

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. K.-W. Jauch

Phänotypische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen

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

vorgelegt von

Ruth Mamede Müller

aus

Manaus / Brasilien

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. I. Funke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. D. Hölzel
Prof. Dr. B. Emmerich
Prof. Dr. H. Sommer

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Frau PD Dr. med. Ilona Funke

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2007

Widmung

Diese Arbeit ist meinem Mann Christian gewidmet, der mich mit viel Geduld und Kraft in vielfältiger Weise unterstützte und mir so die Durchführung dieser Dissertation ermöglichte.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	4
2	Material und Methoden	8
2.1	Patientenkollektiv _____	8
2.2	Auswahl des Antikörpers _____	10
2.3	Gewinnung und Aufarbeitung der Knochenmarkaspirate _____	10
2.3.1	Material _____	11
2.3.2	Methode _____	11
2.3.3	Herstellen der Zytospin – Präparate _____	12
2.4	Herstellung von Präparaten der Zelllinie MCF-7 _____	14
2.4.1	Material _____	14
2.4.2	Methode _____	14
2.5	APAAP-Färbung unter Verwendung des Antikörpers CK2 _____	15
2.5.1	Material _____	15
2.5.2	Immunzytochemische Färbungen _____	17
2.5.3	Auswertung _____	19
2.6	Immunzytochemische Färbung mit dem Epimet Kit A45 _____	21
2.6.1	Material _____	21
2.6.2	Methode _____	21
2.6.3	Auswertung _____	22
2.7	APAAP-Färbung nach Verwendung von Antikörper CK22 _____	23
2.7.1	Material _____	23
2.7.2	Methode _____	23
2.7.3	Auswertung _____	23
2.8	CK2-Biotinilierung _____	24
2.8.1	Material _____	24
2.8.2	Methode _____	24
2.9	Doppelfärbung mit dem Antikörper CK2 und dem Anti-Östrogenrezeptor Antikörper _____	26
2.9.1	Material _____	26
2.9.2	Doppelfärbungsmethode : APAAP / Streptavidin / Immunogold - Standardprotokoll ____	27
2.9.3	Protokollmodifikation der Doppelfärbungsmethode _____	28
2.9.4	Auswertung _____	29
2.10	Qualitätskontrolle der Doppelfärbungsmethode _____	31
2.10.1	Material _____	31
2.10.2	Erste Qualitätskontrolle der Doppelfärbungsmethode: PBL als Negativkontrolle _____	31
2.10.3	Zweite Qualitätskontrolle der Doppelfärbungsmethode : APAAP-Färbung statt APAAP/Streptavidin _____	32

2.10.4	Lagerungsfähigkeit der gefärbten Präparate und Wiederfindungsrate der CK-18 positiven Zellen _____	33
2.10.5	Doppelfärbung an asservierten Präparaten _____	33
2.10.6	Auswertung _____	34
2.11	Doppelfärbung A45-B/B3 - Östrogenrezeptor _____	35
2.11.1	Auswertung _____	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Verteilungsmuster klinisch-pathologischer Parameter und des Knochenmark-Status _____	37
3.2	pTNM Stadium im gesamten M0 Kollektiv: _____	37
3.3	Korrelation des Knochenmark-Status mit etablierten klinisch-pathologischen Parametern _____	40
3.4	Der Vergleich der Spezifität und Sensivität der Antikörper CK2, A45-B/B3 und CK22 _____	43
3.4.1	CK22 Expressionsmuster im Knochenmark der untersuchten Patientinnen _____	48
3.4.2	Vergleich der CK-18 und A45-B/B3 - Positivität im Knochenmark der untersuchten Patientinnen _____	48
3.4.3	Vergleich der CK-18 und CK22 - Positivität im Knochenmark der untersuchten Patientinnen _____	49
3.4.4	Vergleich der A45-B/B3 und CK22 Positivität im Knochenmark der untersuchten Patientinnen _____	49
3.5	Einfluss der untersuchten Zellzahl auf den Knochenmark-Status _____	50
3.6	Einlagerungsfähigkeit der gefärbten Präparate und Wiederfindung der CK-18 positive Zellen	51
3.7	Der Vergleich des Östrogenrezeptor-Status des Primärtumors und der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark _____	53
3.7.1	Expression des Östrogenrezeptors auf CK-18 positiven Zellen im Knochenmark im Vergleich zum Östrogenrezeptor-Status des Primärtumors _____	53
4	Diskussion	56
4.1	Tumorbiologie und Terminologie _____	56
4.1.1	Knochenmark-Status als Tumorbiologischer Prognosefaktor _____	58
4.2	Korrelation des Knochenmark-Status zu etablierten Parametern im M0 Kollektiv _____	62
4.3	Spezifität und Sensivität der Antikörper CK2, A45-B/B3 und CK22 _____	62
4.4	Der Einfluss der untersuchten Zellzahl auf den Knochenmark-Status _____	63
4.5	Einlagerungsfähigkeit der gefärbten Präparate und Wiederfindung der CK-18 positive Zellen	65
4.6	Methodische Fragestellungen _____	65
4.7	Hormontherapie des Mammakarzinoms, Östrogen und Östrogenrezeptor _____	67
4.7.1	Östrogen und Östrogenrezeptor _____	67
4.7.2	Hormontherapie des Mammakarzinoms _____	69
4.8	Östrogenrezeptorexpression auf disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark _____	70
4.9	Welche Gründe können differierende Ergebnisse zwischen den Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und im Knochenmark haben? _____	73
4.10	Welche Konsequenz ergibt sich hieraus für die Therapie? _____	75

5	Zusammenfassung	77
6	Abbildungsverzeichnis	80
7	Tabellenverzeichnis	81
8	Literaturverzeichnis	82
9	Danksagung	103
10	Lebenslauf	104

1 Einleitung

In den westlichen Industrieländern werden die meisten Krebsneuerkrankungen und krebsbedingten Todesfälle bei Männern und Frauen durch maligne epitheliale Tumoren verursacht. Dabei ist das Mammakarzinom bei Frauen die häufigste bösartige Tumorart und betrifft ca. 10 % der weiblichen Bevölkerung⁽³⁷⁾. Die Inzidenz der Neuerkrankungen an einem Mammakarzinom in Deutschland liegt bei ca. 55.000⁽¹²⁵⁾.

Trotz verbesserter diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen ist die Mortalität der von einem Mammakarzinom betroffenen Patientinnen in den letzten Jahren nicht erheblich gesunken^{(14) (125)}. Die Prognose von Mammakarzinompatientinnen ist von der Fähigkeit des Primärtumors zur Metastasierung abhängig. Die derzeit aktuellen Methoden zum Ausschluss von Fernmetastasen sind die so genannten Staging-Untersuchungen des Thorax (konventionelle Röntgenaufnahme) und der Leber (Abdomen-Sonographie), sowie des Skelettsystems (Skelettszintigraphie). Die kontralaterale Mamma wird durch die präoperative Mammographie abgeklärt und die Tumormarker-Bestimmung von CEA und CA-15-3 erscheint insbesondere im Verlauf sinnvoll⁽²³⁾. Diese Untersuchungen haben sich zum Standard entwickelt, erfassen aber keine unmittelbaren Informationen über das Metastasierungspotential der Tumore. Die Primärtherapie des Mammakarzinoms beinhaltet nicht nur die Operation, sondern auch die Strahlentherapie und die adjuvante Hormon-, und Chemotherapie, die in erster Linie vom histopathologischen Befund abhängig sind.

Bekannte Risikofaktoren wie frühe Menarche oder späte Menopause, Nullparität oder späte erste Schwangerschaft, sowie Malignome des Uterus, der Ovarien oder des Darms deuten darauf hin, dass die Entstehung eines Mammakarzinoms mit der Dauer der Östrogenwirkung auf das Brustgewebe korreliert. Einen der wichtigsten Risikofaktoren für ein erblich bedingtes Mammakarzinom stellt derzeit eine Mutation des BRCA1-Gens dar^{(23) (57)}. Der axilläre Lymphknotenstatus ist nicht nur der aussagekräftigste Prognosefaktor für das Mammakarzinom, sondern hat auch entscheidenden Einfluss auf die Wahl der Therapie nach dem chirurgischen Eingriff⁽²³⁾. Der Nachweis von Tumorzellen in den axillären Lymphknoten wird als Beginn der systemischen Disseminie-

rung angesehen ⁽⁵⁷⁾. Allerdings erleiden auch ca. 25-30 % der nodalnegativen Patientinnen innerhalb der nächsten 10 Jahren ein Rezidiv ⁽⁸⁴⁾ ⁽¹²⁸⁾. Die Tumorgröße, das Grading und der Hormonrezeptor-Status sind weitere wichtige Prognosefaktoren des Mammakarzinoms. Zu den fakultativen tumorbiologischen Prognosefaktoren zählen unter anderem uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp), und PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) im Primärtumor ⁽⁵⁷⁾.

Einzelne disseminierte Tumorzellen lassen sich durch die genannten konventionellen histopathologischen und bildgebenden Stagingmodalitäten nicht auffinden ⁽²⁹⁾ ⁽¹³²⁾. Es wurden daher immunzytochemische Verfahren entwickelt, die es erlauben auch einzelne disseminierte Tumorzellen nachzuweisen. Die umfangreichsten Daten liegen dabei bei Untersuchungen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen vor ⁽⁹⁾. Das Vorhandensein epithelialer Zellen im Knochenmark wird als Indikator für die frühe systemische Tumorzell dissemination diskutiert, da unter normalen Umständen keine epithelialen Zellen in diesem Organsystem zu finden sind ⁽⁵⁷⁾. Die leichte Zugänglichkeit des Knochenmarkes durch einen intraoperativ schmerz- und gefahrlos nur minimal invasiven Eingriff, sowie die Möglichkeit disseminierte epitheliale Zellen in dem histogenetisch verschiedenen Kompartiment des Knochenmarkes mit hoher Spezifität nachzuweisen, machen das Knochenmark als Untersuchungsmaterial besonders geeignet. In der Literatur wird angegeben, dass der Nachweis dieser Zellen im Knochenmark, nicht nur auf eine frühe Disseminierung der Tumorzellen bei Patienten ohne klinisch fassbare systemische Manifestationen hindeutet ⁽²⁾, sondern auch mit einer schlechten Prognose assoziiert ist ⁽²⁾ ⁽¹⁷⁾ ⁽²⁵⁾ ⁽³⁰⁾ ⁽⁴⁷⁾ ⁽⁵¹⁾ ⁽⁹³⁾. Dieser Nachweis entwickelt sich zunehmend als klinisch relevanter Prognosefaktor bei Mammakarzinompatientinnen ⁽⁵⁷⁾, und liefert zusätzliche Informationen zur Einschätzung des individuellen Krankheitsverlaufes ⁽³¹⁾.

Der Nachweis isolierter Tumorzellen wurde bereits 1993 durch die UICC in den Ergänzungsband der pTNM-Klassifikation als fakultativer Prognosefaktor aufgenommen ⁽¹³⁵⁾ ⁽¹⁵⁴⁾.

Trotz der zunehmenden Daten, die die prognostische Wertigkeit des Knochenmark-Status beim Mammakarzinom belegen, existiert bislang noch kein allgemein akzeptier-

tes standardisiertes Protokoll für den Tumorzellnachweis im Knochenmark. Derzeit wird intensiv diskutiert welcher Primärantikörper hinsichtlich Spezifität und Sensivität für den Nachweis der disseminierten epithelialen Tumorzellen am besten geeignet ist.

Um epitheliale Tumorzellen im Knochenmark nachweisen zu können, werden monoklonale Antikörper gegen verschiedene Zytoskelettkomponenten und Membranantigene verwendet, wobei die Anwendung von Antikörpern gegen Zytokeratine am geeignetsten erscheint ⁽¹²⁾. Zytokeratine sind integrale Bestandteile des Zytoskeletts von epithelialen Zellen ⁽⁹⁹⁾, werden auch von Tumorzellen stabil exprimiert und sind mit spezifischen monoklonalen Antikörpern in einzelnen Karzinomzellen eindeutig nachweisbar ⁽⁶⁵⁾. Der monoklonale Antikörper CK2, der gegen die Zytokeratinkomponent Nr. 18 gerichtet ist, ist der bislang am häufigsten eingesetzte Antikörper in Studien zur klinischen Relevanz des Knochenmark-Status bei Mammakarzinompatientinnen. Die Nachweishäufigkeit einzelner epithelialer Zellen im Knochenmark bei Verwendung des Antikörpers CK2 liegt bei etwa 27% - 45 % der untersuchten Patientinnen bei Mammakarzinom im Stadium M0 ^{(45) (46)}.

In dieser Arbeit wurde der Antikörper CK2 als „Standard“ Antikörper zur Detektion der disseminierten epithelialen Zellen eingesetzt und mit anderen für die Fragestellung potentiell geeigneten Antikörpern hinsichtlich Spezifität und Sensivität verglichen. Damit sollten wesentliche Voraussetzungen für die Erarbeitung einen standardisierten methodischen Protokolls geschaffen werden.

Über diese methodischen Fragestellungen hinausgehend wurden die disseminierten epithelialen Tumorzellen bezüglich ihrer Östrogenrezeptorexpression durch immunzytochemische Doppelfärbung charakterisiert. Es handelt sich dabei um eine klinisch relevante Fragestellung, da es noch unklar ist, warum 20-40 % der Mammakarzinome trotz positiver Rezeptoren nicht auf eine endokrine Therapie reagieren, während immerhin noch 10 % der rezeptorennegativen Tumoren dies tun ⁽⁶³⁾. Es soll geklärt werden, ob Patientinnen, die einen Östrogenrezeptor-positiven Status im Primärtumor zeigen, ebenfalls einen positiven Östrogenrezeptor-Status der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark haben. Unterschiede im Expressionsmuster der Zellen des Primärtumors

und der residualen Tumorzellen im Knochenmark, könnten ein Grund für den unbefriedigenden Erfolg der antihormonellen Therapie des Mammakarzinoms sein.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In diese Arbeit wurden 114 Patientinnen im Alter von 27 bis 86 Jahren aufgenommen, die wegen eines Mammakarzinoms operiert wurden. Die operative Therapie der Patientinnen erfolgte in der Chirurgischen Klinik Großhadern, dem Kreiskrankenhaus Reichenbach, in der Abteilung für Plastische Chirurgie des Krankenhauses III. Orden und im Kreiskrankenhaus Starnberg.

Die Knochenmarkpunktion wurde intraoperativ durchgeführt. Die Einwilligung hierzu wurde nach einem entsprechenden Aufklärungsgespräch schriftlich mit der Einverständniserklärung zur Operation erteilt.

Primärtumor

In diese Gruppe wurden nur Patientinnen, die eine operative Primärtherapie bei histologisch gesichertem Mammakarzinom erhielten, eingeschlossen.

Rezidiv

In diese Gruppe wurden Patientinnen mit Lokalrezidiven oder Fernmetastasen aufgenommen.

Nachpunktate

Nachpunktate wurden zur Analyse des Knochenmark-Status im Verlauf zu verschiedenen Zeitpunkten nach der operativen Primärtherapie und gegebenenfalls nach Abschluss einer adjuvanten systemischen Therapie durchgeführt.

Kontrollgruppe

In diese Gruppe gingen zwei Patientinnen ein, die wegen eines klinischen oder mammographischen Verdachtes auf ein Mammakarzinom operiert wurden, bei denen aber der endgültige histopathologische Befund keinen Anhalt für Malignität ergab.

Perioperativ wurden bei den Patientinnen die von der *Projektgruppe Mammakarzinom* des Tumorzentrums München empfohlenen Staging-Untersuchungen (Röntgen-Thorax, Oberbauchsonographie, Skelettszintigraphie und Bestimmung der Tumormarker CEA, CA-15-3) durchgeführt.

Für jede Patientin wurden sowohl obligate als auch fakultative patienten-, tumor- und therapiebezogene Parameter erhoben.

Obligat war die Erhebung der Daten zu: pT-Klassifikation, pN-Klassifikation, Differenzierungsgrad, histologischem Tumortyp, Tumorstadium, Östrogenrezeptor-Status und Progesteronrezeptor-Status im Tumorgewebe.

Die histopathologischen Parameter wurden routinemäßig durch das Institut für Pathologie der LMU-München bestimmt und beinhalteten die Infiltrationstiefe des Primärtumors (pT-Stadium), das Vorliegen von axillären Lymphknotenmetastasen (pN-Stadium) bzw. Fernmetastasen ([p]M-Stadium), den histologischen Tumortyp und das Grading sowie den Hormonrezeptor-Status. Bei der Auswertung und Klassifizierung der Daten wurde in der vorliegenden Studie die pTNM-Klassifikation nach UICC 2002 zugrundegelegt⁽¹³⁵⁾. Das histopathologische Grading zur Beurteilung des Differenzierungsgrades invasiver Mammakarzinome erfolgte nach der Klassifikation von Bloom und Richardson in der Modifikation nach Elston und Ellis⁽³⁾.

Die Nachweisbarkeit von Resttumor nach dem chirurgischen Eingriff (R-Klassifikation) wurde nach der Auswertung der vorgenannten histopathologischen und klinischen Befunde ebenfalls entsprechend den UICC-Richtlinien von 2002 beurteilt⁽¹³⁵⁾.

Die Steroidhormonrezeptorbestimmung erfolgte im Hormonrezeptorlabor der Frauenklinik des Klinikum Großhadern in quantitativen Enzymimmunoassays (ER–EIA und PR–EIA). Die Grenzwerte für die Beurteilung eines positiven oder negativen Rezeptorstatus liegen bei dieser Methode bei 10 fmol/mg Protein. Alternativ bzw. bei nicht ausreichendem Material für die biochemische Analyse wurde die Hormonrezeptorbestimmung im Institut für Pathologie semiquantitativ nach dem immunreaktiven Score von Remmele und Stegner ⁽¹²³⁾ durchgeführt. Dieser Score berücksichtigt Färbintensität und Prozentsatz positiver Zellen. Den Empfehlungen des Tumorzentrum München entsprechend, wurde ein Prozentsatz positiver Zellen von 10% als Grenzwert zwischen positivem und negativem Hormonrezeptor-Status festgelegt.

2.2 Auswahl des Antikörpers

Zur Detektion der ins Knochenmark disseminierten epithelialen Zellen wurde in dieser Arbeit der gegen die Zytokeratinkomponente Nr. 18 gerichtete monoklonale Antikörper CK2 verwendet. Weitere Analysen wurden mit den Antikörpern A45-B/B3 und CK22 durchgeführt. Der Antikörper A45-B/B3 ist gegen die Zytokeratinkomponenten Nr. 8, 18, 19 gerichtet. Der Antikörper CK22 ist ein Pan-Zytokeratinmarker, der mit Zytokeratin Nr. 19, 18, 16, 15, 14, 8, 7, 6,10, 5, 4, 3, 2, 1 reagiert ⁽⁹⁹⁾.

2.3 Gewinnung und Aufarbeitung der Knochenmarkaspirate

Nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung der Patientinnen, wurde die Punktion des Knochenmarkes intraoperativ unter Vollnarkose durchgeführt. Aus den beiden anterioren spinae iliacae superiores wurden pro Punktion zwischen 5 ml und 10 ml Knochenmark in eine mit EDTA beschichtete Plastikspritze aspiriert, in einem Mischverhältnis von 0,5 ml Di-Natrium AEDTA 1.107 % pro 2 ml Aspirationsvolumen.

2.3.1 Material

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung):				
werden in 10 l aqua dest unter Rühren gelöst und auf den pH 7,4 eingestellt.				
Menge	Substanz	Firma	Art.-Nr.	Land
80 g	NaCl	Fluka	71380	Schweiz
2 g	KCl	Fluka	60130	Deutschland
2 g	KH ₂ PO ₄	Merk	4873.1000	Deutschland
4,2 g	Na ₂ HPO ₄	Merk	6580	Deutschland
Erythrozyten-Lyse-Puffer				
werden in 1 l aqua dest unter Rühren gelöst				
Menge	Substanz	Firma	Art.-Nr.	Land
0,0372 g	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Fluka	03620	Schweiz
1 g	CHKO ₃	Fluka	60340	Schweiz
8,3 g	CIN ₄ N	Fluka	09700	Schweiz
Weitere Materialien				
Menge	Substanz	Firma	Art.-Nr.	Land
	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan*	Merk	8387	Deutschland
	Trypan Blue Solution 0,5 %	Serva	47285	Deutschland
1,077 g/ml	Pancoll®	PAN	P04-60500	Deutschland

* pH-Wert mit HCl auf 9,4 einstellen

Tabelle 1: Eingesetzte Materialien für die Aufarbeitung der Knochenmarkaspirate

2.3.2 Methode

Die Aspirate wurden jeweils in sterile 50 ml Caps mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (Bremse, 4°C, 1200 U/Min, 7 Minuten), um das EDTA und Fett abzutrennen. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das Sediment resuspendiert und auf 30 ml mit PBS aufgefüllt. Diese Probe wurde nun in einem neuen 50 ml Cap, das bereits mit 20 ml Pancoll® gefüllt war, sehr langsam und sorgfältig überschich-

tet. Es war darauf zu achten, die Pipette mit dem verdünnten Knochenmark schräg an der Röhrenwand und kurz oberhalb des Flüssigkeitsspiegels anzusetzen, um eine Vermischung mit Pancoll[®] zu vermeiden. Durch Dichtegradientenzentrifugation (4°C, 2000 U/Min, 25 Minuten, keine Bremse) wurden die Bestandteile der Aspirate abgetrennt. Dabei zeigte sich folgender 4-phasiger Aufbau:

1. Phase: oberste Fettschicht und lösliche Verschmutzung.
2. Phase: INTERPHASE: mononukleäre Knochenmarkzellen und eventuelle Tumorzellen.
3. Phase: Pancoll[®].
4. Phase: Sediment.

Die Interphase und obere Phase wurden sorgfältig abpipettiert, in ein neues Röhrchen überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und durch Zentrifugation (Bremse, 4°C, 1200 U/Min, 7 Minuten) gewaschen. Der Überstand wurde abpipettiert und das entstandene Sediment mit 3 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer 3 Minuten lang vermischt, um Erythrozytenkontamination zu vermeiden. Danach wurde das Cap mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und die Zellen erneut durch Zentrifugation gewaschen (Bremse, 4, 1200 U/Min, 7 Minuten). Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in PBS auf ca. 5-10 ml Volumen resuspendiert.

2.3.3 Herstellen der Zytospin – Präparate

Die Bestimmung der Vitalität und der Gesamtzellzahl erfolgte wie folgend beschrieben: In einer Microtiterplatte wurden 30 µl der Zellsuspension und 30 µl Trypanblue-Lösung inkubiert. 30 µl davon wurden nach 3-5 min in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Vitalität der mononukleären Zellen wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{Anzahl vitale Zellen}}{\text{Anzahl vitale Zellen} + \text{Anzahl der toten Zellen}} \cdot 100$$

Die Vitalität der Zellpopulationen lag mindestens bei 95 %.

Die Erythrozyten wurden nicht mitgezählt. Ausgezählt wurden 16 Eckquadrate und ein Mittelwert gebildet.

Die Gesamtzellzahl errechnete sich aus folgender Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl } G \cdot 10^6 = M \cdot 2 \cdot V \cdot 10000$$

M : Mittelwert

2 : Verdünnung mit Trypan-Blue

V : Volumen der gesamten Suspension (ml)

10000 : Faktor der sich aus der Fläche der Neubauer-Zählkammer ergibt

Die isolierten Zellen wurden auf eine Konzentration von $0,5 \cdot 10^6 / \text{ml}$ eingestellt:

$$\text{Volumen (ml)} = \frac{0,5 \cdot 10^6 \cdot V}{G \cdot 10^6}$$

V : Volumen der gesamten Suspension (ml)

G : Gesamtzellzahl

Durch Zytozentrifugation (500 U/Min, 2 x 5 min) wurde dieses Volumen auf die Objektträger aufgebracht. Von jeder Beckenkampfpunktion wurden je nach Quantität der Suspension, 6 bis 12 Zytospinspräparate, mit je $0,5 \cdot 10^6$ Zellen angefertigt und bei Raumtemperatur 2-18 Stunden getrocknet. Trockene Zytopräparate, die nicht am selben Tag angefärbt wurden, wurden in Alufolie eingewickelt und bei -20°C aufbewahrt.

Falls aus technischen Gründen nur ein Beckenkampfpunkt zur Verfügung stand, wurde die doppelte Anzahl von Zytozentrifugepräparaten angefertigt, um die gleiche Gesamtzellzahl pro Patientin in die Auswertung einzubringen, nämlich $1 \cdot 10^6$ Zellen.

2.4 Herstellung von Präparaten der Zelllinie MCF-7

2.4.1 Material

Kulturmedien			
RPMI with Glutamax (500 ml)			
Reagenz	Firma	Art.-Nr.	Land
RPMI 1640 with Glutamax 500 ml	Gibco	61870-010	
Antibiotic-antimycotic 5 ml	Sigma	A9909	Deutschland
FBS 50 ml	Gibco	10270-106 (Lot.Nr.40G9185K)	
Natriumpyruvat	Sigma	S 8636	Deutschland
Einfriermedium			
Reagenz	Firma	Art.-Nr.	Land
80 % FCS + 20 % DMSO Zellsuspension (1:1)			
Trypsin / EDTA			
Reagenz	Firma	Art.-Nr.	Land
0,25 % Trypsin EDTA Solution (-20°C lagern, aliquotieren)	Sigma	T4094	Deutschland

Tabelle 2: Eingesetzte Materialien für die Herstellung von Kontrollpräparaten der Zelllinie MCF-7

2.4.2 Methode

1. In Stickstoff eingelagerte MCF-7 Zellen (ATCC HTB-22)⁽¹⁾ wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in RPMI 1640 Medium überführt und bei 1000U/min 7 Minuten lang zentrifugiert.

2. Der Überstand wurde abpipettiert.
3. Das Pellet wurde vorsichtig resuspendiert.
4. In einem weiteren Schritt wurde 1 ml des folgenden Mediums hinzugegeben:
 - RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Natriumpyruvat +
 - 1 % Antibiotic-Antimycotic Solution.
5. Die Anzahl der vitalen Zellen wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.
6. Mindestens Zellen/ml wurden in einer kleinen Kulturflasche eingesetzt.
7. Die Zellen wurden mehrmals passagiert.

Die Zytopinspräparaten wurden mit je $0,05 \cdot 10^6$ Zellen wurden angefertigt.

2.5 APAAP-Färbung unter Verwendung des Antikörpers CK2

2.5.1 Material

Reagenz	Firma	Art.-Nr.	Land
Aceton	Fluka	00570	Schweiz
AB-Serum	Biotest	805135	Deutschland
PBS (Abschnitt 2.3.1)	-	-	-
Kaisers-Glycerin-Gelatine	Merk	9242	Deutschland

Tabelle 3: Eingesetzte Materialien für APAAP-Färbung

Neufuchsin-Färbelösung				
Lösung 1				
Menge	Substanz	Firma	Art.-Nr.	Land
90 g	Levamisole	Sigma	L-9756	Deutschland
62,5 ml	Tris-Puffer	Merk	8387	Deutschland
Lösung 2				
Menge	Substanz	Firma	Art.-Nr.	Land
50 mg	Natrium-Nitrit	Sigma	3421	Schweiz
1 ml	aqua dest	-	-	-
0,5 ml	New Fuchsin 5 % (in 2N HCl)	Sigma	N 0638	Deutschland
Lösung 3				
Menge	Substanz	Firma	Art.-Nr.	Land
125 mg	Naphtol-AS Biphosphat	Sigma	N-2250	Deutschland
1,5 ml	N, N-Dimethyl- formamid	Fluka	40250	Schweiz

Tabelle 4: Zusammensetzung der Neufuchsin-Färbelösung

Bezeichnung	Antigen	Isotyp	Spezies	Protein Konzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
CK2	Zytokeratin ₁₈	IgG 1	Maus	20 µg/ml	0,08 µg/ml	Boeringer Mannheim Nr. 814385
W6/32	HLA1 (A,B,C)	IgG 2a	Maus	20 µg/ml	4µg/ml	Dianova Nr. 0107
MOPC 21	Maus-Ig	IgG 1	Maus	1100 µg/ml	2,75 µg/ml	Sigma Nr. M 9269
RαM	Maus-Ig	Polyklo- nal	Kanin- chen	3,5 mg/ml	0,14 mg/ml	Dakopatts Hamburg Nr. Z 259
APAAP	Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische Phosphatase	IgG 1	Maus	0,12 mg/ml	0,0012 mg/ml	Dakopatts Hamburg Nr. D 651

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die APAAP-Färbung

2.5.2 Immunzytochemische Färbungen

Die immunzytochemische APAAP-Färbung erfolgte nach dem Färbeprotokoll von Cordell⁽¹⁵⁾ bei Raumtemperatur.

Für jede Patientin wurden insgesamt 4 Präparate aus beiden Beckenkammpunktionen benutzt. Als Negativ-Kontrolle wurde die Isotypkontrolle MOPC verwendet, und der An-

tikörper W6/32 wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Zwei Präparate (je ein Präparat vom rechten und linken Beckenkamm) wurden mit dem Antikörper CK2 inkubiert.

Zur Kontrolle der Qualität der Färbung wurde als zweite Positiv-Kontrolle ein Präparat mit Zellen der Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 (ATCC HTB-22⁽¹⁾) mitgefärbt.

Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

1. Die Objektträger wurden in Aceton 7 Minuten lang fixiert, und luftgetrocknet.
2. Zur Absättigung unspezifischer Fc-Rezeptoren, wurden alle Zytospins mit AB-Serum 10 % (in PBS verdünnt) überschichtet, und in einer zugedeckten feuchten Kammer 20 Minuten lang inkubiert.
3. Nach Abkippen des Überstandes der Präparate, wurde die überschüssige Flüssigkeit um das Präparat herum abgetupft.
4. Nun erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper (s. o.)
5. 3 x 5 Minuten waschen in PBS.
6. Inkubation aller Präparate mit Kaninchen-anti-Maus-Brückenantikörper (R α M) in einer zugedeckten feuchten Kammer 30 Minuten lang.
7. 3 x 5 min waschen in PBS.
8. Inkubation mit APAAP Komplex für 30 Minuten zugedeckt in einer feuchten Kammer.
9. 3 x 5 Minuten waschen in PBS.
10. Die Färbung erfolgte mit der Neufuchsinmethode unter Verwendung von:
Lösung A: 0,090 g Levamisole wurde in 62,5 ml Tris-Puffer-Lösung gelöst.
Lösung B: 0,050 g Natriumnitrit wurde in 1 ml aqua dest und 1,5 ml Neufuchsin gelöst.
Lösung C: 0,125 g Naphtol AS-Biphosphat wurde in 1,5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst.

Lösung A wurde mit Lösung B gemischt. Anschließend wurde Lösung C dazu gegeben. Die endgültige Mischung wurde filtriert. Die Präparate wurden in eine Standkuvette umgesetzt und unter leichter kontinuierlicher Bewegung auf dem Schüttler 20 Minuten lang gefärbt.

11. 3 x 5 min waschen in PBS.
12. Die gefärbten Präparate wurden nass mit Kaisers-Glycerin-Gelatine eingedeckt und anschließend ausgewertet.

2.5.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher, ohne Vorkenntnisse der klinischen Daten der Patientinnen. Beide Beckenkämme wurden separat beurteilt. Der Nachweis epithelialer Einzelzellen, sowie der von Zellclustern, erfolgte qualitativ und quantitativ unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 10, Zeiss, Jena). Die Anzahl CK2 positiver Zellen pro $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Patientin wurde bestimmt. Die CK-18 positiven Zellen wurden an der Rotfärbung des Zytoplasmas erkannt und mindestens eine Zelle epithelialer Ursprungs musste angefärbt sein, um das Ergebnis als positiv zu beurteilen. In Abbildung 1 wird exemplarisch ein positives Präparat gezeigt. Pro Färbung mussten die Positiv-Kontrollen W6/32 und MCF-7 eine eindeutige Anfärbung des Zytoplasmas zeigen, und die Negativ-Kontrolle MOPC eindeutig ohne Farbreaktion sein.

Abbildung 1: CK18-positive Zellen im Knochenmark einer Mammakarzinompatientinnen



Legende: 320faches Hellfeld: Rot gefärbte CK-18-positive Zellen und nicht gefärbte mononukleäre Zellen

Die CK-18 Zellen zeigten sich nicht nur als Einzelzellen, sondern auch als Zellcluster. Ein Cluster ist dabei definiert als mindestens zwei eng aneinanderliegende Zellen ohne erkennbaren interzellulären Abstand ⁽⁴⁶⁾.

2.6 Immunzytochemische Färbung mit dem Epimet Kit A45

2.6.1 Material

Reagenz	Firma	Art.-Nr.	Land
Epimet (Epithelial Cell Detection Kit)	Baxter	FAR 9863	Deutschland
Epimet Fixation Solution B	Baxter	FAR 9864	Deutschland
PBS (Abschnitt 2.3.1)			
Kaisers-Glycerin-Gelatine	Merk	9242	Deutschland

Tabelle 6: Epimet Kit A45: Eingesetzte Materialien

2.6.2 Methode

Der Epimet KIT A45 wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers eingesetzt:

1. Pro Patientin wurden zwei Präparate aus beiden Beckenkammaspiraten sowie ein Präparat als Negativ-Kontrolle verwendet.
2. Eine Positiv-Kontrolle MCF-7 (ATCC HTB-22) ⁽¹⁾ wurde erstellt.
3. Permeabilization: 1 ml Lösung A wurde mit 100 ml PBS sorgfältig gemischt, auf die Präparate in eine Standküvette gebracht und 5 Minuten lang inkubiert.
4. Fixierung: 1,35 ml Solution B wurde mit 100 ml PBS sorgfältig gemischt.
5. Die Lösung A wurde abgekippt. Lösung B wurde auf die Präparate gebracht und 10 Minuten inkubiert.
6. 3 x 3 Minuten waschen in PBS

7. Inkubation mit dem Antikörper A45-B/B3 für 45 Minuten. Pro Präparat sowie auf die Positiv-Kontrolle wurde 247.5 µl Solution D mit 2.5 µl Solution C langsam gemischt und aufgebracht.
8. Auf die Negativ-Kontrolle wurde pro Kontrolle 247.5 µl Lösung D und 2.5 µl Lösung C-NC aufgebracht.
9. 3 x 3 Minuten waschen in PBS.
10. Färbung: für jeden Objektträger wurden 1,5 µl Lösung F mit 0,6 µl Lösung G gemischt und für 3 Minuten inkubiert.
11. 300 µl Lösung E wurden mit 3 µl Lösung H gemischt und zur vorherigen Mischung hinzugefügt.
12. Die endgültige Mischung wurde auf alle Präparate aufgebracht und 10 Minuten lang inkubiert.
13. 3 x 3 Minuten waschen in PBS.
14. Eindeckung mit Kaisers-Glycerin-Gelatine

2.6.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben.

2.7 APAAP-Färbung nach Verwendung von Antikörper CK22

2.7.1 Material

Antikörper						
Bezeichnung	Antigen	Isotyp	Spezies	Protein-konzentration	Arbeits-konzentration	Hersteller
CK22™	Zytokeratin 19, 18, 16, 15, 14, 8, 7, 6, 10, 5, 4, 3, 2, 1	IgG 1	Maus	800-900 mg/ml	30mg/ml	Biomeda Nr. V3022

Tabelle 7: Beschreibung der Antikörper für APAAP-Färbung unter Verwendung von Antikörper CK22

2.7.2 Methode

Die nachfolgend beschriebene Methode „APAAP-Färbung nach Verwendung von Antikörper CK22“ variiert zum Ansatz „APAAP-Färbung nach Verwendung von Antikörper CK2“ (siehe Abs. 2.5).

Die Objektträger wurden 5 Minuten lang in Aceton fixiert und luftgetrocknet. Danach erfolgte die Inkubation mit AB-Serum 10 %, sowie mit dem **monoklonalen Antikörper CK22**, Kaninchen-anti-Maus-Brückenantikörper (R α M) und APAAP Komplex. Die Färbung erfolgte mit der Neufuchsinmethode (Abschnitt 2.5.2).

2.7.3 Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte wie unter Abschnitt 2.5.3 beschrieben.

2.8 CK2-Biotinilierung

2.8.1 Material

Zur CK2-Biotinilierung werden folgende Materialien und Geräte benötigt:

- Beckman Ultrazentrifuge, Model J–21B, Katalog Nr. 336795
- Beckman Rotortyp JA–0, Serien Nr. 1610
- Amicon Zentrifugeneinsätze: Centrion “C von 30“, Probenauffanggefäß
- Kleines verschraubbares Glasgefäß (z. B. leeres Antikörpergefäß)

Folgende Lösungen wurden verwendet:

- **Biotinlösung:** 10 mg D-Biotinyl-E-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimides-ter (Boeringer Mannheim, 50 mg, Best. Nr. 1008960) in 2 ml DMF (N, N-Dimethylformamid, Fluka, Best. Nr. 40250) in einem kleinen Glasgefäß lösen.
- **CK2–Stammlösung:** 1 ml CK2 (1 mg/ml PBS/10 % AB-Serum, Boehringer) ca. 20 ml steriles PBS (Elektolyt-Grundlösung, Fresenius-AG, Bad Homburg) ca. 10 ml steriles PBS + 0,1 % (d. h. 1ml/ml) Natriummazid (Merk, Art. Nr. 6688).

2.8.2 Methode

1. 1 ml CK2–Stammlösung wurde in ein Glasgefäß gegeben. Hinzu kamen 50 ml der Biotinlösung. Mit Aluminium wurde das Glasgefäß verdunkelt und 18-24h geschüttelt.
2. *I. Ultrazentrifugation:* 1 ml CK2-Biotin-Ansatz + 500 µl steriles PBS wurden bei 5500 U/min 45 Minuten lang zentrifugiert. Mit 500 µl PBS wurde der letzte Rest des CK2-Biotin-Ansatzes aus dem Gefäß gespült.

3. Der Unterstand wurde mit dem abzentrifugierten Biotinyl verworfen. Am AK Überstand müssen noch ca. 40 µl Flüssigkeit verbleiben, um den AK gegen Austrocknung zu schützen.
4. Der AK wurde in 1 ml sterilem PBS auf einem Vortex-Schüttler resuspendiert.
5. *II. Ultrazentrifugation:* das 1 ml Resuspensat wurde bei 5500 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert.
6. Der Unterstand wurde mit dem abzentrifugierten Biotinyl verworfen.
7. Der AK wurde auf einem Schüttler in 1 ml sterilem PBS resuspendiert.
8. *III. Ultrazentrifugation:* das 1 ml Resuspensat wurde bei 5500 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert.
9. Der Unterstand wurde mit dem abzentrifugierten Biotinyl verworfen. Am AK Überstand müssen noch ca. 40 µl Flüssigkeit verbleiben, um den AK gegen Austrocknung zu schützen.
10. Das endgültige Probenauffanggefäß wurde auf das obere Röhrchenteil gesetzt. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Röhrchen umgedreht gehandhabt.
11. Es folgte die Zugabe von 500 µl PBS auf die Oberseite der Membran.
12. Es wurde die Resuspension auf dem Schüttler durchgeführt.
13. *IV. Zentrifugation:* Die 500 µl Resuspensat wurde 5 Minuten lang bei 1000 U/Min zentrifugiert.
14. Die abzentrifugierten 500 µl Resuspensat wurden in das endgültige AK-Aufbewahrungsgefäß gegeben.
15. Erneut wurden 500 µl PBS auf die Oberseite der Membran hinzugegeben.
16. Danach erfolgte die Resuspension auf einem Schüttler.
17. *V. Zentrifugation:* die 500 µl Resuspensat wurden bei 1000 U/Min 5 Minuten lang zentrifugiert.
18. Die abzentrifugierten 500 µl Resuspensat wurden in das endgültige AK-Aufbewahrungsgefäß gegeben.
19. Aliquotierung des biotinierten AKs je 200 µl bei -20°C.

2.9 Doppelfärbung mit dem Antikörper CK2 und dem Anti-Östrogenrezeptor Antikörper

2.9.1 Material

Reagenz	Firma	Art.-Nr.	Land	Protein-konzentra-tion	Arbeitskon-zentration
Aceton	Fluka	00570	Schweiz	-	-
AB-Serum	Biotest	80513	Deutschl.	-	-
Monoclonal Mouse Anti Human Estrogen Recep-tor	Dako	M7047	Dänemark	35,2 mg/ml	1,17 mg/ml
Alkaline Phosphatase-Conjugated streptavidin	Dianova	29140	Deutschl.	5µl/ml	0,025 µl/ml
Auroprobe™One GAM (1 mn gold labelled goat anti mouse IgG)	Amers-han	RPN 471	England	20µl/ml	0,4 µl/ml
Normal Mouse Serum	Dianova	015-000-001	Deutschl.	50mg/ml	1 mg/ml
Biotiniliert CK2 (Abs. 2.8)	-	-	-	-	-
Intense™M silver enhancement kit	Amers-han	RPN 491	England	-	-
MOPC 21	Sigma	M 9269	Deutschl.	1,1 mg/ml	0,01 mg/ml als CK2-Kontrolle und 0,011 mg/ml – als ÖR- Kontrolle
Neufuchsin-Färbelösung (Abs. 2.5.2)	-	-	-	-	-
Kaisers-Glycerin-Gelatine	Merk	9242	Deutschl.	-	-
APAAP-Färbung (Abs. 2.5.2)	-	-	-	-	-

Tabelle 8: Eingesetzte Materialien für die Doppelfärbung CK2 / Östrogenrezeptor

2.9.2 Doppelfärbungsmethode : APAAP / Streptavidin / Immunogold - Standardprotokoll

Für jede Patientin wurde pro Beckenkammseite ein Präparat benutzt. Für den Fall, dass die Präparate nur aus einer Beckenkammseite gewonnen wurden, wurden zwei Präparate aus derselben Probe gefärbt.

Zur Kontrolle der Qualität der Färbung wurden drei MCF-7 Kontrollen (ATCC HTB-22⁽¹⁾), erstellt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die MCF-7 Zellen Östrogenrezeptor positiv sind⁽¹⁾.

- MCF-7 Kontrolle: CK2 / Östrogenrezeptor
 - MCF-7 Kontrolle: CK2 / MOPC
 - MCF-7 Kontrolle: Östrogenrezeptor / MOPC
1. Alle Objektträger wurden 5 Minuten in Aceton fixiert und luftgetrocknet.
 2. Zur Absättigung unspezifischer Fc-Rezeptoren wurden alle Objektträger mit 10 % AB-Serum überschichtet und 20 Minuten lang inkubiert.
 3. Inkubation mit dem ersten Primärantikörper Östrogen für alle Präparate, mit Ausnahme der MCF-7 Kontrolle CK2 / MOPC für 1 Stunde.
 4. 3 x 5 Minuten waschen in PBS.
 5. Inkubation mit 1nm gold labelled goat anti mouse auf allen Zytospins für 30 Minuten.
 6. 3 x 5 Minuten waschen in PBS.
 7. Inkubation mit 5 % Mausserum auf allen Präparaten für 20 Minuten.
 8. Nach Abkippen des Überstandes von diesen Präparaten erfolgte die Inkubation mit dem zweiten biotinierten Primärantikörper CK2 auf allen Präparaten für eine Stunde, mit Ausnahme der Kontrolle mit dem Östrogenrezeptor/MOPC. Diese Kontrolle wurde mit MOPC (1:100) überschichtet.

9. 3 x 5 Minuten lang waschen in PBS.
10. Inkubation mit Alkaline Phosphatase conjugated Streptavidin für 30 Minuten.
11. 3 x 5 Minuten waschen in PBS.
12. Die Färbung erfolgte mit der Neufuchsinmethode (s. Abschnitt 2.5.2)
13. 3 x 5 Minuten waschen in PBS.
14. Für 30 - 90 Minuten wurden Reagenz A + B (1:1) auf die Zytospins aufgetragen. Es wurde darauf geachtet, das Reagenzgemisch A + B spätestens nach 30 min. frisch anzusetzen und aufzutragen, da die Mischung nur in einem bestimmten Zeitraum verwendbar ist. Die Entwicklung der Reaktion mit dem Silver Enhancement Reagenz A + B ist von der Raumtemperatur abhängig. Steigt die Raumtemperatur, so reduziert sich der Zeitraum der Reaktion.
15. Zytospins wurden in aqua bidest gespült, um die Reaktion abubrechen.
16. Präparate wurden mit Kaisers-Glycerin-Gelatine nass eingedeckt und ausgewertet.

Die Beurteilung der Präparate mit dieser Färbungsmethode ist mit Schwierigkeiten verbunden, da die Färbeintensität der enzymatischen Färbung durch die Entwicklung mit dem Immunogold-Färbung überlagert wurde. Um reproduzierbare, eindeutig auswertbare Färbeergebnisse zu erreichen, wurde eine Modifikation des Protokolls vorgenommen.

2.9.3 Protokollmodifikation der Doppelfärbungsmethode

Die Methode wurde zum Nachweis der Östrogenrezeptorexpression auf disseminierten epithelialen Einzelzellen variiert. Die folgenden Modifikationen dienen zur Optimierung der Kombination APAAP/Immunogold. Die Färbungsmethode APAAP/Streptavidin wurde als Anwendungsmethode ausgewählt, da diese bereits in unserer Arbeitsgruppe mit Erfolg eingesetzt wurde.

Zur Kontrolle der Qualität der Färbung wurden vier Kontrollen aus der Mammakarzinom Zelllinie, MCF-7 (ATCC HTB-22⁽¹⁾), erstellt:

- MCF-7 Kontrolle: CK2 / Östrogenrezeptor
- MCF-7 Kontrolle: MOPC / Östrogenrezeptor
- MCF-7 Kontrolle: CK2 / MOPC
- MCF-7 Kontrolle: W6/32

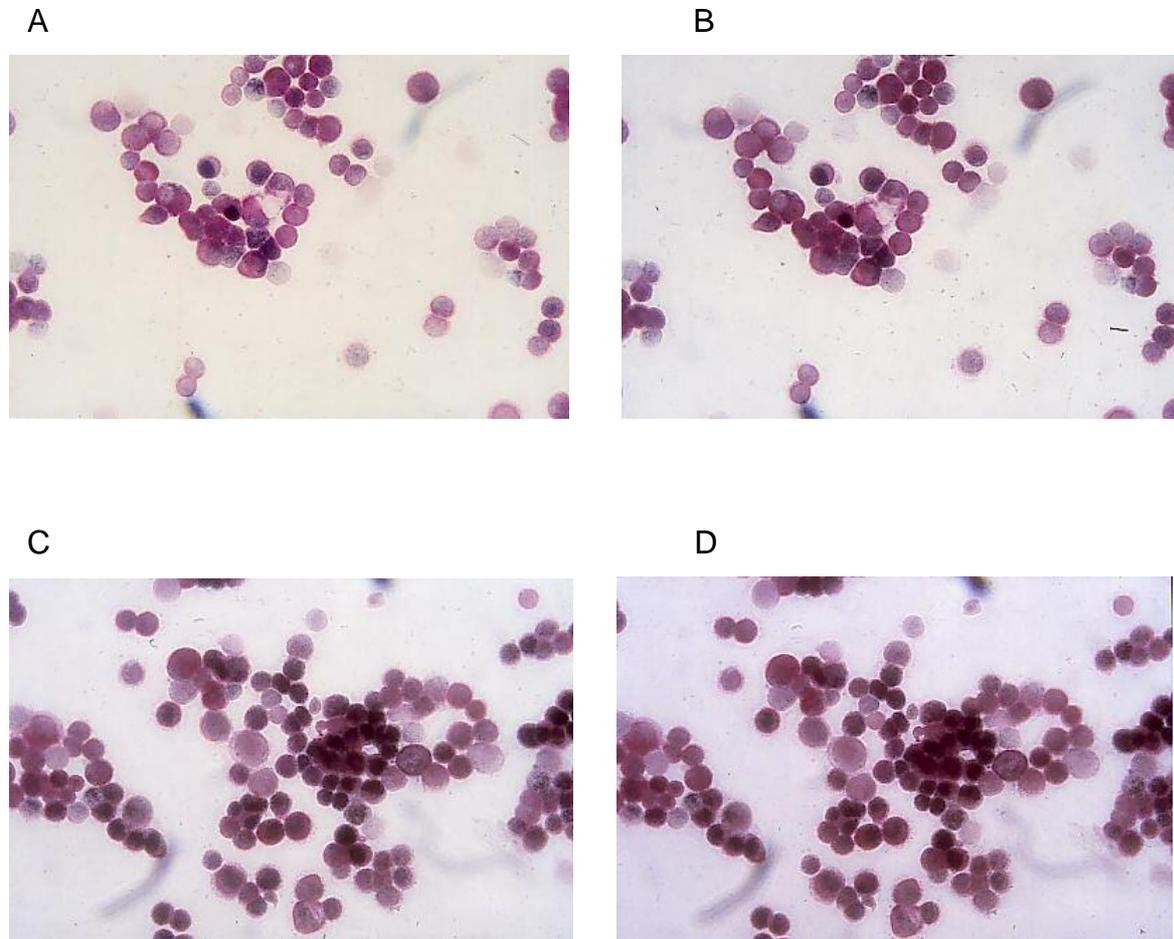
Zuerst erfolgte die Inkubation mit dem AB-Serum 10 %, dem Antikörper CK2, dem Kaninchen-anti-Maus-Brückenantikörper (R α M) und dem APAAP Komplex. Die Färbung erfolgte mit der Neufuchsinmethode (Abschnitt 2.5.2). Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem Östrogenrezeptor und dem Gold-labelled-goat-anti-mouse-Komplex. Die Reaktion wurde durch den Intense TMM silver enhancement Kit sichtbar gemacht.

2.9.4 Auswertung

In beiden Färbungsmethoden wurden die Zellen durch den Antikörper CK2 rot angefärbt und gleichzeitig durch den Gold-labelled-goat-anti-mouse-Komplex körnig schwarz angefärbt, so dass eine Doppelfärbung nachzuweisen war. Die Positivkontrolle CK2/Östrogenrezeptor zeigte eine eindeutig rot/schwarze Anfärbung der Zellen, die Kontrolle MOPC/CK2 dagegen nur die Rotfärbung des Zytoplasmas, während die Kontrolle Östrogen/MOPC nur eine schwarze Anfärbung der Zellen zeigte. Es wurde jeweils die Anzahl CK2/Östrogenrezeptor positiver Zellen pro $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Patientin unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 10, Zeiss, Jena) ermittelt.

Mit der vorgenommenen Protokollmodifikation der Doppelfärbungsmethode wurde eine starke Färbeintensität sowohl für die enzymatische Färbereaktion als auch für die Immunogold Färbung erreicht.

Abbildung 2: MCF-7 Präparat: CK18-positive - Östrogenrezeptor-positive MCF-7 Zellen



Legende: 320faches Hellfeld: Schwarz-rot gefärbte MCF-7 Zellen

Bild A: Entwicklungslösung nach 1 Stunde und 10 Minuten

Bild B: Entwicklungslösung nach 1 Stunde und 12 Minuten

Bild C: Entwicklungslösung nach 1 Stunde und 20 Minuten

Bild D: Entwicklungslösung nach 1 Stunde und 22 Minuten

2.10 Qualitätskontrolle der Doppelfärbungsmethode

Um die Spezifität der Färbung zu sichern wurde geprüft, ob eventuell Zellen der Hämatopoese ein falsch-positives Ergebnis liefern.

2.10.1 Material

Reagenz	Firma	Art.-Nr.	Protein Konzentration	Arbeitskonzentration	Land
Leucocyte Common Antigen	Dako	M0701	14 mg/ml	0,14 mg/ml	Dänemark
Biotin Rabbit anti mouse für APAAP u. POX	Dianova	315-065-048	1,3 mg/ml	0,013mg/ml	Deutschland

Tabelle 9: Eingesetzte Materialien für die Protokollmodifikationen der Doppelfärbungsmethode

2.10.2 Erste Qualitätskontrolle der Doppelfärbungsmethode: PBL als Negativkontrolle

Die folgend beschriebene Methode "Erste Qualitätskontrolle der Doppelfärbungsmethode: PBL als Negativkontrolle" variiert zum Ansatz „Doppelfärbungsmethode : APAAP / Streptavidin / Immunogold - Standardprotokoll“ (siehe Abs. 2.9.2).

Es handelt sich bei diesem Protokoll um eine weitere Methodenoptimierung. Die Doppelfärbung besteht aus einer Kombination aus der Alkalischen Phosphatase Streptavidin Färbung und der Immunogold Färbung (Abs. 2.9.2).

Zur Überprüfung der Qualität der Färbung wurden drei Kontrollen, MCF-7 (ATCC HTB-22⁽¹⁾), wie bei bei Abschnitt 2.9.2 beschrieben, erstellt. Gleichzeitig wurden PBL (Peripheral Blood Lymphocytes) als Negativkontrolle benutzt:

- PBL Kontrolle: Östrogenrezeptor / M0701
- PBL Kontrolle: MOPC / M0701
- PBL Kontrolle: Östrogenrezeptor/ MOPC

* M0701 = Leucocyte Common Antigen

Zunächst erfolgte die Inkubation mit dem ersten Primärantikörper Östrogen, 1nm gold labelled goat anti mouse, 5 % Mausserum, und dem biotinierten Primärantikörper CK2. Danach erfolgte die Inkubation (für alle PBL Präparate) mit dem Leucocyte Common Antigen-Antikörper und Biotin Rabbit anti mouse sowie die Inkubation mit Alkaline Phosphatase conjugated Streptavidin. Die Färbung erfolgte mit der Neufuchsinmethode (Abschnitt 2.5.2) Die Reagenz A + B wurden 1:1 auf die Zytospins aufgetragen. Aqua bidest wurde benutzt, um die Reaktion abzurechen.

2.10.3 Zweite Qualitätskontrolle der Doppelfärbungsmethode : APAAP-Färbung statt APAAP/Streptavidin

Eine weitere Untersuchung, die es ermöglicht, die Sensitivität und Spezifität der Doppelfärbung zu prüfen, wurde durchgeführt. Eine einfache APAAP-Färbung unter Verwendung des Antikörpers CK2 erfolgte mit MCF-7-Zellen sowie mit PBL Präparaten. Im Anschluss an die Färbung wurde an der Hälfte der Präparate die Doppelfärbung mit dem Östrogenrezeptor-Antikörper durchgeführt. Die andere Hälfte der Präparate wurde direkt mit Kaisers-Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

Zur Kontrolle der Qualität der Färbung wurden vier Kontrollen, MCF-7 (ATCC HTB-22⁽¹⁾), eingesetzt. Als negative Kontrollen wurden PBL (Peripheral Blood Lymphocytes) benutzt. Zuerst erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper CK2, Inkubation aller PBL Präparaten mit Leucocyte Common Antigen, die Inkubation für alle Präparate mit Kaninchen-anti-Maus-Brückenantikörper (R α M) und APAAP Komplex sowie die Färbung mit der Neufuchsinmethode. Danach Inkubation mit dem Antikörper gegen den Östro-

genrezeptor, 1nm gold labelled goat anti mouse. Reagenz A + B wurde 1:1 auf die Zytospins aufgetragen.

2.10.4 Lagerungsfähigkeit der gefärbten Präparate und Wiederfindungsrate der CK-18 positiven Zellen

Bereits gefärbte und über unterschiedliche Zeiträume eingelagerte Präparate mit nachgewiesenen CK-18 positiven Zellen wurden entdeckelt und morphologisch intakte Zellen auf ihre Östrogenrezeptorexpression hin untersucht. Hierfür mußte zunächst die Lagerungszeit festgestellt werden nach der noch eindeutige Antigenexpressionsmuster festgestellt werden können. Insgesamt wurden 46 eingelagerte Präparate mit CK18-positiven Zellen im Primärscreening entdeckt.

Insgesamt 12 Präparate, neun Präparate aus dem Jahr 1992 bis 1995, zwei Präparate aus dem Jahr 1998 und 1999 und ein Präparat, das nicht älter als 6 Monate war (2001), wiesen nach Lagerung bei Raumtemperatur intakte Zellen in einem guten Zustand auf. 18 Objektträger waren nicht auswertbar. Diese stammten ohne Ausnahme aus dem Jahr 1990 bis 1992. Zusammenfassend zeigte sich, dass alle Präparate, die älter als 9 Jahre waren, nicht mehr ausgewertet werden konnten. Die Zellen waren ausgetrocknet und zeigten keine intakte Morphologie.

Bei 34,7 % aller untersuchten Präparate mit einer Lagerungszeit bis zu 7 Jahren war die Wiederfindung intakter CK18-positiven Zellen möglich.

2.10.5 Doppelfärbung an asservierten Präparaten

Bei der nachträglichen Doppelfärbung mit dem Östrogenrezeptor-Antikörper an asservierten, bereits CK18 gefärbten Präparaten wurde wie folgt verfahren:

Zur Kontrolle der Qualität der Färbung wurden positive Kontrollen, MCF-7 (ATCC HTB-22) erstellt. Als negative Kontrollen wurden PBL (Peripheral Blood Lymphocytes) benutzt. Vorerst erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper CK2, Leucocyte Common Antigen, Kaninchen-anti-Maus-Brückenantikörper (R α M), APAAP Komplex und die Färbung mit der Neufuchsinmethode. Die gefärbten Präparate wurden nass mit Kaisers-Glycerin-Gelatine eingedeckt und eingelagert. Die Präparate wurden in einer Standküvette mit PBS gefüllt bei Temperatur von 37°C gebracht, bis die Deckel der Präparaten abgelöst wurden. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper Östrogen, mit 1nm gold labelled goat anti mouse. Reagenz A + B wurde 1:1 auf die Zytospins aufgetragen.

2.10.6 Auswertung

Die Anzahl CK2/Östrogen positiver Zellen pro $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Patientin wurde unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 10, Zeiss, Jena) ausgewertet. Die Zellen wurden durch den Antikörper CK2 rot angefärbt und gleichzeitig durch den Gold Labelled Goat Anti Mouse-komplex körnig schwarz angefärbt, so dass eine Doppelfärbung nachzuweisen war. Die Positivkontrolle MCF-7 CK2/Östrogenrezeptor zeigte eindeutig eine rot/schwarze Anfärbung der Zellen, die Kontrolle MCF-7 MOPC/CK2 dagegen nur die Rotfärbung des Zytoplasmas, während die Kontrolle MCF-7 Östrogen/MOPC nur eine schwarze Anfärbung der Zellen zeigte.

Die PBL Kontrolle M0701/ Östrogenrezeptor zeigte eine Rotfärbung der Zellen. Die Kontrolle M0701/ MOPC zeigte nur die Rotfärbung der Zellen. Die Kontrolle MOPC/ Östrogenrezeptor zeigte keine Anfärbung der Zellen. Alle Kontrollen zeigten keinerlei schwarz Anfärbung der Zellen durch den Östrogenrezeptor-Antikörper.

2.11 Doppelfärbung A45-B/B3 - Östrogenrezeptor

Zur Etablierung der Doppelfärbung mit A45-B/B3 und dem Östrogenrezeptor wurden drei verschiedene Modifikationen APAAP / Streptavidin / Immunogold - Standardprotokolle getestet, um das bestgeeignete methodische Vorgehen zu erarbeiten.

Bei der ersten Modifikation erfolgte zunächst die Permeabilization, Fixierung und Inkubation mit dem Antikörper A45-B/B3 und die Färbung entsprechend dem Protokoll des kommerziell erhältlichen Kits. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen den Östrogenrezeptor und mit 1nm gold labelled goat anti mouse. Reagenz A + B wurden auf die Zytospins aufgetragen.

Bei dem II. Färbungsprotokoll der Doppelfärbung A45-B/B3 / Östrogenrezeptor erfolgte die Inkubation in der Reihenfolge: Östrogenrezeptor-Antikörper; 1nm gold labelled goat anti mouse und mit dem Antikörper A45-B/B3. Im Anschluss daran erfolgte die Färbung. Reagenz A + B wurden auf die Zytospins aufgetragen.

Bei der III. Modifikation erfolgte die Inkubation mit Östrogenrezeptor, 1nm gold labelled goat anti mouse, 5 % Mausserum, sowie mit dem Antikörper A45-B/B3, Biotin Rabbit Anti-mouse, und Alkaline Phosphatase conjugated Streptavidin. Danach erfolgte die Färbung mit der Neufuchsinmethode. Reagenz A + B wurde auf die Zytospins aufgetragen.

2.11.1 Auswertung

Im Bezug auf die Doppelfärbung A45-B/B3 – Östrogenrezeptor zeigte nur das III. Färbungsprotokoll eine eindeutige Auswertbarkeit der Präparate. Die Benutzung von Biotin Rabbit Antimouse für die APAAP-Färbung ermöglichte eine Doppelfärbung der Zellen. Die Auswertung der Präparate erfolgte wie unter Abschnitt 2.9.4 beschrieben.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden die Knochenmarkaspirate von 114 konsekutiv rekrutierten Patientinnen mit einem Mammakarzinom analysiert. Es handelte sich dabei entweder um Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, einem Rezidiv der Erkrankung oder einer Punktion während der Nachsorge. Bei zwei Patientinnen ergab der definitive histopathologische Befund eine benigne Veränderung, so dass sie als Kontrollgruppe aufgeführt werden (Tabelle 10).

Mammakarzinom	Patienten		M0 - Patienten	
	n = 114	%	n = 96	%
Primärtumor	84 / 114	73,7	75/96	78,1
Rezidiv	17 / 114	15,0	10/96	9,4
Nachpunktat	11/114	9,6	8/96	10,4
Kontrollgruppe	2 / 114	1,7	2/96	2,1

Tabelle 10 Untersuchtes Patientkollektiv

Von den 84 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom waren 75 frei von Fernmetastasen (Stadium M0). In der Gruppe der Patientinnen mit einem Rezidiv waren 10/17 und bei den nachpunktierten Patientinnen 8/11 Frauen frei von Metastasen.

Mammakarzinom	CK-18 positive Zellen im Gesamtkollektiv		CK-18 positive Zellen im M0 Kollektiv	
	(n = 114)	%	(n = 96)	%
Primärtumor	5 / 114	4,4	5 / 96	5,2
Rezidiv	4 / 114	3,5	2 / 96	2,1
Nachpunktat	1 / 114	0,9	0	
Kontrollgruppe	0		0	

Tabelle 11 Knochenmark-Status in den Gruppen

Bei 10/114 Patientinnen des Gesamtkollektivs wurden CK-18 positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen (8,8%). In der Gruppe der metastasenfrenen Patientinnen sinkt die Positivitätsrate auf 7,3% (n=7).

In der Gruppe der Patientinnen mit einer Nachpunktion zu einem beliebigen Zeitpunkt der Nachsorge fand sich bei keiner der Patientinnen ein positiver Knochenmark-Status. Es handelte sich um Patientinnen, bei denen die Punktion im Rahmen einer erneuten Operation durchgeführt wurde. Bei drei Patientinnen ging es dabei um den Ausschluss eines Lokalrezidives und bei den weiteren fünf Patientinnen wurde ein Wiederaufbau der Brust vorgenommen.

3.1 Verteilungsmuster klinisch-pathologischer Parameter und des Knochenmark-Status

Im Gesamtkollektiv liegt die Prävalenz eines positiven Knochenmark-Status bei M0 Patienten bei 7,3%. In Tabelle 2 ist die Korrelation des Knochenmark-Status mit etablierten Parametern dargestellt.

3.2 pTNM Stadium im gesamten M0 Kollektiv:

pT	Patienten		Knochenmark-Status CK-18 +
	n = 96	%	
pT1 ohne nähere Angabe	6	6,2	0
pT1a	4	4,4	0
pT1b	8	8,3	1
pT1c	27	28,1	3
pT2*	33	34,3	3
pT3	3	3,1	0
pT4a	0	0,0	0
pT4b	2	2,1	0
pT4c	1	1,0	0
keine Angabe	12	12,5	0
pN	Patienten		CK-18 +
	n = 96	%	
pNX	3	3,1	1
pN0*	54*	56,3	3
pN1a	2	2,0	0
pN1bi	8	8,3	2
pN1bii	1	1,0	0
pN1biii	10	10,4	0

pN1b IV	4	4,3	1
pN2	1	1,0	0
pN3	0	0,0	0
keine Angabe	13	13,6	0
Grading	Patienten		CK-18 +
	n = 96	(%)	
G1	6	6,2	0
G2*	46*	48,0	6
G3	24	25,0	1
keine Angabe	20	20,8	0
Tumortyp	Patienten		CK-18 +
	n = 96	%	
Dukt. Ca in situ	4	4,2	0
Lobuläres Ca in situ	2	2,1	0
Inv. dukt. Ca	42*	43,8	5
Inv. dukt. Ca mit intradukt Anteil	23	23,9	1
Lobuläres Ca	5	5,1	0
Andere histol. Ca	7	7,2	0
keine Angabe	13	13,5	1
Stadium	Patienten		CK-18 +
UICC	n = 96	%	
0	4	4,3	0
I	30	31,2	2
IIa*	31	32,3	2
IIb	11	11,4	2
IIIa	3	3,1	0
IIIb	3	3,1	0
IV	0	0,0	0
keine Angabe	14	14,6	1
Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe	Patienten		CK-18 +
	n = 96	%	
Östrogenrezeptor negativ	20	20,8	0
Östrogenrezeptor positiv	62	64,6	7
keine Angabe	14	14,6	0
Progesteronrezeptor-Status im Tumorgewebe	Patienten		CK-18 +
	n = 96	%	
Progesteronrezeptor negativ	22	22,9	0
Progesteronrezeptor positiv	60	62,5	7
keine Angabe	14	14,6	0
Rezeptor-Status im Tumorgewebe	Patienten		CK-18 +
	n = 96	%	
Hormonrezeptor-Status negativ	13	13,5	0
Hormonrezeptor-Status positiv	67	69,8	7
keine Angabe	16	16,7	0

Tabelle 12 pTNM-Klassifikation im M0 Gesamtkollektiv

pT-Klassifikation

Im untersuchten Patientenkollektiv hatte die Mehrheit der Tumoren (34,3%) einen Durchmesser zwischen 2 - 5 cm, gefolgt von Tumoren mit einer Infiltrationstiefe von 1- 2 cm (Stadium pT1c; 28,1%). Am häufigsten kamen Primärtumoren des Stadiums pT1 vor. Insgesamt war bei 45 Patientinnen der Primärtumor kleiner als 2 cm (47%). Nur bei 3,1 % der Patienten war der Tumordurchmesser größer als 5 cm (Stadium pT3). Größere Tumoren wurden in diesem Kollektiv nicht erfasst.

pN-Klassifikation

Bei 54 Patientinnen (56,3 %) waren die axillären Lymphknoten tumorfrei. Bei 23 Patientinnen lag die Anzahl der infiltrierten Lymphknoten zwischen 1-3 (23,9 %) und bei 7 Patientinnen wurden 4-9 infiltrierte Lymphknoten nachgewiesen (7,3 %). Bei 4 Patientinnen wurden mehr als 9 infiltrierte Lymphknoten nachgewiesen (4,2 %).

Differenzierungsgrad

Ein hoher Differenzierungsgrad des Tumorgewebes (G1) wurde in nur 6 Patienten (6,2 %) beschrieben. 46 Patienten (48 %) zeigten ein mäßig differenziertes (G2) Tumorgewebe. Bei 24 Patienten (25 %) wurde ein schlecht differenziertes (G3) Tumorgewebe festgestellt.

Tumortyp

Das invasiv duktales Mammakarzinom war mit 43,8 % der häufigste histologische Tumortyp im Patientenkollektiv. Bei weiteren 23,9 % der Patienten wurde ein invasiv duktales Karzinom mit einem intraduktalen Anteil nachgewiesen. In der Literatur wird das invasiv duktales Mammakarzinom mit einer Häufigkeit von 65-80 % ⁽¹⁰⁴⁾ angegeben.

UICC-Klassifikation

Die Mehrheit der Patientinnen ist nach der UICC-Klassifikation im Stadium I-II der Erkrankung. Die Tabelle 2 zeigt, dass 30 Patienten (31,2 %) in das Tumorstadium I und 31 Patienten (32,3 %) in das Tumorstadium IIa zu klassifizieren sind.

Hormonrezeptor-Status im Tumorgewebe

69,8 % der Patienten zeigten einen positiven Hormonrezeptor-Status und 13,5 % einen negativen Hormonrezeptor-Status. Bei 16,7% der Patientinnen waren keine Angaben zum Hormonrezeptor-Status verfügbar. Dieses Ergebnis bezieht sich auf die zusammenfassende Beurteilung beider Hormonrezeptoren, d. h. gemeinsam auf den Östrogen-, und den Progesteronrezeptor-Status.

3.3 Korrelation des Knochenmark-Status mit etablierten klinisch-pathologischen Parametern

Der Zusammenhang zwischen dem Knochenmark-Status und den klinisch-pathologischen Parametern des M0 Kollektives wird in der folgenden Tabelle dargestellt. Der p-Wert wurde mittels chi-square Test berechnet. Die Werte $p \leq 0.05$ gelten als signifikant

pT	Patienten		Knochenmark- Status CK-18 +	Chi-Square p =
	n = 96	%		
≤ pT1c	45	46,9	4 (8,9)	n.s.
≥ pT2	51	53,1	3 (5,9)	
pN	Patienten		CK-18 +	Chi-Square p =
	n = 80	%		
nodalnegativ	54	67,5	3 (5,5)	n.s.
nodalpositiv	26	32,5	3 (11,5)	
Grading	Patienten		CK-18 +	Chi-Square p =
	n = 76	(%)		
G1	6	7,9	0 (-)	0,0008
G2-G3	70	92,1	7 (10,0)	
Tumortyp	Patienten		CK-18 +	Chi-Square p =
	n = 83	%		
DCIS / LCIS	6	7,2	0 (-)	0,06*
Invasiv duktal	42	50,6	5 (11,9)	
Invasiv duktal mit intraduktalem Anteil	23	27,7	1 (4,3)	
Anderer histolog. Typ	12	14,5	0 (-)	
Stadium UICC	Patienten		CK-18 +	Chi-Square p =
	n = 82	%		
0	4	4,9	0 (-)	n.s.
≤ IIa	61	74,4	4 (6,5)	
≥ IIb	17	20,7	2 (11,7)	
Östrogenrezeptor- Status	Patienten		CK-18 +	Chi-Square p =
	n = 82	%		
negativ	20	24,4	0 (-)	0,0007
positiv	62	75,6	7 (11,3)	
Progesteronrezeptor- Status	Patienten		CK-18 +	Chi-Square p =
	n = 82	%		
negativ	22	26,8	0 (-)	0,0003
positiv	60	73,2	7 (11,6)	
Hormonezeptor- Status	Patienten		CK-18 +	Chi-Square p =
	n = 96	%		
negativ	13	16,3	0 (-)	0,0008
positiv	67	83,7	7 (10,4)	

Tabelle 13 Korrelation des Knochenmark-Status mit den klinisch-pathologischer Parametern

Legende: n.s.: nicht signifikant

* : Tendenz

(-): keine CK-18 Zellen

pT-Klassifikation

Weder bei Tumoren kleiner als 2 cm noch bei Tumoren größer als 2 cm zeigte sich eine signifikante Korrelation mit dem Knochenmark-Status. Die Dichotomisierung der pT-Klassifikation wurde aufgrund der zunehmenden Anzahl von kleineren Tumoren in \leq pT1c und \geq pT2 eingeteilt.

pN-Klassifikation

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Knochenmark-Status und dem Nodalstatus konnte nicht festgestellt werden.

Differenzierungsgrad

Patientinnen mit G2-G3 Tumoren wiesen signifikant häufiger einen positiven Knochenmark-Status auf als Patientinnen mit G1 Tumoren.

Tumortyp

Es zeigte sich, dass Patientinnen mit einem invasiv duktalem Karzinom gegenüber Patientinnen mit invasivem duktalem Karzinom mit intraduktalem Anteil tendenziell häufiger einen positiven Knochenmark-Status aufweisen.

UICC-Klassifikation

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Knochenmark-Status und dem UICC-Stadium fand sich nicht.

Hormonrezeptor-Status im Tumorgewebe

Es fand sich sowohl eine signifikante Korrelation von positivem Östrogenrezeptor-Status und positivem Knochenmark-Status ($p = 0,0007$) wie auch eine Korrelation von positivem Progesteronrezeptor-Status und positivem Knochenmark-Status ($p = 0,0003$). Patientinnen mit positivem Hormonrezeptor-Status zeigen häufiger einen positiven Knochenmark-Status als solche mit negativem Hormonrezeptor-Status ($p = 0,0008$).

3.4 Der Vergleich der Spezifität und Sensivität der Antikörper CK2, A45-B/B3 und CK22

Zum Zeitpunkt der operativen Therapie wurde das Knochenmark von 114 Mammakarzinompatientinnen auf disseminierte epitheliale CK18-positive Zellen untersucht. Nur bei 10 von 114 Patientinnen (8,8 %) des Gesamtkollektives wurden immunzytochemisch CK18-positive Zellen im Knochenmark nachgewiesen.

Um die Spezifität und Sensitivität des Antikörpers CK2 im Vergleich mit anderen Anti-Zytokeratin-Antikörpern zu untersuchen, wurden bei -20°C asservierte Präparate derjenigen Patienten, bei denen im Primärscreening keine CK-18 positiven Zellen festgestellt worden waren, eingesetzt. Hierbei wurden der Antikörper A45-B/B3, der gegen die Zytokeratinkomponenten Nr. 8, 9,18 gerichtet ist und der monoklonale Antikörper CK22, der gegen die Zytokeratinkomponenten Nr. 19, 18, 16, 15, 14, 8, 7, 6, 10, 5, 4, 3, 2, 1 gerichtet ist, verwendet.

Da nicht von allen Patientinnen Präparate in ausreichender Anzahl zur Verfügung standen, stimmt die Anzahl der jeweils mit den Antikörpern A45-B/B3 und CK22 untersuchten Patientinnen nicht überein.

Bei jeder Patientin wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Anti-Zytokeratinantikörper mit der unter Material und Methoden beschriebenen APAAP-Färbung analysiert, so dass sich die Färbungen nur hinsichtlich des eingesetzten Antikörpers A45-B/B3 (Abs. 2.6) bzw. CK22 (Abs. 2.7) zur Detektion der ins Knochenmark disseminierten epithelialen Zellen unterschieden.

Bei 13 von 83 Patientinnen (15,7%), deren Knochenmarkaspirate mit dem Antikörper A45-B/B3 untersucht wurden, waren A45-B/B3-positive Zellen nachweisbar.

Die Beurteilung erfolgte nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ, d.h. es wurde die Anzahl A45-B/B3-positiver Zellen pro $1 \cdot 10^6$ untersuchter Zellen ausgezählt. Dabei

schwankte die Anzahl A45-B/B3-positiver Zellen pro $1 \cdot 10^6$ untersuchter Zellen zwischen einer bis zu 57 Zellen.

Es wurde ebenfalls berücksichtigt, ob A45-B/B3-positiven Zellen als Einzelzellen oder als Zellcluster vorlagen. In der Literatur werden 2 Typen von Zellclustern definiert. Typ 1 Cluster wurden dabei als Verbund aus maximal zehn Zellen und der Typ II Cluster als mehr als zehn Zellen ohne lichtmikroskopisch erkennbaren Interzellularraum definiert (46).

Die unterschiedliche Cluster- und Einzelzellverteilung der 13 Patientinnen, bei denen A45-B/B3-positive Zellen nachzuweisen waren, wird in der Tabelle 14 dargestellt. Insgesamt wurden 66 A45-B/B3-positive Einzelzellen, 45 Zellcluster mit einer Anzahl zwischen 2 und 10 Zellen und 3 Zellcluster mit mehr als 10 Zellen beobachtet.

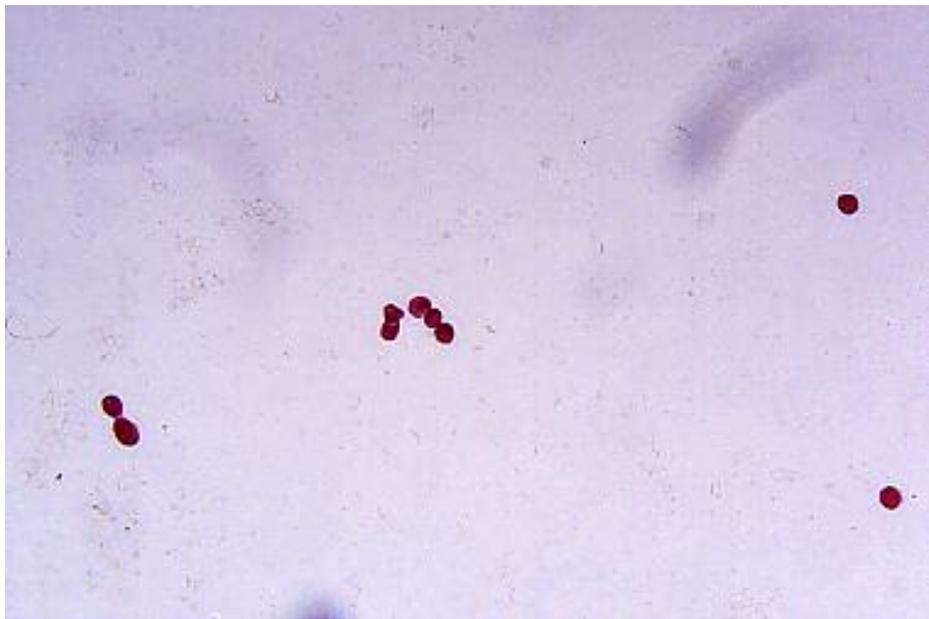
Pat. Nr.	EZ	Cluster Typ 1	Cluster Typ 2	Gesamtzellzahl
3297	2	1	-	6
3298	-	1	-	2
3325	1	3	-	12
3328	-	2	-	5
3329	14	8	1	57
3339	7	7	-	29
3343	-	1	-	4
3344	10	9	-	37
3353	17	8	1	53
3358	9	4	1	32
3369	1	-	-	1
3390	3	-	-	3
3391	2	1	-	5

Tabelle 14 Einteilung der A45-B/B3-positiver Zellen

Legende: EZ : Einzelzellen
 - : keine Einzelzellen/Zellcluster nachgewiesen
 Cluster Typ I : Zellcluster mit weniger als zehn Zellen
 Cluster Typ II: Cluster mit mehr als 10 Zellen

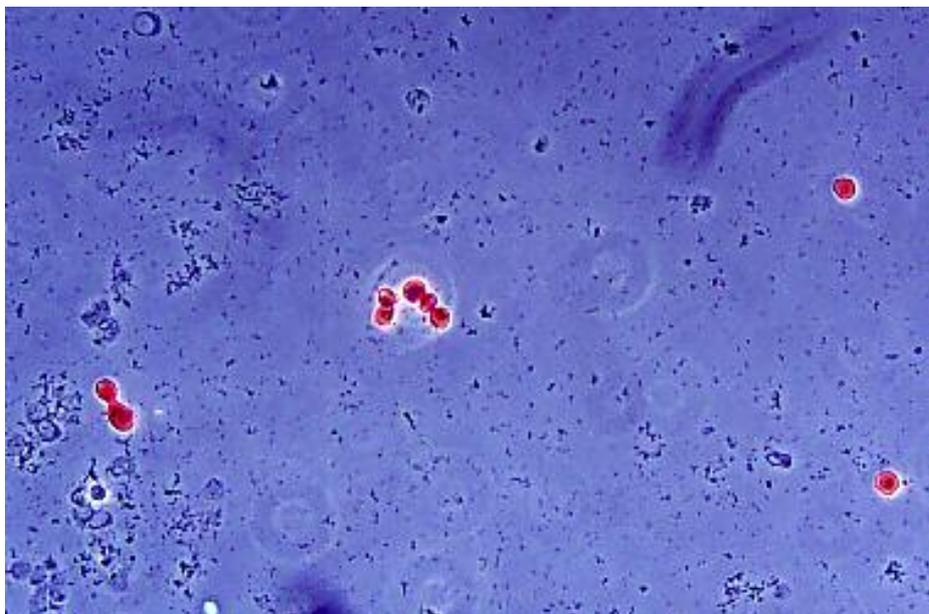
Im Vergleich zu den Untersuchungen mit den Antikörpern CK2 und CK22 fiel bei der lichtmikroskopischen Auswertung eine stärkere Intensität der Rotfärbung der A45-B/B3-positiven Zellen auf. Auffallend war ebenfalls das Verteilungsmuster der positiven Zellen in den Präparaten. Bei der mikroskopischen Auswertung zeigte sich, dass die Mehrheit dieser Zellen in den Randbereichen der Präparate lokalisiert war. Bei der Untersuchung im Phasenkontrast ließ sich feststellen, dass viele der positiven Zellen keine intakte Zellmorphologie aufwiesen.

Abbildung 3a: Patientenpräparat: Disseminierte epitheliale A45-B/B3-positive Zellen im Knochenmark



Legende: 320fache Vergrößerung Hellfeld: Intensiv rot gefärbte A45-B/B3-positive Zellen im Randbereich des Präparates

Abbildung 4b: Patientenpräparat: Disseminierte epitheliale A45-B/B3-positive Zellen im Knochenmark



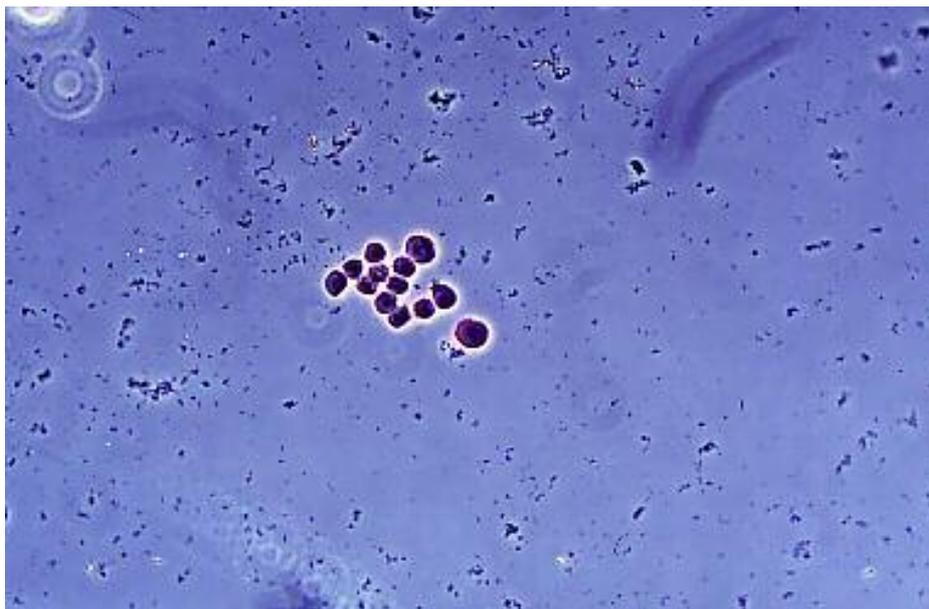
Legende: 320fache Vergrößerung Phasenkontrast: Intensiv rot gefärbte A45-B/B3-positive Zellen im Randbereich des Präparates

Abbildung 5a: Patientenpräparat: A45-B/B3-positive Zellen ohne intakte Zellmorphologie im Knochenmark (im Randbereich des Präparates lokalisiert)



Legende: 320facheVergrößerung Hellfeld: Intensiv rot gefärbte A45-B/B3-positive Zellen im Randbereich des Präparates

Abbildung 6b: Patientenpräparat: A45-B/B3-positive Zellen ohne intakte Zellmorphologie im Knochenmark (im Randbereich des Präparates lokalisiert)



Legende: 320fache Vergrößerung Phasenkontrast: Intensiv rot gefärbte A45-B/B3-positive Zellen im Randbereich des Präparates

3.4.1 CK22 Expressionsmuster im Knochenmark der untersuchten Patientinnen

Zytospinspräparate der Knochenmarkaspirate von 57 Patientinnen, bei denen im Primärscreening keine CK-18 positiven Zellen nachgeweisbar waren, wurden mit dem Antikörper CK22 gefärbt und ausgewertet. Insgesamt wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Patientin untersucht. Obwohl verschiedene Färbungen zur Austestung der optimalen Arbeitskonzentration des Antikörpers CK22 durchgeführt wurden, zeigten einige Präparate einen erhöhten Background mit partieller unspezifischer Anfärbung des Zytoplasma der Zellen (Abs.2.7.3). Die Kontrollfärbungen für die Positiv- und Negativkontrolle waren jeweils eindeutig zu beurteilen. Ein vergleichbares Problem, den Background zu optimieren, stellte sich bei den Untersuchungen mit den Antikörpern CK2 (Abs. 2.5.3) und A45-B/B3 (Abs. 2.6.3) nicht.

In die definitive Auswertung gingen daher nur fünfzig Patientinnen ein, bei denen eine eindeutige Beurteilung möglich war. Bei sechs Patientinnen wurden CK22-positive Zellen festgestellt, dies entspricht einer Positivitätsrate von 12%. Die Quantität der nachgewiesenen CK22-positiven Zellen lag zwischen ein und zwei Zellen/Präparat. Insgesamt wurden sieben Einzelzellen beobachtet. Bei fünf Patientinnen wurde eine Einzelzelle und bei einer Patientin wurden zwei Einzelzellen nachgewiesen.

3.4.2 Vergleich der CK-18 und A45-B/B3 - Positivität im Knochenmark der untersuchten Patientinnen

Epitheliale Zellen wurden im Knochenmark von 10/114 (8,8%) Patientinnen im Primärscreening mit dem Antikörper CK2 nachgewiesen (Abs. 2.5).

Die Untersuchung mit dem Antikörper A45-B/B3 erfolgte bei insgesamt 83 Patientinnen, bei denen im Primärscreening keine CK-18 positiven Zellen nachweisbar waren. Bei 13/83 (15,7%) Patientinnen wurden A45-positive Zellen nachgewiesen. Die Untersuchung mit dem Antikörper A45-B/B3 zeigt damit im Vergleich zum Antikörper CK2 eine deutlich höhere Positivitätsrate. Allerdings erwies sich die Auswertung der Färbung mit dem Antikörper A45-B/B3 als schwieriger, da häufiger avitale Zellen ohne intakte Zellmorphologie angefärbt waren. Die Negativkontrolle der Färbung mit dem Antikörper A45-B/B3 zeigte keinen Unterschied zu den standardisierten Negativkontrollen der Färbung mit dem Antikörper CK2 (Abs.2.5.3).

3.4.3 Vergleich der CK-18 und CK22 - Positivität im Knochenmark der untersuchten Patientinnen

Im Vergleich zu der Färbung mit dem Antikörper CK2 (6/50) ergab sich auch für die Färbung mit dem Antikörper CK22 eine höhere Positivitätsrate (10/114; 8,8 % versus 6/50; 12 %).

Obwohl beide Färbungen nach der gleichen Färbungsmethode und mit identischen untersuchten Zellzahlen durchgeführt wurden (Abschnitt 2.5 und 2.6), war die Auswertung der Präparate nach Verwendung des Antikörpers CK22 wesentlich schwieriger, da durch die unspezifische Anfärbung des Zytoplasma ein hoher Background entstand.

3.4.4 Vergleich der A45-B/B3 und CK22 Positivität im Knochenmark der untersuchten Patientinnen

Aufgrund der geringen Anzahl der für diese Untersuchungen noch zur Verfügung stehenden Zytospinpräparate, war nur bei 44 Patientinnen ein direkter Vergleich der Färbeargebnisse mit den Antikörpern A45-B/B3 und CK22 möglich.

Bei 6/44 Patientinnen (13,6%) fanden sich disseminierte epitheliale Zellen, wobei sich nur bei einer Patientin (2,2%) sowohl CK22 wie auch A45-positive Zellen im Knochenmark nachweisen ließen. Bei den restliche 38 Patientinnen ließen sich weder mit dem einen noch mit dem anderen Antikörper epitheliale Zellen im Knochenmark nachweisen.

Patient-Nr	A45-B/B3	CK22
3297	positiv	negativ
3299	negativ	positiv
3322	negativ	positiv
3325	positiv	positiv
3339	positiv	negativ
3356	negativ	positiv

Tabelle 15: Sensivität des Antikörpers A45-B/B3 und CK22

Legende: Positiv: Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark

3.5 Einfluss der untersuchten Zellzahl auf den Knochenmark-Status

Weiterhin wurde überprüft inwieweit die Erhöhung der untersuchten Zellzahl die Positivitätsrate beeinflusst. Dabei wurde hinsichtlich immunzytochemischer Färbung und Auswertung ebenso verfahren wie unter Abschnitt 2.5 beschrieben.

Die Untersuchung mit einer erhöhten Zellzahl erfolgte erneut ohne Kenntnis der klinischen Daten der Patientinnen, so dass Patientinnen in unterschiedlichen Tumorstadien einbezogen wurden.

Verwendet wurden die Präparate derjenigen Patientinnen, bei denen im Primärscreening keine CK-18 positiven Zellen nachweisbar waren. Die Färbung erfolgte mit der vorbeschriebenen Methode (Abschnitt 2.5.2). Die Methode differiert lediglich in der Quantität der untersuchten Zellzahl, die von **1·10⁶ Zellen** auf **6·10⁶** erhöht wurde. Aufgrund der begrenzten Anzahl der Zytospinspräparate, war die Durchführung dieser Un-

tersuchung nur bei 40 Patientinnen möglich. Bei 4/40 dieser Patientinnen, die im Primärscreening keine CK-18 Zellen aufgewiesen hatten, wurden bei erneuter Untersuchung mit $6 \cdot 10^6$ Zellen CK18-positive Zellen gefunden.

Die Auswertung erfolgte erneut qualitativ und quantitativ. Die positiven CK-18 Zellen wurden erfasst und in Einzelzellen oder Zellcluster eingeteilt.

Die Zahl positiver Zellen pro Patientin lag zwischen 1-7 Zellen. Insgesamt wurden sieben Einzelzellen bei Präparaten der vier Patientinnen beobachtet. Ein Zellcluster bzw. Zellcluster die bis zehn epithelialen Zellen bestanden, wurden jeweils nur in zwei Präparaten nachgewiesen. In keinem der Präparate fanden sich Zellclusters mit mehr als zehn epithelialen Zellen.

Pat. Nr	EZ*	Cluster Typ 1	Cluster Typ 2	Total
3327	2	2	-	7
3361	3	-	-	3
3365	1	-	-	1
3389	1	-	-	1

Tabelle 16: Einteilung der CK-18 Zellen bei Untersuchungen mit erhöhter Zellzahl

Legende: EZ: Einzelzellen

- : kein Cluster

3.6 Einlagerungsfähigkeit der gefärbten Präparate und Wiederfindung der CK-18 positive Zellen

Um für die Durchführung von Doppelfärbungen auch auf asservierte und gefärbte Präparate mit intakten CK18-positiven Zellen zurückgreifen zu können, wurden Präparate aus verschiedenen Jahrgängen erneut untersucht. Insgesamt wurden 46 eingelagerte Präparate, die CK-18 Zellen aufgewiesen, zur Durchführung einer Doppelfärbung mit Östrogenrezeptor / CK2 entdeckt (Abs. 2.10.5).

Die im Primärscreening immunzytochemisch gefärbten CK18-positiven Zellen wurden bei 16 (34,8 %) Zytospinpräparaten erneut nachgewiesen. Insgesamt waren die Präparate von 30 Patientinnen (65,2%) nicht auswertbar. Die Zellen waren ausgetrocknet und zeigten keine intakte Morphologie oder waren nicht mehr auffindbar. Präparate die länger als sieben Jahre eingelagert waren, waren grundsätzlich nicht mehr verwertbar. Die individuelle Lagerungsqualität zeigten große Schwankungen.

Pat. Nr.	Jahr	CK2+	Auswertung
154	1990	14 re - 2 li	nicht auswertbar
160	1990	3 re - 4 li	nicht auswertbar
171	1990	7 re - 4 li	nicht auswertbar
177	1990	5 re - 2 li	nicht auswertbar
189	1990	1 re - 2 li	nicht auswertbar
214	1990	20 re - 6 li	nicht auswertbar
218	1990	9 re - 18 li	nicht auswertbar
230	1990	165 re - 179 li	nicht auswertbar
252	1990	6 re - 12 li	nicht auswertbar
313	1990	1 re - 3 li	nicht auswertbar
522	1991	2 re - 4 li	nicht auswertbar
549	1991	2 re - 2 li	nicht auswertbar
588	1991	5 re - 5 li	nicht auswertbar
590	1991	1 re - 1 li	nicht auswertbar
625	1991	0 re - 2 li	nicht auswertbar
799	1991	9 re - 3 li	nicht auswertbar
965	1992	1 re - 5 li	nicht auswertbar
980	1992	1 re - 6 li	nicht auswertbar
1031	1992	7 re - 7 li	nicht auswertbar
1047	1992	5 re - 5 li	nicht auswertbar
1240	1993	3 re - 1 li	nicht auswertbar
1329	1993	5 re - 5 li	nicht auswertbar
1391	1993	12 re - 1 li	nicht auswertbar
1537	1993	2 re - 2 li	nicht auswertbar
1601	1994	1 re - 2 li	nicht auswertbar
2088	1995	1 re - 0 li	nicht auswertbar
2107	1995	5 re - 1 li	nicht auswertbar
2144	1995	1 re - 1 li	nicht auswertbar
3088	1998	1 re - 3 li	nicht auswertbar
3449	2001	0 re - 1 li	nicht auswertbar
1474	1993	5 re - 6 li	1 EZ re/li *
1497	1993	1 re - 1 li	1 EZ li
1278	1993	1 re - 19 li	1 EZ re/li*
1547	1993	9 re - 4 li	1 EZ li
1601	1994	5 re - 6 li	1 EZ re

3088	1998	1	re	-	3	li	1 EZ li
3140	1999	15	re	-	2	li	2 EZ re/li*
3133	1999	1	re	-	2	li	2 Zellen (1Cluster) li
3336	2000	0	re	-	8	li	1 EZ re
3360	2000	1	re	-	0	li	1 EZ re
3389	2000	2	re	-	0	li	1 EZ re
3337	2001	6	re	-	2	li	6 EZ re
3327	2001	4	re	-	0	li	1 EZ re
3365	2001	1	re	-	0	li	1 EZ re
3402	2001	1	re	-	0	li	1 EZ re
3427	2001	17	re	-	0	li	2 EZ re

Tabelle 17: Auswertung der entdeckelten Präparaten

Legende: * : Knochenmarkaspirate wurden zusammen aufgearbeitet.

3.7 Der Vergleich des Östrogenrezeptor-Status des Primärtumors und der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

3.7.1 Expression des Östrogenrezeptors auf CK-18 positiven Zellen im Knochenmark im Vergleich zum Östrogenrezeptor-Status des Primärtumors

Bei insgesamt 18 Patientinnen mit positivem Knochenmark-Status war eine eindeutig beurteilbare Doppelfärbung (ÖR/CK18) durchführbar. Dieses Ergebnis der ÖR-Rezeptorexpression der disseminierten Tumorzellen wurde mit dem Östrogen-Rezeptorstatus im Tumorgewebe verglichen.

Pat. Nr.	Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe	Prozentsatz positiver Tumorzellkerne	Östrogenrezeptor-Status im Knochenmark
3336	negativ	0 **	positiv
3360	positiv	66%* (8/12)	negativ
3427	positiv	100 % * (12/12)	positiv
3449	positiv	50 % * (6/12)	negativ
3389	positiv	50 % * (6/12)	negativ
3133	positiv	50 % * (6/12)	positiv
3337	negativ	Keine Angabe	positiv
3140	positiv	18 **	positiv
3327	negativ	2 **	positiv
3365	negativ	3 **	negativ
3483	negativ	Keine Angabe	negativ
3402	negativ	Keine Angabe	negativ
1474	positiv	198 **	negativ
3088	positiv	Keine Angabe	positiv
1601	positiv	58 **	positiv
1497	positiv	16 **	positiv
1278	positiv	109 **	positiv
1547	negativ	Keine Angabe	negativ

Tabelle 18 Expression von Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und Knochenmark

Legende: * Immunhistochemische Untersuchung zur Bestimmung des Hormonrezeptor-Status.

** Untersuchung nach der Elisa-Methode

In der Doppelfärbung der CK18-positiven Zellen mit dem Östrogenrezeptor-Antikörper ließ sich bei zehn Patientinnen (55,6%) eine Expression des Östrogenrezeptors auf den CK18-positiven Zellen nachweisen. Bei den anderen acht Patientinnen (44,4%) konnte keine Expression des Östrogenrezeptors in diesen Zellen nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis wurde mit dem Östrogenrezeptor-Status im Primärtumor verglichen. Bei 11/18 (61,1%) Patientinnen stimmte der Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe mit dem Östrogenrezeptor-Status im Knochenmark überein. Bei 7/18 Patientinnen (38,9 %) ergaben sich Diskrepanzen zwischen dem Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und dem Östrogenrezeptor-Status im Knochenmark. Interessanterweise fanden sich bei drei Patientinnen mit Östrogenrezeptornegativem Primärtumor, Östrogenrezeptor-

positive disseminierte CK18-positive Zellen im Knochenmark. In vier Fällen waren die disseminierten CK18-positiven Zellen bei positivem Östrogenrezeptor-Status im Primärtumor Östrogenrezeptor-Status negativ (Tabelle 18).

4 Diskussion

4.1 Tumorbilogie und Terminologie

Auch aktuell gibt es noch keine terminologische Klarheit in diesem Arbeitsgebiet. „Disseminierte Tumorzellen, epitheliale Zellen, minimal residuale Erkrankung, okkulte Metastase und Mikrometastase“ sind Begriffe, die oft in der Literatur verwendet werden.

Die Bezeichnung „Mikrometastasierung“ ist nicht korrekt, da Mikrometastasen organisierte stromahaltige Zellverbände sind, die Anschluss an das Kapillarsystem gefunden haben und maximal 2 mm groß sind^{(32) (59)}. Der Nachweis von Mikrometastasen erfolgt durch histologische Methoden⁽⁵⁸⁾. Die minimale, residuale Erkrankung kann als Vorläufer-Stadium von Mikrometastasen betrachtet werden⁽¹¹²⁾.

Die Entstehung von Metastasen ist ein komplexer Prozess und wird durch den Verlust der Zelladhäsion initiiert. In normalen Geweben sind die Zellen durch membranständige Moleküle, Adhäsionsproteine und Integrine, an die benachbarten Zellen und Extrazellulärmatrix gebunden. Falls sich diese Zellen aus ihrem Verband lösen, so können sie durch Apoptose vernichtet werden. Die meisten Tumorzellen zeigen diese Eigenschaft nicht. Sie durchdringen die Basalmembran, gelangen durch die Endothelzellen in den Blutstrom und können die Sekundärorgane erreichen. Der Metastasierungsprozess wird durch Angiogenesefaktoren unterstützt^{(59) (73) (96) (101)}.

Die maligne Herkunft CK-positiver Zellen wurde durch die FISH-Analyse bestätigt, die Chromosomenaberrationen nachwies⁽¹⁰³⁾. Dennoch wurde der Nachweis, dass es sich bei epithelialen Zellen tatsächlich ausschließlich um Tumorzellen handelt, bis Dato nicht definitiv erbracht.

Der immunzytochemische Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark wird als sensibles Verfahren angesehen⁽¹⁰⁹⁾ und wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen während der letzten Jahre untersucht⁽⁴⁷⁾.

Die relativ leichte und gefahrlose Zugänglichkeit begründen den Einsatz des Knochenmarks als Kompartiment für die immunzytochemische Untersuchung disseminierter, epithelialer Zellen. Als integrierte Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen, die stabil exprimierte Merkmale auch in Tumorzellen sind, lassen sich Zytokeratine in einzelnen Tumorzellen durch den Einsatz von spezifischen, monoklonalen Antikörpern nachweisen ⁽¹¹⁶⁾.

Monoklonale Antikörper gegen Zytokeratine haben sich derzeit als geeigneteste Sonden zur Detektion einer minimal residualen Erkrankung etabliert ⁽¹⁴¹⁾. Unter ihrer Verwendung kann in ca. 20-30% der Knochenmarkaspirate von Karzinompatienten ohne klinisch manifeste Fernmetastasen immunzytochemisch eine minimal residuale Erkrankung nachgewiesen werden ⁽⁶⁶⁾. Die Spezifität der Zytokeratine ist im Vergleich zu anderen Antikörpern gegen „tumor-assoziierte Zelloberflächenantigene“ bedeutsam höher ⁽⁵⁾. Prä- bzw. postoperativ gewonnene Proben haben keinen Einfluss auf das Ergebnis der immunzytochemischen Detektionsrate ⁽¹¹²⁾.

Auch ein falsch-positiver Nachweis epithelialer Zellen in der immunzytochemischen Färbung von Kontrollpräparaten wird in der Literatur mehrmals beschrieben ^{(8) (115) (149)}. Borgen et al weisen darauf hin, dass das Vorhandensein seltener, hämatopoetischer Zellen die Zuverlässigkeit von immunzytochemischen Untersuchungen beeinflussen kann ⁽⁴⁾.

Als Alternative zu den immunzytochemischen Verfahren stehen molekulare Nachweismethoden mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) ^{(26) (116) (136) (139) (155) (156)} zur Verfügung, die derzeit methodisch optimiert werden ⁽¹³⁾. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-(FISH)-Technik dient zur Charakterisierung von CK-positiven Zellen auf genomischer Ebene im Knochenmark ⁽¹⁰³⁾. In der Literatur sind darüber hinaus immunomagnetische Verfahren zur Anreicherung der disseminierten epithelialen Zellen beschrieben ^{(41) (50) (140)}.

Schlimok ist der Meinung, dass die Verteilung epithelialer Zellen im Knochenmark nicht homogen ist ⁽¹³²⁾. Die disseminierten epithelialen Zellen könnten möglicherweise von

einem Reservoir von genetischen Zellvarianten stammen ⁽⁷⁴⁾. Kasimir-Bauer et al untersuchten die CK-positiven Zellen im Knochenmark von 128 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom. Bei 76% (97/128) der Patientinnen wurden beide Beckenkämme untersucht. Die Positivitätsrate dieser Patientinnen lag bei 37% (36/97). Bei 67% (24/36) dieser Patientinnen mit positivem Knochenmark-Status wurden CK-positive Zellen in nur einer der beiden untersuchten Beckenkämme nachgewiesen ⁽⁷¹⁾.

Zu dem Zeitpunkt der primären Diagnose weisen die disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark ein limitiertes Proliferationspotential auf ^{(51) (117)}. Der fehlende Nachweis von Proliferationsantigenen und der überwiegend nicht mitotisch aktive Zustand (G0-Phase) bei den Tumorzellen scheint ein Indikator dafür zu sein, dass diese Zellen „*dormant*“ und damit resistent auf die Behandlung mit einer Chemotherapie sind ^{(12) (62) (65) (80) (118)}. Daher sind systemische Therapien, die nicht nur gegen proliferierende Zellen, sondern auch gegen die sogenannten „*dormant cells*“ gerichtet sind, von großem Interesse.

Der adjuvante Einsatz von Antikörpern gegen die minimal residuale Erkrankung wäre in Kombination mit der Chemotherapie sinnvoll, da die Antikörpertherapie auch gegen sogenannte „*dormant cells*“ gerichtet und dessen Wirkung unabhängig von der Chemotherapieresistenz ist ⁽¹¹⁸⁾.

4.1.1 Knochenmark-Status als Tumorbioogischer Prognosefaktor

Trotz der Verbesserung des operativen und systemischen Vorgehens ist die Prognose von Mammakarzinompatientinnen durch das Auftreten eines Lokalrezidives oder einer Metastasierung weiterhin schlecht. Ursache hierfür könnte die frühzeitige Dissemination von Tumorzellen sein. Eine bessere Risikoabschätzung des Krankheitsverlaufes bezüglich eines erhöhten Metastasierungsrisikos wäre durch eine Früherkennung disseminierter Zellen möglich. Daten aus der Studie von Krag et. al. zeigen, dass 95% der Mam-

makarzinompatientinnen unabhängig von Tumorstadium zum Zeitpunkt vor dem operativen Eingriff Tumorzellen im Blut aufweisen ⁽⁷⁵⁾.

Das Vorhandsein einer minimal residualer Erkrankungen im Knochenmark von Patienten mit primär malignen, epithelialen Tumoren wie **Mamma-** ^{(2) (8) (10) (11) (16) (19) (24) (28) (29) (33) (153)}, **Magen-** ^{(46) (69) (87) (95) (111) (134)}, **Kolonrektal-** ^{(129) (133) (147) (151) (156)}, **Pankreas-** ^{(70) (126) (143) (144)}, **Lungen-** ^{(18) (44) (114) (117) (120) (138) (157)}, **Prostata-** ^{(26) (85) (92) (107) (148) (149) (150)}, **Gebärmutterhals-** ⁽⁶⁸⁾, **Ösophaguskarzinom** ⁽¹⁴²⁾ und **Neuroblastoma** ⁽¹⁰⁰⁾ wurde von mehreren Arbeitsgruppen immunzytochemisch nachgewiesen. Es gibt derzeit keinen Konsens in Bezug auf das genaue methodische Vorgehen und klinische Implikationen. Die Wertigkeit dieser Untersuchungen wird insbesondere bezüglich der adjuvanten Systemtherapie kontrovers diskutiert.

Die prognostische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark zum Zeitpunkt der primären Diagnose bei klinisch nicht metastasierten Mammakarzinompatientinnen wird in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert. Mehrere Arbeitsgruppen konnten eine Assoziation des Nachweises epithelialer Zellen im Knochenmark mit einer schlechteren Prognose der Erkrankung feststellen ^{(25) (28) (31) (46) (51) (56) (69) (88) (97) (107) (111) (149) (153)}. Andererseits haben eine Vielzahl von Publikationen diesen Zusammenhang nicht erkannt ^{(91) (95) (98) (122) (148) (156)}.

Die Ergebnisse einer Untersuchung an 1026 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 42 Monaten ergab, dass der Tumorzellnachweis ein hochsignifikanter und unabhängiger Prognosefaktor für das rezidivfreie und das Gesamtüberleben ist. Verglichen mit dem Nodalstatus ist der immunzytochemische Nachweis bei Frauen mit kleinem Mammakarzinom (T1) von größerer Bedeutung in Bezug auf das Auftreten einer subsequenter Metastasierung ⁽³¹⁾.

Der Nachweis epithelialer Zellen wird in der Literatur als unabhängiger Prognosefaktor beschrieben ^{(120) (150) (153)}. Solomayer et al weisen im Rahmen einer Untersuchung an 727 Patientinnen mit einer Nachbeobachtungszeit von 6,5 Jahren den Tumorzellnachweis als unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben nach ⁽¹³⁷⁾.

Mansi et al zeigten im Rahmen einer Follow-up-Studie nach 6 Jahren, dass der Tumorzellnachweis ein unabhängiger, prognostischer Faktor für die rezidivfreie Zeit und für das Gesamtüberleben darstellt ⁽⁹³⁾. Die Nachuntersuchung nach 12,5 Jahren von 350 Patientinnen hat gezeigt, dass der Tumorzellnachweis als prognostisch signifikant betrachtet werden darf, aber nicht als unabhängiger Faktor zu beurteilen ist ⁽⁹⁴⁾.

Die Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen scheint mit einem erhöhten Rezidivrisiko verbunden zu sein und kann eine Patientengruppe mit erhöhtem Rezidivrisiko identifizieren ^{(2) (91)}. Die Studie von Harbeck et al. bei 100 Frauen mit einem medianen Nachbeobachtungszeit von 34 Monaten zeigte eine Rezidivrate von 15% bzw. 39% bei Patientinnen mit negativen bzw. positiven Knochenmark-Status ⁽⁵⁶⁾. Der Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark ist ein prognostischer Faktor bei nodal-negativen Patientinnen ^{(10) (11)} und bei Patientinnen im Stadium I, II und III ⁽⁸⁾. Die Studie von Cote et. al ⁽¹⁷⁾ ergab bei der Untersuchung von 49 Patientinnen mit Tumorstadium I and II eine 2-jährige Rezidivrate von 3% bei Patientinnen ohne Knochenmarkbefund im Vergleich zu 33% bei Patientinnen mit positiven Knochenmark-Status.

Die Korrelation des Vorhandenseins epithelialer Zellen im Knochenmark als Indikator der Entwicklung von Metastasen wird in der Literatur beschrieben ^{(2) (29) (68) (91)}. Eine Studie mit 393 Patientinnen nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 5 Jahren ergab, dass ca. 65% der tumorzellpositiven Patientinnen keine Metastasen aufwiesen. Dennoch war die Prognose dieser Patientinnen schlechter als bei den tumorzellnegativen Patientinnen ⁽⁵¹⁾. Der Nachweis einer minimal residualen Erkrankung bei 65 Mammakarzinompatientinnen mit Rezidive bzw. Fernmetastasen ergab eine Positivitätsrate von 16% bzw. 73% ⁽⁶⁷⁾. Eine Studie nach einer medianen Nachbeobachtung von 9,5 Jahren untersuchte 39 Frauen und ergab eine Entwicklung von Fernmetastasen bei 83% der Patientinnen mit positivem Knochenmark-Status, verglichen mit 31% bei Patientinnen mit negativem Knochenmarkbefund ⁽²⁵⁾.

Auch die Korrelation des Knochenmark-Status nach Durchführung einer Chemotherapie wird in der Literatur beschrieben. Diese besagt, dass der Nachweis von CK-positiven

Zellen im Knochenmark nach der adjuvanten Chemotherapie mit einer schlechten Prognose assoziiert ist und möglicherweise die Vorhersage auf eine Subgruppe von Patientinnen mit einem geringeren Gesamtüberlebenszeitraum erlaubt ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁵⁾. Eine Studie von Kvalheim et al zeigte, dass, verglichen mit dem Nachweis CK-positiver Zellen vor der Chemotherapiebehandlung nach der Therapie mit einem erhöhten Rezidivrisiko zu rechnen ist ⁽⁸⁰⁾.

Andererseits zeigten die Ergebnisse einer Metaanalyse, die 20 Arbeiten und 2494 Patientinnen umfasste, eine Positivitätsrate epithelialer Zellen, unabhängig vom histologischen Typ und Tumorarten, von 35%. In 13/20 Studien ergab sich eine Verbindung zwischen dem Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark und den ungünstigen Prognosefaktoren. Der Einfluss des Nachweises dieser Zellen auf das rezidivfreie Überleben wurde in 5/11 Studien belegt. Die Autoren erwähnen, dass die prognostische Wertigkeit des Nachweises von epithelialen Zellen im Knochenmark noch nicht als gesichert gilt und weitere Studien notwendig sind ⁽⁴⁷⁾.

Daten aus einer Studie mit 1045 Mammakarzinompatientinnen im Stadium I-III und R0-Resektion mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von 53 Monate konnte das Knochenmark-Status als stärkster, unabhängiger Prognosefaktor nicht bestätigen ⁽⁴⁸⁾.

Molino et al fanden nach einer Untersuchung von 109 Patientinnen (Stadium I und II) keine Korrelation zwischen positivem Knochenmark-Status und Nodalstatus, Menopausalstatus und Östrogenrezeptor-Positivität. Die Autoren betonten, dass keine Assoziation zwischen der Knochenmark-Positivität und den prognostischen Parametern oder der Prognose vorlag ⁽⁹⁸⁾.

Die Problematik der minimalen, residualen Erkrankung ist immer noch aktuell. Einerseits behaupten verschiedene Arbeitsgruppen, der positive Knochenmark-Status sei ein unabhängiger Prognosefaktor zum Zeitpunkt der Primäroperation, wo Patientinnen häufiger und früher ein Rezidiv erleiden. Andererseits wird behauptet, der Nachweis einer minimal, residualen Erkrankung sei insbesondere bei nodal-negativen Patientinnen bedeutungslos.

4.2 Korrelation des Knochenmark-Status zu etablierten Parametern im M0 Kollektiv

Die Korrelation des Knochenmark-Status mit verschiedenen Parametern wurde in der Literatur beschrieben. Mehrere Studien zeigen die Korrelation eines positiven Knochenmark-Status mit der TumorgroÙe^{(8) (30) (46) (105) (137)}, dem Grading^{(8) (30) (137)}, dem positiven Nodal-Status^{(8) (30) (46) (105) (137) (153)}, dem UICC-Stadium⁽⁴⁶⁾ sowie mit dem negativen Östrogenrezeptor-Status, und/oder Progesteronrezeptor-Status⁽¹⁰⁵⁾. Andererseits zeigt die Studie von Wiedswang et al, dass die Korrelation zwischen Knochenmark-Status und der TumorgroÙe, dem Grading, dem negativen Östrogenrezeptor-Status und dem Progesterorezeptor-Status nicht signifikant ist⁽¹⁵³⁾.

In der vorliegenden Arbeit wies die Mehrheit der Patientinnen des gesamten M0 Kollektivs Tumoren mit pT1 pN0 G2 auf. Die Mehrheit der Tumoren in frühen Stadien (I-II) erklärt die niedrige Positivitätsrate des Knochenmark-Status (7,3%) im M0 Kollektiv. Das Knochenmark-Status korreliert im M0 Kollektiv signifikant mit dem Grading ($p=0,0008$), mit dem Östrogenrezeptor-Status ($p=0,0007$), und Progesteronrezeptor-Status ($p=0,0003$).

4.3 Spezifität und Sensivität der Antikörper CK2, A45-B/B3 und CK22

Die Sensivität des monoklonalen Antikörpers CK2 wurde generell bei allen in dieser Studie eingeschlossenen Patientinnen getestet. Die Positivitätsrate des Antikörpers CK2 lag bei 8,8% (10/114) im Gesamtkollektiv. In 15,7% (13/83) dieser CK-18 negativen Patientinnen wurde ein positiver Knochenmark-Status mit dem Antikörper A45-B/B3 nachgewiesen. Verglichen mit dem Antikörper CK2 zeigt der Antikörper A45-B/B3 eine höhere Positivitätsrate. Dennoch wurde sowohl das Vorhandensein avitaler Zellen als auch eine große Anzahl A45-positiver Zellen am Rand des Präparates beobachtet. Eine Erklärung hierfür liegt nicht vor.

Der Antikörper CK22 ergab eine Positivitätsrate von 12% (6/50) bei CK-18 negativen Patientinnen. Ein erhöhter Background mit partieller unspezifischer Anfärbung des Zytoplasma wurde bei einigen Präparate der Zellen festgestellt. Die Sensivität von Antikörper A45-B/B3 und Antikörper CK22 wurde bei 44 Patientinnen gleichzeitig untersucht und verglichen. In nur 1/44 Patientin (2,2%) ergab sich einer Positivität mit beiden Antikörpern.

In die vorliegende Arbeit wurden 2 Patientinnen ohne Malignom als Kontrollpatientinnen einbezogen. Beide Patientinnen wurden immunzytochemisch mit den Antikörpern CK2 und A45-B/B3 untersucht. Bei einer Patientin wurden A45-positive Zellen nachgewiesen.

Die Spezifität des Antikörpers CK2 erscheint höher, verglichen mit den Antikörpern A45-B/B3 und CK22, da sowohl keine negativen Eigenschaften bezüglich der Auswertung der Präparate als auch keine falsch-positiven epithelialen Zellen nachgewiesen werden konnten. Die bevorzugte Lokalisation fast aller A45-positiven Zellen im Randbereich der Präparate im Vergleich zum heterogenen Verteilungsmuster der CK2-positiven und CK22-positiven Zellen ist noch zu klären.

4.4 Der Einfluss der untersuchten Zellzahl auf den Knochenmark-Status

Immunzytochemische Untersuchungen unter Verwendung von APAAP-Färbung und den Antikörpern CK2 und A45-B/B3 bei Mammakarzinompatientinnen ohne Fernmetastasen werden in der Literatur beschrieben. Die Detektionsraten dieser Studien schwanken von 16% bis 49,2%. Dieser Unterschied zwischen der Positivitätsrate ist möglicherweise durch unterschiedliche Ausschlusskriterien des Patientinnenkollektives und durch die Anzahl der untersuchten Zellzahl (Tabelle 19) zu erklären. Die Studie von Wieds-

gang et al zeigte, wie die Studie von Naume et al ⁽¹⁰⁵⁾, unter Verwendung eines anti-Zytokeratin Antikörpers an 817 Mammakarzinompatientinnen ohne Fernmetastasen eine niedrige Positivitätsrate ⁽¹⁵³⁾.

Erstautoren	Antikörper	Anzahl an Patient.	Detektionsrate (%)	Untersuchte Zellzahl	Klinisch-pathologische Parameter
Braun, 2000 ⁽⁷⁾	A45-B/B3	59	49,2	$2 \cdot 10^6$	M0
Braun, 2000 ⁽⁸⁾	A45-B/B3	552	36,0	$2 \cdot 10^6$	M0
Braun, 2001 ⁽¹⁰⁾	A45-B/B3	150	29,0	$2 \cdot 10^6$	NOM0
Janni, 2000 ⁽⁶⁷⁾	A45-B/B3	65	16,0	$2 \cdot 10^6$	M0
Kasimir-Bauer, 2001 ⁽⁷¹⁾	A45-B/B3	122	31,0	$4 \cdot 10^6$	M0
Funke, 1991 ⁽⁴⁵⁾	CK2	87	45,0	$5 \cdot 10^5$	M0
Funke, 1996 ⁽⁴⁶⁾	CK2	234	37,6	$1 \cdot 10^6$	M0
Naume, 2001 ⁽¹⁰⁵⁾	AE1/AE3	920	13,4	$2 \cdot 10^6$	M0
Wiedswang, 2003 ⁽¹⁵³⁾	AE1/AE3	817	13,2	$2 \cdot 10^6$	M0

Tabelle 19: Studien zur Bestimmung des Knochenmark-Status beim Mammakarzinompatientinnen mit Benutzung von Antikörpern CK2 und A45-B/B3 bei definierter Zellzahl

Auf die Frage hin, ob die Zellzahl die Sensivitätsrate der Methode beeinflusst, wurde im eigenen Kollektiv eine Versechsfachung der untersuchten Zellzahl unter Verwendung der gleichen Methode vorgenommen. In der Literatur wird die Benutzung von $6 \cdot 10^6$ untersuchten Zellen noch nicht dokumentiert.

Die Untersuchung von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Patientin ergab eine Positivitätsrate von 8,8% (10/114 Patientinnen) während die Untersuchung mit $6 \cdot 10^6$ Zellen die Positivitätsrate auf 18% (9/50) ansteigen ließ. Obwohl die Versechsfachung der untersuchten Zellzahl mit erheblichen Kosten und Zeitaufwand verbunden ist, verdoppelte sich die Positivitätsrate und somit die Sensivität der Methode. Der Nachweis epithelialer Zellen scheint eine enge Verbindung mit der Quantität untersuchter mononukleären Zellen zu haben. Diese

Abhängigkeit kann entscheidend für den Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark sein.

Dieses Ergebnis sollte in weiteren Untersuchungen mit einem großen Patientenkollektiv überprüft werden, um die Sensitivität der Methode zu verifizieren.

4.5 Einlagerungsfähigkeit der gefärbten Präparate und Wiederfindung der CK-18 positive Zellen

Die Untersuchung an gefärbten und eingelagerten Präparaten in der vorliegender Arbeit zeigt, dass die Mehrheit der Präparate nach 7 Jahren nicht auswertbar ist. Durch diese Untersuchung wurde festgestellt, dass viele markierte Zytokeratin-positive Zellen in diesen Präparaten nicht mehr auffindbar sind. Dazu ist dieselbe Zahl an CK-18 Zellen im Vergleich zur ersten Untersuchung generell nicht zu erwarten. Die Begründung dazu ist wahrscheinlich auf den Verlust der Rotanfärbung der Zytoplasma zurückzuführen.

4.6 Methodische Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Knochenmarkaspirate von 114 Patientinnen gewonnen und nach spätestens 48 Stunden immunzytochemisch aufgearbeitet, um einen Qualitätsverlust der Aspirate durch lange Lagerung zu vermeiden. Die Benutzung der Dichtgradientenzentrifugation wird von mehreren Arbeitsgruppen zur Trennung der mononuklearen Zellen in der Literatur beschrieben. Der Nachteil dieser Methode liegt daran, dass durch die nicht geeignete Dichtegradientenzentrifugation von Ficoll[®] für die Anreicherung von epithelialen Zellen eine geringe Ausbeute von ca. 10-15% der tatsächlich vorhandenen Tumorzellen resultiert ⁽¹¹⁹⁾.

Der Antikörper CK2, der gegen die Zytokeratinkomponente Nr. 18 gerichtet ist, wurde in der vorliegenden Arbeit zur immunzytochemischen Untersuchung der Präparate mittels APAAP-Färbung verwendet. Das Prinzip der APAAP-Färbung besteht aus einer Reaktion der alkalischen Phosphatase, die im APAAP-Komplex enthalten ist, und der dagegen gerichteten Antikörper. Durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem in der Färbungslösung enthaltenen Substrat erfolgt die Färbungsreaktion, wobei die vorhandene endogene alkalische Phosphatase durch das Levamisol blockiert wird ⁽¹⁵⁾.

Die mikroskopische immunzytochemische Auswertung der zytologischen Präparate erfolgte durch zwei unabhängige Personen. Mindestens eine CK-positive Zelle musste nachgewiesen werden, um die Untersuchung als positiven Knochenmark-Status zu bewerten. Die Überprüfung der Methode erfolgte einerseits durch die Verifizierung der eindeutigen Anfärbung des Zytoplasmas der Positiv-Kontrollen und andererseits durch die fehlende Farbreaktion der Negativ-Kontrolle. Die Überprüfung der Reagenzien und der Arbeitstechnik durch die Positiv- und Negativ-Kontrolle zur Bestätigung der immunzytochemischen Färbungsergebnisse wurde bei jeder Färbung durchgeführt.

Um die zeitaufwendige Doppelfärbung erfolgreich durchführen zu können, wurden Präparate von nur einer Patientin pro Färbung untersucht. Der entscheidende Färbungsschritt war die Entwicklung der Reaktion mit der Immunogold Färbung. Die CK-positiven Zellen sollten zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen und markiert werden. Die Entwicklung zur schwarz körnigen Anfärbung der Östrogenrezeptor-positiven, epithelialen Zellen erfolgte nach ca. einer Stunde Inkubationszeit. Eine kontinuierliche Beobachtung der Reaktionsentwicklung unter dem Lichtmikroskop ab diesem Zeitpunkt war ein entscheidender Faktor für die Zuverlässigkeit der Auswertung (Abschnitt 2.9).

4.7 Hormontherapie des Mammakarzinoms, Östrogen und Östrogenrezeptor

4.7.1 Östrogen und Östrogenrezeptor

Einer der bekannten Faktoren für die Entwicklung und Progression von Mammakarzinomen ist die Dauer der Einwirkung von Östrogen auf das Brustdrüsegewebe. Östrogene wirken über ihre Bindung an die Steroidhormonrezeptoren ⁽¹³¹⁾. Steroidrezeptoren sind intrazelluläre Proteine und dienen als Informationsvermittler zwischen den Steroidhormonen und ihren Zielzellen. Sie verursachen die Aktivierung der Transkription durch Bindung des Hormon-Rezeptorkomplexes an die DNS. Die Aktivierung bestimmter Gensequenzen löst eine Reihenfolge von Reaktionen aus, die für Transkription, Translation und Synthese von spezifischen Proteinen verantwortlich ist.

Der Östrogenrezeptor gehört zu einer Super-Familie von nukleären Rezeptoren, welche ca. 150 unterschiedliche Proteine einbeziehen. Der Östrogenrezeptor hat ein Molekulargewicht von 65000 bis 75000 ^{(55) (152)}. Neben den Rezeptoren für Östrogen gehören auch die Bindungsproteine für Vitamin D und die Rezeptoren für Gestagene und Androgene zur Östrogenrezeptor-Subfamilie ^{(53) (78)}.

Östrogen wird bei Frauen hauptsächlich im Graafschen Follikel, in Spuren im Corpus Luteum und während der Schwangerschaft in der Plazenta gebildet. Bei Männern wiederum entsteht Östrogen in den Hoden und der Nebennierenrinde. Die Hormonbildung erfolgt über den Hypothalamus, der durch die Gonadotropin Releasing-Hormone und die Hypophysenvorderlappen gesteuert wird. Das follikelstimulierende und luteinisierende Hormon stimuliert die Ovarien zur Bildung von Östradiol und Progesteron. Es gibt drei Typen von Östrogen: 17 β -Östradiol, Östron und Östratriol ⁽⁵³⁾, wobei der 17 β -Östradiol das wirksamste endokrinologische ovarielle Östrogen ist.

Bis 1996 war nur ein Östrogenrezeptor, kloniert aus der humanen Mammakarzinom Zelllinie MCF-7, bekannt^{(54) (55)}. Die cDNA für einen zweiten Rezeptor wurde aus humanen Gewebe⁽¹⁰²⁾ und aus der Prostata von Ratten kloniert⁽⁷⁶⁾. Der zuvor bekannte Östrogenrezeptor wurde ER α genannt und der neue Östrogenrezeptor ER β .

Beide ER werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert. Das Gen von ER α ist auf Chromosom 6 lokalisiert und kodiert ein Protein mit 595 Aminosäuren⁽⁵⁴⁾. Das ER β -Gen ist auf Chromosom 14 lokalisiert und kodiert ein 530 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 59.2 kDa.^{(38) (102) (108)}.

Aufgeteilt werden beide Östrogenrezeptoren in sechs Funktionsdomänen^{(27) (78) (102)}, die alphabetisch von A-F definiert sind. Die Domänen A und B enthalten eine der zwei Transkriptionsaktivierungsfunktionen AF-1 und AF-2 des Rezeptors und liegen am Amino-Terminus. Die Domäne C ist in die DNA-Bindung involviert und beinhaltet die Dimerisationsdomäne und die Region für den Liganden-induzierten Transkriptionsfaktor 2 (AF-2)⁽²⁷⁾.

ER α und ER β zeigen einen hohen Grad an Homologie (95%), sowohl der DNA-bindenden-Domäne als auch der Ligandenbindungsdomäne (55%), und stimulieren die Transkription von Genen, die die sogenannten estrogen responsive elements (EREs) enthalten^{(76) (121) (146)}. Beide Östrogenrezeptoren können 17 β -Östradiol mit vergleichbarer Affinität binden und können durch ein Antiöstrogen inhibiert werden^{(77) (102)}. ER α und ER β können gemeinsame Homodimere und Heterodimere während der Transkriptionsaktivierung bilden⁽²¹⁾. Die Existenz eines weiteren Östrogenrezeptors wird spekuliert⁽¹⁰⁸⁾.

Es scheint eine Gewebespezifität der Östrogenrezeptoren zu geben. Die Gewebeverteilung von ER β wird insbesondere in den Ovarien und an der Prostata vermutet^{(76) (102) (130)}. Auch Uterus, Hoden und Colon zeigen eine Expression von ER β ^{(42) (77)}. Der ER α deutet darauf hin, der dominante Östrogenrezeptor im Uterus, Brust und Leber zu sein

⁽²⁰⁾. Eine Expression der beiden Östrogenrezeptoren sind nicht nur in normalen Mamma, sondern auch bei Mammakarzinomen zu finden ⁽³⁸⁾⁽¹¹³⁾. Der Wirkungsmechanismus dieser Rezeptoren bei der Entwicklung und Progression von Tumoren ist noch unklar, es wird angenommen, dass der ER α der dominante Rezeptor in der Pathogenese von Mammakarzinomen ist ⁽¹³¹⁾. ER β scheint bei der Proliferationskontrolle von Mammakarzinomzellen involviert zu sein ⁽⁸³⁾.

Die Wirkung von Östrogen ist vielseitig und noch nicht endgültig geklärt. Zu den verschiedenen Wirkungen zählen die Proliferation des Endometriums, die Hyperämisierung und Proliferation der Vaginalschleimhaut, die Beeinflussung von Gehirnzentren, die die Körpertemperatur regulieren und die Erhaltung der Knochensubstanz. Durch den Östrogenrezeptor hat das Östrogen eine entscheidende Rolle für mehrere Organe einschließlich der Knochen, wie z.B. die Verhinderung der Osteoporose, die Senkung des kardio-vaskulären Risikos, und die Östrogensubstitution postmenopausaler Frauen ⁽¹⁴⁵⁾. Das Östrogen im Rahmen der Hormonsubstitution senkt das Alzheimerisiko bei Frauen ⁽³⁹⁾. Andererseits wird das Wachstum von 40% der Mammakarzinome von Östrogen stimuliert ⁽³⁶⁾.

4.7.2 Hormontherapie des Mammakarzinoms

Da ein Großteil der Mammakarzinome östrogenabhängig ist, spielen Antiöstrogene bei der Wahl der Hormontherapie eine große Rolle. Sie wirken als kompetitive Inhibitoren der Östrogenbindung. Sie führen dadurch zu einer Inhibition der Expression der Östrogen-regulierten Gene, einschließlich der Wachstumsfaktoren ⁽¹¹⁰⁾.

Die endokrine Therapie, insbesondere Tamoxifen, ist die wichtigste, systemische Therapie bei Tumoren mit positivem Östrogenrezeptor-Status ⁽¹³¹⁾. Die Einführung von Tamoxifen in der adjuvanten Therapie hat die Lebenserwartung von Frauen, die ein Mammakarzinom mit positivem Östrogenrezeptor-Status vorweisen, verlängert ⁽³⁵⁾. Tamoxifen wird heute zur Behandlung aller Formen des Mammakarzinoms eingesetzt ⁽²²⁾.

Eine 5-jährige Behandlung mit Tamoxifen zeigt sowohl eine jährliche Reduktion der Rezidivrate von 50%, als auch eine Reduktion der jährlichen Mortalitätsrate von 28% ⁽⁴⁰⁾ ⁽⁴³⁾ ⁽¹¹⁰⁾.

Raloxifen

Raloxifen ist ein selektiver Östrogenrezeptormodulator mit Östrogenwirkung auf den Knochen und Antiöstrogenwirkung auf Endometrium und Mammagewebe.

Aromatasehemmer

Aromatasehemmer können die peripher Konversion von Androgen in Östrogen inhibieren, die zu einer geringen Konzentration von zirkulierendem Östrogen im Tumorgewebe führt

GnRH-Analoga

GnRH-Analoga verursachen eine Verringerung von Gonadotropinausschüttung, die zur Senkung des Östrogenspiegels mittels Unterdrückung der ovariellen Östrogensynthese führt.

4.8 Östrogenrezeptorexpression auf disseminierten epithelialen Zellen im Knochenmark

Verschiedene Verfahren zur phenotypischen Charakterisierung disseminierter, epithelialer Zellen im Knochenmark werden in der Literatur beschrieben ⁽⁴⁾ ⁽¹⁰⁴⁾ ⁽¹²⁴⁾. In der vorliegenden Arbeit wurde die Östrogenrezeptorexpression disseminierter epithelialer Zellen im Knochenmark immunzytochemisch charakterisiert.

Eine Östrogenrezeptorexpression bei CK-18 positiven Zellen wurde in 10/18 Patientinnen (55,6%) nachgewiesen. In 8/18 Patientinnen (44,4%) zeigten diese CK-18 positiven Zellen keine Östrogenrezeptorexpression.

Der Vergleich des Östrogenrezeptor-Status bei den epithelialen Zellen im Knochenmark mit dem Primärtumor zeigte eine erhebliche Diskrepanz zwischen beiden Östrogenrezeptor-Status. 11/18 (61,1%) Patientinnen zeigten dieselbe Östrogenrezeptorexpression im Tumorgewebe und bei CK-18 positiven Zellen. Die Diskrepanz der Östrogenrezeptorexpression wurde bei 7/18 (38,9%) Patientinnen nachgewiesen. Davon zeigten 4/7 (57%) Patientinnen einen positiven Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und einen negativen Knochenmark-Status. In 43% der Fälle (3/17 Patientinnen) wurde ein negativer Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und ein positiver Knochenmark-Status nachgewiesen.

Frau Dr. N. Ditsch aus unserer Arbeitsgruppe untersuchte die Östrogenrezeptorexpression epithelialer Zellen im Knochenmark von 17 nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen⁽³⁴⁾. Unter Verwendung der gleichen Methode ergab die Untersuchung von Ditsch et. al, dass 88,2% (15/17) der Patientinnen CK-18 positive Zellen ohne Östrogenrezeptorexpression und die restlichen 11,8% (2/17) der Patientinnen CK-18 positive Zellen mit Östrogenrezeptorexpression aufwiesen. Die Übereinstimmung des Östrogenrezeptor-Status im Primärtumor mit dem Knochenmark lag in dieser Studie bei nur 9,1% (1/11 Patientinnen). Bei einer weiteren Patientin (9,1%) wurde sowohl eine epitheliale Zelle mit Östrogenrezeptorexpression als auch epitheliale Zellen ohne Östrogenrezeptorexpression nachgewiesen. In 81,8% des Kollektivs (9/11) wurde ein positiver Östrogenrezeptor-Status im Primärtumor und ein negativer Östrogenrezeptor-Status im Knochenmark nachgewiesen. Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studie können durch die Lagerung der Präparate erklärt werden. Die Doppelfärbungsuntersuchung in der vorliegenden Arbeit erfolgte spätestens wenige Tage nach der Knochenmarkaufarbeitung. Möglicherweise beeinflusst die jahrelange Lagerung der Präparate die Östrogenrezeptorexpression epithelialer Zellen.

Eine Untersuchung der Östrogenrezeptorexpression auf A45-positive Zellen liegt in der Literatur nicht vor. Die Kombination der alkalischen Phosphatase-Streptavidin Färbung und der Immunogold Färbung ergab die Doppelfärbungsmethode „A45-B/B3 und Östrogenrezeptor“. In der Literatur wird die Doppelfärbung mit Antikörpern A45-B/B3 auf dis-

seminierten epithelialen Zellen bezüglich der Expression von Ki67, p53, Her2/-neu, MUC-1, Lewis^x beschrieben ⁽⁶⁾.

Da es in der Literatur keine weiteren Daten zur Östrogenrezeptorexpression disseminierter epithelialer Tumorzellen gibt, zogen wir zum Vergleich die Ergebnisse von Untersuchungen an Lymphknoten heran. Bislang ist in verschiedenen Studien nur die Östrogenrezeptorexpression im Primärtumor und in Lymphknotenmetastasen untersucht worden, während vergleichende Untersuchungen zwischen Primärtumor und Knochenmark-Status nicht vorliegen.

Die Arbeitsgruppe von Iguchi et al. untersuchte immunhistochemisch die Östrogenrezeptorexpression von Primärtumoren und den entsprechenden Lymphknotenmetastasen bei 87 Mammakarzinompatientinnen und stellte eine Diskrepanz der Östrogenrezeptorexpression im Tumorgewebe und in Lymphknoten von 24,1% fest. Ein positiver Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und ein negativer Östrogenrezeptor-Status in den entsprechenden Lymphknoten wurde in 17,2% der Patientinnen festgestellt. Bei 6,9% der Patientinnen wurde eine negative Östrogenrezeptorexpression im Tumorgewebe und eine positive Östrogenrezeptorexpression in den entsprechenden Lymphknoten beobachtet ⁽⁶⁴⁾.

Nedergaard et al. zeigten durch die immunhistochemische Bestimmung der Östrogenrezeptorexpression in Primärtumoren und deren Lymphknotenmetastasen bei 101 Mammakarzinompatientinnen, dass die Tumoren mit positivem Östrogenrezeptor-Status dazu tendieren, die Östrogenrezeptorexpression bei der Entwicklung von Metastasen zu verlieren. In dieser Studie ergaben 21% (21/101) der untersuchten Fällen einen diskrepanten Östrogenrezeptor-Status zwischen den Primärtumoren und den entsprechenden Lymphknotenmetastasen. In dieser Arbeit wiesen 18% (18/101) der Tumoren mit positivem Östrogenrezeptor-Status Lymphknotenmetastasen ohne Östrogenrezeptorexpression auf. 3% (3/101) der Tumoren mit negativem Östrogenrezeptor-Status wiesen Lymphknotenmetastasen mit Östrogenrezeptorexpression auf. Die Autoren sind der Meinung, dass der Verlust von Östrogenrezeptorexpression in durchschnittlich 20%

der Lymphknotenmetastasen die Erklärung dafür sein könnte, warum einige Patientinnen mit positiver Östrogenrezeptorexpression auf die endokrine Therapie nicht reagieren⁽¹⁰⁶⁾.

Eine Studie von Holdaway et al untersuchte den Östrogenrezeptor-Status in Primärtumoren und in den entsprechenden Metastasen. Bei dieser Studie lag die Übereinstimmung zwischen Östrogenrezeptor-Status im Primärtumor und deren Metastasen bei 46%⁽⁶¹⁾.

Der Vergleich des ÖR-Status im Tumorgewebe und des ÖR-Status der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark deutet darauf hin, dass die Expression des Östrogenrezeptors bei diesen Zellen heterogen ist.

4.9 Welche Gründe können differierende Ergebnisse zwischen den Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und im Knochenmark haben?

Die Bestimmung des Östrogen- und des Progesteronrezeptor-Status ermöglicht die Abschätzung der Erfolgsaussichten einer endokrinen Therapie bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom⁽⁶⁰⁾. Eine hohe Rezeptorexpression bedeutet eine höhere Ansprechwahrscheinlichkeit. Immerhin 30-40% der Patientinnen mit fortgeschrittenen Mammakarzinom profitieren von der Hormontherapie⁽⁴⁹⁾.

Ungefähr 70 bis 80 % der Mammakarzinome zeigen eine Expression von ER α und erweisen sich als Östrogenrezeptor-Status positiv. Diese Tumoren tendieren dazu langsam zu wachsen, sind besser differenziert und mit einer besseren Prognose und einer längeren, rezidivfreien Überlebenszeit verbunden^{(49) (52) (60) (72)}. 1/3 aller Mammakarzinome zeigen keine Expression von Östrogenrezeptor⁽⁸¹⁾.

Tumoren mit negativem Östrogenrezeptor-Status neigen dazu früher zu rezidivieren, vorwiegend in den ersten 5 Jahren. Tumoren mit positivem Östrogenrezeptor-Status weisen häufiger Knochenmetastasen auf und zeigen ein späters Rezidiv ⁽⁶⁰⁾.

Nach derzeitigem Kenntnisstand wird der Hormonrezeptor-Status im Tumorgewebe immunhistochemisch bestimmt und nach dem immunreaktiven Score von Remmele und Stegner⁽¹²³⁾ mit folgenden Reaktionsergebnissen bewertet: Prozentsatz positiver Tumorzellkerne, überwiegende Färbungsintensität und Prozentsatz stark positiver Tumorzellkerne.

Die aktuelle Empfehlung des Tumorzentrums München für eine Klassifizierung von Östrogenrezeptor-positiv und -negativ (Cut-off-Wert) liegt bei mindestens 10 % positiven Zellen⁽²³⁾. Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Präparate aus frühen Rekrutierungsjahren untersucht wurden, gingen auch Patientinnen ein, deren Östrogenrezeptor-Status im Primärtumor im quantitativen Enzymimmunoassay bestimmt worden war. Die Grenzwerte für die Beurteilung eines positiven oder negativen Rezeptorstatus liegen bei dieser Methode bei 10 fmol/mg Protein ⁽²³⁾.

Die Zuverlässigkeit der Bestimmungsart der Expression von Hormonrezeptoren spielt eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Therapie. Die Berücksichtigung des reagierenden Antikörpers, die Qualität der Gewebeschnitte und die Erfahrung des auswertenden Pathologen sind wichtige Faktoren bei der Bestimmung des Östrogenrezeptor-Status. Diese Faktoren schwanken stark.

In der Literatur wird angegeben, dass die Bestimmung des Östrogenrezeptor-Status durch die immunhistochemische Untersuchung bei Tumoren, die eine geringe Expression von Östrogenrezeptor vorweisen, 30 bis 60 % falsch-negative Ergebnisse liefert ⁽¹²⁷⁾. Tumoren mit geringen Konzentrationen an Östrogenrezeptoren werden in vielen Labors als Östrogenrezeptor-negativ bewertet ⁽¹¹⁰⁾. Eine Studie untersuchte die Östro-

genexpression von gleichen Tumorgeweben in drei unabhängigen Labors und ergab eine Diskrepanz der Ergebnisse von 26% ⁽⁸²⁾.

In der immunhistochemischen Bestimmung des Östrogenrezeptor-Status wird der ER α bestimmt. Dieses Verfahren ermöglicht keine Informationen über die Expression von ER β ⁽⁹⁰⁾. Eine Studie von Mann et al bei 47 Mammakarzinompatientinnen ohne Berücksichtigung der Tumorstadien zeigte, dass 36% (17/47) der Patientinnen Tumoren mit einem negativen Östrogenrezeptor-Status (ER α) aufweisen. Dennoch wurde bei 47% (8/17) diesen Patientinnen ein Östrogenrezeptor-Status beta (ER β) nachgewiesen. Die Autoren sind der Meinung, dass durch die routinemäßige immunhistochemische Untersuchung von nur ER α eine große Anzahl der Mammakarzinompatientinnen, die an Tumoren mit einem negativen Östrogenrezeptor-Status (ER α) und einem positiven Östrogenrezeptor-Status beta (ER β) erkranken, einem negativen Hormonrezeptor-Status erhalten. Dadurch profitieren viele dieser Patientinnen nicht von einer adjuvanten Hormontherapie ⁽⁹⁰⁾.

4.10 Welche Konsequenz ergibt sich hieraus für die Therapie?

Die adjuvante endokrine Therapie basiert auf der Hypothese, dass die Östrogenrezeptorexpression im Primärtumor mit der Expression bei der Fernmetastase übereinstimmt. Mittlerweile deuten viele Studien darauf hin, dass die Östrogenexpression nicht immer mit dem Ansprechen der endokrinen Therapie korreliert ⁽⁷⁹⁾ ⁽⁶⁴⁾. Es bleibt unklar, warum ca. 40-45% der Tumoren, die einen positiven Östrogenrezeptor-Status aufweisen, resistent auf die endokrine Therapie sind. Umgekehrt zeigen cirka 10% der Tumoren mit negativem Östrogenrezeptor-Status ein Ansprechen auf eine antihormonelle Behandlung ⁽⁶⁴⁾ ⁽¹⁰⁶⁾.

Auch Rezidivtumoren, die aus einem Primärtumor mit positivem Östrogen- und Progesteron-Status stammen, zeigen häufig keine Expression von einem oder beiden Hormonrezeptoren. Es wird angenommen, dass 20 % der Primärtumoren mit positivem Ös-

trogenrezeptor-Status bei einer Metastasenbildung einen negativen Östrogenrezeptor-Status vorweisen ⁽⁴⁹⁾. Die Resistenz auf die endokrine Therapie ist ein Hindernis für die Behandlung von Mammakarzinom. Die Veränderung von positivem Östrogenrezeptor-Status in negativem Östrogenrezeptor-Status bei Tumoren könnte diese Resistenz erklären ⁽¹¹⁰⁾.

Die Assoziation von Tumoren mit positiven,- und Metastasen mit negativen Östrogenrezeptor-Status bzw. Tumoren mit negativen,- und Metastasen mit positiven Östrogenrezeptor-Status, sollte bei der Wahl der Therapie berücksichtigt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass Tumoren mit negativen Östrogenrezeptor-Status und entsprechende Metastasen, die einen positiven Östrogenrezeptor-Status aufweisen, auf eine endokrine Therapie ansprechen könnten.

Der spontane Verlust des Hormonrezeptors bei Rezidiven oder Fernmetastasen könnte ein Grund für die unwirksame Therapie sein und sollte bei der Wahl der Therapie berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

Trotz verbesserter Therapiemaßnahme des Mammakarzinoms und Prognoseverbesserung sind die Patientinnen oft nach langer Latenzzeit mit dem Auftreten von Rezidiven und Fernmetastasen konfrontiert. Als Ursache hierfür wird die Frühdisseminierung in Betracht gezogen. Für die Patientinnen ist eine individuelle Prognose durch die etablierten Prognosefaktoren nicht ausreichend. Daher werden neue Prognosefaktoren, die die Invasion und das Metastasierungspotential der Tumoren reflektieren, entwickelt. Das Vorhandensein epithelialer Zellen im Knochenmark wird als Indikator für die frühe systemische Tumorzelldisseminierung diskutiert, da unter normalen Umständen keine epitheliale Zellen in diesem Organsystem zu finden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden epitheliale Tumorzellen im Knochenmark von 114 Mammakarzinompatientinnen untersucht. Die Knochenmarkaspirate wurden intraoperativ gewonnen. Die mononukleären Zellen wurden isoliert und durch eine standardisierte APAAP-Färbung analysiert. Zur Detektion epithelialer Zellen wurde der Antikörper CK2 verwendet. Zusätzlich wurden die Sensivität und Spezifität des Antikörpers CK2, A45-B/B3 und CK22 miteinander verglichen. Der Einfluss der untersuchten Zellzahl auf den Knochenmark-Status wurde auch untersucht. Die Östrogenrezeptorexpression der CK-positiven Zellen wurde durch immunzytochemische Doppelfärbung unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 1D5 charakterisiert und mit der Östrogenrezeptorexpression im Primärtumor verglichen. Der Antikörper 1D5 wird auch in der histopathologischen Primärdiagnostik eingesetzt.

Die Prävalenz des positiven Knochenmark-Status im Gesamtkollektiv lag bei M0 Patientinnen bei 7,3%. Die Mehrheit der Patientinnen mit positivem Knochenmark-Status zeigte am häufigsten Primärtumoren des Stadiums pT1, pN0, G2 und Tumorstadium I–II. Der Tumordifferenzierungsgrad, der histologische Typ und der Hormonrezeptor-Status zeigten einen signifikanten Zusammenhang mit dem Knochenmark-Status.

Der Vergleich der Untersuchungen mit den Antikörpern CK2, CK22 und A45-B/B3 zeigte mit dem Antikörper A45-B/B3 im Vergleich zum Antikörper CK2 eine deutlich höhere Positivitätsrate. Die Färbung mit dem Antikörper A45-B/B3 zeigte aber häufiger avitale Zellen ohne intakte Zellmorphologie. Durch die Färbung mit dem Antikörper CK22 wurde eine unspezifische Anfärbung des Zytoplasma beobachtet. Die immunzytochemische Untersuchung mit dem Antikörper CK2 erwies sich als zuverlässiger.

Die Analyse des Einflusses der untersuchten Zellzahl auf das Knochenmark-Status ergab eine Positivitätsrate von 8,8% bei der Untersuchung von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Patientin und von 18% bei die Untersuchung mit $6 \cdot 10^6$ Zellen pro Patientin.

Die Untersuchung der Östrogenrezeptorexpression der epithelialen Zellen ergab eine Östrogenrezeptorexpression der CK-18 positiven Zellen bei 55,6% der Patientinnen. Bei 44,4% der Patientinnen konnte keine Expression des Östrogenrezeptors in diesen Zellen nachgewiesen werden.

Bei 61,1% der Patientinnen stimmte der Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe mit dem Östrogenrezeptor-Status im Knochenmark überein. Die Diskrepanz zwischen dem Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und dem Östrogenrezeptor-Status im Knochenmark lag bei 38,9%. Bei 57% der Patientinnen wurden ein positiver Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und ein negativer Knochenmark-Status nachgewiesen. In 43% der Fälle wurde ein negativer Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und ein positiver Knochenmark-Status nachgewiesen.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Heterogenität des Östrogenrezeptor-Status bei epithelialen Zellen und auf die Metastasen hin. Der Verlust des Östrogenrezeptors bei Rezidiven oder Fernmetastasen könnte eine der Ursachen für die wirkungslose Behandlung des Mammakarzinoms sein. Diese Hypothese sollte weiterhin im Rahmen eines größeren Patientinnenkollektivs untersucht werden. Sollte sich diese Hypothese be-

wahrheiten, so sollte die Hormontherapie im Hinblick auf die Patientinnen bei der Wahl der Therapie berücksichtigt werden.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	CK18-positive Zellen im Knochenmark einer Mammakarzinompatientinnen	20
Abbildung 2:	MCF-7 Präparat: CK18-positive - Östrogenrezeptor-positive MCF-7 Zellen	30
Abbildung 3a:	Patientenpräparat: Disseminierte epitheliale A45-B/B3-positive Zellen im Knochenmark.....	46
Abbildung 3b:	Patientenpräparat: Disseminierte epitheliale A45-B/B3-positive Zellen im Knochenmark.....	46
Abbildung 4a:	Patientenpräparat: A45-B/B3-positive Zellen ohne intakte Zellmorphologie im Knochenmark (im Randbereich des Präparates lokalisiert)	47
Abbildung 4b:	Patientenpräparat: A45-B/B3-positive Zellen ohne intakte Zellmorphologie im Knochenmark (im Randbereich des Präparates lokalisiert)	47

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte Materialien für die Aufarbeitung der Knochenmarkspirate	11
Tabelle 2: Eingesetzte Materialien für die Herstellung von Kontrollpräparaten der Zelllinie MCF-7	14
Tabelle 3: Eingesetzte Materialien für APAAP-Färbung	15
Tabelle 4: Zusammensetzung der Neufuchsin-Färbelösung	16
Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die APAAP-Färbung	17
Tabelle 6: Epimet Kit A45: Eingesetzte Materialien	21
Tabelle 7: Beschreibung der Antikörper für APAAP-Färbung unter Verwendung von Antikörper CK22	23
Tabelle 8: Eingesetzte Materialien für die Doppelfärbung CK2 / Östrogenrezeptor	26
Tabelle 9: Eingesetzte Materialien für die Protokollmodifikationen der Doppelfärbungsmethode	31
Tabelle 10: Untersuchtes Patientkollektiv	36
Tabelle 11: Knochenmark-Status in den Gruppen	36
Tabelle 12: pTNM-Klassifikation im M0 Gesamtkollektiv	38
Tabelle 13: Korrelation des Knochenmark-Status mit den klinisch-pathologischer Parametern	41
Tabelle 14: Einteilung der A45-B/B3-positiver Zellen	44
Tabelle 15: Sensivität des Antikörpers A45-B/B3 und CK22	50
Tabelle 16: Einteilung der CK-18 Zellen bei Untersuchungen mit erhöhter Zellzahl	51
Tabelle 17: Auswertung der entdeckelten Präparaten	53
Tabelle 18: Expression von Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe und Knochenmark	54
Tabelle 19: Studien zur Bestimmung des Knochenmark-Status beim Mammakarzinompatientinnen mit Benutzung von Antikörpern CK2 und A45-B/B3 bei definierter Zellzahl	64

8 Literaturverzeichnis

(1) ATCC - CELL LINES

<http://www.atcc.org>

(2) BERGER, U.; BETTELHEIM, R.; MANSI, J. L.; EASTON, D.; COOMBES, R. C.; MUNRO NEVILLE, A.

The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis.

A.J.C.P.: Nr. 1, Vol. 90, S. 1-6, 1988.

(3) BLOOM H. J.; RICHARDSON W.W.;

Histological grading and prognosis in breast cancer

Br. J. Cancer 11: S.359-377, 1957

(4) BORGES, E.; BEISKE, K.; TRACHSEL, S.; NESLAND, J. M.; KVALHEIM, G.; HERSTADT, T. K.; SCHLICHTING, E.; QVIST, H.; NAUME, B.

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

Journal of Pathology 185, S. 427-434, 1998

(5) BRAUN, S.; PANTEL, K.

Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement

Breast Cancer Research and Treatment 52: 201-216, 1998

(6) BRAUN, S.; HEPP, F.; SOMMER, H. L.; PANTEL, K.

Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease.

Int. J. Cancer (pred. Oncol.): Vol 84, S. 1-5, 1999.

(7) BRAUN, S.; KENNTENICH, C.; JANNI, W.; HEPP, F.; DE WALL, J.; WILLGEROTH, F.; SOMMER, H.; PANTEL, K.

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

Journal of clinical oncology, Vol. 18, No. 1, S. 80-86, 2000

(8) BRAUN, S.; PANTEL, K.; MULLER, P.; JANNI, W.; HEPP, F.; KENTENICH, C.R.; GAS-ROPH, S., WISCHNIK, A.; DIMPFL, T.; KINDERMANN, G.; RIETHMULLER, G.; SCHLIMOK G.

Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stages I,II, or III breast cancer

N Engl. J. Med. 24: 342(8), S. 580-1, 2000

(9) BRAUN S., PANTEL K.

Diagnostik und klinische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

Dtsch. Med. Wschr. 125, S. 1237-1239, 2000

(10) BRAUN, S.; CEVATLI, S.; ASSEMI, C.; JANNI, W.; KENTENICH, C. R. M.; SCHINDLBECK, C.; RJOSK, D.; HEPP, F.

Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph Nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy

Journal of Clinical Oncology, Vol. 19, No %: 1468-1475, 2001

(11) BRAUN S., PANTEL K.

Clinical significance of occult metastatic cells in bone marrow of breast cancer patients

The Oncologist 6:125-132, 2001

(12) BRAUN, S.; HARBECK, N.

Molecular markers of metastasis in breast cancer: current understanding and prospects for novel diagnosis and prevention

Exp. Rev. Mol. Med. 6 September, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01003520h.htm>, 2001

(13) BUTTURINI, A.; KLEIN, J.; GALE, R. P.;

Modeling minimal residual disease (MDR)-Testing

Leukemia Research, S. 293-300, 2003

(14) BUNDESAMT S

Fachserie 12 (Gesundheitswesen) Reihe 4: Todesursachenstatistik in Dtl.

Metzler Poeschel, Stuttgart, 1997.

(15) CORDELL J. L.; FALINI B.; ERBER W.N.; GHOSH A. K.; ABDULAZIZ Z.; MACDONALD S.; PULFORD K. A. F.; STEIN H.; MASON D. Y.

Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)

J. Histochem Cytochem 32, S. 219-229, 1984

(16) COTE, R. J.; ROSEN, P. P.; HAKES, T.; SEDIRA, M.; BAZINET, M.; KINNE, D. W.; OLD, L. J.; OSBORNE, M. P.

Monoclonal Antibodies detect occult breast carcinoma Metastases in the bone marrow of patients with early stage disease.

The American Journal of Surgical pathology 12(5), S. 333-340, 1988

(17) COTE, R. J.; ROSEN, P. P.; LESSER, M. L.; OLD, L. J.; OSBORNE, M. P.

Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases.

Journal of Clinical Oncology: Vol. 9, Nr. 10, S. 1749-1756, 1991.

(18) COTE, R.; BEATTIE, E.; CHAIWUN, B.; SHI, S.; HARVEY, J.; CHEN, S.; SHERROD, A.; GROSHEN, S.; TAYLOR, C.

Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma.

Annals of Surgery: Nr. 4, Vol. 222, S. 415-425, 1995

(19) COTE, R. J.; ROSEN, P. P.; HAKES, T. B.; SEDIRA, M.; BAZINET, M.; KINNE, D. W.; OLD, L. J.; OSBORNE, M. P.

Monoclonal antibodies detect occult breast carcinoma metastases in the bone marrow of patients with early stage disease.

The American Journal of Surgical Pathology 12(5): S. 333-340, 1988.

(20) COUSE, J. F.; LINDZEY, J.; GRANDIEN, K.; GUSTAFSSON, J.-A.; KORACH, K. S.

Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse

Endocrinology, Vol. 138, No. 11, S. 4613-4621, 1997

(21) COWLEY, S. M.; HOARE, S.; MOSSELMAN, S.; PARKERS, M. G.

Estrogen receptors α and β form heterodimers on DANN

The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 32, S. 19858-19862, 1997

(22) CRAIG, V. J.

Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. clinical considerations and new agents

Journal of medicinal chemistry Vol. 46, No. 7, 2003

(23) DE WAAL, J. C. ; EIERMANN, W. ; ENGEL, J.; GAUWERKY, J.; HÖLZEL, D.; KESSLER, M.; MAHL, G.; SITTEK, H.; SOMMER, H.; STRIGL, R.; UNTCH, M.

Diagnostik

Manual des Tumorzentrum München: Empfehlung zur Diagnostik, therapie und Nachsorge, Mammakarzinome; 8. Auflage, S. 9-17, 2001

(24) DEARNALEY, D. P.; SLOANE, J. P.; IMRIE, S.; COOMBES, R. C.; ORMEROD, M.G.; LUMLEY, H.; JONES, M.; NEVILLE, A. M.

Detection of isolated mammary carcinoma cells in marrow of patients with primary breast cancer.

Journal of Royal Society of Medicine: Vol. 76, S. 359-364, 1983.

(25) DEARNALEY, D. P.; ORMEROD, M. G.; SLOANE, J. P.

Micrometastases in breast cancer: long-term follow-up of the first patient cohort

Eur. J. Cancer: Vol 27, Nr. 3, S. 236-239, 1991.

(26) DEGUCHI, T.; YANG, M.; EHARA, H.; ITO, S.; NISHINO, Y.; TAKAHASHI, Y.; ITO, Y.; SHIMOKAWA, K.; TANAKA, T.; IMAEDA, T.; DOI, T.; KAWADA, Y.

Detection of micrometastatic prostate cancer cells in the bone marrow of patients with prostate cancer.

Br. J. Cancer 75(5): S. 634-638, 1997.

(27) DICKSON, R. B.; STANCEL, G. M.

Chapter8: estrogens receptor-mediated process in normal and cancer cells

J. Natl. Cancer Inst. Monographs No. 27: 135,145, 1999

(28) DIEL, I. J.; KAUFMANN, R.; COSTA, S. D.; KAUL, B. KREMPIEN, M.; GOERNER, S.; BASTERT, G

Prognostische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark von patientinnen mit Mammakarzinom

Geburtsh u. Frauenheilk. 50, S. 923-928, 1990

(29) DIEL, I. J.; KAUFMANN, M.; GOERNER, R.; COSTA, S. D.; KAUL, S.; BASTERT, G.

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

Journal of Clinical Oncology: Vol. 10, Nr. 10, S. 1534-1539, 1992.

(30) DIEL, I. J.; KAUFMANN, M.; COSTA, S. D.; HOLLE, R.; MINCKWITZ, G. V.; SOLOMAYER, E. F.; KAUL, S.; BASTERT, G.

Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status.

J. of the Nat. Cancer Institut: Vol. 88, Nr. 22, S. 1652-1658, 1996.

(31) DIEL, J.; KAUFMANN, M.; SOLOMAYER, E. F.; WALLWIENER, D.; GOLLAN, CH.; GOERNER, R.; KAUL, S.; COSTA, S. D.; MINCKWITZ, G. V.; HOLLE, R.; BASTERT, G.

Prognostische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark im Vergleich zum Nodalstatus beim primären Mammakarzinom.

Geburth. u. Frauenheilk. 57: S. 333-341, 1997.

(32) DIEL, I. J.; COTE, R. J.

Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer

Cancer Treatment Reviews 26, S. 53-65, 2000

(33) DIEL, I.; SOLOMAYER, E.-F.; BASTERT, G.

Mikrometastatische Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom

Radiologe 40, S. 681-687, 2000

(34) DITSCH, N.; MAYER, B.; ROLLE, M.; UNTCH, M.; SCHILDBERG, F.W.; FUNKE, I.

Estrogen receptor (ER) expression profile of disseminated epithelial tumor cells in bone marrow of breast cancer patients

Recent Result Cancer Res. 162, S. 141-147, 2003

(35) EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP

Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials

The Lancet, Vol. 351, S. 1451-1467, 1998

(36) EKENA, K.; WEIS, K. E.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, B. S.

Identification of amino acids in the hormone binding domain of the human estrogen receptor important in estrogen binding

The Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 33, S. 20053-20059, 1996

(37) ENGEL, J.; SCHUBERT-FRITSCHLE, G.; HÖLZEL, D.

Epidemiologie

Manual des Tumorzentrum München: Empfehlung zur Diagnostik, therapie und Nachsorge, Mammakarzinome; 8. Auflage, S. 9-17, 2001

(38) ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; GRANDIEN, K.; LAGERCRANTZ, S.; LAGERCRANTZ, J.; FRIED, G.; NORDENSKJÖLD, M.; GUSTAFSSON, J.-A.

Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 82, No. 12, S. 4258-4265, 1997

(39) ENMARK, E.; GUSTAFSSON, J.-A.

Oestrogen receptors – an overview

Journal of Internal Medicine 246, S. 133-138, 1999

(40) FISHER, B.; Constantino, J. P.; Wickerham, D. L.; Redmond, C. K.; Kavanah, M.; Cronin, W. M.; Vogel, V.; Robidoux A.; Dimitrov, N.; Atkins, J.; Daly, M.; Wieand, S.; Tan-Chiu, E.; Ford, L.; Wolmark, N.;

Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 Study

Journal of the National Cancer Institute, Vol. 90, No. 18, S. 1371-1388, 1998

(41) FLATMARK, K.; BJORNLAND, K.; JOHANESSEN, H. O.; HEGSTAD, E.; ROSALES, R.; HÄRKLAU, L.; SOLHAUG, J. H.; FAYE, R. S.; SOREIDE, O.; FODSTAD, O.

Immunomagnetic detection of micrometastatic cells in bone marrow of colorectal cancer patients

Clinical Cancer Research, Vol. 8, S. 444-449, 2002

(42) FOLEY, E. F.; JAZAERI, A. A.; SHUPNIK, M. A.; JAZAERI, O.; RICE, L. W.;

Selective loss of estrogen receptor β in malignant human colon

Cancer Research 60, S. 245-248, 2000

(43) FREDMANN, A. N.; GRAUBARD, B. I.; R., R.R.; MCCASKILL-STEVENS, W.; BALLARD-BARBASH, R.; GAIL, M. H.

Estimates of the number of U.S. women who could benefit from tamoxifen for breast cancer prevention

Journal of the Cancer Institute, Vol. 95, No. 7, S. 526-532, 2003

(44) FREW, A.; RALFKIAER, N.; GHOSH, A.; GATTER, K.; MASON, D.

Immunocytochemistry in the detection of bone marrow metastases in patients with primary lung cancer.

Br. J. Cancer: 53: S. 555-556, 1986.

(45) FUNKE, I.; FRIES, S.; JAUCH, K.-W.

Tumorzellnachweis im Knochenmark: Entscheidungshilfe zur adjuvanten Therapie bei nodal-nagativen Patientinnen mit Mammakarzinom.

Chirurg 62: S. 805-809,1991.

(46) FUNKE, I.; FRIES, S.; ROLLE, M.; HEISS, M. M.; UNTCH, M.; BOHMERT, H.; SCHILDBERG, F. W.; JAUCH, K. W.

Comparativ analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer.

Int. J. Cancer 65: S. 755-761, 1996.

(47) FUNKE, I.; SCHRAUT, W.

Meta-Analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated.

Journal of Clinical Oncology Vol. 16, No. 2, S. 557-566, 1998.

(48) FUNKE, I.; SCHRAUT, W.; UNTCH, M.; SCHLIMOK, G.; JAUCH, K. W.; SCHILDBERG, F. W.

Prognoserelevanz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark: prospektive Studie an 1045 Mammakarzinompatientinnen im Stadium I-III.

Chirurgisches Forum, Band 30, S. 547-549, 2001.

(49) FUQUA, S. A. W.

The role of estrogens receptors in breast cancer metastasis

Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, Vol. 6, No. 4, 2001

(50) GAFORIO, J.-J.; SERRANO, M.-J.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; SIRVENT, A.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; CAMPOS, M.; DE LA TORRE, N.; ALGARRA, I.; DUEÑAS, R.; LOZANO, A.

Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis

Int. J. Cancer 107, S. 984-990, 2003

(51) GEBAUER G, FEHM T., MERKLE E., BECK E.P., LASG N., JAGER W.

Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up

J. Clin. Oncology 15;19(16): 3669-74, 2001

(52) GEBAUER G, FEHM T., LANG, N.; JÄGER, W.

Tumor size, lymph node status and steroid receptor expression in breast cancer: Prognostic Relevance 5 Years after Surgery

Breast Cancer research and Treatment 75, S. 167-173, 2002

- (53) GRANDIEN, K.; BERKENSTAM, A.; GUSTAFSSON, J.-A.
The estrogen receptor gene: promoter organization and expression
Int. J. Bio. Vol. 29, No. 12: 1343-1369, 1997
- (54) GREEN, S.; WALTER, P.; KUMAR, V.; KRUST, A.; BORNERT, J.-M.; ARGOS, P.; CHAMBON, P.
Humans oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A
Nature vol. 320:134-139, 1986
- (55) GREENE, GL; GILNA, P.; WATERFIELD, M.; BAKER, A.; HORT Y.; SHINE, J.;
Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA
Science 231, S. 1150-1154, 1986
- (56) HARBECK, N.; UNTCH, M.; PACHE, L.; EIERMANN, W.
Tumour Cell Detection in the Bone Marrow of Breast Cancer Patients at Primary Therapy: Results of a 3-year Median Follow-up.
Br. J. Cancer 69: S. 566-571, 1994.
- (57) HARBECK, N.; EIERMANN, W.; ENGEL, J.; FUNKE, I.; LEBEAU, A.; PERMANETTER, W.; UNTCH, M.
Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom
Manual des Tumorzentrum München: Empfehlung zur Diagnostik, therapie und Nachsorge, Mammakarzinome; 8. Auflage, S. 9-17, 2001
- (58) HERMANEK, P.; HUTTER, R. V. P.; SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C.
Classification of isolated tumor cells and micrometastasis.
Cancer : Vol. 5, Nr. 12, S. 2668-2673, 1999.
- (59) HERMANEK, P.
Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems
Anticancer Research 19: 2771-2774, 1999
- (60) HESS, K. R.; PUSZTAI, L.; BUZDAR, A. U., HORTOBAGYI, G. N.;
Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse
Breast Cancer Research and Treatment 78, S. 105-118, 2003

- (61) HOLDAWAY, I. M.; BOWDITCH, J. V.
Variation in receptor status between primary and metastatic breast cancer
Cancer, Vol. 52, S. 479-478, 1983
- (62) HOSCH, S. B.; BRAUN, .; PANTEL, K.
Characterization of disseminated tumor cells
Seminars in Surgical Oncology 20,S. 265-271, 2001
- (63) HUGO, V. R.; JÄNICKE, F.
Hormontherapie beim Mammakarzinom.
Krankenhausarzt 63: S. 1, 32-36, 1990.
- (64) IGUCHI, C.; NIO, Y.; ITAKURA, M.
Heterogeneous expression of estrogen receptor between the primary tumor and the corresponding involved lymph nodes in patients with node-positive breast cancer and its implications in patients outcome
Journal of Surgical Oncology, 83, S. 85-93, 2003
- (65) IZBICKI, J. R.; HOSCH, S. B.; HOSSFELD, D. K.; PANTEL, K.
Minimale residuale Tumorerkrankung bei soliden epithelialen Tumoren.
Deutsches Ärzteblatt 97: Heft 22, Juni 2000.
- (66) IZBICKI, J. R.; PANTEL, K.; HOSCH, S. B.
Micrometastasis in solid epithelial tumors: Impact on surgical oncology
Surgery Vol. 131, No.1, S. 1-5, 2002
- (67) JANNI, W.; GASTROPH, S.; HEPP, F.; KENTENICH, C; RJOSK, D.; SCHINDLBECK;
DIMPFL, T.; SOMMER, H.; BRAUN, S.
Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma.
Cancer, Vol. 88, No. 10, S. 2252-2259, 2000
- (68) JANNI W., HEPP, F.; STROBL B., RACK, B.; RJOSK D., KENTENNICH C., SCHINDLBECK C., HANTSCHMANN P., PANTEL K., SOMMER H., BRAUN S.
Patterns of disease recurrence influences by hematogenous tumor cell dissemination in patients with cervical carcinoma of the uterus
Cancer 15, Vol. 97, No. 2, 2003

(69) JAUCH, K.-W.; HEISS, M. M.; GRÜTZNER, U.; FUNKE, I.; PANTHEL, K.; BABIC, R.; EISSNER, H.-J.; RIETHMUELLER, G.; SCHILDBERG, F.-W.

Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer.
Journal of Clinical Oncology: Vol.14, Nr. 6, S. 1810-1817, 1996.

(70) JUHL, H.; KALTHOFF, H.; KRÜGER, U.; SCHOTT, A.; SCHREIBER, H.-W.; HENNE-BRUNS, D.; KREMER, B.

Immuncytologischer Nachweis disseminierter Tumorzellen in der Bauchhöhle und im Knochenmark von Pankreascarcinompatienten.

Chirurg 65: S. 1111-1115, 1994.

(71) KASIMIR-BAUER, S.; OBERHOFF, C.; SLIWINSKA, K.; NEUMANN, R.; SCHINDLER, A. E.; SEEGER, S.

Evaluation of different methods for detection of minimal residual disease in blood and bone marrow of patients with primary breast cancer: importance for clinical use?

Breast Cancer Research and Treatment 69, S. 123-132, 2001

(72) KEEN, J. C.; DAVIDSON, N. E.

The biology of breast carcinoma

Cancer Supplemnt, Vol. 97, No. 3, S. 825-833, 2003

(73) KELLER, E. T.

Overview of metastasis and metastases

J Musculoskel Neuron interact 2(6), S. 567-569, 2002

(74) KLEIN, C.; BLANKENSTEIN, T. J. F.; SCHMIDT-KITTLER, O.; PETRONIO, M.; POLZER, B.; STOECKLEIN, N. H.; RIETHMÜLLER, G.

Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer

The Lancet, Vol. 360, No. 9334, s. 638-389, 2002

(75) KRAG, D. N.; ASHIKAGA, T.; MOSS, T. J.; KUMINSKY R. E.; FELDMAN, S.; CARP, N. Z.; MOFFAT, F. L.; BEITSCH, P. D.; FRAZIER, T. G.; GASKIN, T. A.; SHOOK, J. W.; HARLOW, S.P.; WEAVER, D. L.

Breast cancer in blood: a pilot study

The Breast Journal, Vol. 5, No. 6, S. 354-358, 1999

(76) KUIPER, G. J. M.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.

Cloning a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary

Proc. Natl. Acad. Sci, Vol 93: 5925-5930, 1996

(77) KUIPER, G. J. M.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HÄGGBLAD, J. NILSSON, S. GUSTAFSSON J.-A.

Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogens receptors α and β

Endocrinology Vol. 138, No. 3: 863-870, 1997

(78) KUMAR, R.; THOMPSON, E. B.

The structure of the nuclear hormone receptors

Steroids 64, S. 310-319, 1999

(79) KUUKASJÄRVI, T.; KONONEN, J.; HELIN, H.; HOLLI, K.; ISOLA, J.

Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy

Journal of Clinical Oncology, Vol. 14, No. 9, S. 2584-2589, 1996

(80) KVALHEIM, G.; NESTLAND, J. M.; SOMMER, H.; ANKER, G.; HAARSTAD, H.; KOLSTAD A.; ERIKSTEIN, B.

Monitoring of minimal residual disease in breast cancer patients treated with adjuvant high-dose therapy and stem cell support

[http://www.bloodline.net/stories/storyReader\\$2923](http://www.bloodline.net/stories/storyReader$2923)

(81) LAPIDUS, R. G.; NASS, S. J.; DAVIDSON N. E.

The loss of Estrogen and Progesterone receptor gene Expression in human breast cancer

J. of Mammary Gland Biology and Neoplasia: Vol. 3, No. 1, S. 85-94, 1998

(82) LAYFIELD, L.; GOLDSTEIN, N.; PERKINSON, K.R.; PROIA, A.

Interlaboratory variation in results from immunohistochemical assessment of estrogens receptor status

The Breast Journal, Vol. 9, No. 3, S.:257-259, 2003

(83) LAZENNEC, G.; BRESSON, D; LUCAS, A.; CHAUVEAU, C.; VIGNON, F.

Er β inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells

Endocrinology 142(9): 4120-4130, 2001

(84) LEONE, B. A; ROMERO A.; RABINOVIC M.G, VALLEJO, C. T.; BIANCO, A.; PEREZ, J. E.; MACHIAVELLI, M.; RODRIGUEZ, R.; ALVAREZ, L. A.

Stage IV breast cancer: clinical course and survival of patients with osseous versus extraosseous metastases at initial diagnosis.

Amer. J. clin. Oncol. 11:618-622, 1988

(85) LILLEBY W.; NESSLAND, J. M.; FOSSA, S. D.; TORLAKOVIC, G.; WAERE, H.; KVALHEIM, G.

The prognostic impact of cytokeratin-positive cells in bone marrow of patients with localized prostate cancer

Int. J. Cancer 103, S. 91-96, 2003

(86) LINDEMANN F.; SCHLIMOK G.; DIRSCHELD P.; WITTE J.; RIETHMÜLLER G.

Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients.

The Lancet 340: S. 685-689, 1992.

(87) MAEHARA, Y.; YAMAMOTO, M.; ODA, S.; BABA, H.; KUSUMOTO, T.; OHNO, S.; ICHIYOSHI, Y.; SUGIMACHI, K.

Cytokeratin-positive cells in bone marrow for identifying distant micrometastasis of gastric cancer.

British Journal of Cancer 73, S. 83-87, 1996.

(88) MAGUIRE, D.; O'SULLIVAN, G. C.; MCNAMARA, B.; COLLINS, K.; SHANAHAN, F.

Bone-marrow micrometastases in patients with brain metastases from epithelial cell tumours

Q. J. Med. 93: S. 611-615, 2000

(89) MANEGOLD, C.; KREMPIEN, B.; KAUFMANN, M.; SCHWECHHEIMER, K.; SCHETTLER, G.

The value of bone marrow examination for tumor staging in breast cancer.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 114: S. 425-428, 1988.

(90) MANN, S.; LAUCIRICA, R.; CARLSON, N.; YOUNES, A.; YANG, L.; YOUNES, M.

Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer

Human Pathology, Vol.32, No.1, 2001

(91) MANSI, J. L.; BERGER, U.; EASTON, D.; MCDONNELL, T.; REDDING, W.; GAZET, J. C.; MCKINNA, A.; POWLES, T. J.; COOMBES, R. C.

Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases.

British Medical Journal: Vol. 295, S. 1093-1095, 1987.

(92) MANSI, J. L.; BERGER, U.; COOMBES, R. C.

Detection of tumor cells in bone marrow of patients with prostatic carcinoma by immunocytochemical techniques.

The Journal of Urology: Vol. 139, S. 545-548, 1988.

(93) MANSI, J. L.; EASTON, D.; BERGER, U.; GAZET, J. C.; FORD, H. T.; DEARNALEY, D. P.; COOMBS, R. C.

Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years: follow-up.

Eur. J. Cancer: Vol. 27, S. 1552-1555, 1991.

(94) MANSI, J. L. ; GOGAS, H. ; BLISS, J. M. ; GAZET, J.-C. ; BERGER, U. ; COOMBS, C.

Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study

The Lancet, Vol 354, S. 195-200, 1999

(95) DE MANSONI, G.; PELOSI, G. ; PAVANEL, F.; DI LEO, A.; PEDRAZZANI, C.; DURANTE, E.; CORDIANO, C.; PASINI, F.

The presence of bone marrow cyokeratin-immunoreactive cells does not predict outcome in gastric cancer patients

British Journal of Cancer 86, S. 1047-1051, 2002

(96) McDONNELL, C. O.; HILL, A. D. K.; McNAMARA, D. A.; WALSH, T. N.; BOUCHIER-HAYES

Tumour micrometastases: the influence of angiogenesis

European Journal of Surgical Oncology 26:105-115, 2000

(97) MERKLE E.; BÄHR, J.; HENKE, A.; BÜHNER, M.; MARTUS, P.

Immunzytochemischer Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark als Prognosefaktor beim Mammakarzinom.

Geburts u. Frauenheilk. 54, S. 662-669, 1994

(98) MOLINO, A.; PELOSI, G.; TURAZZA, M.; SPEROTTO, L.; SONETTI, A.; NORTILLI, R.; FATTOVICH, G.; ALAIMO, C.; PIUBELLO, Q.; PAVANE, F.; MICCIOLO, R.; CETTO, G. L.

Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis.

Breast Cancer Reseach and Treatment 42: S. 23-30, 1997.

(99) MOLL R, FRANKE WW, SCHILLER DL, GEIGER B, KREPLER R.

The Catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells

Cell. 31(1), S. 11-24. 1982

(100) MOSS, T. J.; REYNOLDS, C. P.; SATHER, H. N.; ROMANSKY, S. G.; HAMMOND, D.; SEEGER, R. C.

Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastases in neuroblastoma.

The New England Journal of Medicine: Vol. 324, Nr. 4, S. 219-225, 1991.

(101) Moss, T. J.

Clinical relevance of minimal residual cancer in patients with solid malignances

Cancer and Matastasis rewiew 18, S. 91-100, 1999

(102) MOSSELMANN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R.

ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor

FEBS Letters 392: S. 49-53, 1996

(103) MÜLLER, P.; WECKERMANN, D.; RIETHMÜLLER, G.; SCHLIMOK, G.

Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridation.

Cancer Genet Cytogenet 88, S. 8-16, 1996

(104) MÜLLER, P.; HEMPEL, D.; ORUZIO, D.; EHNLE, S.; KOLLOCH, K; SCHLIMOK, G.

Sequential immunotyping and genotyping of tumor clls in bone marrow of cancer patients: a model study

Cytometry 33, S. 492-497, 1998

(105) NAUME, B.; BORGES, E.; KVALHEIM, G.; KARESEN, R.; QVIST, H.; SAUER, T.; KUMAR, T.; NESLAND J.M.;

Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early stage breast cancer carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics

Clin. Cancer Res. 7 (12): 4122-4129, 2001

(106) NEDERGAARD L.; HAERSLEV T.; JACOBSEN G. K.

Immunohistochemical study of estrogens receptors in primary breast carcinomas and their lymph node metastases including comparison of two monoclonal antibodies

APMIS 103, Seite 20-24, 1995

(107) OBERNEDER, R.; RIESENBERG, R.; KRIEGMAIR, M.; BLITZER, U.; KLAMMERT, R.; SCHNEED, P.; HOFSTETTER, A.; RIETHMÜLLER, G.; PANTEL, K.

Immunocytochemical detection and phenotypic characterization of micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with prostate cancer.

Urol. Res. 22: S. 3-8, 1994.

(108) OGAWA, S.; INOUE, S.; WATANABE, T.; HIROI, H.; ORIMO, A.; HOSOI, T.; OUCHI, Y.; MURAMATSU, M.

The complete primary structure of human estrogen receptor β (hER β) and its heterodimerization with ER α in vivo and in vitro

Biochemical and Biophysical Research Communications 243: 112-126, 1998

(109) OSBORNE, M. P.; WONG, G. Y.; ASINA, S.; OLD, L. J.; COTE, R. J.; ROSEN, P. P.

Sensitivity of immunocytochemical detection of breast cancer cells in human bone marrow.

Cancer Research 51: S. 2706-2709, 1991.

(110) OSBORNE, C. K.

Tamoxifen in the treatment of breast cancer

Drug Therapy Vol. 339, No. 22, S. 1609-1618, 1998

(111) O'SULLIVAN, G. C.; COLLINS, J. K.; KELLY, J.; MORGAN, J.; MADDEN, M.; SCHANAHAN, F.

Micrometastases: marker of metastatic potential or evidence of residual disease?

Gut 40: S. 512-515, 1997.

(112) OZBAS, S.; DAFYDD, H.; PURUSHOTHAM, A. D.

Bone marrow micrometastasis in breast cancer

British Journal of Surgery 90, S. 290-301, 2003

(113) PALMIERI, C.; CHENG, G. J.; ZELADA-HEDMAN, M.; WÄRRI, A.; WEIHUA, Z.; VAN NOORDEN, S.; WAHLSTROM, T.; COOBES, R. C.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.-A.

Estrogens receptor beta in breast cancer

Endocrine-Related Cancer 9, S. 1-13, 2002

(114) PANTEL, K.; IZBICKI, J. R.; ANGSTWURM, M.; BRAUN, S.; PASSLICK, B.; KARG, O.; THETTER, O.; RIETHMÜLLER, G.

Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer.

Cancer Research 53: S. 1027-1031, 1993.

(115) PANTEL, K.; SCHLIMOK, G.; ANGSTWURM, M.; WECKERMANN, D.; SCHMAUS, W.; GATH, H.; PASSLICK, B.; IZBICKI, J. R.; RIETHMÜLLER, G.

Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow.

Journal of Hematotherapy 3: S. 165-173, 1994.

(116) PANTEL, K.; RIETHMÜLLER, G.

Methods for detection of micrometastatic carcinoma cells in bone marrow, blood, and lymph nodes.

Onkologie 18: S. 394-401, 1995.

(117) PANTEL, K.; IZBICKI, J.; PASSLICK, B.; ANGSTWURM, M.; HÄUSSINGER, K.; THETTER, O.; RIETHMÜLLER, G.

Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases.

Lancet 347: S. 649-653, 1996.

(118) PANTEL K., DOEBERITZ M. VON K., IZBICKI J. R., RIETHMÜLLER G.

Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien.

Chirurg 68: S. 1241-1250, 1997.

(119) PANTEL, K.; OTTE, M.

Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells

seminars in Cancer biology, Vol 11, 327-337, 2001

(120) PASSLICK, B.; KUBUSCHOK, B.; IZBICKI, J.; THETTER, O.; PANTEL, K.

Isolated tumor cells in bone marrow predict reduced survival in node-negative non-small cell lung cancer

Ann Thorac Surg 68, S. 2053-2058, 1999

- (121) PETTERSSON, K.; GUSTAFSSON, J.-A.
Role of estrogens receptor beta in estrogens action
Annu.Rev. Physiol. 63, S. 165-192, 2001
- (122) PONCELET, A.J.; WEYNAND, B.; FERDIN, F.; ROBERT, A. R.; NOIHOMME, P. H.
Bone marrow micrometastasis might not be a short-term predictor of survival in erarly stages non-small cell lung carcinoma
European Journal of Cardio-Thoracic Surgery Vol. 20, No. 3, S. 481-488, 2001
- (123) REMMELE, W.; STEGNER, H. E.
Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immuno-histochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue
Pathologe 8: 138-140, 1987
- (124) RIESENBERGER, R., OBERNEDER R., KRIEGMAIR M, EPP M., BITZER U., HOFFSTETTER A., BRAUN S., RIETHMÜLLER, G., PANTHEL K.
Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumor cells:
Hytochemistry, 99: 61-66, 1993
- (125) RKI KREBSKRANKHEITEN.
www.rki.de
Robert Koch Institut, Berlin 2006
- (126) RODER, J.; THORBAN, S.; PANTEL, K.; SIEWERT, J. R.
Micrometastases in bone marrow: prognostic indicators for pancreatic cancer
World J. Surg. 23, S. 888-891, 1999
- (127) RHODES, A., JASANI, B.; BARNES, D. M. ; BOBROW, L. G. ; MILLER, K. D.
Reability of immunohistochemical demonstration of estrogen receptors in routine practise:interlaboratory variance in the sensivity of detection and evaluation of scoring systems
J Clin Pathol 53, S. 125-130, 2000
- (128) ROSE, P.P; GROSHEN, S.; SAIGO, P. E.; KINNE, D. W.; HELLMANN, S.
A longtherm follow-up study of survival in stage I (T1, N0, M0) and stage II (T1, N1, M0) breast carcinoma.
J. Clin. Oncol. 7:355-366,1989

- (129) ROUZIER, R.; BOURSIN, E.; GROZIER, F.; BERGER, A.; LOUVARD, D.; ROBINE, S.
Immunocytochemical detection of bone marrow micrometastases in colorectal carcinoma patients using a monoclonal antibody to villin
Cytometry(Communications in Clinical Cytometry) 46, S. 281-289, 2001
- (130) SAR, M.; WELSCH, F.
Oestrogen receptor alpha und beta in rat prostate and epididymis
Andrologia 32: 295-301, 2000
- (131) SCHIFF, R.; MASSARWEH, S.; SHOU, J.; OSBORNE, C. K.
Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signalling and estrogens receptor coregulators modulate response
Clinical Cancer Research, Vol. 9, S. 447-454, 2003
- (132) SCHLIMOK, G.; FUNKE, I.; HOLZMANN, B.; GÖTTLINGER, G.; SCHMIDT, G.; HÄUSER, H.; SWIERKOT, S.; WARNECKE, H. H.; SCHNEIDER, B.; KOPROWSKI, H.; RIETHMÜLLER, G.
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.: Vol. 84, S. 8672-8676, 1987.
- (133) SCHLIMOK, G.; FUNKE, I.; BOCK, B.; SCHWEIBERER, B.; WITTE, J.; RIETHMÜLLER, G.
Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance.
J. of Clinical Oncology: Vol. 8, Nr. 5 S. 831-837, 1990.
- (134) SCHLIMOK, G.; FUNKE, I.; PANTHEL, K.; STROBEL, F.; LINDEMANN, F.; WITTE, J.; RIETHMÜLLER, G.
Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance.
Eur. J. Cancer: Vol. 27, S. 1461-1465, 1991.
- (135) SOBIN LH; WITTERKIND CH (EDS)
UICC TNM classification of malignant tumors
6th edn. Wiley-Liss, New York, 2002

- (136) SOETH, E.; RÖDER, C.; JUHL, H.; KRÜGER, U.; KREMER, B.; KALTHOFF, H.
The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease.
Int. J. Cancer(Pred. Oncol.) 69: S. 278-282, 1996.
- (137) SOLOMAYER, E.F.; DIEL, I. J.; SALANTI, G.; HAHN, M.; DGOLLAN C.; SCHUTZ, F.; BASTERT, G.
Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients
Clin. Cancer Res. 7(12): 4102-4108, 2001
- (138) STAHEL, R. A.; MABRY, M.; SKARIN, A. T.; SPEAK, J.; BERNAL, S. D.
Detection of bone marrow metastasis in small-cell lung cancer by monoclonal antibody.
Journal of Clinical Oncology: Vol. 3, Nr. 4, 1985.
- (139) STATHOPOULOU, A.; VLACHONIKOLIS, I.; MAVROUDIS, D.; PERRAKI, M.; KOUROSSIS, CH.; APOSTOLAKI, S.; MALAMOS, N.; KAKOLYRIS, S.; KOTSAKIS, A.; XENIDIS, N.; REPPA, D.; GEORGOULIAS, V.
Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer:evaluation of their prognostic significance
Journal of Clinical Oncology Vol. 20, No. 166, S. 3404-3412, 2002
- (140) TAUBERT, H.; BLÜMKE, K.; BILKENROTH, U.; MEYE, A.; KUTZ, A.; BARTEL, F.; LAUTENSCHLÄGER, C.; ULBRICH, E. J.; NASS, N.; HOLZHAUSEN, H.-J.; KOELBL, H.; LEBRECHT, A.
Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases
Gynecologic Oncology 92, S. 256-261, 2004
- (141) THOR, A.; VIGLIONE, M. J.; OHUCHI, N.; SIMPSON, J.; STEIS, R.; COUSAR, J.; LIPPMAN, M.; KUFE, D. W.; SCHLOM, J.
Comparison of monoclonal antibodies for the detection of occult breast carcinoma metastases in bone marrow.
Breast Cancer Research and Treatment 11: S. 133-145, 1988.
- (142) THORBAN, S.; RÖDER, J. D.; NEKARDA, H.; PUNK, A.; SIEWER, J. R.; PANTEL, K.
Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with esophageal carcinoma.
Journal of the National Cancer Institute 88: Nr. 17, S. 1222-1227, 1996.
- (143) THORBAN, S.; RÖDER, J. D.; PANTEL, K.; SIEWERT, J. R.

Epithelial tumour cells in bone marrow of patients with pancreatic carcinoma detected by immunocytochemical staining.

European Journal of Cancer: Vol 32A, Nr. 2, S. 363-365, 1996.

(144) THORBAN, S.; RODER, J. D.; PANTEL, K.; SIEWERT, R.

Immunocytochemical detection of isolated epithelial tumor cells in bone marrow of patients with pancreatic carcinoma.

Am J. Surg. 172: S. 297-298, 1996.

(145) THOMAS L.;

Labor und Diagnose, 5. Auflage, S. 1117-1118

(146) TREMBLAY, G. B.; TREMBLAY, A.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. A.; LABRIE, F.; GIGUÈRE, V.

Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogens receptor β .

Molecular endocrinology, Vol. 11, No. 3: 353-365, 1997

(147) TSAVELLAS, G.; PATEL, H.; ALLEN-MERSH, T. G.

Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer

British Journal of Surgery 88, S. 1307-1320, 2001

(148) VAGUNDA V.; LANDYS K.; KANKKUNEN J.-P.; VAGUNDOVA, M; HULTBORN, R.; KOVARIK, J; HUGOSSON, J.

Bone marrow metastases in patients with stages I-II localised prostate cancer

Eur. J. of Cancer 37: 1847-1852, 2001

(149) VAN HEEK, N. T.; TASCILAR, M.; VAN BEEKVELD, J. L.; DRILLENBURG, P; OFFERHAUS, G. J. A; GOUMA, D. J

Micrometastasis in bone marrow of patients with suspect pancreatic and ampullary cancer

EJSO 27: 740-745, 2001

(150) WECKERMANN, D.; MÜLLER, P.; WAWROSCHEK, F.; KRAWCZAK, G.; RIETHMÜLLER, G.; SCHLIMOK, G.;

Micrometastases of bone marrow in localized prostate cancer: correlation with established risk factors

J. of Clinical Oncology, Vol. 17, No 11, S. 3438-3443, 1999

- (151) WERTHER, K.; NORMARK, M.; BRÜNNER, N.; NIELSEN, H. J.
Cytokeratin-positive cells in preoperative peripheral blood and bone marrow aspirates of patients with colorectal cancer
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 62, S. 49-58, 2002
- (152) WHITE, R.; PARKER, M. G.
Molecular mechanisms of steroid hormone action
Endocrine-Related Cancer 5: 1-14, 1998
- (153) WIEDSWANG, G.; KÅRESEN, R.; KVALHEIM, G.; NESLAND, J. M.; QVIST, H.; SCHLICHTING, E.; SAUER, T.; JANBU, J.; HARBITZ, T.; NAUME, B.
Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer
J. of Clinical Oncology, Vol. 21, No. 18, S. 3469-3478, 2003
- (154) WITTEKIND C., WAGNER G.
TNM-Klassifikation maligner Tumoren
5. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg
- (155) WOOD JR., D. P.; BANKS, E. R.; HUMPHREYS, S.; MCROBERTS, J. W.; RANGNEKAR, V. M.
Identification of bone marrow micrometastases in patients with prostate cancer.
Cancer 74: Nr. 9, S. 2533-2540, 1994
- (156) WYLD, D. K.; SELBY, P.; PERREN, T. J.; JONAS, S. K.; ALLEN-MERSH, T. G.; WHEELDON, J.; BURCHILL, S. A.
Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20
Int. J. Cancer (pred. Oncol.) 79, S. 288-293, 1998
- (157) YASUMOTO, K.; OSAKI, T.; WATANABE, Y.; KATO, H.; YOSHIMURA, T.
Prognostic value of cytokeratin-positive cells in the bone marrow and lymph nodes of patients with resected nonsmall cell lung cancer: a multicenter prospective study
Ann Thorac Surg. 76, S. 194-202, 2003

9 Danksagung

Besonders danken möchte ich

meinen Eltern, die immer an meiner Seite standen und mir in Allem unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. med. K.-W. Jauch für die freundliche Vergabe des Themas.

Frau PD Dr. Ilona Funke für die intensive Betreuung bei der Erstellung der Arbeit und vor allem für Ihr enormes Engagement und Hilfe in einer für mich sehr schwierigen Zeit.

Frau PD Dr. Barbara Mayer für die großzügige Unterstützung.

Herrn Dr. W. Schraut für den Beitrag bei der statistischen Auswertung und Frau Michaela Rolle (MTA) für den sorgfältigen technischen Beistand.

10 Lebenslauf

Geburtsdatum und Ort

05. Oktober 1968 in Manaus, Amazonas, Brasilien

Schulbildung

N. S. do Rosário-Schule in Itacoatiara und Manaus / Brasilien (bis einschließlich 8. Klasse)

Contato Schule in Recife / Brasilien (9. bis 11. Klasse)

Aufnahmeprüfung Universität

Studium

Medizinstudium an der Universität „Faculdade de Ciências Médicas de Pernambuco“ (FESP/PE) in Recife / Brasilien

Ärztliche Tätigkeiten

AIP: Gynäkologie / Geburtshilfe, Pädiatrie, Innere Medizin, Chirurgie.

Assistenzärztin in der dermatologisch/allergologischen Privatpraxis von Dr. Reichhart/Dr. Schatz in München.

Wissenschaftliche Hilfskraft im Labor für Klinische und Experimentelle Onkologie von Fr. PD Dr. I. Funke in der Klinischen Forschung Chirurgie - Klinikum Großhadern

Koordinatorin des Brustzentrums der LMU.

Seit 01.12.2003 DRG-beauftragte in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie – Klinikum Großhadern.

Promotion

Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums Großhadern München

Direktor: Prof. Dr. K.-W. Jauch

Betreuung der Arbeit: Frau PD Dr. med. Ilona Funke

Thema: *„Phänotypische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen“*