

Detektion von uPA-R-positiven Cytokeratin-
positiven Zellen im Knochenmark mittels
Doppelimmunfluoreszenzfärbung und
konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie:
Ein Pilotprojekt bei Patientinnen mit
Ovarialkarzinom

Martina Georgette Pabst

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

Detektion von uPA-R-positiven Cytokeratin-positiven
Zellen im Knochenmark mittels
Doppelimmunfluoreszenzfärbung und konfokaler
Laser-Scanning-Mikroskopie:
Ein Pilotprojekt bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom

Martina Georgette Pabst

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. B. Schmalfeldt

Die Dissertation wurde am 03.08.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.02.2006 angenommen.

Meinem Bruder Bernhard gewidmet
Sein Leben und Tod haben mich entscheidend geprägt

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINFÜHRUNG	1
1.1.	Ovarialkarzinom	2
1.1.1.	Epidemiologie	2
1.1.2.	Stadieneinteilung	3
1.1.2.1.	FIGO-Klassifikation	3
1.1.2.2.	Histopathologisches Grading	4
1.1.3.	Prognosefaktoren	5
1.1.3.1.	Klinische Prognosefaktoren	6
1.1.3.2.	Tumorbiologische Prognosefaktoren	8
1.2.	Minimal-residuale Erkrankung	12
1.3.	Pancytokeratin 8/18/19	14
1.4.	uPA und uPA-Rezeptor-System	16
2.	ZIELSETZUNG	20
3.	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	21
3.1.	Patientengut	21
3.2.	Materialgewinnung und Verarbeitung	23
3.2.1.	Durchführung der Knochenmarkaspiration	23
3.2.2.	Präparation des Knochenmarkspirates	24
3.3.	Zellanalyse mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie	26
3.3.1.	Doppelimmunfluoreszenzfärbung	28
3.3.1.1.	Antikörper	28
3.3.1.2.	Durchführung	29
3.3.2.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	30
3.3.3.	Zellanalyse mittels Doppelimmunfluoreszenz im CLSM	35
3.3.4.	Quantifizierung des uPA-R-Gehaltes CK-positiver Zellen	37

3.3.5.	Verwendete Hilfsmittel und Reagenzien	40
3.3.5.1.	Apparative Einrichtungen	40
3.3.5.2.	Antikörper	41
3.3.5.3.	Reagenzien	41
4.	ERGEBNISSE	42
4.1.	Durchführung der Knochenmarkaspiration, -präparation und -färbung	42
4.1.1.	Einfluss- und Störfaktoren	42
4.1.1.1.	Patienten- und therapiebezogene Faktoren	42
4.1.1.2.	Methodischer Faktor	43
4.1.2.	Qualitätssicherung	43
4.1.3.	Endgültiges Präparations- und Färbeprotokoll	44
4.1.3.1.	Flowsheet Präparationsprotokoll	44
4.1.3.2.	Flowsheet Färbeprotokoll	45
4.2.	Sensitivität von Doppelimmunfluoreszenzfärbung und Laser-Scanning-Mikroskopie	46
4.3.	Detektion uPA-R-positiver CK-positiver Zellen im Knochenmark	48
4.4.	Vergleich von CK-/uPA-R-positiven Zellen (CK-/uPA-R-Status) mit etablierten Prognosefaktoren	49
4.5.	Zusammenhang zwischen dem CK-/uPA-R-Status und neoadjuvanten / adjuvanten Chemotherapien	56
4.6.	uPA-R-Gehalt im Primärtumor bei Ovarialkarzinom	58
4.7.	uPA-R-Gehalt von CK-positiven Zellen im Knochenmark	59
5.	DISKUSSION	62
5.1.	Diskussion methodischer Fragestellungen	62
5.1.1.	Methodische Aspekte der Knochenmarkaspiration	62
5.1.2.	Methodische Aspekte der Doppelimmunfluoreszenzmarkierung	63
5.1.2.1.	Wahl des ersten Antikörpers: Der Pancytokeratinmarker 8/18/19	65
5.1.2.2.	Immunzytochemischer Nachweis von uPA-R in CK-positiven Zellen im Knochenmark	66

5.1.3.	Methodische Aspekte der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie	72
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	74
5.2.1.	Detektion CK- und uPA-R-positiver Zellen im Knochenmark	74
5.2.2.	Vergleich des uPA-R-Status mit etablierten Prognosefaktoren	76
5.2.3.	Zusammenhang zwischen dem uPA-R-Nachweis und neoadjuvanten / adjuvanten Chemotherapien	77
5.2.4.	uPA-R-Gehalt im Primärtumor	79
5.2.5.	uPA-R-Gehalt von CK-positiven Zellen im Knochenmark	80
5.2.6.	Schlußfolgerung und klinische Bedeutung	83
6.	ZUSAMMENFASSUNG	86
7.	LITERATURVERZEICHNIS	88
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	109
9.	TABELLENVERZEICHNIS	111
10.	ANHANG	I
10.1.	Häufig verwendete Abkürzungen	I
10.2.	Tabellen und Abbildungen	I
11.	DANKSAGUNG	V
12.	CURRICULUM VITAE	VII

1. EINFÜHRUNG

– Krebs ist ein zunächst lokalisierter Prozeß, dessen Ausbreitung entlang der Lymphwege geschieht –

So lautet die Essenz der Schrift „Dissertatio academico de cancro“ von Bernard Peyrilhe aus dem Jahre 1774, der als erster die Hypothese von einem kanzerogenen Virus aufstellte (Toellner 1990:2766). Er versuchte damit eine Beobachtung zu erklären, die bereits im 14. Jahrhundert von Henri de Mondeville (1250 - 1325), Leibarzt Philipps des Schönen, im Jahre 1320 in seiner Schrift „Chirurgica“ gemacht wurde:

„Kein Krebs heilt, es sei denn, er wäre ganz und gar herausgeschnitten; wenn aber etwas zurückbleibt, steigert sich die Bösartigkeit von der Wurzel aus.“

(Op. cit. aus: Toellner 99:2762)

Dieser therapeutische Gedanke ist bis heute geblieben, doch umfaßt die Formulierung „ganz und gar“ über den makroskopischen Tumorrest de Mondevilles hinaus zunehmend den mikroskopischen Bereich.

Die Forschungserkenntnisse unserer Zeit dringen dabei tief in die biochemischen Regulationsmechanismen von Tumorzellen ein: klinische Studien zeigen, daß erhöhte Level spezieller Biomarker in und auf malignen Zellen mit einem schlechten Outcome assoziiert sind und zu Tumorzellstreuung und Metastasierung führen (Übersichtsarbeit: Schmitt et al. 1997:285-296).

Patientinnen mit Ovarialkarzinom erliegen im Allgemeinen zwar eher ihrem lokalen Tumorleiden als den Folgen manifester Metastasen, trotzdem zeigten mehrere Autopsie-Studien ein häufiges Erscheinen okkulten Fernmetastasen (Abdul-Karim et al. 1990:108-114, Dauplat et al. 1987:1561-66). Dabei ist die Präsenz okkulten Tumormetastasen auch beim Ovarialkarzinom mit einem schlechten Outcome assoziiert (Braun et al. 2001:368-375).

1.1. Ovarialkarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom (OvCa) ist nach dem Endometrium- und Zervixkarzinom das häufigste Genitalmalignom der Frau in etwa 28% aller malignen Erkrankungen des weiblichen Genitalbereichs (*Tumorzentrum München 1998:1*).

Ovarialkarzinome stehen in der Europäischen Union derzeit mit ca. 26.000 Neuerkrankungen pro Jahr an fünfter Stelle aller Malignome bei Frauen. Mit jährlich etwa 17.000 Todesfällen nehmen sie nach dem Mamma-, dem Bronchial-, dem Magenkarzinom und den kolorektalen Karzinomen ebenfalls die fünfte Position ein; das entspricht in etwa 5% der krebsbedingten Mortalität (*AGO 2000:1-3*).

Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen wird mit etwa 15 Fällen pro 100.000 Frauen im Norden und im Mittelmeerraum mit etwa fünf Fällen pro 100.000 Frauen angegeben (*Tumorzentrum München 1998:1*). In Skandinavien und in der weißen Bevölkerung der USA zeigt sich die Inzidenz mit 15 bis 20 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen pro Jahr vergleichbar hoch. Dabei gilt, daß Frauen unter 30 Jahren nur selten an einem Ovarialkarzinom erkranken, wogegen ab dem 40. Lebensjahr das Erkrankungsrisiko stark zunimmt. So steigt in der Altersgruppe der 75- bis 79jährigen die Rate der Neuerkrankungen pro Jahr auf 54 Fälle pro 100.000 Frauen an (*Tumorzentrum München 1998:1*).

Von allen Malignomen des weiblichen Genitaltraktes hat das Ovarialkarzinom die ungünstigste Prognose mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von etwa 35%. Gründe hierfür liegen zum einen in der langen Zeit eines symptomarmen Krankheitsverlaufes und zum anderen in einem Mangel an Früherkennungsmöglichkeiten. 60% der Patientinnen zeigen deshalb bei Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium.

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist bisher weitgehend ungeklärt.

Als Risikofaktoren gelten familiäre Disposition, Nullipara, Infertilität, dauerhaft ovulatorische Zyklen und eine medikamentöse Ovulationsauslösung. Auch ständiger Wohn- und Lebensraum in West- und Nordeuropa sowie Nordamerika

scheint eine Rolle zu spielen (*Ataseven 1999: Diss*).

Bei 90% aller Ovarialkarzinome ist bisher keine genetische Komponente bekannt. Diese werden als "sporadische" Ovarialkarzinome den 5 - 10% familiär-erblichen Karzinomen gegenübergestellt, welche bevorzugt bei jüngeren Frauen auftreten (*Tumorzentrum München 1998:1*).

Als protektive Faktoren gelten Schwangerschaft, lange Stillperioden, die Einnahme oraler Kontrazeptiva (Ovulationssuppression), Hysterektomie und Sterilisation. Die Risikoreduktion bei langfristiger Einnahme von Kontrazeptiva wird mit einer Größenordnung von etwa 40% geschätzt (*AGO 2000:1-3*).

1.1.2. Stadieneinteilung

1.1.2.1. FIGO-Klassifikation

Zur Stadieneinteilung der Ovarialkarzinome wird in erster Linie die FIGO-Klassifikation (*Pecorelli et al. 1998:75-102*) herangezogen.

Die Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) teilt seit 1985 die fortschreitende Ausbreitung eines Tumors, ausgehend von den Ovarien auf umliegende Gewebe (z.B. Harnblase, Uterus, Dünndarm, etc.), in vier Stadien ein (I - IV). Dabei bezieht sich das Staging auf die klinische, chirurgische und histologisch-zytologische Beurteilung des Tumors (s. Tab.1).

Unter FIGO I (a - c) werden diejenigen Karzinome zusammengefaßt, die auf die Ovarien beschränkt und von einer intakten Kapsel umgeben sind. Eine Ausnahme bilden hier Karzinome der Klasse FIGO I c, bei denen die Kapsel bereits rupturiert und/oder maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülflüssigkeit nachweisbar sind.

Karzinome, die ein oder beide Ovarien betreffen und sich bereits im Becken ausbreiten, werden zur Klasse FIGO II (a - c) gezählt.

In die Kategorie FIGO III und IV werden Karzinome aufgenommen, die peritoneal und/oder in retroperitoneale oder inguinale Lymphknoten metastasiert sind (*Piver et al. 1987:1-10, Boring et al. 1994:7, Mallmann et al. 1994:73-117*).

Fernmetastasen z.B. in Lunge, Leber oder Hirn bedeuten unabhängig vom Ausmaß des Primärtumors immer FIGO IV. Beim Ovarialkarzinom wird auch eine positive Pleurazytologie als Beweis einer Metastasierung akzeptiert (*Tumorzentrum München 1998:1*).

FIGO	Befundsituation
I	Tumor begrenzt auf Ovarien
II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen ausserhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
IV	Fernmetastasen

Tab.1 Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms (Tumorzentrum München 2001:20).

1.1.2.2. Histopathologisches Grading

- G1 Hochdifferenziert
- G2 Mäßig differenziert
- G3-4 Gering differenziert oder undifferenziert
- Gx Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden

Für das Grading von Ovarialkarzinomen wurden erstmals von Silverberg et al 1998 (*Shimizu et al. 1998:893-901*) gut definierte Kriterien vorgeschlagen, die unabhängig vom histologischen Typ angewendet werden konnten.

Das Grading-System von Silverberg besteht aus einem Punkte-Score, der auf der Analyse der histologischen Parameter Architektur, Kernpleomorphie und Mitosezahl beruht, und bei dem maximal 9 Punkte erreicht werden können (s. Tab.2, 3). Nach Addition der drei Punktwerte für Architektur, Kernpleomorphie und Mitosezahl ergibt sich aus dem Gesamtscore der Differenzierungsgrad (s. Tab.3) (*Tumorzentrum München 2001:16-20*).

Punktwert	1	2	3
Architektur	glandulär	papillär	solide
Kernpleomorphie	relativ uniforme vesikuläre Kerne; Kerngrössenvariation < 2:1; keine prominenten Nukleolen	Kerngrössenvariation zwischen 2:1 und 4:1; kleine Nukleolen; kleine bizarre Kerne	Kerngrössenvariation 4:1; grosse eosinophile Nukleolen, evtl. bizarre Kerne
Mitosezahl			
Sehfeldzahl 20	0 - 7	8 - 18	> 19
Sehfeldzahl 26	0 - 9	10 - 24	> 25

Tab.2 Grading des Ovarialkarzinoms (Tumorzentrum München 2001:19).

3 - 5 Punkte	hoch differenziert (Grad 1)
6 - 7 Punkte	mässig differenziert (Grad 2)
8 - 9 Punkte	gering differenziert (Grad 3)

Tab.3 Grading des Ovarialkarzinoms (Tumorzentrum München 2001:19).

1.1.3. Prognosefaktoren

Die Prognose für Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist anhand vielfältiger Faktoren bestimmbar. Es werden klinische Indikatoren, Erkrankungsstadium, Histologie des Primärtumors und insbesondere der postoperativ verbliebene Tumorrest zur Beurteilung herangezogen. Allerdings gewinnen tumorbiologische Parameter, die direkt die Malignität von Tumoren beschreiben (z.B. Proliferation, Invasion, Metastasierung), zunehmend an Bedeutung.

1.1.3.1. Klinische Prognosefaktoren

Neben dem Tumorstadium ist der postoperativ verbliebene Tumorrest (Residualtumor) der stärkste unabhängige prognostische Parameter (*Kuhn et al. 1999:1746-51*).

- R0 Kein Residualtumor
- R1 Mikroskopischer Residualtumor
- R2 Makroskopischer Residualtumor

Dabei gilt, daß Patientinnen, die sich im niedrigsten FIGO-Stadium befinden und diejenigen, bei denen weder makroskopisch (R2-negativ) noch mikroskopisch (R1-negativ) erkennbare Tumorresiduen zurückgeblieben sind, die beste Prognose aufweisen (s. Abb.1, 2).

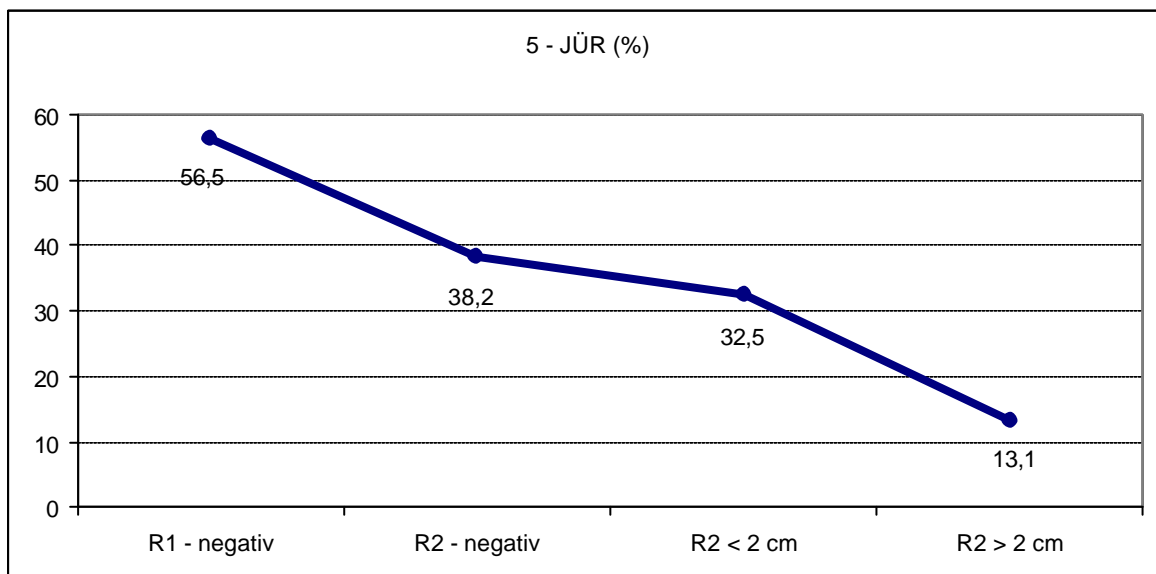


Abb.1 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate (5-JÜR) in Abhängigkeit vom Residualtumor (Tumorzentrum München 1998:13).

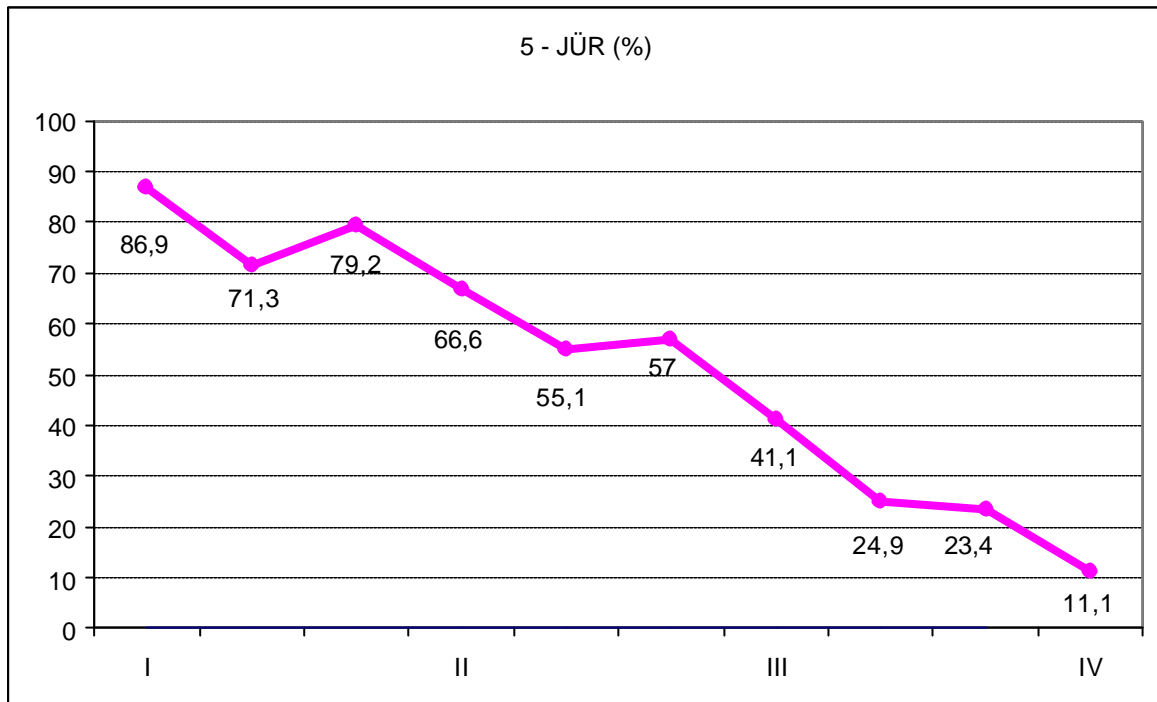


Abb.2 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate (5-JÜR) in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium (I - IV) (Tumorzentrum München 1998:13).

Bei der pathologischen Diagnostik spielen neben der Zuordnung zum Stadium auch die Zuordnung zum histomorphologischen Tumortyp, d.h. die Subklassifizierung (serös, muzinös, endometroid, klarzellig) eine Rolle (Tumorzentrum München 1998:13). So haben die klarzelligen und undifferenzierten Ovarialkarzinome sowohl im Stadium FIGO I/II (Rubin et al. 1993:143-147, Young et al. 1990:1021-1027, Jenison et al. 1989:65-71) als auch im Stadium FIGO III/IV (Jenison et al. 1989:65-71) im Vergleich zu anderen histologischen Typen eine schlechtere Prognose.

Das histopathologische Grading als Prognosefaktor wird kontrovers beurteilt: Einige Autoren schreiben dem Differenzierungsgrad nur in frühen Tumorstadien (FIGO I/II) eine Bedeutung zu, nicht hingegen bei fortgeschrittener Erkrankung (O'Brien et al. 1993:250-254); andere Arbeitsgruppen sehen diesen Unterschied nicht (Ahmet et al. 1996:2968-2975, Beale et al. 1995:96-111, Dembo et al. 1990:263-273).

Weitere wichtige Indikatoren für den Erkrankungsverlauf sind der präoperative Allgemeinzustand und das Lebensalter der Patientin sowie der retroperitoneale Lymphknotenstatus (AGO 2000:27).

Der Tumormarker CA125 ist präoperativ bei 75 - 90% der Patientinnen mit Ovarialkarzinom erhöht und wird in erster Linie zur Verlaufskontrolle herangezogen. Sein absoluter Wert zeigt keine Korrelation zum Überleben (AGO 2000:45); jedoch sehen manche Autoren eine prognostische Bedeutung der CA125-Werte postoperativ, während und nach einer adjuvanten Chemotherapie sowie zum Zeitpunkt der second-look-Laparotomie (Beale et al. 1995:96-111).

1.1.3.2. Tumorbiologische Prognosefaktoren

Die bislang weitgehend standardisierte Therapie bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom soll in Zukunft durch ein besseres Einschätzen des Rezidivrisikos mittels neuer tumorbiologischer Prognosefaktoren individueller gestaltet werden. Damit sollen Patientinnen mit hohem oder niedrigem Risiko innerhalb der durch den postoperativen Tumorrest definierten Gruppen unterschieden werden können. Auf diese Weise würden „aggressive Therapieformen“ gezielter zum Einsatz kommen.

Nach den neuesten Forschungsergebnissen scheinen die tumorbiologischen Prognosefaktoren aussagekräftig zu sein. Bislang sind sie jedoch noch wenig etabliert und bedürfen weiterer prospektiver Therapiestudien.

1.1.3.2.1 Steroidhormonrezeptorstatus

Der Wert des Steroidhormonrezeptorstatus beim Ovarialkarzinom wird im Gegensatz zum Mammakarzinom nicht einheitlich beurteilt. Östrogen- und Progesteronrezeptoren (ER und PR) finden sich bei biochemischen Analysen in etwa 50 - 60% aller fortgeschrittenen Ovarialkarzinome (AGO 2000:44). Bei immunhistochemischen Untersuchungen sind hingegen nur in 30 - 40% ER- oder PR-positive Tumorepithelien nachgewiesen. Bisweilen ist aber eine

Rezeptorexpression in Zellen des Tumorstromas auch bei Negativität der neoplastischen Epithelzellen vorhanden (*Kommoss et al. 1992:317-322*).

In einigen Studien wurde eine univariat signifikante unabhängige Bedeutung der Steroidhormonrezeptordichte postuliert. Da andere Autoren einer derartigen prognostischen Aussage widersprochen haben, ist eine definitive Beurteilung schwierig (*Kommoss 1995, Habil*). Die Bedeutung des ER- und PR-Status als klinische Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom ist in jedem Fall eher als gering einzustufen (*AGO 2000:45*).

1.1.3.2.2 Ploidie, Onkogene, Tumorsuppressorgene

Die Mehrzahl der Ovarialkarzinome weisen ausgeprägte genetische Veränderungen auf. In 50 - 80% aller fortgeschrittenen OvCas liegt ein aneuploider DNA-Gehalt vor. Die Aneuploidie zeigte hierbei in vielen Studien eine signifikant positive Korrelation zu höherem Tumorstadium, schlechterem Differenzierungsgrad und größerem postoperativen Tumorrest. Ebenso war die Aneuploidie in univariaten Analysen häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert (*Pfisterer et al. 1994:2509-2515*). Eine multivariat analysierte, unabhängige prognostische Bedeutung des DNA-Gehaltes bei FIGO III/IV wird in der Literatur allerdings widersprüchlich beurteilt (*Pfisterer et al. 1994:2509-2515*). In fortgeschrittenen Tumorstadien ist bisher die therapeutisch-prognostische Relevanz durch routinemäßige DNA-Messung nicht gesichert (*Scully et al. 1998:425-444*). In frühen Stadien jedoch könnte eine sinnvolle prognostische Einschätzung von Ovarialkarzinomen durch Ploidiebestimmung möglich sein. Bislang vorliegende Untersuchungen zeigen, daß aneuploide OvCas (FIGO I) unabhängig vom Differenzierungsgrad höhere Rezidivraten aufweisen als die entsprechenden diploiden Tumore (*Vergote et al. 1993:40-52*).

Eine abschließende Bewertung der bislang vorliegenden Ergebnisse zur prognostischen Bedeutung von Onkogenen (Her-2/neu) und Tumorsuppressorgenen (z.B. Her-2 und p53) ist aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse (*Scully et al. 1998:425-444*) noch nicht möglich (*AGO 2000:45*). Hierzu zählen auch Protoonkogene wie fms/M-CSF-R und erbB-1/EGF-R.

1.1.3.2.3 Tumorproteolysefaktoren

Eine Vielzahl weiterer tumorbiologischer Parameter wurde bisher untersucht, so z.B. Wachstumsfaktoren (M-CSF, EGF), heat shock proteins (HSP60) und Proteolysefaktoren wie Kathepsine oder Metalloproteinasen.

Der prognostische Stellenwert dieser Faktoren ist bislang jedoch keineswegs gesichert (AGO 2000:45). Allerdings gibt es Tumorproteolysefaktoren, die vermehrt von malignem Gewebe synthetisiert werden und mit dem Ausmaß der Invasivität und Metastasierung korrelieren. So wird z.B. dem Plasmin/Plasminogenaktivator-System eine bedeutende Rolle bei zellulären Invasionsprozessen zugeschrieben (Vassalli und Pepper 1994:14, Pöllänen et al. 1991:273, Markus 1988:158).

Daten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, daß der Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ (uPA) und sein spezifischer Inhibitor PAI-1 auch in der Gruppe der tumorfrei operierten Patientinnen starke unabhängige Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom darstellen (Kuhn et al. 1994:401-409). Einige Arbeiten weisen darauf hin, daß Faktoren des uPA-Systems im Rahmen maligner Transformation von Tumoren überexprimiert werden (Jankun et al. 1993:135-144, Sier et al. 1993:80-85, Tanaka et al. 1991:481-484). Die eigene klinische Arbeitsgruppe fand ebenfalls eine signifikant höhere Konzentration an uPA-R in Ovarialkarzinomgewebe im Vergleich zu Gewebe benigner Ovarialtumoren (Kuhn et al. 1994:401-409). Der uPA-Rezeptor (uPA-R) gilt als Schlüsselfaktor für einen malignen Phänotyp (Andreasen et al. 1997:1-22). Das zeigt sich z.B. in einer Arbeit von Bianchi, der mit einem polyklonalen Antikörper (affinity-purified rabbit) gegen den humanen uPA-R den Nachweis von uPA-R in Mammakarzinomen, nicht jedoch in normalem Mammagewebe erbrachte (Bianchi et al. 1994:861-6).

Die Erkenntnisse um den uPA-Rezeptor finden ihr Korrelat auch in klinischen Studien. UPA und PAI-1 gelten inzwischen als prognostische Parameter beim Mammakarzinom (Jänicke et al. 1993:195-208), dem Bronchialkarzinom vom Adeno-Typ (Pedersen et al. 1994:120-123) und vielen anderen soliden Tumoren (Reuning et al. 1999:893-906). Ebenso erwies sich uPA beim kolorektalen Dukes-B-Karzinom (Mulcahy et al. 1994:583-584) sowie beim Magenkarzinom von unabhängiger

prognostischer Bedeutung. Speziell beim diffusen Magenkarzinom ist der uPA-Rezeptor von starkem prognostischen Einfluß (*Heiss 1995:2084-2093*).

Unsere eigene klinische Arbeitsgruppe zeigte beim Ovarialkarzinom, daß Patientinnen mit niedrigem uPA- und PAI-1-Gehalt der Tumoren (uPA < 0.9 ng pro mg Protein und PAI-1 < 13,5 ng pro mg Protein) eine statistisch signifikant höhere Überlebenszeit hatten als Patientinnen mit hohem uPA- und/oder PAI-1-Gehalt. Besonders aussagekräftig waren diese Parameter bei tumorrestfrei operierten Patientinnen. In einer multivariaten Analyse zeigte sich der postoperativ verbliebene Tumorrest als stärkster prognostischer Faktor, dicht gefolgt von uPA und PAI-1 (*Kuhn et al. 1999:1746-51*).

1.2. Minimal-residuale Erkrankung

Die Idee einer subklinischen Tumorkomponente wird erstaunlicherweise schon von Hippokrates von Kos (460 - 377 v. Chr.) erwähnt, der in seinen Schriften den Begriff „okkultes Krebs“ verwendet und dabei ausdrücklich dessen Unheilbarkeit betont (*Toellner 1990:2766*).

Diese hippokratische Sichtweise findet ihr modernes Korrelat im Begriff der „minimal-residualen Tumorerkrankung“ als Ergebnis tumorbiologischer Studien hauptsächlich der letzten zwei Jahrzehnte.

Unter minimal-residualer Erkrankung versteht man heute das subklinische Persistieren einer Tumorerkrankung nach bereits erfolgter Erstbehandlung (*Hirsch-Ginsberg et al. 1998:111-122*). Bei der Rezidivierung maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems ist hierbei die okkulte Existenz klonogener Tumorzellen als Ursache bereits akzeptiert und zum festen Bestandteil diagnostischer und therapeutischer Konzepte geworden (*Yokota et al. 1991:331-339*). Zunehmend gibt es jetzt auch Hinweise dafür, daß bei soliden Karzinomen bereits sehr frühzeitig eine systemische Aussaat maligner Zellen stattfindet und damit möglicherweise eine minimal-residuale Krankheitskomponente induziert wird (*Osborne et al. 1994:25-31, Riethmüller et al. 1992:647-655*).

Mit Hilfe des immunzytologischen Nachweises von ausschließlich epithelialen Cytokeratinstrukturen (CK18, CK19) konnten disseminierte Zellen epithelialen Ursprungs bereits in sehr frühen Karzinomstadien aus dem mesenchymalen Knochenmark entsprechender Patienten mit hoher Sensitivität detektiert werden (*Cote et al. 1991:1749-1756, Lindemann et al. 1992:685-689, Heiss 1995:2084-2093, Pantel et al. 1993:1419-1424, Pantel et al. 1993:1419-1423*). Eine Korrelation dieses systemischen Zellnachweises mit der klinischen Prognose wird bereits für das Mammakarzinom (*Diel et al. 1992:1534-1539, Mansi et al. 1987:1093-1096*), das Bronchialkarzinom (*Pantel et al. 1993:1027-1031*), das kolorektale (*Lindemann et al. 1992:685-689*), sowie das Pankreas- (*Thorban et al. 1996:363-5*) und Ösophaguskarzinom (*Thorban et al. 1996:1222-7*) postuliert.

Zusammen mit ersten Ansätzen zur phänotypischen Charakterisierung dieser streuenden Zellen (*Pantel et al. 1993:1419-1424, Riesenberger et al. 1993:61-66*) wird

die These einer systemischen Komponente also auch beim frühen soliden Karzinom unterstützt.

Trotzdem wird die biologische Relevanz disseminierter CK-positiver Zellen und die Existenz einer frühen systemischen Komponente angezweifelt. Hauptkritikpunkt dabei ist, daß in den oben beschriebenen Untersuchungen Knochenmarkaspirate intraoperativ entnommen wurden. Eine mechanische, hämatogene Aussaat beliebiger, auch benigner epithelialer Zellen wäre dabei durchaus denkbar. Die Folge wäre ein falsch-positiver Nachweis von Zellen mit z.B. CK18-Expression, die jedoch nicht der postulierten systemischen Tumorkomponente entsprechen. Zusätzlich wird die Vitalität der immunzytologisch detektierten epithelialen Zellen zu Recht in Zweifel gestellt, da sich Antigene auch bei nicht lebensfähigen Zellen nachweisen lassen. Und schließlich zeigte sich bei Mansi et al. (*Mansi et al. 1989:445-449*), die als erste Arbeitsgruppe postoperative Folgepunktionen an einer größeren Patientenserie mit Mammakarzinom durchgeführt haben (n = 82), ein Verschwinden der disseminierten Zellen im Knochenmark, was die biologische Funktion jener Zellen weiter in Frage stellt.

1996 wurde eine Dissertation (*Allgayer 1996, Diss.*) vorgelegt, in der gezeigt wurde, daß bei einem hohen Prozentsatz (60%) von Patienten mit Magenkarzinom auch nach kurativer Resektion disseminierte CK-positive Zellen im Knochenmark nachweisbar waren. 46% dieser Zellen wurden auch durch den uPA-Rezeptor charakterisiert und zeigten eine starke prognostische Bedeutung. Ebenso wird deklariert, daß die Zellen offensichtlich einer eigenständigen, dynamischen Entwicklung unterliegen, durch die sich der klinische Individualverlauf bereits vor Manifestation eines Rezidivs abschätzen ließe. Diese Erkenntnisse implizieren die Notwendigkeit von weiterführenden Forschungsarbeiten und einem therapeutischen Umdenken im Sinne einer neuen Auffassung des soliden Karzinoms als Systemerkrankung.

1.3. Pancytokeratin 8/18/19

Die Cytokeratine stellen eine Familie intermediärer Filamente (Größe 7 - 11 nm) des Zytoskeletts von epithelialen Zellen dar, die sich untereinander durch ihr Molekulargewicht, ihren isoelektrischen pH-Wert und insbesondere durch ihr Verteilungsmuster innerhalb der verschiedenen Epithelien unterscheiden lassen (*Moll et al. 1982:11-24*). Aus dieser Gruppe der Cytokeratine wurden für die vorliegende Arbeit die Hauptvertreter CK8, CK18 und CK19 als Detektionsmarker für disseminierte epitheliale Zellen ausgewählt.

CK18 ist wie alle Cytokeratine kein Bestandteil mesenchymaler Zellen und wurde nicht zuletzt deshalb von verschiedenen Arbeitsgruppen als sehr sensitiver und epithelspezifischer Marker zum Nachweis karzinomatöser Einzelzellen im Knochenmark verwendet (*Cote et al. 1991:1749-1756*, *Lindemann et al. 1992:685-689*, *Osborne 1994:25-31*, *Pantel et al. 1993:1419-1423*, *Riesenberg et al. 1993:61-63*). Cytokeratin 18 (MG $45 \cdot 10^{-3}$ D; isoelektrischer pH 5,7) ist ein Element des Zytoskeletts einschichtig epithelialer Zellen (*Pantel et al. 1997:1241-1250*), kommt jedoch in mehrschichtigen Epithelien sowie der Epidermis nicht vor. So können falsch-positive Ergebnisse im untersuchten Knochenmark durch punktionsbedingte Kontamination mit epidermalen Zellen a priori ausgeschlossen werden. Das von Moll beschriebene Vorkommen von CK18 in apokrinen und auch ekkrinen Drüsen läßt dennoch ein geringes Kontaminationsrisiko durch Verletzung dieser Strukturen theoretisch möglich erscheinen (*Moll et al. 1982:11-24*).

CK8 ist ein Filament-Protein, welches mit CK18 polymerisiert, um eine Komponente des Zytoskeletts einschichtiger Epithelien und vieler Neoplasmen epithelialen Ursprungs zu bilden. CK8 interagiert besonders mit der inneren Schicht der Plasmamembran. Es wurde durch subzelluläre Fraktionierung epithelialer Zellen als eine der Hauptkomponenten der Plasmamembran erkannt (*Hembrough 1996:25684-25691*). Hembrough identifizierte in früheren Studien CK8 sogar als potentiellen Plasminogen-Rezeptor bei Ratten-Hepatozyten. Seine fluoreszenzmikroskopischen Studien von Hepatozyten und Mammakarzinom-Zelllinien haben gezeigt, daß CK8 gleichmäßig auf der Oberfläche von nativen, unpermeabilisierten adhärennten Zellen verteilt ist und nicht nur auf eine bestimmte

Fraktion beschränkt bleibt, wie z.B. auf verletzten Zellen. Er deklariert CK8 als das Protein mit den meisten spezifischen Bindungsstellen für Plasminogen in der Plasmamembran-Fraktion bei Mammakarzinomzellen und als eine notwendige Zellkomponente für die schrittweise Aktivierung von zellassoziertem Plasminogen durch t-PA.

Das Verteilungsspektrum von **CK19** ist, Hepatozyten und Epidermiszellen ausgenommen (kein Vorkommen von CK19), dem von CK18 sehr ähnlich; jedoch sind geringe Mengen an CK19 auch in mehrschichtigen Epithelien und Keratinozyten nachgewiesen worden (*Moll et al. 1982:11-24, Stigbrand et al. 1998:132-152*). Desweiteren scheint CK19 besonders stabil und resistent gegen Proteolyse zu sein, was einen besonderen Vorteil in der Markierung nativen Probenmaterials darstellt (*Stigbrand et al. 1998:132-152*).

Die Cytokeratine 8, 18 und 19 werden typischerweise von einfachen und glandulären Epithelien, Adenokarzinomen und wenigen mehrschichtigen squamösen Epithelien exprimiert. Die einzelnen Antigene zeigen in Versuchen mit Antikörperreaktionen untereinander so gut wie keine Kreuzreaktionen (*Stigbrand et al. 1998:132-152*).

Der monoklonale Antikörper A45-B/B3, ein 56 kD - Molekül, fungiert sowohl als kompletter mAb, als auch als fab-Fragment gegen alkalische Phosphatase. Er erkennt als Pancytokeratinmarker ein gemeinsames Epitop auf unterschiedlichen Cytokeratinen einschließlich CK8, 18 und 19. Seitdem bekannt wurde, daß auch in Ovarialkarzinomgewebe die drei Hauptvertreter der humanen Cytokeratine exprimiert werden, benutzte die Arbeitsgruppe um Braun diesen monoklonalen Antikörper, um versprengte Ovarialkarzinomzellen im Knochenmark zu identifizieren. Studien von Borgen (5,4%, APAAP-Färbung) (*Borgen et al. 1998:427-434*) und Braun (*Braun et al. 2000:525-533*) zeigten mit dem Pancytokeratinmarker A45-B/B3 gegen die Cytokeratine 8/18/19 eine sehr niedrige Rate an falsch-positiven Ergebnissen; eine unerwünschte Cytokeratin-Expression ist einzig auf wenige Retikulumzellen in Lymphknoten beschränkt (*Borgen et al. 1998:427-434*).

In neueren Arbeiten wird deswegen die Verwendung des Pancytokeratin-Antikörpers A45-B/B3 gegen die Cytokeratine 8/18/19 als Standard empfohlen (*Braun et al. 2000:525-533*).

1.4. uPA und uPA-Rezeptor-System

Die spezifische Fähigkeit maligner Zellen zu Invasion, metastatischer Streuung und Manifestation als mikro- und schließlich makroskopische Metastasen steht in kausalem Zusammenhang mit der Expression proteolytischer, stromainduzierter und neoangiogenetischer Faktoren. Dies ist Stand der Forschungsarbeit auf dem Gebiet der „tumorassoziierten Proteolyse“.

1986 wurde erstmals die Hypothese aufgestellt, daß Enzymsysteme der Wundheilung wie Fibrinogen/Fibrin und Plasminogen/Plasmin essentiell an der Interaktion maligner Tumoren mit ihrem umliegenden Gewebe beteiligt sind (Plasmin zerstört Proteine der extrazellulären Matrix), und daß die Formation von sowohl provisorischem als auch endgültigem Tumorstroma pathophysiologisch ihre Parallele in Vorgängen der Wundheilung findet (*Dvorak 1986:1650-1659*). Weitere Untersuchungen deuteten zunehmend darauf hin, daß vor allem die Expression der Faktoren des Urokinase-Systems durch Tumorzellen mit der Aktivierung dieser Enzymsysteme assoziiert ist (*Markus 1988:158, Liotta et al. 1991:327-336, Blasi 1993:105-111*).

Urokinase (uPA, urokinase-type plasminogen activator), ein 54 kD-Protein, wird physiologischerweise von Zellen des Urogenitaltrakts, Fibroblasten, phagozytischen und leukozytären Zellen, Pneumozyten, Keratinozyten und pathologischerweise auch von Tumorzellen sezerniert. Dies vollzieht sich in der inaktiven einkettigen Form (pro-uPA), welche extrazellulär proteolytisch zur aktiven zweikettigen Form des uPA (HMW) umgewandelt wird (*Ataseven 1999, Diss., Vassalli et al. 1984:1653-1668*). HMW-uPA ist in der Lage, inaktives Plasminogen zu Plasmin zu aktivieren, welches in der Umgebung des Tumors verschiedene Strukturen der extrazellulären Matrix wie Fibrin, Fibronectin, Laminin und Proteoglykane auflöst und damit dessen Stromainvasion fördert. HMW-uPA selbst führt aber auch direkt durch Aktivierung der Kollagenase IV zur Lyse von Basalmembranen und ermöglicht der Tumorzelle den ersten Schritt zur Metastasierung durch den Einbruch in das vaskuläre System (*Markus 1988:158*).

Die Wirkung von uPA als tumorassoziierte Protease ist nur durch die Kooperation mit weiteren Faktoren möglich, die in ihrer Gesamtheit das uPA und uPA-

Rezeptor-System bilden. Dazu zählen neben uPA sein spezifischer membranständiger Rezeptor (uPA-R), drei uPA-Inhibitoren (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor PAI-1, PAI-2, Protease-Nexin-1), sowie das uPA-Substrat Plasminogen und dessen spezifischer Rezeptor.

Als Wirkzentrum dieses Urokinase-Systems wird zunehmend der uPA-Rezeptor (uPA-R) angesehen.

uPA-R ist ein Cystein-reiches Glycoprotein, erstmals von Vassalli et al. 1985 auf humanen Monocyten und der promyelotischen Leukämie-Zelllinie U937 beschrieben (Vassalli et al. 1984:1653-1668). Der Genlocus zu diesem Rezeptor, der sich physiologischerweise auch auf peripheren leukozytären Zellen, insbesondere entzündlich aktivierten Monozyten nachweisen lässt, findet sich auf Chromosom 19 (Chr. 19q13.1-2) (Borglum et al. 1992:492-497). Die entsprechende DNA codiert für eine Kette aus 313 Aminosäuren, die aus drei nahezu identischen Sequenzen besteht (Moller 1993:293-303). Im Rahmen der Prozessierung zum endgültigen uPA-R findet eine N-Glykosylierung an Asparagylstellen durch Glucosamin und Sialinsäure statt. Nach Abspaltung von 20 - 30 COOH-terminalen Aminosäuren wird der nun 282 - 284 Aminosäuren umfassende uPA-R mit Hilfe von Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) in der Zellmembran verankert (Moller et al. 1992:493-500). Sowohl die Glykosylierung als auch der GPI-Anker sind essentiell wichtig für die Funktion des uPA-R und damit des gesamten uPA-Systems. Offensichtlich wird über den Glykosylierungsgrad (sehr hoch und sehr variabel: Molekulargewicht des uPA-R ohne Glykosylierung ca. 35 kD, mit Glykosylierung ca. 55 - 60 kD) die Bindungskapazität von Urokinase reguliert. Diese schwankt in der Regel zwischen $K_d = 0.1 - 1.0$ (Behrendt et al. 1990:6453-6460).

Die GPI-Bindung in der Tumorzellmembran verleiht dem uPA-Rezeptor innerhalb dieser eine extreme Beweglichkeit (Estreicher et al. 1990:783-792). Das an ihn gebundene uPA kann so flexibel an Invasionsfronten einzelner Tumorzellen oder soliden Tumoren konzentriert werden. Die proteolytische Effizienz der Urokinase steigert sich damit vergleichbar einem enzymkatalytischen Effekt um mehrere Potenzen (Ossowski et al. 1991:1107-1112, Hollas et al. 1991:3690-3695).

Für Flexibilität und Regulation der proteolytischen Aktivität von Tumorzellen bzw. Tumorgewebe ist darüber hinaus ein transzellulärer uPA/uPA-R-Zyklus verantwortlich (s. Abb.3):

Wird Urokinase extrazellulär durch PAI inaktiviert, so wird der uPA-Rezeptor als trimetrischer Komplex uPA-R/uPA/PAI in die Zelle hinein transportiert. Nur durch die Inaktivierung von uPA ist die Internalisierung als Komplex überhaupt möglich (Cubellis et al. 1990:1079-1085, Dvorak 1986:1650-1659). uPA und PAI werden intrazellulär lysosomal abgebaut, der uPA-Rezeptor zirkuliert an die Zellmembran zurück.

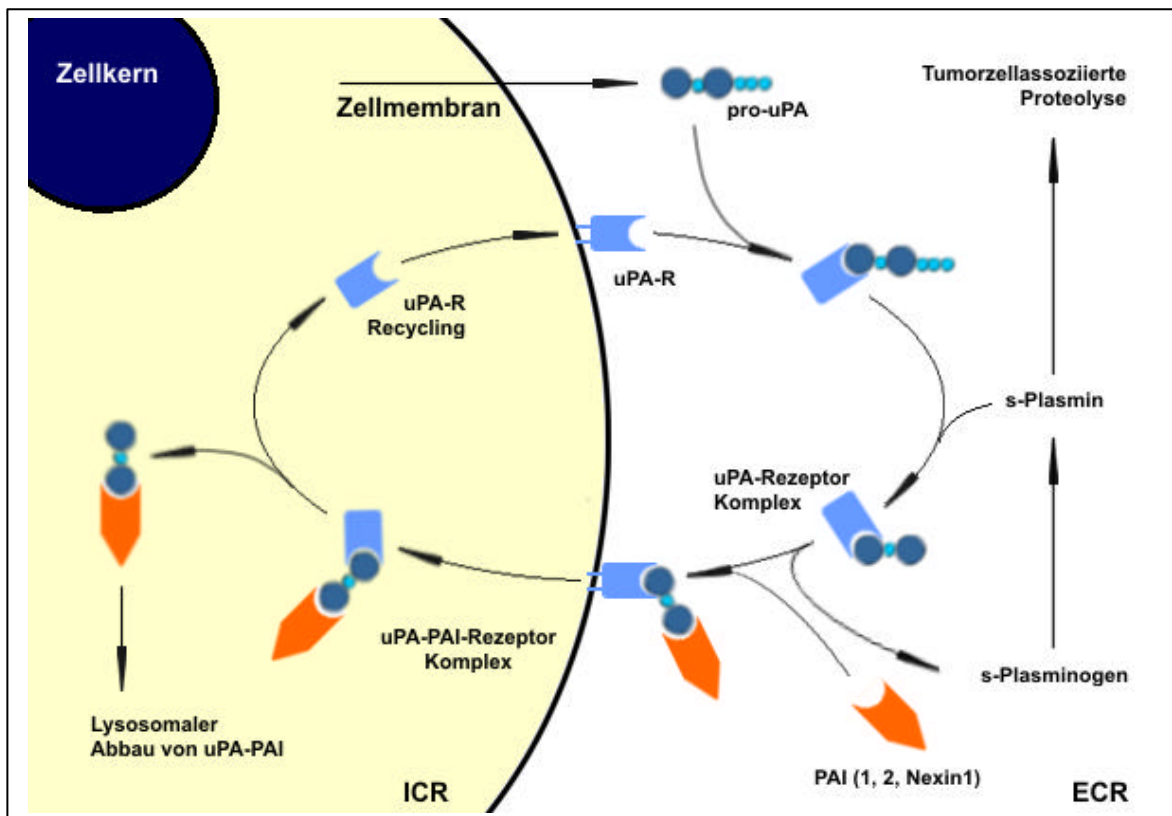


Abb.3 Der uPA/uPA-R-Zyklus, modifiziert nach Blasi (Blasi 1993:105-111).

Der uPA-Rezeptor steht also im Zentrum eines dynamischen, flexiblen und dennoch gerichteten proteolytischen Systems. Dieses verleiht den Tumorzellen nicht nur ihre hocheffiziente Aggressivität, sondern ist darüber hinaus auch Bestandteil autokriner und parakriner Regulation (Ossowski et al. 1991:1107-1112 Blasi 1993:105-111):

Autokrin kann eine gerichtete Invasion und Migration durch die gleichzeitige Sekretion von uPA und Expression von uPA-R von derselben Zelle gesteuert werden (*Blasi 1993:105-111*). Weiterhin wird postuliert, daß Tumorzellen bindegewebiges Stroma zur Produktion von Urokinase-assoziierten Faktoren anregen können. So fanden Pyke et al. beim Kolonkarzinom selektiv uPA-R in Tumorzellen, uPA in umgebenden Fibroblasten und PAI-1 in nahegelegenen Endothelien (*Pyke et al. 1991:4067-4071, Pyke et al. 1991:1059-1067, Pyke et al. 1993:1911-1915*). Dies entspricht der Vorstellung parakrin interaktiver Mechanismen.

Die tumorassoziierte Proteolyse stellt also ein komplexes Zusammenspiel von intra- und extratumoralen Ab- und Umbauvorgängen durch viele verschiedene Faktoren dar. Im Zentrum dieses Schauspiels steht nach heutigem Verständnis das uPA/uPA-Rezeptor-System. Überzeugende klinische und experimentelle Studien deuten daraufhin, dass die tumorassoziierte Serinprotease Plasmin, ihr Aktivator uPA, dessen Rezeptor uPA-R sowie die Inhibitoren PAI-1/2 mit der Invasionsfähigkeit und Metastasierung von Krebsgewebe in Zusammenhang stehen (*Übersichtsarbeiten: Schmitt et al. 1997:285-96, Andreasen et al. 1997:1-22*). Die Ausstattung von Tumorzellen mit jenen antigenetischen Parametern scheint ihre Invasionsfähigkeit entscheidend mitzubedingen.

Aufgrund dieses Wissens und besonders wegen der Rolle des uPA-R als funktionelles „Wirkzentrum“ des Urokinase-Systems erschien es zu dieser Arbeit naheliegend, den uPA-Rezeptor als das zu untersuchende Antigen zu wählen um die vermuteten disseminierten CK-positiven Zellen im Knochenmark näher zu charakterisieren.

2. ZIELSETZUNG

Nachweis und Charakterisierung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark gewinnen durch den Einsatz tumorbiologischer Therapieformen (z.B. monoklonale Antikörpertherapie) zunehmend an klinischer Bedeutung. uPA-R, der Rezeptor der Serinprotease uPA, nimmt eine Schlüsselstellung ein bei Tumorzellinvasion und Metastasierung sowie bei Adhäsion und Migration von Tumorzellen (*Blasi 1993:105-111*).

Bei Patienten mit Magenkarzinom wurde bereits gezeigt, daß der alleinige Nachweis von CK-positiven Zellen im Knochenmark nicht unbedingt eine schlechte Prognose bedeuten muß, daß aber der Nachweis von uPA-R-positiven CK-positiven Zellen auf jeden Fall mit einer schlechten Prognose korreliert (*Heiss et al. 1995:1035-9, Heiss et al. 2002:2005-16*).

Die vorliegende Arbeit soll als Pilotprojekt zu einer prospektiven Studie mit hoher Fallzahl über disseminierte epitheliale Zellen im Knochenmark bei Ovarialkarzinom die folgenden Punkte/Fragen bearbeiten:

1. Etablierung der Methode zur Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Cytokeratin und uPA-R an Knochenmarkaspiraten bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom an der Frauenklinik der Technischen Universität München.
2. Läßt sich der uPA-Rezeptor auf CK-positiven Zellen auch im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom nachweisen?
3. Korreliert der Nachweis von CK-/uPA-R-positiven Zellen im Knochenmark mit klinischen Prognoseparametern wie FIGO-Stadium, Grading und Lymphknotenstatus?

3. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patientengut

Im Rahmen dieser prospektiven Studie wurden im Zeitraum November 1998 bis April 2000 an der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar (TUM) insgesamt 65 Patientinnen mit dem Verdacht auf Ovarialkarzinom therapiert. Von diesen gaben alle nach Aufklärung über Technik, Risiken und Ziel der Knochenmarkaspiration (s. 3.2.1) ihr Einverständnis zur präoperativen Punktion des Knochenmarks.

Bei 41 der untersuchten Patientinnen bestätigte sich postoperativ der Verdacht auf ein Ovarialkarzinom, in 12 Fällen nicht; bei diesen 12 Tumoren handelte es sich um Teratome, Zystadenome, Ovarialkystome, Kystomdermoide und Tubovarialabszesse.

Drei Patientinnen mit gesichertem OvCa zeigten als Nebenbefund noch ein zusätzliches Malignom (Mamma-, Endometrium- und Kolonkarzinom), weshalb sie aus der Studie ausgeschlossen wurden.

Weitere 12 der 65 Proben konnten aufgrund von technischen Problemen bei der Gewinnung oder der Verarbeitung des Knochenmarkspirates nicht ausgewertet werden (s. 4.1.1). Letztendlich stand unserer Arbeitsgruppe ein Kollektiv von 38 Patientinnen mit einem Durchschnittsalter von 57,5 (41 - 72) Jahren mit einem Ovarialkarzinom als Erstmalignom zur Verfügung (s. Tab.4).

Patientinnen gesamt	OvCa	OvCa plus Zweitmalignom	benigne Befunde	Technische Probleme bei KM- Aufarbeitung
65	38	3	12	12

Tab.4 Patientenkollektiv.

Aufgrund der späten klinischen Symptomatik beim Ovarialkarzinom befanden sich die meisten Patientinnen bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (s. Tab.5).

Tumor-Stadium	FIGO I			FIGO II			FIGO III			FIGO IV	Gesamt
	a	b	c	a	b	c	a	b	c		
(n)	2	1	3	2	-	-	3	2	16	9	38
n (%)	5,3	2,6	7,9	5,3	-	-	7,9	5,3	42,0	23,7	100

Tab.5 Patientenkollektiv – Einteilung nach Tumorstadien.

14 Patientinnen wurden im Rahmen einer klinischen Pilotstudie einem neoadjuvanten Therapieprotokoll (3 x Carboplatin mono) unterzogen. Alle anderen Patientinnen wurden stadiengerecht mit adjuvanter Chemotherapie behandelt.

Präoperativ wurden folgende Medikamente verwendet:

Carboplatin mono (3 - 6 x), Carboplatin/Taxol (3 x), Carboplatin/Taxol/Cisplatin (6 x), Carboplatin/Cyclophosphamid (6 x), Carboplatin/Taxol/Epirubicin (6 x).

Zur postoperativen Chemotherapie verwendete Medikamente:

Carboplatin mono (3 - 6 x), Carboplatin/Taxol (3 - 6 x), Carboplatin/Taxol/Epirubicin/Amifostin (6 x), Carboplatin/Taxol/Epirubicin (2 x), Carboplatin/Taxol/Amifostin (6 x), Carboplatin/Paclitaxel (3 x), Cisplatin/Ifosfamid/Ethoposid (2 x), Carboplatin/Cyclophosphamid (4 x), Carboplatin/Cyclophosphamid (4 x)

Eine Einteilung der Patientinnen im Hinblick auf die begleitenden Chemotherapien veranschaulicht Tabelle 6.

Chemo-therapie	nur neoadjuvant	neoadjuvant und adjuvant	nur adjuvant	Gesamt
n	3	18	17	38
n (%)	7,9	47,4	44,7	100

Tab.6 Patientenkollektiv – Einteilung nach Chemotherapie.

3.2. Materialgewinnung und Verarbeitung

3.2.1. Durchführung der Knochenmarkaspiration

Vor dem Eingriff der Knochenmarkpunktion wurden alle Patientinnen über Technik, Risiken und Ziel der Punktion aufgeklärt, und unterzeichneten eine Einverständniserklärung.

Das Knochenmark wurde präoperativ oder vor einer Laparoskopie bzw. CT-gesteuerten Tumorpunktion in Allgemeinnarkose entnommen. Den zeitlichen Zusammenhang zu begleitenden Chemotherapien (CTx) zeigt Tabelle 7.

Zeitpunkt der KM-Aspiration	nach neoadjuvanter CTx	vor adjuvanter CTx	nach neoadjuvanter und adjuvanter CTx
n	20	17	1

Tab.7 Patientenkollektiv – zeitlicher Zusammenhang zu Chemotherapie.

Die Aspiration erfolgte unter streng aseptischen Bedingungen durch die Punktion der unilateralen spina iliaca posterior superior mit einer großlumigen Punktionskanüle. Nach Erreichen des Markraumes wurde der Mandrin entfernt, und aus der Punktionsstelle zunächst 1 ml Knochenmark in eine mit 0,5 ml NaEDTA benetzte Spritze aspiriert. Daraufhin erfolgte, sofern technisch möglich, die stoßweise Entnahme von zweimal je 8 ml Knochenmark in heparinisierte Spritzen. Das entnommene Aspirat wurde sofort zu je 1,5 ml Heparin in sterile Falcon-Röhrchen gegeben, sorgfältig vermischt und bis zur Verarbeitung im Labor auf Eis gestellt (max. Aufbewahrungszeit 1 h). Die Kanüle wurde entfernt, die Punktionsstelle steril abgedeckt und 10 min. lang komprimiert.

3.2.2. Präparation des Knochenmarkspirates

Das gekühlte Knochenmarkspirat wurde innerhalb der ersten Stunde nach der Punktion ins Labor gebracht und verarbeitet (Arbeitsablauf s. Abb.5).

Die Präparation erfolgte gemäß der von Loos und Roos 1974 erstmals beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll (relative Dichte 1.077). Diese Methode ermöglicht die selektive Isolation der Fraktion mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark (*Loos und Roos 1974:333-341*) und - modifiziert - auch aus dem peripheren Blut (*Boyum 2002:76-84*).

Das Knochenmarkspirat wurde mit PBS-Puffer etwa im Verhältnis 1:1,5 verdünnt (resultierende Gesamtmenge 50 ml) und vorsichtig auf etwa die gleiche Menge Ficoll geschichtet. Nach 20 min. Zentrifugation (stets ohne Zentrifugenbremse) mit 400 g bei einer Temperatur von 4 °C wurde die Interphase der mononukleären Zellen mit einer Pasteur-Pipette isoliert und das überschüssige Ficoll mittels zweier PBS-Waschzentrifugationen (je 7 min. bei 250 g und 4 °C) entfernt. Die Interphasenfraktion wird in Abbildung 4 gezeigt (Originalaufnahme).



Abb.4 Interphasenfraktion der mononukleären Zellen.

Die so gereinigte Fraktion der mononukleären Zellen wurde mit PBS-Puffer unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer auf eine Zellzahl von 10^5 pro 300 μ l Volumen eingestellt und daraus Cytospins angefertigt.

„Cytospin“ bezeichnet eine standardisierte Aufbringung zytologischen Probenmaterials auf Objektträger. Die Zellsuspension wurde hierbei in einer Cytozentrifuge (Fa. Shandon, Cytospin 2) 5 min. bei 450 U/min. über spezielle Trichter in Form von runden, im Durchmesser etwa 0,5 cm messenden Spots auf Glas-Objektträger (gereinigt mit Ethanol 100%) aufgebracht.

Diese Technik des Zelltransfers ermöglicht eine verlässliche quantitative Aussage über das analysierte Probenvolumen. Sie ist deshalb der Ausstrichtechnik zur Anfertigung zytologischer Knochenmarkpräparate deutlich überlegen (*Pantel et al. 1997:1241-1250*).

Pro Patientin wurden mindestens 25 Objektträger mit jeweils einem Präparat von 10^5 Zellen angefertigt. Insgesamt erhielten wir also pro Patientin eine Gesamtzellzahl von $2,5 \times 10^6$.

Die Cytospins wurden über Nacht staubgeschützt luftgetrocknet und entweder am darauffolgenden Tag gefärbt oder bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Dabei verzeichneten wir mikroskopisch keinerlei Änderungen in der Qualität der unterschiedlich bearbeiteten Präparate.

Der zeitliche Aufwand von der KM-Aspiration bis zur Fertigstellung der Cytospins betrug etwa 2 - 3 Stunden.

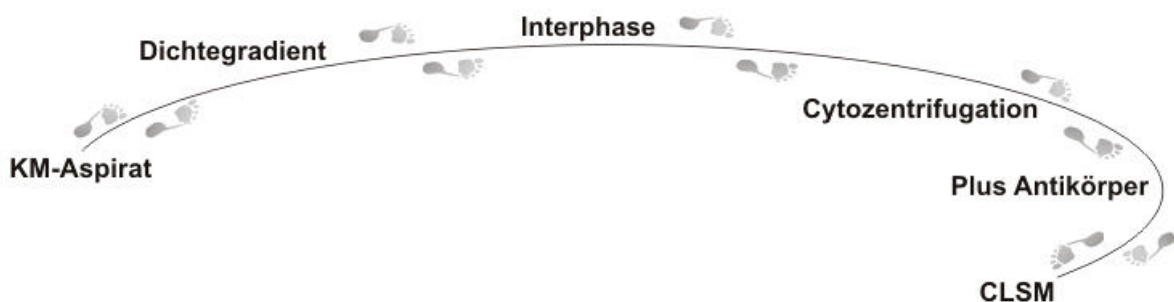


Abb.5 Schema Arbeitsablauf.

3.3. Zellanalyse mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie

Um die Morphologie von Zellen mikroskopisch untersuchen zu können, ist man daran interessiert, spezifische intra- und/oder extrazelluläre Strukturen sichtbar darzustellen.

Man macht sich die Eigenschaft von Antikörpern zunutze bestimmte Moleküle (Antigene) zu erkennen, und sich gezielt an diese zu binden (Primärantikörper). Um den Bindungsort jener Antigen-spezifischen Antikörper zu erfassen, wird ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) benötigt, der sich wiederum Spezies-spezifisch an die Oberfläche des ersten bindet. Diesen zweiten Antikörper koppelt man mit einem fluoreszierenden Farbstoff, der, angeregt durch das Licht einer bestimmten (kurzen) Wellenlänge, Licht einer längeren Wellenlänge abstrahlt. Anregung und Abstrahlung lassen sich mit Filtern trennen. Die markierten Zellstrukturen leuchten hell im Fluoreszenzmikroskop auf (*Stelzer et al. 1991:132-152*).

Diese Technik wird im Gegensatz zur direkten Immunfluoreszenz, bei der bereits der Primärantikörper fluoreszenzmarkiert ist, als indirekte Immunfluoreszenz bezeichnet.

Die schematische Darstellung der Doppelimmunfluoreszenz-Technik zur Detektion und Charakterisierung disseminierter Zellen durch gleichzeitige Markierung der Cytokeratine 8/18/19 und des uPA-Rezeptors zeigt Abbildung 6.

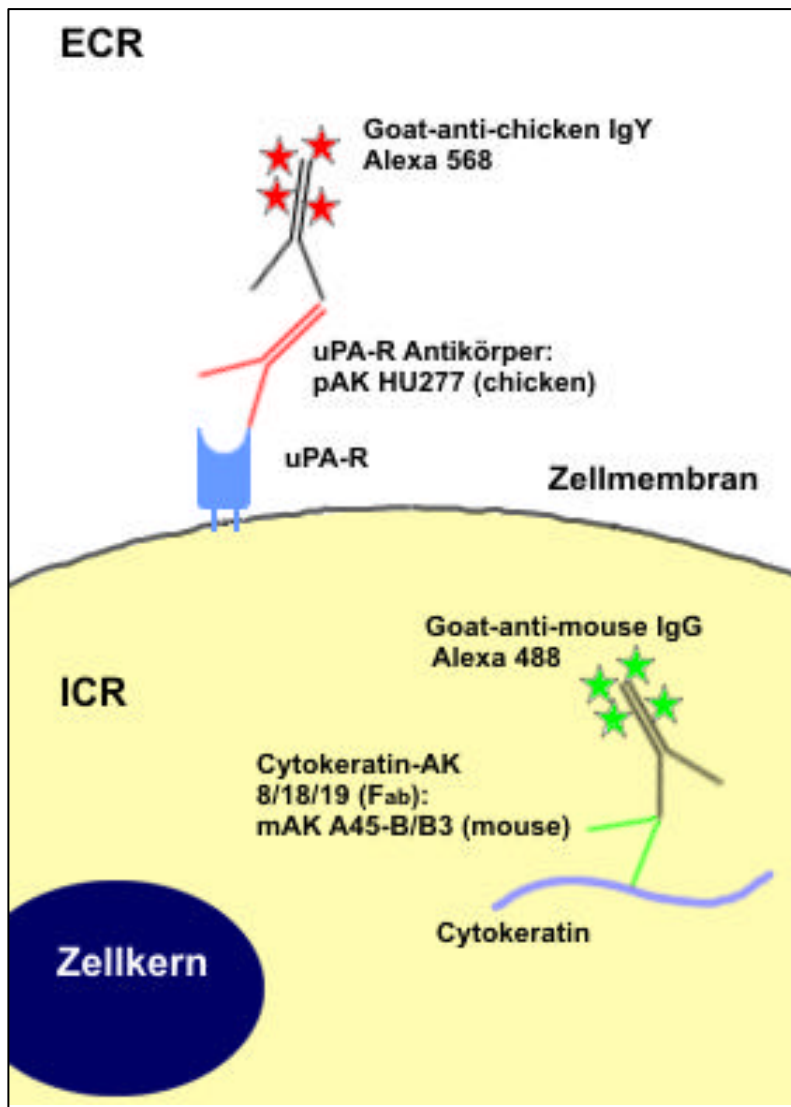


Abb.6 Prinzip der Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen Cytokeratin 8/18/19 und uPA-R; modifiziert nach Noack et al. (Noack et al. 2000:100-104).

3.3.1. Doppelimmunfluoreszenzfärbung

3.3.1.1. Antikörper

3.3.1.1.1 Erster Primärantikörper „Anti-Cytokeratin A45-B/B3“ (Klasse IgG 1, Spezies mouse)

Zur Detektion disseminierter Tumorzellen werden monoklonale Antikörper gegen Cytokeratine verwendet. Cytokeratine sind charakteristischer Bestandteil der Stützfilamente epithelialer Zellen (*Moll et al. 1982:11-24*), die Anfärbung erfolgt also zytoplasmatisch. Bisherige Erfahrungen zeigen, daß Cytokeratine stabil exprimierte Merkmale in Tumorzellen darstellen, die mit spezifischen monoklonalen Antikörpern in einzelnen Karzinomzellen eindeutig nachweisbar sind (*Pantel et al. 1997:1241-1250*). Der monoklonale Antikörper A45-B/B3, ein sogenannter Pancytokeratinmarker, ist gegen die Cytokeratine der Nummern 8, 18 und 19 gerichtet (*Kasper et al. 1987:117-137*).

3.3.1.1.2 Zweiter Primärantikörper „Anti-uPA-Rezeptor HU277“ (Klasse IgY, Spezies chicken)

Magdolen und Mitarbeiter haben 1994 verschiedene polyklonale uPA-R-Antikörper entwickelt. Dabei zeigte sich, daß der Antikörper HU277 vielfältige Formen des uPA-Rezeptors im Westernblot-Verfahren aufdeckte (die glykosylierten sowie die nicht-glykosylierten Formen, ebenso die reduzierten und nicht-reduzierten Formen) (*Magdolen et al. 1995:813-816*).

HU277 reagiert mit menschlichem uPA-R in fixiertem Gewebe gleichermaßen wie mit disseminierten CK-positiven Zellen. Die Anfärbung erfolgt membranbetont.

3.3.1.1.3 Erster Sekundärantikörper „Goat anti-mouse IgG“
(direkt-konjugiert mit ALEXA488)

Durch die Fluoreszenz des ALEXA488-gelabelten Antikörpers gegen den Cytokeratin-Antikörper können epitheliale Zellen im konfokalen Lasermikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und sichtbar gemacht werden (grün) (Noack et al. 1999:617-623).

3.3.1.1.4 Zweiter Sekundärantikörper „Goat anti-chicken IgY“
(direkt-konjugiert mit ALEXA568)

Durch die Fluoreszenz des ALEXA568-gelabelten Antikörpers gegen den uPA-R-Antikörper können uPA-Rezeptor-tragende Zellen im konfokalen Lasermikroskop bei einer Wellenlänge von 568 nm angeregt und sichtbar gemacht werden (rot) (Noack et al. 1999:617-623).

3.3.1.2. Durchführung

Pro Patientin wurden im Durchschnitt 10 - 15 Objektträger gefärbt. Das entspricht einer Mindestzellzahl von 10^6 pro Patientin.

Bei jeder Färbung wurden für die Primärantikörper sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Kontrollen dienten im Rahmen dieser Studie entnommene Knochenmarkpräparate von Patientinnen ohne malignen Befund sowie Cytospinpräparate eines Ovarialkarzinoms der Zellreihe OvMZ #45 (Universität Mainz, unveröffentlicht) zur Prüfung der Antikörperreaktivität.

Alle Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zuerst wurden die Präparate langsam aufgetaut und dann 30 min. mit PFA 4% fixiert. Im Anschluß daran wurden die Präparate dreimal mit PBS/BSA 1% gewaschen (diese drei Waschschrte wiederholten sich im weiteren Verlauf des Färbeprozesses jeweils zwischen den einzelnen Arbeitsschritten).

Es folgte die Permeabilisierung mit Saponin 0,025% über 45 min.

In der Zwischenzeit wurden die Antikörper mit PBS-Puffer auf die im Labor erprobten optimalen Konzentrationen verdünnt (s. Tab.8).

Erster Primär-AK 1 h	Zweiter Primär-AK 1 h	Erster Sekundär-AK 30 min	Zweiter Sekundär-AK 30 min
A45-B/B3 (mouse) 1:99 μ l	HU277 (chicken) 2:123 μ l	Alexa 488 (goat-anti-mouse-Fg) 1:99 μ l	Alexa 568 (goat-anti-chicken-Fgy) 2:80 μ l

Tab.8 Färbeprotokoll.

Die Inkubationszeit für die Primärantikörper A45-B/B3 und HU277 betrug jeweils eine Stunde in einer feuchten Kammer. Für die Einwirkung der Sekundärantikörper waren jeweils 30 min. ausreichend, wobei die Umgebung möglichst dunkel gehalten wurde, um ein verfrühtes Ausbleichen der photosensiblen Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden.

Nach drei letzten Waschschrritten wurden die Zell-Spots in etwa 10 μ l PBS-Puffer unter einem Deckgläschen eingeschlossen, die Abschlußränder mit Nagellack luftdicht versiegelt und die Präparate bis zur Untersuchung im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Standardisierung der Fluoreszenzintensität durfte dabei ein Aufbewahrungszeitraum von fünf Tagen nicht überschritten werden.

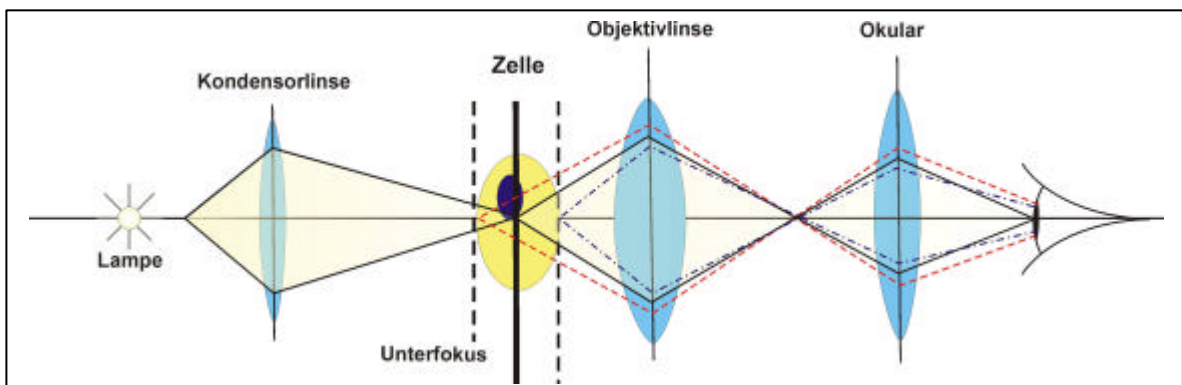
Eine Färbung benötigte einen zeitlichen Rahmen von etwa 5 - 6 Stunden; dabei wurde während des gesamten Färbeporganges ein Austrocknen der Präparate durch Verwendung einer Feuchtkammer konsequent vermieden.

3.3.2. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie ist eine Form der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie, die zurückgeht auf das von Minsky 1957 entwickelte und von Egger und Petran 1967 erstmals angewandte mikroskopische Prinzip (Egger, Petran 1967:305-307, Davidovits et al. 1969:831).

Viele biologische Objekte sind komplex aufgebaut und damit relativ dick. Innerhalb dieser Objekte liegen die fluoreszierenden Strukturen dichtgepackt beisammen. Mit einem konventionellen Lichtmikroskop ist es nicht möglich, eine einzelne Ebene eines Fluoreszenz-Präparates zu beobachten. Der Grund dafür ist, daß die Fluoreszenz der ober- und unterhalb der Fokusebene liegenden Strukturen teilweise zu dem mikroskopischen Bild beitragen und unscharf über das eigentliche Bild gelegt werden.

Beim konventionellen Lichtmikroskop (s. Abb.7) wird das Lampenlicht durch die Kondensorlinse auf das Objekt, und das vom Objekt ausgehende Licht durch die Objektivlinse in die Zwischenbildebene fokussiert. Das so entstehende Bild wird durch die Okularlinse betrachtet. Nicht nur Licht aus der Brennebene des Objektivs (hier schwarz dargestellt), sondern auch unfokussiertes Licht aus Bereichen außerhalb der Brennebene (hier rot und blau) erreicht bei diesem Mikroskop das Auge. Durch die Überlagerung von fokussiertem und unfokussiertem Licht ist die räumliche Auflösung des konventionellen Mikroskops



eingeschränkt.

Abb.7 Prinzip der konventionellen Lichtmikroskopie.

Mit der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie läßt sich dieses Problem zum größten Teil lösen. Das CLSM (Confocal Laserscanning-Microscope) diskriminiert Emissionen außerhalb des Fokus, d.h. es wird Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, ausgeblendet. Die Konstruktion ist in Abbildung 8 dargestellt.

Die Kondensorlinse wird durch eine der Objektivlinse identische Linse ersetzt. Die Ausleuchtung des Objekts wird durch eine Lochblende beschränkt, die auf dem Objekt scharf abgebildet wird. Eine zweite Lochblende beschränkt das Sichtfeld auf einen Punkt. Durch den symmetrischen Aufbau dieses Systems sind beide Blenden und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal.

Der Durchmesser der Blenden wird so klein gewählt, daß Licht aus den Bereichen des Objekts, die nicht in der Brennebene liegen, nicht in die Apertur der Blende fallen und damit ausgeblendet werden. In den Photomultiplier gelangt deshalb nur Licht aus der Brennebene des Objekts.

Im Unterschied zum konventionellen erzeugt das konfokale Mikroskop also zunächst nur einen Bildpunkt, der allerdings genau einen Punkt aus der Brennebene des Objektivs darstellt.

Um ein vollständiges Bild des Objekts zu erhalten, muß es Punkt für Punkt gerastert (gescannt) werden. Bei der hier gezeigten Anordnung geschieht dies durch geringes Verschieben des Objekts, damit der nächste Punkt vom Photomultiplier registriert werden kann. Das Abscannen mikroskopischer Objekte wird durch galvanisch betriebene Umlenkspiegel in einer optischen Ablenkungseinheit ermöglicht, die ein Bild von einer vorgeschriebenen Anzahl von Bildpunkten (Pixel) in 0,5 bis 64 Sekunden abrastern können. Die nur kurzfristige Bestrahlung des Objekts verhindert dabei eine thermische Schädigung, bzw. hat nur einen kleinen Ausbleich-Effekt (photobleaching).

Die auf diese Weise gesammelten Bildpunkte werden schließlich von einer Software zu einem vollständigen Bild zusammengesetzt. Der Bildaufbau kann aber auch optisch (ohne Rechner) mit Hilfe einer Nipkow-Scheibe erreicht werden. Bei den meisten modernen Konfokalmikroskopen wird nicht das Objekt bewegt, sondern ein Laserstrahl Punkt für Punkt über das Objekt geführt. Das Bild entsteht dann durch digitale Verarbeitung im Rechner.

Als Anregungslicht dienen verschiedene monochromatische Laser definierter Wellenlänge und definierter Leistung, die individuell verändert werden können. Dichroitische Farbteiler lassen Licht einer bestimmten Wellenlänge geradlinig passieren, während Licht kürzerer Wellenlänge rechtwinklig reflektiert wird.

Das emittierte Licht kann nun über eine Reihe von Strahlteilern und Emissionsfiltern gereinigt und je nach Wellenlängenbereich auf verschiedene Detektoren geleitet werden. Dies sind die Photomultiplier, die das gerasterte Bild als einzelne Bildpunkte wiedergeben.

Jeder einzelne Pixel besitzt einen Grauwert zwischen 0 und 255. Die Bilder sind digitalisiert extern abspeicherbar und werden auf dem Monitor kontinuierlich aufgebaut.

Zur Darstellung mehrfarbiger Bilder sind auch mehrere Detektoren erforderlich, deren Graubilder auf dem jeweiligen Farbkanal gespeichert werden; dieser entspricht der natürlichen Farbe. Durch die Überlagerung dieser verschiedenen Bilder entsteht das Farbbild. Die Technik der Konfokalität ermöglicht also das Herstellen „optischer Schnitte“ durch dreidimensionale Objekte.

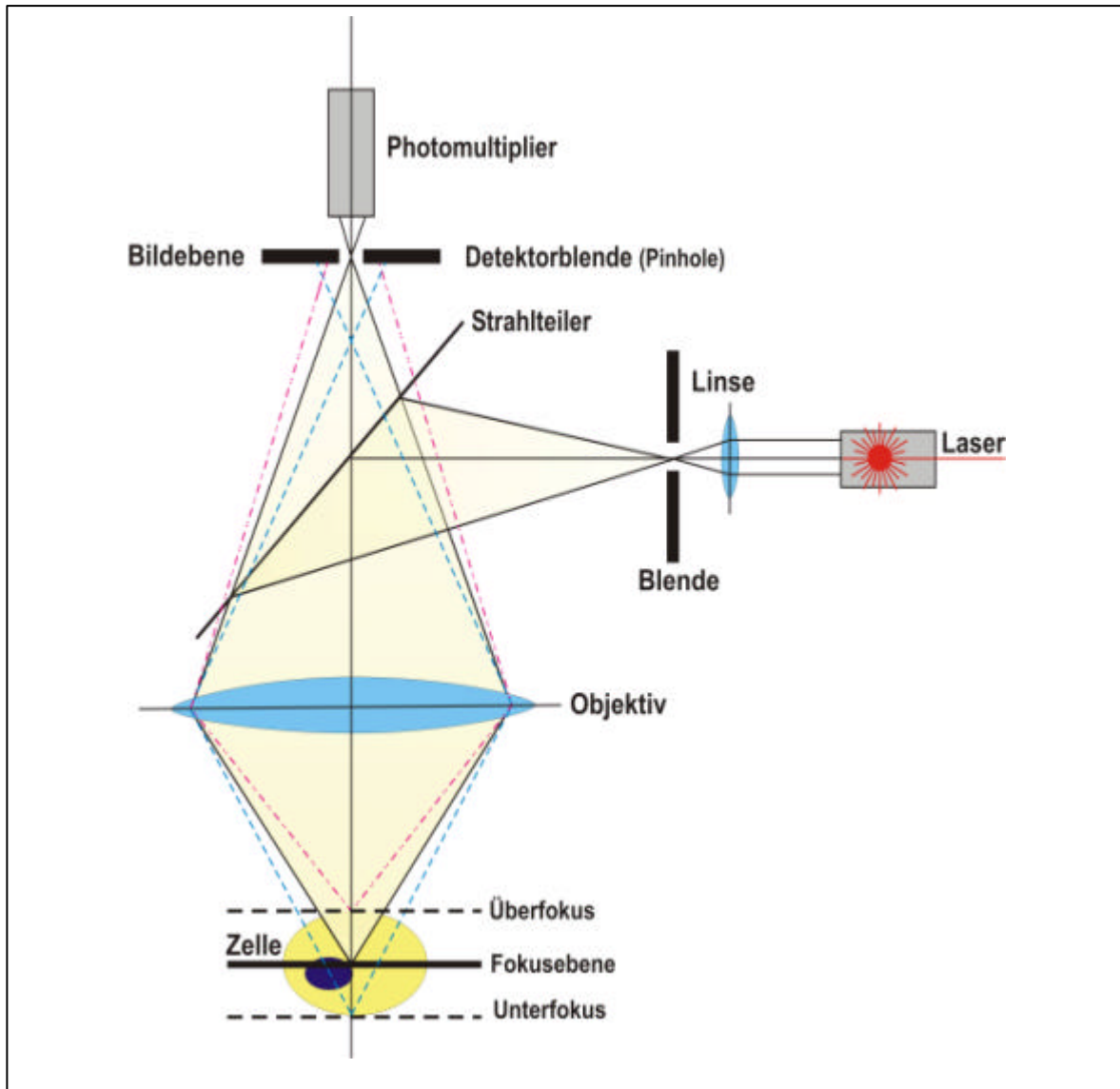


Abb.8 Das Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie; modifiziert nach Minsky M. (s. Anhang 10.2 Original Patentschrift aus dem Jahre 1957).

3.3.3. Zellanalyse mittels Doppelimmunfluoreszenz im CLSM

Der Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie liegt in ihrer hohen Selektivität: Nur die markierte Struktur wird sichtbar. Unter Umständen fehlt damit jedoch jeder Hinweis über die Lage dieser Struktur innerhalb der Zelle. Es ist deshalb sehr wichtig sie mit anderen Zellstrukturen in Verbindung zu setzen. Mit der Doppelimmunfluoreszenz können zwei fluoreszenzmarkierte Strukturen, also zwei spezifische Kontraste, gleichzeitig beobachtet werden. Eine weitere Technik ist die Kombination von Fluoreszenzbild und Transmissionsbild aus Phasen- oder differentiellem Interferenzkontrast (DIK). Sie kombiniert spezifischen und unspezifischen Kontrast. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden des Strukturvergleichs verwendet.

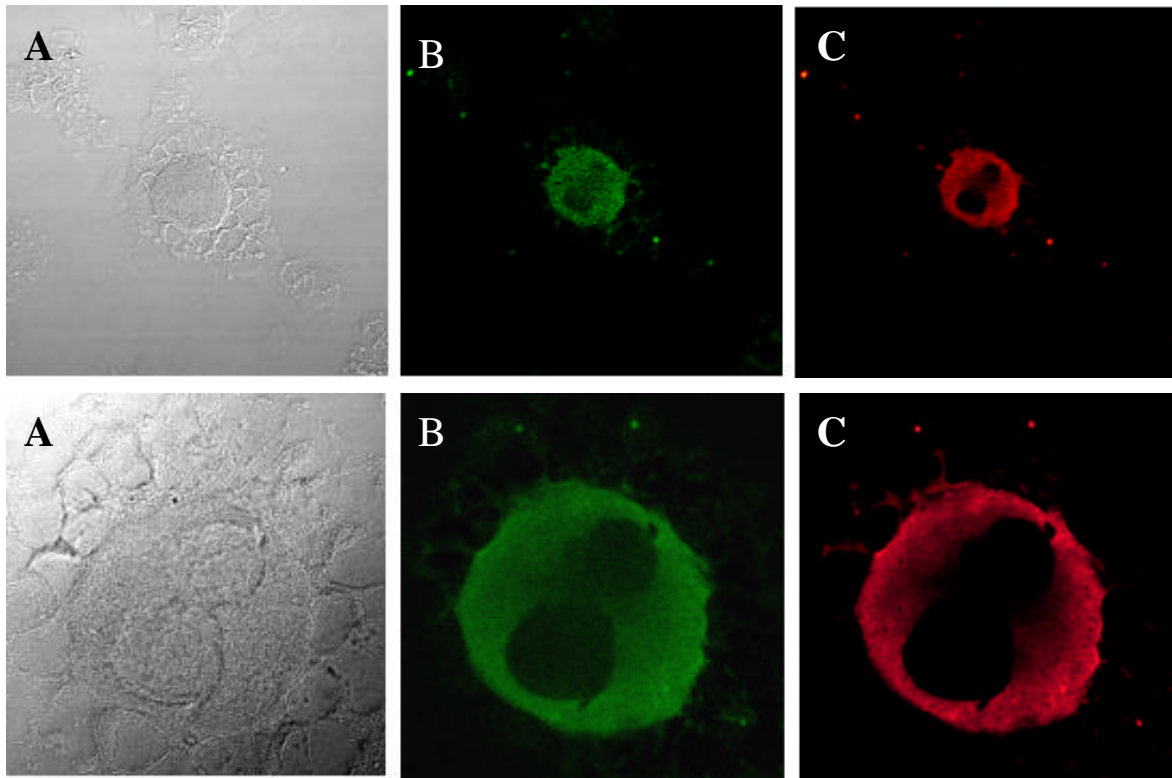
Die Analyse des Probenmaterials erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops: Kombination aus Mikroskop (Fa. Zeiss, Axiovert 35) und Argon/Krypton-Laserscanner (Fa. Leica, TCS 40). Die Software wurde ebenfalls von der Fa. Leica erworben (Scanware 3.61).

Mindestens 10 Cytospins (Gesamtzellzahl 10^6) pro Patientin wurden auf Cytokeratin- und uPA-R-positive Zellen hin untersucht. Die CK- und uPA-R-positive Ovarialkarzinomzelllinie OvMZ #45 (Universität Mainz, unveröffentlicht) diente hierbei als Positivkontrolle.

Die Cytospins wurden präpariert und die Zellen, wie unter 3.3.1 beschrieben, mit Antikörpern gelabelt. Um die fluoreszierenden Cytokeratin-positiven Zellen zu erfassen (Nachweis der epithelialen Abstammung), wurden die Präparate systematisch bei einer Wellenlänge von 488 nm durchmustert. Nach Auffinden einer CK-positiven Zelle wurde sie gescannt, archiviert (CK = grün) und dann ebenfalls bei einer Wellenlänge von 568 nm auf Fluoreszenz (rot) überprüft (Nachweis von uPA-R). War der Befund einer Zelle gleichzeitig positiv für Cytokeratin und uPA-R, mußte sie noch morphologisch beurteilt werden (Größe, Kern-Plasma-Verhältnis, Pleomorphie). Dazu wurde zusätzlich ein Transmissionsbild erstellt (Grauschattierungen), auf welchem die Zellstrukturen deutlich erkennbar waren.

Alle Aufnahmen wurden jeweils bei 200- und 630-facher (Immersions-Öl) Vergrößerung angefertigt.

Abbildung 9 zeigt als Beispiel die Aufnahmen einer Cytokeratin- und uPA-R-positiven Zelle nach dem eben beschriebenen Prinzip (weitere Beispiele s. Anhang 10.2).



*Abb.9 Disseminierte, CK-positive Zelle im Knochenmark bei Patientinnen mit OvCa. Phäotypisierung (Doppelimmunfluoreszenz) und konfokale Lasermikroskopie bei 200- (oben) und 630-facher Vergrößerung (unten), **A** Transmissionsbild (lichtmikroskopisch), **B** Immunfluoreszenzfärbung gegen Cytokeratin 8/18/19 (A45-B/B3, Alexa 488), **C** Immunfluoreszenzfärbung gegen uPA-R (HU277, Alexa 568).*

3.3.4. Quantifizierung des uPA-R-Gehaltes CK-positiver Zellen

Mit fluoreszierenden Partikeln (Latex beads) der Firma InSpeck können Kalibrierungskurven für die Fluoreszenzmikroskopie erstellt werden (*die folgenden Angaben beziehen sich im Wesentlichen auf Noack et al. 1999:617-623*).

Die Fluoreszenz-Signale der Latex beads reichen von sehr schwach bis hell leuchtend, welche von nahezu jedem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Mittels Durchflußzytometrie wurden die Fluoreszenz-Intensitäten der beads bestimmt. Um eine definierte Aussage über diese Fluoreszenz-Intensitäten machen zu können, wurden die stärkste Signalantwort als Bezugsgröße 1 (100%) gesetzt und alle anderen Signalantworten der einzelnen beads relativ zur Bezugsgröße prozentual bewertet. Es wurden standardisierte Latex beads mit der verhältnismäßig schwachen Fluoreszenz-Intensität von 1,6% zur Anwendung gebracht.

Um die detektierten CK-positiven Zellen näher zu charakterisieren, musste eine Analyse ihres uPA-R-Gehaltes erstellt werden. Dazu wurden die Zellen bei einer Wellenlänge von 568 nm im Abstand von 0,2 µm gescannt und als Einzelbilder gespeichert. Im Mittel ergab sich eine Anzahl von 35 (20 - 50) Bildern pro Zelle. Durch Übereinanderlegen der Einzelbilder zu einem Gesamt-Intensitätsbild (extended focus) errechnete sich die Summe aller Einzelintensitäten. Das Prinzip der uPA-R-Quantifizierung zeigt Abbildung 10, ein Beispiel Abbildung 11.

Als Vergleichgröße für die Quantifizierung des uPA-R-Gehaltes dienen, wie oben beschrieben, standardisierte fluoreszierende Latex beads (InSpeck Red). Dazu wurde zu jeder uPA-R-positiven Zelle ein Latex bead (1,6%) bei exakt denselben Mikroskopeinstellungen (voltage, offset, pinhole) in 0,2 µm-Schritten gescannt und ebenfalls dessen Gesamtfluoreszenz (extended focus) berechnet. Die beiden Gesamtfluoreszenzen der uPA-R-positiven Zellen und des zugehörigen Latex beads ergaben zueinander eine bestimmte Relation.

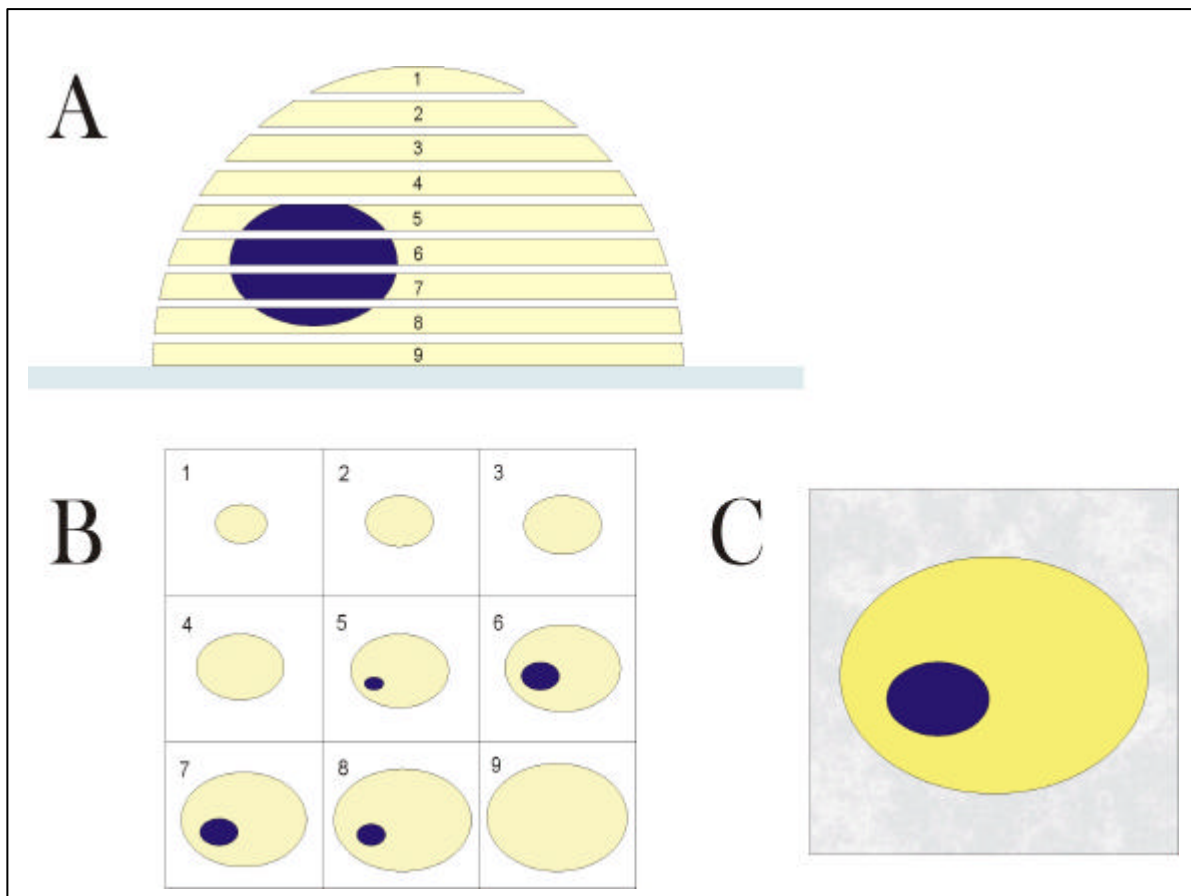
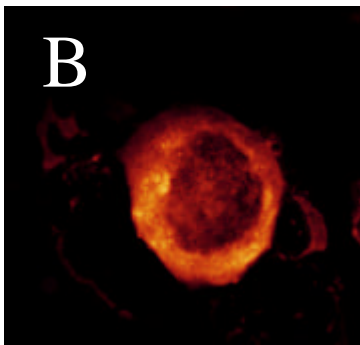
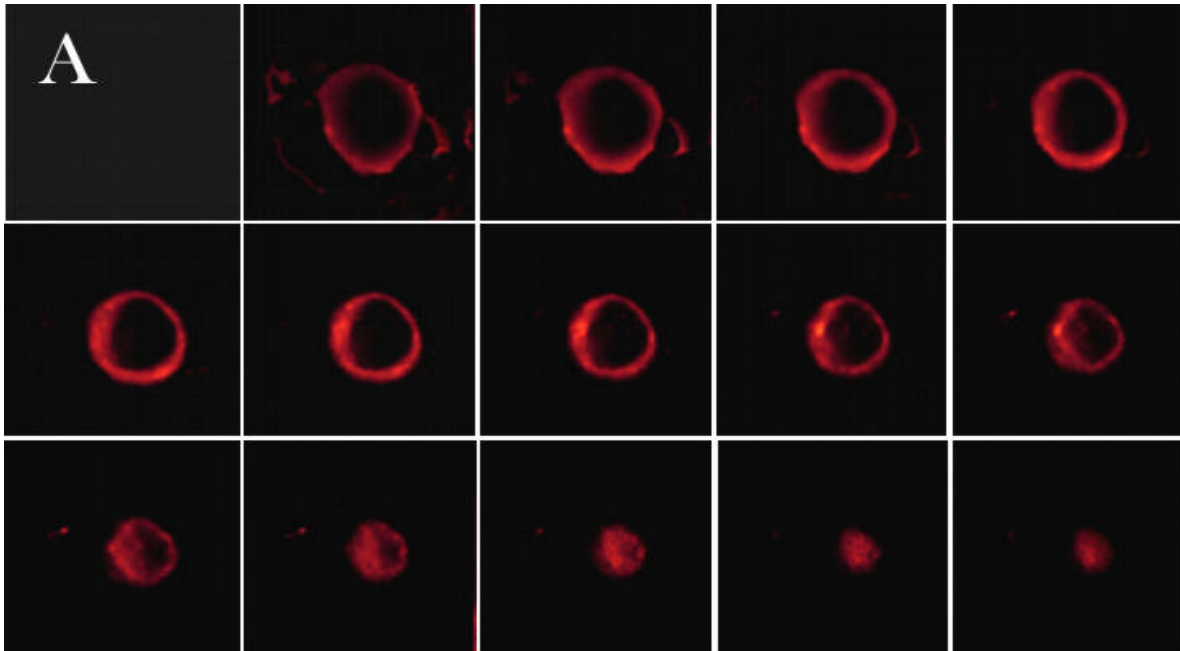


Abb.10 Das Prinzip der uPA-R-Quantifizierung; modifiziert nach Noack (Noack et al. 1999:617-623). **A** Seitenansicht einer gescannten Zelle. **B** Galleriebild aus neun Einzelscans. **C** extended focus.

Mit dieser Methode ist es nicht möglich die Rezeptordichte einer Zelle als Zahlenwert zu erfassen; man erhält lediglich einen Vergleichswert. Enthält z.B. eine uPA-R-positive Zelle eine 6-fach höhere Gesamtfluoreszenz-Intensität als ihr entsprechendes Latex bead und eine zweite Zelle den 2-fachen extended focus ihres entsprechenden Beads, bedeutet das eine dreifach höhere Fluoreszenz der ersten Zelle im Vergleich zur zweiten und somit eine dreifach höhere uPA-R-Dichte der ersten Zelle.



*Abb.11 uPA-R-Quantifizierung einer CK-positiven Zelle im Knochenmark bei Ovarialkarzinom. **A** Galleriebild einer uPA-R-positiven Zelle. **B** Extended focus.*

3.3.5. Verwendete Hilfsmittel und Reagenzien

3.3.5.1. Apparative Einrichtungen

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

CLSM Software Scanware 3.61, Fa. Leica

Cytoclips stainless steel slide clip, Fa. Shandon

Cytofunnel, Fa. Shandon

Cytozentrifuge: Cytospin 2, Fa. Shandon

Deckgläschen 18 x 18 mm, Fa. Marienfeld

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

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

Eppendorfcups 1000 µl, Fa. Biozym Diagnostik GmbH

Fettstift Dako Pen, Fa. DAKO

Filter cards 5991022, Fa. Shandon

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

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

Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM), bestehend aus:

- Mikroskop Axiovert 35, Fa. Zeiss, Heidelberg
- Laser-Scanning-Detektionseinheit TCS 40 (Argon-Krypton Laser), Fa. Leica, Bensheim

Lichtmikroskop, Fa. Leitz

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

Objektträger 76 x 26 mm Menzel-Gläser

Pasteurpipetten 150 mm, 230 mm, Fa. Volac

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

Pipettierhelfer Macro, Fa. Brand GmbH

Präzisionswaage FX-40, Fa. AND, Japan

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

Zentrifuge 4K15, Fa. Sigma

3.3.5.2. Antikörper

- Anti-Cytokeratin 8/18/19 (A45-B/B3), F_{ab}-Fragment, Klasse IgG1, Spezies Maus, monoklonaler Antikörper, 1.0 mg/ml in PBS pH 7.4, Fa. Micromet GmbH, München
- Anti-uPA-Rezeptor HU277, Klasse IgY, Spezies Huhn, polyklonaler Antikörper, PD Dr. Viktor Magdolen, Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München
- Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, 2 mg/ml, Fa. Molecular Probes Europe, Leyden, Niederlande
- Alexa Fluor 568 goat anti-chicken IgY, 2 mg/ml, Fa. Molecular Probes Europe, Leyden, Niederlande

3.3.5.3. Reagenzien

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

Biocoll (density 1.077), Fa. Biochrom KG

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

Giemsa-Färbung, Fa. Merck KGaA

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

Paraformaldehyd pure, Fa. Serva

PBS Pufferlösung, Fa. Gibco

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

Saponin, Fa. Serva

4. ERGEBNISSE

4.1. Durchführung der Knochenmarkaspiration, -präparation und -färbung

Bei der Knochenmarkpunktion kam es bei keiner der behandelten Patientinnen zu Komplikationen (z.B. Nachblutung, Verletzung von Nachbarorganen, Infektion der Einstichstelle, Schmerz).

4.1.1. Einfluss- und Störfaktoren

4.1.1.1. Patienten- und therapiebezogene Faktoren

Aufgrund der Adipositas einiger Patientinnen war die Biopsienadel zu kurz um durch das subkutane Fett- und Muskelgewebe bis zum Markraum vordringen zu können. Die Aspiration war dadurch sehr erschwert bzw. unmöglich. Um dieses zu vermeiden, wurden schließlich, den Körperverhältnissen angepaßt, längere Nadeln zur Knochenmarkpunktion benutzt.

Die Auswirkungen einer der Operation vorausgehenden Radio- oder Chemotherapie stellen ein Hindernis in Gewinn und Verarbeitung des Probenmaterials dar. Durch eine präoperative Bestrahlung wird das Knochenmark der betroffenen Patienten zum Teil erheblich geschädigt und atrophisch (Myelofibrose). In diesen, wenngleich seltenen Fällen, ist bei der Aspiration kein Materialgewinn möglich. Bei einigen Patientinnen, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten, stellte sich das aspirierte Knochenmark nicht homogen dünnflüssig, sondern mit kleinen Klümpchen versetzt dar, die nach der Dichtezentrifugation die Interphase mit den anderen Phasen verkleben ließen. Die Präparation der reinen Interphase wurde dadurch erschwert und in wenigen Fällen sogar unmöglich.

4.1.1.2. Methodischer Faktor

Es waren mehrere Versuche zur Einstellung der richtigen Heparindosis in den Auffanggefäßen der KM-Aspirate nötig. Wurde die Heparindosis zu niedrig gewählt, koagulierte das Knochenmark noch vor der weiteren Verarbeitung. War sie hingegen zu hoch gewählt, führte dies zur Dichteminderung im Präparat; dies hatte zur Folge, daß keine Übersichtung und damit Phasenbildung mit Ficoll zur Erstellung eines Dichtegradienten möglich war.

Mit zunehmender Erfahrung ist es jedoch gelungen, die anfänglichen technischen Schwierigkeiten bei der Knochenmarkaspiration und -präparation auszuschalten.

4.1.2. Qualitätssicherung

Die erste nach der Punktion des Knochenmarks entnommene Probe wurde dem hämatologischen Labor der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar (Univ. Prof. Dr. med. C. Peschel) übergeben. Dort wurden Ausstriche des Knochenmarkspirates angefertigt, einer Giemsa-Färbung (Merck KgaA) unterzogen und lichtmikroskopisch auf Qualität geprüft. Spongiosabälkchen mit umliegenden Zellen der Hämatopoese und ein nur geringer Anteil reifer Erythrozyten galten als Kriterien für die erfolgreiche Knochenmarkpunktion und für eine einwandfreie Qualität des Knochenmarks (s. Abb.12).

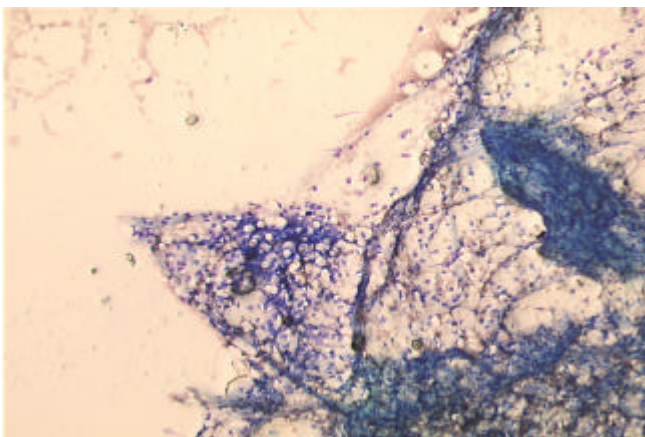
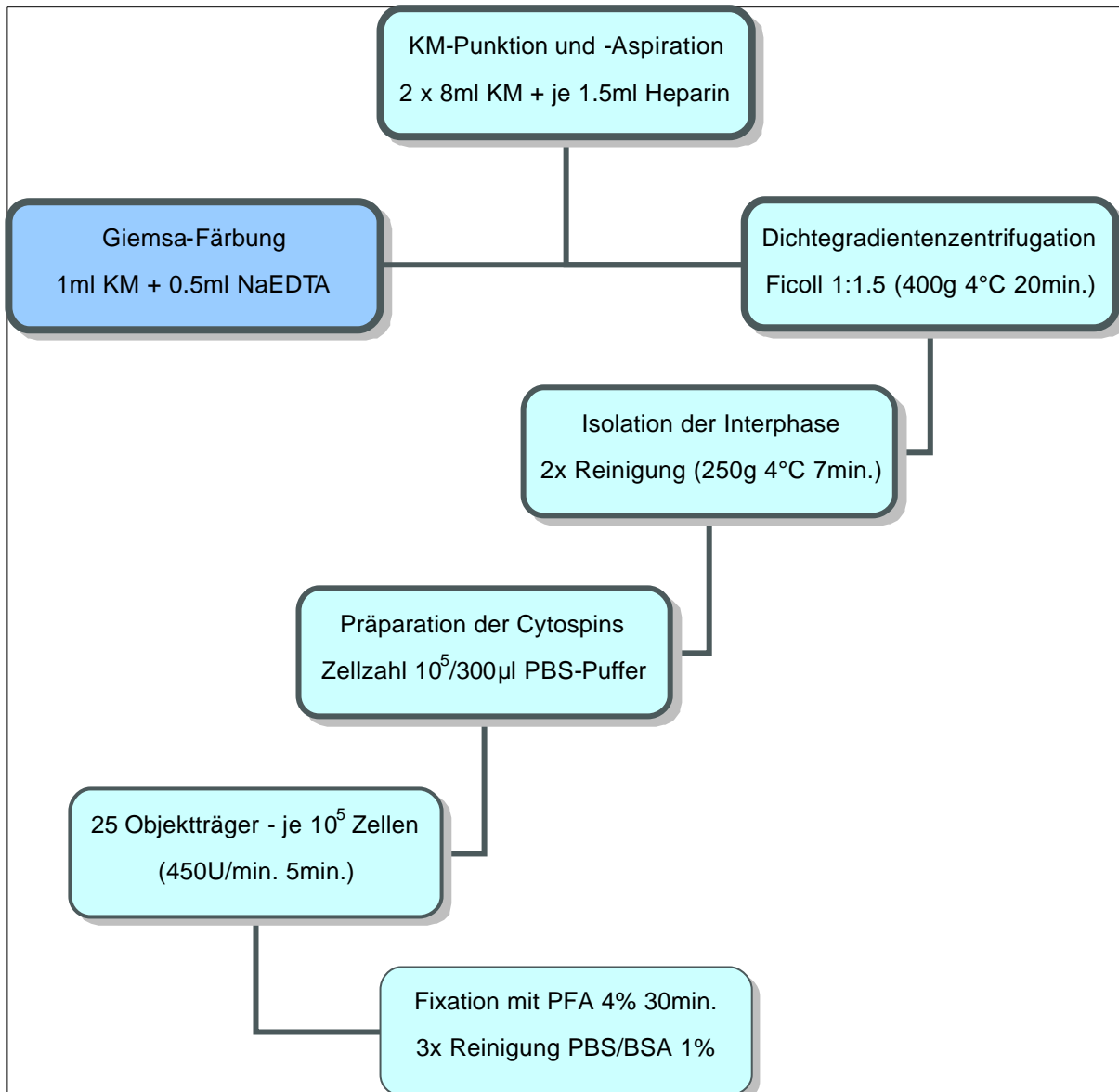


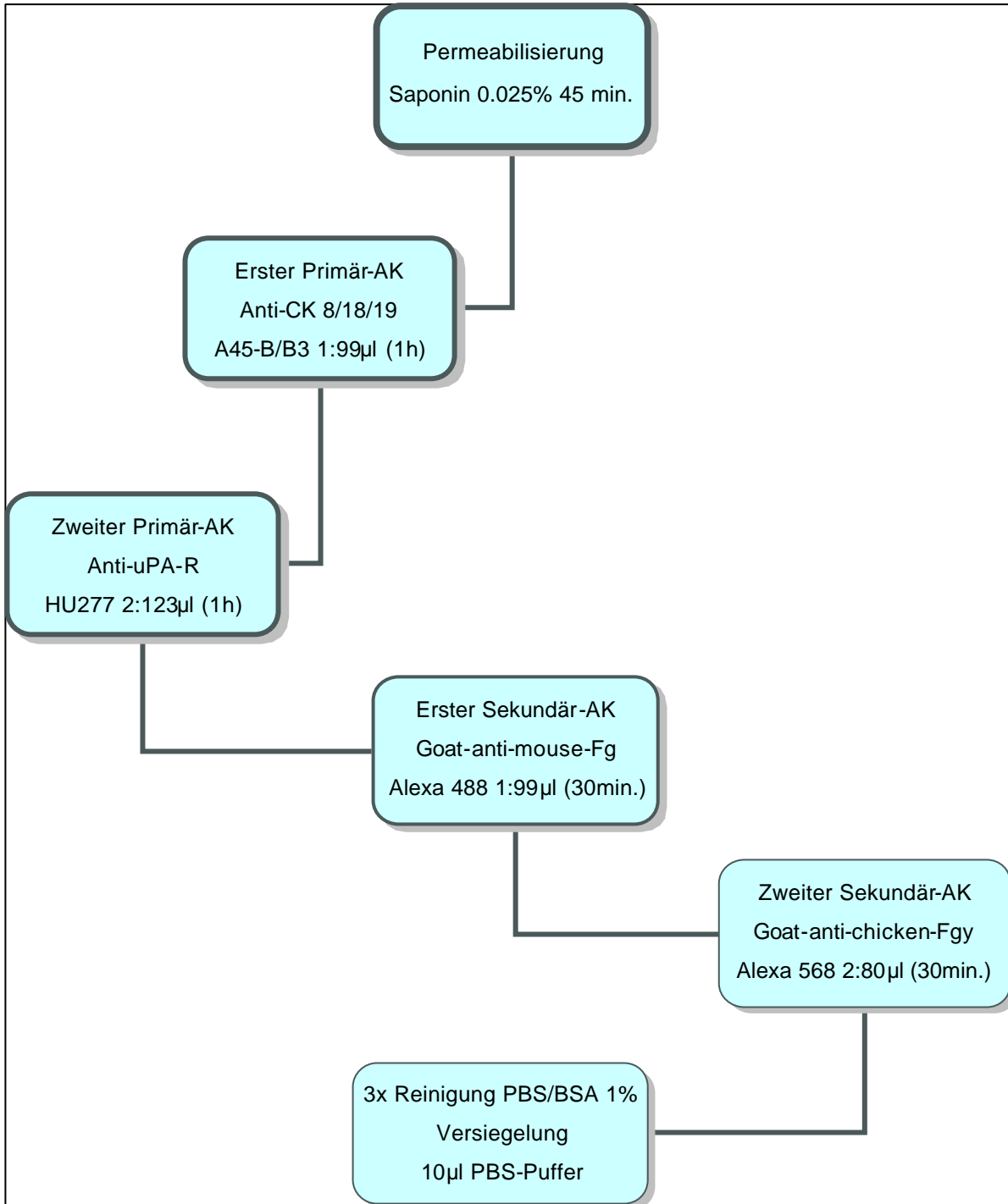
Abb.12: Knochenmarkausstrich einer Patientin mit Ovarialkarzinom (Giemsa-Färbung).

4.1.3. Endgültiges Präparations- und Färbeprotokoll

4.1.3.1. Flowsheet Präparationsprotokoll



4.1.3.2. Flowsheet Färbeprotokoll



4.2. Sensitivität von Doppelimmunfluoreszenzfärbung und Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Detektion von Tumorzellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wird als sehr sensitiv beschrieben (Noack et al. 1999:617-623).

Die Untersuchung zur Sensitivität einer verwendeten Methode sollte folgende beide Fragen beantworten können:

1. Wird das Antigen erkannt wenn es vorhanden ist?
2. In welcher Menge muss das Antigen vorliegen, bzw. wie viele Zellen mit Antigenexpression müssen in 10^6 Zellen vorhanden sein, damit ein positives Ergebnis diagnostiziert wird?

Frage 1 impliziert die Notwendigkeit einer hundertprozentigen Sensitivität des verwendeten Antikörpers. Hier muss man sich auf die Herstellerangaben verlassen (s. 3.3.5.2).

Zur Beantwortung der zweiten Frage wurde eine Verdünnungsreihe mit der Ovarialkarzinomzelllinie OvMZ #45 in Knochenmarkzellen von Patientinnen ohne malignen Befund hergestellt. Dabei wurde eine bekannte Anzahl Zellen OvMZ #45 (zwischen 1 und 500) zu 100.000 Knochenmarkzellen gegeben, Cytospins angefertigt und der Doppelimmunfluoreszenzfärbung (mAK A45-B/B3, pAK HU277) unterzogen (s. 3.3.1.2). Pro Verdünnungsstufe wurden 10 Präparate mit je 100.000 Zellen, also 10^5 Zellen ausgewertet (s. Tab.9).

Ein „natürlicher“ Verlust an Zellen bei der Färbeprozedur wurde erwartet (Franklin et al. 1996:1-13), trotzdem wurde eine hohe Anzahl Tumorzellen über die Fluoreszenzmikroskopie wiedergefunden (s. Tab.9). Selbst bei Proben mit einem sehr geringen Anteil an OvMZ #45 (1:1.000.000) entspricht dies den Vorversuchen mit der Zelllinie ZR75 beim Mammakarzinom (Noack et al. 1999:617-623).

Verdünnung	Eingesetzte Tumorzellen in 10 ⁵	Wiederentdeckte Tumorzellen in 10 ⁵ (Durchschnitt)
1:200	500	102 - 265 (196,3)
1:1.000	100	20 - 62 (48,1)
1:2.000	50	12 - 27 (18,9)
1:10.000	10	1 - 6 (4,2)
1:20.000	5	0 - 3 (0,8)
1:100.000	1	0 - 1 (0,2)
1:1.000.000	0.2 (2 in 10 Präparaten)	2

Tab.9 Verdünnungsreihe zur Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit der Zelllinie OvMZ #45 (Ovariakarzinom).

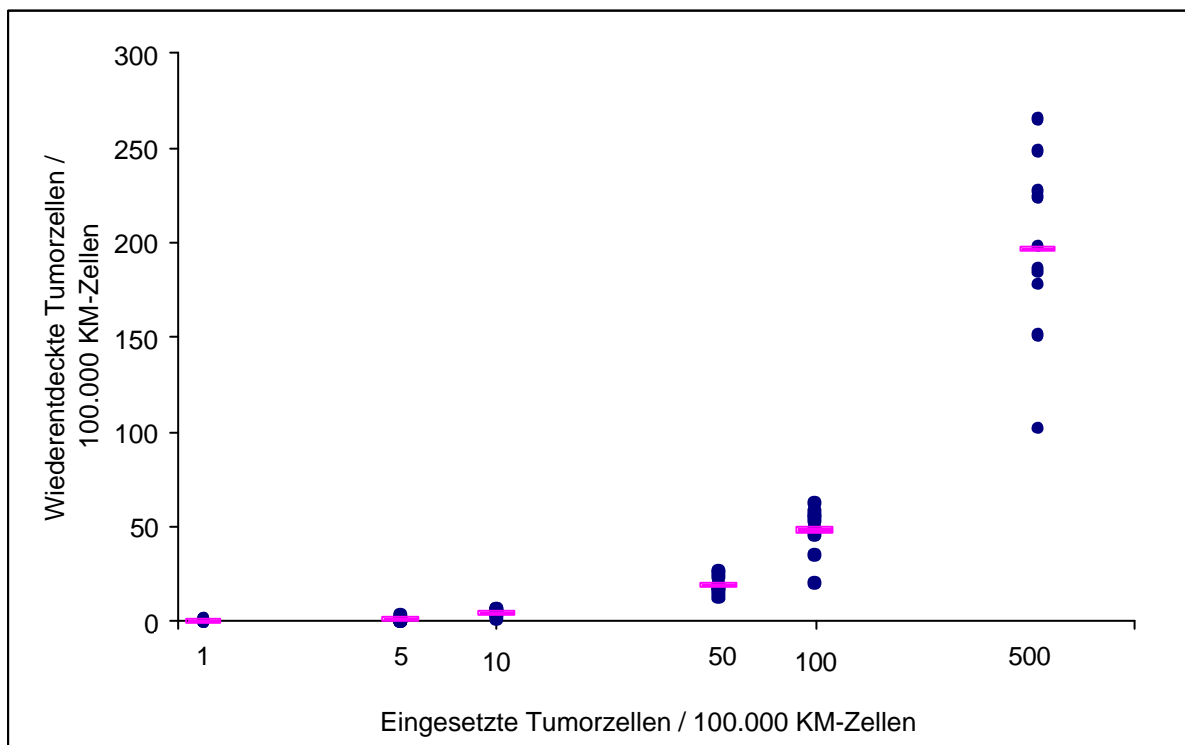


Abb.13 Knochenmarkaspirat versetzt mit OvMZ #45 (Ovariakarzinomzellreihe) in unterschiedlichen Verdünnungsstufen: Wiederentdeckungsrate.

4.3. Detektion uPA-R-positiver CK-positiver Zellen im Knochenmark

Im Rahmen dieses Pilotprojektes wurden 38 Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom präoperativ einer Knochenmarkpunktion unterzogen.

Die KM-Aspirate wurden entsprechend präpariert (s. 3.2.1, 3.2.2), um die Fraktion mononukleärer Zellen der zytologischen Untersuchung unterziehen zu können. Zur Detektion und Phänotypisierung der gewonnenen Zellen kam eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen das Pancytokeratin 8/18/19 (A45-B/B3, Alexa 568), sowie gegen den uPA-R (HU277, Alexa 488) zur Anwendung.

Bei der Analyse im konfokalen Lasermikroskop fanden sich:

1. in den Negativkontrollen ausschliesslich CK-negative Zellen ohne Expression von uPA-R,
2. in den Positivkontrollen ausschliesslich CK-positive Zellen mit Expression von uPA-R,
3. bei neun der untersuchten 38 Patientinnen (9/38) CK-positive Zellen (23,7%). Alle diese Zellen zeigten ebenfalls die Expression des uPA-Rezeptors (s. Abb.14).
4. keine einzige CK-positive Zelle ohne Expression des uPA-Rezeptors (0%).
5. keine einzige u-PA-R-positive Zelle ohne Expression von Cytokeratin (0%).

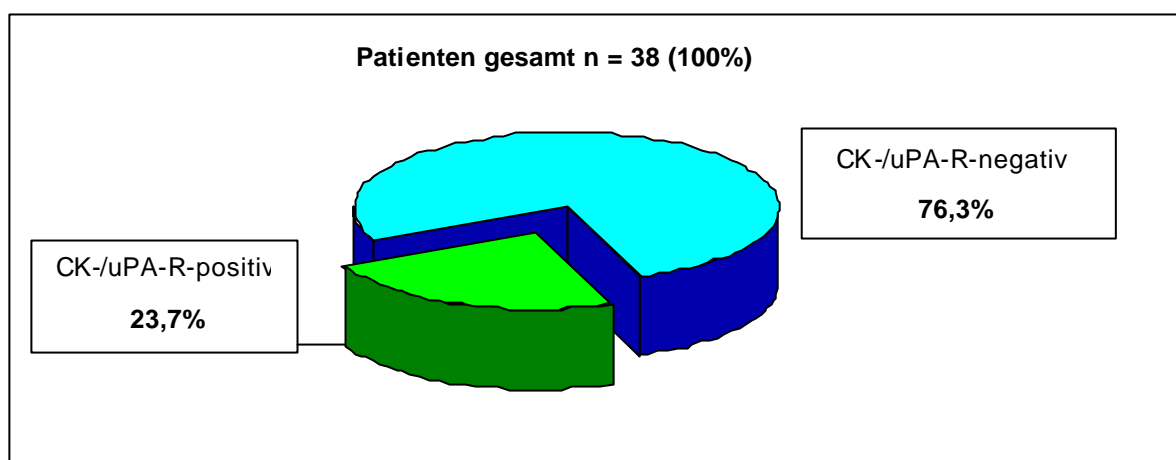


Abb. 14 Patientinnen mit CK- und uPA-R-positiven Zellen im Knochenmark (n = 38).

4.4. Vergleich von CK-/uPA-R-positiven Zellen (CK-/uPA-R-Status) mit etablierten Prognosefaktoren

Eine Übersicht der aus der vorliegenden Studie gewonnenen immunzytologischen Daten und klinischen Merkmale ist den Tabellen 10 und 11 zu entnehmen:

FIGO-Stadium	n	Grading			LK-Status			CK-/uPA-R-positiv
		G1	G2	G3	N0	N1	Nx	
I	6	3	2	1	6	-	-	2
II	2	2	-	-	1	-	1	-
III	21	-	4	17	5	4	12	5
IV	9	-	1	8	-	4	5	2
n gesamt	38	5	7	26	12	8	18	9

Tab.10 Übersicht der Daten zur CK-positiven Zell-Detektion in Bezug zu klinischen Merkmalen.

Pat. - Nr. (uPA-R-positiv)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
FIGO-Stadium	I	I	III	III	III	III	III	IV	IV
Grading	G1	G2	G2	G3	G3	G3	G3	G3	G3
LK-Status	N0	N0	Nx	Nx	N0	Nx	N0	Nx	Nx
neoadjuvante CTx	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	nein	ja

Tab.11 Übersicht des Zusammenhangs zwischen klinischen und immunzytochemischen Daten.

Der statistische Zusammenhang zwischen dem Nachweis von CK-/uPA-R-positiven Zellen (CK-/uPA-R-Status) mit den etablierten Prognosefaktoren FIGO-Stadium, Grading und Lymphknoten-Status wurde zunächst mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes untersucht. Der Chi-Quadrat-Test setzt allerdings voraus, daß höchstens 20% der „erwarteten Anzahlen“ < 5 sein dürfen.

Da diese Voraussetzung für keinen der Fälle erfüllt werden konnte, stellen die Testergebnisse lediglich Näherungswerte dar. Zur Bestätigung wurden die Daten jeweils in Gruppen zusammengefasst und in einer 2x2 -Tabelle dem Exakten Test nach Fisher unterzogen.

Alle Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aus dem Statistikprogramm SPSS dargestellt:

χ^2 -Test FIGO-Stadium gegen CK-/uPA-R-Status

Kreuztabelle

			CK-/uPA-R-Status		Gesamt
			negativ	positiv	
FIGO-Stadium	I	Anzahl	4	2	6
		Erwartete Anzahl	4,6	1,4	6,0
		% von FIGO-Stadium	66,7%	33,3%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	13,8%	22,2%	15,8%
	II	Anzahl	2	0	2
		Erwartete Anzahl	1,5	,5	2,0
		% von FIGO-Stadium	100,0%	,0%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	6,9%	,0%	5,3%
	III	Anzahl	16	5	21
		Erwartete Anzahl	16,0	5,0	21,0
		% von FIGO-Stadium	76,2%	23,8%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	55,2%	55,6%	55,3%
	IV	Anzahl	7	2	9
		Erwartete Anzahl	6,9	2,1	9,0
		% von FIGO-Stadium	77,8%	22,2%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	24,1%	22,2%	23,7%
Gesamt	Anzahl	29	9	38	
	Erwartete Anzahl	29,0	9,0	38,0	
	% von FIGO-Stadium	76,3%	23,7%	100,0%	
	% von CK-/uPA-R-Status	100,0%	100,0%	100,0%	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,941 ^a	3	,816
Anzahl der gültigen Fälle	38		

a. 6 Zellen (75,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,47.

Für die FIGO-Stadien wurden die Kategorien I und II sowie III und IV zu je einer Gruppe zusammengefasst und dem Exakten Test nach Fisher unterzogen.

FIGO I + II gegen III + IV * CK-/uPA-R-Status Kreuztabelle

			CK-/uPA-R-Status		Gesamt
			negativ	positiv	
FIGO I + II gegen III + IV	FIGO I + II	Anzahl	6	2	8
		Erwartete Anzahl	6,1	1,9	8,0
		% von FIGO I + II gegen III + IV	75,0%	25,0%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	20,7%	22,2%	21,1%
FIGO III + IV	FIGO III + IV	Anzahl	23	7	30
		Erwartete Anzahl	22,9	7,1	30,0
		% von FIGO I + II gegen III + IV	76,7%	23,3%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	79,3%	77,8%	78,9%
Gesamt		Anzahl	29	9	38
		Erwartete Anzahl	29,0	9,0	38,0
		% von FIGO I + II gegen III + IV	76,3%	23,7%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,010 ^b	1	,922		
Exakter Test nach Fisher				1,000	,625
Anzahl der gültigen Fälle	38				

b. 1 Zellen (25,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,89.

χ^2 -Test Grading gegen CK-/uPA-R-Status

Kreuztabelle

			CK-/uPA-R-Status		Gesamt
			negativ	positiv	
Grading	G1	Anzahl	2	1	3
		Erwartete Anzahl	2,3	,7	3,0
		% von Grading	66,7%	33,3%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	6,9%	11,1%	7,9%
	G2	Anzahl	7	2	9
		Erwartete Anzahl	6,9	2,1	9,0
		% von Grading	77,8%	22,2%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	24,1%	22,2%	23,7%
	G3	Anzahl	20	6	26
		Erwartete Anzahl	19,8	6,2	26,0
		% von Grading	76,9%	23,1%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	69,0%	66,7%	68,4%
Gesamt	Anzahl	29	9	38	
	Erwartete Anzahl	29,0	9,0	38,0	
	% von Grading	76,3%	23,7%	100,0%	
	% von CK-/uPA-R-Status	100,0%	100,0%	100,0%	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,170 ^a	2	,918
Anzahl der gültigen Fälle	38		

- a. 3 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,71.

Für das Grading wurden zum einen G1 und G2 zu einer Gruppe zusammengefasst und im Exakten Test nach Fisher gegen G3 untersucht, zum anderen G2 und G3 zu einer Gruppe zusammengefasst und gegen G1 untersucht:

Kreuztabelle

			CK-/uPA-R-Status		Gesamt
			negativ	positiv	
Grading 1 + 2 gegen 3	G1 + G2	Anzahl	9	3	12
		Erwartete Anzahl	9,2	2,8	12,0
		% von Grading 1 + 2 gegen 3	75,0%	25,0%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	31,0%	33,3%	31,6%
	G3	Anzahl	20	6	26
		Erwartete Anzahl	19,8	6,2	26,0
		% von Grading 1 + 2 gegen 3	76,9%	23,1%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	69,0%	66,7%	68,4%
Gesamt	Anzahl	29	9	38	
	Erwartete Anzahl	29,0	9,0	38,0	
	% von Grading 1 + 2 gegen 3	76,3%	23,7%	100,0%	
	% von CK-/uPA-R-Status	100,0%	100,0%	100,0%	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,017 ^b	1	,897		
Exakter Test nach Fisher				1,000	,599
Anzahl der gültigen Fälle	38				

b. 1 Zellen (25,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,84.

Kreuztabelle

			CK-/uPA-R-Status		Gesamt
			negativ	positiv	
Grading 1 gegen 2 + 3	G2 + G3	Anzahl	27	8	35
		Erwartete Anzahl	26,7	8,3	35,0
		% von Grading 1 gegen 2 + 3	77,1%	22,9%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	93,1%	88,9%	92,1%
	G1	Anzahl	2	1	3
		Erwartete Anzahl	2,3	,7	3,0
		% von Grading 1 gegen 2 + 3	66,7%	33,3%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	6,9%	11,1%	7,9%
Gesamt		Anzahl	29	9	38
		Erwartete Anzahl	29,0	9,0	38,0
		% von Grading 1 gegen 2 + 3	76,3%	23,7%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,168 ^b	1	,682		
Exakter Test nach Fisher				1,000	,567
Anzahl der gültigen Fälle	38				

b. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,71.

χ^2 -Test und Exakter Test nach Fisher LK-Status gegen CK-/uPA-R-Status

Kreuztabelle

			CK-/uPA-R-Status		Gesamt
			negativ	positiv	
LK-Status	N0	Anzahl	8	4	12
		Erwartete Anzahl	9,5	2,5	12,0
		% von LK-Status	66,7%	33,3%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	53,3%	100,0%	63,2%
	N1	Anzahl	7	0	7
		Erwartete Anzahl	5,5	1,5	7,0
		% von LK-Status	100,0%	,0%	100,0%
		% von CK-/uPA-R-Status	46,7%	,0%	36,8%
Gesamt	Anzahl	15	4	19	
	Erwartete Anzahl	15,0	4,0	19,0	
	% von LK-Status	78,9%	21,1%	100,0%	
	% von CK-/uPA-R-Status	100,0%	100,0%	100,0%	

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,956 ^b	1	,086		
Exakter Test nach Fisher				,245	,128
Anzahl der gültigen Fälle	19				

b. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,47.

Diese Ergebnisse zeigen die Unabhängigkeit des Nachweises CK-/uPA-R-positiver Zellen von bisher etablierten Prognosefaktoren (p-Wert > 0,05):

Ein Zusammenhang des Auftretens uPA-R-positiver CK-positiver Zellen konnte weder zu FIGO-Stadium (χ^2 -Test: p-Wert 0,922; Exakter Test nach Fisher: p-Wert 1,000), Grading (χ^2 -Test: p-Wert 0,897 bzw. 0,682; Exakter Test nach Fisher: p-Wert je 1,000) noch zum Lymphknoten-Status (χ^2 -Test: p-Wert 0,860; Exakter Test nach Fisher: p-Wert 0,245) abgeleitet werden.

4.5. Zusammenhang zwischen dem CK-/uPA-R-Status und neoadjuvanten / adjuvanten Chemotherapien

Während der Ausarbeitung der vorliegenden Studie entstand die Frage nach einem Zusammenhang zwischen der Existenz/Persistenz CK-/uPA-R-positiver Zellen und dem therapeutischen Erfolg operationsbegleitender Chemotherapien. Zu diesem Zwecke ist in Abbildung 15 die Reihenfolge der unterschiedlichen Therapie- bzw. Behandlungsschritte dargestellt (blaue Balken).

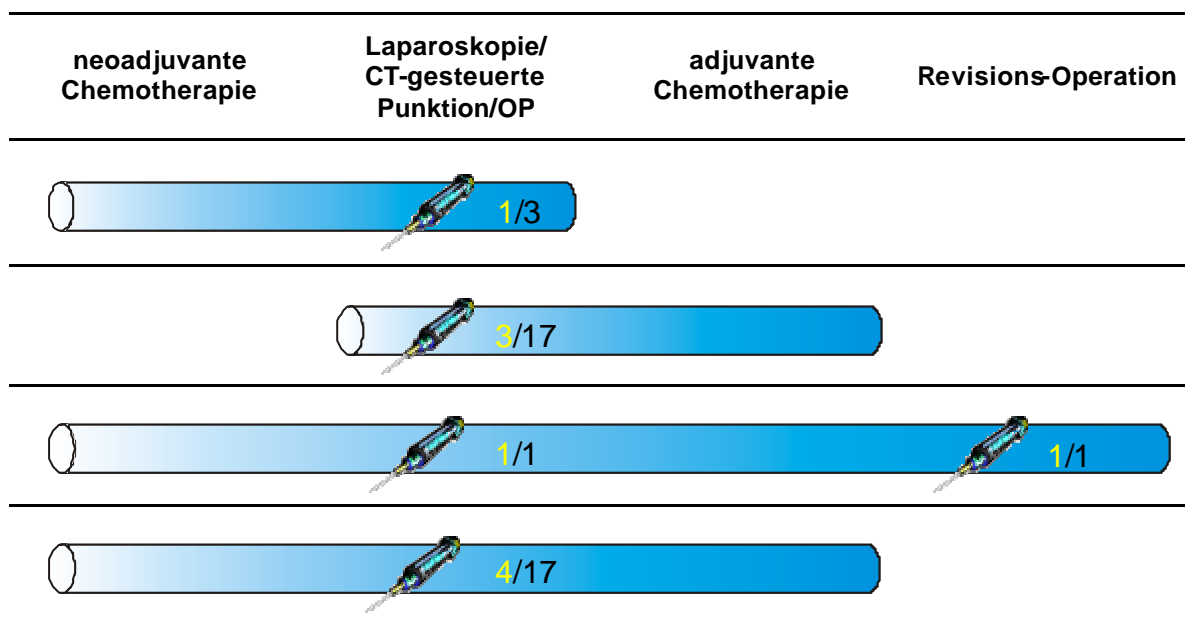


Abb.15 Reihenfolge der Therapie- bzw. Behandlungsschritte (von links nach rechts) bei Patientinnen mit OvCa (schwarz). Anteil der Patientinnen mit CK- und uPA-R-positiven Zellen (gelb); Zeitpunkt der KM-Aspiration (Spritze).

Die Anzahl der in den verschiedenen Gruppen befindlichen Patientinnen ist schwarz dargestellt, der Anteil der Patientinnen mit CK- und uPA-R-positiven Zellen innerhalb dieser Gruppen gelb. Das Symbol der Spritze steht für den Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion.

So wurden z.B. drei Patientinnen einer neoadjuvanten Therapie unterzogen und entweder zum Zeitpunkt der Operation, der CT-gesteuerten Punktion oder einer Laparoskopie punktiert.

Eine dieser drei Patientinnen wurde nach Untersuchung des KM-Aspirates als positiv für CK- und uPA-R befundet (Abb.15, erster Balken von oben).

Eine der untersuchten Patientinnen (Abb.15, dritter Balken von oben) wurde im Laufe der Studie nach bereits erfolgter neoadjuvanter sowie postoperativer Chemotherapie einer Revisions-Operation unterzogen und dabei erneut punktiert. Sie zeigte auch nach der zweiten Chemotherapie weiterhin CK- und uPA-R-positive Zellen im Knochenmark (s. Tab.12).

	nach neoadjuvanter CTx	vor adjuvanter CTx	nach neo ⁺ - und adjuvanter CTx
gesamt (n)	20	17	1
CK-/uPA-R-positiv (n)	5	3	1 ^{*/1}

Tab.12 uPA-R-Status im Zusammenhang mit Chemotherapie (CTx).

Die Auswertung eines statistischen Zusammenhanges zwischen dem Erscheinen uPA-R-positiver CK-positiver Zellen im Knochenmark und der therapeutischen Chemotherapie ist aufgrund der niedrigen Fallzahl schwierig zu interpretieren. Da die Patientinnen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (vor und nach Chemotherapie) punktiert wurden, und ein heterogener Pool an Chemotherapeutika verwendet wurde, verzichteten wir an dieser Stelle auf eine statistische Analyse.

4.6. uPA-R-Gehalt im Primärtumor bei Ovarialkarzinom

Parallel zu der vorliegenden Studie wurde in der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar Gewebeproben des Primärtumors bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom mittels ELISA untersucht. Die entsprechende Vorgehensweise entstammt der Forschungsgruppe um Magdolen, der den uPA-Rezeptor aus Zellen von Mammakarzinomgewebe über zwei neue ELISA-Formate (HU/IIIF10, HU/HD13) extrahierte (Kotzsch et al. 2000:827-34).

Die Verwendung von pAK HU277 mit den peroxidase-konjugierten monoklonalen Antikörpern mAK IIIF10 (HU/IIIF10-ELISA) und mAK HD13.1 (HU/HD13-ELISA) zeigte vergleichbare Sensitivitäten. Für den HU/IIIF10-ELISA wurde dabei eine signifikante prognostische Relevanz des uPA-R-Gehaltes (> 3,33 ng/mg Protein) im Primärtumor bei Mammakarzinom postuliert (Kotzsch et al. 2000:827-34).

Die Ergebnisse des uPA-R-Gehaltes (ng/mg Protein) im Primärtumor bei Ovarialkarzinom der vorliegenden Arbeit zeigt folgende Abbildung, die entsprechenden Zahlenwerte (0,24 - 11,96 ng/mg Protein) finden sich im Anhang (s. 10.2).

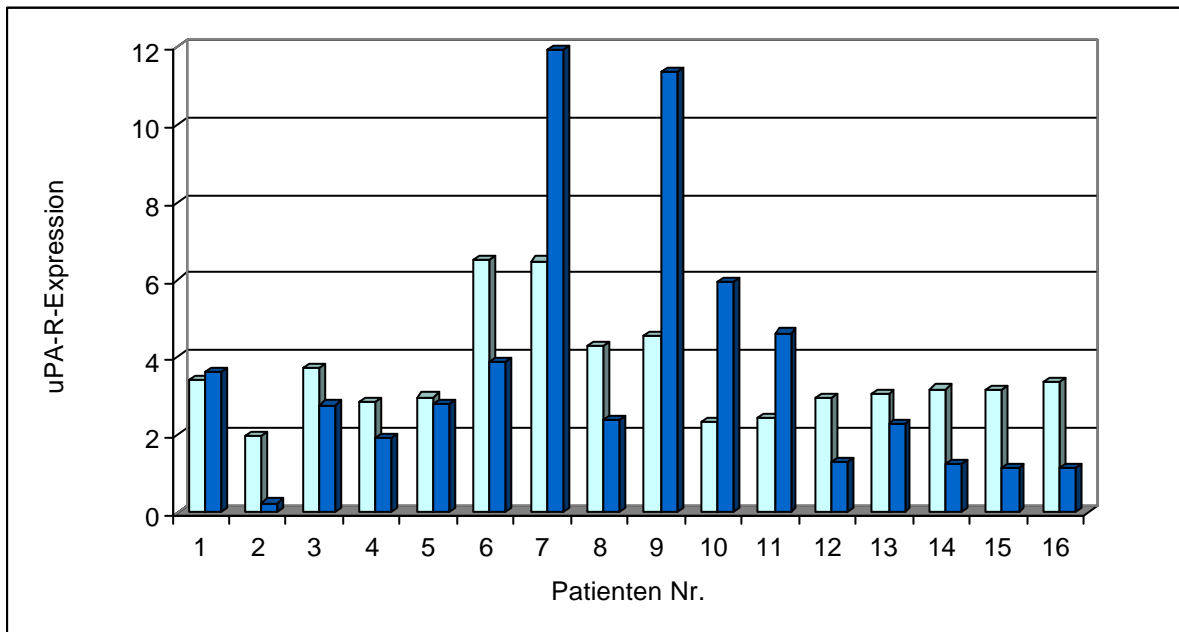


Abb.16: uPA-R-Expression im Primärtumor bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit HU/IIIF10-ELISA (hell) und HU/HD13-ELISA (dunkel).

4.7. uPA-R-Gehalt von CK-positiven Zellen im Knochenmark

Bei 23,7% der untersuchten Patientinnen fanden sich gleichermaßen CK- sowie uPA-R-positive Zellen im Knochenmark. Deren Anzahl schwankte dabei zwischen einer und vier pro 10^6 ausgezählter mononukleärer Zellen.

Es war nun weiterhin von Interesse, ob und inwiefern sich der uPA-R-Gehalt der einzelnen Zellen unterscheidet. Dazu wurde die Gesamtfluoreszenz-Intensität der uPA-Rezeptoren jeder einzelnen Zelle mit standardisierten, fluoreszierenden Latex beads verglichen (s. 3.3.4). Auf diese Weise war es möglich, Angaben über den relativen uPA-R-Gehalt einer Zelle zu machen:

Zelle I der Patientin Nr.1 enthält z.B. die 36,7-fache Gesamtfluoreszenz ihres entsprechenden standardisierten Latex beads. Somit konnte man indirekt den uPA-R-Gehalt aller untersuchten Zellen miteinander vergleichen. Es zeigte sich, daß der Gehalt an uPA-R sowohl zwischen den Patientinnen als auch bei jeder Patientin stark variierte (s. Abb.17). Insgesamt schwankte die Bandbreite der uPA-R-Fluoreszenz-Intensitäten aller untersuchten Zellen zwischen dem 2,3- und 39,7-fachen Gehalt der Referenz-Fluoreszenz-Intensität.

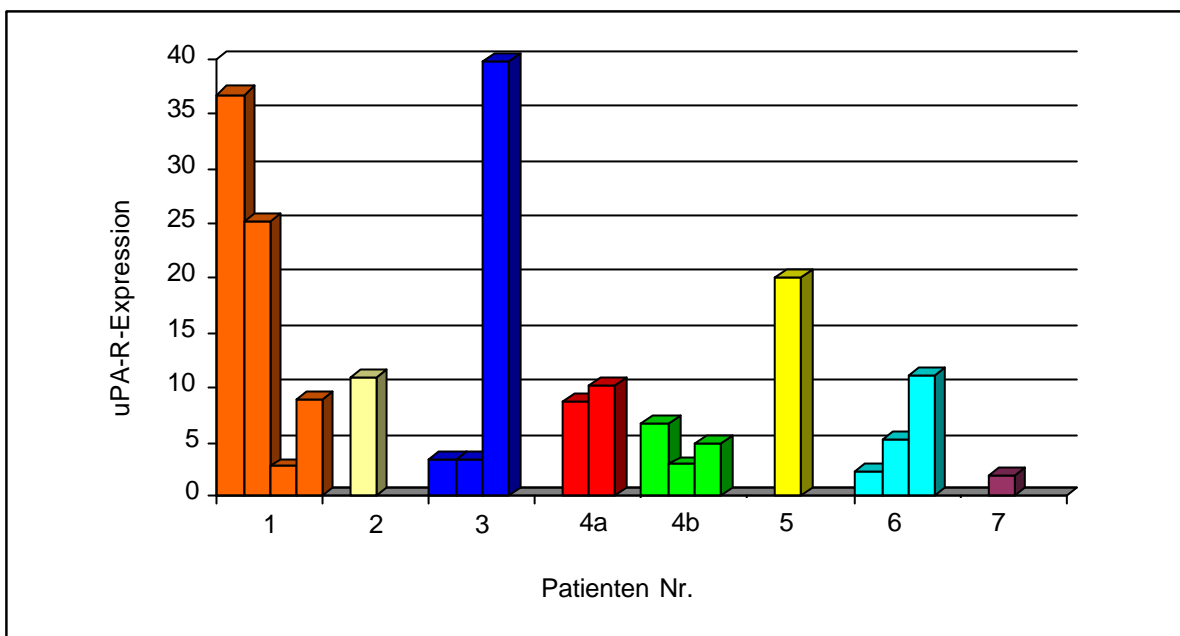
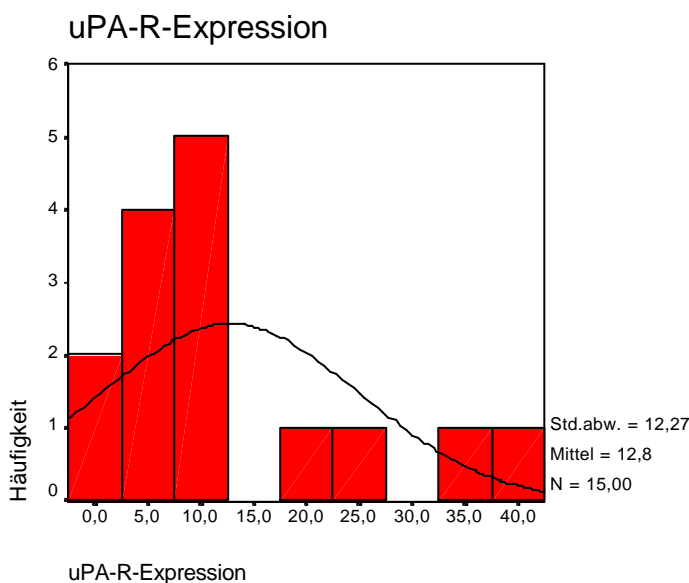


Abb.17 uPA-R-Expression der detektierten CK-positiven Zellen; Patientin vor (4a) und nach (4b) postoperativer Chemotherapie (Zahlenwerte s. Anhang 10.2).

Zur exakten Beschreibung der unterschiedlichen uPA-R-Expression der detektierten Tumorzellen lassen sich statistische Daten heranziehen. So wurden Mittelwert, Median und Standardabweichung der uPA-R-Expression aller detektierten CK/uPA-R-pos. Zellen untereinander berechnet (s. folgende Tabelle).

uPA-R-Expression		
N	Gültig	15
	Fehlend	0
Mittelwert		12,75727
Median		8,99300
Standardabweichung		12,26973
Varianz		150,54624
Minimum		1,914
Maximum		39,783

Im vorliegenden Fall ergibt sich ein Mittelwert von 12,75, der somit höher liegt als der Median von 8,9 und in seiner Dimension in etwa der Standardabweichung von 12,27 entspricht; dieses weist auf eine extreme Streuung der vorliegenden Daten hin. Es wird nicht annähernd eine Normalverteilung erreicht, da sich der Großteil der Daten im unteren Feld befindet (niedrige Expression) und die restlichen Daten deutlich darüber liegen (hohe Expression) (s. folgende Abbildung).



Die große Fluoreszenz-Intensitäts-Streuung ist ebenfalls unter den detektierten Tumorzellen bei den einzelnen Patientinnen statistisch beschreibbar. Dies ist für die uPA-R-Expression der CK-positiven Zellen bei einer einzelnen Patientin beispielhaft in der folgenden Tabelle dargestellt.

Statistiken

uPA-R-Expression		
N	Gültig	4
	Fehlend	0
Mittelwert		18,45350
Median		17,15200
Standardabweichung		15,46069
Varianz		239,03282
Minimum		2,767
Maximum		36,743

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei den untersuchten Zellen untereinander eine starke Varianz der gemessenen Expression an uPA-R beobachtet wurde.

Augenscheinlich spielt bei diesen Ergebnissen der Punktionszeitpunkt prä oder post Chemotherapie keine Rolle. Eine Verifizierung dieser Aussage ist bei der vorliegenden niedrigen Fallzahl und dem heterogener Pool an Chemotherapeutika in unserem Pilotprojekt nicht möglich. Zur Klärung dieser Fragestellung werden zukünftige grossangelegte standardisierte Studien notwendig werden.

5. DISKUSSION

5.1. Diskussion methodischer Fragestellungen

5.1.1. Methodische Aspekte der Knochenmarkaspiration

Einige epitheliale Tumore entwickeln bevorzugt Skelettmetastasen, weshalb es sich anbietet dieses relativ leicht zugängliche Kompartiment durch Beckenkammaspiration direkt zu explorieren. Darüberhinaus ist der Markraum als ein Ort des besonders intensiven Zellaustauschs zwischen zirkulierendem Blut und mesenchyalem Interstitium anzusehen.

Wenngleich Patientinnen mit Ovarialkarzinom eher ihrem lokalen Tumorleiden erliegen als den Konsequenzen manifester Fernmetastasen, haben bereits einige Autopsiestudien die Präsenz okkultter hämatogener Metastasen in Leber, Lunge und Knochenmark gezeigt (*Abdul-Karim et al. 1990:108-114, Dauplat et al. 1987:1561-1566*). Dies impliziert, daß maligne Zellen öfter als es das Muster der klinischen Erkrankung erwarten ließe, insbesondere in das Knochenmark streuen. Dennoch wird die biologische Relevanz disseminierter, bereits bei Diagnosestellung und Resektion im Knochenmark nachweisbarer Tumorzellen bei soliden Karzinomen kontrovers diskutiert.

Ein Hauptkritikpunkt dabei ist, daß in den meisten beschriebenen Untersuchungen Knochenmarkaspirate intraoperativ entnommen wurden. Eine mechanische hämatogene Aussaat beliebiger, auch benignen epithelialer Zellen ist dabei durchaus denkbar. Beim Mammakarzinom hatte jedoch die Wahl des Aspirationszeitpunktes vor oder direkt nach der Operation nachweislich keine Auswirkung auf die Detektionsrate (*Diel et al. 1992:1534-1539, Pantel et al. 1993:1419-1424, Salvadori et al. 1990:865-867*). Dies macht eine iatrogene Tumorzellstreuung durch den Chirurgen als alleinige Erklärung für die Anwesenheit disseminierter epithelialisierter Zellen im Knochenmark sehr unwahrscheinlich. Obwohl beim Ovarialkarzinom noch keine vergleichbaren Studien vorliegen, wurde in unserem Pilotprojekt der Punktionszeitpunkt bewußt präoperativ gelegt.

Eine weitere Schwachstelle in diesem Zusammenhang bietet die Punktion selbst. Da die Knochenmarkaspiration mit derselben Nadel vorgenommen wird, mit der man vorher die Haut punktiert, ist auch dabei eine Verschleppung epithelialer Zellen in den Markraum denkbar. In dieser Studie wurde jedoch der erste Teil des aspirierten Knochenmarks zur Qualitätssicherung und damit nicht für die zytochemische Untersuchung verwendet. Geht man theoretisch von einer Verschleppung epithelialer Zellen durch Bildung eines Punktionszylinders im Lumen der Nadel aus, so kann man erwarten, daß sich dieser in der ersten Fraktion des Aspirates findet. Um aber ganz sicher eine epitheliale Zellverschleppung auszuschließen, sollte man die Haut vor der Punktion mit einem Skalpell inzidieren.

In den meisten großen Studien (*Diel et al. 1996:1652-1664*, *Braun et al. 2000:525-533*, *Mansi et al. 1999:197-202*) werden mindestens zwei Punktionsstellen (Beckenkamm beidseitig und/oder Sternum) verwendet. Redding (*Redding et al. 1983:1271-4*) zeigte deutlich, daß die Detektionsrate von disseminierten epithelialen Zellen mit der Zahl der Punktionsstellen zunimmt. Dies wurde von den oben genannten Gruppen bestätigt: Arbeitsgruppen, die nur eine einzige Aspirationsstelle benutzten, berichteten über eine deutlich niedrigere Detektionsrate (*Übersicht bei: Harbeck et al. 1997:387-392*). Dennoch wurde in unserem Pilotprojekt aus nur einem Beckenkamm Knochenmark entnommen, da dies in großen Studien bei Mammakarzinom als praktikabler Standard gilt (*Salvadori et al. 1990:865-867*, *Diel et al. 1992:1534-1539*) und unnötige Belastungen für die Patientinnen vermieden werden sollten.

5.1.2. Methodische Aspekte der Doppelimmunfluoreszenzmarkierung

In der Onkologie wird die Immunzytochemie häufig dazu genutzt, um Krebszellen anhand von tumorzelltyp-/tumorspezifischer Zellkomponenten (Antigene) aufzuspüren. Für die Aufarbeitung des Knochenmarks verwenden viele Arbeitsgruppen, die sich bisher mit dieser Thematik beschäftigt haben, eine

Anreicherung der mononukleären Zellen über Dichtezentrifugation (*Sinz et al. 2001:M39-M43*).

Von einigen Arbeitsgruppen wird auch eine immunomagnetische Anreicherung (MACS) epithelialer Zellen eingesetzt. Die Anwendung der MACS-Methode vor einer immunzytochemischen Färbung scheint eine erhöhte Detektionsrate zu zeigen und eine höhere Ausbeute kleinerer Tumorzell-Aggregate zu ermöglichen (*Harbeck et al. 1995:1249-1254, Otte et al. 2000:687*).

Ein Einsatz der Durchflußzytometrie in diesem Zusammenhang hat zu keiner methodischen Verbesserung geführt (*Molino et al. 1991:1033-1036*); hier ist die niedrige Tumorzellzahl der limitierende Faktor.

Aufgrund der geringen Frequenz von Tumorzellen im Knochenmarkspirat rücken neue Nachweismethoden wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses (*Datta et al. 1994:475-482, Slade et al. 1999:870-879*).

Auch die eigene Arbeitsgruppe hat sich mit dieser Thematik auseinandergesetzt und die erstmals von Schütze (*Schütze et al. 1998:735-746, Schütze et al. 1998:737-742*) beschriebene Methode zur Laser-beam-assisted-microdissection von Zellen mit der APAAP-Färbung (mAb A45-B/B3) kombiniert: Einzelne, bereits über eine immunzytochemische Färbung detektierte Tumorzellen können mittels eines PALM Laser-Microdissection-Mikroskopes direkt aus dem Präparat herausgeschnitten und weiteren molekularbiologischen Untersuchungen wie z.B. der PCR zugeführt werden (*Noack et al. 1999:617-623*).

Die Untersuchung von 2×10^6 Knochenmarkzellen (Anreicherung über Dichtegradienten-Zentrifugation) gilt heutzutage als Mindestanforderung (*Borgen et al. 1998:427-434*); dabei wird die Detektionsschwelle immunzytochemischer Techniken unabhängig von der Wahl des Primärantikörpers übereinstimmend mit 1 in $10^5 - 10^6$ Zellen angegeben (*Braun et al. 1998:201-216, Osborne et al. 1991:2706-2709, Sinz et al. 2001:M39-M43*).

5.1.2.1. Wahl des ersten Antikörpers: Der Pancytokeratinmarker 8/18/19

Den ersten Antikörper auf der Suche nach Mikrometastasen epithelialer Herkunft im mesenchymalen Knochenmark verwandte Schlimok 1987 gegen Strukturfilamente (*Schlimok et al. 1987:8672-8676*). Es handelte sich dabei um den Antikörper CK2 gegen Cytokeratin 18, welcher bei vielen Arbeitsgruppen über Jahre hinweg Verwendung fand. Viele Arbeitsgruppen versuchten die Sensitivität und Spezifität der Immunzytochemischen Färbungen durch den Einsatz monoklonaler Antikörper als Cocktails (*Harbeck et al. 1994:566-571, Menard et al. 1994:1126-1129*) oder in den eigenen Laboratorien entwickelten Antikörpern (*Salvadori et al. 1990:865-876, Diel et al. 1992:1534-1539*) zu erhöhen. Dabei erwies sich bei immunhistochemischen Untersuchungen von Geweben wie Knochenmark und peripherem Blut zur Detektion von klinisch okkulten, disseminierten Zellen das Pancytokeratin 8/18/19 als epithelialer „Universal-Marker“ (*Angus et al. 1987:377-384*).

In der Literatur werden neben den Cytokeratinen auch andere epitheliale Marker beschrieben. So richtet sich z.B. EMA (epithelial membrane antigen) beim Mammakarzinom gegen Epithelien humaner Milchdrüsen. Sein Vorteil ist seine Membranständigkeit. Eine Lysierung der Zelle - um intrazelluläre Strukturen zu erreichen - ist deshalb nicht notwendig (*Osborne 1994:25-31*). Vom Reaktionspartner Anti-EMA sind jedoch Kreuzreaktionen mit Plasmazellen im Gegensatz zu Anti-CK18 oder -19 bekannt (*Delsol et al. 1984:1124-1128*).

Das 17-1A-Antigen wurde von der Arbeitsgruppe um Riethmüller (*Riethmüller et al. 1994:1177-1183*) als immuntherapeutische Zielsteuerung zur Eliminierung der minimal-residualen Tumorerkrankung beim Kolon- und Mammakarzinom (*Braun et al. 1999*) eingesetzt. Das 17-1A-Antigen ist ein membranständiges Glycoprotein, welches sich sowohl auf benignen als auch auf malignen Zellen entodermalen Ursprungs befindet. Es ist deshalb nicht nur auf einschichtige Epithelien beschränkt. Sein Vorkommen wurde außerdem bei Schilddrüsenfollikel, Langerhanszellen und Schweißdrüsen der Epidermis beschrieben (*Göttlinger et al. 1986:47-53*). Demnach bietet es hinsichtlich der Detektion von disseminierten

epithelialen Zellen im Knochenmark bei malignen Erkrankungen gegenüber dem Pancytokeratin 8/18/19 keinen Spezifitätsvorteil.

Aufgrund der anhaltenden Kritik an der Unspezifität der epithelialen Antikörper wurde für dieses Pilotprojekt der Pancytokeratinmarker A45-B/B3 verwendet. Neuere Arbeiten zeigen eine sehr niedrige Rate an falsch-positiven Ergebnissen bei seiner Verwendung gegen die Cytokeratine 8/18/19 (*Braun et al. 2000:525-533*, *Borgen et al. 1998:427-434*). Der Grund ist in der Morphologie des Antikörpers zu finden. Aufgrund seines fehlenden F_c-Anteils geht er keine unerwünschten Interaktionen ein (*Müller et al. 1998:492-497*).

5.1.2.2. Immunzytochemischer Nachweis von uPA-R in CK-positiven Zellen im Knochenmark

Disseminierte epitheliale Zellen im Knochenmark von Patienten mit malignen Erkrankungen werden oft anhand von Antikörpern identifiziert, die gegen (membranständige) epitheliale Antigene gerichtet sind. Dazu zählen neben dem tumor-assoziierten Glycoprotein TAG12 das epitheliale Membranantigen (EMA), das karzinoembryonale Antigen (CEA) sowie die zytoskelettalen Cytokeratine. Sie können mit Hilfe von Sekundärantikörpern (konjugiert mit alkalischer Phosphatase) oder dem APAAP-Komplex detektiert werden (*Braun et al. 2001:368-375*, *Allgayer et al. 1997:203-212*).

Um einzelne disseminierte epitheliale Zellen in KM-Aspiraten zu phänotypisieren, wurden Methoden zur immunzytochemischen Doppelmarkierung entwickelt wie die zweifach-enzymatische Färbung (z.B. Kombination von alkalischer Phosphatase- und Peroxidase markierung) (*Mason et al. 1978:454-460*) oder die Kopplung einer einfach-enzymatischen Färbung mit der Immunogold-Silber-Methode (*Allgayer et al. 1997:203-212*).

Anhand der Technik zur immunzytochemischen Doppelfärbung wurden bereits tumor-assoziierte Antigene wie der Proliferationsmarker Ki67, das Onkogen Her2/neu und der Invasionsmarker uPA-R in Cytokeratin-positiven Zellen

untersucht (*Pantel et al. 1993:1419-1424, Riesenberger et al. 1993:61-66, Heiss et al. 1995:1035-1039*).

Der Serin-Protease-Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ (uPA) und sein Rezeptor (uPA-R) spielen eine entscheidende Rolle bei Tumorzellinvasion und -metastasierung (s. 1.4). Dies ist von höchstem Interesse für die Entwicklung eines Therapietarget zur monoklonalen Antikörpertherapie und damit zur Verbesserung der Prognose bei Patienten, die nach bereits erfolgter Primärtherapie die Persistenz einer subklinischen systemischen Streuung von Tumorzellen zeigen. Deshalb entwickelte die eigene Arbeitsgruppe eine neue Doppelimmunfluoreszenzfärbung zur gleichzeitigen Darstellung von Cytokeratin und uPA-R in Knochenmarkaspiraten, die zuerst bei KM-Präparaten von Patienten mit Ösophagus- und Magenkarzinom eingesetzt wurde (*Noack et al. 1999:617-623*).

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Färbeprotokoll an Knochenmarkaspirate von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom adaptiert. Das Pancytokeratin 8/18/19 wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers A45-B/B3 (mouse) markiert und über den Sekundärantikörper Goat-anti-mouse IgG (direkt gelabelt mit ALEXA488) sichtbar gemacht. Ebenso wurde bei der Markierung des uPA-Rezeptors verfahren; zur Anwendung kamen der polyklonale Primantikörper HU277 (chicken) und der Sekundärantikörper Goat-anti-chicken IgY (direkt gelabelt mit ALEXA568) (s. 3.3.1.2). Im Gegensatz zu anderen Farbstoffen kommt es nach Herstellerangaben bei dem Gebrauch von ALEXA nicht zu einer unspezifischen Fluoreszenzfärbung durch das produktionsbedingt fehlende Fc-Fragment; es wird ausserdem eine höhere Fluoreszenzausbeute bei geringerem Stoffverbrauch postuliert (*Molecular Probes™, The Handbook 2005*). Nachteilig zeigte sich dabei die fehlende Standardisierung der Zellmembran-Permeabilisierungszeit durch Saponin. Diese ist direkt abhängig von der Einwirkzeit, und somit abhängig von Untersucher und der Menge der zu bearbeitenden Objektträger pro Färbvorgang. Allerdings betrachten wir die maximale Verzögerungszeit von etwa einer Minute während des Arbeitsvorganges bei einer Gesamteinwirkzeit von 45 min. als durchaus vernachlässigbar.

Ein automatisiertes Färbesystem könnte diesen Nachteil ausgleichen, kam aber aufgrund der hohen Kostenintensität für dieses Pilotprojekt nicht in Betracht.

In der Diskussion um die zur Detektion von uPA-R verwendeten Antikörper mAK #3936 und pAK HU277 (*Magdolen et al. 1994:813-816*) läßt sich eine Vergleichsstudie von Hildenbrand (*Hildenbrand et al. 2000:499-504*) heranziehen. Darin wird eine positive Reaktion beider Antikörper sowohl mit dem untersuchten Karzinomgewebe als auch mit myoepithelialen und Stromazellen beschrieben. Aufgrund des physiologischen Vorkommens von uPA-R auf Leukozyten des peripheren Blutes (Monozyten, neutrophile Granulozyten), aus der Literatur hinlänglich bekannt (*Blasi 1993:105-111, Blasi 1988:73-84, Plesner et al. 1994:835-841*), ist dieser Befund nicht weiter verwunderlich. Jedoch fand sich ein eklatanter Qualitätsunterschied in der Farbintensität der markierten makrophagen-ähnlichen Zellen: Die durch mAb #3936 detektierten nicht-malignen Zellen erschienen besser markiert und heller leuchtend als jene durch die Markierung mit pAb HU277. Desweiteren zeigte die Studie eine deutlich höhere Detektionsrate von uPA-R durch HU277 auch in mehreren unterschiedlichen Tumorgeweben. Weiterhin kann die Bindungsfähigkeit des Antikörpers #3936 an uPA-R durch pro-uPA-Komplexe auf bis zu 50% reduziert werden (*Chucholowski et al. 1992:95-102*); die Folge sind falsch-negative Ergebnisse. Der Antikörper HU277 zeigt also im Gegensatz zu mAb #3936 eine deutlich höhere Spezifität und Sensitivität in Bezug auf den uPA-Rezeptor auf Tumorzellen.

Wie in der Literatur beschrieben, wurde unter den Doppelmarkierungen die zweifach-immunzytochemische Methode (*Feller et al. 1983:273-279*) zur einfach-immunzytochemischen Methode in Kombination mit Immunogold modifiziert. Dies sollte zwei entscheidende Nachteile der zweifachen Methodik verhindern. Zum einen treten bei Markierung zweier Antigene innerhalb derselben Zelle keine „Mischfarben“ mehr zwischen den beiden Teilschritten auf. Es handelt sich dabei um ein bekanntes Problem, bei dem ein unterrepräsentiertes Antigen durch große Mengen eines zweiten Antigens maskiert werden kann; dies führt zu falsch-negativen Resultaten (*Mason et al. 1982:135-152, Pantel K et al. 1993:61-66*). Zum anderen kann unter Umständen durch die eben beschriebene

„Mischfarbenbildung“ eine exakte zelluläre Lokalisation der beiden Antigene nicht mehr bestimmt werden. Trotz dieser Vorteile und der Tatsache, daß es sich um eine etablierte und häufig angewandte Methode handelt, sollte die einfach-immunenzymatische Färbung (APAAP) in Kombination mit der Immunogold-Silber-Färbung (*Allgayer et al. 1997:203-212*) vorsichtig beurteilt werden. Falsch-positive Ergebnisse werden aufgrund einer direkten Reaktion von nicht-malignen Zellen mit alkalischer Phosphatase berichtet.

Der Immunogold-Silber-Methode wird eine unkontrollierte Farbentwicklung zugeschrieben (*Krenacs et al. 1990:530-536*, *Newmann et al. 1998:119-125*, *Borgen et al. 1998:427-434*). Sie ist sehr anfällig für unspezifische Hintergrundfärbungen (*Allgayer et al. 1997:203-212*). Die spontane Ablagerung von Silberkörnchen bei zu langer Inkubationszeit veranlaßt zu der Hypothese, daß der geführte Nachweis von uPA-R auf disseminierten Tumorzellen nicht nur durch spezifische Reaktion, sondern auch falsch-positiv durch Silberfällung zustande kommen könnte (*Riesenberg et al. 1993:61-66*). Wie aus eigenen Vorexperimenten unserer Arbeitsgruppe bekannt, ist Folgendes als weiterer Nachteil der Immunogold-Silber-Methode zu nennen: Durch eine starke Silberfällung (spezifisch oder unspezifisch) kommt es zu einer optischen Überdeckung von gleichzeitig markierten Strukturen z.B. CK18 bei der Doppelmarkierung, was zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann. Die oben erwähnten Gründe sind letztenendes dafür verantwortlich, daß die Immunogold-Silber-Methode zunehmend weniger angewendet wird, und so in den letzten Jahren keine relevanten wissenschaftlichen Arbeiten erschienen sind.

Eine geeignete Alternative für die Darstellung zweier Antigene auf derselben Zelle wäre noch die Kombination aus einer immunenzymatischen Methode mit der Immunradiographie. Antica und Heiss stellten 1986 eine sehr sensitive Doppelmarkierung aus Peroxidase-Antiperoxidase und Tritium-Immunautoradiographie vor (*Antica et al. 1986:129-136*). Gegenüber den bis dahin verwendeten Methoden mit ¹²⁵Jod zeichnete sich diese durch eine deutlich geringere radioaktive Belastung und einer längeren Halbwertszeit von H₃ aus (zwölf Jahre im Vergleich zu 60 Tagen). Die Präparate blieben demzufolge über Jahre erhalten. Als Nachteil dieser Methode bleibt die Tatsache der wenn auch geringen Radioaktivität, und der damit gegebenen Notwendigkeit zur Einrichtung

eines entsprechenden Labors. Außerdem nimmt die Photoentwicklung des autoradiographischen Markierungsschrittes mehrere Tage in Anspruch, wohingegen die Auswertung der in dieser Dissertation verwendeten Doppelmarkierung noch am selben Tag möglich. Die Immunfluoreszenz ist allerdings mit einem erheblichen Kostenaufwand verbunden, der im Hinblick auf einen routinemäßigen Einsatz nicht zu vernachlässigen ist.

Bisher können aufgrund der Photolabilität von Fluoreszenzmarkierungen keine Dauerpräparate hergestellt werden, die wie bei enzymatischen Methoden oder Immunogold auch noch nach Monaten bis Jahren beurteilbar sind (*Antica et al. 1986:129-136, Mason et al. 1982:135-152, Rathlev et al. 1981:1513-1515*). Der Einsatz des Laser-Scanning-Mikroskopes bei der Untersuchung von fluoreszierenden Präparaten hingegen, wie in vorliegender Arbeit beschrieben, macht eine aufwendige Archivierung im herkömmlichen Sinne überflüssig. Beim Scannen der fluoreszenzgefärbten Präparate entsteht eine Datensammlung, die mittels einer geeigneten Software zu entsprechenden Bildern verarbeitet und auf dem Bildschirm dargestellt werden kann (s. 3.3.2). Die auf diese Weise errechneten Ergebnisse stellen echte Abbilder der ursprünglichen Präparate dar. Sie können zeitlich unbegrenzt und ohne Qualitätsverlust digital archiviert werden. Weiterhin können beide Färbungen simultan unter derselben Lichtquelle bei unterschiedlichen Wellenlängen beurteilt werden. Bei einer Kopplung von Immunfluoreszenz mit enzymatischen oder auch autoradiographischen Methoden hingegen ist dies nicht möglich. Praktikabilität und Schnelligkeit der Beurteilung sind hierbei stark beeinträchtigt (*Allgayer 1996: Diss.*).

Ein Vergleich der verschiedenen Färbemethoden zeigt die folgende Tabelle.

Methode	Nachteile	Vorteile
Doppelenzymatisch	Exakte zelluläre Lokalisation der beiden Antigene nicht bestimmbar Unterrepräsentiertes Antigen wird durch große Mengen eines zweiten Antigens maskiert	
Einfachenzymatisch + Immunogold	Falsch-positive Ergebnisse Falsch-negative Ergebnisse Unspezifische Hintergrundfärbung	Eindeutige Antigen-Lokalisation Hohe Sensitivität des Immunogold-Teilschrittes
Immunhisto- + Immunradiographisch	Radioaktivität Hohe Kosten Langwierige Photoentwicklung Spezial-Labora-ausstattung notwendig	Hohe Sensitivität Über Jahre haltbare Präparate
Doppelimmunfluoreszenz	Hohe Kosten (Keine Dauerpräparate)	Sicherung der Färberegebnisse in Form elektronischer Daten Sichere Detektion kleinster AG-Mengen in Anwesenheit grösserer Mengen an zweitem Antigen

Tab.13 Vor- und Nachteile verschiedener Färbemethoden.

Das Protokoll zur Doppelimmunfluoreszenzfärbung in dieser Arbeit wurde ursprünglich zur Detektion disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark entwickelt (Noack et al. 1999:617-623). Es kann ebenfalls ohne Einschränkungen zur zytologischen Untersuchung von peripherem Blut, Leukapheresismaterial, Aszites und anderer maligner Effusionen herangezogen werden.

5.1.3. Methodische Aspekte der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie

Im Umgang mit dem Lasermikroskop sind keine besonderen arbeitsschutzrechtlichen Maßnahmen wie z.B. das Tragen von Schutzbrillen erforderlich. Die Ausstattung eines Laboratoriums mit dem für das CLSM benötigten Equipment hingegen ist aufwendig und kostenintensiv. So sollten für die anspruchsvolle Bildverarbeitung speziell für diese Zwecke konfigurierte Computersysteme mit passendem Speicherplatz und entsprechender Software (z.B. von Silicon Graphics) eingesetzt und mit großen, hochauflösenden Bildschirmen gekoppelt werden. Weiterhin sollten alle benutzten Geräte inkl. des Laser-Scanning-Mikroskops in einem Raum aufgestellt werden, der die Möglichkeit zur Kühlung und Abdunkelung bietet. Diese Maßnahmen lassen sich zum einen durch das schnelle Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe begründen, zum anderen ist es besonders für das Arbeiten am Lasermikroskop essentiell, daß die Laserquelle ausreichend gekühlt wird. Eine Überhitzung des Lasers hätte nämlich, bedingt durch geräteinterne Schutzmechanismen, einen vorübergehenden Betriebsausfall zur Folge. Die Zeit bis zur Wiederaufnahme des Betriebes ist temperaturabhängig und kann deshalb zwischen 30 min. und mehreren Stunden betragen. Durch entsprechende Vorsorgemaßnahmen kann diese zeitraubende Verzögerung jedoch einfach vermieden werden.

Wie unter 5.1.2.2 bereits beschrieben ist bei der Probenanalyse unter Einsatz des CLSM eine Detektion von zwei fluoreszenzmarkierten Antigenen unter derselben Lichtquelle möglich. Die gewünschten Antigene können entweder separat nacheinander oder simultan während eines einzigen Arbeitsschrittes betrachtet und gescannt werden (Noack et al. 1999:617-623). Dabei sind keinerlei Interferenzen bei der gleichzeitigen Verwendung verschiedener Wellenlängen (488 nm und 568 nm) bekannt. Die Softwareverarbeitung der Schnittserien erlaubt eine 3D-Abbildung der betreffenden Zelle als rot-grün-Stereobild, das gedreht, geschnitten und in Projektion und Tiefenkodierung betrachtet werden kann (Noack et al. 1999:617-623).

Die Detektion von CK-positiven Zellen durch konfokale Fluoreszenz-Laser-Scanning-Mikroskopie ist eine sehr sensitive Methode; selbst geringste Mengen an Antigen wie Cytokeratin und uPA-R sind ohne Probleme identifizierbar und differenzierbar (*Noack et al. 1999:617-623*).

Nachteilig jedoch ist die zeitaufwendige und potentiell mit Fehlern behaftete manuelle Auswertung der Präparate. So benötigt das Durchsuchen eines Präparates nach CK-positiven Zellen durchschnittlich 20 min. (nach einer Einarbeitungszeit von ca. einer Woche). Das anschließende Scannen einer detektierten CK-positiven Zelle mit dem Erstellen einer digitalen „Schnittserie“ von 50 Bildern erfordert einen weiteren zeitlichen Aufwand von ca. 25 min. Somit wäre der Einsatz von automatisierten Detektions- und Auswertesystemen ein vielversprechender Schritt in Richtung Arbeitsoptimierung und Qualitätssicherung. Die Verwendung solcher Detektionssysteme (z.B. ACIS™, ChromaVision Medical Systems Inc., San Juan Capistrano, CA, USA) ermöglicht eine rasche und reproduzierbare Auswertung auch einer großen Anzahl von Präparaten; doch sind diese Geräte sehr kostenintensiv (*Sinz et al. 2001:M39-M43*).

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Detektion CK- und uPA-R-positiver Zellen im Knochenmark

Eine der Zielsetzungen dieser Arbeit war es, den Nachweis disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark bei Ovarialkarzinom mit Hilfe einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung zu führen.

Das eingesetzte Färbeprotokoll erlaubt eine simultane Darstellung von Cytokeratin und uPA-R in Knochenmarkspiraten. Es wurde erstmals zum Nachweis von Tumorzellen in Knochenmarkpräparaten von Patienten mit Ösophagus- und Mammakarzinom entwickelt und erfolgreich eingesetzt (Noack *et al.* 1999:617-623).

Unserer Arbeitsgruppe gelang es nun, diese Methode auch bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom anzuwenden und in deren Knochenmark disseminierte CK-positive Zellen unabhängig vom Krankheitsstadium aufzufinden. Mit einer Detektionsrate von 23,7% (9 von 38 Patientinnen) wurde ein vergleichbares Ergebnis zu anderen Arbeitsgruppen erzielt (ca. 30%, s. Tab.14).

Autor	Patientinnen gesamt (n)	disseminierte epithelialisierte Zellen (n)	Antikörper
Pabst M. Diss.	38	9/38 (24%)	CK 8/18/19 HU277
Braun S. 2001	108	18/60 (30%)	CK 8/18/19
Gabriel M. 2000	90	9/49 (18%)	CK, CA 125
Marth C. 1999	70	14/70 (20%)	MOC-31
Ross A.A. 1995	20/23 Proben	10/23 (43%)	TFS-4, TFS-2 OV-632, SB-3
Cain J.M. 1990	50/53 Proben	12/53 (23%)	CK

Tab.14 Literaturvergleich der Ergebnisse zur Detektion disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom.

Von Braun et al. wurde bereits gezeigt, daß mit dem Auftreten von disseminierten CK-positiven Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ein negativer Krankheitsverlauf und eine schlechte Überlebensrate assoziiert ist (*Braun et al. 2001:368-375*). Eine ebenfalls schlechte Überlebensrate wurde von Kuhn et al. abhängig vom Nachweis der Urokinase (uPA) und ihrem Inhibitor PAI-1 im Primärtumor bei Ovarialkarzinom beobachtet; dabei bestand ein direkter Zusammenhang zwischen der nachgewiesenen Menge an Antigen und dem Krankheitsverlauf (*Kuhn et al. 1994:401-409*). In diesem Zusammenhang gewinnt die Tatsache, daß *alle* in der vorliegenden Arbeit detektierten CK-positiven Zellen den Rezeptor der Urokinase (uPA-R) auf ihrer Oberfläche präsentierten, eine besondere Wertigkeit.

Folgende Feststellungen bestehen:

1. Disseminierte CK-positive Zellen im Knochenmark bei Ovarialkarzinom korrelieren mit einer schlechten Prognose (*Braun et al. 2001:368-375*).
2. Der uPA-Gehalt in Zellen des Primärtumors bei Ovarialkarzinom korreliert mit einer schlechten Prognose (*Kuhn 1994:401-409*).
3. Allgayer et al. postulieren beim Magenkarzinom, daß nicht die Detektion von CK-positiven Zellen, sondern alleine der Nachweis von uPA-R-exprimierenden CK-positiven Zellen im Knochenmark mit einer schlechten Prognose korreliert (*Allgayer et al. 1997:203-212*).
4. *Alle* in dieser Studie zum Ovarialkarzinom detektierten CK-positiven Zellen exprimierten den uPA-R.

Diese Ergebnisse stützen die Auffassung, daß die Protease Urokinase und ihr spezifischer Rezeptor uPA-R zu Schlüsselfaktoren bei Entstehung, Wachstum und Tumorzellstreuung des Ovarialkarzinoms gehören.

Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sollte die Bedeutung uPA-R-tragender CK-positiver Zellen im Knochenmark bei Ovarialkarzinom in weiteren Studien geprüft und bewertet werden.

5.2.2. Vergleich des uPA-R-Status mit etablierten Prognosefaktoren

Die statistische Analyse eines Zusammenhangs zwischen dem Auftreten uPA-R-positiver CK-positiver Zellen im Knochenmark und etablierten Prognosefaktoren wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests bzw. dem Exakten Test nach Fisher erstellt.

Der Exakte Test nach Fisher wurde jeweils im Anschluß an den Chi-Quadrat-Test zur Bestätigung der Ergebnisse eingesetzt.

Beide Tests basieren auf der Aufstellung der sog. Null-Hypothese zur Bestätigung einer gewünschten Aussage. Die Null-Hypothese besagt, daß sich gegenübergestellte Daten vollständig unabhängig voneinander verhalten.

Bei der Testdurchführung werden nach Vorgaben statistischer Regeln, der Null-Hypothese entsprechend, sogenannte „erwartete Anzahlen“ berechnet und mit den tatsächlichen Anzahlen verglichen. Das Ergebnis dieses Vergleiches wird schließlich in einem Zahlenwert (p-Wert) ausgedrückt, wobei standardmäßig im Chi-Quadrat-Test eine Fehlerquote von 5% (0,05) eingerechnet ist.

Die Null-Hypothese gilt als widerlegt, wenn der p-Wert einen Wert $< 0,05$ annimmt; erst dann ist ein Zusammenhang der untersuchten Datenpaare signifikant bewiesen. Bei einem p-Wert $> 0,05$ wird die Null-Hypothese beibehalten und ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Datenpaaren abgelehnt.

Nimmt der p-Wert extrem hohe Werte an, spricht das für eine sehr niedrige Abhängigkeit der untersuchten Daten, selbst wenn diese Aussage statistisch nicht abgesichert ist.

Der Nachweis von uPA-R-positiven CK-positiven Zellen im Knochenmark wurde mit etablierten Prognosefaktoren verglichen. Alle Ergebnistabellen zeigen durch den p-Wert $\gg 0,05$ (?²: p-Wert = Asymptomatische Signifikanz; Exakter Test nach Fisher: p-Wert = Exakte Signifikanz, 2-seitig), daß mit hoher Wahrscheinlichkeit *kein* Zusammenhang zwischen den Prognosefaktoren FIGO-Stadium, Grading und Lymphknoten-Status und dem Auftreten von uPA-R-positiven CK-positiven Zellen im Knochenmark besteht. Diese Ergebnisse zeigen die Unabhängigkeit des Nachweises CK-/uPA-R-positiver Zellen von bisher etablierten Prognosefaktoren. Eine Unabhängigkeit der disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark bei

malignen Erkrankungen von etablierten Prognosefaktoren wurde bereits von anderen Untersuchern beobachtet (*Braun et al. 2001:368-375, Marth 1999 (abstract)*). Marth et al. fanden dabei als einzige einen Zusammenhang des Tumorzell-Status zum Grading (χ^2 -Test: p-Wert 0,037). Allerdings wurde hierbei, statt mit dem Antikörper A45-B/B3, der Tumorzell-Nachweis anhand des Antikörpers MOC-31 geführt.

Darüberhinaus postulierten Janni und Braun (*Janni et al. 2001:46-53*) das Auftreten CK-positiver Zellen im Knochenmark als unabhängigen prognostischen Parameter für die Überlebensrate bei Ovarialkarzinom (Janni: p-Wert 0,02; Cox-Multivariat-Regressionsanalyse; Braun: p-Wert 0,01; Log-Rank).

Zukünftig gilt es anhand größerer Fallzahlen näher zu evaluieren, ob auch der Nachweis uPA-R-positiver CK-positiver Zellen als eigenständiger und unabhängiger prognostischer Parameter beim Ovarialkarzinom nachgewiesen werden kann. Hierzu muss eine Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse (uPA-R auf CK-positiven Zellen beim Ovarialkarzinom) anhand von Bestätigungsanalysen belegt werden. Darüberhinaus bedarf es einer Präzisierung der prognostisch/prädiktiven Bedeutung dieser detektierten Zellen beim Ovarialkarzinom.

5.2.3. Zusammenhang zwischen dem uPA-R-Nachweis und neoadjuvanten / adjuvanten Chemotherapien

Beim Ovarialkarzinom wurde der Nachweis disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark bislang von nur wenigen Arbeitsgruppen geführt (*Braun et al. 2001:368-375, Marth 1999 (abstract), Ross 1995:929-933, Cain 1999:442-445*). Zwei Arbeitsgruppen postulieren das Auftreten disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark als unabhängigen prognostischen Parameter (*Braun et al. 2001: 368-375, Janni et al. 2001:46-53*); dabei korreliert dieser Zellenachweis zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs zur Tumorsektion mit einer geringeren Überlebensrate. Folgepunktionen wurden nicht durchgeführt, so daß der Einfluß einer Chemotherapie auf den KM-Zellstatus nicht näher untersucht wurde.

In dieser vorliegenden Pilotstudie wurden auch bei Patientinnen, die sich einer neoadjuvanten/adjuvanten Chemotherapie unterzogen hatten, disseminierte epitheliale uPA-R-tragende Zellen im Knochenmark gefunden. Bei einer Patientin wurde auch nach einer weiteren, der zweiten KM-Punktion vorausgehenden Chemotherapie keine Veränderung des KM-Zellstatus festgestellt (s. 4.5). Die Patientin blieb auch nach zweimaliger Chemotherapie CK-/uPA-R-positiv.

Aufgrund der heterogenen Chemotherapeutika, der niedrigen Fallzahl und der unterschiedlichen Punktionszeitpunkte bzgl. CTx dieser Studie lassen sich aus den oben genannten Ergebnissen keine prognostischen Schlussfolgerungen ziehen. Die Beobachtungen stimmen jedoch mit den Daten beim Mammakarzinom überein, die 2000 in einer Pilotstudie von Braun et al. erhoben wurden. Dabei zeigte sich ein unverändertes Vorkommen von klinisch inaktiven („schlafenden“) epithelialen Tumorzellen im Knochenmark sowohl vor als auch nach erfolgter Chemotherapie (Braun et al. 2000:80-86). Weil sich die Mehrheit mikrometastatischer Tumorzellen wahrscheinlich in der nicht-proliferativen Phase (G₀-Phase) befinden, scheint eine zytotoxische Standardchemotherapie (gerichtet gegen proliferative Zellen) wenig erfolgreich und könnte sogar das Versagen der Chemotherapie erklären (Pantel et al. 1999:1113-24). Betrachtet man die Chemotherapie als Strategie zur Verhinderung einer Metastasierung, so könnte durch den Nachweis bzw. durch eine Quantifizierung von disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark (als Ausdruck der frühen systemischen Erkrankung) Aussagen über den Erfolg der Therapie getroffen werden.

Um unter diesem Gesichtspunkt einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Nachweis uPA-R-positiver CK-positiver Zellen im Knochenmark und einer Chemotherapie festzustellen, bedarf es zukünftig einer Reihe von weiteren standardisierten Knochenmarkuntersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzgl. einer neoadjuvanten und adjuvanten Chemotherapie.

5.2.4. uPA-R-Gehalt im Primärtumor

Klinische Studien haben gezeigt, daß im allgemeinen erhöhte Level an Tumorantigenen wie uPA, uPA-R und/oder PAI-1, sowie ein erniedrigter PAI-2-Gehalt im Primärtumor mit einem schlechten Outcome assoziiert sind, und zu einer Tumorzellstreuung und Metastasierung führen (*Übersichtsarbeit: Schmitt et al. 1997:285-296*). Krebspatienten könnten also anhand der exprimierten Menge an uPA, uPA-R oder PAI-1 in ihrem Primärtumor als low-risk oder high-risk Patienten eingeteilt werden. Die meisten Untersucher bestimmten diese Tumorantigene mittels ELISA in frischen Extrakten des Primärtumorgewebes, das während der Operation entnommen wurde (*Übersichtsarbeit: Schmitt et al. 1997:285-296*). Eine starke prognostische Bedeutung wurde dabei an einer Vielzahl von Malignomen (Urothel, Mamma, Cervix, Uterus, Ovar, Magen, Kolon, Lunge, Gehirn, Niere und Weichteilgewebe) festgestellt (*Übersichtsarbeit: Schmitt et al. 1997:285-296*).

Duffy et al. waren 1988 die Ersten, die eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Enzymleveln an uPA im Mammakarzinomgewebe und dem Fortschreiten der Tumorerkrankung zeigten (*Duffy et al. 1988:531-533*). Auch die Erhöhung des Antigengehaltes des zugehörigen Rezeptors der Urokinase uPA-R im Primärtumorgewebe deutet auf eine schlechte Prognose hin (*Übersichtsarbeit: Schmitt et al. 1997:285-296*). Seine prognostische Bedeutung ist jedoch weniger ausgeprägt als die von uPA oder PAI-1 (*Duggan et al. 1995:597-600, Grondahl-Hansen 1995:1079-87*). Im Literaturvergleich lässt sich bislang keine Arbeitsgruppe finden, die den uPA-R-Gehalt im Gewebe von Ovarialkarzinom bestimmte. Unsere eigene Arbeitsgruppe stellte allerdings eine starke prognostische Bedeutung des uPA- und PAI-1-Gehaltes im makroskopisch tumorfreien Gewebe bei Ovarialkarzinom (*Kuhn et al. 1994:401-409*) fest.

Die in dieser Pilotstudie erhobenen Werte zum uPA-R-Gehalt im Primärtumor bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom bedürfen also weiterer Untersuchungen zur Objektivierung.

Der Zusammenhang des uPA-R-Gehaltes im Primärtumor mit dem uPA-R-Gehalt in disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark wird unter 5.2.5 diskutiert.

5.2.5. uPA-R-Gehalt von CK-positiven Zellen im Knochenmark

Anhand des Protokolls bzw. der Anleitung zur neuen Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen das Pancytokeratin 8/18/19 und den uPA-Rezeptor wurden im Rahmen dieser Arbeit Knochenmarkaspirate von 38 Patientinnen mit Ovarialkarzinom untersucht. Neun von ihnen präsentierten gleichermaßen disseminierte CK- und uPA-R-positive Zellen. Bei der Untersuchung fand die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie Anwendung. Dadurch wurde simultan die zelluläre Lokalisation sowie eine quantitative Beurteilung der verschiedenen Antigene (Noack et al. 1999:617-623) ermöglicht.

Die Zellen wurden in einer „Schnittserie“ gescannt, die Einzelbilder zu einem Gesamtfluoreszenz-Bild übereinander projiziert und anschließend ihre Gesamtfluoreszenz-Intensität (extended focus) gemessen. Daraufhin folgte der Vergleich des extended focus des zu bestimmenden Antigens uPA-R mit der bekannten Gesamtfluoreszenz von standardisierten Latex beads und somit dessen Quantifizierung (s. 3.3.4).

Die so detektierten Zellen von sieben der neun CK- und uPA-R-positiven Knochenmarkproben (Patientinnen) zeigten erhebliche Unterschiede in der Menge ihres uPA-R-Antigengehaltes.

Die Spanne des uPA-R-Antigengehaltes lag zwischen dem 2,3- und 39,7-fachen der entsprechenden Referenzgröße (Latex bead 1,6%). Auch die verschiedenen Zellen, die im Knochenmark einer Patientin gefunden wurden, zeigten deutlich unterschiedliche Expressionen des uPA-R (s. 4.7, Abb.17).

Bei der Diskussion dieser Ergebnisse der uPA-R-Quantifizierung kann nur spekuliert werden, da neben den Beobachtungen der eigenen Arbeitsgruppe (Noack et al. 1999:617-623) keine weiteren Werte vorliegen. In einem kleinen Kollektiv von 16 Patienten bestimmte Noack den uPA-R-Antigengehalt: Positivität bei drei von sechs (3/6) Patienten mit Magen- und drei von zehn (3/10) Patienten mit Ösophaguskarzinom. Bei der uPA-R-Quantifizierung der von ihm detektierten CK-/uPA-R-positiven Zellen fand sich eine Bandbreite von dem 3,9- bis 12,5-fachen an uPA-R-Antigenexpression im Vergleich zu den entsprechenden Latex beads (1,6%).

Der uPA-Rezeptor steht im Zentrum eines dynamischen und gerichteten proteolytischen Systems, welches den Tumorzellen eine hocheffiziente Aggressivität verleiht (s. 1.4). Dabei ist die Frage besonders wichtig, inwieweit beim uPA-R-Nachweis auf disseminierten Tumorzellen des Knochenmarks auch uPA-R auf Zellen des zugehörigen Ausgangstumors zu detektieren ist. Es gilt zu klären, ob Zellen des primären Tumorzellverbandes sowie die aus diesem Verband heraus gestreuten Zellen bezüglich uPA-R phänotypisch ähnlich sind. Theoretisch kann davon ausgegangen werden, daß der Ursprung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei bekanntem Malignom in eben diesem Malignom zu suchen ist.

Pantel et al. beleuchteten diese Fragestellung bereits 1997 mit Hilfe des Tyrosin-Kinase-Rezeptors Her-2/neu, der ebenfalls potentiell mit aggressivem Tumorzellwachstum assoziiert ist (*Pantel et al. 1993:1419-1423*). Sie fanden eine Expression des Antigens Her-2/neu bei nur 10 - 30% der Zellen im Primärtumor sowohl bei Mamma- als auch bei unterschiedlichen gastrointestinalen Karzinomen. Dem entgegen stand eine Expression von Her-2/neu auf nahezu 70% der korrespondierenden, disseminierten Tumorzellen im Knochenmark. Zur Erklärung dieses Phänomens wurde ein „Auswahlprozess“ während der Initialphase der Tumorzellstreuung mit dem Inhalt postuliert, daß während der Initialphase hauptsächlich aggressive Zellformen des Karzinomverbandes freigegeben werden. Setzt man - wie oben angeführt - die Aggressivität von Tumorzellen mit einem hohen Anteil an Her-2/neu bzw. uPA-R gleich, müsste sich in diesem Fall ein weit höherer uPA-R-Gehalt auf disseminierten Tumorzellen als auf Zellen im Primärtumor finden lassen.

Allgayer et al. hingegen konnten keine vergleichbaren Ergebnisse mit dem Antigen uPA-R bei der Untersuchung von Patienten mit Magenkarzinom feststellen. Vielmehr verhielt sich die Ausprägung von uPA-R auf disseminierten CK-positiven Zellen und der Expression von uPA-R auf dem korrespondierenden Primärtumor in ihrer Studie genau entgegengesetzt (*Allgayer et al. 1997:1394-1399*). Nur 45% der disseminierten Tumorzellen zeigten eine uPA-R-Expression, wohingegen bei 92% der korrespondierenden Zellen des Primärgewebes eine Antigenexpression beobachtet wurde. Ausgehend von diesen Daten stellte die Arbeitsgruppe um

Allgayer die Hypothese auf, daß die Festlegung des Phänotypes einer Zelle bezüglich ihres uPA-R-Gehaltes nicht auf die Initialphase beschränkt sein muß. Vielmehr kann sich der Phänotyp auch während eines späteren Zeitpunktes des Streuungsprozesses verändern. Dafür werden Interaktionen der Tumorzelle mit ihrer unmittelbaren Umgebung verantwortlich gemacht. Es wird vermutet, daß verschiedene äussere Einflußfaktoren (z.B. Immunsystem, systemische Therapie, etc.) sowie Zelleigenschaften eine unterschiedliche Relevanz für den initialen Streuungsvorgang, die Anreicherung von Tumorzellen in bestimmten Organen und schließlich für die endgültige Manifestation zur Metastase haben. Zu den genannten Eigenschaften zählen Invasions-assoziierte Antigene wie z.B. Proteasen und Her-2/neu, Proliferationsantigene wie p120 oder Ki67 (*Pantel et al. 1993:1419-1423*), sowie ein Verlust an MHC I als Mechanismus der „immunologischen Flucht“, einem Schutz vor zytotoxischen T-Zellen (*Pantel et al. 1991: 4712-4715, Hämmerling et al. 1989:1071-1078, Davidwatine et al. 1990:286-292*) oder einer Reduktion der Apoptose-Rate (*Holmgren et al. 1995:149-153*).

Allgayer et al. belegten ihre Hypothese anhand von individuellen Änderungen des uPA-R-Status in follow-up-Aspiraten bei Patienten mit Magenkarzinom. Dabei zeigte sich eine Zunahme der uPA-R-exprimierenden Zellen im Knochenmark von 31% auf 43% der betroffenen Patienten innerhalb von sieben Monaten. Dieses Ergebnis wird aufgrund eines möglichen methodischen Schwachpunktes bei Einschränkungen in der Sensitivität von der Arbeitsgruppe selbst kritisch betrachtet. Allerdings korrelierten die postulierten phänotypischen Veränderungen mit dem klinischen Krankheitsverlauf, so daß den beobachteten phänotypischen Variationen eine biologische Relevanz zugeschrieben wurde (*Allgayer et al. 1997:1394-1399*).

Ein Kritikpunkt an der vorliegenden Pilotstudie stellt in diesem Zusammenhang die nicht standardisierte Zellmembran-Permeabilisierungszeit bei der Immunfluoreszenzfärbung dar. Diese ist direkt abhängig von der Einwirkzeit, und somit abhängig vom Untersucher und der Menge der zu bearbeitenden Objektträger pro Färbvorgang. Je länger also die Permeabilisierungszeit, desto grösser der Anteil an Antikörpern, die in die Zelle eindringen und somit die Expression von uPA-R erhöhen. Allerdings handelt es sich in der vorliegenden

Arbeit um eine Verzögerungszeit um maximal eine Minute während des Arbeitsvorganges. Bei einer Gesamteinwirkzeit von 45 min. ist diese Abweichung durchaus vernachlässigbar. Trotzdem lässt sich der in dieser Pilotstudie ermittelte Gehalt an uPA-R im Primärgewebe und auf disseminierten CK-positiven Zellen beim Ovarialkarzinom leider nicht miteinander vergleichen, da die uPA-R-Werte von unterschiedlichen Patientinnen bestimmt wurden.

Betrachtet man die phänotypischen Unterschiede und die Tatsache, daß tumorbiologische Therapien auf die minimal-residuale Erkrankung abzielen und nicht auf die Behandlung des Primärtumors, scheint es klinisch relevanter zu sein disseminierte Zellen statt den Primartumor näher zu evaluieren.

Für eine weitere Charakterisierung des Phänotyps disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark von Karzinompatienten könnte die uPA-R-Quantifizierung als nützliches Hilfsmittel dienen.

5.2.6. Schlußfolgerung und klinische Bedeutung

Das Ovarialkarzinom zählt zu den aggressiveren Tumorarten mit einem schnellen und invasiven Wachstum. Die Ursache dieser hohen Malignität ist bis heute nicht vollständig geklärt. Neben der späten Symptomatik spielen hier auch „pathogene“ Faktoren eine Rolle. In Anbetracht der in dieser Studie vorgelegten Ergebnisse und Überlegungen können auch uPA und sein spezifische Rezeptor uPA-R zu diesen pathogenen Faktoren gezählt werden.

Um für Patientinnen mit Ovarialkarzinom prognostisch relevante Aussagen in Bezug auf den uPA-Rezeptor treffen zu können, müssen in weiteren Forschungsarbeiten folgende Punkte geklärt werden:

1. Besteht eine signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis bzw. der Anzahl uPA-R-positiver CK-positiver Zellen im Knochenmark und dem Krankheitsverlauf?

2. Besteht eine signifikante Korrelation zwischen dem uPA-R-Gehalt auf den disseminierten CK-positiven Zellen und dem Krankheitsverlauf?
3. Besteht eine signifikante Korrelation zwischen Anzahl und uPA-R-Gehalt dieser uPA-R-exprimierenden Zellen und hat dieser Zusammenhang Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf? Wenn ja, welcher Faktor korreliert stärker mit dem Krankheitsverlauf – Zellanzahl oder uPA-R-Gehalt?

Der Nachweis disseminierter CK-positiver Zellen im Knochenmark und die Quantifizierung der uPA-R-Expression eröffnet neue Möglichkeiten um die Prognose von Krebspatienten einzuschätzen. Mit Hilfe intensivierter und/oder neuer Therapieansätze (z.B. synthetische Moleküle/Antikörpertherapie) könnten die Patienten individueller behandelt werden. Eine erste Substanz, der Anti-17-1A monoklonale Antikörper, wurde bereits 1999 in einer Pilotstudie erfolgreich eingesetzt - nach Infusion von Anti-17-1A (Edrecolomab) konnten Braun et al. eine Reduktion disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Mammakarzinom nachweisen (*Braun et al. 1999:3999-4004*).

Speziell die Gruppe der aufgrund eines günstigen Stagings (FIGO I, N0) und optimaler Behandlungsergebnisse (R0-Resektion) zunächst als kurativ behandelten Patienten würde von einer gezielten Therapiestrategie profitieren. Sollte sich die prognostische Bedeutung bestätigen, könnten mittels einer Knochenmark-Untersuchung bei diesen Patienten frühzeitig Aussagen über eine eventuelle Metastasen- bzw. Rezidivneigung getroffen und entsprechende Therapiestrategie eingeleitet werden.

Braun und Pantel setzten bereits in Studien mit disseminierten CK-positiven Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom den Pancytokeratinmarker A45-B/B3 ein. Sie fanden in den disseminierten Zellen multiple tumorspezifische Chromosomenaberrationen, was sie als starkes Indiz dafür werteten, daß ihre Methode Mikrometastasen detektiert (*Braun et al. 2000:525-533*).

Aufgrund des wahrscheinlichen Auftretens von uPA-R auf einzelnen mesenchymalen Zellen des Knochenmarks soll noch einmal betont werden, daß sich die Auswertung der uPA-R-Expression bei den hier untersuchten Patientinnen mit Ovarialkarzinom ausschließlich auf CK8/18/19-positive disseminierte Zellen bezieht.

In Analogie zur Arbeitsgruppe um Braun und Pantel, unter Verwendung desselben Detektionsmarkers, wird sich nach unserem Pilotprojekt in zukünftigen Arbeiten die Frage stellen: „Handelt es sich bei den detektierten uPA-R-positiven CK-positiven Zellen im Knochenmark bei Ovarialkarzinom um Tumorzellen?“

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Zeit der Primärtherapie (Operation, systemische Chemotherapie und/oder Bestrahlung) können bei nahezu einem Drittel aller Patienten mit Mamma-, Ösophagus-, Magen-, Kolonkarzinom und anderen soliden Tumoren disseminierte epitheliale Zellen im Knochenmark gefunden werden. Es wurde gezeigt, daß die Expression tumor-assoziiertes Antigene auf diesen disseminierten Zellen in engem Zusammenhang mit der Aggressivität des Krankheitsverlaufs steht. Die Expression des Urokinase-Plasminogen-Rezeptors (uPA-R) auf disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark zum Beispiel korreliert signifikant mit der Prognose bei Magenkarzinom.

Im Gewebe des Primärtumors bei Ovarialkarzinom stellt der Gehalt an uPA und PAI einen starken prognostischen Faktor dar, die Rolle disseminierter epithelialer Zellen beim Ovarialkarzinom hingegen ist bis heute nicht vollständig geklärt. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, Cytokeratin- und uPA-R-positive Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom aufzufinden und zu charakterisieren.

Von November 1998 bis April 2000 wurde bei 38 Patientinnen mit Ovarialkarzinom (FIGO-Stadium IV) unmittelbar präoperativ Knochenmark aus dem Beckenkamm entnommen. Die Fraktion der mononukleären Zellen wurde mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und dann zur Herstellung von Cytospins verwendet. Es wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen das Pancytokeratin 8/18/19 (mAb A45-B/B3) und den uPA-Rezeptor (pAb HU277) durchgeführt. Zur Detektion der CK-/uPA-R-positiven Zellen sowie der Quantifizierung der uPA-Rezeptor-Expression kam das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) zum Einsatz. Fluoreszierende standardisierte Latex beads dienten dabei als Referenz.

Obwohl das Skelettsystem beim Ovarialkarzinom keine Prädilektionsstelle zur Fernmetastasierung darstellt, konnte in dieser Arbeit eine der Literatur entsprechend hohe Frequenz an disseminierten CK-/uPA-R-positiven Zellen im Knochenmark detektiert werden.

Bei 9 der 38 untersuchten Patientinnen mit Ovarialkarzinom fanden sich CK-positive Zellen (23,7%). Alle diese detektierten Zellen wurden als positiv für uPA-R befundet (100%), wobei sie jedoch in ihrer Fluoreszenz-Expressions-Intensität stark variierten.

Die Präsenz von uPA-R-positiven CK-positiven Zellen korrelierte nicht mit etablierten Prognosefaktoren wie FIGO-Stadium, Grading oder Lymphknotenstatus.

Die vielversprechenden Ergebnisse des vorliegenden Pilotprojektes bilden die Grundlage zu weiteren Studien. Man verspricht sich von disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine grosse klinische Relevanz. Sie sollen Informationszuwachs in der individuellen Tumorbiologie (Phänotypisierung) bringen. Ferner könnten sie als Angriffsziel für tumorbiologische Therapieansätze und dem Monitoring systemischer Therapien dienen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdul-Karim FW, Kida M, Wentz WB, Carter JR, Sorensen K, Macfee M, Zika J, Makley JT (1990)
Bone metastasis from gynecologic carcinomas: A clinicopathologic study.
Gynecol Oncol 39(2):108-14
- AGO. Organkommission Ovar der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (2000)
Diagnostische und therapeutische Standards beim Ovarialkarzinom (ICD183) (Langversion)
- Ahmed FY, Wiltshaw E, A'Hern RP, Nicol B, Sheperd J, Blake P, Fishjer C, Gore ME (1996)
Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian carcinoma.
J Clin Oncol 14(11):2968-75
- Allgayer H (1996)
Prognostische Bedeutung der doppelt-immuncytochemisch untersuchten Expression von Urokinase-Rezeptor und der Längsschnittentwicklung disseminierter Tumorzellen beim Magenkarzinom.
München, Diss.
- Allgayer H, Heiss MM, Riesenberger R, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW (1997)
Immunocytochemical Phenotyping of Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow by uPA Receptor and CK18: Investigation of Sensitivity and Specificity of an Immunogold/Alkaline Phosphatase Double Staining Protocol.
J Histochem Cytochem 45:203-212
- Angus B, Purvis J, Stock D, Westley BR, Samson ACR, Routledge EG, Carpenter FH, Horne CHW (1987)
NCL-5D3: A new monoclonal antibody recognizing low molecular weight cytokeratins effective for immunohistochemistry using fixed paraffin-embedded tissue.
J Pathol 153:377-384

Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ (1997)

The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review.

Int J Cancer 72(1):1-22

Antica M, Heiss MM, Kummer U, Munker R, Thiel E, Thierfelder S (1986)

Simultaneous demonstration of two antigens on single T cells using antibodies with contrasting labels.

J Immunol Meth 87: 129-136

Ataseven B (1999)

Genanalyse des Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp (uPA), Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI1) und Urokinaserezeptor (uPAR) in Ovarialkarzinomzelllinien und -gewebe.

München, Diss

Beale PJ, Friedlander ML (1995)

Prognostic variables in ovarian cancer, in: Lawton FG, Neijt JP, Swenerton KD (Hrsg.).

Epithelial cancer of the ovary. London, BMJ Publishing Group:96-111

Behrendt N, Ronne E, Ploug M, Petri T, Lober D, Nielsen LS, Schleunig WD, Blasi F, Appella E, Dano K (1990)

The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH2-terminal amino acid sequence and glycosylation variants.

J Biol Chem 265 (11):6453-6460

Bianchi E, Cohen RL, Thor AT, Mizukami IF, Lawrence DA, Ljung BM, Shuman MA, Smith HS (1994)

The urokinase receptor is expressed in invasive breast cancer but not in normal breast tissue.

Cancer Res 54:861-866

Blasi F (1988)

Surface receptors for urokinase plasminogen activator.

Fibrinolysis 2:73-84

Blasi F (1993)

Urokinase and urokinase receptor: A paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness.

Bio Essays 15:105-111

Borgen E, Beiske K, Trachsel S, Nesland JM, Kvalheim G, Herstad TK, Schlichting E, Qvist H, Naume B (1998)

Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: Non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase.

J Pathol 185:427-434

Borglum AD, Byskov A, Ragno P, Roldan AL, Tripputi P, Cassani G, Dano K, Blasi F, Bolund L, Kruse TA (1992)

Assignment of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene (PLAUR) to chromosome 19q13.1-q13.2. Am J Hum Genet 50:492-497

Boring CC, Squires TS, Tong T (1994)

Cancer statistics.

CA Cancer J Clin 44:7

Braun S, Pantel K (1998)

Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement. Breast Cancer Res Treat 52:201-216

Braun S, Hepp F, Kentenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmuller G, Willgeroth F, Sommer HL (1999)

Monoclonal antibody therapy with Edrecolomab in breast cancer patients: Monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow.

Clin Cancer Res 5:3999-4004

Braun S, Kentenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willegroth F, Sommer H, Pantel K (2000)

Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients.

J Clin Oncol 18,1(1):80-86

- Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G. (2000)
Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.
New Engl J Med 342:525-533
- Braun S, Schindlbeck C, Hepp F, Wolfgang J, Kantenich C, Riethmüller G, Pantel K (2001)
Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse.
J Clin Oncol 19,2(1):368-375
- Boyum A, Brincker Fjerdningstad H, Martinsen I, Lea T, Lovhaug D (2002)
Separation of human lymphocytes from citrated blood by density gradient (NycoPrep) centrifugation: Monocyte deplet depending upon activation of membrane potassium channels.
Scand J Immunol. 56(1):76-84
- Cain JM, Ellis GK, Collins C, Greer BE, Tamimi HK, Figge DC, Gown AM, Livingston RB (1990)
Bone marrow involvement in epithelial ovarian cancer by imunocytochemical assessment.
Gynecol Oncol 38:442-445
- Chucholowski N, Schmitt M, Rettenberger P, Schüren E, Moniwa N, Groetzki L, Wilhelm O, Weildle U, Jänicke F, Graeff H (1992)
Flow cytofluorometric analysis of the urokinase receptor (uPAR) on tumor cells by fluorescent uPA-ligand or monoklonal antibody 3936.
Fibrinolysis 6 (4):95-102
- Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP (1991)
Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases.
J Clin Oncol 9:1749-1756

Cubellis MV, Wun TC, Blasi F (1990)

Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI1.

EMBO J 9:1079-85

Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L (1985)

Plasminogen activators, tissue degradation and cancer.

Adv Cancer Res 44:139

Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS (1994)

Sensitive detection of occult breast cancer by reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

J Clin Oncol 12:475-482

Dauplat J, Hacker NF, Nieberg RK, Berek JS, Rose TP, Sagae S (1987)

Distant metastases in epithelial ovarian carcinoma.

Cancer 60:1561-1566

Davidovits P, Egger M. (1969)

Scanning laser microscope.

Nature 223:831

Davidwatine DP, Israel A, Kourilsky P (1990)

The regulation and expression of MHC class I genes.

Immunol Today 11:286-292

Delsol G, Gatter K, Stein H, Erber WN, Pulford KAF, Zinne K, Mason DY (1984)

Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen: Implications for diagnosis of human neoplasms.

Lancet 2:1124-1128

Dembo AJ, Davy M, Stenwig AE, Berle EJ, Bush RS, Kjorstad K (1990)

Prognostic factors in patients with stage I epithelial ovarian cancer.

Obstet Gynecol 75:263-273

Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G (1992)

Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: A prognostic factor for distant metastasis.

J Clin Oncol 10(10):1534-1539

- Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G (1996)
Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: Prognostic value in comparison with nodal status.
J Nat Cancer Inst 88:1652-1664
- Duffy M, O`Grady P, Devaney D, O`Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ (1988)
Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas.
Cancer 62:531-533
- Duggan C, Maguire T, McDermott E, O`Higgins N, Fennelly JJ, Duffy MJ (1995)
Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in breast cancer.
Int J Cancer 61:597-600
- Dvorak HF (1986)
Wounds that do not heal. N Engl J Med 315:1650-1659
- Egger MD, Petran M (1967)
New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells.
Science 157:305-307
- Estreicher A, Mühlhauser J, Carpentier JL, Orci L, Vassalli JD (1990)
The receptor for urokinase-type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes.
J Cell Biol 111:783-792
- Feller AC, Parwaresch MR (1983)
Simultaneous enzyme-immunocytochemical detection of antigens in monocellular specimens with monoclonal antibodies.
J Immunol Meth 63:273-279

Franklin WA, Shpall EL, Archer P, Johnston CS, Garza-Williams S, Hami L, Bitter MA, Bast RC, Jones RB (1996)

Immunocytochemical detection of breast cancer cells in marrow and peripheral blood of patients undergoing high dose chemotherapy with autologous stem cell support.

Breast Cancer Res Treat 41:1-13

Gabriel M, Obrebowska A, Spaczynski M (2000)

Nachweis von Epithelzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom unter Anwendung von immunhistochemischen Methoden.

Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch 40:140-144

Göttlinger HG, Funke I, Johnson JP, Gokel JM, Riethmüller G (1986)

The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: Its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies.

Int J Cancer 38:47-53

Grondahl-Hansen J, Peters HA, van Putten WLJ, Look MP, Pappot H, Ronne E, Dano K, Klijn JGM, Brünner N, Foekens JA (1995)

Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer.

Clin Cancer Res 1:1079-1087

Hämmerling G, Maschek U, Sturmhöfel K, Momburg F (1989)

Regulation and functional role of MHC expression on tumors.

Prog Immunol 7:1071-1078

Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W (1994)

Tumor cell detection in the bonemarrow of breast cancer patients at primary therapy: Results of a three-year median follow-up.

Br J Cancer 69:566-571

Harbeck N, Schwarze S, Schüren E, Yamamoto N, Moniwa N, Schmitt M, Dettmar P, Nathrath W, Jänicke F, Höfler H, Graeff H (1995)

Model system for isolation of competent ovarian carcinoma cells from fresh tumor tissue by a magnetic separation technique (MACS).

Int J Oncol 6:1249-1254

Harbeck N, Abdulsalam A, Jänicke F (1997)

Clinical Relevance of Detection of Tumor Cells in the Bone Marrow of Primary Breast Cancer Patients: A Review.

Onkologie 20:387-392

Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW (1995)

Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumor cells in bone marrow: A reference to early systemic disease in solid cancer.

Nat Med 1:1035-1039

Heiss MM (1995)

Tumor-associated proteolysis and prognosis: New functional risk factors in gastric cancer defined by urokinase-type plasminogen activator system.

J Clin Oncol 13(8):2084-2093

Heiss MM, Simon EH, Beyer BC, Gruetzner KU, Tarabichi A, Babic R, Schildberg FW, Allgayer H (2002)

Minimal residual disease in gastric cancer: Evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow.

J Clin Oncol 20(8):2005-16

Hembrough TA, Li L, Gonias S (1996)

Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator.

J Biol Chem 271, 41(11):25684-25691

Hildenbrand R, Leitz M, Magdolen V, Luther T, Albrecht S, Graeff H, Stutte H-J, Bleyel U, Schmitt M (2000)

Validation of immunolocalization of the urokinase receptor expression in ductal carcinoma in situ of the breast: Comparison with detection by non-isotopic in situ hybridization.

Histopath 36:499-504

Hirsch-Ginsberg C (1998)

Detection of minimal residual disease: relevance for diagnosis and treatment of human malignancies.

Annu Rev Med 49:111-122

Hollas W, Blasi F, Boyd D (1991)

Role of the urokinase receptor in facilitating extracellular matrix invasion by cultured colon cancer.

Cancer Res 51:3690-3695

Holmgren L, O`Reilly MS, Folkman J (1995)

Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.

Nat Med 1:149-153

Ioffe OB, Silverberg SG (2000)

A universal grading system for ovarian cancer.

Contemporary OB/Gyn Archive. Aug 1:1-6

Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Harbeck N, Hoefler H, Graeff H (1993)

Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer.

Breast cancer Res and Treatment 24:195-208

Jankun J, Merrick HW, Goldblatt PJ (1993)

Expression and localisation of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancers.

J Cell Biochem 53:135-144

Janni W, Hepp F, Rjosk D, Kentenich C, Strobl B, Schindlbeck C, Hantschmann P, Sommer H, Pantel K, Braun S (2001)

The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence.

Cancer. 92(1):46-53

- Jenison EL, Montag AG, Griffiths CT, Welch WR, Lavin PT, Greer J, Knapp RC (1989)
Clear cell adenocarcinoma of the ovary: A clinical analysis and comparison with serous carcinoma.
Gynecol Oncol 32:65-71
- Kasper M, Stosiek P, Typlt H, Karsten U (1987)
Histological evaluation of three monoclonal anti-cytokeratin antibodies. 1. Normal tissues.
Eur J Cancer Clin Oncol 23(2):117-137
- Kommoss F, Pfisterer J, Thome M, Schafer W, Sauerbrei W, Pflaiderer A (1992)
Steroid receptors in ovarian carcinoma: Immunohistochemical determination may lead to new aspects.
Gynecol Oncol 47:317-322
- Kommoss F (1995)
Zur Bedeutung der Steroidrezeptoren bei Ovarialtumoren.
Wiesbaden, Wiss. Verl.-Abt. Abbott (Abbott-Schriftenreihe Habilitation)
- Kotzsch M, Luther T, Harbeck N, Ockert D, Lutz V, Noack F, Grossmann D, Albrecht S, Kramer MD, Lossnitzer A, Grosser M, Schmitt M, Magdolen V (2000)
New ELISA for quantitation of human urokinase receptor (CD87) in cancer.
Int J Oncol 17:827-34.
- Krenacs T, Krenacs L, Bozoky B, Ivany B (1990)
Double and triple immunocytochemical labelling at the light microscope level in histopathology.
Histochem J 22:530-536
- Kuhn W, Pache L, Schmalfeldt B, Dettmar P, Schmitt M, Jänicke F, Graeff H (1994)
Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based chemotherapy.
Gynecol Oncol 55:401-409

- 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 (1999)
Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc.
Br J Cancer 79(11-12):1746-51
- Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G (1992)
Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients.
Lancet 340:685-689
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG (1991)
Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation.
Cell 64:327-336
- Loos JA, Roos D (1974)
Ficoll-Isopaque gradient for the determination of density distributions of human blood lymphocytes and other reticulo-endothelial cells.
Exp Cell Res 86:333-341
- Magdolen V, Rettenberger P, Lopens A, Oi H, Lottspeich F, Kellermann J, Creutzberg S, Goretzki L, Weidle UH, Wilhelm O, et al. (1995)
Expression of the human urokinase-type plasminogenactivator receptor in E. coli and Chinese hamster ovary cells: Purification of polyclonal antibodies in chicken.
Electrophoresis 16:813-816
- Mallmann P, Krebs D (1994)
Gynäkologische Onkologie. Diagnostik, Therapie und Nachsorge bei Mamma- und Genital-Karzinomen in der Praxis.
München, W. Zuckerschwerdt Verlag:73-117
- Mansi JL, Berger U, Easton D, McDonnell T, Redding WH, Gazet JC, McKinna A, Powels TJ, Coombes RC (1987)
Micrometastasis in bone marrow in patients with primary breast cancer: Evaluation as an early predictor of bone metastases.
Br Med J 295:1093-6

- Mansi JL, Berger U, McDonnell T, Pople A, Rayter Z, Gazet JC, Coombes RC (1989)
The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer.
J Clin Oncol 7(4):445-449
- Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC (1999)
Outcome of primary breast-cancer-patients with micrometastases: A long-term follow-up study.
Lancet 354:197-202
- Markus G (1988)
The relevance of plasminogen activators to neoplastic growth. A review of recent literature.
Enzyme 40:158
- Mason DY, Sammonds R (1978)
Alcaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents.
L Clin Pathol 31:454-460
- Mason DY, Woolston RE (1982)
Double immunoenzymatic labelling, in: Bullock, G., Petrusz, P. (Hrsg.) 1982. Techniques in immunocytochemistry.
London Academic Press 1:135-152
- Marth C, Hoifodt H, Walberg L, Kaern J, Andresen M, Hovland B, Mathiesen O, Trope C (1999)
Carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood of ovarian cancer patients (abstract).
2nd International Symposium on Minimal Residual Cancer, Berlin, Germany
- Menard S, Squicciarini P, Luini A, Sacchini V, Rovini D, Tagliabue E, Veronesi P, Salvadori B, Veronesi U, Colnaghi MI (1994)
Immunodetection of bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients and its correlation with primary tumour prognostic features.
Br J Cancer 69:1126-1129

Molecular Probes™ invitrogen detection technologies, The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Tenth Edition, Updated: 05.05.2005, Online in Internet: URL: <http://probes.invitrogen.com/lit/catalog/3/sections/7813.html>)

Molino A, Colombatti M, Bonetti M, Zardini M, Pasini F, Perini A, Pelosi G, Tridente G, Veneri D, Cetto GL (1991)

A comparative analysis of three different techniques for the detection of breast cancer cells in bone marrow.

Cancer, 67:1033-1036

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982)

The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.

Cell 31:11-24

Moller LB, Plou, M, Blasi F (1992)

Structural requirements for glycosyl-phosphatidylinositol-anchor attachment in the cellular receptor for urokinase plasminogen activator.

Eur J Biochem 208:493-500

Moller LB (1993)

Structure and function of the urokinase receptor.

Blood Coagulation and Fibrinolysis 4:293-303

Müller P, Hempel D, Oruzio D, Ehnle S, Kolloch K, Schlimok G (1998)

Sequential immunotyping and genotyping of tumor cells in bone marrow of cancer patients: A model study.

Cytometry 33:492-497

Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons D, McCarthy P, Parfrey NA, O'Donoghue DP, Sheahan K (1994)

Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Dukes B colorectal cancer.

Lancet 344:583-584

- 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 (1999)
CD87-positive tumor cells in bone marrow aspirates identified by confocal laser scanning fluorescence microscopy.
Int J Oncol 15:617-623
- Noack F, Schmitt M, Bauer J, Helmecke D, Kruger W, Thorban S, Sandherr M, Kuhn W, Graeff H, Harbeck N (2000)
A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: Methodological advances and clinical implications.
Int J Biological Markers 15(1):100-104
- Newmann GR, Jasani B (1998)
Siver development in microscopy and bioanalysis: Past and present.
J Pathol 186:119-125
- O'Brien MER, Schofield JB, Tan S, Fryatt I, Fisher C, Wiltshaw E (1993)
Clear cell epithelial ovarian cancer (mesonephroid): Bad prognosis only in early stages.
Gynecol Oncol 49:250-254
- Osborne MP, Wong GY, Asina S, Old LJ, Cote RJ, Rosen PP (1991)
Sensitivity of immunocytochemical detection of breast cancer cells in human bone marrow.
Cancer Res 51:2706-2709
- Osborne MP, Rosen PP (1994)
Detection and management of bone marrow micrometastases in breast cancer.
Oncology 8:25-31
- Ossowski L, Clunie G, Masucci MT, Blasi F (1991)
In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: Effect on tumor cell invasion.
J Cell Biol 115(4):1107-1112

- Otte M, Deppert K, Ebel S, Hosch S, Jänicke F, Izbicki JR, Pantel K (2000)
Immunomagnetic enrichment of disseminated tumor cells from bone marrow of carcinoma patients.
Proc AACR 41 (abstract #2475):687
- Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, Backmann R, Funke I, Riethmüller G (1991)
Frequent down-regulation of MHC class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells.
Cancer Res 51:4712-4715
- Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M, Braun S, Passlick B, Karg O, Thetter O, Riethmüller G (1993)
Immunocytological detection of bone marrow metastasis in operable non-small cell lung cancer.
Cancer Res 53:1027-1031
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki J, Riethmüller G (1993)
Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells.
J Nat Cancer Inst 85(17):1419-1424
- Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmüller G (1994)
Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow.
J Hematother 3(3):165-173
- Pantel K, von Knebel Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmüller G (1997)
Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien.
Chirurg 68:1241-125
- Pantel K, Cote RJ, Fodstad O (1999)
Detection and clinical importance of micrometastatic disease.
J Nat Cancer Inst 91:1113-24

- Pecorelli S, Odicino F, Maissonneuve P et al. (1998)
Carcinoma of the ovary, in: Pecorelli S (Hrsg.). FIGO Annual Report on the results of treatment in gynecological cancer.
J Epidemiol Biostat 23(3):75-102
- Pedersen H, Grondahl-Hansen J, Francis D, Osterlind K, Hansen HH, Dano K, Brønner N (1994)
Urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1 in pulmonary adenocarcinoma.
Cancer Res 54:120-123
- Pfisterer J, Kommoss F, Sauerbrei W (1994)
Cellular DNA content and survival in advanced ovarian carcinoma.
Cancer 74:2509-2515
- Piver MS (1987)
Clinical obstetrics & gynecology. Ovarian malignancies. Diagnostic and therapeutic advances.
Churchill Livingstone:1-10
- Plesner T, Ralfkiaer E, Wittrup M, Johnsen H, Pyke C, Pedersen TL, Hansen NE, Dano KAD (1994)
Expression of the receptor for unrokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue.
Am J Clin Pathol 102(6):835-841
- Pöllänen J, Stephens RW, Vaheri A (1991)
Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells.
Adv Cancer Res 57:273
- Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Eriksen J, Dano K (1991)
The plasminogen activation system in human colon cancer: Messenger RNA for the inhibitor PAI-1 is located in endothelial cells in the tumor stroma.
Cancer Res 51:4067-4071

Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Grondahl-Hansen J, Eriksen J, Blasi F, Dano K (1991)

Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas.

Am J Pathol 138:1059-1067

Pyke C, Graem N, Ralfkiaer E, Ronne E, Hoyer-Hansen G, Brünner N, Dano K (1993)

Receptor for urokinase is present in tumor-associated macrophages in ductal breast carcinoma.

Cancer Res 53:1911-1915

Rathlev T, Hocko JM, Franks GF, Suffin SC, O'Donnell CM, Porter DD (1981)

Glucose oxidase immunoenzyme methodology as a substitute for fluorescence microscopy in the clinical laboratory.

Clin Chem 27(9):1513-1515

Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrise SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ (1983)

Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer.

Lancet Dec 3;2(8362):1271-4

Rettenberger P (1996)

Klonierung und Expression von Mutanten des humanen Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp (uPA) und seines Rezeptors (uPAR) zur Analyse der uPA/uPAR-Interaktion.

München, Diss.

Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M (1998)

Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review).

Int J Oncol. 13(5):893-906

Riesenberg R, Oberneder R, Kriegmair M, Epp M, Bitzer U, Hofstetter A, Braun S, Riethmüller G, Pantel K (1993)

Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumour cells.

Histochemistry 99:61-66

Riethmüller G, Johnson J (1992)

Monoclonal antibodies in the detection and therapy of micrometastatic epithelial cancer.

Curr Opin Immunol 4:647-655

Riethmüller G, Schneider-Gädicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken, K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R, Buggisch P, Witte J (1994)

German Cancer Aid 17-1A Study Group: Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes C colorectal carcinoma.

Lancet 343:1177-1183

Roche Lexikon Medizin (4. Aufl.) (1998).

München, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.

Hofmann-La Roche AG und Urban & Fischer

Ross AA, Miller GW, Moss TJ, Kahn DG, Warner NE, Sweet DL, Louie KG, Schneidermann E, Pecora AL, Meagher RC (1995)

Immunocytochemical detection of tumor cells in bone marrow and peripheral blood stem cell collections from patients with ovarian cancer.

Bone Marrow Transplant 15:929-933

Rubin SC, Wong GY, Curtin JP, Barakat RR, Hakes TB, Hoskins WJ (1993)

Platinum-based chemotherapy of high-risk stage I epithelial ovarian cancer following comprehensive surgical staging. Obstet Gynecol 82:143-147

Salvadori B, Squicciarini P, Rovini D, Orefice S, Andreola S, Rilke F, Barletta L, Menard S, Colnaghi MI (1990)

Use of monoclonal antibody Mbr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients. Eur J Cancer 26(8):865-867

Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Göttlinger G, Schmidt G, Häuser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, Riethmüller G (1987)

Micrometastatic cancer in bone marrow: In vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labelling with anti-17-1A monoclonal antibodies.

Proc Natl Acad Sci 84(12):8672-8676

- Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Hofler H, Janicke F, Graeff H (1997)
Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: Prognostic relevance and target for therapie.
Thromb Haemost 78(1):285-96
- Schütze K, Posl H, Lahr G (1998)
Laser micromanipulation systems as universal tools in cellular and molecular biology and in medicine.
Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 44:735-746
- Schütze K, Lahr G (1998)
Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells.
Nature Biotech 16:737-742
- Scully RE, Silva E (1998)
Pathology of ovarian cancer, in: Gershenson GM, McGuire WP (Hrsg.).
Ovarian cancer. Controversies in management.
New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco, Tokyo,
Churchill Livingstone:425-444.
- Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Hasumi K, Akiyama F, Silverberg SG (1998)
Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. Prognostic significance of histopathologic features - problems involved in the architectural grading system.
Gynecol Oncol. 70(1):2-12
- Sier CFM, Vespaget HW, Griffionen G, Ganesh S, Vloedgraven HLM, Lamers CBHW (1993)
Plasminogen activators in normal tissue and carcinomas of the human oesophagus and stomach.
Gut 34:80-85
- Sinz S, Braun S, Sandherr U, Werner M, Harbeck N (2001)
Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark: Prognostische und prädiktive Relevanz beim Mammakarzinom.
Geburtsh Frauenheilk 61:M39-M43

- Slade MJ, Smith BM, Sinnett D, Cross NCP, Coombes RC (1999)
Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer.
J Clin Oncol 17:870-879
- Stelzer EHK, Merdes A, De Mey J (1998)
Konfokale Fluoreszenzmikroskopie in der Zellbiologie, in: Stigbrand T et al. (Hrsg.).
Biologie in unserer Zeit, 21. Jahrg. (1):132-152
- 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 (1998)
Epitope Specificity of 30 Monoclonal Antibodies against Cytokeratin Antigens: The ISOBM TD5-1 Workshop.
Tumor Biol 19:132-152
- Tanaka N, Fukao H, Ueshima S, Okada K, Yasutomi M, Matsuo O (1991)
Plasminogen activators in human gastric cancers: Correlation with DNA ploidy and immunohistochemical staining.
Int J Cancer 48:481-484
- Thorban S, Roder JD, Pantel K, Siewert JR (1996)
Epithelial tumour cells in bone marrow of patients with pancreatic carcinoma detected by immunocytochemical staining. Eur J Cancer 32A(2):363-5
- Thorban S, Roder JD, Nekarda H, Funk A, Siewert JR, Pantel K (1996)
Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with oesophageal carcinoma.
J Natl Cancer Inst 88(17):1222-7
- Toellner R (Hrsg.) (1990)
Salzburg, Illustrierte Geschichte der Medizin, Band 5.
Andreas Verlag

Tumorzentrum München (Hrsg.) (1998)

Tumorzentrum München an den medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität (5. Aufl.): Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.

Maligne Ovarialtumoren

Tumorzentrum München (Hrsg.) (2001)

Tumorzentrum München an den medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität: Manual Maligne Ovarialtumoren

Vassall J-D, Dayer JM, Wohlwend A, Belin D (1984)

Concomitant secretion of prourokinase and of plasminogen activator-specific inhibitor by cultured human monocytes-macrophages.

J Exp Med 159:1653-1668

Vassalli J-D, Pepper MS (1994)

Membrane proteases in focus.

Nature 370:14

Vergote IB, Kaern J, Abeler VM, Pettersen EO, De Vos LN, Trope CG (1993)

Analysis of prognostic factors in stage I epithelial ovarian carcinoma: Importance of degree of differentiation and DNA ploidy in predicting relaps.

Am J Obstet Gynecol 169:40-52

Yokota S, Hansen-Hagge TE, Ludwig WD, Reiter A, Raghavachar A, Kleihauer E, Bartram CR (1991)

Use of polymerase chain reactions to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia patients.

Blood 77:331-339

Young RC, Walton LA, Ellenberg SS, Homesley HD, Wilbanks GD, Decker DG, Miller A, Park R, Major F Jr (1990)

Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials.

N Engl J Med 322:1021-1027

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1	5-Jahres-Gesamtüberlebensrate (5-JÜR) in Abhängigkeit vom Residualtumor (Tumorzentrum München 1998:13).	6
Abb.2	5-Jahres-Gesamtüberlebensrate (5-JÜR) in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium (I - IV) (Tumorzentrum München 1998:13).	7
Abb.3	Der uPA/uPA-R-Zyklus, modifiziert nach Blasi (Blasi 1993:105-111).	18
Abb.4	Interphasenfraktion der mononukleären Zellen.	24
Abb.5	Schema Arbeitsablauf.	25
Abb.6	Prinzip der Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen Cytokeratin 8/18/19 und uPA-R; modifiziert nach Noack et al. (Noack et al. 2000:100-104).	27
Abb.7	Prinzip der konventionellen Lichtmikroskopie.	31
Abb.8	Das Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie; modifiziert nach Minsky M. (s. Anhang 10.2 Original Patentschrift aus dem Jahre 1957).	34
Abb.9	Disseminierte, CK-positive Zelle im Knochenmark bei Patientinnen mit OvCa. Phänotypisierung (Doppelimmunfluoreszenz) und konfokale Lasermikroskopie bei 200-(oben) und 630-facher Vergrößerung (unten), A Transmissionsbild (lichtmikroskopisch), B Immunfluoreszenzfärbung gegen Cytokeratin 8/18/19 (A45-B/B3, Alexa 488), C Immunfluoreszenzfärbung gegen uPA-R (HU277, Alexa 568).	36
Abb.10	Das Prinzip der uPA-R-Quantifizierung; modifiziert nach Noack (Noack et al. 1999:617-623). A Seitenansicht einer gescannten Zelle. B Galleriebild aus neun Einzel-scans. C extended focus.	38
Abb.11	uPA-R-Quantifizierung einer CK-positiven Zelle im Knochenmark bei Ovarialkarzinom. A Galleriebild einer uPA-R-positiven Zelle. B Extended focus.	39
Abb.12:	Knochenmarkausstrich einer Patientin mit Ovarialkarzinom (Giemsa-Färbung).	43
Abb.13	Knochenmarkspirat versetzt mit OvMZ #45 (Ovarialkarzinomzellreihe) in unterschiedlichen Verdünnungsstufen: Wiederentdeckungsrate.	47
Abb.14	Patientinnen mit CK- und uPA-R-positiven Zellen im Knochenmark (n = 38).	48

- Abb.15 Reihenfolge der Therapie- bzw. Behandlungsschritte (von links nach rechts) bei Patientinnen mit OvCa (schwarz). Anteil der Patientinnen mit CK- und uPA-R-positiven Zellen (gelb); Zeitpunkt der KM-Aspiration (Spritze). 56*
- Abb.17 uPA-R-Expression der detektierten CK-positiven Zellen; Patientin vor (4a) und nach (4b) postoperativer Chemotherapie (Zahlenwerte s. Anhang 10.2). 59*

9. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tab.1</i>	<i>Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms (Tumorzentrum München 2001:20).</i>	<i>4</i>
<i>Tab.2</i>	<i>Grading des Ovarialkarzinoms (Tumorzentrum München 2001:19).</i>	<i>5</i>
<i>Tab.3</i>	<i>Grading des Ovarialkarzinoms (Tumorzentrum München 2001:19).</i>	<i>5</i>
<i>Tab.4</i>	<i>Patientenkollektiv.</i>	<i>21</i>
<i>Tab.5</i>	<i>Patientenkollektiv – Einteilung nach Tumorstadien.</i>	<i>22</i>
<i>Tab.6</i>	<i>Patientenkollektiv – Einteilung nach Chemotherapie.</i>	<i>22</i>
<i>Tab.7</i>	<i>Patientenkollektiv – zeitlicher Zusammenhang zu Chemotherapie.</i>	<i>23</i>
<i>Tab.8</i>	<i>Färbeprotokoll.</i>	<i>30</i>
<i>Tab.9</i>	<i>Verdünnungsreihe zur Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit der Zelllinie OvMZ #45 (Ovarialkarzinom).</i>	<i>47</i>
<i>Tab.10</i>	<i>Übersicht der Daten zur CK-positiven Zell-Detektion in Bezug zu klinischen Merkmalen.</i>	<i>49</i>
<i>Tab.11</i>	<i>Übersicht des Zusammenhangs zwischen klinischen und immunzytochemischen Daten.</i>	<i>49</i>
<i>Tab.12</i>	<i>uPA-R-Status im Zusammenhang mit Chemotherapie (CTx).</i>	<i>57</i>
<i>Tab.13</i>	<i>Vor- und Nachteile verschiedener Färbemethoden.</i>	<i>71</i>
<i>Tab.14</i>	<i>Literaturvergleich der Ergebnisse zur Detektion disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom.</i>	<i>74</i>

10. ANHANG

10.1. Häufig verwendete Abkürzungen

CTx	Chemotherapie
CLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CS	Cytospin
CK	Cytokeratin
KM	Knochenmark
OvCa	Ovarialkarzinom
PAI	Plasmin-Aktivator-Inhibitor
uPA	Plasminogen-Aktivator vom Urokinasetyp
uPA-R	Rezeptor des Urokinase-Plasminogen-Aktivator

10.2. Tabellen und Abbildungen

Patienten Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
uPA-R-Expression IIIF10 ng/mg Protein	3,42	1,96	3,72	2,86	2,98	6,52	6,49	4,29
uPA-R-Expression HD13.1 ng/mg Protein	3,36	0,24	2,77	1,94	2,78	3,88	11,96	2,4

Patienten Nr.	9	10	11	12	13	14	15	16
uPA-R-Expression IIIF10 ng/mg Protein	4,56	2,32	2,45	2,97	3,06	3,19	3,15	3,35
uPA-R-Expression HD13.1 ng/mg Protein	11,37	5,96	4,63	1,28	2,29	1,26	1,12	1,14

uPA-R-Expression im Primärtumor bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom HU/IIIF10-ELISA und HU/HD13-ELISA (s. Text 4.6, Abb.16, S.58).

Patienten Nr.	uPA-R-Expression der CK-positiven Zellen			
	I	II	III	IV
1	36,743	25,311	2,767	8,993
2	11,025			
3	3,583	3,517	39,783	
4a	8,774	10,244		
4b	6,787	2,912	5,009	
5	19,919			
6	2,317	5,322	11,153	
7	1,914			
8	n.a.			
9	n.a.			

uPA-R-Expression der CK-positiven Zellen (Anzahl I - IV); Patientin vor (4a) und nach (4b) postoperativer Chemotherapie; nicht auswertbare Zellen (n.a.) (s. Text 4.6, Abb.17, S.59).

Dec. 19, 1961

M. MINSKY
MICROSCOPY APPARATUS
Filed Nov. 7, 1957

3,013,467

LIBRARY

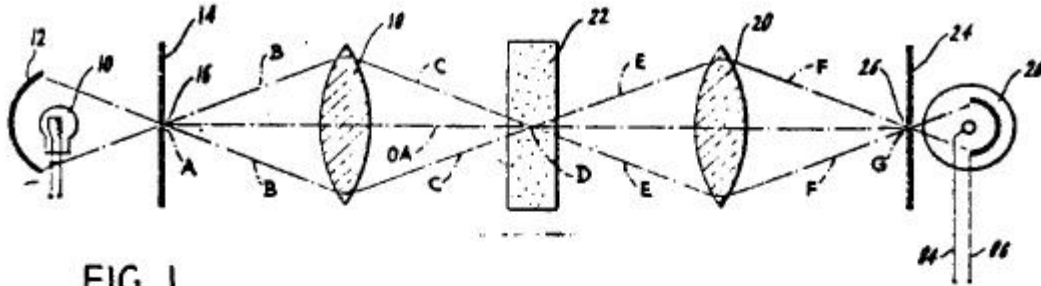


FIG. 1.

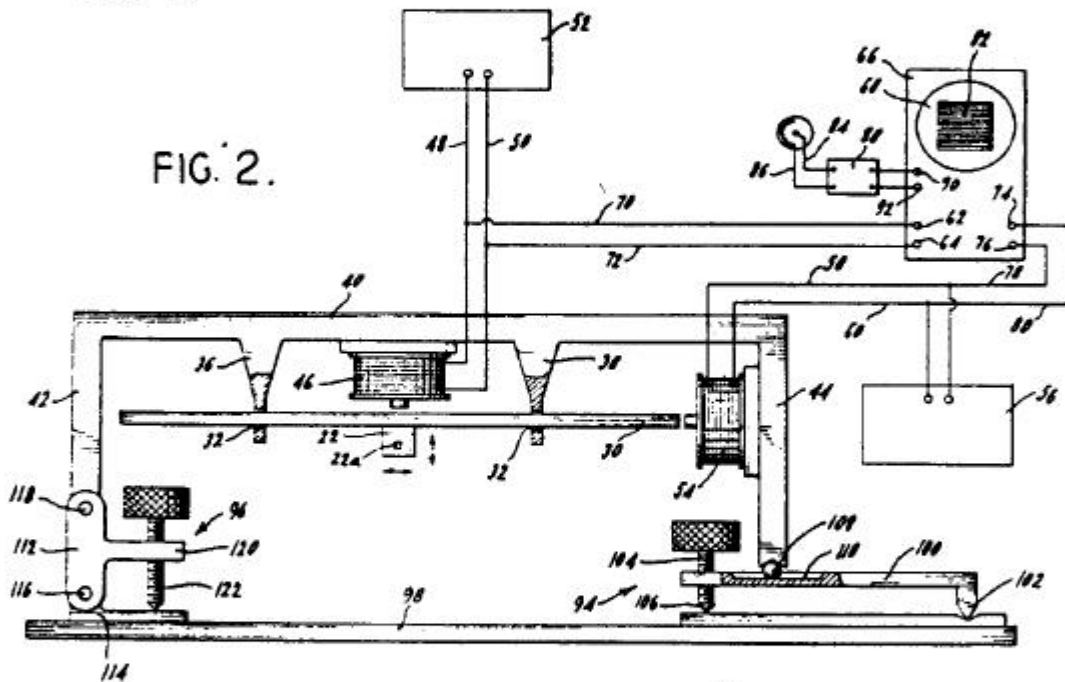


FIG. 2.

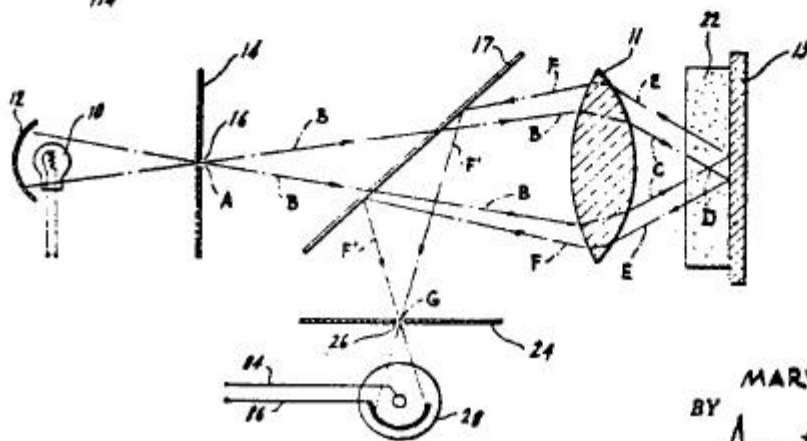
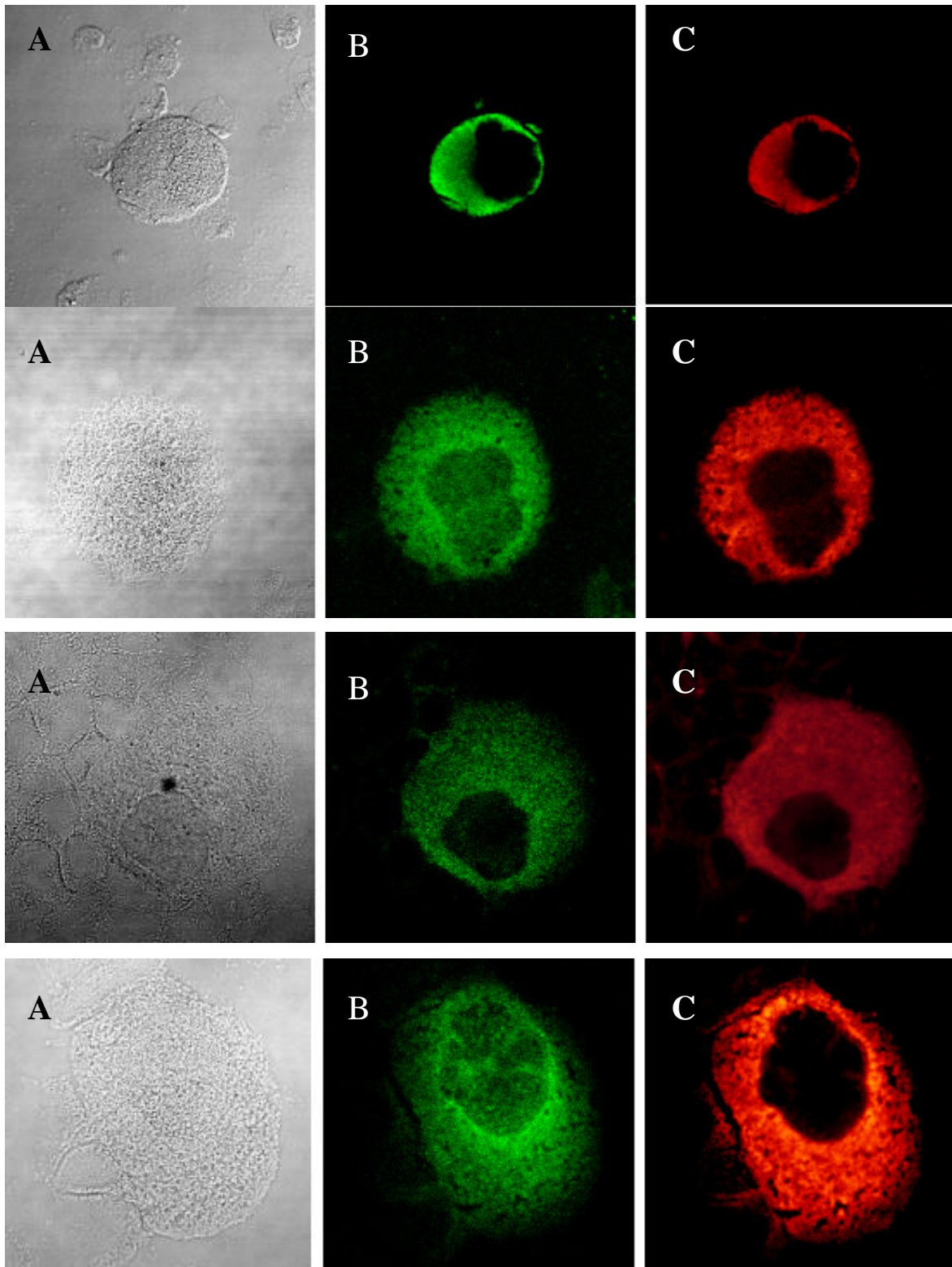


FIG. 3.

INVENTOR
MARVIN MINSKY
BY
Ameter & Levy

Original Patentschrift zum Prinzip des konfokalen Mikroskopes. Minsky, M. (1957).



Beispiele für disseminierte CK-positive Zellen im KM bei 200- (Reihe 1) und 630-facher Vergrößerung (Reihe 2-4). **A** Transmissionsbild (lichtmikroskopisch). **B** Immunfluoreszenzfärbung gegen Pancytokeratin 8/18/19 (A45-B/B3, Alexa 488). **C** Immunfluoreszenzfärbung gegen uPA-R (HU277, Alexa 568).

11. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Henner Graeff, dem ehemaligen Direktor der Frauenklinik, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchführen und *Frau Prof. Dr. med. Marion Kiechle*, der heutigen Direktorin der Frauenklinik dafür, diese Arbeit unter ihrer Leitung fertigstellen zu können.

Frau Prof. Dr. med. Nadia Harbeck gilt mein Dank für die Themaüberlassung. Frau Harbeck war mir durch ihre Persönlichkeit ein ganz besonderes Vorbild in Motivation und Organisation dieses Projektes.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Manfred Schmitt, dem Leiter der Klinischen Forschergruppe, danke ich für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Mitteln sowie seiner in jeder Hinsicht fördernden Unterstützung.

Herrn Dr. med. Frank Noack danke ich herzlich für seine überaus freundliche und kooperative Unterstützung und Beratung, sowie seine besondere Geduld und sein großes Engagement.

Frau Prof. Dr. med. B. Schmalfeldt und *Herrn Prof. Dr. med. Walter Kuhn* danke ich für die Bereitstellung der klinischen Patientendaten sowie für die Möglichkeit zur eigenständigen Knochenmarkpunktion, die ich unter Anleitung von *Frau Dr. med. Kerstin Späthe* und *Herrn Dr. med. Stefan Rutke* erlernte. Ein ganz spezieller Dank gilt dabei Frau Späthe, die mir stets hilfsbereit mit Rat und Tat bei klinischen Fragen zur Seite gestanden ist.

Den beiden Technischen Assistenten der Klinischen Forschergruppe *Frau Anita Welk* und *Herrn Dominik Helmecke* danke ich herzlich für ihre freundliche Unterstützung bei der Einführung in die Praxis immunzytologischer Arbeitstechniken. Ein weiterer besonderer Dank gebührt Herrn Helmecke für die Hilfe bei jeglichen computertechnischen Problemen, die sich mir stetig wiederkehrend bei der Arbeit am konfokalen Lasermikroskop eröffneten.

Herr Dr. med. Michael Sandherr (Hämatonkologisches Labor der Medizinischen Klinik III, Klinikum rechts der Isar) übernahm selbstverständlich die Qualitätssicherung der Knochenmarkaspirate. An dieser Stelle vielen Dank.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Ovarialkarzinom danke ich schließlich für eine freundschaftlich-kollegiale, jederzeit hilfsbereite, kooperative und humorvolle Zusammenarbeit.

Ein freundliches Dankeschön für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung geht an *Herrn Klaus Hechenbichler*, Diplomstatistiker und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut und dem Institut für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Meinem Freund und Kollegen *Herrn Amir Parasta* danke ich besonders herzlich für seinen 24-Stunden-Bereitschaftsdienst bei der Erstellung des schriftlichen Teils meiner Arbeit. Durch seine endlos geduldige Hilfe wurde mir die Welt der Textverarbeitung, Tabellen und Graphiken zugänglich.

Meinen beiden Großmüttern *Frau Elsedore Goldmann* und *Frau Gisela Pabst* möchte ich für ihre liebevolle Unterstützung bei den kleinen und großen Sorgen des alltäglichen Lebens während der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Meinen Eltern *Marion* und *Gerhard Pabst* und deren Lebenspartnern *Gertraud Pabst* und *Peter Müller* verdanke ich eine unermüdliche mentale und seelische Unterstützung, die mich während meines gesamten Studiums und auch bei dieser Arbeit stets begleitete.

Abschließend nochmals herzlichen Dank an alle, die mir diese Zeit angenehm und lehrreich gestaltet haben.

Bern, im Februar 2006

12. CURRICULUM VITAE

Name	Martina Georgette Pabst	
Adresse	Gutenbergstr. 24, CH - 3011 Bern	
Geburtsdatum	23. April 1973	
Geburtsort	Dachau	
Familienstand	Ledig	
Schule	1983 - 1992	Ignaz-Taschner-Gymnasium Dachau
Berufsausbildung	1992 - 1995	Biologisch-Technische Assistentin. GSF, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München
Medizinstudium	1995 - 1997	Ludwig-Maximilians-Universität, München
	1997	Ärztliche Vorprüfung
	1997 - 2000	Technische Universität München
	2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2004	Vollapprobation
Sprachen	Deutsch, Englisch, Spanisch	

Praktisches Jahr 2000 - 2001

- Anästhesie, Kantonsspital Schaffhausen, Schweiz
- Innere Medizin, Universitätsklinikum Granada, Spanien
- Innere Medizin, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru
- Chirurgie, Städtisches Krankenhaus München-Bogenhausen

Facharztweiterbildung / Assistenzarztstätigkeit im Bereich Chirurgie

06/02 - 12/04	Kantonsspital Schaffhausen, Schweiz (PD Dr. med. W. Schweizer)
01/05 - 09/05	Universitätsklinikum Dresden (Prof. Dr. med. H.D. Saeger)
seit 10/05	Universitätsspital Bern, Inselspital, Bern, Schweiz (Prof. Dr. med. D. Candinas)

Lehrtätigkeiten

1. Erste Hilfe bei Baby- und Kindernotfällen für Eltern und Erziehungsberufe
2. Basiskurse in Erster Hilfe für Kinder und Führerscheinanwärter
3. Instruktorin für PALS (pediatric advanced life support)

Spezielle Qualifikationen / Weiterbildungen

- Praktischer Kurs für Gastroenterologische Chirurgie, Basiskurs und Fortgeschrittene, Arbeitsgruppe für Gastroenterologische Chirurgie, Davos, Schweiz
- Advanced Cardiac Life Support (ACLS), St. Gallen, Schweiz
- Advanced Trauma Life Support (ATLS), Basel, Schweiz
- Pediatric Advanced Life Support (PALS), St. Gallen, Schweiz
- AO - Basiskurs für Frakturmanagement, Davos, Schweiz
- Instruktoren-Kurs für PALS, St. Gallen, Schweiz
- Fachkundenachweis Rettungsdienst, Dresden

Arbeiten / Publikationen

1. Roggel F, Hocke S, Lindemann K, Sinz S, Welk A, Bosl M, *Pabst M*, Nusser N, Braun S, Schmitt M, Harbeck N (2003)
Minimal Residual Disease in Breast Cancer and Gynecologic Malignancies: Phenotype and Clinical Relevance.
Rec Res Cancer Res 162:89-100
2. Späthe K, Noack F, *Pabst M*, Kuhn W, Graeff H, Schmitt M, Harbeck N (2000)
Nachweis CD87-positiver Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom.
GebFra Thema: Posterpräsentationen Gynäkologie und Onkologie Ovarialkarzinom – Wachstumsmarker, Genetik, Varia P2.09.02
3. Noack F, Harbeck N, *Pabst M*, Späthe K, Kuhn W, Graeff H, Schmitt M. (2000)
Minimal residual disease in ovarian cancer: detection of CD87-positive tumor cells in bone marrow aspirates by confocal laser scanning microscopy (CLSM)
J Cancer Res Clin Oncol 126 (suppl): R61

4. Noack F, Bauer J, Sinz S, Bosl M, *Pabst M*, Helmecke D, Welk A, Schmitt M, Harbeck N (2000)
A new approach to phenotype and genotype disseminated tumor cells in bone marrow aspirates of breast cancer patients.
Electronic J Pathology Histology Vol 6.3 July – September: 03.12.
5. Späthe K, Noack F, *Pabst M*, Kuhn W, Graeff H, Schmitt M, Harbeck N (2000)
Nachweis CD87-positiver Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom.
Geburtsh Frauenheilk 60: S138.
6. Harbeck N, Noack F, *Pabst M*, Sandherr M, Kuhn W, Graeff H, Schmitt M (1999)
Minimal residual disease in ovarian cancer: Detection of CD87 positive tumor cells in bone marrow aspirates by confocal laser scanning microscopy (CLSM).
EORTC RBSG Tagung, Brdo, Slowenien (16.-18.10.1999)
7. Noack F, Sinz S, Bauer J, *Pabst M*, Bosl M, Helmecke D, Schmitt M, Harbeck N (2000)
Characterization of disseminated tumor cells in breast cancer patients using immunofluorescent phenotyping, lasermicrodissection, and genotyping.
EuroConference "Microdissection and its Downstream Tools" Pathologie, Bonn
8. Parasta A, Metzger R, *Pabst M*, Nikmond D, Parasta AM (2004)
Evidence Based Telemedicine? - Sinnvolle Nutzung von Daten als Mittel der Qualitätssicherung.
In: Jäckel (Hrsg.) Telemedizinführer Deutschland, Ober-Mörlen
9. Parasta A, Metzger R, Nikmond D, Till H, *Pabst M*, Parasta AM (2004)
Die Elektronische Patientenakte - Übersicht und Leitlinien für künftige Entwicklungen.
In: Jäckel (Hrsg.) Telemedizinführer Deutschland, Ober-Mörlen
10. *Pabst M*, Giger U, Senn M, Gauer JM, Boldog B, Schweizer W (2005)
transanal treatment of strictured colorectal anastomosis with a circular stapler device: simple and safe. Digestive Surgery (eingereicht).

