

Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)
zum Nachweis von Parathormon-ähnlichem Protein (PTHrP)
sowie Immunzytologie von Zytokeratin 18 (CK 18)
zur Detektion disseminierter Tumorzellen
im peripheren Blut und Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Peer Scharnberg

aus
Essen

Göttingen 2008

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. G. Wulf

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

1. Einleitung	1
1.1 Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.1.2 Tumoren der Mamma	1
1.1.2.1 Gutartige Tumoren und Erkrankungen der Mamma	1
1.1.2.2 Einteilung der Mammakarzinome	3
1.1.3 Stadieneinteilung (Staging)	5
1.1.4 Therapie des Mammakarzinoms	5
1.1.5 Prognostische Faktoren des Mammakarzinoms	6
1.1.6 Diagnostik des Mammakarzinoms	7
1.1.6.1 Bildgebende Verfahren zum Nachweis ossärer Metastasen	7
1.1.7 Metastasierung	8
1.1.7.1 Tumorzelldissemination, Mikrometastasen und ihre klinische Bedeutung	9
1.1.8 Nachweis disseminierter Tumorzellen	11
1.1.8.1 Immunzytochemischer Nachweis von disseminierten Tumorzellen und seine klinische Bedeutung im Zusammenhang mit Mammakarzinomen	12
1.1.8.2 Molekularbiologische Nachweisverfahren	14
1.1.9 Zytokeratine	15
1.1.9.1 Zytokeratin 18	16
1.1.10 PTHrP (Parathormon-ähnliches Protein)	17
1.1.10.1 Die Funktion des PTHrP in der gesunden Mamma und bei Mammakarzinomen	18
1.2 Zielsetzung der Arbeit	20
2. Patienten, Material und Methoden	21
2.1 Patienten	21
2.2 Material	22
2.2.1 Patientenmaterial	22
2.2.2 Negativkontrollen	23
2.2.3 Positivkontrollen	23
2.2.3.1 Mammakarzinomzelllinien	23
2.2.3.1.1 MCF-7	23
2.2.3.1.2 MDA-MB-231	23
2.2.3.2 Nierenkarzinomzelllinie (786-O)	23
2.3 Chemikalien und Reagenzien	24
2.4 Media, Zusätze und Supplemente	25
2.5 Enzyme und spezielle Reagenzien	25
2.6 Antikörper	26

2.7 Medien, Puffer und Lösungen	26
2.8 Methoden	29
2.8.1 Aufbereitung des Patientenmaterials	29
2.8.2 Isolation der mononukleären Zellen aus Blut- und Knochenmarkaspiraten	29
2.8.3 Anfertigung von Leukozytenpräparaten mittels der Zytozentrifugations- und Sedimentationstechnik	30
2.8.4 Kryokonservierung mononukleärer Zellen	30
2.8.5 Immunzytochemie	30
2.8.6 Vergleich der Sensitivität von Zentrifugations- und Sedimentationspräparaten	32
2.8.7 RNA-Extraktion aus mononukleären Zellen und homogenisiertem Tumormaterial	32
2.8.8 Reverse Transkription	33
2.8.9 Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	34
2.8.10 Gelelektrophorese	37
2.8.11 Southern Blot	38
2.8.12 Herstellung spezifischer markierter Sonden	38
2.8.12.1 Dot Blot	39
2.8.13 Hybridisierung	39
2.8.14 Immunologischer Nachweis (Färbereaktion)	40
3. Ergebnisse	47
3.1 Ergebnisse der Verdünnungsreihen für den CK-18-Nachweis in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten	47
3.1.1 Ergebnisse der Verdünnungsreihe im Bereich von 1×10^{-3} bis 1×10^{-6} Tumorzellen	47
3.1.2 Ergebnisse der Verdünnungsreihe im Bereich 1×10^{-4} bis 1×10^{-5} Tumorzellen	49
3.1.3 Übersicht über beide Verdünnungsreihen und Darstellung der Detektionsgrenze	52
3.2 Lichtmikroskopische Auswertung der Knochenmark- und Blutausstriche in der Pappenheimfärbung	54
3.3 Ergebnisse des immunzytologischen Nachweises von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten	55
3.3.1 Ergebnisse der auf CK 18 untersuchten Zytozentrifugationspräparate des Materials der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma	55
3.3.2 Ergebnisse der immunzytologischen Untersuchung für CK 18 des Patientenkollektivs mit einem Mammakarzinom	55

3.3.2.1	Auswertung der immunzytologisch auf CK 18 untersuchten Zytozentrifugationspräparate des gesamten Patientenkollektivs mit einem Mammakarzinom bezogen auf das Stadium des Tumors_____	55
3.3.2.2	Ergebnisse der immunzytologischen Untersuchung auf CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom_____	58
3.3.2.3	Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen_	60
3.3.2.4	Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen_____	62
3.3.2.5	Ergebnisse für CK 18 in den Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen_____	64
3.3.2.6	Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma_____	65
3.4	Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten_____	67
3.4.1	Ergebnisse der auf CK 18 untersuchten Sedimentationspräparate des Materials der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma_____	67
3.4.2	Auswertung der immunzytologisch auf CK 18 untersuchten Sedimentationspräparate des Patientenkollektivs mit einem Mammakarzinom_____	67
3.4.2.1	Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom_____	68
3.4.2.2	Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen_	70
3.4.2.3	Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom mit Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen_____	72
3.4.2.4	Ergebnisse für CK 18 in den Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen_____	73
3.4.2.5	Ergebnisse für CK 18 in den Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms oder einem Zweitkarzinom der Mamma_____	74
3.5	Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten_____	74

3.5.1	Vergleich der Ergebnisse des in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten auf CK 18 untersuchten Materials der Patientinnen mit einer gutartigen Erkrankung der Mamma	74
3.5.2	Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem Mammakarzinom	75
3.5.2.1	Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des gesamten Patientenkollektivs mit einem Mammakarzinom	75
3.5.2.2	Vergleich der Ergebnisse der auf CK 18 untersuchten Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparate aller Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom	75
3.5.2.3	Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen	77
3.5.2.4	Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen	79
3.5.2.5	Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit Fernmetastasen	80
3.5.2.6	Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma	80
3.6	Korrelation der Ergebnisse der immunzytologischen Untersuchung auf CK18 mit dem Östrogen und Progesteronrezeptorstatus	80
3.6.1	Korrelation der Ergebnisse der immunzytologischen Untersuchung auf CK18 in Zytozentrifugationspräparaten mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus	80
3.6.1.1	Korrelation der gegen CK 18 gefärbten Zytozentrifugationspräparate mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom	82
3.6.1.2	Korrelation der gegen CK 18 gefärbten Zytozentrifugationspräparate mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma	84
3.6.2	Korrelation der gegen CK 18 gefärbten Sedimentationspräparate mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus	84

3.6.2.1	Korrelation der gegen CK 18 gefärbten Sedimentationspräparate mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom_____	85
3.6.2.2	Korrelation der gegen CK 18 gefärbten Sedimentationspräparate mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma_____	86
3.7	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden_____	86
3.7.1	Ergebnisse der β -Aktin-PCR zur Überprüfung der Integrität der cDNA aus Knochenmark-, Blut- und Tumorgewebeproben_____	86
3.7.2	Ergebnisse der primären PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP_____	87
3.7.2.1	Ergebnisse der primären PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP in Knochenmarks- und Blutproben der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma_____	87
3.7.2.2	Ergebnisse der primären PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP in Knochenmarks-, Blut- und Tumorgewebeproben der Patientinnen mit einem Mammakarzinom_____	87
3.7.3	Ergebnisse der nested-PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP_____	88
3.7.3.1	Ergebnisse der nested-PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP in Knochenmark- und Blutproben der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma_____	88
3.7.3.2	Ergebnisse der nested-PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP in Knochenmark-, Blut- und Tumorgewebeproben der Patientinnen mit einem Mammakarzinom_____	89
3.7.4	Ergebnisse der Hybridisierung der PCR-Produkte der Knochenmark-, Blut- und Tumorgewebeproben der Patientinnen mit einem Mammakarzinom mit PTHrP-spezifischen Sonden_____	89
3.8	Ergebnisse des Nachweises von PTHrP bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf das Stadium des Tumors_____	92
3.8.1	Ergebnisse des PTHrP-Nachweises bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen_____	94
3.8.2	Ergebnisse des PTHrP-Nachweises bei nodal positiven Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen_____	95
3.8.3	Ergebnisse des PTHrP-Nachweises bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen_____	97
3.8.4	Ergebnisse des PTHrP-Nachweises bei Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma_____	98

3.9 Korrelation der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus	100
3.9.1 Korrelation der Ergebnisse von PTHrP mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom	100
3.9.2 Korrelation der Ergebnisse für PTHrP mit dem Östrogen- und Progesteronstatus der Patientinnen mit einem Rezidiv oder Zweitkarzinom der Mamma	101
3.10 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten	102
3.10.1 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten bei Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma	102
3.10.2 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten aller Patientinnen mit einem Mammakarzinom	102
3.10.3 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom unter Berücksichtigung des Tumorstadiums	103
3.10.3.1 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen	106
3.10.3.2 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen	108
3.10.3.3 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen	110
3.10.4 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma	111
3.11 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten	111
3.11.1 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten bei Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma	111

3.11.2	Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten aller Patientinnen mit einem Mammakarzinom	112
3.11.2.1	Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom unter Berücksichtigung des Tumorstadiums	113
3.11.2.2	Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen	115
3.11.2.3	Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen	117
3.11.2.4	Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen	118
3.11.3	Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma	119
3.12	Auswertung des Beobachtungszeitraumes	119
3.12.1	Betrachtung des Beobachtungszeitraums der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma	119
3.12.2	Betrachtung des Beobachtungszeitraums der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom	119
3.12.3	Betrachtung des Beobachtungszeitraums der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms und mit einem Zweitkarzinom der Mamma	123
4.	Diskussion	131
4.1	Immunzytologischer Nachweis von Tumorzellen mittels gegen CK 18 gerichteter Antikörper in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten	131
4.1.1	Bestimmung und Vergleich des Sensitivitätsniveaus der APAAP-Färbung in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten	132
4.2	Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut von Patientinnen mit Mammatumoren mittels gegen CK 18 gerichteter Antikörper	136
4.2.1	Immunzytologischer Nachweis disseminierter Tumorzellen in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des Knochenmarks und peripheren Blutes von Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma	136

4.2.2	Vergleich des immunzytologischen Nachweises disseminierter Tumorzellen in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des Knochenmarks und peripheren Blutes von Patientinnen mit einem Mammakarzinom_____	138
4.2.3	Bewertung der Ergebnisse des immunzytologischen Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut von Patientinnen mit einem Mammakarzinom_____	140
4.2.4	Immunzytologischer Nachweis disseminierter Tumorzellen in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des Knochenmarks und peripheren Blutes von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und dem Auftreten von Fernmetastasen und Rezidiven__	145
4.3	Molekularbiologischer Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut_____	148
4.3.1	Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut mit der PTHrP RT-PCR_____	149
4.3.2	Nachweis von PTHrP im Knochenmark und peripheren Blut und dem Auftreten von Fernmetastasen und Rezidiven_____	151
4.3.3	Nachweis von PTHrP in Mammakarzinomgeweben mit der RT-PCR und Vergleich der Ergebnisse im Knochenmark und Blut_____	152
4.4	Vergleich der Ergebnisse des immunzytologischen Nachweises für CK 18 und des molekularbiologischen Nachweises für PTHrP in Proben des Knochenmarks und peripheren Blutes_____	154
5.	Zusammenfassung_____	156
6.	Literaturverzeichnis_____	158

Tab. 2.1	22	Tab. 3.28	70
Tab. 2.2	22	Tab. 3.29	71
Tab. 2.3	24	Tab. 3.30	71
Tab. 2.4	25	Tab. 3.31	72
Tab. 2.5	25	Tab. 3.32	72
Tab. 2.6	26	Tab. 3.33	73
Tab. 2.7	32	Tab. 3.34	73
Tab. 2.8	32	Tab. 3.35	74
Tab. 2.9	41	Tab. 3.36	74
Tab. 2.10	42	Tab. 3.37	75
Tab. 3.1	48	Tab. 3.38	75
Tab. 3.2	49	Tab. 3.39	76
Tab. 3.3	50	Tab. 3.40	77
Tab. 3.4	51	Tab. 3.41	78
Tab. 3.5	53	Tab. 3.42	78
Tab. 3.6	55	Tab. 3.43	79
Tab. 3.7	56	Tab. 3.44	79
Tab. 3.8	57	Tab. 3.45	82
Tab. 3.9	57	Tab. 3.46	82
Tab. 3.10	59	Tab. 3.47	82
Tab. 3.11	59	Tab. 3.48	82
Tab. 3.12	60	Tab. 3.49	83
Tab. 3.13	61	Tab. 3.50	83
Tab. 3.14	61	Tab. 3.51	84
Tab. 3.15	62	Tab. 3.52	84
Tab. 3.16	63	Tab. 3.53	85
Tab. 3.17	63	Tab. 3.54	85
Tab. 3.18	64	Tab. 3.55	86
Tab. 3.19	64	Tab. 3.56	86
Tab. 3.20	65	Tab. 3.57	88
Tab. 3.21	65	Tab. 3.58	91
Tab. 3.22	66	Tab. 3.59	91
Tab. 3.23	66	Tab. 3.60	92
Tab. 3.24	67	Tab. 3.61	92
Tab. 3.25	67	Tab. 3.62	92
Tab. 3.26	69	Tab. 3.63	93
Tab. 3.27	69	Tab. 3.64	94

Tab. 3.65	94	Tab. 3.102	112
Tab. 3.66	95	Tab. 3.103	112
Tab. 3.67	95	Tab. 3.104	113
Tab. 3.68	95	Tab. 3.105	113
Tab. 3.69	96	Tab. 3.106	114
Tab. 3.70	96	Tab. 3.107	115
Tab. 3.71	97	Tab. 3.108	116
Tab. 3.72	97	Tab. 3.109	116
Tab. 3.73	97	Tab. 3.110	116
Tab. 3.74	98	Tab. 3.111	117
Tab. 3.75	98	Tab. 3.112	118
Tab. 3.76	98	Tab. 3.113	118
Tab. 3.77	99	Tab. 3.114	118
Tab. 3.78	99	Tab. 3.115	118
Tab. 3.79	99	Tab. 3.116	125
Tab. 3.80	101	Tab. 3.117	126
Tab. 3.81	101		
Tab. 3.82	101		
Tab. 3.83	101		
Tab. 3.84	102		
Tab. 3.85	102		
Tab. 3.86	103		
Tab. 3.87	103		
Tab. 3.88	105		
Tab. 3.89	106		
Tab. 3.90	107		
Tab. 3.91	107		
Tab. 3.92	108		
Tab. 3.93	108		
Tab. 3.94	109		
Tab. 3.95	109		
Tab. 3.96	109		
Tab. 3.97	110		
Tab. 3.98	110		
Tab. 3.99	110		
Tab. 3.100	111		
Tab. 3.101	111		

Diagramm 3.1	48
Diagramm 3.2	49
Diagramm 3.3	51
Diagramm 3.4	52
Diagramm 3.5	54
Diagramm 3.6	60
Diagramm 3.7	70
Diagramm 3.8	93
Diagramm 3.9	105
Diagramm 3.10	106
Diagramm 3.11	114
Diagramm 3.12	115
Abb. 2.1	35
Abb. 2.2	36
Abb. 3.1	58
Abb. 3.2	68
Abb. 3.3	88
Abb. 3.4	89

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AB-Serum	humanes Serum der Blutgruppe AB
ad	auf
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
Aqua bidestillata	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
cDNA	komplementäre DANN
CK 18	Zytokeratin 18
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCIS	duktales Carcinoma in situ
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dia.	Diagramm
DIG-UTP	Digoxigenin-markiertes Desoxyuridintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	Downstream
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	epitheliales Membranantigen
ER	Östrogenrezeptorstatus
FCS	Fetal Calve Serum Fötales Kälberserum
<i>g</i>	Gravidität / Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
H	Stunde
hrsg.	Herausgegeben
IgG	Immunglobulin G
Immunette	Gerät zur Herstellung von Sedimentationspräparaten mit 1x10 ⁶ Zellen
J	Jahre

kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
l	Liter
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
M	Molar
MCF-7	Mammakarzinomzelllinie (Michigan Cancer Foundation)
MDA-MB-231	Mammakarzinomzelllinie
mg	Milligramm
min.	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-MLV Reverse Transkriptase	Reverse Transkriptase des murinen Leukämievirus
mol	Mol
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
n.a.	nicht auswertbar
n.v.	nicht vorhanden
NBT	Nitroblau-tetrazoliumsaz
neg.	Negativ
nested RT-PCR	PCR eines PCR-Produktes, welches mit der RT-PCR gewonnen wurde
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphate buffered saline Phosphat-gepuffertes Salz
PCR	Polymerase Chain Reaction Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pos.	Positiv
PR	Progesteronrezeptorstatus
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-ähnliches Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription

RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natrium/Natrium-Citrat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	Tris buffered saline Tris gepuffertes Salz
TNM	Größe des Primärtumors Regionärer Lymphknotenstatus Fernmetastasenstatus
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TU	Tumorgewebe
U	Units (Einheiten)
U/ml	Umdrehungen pro Minute
us	Upstream
v.	Von
v/v	% Volumen in Volumen
vergl.	vergleiche
w/v	% Gewicht in Volumen
X-Phosphat	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
z.B.	zum Beispiel
Zytospin	Zytozentrifugationspräparat mit 1×10^5 Zellen

1. Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom stellt mit 23% aller malignen Erkrankungen den häufigsten bösartigen Tumor der Frau und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache dar. Mit einer Inzidenz von 70 bis 110/100000 pro Jahr bedeutet dies, dass jede 8. bis 10. Frau in der westlichen Welt an einem Mammakarzinom erkrankt, die kumulative Häufigkeit, dieses Schicksal zu erleiden, beläuft sich für Frauen in westlichen Ländern auf 5 bis 12%. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr, selten ist der Erkrankungsfall vor dem 2. Lebensjahrzehnt. Die Entartung der männlichen Brustdrüse gilt mit 0,5 bis 1% aller Mammakarzinome und einem Anteil von 0,2 bis 0,5% aller Karzinome bei Männern als Rarität. Das mittlere Manifestationsalter liegt bei Männern in der 6. bis 7. Lebensdekade, der Erkrankungsgipfel im 60. Lebensjahr und somit etwa 10 Jahre höher als bei Frauen (POSSINGER et al. 1999, HARRIS JR et al. 1997).

90% aller Mammakarzinompatientinnen weisen zum Zeitpunkt der primären operativen Therapie keine Fernmetastasen auf, jedoch erleiden 40 bis 50% dieser Patientinnen ein Rezidiv ihrer Erkrankung (MANSI et al. 1987, DIEL et al. 1992, TARIN 1986).

Die durch Brustkrebs verursachte Mortalität wird mit 40/100000 pro Jahr angegeben. Ein Drittel der Mortalität bei Mammakarzinompatientinnen tritt mehr als 5 Jahre nach der primären Therapie in Folge von Rezidiven und Metastasen auf (SALVADORI et al. 1990, SCHIRRMACHER 1985). Als Ursache dafür müssen Mikrometastasen angenommen werden, die zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Tumorleidens mit konventionellen Verfahren nicht erkannt werden können (MANSI et al. 1987). Aus diesem Grund muss das Mammakarzinom zunehmend als systemische Erkrankung und nicht als lokales Geschehen angesehen werden (JAUCH et al. 1995).

1.1.2 Tumoren der Mamma

1.1.2.1 Gutartige Tumoren und Erkrankungen der Mamma

Die gutartigen Erkrankungen der Brustdrüse werden in proliferative und nicht-proliferative unterteilt. Zu den nicht-proliferativen zählen Adenosis, Mikro- und Makrozysten, Duktectasien, Fibroadenome, Fibrosen, Mastitiden, apokrine oder squamöse Metaplasien und die milde Hyperplasie. Die andere Fraktion wird von der moderaten oder floriden Hyperplasie, dem Papillom mit fibrovaskulärem Kern und der atypischen duktaalen oder lobulären Hyperplasie gebildet (HARRIS JR et al. 1993).

Das Fibroadenom ist ein Misch tumor des Lobulus, der mit einer Proliferation epithelialer und mesenchymaler Lobulusanteile einhergeht. Es stellt den häufigsten gutartigen Tumor der Mamma dar und tritt in 10% der Fälle multipel und bevorzugt im 3. und 4. Lebensjahrzehnt auf. Der Tumor, dessen Pathogenese man auf eine hormonelle Dysregulation zurückführt, ist

histologisch einerseits von azinären und duktilären Proliferationen sowie von lobulären Mantelwucherungen andererseits geprägt. Man unterscheidet die peri- oder extrakanalikuläre Form, bei der das myxoide Mantelgewebe die gewucherten Drüsenanteile des Lobulus umscheidet, von dem intrakanalikulären Typ, bei dem das Mantelgewebe die Gangproliferate derart komprimiert, dass diese nur noch spaltähnliche Lumina aufweisen. Verkalkungen und Verknöcherungen können ebenfalls auftreten. Die morphologische Unterscheidung ist prognostisch ohne Relevanz. Fibroadenome können andere proliferative Läsionen aufweisen.

Das intraduktale Papillom zählt ebenfalls zu den benignen Tumoren, die von den Gangepithelien ausgehen, wobei sie entweder solitär in den größeren oder multipel in den kleineren und größeren Milchgängen auftreten. Die bäumchenartig papillär aufgebauten, gelegentlich drüsenartig differenzierten Tumoren bestehen immer aus einem luminal gelegenen Drüsenepithel und einer stromaseitig lokalisierten Myoepithelzone, was ein wesentliches Benignitätskriterium darstellt. Sklerosen und Hämorrhagien werden nicht selten beobachtet. Multiple Papillome neigen häufiger als solitäre zu maligner Entartung.

Das Mamillenadenom oder die subareoläre duktile Papillomatose ist ein seltener Tumor, der von den intramamillären Ductus lactiferi ausgeht und zu den Papillomen gezählt wird. Der Häufigkeitsgipfel liegt im Menopausenalter.

Die Mastopathie ist als Proliferation der hormonabhängigen, mesenchymalen und epithelialen Mammastrukturen definiert, die mit Zystenbildung (*Mastopathia fibrosa cystica*) und regressiven Veränderungen einhergehen und klinisch als Knotenbildung imponieren. Meist werden sie im oberen äußeren Quadranten der Brust diagnostiziert und haben einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr. Pathogenetisch wird ein chronischer Hyperöstrogenismus mit einer latenten Hyperprolaktinämie diskutiert. Abhängig vom Vorherrschen der mesenchymalen oder epithelialen Komponente werden folgende Mastopathieformen unterschieden:

Die nicht-proliferierende Mastopathie, auch *Mastopathia fibrosa simplex* oder Mastopathie Grad I genannt, macht 70% aller Mastopathien aus und zeigt eine Faservermehrung innerhalb der Lobuli und im Lappchenzwischengewebe, sowie zystisch und ektatisch umgewandelte Milchgänge. Die Duktulusepithelien weisen gleichzeitig Hypertrophie, Atrophie und Metaplasie auf.

Die proliferierende Mastopathie ohne Zellatypie oder auch Mastopathie Grad II wird in 20% der Mastopathiefälle diagnostiziert und besteht aus Azinus- und Milchgangsepithelproliferationen, wobei immer Epithelien und Myoepithelien anzutreffen sind. Mitosen, Nekrosen und Mikroverkalkungen treten nur selten in Erscheinung.

Die proliferierende Mastopathie mit Zellatypien oder Mastopathie Grad III ist mit 5% die am seltensten angetroffene Form und ist durch duktile und lobuläre Hyperplasie der Drüsenepithelien charakterisiert und weist Zell- und Kernatypien auf. Eine Unterscheidung

zum Carcinoma in situ ist solange möglich, wie sich Drüsenepithelien von Myoepithelien differenzieren lassen.

Die Adenosis mammae stellt eine bündelartige Proliferation kleiner Gangsegmente und Endstücke dar, die in unterschiedlichem Maße von einer Vermehrung des lobulären Mantelgewebes begleitet wird. Sie wird als 'sklerosierende Adenose' bezeichnet, wenn eine ausgeprägte Sklerosierung des Mantelgewebes angetroffen wird. (WITTEKIND und RIEDE 1993).

1.1.2.2 Einteilung der Mammakarzinome

Definitionsgemäß versteht man unter dem Sammelbegriff 'Mammakarzinom' diejenigen bösartigen Tumoren, welche von den Epithelien der Milchgänge (duktale Karzinome) oder der Drüsenendstücken (lobuläre Karzinome) ausgehen.

Die häufigste Lokalisation des Mammakarzinoms ist der äußere obere Quadrant der Brustdrüse mit 48%, sowie der Mamillenbereich (bis zu 1 cm von der Mamille entfernt) mit 17% und der obere innere Quadrant mit 15%. 11% treten im äußeren unteren, 6% im unteren inneren Quadranten auf und 3% werden wegen ihres multifokalen Ursprunges oder der Beteiligung der gesamten Brust als diffus bezeichnet (HARRIS et al. 1993). Es tritt meistens einseitig auf.

Die histologische Klassifikation invasiver Mammakarzinome erfolgt nach ROSEN und OBERMAN (1993) entsprechend der WHO-Klassifikation von 1992. Diesbezüglich werden nicht-invasive von invasiven Mammakarzinomen unterschieden. Das duktales und das lobuläre Carcinoma in situ bilden die Gruppe der nicht-invasiven Mammakarzinome, welche durch die Proliferation maligne entarteter Epithelzellen charakterisiert sind, die entsprechend in den Drüsengängen oder -läppchen wachsen. Sie durchbrechen die Basalmembran nicht und weisen somit keine Invasion in das Stroma auf. Das intraduktales Karzinom (duktales Carcinoma in situ, DCIS) macht 12 bis 15 % aller neu diagnostizierten Mammakarzinome und 70 bis 95% aller Carcinomata in situ aus. Es entspricht streng genommen einer Präkanzerose, die unbehandelt ein 30- bis 50%iges Risiko aufweist, innerhalb von 10 Jahren in ein invasiv-duktales Karzinom überzugehen (FRYKBERG und BLAND 1994). Aufgrund der Tatsache, dass bei manchen dieser Karzinome die im Inneren des Milchganges liegenden Zellen nekrotisch werden und sich an den Schnittflächen makroskopischer Präparate herausdrücken lassen, bezeichnet man sie als Komedokarzinome, die man von Nicht-Komedo-Karzinomen unterscheidet und die hinsichtlich ihrer Prognose ein aggressiveres Wachstum zeigen (HARRIS JR et al. 1997).

Das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS) macht isoliert 1 bis 6% aller Mammakarzinome und 30 bis 50% der diagnostizierten nicht-invasiven neoplastischen Läsionen der Brustdrüse aus.

In der Gruppe der invasiven Mammakarzinome werden diejenigen malignen Mammatumoren zusammen gefasst, welche ausgehend von ihrem Entstehungsort das umgebende

Organgewebe infiltrieren. Das invasiv duktales Karzinom stellt mit 65 bis 80% die am häufigsten diagnostizierte Form des Mammakarzinoms dar und ist definiert als ein Tumor, der histologisch keiner anderen Kategorie zuzuordnen ist, deshalb auch als "not otherwise specified (NOS)" bezeichnet wird. Einer früheren Einteilung zufolge wurden Karzinome mit einem ausgewogenen Tumor-Stroma-Verhältnis als Carcinoma solidum simplex, solche mit überwiegender Stromabildung als szirrhöse Karzinome bezeichnet. Metastasen dieses Tumortyps siedeln sich vermehrt in dem Parenchym der Leber ab (HARRIS M et al. 1984).

Mit einer Inzidenz von 6 bis 15% steht das invasive lobuläre Karzinom an zweiter Stelle der invasiven Mammakarzinome. Verglichen mit dem duktalem Karzinom weist das lobuläre einen größeren Anteil multizentrischer Tumore in derselben oder der kontralateralen Brust auf. Histologisch lassen sich solide, alveoläre, siegelringzellige, tubulo-tubuläre und pleomorphe Varianten sowie Mischtypen vom klassischen Erscheinungsbild unterscheiden, die sich hinsichtlich der Prognose unterschiedlich verhalten. Die Prädilektionsstellen der Metastasen dieser Tumore sind nach HARRIS M et al. (1984) meningeale sowie seröse Oberflächen und verglichen mit den duktalem Karzinomen finden sich bei diesem histologischen Typ häufiger ossäre Metastasen.

Weitere invasive Mammakarzinome mit einer insgesamt besseren Prognose verglichen mit den oben genannten Formen und einer niedrigeren Auftretensrate sind das medulläre und das muzinöse (jeweils ca. 3%), das tubuläre (1 bis 15%) und das papilläre Karzinom (1 bis 7%). Seltener Karzinomformen, wie z.B. das adenoid-zystische, das sekretorische (juvenile) und das apokrine Karzinom, werden in weniger als 1% der Mammakarzinome beobachtet.

Der Morbus Paget der Mamille, der ca. 1% der Brustkrebse ausmacht, ist eine chronisch-ekzematöse erscheinende neoplastische Veränderung mit nässender, schuppender Rötung oder Blutung, die meist einseitig auftritt und sich auf die Haut der Mamille und der Areola beschränkt. Zurückgeführt wird der Tumor auf sekundär in die Epidermis eingedrungene Paget-Zellen, die meist aus einem retromamillär gelegenen duktalem Karzinom stammen, das in der Mehrzahl der Fälle einen in-situ-Status aufweist und bei 50 bis 75% der betroffenen Patientinnen nachgewiesen werden kann. Die Prognose ist von der Histologie des zugrunde liegenden Tumors abhängig. Entgegen dieser Theorie gehen manche Autoren von einer primären Entartung der ortsständigen Epidermiszellen aus (HARRIS JR et al. 1993).

Das inflammatorische Karzinom imponiert klinisch als prominentes Hautödem mit Rubor und Calor sowie starker Induration des darunter liegenden Gewebes, wobei in der Regel kein zugrunde liegender Tumor gefunden wird. Histologisch stellt sich eine Infiltration der dermalen Lymphbahnen mit Karzinomzellen dar, die in der Mehrzahl der Fälle von gering differenzierten invasiv-duktalem Karzinomen stammen. Trotz der scheinbaren lokalen Begrenztheit weist es mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 5% die schlechteste Prognose der Mammakarzinome auf.

Das Mammakarzinom des Mannes stellt mit einem Anteil von 0,5 bis 1% ebenfalls eine seltene Form dieses malignen Tumors dar. Der Erkrankungsgipfel liegt im 6. bis 7. Lebensjahrzehnt, kann aber wie bei den Frauen prinzipiell jede Altersklasse betreffen. Hinsichtlich der histologischen Klassifikation und den Häufigkeiten der verschiedenen Karzinomtypen, der Ätiologie, der nicht geschlechtsgebundenen Risikofaktoren und der Prognose gibt es keine wesentlichen Unterschiede zu der weiblichen Erscheinungsform. Erwähnenswert ist das erhöhte Karzinomrisiko bei dem Vorliegen von Erkrankungen, die mit einem Hyperöstrogenismus einhergehen (HARRIS JR et al. 1997), die besondere Bedeutung der BRCA2-Genmutationen im Zusammenhang mit einer positiven Familienanamnese (THORLACIUS et al. 1995, COUCH et al. 1996) sowie die seltene Beobachtung lobulär-invasiver Karzinome und das scheinbare Fehlen lobulärer in-situ-Karzinome.

1.1.3 Stadieneinteilung (Staging)

Das Staging dient der Einteilung der Patientinnen in Gruppen mit den Stadien 0 bis IV entsprechend dem Ausmaß ihrer Erkrankung und ist von Nutzen, um die individuelle Therapie der Betroffenen festzulegen, ihre Prognose abzuschätzen und die Ergebnisse verschiedener Therapieansätze vergleichen zu können. Das klinische Staging stützt sich initial auf die Ergebnisse der körperlichen Untersuchung, der bildgebenden Verfahren und operativen Befunde. Die nachfolgende pathologische Stadieneinteilung setzt sich aus den Daten des klinischen Stagings, sowie der histopathologischen Untersuchung des Primärtumors und der Lymphknoten zusammen. Die derzeit gebräuchlichsten Systeme zur Stadieneinteilung sind die der UICC (International Union Against Cancer) und die der AJCC (American Joint Committee on Cancer) von 1997 (Sobin und Fleming 1997), die sich beide auf das 'tumor-nodes-metastases' (TNM) System gründen. 'T' gibt die Tumorgröße und 'N' die Anzahl der befallenen Lymphknoten an. Durch Hinzufügen der Ziffern 0 bis 4 wird eine Differenzierung bezüglich des Ausmaßes der Tumorgröße und der Ziffern 0 bis 3 bezüglich des Lymphknotenbefalls vorgenommen. 'M' bezieht sich auf das Vorhandensein von Fernmetastasen, gekennzeichnet durch das Anhängen einer 0 oder einer 1. Zur Kenntlichmachung des klinischen Staging werden die Buchstaben mit einem vorangestellten 'c', die des pathologischen mit einem 'p' versehen. Der Buchstabe X wird der entsprechenden Kategorie T, N oder M bei Vorliegen einer nicht beurteilbaren Situation zugeordnet (FUNKE et al. 1997).

1.1.4 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms richtet sich individuell nach dem Stadium des Tumors basierend auf der TNM-Klassifikation. Genutzt werden operative, strahlentherapeutische und systemische Verfahren sowie Kombinationen dieser Entitäten. Zu den systemischen Therapien zählen die Chemo- und Hormontherapie.

1.1.5 Prognostische Faktoren des Mammakarzinoms

Ein prognostischer Faktor ist definiert als ein biologisches oder klinisches Maß, welches ohne Anwendung adjuvanter systemischer Therapien mit dem krankheitsfreien Intervall oder der gesamten Überlebensrate assoziiert ist (HARRIS JR et al. 1997).

Bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom ist die Bestimmung von Prognosefaktoren zur prospektiven Abschätzung des individuellen Krankheitsverlaufes sowie zur Auswahl der geeignetsten Therapieform von Bedeutung. Als etablierte Prognosefaktoren des primären Mammakarzinoms gelten derzeit die im Rahmen der TNM-Klassifikation erhobenen Parameter, das Grading, der histologische Typ des Tumors und der Steroidhormonrezeptorstatus. Als aussagekräftigster Prädiktor für Rezidiv und Überleben wird der axilläre Lymphknotenstatus gehandelt, wobei der Anzahl der befallenen untersuchten Lymphknoten eine wesentliche Bedeutung zukommt. Bei Patientinnen mit einem nodal negativen Mammakarzinom tritt die Tumorgöße an diese Stelle. Bei einer Rezidivrate von ca. 30% der nodal negativen Mammakarzinompatientinnen und damit verbundener Therapienotwendigkeit wird die Dringlichkeit eines signifikanten Parameters zur Beurteilung der Invasions- und Metastasierungsfähigkeit des nodal negativen Mammakarzinoms deutlich (HARRIS JR et al. 1997, BROCKMANN und REITZIG 1994). Neben den etablierten Prognosefaktoren werden bis zum jetzigen Zeitpunkt mehr als 100 potentielle neue Prognosefaktoren diskutiert, die auf morphologischen, biochemischen, zellkinetischen und genetischen Aspekten beruhen. Fakultativ wird der immunzytologische Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark in die TNM-Klassifikation mit einbezogen.

Als prognostischer Faktor für das Überleben im metastasierten Stadium kommt nach wie vor dem rezidivfreien Intervall ein signifikanter Stellenwert zu (CUTLER 1974, ESCHER und KAUFMANN 1963). In diesem Zusammenhang korreliert ein langes rezidivfreies Intervall direkt mit einer besseren Prognose (MALAISE et al. 1974). BROCKMANN et al. (1994) beschreiben hinsichtlich einer genaueren Abschätzung des rezidivfreien Intervalls die Anzahl der befallenen Organsysteme sowie des Metastasierungstyps als aussagekräftig. Bezüglich des Metastasierungstyps werden Knochen- und Weichteilmetastasen als prognostisch günstiger eingeschätzt als die viszerale Lungen- und Lebermanifestationen. Einschränkend wird von den Autoren darauf hingewiesen, dass der Rezeptorstatus des Tumors einen wesentlichen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben aufgrund zusätzlicher Therapieoptionen bei steroidhormonrezeptorpositiven Tumoren nimmt.

1.1.6 Diagnostik des Mammakarzinoms

Die Verdachtsdiagnose des Mammakarzinoms wird primär durch die Anamnese und die körperliche Untersuchung gestellt. Die weitere Diagnostik stützt sich auf bildgebende Verfahren, wobei hier in erster Linie die Mammographie, die Sonographie und bei speziellen

Indikationen die Kernspintomographie eine Rolle spielen. Die Gewinnung histologischer Präparate zur Diagnosesicherung erfolgt mittels Feinnadel- oder Stanzbiopsien unter Kontrolle der erwähnten bildgebenden Verfahren oder durch eine diagnostische Exstirpationsbiopsie.

Im Falle eines gesicherten Mammakarzinoms ist im Rahmen der Stadieneinteilung der Ausschluss von Fernmetastasen von Interesse. Diesbezüglich werden zur Erkennung von viszeralen Metastasen konventionelle Röntgenaufnahmen des Thorax und die Sonographie der Leber oder die Computertomographie des Abdomens, als Screening für Knochenmetastasen die Skelettszintigraphie eingesetzt (POSSINGER et al. 1999).

Nicht in die Standarddiagnostik zur Metastasensuche miteinbezogen sind die Knochenmarkhistologie und -zytologie, die Molekularbiologie und Immunzytologie (FUNKE et al. 1997).

1.1.6.1 Bildgebende Verfahren zum Nachweis ossärer Metastasen

Das Skelettsystem stellt in Abhängigkeit vom Tumorstadium und Rezeptorstatus den häufigsten Manifestationsort hämatogener Metastasen der Mammakarzinome dar. Im Rahmen regelmäßiger Nachsorgeuntersuchungen ist bei ca. 70% der Patientinnen der Fernmetastasennachweis auf ein Organsystem beschränkt, wobei hier 50% bis 70% auf ossäre (COLEMAN et RUBENS 1987), 15% auf pulmonale und nur etwa 5% auf hepatische Metastasen entfallen (POSSINGER et al. 1999).

Mammakarzinome verursachen sowohl osteoklastische als auch osteoblastische Knochenmetastasen. Zum Nachweis ossärer Läsionen dient die Skelettszintigraphie, in welcher Zonen vermehrter bzw. reduzierter Aktivitätsanreicherung nach i.v. verabreichtem ^{99m}Tc-markiertem Zinndiphosphonat zur Darstellung gelangen. Da die Intensität des Radionuklideinbaus in Knochenmetastasen sowohl vom Metastasierungstyp wie auch von der Wachstumspotenz des zugrunde liegenden Tumors abhängig ist, können sich osteolytische (osteoklastische) Metastasen insbesondere bei Fehlen eines hyperreaktiven Randsaumes dem szintigraphischen Nachweis entziehen. Bei Mammakarzinometastasen des Knochens beträgt der Anteil stummer Läsionen bis zu 15% (MAAS 1998).

Die Skelettszintigraphie besitzt eine hohe Sensitivität zur Aufspürung ossärer Läsionen, es mangelt jedoch an der Spezifität des Verfahrens, so dass erhobene pathologische Befunde durch konventionelle Röntgenuntersuchungen abgeklärt werden sollten. Knochenmetastasen lassen sich auf dem Summationsbild z.B. der Wirbelsäule erst ab einer Größe von 1,5 cm nachweisen (MAAS 1998). Die Computer- und Kernspintomographie erhöhen die Sensitivität zur Erfassung ossärer Metastasen, sind in der Praktikabilität und Wirtschaftlichkeit des klinischen Alltags jedoch nicht anwendbar. Insgesamt betrachtet sind die derzeit gebräuchlichen bildgebenden Verfahren weder sensitiv noch spezifisch genug, ossäre Läsionen in der Frühphase zu erkennen, da diese erst ab einer bestimmten Größe erfasst

werden können und die Dignität eines beschriebenen Herdes radiomorphologisch nicht festzulegen ist.

1.1.7 Metastasierung

Unter Metastasierung versteht man die Verschleppung maligner Zellen eines Primärtumors und ihr An- und Weiterwachsen in entfernten Körperregionen. Ebenso wie infiltratives und destruierendes Wachstum ist auch die Metastasierungsfähigkeit eines Tumors als eindeutiges Malignitätskriterium zu werten (TARIN 1986, FROST und LEVIN 1992).

Metastasierung kann direkt als Zellabsiedlung über präformierte Hohlräume auf seröse und muköse Oberflächen erfolgen oder in Form von lymphatischer und hämatogener Metastasierung (FIDLER 1978). Die hämatogene Metastasierung beschreibt die Absiedlung von Tumorzellen über die Blutbahn, die lymphatische begründet sich auf der unmittelbaren Tumorausbreitung in die benachbarten Lymphgefäße, welche aufgrund der fehlenden Basalmembran kein Invasionshindernis für die Tumorzellen darstellen. Sie hängt mehr von der Lage des Primärtumors und seinen Lymphabflusswegen als von seinem Ursprungsgewebe ab (FIDLER 1997, CARR 1983). Dieser Prozess kann als sogenannte Lymphangiosis carcinomatosa erfolgen, bei der die Krebszellen entlang der Lymphgefäße proliferieren und diese verstopfen, oder als lymphonoduläre Metastasierung. Im letzteren Fall werden die Tumorzellen zu nahegelegenen sowie entfernteren Lymphknoten verschleppt, deren Kapsel sie nach expansivem Wachstum durchbrechen und auf diese Weise in andere Gewebe und auch in Blutgefäße gelangen können (FIDLER 1997, PAGET 1889, CARR 1983). Die Beobachtung, dass Tumorzellen das lymphatische System sowohl direkt befallen als auch über Blutgefäße Zugang zu diesem erlangen können und befähigt sind, zwischen beiden Systemen hin- und her zu wandern, weist auf eine venolymphatische Kommunikation hin, aufgrund derer die beiden Wege streng genommen nicht zu trennen sind (FIDLER 1978, FISHER und FISHER 1966, ZEIDMAN 1961).

Zur Erklärung des metastatischen Vorgangs und des zu beobachtenden Organtropismus sind im Verlauf von Jahrzehnten mehrere Theorien erstellt worden, welche initial widersprüchlich erscheinen, sich jedoch ergänzen. PAGET (1889) leitete aus seinen Beobachtungen die "seed and soil-Theorie" ab, welche besagt, dass disseminierte Zellen eines Primärtumors (seed) nur dann zu Metastasen heranwachsen können, wenn das Gewebe oder Organ (soil) das benötigte Wachstumsmilieu zur Verfügung stellen kann. EWING (1928) postulierte hingegen die These, dass die organspezifische Metastasierung auf rein mechanischen Vorgängen beruhe, die sich auf der anatomischen Lage des Primarius sowie hämodynamischer Faktoren begründe. SUGARBAKER (1981) schlussfolgerte, dass die mechanische Theorie von EWING (1928) Phänomene in einer frühen Phase der regionalen Metastasierung in die abführenden venösen und lymphatischen Gefäße erklären könne, während PAGETs These von 1889 eher auf Phänomene des

Krankheitsprogresses späterer Tumorstadien mit dem Auftreten tumorspezifischer Fernmetastasen zutreffen (SUGARBAKER 1979, SUGARBAKER 1981).

Nach der Kaskadentheorie, welche von BROSS und BLUMENSON 1976 beschrieben wurde, ist der Metastasierungsprozess als ein sequenzieller Vorgang zu betrachten, bei welchem die Zellen des Primärtumors in für den Tumor spezifische 'Schlüsselorgane' wie die Leber oder die Lunge gelangen, in denen sie zu Metastasen heranwachsen und modifiziert werden. Durch die Absiedlung dieser modifizierten Zellen über das nachfolgende Gefäßsystem erfolgt die Generalisation der Tumorerkrankung durch sekundäre Metastasen (SCHIRRMACHER 1985, WEISS 1985, FROST und LEVIN 1992).

Auf dem Boden dieser Theorien und fortschreitender wissenschaftlicher Erkenntnisse wird die Metastasierung heute als ein selektiver, stochastischer und sequentieller Vorgang betrachtet (POSTE und FIDLER 1980, PRICE 1990). Die einzelnen Schritte sind eng miteinander verknüpft und jeder ist für die Entstehung einer Metastase essentiell: die lokale Infiltration und Destruktion, Penetration der Blut- und Lymphgefäße, Dissemination, Embolusbildung und Arretierung durch Adhäsion der Emboli in den Kapillargebieten entfernter Organe gefolgt von der Zellinvasion in die Gefäßwand als Grundlage für die Extravasation in das angrenzende Gewebe. Dort erfolgt die Zellvermehrung und die Neovaskularisation mit konsekutivem Anwachsen zu einem neuen Tumor, der Metastase (FIDLER 1978, POSTE und FIDLER 1980, MCMILLAN 1989, HART et al. 1989, FIDLER 1997). Jeder einzelne Schritt muss von der disseminierten Tumorzelle überlebt werden, damit am Ende eine makroskopische, klinisch apparente Metastase heranwachsen kann (FIDLER 1978, FIDLER 1990, POSTE und FIDLER 1980). Dazu bedarf es ausgeprägter Interaktionen zwischen den Homöostasemechanismen, dem Gerinnungssystem und der Immunabwehr des Wirtsorganismus und der Tumorzelle, die zu diesem Zweck mit bestimmten biochemischen und molekularen Elementen wie z.B. Enzymen und Oberflächenproteinen in den entsprechenden Phasen des Metastasierungsprozesses ausgestattet sein muss (FIDLER 1978, FIDLER 1990, PRICE 1990, FIDLER 1995, FIDLER 1997).

1.1.7.1 Tumorzell dissemination, Mikrometastasen und ihre klinische Bedeutung

Die Metastasierung stellt einen kontinuierlichen Prozess dar, von welchem angenommen wird, dass er bereits mit Beginn des Wachstums des Primärtumors stattfindet. Die Tumorzell dissemination beschreibt diesbezüglich sämtliche Vorgänge des Metastasierungsprozesses, welche sich innerhalb der Gefäße abspielen. Nach dem Einbruch eines Tumorfragmentes in ein Gefäß werden die Tumorzellen einzeln oder in Gruppen passiv mit dem Blut- bzw. Lymphstrom in die terminalen Strombahnen entlegener Organe und Gewebe transportiert oder verbleiben an ihrem Invasionsort und proliferieren

dort. Dies gilt auch für Tumoren, die nicht zur Metastasenbildung befähigt sind (FIDLER 1978).

FIDLER et al. konnten 1978 anhand einer Melanomzelllinie im Tierversuch demonstrieren, dass die Zellen des Primärtumors und folglich die disseminierten Tumorzellen bezüglich der Aggressivität ihres Wachstumsverhaltens, ihrer Invasions- und Metastasierungsfähigkeit eine deutliche Heterogenität aufweisen. Verbände von Tumorzellen bzw. Tumorzellemboli haben daher höhere Chancen zu überleben, zu embolisieren und zu Metastasen heranzureifen als einzeln disseminierte Zellen (GLAVES 1983), insbesondere wenn sie Aggregate mit Blutzellen und Plasmabestandteilen des Wirtes bilden (LIOTTA et al. 1974, FIDLER 1978).

An die Tumorzeldissemination schließt sich die Extravasation, also der Austritt der Tumorzelle aus der Gefäßstrombahn und die Absiedlung in das angrenzende Gewebe an. Befindet sich eine solche Tumorzelle oder Tumorzellgruppe mit klonogenem Potential sowie der Fähigkeit zur Neovaskularisation und damit zur Metastasenbildung im nicht-vaskularisierten Zustand im Extrazellularraum, wird sie als Mikrometastase bezeichnet. Diese Zellen können in diesem Zustand absterben oder über lange Zeit in einem ruhenden Zustand ('dormancy', 'dormant state') überleben (WEISS 1985). "Dormancy" ist definiert als ein Zustand, in welchem Tumorzellen in einem klinisch unauffälligen Patienten für lange Zeit unter Wachstumsrestriktion verharren, in dem die Zellpopulation keine oder nur minimale Größenveränderungen erfährt (WHEELLOCK et al. 1981). Die Mechanismen, welche es ermöglichen, dass Tumorzellen über lange Zeiträume hinweg in einem solchen Status verbleiben und ihre malignen Eigenschaften erst zu einem späteren Zeitpunkt entfalten, sind noch nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit ist, dass Zellen einzeln oder als Zellcluster in der G₀-Phase des Zellzyklus verharren und entweder durch Implantation oder isoliert durch eine bindegewebige Kapsel vor der immunologischen Abwehr geschützt sind (MELTZER 1990). Eine andere Theorie ist, dass die Zellen weiterhin einem regulären Zellzyklus unterliegen, wobei sich die Apoptose- und Proliferationsrate im Gleichgewicht befinden und sich dadurch die Größe des Tumors nicht ändert (HOLMGREN et al. 1995, MELTZER 1990, DEMICHELI et al. 1994, FIDLER 1997). Ursächlich hierfür könnte eine mangelnde Vaskularisation oder Neoangiogenese sein (O'REILLY et al. 1996), ebenso wie eine T-Lymphozyten- und Makrophagen-vermittelte Immunität des Wirtes (WHEELLOCK et al. 1982, KHAZAIE et al. 1994).

Der Tatsache, dass nicht jede Tumorzelle, die im Blutkreislauf zirkuliert, die Potenz zur Metastasenbildung besitzt, wird mit dem Begriff der metastatischen Insuffizienz Rechnung getragen (WEISS 1980, WEISS 1990, SCHIRRMACHER 1985). LIOTTA et al. konnten 1974 bereits im Tiermodell zeigen, dass weniger als 1% von Millionen disseminierter Tumorzellen zu lebensfähigen Metastasen heranwachsen, der größte Teil dieser Zellen dagegen stirbt. Ähnliche Ergebnisse konnte GLAVES 1983 demonstrieren und TARIN et al. 1984 anhand autoptischer Daten von Patienten mit peritovenösen Shunts bei malignem Aszites

wiederfinden. Die direkte Infusion vitaler maligner Zellen mit dem Aszites in das venöse System führte zu keiner erkennbar signifikanten Metastasierung. In einigen Fällen wurden bei der Autopsie maligne Zellen gefunden, welche in den Kapillarbetten und dem Gewebe verschiedener Organe arretiert waren, ohne dort zu größeren Läsionen heranzuwachsen.

Bei der Primärdiagnose eines Mammakarzinoms kann in den meisten Fällen durch die chirurgische Therapie eine Tumorfreiheit erreicht werden, wobei bei 40 bis 50% der Patientinnen von einer systemischen Tumorzeldissemination ausgegangen werden muss und ca. 50% der Betroffenen ein Rezidiv erleiden (DIEL et al. 1992). Ein Drittel der Mortalität von Mammakarzinompatientinnen tritt mehr als 5 Jahre nach der Primärtherapie in Folge von Rezidiven und Fernmetastasen auf, die man auf eine frühe Tumorzeldissemination mit der konsekutiven Bildung klinisch inapparenter Mikrometastasen zurückführen muss. Da sich das Mammakarzinom durch diese lange Latenz zwischen initialer Tumorzeldissemination und dem Auftritt von Metastasen und Rezidiven sowie durch eine ausgeprägte Heterogenität in der Zeitspanne der Latenzphase auszeichnet, kommt der Detektion von Mikrometastasen eine besondere Bedeutung zu.

1.1.8 Nachweis disseminierter Tumorzellen

Zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen und Mikrometastasen stellt das Knochenmark das Organ der Wahl dar, da es einfach zu erreichen ist und der Knochen mit bis zu 80% den häufigsten Ort der Metastasierung bei Mammakarzinompatientinnen darstellt. Die einheitlich sinusoidale Gefäßstruktur des Knochenmarks könnte als eine Art Filter zur Anreicherung weniger gestreuter maligner Zellen fungieren, deren Nachweis sich im peripheren Blut als schwieriger erweist (COTE et al. 1991, DIEL et al. 1990, DIEL et al. 1992).

Erste Nachweise von Tumorzellen und Tumorzellverbänden wurden lichtmikroskopisch an Ausstrichen von Knochenmark anhand zytologischer und histologischer Kriterien 1935 durchgeführt (REICH 1935).

Die konventionelle histologische Knochenmarksuntersuchung erweist sich zur Detektion weniger knochenmarksfremder Zellen als ineffektiv, da mit dieser Methode nur in wenigen Fällen Tumorzellen und Mikrometastasen nachgewiesen werden können (SCHLIMOK et al. 1987, PORRO et al. 1988, COTE et al. 1988, COTE et al. 1991, DIEL et al. 1992). Sensitivere und spezifischere Nachweisverfahren disseminierter Tumorzellen stellen die Immunzytochemie und die Polymerasekettenreaktion (PCR) dar.

Unterschiedliche Arbeitsgruppen konnten für verschiedene Primärtumoren einen signifikanten Zusammenhang zwischen immunzytologisch nachgewiesenen Tumorzellen im Knochenmark und einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines lokoregionären Rezidivs und dem Auftritt von Fernmetastasen sowie einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit beobachten (MANSI et al. 1987, BERGER et al. 1988, COTE et al. 1991, DEARNALEY et al.

1991, SCHLIMOK et al. 1991, DIEI et al. 1992, PANTEL et al. 1993b, HARBECK et al. 1994, WOLLENBERG et al. 1994, PANTEL et al. 1994). MANSI et al. 1987, DIEI et al. (1992), DEARNALEY et al. (1991) und HARBECK et al. (1994) beobachteten ein vornehmliches Auftreten von Knochenmetastasen aber auch vermehrt von viszeralen Metastasen bei Mammakarzinompatientinnen mit einem positiven Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark, wobei viszerale Metastasen sowohl bei Patientinnen mit und ohne Knochenmarksinfiltration zu finden waren. Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ist somit als Kriterium für die Malignität hinsichtlich der Metastasierungsfähigkeit des zugrunde liegenden Tumors zu interpretieren (SCHLIMOK et al. 1991). Dem Knochenmark kommt hierbei eine Fenster- bzw. Reservoirfunktion des zirkulierenden Blutes bezüglich disseminierter Tumorzellen zu, da der Ort der Rezidiventwicklung von der Affinität der Tumorzellen zu verschiedenen Organsystemen vorgegeben ist und das Knochenmark für Zellen epithelialer Herkunft in der Mehrzahl der Fälle kein optimales Mikroklima zur Verfügung stellt (PANTEL et al. 1993a, WOLLENBERG et al. 1994, JAUCH et al. 1995).

1.1.8.1 Immunzytochemischer Nachweis von disseminierten Tumorzellen und seine klinische Bedeutung im Zusammenhang mit Mammakarzinomen

Mit der Entwicklung der Immunzytochemie ist eine deutlich höhere Nachweisrate und sicherere Identifizierung von einzelnen Tumorzellen in Lymphknoten, im Knochenmark, peripheren Blut und anderen Organen zur frühen Erkennung einer Tumorzell dissemination und Mikrometastasierung möglich geworden. Die Verwendung mono- und polyklonaler Antikörper, welche gegen spezifische Oberflächenantigene der zu markierenden Zellen gerichtet sind, bilden die Grundlage immunzytologischer Nachweisverfahren (TO et al. 1981, DEARNALEY et al. 1981, DEARNALEY et al. 1983, MANSI et al. 1987, SCHLIMOK et al. 1987, COTE 1988, PORRO et al. 1988).

Zur Kenntlichmachung der immunologisch markierten Zellen werden unter anderem enzymatische Methoden wie die Alkalische-Phosphatase-Anti-alkalische-Phosphatase-Reaktion (APAAP) eingesetzt, bei welcher an den primären gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten Antikörper ein Brückenantikörper gebunden wird, der eine Kopplung des primären Antikörpers an den APAAP-Komplex ermöglicht. Letzterer besteht aus einem Antikörper (Anti-Alkalische Phosphatase), welcher ein Enzym, die alkalische Phosphatase, bindet. Durch Zugabe eines Färbereagenzes (z.B. Fast Red) wird durch die alkalische Phosphatase ein Farbstoff katalysiert, welcher die immunologisch markierten Zellen lichtmikroskopisch sichtbar macht. Die APAAP-Technik wurde aus der Peroxidase-Anti-Peroxidase-Technik (PAP) entwickelt, die eine immunoalkalische Phosphatase anstelle einer Immunoperoxidase verwendete. Die APAAP-Methode hat gegenüber der Peroxidase-Anti-Peroxidase-Technik (PAP) den Vorteil, dass Reaktionen des Farbstoffes mit der endogenen

enzymatischen Aktivität der hämatopoetischen Knochenmarkszellen wie z.B. der Peroxidase von Leukozyten vermieden wird (TAHA et al. 1989, CORDELL et al. 1984, FALINI et al. 1984, PANTEL et al. 1994). Als weitere Verbesserung der Detektionsrate gilt das Anfertigen von Präparaten mononukleärer Zellen (z.B. Zytospins) gewonnen aus Proben von Knochenmark und peripherem Blut durch die Zentrifugation über einen Dichtegradienten (z.B. FICOLL[®]) gegenüber der Anfärbung von nativen Knochenmarksausstrichen (TAHA et al. 1989, PANTEL et al. 1994).

Die gebräuchlichsten immunhistologischen Färbungen zur Detektion okkultur Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen werden mit monoklonalen Antikörper gegen Glykoproteine der Zelloberfläche und Zytokeratine durchgeführt (PORRO et al. 1988, DATTA et al. 1994, DIEL et al. 1992, HARBECK et al. 1994). Der anfänglich eingeführte Antikörper gegen das epitheliale Membranantigen (EMA) zeigte gelegentliche Anfärbung von Plasmazellen, frühen myeloischen und degenerierten Zellen, welche auf eine schwache Expression dieser Membrankomponente oder ein gemeinsames Epitop des Antigens bei diesen nicht-epithelialen Zellen zurückzuführen ist (BERGER et al. 1988, TAHA et al. 1989, DEARNALEY et al. 1991). Antikörper gegen Zytokeratine haben sich zum Nachweis weniger disseminierter Tumorzellen bewährt, da sie keine Kreuzreaktivität mit den Knochenmarkszellen zeigen und aufgrund ihres hohen Anteils im Zytoplasma zu einer deutlichen Markierung der Zellen beitragen (SCHLIMOK et al. 1987, SCHLIMOK et al. 1991, TAHA et al. 1989).

Der Nachweis von Zytokeratinen als Marker für Zellen epithelialen Ursprungs in einem mesenchymalen Netzwerk wie dem Knochenmark oder Blut basiert auf der Überlegung, dass letztere keine Zytokeratine exprimieren (DIEL et al. 1990, WOLLENBERG et al. 1994). Der Nachweis epithelialer Zellen bei Karzinompatienten gilt daher als Hinweis auf disseminierte Tumorzellen. Die Sensitivität dieser Methode wird unterschiedlich angegeben und reicht von 1 Tumorzelle in 1×10^4 bis 2×10^5 normalen Knochenmarkszellen (PORRO et al. 1988, TAHA et al. 1989, DATTA et al. 1994, SCHLIMOK et al. 1991, PANTEL 1993b). Nach Extrapolieren von Verdünnungsreihenergebnissen soll diese Methode eine Sensitivität von einer Tumorzelle in 10^6 normalen Knochenmarkszellen erreichen (OSBORNE et al. 1991).

Die Korrelation des immunologischen Nachweises disseminierter Tumorzellen mit etablierten Prognosefaktoren in verschiedenen Kollektiven von Mammakarzinompatientinnen erbrachte bislang keine einheitlichen Ergebnisse. MANSI et al. (1987), COTE et al. (1991), DIEL et al. (1992) und Funke et al. (1996) fanden eine signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis von Tumorzellen und dem Tumorstadium, dem Nodalstatus und dem histopathologischen Grading. MANSI et al. (1987) und BERGER et al. (1988) konnte einen Zusammenhang zwischen der Tumorgroße (DIEL et al. 1992), der peritumorale Invasion von Blut- und/oder Lymphgefäßen und dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark demonstrieren, der in

den Untersuchungen von COTE et al. 1988 nicht erkennbar war. Eine gute Korrelation zwischen einem positiven immunologischen Nachweis und dem Progesteronstatus konnten DIEL et al. 1992 feststellen. Eine Korrelation zwischen disseminierten Tumorzellen und dem Östrogenstatus gelang nicht (MANSI et al. 1987, DIEL et al. 1992), einen fraglichen Zusammenhang beschrieben BERGER et al. 1988. HARBECK et al. (1994) beobachteten hingegen keine Zusammenhänge zwischen etablierten Prognosefaktoren und einer Tumorzell-detektion im Knochenmark. In dieser Arbeitsgruppe korrelierten lediglich in dem Kollektiv nodal-negativer Patientinnen die etablierten Prognosefaktoren sowie der histologische Tumortyp mit dem Nachweis disseminierter Tumorzellen, wobei gezeigt werden konnte, dass ein Tumorzellnachweis mit einer schlechteren Prognose einherging (HARBECK et al. 1994). Einige Autoren beschrieben den Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark als unabhängigen prognostischen Faktor bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom (COTE et al. 1991, DIEL et al. 1992, PANTEL et al. 1993a, HARBECK et al. 1994), andere bestätigten diese Bedeutung des Markers nicht (MANSI et al. 1987).

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Karzinompatienten könnte nach Auffassung verschiedener Autoren zur besseren Zuordnung einzelner Patienten zu prognostischen Gruppen und folglich der Zuführung differenzierterer Therapieregime dienen (MANSI et al. 1987, DEARNALEY 1991, DIEL et al. 1990, COTE et al. 1991) oder als Monitoring des zytotoxischen Effekts adjuvanter Therapien bei Patienten mit minimalen Residuen epithelialer Tumoren dienen (PANTEL et al. 1994, FUNKE et al. 1996).

Viele Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich Antikörper gegen das Zytokeratin 18 zur Detektion disseminierter epithelialer Tumorzellen als sensitiv und nützlich erwiesen (SCHLIMOK et al. 1987, DIEL et al. 1990, PANTEL et al. 1994, FUNKE et al. 1996).

1.1.8.2 Molekularbiologische Nachweisverfahren

Da Tumorzellen sich nicht nur hinsichtlich ihres Phänotyps sondern auch ihres Genotyps von den Zellen ihres Ausgangsgewebes unterscheiden, bietet der Nachweis tumorspezifischer Gene eine Möglichkeit zur Detektion disseminierter Tumorzellen.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz um den Faktor 10^6 . Durch die Weiterentwicklung der PCR-Methode durch hitzestabilere Enzyme wie z.B. die DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) gelang der Nachweis eines einzelnen DNA-Abschnittes in 10^5 bis 10^6 Zellen (SAIKI et al. 1988). Mit dem Nachweis eines Gens kann keine Aussage über den Grad seiner Transkription und Translation, also seinen Aktivitätszustand getroffen werden. Der Nachweis der von einem Gen stammenden mRNA ist Ausdruck für ein aktiv transkribiertes Gen, dessen Translationsprodukt folglich Funktionen in der Zelle erfüllt (LIANG und PARDEE 1992). Der Nachweis von mRNA erwies sich aufgrund der raschen RNA-Degradation als schwierig (BOUIZAR et al. 1993). Mit der reversen Transkription (RT)

kann aus einem mRNA-Strang eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden, welche wiederum mit Hilfe der PCR amplifiziert werden kann (LIANG und PARDEE 1992). Diese Methode bezeichnet man als RT-PCR (Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion). Eine Erhöhung der Sensitivität kann durch die sogenannte nested PCR erreicht werden. Hierbei wird ein Genabschnitt des primären PCR-Produktes mittels der PCR amplifiziert. Die dabei eingesetzten Primerpaare befinden sich innerhalb der Gensequenz der primär vervielfältigten DNA-Region (SAMBROOK et al. 1989, GRIBBEN und NADLER 1994, DATTA et al. 1994). Die PCR-Produkte sind nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen erkennbar. Transferiert man die erhaltenen DNA-Fragmente auf Zellulose- oder Nylonmembranen, kann die Spezifität der Gensequenzen mit enzymatisch oder radioaktiv markierten RNA-Sonden komplementär zu den nachzuweisenden DNA-Sequenzen verifiziert werden (SOUTHERN 1975).

Mehrere Arbeitsgruppen zeigten die Sensitivität und Spezifität der RT-PCR zur Detektion okkulten Tumorzellen bei Mammakarzinompatientinnen (DATTA et al. 1994), Patienten mit Neuroblastomen (NAITO et al. 1991) und Lymphomen (GRIBBEN und NADLER 1994). Die Spezifität der PCR erwies sich als höher als die immunzytologischer Nachweismethoden mittels monoklonaler Antikörper, da bei letzterer häufig falsch positive Ergebnisse aufgrund unspezifischer Antikörperbindungen zu beobachten waren (TAHA et al. 1989, DIEHL et al. 1992, DATTA et al. 1994).

1.1.9 Zytokeratine

Das Zytoplasma normaler oder transformierter Zellen von Vertebraten wird zu einem großen Teil durch Bestandteile des Zytoskeletts gebildet, welches sich neben den Mikrotubuli und Mikrofilamenten aus Intermediärfilamenten wie Vimentin, Desmin, Neuro- und Gliafilamenten sowie Zytokeratinen zusammensetzt. Zytokeratine sind den epidermalen Alphakeratinen verwandte Polypeptide und stellen die für epitheliale Zellen charakteristischen Intermediärfilamente dar. Sie besitzen ein Molekulargewicht zwischen 40000 und 68000 Dalton und ähneln sich hinsichtlich ihres biochemischen und immunologischen Verhaltens in unterschiedlicher Ausprägung. Die bislang beschriebenen 20 humanen Zytokeratine lassen sich entsprechend ihrem isoelektrischen pH-Wert, welcher zwischen 5 und 8 liegt, in saure (Zytokeratin 9-19) und basische Zytokeratine (Zytokeratin 1 bis 8) unterteilen.

MOLL et al. gelang es 1983 durch die gelelektrophoretische Auftrennung und mittels immunologischer Blots bei autoptisch und bioptisch gewonnenen Proben bestimmten epithelialen Geweben und Karzinomen typische Zytokeratinmuster zuzuordnen und die Zytokeratinmuster der Tumortypen und ihrer Ursprungsgewebe zu vergleichen. Der Vergleich der Zytokeratinmuster der Primärtumoren und ihrer Metastasen wies keine signifikanten Qualitätsunterschiede unabhängig von der Tumorlokalisation und der Tumorgröße auf (MOLL et al. 1983, MOLL et al. 1993). Während sich die Muster der

Zytokeratinexpression in unterschiedlichen Phasen der epithelialen Differenzierung ändern, bleiben diese zellspezifischen Intermediärfilamente bei der Zelltransformation und Tumorentwicklung weitgehend konserviert (MOLL et al. 1982). Der Nachweis von Zytokeratinen kann aufgrund der unterschiedlichen Zytokeratinmuster in diversen Tumoren epithelialer Herkunft in Verbindung mit der Beobachtung stabil bleibender Zytokeratinmuster im Rahmen des malignen Tumorzellwachstums und der Metastasierung in der Tumordiagnostik eingesetzt werden (MOLL et al. 1982).

Die unterschiedlichen Muster der Zytokeratinpolypeptide ließen sich auch nachweisen, nachdem ganze Zellen oder Gewebe direkt denaturiert wurden. Für viele Zytokeratine konnten Translationsprodukte in Form von mRNA nachgewiesen werden, so dass sie als primäre zelleigene Translationsprodukte und nicht als proteolytische Fragmente von Precursormolekülen angesehen werden müssen (MOLL et al. 1982, MOLL et al. 1983).

1.1.9.1 Zytokeratin 18

Das Zytokeratin 18 hat ein Molekulargewicht von 45 kD und zählt mit seinem isoelektrischen pH-Wert von 5,7 zu den sauren Zytokeratinen. Die Zytokeratine 8, 18 und 19 weisen ein ähnliches Verteilungsmuster auf und treten bereits in der embryonalen Entwicklung im 4- bis 8-Zellenstadium auf (SAVTCHENKO et al. 1988). Desweiteren sind sie unter anderem in Epithelien des Gastrointestinaltrakts und seiner Anhangsdrüsen, der Trachea, der Brustdrüse sowie der Karzinome nachweisbar, die von Geweben dieser Organe ausgehen (MOLL et al. 1982, SCHLIMOK et al. 1987, SCHLIMOK et al. 1991, PANTEL et al. 1993a, PANTEL et al. 1993b).

Epithelien der gesunden Brustdrüse exprimieren die Zytokeratine 5, 7, 8, 14, 17 und 19 sowie in geringem Ausmaß die Zytokeratine 15 und 18. Karzinome der Mamma weisen die Zytokeratine 6, 7, 8, 18 und 19 auf. Bei duktalem Mammakarzinomen lassen sich in unterschiedlicher Ausprägung zusätzlich die Zytokeratine 11, 14, 16 und 17 beobachten (MOLL et al. 1982).

Der Nachweis CK-18-positiver Zellen in Proben peripheren Blutes und des Knochenmarks von Mammakarzinompatientinnen als Hinweis auf eine Tumorzell dissemination und dessen Wertigkeit als prognostischer Faktor wurde vielfach untersucht und beschrieben (SCHLIMOK et al. 1987, PORRO et al. 1988, TAHA et al. 1989, DIEL et al. 1990, HARBECK et al. 1994, FUNKE et al. 1996).

PANTEL et al. (1993a) konnten zeigen, dass CK 18-positive Zellen im Knochenmark von Patienten mit Brust-, Magen- oder Darmkrebs ein onkogenes Potential bergen und dass es sich um disseminierte Tumorzellen handelt, welche sich in einem 'dormant state' befinden.

1.1.10 PTHrP (Parathormon-ähnliches Protein)

Das Parathormon-ähnliche Protein (PTHrP) wurde 1982 als derjenige Faktor identifiziert, welcher von verschiedenen Malignomen sezerniert wird und die humorale Hyperkalzämie im Rahmen paraneoplastischer Syndrome verursacht. Mit der Clonierung des PTHrP-Gens im Jahre 1987 (BURTIS et al. 1987, MOSELEY et al. 1987, STREWLER et al. 1987) konnte herausgefunden werden, dass das Gen des humanen PTHrP, lokalisiert auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12, und das Gen des humanen Parathormons (PTH), welches auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 liegt, verwandte Gene einer Genfamilie sind. Im Vergleich zu dem Gen des Parathormons weist das Gen des PTHrP eine höhere Komplexität auf (SUVA et al. 1989, MANGIN et al. 1989, BURTIS 1992, PHILBRICK et al. 1996). Es umfaßt mehr als 15 Kilobasen mit 9 Exons und besitzt mindestens drei Promotor- und eine Silencerregion in dem am 5'-Ende angrenzenden Abschnitt des Gens (MANGIN et al. 1989, MANGIN et al. 1990, SOUTHBY et al. 1995). Der mittlere Abschnitt, der die Exons 2, 3 und 4 beinhaltet, ist in der Organisation seiner Introns und Exons dem aus drei Exons bestehenden Gen des Parathormons ähnlich. Die Downstream-Region des PTHrP-Gens beherbergt die Exons 5 und 6. Durch alternatives Splicen am 5'- und 3'-Ende der Transkripte entstehen eine Reihe verschiedener mRNAs (MANGIN et al. 1989). Eine besondere Bedeutung kommt drei verschiedenen mRNA-Isoformen zu, die aus dem Prozess des Splicens am 3'-Ende (Exons 5 und 6) hervorgehen und deren Proteine eine Länge von 139, 141 und 173 Aminosäuren besitzen. Sie gleichen sich in der Sequenz ihrer Aminosäuren und unterscheiden sich entsprechend ihrer Länge in ihren COOH-Enden (SUVA et al. 1987, THIEDE et al. 1988, MANGIN et al. 1989, MANGIN et al. 1990, IKEDA et al. 1990, BURTIS 1992, SOUTHBY et al. 1995, PHILBRICK et al. 1996).

Das direkt posttranslatorische Parathormon-ähnliche Peptid ist ein 177 Aminosäuren umfassendes Prohormon, welches posttranslatorisch durch Prohormonkonvertasen in eine Vielzahl sekretorischer Peptide des PTHrP aufgespalten wird, von denen jedem eine andere biologische Funktion zukommt, welche über den Rezeptor des Parathormons und über PTHrP-spezifische Rezeptoren vermittelt wird (STEWART und BROADUS 1990, ORLOFF et al. 1994, ORLOFF et al. 1996, PHILBRICK et al. 1996). Es beinhaltet eine Leitsequenz von 36 Aminosäuren (Position -36 bis -1) die analog dem Prepro-PTH als intrazelluläre Prepro- und Pro-Precursor fungieren und dem intrazellulären Transport dienen (SUVA et al. 1987, MANGIN et al. 1989, PHILBRICK et al. 1996, BURTIS 1992). Die ersten 13 Aminosäurereste der daran anschließenden Region des reifen PTHrP sind in ihrer Sequenz dem PTH homolog, die ersten 8 davon identisch und verantwortlich für die meisten agonistischen Effekte an Parathormonrezeptoren an den primären Zielorganen, der Niere und dem Knochen. Die Aminosäurereste, die sich der 13. Position anschließen, präsentieren in ihrer Primärstruktur zwar keine Homologien zu dem Parathormon oder einem anderen bekannten Protein (SUVA et al. 1987, THIEDE et al. 1988, MANGIN et al. 1988, BURTIS 1992), die

Sekundär- und Tertiärstrukturen der Aminosäuren 1 bis 36 des PTHrP und 1 bis 34 des PTH binden jedoch beinahe äquipotent an die klassischen Parathormonrezeptoren (STREWLER et al. 1987, KEMP et al. 1987, BURTIS 1992, PHILBRICK et al. 1996). Somit erstreckt sich die Parathormon-ähnliche Sequenz des PTHrP über die Aminosäurereste 1 bis 34 bzw. 1 bis 36 am Aminoende des Proteins (PHILBRICK et al. 1996).

Im Gegensatz zum Gen des Parathormons, welches nur selten in anderen Geweben als dem der Nebenschilddrüse exprimiert wird, wird das PTHrP-Gen unter physiologischen Bedingungen im überwiegenden Teil normaler adulter Gewebe sowie im Verlauf der fetalen Ontogenese exprimiert. Hier übernimmt es lebenswichtige Funktionen in der Entwicklung, Differenzierung und Proliferation einer Vielzahl verschiedener Organe und Gewebe sowie deren Stoffwechselprozessen. Darüber hinaus hat es Bedeutung für fetomaternale Homöostaseprozesse (ASA et al. 1990, BURTIS 1992, GAICH et al. 1993, ORLOFF 1994, DUNBAR et al. 1996, PHILBRICK 1996). Im Unterschied zur humoralen Hyperkalzämie maligner Tumoren, bei denen PTHrP die klassische Rolle eines endokrinen Hormons spielt, übernimmt es unter physiologischen Bedingungen bis auf wenige Ausnahmen die Funktionen eines para- und autokrinen Hormons (ORLOFF et al. 1992, ORLOFF et al. 1994, GAICH et al. 1993, DUNBAR et al. 1996). Letztere sind komplexer Natur und die zum Teil gegensätzlichen Effekte der verschiedenen sekretorischen Formen des PTHrP an verschiedene Abschnitte des Proteins sowie PTH- und PTHrP-spezifische Rezeptoren gebunden. So bindet beispielsweise das NH₂-terminale Peptid (PTHrP 1-36) an den klassischen Parathormonrezeptor und vermittelt eine osteoklastische knochenresorbierende Wirkung (ORLOFF et al. 1994), während die C-terminal gelegene PTHrP-Region 107 bis 111 die Knochenresorption durch Osteoklasten inhibiert (FENTON et al. 1991).

1.1.10.1 Die Funktion des PTHrP in der gesunden Mamma und bei Mammakarzinomen

PTHrP, von luminalen Epithelien und Myoepithelien der normalen Mamma produziert und sezerniert, reguliert die Entwicklung der Brustdrüse, wobei insbesondere die Stromazellen ein sensibles Zielorgan des PTHrP sind (LIAPIS et al. 1993, PHILBRICK et al. 1996, DUNBAR et al. 1996, DUNBAR et al. 1998). Hohe Konzentrationen des PTHrP sind während der Laktation im Gewebe der Mamma nachweisbar, wobei das Nuckeln den Stimulus zur Ausschüttung des Proteins darstellt (THIEDE und RODAN 1988). Nachfolgend konnten große Mengen des PTHrP in der Muttermilch nachgewiesen werden, was eine Funktion des Peptids in der Calciumhomöostase des Säuglings nahe legt (THIEDE 1994).

PTHrP konnte immunhistochemisch in normalem Mammagewebe, bei Proben von Fibroadenomen der Brust und bei Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Dabei wurden höhere Expressionsraten des PTHrP in Fibroadenomen der Mamma, die höchsten Nachweisraten von PTHrP bei Patientinnen mit einem Mammakarzinomen beschrieben

(LIAPIS et al. 1993, EDWARDS et al. 1995). Es gibt Hinweise, dass PTHrP beim Mammakarzinom für den Osteotropismus der Mammakarzinommetastasen oder zumindest für die osteoklastische Knochenresorption bei manchen Mammakarzinomen verantwortlich ist (PHILBRICK et al. 1996). In einer Untersuchung von GRILL et al. 1991 konnten erhöhte Plasmaspiegel des PTHrP bei Patientinnen mit einem ossär metastasierten Mammakarzinom und gleichzeitiger Hyperkalzämie beobachtet werden. PTHrP konnte immunzytochemisch auch in 56% bis 60% der Tumorgewebe normokalzämischer Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden, wobei die Nachweisrate bei Patientinnen erhöht war, die in der Folge Knochenmetastasen oder eine tumorbedingte Hyperkalzämie entwickelten (SOUTHBY et al. 1990, BUNDRED et al. 1992). Die Plasmaspiegel von PTHrP sowie der immunologische Nachweis von PTHrP in Tumorgeweben war bei hyperkalzämischen Patientinnen im Vergleich zu normokalzämischen Patientinnen mit ossär metastasierten Mammakarzinomen erhöht (BUNDRED et al. 1991). BOUIZAR et al. konnten 1993 mittels einer semiquantitativen Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von PTHrP einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe der PTHrP-Expression im Mammakarzinomgewebe und der späteren Entwicklung von Knochenmetastasen zeigen. Ähnliche Ergebnisse wurden von DE VERNEJOU et al. 1991 vorgestellt, die erhöhte PTHrP-Spiegel im Plasma von normokalzämischen Brustkrebspatientinnen mit ossären Metastasen fanden. Die immunzytologische Untersuchung von Mammakarzinommetastasen verschiedener Lokalisationen ergab bei 92% der untersuchten Proben aus Knochenmetastasen eine Expression des PTHrP-Gens verglichen mit einer Nachweisrate von 17% in Metastasen anderer Lokalisationen (POWELL et al. 1991).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Die Prognose des Mammakarzinoms wird bislang durch die etablierten Parameter der TNM-Klassifikation sowie des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus bestimmt. Im Verlauf der letzten Jahre zeichnete sich der Nachweis disseminierter Tumorzellen insbesondere in niedrigeren Tumorstadien als prognostisch bedeutsamer Faktor ab. Viele Arbeitsgruppen konnten die prognostische Bedeutung eines immunzytologischen Nachweises disseminierter Tumorzellen belegen, wobei neben anderen der Nachweis von Zytokeratinen an Bedeutung gewann. Ossäre Metastasen stellen einen häufigen und frühen Manifestationsort hämatogener Fernmetastasen bei Mammakarzinompatientinnen dar, wobei ein Zusammenhang zwischen der Expression von PTHrP durch die Tumorzellen und dem Auftreten ossärer Läsionen vermutet wird. Im Vergleich zur Immunzytologie stellt die RT-PCR ein sensitiveres Verfahren dar, dessen Bedeutung für den Nachweis disseminierter Tumorzellen noch nicht geklärt ist. Vor diesem Hintergrund sollen die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Etablierung und Überprüfung der Sensitivität des immunzytologischen Nachweises von Zytokeratin-18-exprimierenden Zellen unter Verwendung der APAAP in Zytozentrifugationspräparaten mit 1×10^5 Zellen und in Sedimentationspräparaten mit 1×10^6 Zellen
2. Etablierung und Überprüfung des Nachweises disseminierter Tumorzellen mittels der nested RT-PCR von PTHrP-Transkripten in Tumorgewebe sowie Proben des Knochenmarks und peripheren Blutes von Mammakarzinompatientinnen und Vergleich mit den immunzytologischen Daten
3. Nachbeobachtung der Patientinnen zur Einschätzung der prognostischen Signifikanz des molekularbiologischen Nachweises von PTHrP und des immunzytologischen Nachweises von Zytokeratin 18

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Es wurden Knochenmark (KM), peripheres Blut (PB) und Tumorgewebe von 46 Patientinnen und Patienten mit der gesicherten Diagnose eines Mammakarzinoms auf die Expression von Parathormon-ähnlichem Protein (PTHrP) und Zytokeratin 18 (CK 18) untersucht, um disseminierte Tumorzellen zu detektieren. Zusätzlich wurde diese Untersuchung auch an Proben von 8 Patientinnen mit krankhaften Veränderungen der Mamma durchgeführt, bei denen die abschliessende histologische Beurteilung eine benigne Erkrankung der Mamma nachwies. Die Untersuchungen erfolgten an archiviertem Material von Knochenmarksentnahmen und Blutproben, die nach Aufklärung und mit dem Einverständnis der Patientinnen durch eine Beckenkampunktion im Rahmen der Mamma-OP zur Stadienbestimmung in der Primärdiagnostik durchgeführt worden waren. Die Untersuchungen an RNA aus Tumorgeweben erfolgte ebenfalls an archiviertem Material, das zur Bestimmung von Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus aus dem Primärtumor im Rahmen der Primärdiagnostik in flüssigem Stickstoff gefroren und homogenisiert worden war.

Von den Patientinnen mit einem Mammakarzinom wurden 42 KM und 42 PB sowie 13 Tumorgewebeproben untersucht. Von den 8 Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma wurden jeweils KM und PB untersucht (vergl. Tabellen 2.9 und 2.10). Von den 54 untersuchten Patienten waren 53 weiblichen und 1 männlichen Geschlechts. Das mediane Alter betrug 56 Jahre (31 bis 77 Jahre).

Von den 46 Mammakarzinompatientinnen lag bei 41 Patientinnen ein primäres Mammakarzinom vor, wobei es sich bei einer Patientin um die Erstmanifestation eines Zweitkarzinoms der Brustdrüse handelte, bei dreien zum Zeitpunkt der Diagnose ein Zweitkarzinom bestand und bei 5 weiteren bereits eine Radio- und / oder Chemotherapie vor der Materialgewinnung begonnen worden war. 4 Proben wurden von Patientinnen und Patienten mit Rezidiven gewonnen, von denen sich bei einem die zusätzlichen Diagnosen eines ösophagealen Plattenepithelkarzinoms und eines Basalioms in der Anamnese fanden (I.N.). Die Stadien der Tumorerkrankungen reichten von pTis N0 M0 bis pT4b N3 M1 (vergleiche Tabellen 2.1, 2.2 und 2.9). Der mediane Beobachtungszeitraum lag bei dem Patientenkollektiv mit einem Karzinom der Mamma bei 20 Monaten (19 Tage bis 35 Monate), bei demjenigen mit benignen Erkrankungen der Brustdrüse betrug der Median 30 Monate (28 bis 35 Monate) (vergl. Tabellen 3.116 und 3.117).

Tabelle 2.1 stellt die absoluten Häufigkeiten der einzelnen Tumorstadien innerhalb des Patientenkollektives dar, Tabelle 2.2 die Verteilung der Tumorstadien.

Stadium	Anzahl
Cis	4
I	2
II A	18
II B	8
III A	4
III B	5
IV	3
nicht definiert	2

Tab. 2.1: Die Einteilung der Tumorstadien wurde auf der Grundlage der TNM-Klassifikation der UICC von 1997 vorgenommen (Sobin und Fleming 1997). nicht definiert: 2 Tumorerkrankungen waren nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nicht eindeutig klassifizierbar.

Material	Primäre	Zweitkarzinom als primäres Material	prim. Karzinome unter Therapie	Rezidive
Stadium	Mammakarzinome			
Cis	4	0	0	0
I	2	0	0	0
II A	14	0	1	3
II B	6	0	1	1
III A	4	0	0	0
III B	3	0	2	0
IV	2	0	1	0
nicht definiert	1	1	0	0

Tab. 2.2: Patientencharakteristik; Zweitkarzinom als primäres Material: das gewonnene Material entstammte Patientinnen mit der Manifestation eines zweiten Mammakarzinoms und stellt in diesem Zusammenhang primär gewonnenes Material dar; prim. Karzinome unter Therapie: das Material entstammte Patientinnen mit einer primären Manifestation eines Mammakarzinoms. Das Untersuchungsgut wurde bei dieser Patientengruppe nach bereits begonnener oder durchgeführter Radio- und / oder Chemotherapie gewonnen. Nicht definiert: diese Tumoren waren nach den vorliegenden Unterlagen nicht eindeutig klassifizierbar.

2.2 Material

2.2.1 Patientenmaterial

Peripheres Blut (PB) und Knochenmark (KM) der in den Tabellen 2.9 und 2.10 aufgeführten Patienten wurden auf disseminierte Tumorzellen durch den Expressionsnachweis von PTHrP und CK 18 untersucht, sowie homogenisiertes Material der Primärtumoren auf die Expression von PTHrP geprüft.

2.2.2 Negativkontrollen

Für die immunzytologische Untersuchung wurde das periphere Blut (PB) eines 24 jährigen Probanden ohne bekannte maligne Vorerkrankung als Negativkontrolle verwendet.

2.2.3 Positivkontrollen

Alle Zelllinien, die als Positivkontrollen verwendet wurden, wurden als Dauerkultur in einem Kulturmedium bestehend aus RPMI 1640 und 10% fetalem Kälberserum (FCS) unter Standardbedingungen (5% CO₂, 100% relative Luftfeuchtigkeit) gehalten.

2.2.3.1 Mammakarzinomzelllinien

2.2.3.1.1 MCF-7

Angelegt wurde diese Zelllinie 1970 mit Zellen aus dem Pleuraerguss einer 69 jährigen Patientin mit einem metastasierten östrogenrezeptorpositiven Adenokarzinom der Mamma, nachdem diese eine Radio- und Hormontherapie erhalten hatte (HAY et al. 1992).

Die hier verwendeten Zellen wurden von der ATCC (American Type Culture Collection) bezogen.

Zellen der Zelllinie MCF-7 dienten als positive Kontrolle für die immunzytologische Färbung mit dem Antikörper gegen CK 18, sowie zur Überprüfung der β -Aktin-PCR.

2.2.3.1.2 MDA-MB-231

Diese Zelllinie wurde 1974 nach der Applikation einer Chemotherapie aus Pleuraergusszellen einer 51 Jahre alten Patientin mit einem Adenokarzinom der Brustdrüse etabliert (HAY et al. 1992).

2.2.3.2 Nierenkarzinomzelllinie (786-O)

Die Zelllinie 786-O stammt aus einem primären klarzelligem Adenokarzinom der 1975 exstirpierten Niere eines 58 jährigen Patienten mit multiplen Lungenmetastasen, jedoch ohne Anzeichen für Knochenmetastasen (WILLIAMS et al. 1978, STREWLER et al. 1983).

MCF-7, MDA-MB-231 und 786-O produzieren PTHrP und wurden als Positivkontrolle in den β -Aktin- und PTHrP-nachweisenden PCRs eingesetzt.

2.3 Chemikalien und Reagenzien

2 Materialien und Chemikalien	Hersteller
Aceton (C ₃ H ₆ O)	Merck (Darmstadt)
Agarose	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
Aqua bidest (Ampuwa®)	Fresenius (Bad Homburg)
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Chloroform (CHCl ₃)	J.T. Baker (Deventer, Holland)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma (Deisenhofen)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (Deisenhofen)
DTT (Dithiothreitol)	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma (Deisenhofen)
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Europio
Ficoll®	Seromed (Berlin)
Ficoll® 400	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Gel-Blotting-Paper	Schleicher und Schüll (Dassel)
Giemsa-Lösung	Merck (Darmstadt)
Hybond™-N (Hybridisierungsmembranen)	Amersham
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	J.T. Baker (Deventer, Holland)
KAISER's Glyceringelatine	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
Kobaltchlorid (CoCl ₂)	Boehringer (Mannheim)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
Maleinsäure (C ₄ H ₄ O ₄)	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn)
May-Grünwald-Lösung	Merck (Darmstadt)
MAYER's Hämalaun-Lösung	Merck (Darmstadt)
Methanol (CH ₄ O)	Merck (Darmstadt)
Mineralöl	Sigma (Steinheim)
Natriumazid (NaN ₃)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Sigma (Deisenhofen)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt)
Natronlauge (NaOH)	Merck (Darmstadt)
N-Lauroylsarkosin	Sigma (Deisenhofen)
Parafilm®	American Natl. Can (Greenwich, CT)
Salzsäure (HCl)	Merck
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Paesel / Lorei (Frankfurt a.M.)
Tris-HCl	Sigma (Deisenhofen)
Trypanblau	Serva (Heidelberg)
Tween 20® (polyethylene sorbitan monolaurate)	Bio Rad
Vacu Cap® 60 Filtereinheit 0,2 um	Gelman Sciences
X-Phosphat (5-Brom-4-chlor-3-indol-phosphat, Toluidin-Salz)	Boehringer (Mannheim)

Tab. 2.3: Liste aller verwendeten Materialien, sowie der Chemikalien in Reinform

2.4 Media, Zusätze und Supplemente

Media, Zusätze, Supplemente	Hersteller
Blockreagenz (Proteingemisch)	Boehringer (Mannheim)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Paesel / Lorei (Frankfurt a.M.)
FCS (Fetales Kälber Serum)	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
humanes Immunglobulin	Behring (Marburg)
L-Glutamin (L-2-Glutamat)	Sigma (Deisenhofen)
Penicillin (100 000 I.E./ml)	Sigma (Deisenhofen)
RPMI 1640-Zellkulturmedium	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
Serum von Probanden der Blutgruppe AB	Blutbank des Universitätsklinikums Göttingen
Streptomycin (100mg/ml)	Sigma (Deisenhofen)

Tab. 2.4: Liste der Media, Zusätze und Supplemente

2.5 Enzyme und spezielle Reagenzien

Enzyme und spezielle Reagenzien	Hersteller
DNTP-Mischung	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
10 x PCR-Puffer	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
5 x First Strand Buffer	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
dATP	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
DIG-11-dUTP	Boehringer (Mannheim)
DIG nucleic acid detection kit (Nonradioactive)	Boehringer (Mannheim)
DNA Molecular Weight Marker VI	Boehringer (Mannheim)
Fast Red Substratsystem	DAKO (Hamburg)
M-MLV Reverse Transkriptase	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
NBT (Nitroblau-tetrazoliumsals) Stammlösung	Boehringer (Mannheim)
Random Primer (Hexaoligonukleotide)	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
RNAzol™ B	Paesel / Lorei (Frankfurt a.M.)
Taq-DNA-Polymerase	GIBCO BRL (Eggenstein-Leopoldshafen)
Terminale Transferase	Boehringer (Mannheim)
Terminale-Transferase-Reaktionspuffer (TdT)	Boehringer (Mannheim)
TRI REAGENT™	Sigma (Deisenhofen)

Tab. 2.5: Liste der verwendeten Enzyme und speziellen Reagenzien

2.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Monoklonaler Maus-APAAP-Immunkomplex	DAKO (Hamburg)
Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Anti-DIG)	Boehringer (Mannheim)
Monoklonales Maus IgG1 (unkonjugiert)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Monoklonaler Maus-Anti-Humanes-Zytokeratin-18-Antikörper (Klon CK1)	DAKO (Hamburg)
Monoklonaler Maus-Anti-Humanes-Zytokeratin-18-Antikörper (Klon LP34)	DAKO (Hamburg)
Polyklonales Kaninchen-Anti-Maus-Antiserum	DAKO (Hamburg)

Tab. 2.6: Liste der verwendeten Antikörper

2.7 Medien, Puffer und Lösungen

Die Lagerung der Lösungen erfolgte bei einer Temperatur von 4° C, soweit dies nicht anders vermerkt ist.

Blockierungsstammlösung (für die Hybridisierung und Färbungsreaktion)

Das im DIG Nucleic Acid Detection Kit mitgelieferte Blockierungsreagenz wurde unter Rühren und Erhitzen auf einem heizbaren Magnetrührer in Hybridisierungspuffer 1 zu einer Endkonzentration von 10% gelöst und anschließend autoclaviert.

Blockpuffer (für die APAAP-Reaktion)

- Herstellung der **Stammlösung**:
 - hitzeaggregiertes humanes Immunglobulin in einer Konzentration von 10 mg/ml in PBS lösen
 - 20 Minuten bei 56° C im Wasserbad erhitzen

- Herstellung von 100 ml **Gebrauchslösung** mit 0,01%igem NaN_3 -Anteil:

10 ml Stammlösung
 100 μl 10% Natriumazid-Lösung ($^w/v$)
 (1 g NaN_3 gelöst in 10 ml PBS)
 mit PBS ad 100 ml

Denaturierungspuffer

1,0 mol/l NaCl
 0,5 mol/l NaOH
 mit Aqua bidestillata ad 1 Liter
 Lagerung bei 20°C

Einfriermedium	80% FCS ($\frac{v}{v}$) 20% DMSO ($\frac{v}{v}$)
Hybridisierungspuffer 1	0,1 mol/l Maleinsäure 0,15 mol/l NaCl mit Aqua bidestillata ad 500 ml pH 7,5 bei 20°C
Hybridisierungspuffer 2	Verdünnung der Blockierungs- stammlösung in Hybridisierungspuffer 1 im Verhältnis 1:10.
Hybridisierungspuffer 3	0,1 mol/l TRIS-HCl 0,1 mol/l NaCl 50 mmol/l MgCl ₂ mit Aqua bidestillata ad 500 ml pH 9,5 bei 20°C Lagerung bei 20°C
Hybridisierungspuffer 4	10 mmol/l TRIS-HCl 1 mmol/l EDTA mit Aqua bidestillata ad 500 ml pH 8,0 bei 20°C Lagerung bei 20°C
Hybridisierungswaschlösung 1	10 ml 20 x SSC 1 ml 10% SDS mit Aqua bidestillata ad 100 ml Lagerung bei 20°C
Hybridisierungswaschlösung 2	0,5 ml 20 x SSC 1 ml 10% SDS mit Aqua bidestillata ad 100 ml Lagerung bei 20°C
L-Glutamin-Stammlösung	14,61g L-Glutamin ad 500 ml in Aqua bidestillata (= 200 mM)

Ladepuffer	15% FICOLL 400 (v/v) 0,1% Bromphenolblau (v/v) in Aqua bidestillata
Neutralisierungspuffer	0,5 mol/l TRIS-HCl 1,5 mol/l NaCl in Aqua bidestillata ad 500 ml pH 7,4 bei 20°C, Lagerung bei 20°C
PBS (Phosphate buffered saline) mit BSA-Zusatz	6,7 g NaCl 1,42 g Na ₂ HPO ₄ 0,41 g KH ₂ PO ₄ 2,0 g BSA sterile Filtration durch 0,2 µm Filter Einstellung des pH auf 7,3
Penicillin-Streptomycin-Stammlösung	3,01 g Penicillin (= 10 000 U/ml) 6,67 g Streptomycin (= 10 000 U/ml) mit PBS ad 500 ml
Prähybridisierungspuffer	1% Blockierungsreagenz (w/v) 0,01% N-Lauroylsarkosin (w/v) 0,02% SDS (w/v) mit 5 x SSC ad 25 ml
RPMI-Medium mit 10% FCS	15,89g RPMI 1640 (= 1 Packungseinheit) 2,0 g NaHCO ₃ 10 ml Penicillin-Streptomycin- Stammlösung 10 ml L-Glutamin-Stammlösung 100 ml FCS (30 Minuten bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert) mit H ₂ O, i.e. Aqua bidestillata ad 1 Liter pH 7,40 bei 20°C sterile Filtration mit 0,2 µm Filter

10 x SDS	100 g SDS mit Aqua bidestillata ad 1 Liter pH 7,2 bei 20°C Lagerung bei 20°C
20 x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g Na-Citrat mit Aqua bidestillata ad 1 Liter pH 7 bei 20°C Lagerung bei 20°C
5 x TBE	270 g TRIS 137,5 g Borsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) mit Aqua bidestillata ad 5 Liter Lagerung bei 20°C
TBS	12,1 g TRIS 17,0 g NaCl mit Aqua bidestillata ad 2 Liter pH 7,4 - 7,45 bei 20°C

2.8 Methoden

2.8.1 Aufbereitung des Patientenmaterials

Von jedem peripheren Blut- und Knochenmarksaspirat standen im Rahmen der Routinediagnostik Ausstrichspräparate zur Verfügung, die nach Pappenheim angefärbt und im Lichtmikroskop auf metastatische Zellen untersucht worden waren.

2.8.2 Isolation der mononukleären Zellen aus Blut- und Knochenmarkaspiraten

Das periphere Blut (PB) und Knochenmark (KM) wurde 1:1 mit RPMI-Medium (vergl. 2.7) verdünnt und im Verhältnis 2:1 auf Ficoll (Seromed) aufgeschichtet. Durch anschließende 25-minütige Zentrifugation bei 1200 g bei ungebremster Zentrifuge und 20°C, erfolgte die Auftrennung der zellulären Bestandteile nach dem Prinzip der Dichtezentrifugation über einem kolloidalen Gradienten (BOYUM 1964).

Die auf diese Weise abgetrennte mononukleäre Zellfraktion wurde abpipettiert und 20 µl mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 versetzt, um die Zellzahl, sowie deren Viabilität mittels einer Neugebauer Zählkammer mikroskopisch zu bestimmen. Anschließend wurden die Zellen in

einem äquivalenten Flüssigkeitsvolumen PBS-Lösung (vergl. 2.7) aufgenommen und bei 400 g in der Zentrifuge bei 20°C für 7 Minuten gewaschen. Das so erhaltene Zellpellet wurde in je 500 µl pro 1×10^7 Zellen RPMI-Medium resuspendiert.

2.8.3 Anfertigung von Leukozytenpräparaten mittels der Zytocentrifugations- und Sedimentationstechnik

Aus dem resuspendierten Zellpellet wurden 1×10^5 Zellen je Zytospin entnommen, diese in jeweils 100 µl PBS-Lösung aufgenommen und für 10 Minuten bei 80 U/min auf Ethanol behandelte Objektträger aufgebracht. Nachdem die Präparate an der Luft getrocknet waren, wurden sie in Aluminiumfolie geschützt bei -20°C aufbewahrt.

Für die Präparatanfertigung unter Zuhilfenahme der Sedimentationstechnik wurden 1×10^6 Zellen je Objektträger aus der Zellsuspension (vergl. 2.8.1.1) abgenommen, das Flüssigkeitsvolumen durch Zugabe von PBS-Lösung jeweils auf 500 µl aufgestockt und in je eine trichterförmige Vorrichtung der Immunette[®] überführt. Nach 20-minütiger Sedimentation der Zellen auf Ethanol gereinigte Objektträger, wurde der liquide Überstand mit Hilfe einer angeschlossenen Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Lagerung der Präparate erfolgte wie die der Zytospins.

2.8.4 Kryokonservierung mononukleärer Zellen

Je 1×10^7 in 500 µl RPMI-Medium aufgenommene Zellen (vergl. 2.8.1.1) wurden in 1 ml fassende Cryotubes (Nunc, Wiesbaden) pipettiert und nach der von LOVELOCK und BISHOP 1959 beschriebenen Methode der Gefrierkonservierung mit 500 µl Dimethylsulfoxid-haltigem Einfriermedium (vergl. 2.7) versetzt. Die Beimengung des auf 4°C vorgekühlten Einfriermediums zu den auf Eis gelagerten Proben erfolgte tropfenweise und unter mehrmaligem Schütteln. Nachfolgend wurden die beschickten Röhrchen stufenweise über 12- bis 24-stündige Lagerung bei 4°C, dann -80 °C und zur längerfristigen Aufbewahrung in -196°C kalten flüssigen Stickstoff verbracht.

2.8.5 Immunzytochemie

Die immunzytochemische Färbung von Zellen epithelialen Ursprungs in den PB- und KM-Proben wurde nach dem Prinzip der indirekten Immunphosphatasereaktion mit dem Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex (APAAP) durchgeführt (CORDELL et al., 1984). Markiert wurden die Zellen mit Antikörpern gegen das Intermediärfilament Zytokeratin 18 (CK 18). Die Inkubationen wurde bei Raumtemperatur (ca. 20°C) durchgeführt.

Das Auftauen der bei -20°C gelagerten Leukozytenpräparate erfolgte ebenfalls bei Zimmertemperatur, wobei die Aluminiumfolie erst nach ca. 10 Minute entfernt wurde.

Fixiert wurden die Präparate für 10 Minuten in einem Aceton-Methanol-Gemisch, welches für die mononukleären Zellen des KM ein Verhältnis von Aceton zu Methanol von 83:17, für die des PB eines von 90:10 aufwies.

Nachfolgend wurden die Objekte über 2 Minuten mit dreimaligem Pufferwechsel in TBS (vergl. 2.7) gewaschen und anschließend für 20 Minuten mit dem Blockpuffer (vergl. 2.7) in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach Abklopfen des Blockpuffers, ohne Waschen mit TBS-Puffer, schloß sich die Inkubation der fixierten Zellen mit dem primären Antikörper in der feuchten Kammer an. Als primärer Antikörper für die Zellen der als Positivkontrolle dienenden MCF-7-Zelllinie und die der Patientenproben wurde ein gegen humanes Zytokeratin 18 gerichteter Antikörper (vergl. 2.6) eingesetzt, der im Verhältnis 1:50 mit TBS verdünnt wurde. Die Negativkontrolle des wurde mit einem Maus IgG 1 Antikörper (vergl. 2.6) in einer Verdünnung von 1:20 in TBS inkubiert.

Die pro Objektträger eingesetzte Menge sämtlicher Antikörperlösungen betrug 100 µl je Zytospin und 200 µl für jedes mit der Immunette[®] hergestellte Präparat.

Nach erneutem Waschen in TBS mit dreimaligem Pufferwechsel, wurden alle Präparate über 30 Minuten mit dem Brückenantikörper beschickt, dessen Verdünnung wie folgt vorgenommen wurde:

Herstellung der 'Lösung a' aus humanem AB-Serum und TBS in einer Verhältnis von 1:5 und anschließender Herstellung der 'Gebrauchslösung b' des Brückenantikörpers durch 1:20 Verdünnung des Kaninchen-Anti-Maus-Antikörpers in 'Lösung a'.

Das Waschen der Präparate erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema.

Im Anschluss daran wurde auf die Objektträger der APAAP-Immunkomplex, ein monoklonaler Maus-Antikörper, in einer 1:20 TBS-Verdünnung aufgetragen, welcher für 30 Minuten auf den Zellen belassen wurde.

Nach anschließender Waschung mit TBS über 2 Minuten, wurden die Präparate mit Fast Red Substrat betropft und die 30-minütige Entwicklung der Alkalischen-Phosphatase-Reaktion eingeleitet.

Die Fast-Red-Substrat-Lösung, bestehend aus einer in 2 ml Substratpuffer gelösten Substrat-Tablette, wurde 30 Minuten vor dem Gebrauch angesetzt.

An den darauf folgenden dreimaligen Pufferwechsel über 2 Minuten, schloss sich die Kernfärbung mit MAYER's Hämalaun über 1 Minute an. Zum Bläuen der Kerne verblieben die Objektträger für 10 Minuten in Leitungswasser und wurden abschließend nach 24-stündiger Lufttrocknung mit Glyceringelantine (vergl. 2.3) eingedeckelt. Die Auswertung der immunzytochemisch markierten Leukozytenpräparate erfolgte lichtmikroskopisch, wobei sowohl Präparate mit 1×10^5 als auch mit 1×10^6 Zellen als positiv gewertet wurden, wenn 3 oder mehr in Gruppen (Clustern) oder einzeln liegende Zellen mit deutlicher Rotfärbung reagierten.

2.8.6 Vergleich der Sensitivität von Zentrifugations- und Sedimentationspräparaten

Zur Sensitivitätskontrolle und gleichzeitigem Vergleich der beiden unter 2.8.2 beschriebenen Methoden wurden zwei Verdünnungsreihen von MCF-7-Zellen in PB eines Probanden ohne maligne Erkrankung angefertigt. Hierzu wurde eine bestimmte Anzahl der Tumorzellen entsprechend der angewendeten Methode in 1×10^5 bzw. in 1×10^6 Zellen des PB eingesetzt. Für jede Methode wurden je drei gleiche Ansätze pro Verdünnungsreihe nach folgendem Schema pipettiert:

Verdünnungsreihe 1

Präparat	Tumorzellzahl eingesetzt in	
	1×10^5	1×10^6
1	0	1
2	0	2
3	1	5
4	1	10
5	10	100
6	20	200
7	50	500
8	100	1000

Tab. 2.7

Verdünnungsreihe 2

Präparat	Tumorzellzahl eingesetzt in	
	1×10^5	1×10^6
4	1	10
4a	2	20
4b	5	50
5	10	100

Tab. 2.8

Tab. 2.7 und 2.8: Darstellung der Verdünnungsreihe; Anzahl der Tumorzellen, welche sich in einer Gesamtmenge von 1×10^5 / 1×10^6 Zellen befinden. Die Objektträger wurden mittels der APAAP-Methode (vergl. 2.8.4) gegen CK 18 gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

2.8.7 RNA-Extraktion aus mononukleären Zellen und homogenisiertem Tumormaterial

Die Phenol-Chloroform-Extraktion, modifiziert nach CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987) diente zur Gewinnung von gesamter zellulärer RNA aus mononukleären Zellen und homogenisiertem Tumormaterial.

1×10^7 mononukleäre Zellen (vergl. 2.8.1.1) wurden zunächst im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, zügig in 10 ml steriles PBS überführt und bei 400 g in der Zentrifuge vom Einfriermedium gereinigt. Das Zellpellet wurde unter einem sterilem Abzug in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und in ein autoklaviertes Cup transferiert.

Das PBS wurde nach 5 minütiger Zentrifugation bei 7500 U/min in einer Tischzentrifuge abpipettiert, das Pellet in 1 ml TRI REAGENT™ (Sigma) oder RNAzol™ B (Paesel und Lorei), einer einphasigen Lösung aus Guanidiniumisothiocyanat und Phenol, lysiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Im Anschluss daran wurden 200 μl Chloroform hinzugefügt und jede Probe für 15 Sekunden auf dem Vortex-Rüttler gemischt, bis die

Emulsion ein homogenes milchig-trübes Aussehen angenommen hatte. Im Anschluss an eine 15-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation mit 13000 U/min in einer Tischzentrifuge, die das Gemisch in 3 Phasen auftrennte: eine untere organische, die DNA und Proteine enthielt, eine mittlere, hauptsächlich DNA-haltige, und die obere wässrige Phase, in welcher die RNA solubilisiert war.

Die wässrige Phase wurde abpipettiert, in ein neues steriles Eppendorf-Gefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und zur Ausfällung 10 Minuten bei 4°C inkubiert.

Nach Zentrifugation für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet in 1 ml 75% Ethanol gewaschen und durch Zentrifugieren für 15 Minuten bei 7500 g erneut pelletiert.

Der Ethanol-Überstand wurde mittels einer Pipette bis auf ein Restvolumen von ca. 50 µl abgenommen, welches in dem Speed-Vacuum-Concentrator, einer heizbaren, Sog-angeschlossenen Zentrifuge, verdampft wurde.

Nach Resuspension der RNA in 100 µl autoklaviertem Wasser erfolgte die Lagerung bei -20°C.

2.8.8 Reverse Transkription

Unter der reversen Transkription (RT) versteht man die mRNA-abhängige DNA-Synthese, die sogenannte cDNA, mit Hilfe der reversen Transkriptase, z.B. des murinen Leukämie-Virus.

Je 10 µl mit 2,5 µg der aus Patientenmaterial isolierten RNA wurden in ein steriles Eppendorf-Cup pipettiert, bei ca. 4°C auf Eis gelagert und mit 35 µl des nachfolgend beschriebenen Reaktionsansatzes für 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Der Reaktionsansatz für eine Probe setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen:

10 µl	5 x First Strand Buffer
2,5 µl	10 mM dNTP-Mischung
1 µl	Hexaoligonukleotide (Random-Primer)
5 µl	0,1 M Dithiothreitol
15 µl	DEPC-behandeltes Wasser
2,5 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (entspricht 500 U).

Die reverse Transkriptase wurde dem Ansatz zum Schluss hinzugefügt, um Aktivitätsverlusten des Enzyms vorzubeugen. Die so erzeugte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.8.9 Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht eine selektive Amplifikation kleinster DNA-Mengen eines bestimmten Gen- bzw. Sequenzabschnittes. Diese Art der Amplifikation basiert auf der Abfolge von drei Reaktionsschritten: der Hitzedenaturierung von DNA-Doppelsträngen, der Anlagerung von Oligonukleotiden ("Annealing") und der enzymatischen Verlängerung der DNA-Einzelstränge (Extension). Durch wiederholte Zyklen dieser Reaktionsschritte ist eine exponentielle Vermehrung von DNA-Einzelsträngen komplementär zu einem vorliegenden DNA-Einzelstrang möglich, da jeder Zyklus zu einer Verdopplung der im Reaktionsansatz befindlichen zu untersuchenden DNA-Sequenzen führt.

Die DNA-Hitzedenaturierung dient der Auftrennung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge, um den Primern die Anlagerung ("Annealing") an ihre komplementäre Sequenz zu ermöglichen. Benötigt werden 2 entsprechend formulierte Oligonukleotid-Primer, welche die 3'- und 5'-Region der zu untersuchenden DNA-Sequenz flankieren. Die DNA-Synthese der gewünschten Abschnitte beider Stränge erfolgt in 5'-3'-Richtung ausgehend von dem 3'-Ende eines Oligonukleotids mit Hilfe einer DNA-Polymerase (Extension). Verwendung fand die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte, hitzestabile Taq-DNA-Polymerase, welche ein Temperaturoptimum bei 72°C besitzt und kurzzeitig auch bei 92°C stabil ist. Die Hitzestabilität dieser Polymerase ermöglicht die wiederholte Abfolge der Zyklen ohne Unterbrechungen, da eine erneute Zugabe des Enzyms nach jedem Zyklus nicht erforderlich ist (SAIKI et al. 1988).

Für die RT-PCR wird zunächst die reverse Transkription durchgeführt, wobei mit reverser Transkriptase ein zu der zu untersuchenden mRNA komplementärer DNA-Einzelstrang (cDNA) synthetisiert wird (vergl. 2.8.7). Nachfolgend wird die cDNA zur Amplifikation der interessierenden Sequenzen in die PCR eingesetzt.

Eine Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der PCR ist durch eine zweite, die nested-PCR, erreichbar. Hierbei erfolgt eine erneute Amplifikation der in der primären PCR synthetisierten Einzelstränge, wobei das Produkt der ersten PCR als template der zweiten dient. Das hinzugefügte Oligonukleotidprimerpaar der zweiten PCR ist komplementär zu Sequenzen des Produktes der ersten.

Die Auswahl der als Primer dienenden Oligonukleotidsequenzen erfolgte nach veröffentlichten Sequenzen von PTHrP (MANGIN et al. 1989) und β -Aktin. Die Anlagerungsstellen eines Primerpaares wurden auf bekannten Abschnitten benachbarter Exons lokalisiert, um die Amplifikation genomischer DNA zu unterbinden. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass den Oligonukleotidsequenzen beider Primer eines Paares die gleiche Annealing-Temperatur zu eigen war, keine komplementären Sequenzen zwischen ihnen vorlagen und die Zusammensetzung ihrer Basen ein ausgeglichenes Verhältnis aufwies.

Das in 'sense'-Orientierung verlaufende Oligonukleotid eines Primerpaares wurde mit 5' bzw.

'us' (upstream), gegenläufige mit 3' bzw. 'ds' (downstream) gekennzeichnet.

Die Primer wurden von der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg) synthetisiert und in autoklaviertem Wasser so aliquotiert, dass sie in einer Konzentration von 25 µM vorlagen.

Die schematische Darstellung der Primerbindungsstellen und die Sequenzen der einzelnen Primer werden nachfolgend aufgeführt.

PTHrP

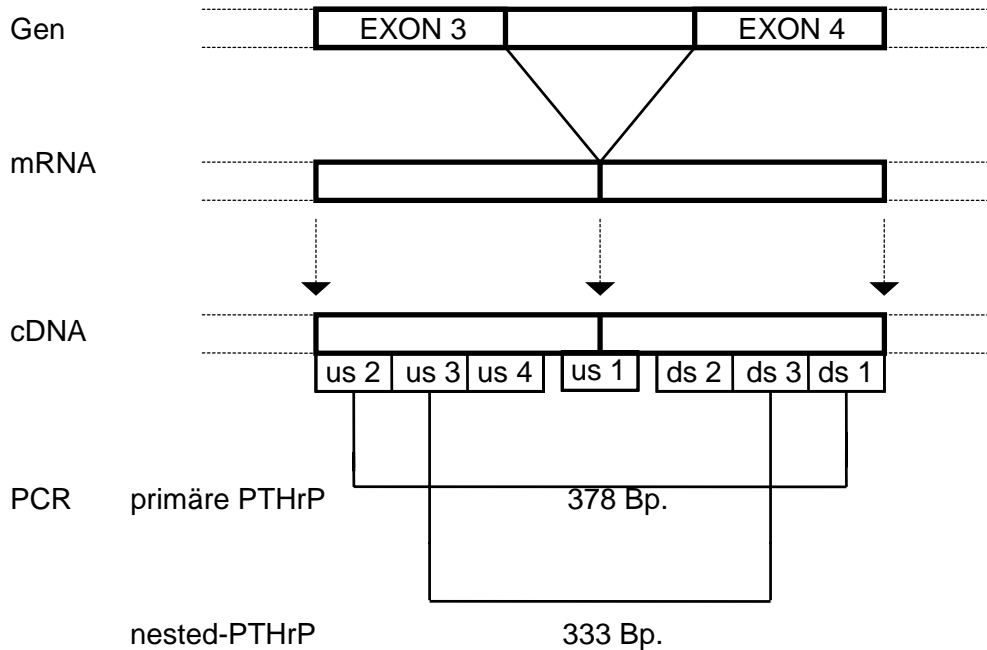


Abb. 2.1 : Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen für die PCR von PTHrP

Bp: Basenpaare; die Angabe der Basenpaare bezieht sich auf das Produkt der jeweiligen PCR

Primer der PCR von PTHrP:

us 2: 5' - GAC TGG TTC AGC AGT GGA GC - 3'

ds 1: 5' - ATC GAG CTC CAG CGA CGT TGT - 3'

Primer der nested PCR von PTHrP:

us 3: 5' - TGT TCC TGC TGA GCT ACG C - 3'

ds 3: 5' - TAG CCC ACT CCC AGT GAG T - 3'

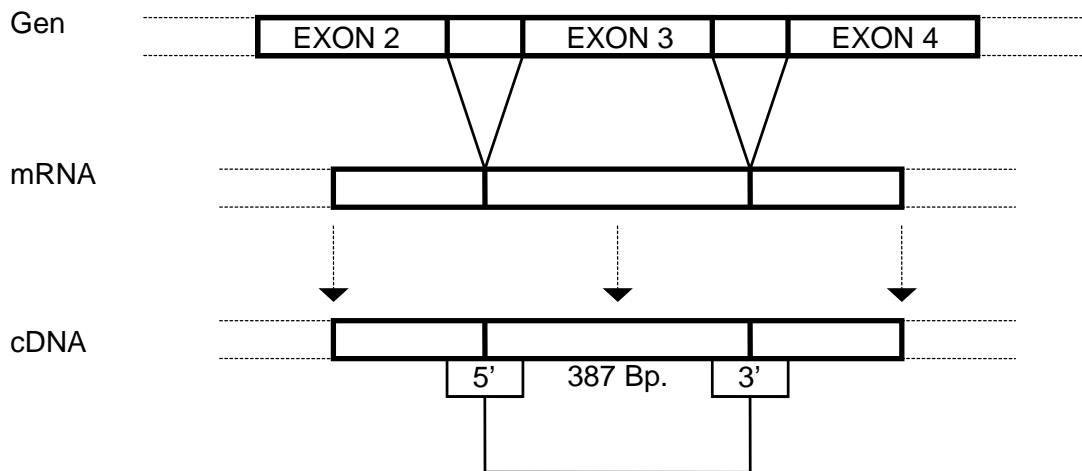
β -Aktin

Abb. 2.2 : Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen für die PCR von β -Aktin
 Bp: Basenpaare; bezieht sich auf die Anzahl der Basenpaare des jeweiligen PCR-Produktes

Primer der PCR von β -Aktin:

3' (antisense): 5' - ACT CCA TGC CCA GGA AGG A - 3'

5' (sense): 5' - TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA - 3'

Für die PCR-Ansätze der β -Aktin- und der primären PTHrP-PCRs wurden zunächst je 4 μ l cDNA (vergl. 2.8.7) in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und 1 μ l jedes Oligonukleotids der entsprechenden Primerpaare, sowie 36,25 μ l autoklaviertes Wasser hinzugefügt. Anschließend wurden 7,75 μ l des Reaktionsansatzes hineinpipettiert und das Reaktionsgemisch mit 30 μ l Mineralöl überschichtet. Der Reaktionsansatz für den 50 μ l Ansatz einer Probe setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen:

- 5 μ l 10 x PCR-Puffer
- 1 μ l 10 mM dNTP-Mix
- 1,5 μ l 50 mM MgCl₂
- 0,25 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l).

Die Taq-DNA-Polymerase wurde zuletzt in den Ansatz pipettiert, um Aktivitätsverlusten des Enzyms vorzubeugen.

Als positive Kontrollen dienten für die β -Aktin-PCR Zellen der Zelllinien 786.O und MCF-7,

für die PTHrP-PCR wurden 786.O und MB-231 eingesetzt.

Für die Negativkontrolle wurden dem Ansatz 4 μ l autoklaviertes Wasser anstelle der cDNA hinzugefügt.

Die Ansätze der nested-PTHrP-PCR wurden nach dem gleichen Schema pipettiert. Der Unterschied bestand darin, dass 2 μ l des 1:10 verdünnten Produktes der primären PTHrP-PCR zum Schluss in den Ansatz hineingegeben wurden.

Alle drei PCRs wurden mit dem folgenden Programm im Thermocycler ausgeführt:

1 Zyklus	Initiale Denaturierung:	94°C für 5 Minuten
	Anlagerung:	58°C für 1 Minute
	Extension:	72°C für 1 Minute
30 Zyklen	Denaturierung:	94°C für 1 Minute
	Anlagerung:	58°C für 1 Minute
	Extension:	72°C für 1 Minute
1 Zyklus	Denaturierung:	94°C für 1 Minute
	Anlagerung:	58°C für 1 Minute
	Extension:	72°C für 7 Minuten.

Die PCR-Produkte wurden bei -20°C konserviert.

2.8.10 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Molekülen nach Ladung und Länge. Die Nukleinsäuremoleküle wandern dabei von der Kathode zur Anode der Elektrophoresekammer, wobei sich die Migrationsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Molekülgröße verhält.

Dieses Verfahren diente dem Nachweis der spezifischen PCR-Produkte. Das für die elektrophoretische Auftrennung verwendete 1,25% Agarosegel wurde durch Lösen von 1,25 g Agarose in 100 ml 1 x TBE unter Erhitzen und anschließendes Zutropfen von 10 μ l Ethidiumbromid (0,001%) hergestellt.

10 μ l des PCR-Produktes wurden mit 3 μ l Ladepuffer versetzt und in je eine Geltasche eingefüllt. Als Längenstandard fand der Molecular Weight Marker VI von Boehringer Verwendung, welcher DNA-Fragmente von 154 bis 2176 Basenpaaren Länge enthält. Dieser wurde im Verhältnis 1:9:2 mit autoklaviertem Wasser und Ladepuffer gemischt in das Gel geladen. Die Laufzeit betrug 60 Minuten bei 80 Volt.

Die mit Ethidiumbromid markierten DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht von 254 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und durch Fotografieren mit einer Video angeschlossenen Kamera dokumentiert.

2.8.11 Southern Blot

Durch die Technik des Southern Blots wurden DNA-Bruchstücke aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran mit Hilfe von Kapillarkräften überführt.

Diese Methode wurde mit den Produkten der nested-PTHrP-PCR und bei den Proben, die bereits in der primären PCR ein positives Ergebnis aufwiesen, durchgeführt.

Zunächst wurde das Gel für jeweils 2 x 15 Minuten mit einmaligem Pufferwechsel in Denaturierungspuffer und anschließend in Neutralisationspuffer gewaschen, wobei für das Puffervolumen 2 ml pro ml Gel veranschlagt wurden. Für den Blotaufbau wurde das Prinzip des Kapillarblots herangezogen:

Das Gel wurde mit der Öffnung der Taschen nach unten auf einem Filterpapierstreifen platziert, dessen Enden in 20 x SSC eingetaucht waren. Auf das Gel wurde eine Nylonmembran mit 0,45 nm Porengröße aufgelegt und die Ränder so mit Parafilm abgedeckt, dass lediglich die PCR-Produkt-haltigen Anteile des Gels dem kapillaren Sog ausgesetzt waren. Abschließend wurde ein zweiter Filterpapierstreifen auf die Membran gelegt, an welchen sich ein Zellstoffstapel anschloss. Alle Schichten mussten untereinander in luft- und faltenfreiem Kontakt stehen.

Der gesamte Blotaufbau wurde mit einem leichten Gewicht so beschwert, dass es gleichmäßigen Druck ausübte.

Nach 6 bis 8 Stunden wurde der Nylonfilter zur Fixation der DNA für 20 Minuten bei 120°C gebacken und danach bei Raumtemperatur trocken gelagert.

2.8.12 Herstellung spezifischer markierter Sonden

Die Herstellung von markierten Sonden geschah durch den kompetitiven Einbau von Digoxigenin-markiertem Desoxyuridintriphosphat (DIG-dUTP) und dATP am 3'-Ende eines zur nachzuweisenden DNA komplementären Oligonukleotids mit Hilfe der terminalen Transferase.

Als spezifische Oligonukleotide dienten zwei Oligonukleotide, deren Bindungsstellen sich auf der Exongrenze 3/4 des PTHrP-Gens befanden (vergl. 2.6.8) und folgende Sequenzen besaßen:

us 4: 5' - TCC TGC GGG CGC TCG GT - 3'

us 1: 5' - CTC AAA AGA GCT GTC TGA ACA - 3'

Das Oligonukleotid us 4 war komplementär zu einer Sequenz in Exon 3 des PTHrP-Gens, während us 1 komplementär zu einer Basenfolge der Region war, in der Exon 3 und Exon 4 aneinandergrenzen (vergleiche Abb. 1).

Es wurden 200 ng eines zu markierenden Oligonukleotids in ein steriles

Mikrozentrifugengefäß transferiert, auf Eis gekühlt gelagert und die folgenden Substanzen hinzupipettiert:

4 µl	Terminale-Transferase-Reaktionspuffer
4 µl	CoCl ₂ (1:5 in ddH ₂ O verdünnt = 5 mM)
1 µl	Digoxigenin-dUTP (0,35 mmol/l)
1 µl	dATP (1 mmol/l)
2 µl	Terminale Transferase

ad 20 µl mit autoklaviertem Wasser.

Nach kurzem Abzentrifugieren in der Eppendorfszentrifuge wurde der Ansatz bei 37°C für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung (pH 8,0) wurde die Reaktion abgestoppt. Zur Fällung der markierten DNA wurde der Reaktionsansatz mit 2,5 µl LiCl (4 mol/l) und 75 µl auf -20°C gekühltem Ethanol gut gemischt und verblieb für 30 Minuten bei -70°C. Im Anschluss an die 15-minütige Zentrifugation bei 12000 g wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Probe für 15 Minuten in 70% Ethanol gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 12000 g für 10 Minuten, nach welcher der Alkohol bei Raumtemperatur verdampfte und das Reaktionsprodukt in 100 µl autoklaviertem Wasser resuspendiert wurde. Aufbewahrt wurde die Sonde bei -20°C.

2.8.12.1 Dot Blot

Mit dem Dot Blot wurde der Erfolg der Sondenmarkierung und deren Detektionsgrenze überprüft. Je 1 µl einer 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:100000 Verdünnung der Sonde wurde auf eine Nylonmembran aufgetragen, diese an der Luft trocknen gelassen und anschließend für 20 Minuten auf 120°C erwärmt. Darauf folgte ein direkter Immunoassay unter Verwendung des Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente-Alkalische-Phosphatase-Konjugats (Anti-DIG), welches zur Anfärbung des eingebauten Dig-UTP führte.

2.8.13 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde nach dem Standardprotokoll von Boehringer (Kat.Nr. 1093 657) durchgeführt und diente dem Nachweis des spezifischen PCR-Produktes mit Hilfe Digoxigenin-markierter Sonden.

Die zu hybridisierenden Nylonmembranen (vergl. 2.8.10) wurden für 60 Minuten mit 25 ml Prähybridisierungspuffer unter leichtem Schütteln bei 68°C im Wasserbad inkubiert. Während dessen wurde der Hybridisierungspuffer, bestehend aus 25 ml des Prähybridisierungspuffers und 100 µl der markierten Sonde, zur Denaturierung auf 100°C erhitzt. Nach diesem Schritt durfte der Puffer nicht mehr unter 68°C abkühlen.

Nachfolgend wurde der Prähybridisierungspuffer verworfen und die spezifische Hybridisierung durch Inkubation der Membranen mit dem Hybridisierungspuffer unter leichtem Schütteln bei 68°C im Wasserbad für mindestens 6 Stunden vollzogen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Hybridisierungspuffer in ein steriles Gefäß dekantiert und zur Wiederverwendung bei -20°C gelagert.

Bevor die hybridisierten Nylonfilter bei Raumtemperatur luftgetrocknet wurden, erfolgte das Waschen in jeweils 50 ml Waschlösung 1 und 2 für je 2 x 15 Minuten.

2.8.14 Immunologischer Nachweis (Färbereaktion)

Die Anfärbung der hybridisierten Nylonmembranen geschah durch einen monoklonalen Antikörper gegen Digoxigenin, an dessen Fab-Fragment alkalische Phosphatase gekoppelt war. Das Enzym katalysierte eine Farbreaktion, deren Produkt sich als blauer Niederschlag auf den entsprechenden Stellen bildete.

Alle Schritte der immunologischen Nachweisreaktion mit Ausnahme der Färbereaktion wurden unter leichtem Rütteln und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Membran wurde für 1 Minute in 20 ml Puffer 1 (Maleinsäure) und nachfolgend für 30 Minuten in 20 ml Blockpuffer (Puffer 2) gewaschen, worauf sich die 30-minütige Inkubation mit 20 ml Puffer 2, welchem 4 µl Anti-DIG-Konjugat zugesetzt wurden, anschloss. Ungebundenes Antikörperkonjugat wurde durch zweimaliges Waschen in 50 ml Puffer 1, versetzt mit 160 µl Tween 20, für je 15 Minuten entfernt. Der nächste Schritt war das Äquilibrieren der Nylonfilter in 20 ml Puffer 3 für 2 Minuten, dem die Inkubation mit 10 ml Färbelösung im Dunkeln, bei Raumtemperatur und ohne Schütteln des Reaktionsgefäßes folgte.

Die Färbelösung wurde nach der folgenden Anleitung immer frisch angesetzt:

10 ml	Hybridisierungspuffer 3
45 µl	NBT
35 µl	X-Phosphat.

Die Reaktion wurde mit 50 ml Hybridisierungspuffer 4 abgestoppt und die Nylonmembranen bei 80°C gebacken. Gelagert wurden die Membranen bei Raumtemperatur.

Patienten ohne maligne Erkrankung der Mamma

Nr.	Pat.	Alter	Zeitpkt. Mat.	Histologie	untersuchtes Material							
					CK-18 Zytospin	CK-18 Progen	β -Aktin	PTHrP	nested PTHrP	Blot		
1	B.K.	57 J.	Primär- tumor	Fibroadenom vom extrakanalikulären Subtyp	KM PB							
2	W.T.	60 J.	Primär- tumor	fibrös-kleinzystische Mastopathie mit herdförmigen Mikroverkalkungen rechts	KM PB		KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
3	B.T.	42 J.	Primär- tumor	intranalikuläres Fibroadenom mit leichten Epithelproliferationen, fibrös-zystische Mastopathie	KM PB		KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
4	R.H.	52 J.	Primär- tumor	sklerosierende Adenose, fibrös-zystische Mastopathie rechts	KM PB		KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
5	K.R.P.	40 J.	Primär- tumor	verzweigtes, partiell adenoides intraduktales Papillom rechts	KM PB		KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
6	F.R.I.	54 J.	Primär- tumor	fibrös-zystische Mastopathie mit partiell sklerosierter Adenose, Milchgangspapillom rechts	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
7	W.S.	49 J.	Primär- tumor	intraduktales Papillom, fibrös-zystische Mastopathie links	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
8	L.H.	60 J.	Primär- tumor	mäßig starke Fibrose blunt-duct-adenosis fibrös-zystische Mastopathie rechts	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB

Tab. 2.9: untersuchtes Material der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma und Histologie

Zeitpkt. Mat.: Zeitpunkt der Materialgewinnung

KM: Knochenmark

Zytospin: 1×10^5 Zellen je Objektträger

Pat.: Patientin

Progen: 1×10^6 Zellen je Objektträger

PB: peripheres Blut

Patientinnen mit einem Mammakarzinom

Nr.	Patient	Alter	Zeitpkt. Mat.	Histologie	TNM-Klassifikation des Primärtumors						Meta- stasen	untersuchtes Material					
					Stad.	T	N	M	G	CK 18 Zyto.		CK 18 Progen	β-Aktin	PTHrP	nested PTHrP	Blot	
1	P.E.	40 J.	Primärtumor	LCIS rechts (Diagnose nach Metastasen HEP / unbekannter Primarius)	0	Cis	0	0	0		HEP	KM PB				KM PB	KM PB
2	P.X.	57 J.	Primärtumor	multifokales DCIS rechts	0	Cis	0	0	2			KM PB				KM PB	KM PB
3	N.E.	71 J.	Primärtumor	DCIS sklerosiertes Fibroadenom rechts	0	Cis	0	0				KM PB				KM PB	KM PB
4	H.N.D.	51 J.	Primärtumor	DCIS prälobuläre atypische Papillombildung links	0	Cis	0	0				KM PB				KM PB	KM PB
5	H.T.M.	54 J.	Primärtumor	invasiv-lobuläres Mamma-Ca rechts	I	1c	0	0	2			KM PB				KM PB	KM PB
6	N.R.	76 J.	Primärtumor	invasiv-duktales Mamma-Ca links	I	1c	0	0	2			KM PB				KM PB	KM PB
7	C.S.	39 J.	Primärtumor	invasiv-lobuläres Mamma-Ca rechts	IIA	1	1	0	2		LYM	KM					
8	S.R.	54 J.	Primärtumor	teils intraduktal, teils invasiv wachsendes Mamma-Ca links DCIS (high grade) rechts	IIA	1a	1bii	0	2 bis 3			KM PB				KM PB	KM PB
9	L.S.	65 J.	Primärtumor	duktales Mamma-Ca links	IIA	1b	1biii	0	2			KM PB				KM PB	KM PB
10	G.L.	35 J.	Primärtumor	invasives solid-duktales Mamma-Ca, DCIS+CLIS mit beginnender Infiltration rechts	IIA	1b	1	0	2		LYM	KM PB				KM PB TU	KM PB TU

Fortsetzung von Tabelle 2.10

Nr.	Patient	Alter	Zeitpkt. Mat.	Histologie	TNM-Klassifikation des Primärtumors						Meta- stasen	untersuchtes Material				
					Stad.	T	N	M	G	CK 18 Zyto.		CK 18 Progen	β-Aktin	PTHrP	nested PTHrP	Blot
11	G.E.	77 J.	Primärtumor	invasiv-duktales Mamma-Ca rechts	IIA	1c	1biii	0	2	LYM	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
12	H.N.H.	69 J.	Primärtumor	invasives tubulo-lobuläres Mamma-Ca links extraduktale Papillombildung	IIA	1c	1biii	0	2	LYM	KM PB	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU
13	R.S.	46 J.	Primärtumor (Z.n.Ther.)	solid-duktales Mamma-Ca links Fibroadenom (Rezidiv)	IIA	1c	1biii	0	2b	LYM	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
14	K.I.	56 J.	Primärtumor	infiltrierendes teils solides, teils drüsig-kribiformes intraduktales Mamma-Ca rechts	IIA	2	0	0	2		KM					
15	F.E.	60 J.	Primärtumor	Infiltrierendes, z.T. drüsiges, z.T. solides duktales Mamma-Ca links, Fibroadenom/Papillom	IIA	2	0	0	2		KM PB	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU
16	H.L.	48 J.	Primärtumor	invasives solides intraduktales Mamma-Ca rechts	IIA	2	0	0	2		KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
17	H.E.	46 J.	Primärtumor	invasiv-duktales Mamma-Ca rechts	IIA	2	0	0	2		KM PB	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU
18	K.L.F.	61 J.	Primärtumor	invasiv-solides Mamma-Ca links	IIA	2	0	0	2		KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
19	H.T.I.T.	47 J.	Primärtumor	invasives intraduktales Mamma-Ca DCIS v. Komedo-Typ (large cell, high grade) links	IIA	2	0	0	3		KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
20	B.G.	72 J.	Primärtumor	invasiv-duktales Mamma-Ca links und DCIS (low grade) links	IIA	2	0	0	2		KM PB	KM PB	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU

Fortsetzung von Tabelle 2.10

Nr.	Patient	Alter	Zeitpkt. Mat.	Histologie	TNM-Klassifikation des Primärtumors					Meta- stasen	untersuchtes Material					
					Stad.	T	N	M	G		CK 18 Zyto.	CK 18 Progen	β-Aktin	PTHrP	nested PTHrP	Blot
21	K.K.W.	53 J.	Primärtumor	invasiv-tubuläres Mamma-Ca links	IIA	2	0	0	1		KM PB	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU
22	H.T.I.G.	61 J.	Primärtumor	invasives solid-duktales Mamma-Ca links	IIB	2	1biii	0	2	LYM	KM PB					
23	S.T.	58 J.	Primärtumor	solid-duktales Mamma-Ca rechts	IIB	2	1bi	0	2	LYM	KM PB	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU
24	F.R.E.	72 J.	Primärtumor	invasiv-duktales und lobuläres Mamma-Ca, 6 Herde CLIS intraduktales Papillom rechts	IIB	2	1a	0	2	LYM	KM PB	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU
25	L.R.	48 J.	Primärtumor	invasiv-duktales Mamma-Ca rechts, Milchgangpapillom, partiell sklerosierende Adenose	IIB	2	1biii	0	2	LYM	KM PB	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU
26	S.M.	42 J.	Primärtumor	invasiv-duktales Mamma-Ca rechts	IIB	2	1biii	0	3	LYM	KM PB	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU
27	E.T.	31 J.	Primärtumor	invasiv-duktales Mamma-Ca links	IIB	2	1biii	0	2	LYM	KM PB	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU
28	G.N.	46 J.	Primärtumor (Z.n.Theer.)	invasiv-duktales Mamma-Ca links	IIB	2	1biii	0	3	LYM	PB		PB	PB	PB	PB
29	H.R.I.	53 J.	Primärtumor	lobuläres Mamma-Ca rechts	IIIA	1b	2biii	0	2	LYM	KM PB		KM PB	KM PB	KM PB	KM PB
30	H.R.G.	76 J.	Primärtumor	solid-duktales Mamma-Ca und lobuläres CIS links	IIIA	2	2	0	2	LYM	KM PB		KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU	KM PB TU

Fortsetzung von Tabelle 2.10

Nr.	Patient	Alter	Zeitpkt. Mat.	Histologie	TNM-Klassifikation des Primärtumors							Meta- stasen	untersuchtes Material					
					Stad.	T	N	M	G	CK 18 Zyto.	CK 18 Progen		β- Aktin	PTHrP	nested PTHrP	Blot		
31	K.R.E.E.	48 J.	Primär- tumor	duktales Mamma-Ca rechts	IIIA	2	2	0	3					KM	KM	KM	KM	
32	K.L.U.	51 J.	Primär- tumor	invasiv-duktales Mamma-Ca links	IIIA	3	1biii	0	3	LYM				KM	KM	KM	KM	
33	K.R.E.H.	57 J.	Primär- tumor (Z.n. R.v.Ch.)	metastasierendes infiltratives duktales Mamma-Ca links	IIIB	3	3	0	3	LYM				KM	KM	KM	KM	
34	P.M.	55 J.	Primär- tumor	invasiv-lobuläres Mamma-Ca rechts	IIIB	4	1biii	0	3	LYM				KM	KM	KM	KM	
35	R.R.	57 j.	Primär- tumor (Z.n.Theer.)	invasives solid-duktales Mamma-Ca links	IIIB	4	1bi	0	3	LYM								
36	T.U.	57 J.	Primär- tumor	invasiv-duktales Mamma-Ca mit atypischer Papillombildung links	IIIB	4b	1biii	0	2	LYM				KM	KM	KM	KM	
37	S.G.	89 J.	Primär- tumor	invasives solid-duktales Mamma-Ca rechts	IIIB	4b	0	0	2					KM	KM	KM	KM	
38	K.C.	59 J.	Primär- tumor	invasives solid-duktales Mamma-Ca links	IV	1c	1biii	1	2	LYM OSS				KM	KM	KM	KM	
39	C.T.	72 J.	Primär- tumor (Z.n.Theer.)	invasives solid-duktales Mamma-Ca rechts	IV	4	3	1	3	LYM PUL				KM	KM	KM	KM	
40	B.S.	57 J.	Primär- tumor	Adeno-Ca links teils solide , teils muzinös	IV	4b	3	1	2	OSS MAR, PUL HEP, LYM								

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Verdünnungsreihen für den CK-18-Nachweis in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten

Bei der immunzytologischen Färbung der Präparate jedes Verdünnungsreihenansatzes wurde eine Probe peripheren Blutes eines Probanden ohne maligne Erkrankung als Negativkontrolle und ein mit MCF-7 Zellen beschickter Objektträger als positive Kontrolle mitgeführt.

3.1.1 Ergebnisse der Verdünnungsreihe im Bereich von 1×10^3 bis 1×10^6 Tumorzellen

In den mit der Zytozentrifuge hergestellten Präparaten war ein Nachweis von Tumorzellen ab einer Verdünnung von 1×10^{-4} , entsprechend 10 Tumorzellen pro 1×10^5 Zellen, möglich. Von den auf dieser Verdünnungsstufe eingesetzten 10 Zellen der Zelllinie MCF-7 konnte in 2 Verdünnungsansätzen 1 Zelle mit Hilfe der APAAP-Methode detektiert werden, in einem Ansatz keine. Die mittlere Anzahl angefärbter Zellen betrug 0,6 von 10. Von 20 eingesetzten Tumorzellen konnten lediglich in einem Ansatz 4 Zellen detektiert werden, während in den beiden übrigen kein Zellenachweis erfolgte. Der Mittelwert detektierbarer Zellen betrug hier 1,3 von 20 pro 1×10^5 Zellen. Von 50 eingesetzten MCF-7-Zellen wurden im Verdünnungsansatz I 0, im Ansatz II 14 und im Ansatz III 7 Zellen erkannt, was einem Mittelwert von 7 von 50 detektierbaren Zellen entspricht. Bei 100 eingesetzten Zellen betrug die Anzahl der angefärbten Tumorzellen 2, 3 und 7 in den entsprechenden Verdünnungsansätzen (Mittelwert 4 von 100 Zellen) (Tabelle 3.1, Diagramm 3.1).

In den mittels der Immunette hergestellten Präparaten mit 1×10^6 Zellen lag die Detektionsgrenze ebenfalls bei 1×10^{-4} , entsprechend 100 Tumorzellen pro 1×10^6 Zellen. In den 3 Verdünnungsansätzen wurden 9, 38 und 5 von 100 MCF-7-Zellen gefunden. Die mittlere Anzahl detektierter Zellen lag bei 17,3 von 100 eingesetzten Zellen. Von 200 Tumorzellen in 1×10^6 Zellen konnten in dem Verdünnungsansatz I 11, in dem Verdünnungsansatz II 20 und in dem Verdünnungsansatz III 35 MCF-7-Zellen mittels der APAAP-Methode markiert werden, was einem Mittelwert von 22 detektierten Zellen in dieser Verdünnungsstufe entspricht. Von 500 Tumorzellen wurden in den Verdünnungsansätzen I 46, II 41 und III 10 wiedergefunden, was einem Mittelwert von 64 detektierten von 500 Tumorzellen pro 1×10^6 Zellen entspricht. In den Ansätzen mit 1000 MCF-7 Zellen pro 1×10^6 Zellen wurden 123, 136 und 145 Zellen, entsprechend einem Mittelwert von 134,6 von 1000 detektierbaren Zellen, identifiziert (Tabelle 3.2, Diagramm 3.2).

Zytospin / 1×10^5 Zellen						
Präparat	Verdünnung	eingesetzte Tumorzellzahl	Verdünnungsansatz / detektierte Zellen			Mittelwert detektierter Zellen
			I	II	III	
1	1×10^{-6}	0,1	0	0	0	0
2	$0,2 \times 10^{-5}$	0,2	0	0	0	0
3	$0,5 \times 10^{-5}$	0,5	0	0	0	0
4	1×10^{-5}	1	0	0	0	0
5	1×10^{-4}	10	0	1	1	0,6
6	2×10^{-4}	20	0	4	0	1,3
7	5×10^{-4}	50	0	14	7	7
8	1×10^{-3}	100	2	3	7	4

Tab. 3.1: Darstellung der detektierten Zellen in Zytocentrifugationspräparaten bezogen auf die Verdünnungsstufe bzw. die in 1×10^5 Zellen eingesetzte Tumorzellzahl

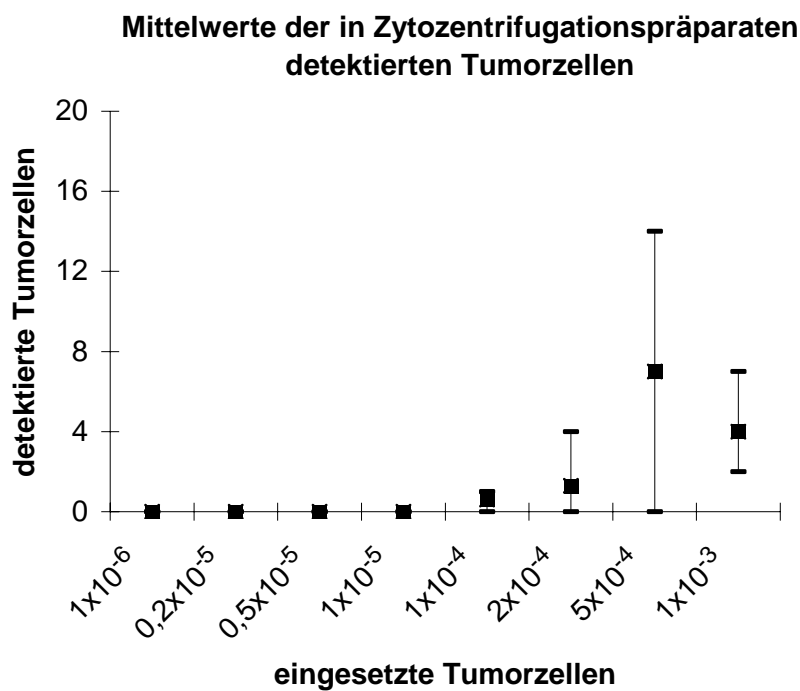


Diagramm 3.1: Darstellung der mittleren detektierten Tumorzellzahl in den Zytocentrifugationspräparaten (1×10^5 Zellen). Der höchste und der niedrigste detektierte Wert des jeweiligen Verdünnungsschrittes sind mit aufgetragen.

Immunette / 1×10^6 Zellen						
Präparat	Verdünnung	eingesetzte Tumorzellzahl	Verdünnungsansatz / detektierte Zellen			Mittelwert detektierter Zellen
			I	II	III	
1	1×10^{-6}	1	0	0	0	0
2	$0,2 \times 10^{-5}$	2	0	2	0	0,6
3	$0,5 \times 10^{-5}$	5	0	0	0	0
4	1×10^{-5}	10	0	0	0	0
5	1×10^{-4}	100	9	38	5	17,3
6	2×10^{-4}	200	11	20	35	22
7	5×10^{-4}	500	46	41	105	64
8	1×10^{-3}	1000	123	136	145	134,6

Tab. 3.2: Darstellung der detektierten Zellen in Sedimentationspräparaten bezogen auf die Verdünnungsstufe bzw. die in 1×10^6 Zellen eingesetzte Tumorzellzahl

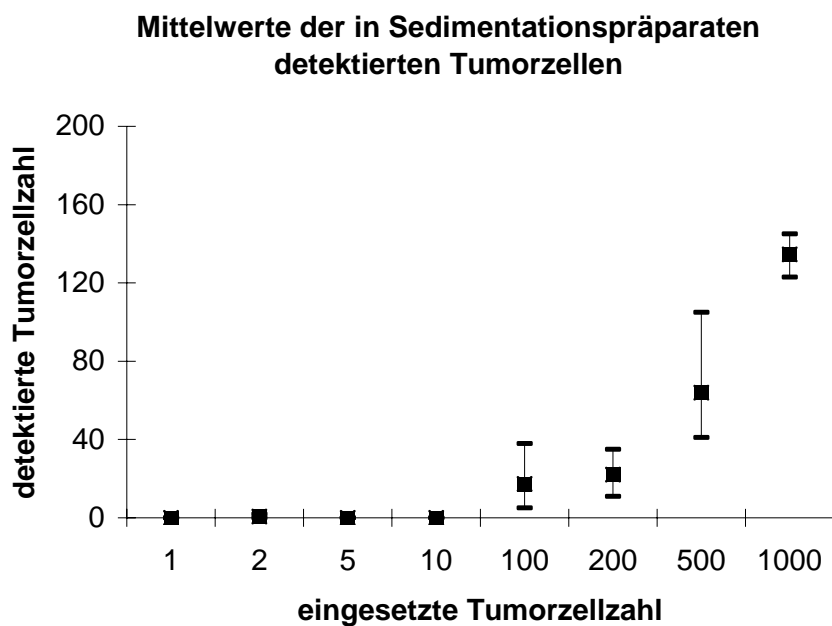


Diagramm 3.2: Darstellung der mittleren detektierten Tumorzellzahl in den Sedimentationspräparaten (1×10^6 Zellen). Der höchste und der niedrigste detektierte Wert des jeweiligen Verdünnungsschrittes sind mit aufgetragen.

3.1.2 Ergebnisse der Verdünnungsreihe im Bereich 1×10^{-4} bis 1×10^{-5} Tumorzellen

Die Verdünnungsreihe 2 wurde angelegt, um eine genauere Detektionsgrenze zwischen den Verdünnungen von 1×10^{-5} und 1×10^{-4} Tumorzellen pro 1×10^5 bzw. 1×10^6 Zellen, die in der ersten Verdünnungsreihe ermittelt wurde, zu bestimmen.

In den Zytozentrifugationspräparaten konnte in einem Ansatz 1 von 5 eingesetzten Tumorzellen in 1×10^5 Zellen mit dem Antikörper gegen CK 18 angefärbt werden, was einer mittleren Anzahl detektierter Tumorzellen von 0,3 von 5×10^{-5} eingesetzten Tumorzellen entsprach. In den 3 Ansätzen der Verdünnungen von 1, 2 und 10 Tumorzellen in 1×10^5 Zellen gelang kein Nachweis von Tumorzellen mittels der APAAP-Methode (Tabelle 3.3, Diagramm 3.3).

In den Sedimentationspräparaten lag die Detektionsgrenze bei 1×10^{-5} , entsprechend 10 Tumorzellen in 1×10^6 Zellen. In den 3 Ansätzen wurden 0, 1 und 3 von 10 eingesetzten Zellen gefunden. Die mittlere Anzahl detektierter Tumorzellen betrug 1 von 10 MCF-7-Zellen in 1×10^6 Zellen. In den Ansätzen mit 20 MCF-7 Zellen pro 1×10^6 Zellen konnten 1, 3 und 1 Zellen detektiert werden, entsprechend einem Mittelwert von 1,6 von 20 eingesetzten Tumorzellen. Von 50 in 1×10^6 verdünnten Tumorzellen konnten 0, 4 und 4 Zellen mit dem gegen CK 18 gerichteten Antikörper markiert werden, was einer mittleren nachweisbaren Anzahl von 2,6 Tumorzellen in dieser Verdünnungsstufe entspricht. Der Mittelwert wiedergefundener Tumorzellen bei einer Verdünnung von 100 MCF-7-Zellen in 1×10^6 Zellen betrug 3. Bei dieser Verdünnung konnten 1, 3 und 5 von 100 eingesetzten Zellen in den jeweiligen Ansätzen detektiert werden.

Zytospin / 1×10^5 Zellen						
Präparat	Verdünnung	eingesetzte Tumorzellzahl	Verdünnungsansatz / detektierte Zellen			Mittelwert detektierter Zellen
			I	II	III	
4	1×10^{-5}	1	0	0	0	0
4a	2×10^{-5}	2	0	0	0	0
4b	5×10^{-5}	5	0	1	0	0,3
5	1×10^{-4}	10	0	0	0	0

Tab. 3.3: Darstellung der detektierten Zellen in Zytozentrifugationspräparaten bezogen auf die Verdünnungsstufe bzw. die in 1×10^6 Zellen eingesetzte Tumorzellzahl

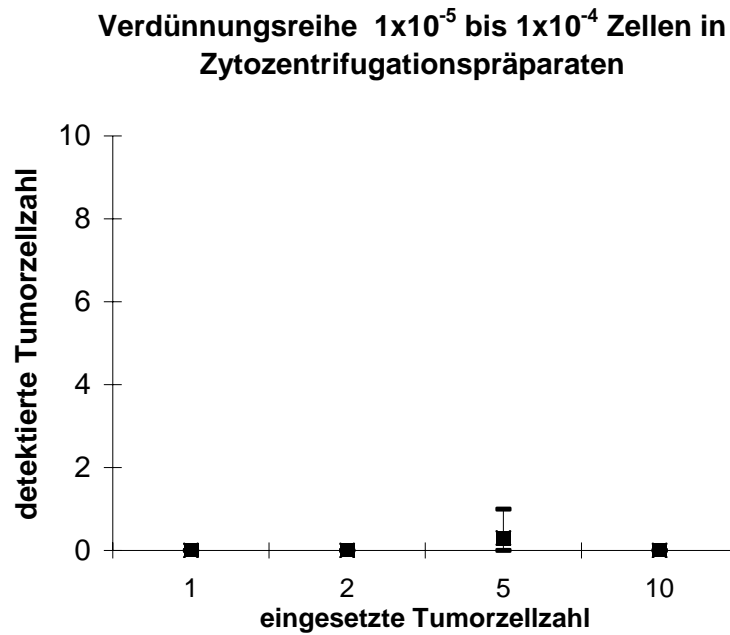


Diagramm 3.3: Darstellung der mittleren detektierten Tumorzellzahl in den Zytozentrifugationspräparaten (1×10^5 Zellen). Der höchste und der niedrigste detektierte Wert des jeweiligen Verdünnungsschrittes sind mit aufgetragen.

Immunette / 1×10^6 Zellen

Präparat	Verdünnung	eingesetzte Tumorzellzahl	Verdünnungsansatz / detektierte Zellen			Mittelwert detektierte Zellen
			I	II	III	
4	1×10^{-5}	10	0	1	2	1
4a	2×10^{-5}	20	1	3	1	1,6
4b	5×10^{-5}	50	0	4	4	2,6
5	1×10^{-4}	100	1	3	5	3

Tab. 3.4: Darstellung der detektierten Zellen in Sedimentationspräparaten bezogen auf die Verdünnungsstufe bzw. die in 1×10^6 Zellen eingesetzte Tumorzellzahl

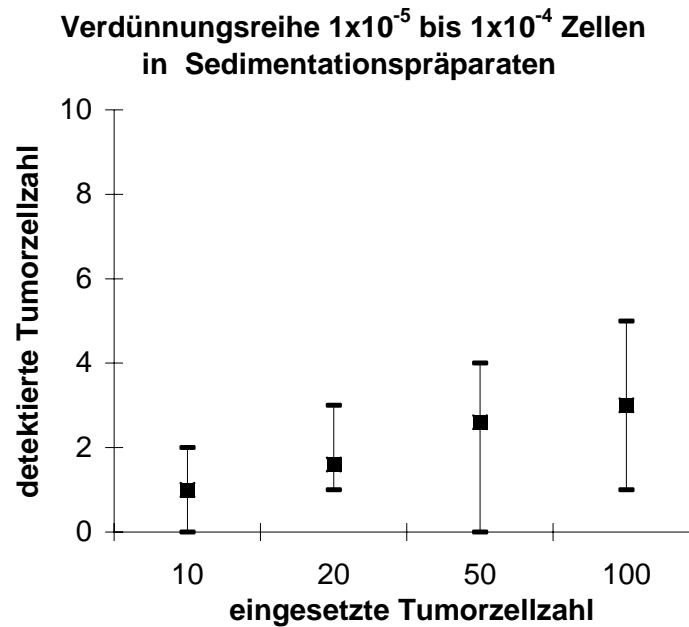


Diagramm 3.4: Darstellung der mittleren detektierten Tumorzellzahl in den Sedimentationspräparaten (1×10^6 Zellen) der Verdünnungsreihe 2. Der höchste und der niedrigste detektierte Wert des jeweiligen Verdünnungsschrittes sind mit aufgetragen.

3.1.3 Übersicht über beide Verdünnungsreihen und Darstellung der Detektionsgrenze

Die Tabelle 3.5 gibt die mittlere Anzahl der detektierten Tumorzellzahlen beider Verdünnungsreihen für die Zentrifugations- und Sedimentationspräparate wieder. Die Mittelwerte der Verdünnungsschritte 4 und 5 wurden aus den detektierten Tumorzellzahlen beider Verdünnungsreihen ermittelt.

Verdünnungs- schritt	Verdünnung	Mittelwerte	
		Zytospin (1×10^5 Zellen)	Immunette (1×10^6 Zellen)
1	1×10^{-6}	0	0
2	$0,2 \times 10^{-5}$	0	0,6
3	$0,5 \times 10^{-5}$	0	0
4	1×10^{-5}	0	0,5
4a	2×10^{-5}	0	1,6
4b	5×10^{-5}	0,3	2,6
5	1×10^{-4}	0,3	10,16
6	2×10^{-4}	1,3	22
7	5×10^{-4}	7	64
8	1×10^{-3}	4	134,6

Tab. 3.5: Darstellung der Mittelwerte der Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparate beider Verdünnungsreihen; Zytospin: Zytozentrifugationspräparate, Immunette: Sedimentationspräparate

In dem Diagramm 3.5 sind die relativen detektierten Tumorzellzahlen in den Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten beider Verdünnungsreihen sowie die Mittelwerte der detektierten Tumorzellen aus Tabelle 3.5 in Relation zu den Verdünnungsstufen aufgetragen. Die Mittelwerte aus den Einzelmessungen der jeweiligen Verdünnungsstufen wurden zur besseren Vergleichbarkeit beider Methoden zu einer Kurve verbunden. Der Verlauf der Kurve der Sedimentationspräparate verläuft ab der Verdünnungsstufe 1×10^{-5} nahezu linear, während der Verlauf der Kurve der Zytozentrifugationspräparate keine Linearität erkennen lässt. Tumorzellnachweise in einzelnen Verdünnungsansätzen konnten in den Sedimentationspräparaten bei einer Verdünnungsstufe von $0,2 \times 10^{-5}$, entsprechend 2 eingesetzten Tumorzellen in 1×10^6 Zellen, geführt werden. Ein Nachweis von Tumorzellen in zwei Verdünnungsansätzen gelang in den Sedimentationspräparaten bei einer Verdünnung von 1×10^{-5} , in allen drei Verdünnungsansätzen erst ab einer Verdünnungsstufe von 2×10^{-5} , entsprechend 10 bzw. 20 Tumorzellen in 1×10^6 Zellen. In den Zytozentrifugationspräparaten konnten Tumorzellen in einzelnen Ansätzen in einer Verdünnung von 5×10^{-5} Zellen, entsprechend 5 Tumorzellen in 1×10^5 Zellen, detektiert werden. Ein zuverlässigerer Nachweis von Tumorzellen in mindestens 2 Verdünnungsansätzen der Zytospinpräparate wurde ab einer Verdünnungsstufe von 1×10^{-4} bis 2×10^{-4} , entsprechend 10 bzw. 20 Tumorzellen in 100000 Zellen, beobachtet.

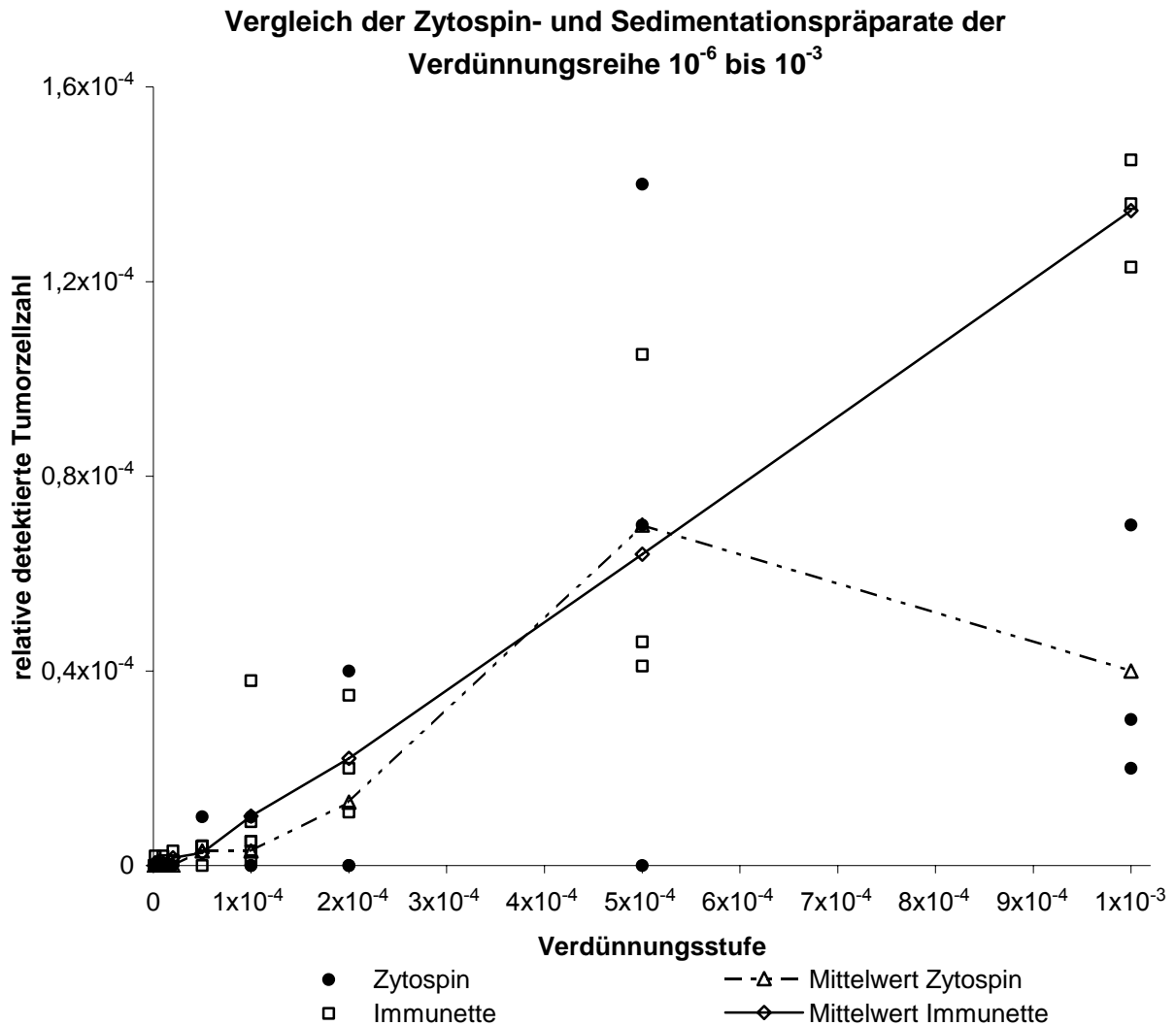


Diagramm 3.5: Darstellung der mittleren detektierten Zellzahlen beider Verdünnungsreihen der Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparate. In den Verdünnungsschritten 4 und 5 wurde der Mittelwert aus den Ergebnissen beider Verdünnungsreihen ermittelt; Zytospin: Zytozentrifugationspräparate, mit 1×10^5 Zellen, Immunette: Sedimentationspräparate, mit 1×10^6 Zellen

3.2 Lichtmikroskopische Auswertung der Knochenmark- und Blutausstriche in der Pappenheimfärbung

Ausstriche des KM und PB wurden von 37 Patientinnen, nur des KM von 5 und nur des PB von 4 Patientinnen angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. In der lichtmikroskopischen Auswertung war in keinem der Knochenmark- und Blutausstriche ein Anhalt für disseminierte Tumorzellen zu erkennen. Als Kriterium der Erkennung von Tumorzellen galten Tumorzellnester (Cluster) und die Zellmorphologie.

Bei einer Patientin (B.S.) mit einem Tumor des Stadiums IV, von der lediglich das PB untersucht wurde, wurde pathohistologisch eine Infiltration des Knochenmarks festgestellt. Der Blutaussstrich dieser Patientin stellte sich unauffällig dar.

3.3 Ergebnisse des immunzytologischen Nachweises von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten

3.3.1 Ergebnisse der auf CK 18 untersuchten Zytozentrifugationspräparate des Materials der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

KM und PB aller 8 Patientinnen wurden anhand von Präparaten, die mit der Zytozentrifugationstechnik hergestellt wurden, auf CK 18 untersucht.

Bei 2 von 8 (25%) Patientinnen war CK 18 im KM (K.R.P., L.H.) und bei keiner der 8 im PB nachweisbar. Negative Ergebnisse fanden sich bei 6 von 8 (75%) Patientinnen im KM (B.K., W.T., B.T., R.H., F.R.I., W.S.) und 8 von 8 (100%) im PB (Tabelle 3.6). 6 der 8 untersuchten Patientinnen (75%) zeigten negative Ergebnisse im KM und PB.

Material	Patientenanzahl	CK 18	
		positiv	negativ
KM	8	2	6
PB	8	0	8

Tab. 3.6: Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM und PB der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

3.3.2 Ergebnisse der immunzytologischen Untersuchung für CK 18 des Patientenkollektivs mit einem Mammakarzinom

3.3.2.1 Auswertung der immunzytologisch auf CK 18 untersuchten Zytozentrifugationspräparate des gesamten Patientenkollektivs mit einem Mammakarzinom bezogen auf das Stadium des Tumors

Von den 46 Patientinnen mit einem Karzinom der Mamma wurden von 36 KM und PB, von jeweils 5 nur KM und nur PB in Zytozentrifugationspräparaten gegen CK 18 gefärbt.

Positive Ergebnisse für CK 18 in den mit der Zytozentrifugationsmethode hergestellten Präparaten wurde bei 10 von 41 Patientinnen (24,39%) im KM nachgewiesen, von denen 1 Probe von einer Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma stammte (N.K.). Bei 4 von 41 Patientinnen (9,76%) wurden CK 18 exprimierende Zellen im PB gefunden. Negativ stellten sich 31 von 41 KM (75,61%) und 37 von 41 PB (90,24%) dar.

Die Anzahl detektierter Tumorzellen reichte in Präparaten des KM von 3 bis 19 Zellen, im PB von 3 bis 14 Zellen, die zum Teil als Cluster vorlagen.

Die Tabellen 3.7 und 3.8 stellen die CK-18-positiven Ergebnisse der KM- und PB-Proben bezogen auf das Tumorstadium und die Anzahl der untersuchten Patientinnen dar. Die Patientinnen mit einem Rezidiv sind unter dem Stadium ihres Primärtumors aufgeführt. Das primäre Karzinom der Patientin mit dem Zweitkarzinom der Mamma hatte ein Stadium I, das Zweitkarzinom wurde mit T1 N2 bei nicht definiertem Fernmetastasenstatus beschrieben, weshalb der Tumor keinem Stadium der TNM-Klassifikation zugeordnet werden konnte und als "nicht definiert" aufgeführt ist. Bei einer Patientin (K.K.I.) mit positivem Lymphknotenstatus wurde die Tumorgöße nicht festgelegt, weshalb diese Patientin in Tabelle 3.7 und 3.8 unter der selben Kategorie aufgeführt ist.

Stadium	Patientenanzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		KM pos.	KM neg.
0	4	1	3
I	2	1	1
II A	18	4	14
II B	5	1	4
III A	4	0	4
III B	4	1	3
IV	2	1	1
nicht definiert	2	1	1
Gesamt	41	10	31

Tab. 3.7: Ergebnisse der gegen CK 18 gefärbten Zytozentrifugationspräparate des KM bezogen auf die Anzahl untersuchter Patientinnen und das Tumorstadium; nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren einer Stadieneinteilung im Sinne der TNM-Klassifikation nicht zugänglich, pos.: positiv, neg.: negativ

Stadium	Patienten- anzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		PB pos.	PB neg.
0	4	0	4
I	2	0	2
II A	16	2	14
II B	8	0	8
III A	2	0	2
III B	5	2	3
IV	3	0	3
nicht definiert	1	0	1
Gesamt	41	4	37

Tab. 3.8: Ergebnisse der gegen CK 18 gefärbten Zytozentrifugationspräparate des PB bezogen auf die Anzahl untersuchter Patientinnen und das Tumorstadium; nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren einer Stadieneinteilung im Sinne der TNM-Klassifikation nicht zugänglich, pos.: positiv, neg.: negativ

In der immunzytologischen Untersuchung auf CK 18 an Zytozentrifugationspräparaten wurde bei 1 von 36 Patientinnen (2,78%) (S.G.) mit einem Tumor des Stadiums IIIB ein positives Ergebnis sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut gefunden. 7 von 36 (19,44%) wiesen ein positives Resultat im KM und ein negatives im PB auf (K.L.F., F.R.E., P.E., K.C., B.G., K.K.W., N.R.). CK-18-negativ im KM und CK-18-positiv im PB waren 2 von 36 Patientinnen (5,56%) (R.S., H.R.). In 26 von 36 Fällen (72,22%) war keine Tumorzell dissemination im KM und PB nachweisbar. Die Tabelle 3.9 stellt die für CK 18 im KM und PB gefundenen Ergebnisse vergleichend dar.

n=36	KM pos.	KM neg.
PB pos.	1	2
PB neg.	7	26

Tab. 3.9: Vergleich der Ergebnisse von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM und PB aller Patientinnen mit einem Mammakarzinom; n: Anzahl, pos.: positiv, neg.: negativ

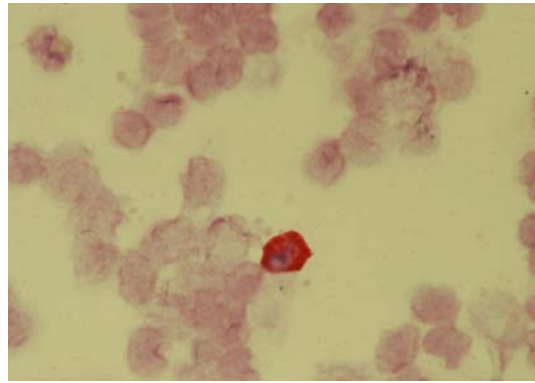


Abb. 3.1: Mit der APAAP-Methode gegen CK 18 gefärbtes Zytozentrifugationspräparat einer KM-Probe

3.3.2.2 Ergebnisse der immunzytologischen Untersuchung auf CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom

Von 33 der 41 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom wurden KM und PB mittels der immunzytologischen Diagnostik an Zytozentrifugationspräparaten auf die Expression von CK 18 überprüft. Bei 4 Patientinnen geschah dies nur an Präparaten des KM (C.S., K.I., K.R.E.E., K.L.U.) und bei 4 Patientinnen nur an Objektträgern des PB (S.T., G.N., R.R., B.S.).

Bei 9 von 37 (24,32%) Patientinnen mit der Diagnose eines primären Mammakarzinoms wurde eine Tumorzell dissemination im KM festgestellt. Von diesen hatte 1 einen Tumor im Stadium 0 (P.E.), 1 einen Tumor im Stadium I (N.R.), 4 einen Tumor im Stadium IIA (K.I., K.L.F., B.G., K.K.W.), 1 einen Tumor im Stadium IIB (F.R.E.), 1 einen Tumor im Stadium IIIB (S.G.) und 1 einen Tumor im Stadium IV (K.C.). Bei 4 der 37 (10,81%) Patientinnen wurden Tumorzellen im PB nachgewiesen, wobei 2 einen Tumor im Stadium IIA (S.R., R.S.) und 2 einen Tumor im Stadium IIIB hatten (R.R., S.G.). Das Material der Patientinnen R.R. (Stadium III B) und R.S. (Stadium IIA) wurde nach begonnener Chemo- und / oder Radiotherapie gewonnen. 28 von 37 (75,68%) KM-Proben und 33 von 37 (89,19%) PB-Proben zeigten keinen Anhalt für eine CK 18-Expression. Der Tumor einer Patientin (K.K.I.) konnte keinem Stadium der TNM-Klassifikation zugeordnet werden, da die Tumorgöße nicht festgelegt wurde (Tabellen 3.10 und 3.11)

Stadium	Patienten- anzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		KM pos.	KM neg.
0	4	1	3
I	2	1	1
II A	15	4	11
II B	5	1	4
III A	4	0	4
III B	4	1	3
IV	2	1	1
nicht definiert	1	0	1
Gesamt	37	9	28

Tab. 3.10: Ergebnisse für CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten des KM von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Probenanzahl und das Stadium des Tumors; Zytospin: Zytocentrifugationspräparate, nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren im Rahmen der TNM-Klassifikation nicht klassifizierbar, pos.: positiv, neg.: negativ

Stadium	Patienten- anzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		PB pos.	PB neg.
0	4	0	4
I	2	0	2
II A	13	2	11
II B	7	0	7
III A	2	0	2
III B	5	2	3
IV	3	0	3
nicht definiert	1	0	1
Gesamt	37	4	33

Tab. 3.11: Ergebnisse für CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten des PB von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Probenanzahl und das Stadium des Tumors; Zytospin: Zytocentrifugationspräparate, nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren im Rahmen der TNM-Klassifikation nicht klassifizierbar, pos.: positiv, neg.: negativ

Von 33 Patientinnen, von denen beide Probenarten untersucht wurden, wiesen die Zytocentrifugationspräparate des Knochenmarks und des peripheren Blutes 1 Patientin (3,03%) mit einem Tumor des Stadiums IIIB (S.G.) positive Ergebnisse für CK 18 auf. In 7 von 33 Fällen (21,21%) waren CK-18-exprimierende Zellen im KM identifizierbar, nicht jedoch im PB. Hierbei handelte es sich um Proben von Patientinnen mit Tumoren im Stadium 0 (P.E.), im Stadium I (N.R.), im Stadium IIA (K.L.F., B.G., K.K.W.), im Stadium IIB (F.R.E.) und im Stadium IV (K.C.). Ein Nachweis von CK 18 im PB bei fehlender CK-18-Expression im KM lag in 2 von 33 Fällen (6,06%) vor. Beide Patientinnen hatten einen Tumor im

Stadium IIA (S.R., R.S.). 23 von 33 Patientinnen (69,7%) zeigten weder im KM noch im PB CK-18-Positivität (Tabelle 3.12, Diagramm 3.6).

n=30	KM pos.	KM neg.
PB pos.	1	2
PB neg.	7	23

Tab. 3.12: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM und PB der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; n: Anzahl, pos.: positiv, neg.: negativ

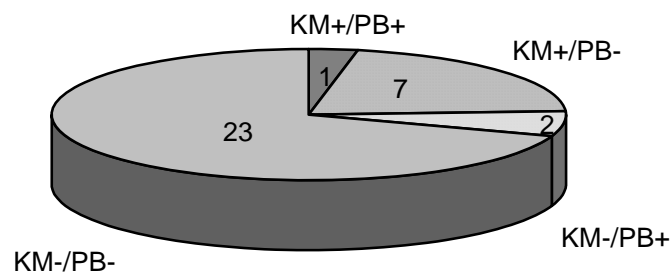


Diagramm 3.6: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in KM- und PB-Proben des Kollektives der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; aufgetragen sind nur die 33 Patientinnen, von denen Zytozentrifugationspräparate des KM und PB auf CK 18 untersucht wurden.

3.3.2.3 Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen

15 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose ihres Tumors einen negativen Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus auf. Bei einer Patientin mit einem Carcinoma in situ wurden vor dem Diagnosezeitpunkt Lebermetastasen festgestellt, deren Ursprung histologisch nicht geklärt werden konnte und bei der das Vorliegen eines anderen Malignoms ausgeschlossen wurde (P.E.), weshalb die Patientin in dieser Gruppe aufgeführt wird.

Das KM und PB von 14 Patientinnen dieser Gruppe wurde in Zytozentrifugationspräparaten auf die Expression von CK 18 überprüft. Bei 1 Patientin wurde die Untersuchung lediglich an Präparaten des KM durchgeführt (K.L.U.).

CK-18-exprimierende Zellen wurden bei 7 von 15 Patientinnen (46,67%) im KM festgestellt. Davon hatte 1 Patientin ein Carcinoma in situ (P.E.), 1 einen T1-Tumor (N.R.), 4 einen T2-Tumor (K.I., K.L.F., B.G., K.K.W.) und 1 einen T4-Tumor (S.G.). Bei 1 der 14 Patientinnen

(7,14%) mit einem Tumor der Größe T4 wurden Tumorzellen im PB identifiziert (S.G.). Negative Ergebnisse für CK 18 wurden in 8 von 15 Fällen (53,33%) im KM und bei 13 von 14 Fällen (92,86%) im PB beobachtet (Tabelle 3.13 und 3.14).

Tumorgröße	Patientenanzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		KM pos.	KM neg.
Tis	4	1	3
T1	2	1	1
T2	8	4	4
T4	1	1	0
Gesamt	15	7	8

Tab. 3.13: Ergebnisse für CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten des KM von nodal negativen Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Anzahl der Proben und die Größe des Tumors; Zytospin: Zytocentrifugationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ

Tumorgröße	Patientenanzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		PB pos.	PB neg.
Tis	4	0	4
T1	2	0	2
T2	7	0	7
T4	1	1	0
Gesamt	14	1	13

Tab. 3.14: Ergebnisse für CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten des PB von nodal negativen Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Anzahl der Proben und die Größe des Tumors; Zytospin: Zytocentrifugationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ

Bei 1 von 14 Patientinnen (7,14%) waren sowohl das KM als auch das PB CK-18-positiv (S.G.). 5 von 14 Patientinnen (35,71%) wiesen ein positives Ergebnis für CK 18 im KM, nicht aber im PB auf. Davon hatte 1 ein Carcinoma in situ (P.E.), 1 einen T1-Tumor (N.R.) und 3 einen T2-Tumor (K.L.F., B.G., K.K.W.). In den Proben peripheren Blutes konnte bei keiner der Patientinnen dieser Gruppe eine Tumorzell dissemination nachgewiesen werden. 8 von 14 (57,14%) Patientinnen zeigten keinen Anhalt für eine gleichzeitige CK-18-Expression im KM und PB (Tabelle 3.15).

n=14	KM pos.	KM neg.
PB pos.	1	0
PB neg.	5	8

Tab. 3.15: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM und PB der nodal negativen Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; n: Anzahl, pos.: positiv, neg.: negativ

3.3.2.4 Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen

Bei 23 der 41 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom hatte der Tumor bereits in die Lymphknoten metastasiert, wobei kein Nachweis von Fernmetastasen vorlag. Eine Chemo- und / oder Strahlentherapie war bei 4 Patientinnen vor der Materialgewinnung bereits begonnen worden (R.S., G.N., K.R.E.H., R.R.). Bei 1 der Patientinnen wurde die Tumorgröße nicht festgelegt, wodurch die Einteilung des Tumors in ein Stadium nach der TNM-Klassifikation nicht möglich war (K.K.I.). Diese wird in der unten aufgeführten Tabelle als "TX" dargestellt.

Von 17 Patientinnen wurden KM und PB in Präparaten, die mit Hilfe der Zytozentrifuge hergestellt worden waren, mit dem Antikörper gegen CK 18 auf die Expression des Zytokeratins untersucht. Bei 3 Patientinnen wurde diese Untersuchung lediglich an Präparaten des KM (C.S., K.R.E.E., K.L.U.), bei 3 Patientinnen nur an Objektträgern des PB (S.T., G.N., R.R.) durchgeführt.

In 1 von 20 KM (5%) einer Patientin mit einem T2-Tumor (F.R.E.) und 3 von 20 PB (15%) konnten 3 oder mehr Zellen mit dem Antikörper gegen CK 18 markiert werden. Die als positiv bewerteten Präparate des PB stammten von 2 Patientinnen mit einem T1-Tumor (S.R., R.S.) und 1 Patientin mit einem T4-Tumor (R.R.). In 19 von 20 KM (95%) und 17 von 20 PB (85%) wurde keine Tumorzell dissemination entdeckt.

In den Tabellen 3.16 und 3.17 sind die Ergebnisse der Zytozentrifugationspräparate des KM bzw. des PB in Bezug auf die Anzahl untersuchter Proben und die Tumorgröße aufgeführt.

Tumorgröße	Patienten- anzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		KM pos.	KM neg.
T1	8	0	8
T2	7	1	6
T3	2	0	2
T4	2	0	2
TX	1	0	1
Gesamt	20	1	19

Tab. 3.16: Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM von nodal positiven Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Größe des Tumors; Zytospin: Zytozentrifugationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ

Tumorgröße	Patienten- anzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		PB pos.	PB neg.
T1	7	2	5
T2	8	0	8
T3	1	0	1
T4	3	1	2
TX	1	0	1
Gesamt	20	3	17

Tab. 3.17: Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des PB von nodal positiven Patientinnen ohne Fernmetastasen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Anzahl der Proben und die Größe des Tumors; Zytospin: Zytozentrifugationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ

14 der 17 (82,35%) untersuchten Patientinnen von denen KM- und PB-Proben untersucht wurden, zeigten ein negatives Ergebnis für CK 18 sowohl im KM als auch im PB. In 1 von 17 Fällen (5,88%) wurden CK-18-exprimierende Zellen im KM, nicht aber im PB von einer Patientin mit einem T2-Tumor (F.R.E.) detektiert. Ein positives Ergebnis im PB und ein negatives im KM lag in 2 von 17 Fällen (11,76%) bei Patientinnen mit einem T1-Tumor (S.R., R.S) vor (Tabelle 3.18).

n=17	KM pos.	KM neg.
PB pos.	0	2
PB neg.	1	14

Tab. 3.18: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM und PB der nodal positiven Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen, n: Anzahl, pos.: positiv, neg.: negativ

3.3.2.5 Ergebnisse für CK 18 in den Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen

Bei 3 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom wurden Fernmetastasen und ein positiver Lymphknotenstatus festgestellt. 2 von 3 Patientinnen hatten einen T4-Tumor (C.T., B.S.) die dritte einen T1-Tumor (K.C.). In Zytozentrifugationspräparaten wurden das KM und PB der Patientin mit dem T1-Tumor und einer Patientin mit einem T4-Tumor (C.T.) auf die Expression von CK 18 untersucht. Von der zweiten Patientin mit einem T4-Tumor wurde dies nur an einem Präparat des PB durchgeführt (B.S.).

Bei 1 von 2 Patientinnen (K.C.) war eine Tumorzell dissemination im KM feststellbar, bei der anderen nicht. In den Zytozentrifugationspräparaten des PB wurden bei keiner der 3 Patientinnen Tumorzellen entdeckt.

Die Tabelle 3.19 und 3.20 stellen die Ergebnisse der PB- und KM-Proben im Zusammenhang mit der untersuchten Probenanzahl und der Tumorgröße dar.

Tumorgröße	Patientenanzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		KM pos.	KM neg.
T1	1	1	0
T4	1	0	1
Gesamt	2	1	1

Tab.3.19: Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Größe des Tumors; Zytospin: Zytozentrifugationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ

Tumorgröße	Patienten- anzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		PB pos.	PB neg.
T1	1	0	1
T4	2	0	2
Gesamt	3	0	3

Tab.3.20: Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten des PB der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Größe des Tumors; Zytospin: Zytocentrifugationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ

KM und PB der Patientin mit dem T4-Tumor (C.T.) zeigten keinen Anhalt für eine Tumorzell dissemination. Im KM der Patientin mit dem T1 Tumor (K.C.) konnten 12 Zellen mit dem Antikörper gegen CK 18 markiert werden, während im PB kein positives Ergebnis für CK 18 nachgewiesen wurde (Tabelle3.21).

n=2	KM pos.	KM neg.
PB pos.	0	0
PB neg.	1	1

Tab. 3.21: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten des KM und PB der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen; aufgeführt sind nur Patientinnen, von denen beide Probenarten vorhanden waren; pos.: positiv, neg.: negativ

3.3.2.6 Ergebnisse für CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma

Das Material von 5 Patientinnen wurde beim Auftreten eines Rezidivs gewonnen. Von diesen wurde bei 2 Patientinnen (H.M., B.E.) und 1 Patienten (I.N.) initial ein primärer Tumor des Stadiums IIA bei nodal negativem Status diagnostiziert. Bei einer wurde initial ein primärer Tumor des Stadiums IIB mit einem Befall der Lymphknoten festgestellt (S.N.). Die Rezidive wurden bei 3 Patientinnen lokal und bei einer in den axillären Lymphknoten festgestellt. Das Material einer weiteren Patientin wurde bei der Diagnose eines Zweitkarzinoms der Mamma entnommen (N.K.). Der Primärtumor wurde als Stadium I eingestuft, das Zweitkarzinom als T1 N2 und war wegen fehlender Beurteilbarkeit der Fernmetastasensituation einer Stadieneinteilung im Sinne der TNM-Klassifikation nicht zugänglich, weshalb das Material

dieser Patientin in der Tabelle als nicht im Rahmen der TNM-Klassifikation definierbarer Tumor aufgeführt ist.

Von den Patientinnen deren Material zum Zeitpunkt eines Rezidivauftrittes gewonnen wurde, wurde von 3 der 4 KM und PB, von einer Patientin (S.N.) lediglich PB im Zytozentrifugationspräparat auf die Expression von CK 18 überprüft. Von der Patientin mit einem Zweitkarzinom (N.K.) wurde nur das Knochenmark im Zytozentrifugationspräparat auf CK 18 untersucht.

Positive Ergebnisse für CK 18 wurden bei 1 (N.K.) von 4 KM- Proben und keiner von 4 PB- Proben der Rezidivpatientinnen gefunden (Tabelle 3.22 und 3.23).

Stadium	Patienten- anzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		KM pos.	KM neg.
II A	3	0	3
II B	x	x	x
nicht definiert	1	1	0
Gesamt	4	1	3

Tab.3.22: Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms oder einem Zweitkarzinom der Mamma bezogen auf die Anzahl der Proben und das Stadium des Tumors; Zytospin: Zytozentrifugationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ; nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren einer Stadieneinteilung im Rahmen der TNM-Klassifikation nicht zugänglich, hier handelt es sich um die Patientin mit dem Zweitkarzinom der Mamma, x: kein Material untersucht

Stadium	Patienten- anzahl	CK 18 Zytospin / 1×10^5 Zellen	
		PB pos.	PB neg.
II A	3	0	3
II B	1	0	1
nicht definiert	x	x	x
Gesamt	4	0	4

Tab.3.23: Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des PB der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms bezogen auf die Anzahl der Proben und das Stadium des Tumors, Zytospin: Zytozentrifugationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ; nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren einer Stadieneinteilung im Rahmen der TNM-Klassifikation nicht zugänglich, hier handelt es sich um die Patientin mit dem Zweitkarzinom der Mamma, von der kein PB vorlag (x)

Die Proben der Patientinnen mit einem initialen Tumor des Stadiums IIA, von denen das Knochenmark und das periphere Blut untersucht wurden, ließen keinen Anhalt für eine Tumorzellaussaat erkennen (Tabelle 3.24).

n=3	KM pos.	KM neg.
PB pos.	0	0
PB neg.	0	3

Tab. 3.24: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten des KM und PB der Patientinnen mit einem Rezidiv; aufgeführt sind nur Patientinnen, von denen beide Probenarten vorhanden waren; pos.: positiv, neg.: negativ

3.4 Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten

3.4.1 Ergebnisse der auf CK 18 untersuchten Sedimentationspräparate des Materials der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

Von 3 der 8 Patientinnen dieses Kollektivs wurden Sedimentationspräparate des KM und PB auf die Expression von CK 18 überprüft.

Ein positiver Nachweis ergab sich in 1 von 3 KM (W.S.) und keinem der 3 PB. Negative Resultate lagen in 2 von 3 KM und 3 von 3 PB vor (Tabelle 3.25). Von diesen zeigten 2 von 3 Fälle negative Ergebnisse im KM und PB.

Material	Patienten- anzahl	CK 18	
		positiv	negativ
KM	3	1	2
PB	3	0	3

Tab. 3.25: Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM und PB der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

3.4.2 Auswertung der immunzytologisch auf CK 18 untersuchten Sedimentationspräparate des Patientenkollektivs mit einem Mammakarzinom

Von den 46 Patientinnen mit der histologisch gesicherten Diagnose eines Mammakarzioms wurde von 13 das KM und PB auf die Dissemination von Tumorzellen in Sedimentationspräparaten mittels der APAAP-Methode untersucht, von 2 der 46 Patientinnen lediglich das KM (N.K., K.L.U.). 1 Patientin (N.K.) hatte ein Zweitkarzinom der

Mamma, die übrigen Patientinnen, die mit dieser Methode auf CK 18-exprimierende Zellen untersucht wurden hatten ein primäres Mammakarzinom.

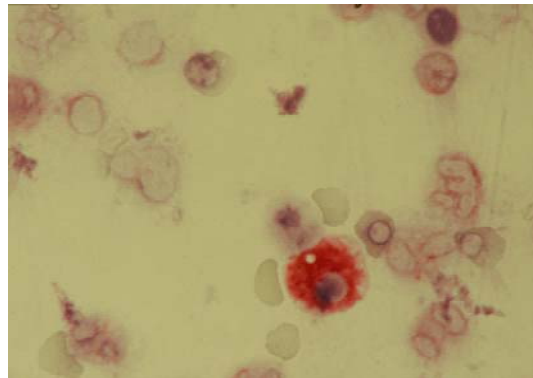


Abb. 3.2: Mit der APAAP-Methode gegen CK 18 gefärbtes Sedimentationspräparat einer KM-Probe

3.4.2.1 Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom

Sedimentationspräparate des KM und PB von 13 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom wurden mittels der immunzytologischen Färbemethode auf CK 18 untersucht. Bei 1 Patientin wurde sie nur an einem Objektträger des KM durchgeführt (K.L.U.).

In 5 von 14 KM (35,71%) konnten Tumorzellen mit Hilfe des Antikörpers gegen CK 18 markiert werden. Diese Proben stammten von Patientinnen mit einem Tumor im Stadium 0 (N.E.), einem Tumor im Stadium I (N.R.), einem Tumor im Stadium IIA (H.N.H., B.G.) und einem Tumor im Stadium IIB (S.M.). In 5 von 13 PB (38,46%) konnten CK-18-positive Zellen bei Patientinnen mit einem Tumor im Stadium 0 (N.E.), im Stadium I (N.R.), im Stadium IIA (H.N.H., B.G.) und einem Tumor im Stadium IV (K.C.) nachgewiesen werden. Ein negatives Ergebnis für CK 18 in den mit 1×10^6 Zellen beschichteten Präparaten wurde in 9 von 14 KM (64,29%) und 8 von 13 PB (61,54%) gefunden. In den Tabellen 3.26 und 3.27 sind die Ergebnisse des CK-18-Nachweises in Sedimentationspräparaten bezogen auf die Art und Anzahl der untersuchten Proben und das Stadium des Tumors dargestellt.

Stadium	Patienten- anzahl	CK 18 Immunette / 1×10^6 Zellen	
		KM pos.	KM neg.
0	3	1	2
I	1	1	0
IIA	3	2	1
IIB	3	1	2
IIIA	1	0	1
IIIB	2	0	2
IV	1	0	1
Gesamt	14	5	9

Tab. 3.26: Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Anzahl der Proben und das Stadium des Tumors; Immunette: Sedimentationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ

Stadium	Patienten- anzahl	CK 18 Immunette / 1×10^6 Zellen	
		PB pos.	PB neg.
0	3	1	2
I	1	1	0
IIA	3	2	1
IIB	3	0	3
IIIA	x	x	x
IIIB	2	0	2
IV	1	1	0
Gesamt	13	5	8

Tab. 3.27: Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des PB von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Anzahl der Proben und das Stadium des Tumors; Immunette: Sedimentationspräparate, x: kein Material, pos.: positiv, neg.: negativ

Die Sedimentationspräparate von KM und PB stellten sich in 4 von 13 Fällen (30,77%) positiv dar. Davon hatte 1 Patientin einen Tumor im Stadium 0 (N.E.), 1 einen Tumor im

Stadium I (N.R.) und 2 einen Tumor im Stadium IIA (H.N.H., B.G.). 1 von 13 Patientinnen (7,69%) mit einem Tumor im Stadium IIB (S.M.) hatte ein positives Ergebnis für CK 18 im KM und ein negatives im PB. Die umgekehrte Konstellation stellte sich in 1 von 13 Fällen (7,69%) bei einer Patientin mit einem Tumor im Stadium IV (K.C.) dar. Bei 7 der 13 Patientinnen (53,85%) ließen sich keine CK-18-exprimierenden Zellen identifizieren (Tabelle 3.28, Diagramm 3.7).

n=13	KM pos.	KM neg.
PB pos.	4	1
PB neg.	1	7

Tab. 3.28: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM und PB der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; aufgeführt sind nur die Patientinnen, von denen beide Probenarten vorhanden waren; n: Anzahl, pos.: positiv, neg.: negativ

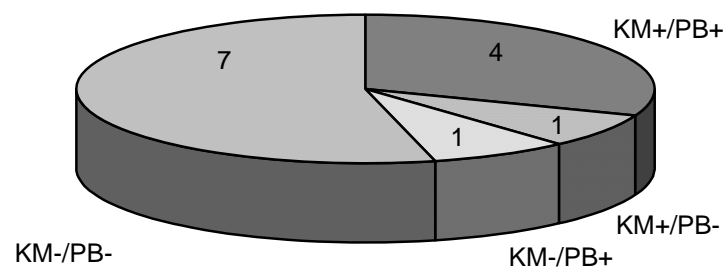


Diagramm 3.7: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM und PB der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; aufgetragen sind nur die Patientinnen, von denen Sedimentationspräparate des KM und PB untersucht wurden

3.4.2.2 Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen

Von den 7 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, negativem Lymphknotenstatus und ohne Fernmetastasen wurde das KM und PB in Sedimentationspräparaten, die mittels der APAAP-Methode gegen CK 18 gefärbt wurden, auf eine Tumorzell dissemination beurteilt.

Ein positives Ergebnis wurde in jeweils 3 von 7 KM (42,86%) und PB (42,86%) der selben Patientinnen gefunden. Von diesen hatte 1 ein Carcinoma in situ (N.E.), 1 einen T1-Tumor (N.R.) und 1 einen T2-Tumor (B.G.). Ohne Anhalt für eine Tumorzell dissemination waren jeweils 4 von 7 KM (57,14%) und PB (57,14%) (Tabelle 3.29, 3.30 und 3.31).

Stadium	Patienten- anzahl	CK 18	
		Immunette/ 1×10^6 Zellen	
		KM pos.	KM neg.
Tis	3	1	2
T1	1	1	0
T2	2	1	1
T4	1	0	1
Gesamt	7	3	4

Tab. 3.29: Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM von nodal negativen Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Anzahl der Proben und die Größe des Tumors; Immunette: Sedimentationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ

Tumorgroße	Patienten- anzahl	CK 18	
		Immunette / 1×10^6 Zellen	
		PB pos.	PB neg.
Tis	3	1	2
T1	1	1	0
T2	2	1	1
T4	1	0	1
Gesamt	7	3	4

Tab. 3.30: Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des PB von nodal negativen Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Anzahl der Proben und die Größe des Tumors; Immunette: Sedimentationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ

n=7	KM pos.	KM neg.
PB pos.	3	0
PB neg.	0	4

Tab. 3.31: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM und PB der nodal negativen Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; n: Anzahl, pos.: positiv, neg.: negativ

3.4.2.3 Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom mit Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen

Von den 6 Patientinnen, die einen positiven Nodalstatus bei unauffälligen weiteren Metastasenstationen aufwiesen, wurde die immunzytologische Untersuchung auf CK 18 bei 5 Patientinnen an Sedimentationspräparaten des KM und PB, bei 1 Patientin nur an einem Präparat des KM durchgeführt (K.L.U).

2 von 6 KM (33,33%) von 1 Patientin mit einem T1-Tumor (H.N.H.) und 1 Patientin mit einem T2-Tumor (S.M.) sowie 1 von 5 PB (20%) von 1 Patientin mit einem T1-Tumor (H.N.H.) waren CK-18-positiv. 4 von 6 KM (66,67%) und 4 von 5 PB (80%) stellten sich negativ in der immunzytochemischen Färbung dar.

Die Tabellen 3.32 und 3.33 stellen die Ergebnisse der Sedimentationspräparate des KM bzw. des PB bezüglich der Anzahl untersuchter Proben und der Tumorgöße dar.

Stadium	Patienten- anzahl	CK 18	
		Immunette / 1×10^6 Zellen	
		KM pos.	KM neg.
T1	1	1	0
T2	3	1	2
T3	1	0	1
T4	1	0	1
Gesamt	6	2	4

Tab. 3.32: Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM von nodal positiven Patientinnen ohne Fernmetastasen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Anzahl der Proben und die Größe des Tumors; Immunette: Sedimentationspräparate, pos.: positiv, neg.: negativ

Tumorgröße	Patienten- anzahl	CK 18	
		Immunette / 1×10^6 Zellen	
		PB pos.	PB neg.
T1	1	1	0
T2	3	0	3
T3	x	x	x
T4	1	0	1
Gesamt	5	1	4

Tab. 3.33: Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des PB von nodal positiven Patientinnen ohne Fernmetastasen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf die Anzahl der Proben und die Größe des Tumors; Immunette: Sedimentationspräparate, x: kein Material, pos.: positiv, neg.: negativ

Bei 1 von 5 Patientinnen mit einem T1-Tumor (H.N.H.) waren CK-18-positive Zellen im KM und PB detektierbar, in 3 von 5 Fällen waren beide Probenarten negativ für diesen Marker (L.R., E.T., P.M.). Ein negatives Resultat im PB und ein positives im KM war in 1 von 5 Fällen bei einer Patientin mit einem T2-Tumor zu finden (S.M.) (Tabelle 3.34).

n=5	KM pos.	KM neg.
PB pos.	1	0
PB neg.	1	3

Tab. 3.34: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM und PB der nodal positiven Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen; n: Anzahl, pos.: positiv, neg.: negativ

3.4.2.4 Ergebnisse für CK 18 in den Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen

Sedimentationspräparate des KM und PB wurden von einer Patientin mit einem T1-Tumor und ossären Metastasen (K.C.) angefertigt und gegen CK 18 gefärbt. Im PB wurde ein positives, im KM ein negatives Ergebnis gefunden.

3.4.2.5 Ergebnisse für CK 18 in den Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms oder einem Zweitkarzinom der Mamma

Das KM einer Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma (N.K.) wurde im Sedimentationspräparat mittels der APAAP-Methode gegen CK 18 gefärbt. Es wurden 3 CK-18-exprimierende Zellen gefunden und das Präparat als positiv eingestuft. Im Zusammenhang mit dem Zweitkarzinom wurde ein positiver Lymphknotenstatus bei nicht beurteilbarer Fernmetastasensituation erfasst, wobei zum Zeitpunkt der Diagnose des Erstkarzinoms weder Metastasen in den Lymphknoten noch in entfernteren Regionen beschrieben wurden. Primarius und Zweitkarzinom waren T1-Tumoren.

3.5 Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten

3.5.1 Vergleich der Ergebnisse des in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten auf CK 18 untersuchten Materials der Patientinnen mit einer gutartigen Erkrankung der Mamma

Die Expression von CK 18 anhand von Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des KM und PB wurde bei 3 Patientinnen mit einer gutartigen Brustdrüsenerkrankung überprüft. Negative Ergebnisse für CK 18 in beiden Methoden zeigten sich in 1 von 3 KM und 3 von 3 PB. Negativ im Zytozentrifugationspräparat und positiv im Sedimentationspräparat war 1 von 3 KM (W.S.). Ein positives Ergebnis in Präparaten der Zytozentrifugationstechnik und ein negatives in solchen der Sedimentationstechnik wurde in 1 von 3 KM (L.H.) gefunden. Von den untersuchten Patientinnen waren KM und PB von 1 von 3 in beiden Methoden CK-18-negativ (Tabelle 3.35 und 3.36).

Knochenmark (n=3)

	Immunette positiv	Immunette negativ
Zytospin positiv	0	1
Zytospin negativ	1	1

Tab. 3.35

peripheres Blut (n=3)

	Immunette positiv	Immunette negativ
Zytospin positiv	0	0
Zytospin negativ	0	3

Tab. 3.36

Tabelle 3.35 und 3.36: Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des KM und PB des Patientenkollektivs mit einer benignen Erkrankung der Mamma; Immunette: 1×10^6 Zellen, Zytospin: 1×10^5 Zellen

3.5.2 Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem Mammakarzinom

3.5.2.1 Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des gesamten Patientenkollektivs mit einem Mammakarzinom

Von den 15 Patientinnen deren Knochenmark und Blut auf CK 18 exprimierende Zellen anhand von Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten untersucht wurde, hatten 14 ein primäres Mammakarzinom und eine Patientin ein Zweitkarzinom der Mamma (N.K.).

CK-18-Positivität sowohl in Sedimentations- als auch in Zytozentrifugationspräparaten war bei 3 von 15 KM-Proben (20%) nachweisbar (N.K., N.R., B.G.) und keiner von 13 PB-Proben. Positive Ergebnisse in Sedimentationspräparaten und negative in Zytozentrifugationspräparaten traten in 3 von 15 KM (20%) (N.E., H.N.H., S.M.) und 5 von 13 PB (38,46%) (N.E., N.R., H.N.H., B.G., K.C.) auf. Positive Ergebnisse in Zytozentrifugationspräparaten und negative in Sedimentationspräparaten wurden in 1 von 13 PB (S.G.) (7,69%) und 3 von 15 KM (K.K.W., S.G., K.C.) (20%) gefunden. Negative Ergebnisse für CK 18 in beiden Untersuchungen traten bei 6 von 15 KM (40%) und 7 von 13 PB (53,85%) auf (Tabelle 3.37 und 3.38).

Knochenmark (n=15)

	Immunette positiv	Immunette negativ
Zytospin positiv	3	3
Zytospin negativ	3	6

Tab. 3.37

Peripheres Blut (n=13)

	Immunette positiv	Immunette negativ
Zytospin positiv	0	5
Zytospin negativ	1	7

Tab. 3.38

Tab. 3.37 und 3.38: Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des KM und PB des Kollektivs der Patientinnen mit einem Mammakarzinom; Zytospin: Zytozentrifugationspräparate mit 1×10^5 Zellen, Immunette: Sedimentationspräparate mit 1×10^6 Zellen, n: Anzahl

3.5.2.2 Vergleich der Ergebnisse der auf CK 18 untersuchten Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparate aller Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom

Auf die Expression von CK 18 wurden KM von 14 und PB von 13 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom anhand von Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten

überprüft. Von diesen standen von 13 Patientinnen sowohl KM als auch PB für beide Methoden zur Verfügung, von einer Patientin lediglich KM (K.L.U.). Die Tabellen 3.39 und 3.40 vergleichen die Ergebnisse beider Untersuchungen für KM bzw. PB bezüglich der Tumorstadien und der untersuchten Probenanzahl.

Positive Ergebnisse in beiden Methoden zeigten 2 von 14 Patientinnen im KM (14,29%) mit einem Tumor im Stadium I (N.R.) und einem Tumor im Stadium IIA (B.G.) und keine von 13 PB-Proben.

CK-18-positive Zytozentrifugationspräparate und negative Sedimentationspräparate fanden sich in 3 von 14 KM (21,43%) von Patientinnen mit einem Tumor im Stadium IIA (K.K.W.), einem Tumor im Stadium IIIB (S.G.) sowie einem Tumor im Stadium IV (K.C.). 1 von 13 PB-Proben (7,69%) von einer Patientin im Stadium IIIB (S.G.) wies ein positives Ergebnis im Zytozentrifugationspräparat und ein negatives im Sedimentationspräparat auf. Negative Resultate in Präparaten, die mittels der Zytozentrifuge hergestellt wurden, und positive Ergebnisse in solchen, die mit der Sedimentationskammer hergestellt wurden, wiesen das KM von 3 von 14 Patientinnen (21,43%) mit einem Tumor im Stadium 0 (N.E.), einem Tumor im Stadium IIA (H.N.H.) und einem Tumor im Stadium IIB (S.M.) sowie das PB von 5 von 13 Patientinnen (38,46%) mit einem Tumor im Stadium 0 (N.E.), einem Tumor im Stadium I (N.R.), einem Tumor im Stadium IIA (B.G., H.N.H.) und einem Tumor im Stadium IV (K.C.) auf. Negative Ergebnisse in beiden Nachweismethoden waren in 6 von 14 KM (42,86%) und 7 von 13 PB (53,85%) zu finden.

Knochenmark (n=14)

Methode		Tumorstadium							Gesamtanzahl
CK 18 (Zytospin)	CK 18 (Immunette)	0	I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	
positiv	positiv	0	1	1	0	0	0	0	2
positiv	negativ	0	0	1	0	0	1	1	3
negativ	positiv	1	0	1	1	0	0	0	3
negativ	negativ	2	0	0	2	1	1	0	6
Patientenanzahl		3	1	3	3	1	2	1	14

Tab. 3.39: Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des Knochenmarks bezogen auf das Tumorstadium und die Anzahl untersuchter Proben; aufgeführt sind nur die Patientinnen von denen beide Präparatarten zur Verfügung standen; Zytospin: Zytozentrifugationspräparate mit 1×10^5 Zellen, Immunette: Sedimentationspräparate mit 1×10^6 Zellen

Peripheres Blut (n=13)

Methode		Tumorstadium							Gesamt- anzahl
CK 18 (Zytospin)	CK 18 (Immunette)	0	I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	
positiv	positiv	0	0	0	0	x	0	0	0
positiv	negativ	0	0	0	0	x	1	0	1
negativ	positiv	1	1	2	0	x	0	1	5
negativ	negativ	2	0	1	3	x	1	0	7
Patientenanzahl		3	1	3	3	x	2	1	13

Tab. 3.40: Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des peripheren Blutes bezogen auf das Tumorstadium und die Anzahl untersuchter Proben; aufgeführt sind nur die Patientinnen von denen beide Präparatarten zur Verfügung standen; Zytospin: Zyto- zentrifugationspräparate mit 1×10^5 Zellen, Immunette: Sedimentationspräparate mit 1×10^6 Zellen, x: kein Material

KM und PB, welche CK-18-positiv im Zytozentrifugationspräparat und negativ im Sedimentationspräparat erschienen, lagen bei 1 Patientin mit einem Tumor im Stadium IIIB vor (S.G.). Bei 1 von 3 Patientinnen mit einem Carcinoma in situ (N.E.) und 1 von 3 Patientinnen mit einem Tumor des Stadiums IIA (H.N.H.) waren sowohl das KM als auch das PB negativ für CK 18 im Zytozentrifugationspräparat und positiv im Sedimentationspräparat.

3.5.2.3 Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen

14 der 41 Patientinnen mit einem primären Karzinom der Mamma hatten einen negativen Lymphknotenstatus und keinen Anhalt für Fernmetastasen. Die CK-18-Expression wurde bei 7 Patientinnen dieses Kollektivs anhand von Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des KM und PB überprüft.

Positive Ergebnisse in beiden Methoden wurden bei 2 von 7 Patientinnen im KM (28,57%) gefunden. Von diesen Patientinnen wies die eine einen T1-Tumor im Stadium IIA (H.N.H.) und die andere einen T2-Tumor im Stadium IIB (S.M.) auf. 2 von 7 KM (28,57%) waren negativ für CK 18 in beiden Verfahren. Positive Ergebnisse im Zytospin und negative im Sedimentationspräparat des KM ergaben sich bei 2 von 7 (28,57%) Patientinnen mit einem Tumor im Stadium IIA mit einem T2-Tumor (K.K.W.) sowie einer Patientin mit einem Tumor im Stadium IIIB mit einem T4-Tumor (S.G.). Das KM einer von 7 Patientinnen (14,29%) mit

einem Tumor im Stadium 0 mit einem Carcinoma in situ zeigte CK-18-positive Zellen im Sedimentationspräparat nicht aber im Zytozentrifugationspräparat (N.E.).

Im PB dieser Patientinnen waren 3 von 7 (42,86%) negativ für CK 18 in beiden Methoden und 3 von 7 (42,86%) positiv in den Sedimentationspräparaten und negativ in den Zytozentrifugationspräparaten. Von den letztgenannten hatte 1 Patientin einen Tumor im Stadium 0 bei einem Carcinoma in situ (N.E.), 1 einen Tumor im Stadium I mit einem T1-Tumor (N.R.) und 1 einen Tumor im Stadium IIA mit einem T2-Tumor. Bei 1 von 7 Patientinnen (14,29%) mit einem T4-Tumor wurden CK-18-exprimierende Zellen im Zytozentrifugationspräparat des PB, nicht aber im Sedimentationspräparat nachgewiesen (S.G.).

Von diesen untersuchten Patientinnen waren KM und PB von 2 von 7 Patientinnen mit einem Carcinoma in situ negativ in beiden CK 18 nachweisenden Verfahren (P.X., H.N.D.). Bei 1 Patientin mit einem Carcinoma in situ waren KM und PB CK-18-negativ in den Zytozentrifugationspräparaten und positiv in den Sedimentationspräparaten (N.E.). Eine Tumorzell dissemination konnte bei 1 Patientin mit einem T4-Tumor in den Zytozentrifugationspräparaten des KM und PB, nicht aber in den Sedimentationspräparaten festgestellt werden (S.G.).

Die Tabellen 3.41 und 3.42 stellen die Ergebnisse der immunzytologischen Färbung beider Präparatformen vergleichend dar.

Knochenmark (n=7)

	Immunette positiv	Immunette negativ
Zytospin positiv	2	2
Zytospin negativ	1	2

Tab. 3.41

Peripheres Blut (n=7)

	Immunette positiv	Immunette negativ
Zytospin positiv	0	1
Zytospin negativ	3	3

Tab. 3.42

Tabelle 3.41 und 3.42: Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des KM bzw. PB nodal negativer Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; Zytospin: Zytozentrifugationspräparate, Immunette: Sedimentationspräparate

3.5.2.4 Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen

Von 5 Patientinnen dieses Kollektivs wurden KM und PB, von einer Patientin nur KM (K.L.U.) mit beiden Methoden auf eine Tumorzell dissemination überprüft.

Positive übereinstimmende Ergebnisse wurden weder in Präparaten des KM noch des PB gefunden. 2 von 6 KM (33,33%) waren im Sedimentationspräparat, nicht aber im Zytozentrifugationspräparat positiv, wobei die Tumorgröße der Patientin mit einem Tumor des Stadiums IIA T1 (H.N.H.) und derjenigen mit einem Tumor des Stadiums IIB T2 (S.M.) war. 1 von 5 PB-Proben (20%) einer Patientinnen mit einem Tumor des Stadiums IIA mit einem T1-Tumor (H.N.H.) wies CK-18-exprimierende Zellen im Sedimentationspräparat, nicht aber im Zytozentrifugationspräparat auf. In 4 von 6 KM (66,67%) und 4 von 5 PB (80%) konnten in keiner Präparatart Tumorzellen identifiziert werden.

Eine Patientin mit einem Tumor im Stadium IIA mit einem T1-Tumor zeigte CK-18-Positivität in den Sedimentationspräparaten des KM und PB bei negativen Ergebnissen in den Zytozentrifugationspräparaten (H.N.H.). Bei 3 Patientinnen mit einem Tumor im Stadium IIB mit einem T2-Tumor wurden übereinstimmende negative Ergebnisse in beiden Präparatarten des KM und PB gefunden (L.R., E.T., P.M.).

Die Tabellen 3.43 und 3.44 stellen die Ergebnisse beider Methoden für KM- bzw. PB-Proben gegenüber.

Knochenmark (n=6)

	Immunette positiv	Immunette negativ
Zytospin positiv	0	0
Zytospin negativ	2	4

Tab. 3.43

peripheres Blut (n=5)

	Immunette positiv	Immunette negativ
Zytospin positiv	0	0
Zytospin negativ	1	4

Tab. 3.44

Tabelle 3.43 und 3.44: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des Materials der nodal positiven Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen; aufgeführt sind nur die Patientinnen, von denen beide Präparatarten vorhanden waren; Zytospin: 1×10^5 Zellen, Immunette: 1×10^6 Zellen

3.5.2.5 Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit Fernmetastasen

Eine Patientin mit einem T1-Tumor wurde anhand von Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des KM und PB auf die Expression von CK 18 untersucht (K.C.). Das KM stellte sich im Zytozentrifugationspräparat positiv und im Sedimentationspräparat negativ dar. Das Zytozentrifugationspräparat des PB ließ keine Tumorzellen erkennen, während im Sedimentationspräparat CK-18-positive Zellen entdeckt wurden.

3.5.2.6 Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma

Das KM der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma wurde in Präparaten beider Methoden mit dem Antikörper gegen CK 18 gefärbt. In beiden Untersuchungen wurden anfärbbare Zellen und somit ein Tumorzellnachweis gefunden.

3.6 Korrelation der Ergebnisse der immunzytologischen Untersuchung auf CK 18 mit dem Östrogen und Progesteronrezeptorstatus

Insgesamt wurde Tumorgewebe von 42 Patientinnen mit einem Mammakarzinom auf Östrogen- und Progesteronrezeptoren untersucht, wobei von 42 Patientinnen der Östrogenrezeptorstatus und von 41 der Progesteronrezeptorstatus bekannt war. Jede Gewebeprobe, die als rezeptorarm, positiv oder hochpositiv für den jeweiligen Rezeptor eingestuft wurde, galt als positiv. Jede Probe, bei der kein Nachweis eines Rezeptors gelang, wurde als negativ betrachtet. Die Proben der Patientinnen mit einem Rezidiv oder einem Zweittumor der Mamma wurden nach dem Rezeptorstatus ihres Rezidivs oder Zweittumors beurteilt. Von den 42 Patientinnen, bei denen der Östrogenrezeptor bestimmt wurde, wiesen 37 einen positiven und 5 einen negativen Status auf. 29 der 41 Patientinnen, die auf die Expression des Progesteronrezeptors untersucht wurden, waren positiv, 12 negativ für den Progesteronrezeptor.

3.6.1 Korrelation der Ergebnisse der immunzytologischen Untersuchung auf CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus

Von 41 Patientinnen, bei denen der Östrogenrezeptor bestimmt wurde, wurden 37 KM und 37 PB in Zytozentrifugationspräparaten auf eine Tumorzelldissemination anhand der CK-18-Expression überprüft. Von diesen Patientinnen wurden von 32 KM und PB, von 5 nur KM (C.S., K.I., K.R.E.E., K.L.U., N.K.) und von 5 nur Proben des PB (S.T., G.N., R.R., B.S., S.N.) auf CK-18-positive Zellen untersucht.

In 32 Tumorgeweben der Patientinnen, deren KM untersucht wurde, wurde eine Expression des Östrogenrezeptors festgestellt. Von diesen zeigten 8 (25%) im Knochenmark CK-18-exprimierende Zellen (K.C., N.R., K.I., K.L.F., F.R.E., B.G., K.K.W., S.G.), bei 24 (75%) fiel der Nachweis des Zytokeratins negativ aus. 5 der untersuchten Tumorgewebe waren negativ für den Östrogenrezeptor. Bei diesen Patientinnen war bei 1 Patientin (20%) (N.K.) eine Tumorzell dissemination im Knochenmark feststellbar, bei 4 (80%) nicht.

37 PB wurden auf Tumorzellen mit der APAAP-Technik untersucht. Die Tumorgewebe dieser Patientinnen ergaben in 34 Fällen einen positiven Nachweis für den Östrogenrezeptor, in 3 Fällen einen negativen Befund. Im PB der östrogenrezeptorpositiven Gruppe wurden bei 3 Patientinnen (8,82%) (S.R., R.R., S.G.) mit CK 18 markierte Zellen gefunden, bei 31 (91,18%) war der Befund negativ. Im PB der 3 Patientinnen mit einem negativen Östrogenrezeptorstatus des Tumors wurde keine Tumorzellkontamination erkannt.

Ein positiver Progesteronrezeptorstatus wurde in 29 der untersuchten Tumorgewebe gefunden, ein negativer bei 12 der untersuchten Karzinome. Von 36 Patientinnen wurde KM und PB auf CK-18-exprimierende Zellen in Zytozentrifugationspräparaten untersucht, von denen von 31 KM und PB, von 5 nur KM (C.S., K.I., K.L.U., N.K., K.R.E.E.) und von 5 nur Proben des PB (S.T., G.N., R.R., B.S., S.N.) zur Verfügung standen. In der Patientinnengruppe, deren KM auf disseminierte Tumorzellen untersucht wurde (n=36), wurde bei 26 ein positiver und bei 10 ein negativer Progesteronrezeptorstatus festgestellt. Von den 36 Patientinnen deren PB auf CK-18-positive Zellen untersucht wurde, exprimierten 26 Tumoren den Progesteronrezeptor und 10 nicht.

Einen positiven Progesteronrezeptorstatus und den Nachweis einer Tumorzell dissemination zeigten 7 von 26 Patientinnen (26,92%) im KM (N.R., K.I., K.L.F., F.R.E., B.G., K.K.W., S.G.), negative Ergebnisse in der APAAP-Technik lagen in 19 (73,08%) der KM vor. Von 10 KM der progesteronrezeptornegativen Gruppe waren 2 CK-18-positiv (20%) (K.C., N.K.) und 8 (80%) negativ.

Von 26 PB der Patientinnen mit einem positiven Nachweis für den Progesteronrezeptor zeigten 2 (7,69%) (S.G., R.R.) CK-18-positive Zellen und 24 (92,30%) nicht. In der Gruppe von 10 Patientinnen, deren Mammakarzinom keine Progesteronrezeptoren exprimierte, war bei 1 (10%) (S.R.) ein Nachweis von Tumorzellen im PB zu beobachten, bei 9 Patientinnen (90%) fiel der Nachweis negativ aus.

Die Tabellen 3.45, 3.46, 3.47 und 3.48 stellen die Ergebnisse der untersuchten KM und PB in Korrelation mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus des Tumors dar.

Knochenmark		
n=37	CK18-positiv	CK18-negativ
ER-positiv	8	24
ER-negativ	1	4

Tab. 3.45

Peripheres Blut		
n=37	CK18-positiv	CK18-negativ
ER-positiv	3	31
ER-negativ	0	3

Tab. 3.46

Tabelle 3.45 und 3.46: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM bzw. PB und des Östrogenrezeptornachweises im Tumorgewebe aller untersuchten Mammakarzinomproben; n: Anzahl, ER: Östrogenrezeptor, pos.: positiv, neg.: negativ

Knochenmark		
n=36	CK18-positiv	CK18-negativ
PR-positiv	7	19
PR-negativ	2	8

Tab. 3.47

Peripheres Blut		
n=36	CK18-positiv	CK18-negativ
PR-positiv	2	24
PR-negativ	1	9

Tab. 3.48

Tabelle 3.47 und 3.48: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM bzw. PB und des Progesteronrezeptornachweises im Tumorgewebe aller untersuchten Mammakarzinomproben; n: Anzahl, PR: Progesteronrezeptor, pos.: positiv, neg.: negativ

3.6.1.1 Korrelation der gegen CK 18 gefärbten Zytozentrifugationspräparate mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom

Von 38 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom wurde der Östrogenrezeptorstatus im entnommenen Tumorgewebe bestimmt. Von 30 Patientinnen standen KM und PB, von 4 nur KM (C.S., K.I., K.R.E.E., K.L.U.) und von 4 nur PB (S.T., G.N., R.R., B.S.) für die Untersuchung auf CK-18-exprimierende Zellen zur Verfügung. Bei 34 Patientinnen war das Ergebnis im Tumorgewebe für den Östrogenrezeptor positiv, bei 4 negativ.

Von den Patientinnen, bei denen das Tumorgewebe den Östrogenrezeptor exprimierte, wurden mittels der indirekten Immunzytologie 30 KM und 31 PB untersucht. In 8 der 30 KM (26,67%) (N.R., K.L.F., F.R.E., B.G., K.K.W., S.G., K.C., K.I.) und in 3 der 31 PB (9,68%) (S.G., R.R., S.R.) wurden Tumorzellen entdeckt, wobei KM und PB von 1 Patientin (S.G.) CK-18-positiv war. 22 von 30 KM (73,33%) und 28 von 31 PB (90,32%) zeigten keinen Anhalt für eine Tumorzell dissemination. Von diesen konnten bei 20 Patientinnen weder im KM noch im PB CK-18-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden.

Bei den Patientinnen ohne eine Expression des Östrogenrezeptors wurden in 4 von 4 KM und 3 von 3 PB negative Ergebnisse für CK 18 festgestellt (Tabellen 3.49 und 3.50). Davon waren bei 3 Patientinnen KM und PB negativ für den untersuchten Marker (H.T.I.G., K.R.E.H., C.T.).

Der Progesteronrezeptorstatus wurde an Tumorgewebe von 37 Patientinnen untersucht. Der Nachweis des Progesteronrezeptors im Mammakarzinomgewebe fiel bei 27 Patientinnen positiv aus, von denen 21 Patientinnen an Proben des KM und PB auf eine Tumorzellkontamination untersucht wurden. Von 3 Patientinnen standen nur Proben des KM (K.I., K.R.E.E., K.L.U.) und von 3 nur Proben des PB (G.N., R.R., B.S.) zur Verfügung. 10 Tumorgewebe waren negativ bezüglich des Progesteronrezeptors, von denen KM und PB von 8 Patientinnen auf eine CK-18-Expression untersucht wurden. Von 1 Patientin wurde dies nur an Proben des KM (C.S.) und bei 1 nur an Proben des PB (S.T.) durchgeführt. In den Proben der Patientinnen mit einem Progesteronrezeptor tragenden Tumor wurden in 7 von 24 KM (29,17%) (N.R., K.L.F., F.R.E., B.G., K.K.W., S.G., K.I.) und 2 der 24 PB (8,33%) (S.G., R.R.) Tumorzellen gefunden. 17 von 24 KM (70,83%) und 22 von 24 PB (91,67%) wiesen keine Tumorzellkontamination auf. Die Patientinnen, deren Tumoren negativ für diesen Rezeptor waren zeigten in 8 der 9 KM (88,89%) und 8 der 9 PB (88,89%) negative Ergebnisse für CK 18 und in je 1 KM (11,11%) (K.C.) und 1 PB (11,11%) (S.R.) ein positives Resultat (Tabellen 3.51 und 3.52). Von 4 der Patientinnen mit einem progesteronrezeptor-freien Malignom waren KM und PB CK-18-negativ (N.E., H.L., P.M., H.R.I.).

Knochenmark		
n=34	CK18-positiv	CK18-negativ
ER-positiv	8	22
ER-negativ	0	4

Tab. 3.49

Peripheres Blut		
n=34	CK18-positiv	CK18-negativ
ER-positiv	3	28
ER-negativ	0	3

Tab. 3.50

Tabelle 3.49 und 3.50: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM bzw. PB und des Östrogenrezeptornachweises im Tumorgewebe der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; n: Anzahl, ER: Östrogenrezeptor, pos.: positiv, neg.: negativ

Knochenmark

n=33	CK18-positiv	CK18-negativ
PR-positiv	7	17
PR-negativ	1	8

Tab. 3.51

Peripheres Blut

n=33	CK18-positiv	CK18-negativ
PR-positiv	2	22
PR-negativ	1	8

Tab. 3.52

Tabelle 3.51 und 3.52: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM bzw. PB und des Progesteronrezeptornachweises im Tumorgewebe der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; n: Anzahl, PR: Progesteronrezeptor, pos.: positiv, neg.: negativ

3.6.1.2 Korrelation der gegen CK 18 gefärbten Zytozentrifugationspräparate mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma

Von 4 Patientinnen mit einem Rezidiv konnte der Rezeptorstatus des Rezidiv- bzw. Zweitkarzinoms der Mamma ermittelt werden. Ein positiver Nachweis für den Östrogenrezeptor lag bei 3 Patientinnen vor, von denen KM und PB von 2 Patientinnen auf CK 18 überprüft wurden, von 1 Patientin nur das PB (S.N.). Positive Ergebnisse für den epithelialen Marker ergaben sich bei keiner Patientin im KM oder PB, negative im KM von 2 Patientinnen (B.E., H.M.) und im PB aller 3 Patientinnen.

Ein negatives Ergebnis für den Östrogenrezeptor wies das Zweitkarzinom der Mamma 1 Patientin auf (N.K.), von der eine Tumorzell dissemination nur anhand des KM untersucht wurde und hier ein positives Ergebnis erbrachte.

Der Progesteronrezeptorstatus war bei 2 Patientinnen positiv, wobei von 1 Patientin KM und PB, von der anderen nur PB (S.N.) auf eine Tumorzellkontamination überprüft wurde. In beiden Proben des PB und im KM wurden keine Tumorzellen detektiert.

Die Tumore von 2 Patientinnen wiesen einen negativen Progesteronrezeptorstatus auf. Von 1 Patientin wurden KM und PB im Zytozentrifugationspräparat mit negativem Ergebnis untersucht. Von der Patientin mit dem Zweitkarzinom der Mamma (N.K.) lag nur KM zur Untersuchung vor und zeigte eine Tumorzellkontamination.

3.6.2 Korrelation der gegen CK 18 gefärbten Sedimentationspräparate mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus

Von 14 Patientinnen in deren Tumorgewebe der Östrogen- und Progesteronstatus ermittelt wurde, wurde die Tumorzell dissemination in Sedimentationspräparaten des KM und PB von 12 Patientinnen und nur des KM von 2 Patientinnen überprüft, von denen bei 1 Patientin (N.K.) ein Zweitkarzinom der Mamma vorlag.

3.6.2.1 Korrelation der gegen CK 18 gefärbten Sedimentationspräparate mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom

Bei allen 13 untersuchten primären Mammakarzinomen wurden Östrogenrezeptoren nachgewiesen. Von 12 der Patientinnen wurde eine Tumorzell dissemination mittels des Antikörpers gegen CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM und PB untersucht, bei 1 Patientin erfolgte dies nur an Präparaten des KM (K.L.U.). In 5 der 13 KM (38,46%) (N.E., N.R., H.N.H., B.G., S.M.) und 5 der 12 PB (41,67%) (N.E., N.R., H.N.H., B.G., K.C.) konnten CK-18-exprimierende Zellen nachgewiesen werden. In 8 von 13 KM (61,54%) und 7 von 12 PB (58,33%) war das Ergebnis negativ (Tabellen 3.53 und 3.54).

10 Patientinnen wiesen einen positiven Progesteronstatus auf. Von diesen wurden von 9 Patientinnen KM- und PB-Proben, von 1 nur das KM (K.L.U.) auf Tumorzellen in Sedimentationspräparaten untersucht. Positive Ergebnisse wurden in 4 von 10 KM (40%) (N.K., H.N.H., B.G., S.M.) und 3 von 9 PB (33,33%) (N.R., H.N.H., B.G.) gefunden. Negative Resultate zeigten 6 der 10 KM (60%) und 6 der 9 PB (66,67%).

Von 3 Patientinnen mit einem negativen Progesteronrezeptorstatus konnten im KM einer Patientin (N.E.) und in 2 von 3 PB (K.C., N.E.) CK-18-positive Zellen identifiziert werden. Davon waren bei 1 Patientin KM und PB positiv für den Tumorzellnachweis (N.E.). In 2 der 3 KM und 1 der 3 PB von Patientinnen mit einem negativen Progesteronrezeptorstatus konnten keine Zellen mit dem Antikörper gegen CK 18 angefärbt werden (Tabellen 3.55 und 3.56).

Knochenmark		
n=13	CK18-positiv	CK 18-negativ
ER-positiv	5	8
ER-negativ	0	0

Tab. 3.53

Peripheres Blut		
n=12	CK18-positiv	CK18-negativ
ER-positiv	5	7
ER-negativ	0	0

Tab. 3.54

Tabelle 3.53 und 3.54: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM bzw. PB und des Östrogenrezeptornachweises im Tumorgewebe der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; n: Anzahl, ER: Östrogenrezeptor, pos.: positiv, neg.: negativ

Knochenmark		
n=13	CK18-positiv	CK18-negativ
PR-positiv	4	6
PR-negativ	1	2

Tab. 3.55

Peripheres Blut		
n=12	CK18-positiv	CK18-negativ
PR-positiv	3	6
PR-negativ	2	1

Tab. 3.56

Tabelle 3.55 und 3.56: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM bzw. PB und des Progesteronrezeptornachweises im Tumorgewebe aller untersuchten Mammakarzinomproben; n: Anzahl, PR: Progesteronrezeptor, pos.: positiv, neg.: negativ

3.6.2.2 Korrelation der gegen CK 18 gefärbten Sedimentationspräparate mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma

In der Untersuchung auf CK 18 an Sedimentationspräparaten wurde das KM der Patientin mit dem Zweitkarzinom untersucht. Das Gewebe des Zweitkarzinoms war sowohl für Östrogenrezeptoren als auch für Progesteronrezeptoren negativ. Das KM dieser Patientin ließ eine Tumorzellkontamination erkennen.

3.7 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden

3.7.1 Ergebnisse der β -Aktin-PCR zur Überprüfung der Integrität der cDNA aus Knochenmark-, Blut- und Tumorgewebeproben

RNA wurde aus dem Knochenmark- und Blutproben von 7 Patientinnen mit einer benignen Mammaerkrankung extrahiert und mittels der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zur Überprüfung der DNA-Integrität diente der positive Nachweis des β -Aktin-Gens in der PCR. Alle 7 KM- und PB-Proben zeigten positive Ergebnisse.

Von 40 Patientinnen mit einem Mammakarzinom wurde RNA aus Probenmaterial extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit dem PCR-Nachweis des β -Aktin-Gens auf die Integrität der DNA überprüft. Von den 40 Patientinnen wurde dies bei 38 an Proben des KM, bei 37 an Proben des PB und bei 14 an Gewebe aus dem operativ entfernten Tumor durchgeführt. Von diesen lagen bei 13 Proben des KM, PB und des Tumors vor, bei 22 Proben des KM und PB. Bei 2 Patientinnen wurde die Untersuchung nur an PB-Proben (G.N., R.R.) und bei 3 Patientinnen nur an Proben des KM durchgeführt (K.L.U., N.K., K.R.E.E.), wobei bei einer Patientin zusätzlich Tumorgewebe zur Untersuchung vorlag (K.R.E.E.).

37 der 38 KM-Proben, alle 37 PB-Proben und 12 der 14 Tumorgewebe zeigten positive Banden in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte. Bei 1 Patientin (R.S.) fiel das Ergebnis der KM-Probe und bei 2 Patienten (C.T., I.N.) das Ergebnis der Tumorgewebeprobe negativ

aus. Die negativen Proben wurden nicht für die PTHrP-nachweisenden Verfahren verwendet und sind deshalb in den entsprechenden Kapiteln nicht mehr mit aufgeführt.

Als positive Kontrolle wurde cDNA aus Tumorzellen der Zelllinien MDA-MB 231, 786-O und MCF-7 mitgeführt. Als negative Kontrolle diente ddH₂O.

3.7.2 Ergebnisse der primären PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP

In die primäre PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP-Gens wurden nur cDNA der Proben eingesetzt, die einen positiven Nachweis der β -Aktin-Expression ergaben. Als positive Kontrolle wurde cDNA aus Tumorzellen der Zelllinien MDA-MB 231 und 786-O, als negative Kontrolle ddH₂O mitgeführt.

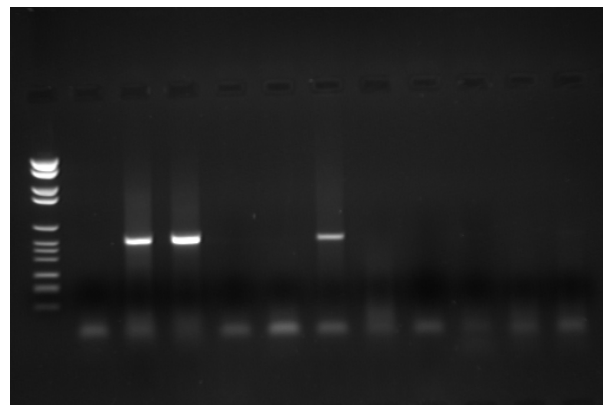
3.7.2.1 Ergebnisse der primären PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP in Knochenmark- und Blutproben der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

Die 7 KM- und PB-Proben der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma fielen negativ für den Nachweis von PTHrP in der primären PCR aus.

3.7.2.2 Ergebnisse der primären PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP in Knochenmark-, Blut- und Tumorgewebeproben der Patientinnen mit einem Mammakarzinom

Von den 40 Patientinnen mit einem malignen Mammatumor wurde die Expression des PTHrP-Gens in der primären PCR an 37 KM, 37 PB und 12 Tumorgewebeproben überprüft. Von 11 der Patientinnen wurden Proben des KM, des PB und des Tumorgewebes untersucht, von 23 Proben des KM und PB. Bei 3 Patientinnen wurde die Untersuchung nur an Proben des PB (R.S., G.N., R.R.) und bei 3 Patientinnen nur an Proben des KM (K.L.U., N.K., K.R.E.E.) durchgeführt, wobei von 1 Patientin zusätzlich eine Probe des Tumorgewebes vorlag (K.R.E.E.).

Keine der 37 KM- und PB-Proben zeigte die für PTHrP-typischen Banden in der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte. Ein positiver Nachweis für PTHrP wurde bei 11 der 12 Tumorgewebe, ein negativer bei 1 der 12 Tumorgewebe (G.L.) gefunden.



LS N P TU KM PB TU KM PB TU KM PB
1 2 3

Abb. 3.3: Produkte der primären PCR für PTHrP des KM und PB der Patientinnen mit einem Mammakarzinom nach gelelektrophoretischer Auftrennung, LS: Längenstandard VI, P: Positivkontrolle / MB-231, N: Negativkontrolle, TU: Tumor, KM: Knochenmark, PB: peripheres Blut, 1: TU, KM und PB der Patientin B.G., 2: Tu, KM und PB der Patientin H.N.H., 3: TU, KM und PB der Patientin G.L.

3.7.3 Ergebnisse der nested PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP

Die Produkte der primären PCR zum Nachweis von PTHrP sowie die Produkte der negativen und positiven Kontrollen der jeweiligen Ansätze der primären PCR wurden in die Versuchsansätze der nested PCR zum Nachweis von PTHrP eingesetzt.

3.7.3.1 Ergebnisse der nested PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP in Knochenmark- und Blutproben der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

Die 7 KM und PB-Proben der 7 Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma zeigten keine Amplifikation des PTHrP-Produktes in der nested PCR zum Nachweis von PTHrP.

Die Hybridisierung mit einer PTHrP-spezifischen Sonde der PCR-Produkte in der Southern-Blot-Technik bestätigte das Ergebnis (Tabelle 3.57).

Material	Patienten- anzahl	PTHrP	
		positiv	negativ
KM	7	0	7
PB	7	0	7

Tab. 3.57: Ergebnisse für PTHrP im KM und PB der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

3.7.3.2 Ergebnisse der nested PCR zum Nachweis der Expression von PTHrP in Knochenmark-, Blut- und Tumorgewebeproben der Patientinnen mit einem Mammakarzinom

Von den Proben der 40 Patientinnen mit einem Mammakarzinom wurden von 34 KM- und PB-Proben untersucht, von 3 Patientinnen nur Proben des KM (K.R.E.E., K.L.U., N.K.) und von 3 Patientinnen nur Proben des PB (R.S., G.N., R.R.). 10 von 37 Knochenmark- und 8 von 37 Blutproben stellten sich PTHrP-positiv in der nested PCR zum Nachweis von PTHrP dar. 27 der 37 KM- und 29 der 37 PB-Proben fielen negativ für PTHrP bei dieser Untersuchung aus.

Das Tumorgewebe der Patientin (G.L.), deren Tumorgewebeprobe in der primären PCR negativ ausgefallen war, zeigte eine PTHrP-typische Bande in der nested PCR zum Nachweis von PTHrP. Die 11 Tumorgewebe, welche in der primären PCR bereits positive Ergebnisse gezeigt hatten, wurden nicht in die nested PCR überführt.

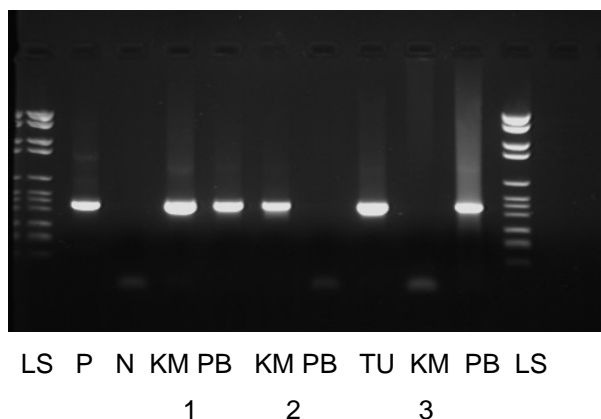


Abb. 3.4: Produkte der nested PCR für PTHrP der KM- und PB-Proben von Patientinnen mit einem Mammakarzinom LS: Längenstandard VI, P: Positivkontrolle / MB-231, N: Negativkontrolle, KM: Knochenmark, PB: peripheres Blut, TU: Tumor, 1: KM und PB der Patientin B.G., 2: KM und PB der Patientin H.N.H., 3: KM, PB und TU der Patientin G.L.

3.7.4 Ergebnisse der Hybridisierung der PCR-Produkte der Knochenmark-, Blut- und Tumorgewebeproben der Patientinnen mit einem Mammakarzinom mit PTHrP-spezifischen Sonden

Die Produkte der nested PCR wurden mit Hilfe des Southern-Blots auf Nylonmembranen transferiert und die Spezifität der Ergebnisse durch die Hybridisierung mit Sonden, die komplementär zu Sequenzen des PTHrP-Gens waren, überprüft. Alle in der nested PCR als PTHrP-positiv bewerteten Produkte konnten bestätigt werden. Insgesamt wurden PCR-Produkte von 37 Proben des Knochenmarks, 37 Proben peripheren Blutes und 12 Proben

des operativ entfernten Tumorgewebes von Patientinnen mit der Erstdiagnose eines Mammakarzinoms auf Transkripte des PTHrP-Gens untersucht.

11 der 37 KM-Proben (29,73%) wurden nach der Hybridisierung der Produkte der nested PCR als PTHrP-positiv eingestuft. Davon zeigte die Knochenmarkprobe 1 Patientin mit einem primären Mammakarzinom des Stadiums IIA und einem T2-Tumor, die in der sekundären PCR keine deutliche Bande erkennen ließ, eine PTHrP-spezifische Bande in der hybridisierten Nylonmembran und wurde somit als positiv für das PTHrP-Gen gewertet (F.E.). 26 der 37 KM-Proben (70,27%) waren negativ für PTHrP in der Blot-Technik.

9 der 37 PB-Proben (24%) waren im Blot mit PTHrP-spezifischen Sonden positiv. Davon wurde bei 1 Patientin (H.L.) mit einem Tumor des Stadiums IIA und einem T2-Tumor, deren Probe in der nested PCR für PTHrP keine deutliche Bande aufwies, eine PTHrP-spezifische Bande auf der Blot-Ebene festgestellt, weshalb die PB-Probe dieser Patientin als PTHrP-positiv gewertet wurde. 28 der 37 PB-Proben (76%) erwiesen sich als PTHrP-negativ in dieser Untersuchung.

Proben des KM und des PB wurden von 34 Patientinnen mit der gesicherten Diagnose eines Mammakarzioms untersucht. PTHrP-Positivität in KM und PB zeigten die Proben von 2 Patientinnen mit einem Tumor des Stadiums IIB (5,88%) (B.G., E.T). Ein positives Ergebnis im KM, nicht aber im PB wurde bei 9 der 34 Patientinnen (26,47%) gefunden (H.N.D., N.R., L.S., H.N.H., F.E., I.N., S.M., C.T., K.C.). PTHrP-positiv im PB und negativ im KM stellten sich 5 der 34 Proben (14,71%) dar (P.X., G.L., H.L., K.L.F., T.U.). Bei 18 der 34 Patientinnen (52,94%) fielen die Proben des KM und des PB negativ für PTHrP aus (Tabelle 3.59).

Für 11 der 12 Tumorgewebeproben, die in der primären PCR positive Ergebnisse für die Expression des PTHrP-Gens gezeigt hatten, und 1 von 12 Tumorgewebeproben, die in der nested PCR für PTHrP einen positiven Nachweis erbracht hatte, wurde die Spezifität der PCR-Produkte in der Hybridisierung bestätigt.

Die Tabelle 3.58 gibt die PTHrP-positiven Ergebnisse des untersuchten KM ,PB und Tumorgewebes bezogen auf die Anzahl und Art untersuchter Proben sowie das Tumorstadium wieder.

PTHrP						
Stadium	KM (n=37)		PB (n=37)		Tumor (n=12)	
	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
0	1 (1)	3 (3)	1 (1)	3 (3)	x	x
I	1 (1)	2 (2)	0 (0)	2 (2)	x	x
IIA	5 (4)	10 (10)	5 (4)	10 (10)	7 (7)	0
IIB	2 (2)	3 (3)	2 (2)	4 (4)	2 (2)	0
IIIA	0 (0)	3 (3)	0 (0)	2 (2)	1 (1)	0
IIIB	0 (0)	4 (4)	1 (1)	4 (4)	1 (1)	0
IV	1 (1)	1 (1)	0 (0)	2 (2)	1 (1)	0
nicht definiert	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	x	x
Gesamt	11 (10)	26 (26)	9 (8)	28 (28)	12 (12)	0

Tab. 3.58: PTHrP-positive Ergebnisse im Blot bezogen auf das Tumorstadium, die Anzahl und die Art der untersuchten Proben; in Klammern sind die Ergebnisse der nested PCR für PTHrP angegeben; nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren einer Einteilung im Sinne der TNM-Klassifikation nicht zugänglich, Tumor: Tumorgewebe, x: kein Material

n=34	KM pos.	KM neg.
PB pos.	2	5
PB neg.	9	18

Tab.3.59: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP in den KM- und PB-Proben der Patientinnen mit einem Mammakarzinom; aufgeführt sind nur Patientinnen, von denen beide Probearten untersucht wurden.

Von den Patientinnen, deren Tumorgewebe auf die Expression von PTHrP untersucht wurde, standen von 11 Patientinnen auch KM und PB, von 1 Patientin nur das KM (K.R.E.H.) für diese Untersuchung zur Verfügung. Alle 12 untersuchten Tumorgewebe exprimierten PTHrP (100%). Zusätzlich wurden im KM von 3 (25%) (F.E., H.N.H., B.G.) und im PB von 2 Patientinnen (18,18%) (G.L., B.G.) positive Ergebnisse für PTHrP beobachtet. Davon waren alle 3 Proben 1 Patientin mit einem Tumor des Stadium IIA (B.G.) positiv für das Gen des überprüften Proteins. 9 von 12 KM (75%) und 9 von 11 PB (81,82%) ergaben keinen Anhalt für die Expression dieses Markers bei PTHrP-positivem Tumorgewebe (Tabellen 3.60 und 3.61).

n=12	Tumor positiv	Tumor negativ
KM positiv	3	0
KM negativ	9	0

Tab. 3.60

n=11	Tumor positiv	Tumor negativ
PB positiv	2	0
PB negativ	9	0

Tab. 3.61

Tabelle 3.60 und 3.61: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für PTHrP in Tumorgewebe und KM bzw. PB der Patientinnen mit einem Mammakarzinom; das Tumorgewebe wurde von Patientinnen mit der Erstdiagnose eines Mammakarzinoms gewonnen; n: Anzahl

3.8 Ergebnisse des Nachweises von PTHrP bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom bezogen auf das Stadium des Tumors

KM und PB von 37 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom wurden mittels der RT-PCR und anschließender Hybridisierung mit PTHrP-spezifischen Sonden auf die Expression von PTHrP überprüft. Von 32 Patientinnen dieser Gruppe standen KM und PB, von 2 Patientinnen nur KM (K.R.E.E., K.L.U.) und von 3 Patientinnen nur PB (R.S., G.N., R.R.) für diese Untersuchung zur Verfügung. Die als positiv gewerteten Proben zeigten PTHrP-positive Ergebnisse im Blot mit PTHrP-spezifischen Sonden.

10 von 34 KM (29,41%) und 9 von 35 PB (25,71%) waren PTHrP-positiv. In 24 von 34 KM (70,59%) und 26 von 35 PB (74,29%) konnte das Gen des Proteins nicht nachgewiesen werden. Die 12 untersuchten Tumorgewebeprobe n stellten sich alle PTHrP-positiv dar (100%) (Tabelle 3.62).

Stadium	PTHrP					
	KM (n=34)		PB (n=35)		Tumor (n=12)	
	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
0	1	3	1	3	x	x
I	1	1	0	2	x	x
IIA	4	9	5	8	7	0
IIB	2	3	2	4	2	0
IIIA	0	3	0	2	1	0
IIIB	0	4	1	4	1	0
IV	1	1	0	2	1	0
nicht definiert	1	0	0	1	x	x
Gesamt	10	24	9	26	12	0

Tab. 3.62: Ergebnisse für PTHrP des KM und PB von Patientinnen mit einem primären Karzinom der Mamma auf Blotebene bezogen auf die Anzahl untersuchter Proben und das Stadium des Tumors; nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren im Sinne der TNM-Klassifikation nicht klassifizierbar, pos.: positiv, neg.: negativ, x: kein Material

Ein positives Ergebnis für PTHrP im KM und ein negatives im PB wurde bei 8 der 32 Patientinnen (25%) festgestellt, von denen beide Probearten untersucht wurden. Von diesen hatte 1 Patientin einen Tumor im Stadium 0 (H.N.D.), 1 einen Tumor im Stadium I (N.R.), 3 einen Tumor im Stadium IIA (L.S., H.N.H., F.E.), 1 einen Tumor im Stadium IIB (S.M.), 1 einen Tumor im Stadium IV (C.T.) und 1 einen Tumor dessen Größe nicht festgelegt wurde und der deshalb keinem Tumorstadium im Rahmen der TNM-Klassifikation zugeordnet werden konnte (K.K.I.). Ein negatives Ergebnis für die Expression von PTHrP im KM und ein positives im PB fand sich bei 5 Patientinnen (15,63%). Von diesen hatte 1 einen Tumor im Stadium 0 (P.X.), 3 einen Tumor im Stadium IIA (G.L., H.L., K.L.F.) und 1 einen Tumor im Stadium IIB (T.U.). Ein Nachweis von PTHrP im KM und PB gelang bei 2 Patientinnen (6,25%). Davon hatte 1 einen Tumor im Stadium IIA (B.G.) und 1 einen Tumor im Stadium IIB (E.T.). Bei 17 der 32 Patientinnen (53,13%), bei denen beide Probearten untersucht wurden, konnte eine Expression des PTHrP-Gens nicht nachgewiesen werden (Tabelle 3.63 und Diagramm 3.8).

n=32	KM pos.	KM neg.
PB pos.	2	5
PB neg.	8	17

Tab. 3.63: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP im KM und PB aller Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; pos.: positiv, neg.: negativ

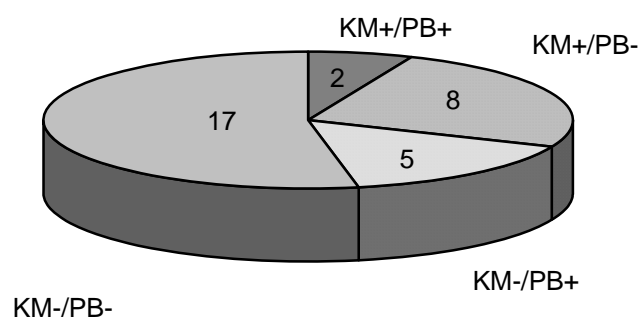


Diagramm 3.8: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Hybridisierung mit spezifischen Sonden zum Nachweis von PTHrP der KM- und PB-Proben der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; aufgeführt sind nur die Patientinnen, von denen KM und PB untersucht wurden (n=32)

Die Darstellung und der Vergleich der Ergebnisse der untersuchten Tumorgewebe von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom sind in Kapitel 3.7.4 dargestellt.

3.8.1 Ergebnisse des PTHrP-Nachweises bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen

Von 14 Patientinnen mit einem negativen Nodalstatus und ohne Fernmetastasen wurden KM und PB auf Transkripte von PTHrP überprüft. Die als positiv für Transkripte des PTHrP-Gens gewerteten Proben zeigten PTHrP-spezifische PCR-Produkte in der Hybridisierung des Southern-Blots.

In 4 der 14 KM-Proben (28,57%) konnte PTHrP detektiert werden. Die Proben stammten von 1 Patientin mit einem Carcinoma in situ (H.N.D.), von 1 Patientin mit einem T1-Tumor (N.R.) und von 2 Patientinnen mit einem T2-Tumor (F.E., B.G.). Proben des PB ergaben bei 4 von 14 Patientinnen (28,57%) ein positives Ergebnis für PTHrP. Von diesen hatte 1 Patientin ein Carcinoma in situ (P.X.), und 3 Patientinnen einen T2-Tumor (H.L., K.L.F., B.G.). In 10 von 14 KM-Proben (71,43%) und 10 von 14 PB-Proben (71,43%) konnten keine Transkripte von PTHrP nachgewiesen werden. Eine Darstellung der Ergebnisse der jeweiligen Probenart bezogen auf die Anzahl der überprüften Proben und die Größe des Tumors zeigen die Tabellen 3.64 und 3.65.

PTHrP			
Tumorgröße	Patientenanzahl	KM	
		pos.	neg.
Cis	4	1	3
T1	2	1	1
T2	7	2	5
T4	1	0	1
Gesamt	14	4	10

Tab. 3.64

PTHrP			
Tumorgröße	Patientenanzahl	PB	
		pos.	neg.
Cis	4	1	3
T1	2	0	2
T2	7	3	4
T4	1	0	1
Gesamt	14	4	10

Tab. 3.65

Tab. 3.64 und 3.65: Ergebnisse für PTHrP im Southern-Blot der KM- und PB-Proben von Patientinnen mit einem primären Karzinom der Mamma bezogen auf die Anzahl untersuchter Proben und die Größe des Tumors; pos.: positiv, neg.: negativ

Bei 1 Patientin (7,14%) mit einem T2-Tumor waren KM und PB positiv für PTHrP (B.G.). 3 Patientinnen (21,43%) zeigten Transkripte für PTHrP im KM, nicht aber im PB, von denen 1 ein Carcinoma in situ (H.N.D.), 1 einen T1-Tumor (N.R.) und 1 einen T2-Tumor hatte. Bei 3 der 14 Patientinnen (21,43%) war PTHrP im PB detektierbar, ohne gleichzeitigen Nachweis im KM. Von diesen hatte 1 ein Carcinoma in situ (P.X.) und 2 einen Tumor der Größe T2 (H.L., K.L.F.). Bei 7 von 14 Patientinnen (50%) waren keine positiven Ergebnisse für PTHrP im KM und PB zu finden (Tabelle 3.66).

PTHrP		
n=13	KM pos.	KM neg.
PB pos.	1	3
PB neg.	3	6

Tab. 3.66: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP im Southern-Blot der KM- und PB-Proben der nodal negativen Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen; pos.: positiv, neg.: negativ

Von 4 Patientinnen mit einem Tumor der Größe T2 im Stadium IIA wurde zusätzlich operativ entferntes Tumorgewebe auf die Expression von PTHrP untersucht. Bei 2 Patientinnen (F.E., B.G.) waren Transkripte für PTHrP im Knochenmark und im Tumorgewebe nachweisbar, bei 2 Patientinnen lediglich im Tumorgewebe. Von 4 Patientinnen mit positiven Ergebnissen für PTHrP im Tumorgewebe fiel bei 1 Patientin (B.G.) die Untersuchung des PB positiv, bei 3 Patientinnen negativ aus. Bei 1 Patientin war die Untersuchung der nested-PCR-Produkte für PTHrP in der Hybridisierung für alle drei Probenarten positiv (B.G.) (Tabellen 3.67 und 3.68).

PTHrP		
n=4	Tumor positiv	Tumor negativ
KM positiv	2	0
KM negativ	2	0

Tab. 3.67

PTHrP		
n=4	Tumor positiv	Tumor negativ
PB positiv	1	0
PB negativ	3	0

Tab. 3.68

Tabelle 3.67 und 3.68: Vergleich der Ergebnisse der KM- und PB-Proben der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen; aufgeführt sind nur Patientinnen, von denen alle 3 Probenarten untersucht wurden

3.8.2 Ergebnisse des PTHrP-Nachweises bei nodal positiven Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen

In dem Kollektiv nodal positiver Patientinnen bei denen keine Fernmetastasen diagnostiziert wurden, wurden von 21 Patientinnen die Produkte der nested PCR für PTHrP von 18 KM-Proben und 19 PB-Proben im Blot mit PTHrP-spezifischen Sonden auf die Expression von PTHrP untersucht. Von 16 Patientinnen lagen PB und KM, von 2 nur Proben des KM (K.R.E.E., K.L.U.) und von 3 nur Proben des PB (R.S., G.N., R.R.) für diese Untersuchung vor. Als PTHrP-positiv wurden Proben gewertet, deren nested-PCR-Produkte sich im Blot mit PTHrP-spezifischen Sonden nachweisen ließen.

In 5 von 18 KM (27,78%) konnten Transkripte des PTHrP-Gens nachgewiesen werden, wobei 2 Patientinnen einen T1-Tumor (L.S., H.N.H.), 2 Patientinnen einen T2-Tumor (S.M.,

E.T.) und 1 Patientin einen Tumor nicht festgelegter Größe (K.K.I.) aufwiesen. In 5 von 19 PB (26,32%) (E.T., T.U., G.N.) konnte PTHrP detektiert werden. Von diesen wurde bei 2 Patientinnen (G.L., R.S.) ein Tumor der Größe T1 diagnostiziert, bei 2 Patientinnen ein Tumor der Größe T2 (E.T., G.N.) und bei 1 Patientin ein Tumor der Größe T4 (T.U.). Negative Ergebnisse für diese molekularbiologische Untersuchung zeigten 13 von 18 KM-Proben (72,22%) und 14 von 19 PB-Proben (73,68%).

Die Tabellen 3.69 und 3.70 zeigen die Ergebnisse im KM und PB der Patientinnen bezogen auf die Anzahl untersuchter Proben und die Tumorgröße.

PTHrP			
Tumorgröße	Patientenanzahl	KM	
		pos.	neg.
T1	6	2	4
T2	7	2	5
T3	2	0	2
T4	2	0	2
TX	1	1	0
Gesamt	18	5	13

Tab. 3.69

PTHrP			
Tumorgröße	Patientenanzahl	PB	
		pos.	neg.
T1	7	2	5
T2	7	2	5
T3	1	0	1
T4	3	1	2
TX	1	0	1
Gesamt	19	5	14

Tab. 3.70

Tabelle 3.69 und 3.70: Ergebnisse für PTHrP im Southern-Blot der KM- und PB-Proben von nodal positiven Patientinnen mit einem primären Karzinom der Mamma ohne Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl untersuchter Proben und die Größe des Tumors; pos.: positiv, neg.: negativ

Von 16 Patientinnen, von denen Proben des KM und des PB untersucht wurden, wurde bei 1 Patientin (6,25%) mit einem Tumor der Größe T2 (E.T.) ein positives Ergebnis in beiden Probenarten gefunden. Ein positives Ergebnis im KM und ein negatives im PB fand sich bei 3 Patientinnen (18,75%), von denen 2 einen T1-Tumor (L.S., H.N.H.) und 1 Patientin einen T2-Tumor (S.M.) aufwiesen. 2 Patientinnen (12,5%) waren PTHrP-positiv im PB und PTHrP-negativ im KM, wobei bei einer ein Tumor der Größe T1 (G.L.) und bei einer ein Tumor der Größe T4 (T.U.) diagnostiziert wurde. In 10 von 16 Fällen (62,5%) fiel der Nachweis von PTHrP im KM und PB negativ aus (Tabelle 3.71).

PTHrP		
n=16	KM pos.	KM neg.
PB pos.	1	2
PB neg.	3	10

Tab. 3.71: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP im Southern-Blot der KM- und PB-Proben der nodal positiven Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen; aufgeführt sind nur Patientinnen, von denen beide Probenarten zur Verfügung standen; pos.: positiv, neg.: negativ

Von 7 der Patientinnen dieses Kollektivs wurden PCR-Produkte der Tumorgewebsproben mit PTHrP-spezifischen Sonden untersucht. Von 6 dieser Patientinnen lagen zusätzlich Proben des KM und PB zur Untersuchung vor, von 1 Patientin nur eine des KM (K.R.E.E.). Alle 7 Tumorgewebsproben stellten sich positiv dar, bei je 1 Patientin mit einem T1-Tumor konnte PTHrP auch im KM (14,29%) (H.N.H.) und im PB (16,67%) (G.L.) nachgewiesen werden. Bei 6 Patientinnen war das KM (85,71%) und bei 5 Patientinnen das PB (83,33%) negativ für PTHrP bei positivem Nachweis im Tumorgewebe (Tabellen 3.72 und 3.73).

n = 7	Tumor positiv	Tumor negativ
KM positiv	1	0
KM negativ	6	0

Tab. 3.72

n = 6	Tumor positiv	Tumor negativ
PB positiv	1	0
PB negativ	5	0

Tab. 3.73

Tabelle 3.72 und 3.73: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für PTHrP im Southern-Blot der Tumorgewebeproben und KM- bzw. PB-Proben der nodal positiven Patientinnen mit einem Mammakarzinom ohne Fernmetastasen; n: Anzahl

3.8.3 Ergebnisse des PTHrP-Nachweises bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen

Von 2 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und dem gleichzeitigen Vorliegen von Fernmetastasen wurden die nested-PCR-Produkte der KM- und PB-Proben mit PTHrP-spezifischen Sonden auf Transkripte des PTHrP-Gens im Southern-Blot überprüft. Als PTHrP-positiv wurden Proben befundet, deren PCR-Produkte sich mit der Sonde zum Nachweis von PTHrP-Transkripten im Southern-Blot markieren ließen.

1 Patientin mit einem T4-Tumor (C.T.) und positivem Lymphknotenstatus und pulmonalen Metastasen wies PTHrP-Transkripte im KM auf. Die Patientin mit einem T1-Tumor, positivem Lymphknotenstatus und ossären Metastasen war PTHrP-negativ in der untersuchten KM-

Probe (K.C.). Die untersuchten PB-Proben dieser Gruppe zeigten keinen Anhalt für das Vorliegen des überprüften Gens (Tabellen 3.74, 3.75 und 3.76).

Tumorgröße	Patientenanzahl	PTHrP KM	
		pos.	neg.
T1	1	0	1
T4	1	1	0
Gesamt	2	1	1

Tab. 3.74:

Tumorgröße	Patientenanzahl	PTHrP PB	
		pos.	neg.
T1	1	0	1
T4	1	0	1
Gesamt	2	0	2

Tab. 3.75

Tabelle 3.74 und 3.75: Ergebnisse für PTHrP des KM von Patientinnen mit einem primären Karzinom der Mamma und mit Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl untersuchter Proben und das Stadium des Tumors; pos.: positiv, neg.: negativ

n=2	KM pos.	KM neg.
PB pos.	0	0
PB neg.	1	1

Tab.3.76: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP im KM und PB der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen; pos.: positiv, neg negativ

3.8.4 Ergebnisse des PTHrP-Nachweises bei Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma

Von KM- und PB-Proben von 2 Patienten, deren Material zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose gewonnen wurde, wurden mittels PTHrP-spezifischer Sonden die Produkte der RT-PCR auf die Expression von PTHrP überprüft. Von diesen wurde initial bei einer Patientin ein primärer Tumor des Stadiums IIA (H.M.) und einem Patienten ein männliches Mammakarzinom des Stadiums IIA (I.N.) diagnostiziert. Lymphknoten- und / oder Fernmetastasen wurden zum Zeitpunkt der Probenentnahme bei keiner der beiden diagnostiziert. Ein positives Ergebnis fand sich bei der Patientin im KM (H.M.), das KM des Patienten mit einem männlichen Mammakarzinom war negativ für Transkripte des PTHrP-Gens. Die Proben des PB beider Patienten waren PTHrP-negativ.

Der Nachweis für die Expression von PTHrP in der RT-PCR und in der Hybridisierung mit PTHrP-spezifischen Sonden im Southern-Blot des untersuchten Knochenmarks der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma fiel negativ aus.

Die Tabellen 3.77, 3.78 und 3.79 stellen die Ergebnisse der untersuchten KM- und PB-Proben in Bezug auf das Stadium des Tumors bzw. des Primärtumors der Rezidivpatientinnen und die Anzahl untersuchter Proben dar. Das Zweitkarzinom der Patientin wurde mit T1 N2 bei unklarem Fernmetastasenstatus festgelegt, weshalb die

Patientin in der Tabelle als nicht definierbar im Rahmen der TNM-Klassifikation aufgeführt wird.

Tumor- stadium	Patienten- anzahl	PTHrP	
		pos.	neg.
IIA	2	1	1
nicht definiert	1	0	1
Gesamt	3	1	1

Tab. 3.77:

Tumor- stadium	Patienten- anzahl	PB	
		pos.	neg.
IIA	2	0	2
nicht definiert	x	x	x
Gesamt	2	0	2

Tab. 3.78

Tab. 3.77 und 3.78: Ergebnisse für PTHrP des KM von Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma bezogen auf die Anzahl untersuchter Proben und das Stadium des Tumors. Die Patientinnen mit einem Rezidiv sind dem Stadium des Primärtumors zu geordnet. pos.: positiv, neg.: negativ, nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren einer Einteilung im Sinne der TNM-Klassifikation nicht zugänglich

n=2	KM pos.	KM neg.
PB pos.	0	0
PB neg.	1	1

Tab. 3.79: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP im KM und PB der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma; pos.: positiv, neg.: negativ

3.9 Korrelation der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus

Im operativ entfernten Tumormaterial von 42 Patientinnen wurde die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren quantitativ bestimmt. Der Rezeptorbefund galt als positiv, wenn das Tumorgewebe als rezeptorarm, positiv oder hochpositiv eingestuft worden war. Negativ waren diejenigen Karzinomgewebe, in denen kein Rezeptorprotein nachgewiesen werden konnte.

Bei 36 der 42 Mammakarzinompatientinnen wurde der Östrogenrezeptorstatus im Tumorgewebe erhoben, bei 35 die Progesteronrezeptorexpression bestimmt und das KM, PB und Tumorgewebe auf Transkripte von PTHrP überprüft. Von 31 Patientinnen lagen KM und PB zur Untersuchung vor, von 3 Patientinnen nur KM-Proben (K.R.E.E., K.L.U., N.K.) und von 2 Patientinnen nur PB-Proben (G.N., R.R.).

3.9.1 Korrelation der Ergebnisse von PTHrP mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom

Von 34 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, in deren Tumorgewebe der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus ermittelt werden konnte, wurden Proben des KM und PB auf einen Tumorzellkontamination mittels der RT-PCR für PTHrP überprüft.

30 Tumorgewebe wiesen einen positiven Östrogenrezeptorstatus auf, 2 waren negativ. Von 30 Patientinnen, deren Tumorgewebe den Östrogenrezeptor exprimierten, wurden von 28 KM und PB, von 2 nur KM (K.R.E.E., K.L.U.) und von 2 Patientinnen nur Proben des PB (G.N., R.R.) auf die Expression von PTHrP untersucht. Transkripte von PTHrP konnten bei diesen in 8 von 30 KM (26,67%) (N.R., F.E., L.S., H.N.H., B.G., S.M., E.T., K.K.I.) und 8 von 30 PB (26,67%) (T.U., E.T., B.G., K.L.F., G.L., G.N., P.X., H.L.) gefunden werden. Bei 2 Patientinnen dieser Gruppe waren sowohl das KM als auch das PB positiv für PTHrP (B.G., E.T.). PTHrP-negativ bei Rezeptornachweis im Tumorgewebe waren 22 der 30 KM (73,33%) und 22 der 30 PB (73,33%). Von den 2 Patientinnen, deren Tumoren keinen Östrogenrezeptor exprimierten, waren das KM von 1 positiv (C.T.) und von 1 PTHrP-negativ. Die PB-Proben beider Patientinnen stellten sich negativ dar (Tabelle 3.80 und 3.81).

Tumorgewebe von 23 der auf PTHrP untersuchten Patientinnen exprimierten den Progesteronrezeptor. Bei 21 dieser Patientinnen wurde die Expression von PTHrP im KM und PB, von 2 nur im KM (K.R.E.E., K.L.U.) und von 2 nur im PB (G.N., R.R.) untersucht.

9 von 23 Patientinnen (39,13%) zeigten Transkripte des PTHrP-Gens im KM (N.R., F.E., L.S., H.N.H., B.G., S.M., E.T., C.T., K.K.I.) und 7 von 23 (30,43%) im PB (P.X., G.N., B.G., E.T., T.U., G.L., K.L.F.). 2 Patientinnen wiesen positive Ergebnisse für PTHrP im KM und PB auf (E.T., B.G.). Negative Ergebnisse für PTHrP bei positivem Rezeptorstatus fanden sich in 14 von 23 KM (60,87%) und 16 von 23 PB (69,57%). Bei 8 Patientinnen war kein Progesteronrezeptor im Tumorgewebe nachweisbar. Keine der 8 Patientinnen exprimierte PTHrP im KM. Bei 1 der 8 Patientinnen (12,5%) wurde PTHrP im PB gefunden (H.L.) und bei 7 der 8 Patientinnen (87,5%) fiel der Nachweis für PTHrP im PB negativ aus (3.82 und 3.83). Karzinome von 25 Patientinnen waren positiv für beide Rezeptortypen. Davon waren bei 2 Patientinnen PTHrP-Transkripte im KM und PB (B.G., E.T.), bei 6 im KM (N.R., F.E., L.S., H.N.H., S.M., K.K.I.) und bei 5 im PB (T.U., K.L.F., G.L., G.N., P.X.) nachweisbar. 1 Patientin zeigte weder eine Rezeptorexpression noch einen PTHrP-Nachweis im KM und PB (K.R.E.H.).

Knochenmark		
n=32	PTHrP-pos.	PTHrP-neg.
ER-positiv	8	22
ER-negativ	1	1

Tab. 3.80

Peripheres Blut		
n=32	PTHrP-pos.	PTHrP-neg.
ER-positiv	8	22
ER-negativ	0	2

Tab. 3.81

Tabelle 3.80 und 3.81: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von PTHrP im KM und PB von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und der Expression von Östrogenrezeptoren im Tumorgewebe; pos.: positiv, neg.: negativ, n: Anzahl, ER: Östrogenrezeptor

Knochenmark		
n=31	PTHrP-pos.	PTHrP-neg.
PR-positiv	9	14
PR-negativ	0	8

Tab. 3.82

Peripheres Blut		
n=31	PTHrP-pos.	PTHrP-neg.
PR-positiv	7	16
PR-negativ	1	7

Tab. 3.83

Tabelle 3.82 und 3.83: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von PTHrP im KM und PB von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und der Expression von Progesteronrezeptoren im Tumorgewebe; pos.: positiv, neg.: negativ, n: Anzahl, PR: Progesteronrezeptor

In den 12 Proben des entnommenen Tumorgewebes der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, wurde eine Koexpression von Östrogenrezeptoren und dem PTHrP-Gen in 12 von 12 Fällen, sowie eine Koexpression von Progesteronrezeptoren und Transkripten für PTHrP in 10 von 12 Fällen festgestellt. 2 der 12 untersuchten Tumorgewebe hatten einen negativen Progesteronrezeptorstatus bei nachweisbarer PTHrP-Expression.

3.9.2 Korrelation der Ergebnisse für PTHrP mit dem Östrogen- und Progesteronstatus der Patientinnen mit einem Rezidiv oder Zweitkarzinom der Mamma

Gewebe des Rezidivtumors einer Patientin, sowie Material der Patientin mit dem Zweitkarzinom der Mamma wurden auf Östrogen- und Progesteronrezeptoren untersucht. Das Tumorgewebe des Rezidivs stellte sich positiv für den Östrogen- und Progesteronrezeptor dar, das auf PTHrP-Transkripte untersuchte KM und PB der Patientin zeigte keinen Anhalt für eine Tumorzell dissemination. Das Gewebe des Zweitkarzinoms der Mamma war für beide Rezeptorarten negativ. Das KM der Patientin war negativ für PTHrP.

3.10 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten

Die in diesem Vergleich als positiv für die Expression von PTHrP bezeichneten Proben sind solche, deren nested-PCR-Produkte einen positiven Nachweis für die Expression für PTHrP in der Hybridisierung mit PTHrP-spezifischen Sonden ergaben. Die als positiv für CK 18 bewerteten Zytozentrifugationspräparate wiesen 3 oder mehr Zellen auf, die mit dem Antikörper gegen CK 18 markiert werden konnten.

3.10.1 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten bei Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

KM und PB von 7 der 8 Patientinnen wurden mittels der RT-PCR und der Hybridisierung der nested-PCR-Produkte auf die Expression von PTHrP und mit Hilfe von Zytozentrifugationspräparaten auf die Expression von CK 18 untersucht. Negative Ergebnisse für CK 18 und PTHrP wurden in 5 von 7 (71,43%) KM-Proben und 7 von 7 (100%) PB-Proben gefunden. Im KM von 2 der 7 Patientinnen (28,57%) (K.R.P., L.H.) ergab sich ein positives Resultat für CK 18 und ein negatives für PTHrP. Von den untersuchten Patientinnen war bei 5 von 7 keiner der beiden Marker im KM und PB nachweisbar (Tabelle 3.84 und 3.85).

Knochenmark (n=7)			peripheres Blut (n=7)		
	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ		PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	0	2	CK-18-positiv	0	0
CK-18-negativ	0	5	CK-18-negativ	0	7

Tab. 3.84

Tab. 3.85

Tabelle 3.84 und 3.85: Vergleich der Ergebnisse für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten und des Nachweises von PTHrP im KM und PB des Patientenkollektivs mit einer benignen Erkrankung der Mamma

3.10.2 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten aller Patientinnen mit einem Mammakarzinom

Von 40 Patientinnen mit der gesicherten Diagnose eines Mammakarzinoms wurde von 36 das KM und von 37 das PB sowohl auf die Expression von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten als auch auf Transkripte des PTHrP-Gens überprüft. Davon standen von 33 Patientinnen KM und PB, von 3 Patientinnen nur KM (K.R.E.E., K.L.U., N.K.) und von 4 Patientinnen nur Proben des PB (S.T., G.N., R.R., R.S.) für beide Untersuchungen zur Verfügung.

Bei der Auswertung der Ergebnisse von CK 18 in den Zytozentrifugationspräparaten und Untersuchung für die Expression von PTHrP wiesen 2 von 36 KM (5,56%) (N.R., B.G.) und 1 von 37 PB (2,70%) (R.S.) positive Ergebnisse in beiden Untersuchungen auf. CK-18-negativ und PTHrP-positiv waren 9 von 36 KM (25%) (H.N.D., L.S., H.N.H., F.E., S.M., E.T., C.T., K.K.I., I.N.) und 8 von 37 PB (21,62%) (P.X., G.L., H.L., K.L.F., B.G., E.T., G.N., T.U.). CK-18-positiv und PTHrP-negativ befundet wurden 7 von 36 KM (19,44%) (P.E., K.C., K.L.F., F.R.E., K.K.W., S.G., N.K.) und 3 von 37 PB (8,12%) (S.R., R.R., S.G.). Negativ für beide Parameter waren 18 von 36 (50%) KM-Proben und 25 von 37 PB-Proben (67,57%) (Tabelle 3.86 und 3.87).

10 von 33 Patientinnen von denen beide Probenarten zur Verfügung standen zeigten negative Ergebnisse für beide Marker im KM und PB, 1 von 33 Patientinnen (S.G.) wies in beiden Probenarten CK 18, nicht aber PTHrP auf und bei 1 von 33 Patientinnen (E.T.) waren KM und PB CK-18-negativ und PTHrP-positiv.

KM / n=36	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	2	7
CK-18-negativ	9	18

Tab. 3.86

PB / n=37	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	1	3
CK-18-negativ	8	25

Tab.3.87

Tabelle 3.86 und 3.87: Darstellung des Vergleichs der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM bzw. des PB aller Patientinnen mit einem Mammakarzinom

3.10.3 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom unter Berücksichtigung des Tumorstadiums

Es wurden Knochenmarksproben von 33 Patientinnen und Proben peripheren Blutes von 35 Patientinnen mit der Diagnose eines primären Mammakarzinoms anhand von Zytozentrifugationspräparaten auf CK 18 und mittels der RT-PCR und Blot-Technik auf die Expression von PTHrP untersucht. Von diesen standen von 31 Patientinnen sowohl KM als auch PB für beide Methoden zur Verfügung, von 2 Patientinnen nur KM (K.R.E.E., K.L.U.) und von 4 Patientinnen nur PB (S.T., G.N., R.R., R.S.). Die Tabellen 3.88 und 3.89 geben die Ergebnisse für Knochenmark- bzw. Blutproben in den nach Tumorstadien unterteilten Gruppen bezogen auf die Anzahl der untersuchten Patientenproben wieder. Bei 1 Patientin mit einem Carcinoma in situ (P.E.) wurden vor dem Zeitpunkt der Diagnose des Mammakarzioms Lebermetastasen festgestellt, deren Ursprung pathohistologisch nicht geklärt werden konnte und bei der ein Tumor anderer Genese ausgeschlossen wurde. Diese Patientin ist aus diesem Grund unter dem Stadium 0 aufgeführt. Bei einer Patientin (K.K.I.)

wurde die Tumorgröße nicht definiert, weshalb eine Einteilung des Tumors in ein Stadium der TNM-Klassifikation nicht möglich war und die Patientin als "nicht definiert" in den Tabellen aufgeführt wurde.

Positive Resultate für beide Untersuchungen lagen in 2 von 33 Fällen (6,06%) in den KM-Proben vor. 1 Probe entstammte einer Patientin mit einem Tumor im Stadium I (N.R.) und 1 Probe einer Patientin mit einem Tumor im Stadium IIA (B.G.). PTHrP-positive und CK-18-negative Ergebnisse zeigten sich im KM von 8 der 33 Patientinnen (24,24%), von denen 1 ein Carcinoma in situ (H.N.D.), 3 einen Tumor im Stadium IIA (L.S., H.N.H., F.E.), 2 einen Tumor im Stadium IIB (E.T., S.M.), 1 einen Tumor im Stadium IV (C.T.) und 1 einen Tumor nicht definierter Größe hatte, weshalb dieser keinem Stadium im Rahmen der TNM-Klassifikation zugeteilt werden konnte (K.K.I.). PTHrP-Negativität und CK-18-Positivität wurde bei 6 der 33 Patientinnen (18,18%) im KM gefunden. Von diesen hatte 1 einen Tumor im Stadium 0 bei Lebermetastasen unklaren Ursprungs (P.E.), 2 einen Tumor im Stadium IIA (K.L.F., K.K.W.), 1 einen Tumor im Stadium IIB (F.R.E.), 1 einen Tumor im Stadium IIIB (S.G.) und 1 einen Tumor im Stadium IV (K.C.). Negativ für beide Marker waren 17 der 33 KM-Proben (51,52%).

1 von 35 PB-Proben (2,86%) von einer Patientin mit einem Tumor im Stadium IIA (R.S.) war positiv für beide Marker. Positive Ergebnisse für PTHrP und negative für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten wurden im PB von 8 der 35 Patientinnen (22,86%) festgestellt. Von diesen hatte 1 ein Carcinoma in situ (P.X.), 4 einen Tumor im Stadium IIA (G.L., H.L., K.L.F., B.G.), 2 einen Tumor im Stadium IIB (E.T., G.N.) und 1 einen Tumor im Stadium IIIB (T.U.). Negativ für PTHrP und positiv für CK 18 im Zytozentrifugationspräparat waren 3 der 35 (8,57%) untersuchten PB-Proben, die einer Patientin mit einem Tumor im Stadium IIA (S.R.) und zwei Patientinnen mit einem Tumor im Stadium IIIB (R.R., S.G.) entnommen worden waren. Ein negatives Ergebnis für beide Marker ergab sich bei 23 der 35 PB-Proben (65,71%).

In 10 von 31 Fällen, von denen KM und PB untersucht wurden, waren sowohl das KM als auch das PB negativ für beide Marker. Konkordante positive Ergebnisse für KM und PB lagen nicht vor. 1 Patientin mit einem Tumor im Stadium IIIB (S.G.) zeigte positive Ergebnisse für CK 18 im KM und PB und negative für PTHrP in beiden Probearten. Bei 1 Patientin mit einem Tumor im Stadium IIB (E.T.) wiesen KM und PB positive Ergebnisse für PTHrP, nicht aber für CK 18 auf.

Methode		Knochenmark (n=33)								Gesamt- anzahl
		Tumorstadium								
PTHrP	CK 18 (Zytospin)	Cis	I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	nicht definiert	
positiv	positiv	0	1	1	0	0	0	0	0	2
positiv	negativ	1	0	3	2	0	0	1	1	8
negativ	positiv	1	0	2	1	0	1	1	0	6
negativ	negativ	2	1	7	1	3	3	0	0	17
Patientenanzahl		4	2	13	4	3	4	2	1	33

Tab.3.88: Vergleich der im Knochenmark gefundenen Ergebnisse für PTHrP und der auf CK 18 untersuchten Zytozentrifugationspräparate bezogen auf das Tumorstadium und die Anzahl der untersuchten Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; Zytospin: Zytozentrifugationspräparate mit 1×10^5 Zellen, nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren im Rahmen der TNM-Klassifikation nicht klassifizierbar

Vergleich von PTHrP und CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM

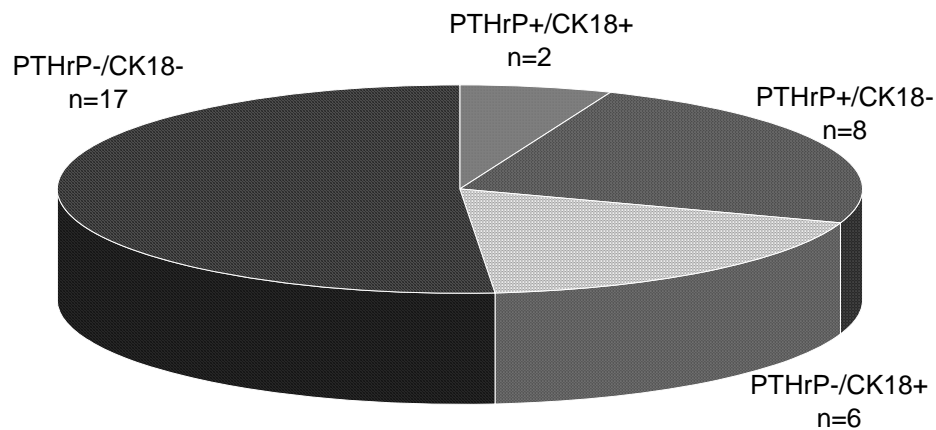


Diagramm 3.9: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP im Blot und CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der KM-Proben aller Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; aufgeführt sind nur Patientinnen, bei denen beide Untersuchungen durchgeführt wurden

Methode		Tumorstadium								Gesamtanzahl
PTHrP	CK 18 (Zytospin)	Cis	I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	nicht definiert	
positiv	positiv	0	0	1	0	0	0	0	0	1
positiv	negativ	1	0	4	2	0	1	0	0	8
negativ	positiv	0	0	1	0	0	2	0	0	3
negativ	negativ	3	2	7	4	2	2	2	1	23
Patientenanzahl		4	2	13	6	2	5	2	1	35

Tab.3.89: Vergleich der im peripheren Blut gefundenen Ergebnisse für PTHrP und der auf CK 18 untersuchten Zytozentrifugationspräparate bezogen auf das Tumorstadium und die Anzahl der untersuchten Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, Zytospin: Zytozentrifugationspräparate mit 1×10^5 Zellen, nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren im Rahmen der TNM-Klassifikation nicht klassifizierbar

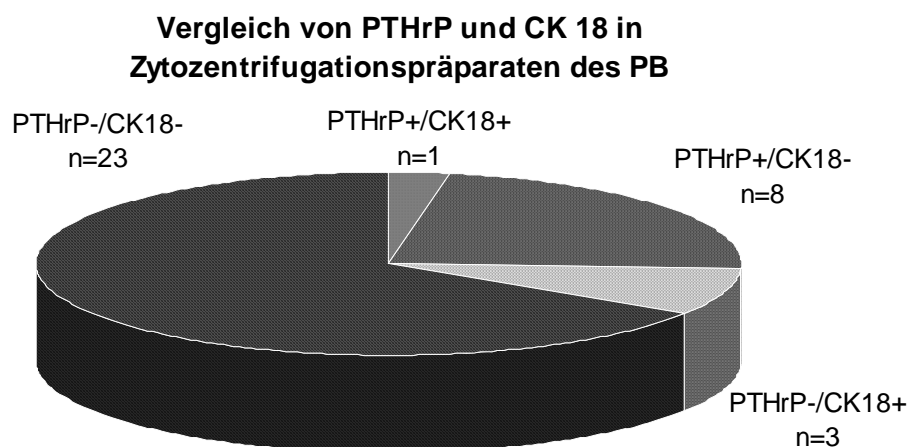


Diagramm 3.10: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP im Blut und CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der PB-Proben aller Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; aufgeführt sind nur Patientinnen, bei denen beide Untersuchungen durchgeführt wurden

3.10.3.1 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen

Von 14 Patientinnen wurden KM und PB in Zytozentrifugationspräparaten gegen CK 18 gefärbt und zusätzlich auf die Expression von PTHrP untersucht.

Im KM zeigten 2 der 14 Patientinnen (14,29%) positive Ergebnisse für CK 18 und PTHrP, von denen 1 einen Tumor der Größe T1 (N.R.) und 1 einen Tumor der Größe T2 (B.G.) aufwies. Positiv für CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten und negativ für die Expression

von PTHrP wurden 4 KM-Proben (28,57%) gewertet, die von 1 Patientin mit einem Carcinoma in situ bei Lebermetastasen unklaren Ursprungs (P.E.), von 2 Patientinnen mit einem T2-Tumor (K.L.F., K.K.W.) und 1 Patientin mit einem T4-Tumor (S.G.) gewonnen worden waren. Ein positiver Nachweis von PTHrP bei fehlendem Nachweis von CK-18-exprimierenden Zellen wurde bei 2 der 14 Patientinnen (14,29%) gefunden, von denen bei 1 Patientin ein Carcinoma in situ (H.N.D.) und bei 1 Patientin ein T1-Tumor (F.E.) diagnostiziert worden war. 6 der 14 (42,86%) untersuchten KM-Proben waren für beide Marker negativ.

Ein positives Ergebnis für PTHrP und CK 18 lag bei keinem (0%) der 14 untersuchten PB-Proben vor. CK-18-positiv und PTHrP-negativ stellte sich das PB von 1 Patientin (7,14%) mit einem T4-Tumor dar. Im PB von 4 Patientinnen (28,57%) wurden negative Ergebnisse für CK 18 und positive für PTHrP festgestellt. Von diesen hatten 1 ein Carcinoma in situ (P.X.) und 3 einen T2-Tumor (H.L., K.L.F., B.G.). Bei 9 der 14 Patientinnen (64,29%) war das PB negativ für beide Marker.

4 von 14 Patientinnen, von denen KM und PB untersucht wurden, wiesen negative Resultate für beide Marker im KM und PB auf. CK 18 wurde im KM und PB bei fehlendem Nachweis für eine PTHrP-Expression bei 1 Patientin mit einem T4-Tumor (S.G.) festgestellt. Positive Ergebnisse in KM und PB für beide untersuchten Proteine konnten bei keiner Patientin nachgewiesen werden.

Die Tabellen 3.90 und 3.91 stellen vergleichend die Ergebnisse des untersuchten KM und PB dieses Patientenkollektivs dar, die Tabellen 3.92 und 3.93 zeigen dies bezogen auf die Größe des Tumors.

Knochenmark		
n=14	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	2	4
CK-18-negativ	2	6

Tab. 3.90

peripheres Blut		
n=14	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	0	1
CK-18-negativ	4	9

Tab. 3.91

Tabelle 3.90 und 3.91: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten des KM bzw. PB nodal negativer Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; Zytospin: Zytocentrifugationspräparate mit 1×10^5 Zellen, n: Anzahl

KM (n=14)	Ergebnisse PTHrP / CK 18				Patienten- anzahl
	PTHrP+ / CK 18+	PTHrP+ / CK 18-	PTHrP- / CK 18+	PTHrP- / CK 18-	
Cis	0	1	1	2	4
T1	1	0	0	1	2
T2	1	1	2	3	7
T4	0	0	1	0	1
Gesamt	2	2	4	6	14

Tabelle 3.92: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM der nodal negativen Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Tumorgöße; \pm : positiv, \mp : negativ

PB (n=14)	Ergebnisse PTHrP / CK 18				Patienten- anzahl
	PTHrP+ / CK 18+	PTHrP+ / CK 18-	PTHrP- / CK 18+	PTHrP- / CK 18-	
Cis	0	1	0	3	4
T1	0	0	0	2	2
T2	0	3	0	4	7
T4	0	0	1	0	1
Gesamt	0	4	1	9	14

Tabelle 3.93: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des PB der nodal negativen Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Tumorgöße; +: positiv, -: negativ

3.10.3.2 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen

21 Patientinnen mit der primären Diagnose eines Mammakarzinoms mit Lymphknotenmetastasen und ohne Anhalt für Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose wurden auf die Expression von PTHrP und anhand von Zytozentrifugationspräparaten auf CK-18-exprimierende Zellen untersucht. Von 15 Patientinnen wurden KM- und PB-Proben auf beide Marker untersucht, von 2 Patientinnen nur KM-Proben (K.R.E.E., K.L.U.) und von 4 Patientinnen nur PB-Proben (R.S., G.N., R.R., S.T.). Bei einer Patientin dieses Kollektivs (K.K.I.) wurde die Tumorgöße nicht festgelegt.

Im KM wurde bei keiner der 17 Patientinnen die Expression von PTHrP und CK 18 festgestellt. CK-18-positiv und PTHrP-negativ war das KM 1 Patientin (B.G.) (5,88%) mit einem T2-Tumor. Negativ für CK 18 und positiv für PTHrP stellten sich die KM-Proben von 5

Patientinnen (29,41%) dar, von denen 2 einen T1-Tumor (L.S., H.N.H.) hatten, 2 einen T2-Tumor (S.M., E.T.) und eine einen Tumor nicht definierter Größe (K.K.I.). Als negativ für die Expression beider Proteine erwiesen sich 11 KM-Proben (64,71%).

Positive Ergebnisse in beiden Nachweisverfahren wurden im PB von 1 der 19 Patientinnen (5,26%) mit einem T1-Tumor (R.S.) beobachtet. Positiv für CK 18 bei negativem Ergebnis für PTHrP war das PB von 2 Patientinnen (10,53%), von denen 1 einen T1-Tumor (S.R.) und 1 einen T4-Tumor (R.R.) hatten. Transkripte von PTHrP ohne gleichzeitiges Vorliegen CK-18-positiver Zellen wurde bei 4 Patientinnen (21,05%) im PB detektiert. Von diesen wurde bei 1 Patientin ein T1-Tumor (G.L.) diagnostiziert, bei 2 Patientinnen ein T2-Tumor (E.T., G.N.) und bei 1 Patientin ein T4-Tumor (T.U.). 12 von 19 PB-Proben (63,16%) der Patientinnen dieses Kollektivs waren negativ für beide Marker.

Von 15 Patientinnen, von denen KM und PB untersucht wurden, war bei 1 Patientin mit einem Tumor der Größe T2 (E.T.) das KM und das PB positiv für PTHrP bei fehlender Expression des Zytokeratins. Von 6 der 15 Patientinnen zeigten weder das KM noch das PB einen Anhalt für eine Tumorzell dissemination.

Die Tabellen 3.94 und 3.95 stellen die Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten vergleichend dar. Die Tabellen 3.96 und 3.97 stellen diese Ergebnisse in Bezug auf die Tumorgöße dar.

Knochenmark		
n=17	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	0	1
CK-18-negativ	5	11

Tab. 3.94

Peripheres Blut		
n=19	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	1	2
CK-18-negativ	4	12

Tab. 3.95

Tabelle 3.94 und 3.95: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der nodal positiven Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen; n: Anzahl

KM (n=17)	Ergebnisse PTHrP / CK 18				Patientenanzahl
	PTHrP+ / CK 18+	PTHrP+ / CK 18-	PTHrP- / CK 18+	PTHrP- / CK 18-	
T1	0	2	0	4	6
T2	0	2	1	3	6
T3	0	0	0	2	2
T4	0	0	0	2	2
TX	0	1	0	0	1
Gesamt	0	5	1	11	17

Tabelle 3.96: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten des KM der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und Lymphknotenbefall ohne Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Tumorgöße; ±: positiv, -: negativ

PB (n=19) Tumor- größe	Ergebnisse PTHrP / CK 18				Patienten- anzahl
	PTHrP+ / CK 18+	PTHrP+ / CK 18-	PTHrP- / CK 18+	PTHrP- / CK 18-	
T1	1	1	1	4	7
T2	0	2	0	5	7
T3	0	0	0	1	1
T4	0	1	1	1	3
TX	0	0	0	1	1
Gesamt	1	4	2	12	19

Tabelle 3.97: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten des PB der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und Lymphknotenbefall ohne Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Tumorgöße; \pm : positiv, \mp : negativ

3.10.3.3 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen

Untersucht wurden das KM und PB von 2 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, bei denen zum Diagnosezeitpunkt bereits Fernmetastasen vorlagen. Im KM der Patientin mit einem T1-Tumor und ossären Metastasen (K.C.) war CK 18 nachweisbar, ohne dass die gleichzeitige Expression von PTHrP vorlag. Die Patientin mit einem T4-Tumor, positivem Lymphknotenstatus und Lungenmetastasen (C.T.) zeigte im KM positive Ergebnisse für PTHrP und negative Resultate in der CK 18 nachweisenden APAAP-Färbung. In den PB-Proben beider Patientinnen fielen die Nachweise der untersuchten Proteine negativ aus (Tabelle 3.98 und 3.99).

Knochenmark		
n=2	PTHrP- positiv	PTHrP- negativ
CK-18-positiv	0	1
CK-18-negativ	1	0

Tab. 3.98

Peripheres Blut		
n=2	PTHrP- positiv	PTHrP- negativ
CK-18-positiv	0	0
CK-18-negativ	0	2

Tab. 3.99

Tabelle 3.98 und 3.99: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Zytocentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen; n : Anzahl

3.10.4 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma

Von 2 Patientinnen, deren initial diagnostizierter Tumor als Stadium IIA klassifiziert wurde und deren KM und PB zum Zeitpunkt eines Rezidivs gewonnen wurde, standen für beide Detektionsverfahren KM und PB zur Verfügung. 1 Patient (I.N.) mit einem Rezidiv eines männlichen Mammakarzinoms wies ein positives Ergebnis für PTHrP und ein negatives für CK 18 im KM auf. Das KM der anderen Patientin war negativ hinsichtlich des Nachweises von PTHrP und CK 18 (H.M.). Das PB beider Patientinnen war für beide Marker negativ. Ein negativer Befund in beiden Detektionsmethoden ergab sich bei 1 von 2 Patientinnen im KM und im PB.

Bei der Patientin mit dem Zweitkarzinom der Mamma (N.K.), deren Zweitkarzinom mit T1 N2 MX festgelegt wurde, wurde nur das KM auf disseminierte Tumorzellen mit beiden Nachweisverfahren untersucht. CK 18 wurde im Zytozentrifugationspräparat nachgewiesen, nicht jedoch PTHrP (Tabelle 3.100 und 3.101).

Knochenmark		
n=3	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	0	1
CK-18-negativ	1	1

Tab. 3.100

Peripheres Blut		
n=2	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	0	0
CK-18-negativ	0	2

Tab. 3.101

Tabelle 3.100 und 3.101: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Zytozentrifugationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma; n: Anzahl

3.11 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten

Die im Folgenden als PTHrP-positiv beschriebenen KM- und PB-Proben ergaben einen positiven Nachweis für PTHrP in der Hybridisierung der nested-PCR-Produkte mit PTHrP-spezifischen Sonden. Die für CK 18 positiv gewerteten Sedimentationspräparate wiesen 3 oder mehr Zellen auf, die mit dem Antikörper gegen CK 18 markiert werden konnten.

3.11.1 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten bei Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

Von 3 Patientinnen wurden KM und PB auf die Expression von CK 18 in Sedimentationspräparaten und von PTHrP überprüft. Im KM zeigten 2 von 3 Patientinnen

und im PB 3 von 3 keinen Anhalt für eine Expression einer der beiden Marker. 1 der 3 Patientinnen (W.S.) zeigte ein positives Ergebnis für CK 18 und ein negatives für PTHrP im KM. Von den untersuchten Patientenproben waren in 2 von 3 Fällen KM und PB negativ für CK 18 und PTHrP (Tabelle 3.102 und 3.103).

	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	0	1
CK-18-negativ	0	2

Tab. 3.102

	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	0	0
CK-18-negativ	0	3

Tab. 3.103

Tabelle 3.102 und 3.103: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM und PB des Patientenkollektivs mit einer benignen Erkrankung der Mamma

3.11.2 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten aller Patientinnen mit einem Mammakarzinom

In der Betrachtung der Ergebnisse für CK 18 in Sedimentationspräparaten (Immunette) und der Hybridisierung der PCR-Produkte für PTHrP wurden KM-Proben von 15 Patientinnen und PB-Proben von 13 Patientinnen verglichen. Von diesen lagen von 13 Patientinnen KM und PB und von 2 Patientinnen (K.L.U., N.K.) nur KM vor. Bei 1 Patientin (N.K.), von der nur das KM untersucht wurde, bestand die Diagnose eines Zweitkarzinoms der Mamma. Die übrigen Proben stammten von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom.

Es zeigten sich positive Ergebnisse für CK 18 und PTHrP in 4 von 15 KM (26,67%) (N.R., H.N.H., B.G., S.M.). Eine Expression von PTHrP bei fehlendem Nachweis von CK 18 wurde bei 2 Patientinnen im KM (13,33%)(H.N.D., E.T.) festgestellt. Im KM von 2 der 15 Patientinnen (13,33%) (N.E., N.K.) wurden CK-18-exprimierende Zellen ohne den gleichzeitigen Nachweis von PTHrP beobachtet. Negativ für beide Marker waren 7 der 15 (46,67%) untersuchten Proben des KM.

In 1 der 13 PB-Proben (7,68%) (B.G.) wurden CK-18-positiv und PTHrP-positiv Befunde erhoben. 2 der 13 PB (15,38%) (P.X., E.T.) waren negativ für CK 18 und positiv für PTHrP. CK-18-Positivität und PTHrP-Negativität wurde bei 4 der 13 PB (30,77%) (N.E., N.R., H.N.H., K.C.) beobachtet. Negativ für beide Marker waren 6 der 13 PB (46,15%). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.104 und 3.105 dargestellt.

KM / n=15	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	4	2
CK-18-negativ	2	7

Tab. 3.104

PB / n=13	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	1	4
CK-18-negativ	2	6

Tab. 3.105

Tabelle 3.104 und 3.105: Darstellung der Ergebnisse für PTHrP auf der Blot-Ebene und CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM bzw. des PB aller untersuchten Patientinnen mit einem Mammakarzinom

3.11.2.1 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom unter Berücksichtigung des Tumorstadiums

Es wurde Knochenmark von 14 und peripheres Blut von 13 Patientinnen mit einem primären Karzinom der Brustdrüse auf die Expression von PTHrP mit Hilfe der RT-PCR und von CK 18 an Sedimentationspräparaten untersucht. Von diesen standen von 13 Patientinnen Blut und Knochenmark für beide Untersuchungen zur Verfügung, von 1 Patientin (K.L.U.) nur Proben des KM. Die Tabellen 3.106 und 3.107 zeigen die Ergebnisse im KM bzw. PB bezogen auf die Anzahl der untersuchten Proben und das Tumorstadium.

4 der 14 KM (28,57%) waren in beiden Untersuchungen positiv für den jeweiligen Marker. Von diesen hatte 1 Patientin einen Tumor im Stadium I (N.R.), 2 einen Tumor im Stadium IIA (H.N.H., B.G.) und 1 einen Tumor im Stadium IIB (S.M.). Ein positives Resultat für PTHrP und ein negatives für CK 18 fand sich in 2 von 14 KM-Proben (14,29%), die von 1 Patientin mit einem Carcinoma in situ (H.N.D.) und von 1 Patientin mit einem Tumor im Stadium IIB (E.T.) stammte. Eine fehlende Expression von PTHrP bei einem Nachweis CK 18 markierter Zellen wurde bei 1 Patientin (7,14%) (N.E.) mit einem Carcinoma in situ beobachtet. 7 der untersuchten KM-Proben (50%) ergaben keinen Hinweis auf eine Tumorzell dissemination.

1 der 13 PB-Proben (7,69%) von einer Patientin mit einem Tumor im Stadium IIA (B.G.) zeigte eine Expression von PTHrP neben einer Expression von CK 18. PTHrP-negative und CK-18-positive Ergebnisse lagen in 4 von 13 PB-Proben (30,77%) vor. Diese Proben stammten von 1 Patientin mit einem Carcinoma in situ (N.E.), von 1 Patientin mit einem Tumor im Stadium I (N.R.), von 1 Patientin mit einem Tumor im Stadium IIA (H.N.H.) und von einer Patientin mit einem Tumor im Stadium IV (K.C.). Bei 2 der 13 Patientinnen (15,38%) ließen sich PTHrP-exprimierende Zellen bei fehlender Expression von CK 18 nachweisen. Von diesen hatte 1 einen Tumor im Stadium 0 (P.X.) und 1 einen Tumor im Stadium IIB (E.T.). Negativ für beide Parameter waren 6 der 13 PB-Proben (46,15%).

Von den 13 Patientinnen, von denen KM und PB untersucht wurden, wies 1 Patientin mit einem Tumor des Stadiums IIA (B.G.) positive Ergebnisse in KM und PB in beiden Untersuchungen auf. 1 Patientin mit einem Tumor des Stadiums IIB (E.T.) zeigte ein

positives Ergebnis für PTHrP und ein negatives für CK 18 in KM und PB. PTHrP-negativ und CK-18-positiv waren KM und PB von 1 Patientin mit einem Carcinoma in situ (N.E.).

Methode		Tumorstadium							Gesamtanzahl
PTHrP	CK 18 (Immunette)	Tis	I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	
positiv	positiv	0	1	2	1	0	0	0	4
positiv	negativ	1	0	0	1	0	0	0	2
negativ	positiv	1	0	0	0	0	0	0	1
negativ	negativ	1	0	1	1	1	2	1	7
Patientenanzahl		3	1	3	3	1	2	1	14

Tab. 3.106: Vergleich der im Knochenmark gefundenen Ergebnisse für PTHrP und der auf CK 18 untersuchten Sedimentationspräparate bezogen auf das Tumorstadium und die Anzahl der untersuchten Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; Immunette: Sedimentationspräparate mit 1×10^6 Zellen,

Vergleich von PTHrP und CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM

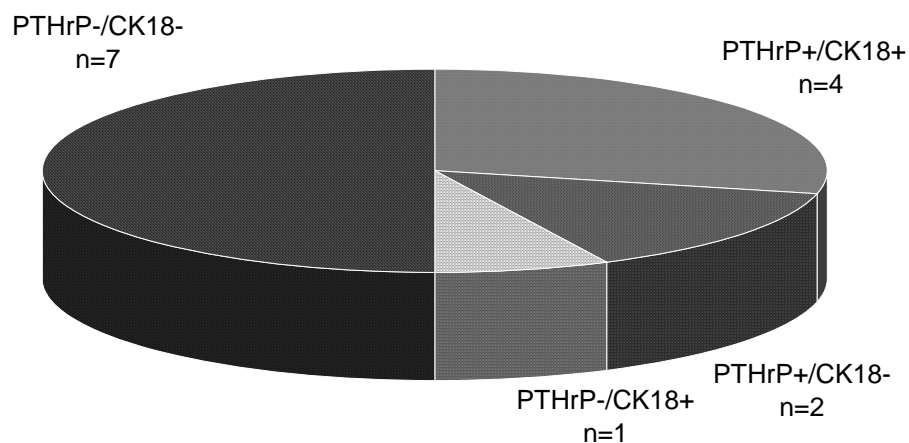


Diagramm 3.11: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP im Blot und CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM aller Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; aufgeführt sind nur die Patientinnen, bei denen beide Untersuchungen durchgeführt wurden

Methode		Tumorstadium							Gesamtanzahl
PTHrP	CK 18 (Immunette)	Tis	I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	
positiv	positiv	0	0	1	0	x	0	0	1
positiv	negativ	1	0	0	1	x	0	0	2
negativ	positiv	1	1	1	0	x	0	1	4
negativ	negativ	1	0	1	2	x	2	0	6
Patientenanzahl		3	1	3	3	x	2	1	13

Tab. 3.107: Vergleich der im peripheren Blut gefundenen Ergebnisse für PTHrP und der auf CK 18 untersuchten Sedimentationspräparate bezogen auf das Tumorstadium und die Anzahl der untersuchten Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; Immunette: Sedimentationspräparate mit 1×10^6 Zellen, nicht definiert: Tumoren dieser Patientinnen waren einer Einteilung im Rahmen der TNM-Klassifikation nicht zugänglich, x: kein Material

Vergleich von PTHrP und CK 18 in Sedimentationspräparaten des PB

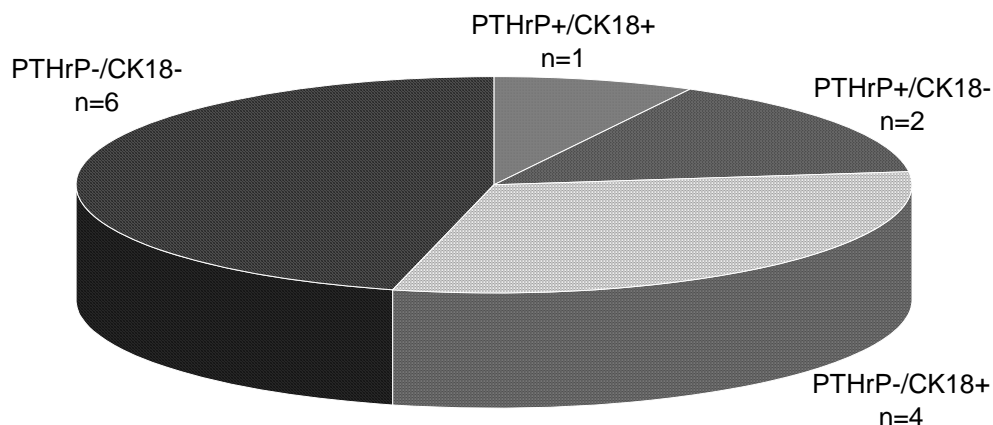


Diagramm 3.12: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP im Blut und CK 18 in Sedimentationspräparaten des PB aller Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom; aufgeführt sind nur die Patientinnen, bei denen beide Untersuchungen durchgeführt wurden

3.11.2.2 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen

KM und PB von 7 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, negativem Lymphknotenstatus und ohne Anhalt für eine Fernmetastasierung wurden anhand von

Sedimentationspräparaten auf CK 18 und mittels der RT-PCR auf die Expression von PTHrP überprüft.

Das KM von 2 Patientinnen, einer mit einem T1-Tumor (N.R.) und einer mit einem T2-Tumor (B.G.), waren positiv für beide Marker. Ein positiver Nachweis von PTHrP und ein negativer von CK 18 fand sich im KM von 1 Patientin mit einem Carcinoma in situ (H.N.D.). Negativ für PTHrP und positiv für CK 18 war das KM 1 Patientin mit einem Carcinoma in situ (N.E.). 3 von 7 KM-Proben waren negativ für beide Proteine.

Im PB waren Transkripte von PTHrP und eine Anfärbung des Zytokeratins 18 bei 1 der 7 Patientinnen (14,29%) mit einem T2-Tumor (B.G.) nachweisbar. CK-18-negativ und PTHrP-positiv war das PB 1 Patientin (14,29%) mit einem Carcinoma in situ (P.X.). PTHrP-negativ und CK-18-positiv war das PB von 2 Patientinnen (28,57%), von denen eine ein Cis (N.E.) und eine einen T1-Tumor (N.R.) hatte. Negativ für beide Marker war das PB von 3 der 7 Patientinnen (42,86%). Dargestellt sind die Ergebnisse in den Tabellen 3.108 und 3.109 sowie den Tabellen 3.110 und 3.111).

Bei 1 der 7 Patientinnen mit einem T2-Tumor (B.G.) waren CK 18 und PTHrP im KM und PB nachweisbar. Im KM und PB 1 Patientin mit einem Cis war CK 18 bei fehlender PTHrP-Expression nachweisbar (N.E.). KM und PB von 2 der 7 Patientinnen waren unauffällig bezüglich der überprüften Marker (K.K.W., S.G.).

Knochenmark		
n=7	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	2	1
CK-18-negativ	1	3

Tab. 3.108

peripheres Blut		
n=7	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	1	2
CK-18-negativ	1	3

Tab. 3.109

Tabelle 3.108 und 3.109: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM bzw. PB nodal negativer Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen; n: Anzahl

KM (n=7)	Ergebnisse PTHrP / CK 18				Patientenanzahl
	PTHrP+ / CK 18+	PTHrP+ / CK 18-	PTHrP- / CK 18+	PTHrP- / CK 18-	
Cis	0	1	1	1	3
T1	1	0	0	0	1
T2	1	0	0	1	2
T4	0	0	0	1	1
Gesamt	2	1	1	3	7

Tabelle 3.110: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Tumorgroße; ±: positiv, -: negativ

PB (n=7) Tumor- größe	Ergebnisse PTHrP / CK 18				Patienten- anzahl
	PTHrP+ / CK 18+	PTHrP+ / CK 18-	PTHrP- / CK 18+	PTHrP- / CK 18-	
Cis	0	1	1	1	3
T1	0	0	1	0	1
T2	1	0	0	1	2
T4	0	0	0	1	1
Gesamt	1	1	2	3	7

Tabelle 3.111: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Sedimentationspräparaten des PB der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Tumorgöße; \pm : positiv, \mp : negativ

3.11.2.3 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen

6 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, positivem Lymphknotenstatus und ohne Fernmetastasen wurde auf die gleichzeitige Expression von CK 18 in Sedimentationspräparaten und Transkripte von PTHrP untersucht. KM und PB lagen von 5 Patientinnen für beide Untersuchungsmethoden vor, von 1 Patientin nur Proben des KM (K.L.U.).

In 2 von 6 KM (33,33%) konnten CK-18-exprimierende Zellen markiert werden und ein positiver Nachweis für PTHrP geführt werden. Die Proben wurden 1 Patientin mit der Diagnose eines T1-Tumors (H.N.H.) und 1 Patientin mit der Diagnose eines T2-Tumors (S.M.) entnommen. Eine Expression von PTHrP bei fehlendem Nachweis von CK 18 lag im KM 1 Patientin (16,67%) mit einem T2-Tumor (E.T.) vor. Negativ für Transkripte von PTHrP und negativ für CK 18 exprimierende Zellen wurden 3 der 6 KM-Proben (50%) bewertet.

Keine der 5 PB-Proben erwies sich als positiv für beide Marker. Die PB-Probe von 2 Patientinnen (40%), eine mit einem T1-Tumor (H.N.H.) und eine mit einem T2-Tumor (E.T.), waren positiv für PTHrP und negativ für CK 18. 3 der 5 PB (60%) stellten sich negativ für beide Marker dar.

Bei 1 der 5 Patientinnen mit einem T2-Tumor, von denen beide Probearten untersucht wurden, waren KM und PB CK-18-negativ und PTHrP-positiv (E.T.). Von einer Patientin mit einem T2-Tumor (S.M.) waren im KM Transkripte von PTHrP nachweisbar und CK-18-positive Zellen zu finden, wobei das PB negative Ergebnisse in beiden Untersuchungsmethoden erbrachte (vergl. Tabelle 3.112 und 3.113, 3.114 und 3.115).

Knochenmark

n=6	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	2	0
CK-18-negativ	1	3

Tab. 3.112

Peripheres Blut

n=5	PTHrP-positiv	PTHrP-negativ
CK-18-positiv	0	0
CK-18-negativ	2	3

Tab. 3.113

Tabelle 3.112 und 3.113: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM bzw. PB nodal positiver Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen; n: Anzahl

KM (n=6)	Ergebnisse PTHrP / CK 18				Patientenanzahl
	PTHrP+ / CK 18+	PTHrP+ / CK 18-	PTHrP- / CK 18+	PTHrP- / CK 18-	
T1	1	0	0	0	1
T2	1	1	0	1	3
T3	0	0	0	1	1
T4	0	0	0	1	1
Gesamt	2	1	0	3	6

Tabelle 3.114: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Sedimentationspräparaten des KM der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Tumorgroße; ±: positiv, -: negativ

PB (n=5)	Ergebnisse PTHrP / CK 18				Patientenanzahl
	PTHrP+ / CK 18+	PTHrP+ / CK 18-	PTHrP- / CK 18+	PTHrP- / CK 18-	
T1	0	1	0	0	1
T2	0	1	0	2	3
T3	x	x	x	x	x
T4	0	0	0	1	1
Gesamt	0	2	0	3	5

Tabelle 3.115: Vergleich der Ergebnisse für PTHrP und CK 18 in Sedimentationspräparaten des PB der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen bezogen auf die Anzahl der Proben und die Tumorgroße; ±: positiv, -: negativ

3.11.2.4 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und mit Fernmetastasen

Das KM und PB einer Patientin (K.C.) mit einem T1-Tumor und ossären Metastasen wurde in Sedimentationspräparaten mit dem Antikörper gegen CK18 gefärbt und in der RT-PCR auf

die Expression von PTHrP überprüft. Das PB wies CK 18 anfärbbare Zellen auf, während Transkripte des PTHrP nicht nachweisbar waren. Im KM der Patientin war weder PTHrP noch CK 18 detektierbar.

3.11.3 Vergleich der Ergebnisse des Nachweises von PTHrP und von CK 18 in Sedimentationspräparaten der Patientinnen mit einem Rezidiv und der Patientin mit einem Zweitkarzinom der Mamma

Die Patientin mit dem Zweitkarzinom der Mamma wurde an einer Probe des Knochenmarks auf die Expression von PTHrP und CK 18 überprüft. Der Nachweis für CK 18 fiel positiv, der für PTHrP negativ aus.

3.12 Auswertung des Beobachtungszeitraumes

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind in den Tabellen 3.116 und 3.117 aufgeführt.

3.12.1 Betrachtung des Beobachtungszeitraums der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

Bei 8 der 54 Patientinnen wurde die Diagnose einer gutartigen Erkrankung der Brustdrüse gestellt.

Der mittlere Beobachtungszeitraum betrug 30 Monate (28 bis 35 Monate). Keine der Patientinnen entwickelte während dieser Zeit einen bösartigen Tumor oder ein Rezidiv des benignen Tumors.

In Zytozentrifugationspräparaten des KM konnten bei 2 von 8 Patientinnen (25%) (K.R.P., L.H.) CK-18-positive Zellen in der APAAP-Färbung detektiert werden. Eine der beiden Patientinnen (K.R.P.) wies ein adenoides intraduktales Adenom auf, bei der anderen wurde die Diagnose einer blut-duct-adenosis und einer fibrös-zystischen Mastopathie gestellt.

In den Sedimentationspräparaten des KM wies 1 von 3 Patientinnen CK 18 markierte Zellen auf (W.S.). Die Patientin hatte ein intraduktales Papillom und eine fibrös-zystische Mastopathie.

Transkripte des PTHrP-Gens konnten bei keiner der 7 untersuchten Patientinnen gefunden werden.

3.12.2 Betrachtung des Beobachtungszeitraums der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom

Bei 41 Patientinnen wurde zum Zeitpunkt der Probenentnahme ein primäres Mammakarzinom gesichert. Der mittlere Beobachtungszeitraum dieses Kollektivs betrug 20 Monate (19 Tage bis 35 Monate). Bei 6 Patientinnen trat innerhalb dieses Zeitraums ein Lokalrezidiv auf (G.L., H.R.I., R.S., S.T., P.M., T.U.), eine Patientin mit einer

Knochenmakskarzinose, hepatischer, pulmonaler und ossärer Filialisierung erlitt einen Progress der Knochenmetastasen (B.S.). Von den 6 Patientinnen erlitten 2 im Verlauf ein weiteres Lokalrezidiv (H.R.I., S.T.), eine davon zusätzlich eine pleurale Metastasierung (S.T.). 1 der 6 Patientinnen entwickelte im weiteren Verlauf ein Karzinom der kontralateralen Mamma (G.L.). Tumorbedingt verstarben 2 Patientinnen, von denen 1 Patientin (P.E.) mit einem Carcinoma in situ an den Folgen einer hepatischen Metastasierung erlag, die dem Primarius nicht eindeutig zuzuordnen war, ein Tumor anderer Genese jedoch ausgeschlossen werden konnte. Die andere Patientin (K.R.E.H.) verstarb durch eine Ausdehnung der zum Zeitpunkt der Diagnose bestehenden Lymphangiosis carcinomatosa, welche zum Todeszeitpunkt eine hepatische und pulmonale Beteiligung erkennen ließ. Da der Zeitpunkt des Progresses nicht dokumentiert wurde, wird die Patientin nicht in dem Kollektiv der Patientinnen aufgeführt, die ein Rezidiv entwickelten. Die Todesursache einer Patientin (H.N.H.) wurde nicht als tumorbedingt dokumentiert, weshalb sie in der folgenden Darstellung der Tumorkomplikationen nicht berücksichtigt wird. Das mittlere rezidivfreie Intervall im gesamten Kollektiv der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom betrug 15,4 Monate, das mittlere Intervall bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes 7,25 Monate. Insgesamt wurden bei 26 der 41 Patientinnen (63%) disseminierte Tumorzellen im Knochenmark oder peripheren Blut durch den immunzytologischen Nachweis von CK 18 in Zytospin- oder Sedimentationspräparaten oder mittels der RT-PCR für den Nachweis von PTHrP detektiert. 15 von 41 Patientinnen (37%) ließen keine Tumorzellen im Knochenmark oder peripheren Blut in einer der angewandten Nachweisverfahren erkennen. In der tumorzellpositiven Gruppe entwickelten 3 Patientinnen (12%) ein Rezidiv (G.L., R.S., T.U.), 1 Patientin (3%) verstarb an den Folgen ihrer hepatischen Metastasierung (P.E.) und 22 Patientinnen (85%) waren unauffällig über den Beobachtungszeitraum. In der Gruppe der Patientinnen ohne evidente Tumorzellen im Knochenmark oder peripheren Blut erlitten 4 (27%) einen Progress oder ein Rezidiv ihrer Erkrankung (H.R.I., S.T., P.M., B.S.), 1 Patientin (6%) erlag ihrem Tumorleiden (K.R.E.H.) und 10 Patientinnen (67%) blieben tumorfrei innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Der mittlere Beobachtungszeitraum bis Auftritt eines Rezidivs betrug in der tumorzellpositiven Gruppe 18,7 Monate und in der tumorzellnegativen 12,3 Monate. Bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes wurde in der tumorzellpositiven Gruppe ein Zeitraum von 0,5 Monaten und in der tumorzellnegativen von 14 Monaten dokumentiert.

Die Betrachtung eines Tumorzellnachweises mit einer der drei Verfahren bezogen auf die untersuchte Probenart ergab einen positiven Nachweis für Tumorzellen in 18 der 38 untersuchten Knochenmarkproben (47%) und 16 der 37 Proben peripheren Blutes (43%). 20 der 38 Knochenmarkproben (53%) und 21 der 37 Proben peripheren Blutes (57%) ließen keine Tumorzell dissemination erkennen. In dem Kollektiv mit tumorzellpositiven

Knochenmarkbefunden verstarb 1 der 18 Patientinnen (6%) an den Folgen ihrer hepatischen Metastasierung (P.E.), 17 von den 18 Patientinnen (94%) blieben rezidivfrei. In der Gruppe mit tumorzellnegativen Knochenmarkbefunden erlitten 6 der 20 Patientinnen (30%) ein Rezidiv oder einen Progress ihrer Erkrankung (G.L., H.R.I., R.S., S.T., P.M., T.U.), 1 Patientin (5%) verstarb tumorbedingt (K.R.E.H.) und 13 Patientinnen (65%) zeigten keine Verschlechterung ihres Tumorleidens. 3 der 16 Patientinnen (19%), deren periphere Blutproben eine Tumorzelldissemination erkennen ließen, entwickelten Rezidive ihres Mammakarzinoms (G.L., R.S., T.U.), 13 der 16 Patientinnen (81%) waren unauffällig innerhalb des Beobachtungszeitraums. In der Gruppe der Patientinnen ohne Hinweis auf disseminierte Tumorzellen im peripheren Blut erlitten 4 der 21 Patientinnen (19%) ein Rezidiv oder einen Progress ihrer Erkrankung (H.R.I., S.T., P.M., B.S.), 2 Patientinnen (10%) verstarben an den Folgen ihres Tumorleidens (P.E., K.R.E.H.) und 15 (71%) blieben rezidivfrei. Für die Patientinnen, deren Knochenmark auf Tumorzellen untersucht wurde, betrug der mittlere Zeitraum bis zum Auftritt eines Rezidivs in der tumorzellnegativen Gruppe 15 Monate und bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes 14 Monate. In der Gruppe der Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurde ein tumorbedingter Tod nach 0,5 Monaten beobachtet. Das mittlere rezidivfreie Intervall in dem Kollektiv der Patientinnen mit nachgewiesenen Tumorzellen im peripheren Blut belief sich auf 18,6 Monate, in der tumorzellnegativen Gruppe auf 12,25 Monate. Die mittlere Zeitspanne bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes wurde für die Patientinnen ohne Tumorzellnachweis im peripheren Blut mit 7,25 Monaten berechnet.

Der mittlere Beobachtungszeitraum der 41 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, deren Knochenmark und peripheres Blut anhand von Zytozentrifugationspräparaten auf eine Tumorzelldissemination mittels der Immunzytologie auf CK-18-exprimierende Zellen untersucht wurde, erstreckte sich über 19,9 Monate. Insgesamt erlitten 7 Patientinnen dieses Kollektivs ein Rezidiv oder einen Progress ihrer Erkrankung, 2 Patientinnen verstarben tumorbedingt (P.E., K.R.E.H.). Der mittlere Zeitraum bis zum Auftritt eines Rezidivs für das gesamte Kollektiv betrug 15,4 Monate, bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes 7,25 Monate (0,5 (P.E.) und 14 Monate). Positive Befunde für den Nachweis von CK 18 ergaben sich in 9 KM-Proben und 4 PB-Proben. 1 von 9 Patientinnen mit einem Tumorzellnachweis im Knochenmark verstarb an den Folgen einer hepatischen Metastasierung (P.E.), 1 der 4 Patientinnen (R.S.) mit einem positiven Befund im PB erlitt ein Lokalrezidiv. 8 von 9 Patientinnen (89%) mit positivem Knochenmarkbefund und 3 der 4 Patientinnen (75%) mit einer nachgewiesenen Tumorzelldissemination im PB erlitten kein Rezidiv innerhalb dieses Zeitraumes. In der tumorzellnegativen Gruppe entwickelten 6 von 28 (21%) Patientinnen (G.L., H.R.I., R.S., P.M., B.S., T.U.), deren Knochenmark untersucht wurde, und 6 von 33 (18%) Patientinnen (G.L., H.R.I., S.T., P.M.,

B.S., T.U.), deren Blutproben analysiert wurden, ein Rezidiv oder einen Tumorprogress. 1 von 28 Patientinnen ohne Tumorzellnachweis im KM (K.R.E.H.) und 2 Patientinnen ohne Hinweis für eine Tumorzell dissemination im PB (P.E., K.R.E.H.) verstarben tumorbedingt. Das mittlere rezidiv- bzw. progressionsfreie Intervall der tumorzellnegativen Gruppe betrug 15,7 Monate bezüglich der untersuchten KM und 13 Monate bezüglich der untersuchten PB. In der Gruppe der Patientinnen mit einem positiven Befund im PB lag das mittlere rezidivfreie Intervall bei 30 Monaten. Das mittlere Zeitintervall bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes belief sich in dem Kollektiv mit nachgewiesener Tumorzell dissemination in das Knochenmark auf 0,5 Monate und in der tumorzellnegativen Gruppe auf 14 Monate. Bezüglich der untersuchten PB betrug das mittlere Intervall bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes 7,25 Monate in der tumorzellnegativen Gruppe.

Von den 14 Patientinnen, deren KM- und PB-Proben an Sedimentationspräparaten untersucht wurden, betrug der mittlere Beobachtungszeitraum 18,8 Monate. Ein Lokalrezidiv trat bei 1 Patientin (P.M.) der tumorzellnegativen Gruppe (KM und PB) nach 12 Monaten auf. Keine der jeweils 5 Patientinnen mit positiven Befunden im Knochenmark oder peripheren Blut zeigte einen Progress ihrer Erkrankung.

Der mittlere Beobachtungszeitraum des Kollektivs der 37 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, deren Knochenmark und peripheres Blut auf Tumorzellen mit Hilfe der RT-PCR zum Nachweis von PTHrP untersucht wurde, betrug 20 Monate. Insgesamt erlitten 6 Patientinnen dieses Kollektivs ein Rezidiv oder einen Progress ihrer Erkrankung, 2 Patientinnen verstarben an den Folgen ihres Tumorleidens. Das mittlere rezidivfreie Intervall belief sich auf 15,5 Monate. Die Zeit bis zum Auftreten eines tumorbedingten Todes wurde im Mittel mit 7,25 Monaten (0,5 und 14 Monate) berechnet. Keine der 10 Patientinnen mit PTHrP-exprimierenden Zellen im Knochenmark entwickelte ein Rezidiv oder verstarb tumorbedingt. In dem Kollektiv der Patientinnen ohne evidente Tumorzellen im Knochenmark erlitten 5 ein Rezidiv (G.L., H.R.I., S.T., P.M., T.U.) und 2 verstarben an den Folgen ihres Tumorleidens (P.E., K.R.E.H.). Das mittlere rezidivfreie Intervall betrug 13 Monate, der Zeitraum bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes 7,25 Monate. 3 von 9 (33%) Patientinnen (G.L., R.S., T.U.) mit einem Tumorzellnachweis mittels der RT-PCR für den Nachweis von PTHrP im peripheren Blut wiesen ein Rezidiv innerhalb des Beobachtungszeitraumes auf, 6 der 9 Patientinnen (67%) erlebten den Beobachtungszeitraum rezidivfrei. In der tumorzellnegativen Gruppe erlitten 4 von 26 (15%) Patientinnen (H.R.I., S.T., P.M., B.S.) ein Rezidiv ihrer Erkrankung. Das mittlere rezidiv- bzw. progressionsfreie Intervall belief sich in der Gruppe mit positivem PTHrP-Nachweis im peripheren Blut auf 18,7 Monate, in der tumorzellnegativen Gruppe auf 13 Monate. Tumorbedingte Todesfälle traten nur in der Gruppe der Patientinnen ohne Tumorzellnachweis im PB auf.

Tumorgewebe wurde von 11 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom auf die Expression von PTHrP in der RT-PCR untersucht. Alle Tumorgewebe stellten sich in der primären PCR für PTHrP positiv dar. Der mittlere Beobachtungszeitraum des gesamten Kollektivs, deren Tumore untersucht wurden, belief sich auf 20 Monate. 7 der 11 Patientinnen (G.L., K.C., H.N.H., H.R.G., F.R.E., L.R., P.M.) wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose Lymphknotenmetastasen auf, eine Patientin zusätzlich ossäre Filiae (K.C.). Bei 4 der 11 Patientinnen lagen zum Diagnosezeitpunkt keine weiteren Tumorlokalisationen vor. 2 Patientinnen erlitten ein Lokalrezidiv (G.L., P.M.). Das mittlere rezidivfreie Intervall betrug 14,5 Monate. 1 Patientin verstarb nach 17 Monaten, wobei ein Zusammenhang zu der Tumorerkrankung nicht eindeutig dokumentiert wurde (H.N.H.).

3.12.3 Betrachtung des Beobachtungszeitraums der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms und mit einem Zweitkarzinom der Mamma

Der mittlere Beobachtungszeitraum der 5 Patientinnen, deren Proben beim Auftritt eines Rezidivs oder eines Zweitkarzinoms gewonnen wurden, erstreckte sich über 24 Monate (14 bis 35 Monate). In dieser Zeit verstarben 3 Patientinnen an ihrem Tumorleiden (S.N., N.K., H.M.). Bei 2 dieser Patientinnen trat innerhalb dieses Zeitraums eine Tumorprogression auf. Da bei der Patientin H.M. der Zeitpunkt der Tumorprogression nicht dokumentiert wurde, findet sie nur in der Gruppe der tumorbedingten Todesfälle Berücksichtigung. Bei der Patientin N.K. wurden zunächst hepatische und lymphonodale Metastasen nach 10 Monaten diagnostiziert, nach 11 Monaten erlitt die Patientin ein Lokalrezidiv ihres Zweitkarzinoms. Der Tumor der Patientin S.N., deren Material zum Zeitpunkt des zweiten Lokalrezidivs mit gleichzeitigem Lymphknotenbefall gewonnen wurde, metastasierte nach 6 Monaten pleural, nach 12 Monaten wurde bei der Patientin eine hepatische Filialisierung sowie ein Lokalrezidiv nach 14 Monaten beobachtet (S.N.). Das mittlere rezidivfreie Intervall des gesamten Kollektivs betrug 8 Monate, das mittlere Intervall bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes 21 Monate. Eine Tumorzell dissemination in das Knochenmark oder periphere Blut durch den Nachweis von CK-18-exprimierenden Zellen in Zytozentrifugations- bzw. Sedimentationspräparaten oder dem Nachweis von PTHrP mittels der RT-PCR wurde bei 2 von 5 Patientinnen (N.K., I.N.) beobachtet, von denen 1 Patientin (N.K.) einen Progress ihrer Erkrankung erlitt, an deren Folgen sie verstarb. Das mittlere rezidivfreie Intervall betrug in der Gruppe der Patientinnen mit einem positiven Tumorzellnachweis 10 Monate und die Zeitspanne bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes 14 Monate. In der Gruppe ohne nachweisbare Tumorzell dissemination in das Knochenmark oder periphere Blut trat bei 1 Patientin eine pleurale Metastasierung nach 6 Monaten auf (S.N.), 2 Patientinnen (S.N., H.M.) verstarben tumorbedingt. In der tumorzellnegativen Gruppe lag das mittlere

progressionsfreie Intervall bei 6 Monaten, die mittlere Zeitspanne bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes bei 25 Monaten.

Proben aller 5 Patientinnen wurden anhand von Zytozentrifugationspräparaten immunzytologisch auf CK-18-exprimierende Zellen untersucht. 1 der 4 (N.K.) untersuchten KM-Proben ließen eine Tumorzell dissemination in das Knochenmark erkennen, 3 der 4 KM-Proben und 4 der 4 PB-Proben waren negativ für das epitheliale Antigen. Die Patientin N.K. erlitt einen hepatischen und lymphnodalen Befall durch das Mammakarzinom nach 10 Monaten sowie ein Lokalrezidiv nach 11 Monaten und erlag ihrem Tumorleiden nach 14 Monaten. In dem Kollektiv der Patientinnen mit einem negativen Tumorzellnachweis im KM erlitt keine der 3 Patientinnen ein Rezidiv, 1 Patientin (H.M.) erlag ihrem Tumorleiden nach 26 Monaten. 1 der 3 Patientinnen (S.N.) mit einem negativen Befund im PB zeigte eine pleurale Metastasierung nach 6 Monaten, eine hepatische Filialisierung nach 12 Monaten und ein Lokalrezidiv nach 20 Monaten. In dem gleichen Kollektiv verstarben 2 Patientinnen tumorbedingt (S.N., H.M.) nach 24 und 26 Monaten. Das mittlere progressionsfreie Intervall in der tumorzellpositiven Gruppe bezogen auf die untersuchten KM-Proben betrug 10 Monate (N.K.). Die Zeit bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes im Zusammenhang mit den untersuchten KM-Proben betrug 14 Monate in der tumorzellpositiven Gruppe und 26 Monate in der tumorzellnegativen. In dem tumorzellnegativen Kollektiv bezüglich der untersuchten PB lag das mittlere progressionsfreie Intervall bei 6 Monaten, bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes bei 25 Monaten.

Anhand von Sedimentationspräparaten wurde lediglich das KM der Patientin N.K. auf die Expression von CK 18 untersucht und ergab hier einen positiven Befund.

Von 3 Patientinnen wurde das KM und von 2 Patientinnen zusätzlich das PB auf eine Tumorzell dissemination mittels der RT-PCR zum Nachweis von PTHrP untersucht. Der mittlere Beobachtungszeitraum dieses Kollektivs belief sich auf 25 Monate. Ein positiver Nachweis von PTHrP im Knochenmark lag in 1 von 3 Proben eines Patienten mit einem Rezidiv eines männlichen Mammakarzinoms (I.N.) vor, der über einen Beobachtungszeitraum von 30 Monaten progressionsfrei blieb. Die beiden Patientinnen ohne nachweisbare Tumorzellen im KM (N.K., H.M.) verstarben tumorbedingt nach 14 und 26 Monaten, wobei die Patientin N.K. nach 10 Monaten einen Befall der Leber und der Lymphknoten erlitt und nach 11 Monaten ein Lokalrezidiv des Zweitkarzinoms der Mamma. Die beiden untersuchten PB-Proben (I.N., H.M.) ließen keine Tumorzell dissemination erkennen.

Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

Pat.	Histologie	CK 18 Zytospin		CK 18 Progen		β-Aktin		PTHrP		nested PTHrP		Blot		Beobachtungszeit / Malignomentwicklung
		KM	PB	KM	PB	KM	PB	KM	PB	KM	PB	KM	PB	
B.K.	Fibroadenom vom extrakanalikulären Subtyp	-	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	keine Nachsorge erfolgt
W.T.	fibrös-kleinzystische Mastopathie mit herdförmigen rechts	-	-			+	+	-	-	-	-	-	-	35 Monate keine Malignomentwicklung
B.T.	intraduktalikuläres Fibroadenom mit leichten Epithelproliferationen, fibrös-zystische Mastopathie	-	-			+	+	-	-	-	-	-	-	30 Monate keine Malignomentwicklung
R.H.	sklerosierende Adenose, fibrös-zystische Mastopathie rechts	-	-			+	+	-	-	-	-	-	-	29 Monate keine Malignomentwicklung
K.R.P.	verzweigtes, partiell adenoides intraduktaltes Papillom rechts	+	-			+	+	-	-	-	-	-	-	keine Nachsorge erfolgt
F.R.I.	fibrös-zystische Mastopathie mit partiell sklerosierter Adenose, Milchgangspapillom rechts	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	28 Monate keine Malignomentwicklung
W.S.	intraduktaltes Papillom, fibrös-zystische Mastopathie links	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	keine Nachsorge erfolgt
L.H.	mäßig starke Fibrose blut-duct-adenosis fibrös-zystische Mastopathie rechts	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	keine Nachsorge erfolgt

Tab. 3.116: Ergebnisse der Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma in Bezug auf die Histologie und den Beobachtungszeitraum+: positiv Zytospin: 1x10⁵ Zellen je Objektträger KM: Knochenmark x: kein Material zur Untersuchung verfügbar-: negativ Progen: 1x10⁶ Zellen je Objektträger PB: peripheres Blut Pat.: Patientin

Patientinnen mit einem Mammakarzinom

Patient	Zeitpkt. Mat.	Stad.	Meta- stasen	ER	PR	CK 18 Zyto.		CK 18 Progen		β-Aktin			PTHrP			nested PTHrP			Blot			Rezidive / Zeitpunkt Beobachtungszeit	
						KM	PB	KM	PB	KM	PB	TU	KM	PB	TU	KM	PB	TU	KM	PB	TU		KM
P.E.	Primär- tumor	0	HEP	n.v.	n.v.	+	-	x	x	+	+	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	Tod / 19 Tage
P.X.	Primär- tumor	0		(+)	(+)	-	-	-	-	+	+	x	-	-	x	-	+	-	-	-	+	x	30 Mo. kein Rezidiv
N.E.	Primär- tumor	0		(+)	-	-	-	+	+	+	+	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	28 Mo. kein Rezidiv
H.N.D.	Primär- tumor	0		n.v.	n.v.	-	-	-	-	+	+	x	-	-	x	+	-	-	-	-	+	x	26 Mo. kein Rezidiv
H.T.M.	Primär- tumor	I		+	+	-	-	x	x	+	+	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	32 Mo. kein Rezidiv
N.R.	Primär- tumor	I		+	+	+	-	+	+	+	+	x	-	-	x	+	-	-	-	-	+	x	16 Mo. kein Rezidiv
C.S.	Primär- tumor	IIA	LYM	-	-	-	x	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	10 Mo. kein Rezidiv
S.R.	Primär- tumor	IIA		(+)	-	-	+	x	x	+	+	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	12 Mo. kein Rezidiv
L.S.	Primär- tumor	IIA		+	+	-	-	x	x	+	+	x	-	-	x	+	-	-	-	-	+	x	25 Mo. kein Rezidiv
G.L.	Primär- tumor	IIA	LYM	+	(+)	-	-	x	x	+	+	+	-	-	x	-	-	-	-	-	-	+	lokal / 17 Mo. 2. Tumor li. / 24 Mo. gesamt 24 Mo.

Fortsetzung Tabelle 3.117

Patient	Zeitpkt. Mat.	Stad.	Meta- stasen	ER	PR	CK 18 Zyto.		CK 18 Progen		β-Aktin			PTHrP			nested PTHrP			Blot			Rezidive / Zeitpunkt Beobachtungszeit			
						KM	PB	KM	PB	KM	PB	TU	KM	PB	TU	KM	PB	TU	KM	PB	TU		KM	PB	TU
G.E.	Primär- tumor	IIA	LYM	+	(+)	-	-	X	X	+	+	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	24 Mo. kein Rezidiv
H.N.H.	Primär- tumor	IIA	LYM	++	(+)	-	-	+	+	+	+	X	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	Tod unklarer Genese / 17 Mo.	
R.S.	Primär- tumor (Z.n. Ther.)	IIA	LYM	n.v.	n.v.	-	+	X	X	-	+	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	lokal / 30 Mo. gesamt 31 Mo.	
K.I.	Primär- tumor	IIA		+	++	+	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	22 Mo. kein Rezidiv	
F.E.	Primär- tumor	IIA		+	+	-	-	X	X	+	+	X	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	18 Mo. kein Rezidiv	
H.L.	Primär- tumor	IIA		(+)	-	-	-	X	X	+	+	X	-	-	X	-	-	-	+	-	-	-	X	20 Mo. kein Rezidiv	
H.E.	Primär- tumor	IIA		+	+	-	-	X	X	+	+	X	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	19 Mo. kein Rezidiv	
K.L.F.	Primär- tumor	IIA		(+)	(+)	+	-	X	X	+	+	X	-	-	X	-	-	-	+	-	-	-	X	24 Mo. kein Rezidiv	
H.T.I.T.	Primär- tumor	IIA		(+)	+	-	-	X	X	+	+	X	-	-	X	-	-	-	+	-	-	-	X	21 Mo. kein Rezidiv	
B.G.	Primär- tumor	IIA		++	++	+	-	+	+	+	+	X	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	12 Mo. kein Rezidiv	

Fortsetzung Tabelle 3.117

Patient	Zeitpkt. Mat.	Stad.	Meta- stasen	ER	PR	CK 18 Zyto.		CK 18 Progen		β-Aktin			PTHrP			nested PTHrP			Blot			Rezidive / Zeitpunkt Beobachtungszeit	
						KM	PB	KM	PB	KM	PB	TU	KM	PB	TU	KM	PB	TU	KM	PB	TU		KM
K.K.W.	Primär- tumor	IIA		+	(+)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	19 Mo. kein Rezidiv
H.T.I.G.	Primär- tumor	IIB	LYM	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	25 Mo. kein Rezidiv
S.T.	Primär- tumor	IIB	LYM	(+)	-	n.a.	-	X	X	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	X	(LYMCARC / 11Mo.) lokal / 14 und 20 Mo. PLEU / 23 Mo. gesamt 26 Mo.	
F.R.E.	Primär- tumor	IIB	LYM	+	+	+	-	X	X	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	31 Mo. kein Rezidiv
L.R.	Primär- tumor	IIB	LYM	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	21 Mo. kein Rezidiv
S.M.	Primär- tumor	IIB	LYM	+	(+)	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	X	21 Mo. kein Rezidiv	
E.T.	Primär- tumor	IIB	LYM	+	(+)	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	17 Mo. kein Rezidiv	
G.N.	Primär- tumor (Z.n. Ther.)	IIB	LYM	+	+	X	-	X	X	+	+	+	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	23 Mo. kein Rezidiv
H.R.I.	Primär- tumor	IIIA	LYM	+	-	-	-	X	X	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	X	lokal / 11 Mo. lokal / 14 Mo. gesamt 17 Mo.	
H.R.G.	Primär- tumor	IIIA	LYM	+	n.v.	-	-	X	X	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	21 Mo. kein Rezidiv

Fortsetzung Tabelle 3.117

Patient	Zeitpkt. Mat.	Stad.	Meta- stasen	ER	PR	CK 18 Zyto.		CK 18 Progen		β-Aktin			PTHrP			nested PTHrP			Blot			Rezidive / Zeitpunkt Beobachtungszeit
						KM	PB	KM	PB	KM	PB	TU	KM	PB	TU	KM	PB	TU	KM	PB	TU	
K.R.E.E.	Primär- tumor	IIIA		(+)	(+)	-	X	X	X	+	X	+	-	X	-	X	-	X	-	X	+	22 Mo. kein Rezidiv
K.L.U.	Primär- tumor	IIIA	LYM	++	+	-	X	-	X	+	X	+	-	X	-	X	-	X	-	X	X	22 Mo. kein Rezidiv
K.R.E.H.	Primär- tumor (Z.n. Rad.v.Ch.)	IIIB	LYM	-	-	-	X	X	+	+	X	+	-	X	-	X	-	X	-	X	X	LYMCARC HEP/PUL Tod / 14 Mo.
P.M.	Primär- tumor	IIIB	LYM	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	lokal / 12 Mo. gesamt 18 Mo.	
R.R.	Primär- tumor (Z.n. Ther.)	IIIB	LYM	(+)	+	X	+	X	X	+	+	X	-	X	X	-	X	X	-	X	X	22 Mo. kein Rezidiv
T.U.	Primär- tumor	IIIB	LYM	+	(+)	-	-	X	X	+	+	+	-	X	-	X	-	X	-	+	X	lokal / 9 Mo. gesamt 21 Mo.
S.G.	Primär- tumor	IIIB		++	++	+	+	-	+	+	+	+	-	X	-	X	-	X	-	X	X	1 Mo. kein Rezidiv
K.C.	Primär- tumor	IV	LYM OSS	++	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	15 Mo. kein Rezidiv
C.T.	Primär- tumor (Z.n.Ch./R.)	IV	LYM PUL	-	(+)	-	-	X	X	+	+	+	-	X	+	X	-	X	+	X	X	2 Mo. kein Rezidiv
B.S.	Primär- tumor	IV	OSS MAR, PUL HEP, LYM	+	+	X	-	X	X	+	+	+	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Progress OSS / 15 Mo. gesamt 22 Mo.

Fortsetzung Tabelle 3.117

Patient	Zeitpkt. Mat.	Stad.	Meta- stasen	ER	PR	CK 18		β-Aktin		PTHrP		nested PTHrP		Blot		Rezidive / Zeitpunkt Beobachtungszeit
						Zyto.	Progen	KM	PB	KM	PB	TU	KM	PB	TU	
K.K.I.	Primär- tumor	X	LYM	+	++	-	X	+	+	-	X	+	-	-	X	26 Mo. kein Rezidiv
N.K.	Zweit- tumor als Rez.	X	LYM	-	-	+	X	+	X	-	X	-	X	X	X	HEP / 10 Mo. Tod / 14 Mo.
B.E.	2. Rezidiv lokal	IIA		+	(+)	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	22 Mo. kein Rezidiv
I.N.	1. Rezidiv lokal	IIA		n.v.	n.v.	-	X	+	-	-	X	+	-	-	X	35 Mo. kein Rezidiv
H.M.	1. Rezidiv lokal	IIA		(+)	(+)	-	X	+	-	-	X	-	-	-	X	Tod / 26 Mo.
S.N.	3. Rezidiv lokal LYM	IIB	LYM	+	++	n.a.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	PLEU / 6 Mo. HEP / 12 Mo., lokal / 14 Mo. Tod / 24 Mo.

Tab. 3.117: Ergebnisse der Patientinnen mit einem Mammakarzinom in Bezug auf Tumorstadium, Beobachtungszeitraum und Rezidiventwicklung

Zeitpkt. Mat.: Zeitpunkt der Materialgewinnung

Metastasen: Metastasen zum Diagnosezeitpunkt

Zeitpunkt: Zeitpunkt des Rezidivauftritts

Beobachtungszeit: Zeitraum der Nachbeobachtung

Z.n. Ther.: Zustand nach Radio- und / oder Chemotherapie

n.a.: nicht auswertbar

Stadium: Tumorstadium nach der TNM-Klassifikation der UICC 1997

x: kein Material zur Untersuchung verfügbar

ER: Östrogenrezeptoren des untersuchten Materials

PR: Progesteronrezeptoren des untersuchten Materials

LYM: Lymphknoten

HEP: Leber

MAR: Knochenmark

LYMCARC: Lymphangioid carcinoma

PUL: Lunge

-: negativ (+): schwach positiv +-: positiv ++: stark positiv

Zyto.: Zytospin: 1x10⁵ Zellen je ObjektträgerProgen: 1x10⁶ Zellen je Objektträger

Mo.: Monate

gesamt: gesamte Dauer des Beobachtungszeitraumes

PLEU: Pleura

OSS: ossär

n.v.: nicht vorhanden

4. Diskussion

Das Auftreten von Fernmetastasen und Spätrezidiven bei Mammakarzinompatientinnen bei fehlendem Metastasennachweis mit konventionellen bildgebenden Verfahren zum Diagnosezeitpunkt wird auf disseminierte Tumorzellen und Mikrometastasen zurückgeführt (MANSI et al. 1987, DIEL et al. 1992). Ziel dieser Arbeit war der Nachweis disseminierter Tumorzellen in Proben des Knochenmarks und peripheren Blutes von Mammakarzinompatientinnen mittels immunhistochemischer und molekularbiologischer Methoden. Immunhistochemisch wurde unter Verwendung der APAAP-Methode und eines monoklonalen Antikörpers gegen das epitheliale Zytokeratin 18 der Nachweis einzelner Tumorzellen versucht. Die Antikörpermarkierung dieser Zellen erfolgte an herkömmlichen Zytoprinpräparaten mononukleärer Zellen und an Sedimentationspräparaten mit höherer Zellzahl mit der Frage nach einer Steigerung der Sensitivität. Überprüft wurde dies sowohl anhand einer Verdünnungsreihe als auch an Proben von Patientinnen mit malignen und benignen Erkrankungen der Mamma. Molekularbiologisch wurde mittels der RT-PCR der Nachweis von Transkripten des PTHrP-Gens in Knochenmark- und Blutproben sowie in einigen Tumorgeweben geführt. Beide Methoden wurden miteinander verglichen sowie die prognostische Wertigkeit der beiden Marker im Vergleich mit den etablierten Prognoseparametern Tumorstadium, Tumorgröße, Nodal-, Fernmetastasen- und Hormonstatus bestimmt. Die Patientinnen mit einem Mammakarzinom wurden über einen mittleren Zeitraum von 20 Monaten, solche mit einer benignen Erkrankung der Mamma über einen mittleren Zeitraum von 30 Monate beobachtet, um die prognostische Aussagekraft positiver Befunde abschätzen zu können.

4.1 Immunzytologischer Nachweis von Tumorzellen mittels gegen CK 18 gerichteter Antikörper in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten

Mit der Einführung monoklonaler und polyklonaler Antikörper wurde der immunzytologische Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark, peripheren Blutproben, Lymphknoten und mittels Lavage gewonnener Zellen möglich. Mono- und polyklonale Antikörper gegen verschiedene Oberflächenantigene von Tumorzellen epithelialen Ursprungs wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen an Proben von Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten eingesetzt (WOLLENBERG et al. 1994, MANSI et al. 1987, SCHLIMOK et al. 1991, PANTEL et al. 1993b, PANTEL et al. 1994, PANTEL et al. 1995, FUNKE et al. 1996). Die APAAP-Methode zeigte sich hinsichtlich der Sensitivität gegenüber anderen Verfahren wie der Immunfluoreszenz überlegen (OSBORNE et al. 1991). SCHLIMOK et al. (1991) und JAUCH (1996) wiesen darauf hin, dass die Spezifität der APAAP-Methode zur Detektion okkultur Tumorzellen sowohl von der Wahl des nachzuweisenden Antigens als auch des eingesetzten Antikörpers abhängig ist.

Neben anderen Arbeitsgruppen konnten SCHLIMOK et al. (1987), PANTEL et al. (1994 und 1993a), HARBECK et al. (1994) und FUNKE et al. (1996) die Effektivität der Verwendung der APAAP-Methode und CK-18-spezifischer monoklonaler Antikörper zum Nachweis disseminierter Tumorzellen und Mikrometastasen in Knochenmark- und Blutproben von Mammakarzinompatientinnen belegen. Die Spezifität von monoklonalen Antikörpern gegen CK 18 zur Markierung von Zellen epithelialen Ursprungs wurde durch eine Doppelfärbung mit Mab CK2 gegen das Zytokeratin 18 und einem Antikörper gegen das Leukozytenantigen CD45 in Zytospinpräparaten mononukleärer Knochenmarkzellen von Patienten mit epithelialen Tumoren bewiesen. Die in der Studie als CK 18-positiv bewerteten Zellen zeigten keine Koexpression des CD45-Antigens (SCHLIMOK et al. 1987).

Die hohe Spezifität des in dieser Studie verwendeten monoklonalen Antikörpers CK1 gegen das Zytokeratin 18 wurde von BEIER (1995) durch das Fehlen falsch positiver Ergebnisse in Spezifitätskontrollen demonstriert.

4.1.1 Bestimmung und Vergleich des Sensitivitätsniveaus der APAAP-Färbung in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten

In der hier durchgeführten Studie wurde eine Verdünnungsreihe mit Zellen der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 durchgeführt. Ziele dieses Experiments waren Unterschiede zwischen herkömmlichen Zytospinpräparaten mit 1×10^5 Zellen und Sedimentationspräparaten mit 1×10^6 Zellen hinsichtlich ihrer Sensitivität und der Beurteilbarkeit der Zellen bezüglich morphologischer Kriterien festzustellen. Aufgrund der von JÜRGENS 1998 beschriebenen Optimierung der Fixierung zur Gewährleistung einer guten morphologischen Darstellung der Zellen bei gleichzeitiger intensiver Färbereaktion, wurden die Zellen auf den Objektträgern mit einer Mischung aus Aceton und Methanol im Verhältnis 90:10 fixiert. Die Morphologie der Zellen war in den Sedimentationspräparaten besser erhalten und es wurden weniger beschädigte Zellen als in den Zytospins beobachtet. Die Begründung für diese Beobachtung liegt in der schonenderen Zellauftragung auf die Objektträger. Somit ist neben der Beurteilung der Anfärbung der Zellen auch eine bessere zytomorphologische Auswertung im Hinblick auf die Kern-Plasma-Relation, der Nukleolenbildung und ähnlicher Malignitätsmerkmale möglich. Dies lässt eine höhere Aussagekraft bezüglich falsch-positiver Färbereaktionen zu.

Die Verdünnungsstufen waren in der Relation gleich und reichten von 1×10^{-6} bis 1×10^{-3} Tumorzellen in 1×10^5 Zellen in den Zytospins bzw. 1×10^6 Zellen in den Sedimentationspräparaten. Dies entsprach absoluten Tumorzellzahlen von 0,1 bis 100 Tumorzellen in 1×10^5 mononukleären Zellen eines gesunden Spenders in den Zytozentrifugationspräparaten und 1 bis 1000 MCF-7-Zellen in 1×10^6 mononukleären Zellen in den Sedimentationspräparaten. Bei der Betrachtung der Kurven der Mittelwerte fällt ein linearer Anstieg der Kurve der Sedimentationspräparate und ein unsteter Verlauf der Kurve

der Zytospins auf. Eine Begründung liegt in der deutlich größeren Streuung der Einzelmesswerte in den Zytospinpräparaten verglichen mit denjenigen in den Sedimentationspräparaten. Aufgrund der extremen Streuung der Werte auf der Verdünnungsstufe 5×10^{-4} von 0 bis 14 nachgewiesenen Tumorzellen im Vergleich zu den Ergebnissen der nachfolgenden Verdünnungsstufe, muss der Nachweis von 14 Tumorzellen auf dieser Verdünnungsstufe als experimenteller Fehler angesehen werden. Das würde den ermittelten Mittelwert aus den Ergebnissen der Zytozentrifugationspräparate dieser Verdünnungsstufe als falsch zu hoch erklären. Diese Überlegung würde, nach Wegfall dieses Datenpunktes, zu einer ebenfalls linear verlaufenden Kurve der Zytospinauswertungen führen, welche eine flachere Steigung aufzeigen würde und in ihrem Verlauf unterhalb der Kurve der Mittelwerte der Sedimentationspräparate bleiben würde. Da die Steigung der Geraden Ausdruck der Sensitivität der Methode ist, ist aus dieser Überlegung eine höhere Sensitivität der APAAP-Methode in Sedimentationspräparaten abzuleiten. Bestätigt wird diese Annahme bei der Betrachtung der Nachweisgrenzen beider Methoden. Ein zuverlässiger Nachweis von Tumorzellen in mindestens 2 Verdünnungsansätzen konnte in den Zytospinpräparaten bei 10 bis 20 Tumorzellen in 10^4 Zellen und in den Sedimentationspräparaten bei 10 bis 20 Tumorzellen in 10^5 Zellen geführt werden, so dass die Sensitivitätsniveau der Methoden in diesem Bereich angenommen werden muss. Somit liegt das Sensitivitätsniveau der APAAP bei Einsatz des monoklonalen Antikörpers CK1 in der Sedimentationstechnik mit 1×10^6 Zellen um eine Zehnerpotenz über dem der Zytozentrifugationspräparate mit 1×10^5 Zellen. Dieses Ergebnis entspricht der Differenz in der Potenz der eingesetzten Zellzahl. Unter der Berücksichtigung, dass die Verdünnungsschritte 1×10^{-6} bis 1×10^{-5} einen theoretischen Tumorzellnachweis bei einer absoluten eingesetzten Tumorzellzahl von unter 1 Tumorzelle in den Zytozentrifugationspräparaten postulieren, ergibt die Betrachtung der absoluten eingesetzten Tumorzellzahlen eine Nachweisbarkeit von Tumorzellen in den Zytospinpräparaten ab einer eingesetzten Tumorzellzahl von 5 in 1×10^5 mononukleären Zellen. In den Sedimentationspräparaten gelang ein Nachweis ab 2 eingesetzten Tumorzellen in 1×10^6 mononukleären Zellen. Nicht zu vernachlässigen ist die Tatsache, dass in den Zytozentrifugationspräparaten auf einer Verdünnungsstufe von 5×10^{-4} immer noch ein fehlender Tumorzellnachweis in einzelnen Ansätzen zu beobachten war.

Die Sensitivität der APAAP-Methode in Verbindung mit monoklonalen Antikörpern gegen Zytokeratine wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Die festgestellten Sensitivitätsniveaus beider Methoden reihen sich in die von BEIER 1995, SCHLIMOK et al. 1991 und TAHA et al. 1989 beschriebenen ein. Sie liegen jedoch unter dem von OSBORNE et al. 1991 ermittelten Sensitivitätsniveau der APAAP-Methode unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen CK 18.

BEIER (1995) verwendete wie in der vorliegenden Studie den monoklonalen Antikörper CK1 in Verbindung mit der APAAP-Methode zur Erkennung von Tumorzellen epithelialen Ursprungs, die das Zytokeratin 18 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Diesbezüglich wurde eine Verdünnungsreihe mit Zellen der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7, welche CK 18 exprimieren, in 1×10^5 mononukleären Knochenmarkzellen eines gesunden Spenders durchgeführt. Die Verdünnungsstufen reichten von 1 bis 100 Tumorzellen in 1×10^5 mononukleären Zellen, welche mittels der Zytozentrifuge auf Objektträger aufgebracht wurden und mit Aceton fixiert wurden. Für jede Verdünnungsstufe wurden 3 Präparate ausgewertet und der Mittelwert bestimmt. Das statistisch ermittelte Sensitivitätsniveau ergab einen Nachweis von 2 Tumorzellen in 1×10^5 Zellen.

Das Sensitivitätsniveau der Sedimentationspräparate in dieser Studie ist dem von BEIER (1995) ermittelten Sensitivitätsniveau gegenüber geringfügig höher anzusiedeln, das Sensitivitätsniveau in den Zytozentrifugationspräparaten liegt im Vergleich mit dem von BEIER (1995) um beinahe eine Zehnerpotenz niedriger. Unter Berücksichtigung des oben erläuterten theoretischen Fehlers, ist die Sensitivität der Zytozentrifugationspräparate in der in dieser Studie angewendeten APAAP-Methode mit der von BEIER (1995) vergleichbar, wenn man die absoluten Zahlen eingesetzter und detektierter Tumorzellen in Augenschein nimmt. Bei einer in 1×10^5 Zellen eingesetzten absoluten Tumorzellzahl von 1, 10, 20, 50 und 100, detektierte BEIER (1995) in drei durchgeführten Versuchen eine mittlere Tumorzellzahl von 0,3, 0,3, 3,3, 7,5 und 15,3. In den hier durchgeführten drei Verdünnungsansätzen der Zytospinpräparate wurden bei den gleichen eingesetzten Tumorzellzahlen im Mittel 0, 0,6, 1,3, 7 und 4 Tumorzellen detektiert. Die niedrige detektierte Tumorzellrate von 2, 3 und 7 Zellen bei einer absoluten eingesetzten Tumorzellzahl von 100 legt folgende Überlegung nahe. Die in die Verdünnungen eingesetzten Tumorzellen entstammten einer Zellkultur der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Vermutbar wäre hier eine ungenügende Trennung von Zellverbänden trotz adäquaten Vorgehens bei der Herstellung der Verdünnungen. Gestützt wird diese Überlegung durch die Beobachtung von immunreaktiven Zellverbänden, sogenannten Clustern, in einigen Präparaten. Daraus würde sich eine Diskrepanz zwischen der theoretisch errechneten Verdünnungsstufe und der tatsächlich eingesetzten Tumorzellzahl ergeben, die zu einer niedrigeren Tumorzellkonzentration in den ausgewerteten Präparaten der Verdünnungsstufe 1×10^{-3} geführt haben könnte. Naheliegender scheint diese Überlegung, da sich der Faktor von wiedergefundenen zu eingesetzten Tumorzellen in den vorangegangenen Verdünnungsstufen in etwa proportional verhält und die absolute Zahl der detektierten Zellen in der Verdünnungsstufe 1×10^{-3} in einem ähnlichen Bereich zwischen 2 und 7 Zellen liegen. PORRO et al. führten 1988 eine ähnliche Verdünnungsreihe mit MCF-7-Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers MBr1 gegen ein neutrales Membranglykoprotein von Mammakarzinomzellen und der Immunfluoreszenzmethod durch. Beobachtet wurde eine Detektionsrate von nur 20% der

eingesetzten MCF-7-Zellen, was mit einem Verlust durch technische Fehler in der Herstellung der Verdünnungen begründet wurde. Andererseits kann die gleiche Überlegung bezüglich der großen Streuung der Messwerte bei 50 eingesetzten Tumorzellen in 1×10^5 Zellen zu Grunde gelegt werden.

SCHLIMOK et al. (1991) erreichten mit der APAAP-Methode und dem gegen CK 18 gerichteten monoklonalen Antikörper CK2 eine reproduzierbare Sensitivität von 1 Tumorzelle in 1×10^4 bis 1×10^5 Knochenmarkzellen in Zytospinpräparaten, die mit Aceton fixiert wurden.

TAHA et al. (1989) führten Verdünnungsexperimente mit der humanen Mammakarzinomzelllinie T47D durch, wobei die Verdünnungsstufen von 1 Tumorzelle in 10 mononukleären Knochenmarkzellen bis zu 1 Tumorzelle in 1×10^6 Knochenmarkzellen reichte. Die Verdünnungsansätze wurden als Zytozentrifugationspräparate aufgearbeitet, mit Aceton fixiert und mittels einer Kombination aus den monoklonalen Antikörpern AE1, AE3, KA-4 und UCD/PR-10.11 gegen die Zytokeratine 8, 14 bis 16, 18 und 19 nach der APAAP-Methode gefärbt. Die Sensitivität lag bei 1 Tumorzelle in 1×10^5 Zellen.

OSBORNE et al. (1991) verwendeten die CK 18 exprimierenden Zellen der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in einem Verdünnungsexperiment, wobei die Konzentration der MCF-7-Zellen von 10 bis 400 Tumorzellen in 1×10^6 mononukleären Knochenmarkzellen in Zytospin betrug. Fixiert wurden die Zellpräparate mit 100% Ethanol. Unter Verwendung des Mab AE1 gegen saure Zytokeratine und der APAAP-Methode konnte eine Sensitivität von 4 bis 6 Zellen in 1×10^6 Zellen in 95% beobachtet werden. Durch Extrapolation wurde das Sensitivitätsniveau bei 1 Tumorzelle in 1×10^6 Zellen festgelegt

Aus dem oben Aufgeführten kann zusammengefasst werden, dass bei intakter Zellstruktur hinsichtlich der Spezifität der Antikörper zwischen Zytospin- und Sedimentationspräparaten kein Unterschied bestehen sollte. Die Morphologie der Zellen ist in den Sedimentationspräparaten besser erhalten als in den Zytozentrifugationspräparaten. Die Untersuchung einer höheren Zellzahl gewährleistet eine zuverlässigere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, was in der geringeren Streubreite der Einzelwerte in den Sedimentationspräparaten zum Ausdruck kommt. Die Sensitivität war mit der Sedimentationstechnik mit Nachweis von 2 in 10^6 mononukleären Zellen peripheren Blutes um den Faktor 4 höher als mit der Zytozentrifugationstechnik mit der ein Sensitivitätsniveau von 5 Zellen in 1×10^5 mononukleären Zellen peripheren Blutes erreicht wurde.

4.2 Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut von Patientinnen mit Mammatumoren mittels gegen CK 18 gerichteter Antikörper

4.2.1 Immunzytologischer Nachweis disseminierter Tumorzellen in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des Knochenmarks und peripheren Blutes von Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma

Das KM und PB von 8 Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma wurde unter Verwendung des CK 18-spezifischen monoklonalen Antikörpers CK1 nach der APAAP-Methode gefärbt und auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Von allen 8 Patientinnen wurden Zytozentrifugationspräparate des KM und PB, von 3 der 8 Patientinnen Sedimentationspräparate des KM und PB auf diese Weise untersucht.

In den Zytozentrifugationspräparaten konnte ein positiver Nachweis von CK 18 in 2 der 8 KM-Proben (25%) geführt werden. 6 der 8 KM-Proben (75%) und alle 8 PB-Proben (100%) zeigten keinen Anhalt für CK-18-exprimierende Zellen. Bei den beiden Patientinnen mit CK 18 markierbaren Zellen im KM lagen die Diagnosen einer blut-duct-adenosis, fibrös-zystischer Mastopathie sowie mäßiger Fibrose (L.H.) und eines partiell adenoiden intraduktalen Papilloms (K.R.P.) vor.

In den Sedimentationspräparaten war 1 der 3 KM-Proben positiv und 2 der 3 KM-Proben negativ für den Nachweis von CK 18. Keine der 3 untersuchten PB-Proben wies CK-18-anfärbbare Zellen auf. Bei der Patientin (W.S.), in deren Knochenmark ein positiver Nachweis für den epithelialen Marker erfolgte, bestand die Diagnose eines intraduktalen Papilloms sowie einer fibrös-zystischen Mastopathie. Konkordante positive Ergebnisse in beiden Untersuchungsmethoden lagen nicht vor. JÜRGENS (1998) untersuchte ein vergleichbares Kollektiv von 6 Patientinnen mit benignen Erkrankungen der Mamma anhand von Zytozentrifugationspräparaten mit der hier verwendeten Fixationsmethode auf die Expression von Zytokeratin 18. Die Ergebnisse zeigten keine positiven Befunde im peripheren Blut und dem Knochenmark dieser Patientinnen. SCHLIMOK et al. (1987) untersuchten im Rahmen einer Studie Knochenmarkproben von 75 Patienten ohne Hinweis auf eine maligne Erkrankung, die unter anderem auch benigne Mammatumoren aufwiesen. CK-18-exprimierende Zellen konnten in keiner Probe beobachtet werden. Die positiven Befunde lassen drei Theorien zu. Erstens wäre ein bis zum Zeitpunkt der Materialgewinnung nicht diagnostiziertes Malignom epithelialen Ursprungs oder die Entwicklung eines epithelialen Tumors denkbar, wie es von PANTEL et al. 1993b beschrieben wurde. In der angeführten Studie wurden CK-18-exprimierende Zellen im Knochenmark von 2 Patienten ohne Anhalt für eine maligne Erkrankung nachgewiesen, von denen einer innerhalb von 10 Monaten ein tubulovillöses Adenom und der andere ein Karzinom des Colons entwickelte.

Über eine etwaige Malignomentwicklung kann für die 3 Patientinnen dieser Arbeit aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraumes keine endgültige Aussage gemacht werden. Aufgrund des Vorliegens einer gutartigen Mammaerkrankung bei den Patientinnen dieses Kollektivs, dürfen die Ergebnisse nicht automatisch als falsch-positiv bewertet werden. MOLL et al. beschrieben 1982 die Expression von Zytokeratin 18 in normalen Epithelien der Mamma und in Mammakarzinomen und hielt den Nachweis von Zytokeratinmustern als aussagekräftiger als den Nachweis einzelner Zytokeratine. PANTEL et al. (1994) erhielten 1 bis 2 CK-18-positive Zellen im Knochenmark von 4 der 75 untersuchten Patienten ohne Nachweis einer malignen Erkrankung. Alle 4 Patienten wiesen gutartige Erkrankungen epithelialer Organe wie Nierenzysten, Adenome der Nebennieren oder der Prostata auf. Mit dieser Beobachtung vereinbar wiesen alle Patientinnen mit einem positiven Nachweis des epithelialen Markers in der vorliegenden Studie eine benigne Erkrankungen der Mamma auf, die sich von den epithelialen Geweben ableiteten. Bei 2 der Patientinnen wurde die Diagnose eines Papilloms gestellt, die in seltenen Fällen zu Entartungen neigen können. Dies ließe vermuten, dass ein Nachweis von CK 18 auch bei gutartigen proliferativen wie nicht-proliferativen Mammaerkrankungen möglich ist. Eine ähnliche Aussage traf Franzén et al. 1996, die mittels gelelektrophoretischer Analyse von Polypeptiden eine höhere Expressionsrate der Zytokeratine in Fibroadenomzellen der Mamma nachweisen konnten als in schnell proliferierenden Tumorzellen des gleichen Organs. Es ist pathogenetisch unklar, warum ein Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark bei Patientinnen mit einer Gruppe von Erkrankungen der Mamma möglich ist, die im Gegensatz zur Gruppe der Mammakarzinome als lokal begrenzte Geschehen angesehen werden. Diese Überlegung führt zu der Möglichkeit einer fehlenden Spezifität des verwendeten Antikörpers oder stellt die Methode zum Nachweis von Zellen epithelialen Ursprungs im Knochenmark in Frage. Die Mehrzahl der im Weiteren angeführten Studien widerlegen diese Annahme (z.B. SCHLIMOK et al. 1987, PANTEL et al. 1993a und b, PANTEL et al. 1994). Nur wenige Autoren beschrieben eine ektopische Expression von CK 18 in mesenchymalen Geweben wie dem Knochenmark unter bestimmten pathophysiologischen Gegebenheiten (JÄRVINEN et al. 1990). Unsere Ergebnisse legen weitere Untersuchungen des Nachweises von CK-18-exprimierenden Zellen im Knochenmark und peripheren Blut von Patientinnen mit benignen proliferativen und nicht-proliferativen Erkrankungen der Mamma an größeren Patientinnenkollektiven nahe, insbesondere im Hinblick auf die pathogenetische Bedeutung dieser Zellen.

4.2.2 Vergleich des immunzytologischen Nachweises disseminierter Tumorzellen in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des Knochenmarks und peripheren Blutes von Patientinnen mit einem Mammakarzinom

Bei 46 Patientinnen lag die Diagnose eines Mammakarzinoms vor, von denen bei 41 die Erstdiagnose und bei 5 die eines Rezidivs eines Mammakarzinoms gestellt wurde.

Die Nachweisrate einer Tumorzell dissemination in der APAAP-Färbung gegen CK 18 in den Proben peripheren Blutes und des Knochenmarks von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom war in den Sedimentationspräparaten mit 1×10^6 Zellen geringfügig höher angesiedelt als in den Zytozentrifugationspräparaten mit 1×10^5 Zellen. Im Knochenmark stellten sich 9 der 37 (24%) Zytospins positiv dar verglichen mit 5/14 (36%) in den Sedimentationspräparaten. Deutliche Unterschiede zeigten sich in den Proben peripheren Blutes mit 4 von 37 (11%) positiven Ergebnissen in den Zytospins und 5 von 13 (38%) in den Sedimentationspräparaten. Möglicherweise ist die Ursache der höheren Nachweisrate in den Sedimentationspräparaten in der größeren Anzahl untersuchter Zellen zu sehen, wie dies in den Verdünnungsstudien dieser Arbeit gesehen und von einigen Autoren postuliert wurde, die eine Verdopplung der Detektionsrate von Tumorzellen durch eine Vervierfachung der Probengröße von 4×10^5 auf $1,6 \times 10^6$ Zellen zeigten (PANTEL et al. 1993a).

Die Rate konkordanter positiver Ergebnisse im KM und PB der Patientinnen, von denen beide Probenarten untersucht wurden, lag in den Sedimentationspräparaten mit 4/13 ebenfalls höher als in den Zytozentrifugationspräparaten mit 1/33. Eine Übereinstimmung negativer Ergebnisse war in 23/33 Zytospins und 7/13 Sedimentationspräparaten zu beobachten. Die Rate diskordanter Ergebnisse erwies sich in den Zytospinpräparaten höher. In den untersuchten Proben waren übereinstimmende Ergebnisse in den Zytospins und Sedimentationspräparaten im KM nur bei 2 Patientinnen (N.R., B.G.) und im PB bei keiner der Patientinnen zu finden. Eine Bedeutung konkordanter und diskordanter Ergebnisse im KM und PB ist aus dieser Studie nicht abzuleiten. Die Wertigkeit des Tumorzellnachweises im KM und PB bedarf weiterer Abklärung, da beide Medien im Hinblick auf den Nachweis disseminierter Tumorzellen nicht als gleichwertig anzusehen sind. Dem Knochenmark kommt eher eine Fenster- bzw. Reservoirfunktion des zirkulierenden Blutes bezüglich disseminierter Tumorzellen zu (DIEL et al. 1990, PANTEL et al. 1993a, WOLLENBERG et al. 1994, JAUCH et al. 1995). Das Auftreten von Tumorzellen im peripheren Blut muss eher als passager angesehen werden. So konnten DEARNALEY et al. 1991 disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nicht jedoch im peripheren Blut von Patientinnen mit einem Mammakarzinom durch den immunzytochemischen Nachweis des epithelialen Membranantigens (EMA) nachweisen, was im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen steht. Hierbei muss die geringere Spezifität des EMA verglichen mit der des CK 18 berücksichtigt werden. Am ehesten sind die Ergebnisse im KM und PB als ergänzend zu betrachten.

Von den Patientinnen mit einer nachgewiesenen Tumorzelldissemination in das Knochenmark zeigte sich in beiden Untersuchungsmethoden eine höhere Nachweisrate bei Patientinnen mit niedrigeren Tumorstadien 0 bis IIB (7/9 in Zytopins und 4/5 in Sedimentationspräparaten) gegenüber 2 von 9 Patientinnen mit Tumoren des Stadiums IIIB und IV (2/9 in Zytopins und 1/5 in Sedimentationspräparaten). Die Untersuchung der Proben peripheren Blutes in den Sedimentationspräparaten ergab ein ähnliches Ergebnis wie im KM mit positiven Nachweisen in 4/5 Fällen mit Tumoren der Stadien 0 bis IIB. In den Zytozentrifugationspräparaten hatten 2/4 Patientinnen einen Tumor im Stadium IIA und 2/4 einen Tumor im Stadium IIIB. Es muss berücksichtigt werden, dass die Mehrzahl der Patientinnen Tumoren niedrigerer Stadien aufwies, wobei die relative Verteilung niedriger und höherer Tumorstadien in beiden Kollektiven etwa gleich war.

Entsprechend der tumorstadienbezogenen Ergebnisbetrachtung ließen sich die Ergebnisse nicht mit den etablierten Prognosefaktoren Tumorgröße, Nodal- und Fernmetastasenstatus korrelieren, wobei sich die Ergebnisse in den Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten ähnlich darstellten. Unter Berücksichtigung der überwiegend niedrigeren Tumorstadien, erfolgte ein Nachweis disseminierter Tumorzellen hauptsächlich im Knochenmark bei Patientinnen mit Tumoren der Größe Tis bis T2 und negativem Nodalstatus in beiden Untersuchungsmethoden sowie in den Sedimentationspräparaten des PB. Die Zytopinpräparate des PB ergaben im Vergleich eine deutlich niedrigere Rate positiver Befunde in diesem nach den TNM-Kriterien prognostisch günstigeren Kollektiv, was im Umkehrschluss eine Korrelation mit dem negativen Nodalstatus und dem niedrigeren Tumorstadium zuließe. Von den 3 Patientinnen, die Fernmetastasen zum Diagnosezeitpunkt aufwies, konnten nur im Zytozentrifugationspräparat des KM und im Sedimentationspräparat des PB Tumorzellen mit der APAAP-Färbung gegen CK 18 detektiert werden. Auffallend hierbei war, dass es sich um eine von zwei Patientinnen mit ossären Metastasen (K.C.) handelte.

Von den 5 Patientinnen, deren Proben zum Zeitpunkt der Diagnose eines Rezidivs ihrer Erkrankung gewonnen wurden, stellte sich in 1/4 Zytozentrifugationspräparaten des KM sowie das Sedimentationspräparat des KM positiv dar (N.K.). Die zu erwartende Tendenz eines erhöhten Tumorzellnachweises in diesem Patientinnenkollektiv mit einer ausgedehnten Tumorerkrankung war jedoch nicht zu erkennen.

Im Vergleich der Korrelation zwischen dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus und dem immunzytologischen Nachweis von Tumorzellen in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten stellte sich eine relativ höhere Inzidenz konkordanter Ergebnisse in den Sedimentationspräparaten des KM und PB gegenüber dem Tumorzellnachweis in den Zytozentrifugationspräparaten beider Probenarten dar. Einschränkend muss erwähnt werden, dass das Verhältnis der Östrogen- und Progesteronrezeptor exprimierenden zu nicht-exprimierenden Tumoren von 3:1 kein repräsentatives Vergleichspotential besitzt. Von

4 Patientinnen, deren Proben zum Zeitpunkt eines Rezidivs gewonnen wurden, wurde der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus des Rezidivs bzw. bei 1 Patientin des Zweitkarzinoms festgestellt. Auch hier wurde keine Korrelation zwischen dem Nachweis von Tumorzellen und dem Hormonrezeptorstatus gesehen.

4.2.3 Bewertung der Ergebnisse des immunzytologischen Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut von Patientinnen mit einem Mammakarzinom

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Studie keinen Zusammenhang bezüglich der etablierten Prognosefaktoren Tumorgröße, Nodal-, Fernmetastasen- sowie Östrogenrezeptorstatus und dem Nachweis von Zytokeratin 18 im peripheren Blut und dem Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen erkennen. Ein Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut von Patientinnen mit einem Mammakarzinom gelang hauptsächlich bei Patientinnen mit kleineren Tumoren (T1 und T2), negativem Nodalstatus und ohne den Nachweis von Fernmetastasen, die sich in weniger fortgeschrittenen Tumorstadien (0 bis IIA) befanden. Die geringe Anzahl der untersuchten Patientinnen mit überwiegend niedrigen Tumorstadien muss in dieser Aussage berücksichtigt werden.

In der vorliegenden Studie lag die Nachweisrate disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom in den Zytospin- und Sedimentationspräparaten zwischen 24% und 36% (9/37 in Zytospins, 5/14 in Sedimentationspräparaten), was die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit Tumorzellnachweisen im Knochenmark mittels CK-18-spezifischer Antikörper bei 5 von 33 (15%) Patientinnen (JÜRGENS 1998) und 4 von 18 (22%) Patientinnen mit einem Mammakarzinom (KLEBE 1999) widerspiegelt. Die in dieser Studie erzielten positiven Tumorzellnachweise liegen auch innerhalb der in den aufgeführten Studien angegebenen Nachweisraten zwischen 18% und 44%.

Bezüglich der fehlenden Korrelation mit der Tumorgröße und dem Nodalstatus stehen die Ergebnisse im Einklang mit denen von PORRO et al. (1988), SCHLIMOK et al. (1987) und HARBECK et al. (1994) und gegensätzlich zu denen von, MANSI et al. (1987), DIEL et al. (1990 und 1992) und FUNKE et al. (1996). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorzellen im Knochenmark und dem Östrogen- und Progesteronstatus konnte ebenfalls in keiner der Studien gezeigt werden (DIEL et al. 1990 und 1992, HARBECK et al. 1994, FUNKE et al. 1996). Alle angeführten Arbeitsgruppen bis auf zwei (PORRO et al. 1988, COTE et al. 1991) verwendeten die APAAP-Methode, benutzten allerdings unterschiedliche Antikörper, um einen Tumorzellnachweis im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen zu führen.

SCHLIMOK et al. (1987) wiesen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers CK 2 gegen das Zytokeratin 18 Tumorzellen im Knochenmark bei 28 von 155 untersuchten

Patientinnen (18%) mit einem Mammakarzinom nach, die sich ähnlich wie in dieser Studie in überwiegend niedrigeren Tumorstadien befanden. Ein Zusammenhang der Ergebnisse mit der Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus konnte nicht beobachtet werden, jedoch gelang dieser Arbeitsgruppe eine Korrelation zwischen CK-18-positiven Zellen und dem Fernmetastasenstatus bei 9/95 (9%) Patientinnen mit einer M₀- Situation versus 12/30 (40%) Patientinnen mit Fernmetastasen.

Die Arbeitsgruppe von MANSI et al. (1987) benutzten einen monoklonalen Antikörper gegen das epitheliale Membranantigen (EMA) und konnten bei 81 von 307 (26%) der untersuchten Patientinnen in unterschiedlichen Tumorstadien ohne Fernmetastasen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisen. Der Tumorzellnachweis korrelierte mit der Tumorgröße (44/222 (20%) T₀₋₂, 36/84 (33%) T₃₋₄) und dem Lymphknotenstatus (29/152 (19%)) nodal negativ, 44/135 (33%) nodal positiv).

DIEL et al. (1990) verwendeten in einer Studie zwei monoklonale Antikörper, von denen PKK 1 gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichtet war und den Antikörper 12H12, der an das tumorassoziierte Antigen TAG 12 bindet. Das Kollektiv der untersuchten Patientinnen befand sich in einer M₀-Situation und wies einen höheren Anteil an niedrigeren Tumorstadien auf (75% T_{1/2}, 25% T_{3/4}, 40% nodal negative und 60% nodal positive Tumore). Bei 41 der 128 (32%) Patientinnen lag eine Tumorzell dissemination in das Knochenmark vor, was mit der Tumorgröße und bedingt mit dem Östrogenrezeptorstatus korrelierte. Eine Korrelation zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark und dem Nodalstatus konnte nicht hergestellt werden: ein positiver Tumorzellnachweis bei 20/73 (27%) nodal positiven und 11/55 (20%) nodal negativen Patientinnen.

PANTEL et al. (1993a) veröffentlichten eine Studie, in der das Knochenmark von 135 Mammakarzinompatientinnen in unterschiedlichen Tumorstadien mit dem CK 18-spezifischen Antikörper CK2 auf disseminierte Tumorzellen untersucht wurde. Insgesamt wurden disseminierte Tumorzellen bei 49 von 135 (36%) Mammakarzinompatientinnen im KM detektiert. Eine Unterteilung der Patientinnenkollektive wurde nur nach dem Fernmetastasenstatus ungeachtet der nodalen Situation und der Tumorgröße vorgenommen. Es gelang ein positiver Tumorzellnachweis im KM bei 14 der 19 (74%) untersuchten Patientinnen mit einem Tumor im metastasierten Stadium, was eine deutlich erhöhte Nachweisrate gegenüber den positiven Befunden der 35/116 (30%) der Patientinnen in nicht metastasierten Stadien entspricht. Bei der Betrachtung des Patientinnenkollektivs mit metastasierten Tumorstadien und der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms konnten wir unter Berücksichtigung des deutlich kleineren Kollektivs diese zu erwartende Beobachtung in den Zytopspinpräparaten nicht bestätigen.

HARBECK et al. (1994) untersuchten Knochenmarkaspirate von 100 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen in überwiegend niedrigeren Tumorstadien (T_{1/2} 83%, T_{3/4} 14%, nodal negative 39%, nodal positive 60%) auf disseminierte

Tumorzellen. Unter Verwendung eines Cocktails aus Antikörpern gegen das epitheliale Membranantigen (EMA), die Zytokeratine 8, 18 und 19 sowie des Antikörpers 12H12 gegen das Glykoprotein TAG 12 ergab sich ein positiver Nachweis von Tumorzellen bei 38/100 Patientinnen, wobei keine Korrelation zwischen den etablierten Prognosefaktoren der TNM-Klassifikation hergestellt werden konnte. Auffällig war auch in dieser Studie der relativ hohe Anteil positiver Knochenmarkbefunde in der Gruppe nodal negativer Patientinnen verglichen mit der Gruppe nodal positiver (19/39 versus 18/60).

FUNKE et al. untersuchten 1996 das Knochenmark von 234 Mammakarzinompatientinnen mit dem monoklonalen Antikörper CK2 gegen das Zytokeratin 18 auf disseminierte Tumorzellen. 88 von 234 (38%) Patientinnen ließen eine Tumorzell dissemination erkennen. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Tumorstadium nach der UICC-Klassifikation und den prognostischen Kriterien der TNM-Klassifikation gefunden. Positive Tumorzellnachweise wurden zu 56% (27/48 Patientinnen) in den höheren Tumorstadien III und IV beobachtet und nur zu 32% (61/186 Patientinnen) in den Stadien 0 bis IIB, wobei eine kontinuierlich ansteigende Nachweisrate mit zunehmendem Tumorstadium dokumentiert werden konnte. Entsprechend der Tumorstadien zeigten 50% (16/32) der Patientinnen mit T3- und T4-Tumoren eine Tumorzellkontamination des Knochenmarks verglichen mit 66 von 194 (34%) Patientinnen mit Tumoren der Größe Tis bis T2. Bei 13 von 22 (59%) der Patientinnen mit einer M₁-Situation wurden Tumorzellen entdeckt, während dies nur bei 35% (75/212) der Patientinnen ohne Fernmetastasen der Fall war. In der Gruppe nodal positiver Patientinnen gelang ein Tumorzellnachweis bei 47% (53 von 112) und 25% (28/111) nodal negativer Patientinnen.

Ähnliche Ergebnisse sind in einer weiterführenden Studie von DIEL et al. (1992) zu finden, die eine Fortführung der Studie von 1990 darstellt und in der der monoklonale Antikörper 2E11 gegen das Coreprotein des tumorassoziierten Antigens TAG 12 zum Nachweis von Tumorzellen eingesetzt wurde. Untersucht wurde das Knochenmark von 260 Mammakarzinompatientinnen ohne Fernmetastasen in überwiegend niedrigeren Tumorstadien (T1-2 81%, T3-4 19%, nodal negativ 51%, nodal positiv 49%). Ein positiver Nachweis wurde bei 115 der 260 (44%) Patientinnen geführt. Im Knochenmark nachgewiesene Tumorzellen korrelierten signifikant mit der Tumorgöße sowie dem Nodalstatus. 38% (79 von 211) der Patientinnen mit einem Tumor der Größe T1-2 wiesen Tumorzellen im Knochenmark auf und 73% (36 von 49) der Patientinnen mit einem T3/4-Tumor. Disseminierte Tumorzellen und ein positiver Lymphknotenstatus lagen in 58% (74/124) der Fälle vor und waren nur bei 30% (40/133) nodal negativer Patientinnen zu finden.

Für die niedrigere Rate positiver Ergebnisse in Knochenmarkproben von 24% in der vorliegenden Studie verglichen mit PANTEL et al. (1993a), DIEL et al. (1990 und 1992) und HARBECK et al. (1994) kommen verschiedene Erklärungsansätze in Betracht.

Unterschiedliche Arbeitsgruppen untersuchten 5 (PANTEL et al. 1993a) bis 10 Präparate (DIEL et al. 1992), was die untersuchte Zellzahl bis auf $1,6 \times 10^6$ Zellen je Patientin steigert. Der Vergleich positiver Ergebnisse von den PB- und KM-Proben in Zytospin- und Sedimentationspräparaten zeigte eine niedrige Konkordanz beider Untersuchungsmethoden, was vermuten lässt, dass sich die Ergebnisse ergänzen. Diese Annahme spricht für das Vorgehen, einen erhöhten Tumorzellnachweis durch die Untersuchung mehrerer Proben einer Patientin zu erzielen. PANTEL et al. (1993a) werteten den Nachweis 1 Tumorzelle als positiv, wobei nicht erkennbar war, ob ein positiver Nachweis in einem oder in allen ausgewerteten Präparaten erfolgen musste. In der hier durchgeführten Studie wurde nur ein Präparat je Patientin in Augenschein genommen und erst ab dem Vorliegen von mindestens 3 CK-18-exprimierenden Zellen als positiv für eine nachgewiesene Tumorzell dissemination befundet. Viele Autoren benutzten gepoolte Knochenmarkaspirate aus 2 bis 6 Punktionsstellen (DIEL et al. 1990 und 1992, PANTEL et al. 1993a, HARBECK et al. 1994, FUNKE et al. 1996). DIEL et al. konnten eine Steigerung eines Tumorzellnachweises durch die Markaspiration aus 4 Stellen des Beckenkamms und 2 Stellen des Sternums von 24% auf 32% in der von ihnen 1990 durchgeführten Studie demonstrieren. PANTEL et al. konnten 1994 zeigen, dass die Detektionsrate von Tumorzellen epithelialer Tumoren mittels des CK-18-spezifischen Antikörpers CK 2 durch die Aspiration des Knochenmarks von 2 bis 3 unterschiedlichen Stellen bis auf 90% erhöht wird. Eine ähnliche Beobachtung wurde 1987 schon von SCHLIMOK et al. gemacht, die einen Nachweis von CK 18-positiven Zellen im Knochenmark von 30 Mammakarzinompatientinnen führten und die Ergebnisse der bilateral gewonnenen Knochenmarkaspirate verglichen. Es fiel auf, dass bei 3/30 KM-Proben CK 18-positive Ergebnisse in beiden Aspiraten entdeckt wurden und bei 4/30 Patientinnen ein Tumorzellnachweis nur in je einem Aspirat gelang. Die Begründung ist sowohl in der Annahme zu sehen, dass disseminierte Tumorzellen eher mit niedriger Frequenz und ungleichmäßig verstreut im Organismus auftreten, als auch in der Heterogenität der Tumorzellen. Letzteres wird durch die Beobachtung gestützt, dass eine verminderte Expression von CK 18 während der Mobilisation epithelialer Tumorzellen in ca. 50% der Fälle auftritt und angenommen werden muss, dass dies den Tumorzellen eine selektive Disseminationskapazität verleiht (LICHTNER et al. 1991, PANTEL et al. 1994). Hierdurch wäre auch die deutliche Erhöhung eines Tumorzellnachweises durch die gleichzeitige Verwendung von verschiedenen Antikörpern, sogenannten Cocktails, erklärbar, bei denen Antikörper gegen CK 18 häufige Verwendung finden (TAHA et al. 1989, DIEL et al. 1990, HARBECK 1994). Die Wahl des Zielantigens scheint ebenfalls für eine höhere Nachweisrate ausschlaggebend zu sein, auch wenn die Autoren darauf hinweisen, dass sich in vergleichenden Studien keine signifikanten Unterschiede zwischen dem monoklonalen Antikörper PKK1 gegen die Zytokeratinkomponenten 8,18 und 19 und dem monoklonalen Antikörper 2E11 gegen das Coreprotein von TAG 12 feststellen ließen (DIEL et al. 1992).

Eine weitere Ursache für eine verminderte Detektionsrate lässt sich mit der von PANTEL et al. 1994 beschriebenen Tatsache erklären, dass die meisten Karzinompatienten, unabhängig von der Tumorentität, weniger als 10 Karzinomzellen in 8×10^5 Knochenmarkzellen aufwiesen, was extrapoliert weniger als 1 Tumorzelle in 1×10^5 Zellen entspricht. Den Untersuchungsergebnissen von PANTEL et al. (1994) zur Folge wird die Detektionsrate weiterhin durch die Blutkontamination im Rahmen der Knochenmarksaspiration negativ um den Faktor 15 beeinflusst.

Die Betrachtung der unterschiedlichen Studien macht deutlich, dass aufgrund fehlender Standards in der praktischen Durchführung bezüglich der Anzahl der Zellen je Zellpräparat, Anzahl der untersuchten und als positiv gewerteten Präparate sowie die als positiv zu wertende Anzahl nachgewiesener CK-18-exprimierender Zellen bislang keine Vergleichbarkeit der Untersuchungen besteht. Inwieweit die unterschiedlichen Methoden der Zellauftragung auf die Objektträger, z.B. Zentrifugationsgeschwindigkeiten, und Fixationsmethoden in den aufgeführten Studien einen Einfluß auf die Antikörpermarkierung einzelner Zellen ausübt, bleibt weiter abklärungsbedürftig. Die Aufarbeitung der Proben mit dem in dieser und den aufgeführten Studien angewandten APPAP-Methode unter Verwendung monoklonaler Antikörper stellt ein zeitaufwendiges Verfahren dar, dass nur in speziellen Laboren durchgeführt werden kann (DIEL et al. 1990). Letztendlich ist zu berücksichtigen, dass nicht jede nachgewiesene Tumorzelle zwangsläufig zu einer Metastase heranreifen wird, und von manchen Autoren postuliert wird, dass dem Knochenmark nur eine Reservoirfunktion für disseminierte Tumorzellen zukommt bzw. das Auftreten von Karzinomzellen im Knochenmark nur einen vorübergehenden Zustand darstellt. Aus den aufgeführten Gründen wird deutlich, dass die prognostische Signifikanz von CK 18 als Nachweis für disseminierte Tumorzellen im Knochenmark und Blut von Patientinnen mit Mammakarzinomen, die damit zusammenhängende klinische Einflussnahme auf eine prätherapeutische Patientinnenselektion und die Praktikabilität der Methode im klinischen Alltag weiterer Abklärung bedarf. Vor allem muss die Bedeutung der relativ hohen Rate von 8% bis 48% von Tumorzellen im Knochenmark nodal negativer Mammakarzinompatientinnen (SCHLIMOK et al. 1987, PORRO et al. 1988, DIEL et al. 1990, HARBECK et al. 1994, FUNKE et al. 1996), die auch in der vorliegenden Studie mit 42% bzw. 48% (3/7 in Sedimentationspräparaten bzw. 7/15 in Zytospins) auffällig war, weitergehend verfolgt werden. Inwieweit sich der zu vermutende Zusammenhang der relativen Häufigkeit des Auftretens von Rezidiven bei Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus bestätigt, die zwischen 30% und 50% angegeben wird, muss Gegenstand weiterer wissenschaftlicher und klinischer Forschung bleiben.

4.2.4 Immunzytologischer Nachweis disseminierter Tumorzellen in Zytozentrifugations- und Sedimentationspräparaten des Knochenmarks und peripheren Blutes von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und dem Auftreten von Fernmetastasen und Rezidiven

Der mittlere Beobachtungszeitraum der 41 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, deren Knochenmark und peripheres Blut anhand von Zytozentrifugationspräparaten auf eine Tumorzell dissemination untersucht wurde, erstreckte sich über 20 Monate. Insgesamt erlitten 7 Patientinnen dieses Kollektivs ein Rezidiv oder einen Progress ihrer Erkrankung, 2 Patientinnen verstarben tumorbedingt. Der mittlere Zeitraum bis zum Auftritt eines Rezidivs für das gesamte Kollektiv betrug 15,4 Monate, bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes 7,25 Monate (0,5 (P.E.) und 14 Monate). Es ließen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen KM- und PB-Befunden ermitteln. 1 von 9 Patientinnen mit einem Tis und einem Tumorzellnachweis im Knochenmark verstarb an den Folgen einer hepatischen Metastasierung eines unbekanntes Primärs (P.E.), weshalb prognostisch zu dieser Gruppe keine Aussage getroffen werden kann. Auffallend ist, dass keine der 8 von 9 (89%) der Patientinnen mit positivem Knochenmarkbefund und keine der 4 Patientinnen mit einer nachgewiesenen Tumorzell dissemination im PB ein Rezidiv innerhalb dieses Zeitraumes entwickelten. Von den 14 Patientinnen, deren KM- und PB-Proben an Sedimentationspräparaten untersucht wurden, betrug der mittlere Beobachtungszeitraum 18,8 Monate. Hautmetastasen traten bei 1 Patientin der tumorzellnegativen Gruppe nach 12 Monaten auf. Keine der 5 Patientinnen mit positiven Befunden im Knochenmark oder PB zeigte einen Progress ihrer Erkrankung. Aufgrund der insgesamt niedrigen Rezidivrate dieses untersuchten Kollektivs, ist eine vergleichende Analyse beider Probenarten zwischen den tumorzellnegativen und tumorzellpositiven Gruppen sowie mit anderen Studien kaum möglich. Eine Korrelation zwischen dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark oder Blut und dem rezidivfreien und gesamten Überleben lässt sich aus dieser Studie nicht ableiten. Somit entsprechen die Ergebnisse dieser Studie nicht den Beobachtungen der meisten Autoren, die ein gehäuftes Auftreten von Fernmetastasen, insbesondere eine Korrelation mit dem Auftreten einer ossären Filialisierung bei Patientinnen mit positiven Tumorzellnachweisen im Knochenmark beobachteten und diesbezüglich ein verkürztes rezidivfreies Intervall und Gesamtüberleben beschrieben.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen das epitheliale Membranantigen EMA Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen nachweisen und in diesem Zusammenhang ein verkürztes rezidivfreies Intervall und Überleben feststellen sowie eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Entwicklung von Fernmetastasen, insbesondere ossärer Metastasen demonstrieren (BERGER et al. 1988, MANSI et al. 1987, DEARNALEY et al. 1991). BERGER et al. (1988) beobachteten Patientinnen mit einem Mammakarzinom ab dem Zeitpunkt der Operation über

einen mittleren Zeitraum von 29 Monaten. Patientinnen mit nachgewiesenen Tumorzellen im Knochenmark erlitten häufiger Rezidive (31/77 (40%)) als solche ohne Tumorzell dissemination (42/208 (20%)), wobei sich das rezidivfreie Intervall in der ersten Gruppe kürzer darstellte. MANSI et al. (1987) verfolgten den Krankheitsverlauf von 307 Mammakarzinompatientinnen über einen medianen Beobachtungszeitraum von 28 Monaten. Insgesamt entwickelten 75 der 307 Patientinnen Rezidive, von denen 60/75 Fernmetastasen aufwiesen. Davon waren 26/81 (32%) in der tumorzellpositiven Gruppe, 34/226 (15%) wiesen keine Tumorzellen im Knochenmark auf. 15 der 81 Patientinnen (19%) des tumorzellpositiven Kollektivs verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraumes tumorbedingt verglichen mit 21 der 226 (9%) der tumorzellnegativen Patientinnen. In den von DEARNALEY et al. (1991) erhobenen Daten in einem Kollektiv von 39 Patientinnen über einen Beobachtungszeitraum von 9 Jahren betrug das rezidivfreie Intervall im Mittel 10 Monate in der tumorzellpositiven Gruppe verglichen mit 24 Monaten in der tumorzellnegativen Gruppe. Die mittlere Zeitspanne bis zum Eintritt eines tumorbedingten Todes stellte sich in der tumorzellpositiven Gruppe mit 23 versus 47 Monaten ebenfalls verkürzt dar. Fernmetastasen traten bei 11/13 (85%) Patientinnen mit einem positiven Knochenmarkbefund und bei 8/36 (31%) Patientinnen mit fehlendem Tumorzellnachweis auf, wobei eine ossäre Beteiligung vornehmlich in der ersten Gruppe (7/11) zu verzeichnen war. SALVADORI et al. (1990) sahen über einen medianen Zeitraum von 48 Monaten eine leicht erhöhte Rezidivrate von 30% bei Patientinnen mit Tumorzellen im Knochenmark gegenüber 20% mit unauffälligen Knochenmarkbefunden. Ossäre Metastasen traten in beiden Gruppen zu gleichen Teilen auf.

Die von COTE et al. 1991 veröffentlichte Studie befasste sich mit der Rezidivhäufigkeit von 49 Mammakarzinompatientinnen mit Tumoren im Stadium I und II nach der UICC-Klassifikation mit nachgewiesenen Tumorzellen im Knochenmark. Der mittlere Beobachtungszeitraum betrug 29 Monate, der mediane 30 Monate. 12 der 49 Patientinnen erlitten ein Rezidiv, von denen 7 von 12 Tumorzellen im Knochenmark aufwiesen. Fernmetastasen traten in beiden Gruppen ohne Prädilektion auf, wobei im gesamten Kollektiv der Knochen die häufigste Lokalisation darstellte. Die 2-Jahres-Rezidivrate wurde mit 33% für Patientinnen mit nachgewiesenen Tumorzellen im Knochenmark und 3% für tumorzellnegative angegeben. DIEL et al. (1990) konnten innerhalb eines medianen Beobachtungszeitraumes von 39,5 Monaten ein deutlich verkürztes Intervall bis zum Auftreten von Knochenmetastasen in dem Kollektiv tumorzellpositiver Patientinnen (8 Monate) gegenüber dem Kollektiv tumorzellnegativer Patientinnen (15,8 Monate) belegen. Ebenso war in der Gruppe der Patientinnen mit nachgewiesener Tumorzell dissemination im Vergleich mit der tumorzellnegativen Gruppe die Inzidenz einer Entwicklung von Knochenmetastasen geringgradig (9/31 versus 4/36) und von Fernmetastasen (14/31 versus 4/36) deutlich erhöht. Lokalrezidive wurden in dieser Studie häufiger bei Patientinnen ohne

Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark beobachtet (5/36 versus 0/31). In der Gruppe tumorzellpositiver Patientinnen verstarben 4 von 31 (12%) im Vergleich zu 2 von 36 (5%) in der tumorzellnegativen Gruppe nach 2 Jahren. In der Fortführung dieser Studie (DIEL et al. 1992) konnte gezeigt werden, dass eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Fernmetastasen und Rezidiven in der tumorzellpositiven Gruppe vorliegt (22/81 versus 4/130). Alleinige Knochenmetastasen traten in einem mittleren Beobachtungszeitraum von 24 Monaten (12 bis 73 Monate) nur in der Gruppe tumorzellpositiver Patientinnen auf, wobei die Wahrscheinlichkeit, in welcher Zeit eine ossäre Metastasierung auftreten könnte, für das tumorzellpositive Kollektiv mit 9 Monaten und für das tumorzellnegative mit 30 Monaten berechnet wurde. Das gleichzeitige Auftreten von Knochen- und Viszeralmetastasen sowie von alleinigen ossären Metastasen überwog ebenfalls deutlich bei Patientinnen mit einer Tumorzell dissemination in das Knochenmark. Lokalrezidive traten in beiden Gruppen zu gleichen Teilen auf, tumorbedingte Todesfälle waren bei 10 der tumorzellpositiven und 5 der tumorzellnegativen Patientinnen zu verzeichnen.

HARBECK et al. (1994) identifizierten den Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen zum Diagnosezeitpunkt als einen signifikanteren prognostischen Marker für ein rezidivfreies Überleben als den Nodalstatus. Der mediane Beobachtungszeitraum in der von ihnen durchgeführten Studie belief sich auf 39 Monate mit einem insgesamt medianen rezidivfreien Intervall von 28 Monaten. Bei Patientinnen mit einem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Diagnose bis zum Auftreten eines Progresses ihrer Erkrankung betrug die mediane Zeitspanne 19 Monate, in der Gruppe tumorzellnegativer Patientinnen 33 Monate. Patientinnen mit nachgewiesener Tumorzell dissemination hatten ein höheres Risiko ein Rezidiv zu entwickeln als solche mit unauffälligen Knochenmarkbefunden: 39% (15/38) der tumorzellpositiven Patientinnen verglichen mit 15% (9/62) der tumorzellnegativen. Fernmetastasen waren in der ersten Gruppe deutlich vermehrt zu beobachten (9/38 (24%) versus 5/62 (8%)). Alleinige Knochenmetastasen stellten die häufigste Lokalisation bei nachgewiesenen Tumorzellen dar und traten nur in dem Kollektiv tumorzellpositiver Patientinnen auf. Viszerale Metastasen wurden häufiger in der Gruppe der tumorzellnegativen Patientinnen diagnostiziert, Lokalrezidive traten in dem Kollektiv mit positivem Tumorzellnachweis etwa doppelt so häufig auf (6/38 (16%) versus 4/62 (7%)). Von den 100 Patientinnen verstarben 16 innerhalb des Beobachtungszeitraumes, davon 24% der Patientinnen mit einem Tumorzellnachweis im Knochenmark, 11% ohne nachweisbare Tumorzell dissemination.

Die erheblichen Unterschiede der Ergebnisse bezüglich des rezidivfreien Intervalls und Gesamtüberlebens zwischen der vorliegenden Studie und den aufgeführten Arbeiten sind am ehesten mit der als positiv bewerteten Tumorzellzahl zu begründen. Mehrere Autoren erklärten das alleinige Auftreten von Tumorzellen im Knochenmark und nicht die Anzahl der

nachgewiesenen Zellen als prognostisch bedeutsam (MANSI et al. 1987, COTE et al. 1991, HARBECK et al. 1994).

Der von einigen Arbeitsgruppen postulierte Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark und dem Auftreten von ossären Metastasen (BERGER et al. 1988, MANSI et al. 1987, DEARNALEY et al. 1991, DIEL et al. 1990, HARBECK et al. 1994) konnte anhand des hier untersuchten Kollektivs nicht beurteilt werden, da keine der Patientinnen innerhalb des Beobachtungszeitraumes ossäre Metastasen entwickelten. Lediglich zwei Patientinnen wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose ossäre Metastasen auf, von denen 1 (K.C.) einen positiven Befund im Zytospin des KM und im Sedimentationspräparat des PB aufwies und keinen weiteren Progress ihres Mammakarzinoms erlitt. Bei der zweiten Patientin (B.S.) wurde ein Progress der ossären Metastasen dokumentiert, jedoch wurde von ihr nur das PB in Zytozentrifugationspräparaten begutachtet. Die übrigen Patientinnen erlitten Lokalrezidive, eine Metastasierung der Pleura und des lymphatischen Systems. Dies bestätigt die Beobachtungen einiger Autoren, die ein gehäuftes Auftreten von Lokalrezidiven (DIEL et al. 1990) und extraossären Lokalisationen (DEARNALEY et al. 1991, HARBECK et al. 1994) in der Gruppe der tumorzellnegativen Patientinnen dokumentierten.

4.3 Molekularbiologischer Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut

PTHrP konnte in einer Vielzahl von Mammakarzinomen nachgewiesen werden und scheint durch die Stimulation osteoklastischer Aktivität in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle für die Entwicklung von Knochenmetastasen zu spielen (SOUTHBY et al. 1990, BOUIZAR et al. 1993, PHILBRICK et al. 1996, SOUTHBY et al. 1995, IGUCHI et al. 1996). Weiterhin konnte PTHrP zu einem höheren Prozentsatz in Knochenmetastasen gefunden werden verglichen mit Proben aus Metastasen anderer Lokalisationen (POWELL et al. 1991).

Die PCR und RT-PCR stellt ein verbreitetes und sensitives Werkzeug für den Nachweis von DNA- bzw. mRNA-Sequenzen gewebspezifischer Proteine dar und beruht auf der Amplifikation der nachzuweisenden DNA- bzw. mRNA-Sequenzen. Die Sensitivität der PCR und RT-PCR wird mit dem Nachweis von 1 Zelle in 1×10^5 bis 1×10^7 Zellen angegeben und konnte von mehreren Arbeitsgruppen für Mammakarzinome und andere Tumorentitäten zur Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und Blut belegt werden (NAITO et al. 1991, DATTA et al. 1994, WOOD et al. 1994, FIELDS et al. 1996, DEGUCHI et al. 1997). Die Spezifität der Methode ist Abhängig von der Wahl des nachzuweisenden Substrates sowie der Verwendung von Primerpaaren, die in genspezifischen Exonabschnitten lokalisiert sein müssen, um die Amplifikation anderer Gensequenzen zu vermeiden. Für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und Blut von Patientinnen mit einem Mammakarzinom wurde die PCR und RT-PCR überwiegend zum Nachweis des Zytokeratin

19 angewandt (DATTA et al. 1994, FIELDS 1996). Während DATTA et al. (1994) und KRÜGER et al. (1996) den so geführten Nachweis von CK 19 als hoch spezifisch bewerteten, konnten andere Arbeitsgruppen eine erhebliche Rate falsch-positiver Befunde in Knochenmark- und Blutproben belegen, welche auf die Amplifikation von Pseudogenen und illegitimen Transkripten des Gens in Blutzellen zurückgeführt werden (WULF et al. 1994, KRISMAN et al. 1995, LOPEZ-GUERRERO et al. 1997, RUUD et al. 1999). Die Sensitivität der in dieser Studie angewendeten RT-PCR zum Nachweis von Transkripten des PTHrP-Gens wurde in einem Verdünnungsexperiment mit Tumorzellen der Tumorzelllinie 786-O aus einem PTHrP-exprimierenden Nierenzellkarzinom bestimmt, die in mononukleären Blutzellen eines gesunden Spenders verdünnt wurden. Die Sensitivität lag bei 1 Tumorzelle in 1×10^5 Zellen und konnte durch den Southern-Blot auf 1 Tumorzelle in 1×10^6 Zellen angehoben werden (WULF et al. 1997). Bezüglich der Spezifität dieser RT-PCR konnten WULF et al. (1997) keine Amplifikate des PTHrP-Gens in den KM und PB gesunder Spender in der primären und der nested PCR nachweisen, jedoch war ein Nachweis von PTHrP-Transkripten in 3 von 25 Proben des Knochenmarks im Southern-Blot zu verzeichnen. Dies bedeutet, dass ein positives Ergebnis in der sekundären PCR einem Tumorzellnachweis entspricht, ein isolierter positiver Nachweis im Southern-Blot jedoch nicht als beweisend für eine Dissemination von Tumorzellen betrachtet werden kann (JÜRGENS 1998). Möglicherweise können aktivierte oder transformierte Lymphozyten PTHrP exprimieren (MARTIN et al. 1989) oder es könnte sich um illegitime Transkripte handeln, die gewebe- oder differenzierungsspezifisch in allen Zellen gebildet werden können und durch eine PCR-bedingte Amplifikation zu einem falsch-positivem Ergebnis führen können (GHOSSEIN und ROSAI 1996). In der bisher veröffentlichten Literatur finden sich keine Hinweise auf Pseudogene des PTHrP-Gens.

4.3.1 Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut mit der PTHrP RT-PCR

Die KM- und PB-Proben von 7 Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma wiesen keine Amplifikationsprodukte des PTHrP-Gens in der durchgeführten RT-PCR auf, was die Spezifität der Methode unterstreicht.

Von 40 Patientinnen des gesamten Kollektivs wurden jeweils 37 KM- und PB-Proben mittels der RT-PCR auf eine Dissemination von Tumorzellen untersucht. In 11 der 37 Knochenmarkproben (30%) und 9 der 37 Blutproben (24%) konnten Tumorzellen nachgewiesen werden. 26 von 37 (70%) der KM-Proben und 28 der 37 (76%) der PB-Proben waren negativ für das PTHrP-Gen.

Knochenmark und peripheres Blut von 37 Patientinnen mit einem primären Mammakarziom wurden auf eine PTHrP-Expression untersucht. Von diesen waren 10 von 34 KM-Proben (29%) und 9 von 35 PB-Proben (26%) positiv für das untersuchte Gen. 71% der

Knochenmark- und 74% der Blutproben waren negativ für disseminierte Tumorzellen in dieser Untersuchung. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den von WULF et al. (1997) erhobenen Befunden, die unter Verwendung der selben Oligonukleotidprimer in der RT-PCR Transkripte des PTHrP-Gens in 9 von 31 Proben peripheren Blutes (29%) und in 9 von 34 Proben des Knochenmarks (26%) von Patientinnen mit einem Mammakarzinom nachweisen konnten. In einer nachfolgenden Arbeit erhielt KLEBE (1999) mit der gleichen Methode eine Detektionsrate von 33% PTHrP-positiven Ergebnissen in KM- und PB-Proben von Patientinnen mit einem Hochrisiko-Mammakarzinom. Die Ergebnisse im peripheren Blut der vorliegenden Studie reihen sich in die anderer Arbeitsgruppen ein, die die PCR bzw. RT-PCR zum Nachweis disseminierter Tumorzellen verwandten und 15% bis 53% positive Befunde erhielten (DATTA et al. 1994, KRÜGER et al. 1996, SCHOENFELD et al. 1997). Der Vergleich der erhobenen Befunde im Knochenmark mit der bislang veröffentlichten Literatur zeigt erhebliche Diskrepanzen. Die Daten von SCHOENFELD et al. (1997) entsprechen mit 25% positiver Ergebnisse unseren Beobachtungen. DATTA et al. (1994), KRÜGER et al. (1996), FIELDS et al. (1996) und VANNUCCHI et al. (1998) publizierten Nachweisraten von Zytokeratin 19 in disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen von 48% bis 82%. Die höhere Nachweisrate im Knochenmark in diesen Studien könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die Patientinnen in überwiegend höheren Tumorstadien befanden und im Zusammenhang mit einer bestehenden Metastasierung eine größere Tumorlast angenommen werden kann.

Eine Assoziation mit dem Tumorstadium der UICC sowie den etablierten Prognosefaktoren der TNM-Klassifikation und dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus war nicht erkennbar. Die Ergebnisse der untersuchten Knochenmark- und Blutproben differierten diesbezüglich nicht wesentlich. Von 10 Patientinnen mit einem positiven Befund im Knochenmark wurde bei 8 (80%) das Tumorstadium 0 bis IIB festgelegt, nur 1 wies einen Tumor im Stadium IV auf und bei einer Patientin (K.K.I.) war das Tumorstadium im Sinne der Klassifikation nach den UICC-Kriterien nicht festzulegen. 8 der 9 (89%) positiven Proben peripheren Blutes stammten von Patientinnen mit einem Tumor im Stadium 0 bis IIB und nur 1 Probe von einer Patientin mit einem Tumor im Stadium IIIB. Die Tumoren mit positiven Befunden im Knochenmark und peripheren Blut wurden mit Tis bis T2 festgelegt (8/10 im KM und 8/9 im PB). Die Betrachtung der Ergebnisse einer Tumorzell dissemination in das Knochenmark in Verbindung mit dem Nodalstatus der Patientinnen ergab ähnliche Ergebnisse bei Patientinnen mit und ohne Lymphknotenbefall: 29% (4/14) in der nodal negativen Gruppe verglichen mit 30% (6/20) in der nodal positiven. In den Proben peripheren Blutes war ein höherer Nachweis von Tumorzellen in der Gruppe der Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen von 29% (4/14) im Gegensatz zu 23% (5/21) der nodal positiven Patientinnen zu verzeichnen. Die Bedeutung dieser Ergebnisse in der prognostisch günstigeren Gruppe von Patientinnen muss Gegenstand weiterer Studien bleiben. Da

lediglich 2 Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose Fernmetastasen aufwiesen, lassen sich bezüglich einer Korrelation eines Tumorzellnachweises keine Aussagen treffen. Von den beiden Proben des KM war eine PTHrP-positiv, die beiden Proben des PB negativ für PTHrP. Für das Kollektiv der Patientinnen mit einem Rezidiv und dem Zweitkarzinom der Mamma gilt gleiches. 1 von 2 KM-Proben zeigte eine Tumorzell dissemination, die beiden Blutproben waren tumorzellnegativ. Bei der Betrachtung der Ergebnisse muss die verhältnismäßig kleine Patientinnenzahl, die sich in überwiegend niedrigen Tumorstadien befand, berücksichtigt werden. Eine gleichzeitige Expression des Östrogenrezeptors und dem Nachweis PTHrP-positiver Zellen waren nur bei jeweils 8 von 30 (27%) KM- und PB-Proben zu erkennen. Einen positiven Progesteronrezeptorstatus bei gleichzeitigem Vorliegen von PTHrP-exprimierenden Zellen zeigten 9 der 23 (39%) Knochenmarkproben und 7 der 23 (30%) Proben peripheren Blutes. Die Ergebnisse der Assoziation der in dieser Arbeit erhobenen Befunde mit den etablierten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms entsprechen denen von JÜRGENS (1998).

4.3.2 Nachweis von PTHrP im Knochenmark und peripheren Blut und dem Auftreten von Fernmetastasen und Rezidiven

Der mediane Beobachtungszeitraum des gesamten Kollektivs der 37 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom deren Knochenmark und peripheres Blut auf Tumorzellen mit Hilfe der RT-PCR zum Nachweis von PTHrP untersucht wurde betrug 20 Monate. Insgesamt erlitten 6 Patientinnen ein Rezidiv oder einen Progress ihrer Erkrankung, 2 Patientinnen verstarben an den Folgen ihres Tumorleidens. Das mediane rezidivfreie Intervall belief sich auf 15,5 Monate. Die Zeit bis zum Auftritt eines tumorbedingten Todes wurde im Median mit 7,25 Monate (0,5 und 14 Monate) berechnet, wobei berücksichtigt werden muss, dass eine Patientin mit einem Carcinoma in situ (P.E.) nach 0,5 Monaten an den Folgen der hepatischen Filialisierung eines unbekanntes Primarius verstarb. Keine der 10 Patientinnen mit PTHrP-exprimierenden Zellen im Knochenmark entwickelte ein Rezidiv oder verstarb tumorbedingt. 3 von 9 Patientinnen (33%) mit einem Tumorzellnachweis mittels der RT-PCR für den Nachweis von PTHrP im peripheren Blut wiesen ein Rezidiv innerhalb des Beobachtungszeitraumes auf. Damit liegt die Rezidivrate in dem tumorzellpositiven Kollektiv deutlich über der der tumorzellnegativen Gruppe, in der 3 von 26 Patientinnen (12%) ein Rezidiv erlitten. Das mediane rezidivfreie Intervall stellte sich mit 18,6 Monaten in der tumorzellpositiven Gruppe jedoch deutlich länger gegenüber dem des tumorzellnegativen Kollektivs mit 12,3 Monaten und dem Gesamtkollektiv mit 15,5 Monaten dar. Diese Diskrepanz lässt die Wertigkeit von PTHrP als prognostischen Faktor offen, wobei der Beobachtungszeitraum im Vergleich zu dem Standard eines 5-Jahres-Beobachtungszeitraumes relativ kurz ist und die erhobenen Ergebnisse somit keine abschließende Aussage darstellen. Da in dem untersuchten Kollektiv überwiegend viszerale

Metastasen und Lokalrezidive vorlagen und ossäre Metastasen häufig nach längeren krankheitsfreien Intervallen auftreten, ist eine Assoziation metastatischer Prädilektionsstellen im Zusammenhang mit dem Nachweis von PTHrP in Proben des Knochenmarks und peripheren Blutes aus dieser Studie nicht möglich. In der kleinen Gruppe der Patientinnen mit einem Rezidiv ihrer Erkrankung konnte keine erhöhte Nachweisrate von PTHrP in KM- und PB-Proben beobachtet werden.

4.3.3 Nachweis von PTHrP in Mammakarzinomgeweben mit der RT-PCR und Vergleich der Ergebnisse im Knochenmark und Blut

11 Tumorgewebeproben wurden auf Transkripte des PTHrP-Gens untersucht, die sich alle positiv darstellten.

Die Ergebnisse der untersuchten Tumorgewebe in dieser Studie bestätigen überwiegend die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die einen Nachweis von PTHrP immunzytochemisch mit mono- und polyklonalen Antikörpern an Tumorgewebsschnitten führten (SOUTHBY et al. 1990, BUNDRED et al. 1992, LIAPIS et al. 1993). SOUTHBY et al. (1990) untersuchten 102 Tumorgewebe auf eine Expression von PTHrP, die sie in 60% nachweisen konnten. Tendenziell konnte eine vorzugsweise Metastasierung in den Knochen beschrieben sowie eine positive Korrelation mit dem Progesteronstatus abgeleitet werden. In der Arbeit von BUNDRED et al. (1992) wurde durch immunzytochemische Färbungen gegen PTHrP an Parafinschnitten von 155 Mammatumoren eine Expression von PTHrP in 56% der Fälle demonstriert. Eine Korrelation der PTHrP-Expression in Tumorgeweben und den etablierten Prognosefaktoren, dem rezidivfreien Intervall und dem Gesamtüberleben gelang in dieser Studie über einen Beobachtungszeitraum über 5 Jahre nicht. Von 28 Patientinnen, die ossäre Metastasen entwickelten, ließ sich PTHrP in 21 Tumorgeweben nachweisen. LIAPIS et al. (1993) fanden in 69% der untersuchten Mammakarzinomgewebe von Patientinnen mit überwiegend niedrigeren Tumorstadien positive PTHrP-Nachweise. Eine Korrelation mit dem Grading und dem Hormonrezeptorstatus wurde nicht beobachtet. Die Ergebnisse korrelierten jedoch invers mit dem Staging und dem Lymphknotenstatus. 80% der Patientinnen mit einem PTHrP-exprimierenden Tumor wiesen weniger als 3 oder keine befallenen Lymphknoten auf. Im Vergleich dazu zeigten 50% der Patientinnen mit PTHrP-negativen Tumoren keine Lymphknotenmetastasen, was sich mit unseren Ergebnissen deckt. EDWARDS et al. (1995) konnten mittels IRMA und RIA Nachweisraten von PTHrP in Mammakarzinomgeweben von 68% erzielen.

Die hohen Nachweisraten von Transkripten des PTHrP-Gens mittels der RT-PCR entsprechen denen von BOUIZAR et al. (1993) und SOUTHBY et al. (1995) und machen die höhere Sensitivität dieser Methode deutlich. BOUIZAR et al. (1993) wiesen in 37 Tumorgewebe von 38 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR eine Transkription des PTHrP-

Gens nach, SOUTHBY et al. (1995) gelang dies mit einer quantitativen RT-PCR in 13 von 13 Mammakarzinomgeweben. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen konnten BOUIZAR et al. (1993) eine Korrelation zwischen der PTHrP-Expression und dem Nodalstatus der Patientinnen herstellen, nicht jedoch zur TumorgroÙe, dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus. In einem Beobachtungszeitraum über 5 Jahre zeigte sich in der angeführten Studie eine hohe Inzidenz von ossären Metastasen bei 17 der 38 Patientinnen. 10 der 38 Patientinnen entwickelten Weichteilmetastasen und 11 blieben rezidivfrei. Diese Ergebnisse stützen die These eines PTHrP-vermittelten Osteotropismus von Mammakarzinommetastasen.

Ein Vergleich zwischen der Expression von PTHrP in Tumorgewebe und dem rezidivfreien Intervall bzw. dem Gesamtüberleben konnte aus dieser Studie nicht abgeleitet werden, da alle untersuchten Tumorgewebe PTHrP exprimierten. Eine Konkordanz zwischen der Expression von PTHrP im Primärtumor und einem gleichzeitigen Nachweis von PTHrP in Proben des peripheren Blutes und / oder Knochenmarks sowie dem Auftreten von Metastasen wurde nicht festgestellt. 3 von 11 Patientinnen (H.N.H., F.E., B.G.) wiesen PTHrP-positive Tumore bei gleichzeitig positiven Ergebnissen im Knochenmark auf, ein PTHrP-Nachweis im Tumorgewebe und peripheren Blut lag bei 2 von 10 untersuchten Patientinnen (G.L., B.G.) vor und ging nicht mit einer erhöhten Rezidivrate einher.

Die insgesamt hohe Nachweisrate von Transkripten des PTHrP-Gens in Gewebeproben des Primärtumors in dieser und den aufgeführten Studien legt eine Funktion von PTHrP in der Entwicklung und Differenzierung von Mammakarzinomen nahe. Die Inhomogenität der Ergebnisse bezüglich eines aggressiveren Tumorwachstums und eines Organotropismus der Metastasen unter Berücksichtigung kleiner bzw. fehlender Vergleichskollektive PTHrP-negativer Tumore lässt in diesem Zusammenhang keine eindeutige Aussage zu. Die niedrige Rate an konkordanten positiven Ergebnissen im Tumorgewebe, Proben des Knochenmarks und peripheren Blutes unterstreicht die Heterogenität der Tumorzellen eines Primärtumors und insbesondere ihrer damit verbundenen Potenz in bestimmten Geweben zu arretieren und zu einer Metastase heranwachsen zu können. Dies legt die Vermutung nahe, dass dem Nachweis von PTHrP in Blut- und Knochenmarkproben eine höhere prognostische Wertigkeit zukommen müsste als dem Nachweis im Primärtumor. Es kommen verschiedene Überlegungen in Betracht, weshalb die vorliegende Studie diese These nicht eindeutig belegt. Der mediane Beobachtungszeitraum ist mit 20 Monaten verhältnismäßig kurz, so dass eine abschließende Aussage nicht zu treffen ist. Im Gegensatz zum peripheren Blutkreislauf, von dem man annimmt, dass Tumorzellen nur passager auftreten (DEARNALEY et al. 1991), kommt dem Knochenmark eher eine Filter- und Reservoirfunktion zu (PANTEL et al. 1993a, WOLLENBERG et al. 1994, JAUCH 1995). Weiterhin muss eine heterogene Verteilung der Tumorzellen im Knochenmark angenommen werden, was die niedrige Nachweisrate PTHrP-positiver Zellen in Knochenmarkproben aus nur einer

Punktionsstelle erklärt. Dies wird durch die Beobachtung verschiedener Autoren belegt, die eine höhere Detektionsrate von Tumorzellen im Knochenmark aus Aspiraten mehrerer verschiedener Punktionsstellen erzielten (DIEL et al. 1992, PANTEL et al. 1993a, HARBECK et al. 1994, FUNKE et al. 1996, VANNUCCHI et al. 1998). Da Tumorzellen über lange Zeit in verschiedenen Organsystemen in einem 'dormant state' verharren können und sich die Eigenschaften der Zelle in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrads und Aktivitätszustands verändern (FIEDLER et al. 1978, WEISS 1985), könnte auch der Nachweis von Transkripten des PTHrP-Gens in Knochenmark- und Blutproben hierdurch beeinflusst werden. EDWARDS et al. (1995) postulierten einen Zusammenhang zwischen der PTHrP-Sekretion von normalen und malignen Keratinozyten und ihrem Differenzierungsgrad, wobei eine erhöhte PTHrP-Produktion mit einer Induktion zur Differenzierung einhergeht.

4.4 Vergleich der Ergebnisse des immunzytologischen Nachweises für CK 18 und des molekularbiologischen Nachweises für PTHrP in Proben des Knochenmarks und peripheren Blutes

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Zellprodukte zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut untersucht. Beide Marker treten unabhängig voneinander auf und man muss davon ausgehen, dass ihr Auftreten mit dem Differenzierungsgrad und dem Funktionsstatus der Tumorzelle in Zusammenhang steht, was die überwiegende Diskordanz der positiven Ergebnisse begründet. Auffallend war eine relativ hohe Nachweisrate von mindestens einem der beiden Marker bei Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus sowie eine im Vergleich beider Methoden erhöhte Rate positiver Ergebnisse für PTHrP im KM und PB von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom und nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen. Die Bedeutung dieser Ergebnisse konnte aufgrund des verhältnismäßig kurzen Beobachtungszeitraumes nicht geklärt werden. Die prognostische Wertigkeit beider Zellcharakteristika stellte sich in dieser Arbeit ähnlich dar, wobei sich bei der Betrachtung der Ergebnisse eine erhöhte Rezidivrate im Zusammenhang mit einem PTHrP-Nachweis im peripheren Blut erkennen ließ. Insgesamt konnte keine Assoziation zwischen den etablierten Prognoseparametern der TNM-Klassifikation, dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, dem rezidivfreien und gesamten Überleben und einem Nachweis von PTHrP oder CK 18 im Knochenmark und peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen beschrieben werden. Auch bleibt die Bedeutung der positiven Ergebnisse für CK 18 bei fehlendem Nachweis für PTHrP in Proben von Patientinnen mit gutartigen Erkrankungen der Mamma zu klären. Diesbezüglich bleibt abzuwarten, ob diese unterschiedlichen Ergebnisse Ausdruck qualitativer Unterschiede der Nachweisverfahren oder der ausgewählten Marker sind.

Die Diskrepanz der positiven Ergebnisse findet auch in der unterschiedlichen Sensitivität der Methoden Erklärung. Der Vergleich der Sensitivitätsniveaus zeigt, dass die RT-PCR die

sensitivere Methode für den Nachweis disseminierter Tumorzellen darstellt. Die Sensitivität der in dieser Studie angewendeten RT-PCR und nested PCR zum Nachweis von Transkripten des PTHrP-Gens lag bei 1 Tumorzelle in 1×10^5 Zellen und konnte durch den Southern-Blot auf 1 Tumorzelle in 1×10^6 Zellen angehoben werden (WULF et al. 1997). Die Sensitivität des immunzytochemischen Nachweises von CK-18-exprimierenden Zelle wird in der zitierten Literatur mit 1 Zelle in 1×10^4 bis 1×10^6 Zellen angegeben. Die Sensitivität der in dieser Arbeit angewandten Methode wurde von BEIER 1995 in einem Verdünnungsexperiment mit 2 Tumorzellen in 1×10^5 Zellen ermittelt und lag in einem vergleichbaren Verdünnungsexperiment in dieser Arbeit bei ca. 10 Tumorzellen in 1×10^4 bzw. 1×10^5 Zellen.

Bezüglich der Spezifität gibt es in der zitierten Literatur Hinweise für falsch-positive Ergebnisse mit beiden Nachweisverfahren. In dieser Arbeit wurde die Spezifität der nested RT-PCR zum Nachweis von PTHrP durch die Markierung der Produkte durch genspezifische Sonden gewährleistet. Die verwendete Methode der APAAP mit einem CK-18-spezifischen Antikörper bietet neben der Qualität eines CK-18-Nachweises auch den zusätzlichen Aspekt der zytomorphologischen Beurteilbarkeit und die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung der Proben. Aus dem oben genannten wird deutlich, dass beide Marker innerhalb eines kurzen Beobachtungszeitraumes nur wenig prognostische Bedeutung besitzen und PTHrP den zuverlässigeren Marker für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen darzustellen scheint. Unter Berücksichtigung der Probenart stellte sich in dieser Arbeit ein Nachweis von Tumorzellen im peripheren Blut als aussagekräftiger dar. Um die Bedeutung von CK 18 und PTHrP zum Nachweis disseminierter Tumorzellen zu klären, bedarf es weiterer prospektiver Studien, die Beobachtungszeiträume von mindestens 5 Jahren vorsehen. Die weitere Standardisierung sowohl immunzytologischer als auch molekularbiologischer Nachweisverfahren ist notwendig, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Insbesondere im Hinblick auf die hohe Sensitivität der RT-PCR muss neben einem qualitativen auch ein quantitativer Nachweis etabliert und dessen prognostische Bedeutung evaluiert werden, um einen Nachweis disseminierter Tumorzellen in das Staging von Mammakarzinompatientinnen aufnehmen und eine bessere Zuordnung der Patientinnen zu Risikogruppen vornehmen zu können.

5. Zusammenfassung

Zur Einschätzung der Tumorzell dissemination bei soliden Tumoren wurden in den letzten Jahren sensitive Verfahren für eine Reihe von tumorassoziierten Zellbestandteilen untersucht, die eine Verbesserung der prognostischen Aussage ermöglichen sollen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis disseminierter Tumorzellen im peripheren Blut und Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen immunzytochemisch unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen Zytokeratin 18 sowie mittels einer nested RT-PCR zum Nachweis von PTHrP-Transkripten adressiert. Zunächst wurden als Kontrollgruppe im Knochenmark und peripheren Blut von 8 Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma in 2 von 8 KM-Proben und in keiner der PB-Proben CK-18-positive Zellen nachgewiesen. Die positiven KM-Proben stammten von Patientinnen mit einer fibrös-zystischen Mastopathie bzw. mit adenoiden oder papillomatösen Veränderungen der Brustdrüse. Für den Nachweis von PTHrP mittels der RT-PCR stellten sich 7 KM- und PB-Proben negativ dar. Innerhalb eines mittleren Beobachtungszeitraums von 30 Monaten ergab sich für diese Patientinnen kein Hinweis auf die Entwicklung eines epithelialen Tumors. Weiterhin wurden Proben von 46 Mammakarzinompatientinnen untersucht, von denen 41 ein primäres Mammakarzinom und 5 ein Rezidiv ihrer Erkrankung zum Zeitpunkt der Probenentnahme aufwiesen. Der mediane Beobachtungszeitraum nach Analyse betrug 20 Monate. Mit der APAAP-Färbung konnte ein positiver Nachweis von CK 18 in 9 von 37 KM und 4 von 37 PB in Zytozentrifugationspräparaten, bzw. in 5 von 14 KM und 5 von 13 PB in Sedimentationspräparaten geführt werden. In der nested RT-PCR wiesen 10 von 34 Patientinnen im KM, und 9 von 35 Patientinnen im PB ein positives Ergebnis auf. Alle 12 untersuchten Tumorgewebe exprimierten das PTHrP-Gen. Mit Hinblick auf die etablierten prognostischen Faktoren gelang ein Nachweis positiver Befunde mit allen drei Methoden vornehmlich bei Patientinnen mit niedrigeren Tumorstadien. Eine Assoziation mit den Stadien der TNM-Klassifikation sowie dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus ließ sich allerdings nicht ableiten. Die Ergebnisse des immunzytologischen Nachweises Zytokeratin-positiver Zellen und dem molekularbiologischen Nachweis PTHrP-positiver Zellen waren nur partiell konkordant. Innerhalb der für das Mammakarzinom kurzfristigen Nachbeobachtungszeit war für keine der untersuchten Methoden eine Assoziation mit einem verkürzten rezidivfreien Intervall oder einem verkürzten Überleben der Patientinnen festzustellen. Die Bedeutung der Nachweise CK-18-positiver Zellen in den Proben von Patientinnen mit einer benignen Erkrankung der Mamma bleibt abklärungsbedürftig. Der klinische Stellenwert der hier untersuchten Methoden, insbesondere die Bedeutung der relativ hohen Nachweisraten disseminierter Tumorzellen in dem nach den Kriterien der TNM-Klassifikation prognostisch günstigen Kollektiv der nodal negativen Mammakarzinompatientinnen mit kleinen Tumoren, muss Gegenstand weiterer

wissenschaftlicher Studien mit höheren Fallzahlen und längeren Nachbeobachtungszeiten bleiben.

6. Literaturverzeichnis

Beier U: Immunzytologischer Nachweis disseminierter Tumorzellen im peripheren Blut und Knochenmark von Patienten mit neu diagnostiziertem Bronchialkarzinom. Med. Diss. Göttingen 1995

Berger U, Bettelheim R, Mansi JL, Easton D, Coombes RC, Nevile M (1988): The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis. *Am J Clin Pathol* 90, 1-6

Bouizar Z, Spyrtos F, Deytieux S, de Vernejoul M-C, Julienne A (1993) : Polymerase chain reaction analysis of parathyroid hormone-related protein gene expression in breast cancer patients and occurrence of bone metastases. *Cancer Res* 53, 5076-5078

Boyum A (1964): Separation of white blood cells. *Nature* 204, 793-794

Brockmann B, Reitzig P (1994): „Prognosefaktoren“ des Mammakarzinoms – Teil 1. *Z Ärztl Fortbild* 88 (2), 111-114

Brockmann B, Reitzig P, Dietzmann A, Cyganiak P (1994): „Prognosefaktoren“ des metastasierten Mammakarzinoms – Teil 2; *Z Ärztl Fortbild* 88 (4), 305-309

Bross IDJ und Blumenson LE: Metastatic sites that produce generalized cancer: identification and kinetics of generalizing sites; in: *Fundamental aspects of metastasis*, hrsg. v. Weiss L, Amsterdam-Oxford, North Holland 1976, 359-375

Bundred NJ, Ratcliffe WA, Walker RA, Coley S, Morrison JM, Ratcliffe JG (1991): Parathyroid hormone-related protein and hypercalcemia in breast cancer. *Br Med J* 303, 1506-1509

Bundred NJ, Walker RA, Ratcliffe WA, Warwick J, Morrison JM, Ratcliffe JG (1992): Parathyroid hormone-related protein and skeletal morbidity in breast cancer. *Eur J Cancer* 28, 690-692

Burtis J (1992): Parathyroid hormone-related protein: Structure, function, and measurement. *Clin Chem* 38 (11), 2171-2183

Burtis WJ, Wu J, Bunch CM, Wysolmerski JJ, Insogna KI, Weir EC, Broadus AE, Steward AF (1987): Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumour associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem* 262, 7151-7156

Carr I (1983): Lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 22, 307

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159

Coleman RE, Rubens RD (1987): The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer* 55, 61-66

Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY (1984): Immunoenzymatic labeling of antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32, 219-229

Cote RJ, Rosen PP, Hakes TB, Sedira M, Bazinet M, Kinne DW, Old LJ, Osborne MP (1988): Monoclonal antibodies detect occult breast carcinoma metastases in the bone marrow of patients with early stage disease. *Am J Surg Pathol* 12 (5), 333-340

Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne P (1991): Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow metastases. *J Clin Oncol* 9, 1749-1756

Couch FJ, Farid LM, DeShano ML, Tavgigian SV, Calzone K, Campeau L, Peng Y, Bogden B, Chen Q, Neuhausen S, Shattuk-Eidens D, Godwin AK, Daly M, Radford DM, Sedlacek S, Rommens J, Simard J, Garber J, Merajver S, Weber BL (1996): BRCA2 germline mutations in male breast cancer families. *Nat Genet* 13 (1), 123-125

Cutler S (1974): Classification of extent of disease in breast cancer. *Sem Oncol* 4, 91-96

Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS (1994): Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 12, 475-482

De Vernejoul MC, Bouizar Z, Lasmoles F, Tubiana-Hulin M, Spyratos F, Gueris J, Jullienne A (1991): Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and breast cancer. *Nouv Rev Fr Hematol* 33, 484-487

Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG, Steele K, Coombes RC, Clink HMCD, Powles TJ, Ford HAT, Gazet JP, Neville AM (1981): Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 44, 85-90

Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Lumley H, Imrie S, Jones M, Coombes RC, Neville AM (1983): Detection of isolated mammary carcinoma cells in marrow of patients with primary breast cancer. *J R Soc Med* 76, 359-364

Dearnaley DP, Ormerod MG und Sloane JP (1991): Micrometastases in breast cancer: Long-term follow-up of the first patient cohort. *Eur J Cancer* 27 (3), 236-239

Deguchi T, Yang M, Ehara H, Ito S, Nishino Y, Ito Y, Shimokawa K, Tanaka T, Imaeda T, Doi T, Kawada Y (1997): Detection of micrometastatic prostate cancer cells in the bone marrow of patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 75, 634-638

Demicheli R, Terenziani M, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Bonadonna G (1994): Local recurrences following mastectomy: support for the concept of tumor dormancy. *J Natl Cancer Inst* 86 (1), 45-48

Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Kaul S, Krempien B, Goerner R, Bastert G (1990): Prognostische Bedeutung des Tumorzellnachweises im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 50, 923-928

Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G (1992): Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J Clin Oncol* 10, 1534-1539

Dunbar ME, Wysolmerski JJ, Broadus AE (1996): Parathyroid hormone-related protein: from hypercalcemia of malignancy to developmental regulatory molecule. *Am J Med Sci* 312 (6), 287-294

Dunbar ME, Young P, Zhang JP, MC Caughern-Carucci J, Lanske B, Orloff JJ, Karapalis A, Cunha G, Wysolmerski JJ (1998): Stromal cells are a critical targets in the regulation of mammary ductal morphogenesis by parathyroid hormone-related protein. *Dev Biol* 203 (1), 75-89

Edwards RC, Ratcliffe WA, Walls J, Morrison JM, Ratcliffe JG, Holder R, Bundred NJ (1995): Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in breast cancer and benign breast tissue. *Eur J Cancer* 31A (3), 334-339

Escher GC und Kaufmann RJ (1963): Advanced breast carcinoma-factors influencing survival. *Acta Unio Int Contra Canc* 19, 1039-1043

Ewing J: Neoplastic diseases. 3. Auflage, Saunders WB, Philadelphia 1928

Falini B, Martelli MF, Tarallo F, Moir DJ, Cordell JL, Gatter KC, Loreti G, Stein H, Mason DY (1984): Immunohistological analysis of human bone marrow trephine biopsies using monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 56 (3), 365-386

Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG Jr, Mitchelhill K, Moseley JM, Martin TJ, Nicholson GC (1991): A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP (107-111). *Endocrinology* 129 (6), 3424-3426

Fidler IJ (1978): Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 38, 2651-2660

Fidler IJ (1990): Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eights GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50, 6130

Fidler IJ (1995): Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis (editorial). *J Natl Cancer Inst* 84, 1588

Fidler IJ: Molecular biology of cancer: invasion and metastasis; in: *Cancer: Principles and practice of oncology*, hrsg. v. DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997, 135-152

Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR (1978): The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res* 28, 149

Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau WL, Perkins JB, Janssen WE, Moscinski LC (1996): Clinical significance of bone marrow metastases as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 14, 1868-1876

Fisher B, Fisher ER (1966): The interrelationship of hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination. *Surg Gynecol Obstet* 122, 791

Franzén B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Uruy K, Hirano T, Okuzawa K, Auer G (1996): Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down-regulation of cytokeratins. *Br J Cancer* 74 (10), 1632-1638

Frost P, Levin B (1992): Clinical implications of metastatic process. *Lancet* 339, 1458-1461

Frykberg ER und Bland K (1994): Overview of the biology and management of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 74 (1), 350-361

Funke I, Fries S, Rolle M, Heiss MM, Untch M, Bohmert H, Schildberg FW, Jauch KW (1996): Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer. *Int J Cancer* 65, 755-761

Funke I, Classen S, Eiermann W, Harbeck N, Konecny G, Lebeau A, Permanetter W, Untch M: Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom, in: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Mammakarzinome, hrsg. v. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität 1997, 31-35

Gaich G, Orloff JJ, Atilasoy EJ, Burtis WJ, Ganz MB, Steward AF (1993): Amino-terminal parathyroid hormone-related protein: specific binding and cytosolic calcium responses in rat insulinoma cells. *Endocrinology* 132 (3), 1402-1409

Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M (1994): Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 12, 725-729

Ghossein RA, Rosai J (1996): Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer* 78, 10-16

Glaves D (1983): Correlation between circulating cancer cells and incidence of metastases. *Br J Cancer* 48, 665-673

Gribben JG und Nadler LM: Detection of minimal residual disease in patients with lymphomas using the polymerase chain reaction; in: *Important advances in oncology 1994*, hrsg. Von De Vita VT, Hellman S und Rosenberg SA, JB Lippincott Company, Philadelphia 1994, 117-127

Grill V, Ho P, Body JJ, Johanson N, Lee SC, Kukreja SC, Moseley JM, Martin TJ (1991): Parathyroid hormone-related protein: elevated levels in both humoral hypercalcemia of malignancy and hypercalcemia complicating metastatic breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 6, 1309-1315

Harbeck N, Untch M, Pache L, Eiermann W (1994): Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* 69, 566-571

Harris JR, Morrow M, Bonadonna G: Cancer of the breast; in: *Cancer: Principles and practice of oncology*, hrsg. v. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, 4. Auflage, JB Lippincott Company, Philadelphia 1993, 1264-1332

Harris JR, Morrow M, Norton L: Malignant tumors of the breast; in: *Cancer: Principles and practice of oncology*, hrsg. DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, 5. Auflage, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997, 1557-1616

Harris M, Howell A, Chrissohou M, Swindell RI, Hudson M, Sellwood RA (1984): A comparison of the metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma and infiltrating duct carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 50 (1), 23-30

Hart IR, Goode NT, Wilson RE (1989): Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim Biophys Acta* 989, 65

Hay R, Caputo J, Chen TR, Macy M, McClintock P, Reid Y: *American type culture collection (ATCC); Catalogue of cell lines and hybridomas*, 7. Auflage, Rockville, Maryland 1992

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J (1995): Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1 (2), 149-153

- Iguchi H, Tanaka S, Ozawa Y, Kashiwakuma T, Kimura T, Hiraga T, Ozawa H, Kono A (1996): An experimental model of bone metastasis by human lung cancer cells: the role of parathyroid hormone-related protein in bone metastasis. *Cancer Res* 56, 4040-4043
- Ikeda K, Lu C, Weir EC, Mangin M, Broadus AE (1990): Regulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by cyclohexamide. *J Biol Chem* 265 (10), 5398-5402
- Järvinen M, Andersson LC und Virtanen I (1990): K562 erythroleukemia cells express cytokeratins 8, 18, and 19 and epithelial membrane antigen that disappear after induced differentiation. *J Cell Physiol* 143, 310-320
- Jauch KW, Friess S, Grützner U, Heiss MM, Funke I (1995): Prognostic significance of 'micrometastases'. *Onkologie* 18, 525-532
- Jauch KW, Friess S, Grützner U, Heiss MM, Funke I (1996): Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 14, 1810-1817
- Jürgens B: Nachweis disseminierter Tumorzellen im peripheren Blut und Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom: Vergleich der immunzytologischen Färbung gegen Zytokeratin 18 und des Transkriptionsnachweises von PTHrP mittels RT/PCR. Med. Diss. Göttingen 1998
- Kemp BE, Moseley JM, Rodda CP, Ebeling PR, Wettenhall RE, Stapleton D, Diefenbach-Jagger H, Ure F, Michelangeli VP, Simmons HA, et al. (1987): Parathyroid hormone-related protein of malignancy: active synthetic fragments. *Science* 238 (4833), 1568-1570
- Khazaie K, Prifti S, Beckhove P, Griesbach A, Russell S, Collins M, Schirrmacher V (1994): Persistence of dormant tumor cells in the bone marrow of tumor cell-vaccinated mice correlates with long-term immunological protection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (16), 7430-7434
- Klebe S: Nachweis von Transkripten für Parathormon related Protein (PTHrP) in peripheren Blutstammzellpräparaten von Patientinnen mit Hochrisiko-Mammakarzinom. Med. Diss. Göttingen 1999
- Krisman M, Todt B, Schröder J, Gareis D, Müller KM, Seeber S, Schütte J (1995): Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol* 13, 2769-2775

Krüger W, Krizizanowski C, Holweg M, Stockscläder M, Kröger N, Jung R, Mross K, Jonat W, Zander AR (1996): Reverse transcriptase/polymerase chain reaction detection of cytokeratin-19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 122, 679-686

Liang P, Pardee AB (1992): Differential display of eukariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971

Liapis H, Crouch EC, Grosso LE, Kitazawa S, Wick MR (1993): Expression of parathyroidlike Protein in normal, proliferative and neoplastic human breast tissues. *Am J Pathol* 143, 1169-1178

Lichtner RB, Julian JA, North SM, Glasser SR, Nicolson GL (1991): Coexpression of cytoceratin characteristic for myoepithelial and luminal cell lineages in rat 13762NF mammary adenocarcinoma tumors and their spontaneous metastases. *Cancer Res* 51, 5943-5950

Liotta LA, Kleinermann J und Saidel GM (1974): Quantitativ relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 34, 997-1004

Lopez-Guerrero JA, Bolufer-Gilabert P, Sanz-Alonso M, Barragan-Gonzalez E, Palau-Perez J, De la Rubia-Cosmos J, Sempere-Talens A, Bonand-Boix S (1997): Minimal illegitimate levels of cytokeratin K19 expression in mononucleated blood cells detected by a reverse transcription PCR method (RT-PCR). *Clin Chim Acta* 263, 105-116

Lovelock JE, Bishop MWH (1959): Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183, 1394-1396

Maas R: Tumoren und tumorähnliche Veränderungen; in: Einführung in die radiologische Diagnostik, hrsg. v. Thurn P, Bücheler E, Lackner K-J, Thelen M, 10. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 1998, 189-213

Malaise EP, Chavandra N, Charbit A, Tubiana M (1974): Relationship between the growth rate of human metastases, survival and pathological type. *Eur J Cancer* 10, 451-459

Mangin M, Webb AC, Dreyer BE, Posillico JT, Ikeda K, Weir EC, Steward AF, Bander NH, Milstone L, Barton DE, et al. (1988): Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (2), 597-601

Mangin M, Ikeda K, Dreyer BE, Broadus AE (1989): Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (7), 2408-2412

Mangin M, Ikeda K, Dreyer BE, Broadus AE (1990): Identification of an up-stream promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene. *Mol Endocrinol* 4 (6), 851-858

Mansi JL, Berger U, Easton D, McDonnell T, Redding WH, Gazet J-C, McKinna A, Powles TJ, Coombes RC (1987): Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases. *BMJ* 295, 1093-1096

Martin TJ, Allan EH, Caple IW, Care AD, Danks JA, Diefenbach-Jagger H, Ebeling PR, Gillesby MT, Hammonds G, Heath JA et al. (1989): Parathyroid hormone-like protein: Isolation, molecular cloning and mechanisms of action. *Recent Prog Horm Res* 45, 467-502

Mc Millan TJ (1989): The biology of metastases. *Top Oncol* 243, 75-76

Meltzer A (1990): Dormancy and breast cancer. *J Surg Oncol* 43 (3), 181-188

Moll R, Franke WW, Schiller DL (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24

Moll R, Krepler R, Franke WW (1983): Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation* 23 (3), 256-269

Moll R, Zimbelmann R, Goldtschmidt MD, Keith M, Laufer J, Kasper M, Koch PJ, Franke WW (1993): The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* 53 (2), 75-93

Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H, Wettenhall REH, Kemp BE, Suva LJ, Rodda CP, Ebeling PR, Hudson PJ, Zajac JD, Martin TJ (1987): Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 5048-5052

Naito H, Kuzumaki N, Uchino J, Kobayashi R, Shikano T, Ishikawa Y, Matsumoto S (1991): Detection of tyrosine hydroxylase mRNA and minimal neuroblastoma cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 27, 762-765

O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J (1996): Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 2 (6), 689-692

Orloff JJ, Ganz MB, Ribaud AE, Burtis WJ, Reiss M, Milstone LM, Steward AF (1992): Analysis of PTHrP binding and signal transduction mechanisms in benign and malignant squamous cells. *Am J Physiol* 262, 599-607

Orloff JJ, Reddy D, De Papp AE, Yang KH, Soifer NE, Steward AF (1994): Parathyroid-hormone-related protein as a prohormone: posttranslational processing and reception interactions. *Endocr Rev* 15 (1), 40-60

Orloff JJ, Ganz MB, Nathanson MH, Moyer MS, Kats Y, Mitnick M, Behal A, Gasalla-Herraiz J, Isales CM (1996): A midregion parathyroid hormone-related peptide mobilizes cytosolic calcium and stimulates formation of inositol triphosphate in a squamous carcinoma cell line. *Endocrinology* 137 (12), 5376-5385

Osborne MP, Wong GY, Asina S, Old LJ, Cote RJ, Rosen PP (1991): Sensitivity of immunocytochemical detection of breast cancer cells in human bone marrow. *Cancer Res* 51, 2706-2709

Paget S (1889): The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, 571-573

Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmüller G (1993a): Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85 (17), 1479-1424

Pantel K, Izbicki M, Braun S, Passlick B, Karg O, Thetter O, Riethmüller G (1993b): Immunological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 53, 1027-1031

Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmüller G (1994): Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 3, 165-173

Pantel K, Aignherr J, Köllermann J, Caprano J, Riethmüller G, Köllermann MW (1995): Immunocytochemical detection of isolated tumour cells in bone marrow of patients with untreated stage C prostatic cancer. *Eur J Cancer* 31A (10), 1627-1632

Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, Steward AF (1996): Defining the roles of Parathyroid-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 76, 127-173

Porro G, Ménard S, Tagliabue E, Orefice S, Salvatori B, Squicciarni P, Andreola S, Rilke F, Colnaghi MI (1988): Monoclonal antibody detection of carcinoma cells in bone marrow biopsy specimens from breast cancer patients. *Cancer* 61, 2407-2411

Possinger H-J, Schmoll K, Höffken H, Große Y: Mammakarzinom der Frau; in: Kompendium der internistischen Onkologie - Band 2, hrsg. v. Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K, 3. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1999, 1253-1342

Poste G, Fidler IJ (1980): The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283, 139-146

Powell GJ, Southby J, Danks JA, Stillwell RG, Hayman JA, Henderson MA, Bennett RC, Martin TJ (1991): Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites. *Cancer Res* 51, 3059-3061

Price JE (1990): The biology of cancer metastasis. *Prog Clin Biol Res* 354A, 237-255

Reich A (1935): Tumorzellen im Sternalpunktat. *Dtsch Arch Klin Med* 179, 61-79

Rosen P, Oberman HA: Tumors of the mammary gland. Atlas of tumor pathology, 3rd ser., Fasc.7. AFIP, Washington D.C. 1993

Ruud P, Fodstad O, Hovig E (1999): 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* 80, 119-125

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* 239, 487-491

Salvadori B, Squicciarini P, Rovini D, Orefice S, Andreola S, Rilke F, Barletta L, Menard S, Colnaghi MI (1990): Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 26 (8), 865-867

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning – a laboratory manual*. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989

Savtchenko ES, Schiff TA, Jiang CK, Freedberg IM, Blumenberg M (1988): Embryonic expression of the human 40-kD keratin: evidence from a processed pseudogene sequence. *Am J Hum Genet* 43 (5), 630-637

Schirmacher V (1985): Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies. *Adv Cancer Res* 43, 1-73

Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Göttlinger G, Schmidt G, Häuser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, Riethmüller G (1987): Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 8672-8676

Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J, Riethmüller G (1991): Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: Methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer* 27, 1461-1465

Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnott HD, Gazet JC, Sacks N, Bender HG, Luqmani Y, Coombes RC (1997): The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer* 33, 854-861

Schweiger C: *Molekularbiologischer Nachweis der Transkripte von Parathyreoid Hormon-related Protein, Zytokeratin 8 und 19 bei Patienten mit Bronchialkarzinom*. Med. Diss. Göttingen 1995

Sobin LH und Fleming ID (1997): *TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition* (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*, 80 (9), 1803-1804

Southby J, Kissin MW, Danks JA, Hayman JA, Moseley JM, Henderson MA, Bennett RC, Martin TJ (1990): Immunohistochemical localization of Parathyroid Hormone-related Protein in human breast cancer. *Cancer Res* 50, 7710-7716

Southby J, O'Keeffe LM, Martin TJ, Gillespie MT (1995): Alternative promoter usage and mRNA splicing pathways for parathyroid hormone-related protein in normal tissues and tumours. *Br J Cancer* 72, 702-707

Southern EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoreses. *J Mol Biol* 95, 503-517

Stewart AF, Broadus AE (1990): Clinical review 16: Parathyroid hormone-related proteins: coming of age in the 1990s. *J Clin Endocrinol Metab* 71, 1410-1414

Strewler GJ, Williams RD, Nissenson RA (1983): Human renal cells produce hypercalcemia in the nude mouse and a novel protein recognized by parathyroid hormone receptors. *J Clin Invest* 71, 769 -774

Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M, Nissenson RA (1987): Parathyroid hormone-like protein from human renal carcinoma cells: structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 80, 1803-1807

Sugarbaker EV (1979): Cancer metastasis: a product of tumor-host interactions. *Curr Probl Cancer* 3, 1

Sugarbaker EV: Patterns of metastasis in human malignancies; in : *Cancer biology review* Vol. 2; hrsg. v. Marchalonis JJ, Hanna MG, Fidler IJ, Dekker New York 1981, 235-278

Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, Rodda CP, Kemp BE, Rodriguez H, Chen EY, et al. (1987): A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 237 (4817), 893-896

Suva LJ, Mather KA, Gillespie MT, Webb GC, Ng KW, Winslow GA, Wood WI, Martin TJ, Hudson PJ (1989): Structure of the 5' flanking region of the gene encoding human parathyroid-hormone-related protein (PTHrP). *Gene* 77 (1), 95-105

- Taha M, Ordoñez NG, Kulkarni S, Owen M, Ro JS, Hortobagyi G, Reading CL, Dicke KA, Spitzer G (1989): A monoclonal antibody cocktail for detection of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 4, 297-303
- Tarin D (1986): Biological and clinical studies relevant to metastasis of breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 5, 95-108
- Tarin D, Price JE, Kettlewell MGW, Souter RG, Vass ACR, Crossley B (1984): Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res* 44, 3584-3592
- Thiede MA (1994): Parathyroid hormone-related protein: a regulated calcium-mobilizing product of the mammary gland. *J Dairy Sci* 77 (7), 1952-1963
- Thiede MA, Rodan GA (1988): Expression of a calcium-mobilizing parathyroid hormone-like peptide in lactating mammary tissue. *Science* 242 (4876), 278-280
- Thiede MA, Strewler GJ, Nissenson RA, Rosenblatt M, Rodan GA (1988): Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (13), 4605-4609
- Thorlacius S, Tryggvadottir L, Olafsdottir GH, Jonasson JG, Ogmundsdottir HM, Tulinius H, Eyfjord JE (1995): Linkage to BRCA2 region in hereditary male breast cancer. *Lancet* 346 (8974), 544-555
- To A, Coleman DV, Dearnaley DP, Ormerod MG, Steele K, Neville AM (1981): Use of antisera to epithelial membrane antigen for the cytodagnosis of malignancy in serous effusions. *J Clin Pathol* 34(12), 1326-1332
- UICC 1997: TNM-Klassifikation maligner Tumoren, hrsg. v. Wittekind C und Wagner G, 5. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1997
- Vannucchi AM, Bosi A, Glinz S, Pacini P, Linari S, Saccardi R, Alterini R, Rigacci L, Guidi S, Lombardini L, Longo G, Mariani MP, Rossi-Ferrini P (1998) : Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by RT-PCR for cytokeratin-19 mRNA. *Br J Haematol* 103, 610-617

Weiss L (1980): Cancer cell traffic from the lungs to the liver: an example of metastatic inefficiency. *Int J Cancer* 25 (3), 385-392

Weiss L: Principles of metastasis. Academic Press, Orlando 1985

Weiss L (1990): Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* 54, 159-211

Wheelock EF, Weinhold KJ, Levich J (1981): The tumor dormant state. *Adv Cancer Res* 34, 107-140

Wheelock EF, Robinson MK, Truitt GA (1982): Establishment and control of the vL5178Y-cell tumor dormant state in DBA/2 mice. *Cancer Metastasis Rev* 1 (1), 29-44

Williams RD, Elliott AY, Stein N, Fraley EE (1978): In vitro cultivation of human renal cell cancer II. characterization of cell lines. *In Vitro* 14 (9), 779 -786

Wittekind C und Riede UN: Brustdrüse; in: Allgemeine und spezielle Pathologie; hrsg. v. Riede UN, Schaefer HE, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 1993, 950-961

Wollenberg B, Ollesch A, Maag K, Funke I, Wilmes E (1994): Mikrometastasen im Knochenmark von Patienten mit Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich. *Laryngo-Rhino-Otologie* 73, 88-92

Wood DP, Banks ER, Humphreys S, McRoberts JW, Rangnekar VM (1994): Identification of bone marrow micrometastases in patients with prostate cancer. *Cancer* 74, 2533-2540.

Wulf GG, Schweiger C, Hannemann P, Beier U, Hüttemann U, Hiddemann W, Wörmann B (1994): RT/PCR of parathormon related protein (PTHrP) and Cytokeratins 8, 18, 19 for the detection of micrometastases in patients with lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 13, 341

Wulf GG, Jürgens B, Liersch T, Gatzemeier W, Rauschecker H, Buske C, Hüfner M, Hiddemann W, Wörmann B (1997): Reverse transcriptase/polymerase chain reaction analysis of parathyroid hormone-related protein for the detection of tumor cell dissemination in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 123, 514-521

Zeidman I (1961): The fate of circulating tumor cell. I. Passage of cells through capillaries. *Cancer Res* 21, 38

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Hämatologie und Onkologie des Zentrums Innere Medizin der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. med. Wörmann möchte ich für die Vermittlung der Arbeit danken, für sein Interesse und seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. Hiddemann danke ich dafür, dass die Experimente dieser Arbeit in seinen Laboratorien durchgeführt werden durften.

Bei Herrn Dr. med. T. Liersch möchte ich mich für das Interesse an dieser Arbeit und die damit verbundene Bereitstellung der Blut- und Knochenmarkproben bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Hufner danke ich für die freundliche Überlassung der Tumorgewebebeurteilungen.

Stellvertretend für alle medizinisch-technischen Assistentinnen möchte ich mich herzlich bei Frau C. Troff, Frau D. Grove, Frau A. Renziehausen, Frau K. Schreiber und Frau U. Schmidt-Martens bedanken, die mich in der Erlernung der notwendigen Techniken und Durchführung der Experimente unterstützt haben.

Bei Herrn Dr. med. S. Klebe bedanke ich mich herzlichst für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. G.G. Wulf, der mir das Thema dieser Arbeit freundlicherweise überließ, mir mit seiner Diskussionsbereitschaft, seinen Anregungen und Lösungsvorschlägen bei aufgetretenen Problemen bei der Erstellung dieser Arbeit immer hilfreich und unterstützend zur Seite stand. Nicht zuletzt danke ich ihm für seine freundschaftliche Art und endlose Geduld.

Lebenslauf

Am 20.11.1971 wurde ich, Peer Scharnberg, als erstes Kind der Eheleute Gisela Scharnberg, geborene Euteneuer, und Bernd Scharnberg in Essen geboren. Ich habe eine jüngere Schwester. Ich bin ledig, lebe in einer eheähnlichen Gemeinschaft und bin seit dem 07.01.2007 Vater eines Sohnes.

Am 01.08.1978 wurde ich in die Grundschule am Schmachtenberg in Essen-Kettwig eingeschult. Ab 1982 besuchte ich bis zum Abschluss der 10. Klasse 1988 das Theodor-Heuss-Gymnasium in Essen-Kettwig. Von 1988 bis 1989 verbrachte ich einen einjährigen Schüleraustausch in Forest City, Iowa und erlangte dort den High School Abschluss. Nach meiner Rückkehr wechselte ich auf das Gymnasium Grashofstraße in Essen-Bredeney, an dem ich am 11. Juni 1991 das Abitur ablegte.

Den Zivildienst leistete ich von September 1991 bis November 1992 im Pflegedienst auf einer Station der Medizinischen Klinik II / Nephrologie des Alfred Krupp Krankenhauses in Essen-Rüttenscheid ab.

Im Wintersemester 1992 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Im Rahmen des Studiums legte ich die ärztliche Vorprüfung am 26.09.1994 ab, das erste Staatsexamen folgte am 29.08.1995 und das zweite Staatsexamen am 20.03.1998. Das Praktische Jahr absolvierte ich in der Zeit von April 1998 bis April 1999 am Städtischen Krankenhaus in Lüneburg und in der Schweiz am Inselspital in Bern. Mit dem dritten Staatsexamen schloss ich das Studium der Humanmedizin erfolgreich am 27.04.1999 ab.

Im August 1999 nahm ich die Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin am Evangelischen Krankenhaus Holzminden auf, wo ich im Januar 2000 die Approbation erlangte und bis Ende August 2006 als Assistenzarzt arbeitete. Während dieser Zeit war ich seit September 2001 als Notarzt für den Landkreis Holzminden tätig, erlangte am 21.01.2002 die Fachkunde Rettungsmedizin und legte am 20.06.2006 erfolgreich die Prüfung zum Facharzt für Innere Medizin ab. Seit September 2006 bin ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Zentrums Innere Medizin an der Georg-August-Universität in Göttingen tätig.

Im April 1995 begann ich in der Abteilung Hämatologie und Onkologie des Zentrums Innere Medizin der Georg-August-Universität in Göttingen mit dem experimentellen Teil der vorliegenden Dissertation, den ich Ende 1997 abschloss. Bis April 1998 erfolgte die Recherche bezüglich der Krankheitsverläufe der untersuchten Patientinnen. Teile der Dissertation wurden 1997 unter dem Titel „P.Scharnberg, B.Jürgens, T.Liersch, W.Hiddemann, B.Wörmann, G.G.Wulf (1997): Detection of tumor cell dissemination in patients with breast cancer by RT/PCR of PTHrP“, Onkologie Suppl. 20, S.180 veröffentlicht.