgten präoperativen Chemotherapie untersuchten Patientengruppe ($n = 21$) zu sehen ($p = 0,011$). Dies ist vor allem durch die höher als erwartete Anzahl von Fällen zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark im Stadium G2 (3 von 4 Patientinnen) und durch eine niedriger als erwartete Anzahl zytokeratinpositiver Befunde im Stadium G3 (2 von 16 Patientinnen) zu erklären. Kein Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark zeigte sich bei Patientinnen mit LMP-Ovarialtumor ($n = 3$) (s.o.). Die beiden Arbeitsgruppen um Braun (2001) und Cain (1990) konnten kein statistisch signifikantes Ergebnis der Tumordifferenzierung erbringen.

Die Analyse der Aszitesmenge ($p = 0,157$ bzw. $p = 0,184$) bei Diagnosestellung und der histologischen Typisierung ($p = 0,120$ bzw. $p = 0,316$) des Operationspräparates ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zu dem Auftreten zytokeratinpositiver Knochenmarkbefunde der untersuchten

Patientinnen. Eine Veröffentlichung dieser Parameter von anderen Arbeitsgruppen existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht.

Bei Analyse der Tumormarkerwerte CA 12-5 in der vorliegenden Dissertation fand sich bei der nach Chemotherapie untersuchten Patientengruppe ($n = 21$) kein statistisch signifikanter Unterschied zur Detektion zytokeratinpositiver Zellen ($p = 0,280$). Auch die mittleren Tumormarkerwerte der zytokeratinpositiven (1198 U/ml) und der zytokeratinnegativen (2251 U/ml) Patientinnen zeigten keine Auffälligkeiten. Dies bestätigt das Ergebnis mittlerer CA 12-5-Werte von Cain JM et al. (1990) bei der zytokeratinpositiven Gruppe von 733 U/ml zur zytokeratinnegativen Gruppe von 1153 U/ml. Ein signifikant abweichendes Ergebnis ($p = 0,044$) zeigte jedoch die Patientengruppe, untersucht vor Therapiebeginn ($n = 30$) (siehe Tabelle 8). Die unterschiedliche Verteilung der Ergebnisse wird vor allem durch das Auftreten zweier zytokeratinpositiver und keiner Patientin mit zytokeratinnegativem Befund im Normbereich des Tumormarkers CA 12-5 verursacht. Gemittelte CA-12-5-Werte dieser Patientengruppe (zytokeratinpositive Gruppe: 304 U/ml; zytokeratinnegative Gruppe: 741 U/ml) waren in diesem Fall unauffällig. Braun et al. konnte bei seinen Untersuchungen den Nachweis von zytokeratinpositiven Zellen mit dem Tumormarker CA 12-5 in keinen statistisch signifikanten Zusammenhang bringen ($p = 0,67$). Andere Arbeitsgruppen veröffentlichen derzeit hierzu keine Ergebnisse.

Die Ergebnisse von Braun et al. (2001) bezüglich des Residualtumors, die keinen signifikanten Unterschied erkennen ließen ($p = 0,12$), konnten durch die Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigt werden ($p = 0,515$), ebenso die Ergebnisse der Fernmetastasierung zum Diagnosezeitpunkt. Sie waren sowohl in der Patientengruppe untersucht vor Therapiebeginn ($p = 0,671$), wie auch in der Patientengruppe untersucht nach präoperativer Chemotherapie ($p = 0,342$) nicht von statistischer Relevanz. Auch andere Arbeitsgruppen können hier keine eindeutig signifikanten Ergebnisse vorweisen (18, 88).

Braun et al. (2001) konnte bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 45 (12 – 77) Monaten ein erhöhtes relatives Risiko von 6,2 bis 56,9 ($p > 0,001$) bei der Präsenz okkult metastatischer Zellen im Knochenmark nachweisen, an extraperitonealen, vorwiegend außerhalb des Skelettsystems vorkommenden Fernmetastasen zu erkranken (11). Eine Assoziation mit Rezidivfreiheit oder mit dem Gesamtüberleben konnte die Arbeitsgruppe jedoch nicht beweisen.

Auch andere Arbeitsgruppen, die den Krankheitsverlauf von Ovarialkarzinompatientinnen mit der Detektion von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark verglichen, konnten keinen Zusammenhang mit dem rezidivfreien- oder dem Gesamtüberleben erkennen (18, 88).

Das rezidivfreie Überleben (siehe Abbildung 16) der Patientengruppe untersucht vor Therapiebeginn ($n = 30$), in der vorliegenden Dissertation, lässt keine signifikanten Unterschiede erkennen ($p = 0,3346$). So auch das Gesamtüberleben, wobei in der zytokeratinpositiven Gruppe bei einer nur

geringen medianen Nachbeobachtungszeit von 16 Monaten keine Patientin verstarb. So erscheint in der Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier (Abbildung 17) die Prognose zytokeratinnegativer Patientinnen als ungünstiger. Dies ist allerdings bei einer niedrigen Fallzahl statistisch nicht signifikant ($p = 0,2258$).

Interessant jedoch ist die Untersuchung des rezidivfreien und Gesamtüberlebens bei Patientinnen, die alle das gleiche Therapieschema erhielten. In diesem Fall wurden die Patientinnen, die unmittelbar vor Therapiebeginn untersucht wurden und postoperativ, nach Laparotomie, eine adjuvante Chemotherapie erhielten ($n = 20$) erneut der Analyse von rezidivfreiem –und Gesamtüberleben unterzogen (siehe Abbildung 18 und 19). Hier lässt sich beim rezidivfreien Überleben kein Unterschied zwischen dem Auftreten zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark und einem zytokeratinnegativen Knochenmarkbefund bestätigen ($p = 0,4718$). Bei einer kurzen medianen Nachbeobachtungszeit von 16 Monaten der zytokeratinpositiven und 19 Monaten der zytokeratinnegativen Gruppe ist ein eindeutiges Ergebnis des Gesamtüberlebens noch nicht zu erkennen ($p = 0,2371$).

In einer anderen Patientengruppe erhielten alle Patientinnen ($n = 21$), untersucht nach erfolgter präoperativer Chemotherapie, unmittelbar vor einer Laparotomie, nach ihrer Operation eine postoperative Chemotherapie (siehe Abbildung 22 und 23). Bei Analyse der Daten konnte man beim rezidivfreien Überleben keine Abweichungen der zytokeratinpositiven von der zytokeratinnegativen Gruppe

registrieren ($p = 0,310$). Auf den ersten Blick kann man bei Betrachtung der Überlebensfunktion für das Gesamtüberleben einen günstigeren Verlauf für Patientinnen mit zytokeratinnegativem Knochenmarkbefund erahnen. Dies ist allerdings nicht signifikant ($p = 0,2237$). Die Fallzahl ($n = 21$) und die mediane Nachbeobachtungszeit von 18 (zytokeratinpositive Patientengruppe) und 21 (zytokeratinnegative Patientengruppe) Monaten sind zudem nicht ausreichend, um eine brauchbare Aussage über den Einfluss eines zytokeratinpositiven Knochenmarkbefundes auf das rezidivfreie –oder auf das Gesamtüberleben machen zu können.

Daten über den Einfluss einer systemischen chemotherapeutischen Behandlung auf zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark sind beim Ovarialkarzinom bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhanden. In einer Arbeit von S. Braun et al. (2000) wurde der Effekt der adjuvanten Chemotherapie auf die Elimination von disseminierten „Dormant Cells“ im Knochenmark bei Hochrisiko-Mammakarzinom-patientinnen untersucht (12). Bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 19 (6 – 39) Monaten hatten von 59 untersuchten Patientinnen 29 (49,2%) vor Chemotherapie und 26 (44,1%) nach Chemotherapie zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark. Nach der Chemotherapie hatten weniger als die Hälfte der vorher zytokeratinpositiven befundeten Patientinnen (14 von 29 Patientinnen; 48,3%) einen negativen Knochenmarkbefund, und elf (36,7%) von 30 vorher zytokeratinnegativ befundeten Patientinnen waren nach Chemotherapie zytokeratinpositiv im

Knochenmarkaspirat. Dies zeigt, dass die zytotoxischen Therapeutika die gegenwärtig beim Mammakarzinom eingesetzt werden, die zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark nicht komplett eliminieren können. Die Präsenz dieser Zellen im Knochenmark nach der Chemotherapie ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (12). Braun et al. (2000) zeigte, dass 55 Patientinnen mit Mammakarzinom, die nach einer erfolgten Chemotherapie einen zytokeratinpositiven Knochenmarkbefund aufwiesen, ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben aufwiesen ($p = 0,011$). Dies begründet, dass durch das Monitoring zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark, nach einer erfolgten Chemotherapie, der Misserfolg einer systemischen verabreichten Chemotherapie früher vorhergesagt werden könnte (12).

Die Knochenmarkanalyse der Patientengruppe A ($n = 7$), vor und nach der Verabreichung einer präoperativen platinhaltigen Chemotherapie, sollte den Einfluss von Chemotherapie auf disseminierte zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark beim Ovarialkarzinom untersuchen (siehe Kapitel 4.2.4). Eine Patientin hatte vor und nach der präoperativen Chemotherapie einen positiven Zytokeratinbefund. Bei drei Patientinnen war der Befund vor und nachher negativ. Vorher positiv und nach Chemotherapie negativ war der Befund bei zwei Patientinnen. Eine Patientin war vor der verabreichten Chemotherapie zytokeratinnegativ, nach der Behandlung hatte sie einen positiven Befund. Man kann hier trotz geringer Patientenzahl erkennen, dass der Verlauf der minimal residualen Erkrankung dieser Patientinnen nicht von der verabreichten

platinhaltigen Chemotherapie beeinflusst wird. Diese Folgerung kann durch die veröffentlichten Ergebnisse Brauns et al. (2000) beim Mammakarzinom (s.o.) bestätigt werden. Die Ursache des Misserfolges einer systemischen Chemotherapie könnte an der Phase des Zellzyklus liegen, in der sich disseminierte zytokeratinpositive Zellen befinden (70). Zellen, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus, d.h. in einem nicht proliferativen Status verweilen, sind für Chemotherapeutika wegen der ausbleibenden Replikation und Translation der DNA nicht empfindlich. Diese mit einer Chemotherapie nicht erfassten disseminierten zytokeratinpositiven Zellen („Dormant Cells“) könnten jedoch durch einen nicht bekannten Auslöser und zu einem unbekanntem Zeitpunkt ihr malignes Potential abrufen und dann als klinisch nachweisbare Metastase auftreten, wenn sie nicht vorher vom Immunsystem als entartete Zellen erkannt und vernichtet werden. Somit könnte man das Bestehen einer minimal residualen Erkrankung als Indikator für eine spätere Fernmetastasierung ansehen. Dies macht den Einsatz weiterer Therapieoptionen, die die Präsenz disseminierter zytokeratinpositiver Zellen beeinflusst, naheliegend.

5.2.2 Expression des u-PA-Rezeptors auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark

Wie für uPA wurde in Studien gezeigt, dass eine erhöhte uPA-R-Expression im Primärtumorgewebe mit kürzeren Überlebenszeiten bei z.B. Mammakarzinom (21), Magenkarzinom (39) und großzelligem Lungenkarzinom (77) einhergeht. Durch die Bindung von Vitronektin (45, 96) und Veränderung der Eigenschaften von Integrinen (109) scheint uPA-R in der Lage zu sein, die Zelladhäsion an Matrixproteine und Migration von Zellen und damit die Metastasierung von Primärtumoren im peripheren Gewebe beeinflussen zu können. Wie bereits in Kapitel 5.1.2 gezeigt, konnte ein erhöhter Anteil des fibrinolytischen Systems (uPA, uPA-R, PAI-1 und PAI-2) auf der Seite der Tumorfiliae beim Ovarialkarzinom im Vergleich zum Primärtumor nachgewiesen werden, wobei dieses Proteasensystem zu dem aggressiven Potential von Karzinomzellen beiträgt (94). Zusätzlich konnte die prognostische Relevanz von u-PA- und PAI-1-Gehalt im Primärtumorgewebe des Ovarialkarzinoms für das Gesamtüberleben bestätigt werden (52). Es häufen sich zwingende klinische und experimentelle Beweise, dass durch die Interaktion von uPA mit uPA-R auf der Zelloberfläche eine Bahnung von Karzinomzellen für Extravasation, Intravasation, Proliferation, Migration, Invasion und Neovaskularisation stattfindet (83). Deshalb ist es erforderlich, das fibrinolytische uPA/uPA-R-System auf disseminierten zytokeratinpositiven Einzelzellen zu untersuchen, um

es mit klinischen Parametern wie zum Beispiel rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben zu vergleichen. Heiss et al. (1995) erkannte, dass nicht nur die Anwesenheit von disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark, sondern auch der Phänotyp der einzelnen Karzinomzelle von entscheidender Bedeutung für die Prognose von Patienten ist (37). Wie in Kapitel 5.1.2 bereits eingehend beschrieben, verwendete diese Arbeitsgruppe eine immunzytochemische Doppelfärbung zur Markierung von uPA-R und Zytokeratin 18. Es wurde insgesamt bei 78 Patienten mit Magenkarzinom Knochenmarkaspirationen durchgeführt. Bei 47 von 78 Patienten (60%) zeigten sich zytokeratin-18-positive Zellen im Knochenmark pro 10^6 Zellen zum Zeitpunkt der Primäroperation. Bei diesen 47 Patienten mit positivem Knochenmarkbefund wurden weitere 106 Knochenmarkzellen mittels immunzytochemischer Doppelfärbung (CK18/uPA-R) untersucht, wobei bei 44 von 47 Patienten zytokeratinpositive Zellen gefunden werden konnten. Heiss et al. konnten im Knochenmark bei 20 von 44 Patienten (45%) uPA-R-positive disseminierte zytokeratinpositive Zellen nachweisen. Eine Quantifizierung des uPA-Rezeptors bei dieser Art der Färbung war nicht möglich. Es stellte sich eine Korrelation uPA-R-positiver zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark mit Lymphgefäßinvasion ($p = 0,0359$) und mit PAI-1-Werten im korrespondierenden Primärtumor ($p = 0,0381$) heraus. Außerdem konnte man erkennen, dass der Nachweis uPA-R-positiver zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark einen hoch signifikant prognostischen Faktor für ein Frührezidiv

darstellt und signifikant mit dem pathologischen T-Stadium korreliert. Zusätzlich zeigte sich bei Knochenmarkuntersuchungen im Rahmen des Follow-up bei 16 von 20 (80%) der Patienten mit uPA-R-positivem Knochenmarkbefund zum Zeitpunkt der Primäroperation eine Erhöhung der zytokeratinpositiven Zellzahl im Knochenmark. Dagegen sah man bei Patienten mit uPA-R-negativen Zellen (18 von 24) im Knochenmark eine signifikante Verringerung der zytokeratinpositiven Zellzahl (10 von 18 Patienten), teilweise war sogar ein Nachweis von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark nicht mehr möglich (8 von 18 Patienten) (37). Allgayer und Heiss et al. (1997) konnten bei 58 von 78 Magenkarzinompatienten eine immunzytochemische Doppelfärbung von zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark bei Primäroperation und eine Follow-up Untersuchung durchführen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Korrelation der Expression des u-PA-Rezeptors mit späterer Erhöhung der Anzahl zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark ($p = 0,0009$). Insgesamt stieg die mediane Zellzahl zytokeratinpositiver Zellen mit Expression von uPA-R signifikant während des Follow-up von 5,5 auf 10,0 pro 106 Zellen ($p = 0,008$). Auch die mittlere relative Anzahl von uPA-R-positiven disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark, verglichen mit dem uPA-R-negativen, stieg von 47,9% bei Primäroperation auf 68,6% im Rahmen der Nachuntersuchung an ($p < 0,001$). Dies entsprach hauptsächlich den Patienten mit einem später diagnostizierten Tumorrezidiv (hier stieg die Zellzahl von 63,9% auf 80,7%, $p = 0,001$). Patienten ohne

Tumorrezidiv zeigten dagegen nur einen schwachen Anstieg mit niedrigem uPA-R-positiven Zellanteil (5,7% bei Primäroperation, 7,4% bei Nachuntersuchung). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der uPA-Rezeptor ein Marker sein könnte, welches die Identifikation und die Nachbeobachtung von metastasierungsfähigen Phänotypen disseminierter zytokeratinpositiver Zellen ermöglicht. So könnte man unter zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark uPA-R-positive Zellen differenzieren, die ein individuelles Potential besitzen, Rezidive zu entwickeln (4). 2002 wies Heiss et al. zytokeratin-18-positive Zellen im Knochenmark bei 97 von 156 zum Zeitpunkt der Primäroperation untersuchten Magenkarzinompatienten nach (pro Patient 106 untersuchte Knochenmarkzellen). In 81 Fällen konnten zytokeratinpositive Zellen mit der bekannten immunzytochemischen Doppelfärbung (CK18/uPA-R) wieder aufgefunden werden (pro Patient 106 untersuchte Knochenmarkzellen). Von diesen 81 Patienten konnte bei 47 (58%) mindestens eine zytokeratinpositive Zelle mit positivem uPA-R-Nachweis detektiert werden. Es bestätigte sich die bereits 1995 von Heiss et al. beschriebene Korrelation von uPA-R-positiven Zellen mit der Tumortiefeninvasion, dem pathologischen T-Stadium ($p = 0,0474$). Zudem bestand eine signifikante Assoziation uPA-R-positiver disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark mit einer hohen Konzentration von uPA-R und PAI-1 im korrespondierenden Primärtumor. Das Entscheidende war jedoch hier, dass von 144 kurativ operierten Magenkarzinompatienten der Nachweis mindestens einer uPA-R-

positiven disseminierten Zelle hinweisend war für ein kürzeres rezidivfreies Überleben ($p < 0,0001$). Ebenfalls war das Gesamtüberleben der kurativ resezierten Patienten mit positiven uPA-R-Nachweis signifikant kürzer ($p = 0,0005$). Auch der Nachweis uPA-R-positiver zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark der 156 Patienten, untersucht bei Primäroperation, war ein signifikanter Nachteil für das Gesamtüberleben ($p = 0,0002$). Pathologisches T-Stadium und der Nodalstatus waren in multivariaten Analysen unabhängige Parameter für das rezidivfreie Überleben. Im Rahmen dieser Analyse stellte sich uPA-R auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen als neuer unabhängiger Parameter heraus, mit einem relativen Risiko von 2,35 an einem Tumorrezidiv zu erkranken. Dies konnte man auch für das Gesamtüberleben (relatives Risiko: 2,89) erkennen. Diese Ergebnisse deuten nachdrücklich darauf hin, dass eine einfache Detektion disseminierter zytokeratinpositiver Zellen zum Zeitpunkt der Primäroperation nicht die biologisch relevante minimal residuale Erkrankung suffizient darstellen kann. Zusätzliches molekulares Phänotypisieren dieser Zellen kann helfen, Hochrisiko-Patienten zu bestimmen, die, im Falle eines Tumorrezidivs, eine erneute therapeutische Intervention benötigen könnten (38).

Tögel et al. 2001 konnte bei einer weitaus geringeren Patientenzahl mit einer immunzytochemischen Doppelfärbung (CK18/uPA-R) uPA-R auf zytokeratinpositiven disseminierten Zellen im Knochenmark, peripherem Blut und in mit cytokin-mobilisiertem peripherem Stammzellblut von Mammakarzinompatientinnen nachweisen. Im Knochenmark konnte die

Arbeitsgruppe in 10 von 15 (67%) Fällen und im peripheren Blut in 7 von 10 (70%) Fällen einen uPA-R-positiven Befund auf zytokeratinpositiven Zellen erheben. Es wurde eine signifikant geringere Expression von uPA-R auf detektierten zytokeratinpositiven Zellen in G-CSF-mobilisiertem Stammzellblut (3 von 9 Proben) als im Knochenmark ($p=0,03$), im peripheren Blut ($p = 0,02$) und in beiden Testverfahren gemeinsam ($p=0.02$) nachgewiesen. Eine Korrelation uPA-R-positiver zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark mit dem Krankheitsverlauf oder ein Vergleich mit anderen Prognosefaktoren der Tumorerkrankung wurde hier nicht untersucht (106).

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte bei 11 Patientinnen mit Ovarialkarzinom insgesamt 23 zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark mit einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung ausgewertet werden. Hierbei waren alle 23 zytokeratinpositiven Zellen uPA-R-positiv (100%), allerdings nach der semiquantitativen Analyse mit unterschiedlicher Ausprägung bzw. mit abweichender Rezeptorzahl (Tabelle 15, Abbildung 24).

Die gemittelten uPA-R-Intensitätswerte verschiedener Zellen einer Patientin (Abbildung 25) stellen sich in einigen Fällen korrelierend mit dem Krankheitsverlauf, bzw. dem progressionsfreien Intervall der erkrankten Frauen dar. Diese Aussagen sind jedoch nicht signifikant ($p = 0,077$). Vergleicht man die maximalen uPA-R-Intensitätswerte mit dem rezidivfreien Intervall der 11 untersuchten Patientinnen (Abbildung 26) stellt sich eine signifikante Korrelation heraus ($p = 0,018$). Obwohl man bei einer Fallzahl von

11 Patientinnen von einer statistisch stark fehlerträchtigen Aussage ausgehen muss, kann man hier das aggressive Potential disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark mit dem Auftreten von Frührezidiven beim Ovarialkarzinom in Zusammenhang bringen. Interessant ist hierbei nicht nur die alleinige uPA-R-Positivität für zytokeratinpositive Zellen (vgl. Heiss et al. 1995), sondern die Menge der Rezeptoren auf den disseminierten Zellen und damit die Invasivität der Einzelzelle. Wegen der geringen Patientenzahl (n = 11) der untersuchten Patientinnen ist jedoch eine definitive Aussage über die Korrelation von uPA-R-Maximal- oder gemittelten uPA-R-Werten nicht möglich. In jedem Fall berechtigen aber diese ersten Ergebnisse die Fortführung von Untersuchungen, die Charakterisierungen zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark vornehmen.

Aufgrund der geringen Fallzahl und der dadurch unzureichend prognostischen Aussage werden nun interessante Krankheitsverläufe der untersuchten Patientinnen (Tabelle 15) verglichen und diskutiert:

Patientin N° 2 hatte zum Zeitpunkt der Operation das Tumorstadium FIGO Ia mit einer pathologischen Klassifikation pT1a, G2, pN0, M0. In diesem Fall ist der Tumor auf ein Ovar begrenzt, die Kapsel ist intakt. Eine Fernmetastasierung bestand zum Diagnosezeitpunkt nicht. Trotzdem zeigten sich bei der Patientin disseminierte zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark. Die Patientin entwickelte bei einem uPA-R-Intensitätswert von 11,330 bereits nach 10 Monaten ein Rezidiv.

Patientin N° 8 (Tabelle 15, Abbildung 24) befand sich ebenfalls in einem frühen Stadium ihrer Tumorerkrankung (FIGO Ic, pT1c, G2, pN0, M0). In diesem Stadium ist der Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien, wobei eine Kapselruptur bereits vorhanden ist. Bei einer Nachbeobachtungszeit von 24 Monaten entwickelte die Patientin bis zum Zeitpunkt des Abschlusses der Datenerfassung kein Rezidiv. Der uPA-R-Intensitätswert war auf der nachgewiesenen zytokeratinpositiven Zelle im Knochenmark 1,914. Bei Vergleich der zwei frühen Stadien der Erkrankung kann man eine längere rezidivfreie Überlebenszeit bei einem niedrigen uPA-R-Intensitätswert erkennen.

Dagegen zeigte sich bei Patientin N° 5 (Tabelle 15, Abbildung 24) ein Tumorstadium FIGO IV bei einer pathologischen Klassifikation pT1a, G3, pN0, M1, mit primärer Lebermetastasierung. Ein kuratives Vorgehen war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht mehr möglich. Trotzdem hatte die Patientin bei Abschluss der Datenerfassung nach 19 Monaten progressionsfreiem Intervall und einem uPA-R-Intensitätswert von 19,919 auf einer detektierten zytokeratinpositiven Zelle im Knochenmark noch kein Rezidiv. Bei einem primär metastasierten Ovarialkarzinom war die Patientin N°5 nach 1 1/2 Jahren rezidivfrei bei höheren uPA-R-Intensitätswerten als Patientin N°2 bei einem ähnlichen lokalen Tumorstadium.

Man kann erkennen, dass der Krankheitsverlauf beider Patientinnen mit einem lokalen Tumorstadium pT1 nicht mit dem Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark oder dem uPA-R-Intensitätswert korreliert.

Patientin N° 4 wurde vor und nach einer präoperativen Chemotherapie auf uPA-R-Positivität disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark untersucht (siehe Kapitel 4.3). Zur Zeit der Diagnosestellung des Ovarialkarzinoms befand sich die Patientin im Tumorstadium FIGO III. Vor präoperativer Chemotherapie lag der gemittelte uPA-R-Wert bei 9,5 bei einem Maximalwert von 10,244. Nach präoperativer Chemotherapie konnte erneut ein Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark erfolgen, wobei der gemittelte uPA-R-Wert auf 4,9 sank bei einem Maximalwert von 6,787. Hier sieht man eine Reduktion des uPA-R-Mittel- und Maximalwertes nach applizierter präoperativer Chemotherapie. Man könnte annehmen, dass durch eine Chemotherapie eine Reduktion der Aggressivität zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark erreicht wird. Dennoch entwickelte die Patientin nach 14 Monaten ein Rezidiv.

Die Patientinnen N° 1, 3, 6, 7 und 11 befanden sich bei Diagnosestellung des Ovarialkarzinoms in einem Tumorstadium FIGO III. Patientin N° 1 hatte bereits 7 Monate nach der primären Operation ein Rezidiv und verstarb nach 25 Monaten. Der uPA-R-Mittelwert war bei 18,4 wobei eine zytokeratinpositive Zelle einen Maximalwert von 36,743 vorweisen konnte. Patientin N° 3 hatte ähnlich bereits 8 Monate nach Primäroperation ein Rezidiv bei einem uPA-R-

Mittelwert von 15,6 bei 39,783 als Spitzenwert auf einer der detektierten zytokeratinpositiven Zellen. Patientin N° 11 hatte bei einem uPA-R-Maximalwert von 25,204 nach 19 Monaten ein Rezidiv. Patientin N° 7 hatte nach 17 Monaten keinen Anhalt für ein Rezidiv bei einem gemittelten uPA-R-Wert von 6,2 und einem Maximalwert von 11,153 auf den detektierten disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark. Hier ist es möglich, einen Trend zu erkennen, wobei niedrige uPA-R-Mittel- oder Maximalwerte längere rezidivfreie Überlebenszeiten anzeigen. Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Ergebnissen hatte Patientin N° 6 bei einem uPA-R-Wert von 11,025 bereits nach 11 Monaten ein Rezidiv ihres Ovarialkarzinoms. Dies zeigt, dass bei geringen Fallzahlen ($n = 11$) und bei einer nur kurzen medianen Nachbeobachtungszeiten (17 Monate) eine eindeutige Aussage über Korrelationen gemittelter uPA-R- oder -Maximalwerte mit der rezidivfreien Überlebenszeit oder dem Gesamtüberleben erst nach dem Evaluieren größerer Patientenzahlen erfolgen kann.

5.3 Ausblick und klinische Konsequenzen

Das Untersuchen und Verstehen des Plasminogen/Plasmin-Systems, auch auf disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Knochenmark, könnte neue therapeutische Möglichkeiten für die Behandlung von Karzinomen eröffnen. Zahlreiche Publikationen, sich konzentrierend auf die Hemmung der uPA/uPA-

R-Interaktion, wurden bereits veröffentlicht. Drei Zielpunkte beim uPA/uPA-R-Komplex für therapeutische Interventionen konnten bisher gefunden werden: Hemmung der katalytischen Aktivität von uPA, Hemmung von uPA- oder der uPA-R-Expression durch Oligodesoxynukleotide, und Verhinderung der Formation des uPA/uPA-R-Komplexes (56).

Durch die Blockierung der pro-uPA-Bindung an uPA-R kann die zelloberflächengebundene Plasminogenaktivierung unterbunden werden. Auch mit anti-katalytisch wirksamen Substanzen wie Anti-uPA-Antikörpern, exogen zugeführtem PAI-1/2 oder chemischen Substanzen mit einer Bindungsaffinität an das aktive Zentrum des uPA-Moleküls, kann die Plasminogenaktivierung verhindert werden. Ronne et al. (1991) konnte zeigen, dass durch Blockade der pro-uPA-Bindungsregion mit Anti-uPA-R-Antikörpern die zellgebundene Plasminogenaktivierung aufgehoben werden konnte (87). Zellen, deren uPA-R mittels uPA-Analoga (aminoterminales Fragment von uPA – ATF) gesättigt wurden, zeigten ein stark vermindertes invasives Potential in Matrigel (48, 95). Später konnte dann durch exogene Zufuhr von ATF-UTI-Konstrukten (Urinary Trypsin Inhibitor; ein physiologischer Trypsininhibitor) zu U937-Zellen deren *in vitro* Gewebeinvasionskapazität gesenkt werden (47). Durch Transfektion von ATF in uPA- und uPA-R-produzierenden Tumorzellen konnte eine beträchtliche Reduktion der Metastasierungsrate von humanen Prostatakarzinomzellen in Mäusen erreicht werden (25). Andere Arbeitsgruppen konnten durch einen Zusatz von löslichen uPA-R (suPA-R) zu uPA- und uPA-R-positiven

Tumorzellen eine Inhibierung der Invasionskapazität der Zellen nachweisen (111). Der Effekt der Applikation von löslichen uPA-R (suPA-R) konnte auch in einem *in vivo*-Modell in Mäusen, denen intraperitoneal Ovarialkarzinomzellen (OV-MZ-6#8) injiziert wurden, dargestellt werden. Hier konnte man eine Reduktion des Tumorzellwachstums und der intraperitonealen Tumorzellaussaat bei zusätzlicher intraperitonealer Applikation von suPA-R erkennen (55). Auch durch die Zugabe von PAI-1 und PAI-2 zu uPA- und uPA-R-positiven Zellkulturen konnte der Matrixabbau nachweislich inhibiert werden (81). Fischer K et al. (1998) konnten den Beweis liefern, dass durch Zusatz von uPA zu Ovarialkarzinomzelllinien (OV-MZ-6) die Zellteilungsrate deutlich gesteigert wurde und durch Blockierung der uPA/uPA-R Interaktion mit dem monoklonalen Antikörper IIIIF10 oder durch Zusatz von suPA-R während der uPA-Stimulationsperiode gleichzeitig signifikant gemindert werden konnte (31). Die Arbeitsgruppen um Towle M. (1993) und Wilhem O. (1995) konnten mit spezifischen uPA-Inhibitoren oder uPA Antisense-Oligonukleotiden eine Reduktion der Tumorinvasivität bzw. Metastasierung von Ovarialkarzinom bei Mäusen erreichen (107, 110). Ebenfalls konnte auf Transkriptionsebene, durch Applikation von Antisense-uPA-R Konstrukten aus Adenoviren (Ad-uPA-R) die Tumorinvasion und das Tumorzellwachstum beim Gliom *in vitro* und in einem *in vivo*-Modell bei Mäusen merklich gehemmt werden (61). Die Ergebnisse von v. Billström et al. (1995), der mit einem schwachen unspezifischen Serinproteasen-Inhibitor (p-aminobenzamidine), welcher signifikant das

Tumorzellwachstum von Prostatakarzinomzellen bei Mäusen reduzierte (6) und die Ergebnisse von Rabbani et al.(1995), der mit B428 – ein selektiverer Serinproteasen-Inhibitor – das Tumorzellwachstum und Metastasierung vom Prostatakarzinom bei Ratten hemmte (79) ließen das Interesse an der Entwicklung von potenteren und selektiveren uPA-Inhibitoren wachsen. Ein uPA-Inhibitor (WX-UK1) wurde von der Firma Willex (www.willex.com) entwickelt und befindet sich bereits in klinischen Phase-I-Studien. Hier wird die Wirksamkeit des niedermolekularen Serinproteasen-Inhibitors bei soliden Tumoren in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien von Mamma-, Ovarial- und Magenkarzinomen sowohl in WX-UK1-Monotherapie als auch in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Capecitabine (Firma Xeloda – www.xeloda.com) getestet. Präklinische Untersuchungen haben synergistische Effekte der Kombinationsgabe von WX-UK1 mit bestimmten Chemotherapeutika (Capecitabine) hinsichtlich der Reduzierung der Metastasenbildung und des Primärtumorwachstums gezeigt (www.willex.com).

Bislang wird das Phänotypisieren von disseminierten zytokeratinpositiven Zellen im Rahmen der minimal residualen Erkrankung zur Festlegung der Prognose der Patienten, für das Monitoring des Ansprechens einer Chemotherapie oder für die Planung individualisierter Therapieformen nur in Studien angewandt. Als erste Therapieansätze in diese Richtung erwies sich die spezifische, Antikörper-basierende Therapie gegen Antigene wie HER-2/neu

oder 17-1A (auch bekannt als EGP40 oder EpCAM) bei Patienten mit Mamma- und Kolonkarzinom als effektiv (85, 99).

Obwohl das Skelettsystem nicht ein bevorzugter Metastasierungsort des Kolonkarzinoms darstellt, konnten zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark bei rund 30% von Dukes`C Patienten nachgewiesen werden, die keine klinischen Anzeichen einer Fernmetastasierung (Stadium M0) hatten (85).

Braun S und Pantel K (1995) demonstrierten, dass die intravenöse Applikation des monoklonalen Antikörpers 17-1A (gerichtet gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM) bei Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium Dukes` C signifikant die Gesamttodesrate um 30 % und die Rezidivrate um 27 % verringern konnte (14). Unter Riethmüller G. et al. (1998) wurde in einer multizentrischen randomisierten Studie mit einem siebenjährigen Follow-up die Gesamtüberlebens- und Rezidivrate von Patienten (n = 189) mit reseziertem Dukes` C kolorektalem Karzinom untersucht. Ein Teil der Patienten (n = 99) erhielt eine präoperative Infusion von 900 mg 17-1A Antikörper, postoperativ eine Infusion von 500 mg 17-1A Antikörper und dann 4-monatlich 100 mg 17-1A Antikörper. Eine zweite Patientengruppe (n = 90) wurde nur beobachtet. Es zeigte sich der Erfolg der Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper 17-1A mit einer Reduktion der Rezidivrate um 23% und der Gesamtmortalität um 32%. Dies ergab einen signifikanten Effekt für das Gesamtüberleben und rezidivfreie Überlebenszeit für die Patienten (n = 99), die adjuvant mit dem monoklonalen Antikörper therapiert wurden. Beachtlich ist, dass 17-1A

Antikörper, verabreicht nach der operativen Entfernung des Tumors, die Entwicklung von Fernmetastasen in nahezu einem Drittel der Patienten verhinderte. Während die Fernmetastasen signifikant reduziert werden konnten, konnte dies für die Entstehung eines Lokalrezidivs nicht erreicht werden (85).

Die Inzidenz eines Lokalrezidivs nach kompletter Resektion eines soliden malignen Tumors (R0) hängt im großen Maß von der Fertigkeit des Chirurgen ab, wobei das Auftreten von Metastasen in distalen Organen durch prä- oder perioperative systemische Tumorzellaussaat bedingt ist. Die Präsenz von disseminierten zytokeratinpositiven Zellen, z.B. im Knochenmark als Indikatororgan, kann mit Immunfluoreszenz und sensitiven immunzytochemischen Methoden nachgewiesen werden und wird als klinischer prognostischer Faktor betrachtet.

Im Unterschied zu soliden Metastasen im Tumorzellverband sind einzelne, isolierte, potentiell mikrometastatische Tumorzellen passendes Ziel für intravenös applizierte Antikörper-Therapie gegen Karzinomzellen. Die Mehrheit disseminierter Tumorzellen scheinen nicht-proliferierende Zellen zu sein, welche sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden und sind damit nicht erreichbar für Chemotherapien. Dies könnte das Scheitern konventioneller adjuvanter Chemotherapien erklären (75). Im Falle des Versagens konventioneller Chemotherapieformen wäre es möglich, aggressive Faktoren, z.B. den uPA/uPA-R-Protease-Komplex, auf minimal residualen Zellen zu inhibieren, um so ihr invasives Potential zu verringern (s.o.). Die weitere

Erforschung des uPA/uPA-R-Systems wird die klinische Wirksamkeit der Inhibitoren des Plasminogenaktivators und dessen Rezeptor in der Tumorthherapie zeigen. Das Detektieren disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark und das Charakterisieren deren biologischer Heterogenität wird im weiteren Verlauf Erkenntnisse über die individuelle Tumorbilogie und neue Ziele für eine individualisierte adjuvante Therapie liefern.

6. Zusammenfassung

Nachweis und Charakterisierung disseminierter zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark gewinnen durch den Einsatz tumorbiologischer Therapieformen (z.B. Antikörpertherapie) zunehmend an klinischer Bedeutung. Der uPA-Rezeptor (CD87) spielt in der Tumorbiologie sowohl bei Invasion und Metastasierung als auch bei Adhäsion und Migration der Tumorzellen eine wichtige Rolle. In dieser Doktorarbeit wurde versucht die folgenden zwei Fragestellungen zu beantworten: Lassen sich uPA-R-positive, zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark beim Ovarialkarzinom nachweisen? Korrelieren Nachweis zytokeratinpositiver Zellen und CD87-Expression mit klinischen Parametern und Krankheitsverlauf?

Es erfolgte in einer prospektiven Untersuchung bei 60 Patientinnen mit Ovarialkarzinom unmittelbar präoperativ die Entnahme eines Knochenmarkspirats aus dem Beckenkamm. Eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung des Knochenmarkpräparats wurde mit dem anti-Zytokeratin-Antikörper A45B/B3 und HU277, einem Antikörper gegen uPA-Rezeptor, durchgeführt. Anschließend wurden die Knochenmarkspirate mittels konfokaler Laserscanmikroskopie auf zytokeratinpositive Zellen untersucht. Der uPA-R-Gehalt konnte bei 11 Patientinnen quantifiziert werden.

Sieben von 30 (23%) Patientinnen, untersucht vor Therapiebeginn, hatten zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark. Der Vergleich klinischer Parametern mit dem Nachweis zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark

ergab signifikante Unterschiede im FIGO-Stadium, pT-Stadium und dem Tumormarker CA 12-5 im Serum. Eine Korrelation mit dem rezidivfreien –und Gesamtüberleben bestand nicht. Bei 6 von 21 (28%) Patientinnen, untersucht nach präoperativer Chemotherapie, waren zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark detektiert worden. Signifikante Abweichungen zwischen Knochenmarkbefund und Grading konnte beobachtet werden. Gemittelte uPA-R-Intensitätswerte auf zytokeratinpositiven Zellen zeigten keine signifikante Korrelation zum progressionsfreien Intervall. Jedoch korrelierten maximale uPA-R-Intensitätswerte signifikant mit dem rezidivfreien Überleben (n = 11).

Obwohl das Skelettsystem beim Ovarialkarzinom keine Prädilektionsstelle für die Fernmetastasierung darstellt, konnte bei 23 bzw. 28% der Patientinnen mit Ovarialkarzinom disseminierte zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Der alleinige Nachweis zytokeratinpositiver Zellen korrelierte nicht mit dem Krankheitsverlauf beim Ovarialkarzinom. Für tumorbiologische Therapieansätze stellen die auf disseminierte Zellen im Knochenmark exprimierten Antigene, wie der uPA-Rezeptor, interessante Zielstrukturen dar. Die weitere Nachbeobachtung der Patientinnen ist notwendig, um die klinische Bedeutung dieser zytokeratinpositiven, uPA-R-positiven Zellen für Prognose und Prädiktion des Ansprechens auf Chemotherapie abzugrenzen.

7. Literaturverzeichnis

- 1) Abdul-Karim FW, Kida M, Wentz WB, Carter JR, Sorensen K, Macfee M, Zika J, Makley JT. Bone metastasis from gynecologic carcinomas: A clinicopathologic study. *Gynecol Oncol* 39:108-114 (1990)
- 2) Allgayer H, Heiss MM, Riesenberger R, Babic R, Jauch KW, Schilberg FW. Immunocytochemical phenotyping of disseminated tumor cells in bone marrow by uPA Receptor and CK18 : Investigation of sensitivity and specificity of an immunogold/alkaline phosphate double staining protocol. *J Histochem Cytochem* 45:203-212 (1997)
- 3) Allgayer H, Babic R, Grutzner KU, Beyer BC, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: Analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns. *Clin Exp Metastasis* 16:62-73 (1998)
- 4) Allgayer H, Heiss MM, Riesenberger R, Grutzner KU, Tarabichi A, Babic R, Schildberg FW. Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R) : one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual disease. *Cancer Res* 57(7):139-9 (1997)
- 5) Berzowski K, Stastny JF, Kornstein MJ. Cytokeratin 7 and 20 and carcinoembryonic antigen in ovarian and colonic carcinoma. *Mod. Pathol.* 9:426-429 (1996)
- 6) Behrendt N, Ploug M, Patthy L, Houen G, Blasi F, Dano K. The ligand-binding domain of the cell surface receptor for urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 266:7842-7847 (1991)
- 7) Blasi F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness. *BioEssays* 15:105-111 (1993)
- 8) Borglum AD, Byskov A, Ragno P, Roldan AL, Triputti P, Cassani G, Dano K, Blasi F, Bolund L, Kruse TA. Assignment of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene (PLAUR) to chromosome 19q13.1-q13.2. *Am J Hum Genet* 50:492 (1992)
- 9) Braun S, Muller M, Hepp F, Schlimok G, Riethmuller G, Pantel K. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 90:1099-1101 (1998)
- 10) Braun S, Hepp F, Sommer HL, Pantel K. Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells : implications of immunotherapy of minimal residual disease. *Int J Cancer* 84(1):1-5 (1999)
- 11) Braun S, Schindelbeck C, Hepp F, Jenni W, Kentenich C, Riethmuller G, Pantel K. Occult tumor cells in Bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J Clin Oncol* 19:368-375 (2001)

- 12) Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 18:80-86 (2000)
- 13) Braun S, Pantel K. Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow. *Cancer and Metastasis Reviews* 18:75-90 (1999)
- 14) Braun S, Pantel K. Immunodiagnosis and immunotherapy of isolated tumor cells disseminated to bone marrow of patients with colorectal cancer. *Tumori* 81(3):78-83 (1995)
- 15) Braun S, Pantel K. Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance. *Medical Oncology* 16:154-165 (1999)
- 16) Braun S. Tumorzellen im Knochenmark von Krebspatienten – Ihre Charakterisierung mit Hilfe einer Immunogold-alkalische-Phosphatase-Doppelmarkierungstechnik. *Dissertationsarbeit* (1997)
- 17) Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br. J. Cancer* 71:278-281 (1995)
- 18) Cain JM, Ellis GK, Collins C, Greer BE, Tamimi HK, Figge DC, Gown AM, Livingston RB. Bone marrow involvement in epithelial ovarian cancer by immunocytochemical assessment. *Gynecol Oncol* 38:442-445 (1990)
- 19) Carlin B, Jaffe R, Bender B, Chung AE. Entactin a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 256: 5209- 5214 (1981)
- 20) Casey JR, Petranka JG, Kottra J, Fleenor DE, Rosse WF. The structure of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *Blood* 84:1151-1156 (1994)
- 21) Constantini V, Sidoni A, Devegilia R, Cazzato OA, Bellezza G, Ferri I, Bucciarelli E, Nenci GG. Combined overexpression of urokinase, urokinase receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 is associated with breast cancer progression. *Cancer* 77:1079-1088 (1996)
- 22) Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford Ka, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32:219-229 (1984)
- 23) Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B, Shi SR, Harvey J, Chen SC, Sherrod AE, Groshen S, Taylor CR. Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg* 222(4):415-425 (1995)

- 24) Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osbome MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 9:1749-1756 (1991)
- 25) Crowley GW, Cohen RL, Lucas BK, Liu G, Shuman MA, Levinson AD. Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5021-5025 (1993)
- 26) Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Oncol.* 12:475-482 (1994)
- 27) Dauplat J, Hacker NF, Nieberg RK, Berek JS, Rose TP, Sagae S. Distant metastases in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 60:1561-1566 (1987)
- 28) Delsol G, Gatter KC, Stein H, Erber WN, Pulford KA, Zinne K, Mason DY. Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. *Lancet* 2:1124-1128 (1984)
- 29) Deutsche Krebsgesellschaft und die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. Diagnostische und therapeutische Standards beim Ovarialkarzinom. (ICD 183) (2000)
- 30) Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 88(22):1652-8 (1996)
- 31) Fischer K, Lutz V, Wilhelm O, Schmitt M, Graeff H, Heiss P, Nishiguchi T, Harbeck N, Kessler H, Luther T, Magdolen V, Reuning U. Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function. *FEBS Lett.* 438(1-2):101-5 (1998)
- 32) Ganesh S, Sier CF, Heerding MM, Griffioen G, Lamers CB, Verspaget HW. Urokinase receptor and colorectal cancer survival. *Lancet* 344:401-402 (1994)
- 33) Geisler JP, Wiemann MC, Miller GA, Geisler HE. Estrogen progesterone receptor status as prognostic indicators in patients with optimally cytoreduced stage IIIc serous cystadenocarcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 60:424-427 (1996)
- 34) Graeff H. Prognostic impact and clinical relevance of tumor-associated proteases in breast cancer. *Fibrinolysis* 6:45-53 (1992)
- 35) Hacker NF, Berek JS, Lagasse LD, Nieberg RK, Elashoff RM. Primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 61:413-420 (1983)
- 36) Harbeck N, Untch M, Pache L, 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* 69:566-571 (1994)

- 37) Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow : a reference to early sytemic disease in solid cancer. *Nat Med.* 1(10):1035-9 (1995)
- 38) Heiss MM, Simon EH, Beyer BC, Gruetzner KU, Tarabichi A, Babic R, Schildberg FW, Allgayer H. Minimal residual disease in gastric cancer: Evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. *J Clin Oncol* 20(8):2005-16 (2002)
- 39) Heiss MM, Babic R, Allgayer H, Gruetzner KU, Jauch KW, Loehrs U, Schildberg FW. Tumor associated proteolysis and prognosis : New functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system. *J Clin Oncol* 13:2084-2093 (1995)
- 40) Heyderman E. Epithelial membrane antigen and lymphoid cells. *Lancet* 1:109 (1985)
- 41) Hoskins WJ, Bundy BN, Thigpen JT, Omura GA. The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small-volume stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 47:159-166 (1992)
- 42) Hugh RK, Barber HR. *New Frontiers in Ovarian Cancer Diagnosis and Management.* Yale Journal of Biology and Medicine 64, 127- 141 (1991)
- 43) Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, Graeff H. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node- negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24:195-208 (1993)
- 44) Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R, Eissner HJ, Riethmueller G, Schildberg FW. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 14(6):1810-7 (1996)
- 45) Kanse S.M., Kost C, Wilhelm OG, Andreasen PA, Preissner KT. The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein endothelial cells. *Exper. Cell. Res.* 224: 344-353 (1996)
- 46) Kasper M, Stosiek P, Typlt H, Karsten U. Histological evaluation of three new monoclonal anti-cytokeratin antibodies. 1. Normal tissues. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23:137-147 (1987)
- 47) Kobayashi H, Gotho J, Hirashima Y, Fujie M, Sugino D, Terao T. Inhibitory effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro. *J. Biol. Chem.* 270: 8361-8366 (1995)
- 48) Kobayashi H, OHi H, Shinohara H, Sugimura M, Fujii T, Terao T, Schmitt M, Goretzki L, Chucholowski N, Janicke F. Saturation of tumor cell surface receptors for urokinase-type plasminogen activator

- by amino-terminal fragment and subsequent effect on reconstituted basement membranes invasion. *Br. J. Cancer* 67: 537-544 (1993)
- 49) Kramer MD, Spring H, Todd RF, Vettel U. Urokinase-type plasminogen activator enhances invasion of human T-cells (Jurkat) into a fibrin matrix. *J Leukocyte Biol* 56:110-116 (1994)
 - 50) Kuhn W, Janicke F, Pache L, Holscher M, Schattenmann G, Schmalfeldt B, Anderl H, Schule G, Dettmar P, Siewert JR. Entwicklung in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms FIGO III. *Geburtsh Frauenheilk* 53:293-302 (1993)
 - 51) Kuhn W. The Influence of upper abdominal surgery on perioperative morbidity and mortality in patients with advanced ovarian cancer FIGO III and FIGO IV. *Int J Gynecol Cancer* 8:56-63 (1998)
 - 52) Kuhn W, Schmalfeldt B, Reuning U, Pache L, Berger U, Ulm K, Harbeck N, Späthe K, Dettmar P, Hofler H, Janicke F, Schmitt M, Graeff H. Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br J Cancer* 79(11-12):1746-51 (1999)
 - 53) Lengyel E, Schmalfeldt B, Konik E, Späthe K, Harting K, Fenn A, Berger U, Fridman R, Schmitt M, Prechtel D, Kuhn W. Expression of latent matrix metalloprotease 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 82(2):291-8 (2001)
 - 54) Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 340(8821):685-9 (1992)
 - 55) Lutz V, Reuning U, Kruger A, Luther T, von Steinburg SP, Graeff H, Schmitt M, Wilhelm OG, Magdolen V. High level synthesis of recombinant soluble urokinase receptor (CD87) by ovarian cancer cells reduces intraperitoneal tumor growth and spread in nude mice. *Biol Chem* 382:789-798 (2001)
 - 56) Magdolen V, Kruger A, Sato S, Nagel J, Sperl S, Reuning U, Rettenberger P, Magdolen U, Schmitt M. Inhibition of the tumor-associated urokinase-type plasminogen activation system : effects of high-level synthesis of soluble urokinase receptor in ovarian and breast cancer cells in vitro and in vivo. *Recent Results Cancer Res* 162:43-63 (2003)
 - 57) Magdolen V, Rettenberger P, Lopens A, Oi H, Lottsoeich F, Kellermann J, Creutzburg S, Goretzki L, Weidle UH, Wilhelm O. Expression of the human urokinase-type plasminogen activator receptor in E.coli and Chinese hamster ovary cells: Purifikation of the recombinant proteins and generation of polyclonal antibodies in chicken. *Electrophoresis* 16:813- 816 (1994)

- 58) Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* 254(9174):197-202 (1999)
- 59) Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry in tumor invasion. *Physiol. Rev.* 73:161- 195 (1993)
- 60) Min HY, Semnani R, Mizukami IF, Watt K, Todd RF 3rd, Liu DY. cDNA for Mo3, a monocyte activation antigen, encodes the human receptor for urokinase plasminogen activator. *J Immunol* 148:3636, 1992
- 61) Mohan PM, Chintala SK, Mohanam S, Gladson CL, Kim ES, Gokaslan ZL, Lakka SS, Roth JA, Fang B, Sawaya R, Kyritsis AP, Rao JS. Adenovirus-mediated delivery of antisense gene to urokinase-type plasminogen activator receptor suppresses glioma invasion and tumor growth. *Cancer Res* 59:3369-3373 (1999)
- 62) Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. Catalogue of human cytokeratins, Patterns of expression in normal epithelia, tumours and cultured cells. *Cell* 31:11-24 (1982)
- 63) Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons D, McCarthy P, Parfrey NA, O'Donoghue DP, Sheahan K. Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes' B colorectal cancer. *Lancet* 344:583-584 (1994)
- 64) Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, Roder JD, Fink U, Siewert JR. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 54:2900-2907 (1994)
- 65) Nekarda H, Schlegel P, Schmitt M, Stark M, Mueller JD, Fink U, Siewert JR. Strong prognostic impact of tumor-associated urokinase-type plasminogen activator in completely resected adenocarcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 4:1755-1763 (1998)
- 66) Noack F, Helmecke D, Rosenberg R, Thorban S, Nekarda H, Fink U, Lewald J, Stich M, Schutze K, Harbeck N, Magdolen V, Graeff H, Schmitt M. CD-87 positive tumor cells in bone marrow aspirates identified by confocal laser scanning microscopy. *Int J Oncol* 15:617-23 (1999)
- 67) Noack F, Schmitt M, Bauer J, Helmecke D, Kruger W, Thorban S, Sandherr M, Kuhn W, Graeff H, Harbeck N. A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: Methodological advances and clinical implications. *Int J Biological Markers* (2000)
- 68) Ohgami A, Mitsudomi T, Sugio K, Tsuda T, Oyama T, Nishida K, Osaki T, Yasumoto K. Micrometastatic tumor cells in bone marrow of patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 64(2):363-7 (1997)
- 69) Ovarialkarzinom - State of the Art in Diagnostik und Therapie. Symposium der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie

- (AGO) Hamburg, 1./2. Oktober 1999. Wissenschaftliche Leitung: Prof. Dr. Fritz Jänicke, Hamburg (1999)
- 70) Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85:1419-1424 (1993)
 - 71) Pantel K et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 347(9002):649-53 (1996)
 - 72) Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, Riethmuller G. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res* 51:4712-4715 (1991)
 - 73) Pantel K, Ahr A. Immunocytochemical and molecular strategies for the detection of micrometastases in patients with solid epithelial tumours: A review. *Nuclear Medicine Communications* 19:521-527 (1998)
 - 74) Pantel K, Otte M. Disseminated Tumor Cells: Diagnosis, prognostic relevance, and phenotyping. *Recent Results in Cancer Research*, Vol. 158, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (2001)
 - 75) Pantel K, von Knebel Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmuller G. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Chirurg* 68(12):1241-50 (1997)
 - 76) Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmuller G. Methodological analysis of immunocytochemical screening of disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 3:165-173 (1994)
 - 77) Pedersen H, Grondahl-Hansen J, Francis D, Osterlind K, Hansen HH, Dano K, Brunner N. Urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in pulmonary adenocarcinoma.. *Cancer Res* 54:120-13 (1994)
 - 78) Ploug M, Ronne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Dano K. Cellular receptor for urokinase plasminogenactivator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Biol. Chem.* 266(3):1926-1933 (1991)
 - 79) Rabbani SA, Harakidas P, Davidson DJ, Henkin J, Mazar AP. Prevention of prostate cancer metastasis in vivo by novel synthetic inhibitor of urokinase-type plasminogen activator (uPA). *Int J Cancer* 63:840-845 (1995)
 - 80) Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* II:1271-1274 (1983)

- 81) Reiter LS, Kruithof EK, Cajot JF, Sordat B. The role of the urokinase receptor in extracellular matrix degradation by HT29 human colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 53:444-450 (1993)
- 82) Rettenberger P. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades. Klonierung und Expression von Mutanten des humanen Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp (uPA) und seines Rezeptors (uPA-R) zur Analyse der uPA/ uPA-R-Interaktion (1996)
- 83) Reuning U, Sperl S, Kopitz C, Kessler H, Kruger A, Schmitt M, Magdolen V.. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPA-R): Development of antagonists of uPA/uPA-R Interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des* 9(19):1529-43 (2003)
- 84) Riesenberger R, Oberneder R, Kriegmair M, Epp M, Bitzer U, Hofstetter A, Braun S, Riethmüller G, Pantel K. Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumor cells. *Histochemistry* 99:61-66 (1993)
- 85) Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmayr R. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes`C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 16:1788-94 (1998)
- 86) Roggel F, Hocke S, Lindemann K, Sinz S, Welk A, Bosl M, Pabst M, Nusser N, Braun S, Schmitt M, Harbeck N. Minimal residual disease in breast cancer and gynecological malignancies: Phenotype and clinical relevance. *Recent Results Cancer Res.* 162:89-100 (2003)
- 87) Ronne E, Behrendt N, Ellis V, Ploug M, Dano K, Hoyer-Hansen G. Cellinduced potentiation of the plasminogen activation system is abolished by a monoclonal antibody that recognizes the NH₂-terminal domain the urokinase receptor. *FEBS Lett.* 288:233-236 (1991)
- 88) Ross AA, Miller GW, Moss TJ, Kahn DG, Warner NE, Sweet DL, Louie KG, Schneidermann E, Pecora AL, Meagher RC. Immunocytochemical detection of tumor cells in bone marrow and peripheral blood stem cell collections from patients with ovarian cancer. *Bone Marrow Transplantation* 15:929-933 (1995)
- 89) Scarabelli C, Gallo A, Franceschi S, Campagnutta E, De G, Giorda G, Visentin MC, Carbone A. Primary cytoreductive surgery with rectosigmoid colon resection for patients with advanced epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 88:389-397 (2000)
- 90) Schlimok G, Riethmüller G. Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow. *Semin Cancer Biol* 1:207-215 (1990)
- 91) Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J, Riethmüller G. Micrometastatic tumour cells in bone marrow of

- patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer* 27(11):1461-5 (1991)
- 92) Schlimok G, Funke I, Bock B, Schweiberer B, Witte J, Riethmuller G. Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance. *J Clin Oncol* 8:831-837 (1990)
 - 93) Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, Späthe K, Ruthke S, Konik E, Fridmann R, Berger U, Schmitt M, Kuhn W, Lengyel E. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9 and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 7(8): 2396-404 (2001)
 - 94) Schmalfeldt B, Kuhn W, Reuning U, Pache L, Dettmar P, Schmitt M, Janicke F, Hofler H, Graeff H. Primary tumor and metastasis in ovarian cancer differ in their content of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitors types 1 and 2. *Cancer Res.* 55(18):3958-63 (1995)
 - 95) Schmitt M. The urokinase plasminogen activator system as a novel target tumor therapy. *Fibrinol Proteol* 14:114-132 (2000)
 - 96) Schmitt M. Biology of Vitronectins and their Receptor. *International Congress Series 1993, Excerpta Medica 1042, Elsevier, Amsterdam* 331-341 (1993)
 - 97) Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and his receptor (CD87): a new target in tumorinvasion and metastasis. *J. Obstet. Gynaecol.* 21:151- 165 (1995)
 - 98) Scully RE. Pathology of ovarian cancer. In: Gershenson GM, McGuire WP (Hrsg) *Ovarian Cancer. Controversies in management.* Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, San Francisco, Tokyo 425-444 (1998)
 - 99) Slamon D. Addition of herceptin (humanized anti-HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+/MBC) markedly increases anti-cancer activity: A randomized, multinational controlled phase III trial *ASCO Proc* 1998:377
 - 100) Späthe K. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades. Stellenwert der Oberbauchchirurgie bei der Behandlung des fortgeschrittenen Ovariakarzinoms FIGO III und FIGO IV (1997)
 - 101) Stigbrand T, Andres C, Bellanger L, Bishr Omary M, Bodenmuller H, Bonfrer H, Brundell J, Einarsson R, Erlandsson A, Johansson A, Leca JF, Levi M, Meier T, Nap M, Nustad K, Seguin P, Sjodin A, Sundstrom B, van Dalen A, Wiebelhaus E, Wiklund B, Arlestig L, Hilgers J. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens : the ISOBM TD5-1 workshop. *Tumor Biol* 19:132-152 (1998)

- 102) Stimpfl M, Schmid BC, Schiebel I, Tong D, Leodolter S, Obermair A, Zeillinger R. Expression of mucins and cytokeratines in ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett.* 145(1-2):133-41 (1999)
- 103) Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Moss F, Beverley P. Monoclonal antibodies to epithelial membrane antigen and human milk fat globule mucin define epitopes expressed on other molecules. *Lancet* 1:458 (1985)
- 104) Thorban S, Roder JD, Nekarda H, Funk A, Pantel K, Siewert JR. Disseminated epithelial tumor cells in bone marrow of patients with esophageal cancer: detection and prognostic significance. *World J Surg* 20(5):567-73 (1996)
- 105) Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kuhn K. A network for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur. J. Biochem.* 120:203-211 (1981)
- 106) Tögel F, Datta C, Badbaran A, Kroger N, Renges H, Giesecking F, Janicke F, Zander AR, Kruger W. Urokinase-like plasminogen activator receptor expression on disseminated breast cancer cells. *J Hematother Stem Cell Res* 10:141-145 (2001)
- 107) Towle M, Lee A, Maduakor EC, Schwartz CE, Bridges AJ, Littlefield BA. Inhibition of urokinase by 4-substituted benzol[b]thiophene-2-carboxamidines: an important new class of selective urokinase inhibitors. *Cancer Res.* 53:2553-2559 (1993)
- 108) Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. *Maligne Ovarialtumoren* (2001)
- 109) Wei Y. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 273:1551-1555 (1996)
- 110) Wilhelm O, Schmitt M, Hohl S, Senekowitsch R, Graeff H. Antisense inhibition of urokinase reduces spread of human ovarian cancer in mice. *Clin. Exp. Metastasis* 13:296-302 (1995)
- 111) Wilhelm O, Weidle U, Hohl S, Rettenberger P, Schmitt M, Graeff H. Recombinant soluble urokinase receptor as scavenger for urokinase-type plasminogen activator (u-PA). *FEBS Lett.* 337: 131-134 (1994)
- 112) Zia A, Schildberg FW, Funk I. MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in R0 M0 breast cancer patients. *Int J Cancer* 93(4):566-70 (2001)

8. Liste verwendeter Materialien

Cytospin:

Röhrchen 15ml: Falcon 352096

Röhrchen 50ml: Falcon 352070

Glaspipetten: Pasteurpipetten Firma Volac 150mm/230 mm

Objektträger: 76x26mm Menzel-Gläser

Filterpapierchen: Shandon filter cards 5991022

Zentrifuge: Sigma 4K15

Cytozentrifuge: Shandon Cytospin 2

Cytoclips stainless steel slide clip von Shandon

Cytofunnel von Shandon

Neubauerzählkammer

Biocoll Density 1.077 von Firma Biochrom KG

PBS

Reagenzien:

Biocoll Density 1.077 von Firma Biochrom KG

Albumin bovine Fraction V, pH 7,0 von Serva

Paraformaldehyde pure von Serva

Saponin von Serva

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

Liquemin N 25000 5ml, Roche

Färbung:

Antikörper:

A45B/B3 mAb, mouse, 1,0 mg/ml in PBS ph 7,4, Micromet GmbH

A45B/B3, Cy3 1mg/ml, Micromet GmbH

A45B/B3, Cy3,5 1mg/ml, Micromet GmbH

HU 277 pAb, chicken, PD Dr. Viktor Magdolen, Frauenklinik, TU München

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

Alexa Fluor 568 goat anti chicken IgG 2mg/ml, Molecular Probes

Deckgläschen: Marienfeld 18x18mm

Fixogumm, Marabu

Fettstift: DAKO Pen

May-Grünwald-Giemsa-Färbung:

May-Grünwald, Merck KGaA

Giemsa, Merck KgaA

Mikroskope:

Laser Leica: TCS 40

CLSM Software von Leica: Scanware 3.61

Mikroskop von Zeiss: Axiovert 35

Lichtmikroskop von Leitz, Wetzlar

Knochenmarkaspiration:

Stanznadel: Gallini s.r.l., Italy, biopsy needle

Skalpell: Feather Safety Razor CO., LTD. Medical Division, Japan, Fig.11

Spritzen: Einmalspritze 5ml, B/Braun MelsungenAG

Einmalspritze 10 ml, B/Braun MelsungenAG

Lochtuch: Foliodrape 50x60, Paul Hartmann AG

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

1. Herrn Prof. Dr. H. Graeff für die Möglichkeit, diese Forschungsarbeit an der Frauenklinik der Technischen Universität München durchzuführen.
Frau Prof. Dr. M. Kiechle für die Möglichkeit, diese Untersuchung an dieser Klinik fortzuführen.
2. Prof. Dr. M. Schmitt für die Möglichkeit, diese Forschungsarbeit innerhalb der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München durchzuführen.
3. Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. N. Harbeck, für die Überlassung des Themas, und für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Doktorarbeit im Labor.
4. Bei Herrn Prof. Dr. W. Kuhn, Frau Prof. Dr. B. Schmalfeldt und Frau Dr. K. Späthe möchte ich mich für die Betreuung im klinischen Teil der Dissertationsarbeit bedanken.
5. Mein herzlicher Dank gilt außerdem Herrn D. Helmecke (MTA), Frau A. Welk (MTA) und Frau A. Wölfel-Hoffmann (Studiensekretärin) für die Hilfe im Labor und bei der Datenerhebung. Außerdem danke ich Frau R. Hollweck (Statistikerin am Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München) für Hilfestellungen und die Durchsicht statistischer Berechnungen.

10. Lebenslauf

Name: Martin Bosl
Geburtsort: München
Geburtsdatum: 07.01.1973
Familienstand: ledig
Vater: Dr. med. Günther Bosl, Facharzt für Frauenkrankheiten und Geburtshilfe
Mutter: Roswitha Bosl, geborene Lang

1979 bis 1983 Grundschule an der Ostpreußenstraße in München
1983 bis 1987 Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium in München
1987 bis 1993 Pater-Rupert-Mayer-Gymnasium in Pullach
1993 bis 1995 Studium des Bauingenieurwesens an der Technischen Universität München
1995 bis 1997 Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität Budapest
1997 bis 1998 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität Dresden
1998 bis 2002 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
2002 Staatsexamen der Humanmedizin

Dissertation: 01.10.1999 bis 01.11.2000 Durchführung des experimentellen Teils der Doktorarbeit an der Frauenklinik der Technischen Universität München

01.06.02 bis 30.11.03 Arzt im Praktikum in der Urologischen Abteilung des städtischen Krankenhauses München-Harlaching unter der Leitung von Prof. Dr. Ch. Chaussy

seit 01.05.04 Assistenzarzt in der Urologischen Abteilung des städtischen Krankenhauses München-Harlaching unter der Leitung von Prof. Dr. Ch. Chaussy