

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Direktor: Professor. Dr. K. Friese

**CD31-Expression am Primärtumor und Nachweis hämatogen
disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von
Brustkrebspatientinnen: Korrelation und prognostische Relevanz**

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

vorgelegt von

Petra Nicole Eisenmann

aus München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. W. Janni

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. V. Heinemann
Priv. Doz. Dr. Chr. Klein

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.05

1	Einleitung	5
2	Fragestellungen	7
3	Patientinnen und Methode	7
3.1	Durchführung der Knochenmarkaspirationen.....	7
3.2	Aufbereitung des Knochenmarkspirates und Detektion cytokeratin-positiver Zellen	9
3.2.1	Färbeprotokoll CD31.....	14
3.2.2	Charakterisierung der verwendeten Antikörper.....	17
3.2.3	Positiv und Negativ Kontrolle / Spezifitätskontrolle	18
3.2.4	Auswertung der CD31 Expression.....	18
3.3	Beschreibung des Patientinnenkollektives	20
3.3.1	Gesamtkollektiv zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms	20
3.3.2	Therapierichtlinien	23
3.4	Nachbeobachtung und Statistische Methodik	24
4	Ergebnisse	27
4.1	Inzidenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms.....	27
4.2	Inzidenz der CD31-Expression zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms.....	29
4.3	Korrelation einer CD31-Expression mit dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark	31
4.4	Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Expressionstatus von CD31	32
4.5	Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Knochenmarkstatus	33
4.6	Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit der TumorgroÙe	35
4.7	Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus	36
4.8	Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Expressionstatus von CD31	37
4.9	Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus	39
4.10	Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit der TumorgroÙe....	41

4.11 Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus	42
5 Multivariate Analyse	43
5.1 Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben der Patientinnen.....	43
5.2 Multivariate Analyse für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen	44
6 Diskussion	45
6.1 Entwicklung des Nachweises minimal residueller Tumorerkrankungen.....	45
6.2 Nachweis disseminierter Tumorzellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms.....	46
6.3 Kontroversen in der Methodik des Nachweises disseminierter Tumorzellen .	50
6.4 Nachweis der Neoangiogenese am Primärtumor zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms	52
6.5 Kontroversen in der Methodik des Nachweises von CD31	57
7 Zusammenfassung	59
8 Abbildungsverzeichnis	61
9 Tabellenverzeichnis.....	63
10 Anhang	64
11 Literaturverzeichnis.....	66
12 Danksagung	76
13 Lebenslauf.....	77

1 Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste Todesursache von Frauen im Alter von 40 bis 55 Jahren⁴⁰. Aus diesem Grund ist es besonders wichtig, nach neuen Prognosefaktoren und Therapien zu suchen. Ganz allgemein ist die Prognose eines Mammakarzinoms von der dynamischen Interaktion zwischen der anatomischen Ausdehnung des Krebses, dem Zeitpunkt der Erstdiagnose, dem Wachstum des Karzinoms einerseits und der Immunkompetenz der Patientin sowie einer angemessenen Therapie andererseits abhängig⁴⁰. Etwa 40 % der Patientinnen, die ein Mammakarzinom erleiden, werden an dieser Erkrankung versterben⁸². Die empirische Erkenntnis der häufigen Fernmetastasierung beim Mammakarzinom hat bereits früh dazu geführt, dass das Halsted'sche Konzept einer primär lokalen Erkrankung zugunsten des Konzeptes einer hauptsächlich systemisch determinierten Erkrankung verlassen wurde^{31;34}. Den bislang wichtigsten prognostischen Faktor stellt das Vorhandensein oder Fehlen von Lymphknotenmetastasen dar. Die Präsenz von axillären Lymphknotenmetastasen gilt als Zeichen für eine Tumoraussaat und ist mit einer erhöhten Rate an Rezidiven und einer geringeren Überlebensrate assoziiert⁷⁹.

Die Prognose eines Mammakarzinoms wird im Wesentlichen durch histopathologisch und immunhistochemisch definierte Parameter determiniert. Das Vorliegen eines negativen Lymphknotenstatus ist zum Beispiel mit einer Verlängerung des rezidivfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens assoziiert. Nach Aussagen der Konsensuskonferenz von St. Gallen 2003 gelten folgende zusätzlichen Faktoren als etabliert: Tumorgöße, Grading, Histologie sowie Alter bei Diagnose³⁰. In den letzten Jahren wurden neue Faktoren identifiziert, wie zum Beispiel das Zelloberflächen-Glykoprotein (CD44), Mutationen in Onkogenen (erbB-2) oder Tumorsupressor-Genen (p53, BRCA1/2) und Neoangiogenesefaktoren (CD31), die die Biologie des Mammakarzinoms beschreiben. All diese Primärtumoreigenschaften sollen das maligne Potential des Tumors charakterisieren, um eine Einschätzung der Risikosituation zum Zeitpunkt der Primärdiagnose zu evaluieren.

Angiogenese, die Entstehung neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen, ist essentiell für das Tumorstadium²¹. An diesem Prozess sind im Wesentlichen Adhäsionsfaktoren und Wachstumsfaktoren wie der vascular endothelial growth

factor (VEGF) beteiligt. Die eingesetzten Färbemethoden, die die Angiogenese im Tumor nachweisen, benutzen Antikörper gegen Endothelmarker, die zur Quantifizierung der Gefäße bzw. Messung der Vaskularisation von Tumoren herangezogen werden. Diese sind CD31, CD34 und das Faktor VIII assoziierte Antigen¹¹. Es existieren zwei verschiedene Arten der Gefäßneubildung. Hierbei handelt es sich zum einen um den Vorgang der Vaskulogenese, beschrieben als die Bildung neuer Gefäße endothelialen Ursprungs während der Embryonalentwicklung. In der Adoleszenzphase handelt es sich zum anderen um die Angiogenese, die die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Blutgefäßen umfasst. Die Angiogenese ist ein komplexer, schrittweise ablaufender Prozess. Dieser beginnt mit dem sich Zurückziehen der an der abluminalen Seite der Kapillaren anhaftenden Perizyten. Durch diesen Prozess wird die Ausschüttung von Proteasen wie z.B. eines Urokinase-Plasminogenaktivators aus den „aktivierten“ Endothelzellen verursacht. Dies bewirkt eine Degeneration der extrazellulären Matrix, die die Kapillare umgibt. Es erfolgt die Migration und Proliferation von Endothelzellen in tubenartige Strukturen. Zwischen den neuen und alten Gefäßen entstehen Anastomosen und somit die neue Gefäßversorgung². Die angiogenetische Aktivität eines Tumors lässt sich durch die Dichte der Mikrogefäße bestimmen und hat sich in mehreren Arbeiten als unabhängiger Prognosefaktor für viele Tumorentitäten einschließlich des Mammakarzinoms gezeigt^{25,23}.

Wie Braun et al. in einer Studie mit 552 Patienten, die an Brustkrebs im Stadium I – III erkrankt waren, zeigen konnte, korreliert der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mit einem signifikant häufigerem Auftreten von Fernmetastasen und tumorassoziertem Tod. Die prognostische Relevanz der Knochenmarksbefunde bestätigte sich auch in der multivariaten Analyse als unabhängiger Parameter⁷.

Fox et al. untersuchten 1979 die prognostische Relevanz sowie die Korrelation von Knochenmarksmikrometastasen und dem Nachweis von Neoangiogenese am Primärtumor Mammakarzinom²³.

In dieser Arbeit wollen wir die Beziehung zwischen Neoangiogenese und dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark an einer Serie von Brustkrebspatientinnen bestimmen.

2 Fragestellungen

Die Zielsetzung dieser Arbeit liegt in der Verbesserung des Verständnisses über die Inzidenz hämatogen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark in Abhängigkeit zur CD31-Expression am Primärtumor Mammakarzinom. Um dies zu erreichen, wurde zum einen die Untersuchung des Primärtumors auf CD31 durchgeführt, zum anderen der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark.

Im Einzelnen wurden in der vorliegenden Untersuchung folgende Fragestellungen bearbeitet:

- § Korreliert eine Überexpression von CD31 im Tumor mit dem Nachweis hämatogen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark?
- § Haben CD31 Überexpression im Tumor und Nachweis hämatogen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark jeweils eine prognostische Relevanz?

3 Patientinnen und Methode

3.1 Durchführung der Knochenmarkaspirationen

An der I. Universitätsfrauenklinik der LMU München wird die Knochenmarkpunktion im Bereich der Spina iliaca anterior superior durch die Mitglieder des Labors für Tumorummunologie durchgeführt (Abbildung 1 und Abbildung 2). Bei Patientinnen mit klinischem Verdacht auf ein Mamma-, Ovarial- oder Zervixkarzinom wird im Rahmen des Primärscreenings nach Durchführung der Intubationsnarkose, aber vor Beginn der Primäroperation, die Punktion durchgeführt. Zum Zweck einer Verlaufskontrolle nach erfolgter Primärtherapie oder im Rahmen der onkologischen Nachsorge wird der Eingriff in Lokalanästhesie ambulant auf der tagesklinischen Station der Klinik vorgenommen. Durch eine kleine Schnittinzision der Haut am Punktionsort wird das Risiko für eine Kontamination des Präparates mit epithelialen Hautzellen vermindert.

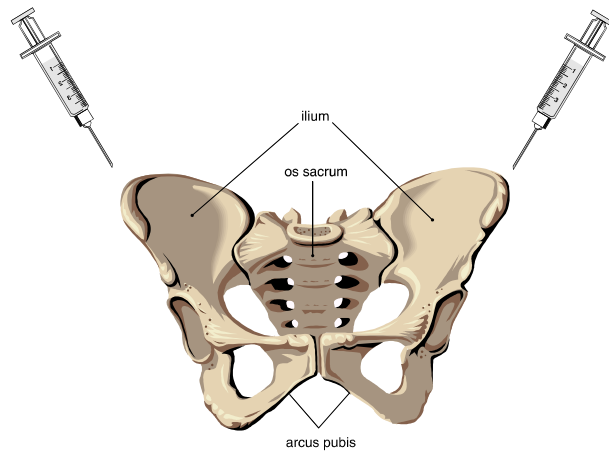


Abbildung 1. Punktionsstellen bei der Knochenmarkaspiration

Das Knochenmark wird in mit 0,5 – 1 ml Natrium-Heparin versetzte Spritzen gewonnen und anschließend unmittelbar in das tumorimmunologische Labor gebracht, um dort nach dem in Kapitel 3.2 geschilderten Verfahren aufgearbeitet zu werden.

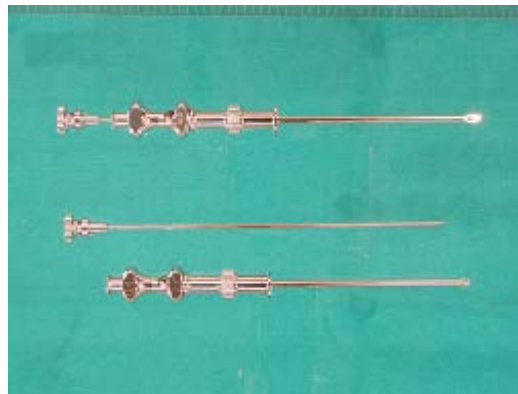


Abbildung 2. Knochenmarkaspirationsnadeln

Das schriftliche Einverständnis zum Eingriff und zur wissenschaftlichen Auswertung der aus dem Material gewonnenen Erkenntnisse wird von allen Patientinnen vor der Knochenmarkpunktion eingeholt. Zur Aufklärung dient das im Kapitel 10 (Anhang) beigefügte Merkblatt. Zur Risikoaufklärung gehört neben den generell gültigen Risiken, wie Blutung, Infektion und Wundheilungsstörung, auch das aufgrund der Punktionsstelle erhöhte Verletzungsrisiko der Beckengefäße (Aa. und Vv. iliaca

communis, iliaca interna et iliaca externa), sowie das seltene und schwerwiegende Ereignis einer Osteomyelitis. An der I. Frauenklinik Innenstadt der LMU München ist bei über 1200 Punktionen bislang noch keine klinisch relevante Komplikation aufgetreten. Die Patientinnen beschreiben immer wieder vorübergehende Reizungen des Periostes, sowie kleinere kutane Hämatome, ohne dass es jedoch hierdurch zu einer Beeinträchtigung der Patientinnen gekommen wäre.

3.2 Aufbereitung des Knochenmarkspirates und Detektion cytokeratin-positiver Zellen

Die im Folgenden beschriebene Aufarbeitung des Knochenmarkes und die Detektion von cytokeratin-positiven Zellen erfolgte weitgehend nach dem von Pantel et al. 1994 eingeführten Protokoll⁵⁵. Zwei grundlegende Arbeitsschritte waren hierzu nötig:

1. Das Anfertigen knochenmarkszelltragender **Zytospins** und
2. Die **immunzytochemische Färbung** dieser Zytospins.

Zur Herstellung der **Zytospins** wurde das Knochenmark zunächst unter sterilen Bedingungen in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit Hankscher Lösung (Biocrom, Berlin) auf 50ml aufgefüllt und 10 min bei 900 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei $r = 16$ (entsprechend 160g) in einer Hettich Zentrifuge Universal 30F bei einer Temperatur von 21°C zentrifugiert (Auslauf ungebremst). Plasma, Fettpartikel und Detritus konnten hierdurch aus der Probe entfernt werden. Den oberen Überstand pipettierten wir vorsichtig ab. Die Zellsuspension (Pellet) wurde anschließend in ein 15ml Zentrifugenröhrchen mit 8ml des Dichtegradienten Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Freiburg, Dichte 1,077 g/ml) übergeschichtet. Die folgende Abbildung 3 zeigt die entsprechend vorbereiteten Zentrifugenröhrchen vor der Zentrifugation.

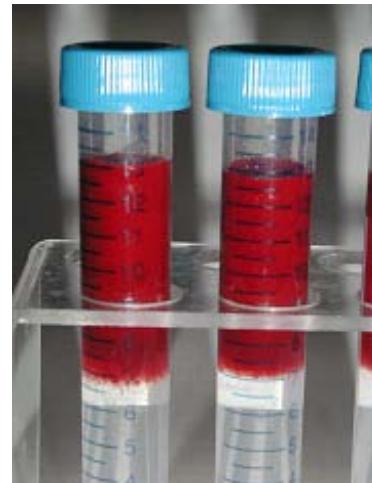
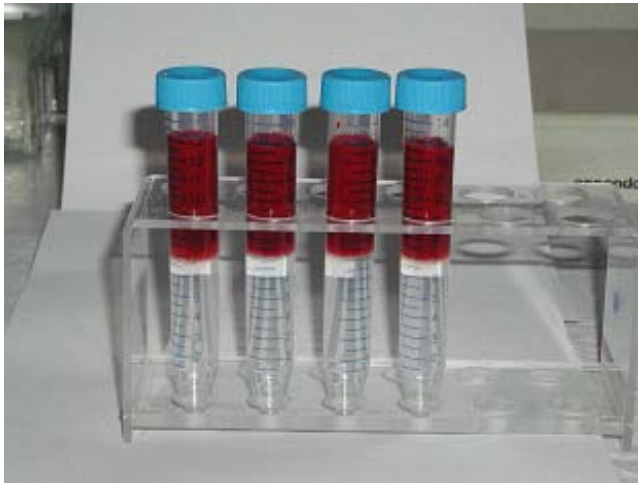


Abbildung 3. Zentrifugenröhrchen mit Zellsuspension und Dichtegradienten Ficoll-Hypaque in Gesamtansicht (links) und Detailansicht (rechts)

Es folgte die Dichtegradientenzentrifugation bei 900g (2300 rpm, 21°C) über 30 Minuten (Auslauf ungebremst). Tumorzellen, Knochenmarkzellen und eine leukozytäre Fraktion wurden durch diesen Vorgang aus der peripheren Blutbeimengung in der Interphase angereichert. Erythrozyten und Granulozyten gelangten weitestgehend in das Pellet. Die folgende Abbildung 4 zeigt die entsprechend vorbereiteten Zentrifugenröhrchen vor der Zentrifugation. Die leukozytäre Fraktion ist im rechten Bild als ‚Ring‘ zu erkennen.

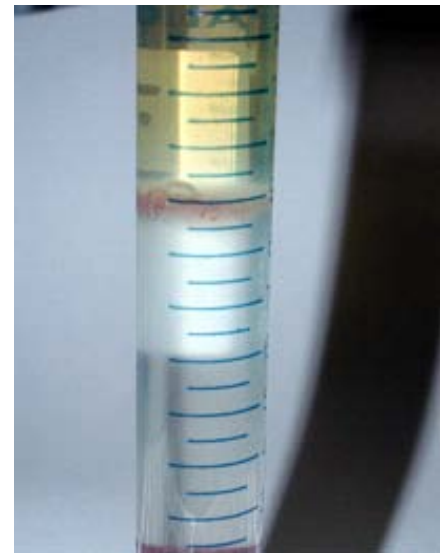


Abbildung 4. Zentrifugenröhrchen nach Zentrifugation mit Dichtegradienten Ficoll-Hypaque in Gesamtansicht (links) und Detailansicht (rechts)

Die Interphase und die obere Phase wurden mit einer Pipette aufgenommen, in ein neues 50ml Röhrchen überführt, und mit Phosphatpuffer (PBS, pH = 7,4) auf 50 ml aufgefüllt. Über eine Zeit von 10 min bei rpm 1600 und 4° Celsius (Auslauf gebremst) folgte eine neue Zentrifugierung. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Sediment in PBS gewaschen und auf 2-3ml resuspendiert. Mit der Pipette wurde das Gesamtvolumen der Suspension bestimmt. Im Anschluss wurde eine volumengleiche Mischung von 10 µl der eben bereiteten Suspension mit 10 µl Trypanblau hergestellt. Durch diese Farbsuspension wurde sowohl eine mikroskopische Vitalitätsprüfung der Zellen, als auch die Bestimmung der Zelldichte ermöglicht. Bei einem angesetzten Sollwert von 50-300 Zellen/Quadrat erfolgte die Auszählung der Zellen in der Neubauer Zählkammer (Thomakreuz 25 Quadrate ausgezählt).

Der notwendige Anteil vom Aspirationsvolumen zur Herstellung des Zytospins ließ sich mit folgender Formel berechnen:

$$Volumen = \frac{10^6 \cdot \text{Gesamtvolumen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

Hierdurch war gewährleistet, dass die geschätzte Zellzahl von 10^6 Zellen pro Zytospin erreicht wurde. Das Volumen wurde in eine 15ml Zentrifugations-Tube (vgl. Abbildung 5) überführt und mit PBS auf 4ml aufgefüllt. Nach Fertigstellung der Träger erfolgte die Zentrifugation über 3 min bei 1000 rpm und Raumtemperatur auf einer Hettich Universal 30 F Zentrifuge (Auslauf gebremst). Die so angefertigten Zytospins wurden nun 12 – 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.



Abbildung 5. Zentrifugations-Tube in der Hettich Universal 30 F Zentrifuge

Die immunzytochemische Färbung von mindestens vier Präparaten geschah mit dem monoklonalen Antikörper A45/B/B3 und der alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik. Das Antikörperserum wurde zunächst in PBS auf ein Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die Applikation der Antikörper erfolgte über einen Zeitraum von 45 min. Der murine monoklonale Antikörper A45-B/3 (Firma Micromet, München), Isotyp: IgG 1 erkennt ein gemeinsames Epitop der Keratinkomponenten CK8, CK18 und CK19^{54;55;58;59;84}.

Es schloss sich ein dreifacher Waschvorgang mit PBS an und daraufhin die Inkubation über 30 min mit dem Rabbit-Mouse Brückenantikörper ZO2593 (Firma DAKO, Dänemark), Isotyp: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Daraufhin folgte erneutes dreimaliges Waschen mit PBS und Inkubation mit dem APAAP-System (Firma DAKO, Dänemark), Isotyp: IgG1 (Kappa). Die Substratlösung für die Entwicklung des Immuno-Enzym-Konjugates mit alkalischer Phosphatase besteht aus drei separat angesetzten Lösungen. Lösung I enthält 90mg Levamisole [L-2,3,5,6-Tetrahydro-6-phneylimidazo 2,1-b thiazole] und 62,5ml 0,2-molare Trislösung (Firma Sigma, Deisenhofen) in 250ml destilliertem H₂O. Nach Zugabe von Lösung II (50mg Na NO₂ [Firma Merck, Darmstadt] in 1250 µl Aqua dest. und 500 µl 5% Neufuchsin [Firma Serva, Heidelberg] in 2-molarer HCL-Säure [Firma Merck, Darmstadt]) wurde Lösung III (125mg Naphtol-AS-BI-Phosphat [Firma Sigma, Deisenhofen], gelöst in 1500 µl N,N-Dimethylformamid [Firma Sigma, Deisenhofen]), zugesetzt. Die Präparate verblieben 20 min in der gefilterten Substratlösung. Die gewaschenen Präparate wurden feucht mit dem wässrigen Eindeckmittel Aquatex (Firma Merck, Darmstadt) mit Deckgläschen bedeckt.

Durch manuelles Screening mittels Durchlichtmikroskopie konnten nun die angefärbten, cytokeratin positiven Zellen detektiert werden.

Alle der folgenden Kriterien für die Klassifikation einer isolierten Tumorzelle (vgl. Abbildung 6) bei Positivfärbung müssten erfüllt sein:

- § Nachgewiesene Zellintegrität bei der Vitalitätsprüfung der Zellen (durchgehende Zellmembran, Zellkern abgrenzbar)
- § Zellen gleichmäßig angefärbt (darf intrazelluläre Granula haben)
- § Im Phasenkontrast Bestätigung der Färbung und gut erkennbarer Zellkern
- § Positivfärbung in gleicher Ebene mit den umgebenden Zellen

§ Weitere pathomorphologische Kriterien wie etwa das Zellkern/Zellplasmaverhältnis wurden nicht angewandt

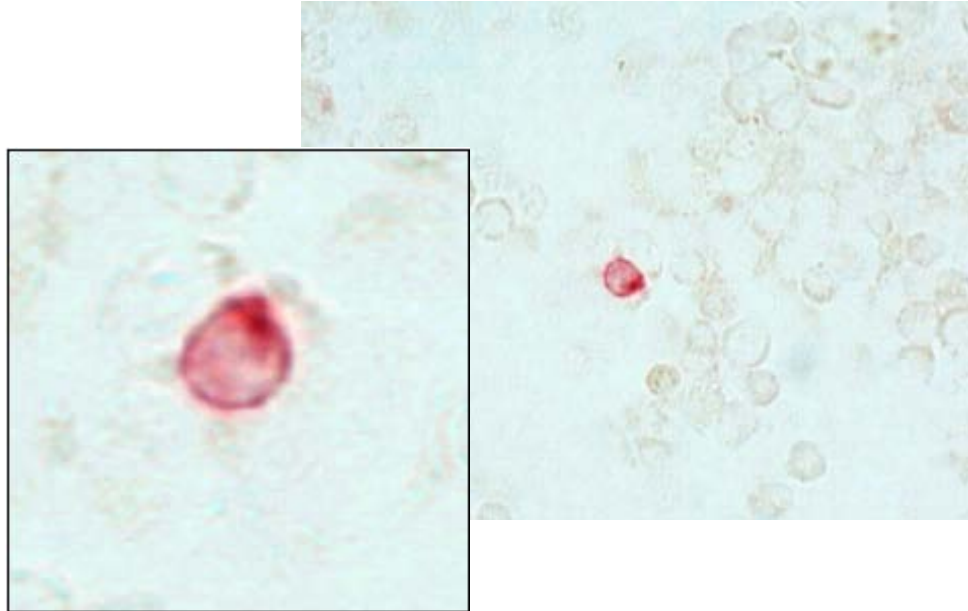


Abbildung 6. Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle im Knochenmarkspirat (mit Detailansicht)

Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle mit dem Antikörper A45B/B3 und der alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik; zu beachten ist vor allem die fehlende Anfärbung der im Hintergrund erkennbaren Knochenmarkszellen.

Diese definierenden Kriterien galten sowohl für singuläre isolierte Tumorzellen, als auch für sogenannte Zellcluster (vgl. Abbildung 7), also Konglomeraten von mindestens zwei cytokeratin-positiven Zellen. Alle Präparate wurden grundsätzlich von zwei unabhängigen Mitarbeitern des Labors für Tumorummunologie ohne Kenntnis der Tumorentität und des Tumorstadiums analysiert. Für die endgültigen Klassifikation zu einer Tumorzelle mussten beide Gutachter übereinstimmen.

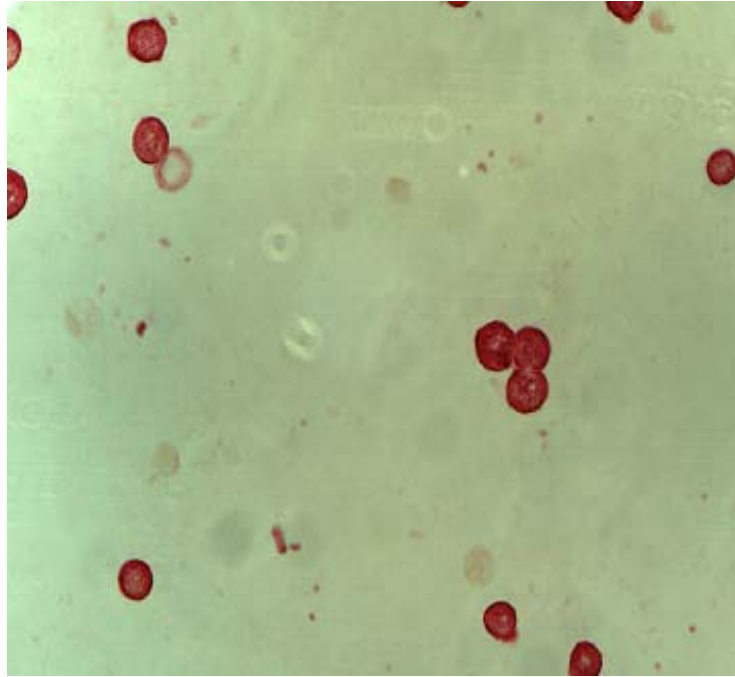


Abbildung 7. Positivfärbung eines Cellclusters von Mammakarzinomzellen (mit Detailansicht)

3.2.1 Färbeprotokoll CD31

Es wurden an der I. Frauenklinik der LMU München insgesamt 195 Paraffinschnitte eines primären Mammakarzinoms untersucht, bei denen ebenfalls das Resultat einer Knochenmarkspunktion vorlag. Die Paraffinschnitte waren 2-3 μm dick und auf Super Frost/Plus Objektträgern (Firma: R. Langenbrick) gezogen. Vor der Entparaffinisierung trockneten die Objektträger über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank. Beim Entparaffinisieren wurden die Schnitte für 10 min in Xylol getaucht, dann wurden sie durch eine absteigende Alkoholreihe (100%-96%-70%igen Alkohol) gezogen, bis reines Aqua dest erreicht war. Zum Andauen der Präparate wurden die Objektträger in einem Schnellkochtopf in 1L Citratlösung für 5 Minuten gekocht. Die Präparate wurden der Citratlösung zugegeben, sobald diese 100°C erreicht hatte. Der Deckel des Kochtopfes wurde dann verschlossen, und die Präparate wurden bei 100° C für 3 Minuten angedaut. Dann wurde die Hitze stark reduziert, da sich die Paraffinschnitte bei zu hoher Temperatur von den Objektträgern lösten. Die Präparate wurden dann nach insgesamt 5 min aus dem Schnellkochtopf entnommen und in Aqua dest. überführt. Danach folgte ein zweimaliger Waschgang

in PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,96 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Vor der Anwendung der Vectastatin® Elite ABC – Kit Mouse IgG PK-6102 (Firma Vector Laboratories) mussten die Präparate nochmals für 20 min mit 3% H₂O₂ geblockt werden. Das Vectastatin® ABC System ist einer der weit verbreitetsten und akzeptiertesten sowie sensitivsten, ökonomischsten und verlässlichsten Immunoperoxidase Systeme, die derzeit erhältlich sind. Das 68.000 kDa schwere Glykoprotein Avidin ($10^{15}M^{-1}$) hat eine enorm hohe Affinität zu dem niedermolekularen Vitamin Biotin. Diese Bindungsaffinität ist um den Faktor 1×10^6 stärker als eine herkömmliche Antigen-Antikörper-Bindung. Die Biotin-Avidin Bindung ist irreversibel. Ergänzend zu dieser hohen Affinität kann das Biotin-Avidin System sehr effektiv genutzt werden, da Avidin 4 Bindungsstellen für Biotin aufweist und die meisten Proteine (inklusive Antikörper und Enzyme) mit diversen Biotin Molekülen konjugiert werden können. Um einen Primärantikörper sichtbar zu machen, ist die Zugabe eines biotinabhängigen affinitätsfreien Zweitantikörpers notwendig. Der biotinabhängige Zweitantikörper kann dann gekennzeichnet werden durch einen makromolekularen Komplex zwischen einem Avidin und einem biotinabhängigen Enzym, welches noch Biotinbindungsstellen offen hat, wie z.B das Vectastatin ABC System.

Das Vectastatin® ABC System beinhaltet 3 Systeme:

Das Normalserum (Blockserum): 3 Tropfen Normalserum entsprechen 150 µl
auf 10 ml PBS

Biotinabhängiger Antikörper: 3 Tropfen Normalserum auf 10 ml PBS und 1
Tropfen biotinabhängiger Antikörper

Vectastatin Elite ABC Reagenz: 2 Tropfen Reagenz A auf 5ml PBS und 2
Tropfen Reagenz B

Vor Anwendung der Vectastatin Elite ABC Reagenz musste dieses, bestehend aus Reagenz A und Reagenz B, mit 5 ml PBS eine halbe Stunde inkubiert werden. Die Präparate wurden nun mit Normalserum 20 min geblockt. Die restliche Flüssigkeit wurde von den Paraffinschnitten abgeklopft. Es wurde der Antikörper CD31 Clone JC/70A Code No. M 0823 (Dako U.K.) verwendet. Dieser Antikörper muß bei 2-8°C

gelagert werden. Die Inkubationszeit der Paraffinschnitte betrug 45 min in einer Konzentration des primären Antikörpers von 1:30. Nach 45 min Inkubationszeit wurden die Präparate 3 mal in PBS gewaschen. Nun wurde mit dem biotinabhängigen Antikörper für 30 min inkubiert. Danach erfolgte ein 3 maliges Waschen mit PBS und eine weitere Inkubation über 30 min mit dem Vectastatin® Elite ABC Reagenz, bestehend aus Reagenz A und Reagenz B. Um die Peroxidase sichtbar zu machen, wurden die Paraffinschnitte mit DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) - Substratkit (Coulter-Immunotech) behandelt. Der DAB Substratkit wurde für den Nachweis von zellulären Antigenen genutzt, wenn Meerrettich-Peroxidase konjugiert an (Strept-) Avidin oder Antikörper als Nachweisenzym verwendet wurde. In Verbindung mit H₂O₂ wurde das Substrat DAB (3,3- Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) durch Peroxidase zu einem Nitrofarbstoff oxidiert, der unlöslich war und am Ort der Enzymaktivität ein Präzipitat bildete. Abbildung 8 zeigt die Neoangiogenese in Form einer braunen Färbung. Dieses Präzipitat war im Lichtmikroskop als braune Färbung sichtbar und markierte spezifisch die Lokalisation des Antigens. Die Reaktion benötigte einen bestimmten pH-Wert, der durch den Trispuffer (= Pufferkonzentrat im DAB-Substratkit) gewährleistet wurde. Die Herstellung der Substratlösung erfolgte, indem man 5ml destilliertes H₂O in eine leere Flasche pipettierte. Hinzu gegeben wurden 5 Tropfen des Trispufferkonzentrats, 5 Tropfen des Chromogens DAB und 2 Tropfen der 3 % H₂O₂-Lösung. Danach musste die Mischung gut geschüttelt werden. Die Substratlösung musste kurz vor Gebrauch hergestellt werden, da sie nur eine Stunde stabil bleibt. Nach der Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase wurden die Objektträger 3 mal mit Waschpuffer gespült. Dabei war darauf zu achten, dass der Waschpuffer ausgewechselt wurde. Dann wurden die Gewebeschnitte 45 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Tropfen der fertigen, frisch angesetzten Substratlösung inkubiert, bis eine optimale Färbung erreicht war. Die Substratlösung wurde von den Präparaten dann mit Aqua dest. abgespült. Die Schnitte verweilten dann nochmals für 2 min in Aqua dest. Für die Kerngegenfärbung tauchte man dann die Schnitte für 3 min in eine Hämatoxylin Lösung. Anschließend wurden die Schnitte über 10 min in Leitungswasser inkubiert. Die Alkoholreihe wurde nun nochmals von oben (hochprozentig) nach unten bis zum Xylol durchwandert. Das Eindeckeln erfolgte dann anschließend mit Eukit.

Herstellung des Citratpuffer: (10 mM):

Der Citratpuffer wird aus einer Stammlösung A bestehend aus 21,01 g Citronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) in 1000 ml a.d. zu 18 ml und einer Stammlösung B bestehend aus 29.41g Natriumacetat ($C_6H_5Na_3O_7$) in 1000ml a.d. zu 82 ml hergestellt.

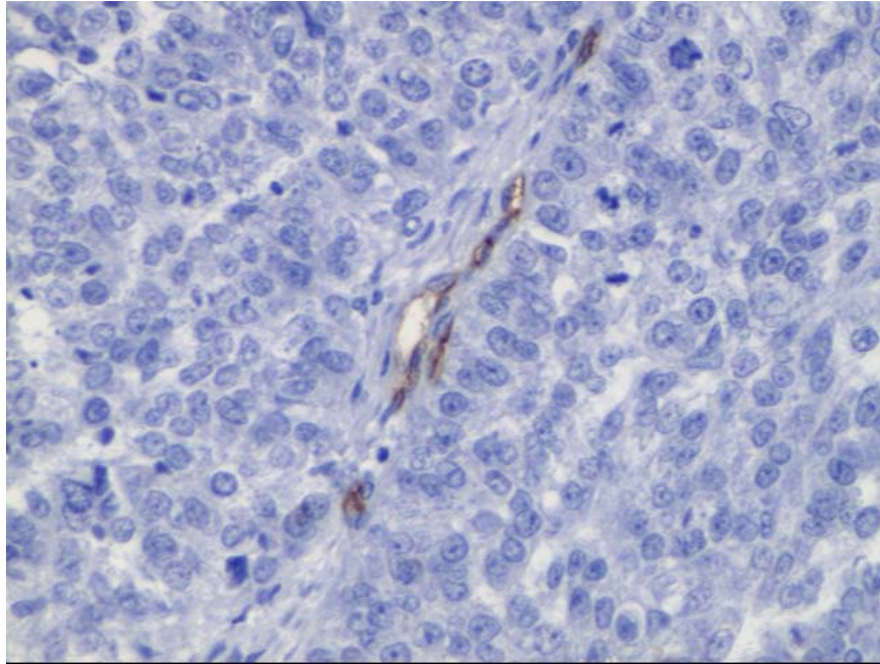


Abbildung 8. CD31 positive Expression

3.2.2 Charakterisierung der verwendeten Antikörper

CD31 (PECAM / endo CAM-1) gehört zu der Familie der Immunoglobuline mit Adhäsionsmöglichkeiten. Es ist ein einzelkettiges Typ 1 transmembranöses Glykoprotein mit einer Molekularmasse von 130 kDa. CD31 wird vor allem stark von Endothelzellen exprimiert. Auch einige Leukozyten exprimieren CD31. CD31 ist ein Adhäsionsmolekül mit homophilen und heterophilen Bindungsstellen. Die homogene Bindungsstelle dient der transendothelialen Diapedese und Passage durch extrazelluläre Membranen von Leukozyten. Die heterogenen Anteile enthalten Integrine $\alpha\beta_3$ und Glykosaminyglykane. Das Anfärben von Gefäßen mit dem CD31 Antikörper hat gezeigt, dass dieser zur Beurteilung von Neoangiogenese in verschiedenen Tumorentitäten wie Brustkrebs, Colonkarzinom und Bronchialkarzinom genutzt werden kann^{60;87}. Die Dissemination von Tumorzellen innerhalb von Gefäßen umfasst im Wesentlichen das Rollen, die Triggerung, die

Adhäsion an die Endothelzellen und die Wechselwirkung der Tumorzellen mit Komponenten der subendothelialen Matrix. Das Überleben der Tumorzellen wird vor allem durch eine Tumorthrombenbildung gewährleistet, wofür Interaktionen zwischen den Thrombozyten und den Tumorzellen notwendig sind⁶⁵.

3.2.3 Positiv und Negativ Kontrolle / Spezifitätskontrolle

In allen Färbungen wurde eine standardisierte Spezifitätskontrolle mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Als Kontrollantikörper wurden murine Immunoglobulin - Isotypen aus Myelomen eingesetzt, die keine menschlichen Epitope erkennen – Klon MOPC 21 (Fa. Sigma, Deisenhofen), Isotypen IgG1₁, IgG2b, IgG3. Ein Lymphknotenpräparat wurde als Negativkontrolle verwendet. Die verwendete Konzentration des MOPC–Antikörpers betrug 1:500. Ein Primärtumorpräparat mit gesicherter Neoangiogenese, welches mit dem entsprechenden Primärantikörper CD31 behandelt wurde, diente als Positivkontrolle. Als Kontrollpräparate dienten Zelllinien mit definierter Antigenität. Dies erlaubte die sichere Interpretation spezifischer Bindungen verschiedener monoklonaler Antikörper auf bekannten, antigen-positiven Zelllinien und eventuell unspezifischer Bindungen auf bekannten, antigen-negativen Zelllinien. Auf diese Weise konnte ein positives sowie ein negatives Färberesultat verifiziert werden.

3.2.4 Auswertung der CD31 Expression

Mit Hilfe der manuellen Durchlichtmikroskopie (Axiophot Durchlicht-Auflicht Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss) wurden die einzelnen gefärbten Primärtumorpräparate in einer Vergrößerung von 1:40 befundet. Nach einer Auswahl von drei hotspots (Tumorgebiet mit höchster Gefäßdichte) pro Präparat wurden diese mit der eingebauten analogen Kamera der Firma Zeiss abgelichtet⁸³. Die Ablichtungen der Präparate wurden im hauseigenem Fotolabor im 13x18cm vergrößertem Format entwickelt. Mit Hilfe der in Abbildung 9 abgebildeten 25 Punkt Chalkley Count-Schablone konnte nun die Auswertung erfolgen. Dazu wurde die Schablone über die zuvor entwickelten Bilder gelegt. Die auf der Schablone abgebildeten Punkte wurden nun mit dem Bereich der maximalen Expression der

Neoangiogenese (hotspot) in Deckung gebracht. Aus den ausgezählten Punktzahlen wurde für jede Patientin der Mittelwert berechnet, um sie dann in positive und negative Expression unterteilen zu können. Eine negative Expression entsprach einem Wert kleiner 5, bei einem Wert größer 5 wurde von einer positiven Expression ausgegangen¹².

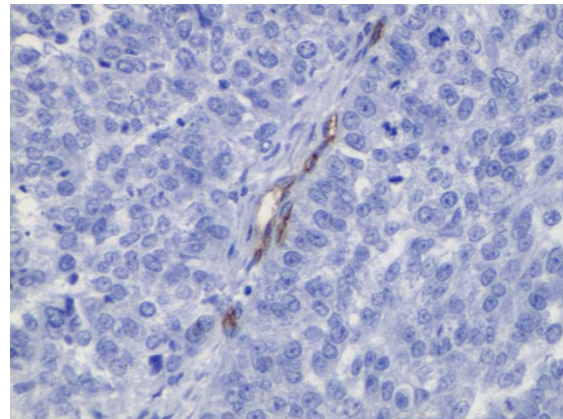
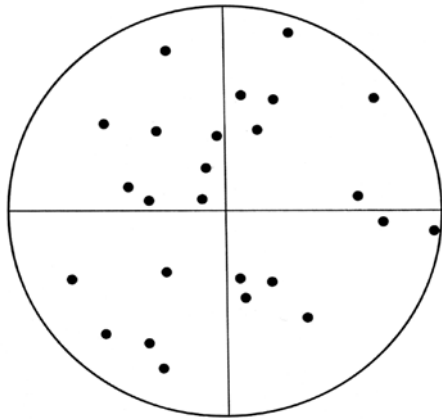


Abbildung 9. Chalkley - Count Schablone

3.3 Beschreibung des Patientinnenkollektives

3.3.1 Gesamtkollektiv zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms

Im Zeitraum von August 1998 bis Dezember 2000 wurde an der I. Frauenklinik bei 195 konsekutiven Patientinnen mit primärem Mammakarzinom vor Beginn der Primärtherapie eine Knochenmarkaspiration durchgeführt. Ausgeschlossen wurden Patientinnen, bei denen eine primäre Fernmetastasierung oder ein Zweitmalignom vorlag. Die Knochenmarkaspirationen nahm man in der Regel vor Beginn der Primäroperation nach Einleitung der Intubationsnarkose vor. Alle Patientinnen mussten am Tag vor dem geplanten Eingriff ihr schriftliches Einverständnis geben (siehe Anhang 10).

Das Durchschnittsalter der untersuchten Patientinnen betrug 57,8 Jahre (Minimum 31, Maximum 88, Standardabweichung 11,1).

In Tabelle 1 sind die detaillierten onkologischen Charakteristika der Patientinnen zum Zeitpunkt der Primärtherapie dargestellt.

Tabelle 1. Gesamtkollektiv der Patientinnen mit Knochenmarkpunktion:
Charakteristika zum Zeitpunkt der Primärtherapie

	Anzahl der Patientinnen (n=195)	Prozent
Tumorgröße		
pT1	1	0,5
pT1a	3	1,5
pT1b	27	13,8
pT1c	92	47,2
pT2	64	32,8
pT3	2	1,0
pT4	1	0,5
pT4b	3	1,5
pT4d	2	1,0
Axilläre Lymphknotenmetastasen[†]		
pN0	107	54,8
pN0(i-)	79	40,5

pN0(i+)	28	14,3
PN1mi	4	2,1
pN1a-c	39	20
pN2	20	10,2
pN3	25	12,8
Anzahl der Lymphknotenmetastasen		
1-3	43	20,1
4-9	20	10,3
≥ 10	25	12,8
Grading		
G1	6	3,1
G2	80	41,0
G3	57	29,2
GX	52	26,7
Menopausenstatus		
Prämenopausal	58	29,7
Postmenopausal	137	70,3
Östrogenrezeptorstatus		
Positiv	127	65,2
Negativ	68	34,9

Die Primäroperation bestand bei 78 Patientinnen aus einer primären oder sekundären modifiziert radikalen Mastektomie (40%), 117 Patientinnen konnten brusterhaltend operiert werden (60 %). Die durchschnittliche Tumorgöße betrug 1,5 cm (Standardabweichung 1,9). Durch axilläre Dissektion wurden im Durchschnitt 18 axilläre Lymphknoten (Standardabweichung 6,1) entfernt. Im Mittel waren 3 axilläre Lymphknoten metastatisch befallen (Standardabweichung 6,6).

Histopathologische Zusatzkriterien des Primärtumors, wie der histologische Subtyp, die Präsenz einer den Tumor umgebenden Häm- und Lymphangiosis carcinomatosa, sowie die Häufigkeit einer multifokalen und - zentrischen Tumorausbreitung sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. Histologische Zusatzkriterien des Primärtumors zum Zeitpunkt der Primärtherapie

	Anzahl der Patientinnen (n=195)	Prozent
Histologischer Subtyp		
Duktal	115	59,0
Lobulär	38	18,6
Gemischt duktal-lobulär	18	9,2
Medullär	2	1,0
Inflammatorisch	2	1,0
Sonstige	20	11,2
Lymphangiosis carcinomatosa		
Keine	151	22,6
Vorhanden	44	77,4
Hämangiosis carcinomatosa		
Keine	190	97,4
Vorhanden	5	2,6
Multifokalität		
Ja	99	50,8
Nein	96	49,2
Multizentrität		
Ja	23	11,8
Nein	172	88,2
Primäroperation		
Mastektomie	78	40
Brusterhaltend	117	60
Adjuvante Therapie^a		
Chemotherapie	43	22
Endokrine Therapie	39	20,5
Keine	113	57,4
Adjuvante Radiotherapie*	122	62,5

^a 2 Patientinnen haben eine andere Therapie erhalten

* Bei 4 Patientinnen gibt es keine Angaben

88 Patientinnen mit axillären Lymphknotenmetastasen erhielten nach Erstdiagnose des Karzinoms eine systemische adjuvante Therapie. Diese bestand bei 39 Patientinnen aus einer Antiöstrogentherapie mit Tamoxifen und bei 43 Patientinnen aus einer Chemotherapie. Sechs Patientinnen erhielten trotz positiven Lymphknotenbefalls weder eine systemische adjuvante noch eine endokrine Therapie. Die primäre Therapieentscheidung wurde in Unkenntnis des Knochenmarkstatus getroffen.

3.3.2 Therapierichtlinien

Die Primäroperation, bestehend aus brusterhaltender Segmentektomie (BET) oder aus primärer oder sekundärer modifiziert radikaler Mastektomie, führte bei allen Patientinnen zu einer R₀-Resektion. Es wurde routinemäßig eine axilläre Dissektion mit systematischer Entfernung der Lymphknoten der Stationen I-II durchgeführt. Bei makroskopischem Verdacht auf axilläre Lymphknotenmetastasierung und/oder einer Tumorgroße $\geq T_2$ wurden die axillären Lymphknoten der Station ebenfalls entfernt. Alle entfernten Lymphknoten wurden durch lamellierte Paraffinschnitttechnik sorgfältig histologisch untersucht und entsprechend des lokalen Befalls klassifiziert. Alle Patientinnen mit brusterhaltender Operation unterzogen sich einer adjuvanten Telekobaltbestrahlung der Brust. Diese wurde mittels tangentialer Gegenfelder mit Einzelfractionen von 1,8 bis 2,0 Gray bis zu einer Gesamtdosis von 50 Gray oder 50,4 Gray durchgeführt. Bei Patientinnen nach Mastektomie erfolgte bei Nachweis einer Lymphangiosis carcinomatosa am Absetzungsrand eine Bestrahlung der Thoraxwand. Eine retrosternale Bestrahlung der Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna wurde bei medialem Tumorsitz angewandt. Die Infra-/Supraclavicularregion wurde bei metastatischem Befall von mehr als drei axillären Lymphknoten bestrahlt. Die Bestrahlungsplanung erfolgte rechnergestützt, individuell mit Hilfe der Computertomographie in mehreren Schnittebenen. Die Bestrahlung begann in der Regel 4-6 Wochen nach Abschluss der operativen Primärtherapie in Abhängigkeit von der Wundheilung. Die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie wurde bei den Patientinnen mit Mammakarzinom in der Regel aufgrund des positiven Lymphknotenbefalls gestellt. Postmenopausale Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptor erhielten eine orale Antiöstrogentherapie, während prämenopausale Patientinnen mit einem GnRH-Analogen in Depotform behandelt wurden. Patientinnen mit bis zu drei metastatisch befallenen axillären Lymphknoten wurden mit dem CMF-Schema (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5 - Fluouracil) behandelt. Patientinnen mit mehr als drei befallenen Lymphknoten erhielten entweder EC/CMF-Schema (Epirubicin und Cyclophosphamid, gefolgt von CMF) oder das DE-Schema (Docetaxel und Epirubicin). Die Dosierung und Therapieintervalle sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3. Chemotherapieschemata Mammakarzinom

Schema	Substanz	Dosierung	Wiederholung
CMF	Cyclophosphamid	600 mg/m ² *	6xq3w
	Methotrexat	40 mg/m ²	6xq3w
	5-Fluorouracil	600 mg/m ²	6xq3w
EC/CMF	Epirubicin	90 mg/m ² *	4xq3w
	Cyclophosphamid	600 mg/m ²	4xq3w, anschl.
	Cyclophosphamid	600 mg/m ²	3xq3w
	Methotrexat	40 mg/m ²	3xq3w
	5-Fluorouracil	600 mg/m ²	3xq3w
DE	Docetaxel	75 mg/m ² *	4xq3w
	Epirubicin	90 mg/m ²	4xq3w

* Bezogen auf die Körperoberfläche

Bei allen Patientinnen mit einem Rezidiv der Thoraxwand nach Mastektomie wurde das Lokalrezidiv durch eine großzügige Exzision in sano entfernt. Bei Patientinnen nach BET wurde -wenn möglich- erneut ein brusterhaltendes Vorgehen eingeschlagen oder eine sekundäre Mastektomie durchgeführt.

3.4 Nachbeobachtung und Statistische Methodik

Die Patientinnen wurden überwiegend in der onkologischen Ambulanz der I. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München nachbeobachtet. Im Falle einer externen onkologischen Nachsorge wurden in regelmäßigen Abständen die niedergelassenen Kollegen kontaktiert, um den Gesundheitszustand der Patientinnen zu erheben. Während der ersten zwei Jahre nach Primärdiagnose oder Rezidivdiagnose erfolgten die Nachsorgetermine in einem 3-monatigen Intervall, während der nächsten zwei Jahre im 6-monatigen Intervall und anschließend jährlich. Jede Nachsorgeuntersuchung bestand aus Nachsorgeanamnese, körperlicher Untersuchung und apparativer Diagnostik.

Gemäß den ‚*Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Mammakarzinome*‘ des Tumorzentrums München³⁸ wurden im Rahmen der **Nachsorgeanamnese** folgende Fragen an die Patientinnen gerichtet:

- Haben Sie Veränderungen oder Knoten im Bereich des Operationsgebietes, der Restbrust, der Achseln oder der Brust der Gegenseite getastet?
- Haben Sie Beschwerden des Skelettsystems?
- Hat sich der Bauchumfang verändert?
- Haben Sie neuerdings Probleme mit der Atmung?
- Hat sich Ihr Gewicht verändert?
- Leiden Sie unter zunehmender Müdigkeit oder Leistungsschwäche?

Die **körperliche Untersuchung** umfasste die Gewichtskontrolle, eine komplette Brustuntersuchung, eine jährliche gynäkologische Untersuchung, Perkussion und Auskultation der Lunge, die Prüfung der Klopfschmerzhaftigkeit des Rumpfskeletts, die neurologische Orientierungsuntersuchung und die Beurteilung des Leistungsvermögens.

Zur routinemäßigen **apparativen Diagnostik** zählte die regelmäßige Mammographie der Restbrust und/oder der kontralateralen Brust. Weiterführende bildgebende Verfahren wie Skelettszintigraphie, Leberzonographie oder Röntgenthorax wurden nur bei klinischem oder laborchemischem Verdacht auf ein Rezidiv durchgeführt.

Als Lokalrezidiv wurde jede Wiederkehr des Malignoms im Operationsgebiet der Mastektomie zwischen Mitte des Sternums und vorderer Axillarlinie, sowie unterhalb der Fossa infraclavicularis und der 7. Rippe definiert. Weiterhin wurden Wiedererkrankungen an der Pektoralismuskulatur sowie an den Faszien von M. serratus lateralis und M. obliquus externus den Lokalrezidiven zugerechnet. Als regionales Rezidiv wurde das Wiederauftreten des Malignoms in der Haut und/oder in den Lymphknoten der Achselhöhle oder der metastatische Befall allein der Noduli in Infraclavivulargrube verstanden. Alle Tumorabsiedelungen außerhalb dieser definierten Grenzen wurden als generalisiertes Rezidiv oder Fernmetastase bezeichnet²⁹.

Die Nachbeobachtungszeit der Patientinnen endete mit jenem Zeitpunkt, an dem die Patientin nicht mehr in der onkologischen Sprechstunde erschien oder verstarb. Als Ereignis bei den Gesamtüberlebenskurven wurden lediglich jene Todesfälle gewertet, die kausal mit der Erkrankung des Mammakarzinoms in Verbindung standen. Alle gemeldeten Todesfälle wurden durch Vergleich mit dem Tumorregister verifiziert¹.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware 'Statistical Package for the Social Sciences 11.0' (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Tumorstadien wurden gemäß der Revision der TNM-Einteilung des AJCC (American Joint Committee on Cancer) eingeteilt⁷¹. Die Berechnung der Überlebenskurven geschah nach der Kaplan-Meier-Methode, deren Vergleich nach dem Log-Rank-Test. Die multivariate Analyse erfolgte nach dem Cox-Regressions Modell^{38,15}. Die Signifikanzprüfung zwischen kategorialen Variablen wurde mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson durchgeführt, der Vergleich von Mittelwerten kontinuierlicher Größen mit dem zweiseitigen T-Test. Korrelationskoeffizienten wurden 2-seitig nach Pearson berechnet. Ein signifikanter Unterschied wurde beim einem p-Wert <0,05 angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Inzidenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms

Bei 52 von 195 Patientinnen (27%) ließen sich zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms disseminierte Tumorzellen im Knochenmark feststellen. In Relation zu den bekannten etablierten Prognoseparametern Tumorgroße, axillärer Lymphknotenstatus, histopathologisches Grading, Menopausenstatus und Hormonrezeptorstatus fand sich keine statistisch signifikante Korrelationen. (Tabelle 3). Während 44% der Patientinnen (n=23) mit Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark eine Tumorgroße >2 cm aufwiesen, war dies nur bei 34% der Patientinnen (n=49) mit negativem Knochenmarkstatus der Fall (p=0,202). Der axilläre Lymphknotenstatus korrelierte weder als dichotomisierte Variable (negativ vs. positiv, P = 0,931) noch als kategorialisierte Variable mit der nach der St. Galler Konsensuskonferenz definierten Risikostratifizierung⁶⁴ (negativ vs. 1-3 LK vs. 4-9 LK vs. ≥ 10 LK, P=0,934). Es fand sich allerdings ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der metastatisch befallenen Lymphknoten im Vergleich zwischen den beiden Gruppen. Die durchschnittliche Anzahl der befallenen Lymphknoten betrug 4,2 in der Patientinnengruppe mit positivem Knochenmarkresultat und 3,0 in der Patientinnengruppe mit negativem Knochenmarkresultat (p=0,024, T-Test). Bei 62% der Patientinnen mit nachweisbaren disseminierten Tumorzellen im Knochenmark fand sich ein positiver Östrogenrezeptorstatus im Primärtumor (n=32). In dieser Gruppe hatten 38% einen negativen Östrogenrezeptorstatus des Primärtumors (n=20).

Tabelle 4. Patientinnencharakteristika in Abhängigkeit des Knochenmarksbefundes

	Knochenmark CK-neg (%)	Knochenmark CK-pos (%)	P-Wert
Anzahl der Patientinnen	143 (73)	52 (27)	
Alter	57,4	58,8	0,443
Tumorgroße			0,202
< 2 cm (pT1a-c)	94 (66)	29 (56)	
> 2 cm (pT2 – pT4)	49 (34)	23 (44)	
Axilläre Lymphknotenmet.			0,931
Keine (pN0)	79 (55)	28 (54)	
Vorhanden (pN1- pN3)	64 (45)	24 (46)	
Anzahl der Lymphknotenmetastasen[†]			0,934
1-3	32 (22,4)	11 (21,2)	
4-9	15 (10,5)	5 (9,6)	
≥ 10	17(11,9)	8 (15,4)	
Durchschnittliche Anzahl der Lymphknotenmetastasen			0,024
	3,0 (2,0)	4,2 (8,0)	
Grading			0,85
GX	44 (31)	8 (15)	
G1 – G2	61 (42)	25 (48)	
G 3	38 (27)	19 (37)	
Östrogenrezeptorstatus			0,526
Positiv	95 (66)	32 (62)	
Negativ	48 (34)	20 (38)	
Lymphangiosis carcinomatosa			0,776
Positiv	33 (23)	11 (21)	
Negativ	110 (76,9)	41 (78,8)	
Hämangiosis carcinomatosa			0,733
Positiv	4 (2,8)	1 (1,9)	
Negativ	139 (97,2)	51 (98,1)	
Menopausenstatus			0,587
Prämenopausal	41 (29)	17 (32)	
Postmenopausal	102 (71)	35 (67)	

* Grading in 111 Fällen nicht bestimmt

† Nodalstatus bei 19 Patientinnen wegen neoadjuvanter Chemotherapie nicht bestimmbar

4.2 Inzidenz der CD31-Expression zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms

Bei 50 von 195 Patientinnen (25,6%) ließ sich zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms eine positive CD31-Expression feststellen. In Relation zu den bekannten etablierten Prognoseparametern Tumorgroße, axillärer Lymphknotenstatus, histopathologisches Grading und Hormonrezeptorstatus fanden sich keine statistisch signifikanten Korrelationen. Es zeigte sich jedoch, dass eine CD31-Expression signifikant häufiger bei postmenopausalen Frauen auftrat. Während 52% der Patientinnen (n=26) mit einer positiven CD31-Expression eine Tumorgroße >2cm aufwiesen, war dies nur bei 32% der Patientinnen (n=46) mit negativer CD31-Expression am Primärtumor der Fall ($p=0,10$). Der axilläre Lymphknotenstatus korrelierte auch hier weder als dichotomisierte Variable (negativ vs. Positiv $P = 0,088$) noch als kategorialisierte Variable mit der nach der St. Gallener Konsensuskonferenz definierten Risikostratifizierung¹⁵ (negativ vs. 1-3 LK vs. 4-9 LK vs. ≥ 10 LK, $p=0,114$). Es fand sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der metastatisch befallenen Lymphknoten im Vergleich zwischen den beiden Gruppen. Die durchschnittliche Anzahl der befallenen Lymphknoten betrug 3,0 in der Patientinnengruppe mit positiver CD31-Expression und 3,4 in der Patientinnengruppe mit negativer Expression ($p=0,93$, T-Test). Bei 68% der Patientinnen mit nachweisbarer Neoangiogenese fand sich ein positiver Östrogenrezeptorstatus im Primärtumor (n=34). Aus dieser Gruppe hatten 32% einen negativen Östrogenrezeptorstatus des Primärtumors (n=16), siehe (Tabelle 5).

Tabelle 5 Patientinnencharakteristika in Abhängigkeit der CD31-Expression

	CD31 neg (%)	CD31 pos (%)	P-Wert
Anzahl der Patientinnen	145 (74,4)	50 (25,6)	
Alter	58,1	56,8	0,73
Tumorgroße			0,10
< 2 cm (pT1a-c)	99 (68)	24 (48)	
> 2 cm (pT2 – pT4)	46 (32)	26 (52)	
Axilläre Lymphknotenmet.			0,088
Keine (pN0)	85 (58)	22 (44)	
Vorhanden (pN1- pN3)	60 (41)	28 (56)	
Anzahl der Lymphknotenmetastasen[†]			0,114
1-3	28 (19,3)	15 (30)	
4-9	12 (8,3)	8 (16)	
≥ 10	20 (13,8)	5 (10)	
Durchschnittliche Anzahl der Lymphknotenmetastasen	3,4	3,0	0,93
Grading			0,249
GX	39 (27)	13 (26)	
G1 – G2	68 (47)	18 (36)	
G 3	38 (26)	19 (38)	
Östrogenrezeptorstatus			0,621
Positiv	93 (64)	34 (68)	
Negativ	52 (36)	16 (32)	
Lymphangiosi cacinomatosa			0,500
Positiv	31 (21,4)	13 (26,0)	
Negativ	114 (78,6)	37 (74,0)	
Hämangiosi carcinomatosa			0,770
Positiv	4 (28,0)	1 (2,0)	
Negativ	141 (97,2)	49 (98,0)	
Menopausenstatus			0,028
Prämenopausal	108 (75)	29 (58)	
Postmenopausal	37 (25)	21 (42)	

4.3 Korrelation einer CD31-Expression mit dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

Es fand sich keine Korrelation ($p=0,805$) zwischen positiven Knochenmarkstatus und Überexpression von CD31 am Primärtumor.

Tabelle 6 Korrelation der CD31-Expression mit dem Knochenmarkstatus

		CD31 (%)	neg	CD31 (%)	pos	P-Wert
Knochenmark (%)	CK-neg	107 (74,8)		36 (25,2)		
Knochenmark (%)	CK-pos	38 (73,1)		14 (26,9)		0,805

4.4 Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Expressionstatus von CD31

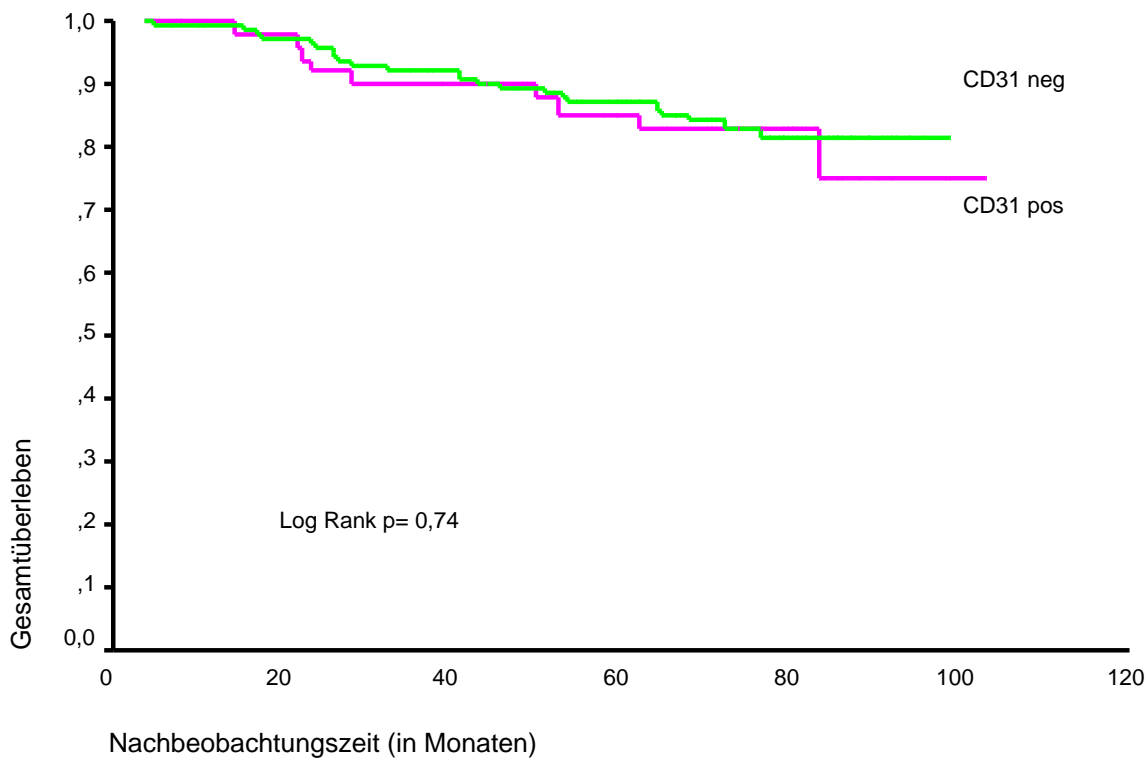


Abbildung 10. Kaplan Meier Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Expressionsstatus von CD31

In Abbildung 10 sind die Kaplan Meier Kurven für das Gesamtüberleben bei positivem versus negativem CD31 Status am Primärtumor dargestellt. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei positivem CD31 Status (n=50; mediane Gesamtüberlebenszeit 90 Monate {82-98, 95%CI}) und negativem CD31 Status (n=145; mediane Gesamtüberlebenszeit 88 Monate {84-92; 95% CI}), P=0,74, Log-rank Test festgestellt werden. In der Gruppe der Patientinnen mit Nachweis von CD31 am Primärtumor betrug das Gesamtüberleben nach 2 Jahren 91%. In der CD31 negativem Gruppe betrug das Gesamtüberleben nach 2 Jahren 95%.

Nach 5 Jahren betrug das Gesamtüberleben der CD31 positiven Gruppe 83% und der CD31 negativen Gruppe 86%.

In der Gruppe der CD31 positiven Patientinnen (n=50) verstarben 9 der Patientinnen. In der Gruppe der CD31 negativen Patientinnen verstarben 22 Patientinnen. (Tabelle 7).

Tabelle 7. Korrelation des Gesamtüberlebens mit der CD31-Expression

	CD31 neg (%)	CD31 pos (%)	P-Wert
lebend (%)	123 (84,8)	41 (82)	
verstorben (%)	22 (15,2)	9 (18)	0,637

4.5 Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Knochenmarkstatus

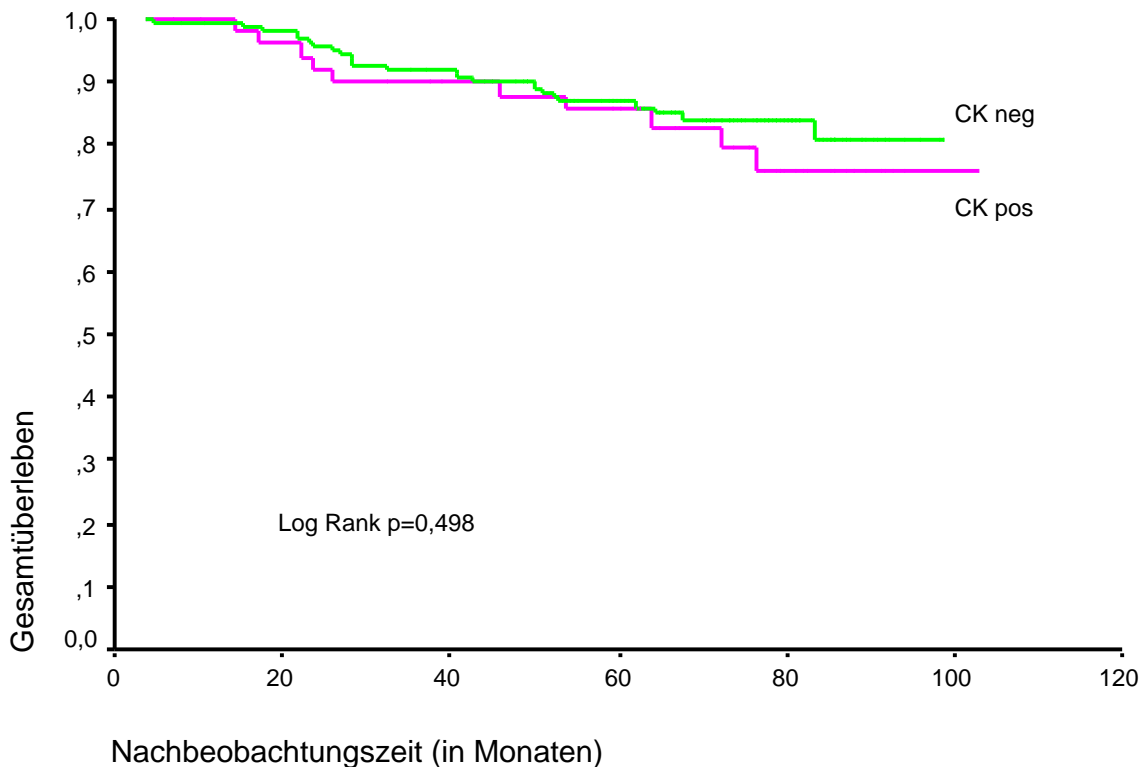


Abbildung 11. Kaplan Meier Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus

In Abbildung 11 sind die Kaplan Meier Kurven für das Gesamtüberleben der Patientinnen bei positivem Knochenmarkstatus versus negativem Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Primärdiagnose dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei positiven Knochenmarkstatus (n=52; mediane Gesamtüberlebenszeit 90 Monate {82-97 CI 95%}) und negativem Knochenmarkstatus (n=143 ; mediane Gesamtüberlebenszeit 89 Monate {85-92 CI 95%}); konnte nicht festgestellt werden, $p=(0,498)$ Log-rank Test. Nach 2 Jahren lebten in der Gruppe mit positivem Knochenmarkstatus noch 92% der Patientinnen, während in der Gruppe ohne Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mit 95% etwas mehr überlebten.

Nach 5 Jahren lebten in der Gruppe mit positivem Knochenmarkstatus noch 85% der Patientinnen, während in der Gruppe mit negativem Knochenmarkstatus noch 86% lebten.

In Bezug auf das Gesamtüberleben konnte in diesem Kollektiv ebenfalls keine Korrelation zum Knochenmarkstatus hergestellt werden. Von den 52 Patientinnen mit positiven Knochenmarkstatus sind 10 Patientinnen verstorben und 42 Patientinnen überlebten. Von der Patientengruppe mit negativen Knochenmarkstatus (n=143) haben 122 überlebt und 21 sind verstorben.

Tabelle 8. Korrelation des Gesamtüberlebens mit dem Knochenmarkstatus

	CK (%)	neg	CK (%)	pos	P-Wert
Lebend (%)	122 (85,3)		42 (80,8)		
Verstorben (%)	21 (14,7)		10 (19,2)		0,443

4.6 Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit der Tumorgroße

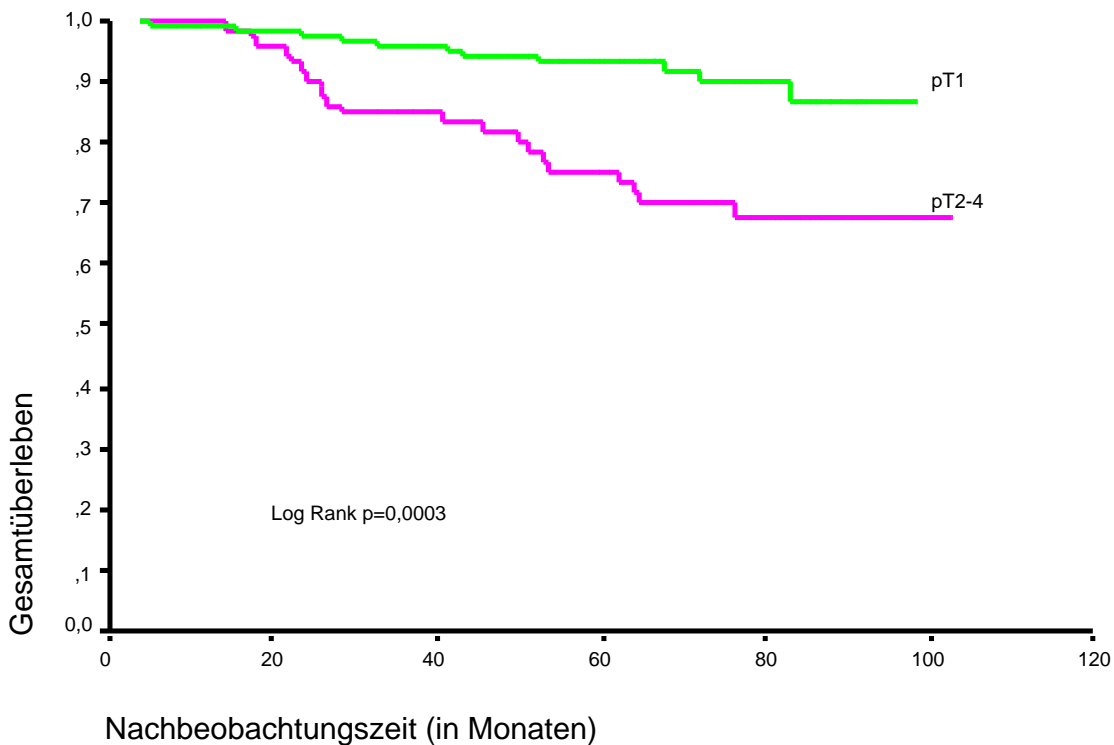


Abbildung 12. Kaplan Meier Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit der Tumorgroße

In Abbildung 12 sind die Kaplan Meier Kurven für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Größe des Gesamttumors dargestellt. Es findet sich ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen den Patientinnen mit pT1 Tumoren (n=123; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 92 Monate {98-96 CI 95%}) und pT2-4 Tumoren (n=72; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 83 Monate {75-90 CI 95%}); p=0,0003 Log-rank Test. Nach 2 Jahren waren in der Gruppe mit pT1 Tumoren noch 97% der Patientinnen ohne Rezidiv, während in der Gruppe der pT2-4 Tumoren nur noch 90% der Patientinnen ohne Rezidiv waren. Nach 5 Jahren waren in der Gruppe der pT1 Tumoren noch 92% der Patientinnen ohne Rezidiv, während in der Gruppe mit pT2-4 Tumoren nur noch 74% der Patientinnen rezidivfrei blieben.

4.7 Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus

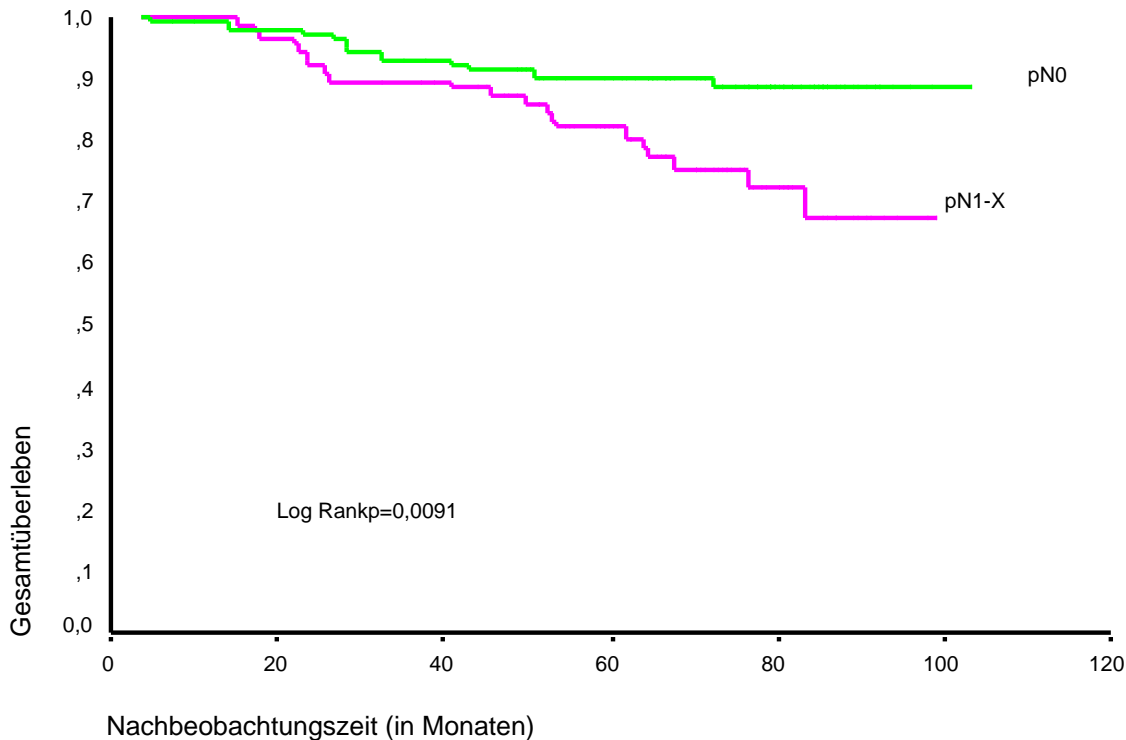


Abbildung 13. Kaplan Meier Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

In Abbildung 13 sind die Kaplan Meier Kurven für das Gesamtüberleben bei positivem versus negativem Lymphknotenstatus am Primärtumor dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei negativen Lymphknoten pN0 (n=106; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 95 Monate {91-99, 95%CI}) und positiven Lymphknotenstatus pN1-X (n=89; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 83 Monate {77-89; 95% CI}), $P=0,0091$, Log-rank Test, konnte festgestellt werden. In der Gruppe der Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus betrug das rezidivfreie Gesamtüberleben nach 2 Jahren 97%. In der pN1-X Gruppe betrug das rezidivfreie Gesamtüberleben nach 2 Jahren 91%. Nach 5 Jahren betrug das rezidivfreie Gesamtüberleben in der pN0 Gruppe 89% und in der pN1-X Gruppe 81%.

4.8 Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Expressionstatus von CD31

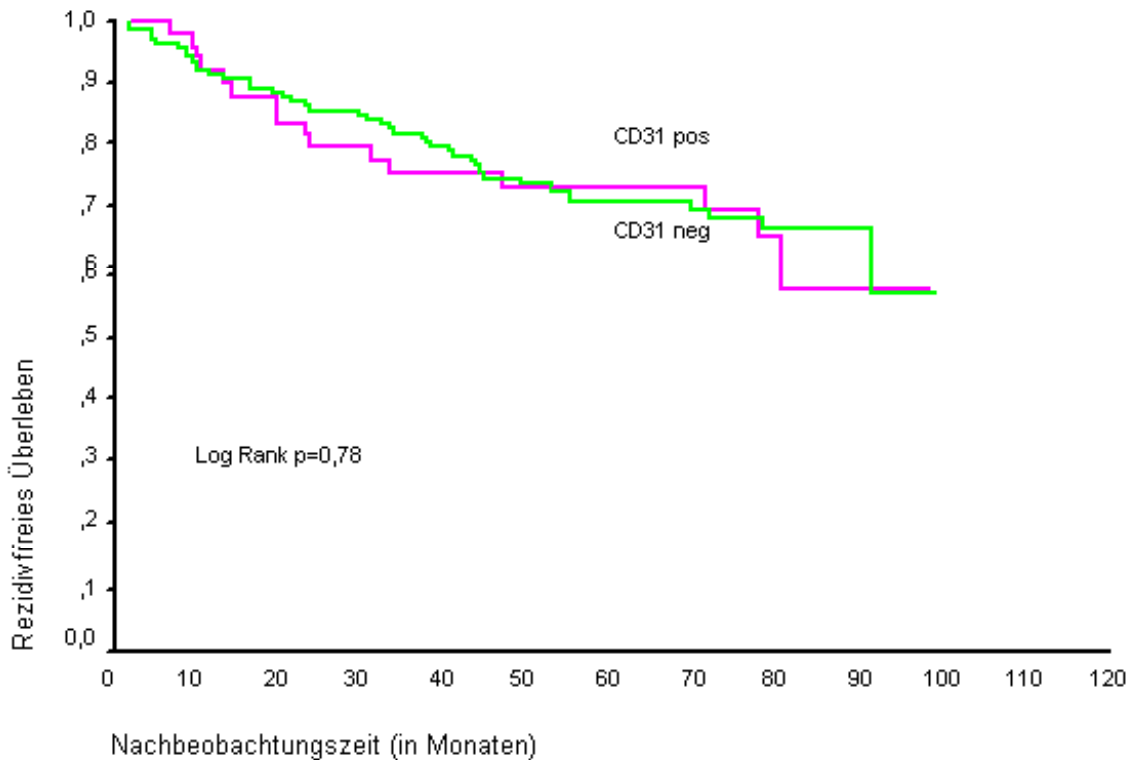


Abbildung 14. Kaplan Meier Kurve für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit der CD31 Expression

In Abbildung 14 sind die Kaplan Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben bei positivem versus negativem CD31 Status am Primärtumor dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei positivem CD31 Status (n=50; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 74 Monate {73-93, 95%CI}) und negativem CD31 Status (n=145; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 76 Monate {70-82; 95% CI}), P=0,78, Log-rank Test, konnte nicht festgestellt werden. In der Gruppe der Patientinnen mit Nachweis von CD31 am Primärtumor betrug das rezidivfreie Gesamtüberleben nach 2 Jahren 79%. In der CD31 negativen Gruppe betrug das rezidivfreie Gesamtüberleben nach 2 Jahren 84%.

Nach 5 Jahren betrug das rezidivfreie Gesamtüberleben in der CD31 positiven Gruppe 69 % und in der CD31 negativen Gruppe 70 %.

Bei Patientinnen mit einer Überexpression von CD31 am Primärtumor zeigte sich keine signifikant höhere Rezidivrate. Von 135 Patientinnen, die rezidivfrei blieben, hatten immerhin 34 (68%) eine Überexpression von CD31. 101 Patientinnen in dieser Gruppe zeigten keine Überexpression von CD31 (69%). (Tabelle 9).

Tabelle 9. Korrelation von Rezidivereignissen mit der CD31-Expression

	CD31 (%)	neg	CD31 (%)	pos	P-Wert
Kein Rezidiv (%)	101 (69,7)		34 (68)		
Rezidiv (%)	44 (30,3)		16 (32)		0,827

4.9 Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus

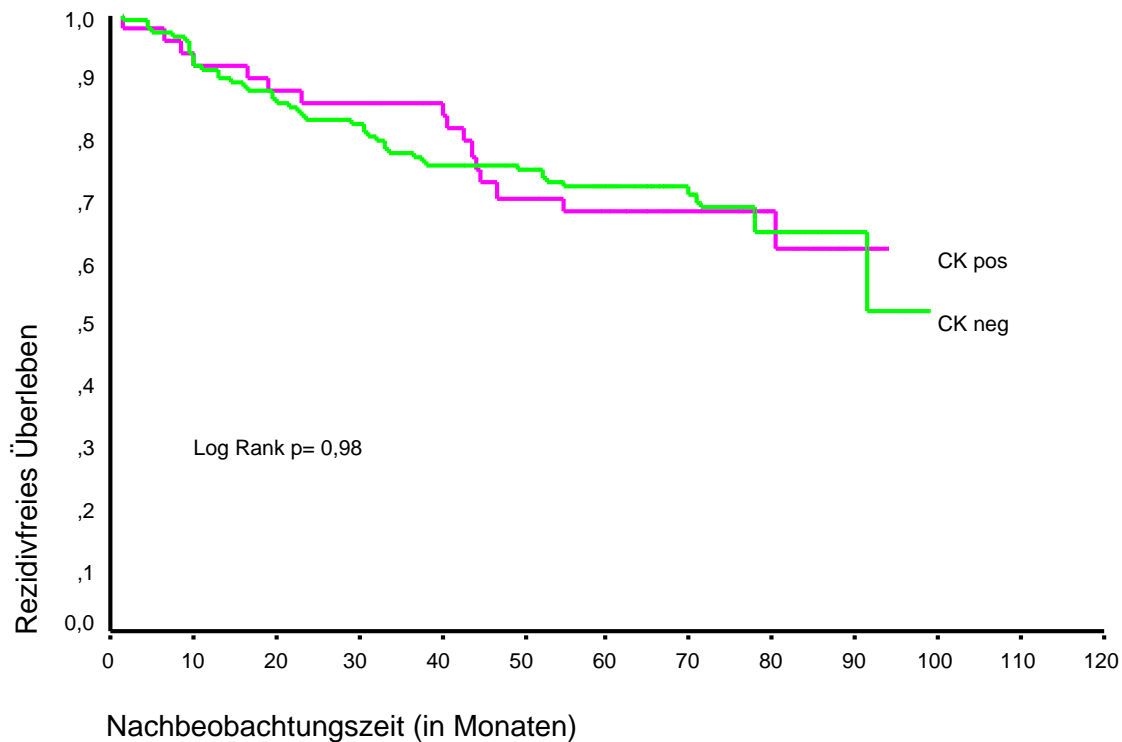


Abbildung 15. Kaplan Meier Kurve für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus

In Abbildung 15 sind die Kaplan Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben bei positivem Knochenmarkstatus versus negativem Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Primärdiagnose dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei positiven Knochenmarkstatus ($n=52$; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 89 Monate {82-97 CI 95%}) und negativem Knochenmarkstatus ($n=143$; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 88 Monate {85-92 CI 95%}); konnte nicht festgestellt werden. $P=0,98$ Log-rank Test. Nach 2 Jahren waren in der Gruppe mit positivem Knochenmarkstatus noch 92% der Patientinnen ohne Rezidiv, während in der Gruppe ohne Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark noch 95% der Patientinnen ohne Rezidiv waren. Nach 5 Jahren waren in der Gruppe mit positivem Knochenmarkstatus noch 84% der

Patientinnen ohne Rezidiv, während in der Gruppe mit negativem Knochenmarkstatus noch 85% der Patientinnen rezidivfrei blieben.

In der Knochenmark positiven Gruppe (n=52) war die Rezidivhäufigkeit 30,8% (n=16). In der Knochenmark negativen Gruppe (n=143) war sie 30,3% (n=44) (Tabelle 10).

Tabelle 10. Korrelation von Rezidivereignissen mit dem Knochenmark

	CK (%)	neg	CK (%)	pos	P-Wert
Kein Rezidiv (%)	99 (69,2)		36 (69,2)		
Rezidiv (%)	44 (30,3)		16 (30,8)		1,0

4.10 Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit der Tumorgroße

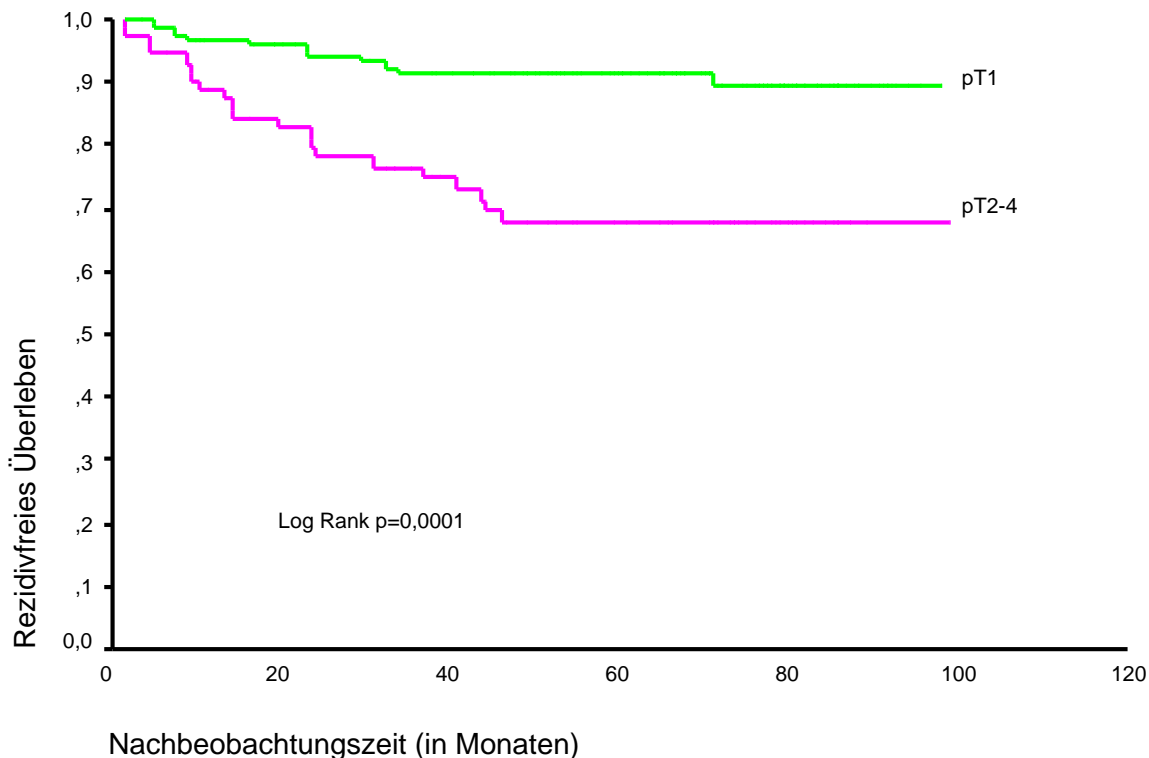


Abbildung 16. Kaplan Meier Kurve für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit der Tumorgroße

In Abbildung 16 sind die Kaplan Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben bei Tumorgroße pT1 versus Tumorgroße pT2-4 zum Zeitpunkt der Primärdiagnose dargestellt. Bei pT1 Tumoren (n=123; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 90 Monate {86-95 CI 95%}) und pT2-4 Tumoren (n=72; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 73 Monate {64-82 CI 95%}); konnte eine Signifikanz festgestellt werden. P=0,0001 Log-rank Test. Nach 2 Jahren waren in der Gruppe mit pT1 Tumoren noch 94% der Patientinnen ohne Rezidiv, während in der Gruppe der pT2-4 Tumoren nur noch 79% der Patientinnen ohne Rezidiv waren. Nach 5 Jahren waren in der Gruppe der pT1 Tumoren noch 90% der Patientinnen ohne Rezidiv, während in der Gruppe mit pT2-4 Tumoren nur noch 64% der Patientinnen rezidivfrei blieben.

4.11 Rezidivfreies Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus

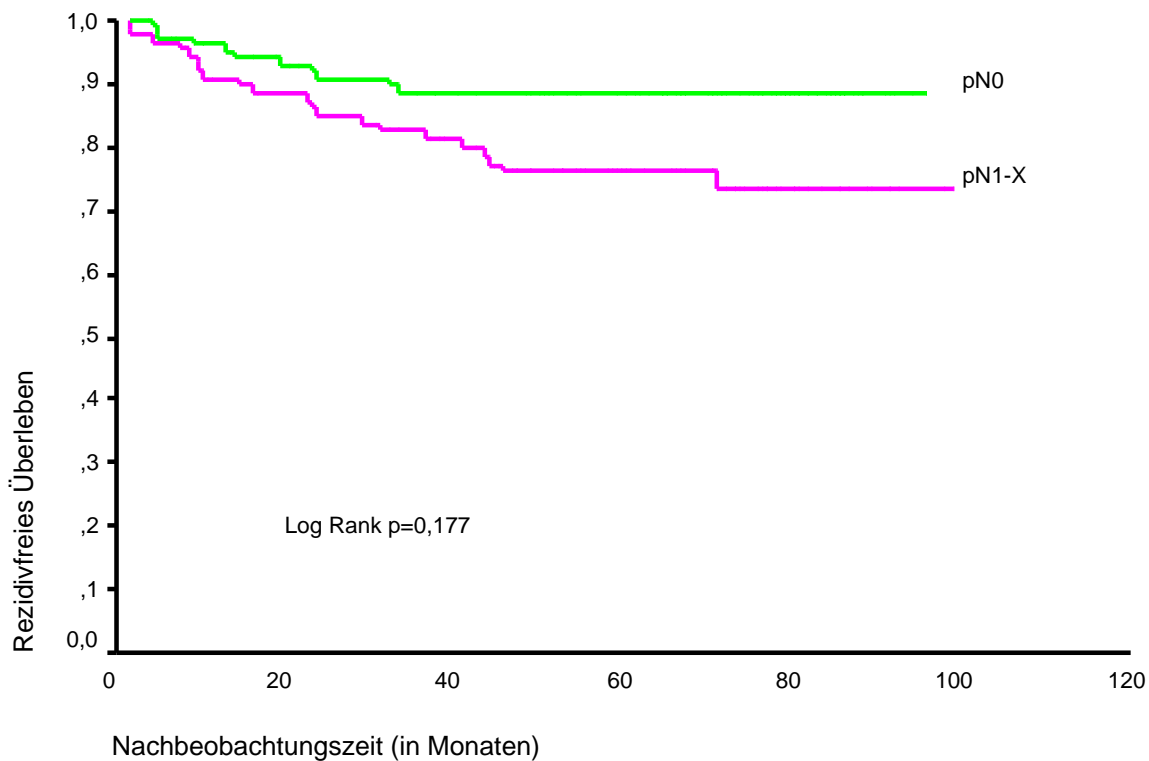


Abbildung 17. Kaplan Meier Kurve für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus

In Abbildung 17 sind die Kaplan Meier Kurven für das rezidivfreie Überleben bei positivem versus negativem Lymphknotenstatus am Primärtumor dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei negativen Lymphknoten pN0CD31 (n=106; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 86 Monate {82-91, 95%CI}) und positiven Lymphknotenstatus pN1-X (n=89; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 79 Monate {72-86; 95% CI}), P=0,177, Log-rank Test, konnte nicht festgestellt werden. In der Gruppe der Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus betrug das rezidivfreie Gesamtüberleben nach 2 Jahren 90%. In der pN1-X Gruppe betrug das rezidivfreie Gesamtüberleben nach 2 Jahren 84%. Nach 5 Jahren betrug das rezidivfreie Gesamtüberleben in der pNo Gruppe 88% und in der pN1-X Gruppe 74%.

5 Multivariate Analyse

5.1 Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben Patientinnen

In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass die klassischen Prognoseparameter Grading ($p=0,039$) und die Tumorgroße ($p=0,013$) als unabhängige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben stehen.

Tabelle 11. Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben der Patientinnen

	P-Wert	Wald Statistik	RR	(95% CI)
CD31 Status neg 1-5 (145/195) vs. pos >5(50 /195)	0,668	0,184	0,843	0,386-1,841
Knochenmarkstatus neg (143/195) vs. pos (52/195)	0,937	0,006	1,031	0,482-2,206
Grading[%] G1-G2 (86/195) vs. G3 (57/ 195)	0,039	4,268	1,681	1,027-2,751
Primäre Tumorgroße* < 2 cm (pT1a-c, 150/195) vs. ≥ 2 cm (pT2 – pT4, 45/195)	0,013	6,198	2,681	1,233-5,825
Primärer Lymphknotenstatus* Negativ (pN0, 106/195) vs. Positiv (pN1 und pN2, 89/195)	0,109	2,575	1,870	0,870-4,043

RR = Relatives Risiko

CI = Konfidenzintervall

* zum Zeitpunkt der Primärdiagnose

[%] Bei 52 Patientinnen liegt kein Grading vor

5.2 Multivariate Analyse für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen

In dieser multivariaten Analyse zeigte sich, dass die TumorgroÙe $p=0,004$ unabhängiger Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben ist.

Tabelle 12. Multivariate Analyse für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen

	P-Wert	Wald Statistik	RR	(95% CI)
CD31 Status neg 1-5 (145/195) vs. pos >5(50 /195)	0,743	0,116	0,904	0,505-1,618
Knochenmarkstatus neg (143/195) vs. pos (52/195)	0,635	0,225	0,868	0,483-1,560
Grading[%] G1-G2 (86/195) vs. G3 (57/ 195)	0,327	0,960	1,186	0,843-1,670
Primäre TumorgroÙe* < 2 cm (pT1a-c, 150/195) vs. ≥ 2 cm (pT2 – pT4, 45/195)	0,004	8,324	2,209	1,289-3,784
Primärer Lymphknotenstatus* Negativ (pN0, 106/195) vs. Positiv (pN1 und pN2, 89/195)	0,235	1,411	1,385	0,809-2,373

RR = Relatives Risiko

CI = Konfidenzintervall

* zum Zeitpunkt der Primärdiagnose

[%] Bei 52 Patientinnen liegt kein Grading vor

6 Diskussion

6.1 Entwicklung des Nachweises minimal residueller Tumorerkrankungen

Dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark kommt eine zunehmende klinische Bedeutung zu, da als Hauptursache für eine folgende Fernmetastasierung, die hämatogene Streuung einzelner Tumorzellen angesehen wird³³. Seit dem Jahr 1955 erschien eine Reihe von Arbeiten, die sich mit dem zytologischen Nachweis von zirkulierenden Tumorzelle beschäftigte²⁰. Die zytomorphologische Nachweismethode wurde aufgrund von falsch-positiven Nachweisraten bis zu 96% 20 Jahre später von der immunzytochemischen Nachweismethode abgelöst^{51;64;73}. Während die Nachweismethoden eine ausreichende Sensivität aufwiesen, wurde die prognostische Bedeutung der mit diesen Methoden erhobenen Befunde wiederholt in Frage gestellt²⁷. Die Vermutung, dass falsch-positive Befunde erneut die Aussagekraft der Nachweismethode beeinträchtigen, stützte sich auf der These, dass Kreuzreaktionen der eingesetzten monoklonalen Antikörper, vor allem mit hämatopoetischen Stammzellen, die Ursache seien^{18;36;54;55}. Seit den späten 80er Jahren wird die hochsensitive Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von MRD bei verschiedenen Malignomen eingesetzt^{43;53}. Die PCR ist eine in vitro Methode, welche durch Anwendung von Oligonukleotidprimern in der Lage ist, spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren und anschließend durch Färbung nachzuweisen. Eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR-Methode war die Etablierung der „reverse transkriptase“ (RT)-PCR, welche tumorspezifische mRNA amplifizieren kann. Der Ansatz zum Nachweis von MRD basiert auf der Annahme, dass maligne Zellen mittels Transkription Marker exprimieren, die typisch für ihr Ursprungsgewebe sind. Die derzeitige PCR-Technologie ist in der Lage, eine Tumorzelle in 1.000.000 bis 10.000.000 mononukleären Zellen nachzuweisen⁵. Zur Zeit ist jedoch noch ungeklärt, welche genetischen Marker zum Nachweis von malignen Zellen am besten geeignet sind⁵. Aufgrund der noch nicht ausreichenden Erfahrungen mit molekularen Nachweismethoden ist der immunzytochemische Nachweis von isolierten Tumorzellen im Knochenmark derzeit die verlässlichste Detektionsmethode⁵⁴. Die

Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit einem etablierten immunzytochemischen Ansatz durchgeführt³.

6.2 Nachweis disseminierter Tumorzellen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms

In der vorliegenden Untersuchung wurden bei 27% der Patientinnen cytokeratin-positive Zellen im Knochenmarkspirat detektiert. Keiner der untersuchten konventionellen Prognoseparameter wie der kategorialisierte Lymphknotenstatus, der histopathologische Differenzierungsgrad, der Menopausenstatus und der Hormonrezeptorstatus korrelierten mit dem Nachweis einer hämatogenen Tumorzeldisseminierung.

In den letzten Jahren haben eine Reihe von Untersuchungen die prognostische Relevanz des Nachweises disseminierter Tumorzellen nachgewiesen^{7;8;13;17;32;42;48;69;84;85}. Die Klassifikation M1(i) als Hinweis für eine hämatogene Mikrometastasierung wurde 1997 in das TNM System eingeführt⁷². Im Zuge dieser Reformierung der TNM-Klassifikation wurde 1998 eine Metaanalyse von 20 Studien mit 2494 Patientinnen durchgeführt. Aufgrund der Heterogenität der untersuchten Tumorentitäten und Testmethoden kamen die Autoren zwar zu einem zurückhaltenden Ergebnis, kalkulierten jedoch ein relatives Rezidivrisiko von 1,34 (1,27 – 1,42 95 % CI) für Brustkrebspatientinnen mit Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark²⁷. Die Datenlage konnte im Jahr 2000 durch eine weitere umfangreiche Studie der I. Universitätsfrauenklinik München und der Frauenklinik des Zentralklinikums Augsburg ergänzt werden⁷. Diese Studie untersuchte 552 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom im UICC-Stadium I-III. Die in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen entstammen ausschließlich aus dem Patientengut der I. Universitätsfrauenklinik München, und sind teilweise Gegenstand der oben genannten Studie von Braun et al. Das Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark war signifikant mit dem Auftreten von Fernmetastasen und mit dem tumorbedingten Versterben der Patientinnen assoziiert ($P < 0.001$). In der multivariaten Analyse bestätigte sich der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark als unabhängiger Parameter für die prognostische Relevanz. In Tabelle 12 sind die bis dato wichtigsten Publikationen zur

prognostischen Relevanz isolierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom zusammengefasst.

Tabelle 13. Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

Antikörper	Antigen	N	Inzidenz (%)	Prognost. Relevanz	Literatur
Mbr1	Glycolipid	159	16	-	Porro et al. 1988 ^{51*}
Mbr1	Glycolipid	121	17	-	Salvadori et al. 1990 ^{67*}
Mbr1/8	Glycolipid	109	38	-	Molino et al. 1997 ⁵⁰
E29	EMA	350	25	+	Mansi et al. 1991 ⁴⁸
E29	EMA	350	25	-	Mansi et al. 1999 ⁴⁹
E29/12H12	EMA/Glyco-protein	68	37	-	Untch et al. 1999 ⁸¹
E29/Moll/12H12	EMA/Cyto-keratin	100	38	+	Harbeck et al. 1994 ³²
2E11	TAG12	727	43	+	Diel et al. 1996 ¹⁷
35H11/34H12	Cytokeratin	25	16	n.b.	Ellis et al. 1989 ¹⁹
T16/26	Cytokeratin	49	35	+	Cote et al. 1991 ¹³
CK2	Cytokeratin-18	155	18	+	Schlimok et al.. 1987 ⁶⁹
CK2	Cytokeratin-18	234	38	n.b.	Funke et al. 1996 ²⁶
AE-1/AE-3	Cytokeratin	128	19	+	Landys et al. 1998 ^{42*}
A45-B/B3	Cytokeratin-8/18&8/19	552	36	+	Braun et al. 2000 ⁷
A45-B/B3	Cytokeratin-8/18&8/19	4268	31	+	Braun et al 2003 ⁸⁸
AE1/AE3	Cytokeratin	817	3,2		Wiedswang et al 2003 ⁸⁵

n.b. = nicht bestimmt

* Knochenmarkbiopsien

Weiterhin kontrovers bleibt die Korrelation des Knochenmarkstatus mit etablierten Prognoseparametern. Selbst die beiden Untersuchungen von Diel et al. und Braun et al. kommen zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen^{7;17}. Während Diel et al. eine Korrelation zwischen dem Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark mit TumorgroÙe ($p < 0,001$), axillärer Lymphknotenmetastasierung ($P = 0,001$), Menopausenstatus ($p = 0,01$) und dem histopathologischen Differenzierungsgrad ($p = 0,002$) fanden, wurde von Braun et al. nur eine Assoziation des Knochenmarkstatus mit der TumorgroÙe ($p < 0,001$) und dem histopathologischen Differenzierungsgrad ($p = 0,017$), nicht jedoch mit dem Auftreten von axillären Lymphknotenmetastasen, beschrieben. Eine positive Korrelation konnte lediglich nach Stratifizierung der Anzahl der metastatisch befallenen Lymphknoten errechnet werden⁸. Auch in dieser Arbeit konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der mittleren Anzahl der befallenen Lymphknoten nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Anzahl der befallenen Lymphknoten betrug 4,2 in der Patientinnengruppe mit positivem Knochenmarkresultat und 3 in der Patientinnengruppe mit negativem Knochenmarkresultat ($p = 0,024$). Dies lässt vermuten, dass der Lymphknotenbefall Ausdruck einer höheren biologischen Aggressivität des Primärtumors sein könnte, die sich mit dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark nachweisen lieÙe. In einer neuen Untersuchung von Rack et al. konnte gezeigt werden, dass in einem Kollektiv von Patientinnen mit Rezidiven eines Mammakarzinoms die mediane Überlebenszeit signifikant mit der Anzahl der befallenen Lymphknoten korreliert ($p < 0,0001$)⁶³. Die mediane Überlebenszeit bei nodal-negativen Patientinnen nach Auftreten eines Rezidives betrug 42 Monate, während sie bei Patientinnen mit 1-3 befallenen Lymphknoten nur 20 Monate betrug. Patientinnen mit vier und mehr befallenen Lymphknoten hatten sogar nur eine mittlere Überlebenszeit von 13 Monaten. Bringt man diese Daten mit den Ergebnissen zum Knochenmarkstatus in Verbindung, wird die Hypothese einer erhöhten biologischen Aggressivität des Tumors mit steigender Anzahl der befallenen Lymphknoten zusätzlich unterstützt. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine Signifikanz ($p = 0,024$) der durchschnittlichen Anzahl der befallenen Lymphknoten in Abhängigkeit des Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark (vgl. Kapitel 4.1). In der Arbeit von Braun et al. zeigte die Korrelation der nodal-negativen Patientinnen mit dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen

im Knochenmark, dass für diese Subgruppe der Knochenmarkstatus sowohl für das Auftreten von Fernmetastasen ($p=0,025$), als auch das Gesamtüberleben ($p<0,001$) ein signifikanter prognostischer Marker ist.

Eine prognostische Relevanz des Knochenmarkstatus kann mit der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Auch in der multivariaten Analyse stellte sich der Knochenmarkstatus in diesem Kollektiv nicht als unabhängiger Prognoseparameter dar ($p=0,561$).

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und der Publikation von Braun et al. im New England Journal of Medicine (NEJM), sowie der zitierten Pool Analysis könnte durch eine Reihe von Unterschieden in Methodik und Auswertung erklärt werden. Durch die Anfärbung der Primärtumore auf CD31 ist es gegenüber dem Kollektiv aus dem NEJM zu einer Patientinnenselektion gekommen, da nicht alle Primärtumore für die immunhistochemische Untersuchung zur Verfügung standen. Zum Teil wurde Tumorgewebe verloren, da das Anfertigen neuer Schnitte aus den alten Paraffinblöcken nicht möglich war, andererseits wurden Primärtumorschnitte durch den Andauungsprozess zerstört.

Die mittlere Nachbeobachtungszeit dieser Untersuchung betrug 65,8 Monate (4-103). Wie die beiden Studien von Mansi et al. zeigen, scheint die prognostische Relevanz von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark mit zunehmender Nachbeobachtungszeit geringer zu werden^{48,49}. Nach einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 76 Monaten (34-108) konnten Mansi et al. ein signifikant höheres Auftreten von Fernmetastasen (ohne Knochenmetastasen) ($p=0,001$) sowie ein geringeres Gesamtüberleben bei Patientinnen mit positivem Knochenmarkstatus nachweisen ($p=0,005$). Nach einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 12,5 Jahren war der Effekt von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark auf das Gesamtüberleben in der multivariaten Analyse statistisch nicht mehr signifikant ($p=0,3$). Im Vergleich zu der Studie von Braun et al. handelt es sich auch in dieser Arbeit um eine deutlich längere mittlere Nachbeobachtungszeit (38 vs. 65,8 Monate). Dies könnte zumindest teilweise die unterschiedlichen Signifikanzen der beiden Arbeiten erklären.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit nur bei 52 Patientinnen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark gefunden. Das entspricht 27% des Gesamtkollektivs. Dieser Prozentanteil entspricht in etwa den Angaben in der Literatur^{18,32,48,49}. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass der Nachweis von disseminierten

Tumorzellen in den verschiedenen Arbeiten mit unterschiedlichen, teilweise monoklonalen Antikörpern erfolgte. Auf den Nachteil dieser Methode wird in Kap. 6.3 hingewiesen.

Die Anzahl von 52 Patientinnen mit positivem Knochenmarksbefund lässt es möglich erscheinen, dass die statistische Power nicht ausreicht, um eine prognostische Relevanz nachzuweisen. In der Gruppe der nodal-negativen Patientinnen waren nur bei 28 Patientinnen disseminierte Tumorzellen gefunden worden. Von den 31 Todesfällen hatten 21 Patientinnen keine disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (14,7%), während zehn Patientinnen (19,2%) disseminierte Tumorzellen im Knochenmark aufwiesen ($p=0,443$). In der Gruppe der 106 nodal-negativen Patientinnen sind 10 verstorben, davon zwei mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (6,9%), und acht Patientinnen hatten keinen Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (10,8%) ($p=0,53$). Die Ergebnisse dieser Arbeit zur prognostischen Relevanz treten vor dem Hintergrund der aktuellen Datenlage mit wesentlich größeren Patientenkollektiven in ihrer Bedeutung zurück, und sollten diesbezüglich mit großer Zurückhaltung interpretiert werden.

6.3 Kontroversen in der Methodik des Nachweises disseminierter Tumorzellen

Tumorassoziierte Zellmembranproteine stehen für die immunzytochemischen Detektion von Tumorzellen seit langem zur Verfügung. Als Antigene für die Antikörperbindung werden am häufigsten das ‚*epithelial membrane antigen*‘ (EMA)^{23;46;47;49} und das polymorphe epitheliale Glykoprotein TAG12^{17;18} verwendet. Die längste Nachbeobachtungszeit weisen Studien mit Antikörpern gegen mucin-ähnliche Membranproteine auf. Die prognostischen Relevanz dieser Studien ist daher von besonderer Bedeutung. Die in diesen Studien verwendeten Antikörper geben allerdings derzeit den größten Anlass für Kritik. Die Expression der mucin-ähnlichen Membranproteine durch hämatopoetische Stammzellen kann zu einer Positivfärbung von 2-10% der mesenchymalen mononukleären Zellen von tumorfreien Probanden führen^{10;69}.

Cytokeratin ist ein integrierter Bestandteil des Cytoskeletts epithelialer Zellen. Mit spezifischen monoklonalen Antikörpern ist dieser relativ stabil exprimierte Marker in einzelnen Karzinomzellen einfach nachweisbar. Solche anti-cytokeratin Antikörper

scheinen eine höhere Spezifität aufzuweisen als Antikörper gegen mucin-ähnliche Membranproteine⁷. Auch der in dieser Untersuchung verwendete anti-cytokeratin Antikörper A45-B/B3, der gegen ein gemeinsames Epitop der Keratinkomponenten CK8, CK18 und CK19 gerichtet ist, hat in der Vergangenheit eine Spezifität von ca. 98% unter Beweis gestellt^{7;75}. Obwohl eine ektope oder illegitime m-RNA-Expression von Cytokeratinen in den mesenchymalen Zellen des Knochenmarkes möglich scheint,^{5;41;66;78;88}, ist dies beim immunzytochemischen Nachweis der Zellen von untergeordneter Bedeutung. Die Phänotypisierung cytokeratin-positiver disseminierter Tumorzellen durch PCR und FISH-Analyse durch Klein et al.³⁹ und Müller et al.⁵² hat eine Reihe von genetischen Merkmalen nachgewiesen, die für Tumorzellen charakteristisch sind.

In der Mehrzahl der Studien, bei denen anti-cytokeratin Antikörper verwendet wurden, kamen monoklonale Antikörper gegen das Cytokeratinisomer 18 zum Einsatz^{37;44;56;70}. Durch häufige Down-Regulation des Cytokeratinisomers 18 in Tumorzellen kann allerdings die Sensitivität der Nachweismethode beeinträchtigt sein, während die Sensitivität durch die Verwendung eines Panzytokeratin-Antikörpers vermutlich verbessert werden kann^{6;37}. Es bleibt allerdings bis dato unklar, welcher Antikörper am besten geeignet ist, die Grundlage für einen zuverlässigen und reproduzierbaren Goldstandard für die immunzytochemische Detektion von Tumorzellen im Knochenmark zu bieten.

Ein ebenfalls noch zu klärender Punkt der Nachweismethodik ist die mikroskopische Detektion der Zellen. Derzeit fehlen allgemein anerkannte Standardrichtlinien, um ein immunzytochemisches Färbereignis sicher als Tumorzelle klassifizieren zu können. Die subjektive Bandbreite der hier angewandten Kriterien führt zu Unsicherheiten in der Methodik, die im Falle einer therapeutischen Relevanz des Testergebnisses inakzeptabel sind. Im Bemühen um eine Objektivierung des mikroskopischen Read-outs wurden automatisierte Systeme entwickelt, die nicht nur eine hohe Sensitivität aufweisen, sondern durch computergestützte Analysen uniforme Kriterien anwenden, um die Wahrscheinlichkeit besser einzuschätzen, dass ein bestimmtes Färbereignis eine Tumorzelle repräsentiert^{14;45}. Derzeit sind vor allem die Systeme der amerikanischen Firmen Chromavision und Applied Imaging im Einsatz. Diese bedürfen aber noch einer ausreichenden Validierung. Das System MDS[®] der Firma Applied Imaging befand sich von September 2001 bis Ende 2002 im

tumorimmunologischen Labor unserer Klinik in Erprobung (Abbildung 18) und lieferte zuverlässige, mit manueller Detektion vergleichbare Ergebnisse.

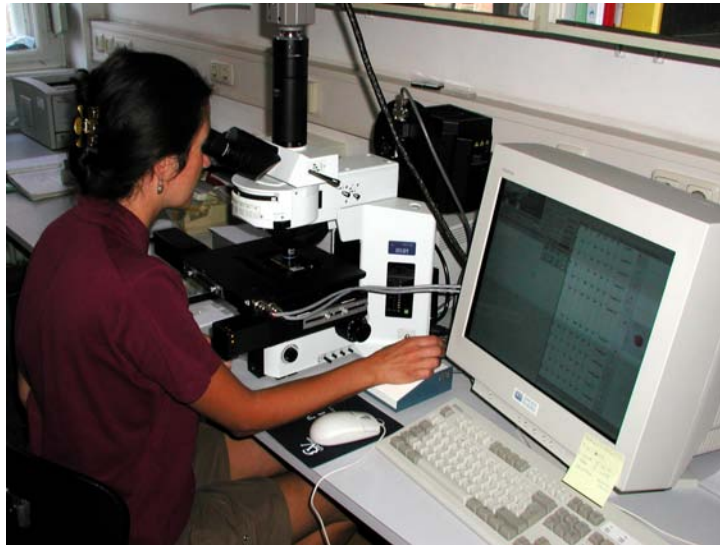


Abbildung 18. Automatisiertes Zellscreeningsystem MDS der Firma Applied Imaging

Der hier verwendete Testansatz ist eine der derzeit am besten validierten nichtmolekularen Nachweismethoden für hämatogen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark^{7;54;57}. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass diese Testmethode für die Beantwortung der Fragestellung geeignet war. Die Beibehaltung der Modalitäten der Nachweismethoden über alle Elemente dieser Untersuchung garantiert eine größtmögliche Konsistenz und Reproduzierbarkeit. Es ist jedoch zu fordern, dass der routinemäßigen Durchführung eines Tumorzellscreenings im Knochenmark eine grundlegende Standardisierung der Testmethodik vorausgeht.

6.4 Nachweis der Neoangiogenese am Primärtumor zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms

CD31 ist ein Endotheladhäsionsmolekül und gehört zu einer Gruppe transmembranöser Glykoproteine. Der immunzytochemische Nachweis einer Überexpression von CD31 ist ein Indikator für eine verstärkte Neoangiogenese²³.

In der vorliegenden Untersuchung wurden bei 25,6% der Patientinnen CD31 positive Zellen detektiert. Unter den untersuchten konventionellen Prognoseparametern

korrelierte lediglich der Menopausenstatus mit dem Nachweis einer CD31-Expression ($p=0,028$), nicht jedoch der kategorialisierte Lymphknotenstatus, der histopathologische Differenzierungsgrad, die Tumorgöße und der Hormonrezeptorstatus. Von den untersuchten histologischen Zusatzkriterien wie Hämangiosis carcinomatosa und Lymphangiosis carcinomatosa fand sich keine Korrelation mit der CD31 Expression. Eine Reihe von Untersuchungen haben in den letzten Jahren die prognostische Relevanz der Neoangiogenese nachgewiesen^{28;35;77,68,74,84}. Der Begriff Angiogenese wurde erstmals 1935 im Zusammenhang mit der Gefäßneubildung in der Plazenta benutzt. Angiogenese findet physiologischer Weise bei der Wundheilung und während des Menstruationszyklus in Ovarien und Endometrium statt. Als Angiogenese wird auf dem Gebiet der Onkologie die Neubildung von Blutgefäßen im Tumor bezeichnet. Ab einem Kubikmillimeter Tumolvolumen ist ein weiteres Wachstum ohne Neoangiogenese nicht möglich⁸⁰.

Angiogenese ist ein sehr komplexes Phänomen, welches im normalen Gewebe des Erwachsenen in aller Regel inhibiert wird^{9;86}. In erkranktem Gewebe, wie etwa Karzinomen, wird sie jedoch aktiviert. Die angiogenetische Aktivität ist in jedem Tumor zu einem bestimmten Zeitpunkt das Ergebnis der Balance zwischen angiogenetischen Stimuli und natürlichen Angiogenese-Inhibitoren²². Diese Balance ist sehr sensibel, verändert sich mit der Zeit und ist wahrscheinlich durch verschiedene Schritte reguliert: Zellulär (z.B. durch Makrophagen, Fibroblasten, Mastzellen etc), genetisch, biochemisch oder mechanisch¹⁶. Aufgrund dessen ist es sehr schwierig, eine einzelne Methode zu entwickeln, die in der Lage ist, dieses komplexe biologische Phänomen zu detektieren. Derzeit ist die am häufigsten verwendete Methode, um Angiogenese in menschlichen Neoplasien nachzuweisen, die Quantifikation von intratumoraler Gefäßdichte (IMD) in Primärtumoren. Um die Mikrogefäße sichtbar zu machen, wird eine standardisierte Immunoperoxidase Technik angewandt. Hierzu werden spezifische Marker für Endothelzellen verwendet, die das Faktor VIII related Antigen (fVIII-RA), CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule/PECAM) und CD34 einschließen⁶⁰. Derzeit ist Anti CD31 der sensitivste erhältliche Endothelmarker, da er eine größere Anzahl von Mikrogefäßen erkennt, als die anderen getesteten Marker Faktor VIII related Antigen (fVIII-RA), CD34. Von fVIII-RA ist bekannt, dass er auch lymphatisches Gewebe anfärbt. Zu erwähnen ist jedoch, dass auch CD31, außer mit Endothelzellen, noch mit anderen Zellen reagiert,

beispielsweise Plasmazellen³⁵. Dennoch zeigten zwei Studien, welche die prognostische Relevanz von IMD untersuchten, dass sowohl CD31 als auch fVIII-RA signifikante prognostische Informationen liefern. Neuerlich entwickelte Antikörper wie E-9, TEC-11 und LM-609 scheinen spezifisch für aktivierte proliferierende Endothelzellen zu sein^{35;83}. Vergleichende Studien werden zeigen müssen, ob diese Antikörper einen besseren prognostischen Wert haben als CD31 oder fVIII-RA.

Bereits 1907 veröffentlichten Goldmann et al. im Lancet den Zusammenhang zwischen Tumorwachstum, Metastasenbildung und der Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese)³⁵.

Bezüglich des Mammacarcinoms und Neoangiogenese wurden erste Studien durch Horak et al. und Weidner et al. veröffentlicht. Horak et al. untersuchten Gewebe von 103 primären Mammacarcinom Patientinnen. Die immunhistochemische Färbung wurde mit dem monoklonalen Antikörper JC70 und der APAAP Methode durchgeführt⁶⁰. Ebenso wurde der Antikörper fVIII verwendet. Der Vergleich der Marker in 12 Fällen zeigte, dass JC 70 eine höhere Anzahl von Mikrogefäßen detektierte und somit der sensitivere Marker war. In der univariaten Analyse für das Gesamtüberleben zeigte der Nachweis von CD31 am Primärtumor eine hohe Signifikanz $p=0,006$. Patientinnen mit einer hohen Gefäßdichte zeigten nach einer Nachbeobachtungszeit von 2,5 Jahren eine höhere Rezidiv- und Todesrate³⁵. Die Hauptgrundlage für die vorliegende Arbeit ist die Veröffentlichung von Stephen B. Fox aus dem Jahr 1997. Er untersuchte die Assoziation von Tumorangiogenese mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Mammacarcinom Patientinnen. Von 214 untersuchten Patientinnen zeigten 42 (20%) disseminierte Zellen im Knochenmark und 75 (35%) waren positiv für CD31. Die Assoziation von disseminierten Tumorzellen und Tumorangiogenese zeigten eine Signifikanz von $p=0,01$. Die multivariate Analyse zeigte, dass nur die Tumorangiogenese und vasculäre Invasion signifikant mit dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark assoziiert war²³. Um einen möglichst objektiven Vergleich zu der Studie von Fox et al. ziehen zu können, wendeten wir die von ihm beschriebene Methodik zur Andauung der zuvor entparaffinisierten Primärtumorpräparate an. Fox et al. verwendeten für die Andauung des Tumorgewebes Protease vom Typ XXIV 12,5 mg pro 100 ml Phosphatpuffer. In einer Versuchsreihe an 60 Präparaten konnte mit der oben beschriebenen Methodik kein Färbeergebnis erzielt werden. Daraufhin wurde an 30 weiteren Präparaten versucht, durch eine Konzentrationsänderung der

Protease eine Anfärbung zu erreichen. Dies erfolgte mit Protease/Puffer Konzentrationen von 1:10 bis 1:60. Die anschließende Färbung nach der APAAP-Technik und Entwicklung mit DAB-Substrat war in keiner der genannten Konzentrationen positiv. Im immunhistologischen Labor der I. Universitätsfrauenklinik wird zur Andauung von entparaffinisierten Tumorpräparaten ein standardisiertes Verfahren unter Anwendung des Citratpuffers durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.1.). In einer neuen Versuchsreihe an 30 Präparaten unter Anwendung dieser Methodik konnten zufriedenstellende Färbeergebnisse erzielt werden. Daraufhin entschlossen wir uns, diese Methodik trotz der Abweichung zu der Arbeit von S.B.Fox für den Nachweis von CD31 am Primärtumor zu verwenden. Kritisch anzumerken ist hierbei, dass die von uns verwendete Andauungsmethodik eine deutlich höhere Aggressivität gegenüber dem Tumorgewebe zeigt. Dadurch kam es im Rahmen des Andauungsprozesses zum Abschwimmen des Primärtumorgewebes vom Objektträger, welches dann nicht mehr für die Färbung zur Verfügung stand. Diese Tatsache hat die Zahl der untersuchten Patientinnen deutlich reduziert. Obwohl in der mikroskopischen Begutachtung nur histopathologisch intakte Tumoren zu erkennen waren, ist nicht auszuschließen, dass der beschriebene Andauungsprozess einen Einfluss auf die Färbeergebnisse genommen hat. Immerhin haben Fox et al. in ihrer Studie bei 35% der Patientinnen CD31 am Primärtumor nachweisen können, dies sind 10% mehr als in der vorliegenden Arbeit. Dies ist insbesondere bemerkenswert, da beide Untersuchungen fast identische Fallzahlen aufweisen. Im Widerspruch dazu steht, dass in der bereits 1992 erschienenen Arbeit von Horek et al. unter der Verwendung der Protease Andauungstechnik nur 20% der 103 Präparate CD31 positiv waren. Die prozentualen Färbeergebnisse der vorliegenden Arbeit liegen somit im Durchschnitt. Es ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit verwendete Andauungsmethodik ein adäquates Verfahren zur Bearbeitung von Paraffinschnitten ist. Alle drei Arbeiten, inklusive der vorliegenden, verwendeten denselben Antikörper JC70, so dass die Verwendung des Antikörpers keine Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle Präparate von zwei unabhängigen Untersuchern begutachtet und anschließend fotodokumentiert. In der Studie von Fox et al. wurden hingegen nur 35 Tumorpräparate von zwei unterschiedlichen Untersuchern ausgewertet, was zu einer Übereinstimmung von 86% führte. Dies verdeutlicht, dass auch mit Hilfe des Chalkley-Counts die Auswertung auf der subjektiven Beurteilung

des Einzelnen basiert. Zur Optimierung der Auswertungsergebnisse wäre die Beurteilung der Präparate durch einen erfahrenen Pathologen ein möglicher Lösungsansatz. Insbesondere im Hinblick auf die Anfärbung von Leukozyten und Plasmazellen wäre die Differenzierung durch einen Spezialisten als sinnvoll zu erachten. Die fehlende prognostische Bedeutung von CD31 bezüglich des Mammakarzinoms in dieser Arbeit lässt sich nicht abschließend erklären. Eine denkbare Möglichkeit wäre z. B. die Anwendung des Chalkley Counts. In diesem Verfahren werden mit Hilfe einer Schablone Punkte vergeben, die folgendermaßen skaliert werden: <5, 5-7, >7. Die unabhängige prognostische Relevanz zeigte ein 75% höheres Risiko zu sterben, wenn der Chalkley Count zwischen 5 und 7 lag und ein 125% höheres Risiko wenn der Chalkley Count größer gleich 7 war. Dies ist bezogen auf das Risiko von Tumoren mit einem Chalkley Count kleiner gleich fünf⁷⁴. Stephen B. Fox et al. legte in seiner Untersuchung einen Chalkley Count von sieben als Nachweis einer positiven CD3-Expression zu Grunde. In Anbetracht der oben genannten Zahlen könnte dies die Erklärung für die Korrelation mit dem gehäuften Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sein. Eine Überlebensanalyse dieses Patientengutes wurde nicht durchgeführt. Studien mit größeren Fallzahlen und standardisierten Nachweismethoden müssen Klarheit über die Wertigkeit der Neoangiogenese bei primärem Mammakarzinom erbringen.

Tabelle 14. Studien zum Nachweis der Neoangiogenese von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom

Antikörper	Antigen	N	Inzidenz (%)	Prognost. Relevanz	Literatur
CD31	JC70	103	20	+	Horak et al³⁵ 1992
CD31	JC70	214	35	+	Stephen B Fox et al. 1997²³
FVIII	FVIII	165	25	+	Weidner et al 1992⁸³
CD31	JC20	33	33	n.b.	Sapino A et al 2001⁶⁸
CD34	NB	836	40	+	Steinbj rn et al 2000.⁷⁴

n.b. = nicht bestimmt

6.5 Kontroversen in der Methodik des Nachweises von CD31

Für den Nachweis von Neoangiogenese am Primärtumor steht ausschließlich die immunhistochemische Färbung zur Verfügung. Hierbei beeinflusst die Wahl des Antikörpers die Auswertungsmethode wesentlich. Antikörper/Marker, die schlecht an den zu markierenden Endothelzellen der Gefäße binden, wie z.B Faktor VIII oder CD 34, erfassen nur einen Anteil der vaskulären Endothelien und somit nicht die reale Gefäßdichte im zu bestimmenden Präparat^{84;83}. Antikörper gegen das Faktor VIII Antigen sind zusätzlich in der Lage, an lymphatisches Gewebe zu binden und bergen somit die Gefahr einer falsch positiven Anfärbung und Auswertung.

Neoangiogenese ist die Voraussetzung für das Tumorwachstum. Bosari et al. und Weidner et al. zeigten in ihren Studien, dass die Gefäßdichte ein unabhängiger prognostischer Faktor für viele Tumortypen sowie auch für das Mammakarzinom ist^{4;84;21}.

Zusätzliche Antikörper gegen Vimentin, Lectin, alkalische Phosphatase sowie Typ IV Kollagen zeigen eine sehr geringe Spezifität und Sensibilität und spielen daher zum Nachweis von Angiogenese eine untergeordnete Rolle²⁵. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten JC 70, einem anti CD31 Antikörper, stand uns ein Endothelmarker zur Verfügung, mit dem ein verlässlicher Mikrogefäßnachweis bei routinemäßig gehandhabten formalinfixierten in Paraffin gebetteten Präparaten möglich ist. Der sensibelste derzeit erhältliche Endothelmarker ist CD31. Er erkennt mehr Endothelien von Tumormikrogefäßen als andere, schon beschriebene Marker und reagiert auch nicht mit lymphatischem Gewebe²⁸.

Unter der Verwendung von Faktor VIII und CD31 zum Nachweis von Neoangiogenese konnte diese in unterschiedlichen Studien als prognostischer Marker für das Mammakarzinom nachgewiesen werden. Dennoch konnten Horek et al. in einem Vergleich zeigen, dass JC 70 eine höhere Sensivität aufweist als FVIII Antigen. Bei der Anfärbung desselben Areals wurden mit JC 70 in allen Fällen mehr Mikrogefäße angefärbt³⁵.

Es ist zu vermuten, dass die Unterschiede in den veröffentlichten Daten durch die verschiedenen Methoden zur Quantifizierung der Gefäßdichte verursacht werden^{24;35;76;83}. Um die Tumorgefäßdichte zu quantifizieren, gibt es verschiedene Methoden. Hierbei handelt es sich um die Anzahl der Gefäße, den Gefäßdurchmesser und die Größe des betroffenen Gebietes. Viele erkennen die Arbeit von Weidner et al. als Grundlage für die Quantifizierung der Gefäßdichte an

und bewerten „hot spots“, das heißt die Gebiete mit der größten Gefäßdichte. Kritiker wie z.B. Fox et al. beurteilen diese Methode als langsam und langwierig und somit unpassend⁸⁴. Auswertungsmethoden, neben dem auch in dieser Arbeit verwendeten Chalkley Count sind eine automatische Analyse sowie eine Gefäßgradierung. In der Arbeit von Stephen B. Fox et al. zeigt sich, dass das automatische Messverfahren sich aufgrund zu geringer Vergrößerung der Bildanalyse nicht durchsetzen konnte^{25;35}. Der Chalkley Count und die Gefäßgradierung erwiesen sich beide als erfolgreiche Methoden der Auswertung. Die Gefäßgrading bleibt jedoch im Vergleich zum Chalkley Count eine subjektive Methode. Mit dem Chalkley Count bietet sich eine schnelle und objektive Methode zur Bewertung der Neoangiogenese. 1996 wurde der Chalkley Count durch eine internationale Konsensusgruppe als Methode der Wahl empfohlen⁷⁴. Chalkley selbst postuliert: *“Eine zur Quantifizierung brauchbare Methode sollte präzise, einfach, auf kompliziertes Gewebe anwendbar, und an unabhängigen Testen geprüft worden sein“*¹².

7 Zusammenfassung

Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom ist ein wichtiger prognostischer Parameter. In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis von CD31 am Primärtumor Mammakarzinom mit dem Auftreten von Mikrometastasen im Knochenmark korreliert. Ferner wurde die prognostische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und die prognostische Bedeutung von CD31 evaluiert. Bei 50 Patientinnen des Gesamtkollektivs von 195 (25,6%) wurde zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms eine positive CD31-Expression festgestellt. In Relation zu den bekannten etablierten Prognoseparametern Tumorgröße, axillärer Lymphknotenstatus, histopathologisches Grading, Menopausenstatus und Hormonrezeptorstatus fand sich keine signifikante Korrelation. Es zeigte sich jedoch, dass eine CD31-Expression signifikant häufiger bei postmenopausalen Frauen auftrat. Bei 52 Patientinnen des Gesamtkollektivs von 195 (27%) wurden zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Mammakarzinoms disseminierte Tumorzellen im Knochenmark festgestellt. Gegenüber den bekannten etablierten Prognoseparametern Tumorgröße, axillärer Lymphknotenstatus, histopathologisches Grading, Menopausenstatus und Hormonrezeptorsstatus fand sich keine signifikante Korrelation.

Des Weiteren fand sich keine Korrelation $p=0,805$ bei den 50 Patientinnen mit einer Überexpression von CD31 am Primärtumor und den 52 Patientinnen mit positiven Knochenmarkstatus.

In Bezug auf des Gesamtüberleben ergab sich weder zwischen den Patientenkollektiven bei positivem CD31 Status ($n=50$; mediane Gesamtüberlebenszeit 90 Monate {82-98, 95%CI}) und negativem CD31 Status ($n=145$; mediane Gesamtüberlebenszeit 88 Monate {84-92; 95% CI}), $p=0,74$, Log-rank Test, noch zwischen den Patientenkollektiven bei positiven Knochenmarkstatus ($n=52$; mediane Gesamtüberlebenszeit 90 Monate {82-97 CI 95%};) und negativem Knochenmarkstatus ($n=143$; mediane Gesamtüberlebenszeit 89 Monate {85-92 CI 95%}); eine Signifikanz. $P=(0,498)$ Log-rank Test.

Dasselbe gilt ebenfalls für die rezidivfreie Überlebenszeit. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei positivem CD31 Status (n=50; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 74 Monate {73-93, 95%CI}) und negativem CD31 Status (n=145; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 76 Monate {70-82; 95% CI}), P=0,78, Log-rank Test, konnte nicht festgestellt werden.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven bei positiven Knochenmarkstatus (n=52; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 89 Monate {82-97 CI 95%}) und negativem Knochenmarkstatus (n=143; mediane rezidivfreie Überlebenszeit 88 Monate {85-92 CI 95%}); konnte nicht festgestellt werden. P=0,98 Log-rank Test.

In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass die klassischen Prognoseparameter Grading (p=0,039) und Lymphknotenstatus (p=0,013) als unabhängige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben stehen.

Die Schlussfolgerung dieser Arbeit ist, dass die Bestimmung der CD31-Expression am Primärtumor von Mammakarzinomen nicht zur Prognoseeinschätzung geeignet ist.

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1. Punktionsstellen bei der Knochenmarkaspiration.....	7
Abbildung 2. Knochenmarkaspirationsnadeln	8
Abbildung 3. Zentrifugenröhrchen mit Zellsuspension und Dichtegradienten Ficoll-Hypaque in Gesamtansicht (links) und Detailansicht (rechts).....	9
Abbildung 4. Zentrifugenröhrchen nach Zentrifugation mit Dichtegradienten Ficoll-Hypaque in Gesamtansicht (links) und Detailansicht (rechts).....	10
Abbildung 5. Zentrifugations-Tube in der Hettich Universal 30 F Zentrifuge....	11
Abbildung 6. Positivfärbung einer isolierten Tumorzelle im Knochenmarkspirat (mit Detailansicht).....	13
Abbildung 7. Positivfärbung eines Cellclusters von Mammakarzinomzellen (mit Detailansicht).....	13
Abbildung 8. CD31 positive Expression.....	17
Abbildung 9. Chalkley - Count Schablone.....	19
Abbildung 10. Kaplan Meier Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Expressionsstatus von CD31.....	32
Abbildung11. Kaplan Meier Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus	33
Abbildung 12. Kaplan Meier Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit der TumorgroÙe	35
Abbildung 13. Kaplan Meier Kurve für das Gesamtüberleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus	36
Abbildung 14. Kaplan Meier Kurve für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit der CD31 Expression	37
Abbildung 15. Kaplan Meier Kurve für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus.....	39
Abbildung 16. Kaplan Meier Kurve für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit der TumorgroÙe.....	41
Abbildung 17. Kaplan Meier Kurve für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus	42

Abbildung 18. Automatisiertes Zellscreeningsystem MDS der Firma Applied Imaging..... 52

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Gesamtkollektiv der Patientinnen mit Knochenmarkpunktion: Charakteristika zum Zeitpunkt der Primärtherapie.....	20
Tabelle 2. Histologische Zusatzkriterien des Primärtumors zum Zeitpunkt der Primärtherapie	22
Tabelle 3. Chemotherapieschemata Mammakarzinom.....	24
Tabelle 4. Patientinnencharakteristika in Abhängigkeit des Knochenmarksbefundes.....	28
Tabelle 5. Patientinnencharakteristika in Abhängigkeit der CD31-Expression.	30
Tabelle 6. Korrelation der CD31-Expression mit dem Knochenmarkstatus	31
Tabelle 7. Korrelation des Gesamtüberlebens mit der CD31-Expression	33
Tabelle 8. Korrelation des Gesamtüberlebens mit dem Knochenmarkstatus... 	34
Tabelle 9. Korrelation von Rezidivereignissen mit der CD31-Expression.....	38
Tabelle 10. Korrelation von Rezidivereignissen mit dem Knochenmark.....	40
Tabelle 11. Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben der Patientinnen... 	43
Tabelle 12. Multivariate Analyse für das rezidivfreie Überleben der Patientinnen	44
Tabelle 13. Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom	47
Tabelle 14. Studien zum Nachweis der Neoangiogenese von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom	56

10 Anhang

EINWILLIGUNG ZUR KNOCHENMARKPUNKTION

IMMUNZITOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Liebe Patientin,

die Untersuchung des Knochenmarks wird in der Krebsdiagnostik eingesetzt, um wertvolle Informationen über den Ausbreitungsgrad der Krankheit zu erhalten. Dieses Verfahren ist momentan noch Gegenstand wissenschaftlicher Forschung, um neue Therapiemöglichkeiten und Chancen der Früherkennung zu entwickeln. Zu diesem Zweck bitten wir Sie, liebe Patientin, um die Einwilligung zu einer Knochenmarkspunktion. Die Untersuchung ist kostenlos.

Untersuchungsverfahren

Mit einer Spezialnadel wird vom Beckenkammknochen der linken und rechten Seite jeweils eine Knochenmarkprobe entnommen. Die Punktion des Knochenmarks erfolgt in örtlicher Betäubung. Anhaltende Schmerzen im Bereich der Punktionsstelle nach der Operation sind nicht zu erwarten. Wird die Punktion in örtlicher Betäubung durchgeführt, so kann das Ansaugen des Knochenmarks einen heftigen, aber sehr kurzen Schmerz verursachen.

Mögliche Komplikationen

Die Risiken des Eingriffs, wie z.B. das Infektionsrisiko, sind außerordentlich gering. Eventuelle Nachblutungen aus Hautvenen sind selten und lassen sich durch einfachen Druck auf die Punktionsstelle leicht beherrschen. Die Beantwortung der folgenden Fragen hilft uns, die Risiken zusätzlich möglichst gering zu halten:

1. Besteht eine vermehrte Blutungsneigung?
 nein ja
2. Besteht eine Allergie ? (z.B. Medikamente, Pflaster, örtliche Betäubungsmittel?)
 nein ja, welche: _____

Verhalten nach der Untersuchung

Zur Blutstillung genügt in der Regel ein Druck von wenigen Minuten auf die Einstichstelle. Die Punktionsstelle braucht in der Regel vom Arzt nicht mehr kontrolliert zu werden, falls nicht eine Nachblutung aus dem Punktionskanal oder länger andauernde Schmerzen auftreten.

Nach einer Knochenmarkpunktion, die in örtlicher Betäubung durchgeführt wurde, sollten Sie mindestens eine halbe Stunde ruhen.

Herr/Frau Dr. _____

hat mit mir heute anhand dieses Informationsblattes ein Aufklärungsgespräch geführt, bei dem ich alle mich interessierenden Fragen stellen konnte. Ich stimme zu, dass das entnommene Knochenmark und die Untersuchungsergebnisse wissenschaftlich ausgewertet und weiterverwendet werden.

- Ich habe keine weiteren Fragen und benötige keine zusätzliche Überlegungsfrist.
- Ich willige hiermit in die vorgeschlagene Untersuchung ein.

ODER

- Ich versage meine Zustimmung.

_____, den _____

Unterschrift der Patientin

Unterschrift des Arztes/der Ärztin

11. Literaturverzeichnis

1. Altmann U, Katz FR, Tafazzoli AG, Haeberlin V, Dudeck J. GTDS -a tool for tumor registries to support shared patient care. Proc.AMIA.Annu.Fall.Symp. 1996;512-16.
2. Bicknell R, Lewis C, Ferrara N. Tumour angiogenesis. Oxford University Press 1997;19-28.
3. Borgen E, Beiske K, Trachsel S, Nesland JM, Kvalheim G, Herstad TK *et al.* Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. J. Pathol. 1998;185:427-34.
4. Bosari S, Leek AK. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. Hum. Pathol. 1992;23:755-61.
5. Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R *et al.* Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. J.Clin. Oncol. 1998;16:2632-40.
6. Braun S, Pantel K. Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance. Med. Oncol. 1999;16:154-65.
7. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR *et al.* Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. N. Engl. J. Med. 2000;342:525-33.
8. Braun S, Vogel F D, Schlimok G, Diel I J, Janni W, Gerber B, Gebauer G, Coobes R C, Pierga, J-Y, Naume B, and Pantel K.: Pooled analysis of prognostic impact of bone marrow micrometastases: 10 years survival of 4268 breast cancer patients. Breast Cancer Res. Treat.; 67: 2003;Suppl: Abstract SABCS # 7.

9. Brem S, Gullino P. Angiogenesis: a marker for neoplastic transformation of mammary papillary hyperplasia. *Science* 1997;195:881.
10. Brugger W, Buhring HJ, Grunebach F, Vogel W, Kaul S, Muller R *et al.* Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:1535-44.
11. Buckley CD, Doyonnas R, Newton JP, Blystone SD, Brownn EJ, Watt SM, Simmons DL. Identifications of $\alpha_v\beta_3$ as a heterotypic ligand for CD31/ PECAM-1. *J.Cell Sci.* 1996;109:437-45.
12. Chalkley H. Method for the quantitative morphological analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst.* 1943;4:47-53.
13. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J.Clin.Oncol.* 1991;9:1749-56.
14. Cote RJ, Shi S R, Beattie E J, Makarewicz B, and Chaiwun B. Automated detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Proc. ASCO* 1997;16, 458 a.
15. Cox DR. Regression models and life tables. *J. R. Stat. Soc. B.* 1972;34:187-220.
16. D' Amore PA. Capillary growth: a two cell system. *Cancer Biol.* 1992;3:49-56.
17. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF *et al.* Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J.Natl.Cancer Inst.* 1996;88:1652-58.
18. Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J.Clin.Oncol.* 1992;10:1534-39.

19. Ellis G, Ferguson M, Yamanaka E, Livingston RB, Gown AM. Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients. *Cancer* 1989;63:2509-14.
20. Engell HC. Cancer Cells in the Circulating Blood. *Acta Chir Scand* 1955;Supp 201.
21. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J.Natl.Cancer Inst.* 1990;82:4-6.
22. Folkman J. Angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 1992;267:10931-34.
23. Fox SB, Leek RD, Bliss J, Mansi JL, Gusterson B, Gatter KC *et al.* Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997;89:1044-49.
24. Fox SB, Leek RD, Smith K, Hollyer J, Greenall M, Harris AL. Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinomas-relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor, and survival. *Breast Cancer Res.Treat.* 1994;29:109-16.
25. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol.* 1995;177:275-83.
26. Funke I, Fries S, Rolle M, Heiss MM, Untch M, Bohmert H *et al.* Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. *Int.J.Cancer* 1996;65:755-61.
27. Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J.Clin Oncol* 1998;16:557-66.
28. Gasparini G. Quantification of intratumoral vascularization predicts metastasis in human invasive solid tumors. *Oncol Rep* 1994; 1:7-12.
29. Genz Th, Schaller G. Das Rezidiv beim Mammakarzinom. *Krebsmedizin* 1990;11:15-18.

30. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 2003;21:3357-65.
31. Halsted WS. The results of radical operation for the cure of carcinoma of the breast. *Ann. Surg.* 1907;46:1-19.
32. 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* 1994;69:566-71.
33. Hellman S. Stopping metastases at their source. *N.Engl.J Med* 1997;337:996-97.
34. Henderson IC. *Harrison`s Principle of Internal Medicine.* New York: McGraw-Hill 1994; 13:1840-1850.
35. Horak E, Leek R, Klenk R, Smith K, Lejeune S, Stuart N, Greenall M, Stepniewska A, Harris A. Angiogenesis, assessed by platelet adhesion molecule antibodies as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992;340:1120-24.
36. Janni W, Rjosk D, Braun S. Clinical relevance of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with different stages of breast cancer. *Clin.Breast Cancer* 2000;1:217-25.
37. Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R *et al.* Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J.Clin.Oncol.* 1996;14:1810-17.
38. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 1958;53:457-81.
39. Klein CA, Schmidt KO, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:4494-99.
40. Köchli OR. *Gynäkologische Onkologie, Manual für Klinik und Praxis.* Springer Verlag 1998;2-6.

41. Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seeber S *et al.* Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J.Clin.Oncol.* 1995;13:2769-75.
42. Landys K, Persson S, Kovarik J, Hultborn R, Holmberg E. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res.Treat.* 1998;49:27-33.
43. Lee MS, Kantarjian H, Talpaz M, Freireich EJ, Deisseroth A, Trujillo JM *et al.* Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia following interferon therapy. *Blood* 1992;79:1920-23.
44. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992;340:685-89.
45. Makarewicz B, McDuffie L, Shi S R, Catterjee S, Yang C, and Taylor C R. Immunohistochemical detection of occult micrometastases using an automated intelligent microscopy system. *Proc. Am. Assoc. Cancer* 1997; 38, 269.
46. Mansi JL, Berger U, Easton D, McDonnell T, Redding WH, Gazet JC *et al.* Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases. *Br.Med.J Clin.Res.Ed* 1987;295:1093-96.
47. Mansi JL, Berger U, McDonnell T, Pople A, Rayter Z, Gazet JC *et al.* The fate of bone marrow micrometastases in patients with primary breast cancer. *J.Clin Oncol.* 1989;7:445-49.
48. Mansi JL, Easton D, Berger U, Gazet JC, Ford HT, Dearnaley D *et al.* Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. *Eur.J.Cancer* 1991;27:1552-55.

49. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long- term follow-up study. *Lancet* 1999;354:197-202.
50. Molino A, Pelosi G, Turazza M, Sperotto L, Bonetti A, Nortilli R *et al.* Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res.Treat.* 1997;42:23-30.
51. Moss TJ, Sanders DG. Detection of neuroblastoma cells in blood. *J.Clin.Oncol.* 1990;8:736-40.
52. Mueller P, Carroll P, Bowers E, Moore D, Cher M, Presti J *et al.* Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate carcinoma patients are cytogenetically aberrant. *Cancer* 1998;83:538-46.
53. Negrin RS, Blume KG. The use of the polymerase chain reaction for the detection of minimal residual malignant disease [editorial]. *Blood* 1991;78:255-58.
54. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J.Natl.Cancer Inst.* 1999;91:1113-24.
55. Pantel K, Felber E, Schlimok G. Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J.Hematother.* 1994;3:315-22.
56. Pantel K, Izbicki JR, Angstwurm M, Braun S, Passlick B, Karg O *et al.* Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1993;53:1027-31.
57. Pantel K, Otte M. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, and phenotyping. *Recent Results Cancer Res* 2001;158:14-24:-24.
58. Pantel K, Riethmuller G. Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1996;213:1-18.
59. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H *et al.* Methodological analysis of immunocytochemical screening for

- disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J.Hematother.* 1994;3:165-73.
60. Parums DV, Cordell JL, Micklem K. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue section. *J Clin Pathol* 1990;43:752-57.
 61. Porro G, Menard S, Tagliabue E, Orefice S, Salvadori B, Squicciarini P *et al.* Monoclonal antibody detection of carcinoma cells in bone marrow biopsy specimens from breast cancer patients. *Cancer* 1988;61:2407-11.
 62. Qiu SD, Young CY, Bilhartz DL, Prescott JL, Farrow GM, He WW *et al.* In situ hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate. *J.Urol.* 1990;144:1550-56.
 63. Rack B, Janni W, Gerber B, Strobl B, Schindlbeck C, Klanner E, Rammel G, Sommer H, Dimpfl T, Friese K. Patients with recurrent breast cancer: does the primary axillary lymph node status predict more aggressive tumor progression? *Breast Cancer Res.Treat.* 2003;82:83-92.
 64. Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP *et al.* Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 1983;2:1271-74.
 65. Roy B ,Lewis CE. Tumor angiogenesis. Oxford University Press 1990; 21-44.
 66. Ruud P, Fodstad O, Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int.J.Cancer* 1999;80:119-25.
 67. Salvadori B, Squicciarini P, Rovini D, Orefice S, Andreola S, Rilke F *et al.* Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients. *Eur.J.Cancer* 1990;26:865-67.
 68. Sapino A, Bongiovanni M, Cassoni P, Righi L, Arisio R, Deaglio S *et al.* Expression of CD31 by cells of extensive ductal in situ and invasive carcinomas of the breast. *J Pathol.* 2001;194:254-61.

69. Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H *et al.* Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84:8672-76.
70. Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J *et al.* Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur.J.Cancer* 1991;27:1461-65.
71. Singletary SE, Allred DC, Ashley P. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *J. Clin.Oncol.* 2002;20:3628-36.
72. Sobin LH. Frequently asked questions regarding the application of the TNM classification. TNM/Prognostic Factors Project (International Union Against Cancer [UICC]). *Cancer* 1999;85:1405-06.
73. Stahel RA, Mabry M, Skarin AT, Speak J, Bernal SD. Detection of bone marrow metastasis in small-cell lung cancer by monoclonal antibody. *J.Clin.Oncol.* 1985;3:455-61.
74. Steinjorn H, Dorthe A, Grabau, Flemming B. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley Counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2000;6:139-46.
75. Stigbrand T, Andres C, Bellanger L, Bishr OM, Bodenmuller H, Bonfrer H *et al.* Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumour. Biol.* 1998;19:132-52.
76. Toi M. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast cancer. *Int. J. Cancer* 1993;55:371-74.
77. Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res.Treat.* 1995;36:193-204.

78. Traweek ST, Liu J, Battifora H. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. *Am.J.Pathol.* 1993;142:1111-18.
79. Untch M. Prognose und Prädiktivfaktoren beim Mammakarzinom. *Der Gynäkologe* 1998;12:1067-74.
80. Untch M, Harbeck N, Eiermann W. Mikrometastasen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärtherapie beim Mammakarzinom: Ein neues Prognosekriterium? [Micrometastases in bone marrow at the time of primary treatment of breast cancer: a new prognostic criterion?]. *Gynakol.Rundsch.* 1989;29 Suppl 2231-3:-3.
81. Untch M, Kahlert S, Funke I, Boettcher B, Konecny G, Nestle-Kraemling C, and Bauernfeind I. Detection of Cytokeratin (CK) 18 Positive Cells in the Bone Marrow (BM) of Breast Cancer Patients-No Prediction of Bad Outcome. *Proc.ASCO* 1999; 18: 693 a.
82. Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi U. Patterns of relapse and survival in operable breast carcinoma with positive and negative axillary nodes. *Tumori* 1978;64:241-58.
83. Weidner N, Semple JP. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N.Engl.J.Med.* 1991;324:1-8.
84. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH *et al.* Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84:1875-87.
85. Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H *et al.* Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2003;21:3469-78.
86. Wong S, Purdie AT. Thrombospondin and other possible related matrix proteins in malignant and benign breast disease. *Am J.Pathol.* 1992;140:1473-82.

87. Yan H-C, Newman PJ. Epitope mapping of CD31 (PECAM-1) mAB. Oxford University Press 1995;1261-63.
88. Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G *et al*. Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J.Clin.Oncol.* 1997;15:2701-08.

12. Danksagung

Herrn Priv. Doz. Dr. Stephan Braun danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe des tumorimmunologischen Labors der I. Universitätsfrauenklinik der LMU und die Überlassung des vorliegenden Themas.

Großer Dank gilt insbesondere den medizinisch-technischen-Assistentinnen des Labors, die mich 2 Jahre ertragen und bei Freudensausbrüchen sowie bei Wutanfällen (z.B. wenn die Versuchsreihe misslungen war), mitfühlten. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Beate Zill.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Christina Kentenich bedanken, der ich die Hälfte meiner Labordaten abtrat und die mich immer wieder angetrieben hat, diese Arbeit auch auf dem Papier festzuhalten. Ohne sie wäre ich heute noch nicht fertig.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Doktor Kindermann, der mich für die vorliegende Arbeit während meiner Zeit als Privatassistentin eine Woche von der klinischen Arbeit befreit hat.

Dem Retter in der Not, Herrn Priv. Doz. Dr. Wolfgang Janni, danke ich für die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit, da die Betreuung durch Herrn Priv. Doz. Dr. Stephan Braun aus räumlichen Gründen nicht mehr möglich war.

Nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann Herrn Dr. jur. Simon Eisenmann, der meine Nervenzusammenbrüche am Computer geduldig ertragen hat sowie meinen Eltern die mir, nicht nur durch die Finanzierung des Computers, jede Unterstützung haben zukommen lassen.

Mein aufrichtiger Dank gilt zudem allen weiteren Beteiligten, auch wenn sie nicht namentlich genannt sind .

13. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Petra Nicole Eisenmann, geb. Schaffer
Geburtsdatum	03.06.73
Geburtsort	München

Ausbildung

9.07.93	Abitur am Bertolt-Brecht-Gymnasium in München
1993-1995	Studium der Humanmedizin an der Semmelweis-Universität in Budapest
1995	Ärztliche Vorprüfung in Budapest
1995	Wechsel an die Ruhr-Universität Bochum
1997	1. Staatsexamen in Bochum
1998	2. Staatsexamen in Bochum
Mai 2000	3. Staatsexamen in München
August 2000	Ärztin im Praktikum und wissenschaftliche Assistentin, I. Frauenklinik Ludwig-Maximilian-Universität, München
Februar 2002	Assistenzärztin und wissenschaftliche Assistentin, I. Frauenklinik Ludwig-Maximilian-Universität, München