

---

Chirurgische Klinik und Poliklinik  
Großhadern  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Professor Dr. med. K.W. Jauch

Immunzytologische und regulatorische Untersuchungen der Ep-CAM  
Expression disseminierter Epithelzellen im Knochenmark von  
Mammakarzinom-Patientinnen

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Christopher Wild

aus  
München

2004

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Ilona Funke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. Gerber  
Prof. Dr. Th. Brocker  
PD Dr. R. Huss

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. biol. hum. Barbara Mayer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2004

---

Meiner Großmutter Ama und meinen Eltern  
für Ihre Unterstützung

Meiner geliebten Frau für den innigen und selbstlosen Beistand mit dem Sie mich  
während des Studiums und meiner Promotion in Liebe begleitet hat

## **Inhaltsverzeichnis**

	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	1
	<b>Abbildungs– und Tabellenverzeichnis</b>	3
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	4
<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	5
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	7
<b>3.</b>	<b>Material</b>	11
3.1.	Gewebe	11
3.2.	Zelllinien	11
3.3.	Primär– und Sekundärantikörper	12
3.3.1.	Primärantikörper	12
3.3.2.	Sekundärantikörper	12
3.4.	Chemikalien	13
3.5.	Sonstige Verbrauchsmittel	15
3.6.	Puffer, Medien, Lösungen	16
<b>4.</b>	<b>Patientenkollektiv und Methoden</b>	18
4.1.	Patientenkollektiv	18
4.2.	Erhebung der Patienten– und Tumor bezogenen Daten	19
4.3.	Gewinnung und Aufarbeitung von Knochenmarkaspiraten	19
4.4.	Anfertigung der Zytozentrifugenpräparate	20
4.5.	Zellkultur	21
4.5.1.	Auftauen, Kultivieren und Einfrieren eukaryontischer Zelllinien	21
4.5.2.	Multizelluläre Tumorsphäroid–Kultur	22
4.6.	Herstellung von Paraffinblöcken und Paraffin–Schnittpräparaten	22

4.7.	Hämatoxilin–Eosin–Färbung (HE)	23
4.8.	Immunzytologische Färbungen	23
4.8.1.	Alkalische–Phosphatase–Anti–Alkalische–Phosphatase (APAAP) Färbung	23
4.8.2.	Alkalische–Phosphatase–Streptavidin–Immunogold–Doppelfärbung	24
4.8.2.1.	Biotinylierung des monoklonalen Mausantikörpers CK18	25
4.8.2.2.	Durchführung der Alkalischen–Phosphatase–Streptavidin–Immunogold–Doppelfärbung	25
4.8.3.	Indirekte Peroxidasefärbung	26
4.8.4.	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	27
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
5.1.	Charakterisierung des Patientinnenkollektivs	28
5.2.	Analyse der Tumorgröße im Verhältnis des Lymphknotenstatus	32
5.3.	Histopathologische Differenzierung des Primärtumors	35
5.4.	Tumormarker und Proteolysefaktoren	37
5.5.	Blutgruppen Differenzierung des Patientinnenkollektivs	39
5.6.	Prävalenz und Disseminationsausmaß epithelialer Zellen im Knochenmark des untersuchten Patientinnenkollektivs	40
5.7.	Ep–CAM–Expression in präklinischen <i>in vitro</i> –Modellen	43
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>73</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.</b>	Altersverteilung der CK18–positiven Patientinnen	31
<b>Abb. 2.</b>	Lymphknotenstatus im Verhältnis zur Tumorgröße	33
<b>Abb. 3.</b>	UICC – Klassifikation	34
<b>Abb. 4.</b>	Grading	35
<b>Abb. 5.</b>	Hormon Rezeptorstatus	36
<b>Abb. 6.</b>	Tumormarker	37
<b>Abb. 7.</b>	Tumorassoziierte Proteolysefaktoren	38
<b>Abb. 8.</b>	AB0–Blutgruppe und Rhesusfaktor	39
<b>Abb. 9.</b>	CK18–positive Zellen in APAAP und Doppelfärbung	41
<b>Abb.10.</b>	Wiederfindungsrate CK18–positiver Zellen	42
<b>Abb.11.</b>	Präklinische <i>in vitro</i> –Modelle	44
<b>Abb.12.</b>	Dreidimensionales Tumorwachstum <i>in vitro</i>	45
<b>Abb.13.</b>	Morphologische und funktionelle Tumordifferenzierung	46
<b>Abb.14.</b>	Regulation der Ep–CAM–Expression	48

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	Obligat erhobene Parameter	28
<b>Tabelle 2</b>	Fakultativ erhobene Parameter	30
<b>Tabelle 3</b>	Phänotypisierung disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark von Mammakarzinom–Patientinnen	52

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BH</b>	Benzamidinhydrochlorid
<b>CK18</b>	Zytokeratinkomponente Nr.18
<b>DCIS</b>	Duktales Karzinom in Situ
<b>DMEM</b>	Dulbeccos Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>MRD</b>	Minimal Residual Disease
<b>Ep-CAM</b>	Epithelial Cell Adhesion Molecule
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorter
<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>ICAM-1</b>	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
<b>KGH</b>	Klinikum Großhadern
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>mAk</b>	monoklonaler Antikörper
<b>PAI-1</b>	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ1
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>Pox</b>	Peroxidase
<b>TRIS</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>U</b>	Umdrehungen
<b>UICC</b>	International Union Against Cancer (Union Internationale Contre le Cancer)
<b>uPA</b>	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp

## 1. Zusammenfassung

Die Mehrzahl aller Krebsneuerkrankungen sowie der malignombedingten Todesfälle wird in den westlichen Industrienationen durch maligne epitheliale Tumoren verursacht. Bei Patientinnen, die an einem primären Mammakarzinom erkranken, ist in 95% der Fälle bei Diagnosestellung keine Metastasierung nachweisbar. Dennoch kommt es bei einem Grossteil dieser Patientinnen innerhalb von 10 Jahren zu einer Progression der Erkrankung. Der frühzeitige Nachweis einer minimal residualen Tumorerkrankung und das zunehmende Wissen über die am Metastasierungsprozess von soliden epithelialen Tumoren beteiligten Faktoren könnten es ermöglichen, für diese Patientinnen noch wirkungsvollere Therapiestrategien zu entwickeln als derzeit zur Verfügung stehen.

Die Phänotypisierung und Analyse des Antigenprofils in das Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen disseminierter epithelialer Tumorzellen kann dabei eingesetzt werden, um potentielle „Target-Strukturen“ für den Einsatz therapeutischer Antikörper zu identifizieren. In Studien wird auch beim Mammakarzinom ein monoklonaler Antikörper eingesetzt, der gegen das „epithelial cell adhesion molecule“ (Ep-CAM) gerichtet ist. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Ep-CAM-Expression auf den ins Knochenmark disseminierten epithelialen Zellen bei Mammakarzinom-Patientinnen, um zu evaluieren, ob das Zielantigen, gegen das dieser Antikörper gerichtet ist, auf den nach der Resektion des Primärtumors im Körper verbleibenden disseminierten Tumorzellen exprimiert ist. Hierfür wurden zunächst disseminierte epitheliale Zellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen mit einem gegen die Zytokeratinkomponente Nr.18 gerichteten monoklonalen Antikörper detektiert, und anschließend mit dem gegen Ep-CAM gerichteten monoklonalen Antikörper Ber-EP4 auf dessen Expression untersucht.

Das überraschende Resultat dieser Untersuchung war, dass von 34 Knochenmarkspunktaten von Mammakarzinom-Patientinnen mit einer minimal residualen Tumorerkrankung in der Doppelfärbung nur eines sowohl CK18- als auch Ber-EP4-positiv war. Dies entspricht nur einer Positivitätsrate von 2,9%, und weicht damit erheblich von bisherigen Publikationen zur Expression von Ep-CAM bei disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark ab. Allerdings wurden in bisherigen Studien überwiegend Patientinnen bereits mit einer manifesten Metastasierung untersucht.



Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Ausmaß der Ep-CAM-Expression bei epithelialen Zellen von ihrer Zellzahl bzw. Zelldichte abhängig sein könnte.

Als weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ergab sich daher die Untersuchung des Ausmaßes der Ep-CAM-Expression in Abhängigkeit von der Anordnung bzw. der Zelldichte der Tumorzellen. Da konventionelle einschichtige Zellkulturen von Tumorzellen nicht repräsentativ für die Charakteristik dreidimensionaler solider Tumoren sind, wurde, ausgehend von etablierten Mammakarzinom-Zelllinien, zur weiteren Untersuchung mit dem multizellulären Sphäroidmodell gearbeitet. Im Sphäroidmodell kann die Organisation der Zell-Zell-Interaktionen und das „microenvironment“ von Tumoren im Vergleich zu konventionellen Monolayerkulturen *in vivo* nahe simuliert werden, so dass das Ausmaß der Ep-CAM-Expression auf epithelialen Mammakarzinomzellen mit der standardisierten Monolayerkultur verglichen werden konnte.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Ep-CAM-Expression sowohl von der 3D-Anordnung der Tumorzellen als auch von der Zelldichte im dreidimensionalen Zellverband abhängig ist. Da bei der Mehrheit der Mammakarzinom-Patientinnen in den untersuchten Knochenmarkspunktaten nur Einzelzellen gefunden wurden, könnte dies die Erklärung für die Ep-CAM-negativen Befunde in dieser Arbeit sein. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass monoklonale Ep-CAM-Antikörper nicht für die Immuntherapie einer minimal residualen Tumorerkrankung geeignet sind, da ihr Zielantigen – zumindest beim Mammakarzinom – nur selten auf den disseminierten epithelialen Einzelzellen im Knochenmark exprimiert ist.

## 2. Einleitung

Das Mammakarzinom betrifft ungefähr 8% der weiblichen Bevölkerung und ist damit der häufigste bösartige Tumor der Frau. In Deutschland liegt die Anzahl der Neuerkrankungen an einem Mammakarzinom bei derzeit etwa 46.000 Patientinnen jährlich. Rund 19.000 Patientinnen sterben im gleichen Zeitraum an den Folgen dieser Krebserkrankung (102).

Bislang basierte die Einschätzung der Prognose für Mammakarzinom-Patientinnen auf einer Kombination aus klinischen und histologischen Kriterien, wie Tumorgröße, Nodalstatus, Hormonrezeptorstatus und Differenzierungsgrad des Primärtumors (24, 25, 26, 27). Der Lymphknotenstatus gilt hierbei als der wichtigste prognostische Faktor beim primären Mammakarzinom. Die Prognose der Patientinnen mit positivem Nodalstatus ist schlechter als die der Patientinnen ohne Befall der axillären Lymphknoten und korreliert dabei direkt mit der Anzahl der betroffenen Lymphknoten (102). Bei 92% aller Mammakarzinom-Patientinnen ist bei Diagnosestellung mit konventionellen Methoden keine Metastasierung nachweisbar, dennoch erleiden ungefähr 25–30% der nodalnegativen Patientinnen und 42–53% der nodalpositiven Patientinnen innerhalb von 10 Jahren eine Progression der Erkrankung (24, 25, 26, 27).

Um die Gruppe der Mammakarzinom-Patientinnen mit einem erhöhten Risiko für ein Tumorrezidiv frühzeitig zu erkennen, müssen weitere aussagekräftige Prognosefaktoren erforscht und etabliert werden, um so eine dem jeweiligen Risiko der Patientinnen individuell angepasste optimale Therapie zu erreichen (54).

Man nimmt an, dass der komplexe Prozess der Metastasierung auf dem Zusammenwirken unterschiedlicher Faktoren beruht, bei der Adhäsionsvorgänge von wesentlicher Bedeutung sind. Die verschiedenen Schritte des Metastasierungsprozesses betreffen die Ablösung der Zellen aus dem Verband des Primärtumors, die Invasion in das Gefäßsystem, die Extravasation aus dem Gefäßsystem in ein entsprechendes Sekundärorgan, und das Heranwachsen in dieser neuen Umgebung zu einer Metastase. Bei allen diesen Schritten spielen Veränderungen im Adhäsionsprofil der Tumorzellen eine zentrale Rolle (42, 63, 109). Durch zelloberflächenständige bzw. zytoplasmatische Rezeptoren wird dabei die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen und die Interaktion mit dem Zytoskelett bzw. anderen Signaltransduktionsmolekülen vermittelt. Somit sind Adhäsionsmoleküle entscheidend an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, einschließlich der Differenzierung, Proliferation, Migration und der Apoptose (14).

Der immunzytochemische Nachweis einzelner disseminierter Epithelzellen im Knochenmark wurde unter dem problematischen Begriff „Mikrometastasierung“ in die internationale Literatur eingeführt (94) und 1993 als optionaler Faktor unter dem Terminus M1<sub>(i)</sub> in die TNM-Klassifikation aufgenommen (46, 103, 104). Auch dieser Terminus ist problematisch, da ein positiver Knochenmarkstatus keinesfalls mit einer manifesten Metastasierung (M1) gleichzusetzen ist, sondern vielmehr als Indikator für die Generalisierung der Erkrankung angesehen werden kann.

Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen charakteristische Zytoskelettkomponenten epithelialer Zellen ist das Auffinden epithelialer Zellen im Knochenmark mit geeigneten immunzytochemischen Färbungen wie der APAAP-Färbung (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Färbung) sensitiv und spezifisch möglich. Gegenwärtig hat sich die APAAP-Färbung zunehmend als immunzytochemische Standardtechnik zum Auffinden epithelialer Zellen im Knochenmark etablieren können (8, 32). Zur Phänotypisierung dieser disseminierten epithelialen Zellen wurden immunzytochemische Doppelfärbemethoden entwickelt, die den sensitiven und spezifischen Nachweis definierter Antigene auf den Zytokeratin positiven Zellen im Knochenmark erlauben (75). Durch die geringe Anzahl der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ist eine weitergehende Phänotypisierung jedoch limitiert. Auch mit der PCR-Technik könnte sich zukünftig eine methodische Alternative zur Charakterisierung der disseminierten Epithelzellen etablieren.

Da beim Mammakarzinom das Skelettsystem zu den von Fernmetastasen am häufigsten betroffenen Sekundärorganen gehört, könnte der Nachweis disseminierter Epithelzellen im Knochenmark im Rahmen eines erweiterten perioperativen Tumorstaging eine Ergänzung zum Lymphknotenstatus sein. Gerade innerhalb der letzten zwei bis drei Jahre hat sich der Knochenmarkstatus in verschiedenen Studien beim Mammakarzinom als ein unabhängiger Prognosefaktor erhärtet (10, 12, 21, 22, 23, 33, 35, 36, 67, 68).

Neben der operativen Entfernung des Primärtumors mit Lymphknotendisektion der Axilla steht bislang zur Therapie des Mammakarzinoms eine sich anschließende systemische Chemo-, Hormon- und/oder Strahlentherapie (entsprechend den Empfehlungen des Tumorzentrums unter Berücksichtigung des jeweiligen Tumorstadiums) zur Verfügung. Die therapeutischen Möglichkeiten der bisherigen anti-neoplastischen Therapie könnten durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern in der Immuntherapie erweitert werden (60).

*In vitro*-Experimente haben gezeigt, dass einige Antikörper in der Lage sind, in Anwesenheit von immunologischen Effektorzellen und Komplement Tumorzellen zu lysieren. Die phänotypische Charakterisierung disseminierter Epithelzellen hinsichtlich ihrer Expression von proliferationsassoziierten Antigenen und Wachstumsfaktorrezeptoren legt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Zellen um „dormant cells“ handeln könnte (43).

Dies könnte eine Ursache für die begrenzte Wirkung der adjuvanten Chemotherapie sein, die auf Grund ihres Wirkmechanismus gegen proliferierende Zellen, nicht aber gegen Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase gerichtet ist. Die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern, die gegen Antigene sowohl ruhender als auch proliferierender Zellen gerichtet ist, könnte daher zukünftig eine Alternative bzw. Ergänzung der herkömmlichen Therapieoptionen beim Mammakarzinom sein.

Für eine erfolgreiche Therapie solider Tumoren mit monoklonalen Antikörpern muss zunächst ein tumorassoziiertes Antigen als „Target-Struktur“ definiert sein, gegen das der monoklonale Antikörper gerichtet ist (13, 15, 51). Idealerweise sollte dieses Antigen eine starke Expression auf Tumorzellen haben und nur eine geringe Expression bei normalen Zellen zeigen. Eine Möglichkeit, das Antigenprofil disseminierter Epithelzellen zu analysieren, besteht in der Verwendung von monoklonalen Antikörpern. Mit den oben genannten phänotypischen Charakterisierungen konnte der maligne Charakter der disseminierten Epithelzellen im Knochenmark von Karzinompatientinnen durch den Nachweis tumorassoziiertes Marker wie der Überexpression des c-erbB2-Onkogens bereits untermauert werden (8, 11).

Der gegen das „epithelial cell adhesion molecule“ (Ep-CAM) gerichtete monoklonale Antikörper 17-1A war einer der ersten therapeutisch eingesetzten Antikörper. Ep-CAM wird auf der Oberfläche der meisten epithelialen Tumoren und auf normalen Epithelzellen exprimiert (3). In einer großen Kohortenstudie bei primären Mammakarzinom-Patientinnen konnte gezeigt werden, dass eine starke Expression von Ep-CAM mit der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus korreliert (111). Nach dem erfolgreichen Einsatz des monoklonalen Ep-CAM Antikörpers 17-1A (Edrecolomab) in einer Studie zur adjuvanten Therapie beim Kolonkarzinom wurde die Immuntherapie mit diesem monoklonalen Antikörper auch beim Mammakarzinom im Rahmen einer klinischen Studie eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Expressionsmuster disseminierter Epithelzellen im Knochenmark bei Mammakarzinom-Patientinnen zu untersuchen. Hierfür wurden Epithelzellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen mit einem gegen die Zytokeratinkomponente Nr.18 gerichteten monoklonalen Antikörper in der APAAP-Färbung detektiert und anschließend mittels Doppelfärbung hinsichtlich ihres Ep-CAM Expressionsmusters phänotypisiert. Dafür wurde der monoklonale Antikörper Ber-EP4, der wie der 17-1A Antikörper gegen Ep-CAM gerichtet ist, eingesetzt. Es sollte untersucht werden, wie häufig Ep-CAM auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Mammakarzinom-Patientinnen exprimiert wird, und ob aus diesen Untersuchungen geschlossen werden kann, dass der therapeutische Einsatz eines monoklonalen Ep-CAM Antikörpers in der Therapie von Mammakarzinom-Patientinnen ein sinnvoller Ansatz sein könnte.

### 3. Material

#### 3.1. Gewebe

<b>Gewebe</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Knochenmark:	Chirurg. Klinik&Poliklinik, Klinikum Großhadern Frauenklinik Klinikum Großhadern Krankenhaus Reichenbach

#### 3.2. Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Artikelnummer</b>
<b>Mammakarzinom-Zelllinien:</b>		
MCF-7	ATCC, Manassas, VA	HTB – 22
SK-Br-3	dito	HTB – 30
BT-20	dito	HTB – 19
T47 D	dito	HTB –143

### 3.3. Primär- und Sekundärantikörper

#### 3.3.1. Primärantikörper

Antikörper (Klon)	Isotyp	Arbeitskonzentration	Spezifität	Bezugsquelle	
<b>Isotypkontrollen:</b>					
MOPC 21	IgG1	10 µg/ml	Ø definiert	Sigma	Deisenhofen
UPC-10	IgG2a	10 µg/ml	Ø definiert	Sigma	Deisenhofen
<b>HLA-Antigene:</b>					
W6/32	IgG2a	Überstand*	HLA-A, B,C	ATCC	ManassasVA
<b>Adhäsionsmoleküle</b>					
CK2	IgG1	5 µg/ml	CK18	Boehringer	Mannheim
Ber-EP4	IgG1	4 µg/ml	Ep-CAM	Dako	Hamburg
SS - 3B10-D5	IgG3	Überstand	Ep-CAM	JP. Johnson	München
SS - 3B10-C9	IgG1	Überstand	Ep-CAM	JP. Johnson	München
SS - G61	IgG1	Überstand	Ep-CAM	JP. Johnson	München
F1044-2	IgG2a	10 µg/ml	CD 44s	Novocastra	Newcastle

\* Hybridom-Zellkulturüberstand, unverdünnt

#### 3.3.2. Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezifität	Bezugsquelle	
Kaninchen-Anti-Maus-Ig POX-markiert	1:50	Maus IgG+IgM (H+L)	Dako	Hamburg
Kaninchen-Anti-Maus-Ig FITC-markiert	1:50	Maus IgG+IgM (H+L)	Dianova	Hamburg
APAAP-Komplex	1:100		Dako	Hamburg
Ziegen-anti-Maus-Ig (Biotin markiert)	1:50		Amersham	Braunschweig
AP-Streptavidin	1:200	Biotin	Dianova	Hamburg

### 3.4. Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
AB-Serum, human	Biotest, Dreieich
Sea Plaque Agarose	FMC BioProducts, Rockland, ME
Alkalische Phosphatase Streptavidin	Dianova, Hamburg
3-Amino-9-Ethylkarbazol	Sigma, Deisenhofen
APAAP-Komplex	Dako, Hamburg
Auro Probe™ One GAM 1nm gold labelled goat anti mouse IgG (H+L)	Amersham, Braunschweig
Azeton reinst	Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM + 4,5 g/L Glukose	Life Technologies, Eggenstein
Einbettmedium	Reichert-Jung, Nussloch
Eosin Y	Sigma, St. Louis, MO
Essigsäure 100%ig	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol reinst	Merck, Darmstadt
Ethanol 96% mit Ethylmethylketon	Apotheke, Universität, München
Ethanol 80% mit Ethylmethylketon	Apotheke, Universität, München
Ethanol 70% mit Ethylmethylketon	Apotheke, Universität, München
Ethylendiamintetraessigsäure	Fluka, Neu-Ulm
Fötale Kälberserum 10% (FCS )	Life Technologies, Eggenstein
Ficoll-Paque	Pharmacia, Upsala (Schweden)
β-D(+)-Glucose	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Life Technologies, Eggenstein
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Hämalaun nach Mayer	Merk, Darmstadt
HCL	Fluka, Buchs



**Fortsetzung Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Heparin</b>	Apotheke, Klinikum Großhadern
<b>Kaisers–Glycerin–Gelatine</b>	Merck, Darmstadt
<b>Kaninchen–Anti–Maus–Ig</b>	Dako, Hamburg
<b>Levamisolhydrochlorid</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>L–Glutamin 2mM</b>	Gibco
<b>Maus–Serum</b>	Dianova, Hamburg
<b>Na<sub>2</sub>–EDTA</b>	Delta Pharma, Apotheke, LMU
<b>Naphthol–AS–BI–Phosphat</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>Natriumazetat</b>	Fluka, Neu–Ulm
<b>Natriumazid</b>	Merck, Darmstadt
<b>Natriumnitrit</b>	Fluka, Neu–Ulm
<b>Natriumpyruvat 1mM</b>	Life Technologies, Eggenstein
<b>Neufuchsin</b>	Fluka, Neu–Ulm
<b>Penicillin–Streptomycin 100 U/ml</b>	Life Technologies, Eggenstein
<b>Propidium Iodid</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>RPMI 1640</b>	Biochrom, Berlin
<b>RPMI 1640 Medium (ohne L–Glutamine)</b>	Gibco
<b>Silberentwicklungskit</b>	Amersham, Braunschweig
<b>N,N,N,N–Tetramethylethyldiamin</b>	Sigma, Deisenhofen
<b>Tris</b>	Fluka, Neu–Ulm
<b>Trypanblaulösung 0,5%ig</b>	Serva, Heidelberg
<b>Wasserstoffperoxid 30%ig</b>	Merck, Darmstadt
<b>Xylol reinst</b>	Merck, Darmstadt

**3.5. Sonstige Verbrauchsmittel**

<b>Verbrauchsmittel</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Spritzen, Injektionskanülen, Skalpelle	Chirurgische Klinik, Klinikum Großhadern
24-Loch-, 96-Loch-Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Falcon, Berlin
60x15 mm, 100x20 mm Petrischalen	Falcon
Einfrierröhrchen	Nunc
Objektträger	Marienfeld GmbH, Lauda/Königshofen
Superfrost-Objektträger	Schubert & Weiss, München

### 3.6. Puffer, Medien, Lösungen

Die Angabe „%“ bezieht sich bei Feststoffeinwaagen auf Gewicht/Volumen (w/v) und bei Flüssigkeiten auf Volumen/Volumen (v/v).

Puffer:

#### **PBS–Puffer: pH 7.4**

Substanz	Menge	Hersteller
KCL	2 g	Fluka, Buchs/Schweiz
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.2 g	dito
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g	dito
NaCl	80 g	dito

(werden in 10 Liter Aqua dest. unter Rühren gelöst und auf den pH7.4 eingestellt)

#### **Erythrozyten–Lyse–Puffer**

Substanz	Menge	Hersteller
NH <sub>4</sub> Cl	8.3 g	Fluka, Buchs/Schweiz
KHCO <sub>3</sub>	1 g	dito
EDTA	37 mg	dito

(werden in einem Liter Aqua dest. unter Rühren gelöst)

#### **0,1 M Natriumazetatpuffer: pH 4,9**

Substanz	Menge	Hersteller
NaCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	M 3,5 x 10 <sup>-2</sup>	Fluka, Neu–Ulm
Essigsäure	M 1,5 x 10 <sup>-2</sup>	dito

Medien :**RPMI 1640–Nährmedium**

Substanz	Menge	Hersteller
FCS*	10%	Life Technologies, Eggenstein
Natriumpyruvat	1mM	dito
L–Glutamin	2mM	dito
Streptomycin	100Units/ml	dito
Penicillin	100Units/ml	dito

**Einfriermedium RPMI 1640–Medium**

Substanz	Menge	Hersteller
FCS*	20%	Life Technologies, Eggenstein
DMSO	10%	Merck, Darmstadt

\* Die Hitzeinaktivierung des FCS erfolgt bei 56 °C für 30 Minuten.

Lösungen:**Neufuchsin–Stammlösung**

Substanz	Menge	Hersteller
Neufuchsin	5 g	Fluka, Buchs
HCL (2M)	100 ml	Merck, Darmstadt

**Neufuchsin–Substratlösung\***

Lösung 1	90 mg Levamisole, gelöst in 62.5 ml 0.1 M Tris–Puffer
Lösung 2	50 mg Natriumnitrit, gelöst in 1 ml aqua dest + 500 µl Neufuchsinstammlösung
Lösung 3	125 mg Naphthol–AS–Bi–Phosphat, gelöst in 1.5 ml DMF

(\*kurz vor Gebrauch wird Lösung 1 zunächst mit Lösung 2 und anschließend mit Lösung 3 versetzt. Die Substratlösung wird 5 Minuten lang inkubiert, filtriert und direkt verwendet)

**Biotin–Stammlösung**

Substanz	Menge	Hersteller
D–Biotinyl–ε–aminocapron–säure–N–hydroxysuccinimidester	10 mg in 2 ml DMF	Roche, Mannheim

## **4. Patientenkollektiv und Methoden**

### **4.1. Patientenkollektiv**

In die vorliegende Arbeit gingen die Daten von 34 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ein, bei denen die Bestimmung des Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Operation einen Nachweis disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark erbracht hatte. Nicht aufgenommen wurden Patientinnen, die an einem Rezidiv oder bereits früher an einer anderen Tumorentität erkrankt waren, oder bei denen eine R0–Resektion nicht möglich war. Ein weiteres Ausschlusskriterium war das Vorliegen von manifesten Fernmetastasen (M1) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Routinemäßig war bei allen Patientinnen eine „Staging“-Untersuchung durchgeführt worden, die eine Mammographie, eine Röntgenaufnahme des Thorax, eine Oberbauchsonographie sowie eine Skelettszintigraphie beinhaltete.

Darüber hinaus musste bei diesen Patientinnen noch eine ausreichende Anzahl von kryoasservierten Zytozentrifugenpräparaten vorhanden sein, um die immunzytochemische Doppelfärbung einschließlich der notwendigen Kontrollen durchführen zu können. Das hier vorgestellte Patientenkollektiv stellt damit eine Selektion von Patientinnen aus einem konsekutiv rekrutierten Kollektiv von Mammakarzinompatientinnen der Chirurgischen Klinik aus den Jahren 1993 bis 2002 dar, die die vorgenannten Einschlusskriterien erfüllten. Es wurden daher auch diejenigen Patienten– und Tumor– bezogenen Daten in die Kollektivbeschreibung einbezogen, die in diesem Gesamtkollektiv (n=1045) erfasst wurden.

## 4.2. Erhebung der Patienten- und Tumor bezogenen Daten

Nachfolgend genannte Parameter wurden obligat bzw. fakultativ erhoben:

<b>Obligate Parameter</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Alter</li> <li>– TNM-Klassifikation</li> <li>– Grading</li> <li>– Tumorhistologie</li> <li>– Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus</li> <li>– Knochenmarkstatus</li> </ul>
<b>Fakultative Parameter</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Tumormarker CEA und CA 15-3</li> <li>– Tumorassoziierte Proteolysefaktoren uPA und PAI-1</li> <li>– HER2-neu</li> <li>– Blutgruppe</li> </ul>

## 4.3. Gewinnung und Aufarbeitung von Knochenmarkaspiraten

Das Einverständnis der Patientinnen zur intraoperativen beidseitigen Knochenmarkaspiration aus dem Beckenkamm wurde im Rahmen des präoperativen Aufklärungsgespräches eingeholt und schriftlich dokumentiert. Intraoperativ wurden beidseitig die Spinae iliacae anteriores superiores punktiert. Um eine Gerinnung der Punktate zu vermeiden, wurden in die verwendeten Spritzen 0.5 ml Na<sub>2</sub>-EDTA 1.107% pro 2 ml Knochenmarkaspirat vorgelegt. Die Knochenmarkaspirate wurden bis zur seitengetrenten Aufarbeitung längstens für 48 Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

## Methode

Das intraoperativ aspirierte Knochenmark wurde mit dem 3-fachen Volumen 1xPBS pH 7.4 verdünnt, im Volumenverhältnis 1:1 über Ficoll–Hypaque Separationsmedium geschichtet, und anschließend ohne Bremse zentrifugiert (Hettich Rotixa RP–Zentrifuge, 2000 U/min, 25 Minuten, 4°C). Die mononukleären Zellen, die sich als trüber Ring zwischen Ficoll und Plasma in der Interphase anreicherten, wurden durch Abpipettieren gewonnen. Unvollständig abgetrennte Erythrozyten wurden durch eine drei-minütige Behandlung mit Erythrozyten–Lysepuffer entfernt. Die gewonnenen mononukleären Zellen wurden dann zweimal mit 1xPBS pH 7.4 gewaschen, und die Lebendzellzahl mit einer 0.5%igen Trypanblaulösung in der Neubauer–Zählkammer bestimmt. Aus 1 ml Knochenmark konnten so zwischen  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  mononukleäre Zellen gewonnen werden. Die Vitalität der Zellpopulationen lag dabei jeweils bei mindestens 92%.

### **4.4. Anfertigung der Zytozentrifugenpräparate**

#### **Bei Verwendung von Patientenmaterial**

Die gewaschenen Interphase–Zellen wurden mit 1xPBS pH 7,4 auf eine Lebendzellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden dann jeweils 500 µl unter Verwendung einer Zytospinzentrifuge (Hettich Universal 1500 U/min, 5 Minuten, RT) auf unbehandelte Objektträger aufgebracht, über Nacht getrocknet und anschließend gefärbt, oder bis zu ihrer Verwendung bei –80°C aufbewahrt. Pro Patientin wurden insgesamt  $1 \times 10^6$  Zellen immunzytochemisch (**Kapitel 4.8.1.**) untersucht. Davon stammten jeweils  $5 \times 10^5$  von der rechten bzw. linken Beckenkammpunktion. Wenn nur Material von einer Punktionsseite zur Verfügung stand, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen von dieser Seite aufgebracht.

#### **Bei Verwendung von Karzinomzelllinien**

Im Unterschied zu der oben vorgestellten Methode zur Anfertigung von Zytospinpräparaten (**Kapitel 4.4.1.**) wurden die gewaschenen Mammakarzinom–Zelllinien in Abhängigkeit von ihrer Größe auf eine Lebendzellzahl von  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden im Anschluss jeweils 100µl unter Verwendung einer Shandon Cytospin 2–Zentrifuge (Shandon GmbH, Frankfurt) auf unbehandelte Objektträger aufgebracht.

## 4.5. Zellkultur

Für die Zellkulturuntersuchungen wurden kommerziell erhältliche Mammakarzinom-Zelllinien (**Kapitel 3.2. Tabelle**) eingesetzt. Diese wurden

- a) als Positivkontrolle für die Reaktivität des indirekt markierten CK18-Antikörpers,
- b) zur Austitrierung des biotinylierten CK18-Antikörpers und
- c) für funktionelle Untersuchungen zur Regulation der Ep-CAM-Expression in Monolayer- und multizellulärer Sphäroidkultur verwendet.

### 4.5.1. Auftauen, Kultivieren und Einfrieren eukaryontischer Zelllinien

Das Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen muss möglichst rasch erfolgen, um eine Schädigung der Zellen durch das im Einfriermedium enthaltene toxische DMSO zu vermeiden. Hierfür wurde das Einfrierröhrchen mit den kryokonservierten Zellen bei 37°C solange im Wasserbad geschwenkt, bis nur noch ein kleiner Zellklumpen vorhanden war. Anschließend wurden die aufgetauten Zellen in 10 ml vorgewärmtes (37°C) RPMI 1640-Medium überführt, mehrmals gewaschen, und in geeignet große Plastik-Zellkulturflaschen eingesäht. Alle Zellen wurden in RPMI 1640-Medium, das mit 10% FCS supplementiert wurde, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Kendro, München) expandiert. Adhärenz Zellen wurden bei konfluentem Wachstum mit 1 mM EDTA in 1xPBS pH 7.4 bei 37°C abgelöst. Für morphologische Untersuchungen wurden die Zelllinien außerdem auf positiv geladenen Superfrost-Objektträgern gezüchtet, bei konfluentem Wachstum zweimal mit PBS gewaschen, und anschließend mit 5%iger Essigsäure in 92%igem Ethanol für 5 Minuten fixiert. Für die Langzeitlagerung wurden 5x10<sup>6</sup> Zellen nach zweimaligem Waschen mit RPMI 1640-Medium in 300µl Zellkulturmedium resuspendiert, in ein Einfrierröhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen des kalten Einfriermediums verdünnt. Der Einfriervorgang erfolgte zunächst bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff, um das Auskristallisieren der Zellflüssigkeit zu vermeiden.



#### **4.5.2. Multizelluläre Tumorsphäroid-Kultur**

Dreidimensionale (3D) Zellkulturen wurden mittels der konventionellen „liquid overlay“-Technik nach Yuhas et al., 1978 hergestellt (108). Hierfür wurden 24-Loch Zellkulturplatten mit einer 1%igen Sea Plaque-Agaroselösung in Serum-freiem RPMI-1640 Medium beschichtet, um die Adhäsion der Tumorzellen an den Plastik-Kulturträger zu verhindern. Multizelluläre Tumorsphäroide wurden aus konfluenten Monolayerkulturen generiert, die zuerst mit 1mmol/L EDTA, pH 7,2 bei 37°C behandelt wurden, um Einzelzell-Suspensionen herzustellen. Nach zweimaligem Waschen der Suspensionszellen wurde jede Kavität der Agarose-beschichteten 24-Loch-Platten mit  $1 \times 10^5$  vitalen Zellen in 1ml RPMI-1640 Nährmedium bestückt. Anschließend wurden die Platten sanft geschwenkt, um den Zell-Zell-Kontakt zu unterstützen, und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurde in jeder Kavität ein multizelluläres Aggregat gebildet. Der Durchmesser von jeweils 10 multizellulären Aggregaten wurde mit Hilfe einer kalibrierten Strichplatte vermessen.

#### **4.6. Herstellung von Paraffinblöcken und Paraffinschnittpräparaten**

Die multizellulären Tumorsphäroide wurden geerntet und in einer 10%igen Phosphat-gepufferten Formaldehyd-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur fixiert. Da Paraffin wasserunlöslich ist, wurden die fixierten Sphäroide zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurde der Alkohol durch Xylol entfernt und das Xylol durch 56°C heißes Paraffin ausgetauscht. Die von Paraffin durchtränkten Sphäroide wurden in eine Einbettchale transferiert und so angeordnet, dass die zu schneidende Fläche auf dem Schalenboden lag. Die Sphäroide wurden mit heißem Paraffin überschichtet und der entstandene Paraffinblock nach dem Erkalten aus der Gießform gehoben. Zum Anfertigen der Paraffinschnitte wurde ein Schlittenmikrotom verwendet. Die 3 µm-dicken Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C im Ofen getrocknet. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und durch die absteigende Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt.

## 4.7. Hämatoxilin–Eosin–Färbung

Die morphologischen Eigenschaften der Mammakarzinom–Zelllinien wurden jeweils in der konfluenten Monolayerkultur und der korrespondierenden Sphäroidkultur mittels der konventionellen Hämatoxilin–Eosin (HE)–Färbung untersucht. Hierfür wurden die fixierten Monolayerkulturen (**Kapitel 4.5.1.**) und die Sphäroid–Schnittpräparate (**Kapitel 4.6.**) kurz in Aqua dest gespült und anschließend die Kerne durch eine Hämalaun–Färbung nach Mayer blau dargestellt. Durch Spülen der Präparate in Leitungswasser wurde die überschüssige Hämalaunlösung entfernt und gleichzeitig der Kern–Farbkomplex stabilisiert. Anschließend erfolgte die Differenzierung der Kernfärbung mit 1%igem HCL in 70%igem Alkohol. Nach einem erneuten Spülgang der Präparate, zunächst in Leitungswasser und anschließend in Aqua dest, folgte die Färbung mit Eosin, gelöst in 96%igem Alkohol, wodurch das Zytoplasma der Zellen blassrot dargestellt wurde. Zur Konservierung der Präparate wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt. Der Einschluss erfolgte auf wasserfreier Basis mit Eukittbalsam.

## 4.8. Immunzytologische Färbungen

### 4.8.1. Alkalische–Phosphatase–Anti–Alkalische–Phosphatase (APAAP)

#### Färbung

Die Detektion der epithelialen Zellen in der mononukleären Interphase der Knochenmarkaspirate (**Kapitel 4.3.**) erfolgte mittels der APAAP–Färbung (17). Die Färbung wurde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach Inkubation der Zytospinpräparate mit 10% AB–Serum in 1xPBS pH 7,4 zur Blockade der unspezifischen Fc–Rezeptoren für 20 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Mausantikörper CK18– (IgG1), der gegen die Zytokeratinkomponente Nr.18 gerichtet ist, in der Arbeitskonzentration von 1:200 (5µg/ml) für 1 Stunde. Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS wurden die Präparate mit Kaninchen–Anti–Maus–Immunglobulin, das mit 10% AB–Serum/1xPBS 1:25 verdünnt wurde, überschichtet. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem APAAP–Komplex in einer Verdünnung von 1:100 in 10% AB–Serum/1xPBS. Nach erneutem Waschen wurden die Präparate anschließend 20 Minuten

lang mit der Neufuchsin–Substratlösung inkubiert und nach einem abschließenden Waschschrift mit Kaisers–Glycerin–Gelatine eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch (Axiovert 10, Zeiss, Jena) durch zwei unabhängige Untersucher. Für die Beurteilung des Knochenmarkstatus wurden pro Patientin  $1 \times 10^6$  Zellen mit dem gegen die Zytokeratinkomponente Nr.18 gerichteten Antikörper CK18–(IgG1) gefärbt und ausgewertet. Als positiver Knochenmarkstatus wurde der Nachweis von  $\geq 1$  CK18–positiven Zellen pro  $1 \times 10^6$  untersuchter Zellen definiert. Die Färbung wurde nur dann ausgewertet, wenn die entsprechenden Isotypkontrollantikörper keine Reaktion auf den Kontrollpräparaten zeigten. Als Positivkontrolle wurde der monoklonale Antikörper W6/32 eingesetzt. Dieser Antikörper ist gegen das polymorphe HLA–Klasse I Antigen gerichtet und detektiert somit alle kernhaltigen Zellen. Die Reaktivität des CK18–Antikörpers zum Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark wurde in jeder Färbung auf Präparaten humaner Mammakarzinom–Zelllinien überprüft. Die Auswertung berücksichtigte auch das Disseminationsausmaß, d.h. die Anzahl der CK18–positiven Zellen pro  $1 \times 10^6$  untersuchter Zellen.

Hierbei wurde unterschieden, ob die CK18–positiven Zellen als Einzelzellen oder als Zellcluster vorlagen. Zellcluster wurden definiert als mindestens zwei epitheliale Zellen ohne lichtmikroskopisch erkennbaren interzellulären Zwischenraum. Zu unterscheiden waren zwei Typen von Clustern: Typ I–Cluster werden von maximal 10 epithelialen Zellen gebildet und Typ II–Cluster bestehen aus mehr als 10 epithelialen Zellen.

#### **4.8.2. Alkalische-Phosphatase–Streptavidin–Immunogold–Doppelfärbung**

Die Phänotypisierung der epithelialen Zellen, die in der Interphase der Knochenmarkspirale nachweisbar sind, erfolgte mittels der Alkalische–Phosphatase–Streptavidin–Immunogold–Doppelfärbung modifiziert nach Riesenberg et al. (87). Dabei wurden die epithelialen Zellen mit dem Biotin–Streptavidin–Alkalische–Phosphatase–System identifiziert, das zu einer Rotfärbung der CK18–positiven Zellen führt. Der Nachweis verschiedener tumor–progressionsassoziierten Antigene erfolgte mit der Immunogold–Technik, die sich in einer körnigen Schwarzfärbung zeigte.

#### 4.8.2.1. Biotinylierung des monoklonalen Mausantikörpers CK18

Für die Biotinylierung wurde der monoklonale Antikörper CK18 (IgG1) in einer Konzentration von 1 mg/ml mit 50 µl der Biotin-Stammlösung über Nacht bei Raumtemperatur unter permanentem Schwenken inkubiert. Durch Membranultrazentrifugation (Beckmann Ultrazentrifuge, Typ J-21B, 5500 U/min, 45 Minuten) in Centricon-30 Konzentratorröhrchen wurde das ungebundene Biotin entfernt (5) und gleichzeitig der biotinylierte monoklonale Mausantikörper CK18 konzentriert. Nach zweimaligem Waschen mit 1xPBS pH 7.4 wurde der biotinylierte Antikörper in 500 µl 1xPBS/0.1% Natriumazid gelöst und auf Zytospinpräparaten austitriert.

#### 4.8.2.2. Durchführung der Alkalische-Phosphatase-Streptavidin- Immunogold-Doppelfärbung

Für die Phänotypisierung der epithelialen Zellen aus der Interphase der Knochenmarkaspirate wurden die Zytospinpräparate zunächst für 7 Minuten bei Raumtemperatur acetontfixiert. Nach der Blockade der Fc-Rezeptoren mit 10%igem Humanserum für 20 Minuten wurden die Präparate mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern, die unterschiedliche tumorprogressionsassoziierte Antigene detektieren (**Kapitel 3.3.1. Tabelle**), für eine Stunde inkubiert und anschließend für 30 Minuten mit einem mit Goldpartikeln (Durchmesser 1 nm) beladenen Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin in der Verdünnung 1:50 überschichtet. Nach einer erneuten Blockierung mit 5%igem Mausserum für 20 Minuten wurden die Präparate anschließend mit dem biotinylierten monoklonalen Mausantikörper CK18 in der ausgetesteten Arbeitskonzentration für eine Stunde und danach mit dem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex in der Verdünnung 1:200 für 30 Minuten inkubiert. Nach einer Fixierung mit 2%igem Glutaraldehyd für 10 Minuten wurde zuerst die alkalische Phosphatase entwickelt und im Anschluss daran die Silberentwicklung der Goldpartikel mit einem Kit entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden die Initiator- und Verstärkerlösung im Volumenverhältnis 1:1 versetzt und die Präparate gerade solange damit inkubiert, bis sich unter der Kontrolle im Lichtmikroskop (Axiovert 10, Zeiss, Jena) auf der Isotypkontrolle die ersten Silberkörnchen unspezifisch niederschlugen. Die Silberentwicklung wurde durch das Waschen der Präparate in destilliertem Wasser abgestoppt. Zur besseren Beurteilung der doppelt gefärbten Präparate erfolgte die mikroskopische Auswertung sowohl im Hellfeld wie auch im Phasenkontrast.

### 4.8.3. Indirekte Peroxidasefärbung

Zunächst wurden die rehydrierten Sphäroidpräparate 15 Minuten lang mit 10%igem Humanserum inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Primärantikörper an die Fc-Rezeptoren zu verhindern. Die Primärantikörper wurden als Hybridomkulturüberstände bzw. in gereinigter Form in geeigneten Arbeitskonzentrationen für eine Stunde auf den Gewebeschnitten inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1xPBS pH 7,4 wurden die Präparate mit einem Peroxidase-gekoppelten Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin, das sowohl monoklonale Mausantikörper vom IgG- als auch vom IgM-Isotyp erkennt, in der Verdünnung 1:200 für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen der Präparate mit 1xPBS pH 7,4 erfolgte die Entwicklung der Peroxidase für 7 Minuten in 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und dem Chromogen 3-Amino-9-Ethylkarbazol, (0,25mg/ml 3-Amino-9-Ethylkarbazol gelöst in 5 ml N,N-Dimethylformamid), durch dessen Oxidation ein rotbraunes Reaktionsprodukt entsteht. Die Präparate wurden kurz in Leitungswasser getaucht, anschließend zur Darstellung der Zellkerne für 20 Sekunden in Mayers Hämalaunlösung gefärbt, für 10 Minuten in Leitungswasser gebläut und mit Kaisers Glyzeringelatine eingedeckt. Die Inkubation der Sphäroidschnitte mit dem Primär- bzw. dem Sekundärantikörper erfolgte in einer feuchten Kammer. Der gesamte Färbeprozess wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Evaluierung der gefärbten Präparate erfolgte semiquantitativ im Lichtmikroskop (Axiovert 10, Zeiss, Jena). Die Färbung wurde nur dann ausgewertet, wenn die entsprechenden Isotypkontroll-Antikörper keine Reaktion auf den Präparaten zeigten. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn für den jeweiligen Antikörper eine spezifisch gefärbte Zelle auf dem Präparat nachweisbar war. Der Anteil der mit dem jeweiligen Antikörper positiv gefärbten Epithelzellen wurde semiquantitativ evaluiert. Dabei wurden sowohl die Areale mit stark als auch schwach reaktiven Zellen berücksichtigt. Auf eine getrennte Darstellung der Graduierung der Immunreaktivität wurde jedoch verzichtet, da methodisch bedingte Intensitätsunterschiede möglich sind.

**Substratlösung:**

0,25 mg/ml 3-Amino-9-Ethylkarbazol (gelöst in 5ml N,N-Dimethylformamid)

0,1 M Natriumazetatpuffer pH 4,9

0,003 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.8.4. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Mit der indirekten Immunfluoreszenzfärbung und der Durchflusszytometrie wurde nach standardisierten Versuchsprotokollen die Oberflächenexpression der Zelladhäsionsmoleküle bewertet und quantifiziert. Hierfür wurden die Monolayer- und Sphäroidkulturen mit 1mmol/L EDTA, pH 7,2 bei 37°C behandelt. Die Zellsuspension wurde auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro Versuchsprobe eingestellt und permanent während des Färbens auf Eis gekühlt, um ein „capping“ bzw. „patching“ der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurden die Präparate 20 Minuten lang mit 10% Kaninchenserum inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu verhindern. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit dem primären monoklonalen Antikörper für eine Stunde inkubiert und danach zweimal mit PBS (pH 7,1) gewaschen. Anschließend wurde der FITC-markierte Kaninchen-anti-Maus-Antikörper in einer 1:50 Verdünnung mit PBS, 10% fetalem Kälberserum und 0.1%  $\text{NaN}_3$  für 30 Minuten hinzugegeben. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und hinterher in 1ml PBS (pH 7,2) in Lösung gebracht, bevor sie mit 0,5 mg/ml Propidium Iodid für zehn Minuten gegengefärbt wurden, um tote Zellen zu markieren.

Mit dem FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) wurden 15000 unfixierte Zellen pro Probe gemessen. Die Analyse erfolgte mit dem Cellquest Version 3.2.1.fts Software-Programm (Becton Dickinson). Für jeden Antikörper wurde der Anteil der positiv gefärbten Zellen ermittelt und die Intensität der Färbung durch den korrigierten „mean channel“ MC-Wert angegeben. Der  $\Delta$  MC-Wert repräsentiert den Unterschied zwischen dem korrigierten MC-Wert der spezifischen Antikörperfärbung in 2D und 3D Kultur. Die statistische Signifikanz der unterschiedlichen Antigenexpression wurde mit dem Student „t“ Test berechnet. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Charakterisierung des Patientinnenkollektivs

Zunächst wurde das Verteilungsmuster etablierter klinisch-pathologischer Faktoren im vorgestellten Kollektiv (n=34) von Mammakarzinom-Patientinnen dargestellt. Um tatsächlich eine Aussage über die „minimal residuale Tumorerkrankung“ treffen zu können, wurden ausschließlich lokal kurativ operierte Patientinnen (R0) ohne nachweisbare Fernmetastasen (M0) in die Studie eingeschlossen. Die erhobenen Patienten- und Tumor bezogenen Daten wurden in obligate und fakultative Parameter gegliedert und sind in den **Tabellen 1** und **2** dargestellt.

**Tabelle 1** Obligat erhobene Parameter

<b>Variable</b>	<b>n=</b>	<b>%</b>	
<b><u>Alter</u></b>	≤ 50	12	35,3
	> 50	22	64,7
<b><u>pT –Stadium</u></b>	pTis–pT–1b	8	23,5
	pT–1c	8	23,5
	pT–2	15	44,1
	pT–3– pT–4	3	8,8
<b><u>pN–Stadium</u></b>	pN 0	19	57,6
	pN 1–3	8	24,2
	pN 4–9	5	15,2
	pN > 9	1	3,0
	pN x <sup>■</sup>	1	—
<b><u>UICC</u></b>	STADIUM 0	3	8,8
	STADIUM I	8	23,5
	STADIUM II A	11	32,4
	STADIUM II B	8	23,5
	STADIUM III A	1	2,9
	STADIUM III B	3	8,8
	STADIUM IV	0	0,0
<b><u>Grading</u><sup>&amp;</sup></b>	G1	5	16,1
	G2	16	51,6
	G3	10	32,3

## Fortsetzung Tabelle 1

<b>Variable</b>		<b>n=</b>	<b>%</b>
<b><u>Histologischer Befund</u></b>	invasiv duktal	10	29,4
	invasiv duktal mit intraduktalem Anteil	18	52,9
	Carcinoma in situ	3	8,8
	andere	3	8,8
<b><u>ÖR-Status</u>*</b>	positiv	21	67,7
	negativ	10	32,3
<b><u>PR-Status</u>*</b>	positiv	22	71,0
	negativ	9	29,0

- Legende:**    **n** : Anzahl der Patientinnen  
 \* : Diese Werte sind nicht von allen Patientinnen verfügbar  
 ■ : Eine Patientin war nach der UICC von 1997 als pN<sub>x</sub> zu klassifizieren und wurde deshalb in den Auswertungen des Nodalstatus nicht berücksichtigt  
 & : Drei weitere Patientinnen hatten ein Carcinoma in situ  
 ÖR: Östrogenrezeptor  
 PR: Progesteronrezeptor



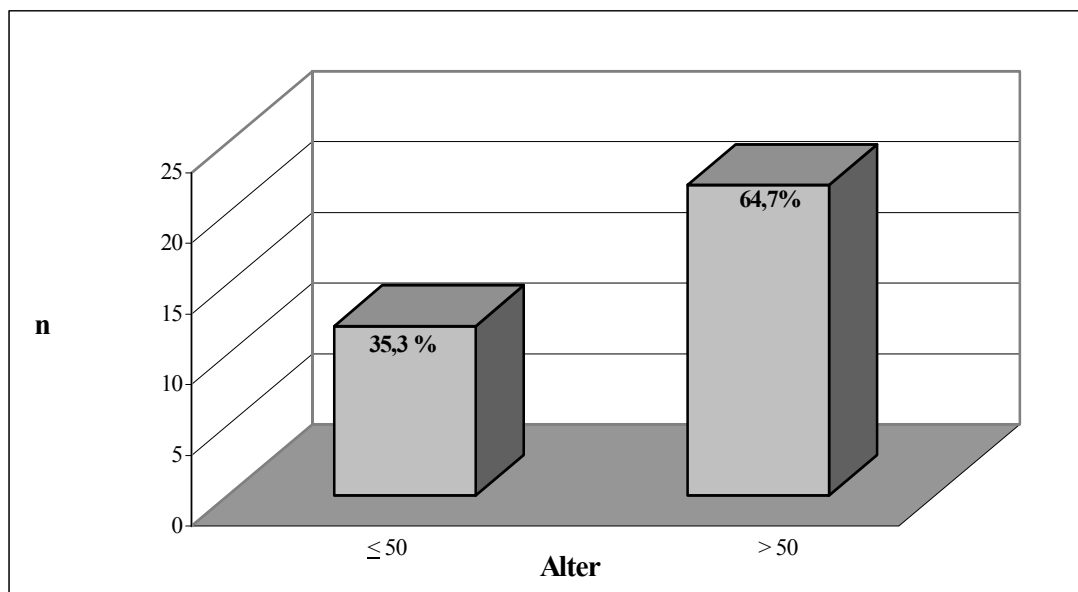
Tabelle 2 Fakultativ erhobene Parameter

Variable		n=	%
<u>CEA</u> *	≤ 3	18	85,7
	> 3	3	14,3
<u>CA-15-3</u> *	≤ 28	19	82,6
	> 28	4	17,4
<u>uPA</u> *	≤ 3	6	40,0
	> 3	9	60,0
<u>PAI-1</u> *	≤ 14	4	26,7
	> 14	11	73,3
<u>HER2-neu</u> *	positiv	1	25,0
	negativ	3	75,0
<u>AB0-Blutgruppen</u> *	0	14	40,6
	A	18	56,3
	B	0	0
	AB	1	3,1
<u>Rhesusfaktor</u> *	Rh +	24	75,0
	Rh -	8	25,0

**Legende:** n : Anzahl der Patientinnen

\* : Diese Werte sind nicht von allen Patientinnen verfügbar

■ : Eine Patientin war nach der UICC von 1997 als pN<sub>x</sub> zu klassifizieren und wurde deshalb in den Auswertungen des Nodalstatus nicht berücksichtigt

**Abb. 1. Altersverteilung der CK18-positiven Patientinnen**

**Legende:** n : Anzahl der Patientinnen

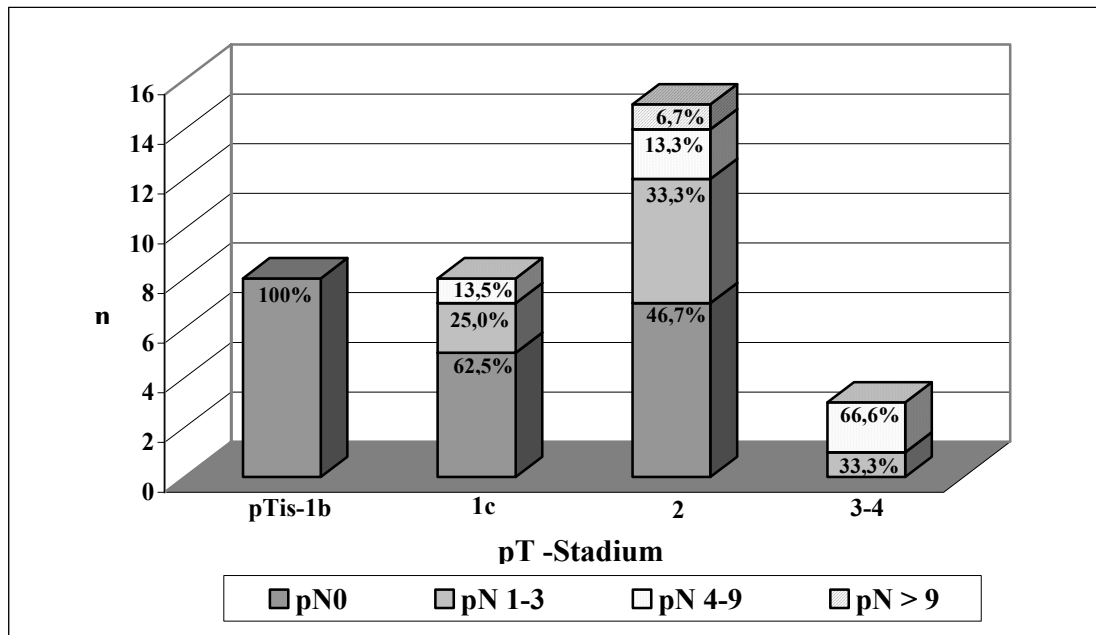
Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug 56,7 Jahre. Die Jüngste war 32 Jahre und die älteste 83 Jahre alt. Insgesamt waren n=12 (35,3%) der Patientinnen bis einschließlich 50 Jahre alt und n=22 (64,7%) der Patientinnen waren älter als 50 Jahre (**Abb. 1**).

## 5.2. Analyse der Tumorgröße im Verhältnis des Lymphknotenstatus

Bei Analyse der pT–Stadien, denen die Tumorgröße nach Messung der invasiven Komponente zugrunde lag, wurden Tumore mit einer Infiltrationstiefe von bis zu 1 cm (pTis–pT1b) bei 8/34 (23,5%) Patientinnen festgestellt. Die Gruppe der Patientinnen des Stadiums pT1c ( $> 1,0$  cm aber  $\leq 2$  cm) war ebenfalls mit 8/34 (23,5%) vertreten, gefolgt von der größten Patientinnengruppe des Tumorstadiums pT2 ( $> 2$  cm  $\leq 5$  cm) mit 15/34 (44,1%) Patientinnen. Eine Tumorausdehnung von mehr als 5 cm (pT 3) oder ein Tumor beliebiger Größenausdehnung bzw. mit einer Infiltration von Haut oder Brustwand (pT 4) kam, zusammengefasst, (pT3 – pT4) bei 3/34 (8,8%) der betroffenen Patientinnen vor.

Auffällig ist der große Anteil der Patientinnen des Stadiums pT2 mit einem Tumordurchmesser größer 2 cm. Es muss hierbei jedoch das Kriterium der CK–18 Positivität in der Vorauswahl des Patientinnenkollektivs berücksichtigt werden, da bei größeren Tumoren der Knochenmarkstatus tendenziell häufiger positiv ist (31).

Eine Patientin war nach UICC 1997 ( siehe Anhang ) als pN<sub>x</sub> zu klassifizieren und ging daher nicht in die Subkollektive des Nodalstatus ein.

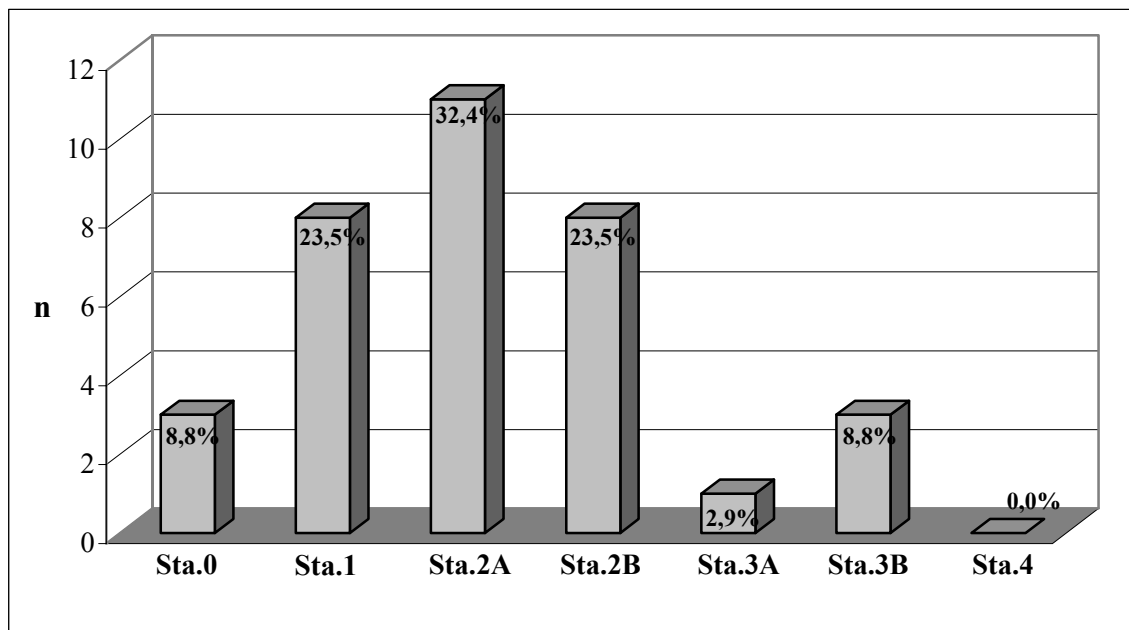
**Abb. 2. Lymphknotenstatus im Verhältnis zur Tumorgröße**

**Legende:** n : Anzahl der Patientinnen

Im Diagramm ist der Lymphknotenstatus im Verhältnis zur Tumorgröße wiedergegeben.

Aus großen epidemiologischen Studien ist bekannt, dass nicht allein der positive Lymphknotenstatus, sondern auch die Anzahl der infiltrierten Lymphknoten prognostisch relevant ist (16, 74, 102). In dem gesamten Patientinnenkollektiv waren bei 19/34 Patientinnen (57,6%) die axillären Lymphknoten tumorfrei, und bei 14 Patientinnen (42,4%) ließ sich ein Befall der Lymphknoten nachweisen. Bei der Mehrzahl der nodalpositiven Patientinnen 8/14 (57,1%) waren ein bis drei Lymphknoten infiltriert. Bei 5/14 (35,7%) der nodalpositiven Patientinnen waren vier bis neun, und bei 1/14 (7,1%) der Patientinnen gab es mehr als neun positive axilläre Lymphknoten.

Während alle Patientinnen mit einer Tumorgröße bis zum Stadium pT1b nodalnegativ waren, gab es bei den Patientinnen mit einem Primärtumor des Stadiums pT1c (n=8) fünf Nodalnegative, zwei Patientinnen mit 1–3, und eine Patientin mit 4–9 positiven Lymphknoten. Im Stadium pT2 waren trotz der Größe des Primärtumors die meisten Patientinnen 7/15 (46,7%) nodalnegativ oder gehörten der Gruppe mit 1–3 positiven Lymphknoten an 5/15 (33,3%). Des weiteren gab es zwei Patientinnen mit 4–9 und eine Patientin mit mehr als 9 positiven Lymphknoten. Bei zwei der drei Patientinnen mit Primärtumoren von mehr als fünf Zentimeter Durchmesser waren 4–9, und bei einer Patientin mehr als neun Lymphknoten tumorinfiltriert (**Abb. 2.**).

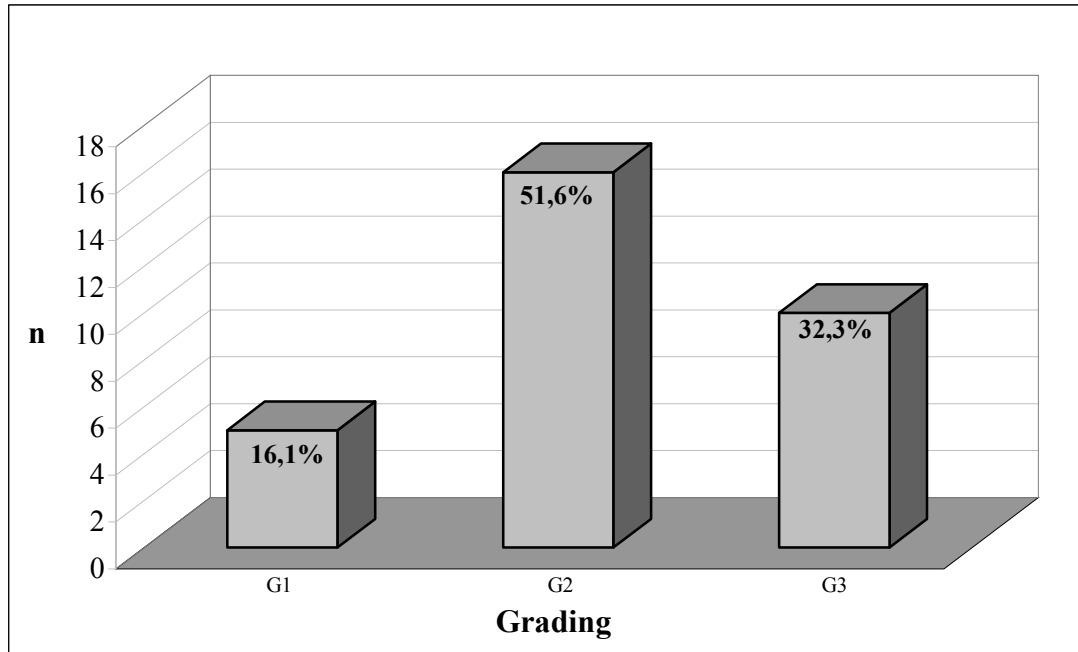
**Abb. 3. UICC – Klassifikation**

**Legende:** n : Anzahl der Patientinnen

In diesem Patientinnenkollektiv wurden 34 Mammakarzinom-Patientinnen nach der UICC Klassifikation von 1997 dargestellt (**Abb. 3**).

### 5.3. Histopathologische Differenzierung des Primärtumors

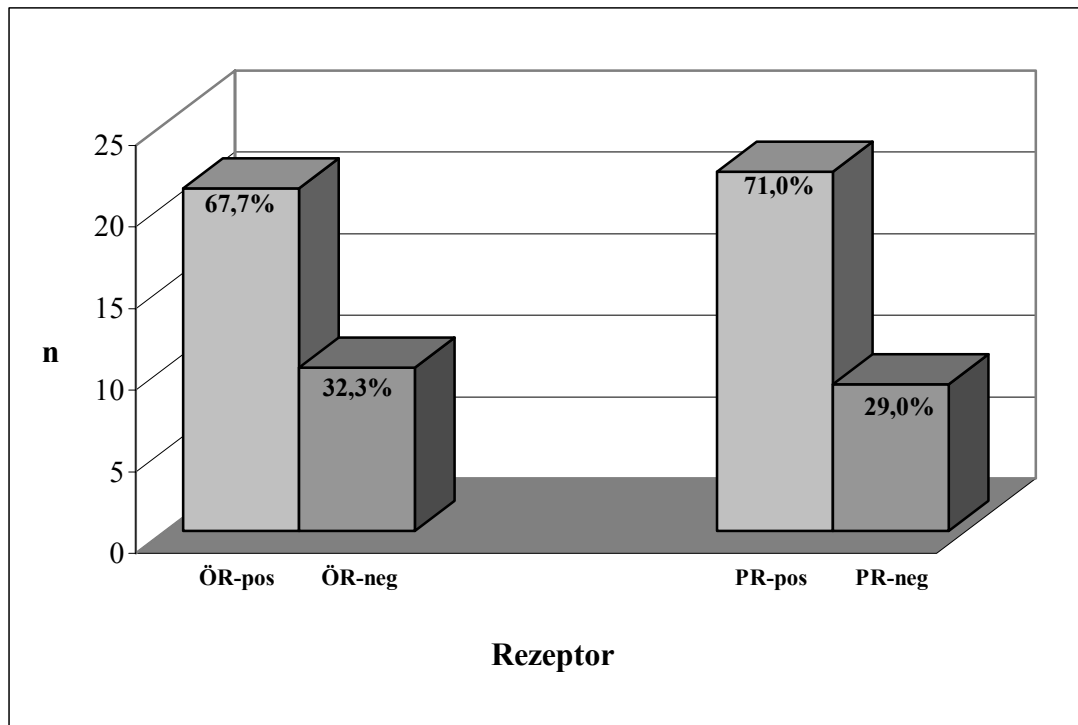
Abb. 4. Grading



**Legende:** n : Anzahl der Patientinnen

Dem histopathologischen Grading zur Beurteilung des Differenzierungsgrades invasiver Mammakarzinome liegt die Klassifikation nach Bloom und Richardson in der Modifikation nach Elston und Ellis nach histo- und zytologischen Kriterien zugrunde (5, 28). Einen gut differenzierten Primärtumor (G1) hatten 5/31 (16,1%) der Patientinnen, als mäßig differenziert (G2) wurden 16/31 (51,6%) und als schlecht differenziert (G3) 10/31 (32,3%) der Primärtumore klassifiziert. Bei drei weiteren Patientinnen lag ein Carcinoma in situ vor, so dass definitionsgemäß das Grading nicht bestimmt werden konnte (**Abb. 4**).

Der histologische Tumortyp des invasivduktalen Mammakarzinoms wurde bei 10/34 (29,4%) und ein invasivduktales Karzinom mit intraduktalen Anteilen unterschiedlichen Ausmaßes bei 18/34 (52,9%) der Patientinnen diagnostiziert. Bei 3/34 (8,8%) der Patientinnen lag ein Karzinom in situ vor, also ein Tumortyp, der durch den fehlenden Nachweis einer Stromainvasion gekennzeichnet ist. Bei weiteren 3/34 (8,8%) der Patientinnen, die in der Gruppe „andere“ zusammengefasst wurden, handelt es sich um ein invasivduktales Karzinom mit papillär-zystischen Anteilen, ein tubuläres nicht weiter klassifizierbares Karzinom und ein lobuläres Karzinom.

**Abb. 5. Hormon-Rezeptorstatus**

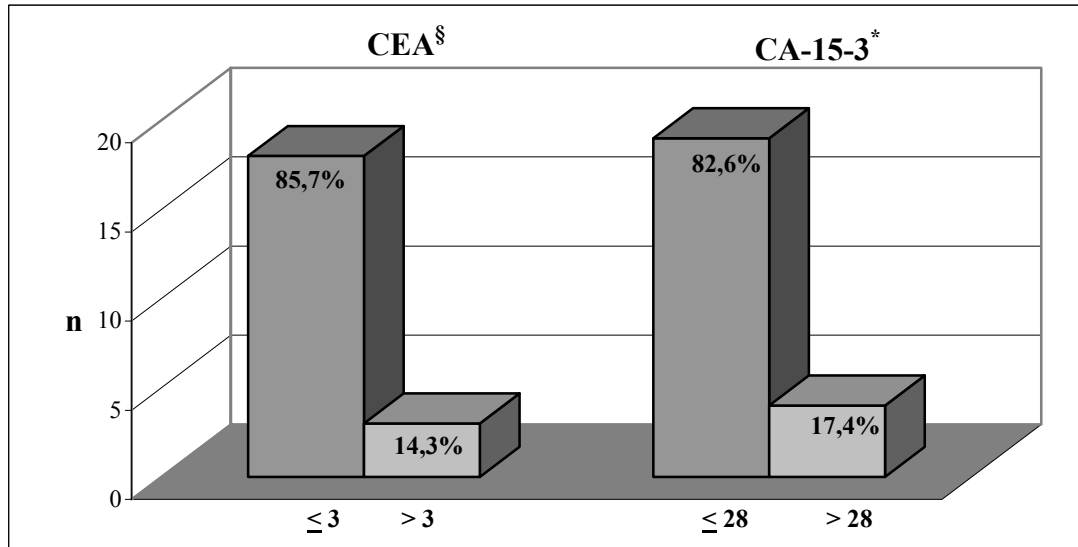
**Legende:** n : Anzahl der Patientinnen  
 ÖR : Östrogenrezeptor  
 PR : Progesteronrezeptor

Die Bestimmung der Steroidhormonrezeptoren hat erhebliche Bedeutung für die weitere Therapieplanung und die Prognose der Patientinnen erlangt. Bei nodalnegativen Patientinnen scheint dem Östrogenrezeptorstatus, bei nodalpositiven Patientinnen dem Progesteronrezeptorstatus die größere prognostische Bedeutung zuzukommen, wenngleich ihre prognostische Vorhersagekraft mit der Dauer der Nachbeobachtungszeit abnimmt (48). In diesem Kollektiv hatten 21/31 (67,7%) der Patientinnen einen positiven Östrogenrezeptorstatus und 22/31 (71,0%) einen positiven Progesteronrezeptorstatus. Bei den drei Patientinnen mit einem Carcinoma in situ war eine Östrogen- oder Progesteronrezeptor-Bestimmung mangels Material nicht möglich (Abb. 5).

Im weiteren wird auf die fakultativ erhobenen Parameter eingegangen.

## 5.4. Tumormarker und Proteolysefaktoren

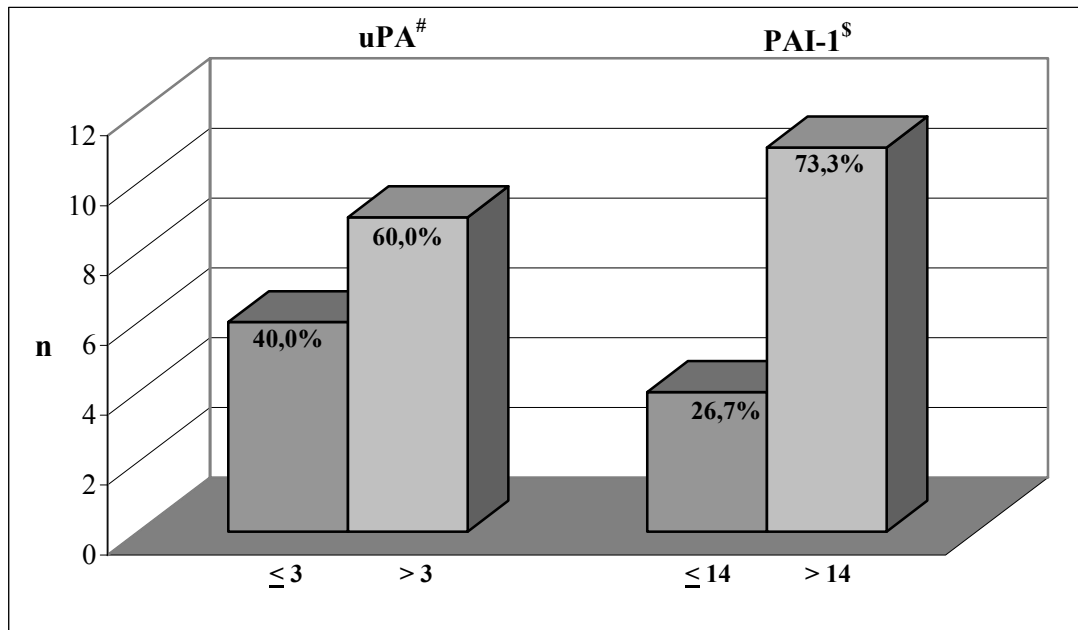
Abb. 6. Tumormarker



**Legende:** n : Anzahl der Patientinnen  
 \* : U/ml  
 § : ng/ml

Ein kontinuierlicher Anstieg der Tumormarker CEA und insbesondere CA-15-3 hat nach derzeitigem Kenntnisstand, während einer symptomfreien Nachsorgeperiode, einen prädiktiven Wert von ca. 80% für eine spätere klinische Tumorprogression. Gegenwärtig wird in einer Studie des Tumorzentrums München geklärt, ob durch die regelmäßige Bestimmung dieser beiden Tumormarker und der auf einem Markeranstieg basierenden frühzeitigen therapeutischen Intervention die Zeit bis zur klinisch manifesten Progression und gegebenenfalls auch die Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen verlängert werden kann (102). In der vorliegenden Untersuchung wurden CEA und CA-15-3 bei einem Teil der Patientinnen (21/34 bzw. 23/34) einmalig präoperativ als Vergleichswert für die Nachsorgeuntersuchungen bestimmt und waren bei 3/21 (14,3%) bzw. 4/23 (17,4%) der Patientinnen erhöht. Da erst seit etwa 1992 routinemäßig bei allen Patientinnen mit Mammakarzinom die Tumormarker CEA und CA-15-3 bestimmt wurden, sind die Daten dieser Parameter nicht vollständig (**Abb. 6**).



**Abb. 7. Tumorassoziierte Proteolysefaktoren**

**Legende:** n : Anzahl der Patientinnen  
 # : ng/mg  
 s : ng/mg

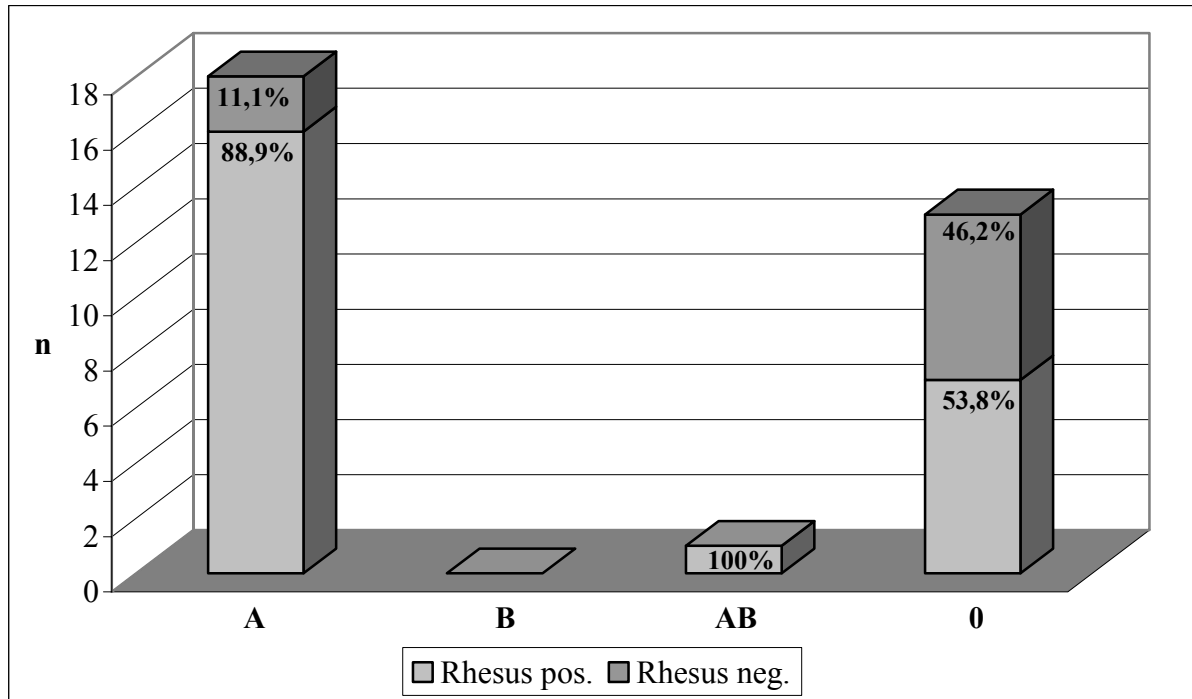
Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und sein Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) sind tumorassoziierte Proteolysefaktoren, die ebenso wie der Knochenmarkstatus als neue tumorbiologische Faktoren Eingang in die klinische Routinediagnostik finden könnten (96).

Von verschiedenen internationalen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass hohe Konzentrationen von uPA und / oder PAI-1 im Primärtumor mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung und einem kürzeren Gesamtüberleben einhergehen (97). Die Bestimmung dieser beiden Proteolysefaktoren mittels standardisierter ELISA-Technik im Tumorgewebeextrakt erfolgte für uPA bei 15 und für PAI-1 bei 16 Patientinnen des hier vorgestellten Kollektivs. Von diesen Patientinnen hatten 9/15 (60,0%) erhöhte uPA-Werte im Primärtumor, bei 11/15 (73,3%) wurden erhöhte PAI-1-Konzentrationen festgestellt (**Abb. 7**).

Untersuchungen zur Her2-neu-Antigenexpression des Primärtumors lagen nur bei vier Patientinnen vor, so dass hierzu keine weiteren Aussagen möglich waren.

## 5.5. Blutgruppen Differenzierung des Patientinnenkollektivs

Abb. 8. AB0–Blutgruppe und Rhesusfaktor



**Legende:** n : Anzahl der Patientinnen

Präoperativ wurden routinemäßig die Blutgruppe und der Rhesusfaktor der Patientinnen bestimmt. Da es in der Literatur Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von Blutgruppenantigenen und der Metastasierungsfähigkeit von Tumoren gibt, wurde das Verteilungsmuster des ABO–Systems und des Rhesusfaktors in die Untersuchung einbezogen (52, 73, 98).

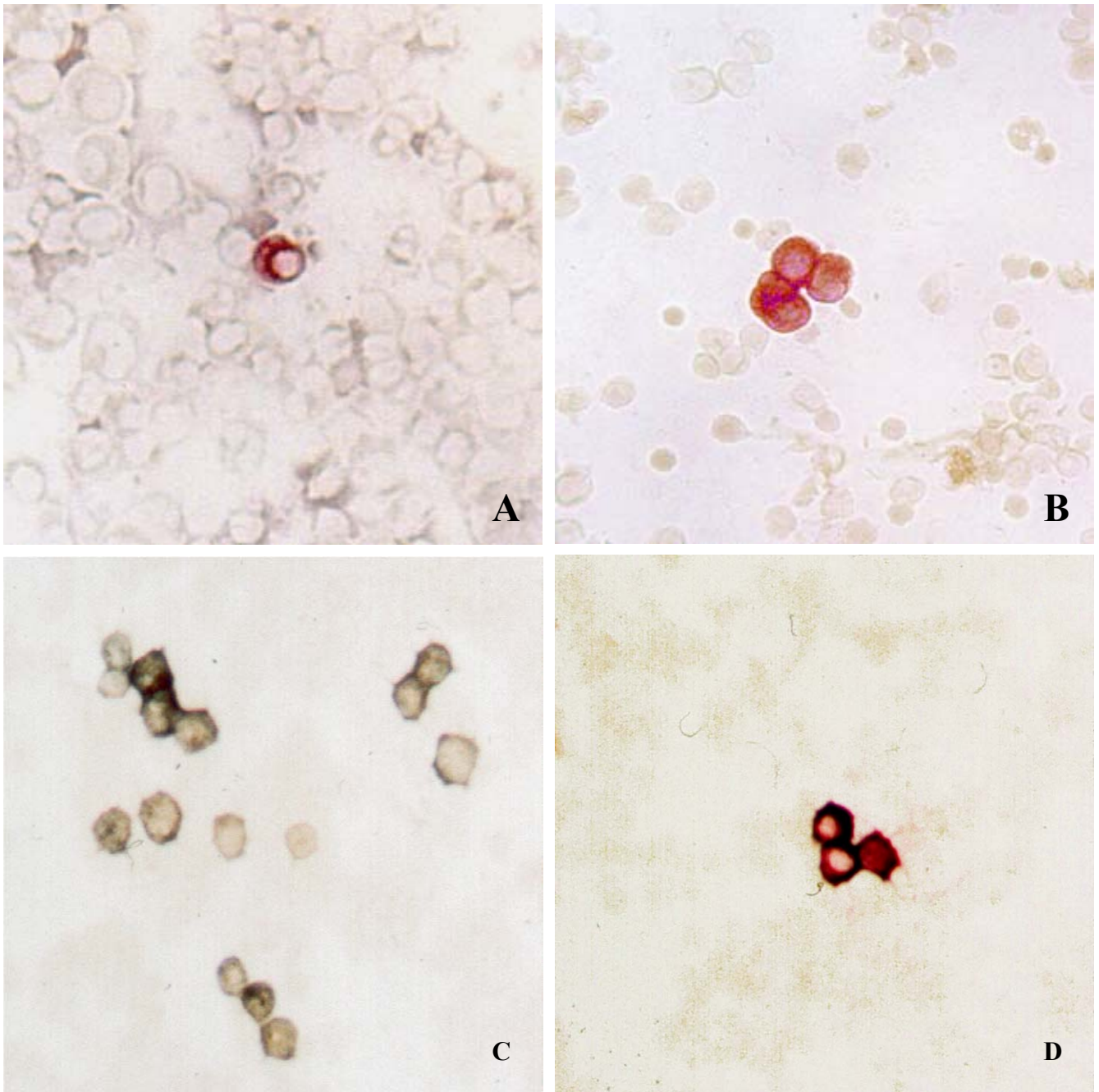
Dabei war die Blutgruppe A mit 18/32 (56,3%) bei den Mammakarzinom–Patientinnen am häufigsten vertreten, gefolgt von der Blutgruppe 0 mit 14/32 (40,6%). Die Blutgruppe AB konnte einmal bestimmt werden. Patientinnen der Blutgruppe B wurden in diesem Patientinnenkollektiv nicht gefunden.

Bei 24/32 (75,0%) Patientinnen war der Rhesusfaktor positiv. 8/32 (25,0%) Mammakarzinom–Patientinnen hatten einen Rhesus D–negativen Phänotyp (**Abb. 8**).

## **5.6. Prävalenz und Disseminationsausmaß epithelialer Zellen im Knochenmark des untersuchten Patientinnenkollektivs**

Bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate wurden die Objektträger sowohl im Primärscreening als auch in der Doppelfärbung nach CK18-positiven Einzelzellen und Zellclustern ausgewertet. Zellcluster wurden definiert als mindestens zwei epitheliale Zellen ohne lichtmikroskopisch erkennbaren interzellulären Zwischenraum. Zu unterscheiden waren zwei Typen von Clustern: Typ I-Cluster aus maximal 10 epithelialen Zellen gebildet und Typ II-Cluster, bestehend aus mehr als 10 epithelialen Zellen (31) (**Abb. 9**).

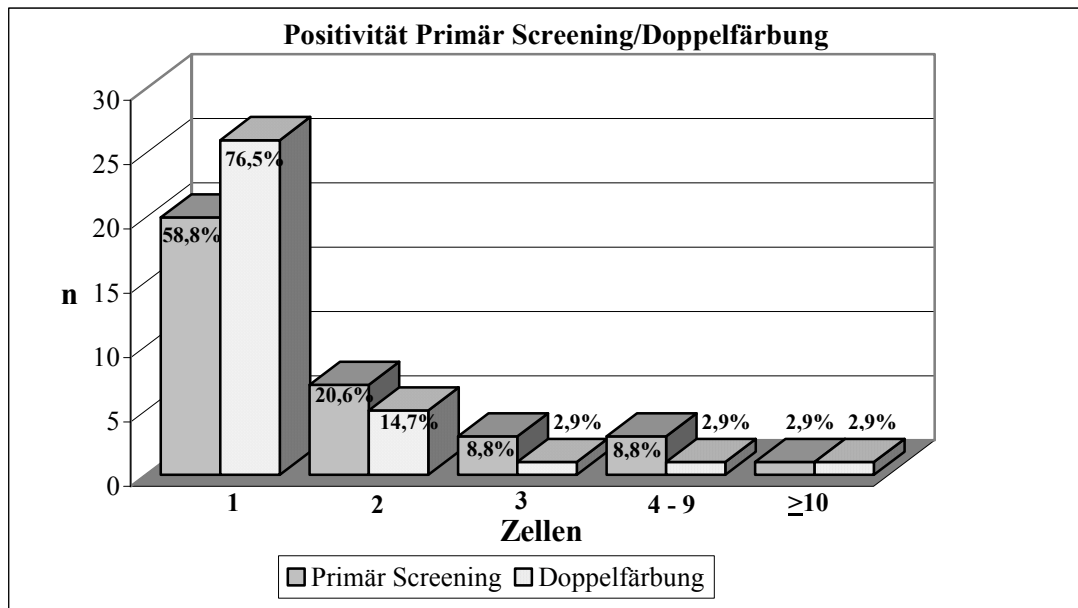
**Abb. 9. CK18-positive Zellen in APAAP und Doppelfärbung**



Nachweis CK18-positiver Zellen (rot) im Knochenmark bei Mammakarzinom-Patientinnen mittels der APAAP-Färbung. Knochenmark-derivierte Zellen sind CK18-negativ (ungefärbt).

- A) CK18-positiv Einzelzelle,
- B) Typ I-Zellcluster bestehend aus fünf CK-18-positiven Zellen,
- C) Ber-EP4-positiv Einzelzellen und Typ I-Zellcluster (Kontrollpräparat),
- D) CK18- und Ber-EP4-positiv Typ I-Zellcluster bestehend aus drei Zellen.

Originalvergrößerung x320.

**Abb. 10. Wiederfindungsrate CK18-positiver Zellen**

**Legende:** n : Anzahl der Patientinnen

Die überwiegende Mehrzahl der Mammakarzinom-Patientinnen hatte sowohl im Primärscreening als auch in der Doppelfärbung einen auf nur einer Zelle basierenden CK18-positiven Knochenmarksstatus.

Im Primärscreening wurden bei 20/34 Patientinnen eine und bei 7/34 zwei CK18-positiv Zellen gefunden. 3/34 Mammakarzinom-Patientinnen hatten drei CK18-positiv Zellen, und bei weiteren drei Patientinnen konnten vier bis neun positive Zellen nachgewiesen werden. Bei einer Patientin wurde im Primärscreening ein mehr als zehn CK18-positiv Zellen enthaltener Typ II-Zellcluster gefunden.

In der Doppelfärbung kamen bei 26/34 Patientinnen eine, und bei 5/34 zwei CK18-positiv Zellen vor. Drei positive Zellen wurden in der Doppelfärbung einmal gefunden, sie lagen in Form eines CK18 und EP4 doppelt positiven Typ I-Zellcluster vor. Dies entspricht einem Anteil von 2,9% von sowohl CK18- als auch Ber-EP4-positiv Patientinnen.

Vier bis neun CK18-positiv Zellen bzw. mehr als zehn CK18-positiv Zellen wurden in der Doppelfärbung jeweils nur einmal gefunden. (**Abb. 10**).

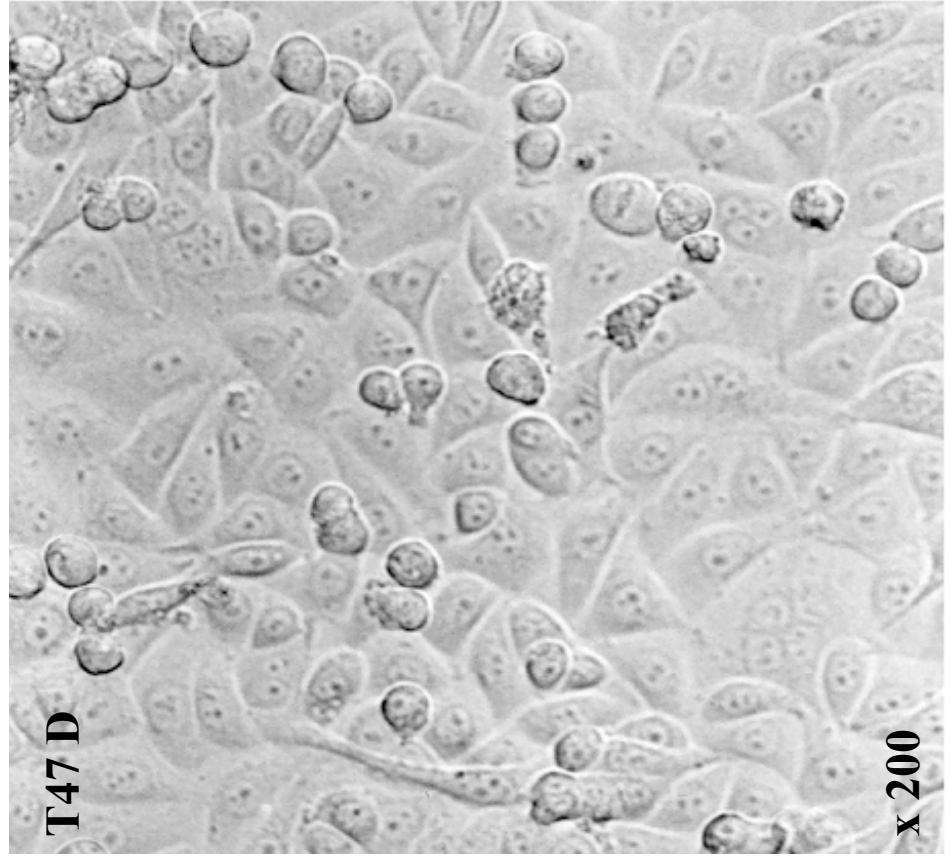
## 5.7. Ep-CAM-Expression in präklinischen *in vitro*-Modellen

Der klinische Befund, dass Ep-CAM nur selten auf epithelialen Einzelzellen im Knochenmark nachweisbar ist, legte die Vermutung nahe, dass die Ep-CAM-Expression möglicherweise in Abhängigkeit von der Zelldichte bzw. der Anordnung der Zellen im dreidimensionalen Zellverband reguliert wird. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde das Ausmaß der Ep-CAM-Expression *in vitro* vergleichend im konventionellen Monolayermodell und im dreidimensionalen Sphäroidmodell untersucht.

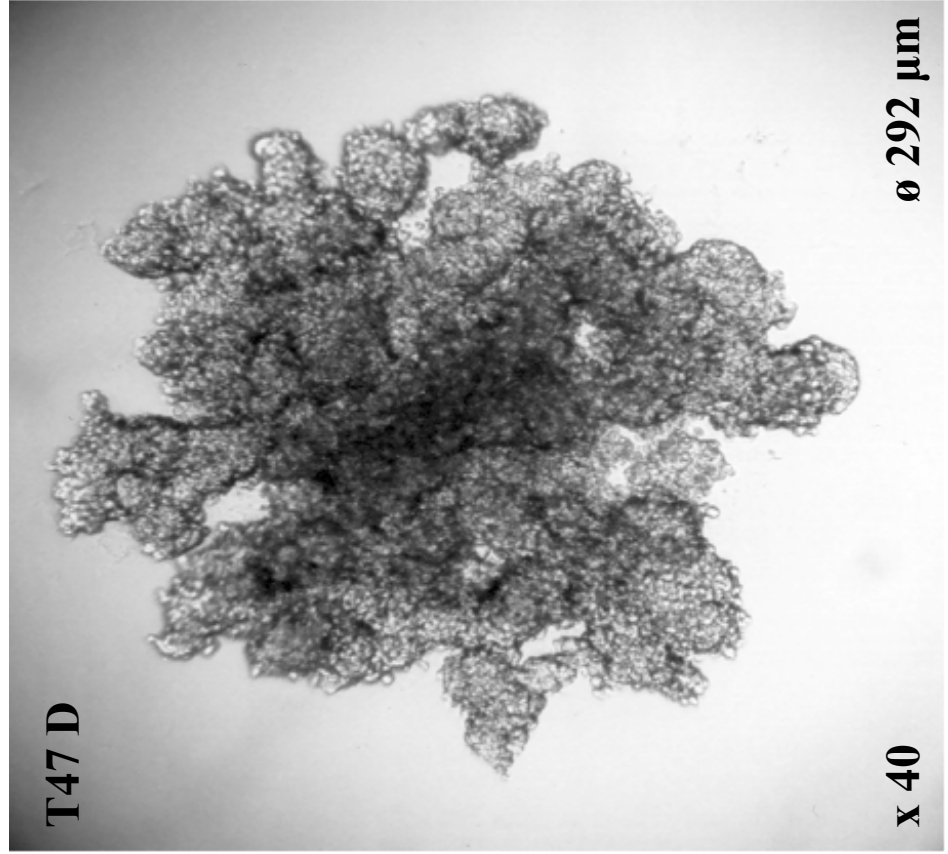
Ausgehend von den vier permanenten humanen Mammakarzinom-Zelllinien T47D, MCF-7, SK-BR-3 und BT-20 wurde zunächst das multizelluläre Tumorsphäroidmodell *in vitro* etabliert. Hierfür wurde die konventionelle „liquid overlay“-Technik verwendet. Ausgehend von einer konfluenten Monolayerkultur (**Abb. 11**) bildeten die vier getesteten Karzinomzelllinien bei einer Zellzahl von jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen und standardisierten Kulturbedingungen multizelluläre Sphäroide, die sich in ihrer Form und Kompaktheit unterschieden (**Abb. 12**). Die dreidimensionale Anordnung der Karzinomzellen ging außerdem mit der Entstehung einer Reihe tumorbiologisch relevanter Eigenschaften einher, die für das humane Mammakarzinom charakteristisch sind. So ging aus histomorphologischen Untersuchungen hervor, dass durch die dreidimensionale Kultur der Karzinomzelllinien die originäre Tumordifferenzierung reinduziert werden kann. Vergleichende Analysen mit den korrespondierenden Monolayerkulturen ergaben, dass die morphologische und funktionelle Differenzierung ausschließlich im Sphäroidmodell detektierbar war. Beispielsweise zeigten MCF-7-Sphäroide entsprechend ihres Ursprungstumors eine drüsige Anordnung der Karzinomzellen, die mit einer luminalen Muzinsekretion einherging. Entsprechend dokumentierten SK-BR-3-Sphäroide ihre Abstammung von einem undifferenzierten Mammakarzinom durch die Anordnung der Zellen in einer unstrukturierten Tumorarchitektur (**Abb. 13**).

**Abb. 11. Präklinische *in vitro*-Modelle**

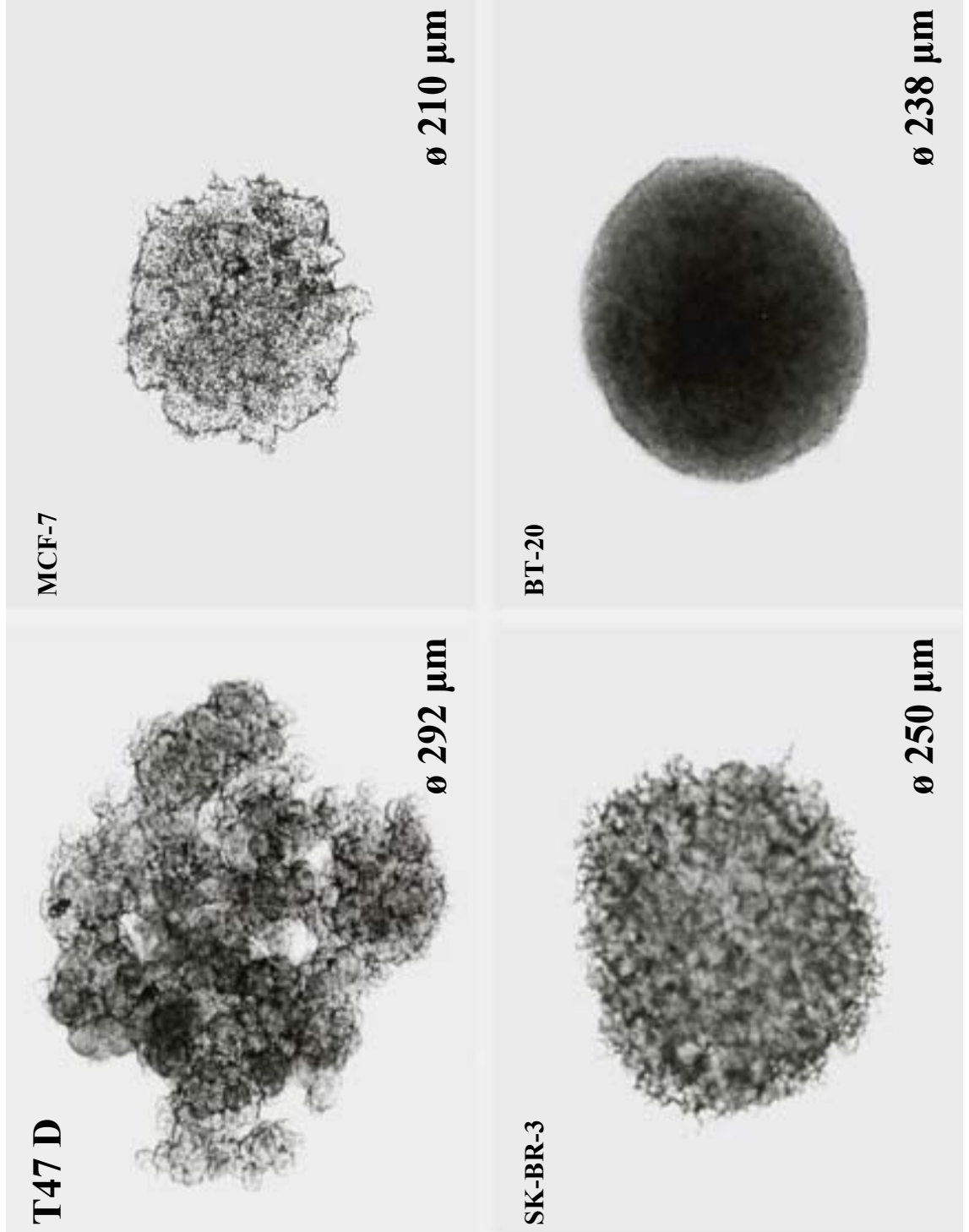
**Monolayerkultur**



**Sphäroidkultur (48h)**



**Abb. 12. Dreidimensionales Tumorstadium *in vitro***

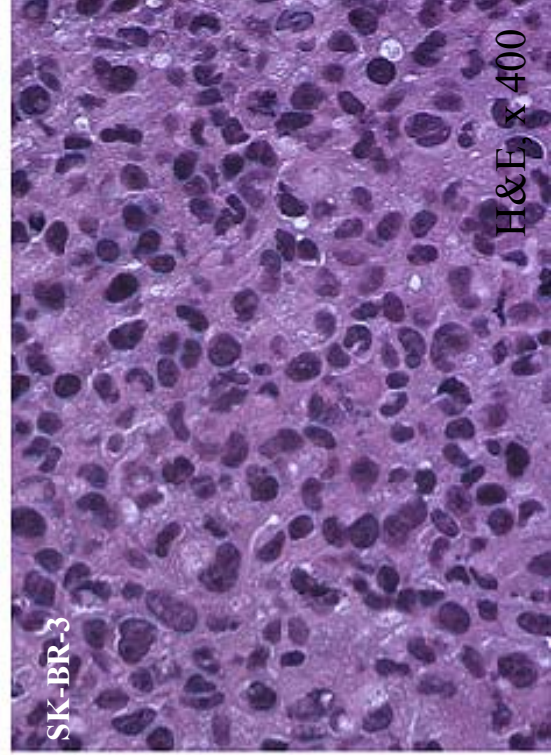
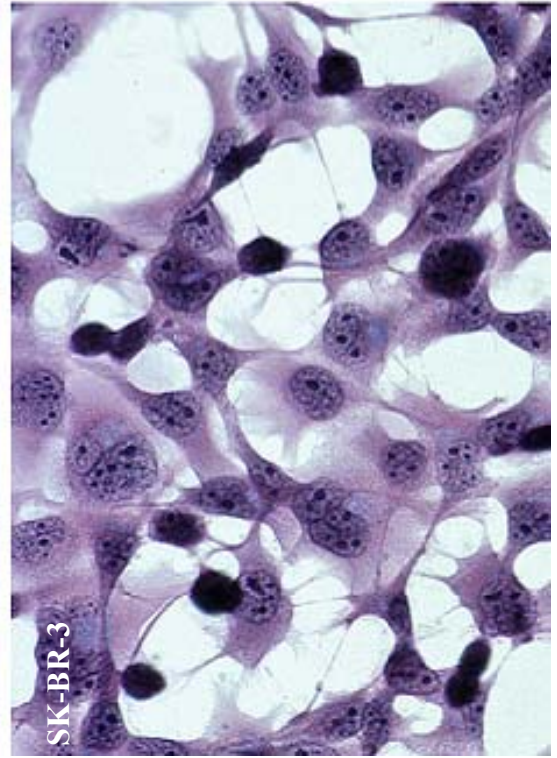
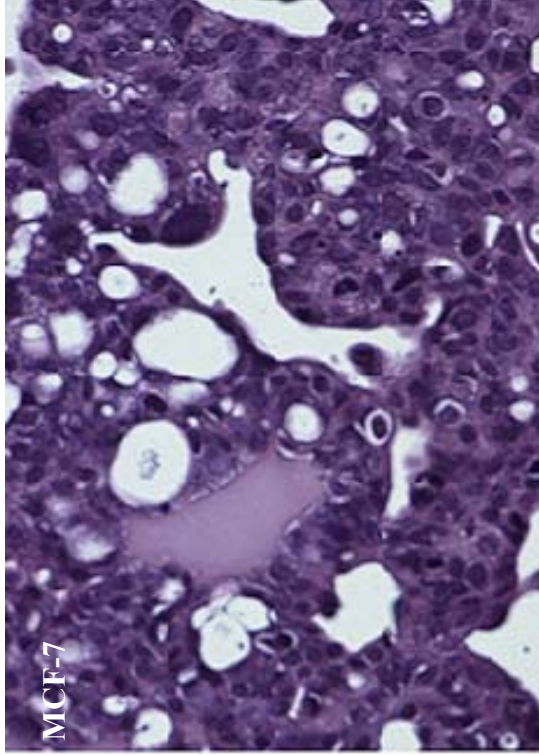
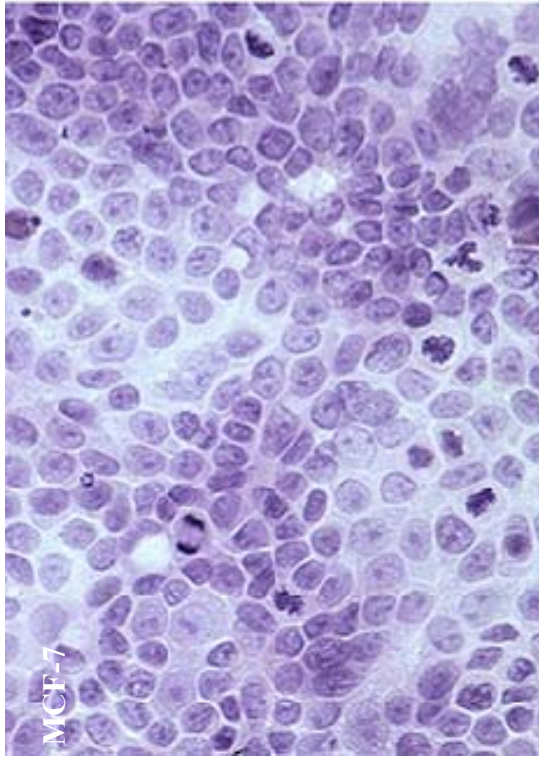




**Abb. 13. Morphologische und funktionelle Tumordifferenzierung**

**Monolayerkultur**

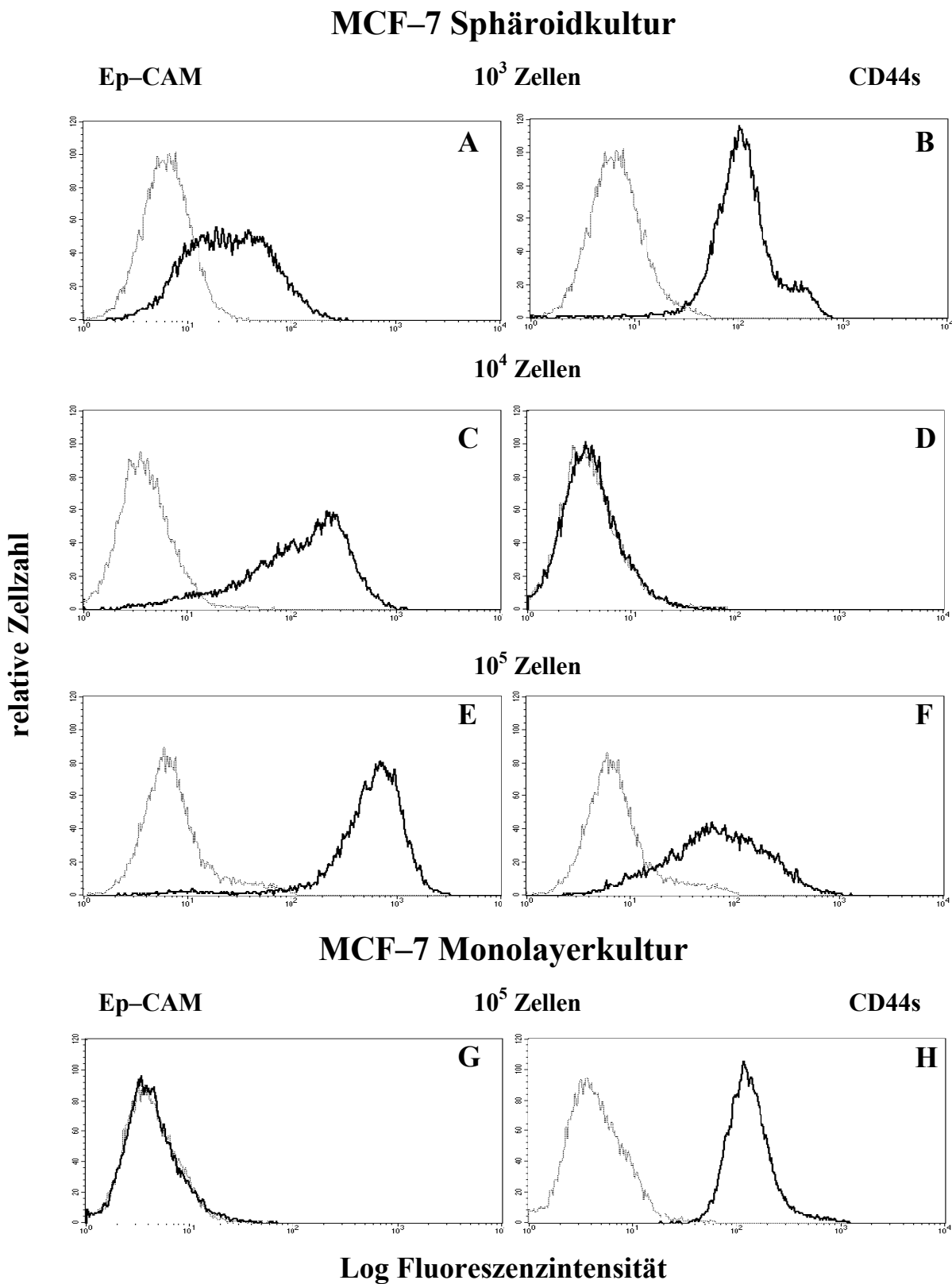
**Sphäroidkultur (48h)**



Diese Befunde identifizierten das multizelluläre Sphäroidmodell, nicht jedoch das klassische Monolayermodell, als ein *in vivo* nahes Testsystem, das wesentliche klinisch-pathologische Eigenschaften der humanen Karzinome reflektiert und sich deshalb für regulatorische Analysen besonders eignet.

Die Untersuchungen zum Ausmaß der Ep-CAM-Expression im multizellulären Sphäroidmodell ergaben, dass primär die dreidimensionale Anordnung der Karzinomzellen, aber auch die Zelldichte einen stimulierenden Einfluss auf die Ep-CAM-Expression ausüben. Am Beispiel der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 konnte gezeigt werden, dass Monolayerzellen auch bei hoher Zelldichte Ep-CAM-negativ waren. Im Gegensatz dazu wurde durch die 3D-Kultur der Tumorzellen die Expression von Ep-CAM stimuliert. Dabei zeigten kleine Sphäroide mit einer geringeren Zelldichte eine schwächere Ep-CAM-Expression als größere Sphäroide mit einer höheren Zelldichte (**Abb. 14**).

Abb. 14. Regulation der Ep-CAM-Expression

**Legende:**

Regulation der Ep-CAM-Expression in Abhängigkeit von der Zellzahl und den Zellkulturbedingungen. Die hellen Kurven repräsentieren die jeweiligen Isotyp-Kontrollen  
Die dunklen Kurven repräsentieren die Expression von Ep-CAM (A,C,E,G)  
bzw. als Kontrolle CD44s (B,D,F,H).

## 6. Diskussion

Die Mehrzahl aller Krebsneuerkrankungen sowie der malignombedingten Todesfälle in den westlichen Industrienationen wird durch maligne epitheliale Tumoren verursacht. Obwohl immer mehr Patientinnen auf Grund einer früheren Diagnosestellung viel früher kurativ operiert werden können, haben sich die Mortalitätsraten nicht signifikant geändert. Trotz radikaler lokoregionaler Therapieverfahren und fehlendem Nachweis einer Disseminierung von Tumorzellen durch konventionelle diagnostische Verfahren (Radiologie, Nuklearmedizin) zum Zeitpunkt der Primäroperation entwickeln 50% der Patientinnen mit epithelialen Malignomen innerhalb von 5 Jahren Fernmetastasen (76).

Bei Patientinnen, die an einem primären Mammakarzinom erkranken, ist in 92% der Fälle bei Diagnosestellung mit konventionellen Methoden keine Metastasierung nachweisbar, dennoch erleiden zwischen 25–30% der nodalnegativen Patientinnen und 42–53% der nodalpositiven Patientinnen innerhalb von 10 Jahren eine Progression der Erkrankung (24, 25, 26, 27). Dies ist am ehesten auf eine frühzeitige okkulte Tumorzell-dissemination zurückzuführen (82,110), welche mit konventionellen histopathologischen Verfahren sowie bildgebenden Stagingmodalitäten nicht nachzuweisen sind (91). Durch die Entwicklung und Einführung von spezifischen monoklonalen Antikörpern in die immunhistochemische und immunzytologische Diagnostik wurde die Erkennung disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark oder Lymphknoten möglich. Für das Auftreten von einzelnen oder wenigen Tumorzellen im Organismus von Patientinnen mit malignen Tumorerkrankungen nach erfolgreicher Primärtherapie wurde der Begriff „minimal-residual-disease“ (MRD) geprägt, der seit 1993 als optionaler Faktor unter dem Terminus M1<sub>(i)</sub> in die TNM-Klassifikation aufgenommen worden ist (46, 54).

Die Indikation zur systemischen adjuvanten Chemotherapie/Hormontherapie nach vollständiger Resektion des Primärtumors und der regionalen Lymphknoten zur Prävention einer Metastasierung erfolgt bisher nach statistisch gewonnenen Prognose-Indizes wie Nodalstatus, Tumorstadium und Grading. Für eine differenzierte Indikationsstellung und ein individuelles Therapiekonzept ist der Nachweis der minimal residualen Tumorerkrankung und das Wissen über das Metastasierungsverhalten von soliden epithelialen Tumoren elementar. Da im Knochenmark ein intensiver Zellaustausch zwischen zirkulierendem Blut und Stroma stattfindet und einige epitheliale Tumoren wie z.B. das Mammakarzinom bevorzugt in das Skelettsystem metastasieren, bietet es sich an, aus diesem leicht zugänglichen Kompartiment Proben auf disseminierte epitheliale Zellen zu untersuchen, da

unter normalen Umständen im Knochenmark keine epithelialen Zellen nachweisbar sind. Des weiteren ist die Gewinnung von Knochenmarkaspiraten aus den Beckenkämmen ungefährlich und komplikationsarm.

Für den Nachweis der disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom hat sich als Standardtechnik die Immunzytologie unter Verwendung der APAAP-Färbetechnik etablieren können (6, 32). Sie erfolgt unter Zuhilfenahme monoklonaler Antikörper, die gegen spezifische Antigene disseminierter epithelialer Zellen gerichtet sind. Die meisten dieser monoklonalen Antikörper, die zum Auffinden epithelialer Zellen benutzt werden, sind gegen Zytokeratinkomponenten – dem Hauptbestandteil des Zytoskeletts epithelialer Zellen – gerichtet (19, 20). Versuchsreihen an peripheren Blut- oder Knochenmarksproben, die mit Tumorzellen kontaminiert worden waren, belegen eine hohe Wiederfindungsrate der Tumorzellen durch immunzytologische Färbemethoden (2–4 Tumorzellen in  $1 \times 10^6$  mononukleären Zellen) (81). Diese Werte liegen deutlich über den Nachweismöglichkeiten der konventionellen Histologie, der Standard-Durchflusszytometrie oder dem Enzymimmunoassay (ELISA) (49). Eine zunehmende Zahl von Publikationen beschäftigt sich mit der Anwendung der PCR-Technik zum Nachweis disseminierter epithelialer Zellen (37, 55). Prinzipiell muss hierbei jedoch unterschieden werden zwischen dem Nachweis von spezifischen Rearrangements, Mutationen auf DNA-Ebene und dem Nachweis von m-RNA tumorassoziierter z.B. (CEA) bzw. gewebsspezifischer Marker (Zytokeratin) durch die „reverse Transkriptase-PCR“ (RT-PCR). Zur Zeit sind falsch positive Befunde das Hauptproblem der RT-PCR, die u.a. durch Amplifikation von Pseudogenen oder durch ektope Expression kleiner Mengen tumorassoziierter m-RNA in Zellen benignen Ursprungs bedingt sind (61). Die Sensitivität der PCR ist nach bisher vorliegenden Daten nicht höher als bei den immunzytologischen Verfahren (76). Durch die PCR-Analyse geht jedoch die Möglichkeit verloren, Morphologie und Phänotyp disseminierter epithelialer Zellen weiter zu charakterisieren.

Auffällig war, dass in dieser Arbeit drei Mammakarzinom-Patientinnen mit einem Duktalen in Situ Karzinom (DCIS) einen positiven Knochenmarkstatus hatten. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es sich bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv um ein Subkollektiv von konsekutiv rekrutierten Mammakarzinom-Patientinnen ( $n=1045$ ) der Chirurgischen Klinik Großhadern aus den Jahren 1993 bis 2002 handelt, in dem die Frequenz von Patientinnen mit einem DCIS und einem positiven Knochenmarkstatus bei 3.5% lag. Die Anzahl der Mammakarzinom-Patientinnen, die an einem DCIS erkrankten, ist innerhalb der vergangenen 20 Jahre durch bessere Diagnostik und Früherkennungsmaßnahmen von etwa

1% auf fast 20% angestiegen (1). Dabei konnte in Studien, die Fallzahlen von 76 bis 223 Patientinnen beinhalten bei unauffälligem Befund in der routinemäßigen histopathologischen Untersuchung der axillären Lymphknoten durch ergänzende immunhistochemische Färbungen in 2–14% eine Infiltration der Sentinel-Lymphknoten nachgewiesen werden (85, 18, 58, 1, 59, 53).

Obwohl die Prognose von Patientinnen mit einem DCIS sehr gut ist, versterben doch durchschnittlich 2,9% der Mammakarzinom-Patientinnen im UICC-Stadium 0 an einer Progression der Erkrankung (1, 69), so dass vermutet werden muss, dass in Einzelfällen bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung invasive Tumorzellen vorhanden sind. Dieser Situation hat die UICC in der Überarbeitung von 1993 durch die Einführung des Stadium pT<sub>mic</sub> Rechnung getragen (103, 104).

Allerdings erleiden nicht alle Patientinnen mit einem positiven Knochenmarkstatus auch eine Progression ihrer Erkrankung. Es scheint also nicht jede disseminierte epitheliale Zelle in der Lage zu sein zu proliferieren und eine Metastase zu bilden. Andererseits wurde auch bei Patientinnen mit einem negativen Knochenmark- und Lymphknotenstatus eine Progression beobachtet. Um diejenigen Mammakarzinom-Patientinnen mit einem positiven Knochenmarkstatus und einem hohen Risiko für eine Progression der Erkrankung herauszufinden, hat daher die Phänotypisierung disseminierter epithelialer Zellen zunehmend an Bedeutung gewonnen und war auch Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Die Phänotypisierung disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark bei minimal residualen Tumorerkrankungen dient der Analyse des Antigenprofils von Tumorzellen in Bezug auf potentielle „Target-Strukturen“, die beispielsweise für den Einsatz therapeutischer Antikörper in der antineoplastischen Therapie geeignet sind, sowie der Entwicklung weiterer unabhängiger Prognosefaktoren. Disseminierte epitheliale Zellen im Knochenmark wurden dafür durch spezifische monoklonale Antikörper mit immunzytochemischen Doppelfärbetechniken phäno- und genotypisch charakterisiert (75). Da disseminierte Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark bei Mammakarzinom-Patientinnen jedoch nur in sehr begrenztem Umfang vorhanden sind, kann mit immunzytologischen Nachweisverfahren nur das Expressionsmuster weniger ausgewählter Antigene analysiert werden (30, 83, 92). Durch den Einsatz immunzytologischer Doppelfärbemethoden wurden disseminierte epitheliale Zellen im Knochenmark bereits auf die Expression von unterschiedlichen Merkmalen, wie Wachstumsfaktoren, proliferationsassoziierten Antigenen, MHC-Klasse-I-Antigenen, Zelladhäsionsmolekülen und tumorassoziierten Proteasen untersucht (**Tabellen 3**) (8, 44, 79, 80, 82, 83).

**Tabelle 3 Phänotypisierung disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen**

Phänotypen	Referenz	Anzahl positiv/ Gesamtanzahl	Positiver Phänotyp in %
<b>Adhäsionsmoleküle</b> Ep-CAM	Braun : (8)	155/471	33,1
	Pantel : (82)	20/31	64,5
<b>Wachstumsfaktoren</b> EGF-R Her2-neu/erbB2	Pantel: (106)	10/37	27,0
	Braun: (8)	182/516	35,2
	Pantel: (82)	48/71	67,6
<b>MHC-Klasse-I-Antigene</b>	Pantel: (82)	9/26	34,6
	Zia: (110)	16/30	53,3
<b>Proliferations-assozierte Antigene</b> Ki 67 P 120	Pantel: (82)	1/12	8,3
	Pantel: (82)	1/11	9,1
<b>Transferrin Rezeptor</b>	Pantel: (82)	19/59	28,8

Durch Untersuchungen konnte so z.B. der maligne Charakter CK-positiver Zellen im Knochenmark von Karzinompatientinnen anhand des Nachweises tumorassoziierter Marker, wie der Expression von Lewis-Y-Blutgruppenvorläufen-Antigenen, der Überexpression des erbB2-Onkogens (auch Her-2/neu) und der defizienten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen bereits untermauert werden (8, 11, 77, 79, 81). Auch konnte gezeigt werden, dass bei einem Teil der disseminierten epithelialen Zellen Proliferationsmarker, wie Ki-67 und p120, vermindert exprimiert werden (78, 79), wodurch sich eine relative Resistenz disseminierter epithelialer Zellen gegenüber antiproliferativer Chemotherapie erklären könnte. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Elimination disseminierter epithelialer Zellen durch immunkompetente T-Lymphozyten wegen der defizienten Expression von antigen-präsentierenden MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche dieser Zellen beeinflusst wird (47, 50, 86). So könnte sich erklären lassen, dass eine minimal residuale Tumorerkrankung oft über Jahre hinweg vom Immunsystem unerkannt bleiben kann. In Studien konnte belegt werden, dass bei Mammakarzinom-Patientinnen, bei denen nach R0M0-Resektion die disseminierten epithelialen Tumorzellen im Knochenmark einen MHC-Klasse-I-negativen

Phänotyp besitzen, eine schlechtere Überlebenszeit haben als diejenigen mit einem MHC–Klasse–I–positiven Phänotyp (110).

Auch spielen Zelladhäsionsmoleküle neben der Vermittlung einer direkten Zell–Zell–Interaktion bei einer Vielzahl anderer dynamischer Prozesse wie der Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen und Zellverbänden, eine wichtige Rolle. Zu den Hauptgruppen der Adhäsionsmoleküle, den Cadherinen, Integrinen, Selektinen und der Familie der Immunglobuline kommt mit den „epithelial cell adhesion molecules“ (Ep–CAM) eine weitere strukturell unterschiedliche Gruppe membranständiger Zelladhäsionsmoleküle hinzu (2). Auch diese Rezeptor–Moleküle wurden mit Hilfe der immunzytochemischen Doppelfärbung auf ihre Expression und prognostische Aussagekraft untersucht.

Ep–CAM wurde in der Literatur auch unter einer Vielzahl anderer Bezeichnungen bekannt, die in der Regel von den verschiedenen Antikörpern abgeleitet sind, die gegen Epitope dieses Rezeptors gerichtet sind wie z.B. 17–1A, ESA, EGP40, 323/A3, KSA (3, 34, 62, 95).

Bei dem Ep–CAM Rezeptor handelt es sich um ein 40–kDa schweres transmembranes Glykoprotein, das beim Menschen von allen epithelialen Zellen und Geweben hauptsächlich auf der basolateralen Zelloberfläche exprimiert wird. Ep–CAM unterstützt dabei die Calcium unabhängige, interzelluläre Adhäsion von gleichartigen Zellen untereinander und wird sowohl von benignen als auch von malignen Zellen und während der Embryogenese exprimiert (3, 4, 64, 66). Das für die Codierung von Ep–CAM verantwortliche Gen (GA 733–2) konnte inzwischen auf dem Chromosom 4 lokalisiert werden (65, 95). In hoher Dichte wird Ep–CAM unter anderem in den luminalen Epithelien des Brustdrüsengewebes, dem Alveolar– und Bronchialgewebe und von den Geweben des gesamten gastrointestinalen Traktes gebildet (4, 95). Auch in Tumoren, die von diesen Geweben ausgehen, konnte eine erhöhte Expression von Ep–CAM nachgewiesen werden. Außerdem konnte durch *in vivo*–Experimente eine Verbindung zwischen einer gesteigerten Ep–CAM–Expression und dem hyperplastischen Wachstum maligner epithelialer Zellen nachgewiesen werden. In Studienergebnissen von Patientinnen, die an einem primären Mammakarzinom erkrankt waren, konnte bereits untermauert werden, dass mit einer verstärkten Ep–CAM–Expression eine Verschlechterung der Überlebensprognose und eine größeren Rezidivwahrscheinlichkeit verbunden ist (34, 95).

An der Bildung klassischer Zell–Zell–Verbindungen wie den tight junctions (Occludin), den Desmosomen (Desmoplakin) oder der Zell–Matrix–Adhäsion ( $\beta_1$ – Interin), ist Ep–CAM unbeteiligt. Es beeinflusst aber die Organisation, Morphologie und Architektur epithelialer



Zellen und Gewebe, moduliert Zell–Zell–Verbindungen und nimmt so möglicherweise auch Einfluss auf die Tumorgenese (3, 64, 66). Welche genaue Funktion Ep–CAM jedoch bei der Tumorgenese spielt, ist weiter ungeklärt. Ep–CAM spielt auch bei der Interaktion von Zellen, dem Prozess der Organ– und Gewebebildung, Motilität und der Zelldifferenzierung eine elementare Rolle. Durch seine Eigenschaften sollte Ep–CAM eigentlich die Dissemination epithelialer Zellen aus einem Zellverband inhibieren und so die Bildung von Metastasen verhindern. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Adhäsionsmoleküle in der Lage sind, sich untereinander in ihrer Funktion derart zu beeinflussen, dass sie eine Dissemination von Zellen aus einem Zellverband begünstigen können (4). Durch Ep–CAM werden außerdem interzelluläre Adhäsionsverbindungen gebildet und modifiziert, die für Kommunikation, Entwicklung und Erhaltung epithelialer Zellen und Gewebe wichtig sind (3, 4, 66). So führt z.B. eine gesteigerte Ep–CAM–Expression nicht nur zu einer supprimierten E–Cadherin vermittelten Zelladhäsion, sondern korreliert auch mit einer zunehmenden Proliferation epithelialer Gewebe und einer geringeren Differenzierung des Phänotyps (66). Bei den Cadherinen handelt es sich um eine Gruppe  $Ca^{2+}$  abhängiger Zelladhäsionsmoleküle, die wie Ep–CAM bei Bildung, Ausrichtung und Erhalt einer multizellulären Struktur in den meisten Geweben eine elementare Rolle spielen (4). In epithelialen Geweben erfüllt diese Aufgabe eine Untergruppe der Cadherine, das E–Cadherin, das an einer Aufrechterhaltung der Zellpolarisation, der Zelldifferenzierung und der Apoptose mitwirkt (2, 3). Eine Reduzierung der E–Cadherin vermittelten Zelladhäsion durch eine gesteigerte Ep–CAM–Expression hat dabei keinen Einfluss auf die Summe des gesamt vorhandenen zellulären Cadherins, beeinflusst aber dessen Zusammenspiel mit dem Zytoskelett durch eine reduzierte Reaktionsfähigkeit (66). Es wird vermutet, dass durch Auf– oder Abregulation der Ep–CAM–Expression, die Zell–Zell–Interaktion untereinander beim Wachstum und Remodeling von Geweben beeinflussen kann (3).

Die oben näher beschriebenen Methoden und Techniken zur Erforschung des Aufbaus und der Funktion zellulärer Antigene waren und sind die Grundvoraussetzung zur Identifikation und Analyse potentieller „Target–Strukturen“ einer auf Antikörpern basierenden Immuntherapie. Bereits vor mehr als 20 Jahren wurde mit radioaktiv markierten Antikörpern versucht zu klären, in wieweit diese die Fähigkeit besitzen, *in vivo*–Antigene zu erkennen, die in Tumorgewebe exprimiert werden. (39). Durch Inkubation mit radioaktiv markierten Antikörpern und anschließender histologischer Aufarbeitung von Tumorgewebe konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer Teil der Antikörper in Tumorgewebe angelagert wurde

und diese Antikörperbelegung in großen Tumoren häufig sehr inhomogen ist (39, 107). Ein weiteres Hauptproblem der Immuntherapie besteht darin, geeignete Zielantigene für eine antineoplastische Therapie zu identifizieren. Da sowohl für die Gruppe der epithelialen Tumoren als auch für Neoplasien anderer Gewebe in der Regel keine tumorspezifischen Antigene bekannt sind, muss so auf tumorassoziierte Antigene ausgewichen werden, die von Tumorzellen in einer höheren Dichte als von gesunden Zellen gebildet werden. Eine hieraus resultierende geringere Selektivität der therapeutisch gegen Tumorzellen eingesetzten Antikörper kann – wenn auch in geringerem Ausmaß – gesundes Gewebe beeinträchtigen und so Nebenwirkungen verursachen (60).

Die Ergebnisse von Voruntersuchungen und theoretischen Überlegungen über den Einsatz von monoklonalen Antikörpern in der antineoplastischen Therapie bei Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Tumorleiden führten zu mehreren Phase I- und II-Studien, deren Ergebnisse jedoch, bis auf wenige Ausnahmen, ernüchternd waren (72).

Ursachen für die schlechten Resultate einer auf Antikörpern basierenden Immuntherapie bei soliden Tumoren bestehen in der Heterogenität der Zielantigene und deren unterschiedlich starker Expression und Erreichbarkeit, welche sich mit zunehmender Tumormasse noch weiter verschlechtert (106). Im Gegensatz zu Neoplasien hämatologischer Genese müssen Antikörper bei soliden Tumoren, die im extravasalen Kompartiment angesiedelt sind, in große Tumoren mit einem hohen interstitiellen Druck penetrieren. Auch sind komplette Antikörper mit einem Molekulargewicht von 150 kDa relativ große Moleküle im Vergleich zu den in der Regel kleiner als 1 kDa schweren konventionellen Chemotherapeutika. Alle diese Mechanismen führen zu einer weiteren Verminderung der Erreichbarkeit des Zielantigens (106).

Durch *in vitro*-Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass einige murine monoklonale Antikörper in der Lage sind, in Anwesenheit immunologischer Effektorzellen Tumorzellen zu lysieren. Die Anzahl dieser immunologischen Zellen nimmt jedoch mit zunehmender Tumormasse ab, wodurch eine Therapieresistenz weiter verstärkt wird (106). Einzelne disseminierte Zellen oder kleine Zellgruppen sind jedoch potentiell einer Antikörpertherapie besser zugänglich. Daher bietet es sich an, monoklonale Antikörper dann einzusetzen, wenn die Haupttumormasse bereits durch Operation und Chemotherapie eliminiert werden konnte und verbleibende chemotherapieresistente Zellen – z.B. in der G<sub>0</sub>-Phase – anders nicht eliminiert werden können. Die bis dato erworbenen Daten und Erfahrungen dienen so als

Grundlage für die Weiterentwicklung der Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern als Therapiemodalität in der antineoplastischen Therapie im Rahmen klinischer Studien (107).

Einer der ersten therapeutisch eingesetzten Antikörper war der gegen das tumorassoziierte Antigen CO17-1A (Ep-CAM) gerichtete murine monoklonale Antikörper 17-1A (Edrecolomab/Panorex<sup>®</sup>), der im Gegensatz zu anderen Antikörpern bereits frühzeitig auch in der adjuvanten Therapie eingesetzt wurde (72). Dieser Antikörper gehört zur Subklasse IgG<sub>2a</sub>, die in ihrer Funktion mit den humanen IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2</sub> vergleichbar sind (57). Sein Potential zur Aktivierung der komplementvermittelten Zytotoxizität ist zwar gering, er weist aber eine hohe antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität auf, die sich *in vitro* noch durch Zytokine steigern lässt (70). Auch wirkt das 17-1A Antigen bei der Induktion des programmierten Zelltodes – der Apoptose – mit (100). Dass sich der 17-1A Antikörper an einzelne disseminierte Zellen binden kann, konnte durch *in vivo*-Versuche bereits nachgewiesen werden. Die Expression seines Zielantigens (CO17-1A) ist jedoch innerhalb von epithelialen Tumoren sehr unterschiedlich ausgeprägt und hängt vom Differenzierungsgrad des Tumors ab, wobei in schlechter differenzierten Tumoren eine geringere Expression des 17-1A-Antigens nachgewiesen wurde (29, 40, 91). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte belegt werden, dass das ubiquitär vorkommende epitheliale Antigen 17-1A, das auch von gesunden epithelialen Zellen und Geweben exprimiert wird, in den maligne entarteten Zellen des Kolons in hoher Dichte exprimiert wird, woraus eine gewisse Selektivität des 17-1A Antikörpers resultiert (16).

Riethmüller et al. führten die erste randomisierte Studie mit einem murinen monoklonalen Antikörpern beim kolorektalem Karzinom durch. Nach operativer R0-Resektion wurde bei 189 Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium Dukes C der Antikörper 17-1A (Edrecolomab/Panorex<sup>®</sup>) injiziert (88, 89). Dies geschah in der Erwartung, dass einzelne disseminierte Tumorzellen und kleinere Zellaggregate einer Elimination durch eine Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern besser zugänglich sein würden. Durch diese Immuntherapie konnte nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 5 Jahren die Rezidivrate um 27% und die Letalität um 30% gesenkt werden (88). Auch eine Nachbeobachtung des Kollektivs über weitere zwei Jahre bestätigte dieses Ergebnis (89). Durch den Einsatz des Antikörpers 17-1A konnte damit erstmalig in einer kontrollierten Studie ein Überlebensvorteil durch eine Antikörpertherapie belegt werden.

Ermutigt durch die positiven Ergebnisse des 17–1A Antikörpers (Edrecolomab/Panorex<sup>®</sup>) in der antineoplastischen Therapie des Kolonkarzinoms wurde der Antikörper auch bei der Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt (7). In einer Pilotstudie von Braun et al. wurde dafür bei zehn Mammakarzinom–Patientinnen in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (acht Patientinnen litten bereits an Metastasen und zwei weitere waren an einem Lokalrezidiv erkrankt) eine Knochenmarksaspiration durchgeführt und anschließend eine einmalige Dosis von 500 mg Edrecolomab/ Panorex<sup>®</sup> injiziert. Nach dem fünften und siebten Tagen wurden zur Überprüfung des Verlaufes weitere Aspirationen durchgeführt. Diese Resultate wurden mit den Ergebnissen vor der Behandlung mit dem 17–1A Antikörper verglichen. Bei allen Patientinnen konnte eine Reduzierung der im Knochenmark gefundenen epithelialen Zellen nachgewiesen werden. Eine vollständige Elimination aller epithelialer Zellen wurde bei vier Patientinnen erreicht. Braun schlussfolgerte daraus, dass der 17–1A Antikörper (Edrecolomab/Panorex<sup>®</sup>) in der Lage ist bei Mammakarzinom–Patientinnen Zytokeratin– und Ep–CAM–positive Tumorzellen erfolgreich zu eliminieren. Die Studie wurde allerdings bezüglich der langen Rekrutierungsphase und wegen ihrer geringen Fallzahl kritisiert (9).

Angesichts der vielversprechenden Ergebnisse des Einsatzes von (Edrecolomab/Panorex<sup>®</sup>) bei Mammakarzinom–Patientinnen in einem fortgeschrittenen Tumorstadium sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich der 17–1A Antikörper auch erfolgreich bei Mammakarzinom–Patientinnen mit minimal residualer Tumorerkrankung – nach erfolgreicher Primärtherapie – einsetzen lässt. Hierfür wurden Knochenmarkspunktate von 34 Mammakarzinom–Patientinnen mit nachgewiesener minimal residualer Tumorerkrankung weiter phänotypisiert. Es sollte untersucht werden, wie häufig Ep–CAM auf disseminierten epithelialen Zellen exprimiert wird, und ob Ep–CAM ein möglicher Ansatzpunkt für den therapeutischen Einsatz von monoklonalen Antikörpern, wie z.B. 17–1A (Edrecolomab/Panorex<sup>®</sup>), in der Mammakarzinom Therapie sein kann. Zur Detektion epithelialer Zellen in den Knochenmarkspunktaten wurde ein gegen die Zytokeratinkomponente Nr.18 gerichteter monoklonaler Antikörper verwendet. Die Auswertung der immunzytologischen Präparate erfolgte lichtmikroskopisch und berücksichtigte die Anzahl CK18–positiver Zellen pro  $1 \times 10^6$  untersuchter Zellen. Als positiver Knochenmarkstatus wurde der Nachweis von  $\geq 1$  CK18–positiven Zelle definiert. Für deren weitere Phänotypisierung wurde der – wie der 17–1A–Antikörper– gegen Ep–CAM gerichtete monoklonale Antikörper Ber–EP4 eingesetzt. Ber–EP4, ein IgG1 Antikörper, erkennt zwei Glykoproteine von 34 und 49 kDa, die auf der Oberfläche und im Zytoplasma

nahezu aller epithelialer Zellen (außer Parietalzellen, Hepatozyten und verhorntem Plattenepithel) gebildet werden (84). Da der Antikörper nicht mit mesenchymalen Geweben und Zellen in Interaktion tritt, ist er infolgedessen zur Identifikation disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark besonders geeignet. Der Antikörper Ber-EP4 wurde bereits in mehreren Studien zum Auffinden epithelialer Zellen erfolgreich eingesetzt (56, 62).

Der Antikörper Ber-EP4 wurde vor Versuchsbeginn mehrfach auf den Ep-CAM positiven Mammakarzinom-Zelllinien SK-Br-3 und MCF-7 auf seine Spezifität und Färbeintensität hin getestet. Auch bei den zur Kontrolle der immunhistochemischen Färbung mitgeführten Positivkontrollen aus den oben genannten Mammakarzinom-Zelllinien funktionierte der Antikörper in der Alkalische-Phosphatase-Streptavidin-Immunogold-Doppelfärbung einwandfrei. Von den 34 untersuchten Punktaten lagen bei 32 Patientinnen in der Primärfärbung die CK18-positiven Zellen als Einzelzellen vor. Bei zwei weiteren Patientinnen wurden im Knochenmark Cluster aus epithelialen Zellen gefunden. Hierbei handelte es sich zum einen um einen Typ I-Cluster mit drei CK18-positiven Zellen und um einen Typ II-Cluster mit <12 CK18-positiven Zellen (62).

Das überraschende Ergebnis dieser Untersuchung war, dass von 34 Knochenmarkspunktaten von Mammakarzinom-Patientinnen mit einer minimal residualen Tumorerkrankung in der Doppelfärbung zur weiteren Phänotypisierung der epithelialen Zellen nur eine von 34 Proben sowohl CK18- als auch Ber-EP4-positiv war. Hierbei handelte es sich um das Knochenmark mit dem Typ I-Zellcluster Befund. Dies entspricht nur einem Anteil von 2,9% und steht in einer erheblichen Diskrepanz zu den bisher veröffentlichten Ergebnissen aus anderen Studien zur Expression von Ep-CAM bei disseminierten epithelialen Zellen bei Mammakarzinom-Patientinnen (7, 9).

Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass in der Pilotstudie von Braun et al. Knochenmarkspunktate von Patientinnen untersucht wurden, die an einem Mammakarzinom in einem fortgeschrittenen Tumorstadium mit zum Teil bereits manifesten Metastasen erkrankt waren, während in diesem Patientinnenkollektiv ausschließlich epitheliale Zellen von Patientinnen mit einer minimal residualen Tumorerkrankung untersucht wurden. In dem hier untersuchten Patientinnenkollektiv wurde bei der überwiegenden Mehrzahl der Mammakarzinom-Patientinnen sowohl im Primärscreening als auch in der Doppelfärbung nur eine oder zwei CK18-positive Zellen gefunden, was möglicherweise die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen dieser und früheren Untersuchungen erklären könnte.

Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie Ep-CAM bei disseminierten epithelialen Zellen von der Zelldichte oder der Anordnung der Zellen abhängig sein könnte. Bei minimal residualen Tumorerkrankungen kann die Anzahl disseminierter epithelialer Zellen ganz erheblich zwischen wenigen Einzelzellen und Clustern aus mehreren hundert Zellen variieren. Bei den bisherigen Veröffentlichungen bezüglich der Expression von Ep-CAM bei disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen erfolgte bislang keine weitere Analyse der Ep-CAM-Expression in Abhängigkeit von dem Verteilungsmuster als Einzelzell- bzw. der Zellcluster. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung des Ausmaßes der Ep-CAM-Expression in Abhängigkeit von der Anordnung der Tumorzellen bzw. der Tumorzelldichte. Hierfür wurde ein 3D-Zellkulturmodell etabliert und verwendet. Entsprechend der Literatur (41, 71, 90, 99) zeigte die Validierung dieses Systems, dass multizelluläre Tumorsphäroide ein Modell für avaskuläre Mikrotumore repräsentieren und sich deshalb als Testsystem für regulatorische Fragestellungen eignen. Die vorläufigen Ergebnisse zeigten, dass die Ep-CAM-Expression sowohl durch die 3D-Anordnung der Tumorzellen als auch durch die Erhöhung der Zelldichte im 3D-Modell induziert werden kann. Basierend auf diesen positiven Korrelationen könnte der häufig negative Befund Ep-CAM-negativer epithelialer Einzelzellen im Knochenmark erklärt werden.

Zeitgleich wurde in einer anderen Untersuchung versucht, den Stellenwert des 17-1A-Antikörpers im Vergleich zur adjuvanten Chemotherapie anhand einer kontrolliert randomisierten Studie beim Kolonkarzinom zu ermitteln. Dafür wurden in einer europäischen multizentrischen Studie an über 2700 Patienten drei Versuchsgruppen einander gegenübergestellt. So wurde die Immuntherapie mit dem Antikörper (Edrecolomab/Panorex<sup>®</sup>) mit der adjuvanten Chemotherapie, bestehend aus Leukovorin und 5-Fluorouracil und einer kombinierten Chemo- und Immuntherapie miteinander verglichen (72). Die Auswertung ergab, dass nach einer medianen Nachbeobachtung von 26 Monaten die alleinige Antikörpertherapie den beiden Chemotherapiegruppen der Studie bezüglich des Überlebens unterlegen ist und auch eine Kombinationstherapie keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Chemotherapie zeigt (72). Das prognostizierte drei Jahresüberleben für die Patientengruppe mit der alleinigen Antikörpertherapie war dabei mit 70,1% grenzwertig signifikant schlechter als die alleinige Chemotherapie mit 76,1%. Die kombinierte Chemo-Immuntherapie zeigte mit einem prognostizierten drei Jahresüberleben von 74,7% keinen Vorteil gegenüber einer

alleinigen Chemotherapie (72). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Vertrieb des Antikörpers (Edrecolomab/Panorex<sup>®</sup>) zum gegenwärtigen Zeitpunkt eingestellt.

Aus dieser Studie kann jedoch nicht abgeleitet werden, dass der 17-1A Antikörper in der adjuvanten Immuntherapie des kolorektalen Karzinoms wirkungslos ist. Auch war es aus ethischen Gründen nicht möglich, eine Placebogruppe mitzuführen, da der Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie beim Kolonkarzinom im Stadium Dukes C bzw. UICC III zweifelsfrei belegt ist. Des weiteren konnte in einer anderen klinischen Studie gezeigt werden, dass eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper 17-1A in der Lage ist, die Anzahl disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark zu reduzieren (7, 45). Die Wirksamkeit einer Therapie mit diesem Antikörper muss in klinischen Studien weiter beobachtet und nachgewiesen werden.

Auf Grund der überraschenden Ergebnisse dieser Arbeit in der Doppelfärbung (1/34 C18-positiv/Ep-CAM-positiv; 33/34 C18-positiv/Ep-CAM-negativ) und den oben geschilderten ernüchternden Resultaten der auf Antikörpern basierenden Immuntherapie mit dem 17-1A Antikörper (Edrecolomab/Panorex<sup>®</sup>) beim kolorektalen Karzinom (72) wurde die folgende Hypothese generiert: Das Ausmaß der Ep-CAM-Expression wird über die Zellzahl bzw. Zelldichte reguliert. Hierfür wurde, ausgehend von Mammarkarzinom-Zelllinien, das multizelluläre Sphäroidmodell etabliert und mit der standardisierten Monolayerkultur verglichen.

Da konventionelle einschichtige Zellkulturen von Tumorzellen häufig nicht repräsentativ für die Charakteristik dreidimensionaler solider Tumore sind, wurde das multizelluläre Sphäroidmodell entwickelt, welches die verschiedenen tumorbiologischen und klinikpathologischen Eigenschaften von Patiententumoren besser repräsentieren kann. Auch zur Untersuchung und Charakterisierung maligner Tumore bietet sich die Sphäroidkultur wegen der erprobten standardisierten Handhabung und einem hohen Maß an Reproduzierbarkeit der Ergebnisse an. Mit dem multizellulären Sphäroidmodell konnte bereits eine Vielzahl unterschiedlicher maligner Tumore – z.B. Glioblastome, Prostatakarzinome und Mammarkarzinome – anhand etablierter Tumorzelllinien erfolgreich kultiviert und erforscht werden. Ein großer Vorteil der Sphäroidkultur ist ihr natürlicher dreidimensionaler Aufbau, der einen direkten Vergleich bezüglich Struktur und Funktion mit soliden Tumoren erlaubt. Wegen dieser Eigenschaften konnte sich die Sphäroidkultur zunehmend als repräsentative Methode zur Untersuchung avaskulärer Tumore etablieren.

So kann anhand von Sphäroiden in der Zellkultur die Gewebearchitektur, die Zell-Zell-Interaktion und das „microenvironment“ von Tumoren im Vergleich zu konventionellen herkömmlichen Monolayerkulturen nahezu realistisch simuliert werden. Dabei sind die Eigenschaften der Sphäroide von der Tumorzelllinie, dem Differenzierungsstadium, dem Medium und den Wachstumsbedingungen abhängig. Mit Hilfe des multizellulären Sphäroidmodells wurden bereits die Regulationsmechanismen von Tumorzellen, die das Wachstum, den Stoffwechsel sowie die Differenzierung und die Apoptose betreffen, untersucht (41, 71, 90, 93). Auch wurden bereits Oberflächeneigenschaften und Rezeptoren benigner und maligner Zellen im Sphäroidmodell untersucht. So konnte am Beispiel des verhornten Plattenepithel Karzinoms nachgewiesen werden, dass die Expression der Integrine in der Sphäroidkultur im Gegensatz zur Monolayerkultur *in vivo* herunterreguliert wird. Die Exprimierung der Integrine ist also von den Kulturbedingungen abhängig (90, 105).

Ähnliche Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit für die Ep-CAM-Expression gezeigt werden. Durch die Veränderung der Zellkulturbedingungen von der Monolayerkultur zur Sphäroidkultur, wurde die Ep-CAM-Expression induziert. Darüber hinaus konnte eine von der Zelldichte abhängige Regulation der Ep-CAM-Expression detektiert werden, die mit steigender Zellzahl zunimmt.

Die Analyse therapierelevanter „Target-Strukturen“, wie zum Beispiel dem Ep-CAM-Antigen in pathophysiologisch relevanten, präklinischen Testsystemen, könnte folglich zu einer realistischeren Translation experimenteller Ergebnisse in die klinische Situation beitragen.



## 7. Literaturverzeichnis

1. **Adamovich TL**, Simmons RM. :  
Ductal carcinoma in situ with microinvasion.  
Am J Surg. 2003 Aug;186(2):112–6.
2. **Aplin AE.**, Howe A, Alahari SK., et al.:  
Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin–Cell Adhesion Molecules, and Selectins.  
Pharmacol Rev. 1998 Jun;50(2):197-263.
3. **Balzar M.**, Prins FA., Bakker HA.. et al.:  
The structural analysis of adhesions mediated by Ep–CAM.  
Exp Cell Res. 1999 Jan 10;246(1):108-21.
4. **Balzar M.**, Winter MJ., deBoer CJ., et al.:  
The biology of the 17–1A antigen (Ep-CAM).  
J Mol Med. 1999 Oct;77(10):699-712.
5. **Bloom HJ.**, Richardson WW.:  
Histological grading and prognosis in breast cancer.  
Br J Cancer. 1957 Sep;11(3):359-77.
6. **Braun S.**, Müller M., Hepp F., et al.:  
Micrometastatic breast–cancer cells at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status.  
J Natl Cancer Inst. 1998 Jul 15;90(14):1099-101.
7. **Braun S.**, Hepp F., Kentenich C., et al.:  
Monoclonal antibody therapy with Edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin–positive tumor cells in bone marrow.  
Clin Cancer Res. 1999 Dec;5(12):3999-4004.
8. **Braun S.**, Hepp F., Sommer H., et al.:  
Tumor–antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease.  
Int J Cancer. 1999 Feb 19;84(1):1-5.
9. **Braun S.**, Kentenich C., Janni W., et al.:  
Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high–risk breast cancer patients.  
J Clin Oncol. 2000 Jan;18(1):80-6.
10. **Braun S.**, Pantel K., Müller P., et al.:  
Cytokeratin–positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.  
N Engl J Med. 2000 Feb 24;342(8):525-33.

11. **Braun S.**, Schlimok G., Heumos I., et al.:  
ErbB2 Overexpression on Occult Metastatic Cells in Bone Marrow Predicts Poor Clinical Outcome of Stage I–III Breast Cancer Patients.  
Cancer Res. 2001 Mar 1;61(5):1890-5.
12. **Braun S.**, Semeni Cevatli B., Assami C., et al.:  
Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node–negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy.  
J Clin Oncol. 2001 Mar 1;19(5):1468-75.
13. **Buckley CD.**, Simmons DL.:  
Cell adhesion: a new target for therapy.  
Mol Med Today. 1997 Oct;3(10):449-56.
14. **Buckley CD.**, Rainger GE., Bradfield PF., et al.:  
Cell adhesion: more than just glue (Review).  
Mol Membr Biol. 1998 Oct-Dec;15(4):167-76.
15. **Buolamwini JK.**:  
Novel anticancer drug discovery (Review).  
Curr Opin Chem Biol. 1999 Aug;3(4):500-9.
16. **Chatal JF.**, Thedrez P., Blottiere H. et al.:  
Comparative characteristics of 17–1A and GA–733 monoklonal antibodies for immunoscintigraphic application.  
Hybridoma. 1986 Jul;5 Suppl 1:S87-96.
17. **Cordell JL.**, Falini B., Erber WN., et al.:  
Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complex of alkaline phosphates and monoclonal anti-alkaline phosphates (APAAP–complex).  
J Histochem Cytochem. 1984 Feb;32(2):219-29.
18. **Cox CE.**, Nguyen K, Gray RJ, et al.:  
Importance of lymphatic mapping in ductal carcinoma in situ (DCIS): why map DCIS?  
Am Surg. 2001 Jun;67(6):513–9; discussion 519–21.
19. **Debus E.**, Weber K., Osborne M., et al.:  
Monoclonal cytokeratin antibodies that distinguish simple from stratified squamous epithelia: characterization on human tissues.  
EMBO J. 1982;1(12):1641-7.
20. **Debus E.**, Moll R., Franke WW., et al.:  
Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies.  
Am J Pathol. 1984 Jan;114(1):121-30.
21. **Diel IJ.**, Kaufmann M., Goerner R., et al.:  
Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: A prognostic factor for distant metastases.  
J Clin Oncol. 1992 Oct;10(10):1534-9.

22. **Diel IJ.**, Kaufmann M., Costa SD., et al.:  
Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status.  
J Natl Cancer Inst. 1996 Nov 20;88(22):1652-8.
23. **Diel IJ.**, Cote RJ.:  
Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer.  
Cancer Treat Rev. 2000 Feb;26(1):53-65.
24. **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG).**:  
Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy.  
Lancet 339 1–15, 71–85 (1992).
25. **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG).**:  
Ovarian ablation in early breast cancer: overview of the randomised trials.  
Lancet 348:1189–96 (1996).
26. **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG).**:  
Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials.  
Lancet 351:1451–1467 (1998).
27. **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG).**:  
Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials.  
Lancet 352: 930–942 (1998).
28. **Elston CW.**, Ellis IO.:  
Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up.  
Histopathology 1991; 19; 403-410.
29. **Fleuren GJ.**, Gorter A., Kuppen PJ. et al.:  
Tumor heterogeneity and immunotherapy of cancer.  
Immunol Rev. 1995 Jun;145:91-122.
30. **Funke I.**, Schlimok G., Bock B., et al.:  
Diagnosis and treatment of early micrometastasis of human carcinomas: challenges and chances for monoclonal antibodies. In: Molecular probes. Technology and medical applications, edited by Albertini A.  
Raven Press, New York 1989; pp 237–244.
31. **Funke I.**, Fries S., Rolle M., et al.:  
Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer.  
Int J Cancer. 1996 Mar 15;65(6):755-61.
32. **Funke I.**, Schraut W.:  
Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated.  
J Clin Oncol. 1998 Feb;16(2):557-66.

- 33. Funke I.:**  
Habilitationsschrift: Prospektive Studie zur prognostischen Wertigkeit des Knochenmarkstatus beim Mammakarzinom. 2001
- 34. Gastl G., Spizzo G., Obrist P., et al.:**  
Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival.  
Lancet. 2000 Dec 9;356(9246):1981-2.
- 35. Gerber B., Krause A., Müller H., et al.:**  
Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors.  
J Clin Oncol. 2001 Feb 15;19(4):960-71.
- 36. Gebauer G., Fehm T., Merkle E., et al.:**  
Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up.  
J Clin Oncol. 2001 Aug 15;19(16):3669-74.
- 37. Gerhard M., Juhl H., Kalthoff H., et al.:**  
Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction.  
J Clin Oncol. 1994 Apr;12(4):725-9.
- 38. GlaxoWellcome (2000).:**  
Final analysis for study 157-002. Mitteilung für Prüfärzte 16.10.2000
- 39. Goldenberg DM., De Land F., Kim E., et al.:**  
Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning.  
N Engl J Med. 1978 Jun 22;298(25):1384-6.
- 40. Goodwin RA., Tuttle SE., Bucci DM., et al.:**  
Tumor-associated antigen expression of primary and metastatic colon carcinomas detected by monoclonal antibody 17-1A.  
Am J Clin Pathol. 1987 Oct;88(4):462-7.
- 41. Hamilton G.:**  
Multicellular spheroids as an in vitro tumor model.  
Cancer Lett. 1998 Sep 11;131(1):29-34.
- 42. Hart IR., Saini A.:**  
Biology of tumour metastasis.  
Lancet. 1992 Jun 13;339(8807):1453-7.
- 43. Hart IR.:**  
Perspective: tumour spread-the problems of latency.  
J Pathol. 1999 Jan;187(1):91-4.

44. **Heiss MM.**, Allgayer H., Gruetzner U., et al.:  
Individual development and uPA–receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a Reference to early systemic disease in solid cancer.  
Nat Med. 1995 Oct;1(10):1035-9.
45. **Hempel D.**, Müller P., Oruzio D., et al.:  
Combination of high-dose chemotherapy and monoclonal antibody in breast-cancer patients: a pilot trial to monitor treatment effects on disseminated tumor cells.  
Cytotherapy. 2000;2(4):287-95.
46. **Hermanek P.:**  
pTNM and residual tumor classifications: problems of assessment and prognostic significance.  
World J Surg. 1995 Mar-Apr;19(2):184-90.
47. **Hicklin DJ.**, Marincola FM., Ferrone SF.:  
HLA–class I downregulation in human cancers: T–cell immunotherapy revives an old story.  
Mol Med Today. 1999 Apr;5(4):178-86.
48. **Hilsenbeck SG.** , Ravdin PM., de Moor CA., et al.:  
Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer.  
Breast Cancer Res Treat. 1998;52(1-3):227-37.
49. **Hoechtlen–Vollmar W.**, Gruber P., Bodenmüller H., et al.:  
Occult epithelial tumor cells detected in bone marrow by an enzyme immunassay specific for cytokeratin–19.  
Int J Cancer. 1997 Feb 7;70(4):396-400.
50. **Hosch SB.**, Izbicki JR., Pichlmeier U., et al.:  
Expression and prognostic significance of Immunoregulatory molecules in esophageal cancer.  
Int J Cancer. 1997 Dec 19;74(6):582-7.
51. **Huang YW.**, Baluna R., Vitetta ES.:  
Adhesion molecules as targets for cancer therapy.  
Histol Histopathol. 1997 Apr;12(2):467-77.
52. **Idikio HA.**, Manickavel V.: A, B, H, and Lewis-a and Lewis-b blood group antigens in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptor and disease status. J Cancer Res Clin Oncol. 1993; 119(8):486-492.
53. **Intra M.**, Veronesi P, Mazzarol G, et al.:  
Axillary sentinel lymph node biopsy in patients with pure ductal carcinoma in situ of the breast.  
Arch Surg. 2003 Mar;138(3):309–13.
54. **Isaacs C.**, Stearns V., Hayes DF.:  
New prognostic factors for breast cancer recurrence.  
Semin Oncol. 2001 Feb;28(1):53-67.

55. **Israeli RS.**, Miller WH. Jr, Su SL., et al.:  
Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells : Comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays.  
Cancer Res. 1994 Dec 15;54(24):6306-10.
56. **Izbicki JR.**, Hosch SB., Pichlmeier U., et al.:  
Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer.  
N Engl J Med. 1997 Oct 23;337(17):1188-94.
57. **Juhl H.**, Helmig F., Balzer K.:  
Frequent expression of complement resistance factors CD46, CD55, and CD59 on gastrointestinal cancer cells limits the therapeutic potential of monoclonal antibody 17-1A.  
J Surg Oncol. 1997 Mar;64(3):222-30.
58. **Kelly TA.**, Kim JA, Patrick R, et al.:  
Axillary lymph node metastases in patients with a final diagnosis of ductal carcinoma in situ.  
Am J Surg. 2003 Oct;186(4):368-70
59. **Klauber-DeMore N.**, Tan LK, Liberman L, et al.:  
Sentinel lymph node biopsy: is it indicated in patients with high-risk ductal carcinoma-in-situ and ductal carcinoma-in-situ with microinvasion?  
Ann Surg Oncol. 2000 Oct;7(9):636-42.
60. **Knuth A.**, Jager D., Jager E.:  
Cancer immunotherapy in clinical oncology.  
Cancer Chemother Pharmacol. 2000;46 Suppl:S46-51.
61. **Krismann M.**, Todt B., Schröder J., et al.:  
Low specificity of Cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of haematogenous lung cancer dissemination.  
J Clin Oncol. 1995 Nov;13(11):2769-75.
62. **Kubuschok B.**, Passlick B., Izbicki JR., et al.:  
Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer.  
J Clin Oncol. 1999 Jan;17(1):19-24.
63. **Liotta LA.**, Steeg PS. and Stetler-Stevenson WG.:  
Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.  
Cell. 1991 Jan 25;64(2):327-36.
64. **Litvinov SV.**, Bakker HA., Gourevitch MM., et al.:  
Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion.  
Cell Adhes Commun. 1994 Oct;2(5):417-28.

65. **Litvinov SV.,** Velders MP., Bakker HA., et al.:  
Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule.  
J Cell Biol. 1994 Apr;125(2):437-46.
66. **Litvinov SV.,** Balzar M., Winter MJ., et al.:  
Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins.  
J Cell Biol. 1997 Dec 1;139(5):1337-48.
67. **Mansi JL.,** Easton D., Berger U., et al.:  
Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up.  
Eur J Cancer. 1991;27(12):1552-5.
68. **Mansi JL.,** Gogas H., Bliss JM., et al.:  
Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study.  
Lancet. 1999 Jul 17;354(9174):197-202.
69. **Manual Mammakarzinome**  
Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der LMU und TU  
9. Auflage 2003
70. **Masucci G.,** Mellstedt H., et al.:  
Combinations of IL-2, GM-CSF, IL-4, IFN-alpha and TNF-alpha increase the antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of blood mononuclear cells in presence of either mouse or chimeric m Ab 17-1A – a preclinical evaluation.  
Cancer J. 1991;4: 168-173
71. **Mueller-Klieser W.:**  
Tumor biology and experimental therapeutics.  
Crit Rev Oncol Hematol. 2000 Nov-Dec;36(2-3):123-39.
72. **Müller P.,** Schlimok G.:  
Entwicklung und Einsatz antiepithelialer Antikörper bei soliden Tumoren.  
Internist (Berl). 2001 Jun;42(6):827-34.
73. **Nagaoe T.,** Fukushima K., Tuji T., et al.:  
Immunohistochemical expression of ABH/Lewis-related antigens in primary breast carcinomas and metastatic lymph node lesions. Ccancer Detect Prev. 1998; 22(6):499-505.
74. **Nemoto T.,** Vana J., Bedwani R., et al.:  
Management and survival of female breast cancer patients: Results of a national survey by the American College of Surgeons.  
Cancer. 1980 Jun 15;45(12):2917-24.

75. **Oberneder R.**, Riesenberg R., Kriegmair R., et al.:  
Immunocytochemical detection and phenotypic characterization of micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with prostate cancer.  
Urol Res. 1994;22(1):3-8.
76. **Oruzio D.**, Hempel D., Schlimok G.:  
"Knochenmarksmikrometastasen" epithelialer Tumoren Nachweis und klinische Bedeutung.  
Der Onkologe Volume 3, Issue 1, pp 66–72, February 1997
77. **Pantel K.**, Schlimok G., Kutter D., et al.:  
Frequent down–regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells.  
Cancer Res. 1991 Sep 1;51(17):4712-5.
78. **Pantel K.**, Izbicki JR., Angstwurm M., et al.:  
Immunocytological detection of bone marrow micrometastases in operable small cell lung cancer.  
Cancer Res. 1993 Mar 1;53(5):1027-31.
79. **Pantel K.**, Schlimok G., Braun S., et al.:  
Differential expression of proliferation–associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells.  
J Natl Cancer Inst. 1993 Sep 1;85(17):1419-24.
80. **Pantel K.**, Aigherr C., Köllermann J., et al.:  
Immunocytochemical detection of isolated tumour cells in bone marrow of patients with untreated stage C prostatic cancer.  
Eur J Cancer. 1995 Sep;31A(10):1627-32.
81. **Pantel K.**, Braun S., Passlick S., et al.:  
Minimal residual epithelial cancer diagnostic approaches and prognostic relevance.  
Prog Histochem Cytochem. 1996;30(3):1-60.
82. **Pantel K.**, Cote R.J., Fodstad O.:  
Detection and clinical importance of micrometastatic disease.  
J Natl Cancer Inst. 1999 Jul 7;91(13):1113-24.
83. **Pantel K.**, von Knebel Döberitz M.:  
Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells  
Curr Opin Oncol. 2000 Jan;12(1):95-101.
84. **Passlick B.**, Izbicki JR., Kubuschok B., et al.:  
Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non–small–cell lung cancer.  
J Clin Oncol. 1994 Sep;12(9):1827-32.
85. **Pendas S.**, Dauway E, Giuliano R, et al.:  
Sentinel node biopsy in ductal carcinoma in situ patients.  
Ann Surg Oncol. 2000 Jan–Feb;7(1):15–20.



86. **Rees RC.,** Mian S.:  
Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumor responses.  
Cancer Immunol Immunother. 1999 Oct;48(7):374-81.
87. **Riesenberg R.,** Oberneder R., Kriegmair, M., et al.:  
Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumour cells.  
Histochemistry. 1993 Jan;99(1):61-6.
88. **Riethmüller G.,** Schneider-Gädicke E., Schlimok G., et al.:  
Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A study Group.  
Lancet. 1994 May 14;343(8907):1177-83.
89. **Riethmüller G.,** Holz E., Schlimok G., et al.:  
Monoclonal antibody therapy for resected Dukes C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial.  
J Clin Oncol. 1998 May;16(5):1788-94.
90. **Santini MT.,** Rainaldi G.:  
Three-dimensional spheroid model in tumor biology.  
Pathobiology. 1999 May-Jun;67(3):148-57.
91. **Schlimok G.,** Funke I., Holzmann B., et al.:  
Micrometastatic cancer cells in bone marrow: In vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec;84(23):8672-6.
92. **Schlimok G.,** Riethmüller, G.:  
Detection, characterization and tumorigenicity of tumor cells in human bone marrow.  
Semin Cancer Biol. 1990 Jun;1(3):207-15.
93. **Seidl P.,** Huettinger R., Knuechel R., et al.:  
Three-dimensional fibroblast-tumor cell interaction causes downregulation of RACK1 mRNA expression in breast cancer cells in vitro.  
Int J Cancer. 2002 Nov 10;102(2):129-36.
94. **Sloane JP.,** Ormerod MG., Neville AM.:  
Potential pathological application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastases.  
Cancer Res. 1980 Aug;40(8 Pt 2):3079-82.
95. **Spizzo G.,** Obrist P., Ensinger C., et al.:  
Prognostic significance of Ep-CAM and Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer.  
Int J Cancer. 2002 Apr 20;98(6):883-8.

- 96. State of the Art Meeting Gravenbruch 2002:**  
Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mamma Karzinome.  
Hrsg. Von Minkwitz G., Zuckschwerdt Verlag München, Wien, New York, 2002.
- 97. Stephens RW., Brunner N., Jänicke F., et al.:**  
The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer.  
Breast Cancer Res Treat. 1998;52(1-3):99-111.
- 98. Steplewska-Mazur K., Gabriel A., Zajecki W., et al.:**  
Breast cancer progression of blood-group related tumor-associated antigens.  
Hybridome 2000 Apr 19(2):129-133.
- 99. Sutherland RM.:**  
Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model.  
Science. 1988 Apr 8;240(4849):177-84.
- 100. Takamuku K., Baba K., Li J., et al.:**  
Apoptosis in antibody-dependent monocyte-mediated cytotoxicity with monoklonal antibody 17-1A against human colorectal carcinoma cells: enhancement with interferon gamma.  
Cancer Immunol Immunother. 1996 Dec;43(4):220-5.
- 101. Tandon AK., Clark GM., Chamness GC., et al.:**  
Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer.  
Cancer Res. 1990 Jun 1;50(11):3317-21.
- 102. Tumorzentrum München:**  
Manual Mammakarzinom – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.  
8. Auflage 2001.
- 103. UICC: TNM Supplement 1993.:**  
A commentary on uniform use. Hermanek P, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH ,  
Eds.  
Berlin Heidelberg New York, Springer, 1993.
- 104. UICC: TNM-Classification of Malignant Tumors 1997.:**  
Sobin LH and Wittekind CH (Eds.)  
5<sup>th</sup> Edition. Wiley-Liss, Inc, New York, 1997.
- 105. Waleh NS., Gallo J., Grant TD., et al.:**  
Selective down-regulation of integrin receptors in spheroids of squamous cell carcinoma.  
Cancer Res. 1994 Feb 1;54(3):838-43.

- 106. Weiner LM.:**  
Monoklonal antibody therapy of cancer.  
Semin Oncol. 1999 Oct;26(5 Suppl 14):43-51.
- 107. Welt S., Ritter G.:**  
Antibodies in the therapy of colon cancer.  
Semin Oncol. 1999 Dec;26(6):683-90.
- 108. Yuhas JM, Tarleton AE., Molzen KB.:**  
Multicellular tumor spheroid formation by breast cancer cells isolated from different sites.  
Cancer Res. 1978 Aug;38(8):2486-91.
- 109. Zhou J., Sargiannidou I., Tuszynski.:**  
The role of adhesive proteins in the haematogenous spread of cancer.  
In Vivo. 2000 Jan-Feb;14(1):199-208.
- 110. Zia A., Schildberg FW., Funke I.:**  
MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in R0M0 breast cancer patients.  
Int J Cancer. 2001 Aug 15;93(4):566-70.

## CURRICULUM VITAE

Name: Christopher Wild

Geburtsdatum: 06.08.1971

Geburtsort: München

Nationalität: Deutsch

### **Schulbildung:**

1979–1983 Grundschule Deutsche Schule Paris / Frankreich  
und Feldkirchen–Westerham

1983–1993 Gymnasium Bad Aibling  
und Institut für Unterricht München

1993 Abitur am Gymnasium Oberhaching

### **Studium:**

1994–1998 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig

1998–2002 Studium der Humanmedizin an der LMU–München

April 2002 Drittes Staatsexamen

### **Beruf:**

2002–2004 Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik II des Klinikums Freising

2004– Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik I des Klinikums Freising