

**Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität Tübingen  
Abteilung Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie  
Abteilungsleiter: Professor Dr. B. Bültmann**

**Evaluation von Markergenen zum Nachweis von  
disseminierten Tumorzellen im Knochenmarksaspirat  
von Mammakarzinom- Patientinnen mittels  
nested- RT- PCR**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Elena Sandra Hartmann  
aus Villingen-Schwenningen**

**2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Bültmann

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Meyer-Wittkopf

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Risikofaktoren und Prävention</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Richtlinien zur Früherkennung des Mammakarzinoms</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Diagnostik des Mammakarzinoms</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Histologie</b>	<b>11</b>
<b>1.6 Therapie des Mammakarzinoms</b>	<b>12</b>
<b>1.7 Diagnose und Prognose</b>	<b>13</b>
<b>1.8 Zielsetzung</b>	<b>15</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>18</b>
2.1.1 Knochenmarksaspirate	18
2.1.2 Positivkontrollen	18
2.1.3 Negativkontrollen	19
<b>2.2 Methoden</b>	<b>20</b>
2.2.1 Extraktion von RNA	20
2.2.2 Auswahl der PCR- Primer	21
2.2.3 cDNA- Synthese	24
2.2.4 RT- PCR	25
2.2.5 Nested- RT- PCR	26
2.2.6 Gelelektrophorese	26
2.2.7 Fotografieren der Gele	27
2.2.8 Aufreinigung	27
2.2.9 Sequenzierung	29
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Housekeeping-Gen- Primer</b>	<b>30</b>
3.1.1 beta- 2- Mikroglobulin	30
3.1.2. Porphobilinogen- Deaminase	33
<b>3.2 Maspin</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Humanes Mammaglobin</b>	<b>42</b>
<b>3.4 Zytokeratin 20</b>	<b>49</b>
<b>3.6 Carcinoembryonales Antigen</b>	<b>54</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>60</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>AMV</b>	Affen- Myeloblasten- Virus
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>cDNA</b>	copy- DNA
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser
<b>dNTP</b>	Desoxy- Nukleotidtriphosphat
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>g</b>	Gramm
<b>KUM</b>	klinische Untersuchung der Mammae
<b>l</b>	Liter
<b>M</b>	Mol
<b>mM</b>	Millimol
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NH<sub>2</sub></b>	Stickstoff
<b>PCI</b>	Phenol- Chloroform- Isoamylalkohol
<b>PCR</b>	Polymerase- Ketten- Reaktion
<b>pg</b>	Picogramm
<b>pM</b>	Picomol
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	rotations per minute
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>RT- Reaktion</b>	Reverse- Transkriptase- Reaktion
<b>SUM</b>	Selbstuntersuchung der Mammae
<b>TM</b>	Thermodynamischer Schmelzpunkt
<b>U</b>	Unit
<b>UV- Licht</b>	ultraviolettes Licht
<b>vs</b>	versus

# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom zählt in den westlichen Ländern mit einer Inzidenz von circa 43000 Frauen allein in Deutschland zu den häufigsten bösartigen Neubildungen der Frau [71].

Das Risiko an diesem Tumor zu erkranken ist sehr hoch. Ungefähr jede zehnte Frau muss heute damit rechnen, im Laufe ihres Lebens einen Brustkrebs zu entwickeln. In den letzten fünf Jahren zeigte die Brustkrebserkrankung in allen westlichen Ländern eine Zunahme der Inzidenz [3]. Die zunehmende Detektionsrate ist vermutlich in großem Maße auf die intensivierten Screeningprogramme der meisten westlichen Länder zurückzuführen. Die absolute Mortalität der Patientinnen mit Mammakarzinom zeigte jedoch in den letzten Jahren eine fallende Tendenz um 20 bis 30% [3]. Dies könnte wiederum mit der Durchführung von Früherkennungsmaßnahmen, wie zum Beispiel der Krebsvorsorgeuntersuchung im Rahmen einer Mammographie, aber auch mit verbesserten adjuvanten Therapien des Mammakarzinoms begründet werden.

Die genauen Ursachen für die Entstehung eines Mammakarzinoms sind nicht bekannt. Es muss davon ausgegangen werden, dass nicht eine Ursache allein, als vielmehr ein Zusammentreffen mehrerer Faktoren dafür verantwortlich ist. Auch viele junge Frauen sind von diesem Tumor betroffen. Der Erkrankungsgipfel liegt aber nach wie vor zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Bei zunehmendem Alter der weiblichen Bevölkerung kann eine Ursache der steigenden Erkrankungszahlen in dieser Tatsache begründet liegen. Abgesehen von den in höherem Alter auftretenden Tumoren, sind die genauen Ursachen bei den Patientinnen, bei denen schon vor der Menopause ein Mammakarzinom diagnostiziert wird, nicht genau bekannt.

In der Literatur wird auf eine Reihe von Risikofaktoren eingegangen. Für sich alleine gesehen erhöhen diese Risikofaktoren das Erkrankungsrisiko wahrscheinlich nur wenig. Die Summation dieser Faktoren gibt aber

möglicherweise schließlich den Ausschlag für die Manifestation dieser bösartigen Erkrankung.

In der Literatur werden fünf Hauptfaktoren genannt, die da wären: das Alter, die Familienanamnese, reproduktive/hormonelle Faktoren, benigne Mammopathologie und die mammographische Dichte [9].

Auf diese sowie auf andere Risikofaktoren soll im Folgenden eingegangen werden.

## **1.2 Risikofaktoren und Prävention**

Als Hauptrisikofaktor ist weiterhin das zunehmende Alter der Patientinnen über 60 Jahre anzusehen [71]. Mit steigendem Alter wächst die Wahrscheinlichkeit an einem Mammakarzinom zu erkranken. Eine nicht beeinflussbare Ursache ist auch die familiäre Disposition bei Erkrankung von Mutter und/ oder Schwester einer Patientin. Epidemiologische Studien belegen, dass Frauen mit an Mammakarzinom erkrankten Verwandten ersten oder zweiten Grades ein erhöhtes Risiko haben selbst an Brustkrebs zu erkranken [15, 64]. Eine eventuell vorliegende familiäre Vorbelastung ergibt sich in solchen Fällen also direkt aus der Anamnese.

In diesem Zusammenhang liegen gesicherte Daten nur in Bezug auf die beiden Brustkrebsgene BRCA 1 und BRCA 2 vor [72]. Diese Gene wurden in den Jahren 1994 und 1995 entdeckt [48, 90].

Nur rund fünf Prozent der Mammakarzinome liegt eine Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA 1 und BRCA 2 zugrunde. Diese folgen einem autosomal- dominanten Erbgang. Dies bedeutet, dass die Erkrankung mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% an die Nachkommen weitergegeben wird. Das lebenslange Risiko einer Mutationsträgerin beträgt 80 bis 90% [72].

Andere wichtige Risikofaktoren stehen im Zusammenhang mit reproduktiven und hormonellen Faktoren. Dies sind zum Beispiel das Alter der Frau bei der ersten Geburt, die Anzahl der Geburten sowie das Stillen.

Man weiß heute, dass eine junge Erstgebärende mit vielen nachfolgenden Geburten, die gestillt hat, ein deutlich niedrigeres Erkrankungsrisiko aufweist. Auch zivilisatorische Faktoren scheinen eine große Rolle zu spielen. Eine starke Gewichtszunahme nach der Jugend kann das Brustkrebsrisiko deutlich erhöhen. Man vermutet einen Zusammenhang mit positiven Veränderungen im Östrogenmetabolismus. Ein Diabetes sowie eine fett- und fleischreiche aber ballaststoffarme Ernährung gelten als weitere Risikofaktoren. Nicht vergessen werden sollen das Rauchen und der regelmäßige Alkoholkonsum.

Neuere Studien konnten zeigen, dass das Rauchen bei prämenopausalen Frauen um die Menarche zu einer Risikoerhöhung führt. Bei Frauen nach der Menopause soll das Rauchen zu einer Erniedrigung des Mammakarzinomrisikos führen [3]. Was den Alkoholkonsum angeht, so führt er in linearer Abhängigkeit von der getrunkenen Menge zu einer Risikosteigerung. Ein gelegentlicher Alkoholkonsum soll das Risiko jedoch nicht erhöhen.

Tabelle 1 zeigt nochmals verschiedene hormonelle Risikofaktoren und deren Risikoveränderung:

<b>Risikofaktor</b>	<b>Risikoveränderung</b>
<b>Hohes Alter bei Erstgeburt</b>	<b>+ 3% pro Jahr</b>
<b>Viele Geburten</b>	<b>- 7% pro Geburt</b>
<b>Stillen</b>	<b>- 4,3% pro Stilljahr</b>
<b>Alter &gt;12 bei Menarche</b>	<b>- 4% pro Jahr</b>
<b>Hohes Alter bei Menopause</b>	<b>+ 3% pro Jahr</b>
<b>Viel Gewicht in Postmenopause</b>	<b>+ 1% pro kg KG</b>
<b>Alkohol pro 10g/Tag</b>	<b>+ 7% pro Jahr</b>
<b>Rauchen prämenopausal</b>	<b>+ 3% pro Jahr</b>
<b>Rauchen postmenopausal</b>	<b>- 1% pro Jahr</b>

Tabelle 1: Hormonelle Risikofaktoren

Es sei nochmals erwähnt, dass eine Bewertung des Einzelfaktors für die genaue Risikobeurteilung, beziehungsweise das Zusammenspiel mehrerer dieser Faktoren im Hinblick auf die hormonelle Regulation und den direkten Einfluss auf die Entstehung von östrogenrezeptor- und progesteronrezeptor-positiven Mammakarzinomen derzeit nicht möglich ist [61].

Das zunehmende Wissen um das mögliche Zusammenwirken der verschiedenen Faktoren jedoch könnte eine Risiko adaptierte Patientinnenbetreuung nach sich ziehen.

### **1.3 Richtlinien zur Früherkennung des Mammakarzinoms**

Die Mehrheit der derzeit diagnostizierten malignen Mammatumoren wird von den Frauen selbst ertastet. Sei es zufällig oder im Rahmen der Selbstuntersuchung der Mamma (SUM) durch die Frau.

Die Wichtigkeit der monatlichen postmenstruellen Brustselbstuntersuchung ab dem 20. Lebensjahr wird demnach immer wieder betont.

Als weitere Leitlinie gilt ebenfalls die klinische Untersuchung der Brust (KUM) durch den Frauenarzt im Rahmen der jährlichen Krebsvorsorgeuntersuchung [4, 21]. Für Frauen vor dem 40. Lebensjahr wird eine Screening-Mammographie aufgrund der Parenchymdichte der Brustdrüsen nicht empfohlen [72].

Zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr gilt die röntgenologische Untersuchung der Brust mit Hilfe der Mammographie als Krebsvorsorgeuntersuchung in zweijährigem Abstand als Standard. Es konnte gezeigt werden, dass durch das Mammographie- Screening vor allem bei den Frauen zwischen 50 und 69 Jahre eine deutliche Reduktion der Brustkrebs- Mortalität nachzuweisen ist.

Dieses Ergebnis konnte bis jetzt auf Patientinnen im Alter zwischen 40 und 49 Jahren leider nicht direkt übertragen werden. Der Nutzen- Risiko- Abwägung nach scheint ein Screening jedoch auch in dieser Altersgruppe gerechtfertigt zu sein [34, 58, 78].

## 1.4 Diagnostik des Mammakarzinoms

In der Diagnostik des Mammakarzinoms muss man eine nicht- invasive von einer invasiven Diagnostik unterscheiden. Zur nicht- invasiven Standarddiagnostik zählt in erster Linie die röntgenologische Untersuchung der Brust mit Hilfe der Mammographie. Liegt jedoch eine stark röntgendichte Brust vor, kann die Mamma- Ultraschalluntersuchung als Erweiterung zur Befundeingrenzung dienen. Weiterhin wird die Sonographie bei Rundherden oder bei Tastbefunden durchgeführt, die keine radiologische Korrelation vorweisen können.

Eine weitere und noch relativ neue nicht- invasive diagnostische Methode stellt die Magnetresonanztomographie (MRT, Kernspintomographie) dar.

Hier kann an verschiedenen Schnittbildern eine genaue Auswertung des vorliegenden Befundes vorgenommen werden. Die Auswahl von verschiedenen Ebenen ist ein sehr bedeutender Vorteil dieser Technik.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass hier keine Röntgenstrahlen zum Einsatz kommen und somit die Patientinnen keiner Strahlenbelastung unterliegen.

Die Magnetresonanztomographie findet zum Beispiel Anwendung bei Vorhandensein von Brustimplantaten oder bei postoperativen Narbenbildungen. In neueren Untersuchungen wurde die Kernspintomographie der Brust als zusätzliches bildgebendes Verfahren eingesetzt. Sie führte hier zu einer verbesserten Detektionsrate der Mammakarzinome [10, 81, 83, 86].

Eine invasive Diagnostik ist zur Befundsicherung oft leider unentbehrlich. Vor einem operativen Eingriff kann eine Stanz-, Drill- oder Vakuum- Biopsie durchgeführt werden. Dies sollte vor allem dann geschehen, wenn eine Schnellschnittuntersuchung nicht möglich ist, oder wenn eine Schnellschnittuntersuchung in speziellen Fällen keine absolut sichere diagnostische Aussage liefern würde [71]. Aus dem verdächtigen Tumorherd wird die Stanzbiopsie mit einer Stanztiefe von 1,5 cm bis 2,2 cm entnommen. Es sollten mindestens drei bis fünf Stanzzyylinder gewonnen werden, um eine genaue histologische Untersuchung zu ermöglichen.

Bei nicht eindeutig tastbaren Veränderungen sollte präoperativ eine Markierung mittels Nadel, Draht oder Farbstoff durchgeführt werden. Mit dieser Technik kann das Auffinden des Tumors in der anschließenden Operation gesichert werden. Die offene Probeentnahme gilt aber weiterhin als Goldstandard [3]. Das entnommene Gewebe wird anschließend histologisch untersucht.

Bei präoperativ zur Befundsicherung entnommenem Gewebe bestimmt das histologische Ergebnis zu einem großen Teil das Ausmaß des späteren chirurgischen Eingriffes.

Bei Vorliegen einer malignen Geschwulst in der Mamma wird immer die Untersuchung des Lymphabflussgebietes durchgeführt. Denn es ist wichtig zu wissen, ob bereits eine Ausbreitung der Krankheit in die Lymphknoten der Achselhöhle stattgefunden hat. Die lymphogene Metastasierung, also die Absiedelung maligner Zellen entlang des Lymphabflussgebietes, ist beim Mammakarzinom der häufigste Weg.

Das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen ist der entscheidendste Prognoseparameter und wird in die Diagnostik und die Therapie mit eingeschlossen. So ist die axilläre Lymphonodektomie ein obligater Bestandteil der operativen Therapie. Sie gibt wichtige Informationen zur Prognose und führt zu einer geringen, aber signifikanten Verbesserung des Überlebens [13, 66, 84].

Die Entscheidung über eine möglicherweise notwendige Zusatzbehandlung in Form einer Chemotherapie oder einer postoperativen Strahlentherapie wird von diesem Ergebnis ebenfalls stark beeinflusst.

Die Untersuchung der Lymphknoten konzentriert sich, wie bereits erwähnt, auf das Hauptabflussgebiet der Brustdrüse in die Axilla. Eine eventuell schon vorhandene Tumorzellabsiedelung wird also durch die Untersuchung möglichst vieler axillärer Lymphknoten nachgewiesen. Die Untersuchung gilt als die geeignetste, um eine Aussage über das vorliegende Krankheitsstadium im Sinne einer Generalisation der Krebserkrankung und damit auch der Prognose treffen zu können [28]. Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen haben generell gesehen eine bessere Prognose [28].

Die regionären Lymphknoten in der Axilla lassen sich in drei Level einteilen. Um eine pathologische Klassifikation des Nodalstatus erhalten zu können, muss mindestens eine Resektion der Lymphknoten des axillären Level I, besser aber von Level I und II durchgeführt werden.

Aus der Lokalisation Level I müssen dann anschließend wenigstens sechs Lymphknoten histologisch untersucht werden. Werden Level I und II ausgeräumt, erhöht sich die Zahl auf mindestens zehn Lymphknoten [3].

Um die Operation in der Achselhöhle so schonend wie möglich zu gestalten, wird versucht, lediglich die Lymphknoten zu entfernen. Dies muss aber, wie oben beschrieben, in ausreichendem Maße geschehen. Diese Art der Operation kann jedoch eine Vielzahl von möglichen unerwünschten Nebenwirkungen nach sich ziehen. Beispielsweise können ein Taubheitsgefühl oder Gefühlsstörungen am Oberarm auftreten. Ebenso wurde von einer Schwellneigung des operierten Armes bis hin zur Entstehung eines Lymphödems aufgrund eines gestörten Lymphabflusses berichtet. Auch Bewegungseinschränkungen im Schultergelenk sowie Armschmerzen können zu einer deutlichen Minderung der Lebensqualität führen.

Als eine sehr schonende Methode der Operation in der Achselhöhle sei hier die relativ neue Methode der Wächterlymphknotenbiopsie (sentinel lymph node biopsy- SLNB) erwähnt.

Giuliano et al 1994, 1995, 1996 verwendeten diese Methode erstmals bei Patienten mit malignen Melanomen. Sie konnten zeigen, dass der Wächterlymphknoten als erster Lymphknoten im Lymphabflussgebiet Metastasen des Tumors abfängt.

Veronesi et al, 1997 schrieben ebenfalls, dass die Sentinellymphknotenbiopsie den Status der axillären Lymphknoten darstellen könne. Auch bei Patientinnen mit Mammakarzinom wird die Methode inzwischen angewendet, wenn auch nicht im Rahmen der Routine.

Durch die Entfernung dieses Lymphknotens oder dieser Lymphknotengruppe, kann also eine Aussage über den Tumorbefall gemacht werden.

Mit Hilfe einer geringen Menge eines radioaktiv markierten Kolloids und/ oder eines blauen Farbstoffes kann dieser Lymphknoten mit relativ einfachen Hilfsmitteln genau lokalisiert werden. Dazu wird die Lösung vor beziehungsweise während der Operation in die Gegend um den Tumor eingespritzt. Die injizierten Substanzen werden abtransportiert und reichern sich schließlich im erwähnten Lymphknoten an. Durch die Radioaktivität und/ oder die Farbstoffmarkierung kann er zu diesem Zeitpunkt leicht aufgesucht und dann entfernt werden.

Die bei dieser Methode frei werdende Radioaktivität ist absolut unbedenklich. Als Begleiterscheinung kann eine Blaufärbung des Urins oder anderer Körperflüssigkeiten während der ersten 24 Stunden nach dem Eingriff kurzfristig beobachtet werden.

Der oder die entfernten Lymphknoten können dann noch während des Eingriffes einer Schnellschnittuntersuchung zugeführt werden. Hier wird das unfixierte Gewebe an einem Gefrierschnitt auf Tumorzellen untersucht. Bei Tumorbefall wird eine konventionelle Lymphadenektomie, das heißt eine Ausräumung der gesamten Achselhöhle, vorgenommen. Bei Tumorfreiheit des Sentinel- Lymphknoten können die restlichen Lymphknoten jedoch in der Axilla belassen werden, da angenommen werden kann, dass dahinter liegende Lymphknoten ebenfalls tumorfrei sind.

Giuliano et al, 1997 beschrieben, dass der Wächterlymphknoten den Status der axillären Metastasierung in fast 98% der Fälle akkurat darstellen kann. Wenn man die alleinige Entfernung des sentinel node mit der Lymphadenektomie der gesamten Axilla in Bezug auf das Staging der Patientinnen vergleicht, war die Zahl der Patientinnen mit axillären Metastasen oder Mikrometastasen in der Gruppe der nur am sentinel node Operierten signifikant höher [28, 29, 30]. Somit kann durch die Untersuchung des Wächterlymphknotens eine relativ genaue Aussage über den Grad der Metastasierung getroffen werden.

Zusätzlich zur Schnellschnittuntersuchung können anschließend noch weitere Spezialuntersuchungen an dem entfernten Lymphknotengewebe durchgeführt werden.

Dies können immunhistologische und/ oder molekularbiologische Untersuchungen, wie zum Beispiel eine Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR) sein. Es kann nun auch vorkommen, dass doch noch kleinste Tumorzellherde nachgewiesen werden können. In einem solchen Fall sollte nachträglich eine Entfernung der noch vorhandenen Achsellymphknoten durchgeführt werden. Die Methode der Wächterlymphknoten- Biopsie kann derzeit noch nicht als Standardverfahren angesehen werden. Sie wird jedoch unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen im Rahmen von Studien an großen Zentren wie auch der Universitäts- Frauenklinik in Tübingen bereits eingesetzt.

Tabelle 2 zeigt die allgemein gültige Einteilung des klinischen Nodalstatus:

<b>Nx</b>	<b>nicht beurteilbar</b>
<b>N0</b>	<b>klinisch unauffällig</b>
<b>N1</b>	<b>bewegliche, ipsilaterale axilläre LK</b>
<b>N2a</b>	<b>axilläre LK untereinander oder an andere Strukturen fixiert</b>
<b>N2b</b>	<b>Mammaria interna LK ohne axilläre LK</b>
<b>N3a</b>	<b>infraklavikuläre LK</b>
<b>N3b</b>	<b>Mammaria interna LK und axilläre LK</b>
<b>N3c</b>	<b>Supraklavikuläre LK</b>

Tabelle 2: Klinischer Nodalstatus

Ist der Sentinel- Lymphknoten Grundlage der Einteilung und wurde keine Lymphknotendissektion in der Achselhöhle durchgeführt, geht dies in einem Zusatz (sn) mit ein.

Tabelle 3 zeigt die histopathologische N- Klassifikation:

<b>pNx</b>	<b>nicht beurteilbar</b>
<b>pN0</b>	<b>Keine befallenen LK, isolierte Tumorzellen <math>\leq 200</math> um</b>
<b>pN1mic</b>	<b>Mikrometastasen <math>&lt; 0,2</math> mm- 2 mm</b>
<b>pN1a</b>	<b>Metastasen in 1- 3 axillären LK</b>
<b>pN1b</b>	<b>Mammaria interna LK bei Sentinelbiopsie, klinisch nicht evident</b>
<b>pN1c</b>	<b>Metastasen in 1- 3 axillären LK und Mammaria interna LK bei Sentinelbiopsie, klinisch nicht evident</b>
<b>pN2a</b>	<b>Metastasen in 4- 9 axillären LK</b>
<b>pN2b</b>	<b>Metastasen in auch klinisch erkennbaren Mammaria interna LK bei fehlenden axillären Metastasen</b>
<b>pN3a</b>	<b>Metastasen in 10 oder mehr axillären LK oder Metastasen in infraklavikulären LK</b>
<b>pN3b</b>	<b>Metastasen in klinisch evidenten Mammaria interna LK bei positiven axillären LK, oder Metastasen in mehr als 3 axillären LK und Mammaria interna LK bei Sentinelbiopsie ohne klinisch evidente Metastasen</b>
<b>pN3c</b>	<b>Metastasen in supraklavikulären LK</b>

Tabelle 3: Histopathologische N- Klassifikation

## 1.5 Histologie

Unter den invasiv wachsenden Karzinomen wird bei 80% der Patientinnen ein duktales Karzinom gefunden. Hier liegt eine maligne Entartung der Zellen an der Innenseite der Milchgänge vor. Dieser häufigste Typ tritt meistens lokal begrenzt auf. Die restlichen Erkrankungsfälle lassen sich unter den anderen histologischen Grundtypen des Mammakarzinoms aufteilen [71].

Circa zehn Prozent der invasiven Befunde stellen dabei die lobulären Karzinome dar. Lobulär bedeutet, dass die entarteten Zellen ihren Ursprung von den Drüsenläppchen der Brustdrüse nehmen. Ein lobuläres Karzinom tritt häufiger multifokal und auch bilateral auf, weshalb durch eine Spiegelbildbiopsie ein Befall der kontralateralen Brust ausgeschlossen werden muss. Diese Tatsache macht die Wichtigkeit einer präoperativen histologischen Untersuchung des entnommenen Gewebes sehr gut deutlich.

Die übrigen zehn Prozent entfallen schließlich auf Typen wie die prognostisch günstigeren muzinösen und medullären Karzinome sowie solche mit einer ungewöhnlichen Differenzierung und das Paget- Karzinom als Sonderform [71]. Als Krebsvorstufe, auch Präkanzerose genannt, ist das Carcinoma lobulare in situ (CLIS) anzusehen. Dieses entwickelt sich häufig multizentrisch und bilateral, geht aber häufig nur partiell und auch mit einer großen Latenzzeit in ein Karzinom über. Das Risiko einer Karzinomentstehung steigt hier jedoch auf das bis zu Zehnfache in einem Zeitraum über zehn Jahre an [3].

Auch das duktales Carcinoma in situ (DCIS) stellt eine Veränderung dar, bei der ein Durchbruch durch die Basalmembran noch nicht stattgefunden hat. Es ist ebenfalls als ein noch frühes Stadium in der Karzinogenese anzusehen. Circa 20% der durch das Mammographie- Screening entdeckten Mammatumore sind nicht invasiv [53]. Das DCIS birgt jedoch ein erhöhtes Risiko und erfordert deshalb auch eine adäquate operative Therapie.

Als weitere mögliche Krebsvorstufe seien hier noch die fibrös- zystischen Mammaveränderungen erwähnt. Hier liegt eine knötchen- oder zystenförmige Veränderung an der Brustdrüse vor, die mit der Entstehung atypischer Zellen

einhergehen kann. Die Veränderungen mit (intra-) duktalem Proliferat bedeuten ein bis zu zweifach erhöhtes Risiko [3].

Die Veränderungen mit atypischen (intra-) duktalem Hyperplasien bedeuten sogar ein vier bis fünffach erhöhtes Risiko, ein Mammakarzinom zu entwickeln.

## **1.6 Therapie des Mammakarzinoms**

Der kurative Ansatz bei dieser Erkrankung besteht wie bei anderen malignen Tumoren auch in einer operativen Extirpation von invasiven und nicht-invasiven Tumorkomponenten [50]. Die Resektionsränder sollen makroskopisch und mikroskopisch im Gesunden ( $> 1\text{mm}$ ) sein [68]. Eine histologische Beurteilung des tumorfreien Randsaumes wird empfohlen [6]. In manchen Fällen muss dieser Therapie eine Chemotherapie oder lokale Strahlentherapie vorgeschaltet werden. Damit wird versucht, den Tumor zu verkleinern. Die anschließende Operation kann dadurch vereinfacht werden.

Eine brusterhaltende Therapie ist in circa 50% der Fälle möglich. Die Entscheidung, wie operiert werden kann, muss jedoch immer individuell getroffen werden. Der ausschlaggebende Faktor ist hierbei auch das Verhältnis von Tumorgröße zu Brustgröße. Bei einem großen Tumor in einer kleinen Brust kann der so wichtige Sicherheitsabstand oft nicht gewährleistet werden. Dann muss einer Brusterhaltung eine Mamma-Ablation, also eine komplette Entfernung der Brustdrüse und anderer Anhangsgebilde vorgezogen werden. Auch wird eine Mastektomie oft bei weiter fortgeschrittenen Tumorstadien durchgeführt.

Einen zweiten Ansatz der Therapie bei Brustkrebs stellt die medikamentöse Therapie dar. Bei rezeptorpositivem Tumor können Antiöstrogene, wie zum Beispiel das Tamoxifen angewendet werden, die die Funktion der Ovarien ausschalten. Bei solchen Tumoren ist die endokrine Therapie heutzutage fester Bestandteil der Therapie. Eine fünfjährige Behandlung mit dem Antiöstrogen Tamoxifen kann die Häufigkeit invasiver intramammärer Rezidive und

kontralateraler Mammakarzinome senken. Die Rate nicht- invasiver Rezidive kann jedoch nicht gesenkt werden [22].

Bei rezeptornegativen Tumoren ist eine solche Therapie natürlich nicht sinnvoll. Eine zytostatische Therapie besteht in der Regel aus einer Kombination von Cyclophosphamid, Methotrexat und 5- Fluorouracil (= CMF). Die Gabe einer CMF- haltigen Chemotherapie führt zu einer absoluten Reduktion der Rezidive um 6,4% und der Mortalität um 4,4% im Vergleich mit einer nicht behandelten Kontrollgruppe [50]. Eine andere Möglichkeit ist die Kombination von Epirubicin und Cyclophosphamid (= EC).

Die Radiatio ist ein weiterer wichtiger Bestandteil der Therapie des Mammakarzinoms. Sie muss immer dann durchgeführt werden, wenn ein hohes Risiko für ein Rezidivieren der Erkrankung besteht. Dies ist immer nach einer brusterhaltenden Therapie der Fall, oder wenn der entfernte Tumor sehr groß war. Durch eine postoperative Strahlentherapie kann auch bei Patientinnen mit Zustand nach Ablatio mammae bei einem sehr weit fortgeschrittenen Tumorgeschehen mit Hautinfiltration oder Lymphangiosis carcinomatosa ebenfalls ein positiver Effekt auf deren rezidivfreies Überleben ausgeübt werden.

Auf weitere Therapieansätze wie zum Beispiel die Antikörpertherapie soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Betont werden soll hier nochmals, dass das Mammakarzinom immer nach einer individuell zugeschnittenen Therapie verlangt. Es sind immer verschiedene Tumoreigenschaften und andere individuelle Begleitfaktoren zu berücksichtigen.

## **1.7 Diagnose und Prognose**

Die Entscheidung darüber, ob eine Brustkrebserkrankung geheilt werden kann, ist klar vom Zeitpunkt der Diagnosestellung abhängig. Dieser steht in direktem Zusammenhang mit dem Tumorstadium.

Zur Bestimmung der Prognose ist die Erhebung des TNM- Status (Tumorgröße, axillärer Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung), des histologischen Typs, des Gradings sowie die Bestimmung des Östrogen- und Progesteronstatus obligat. Die Tumorgröße verdeutlicht die Aggressivität der vorliegenden bösartigen Geschwulst und es scheint klar, dass eine frühe Diagnosestellung für den weiteren Verlauf der Erkrankung eine sehr wichtige Rolle spielt.

Die allgemein gültige T- Klassifikation ist in Tabelle 4 dargestellt:

<b>Tx</b>	<b>Primärtumor nicht beurteilbar</b>
<b>T0</b>	<b>Kein Primärtumor nachweisbar</b>
<b>Tis</b>	<b>Carcinoma in situ (DCIS, CLIS, Paget)</b>
<b>T1mic</b>	<b>Invasion <math>\leq</math> 0,1 cm</b>
<b>T1a</b>	<b>&lt; 0,1 cm bis einschließlich 0,5 cm</b>
<b>T1b</b>	<b>&gt; 0,5 cm bis einschließlich 1,0 cm</b>
<b>T1c</b>	<b>&gt; 1,0 cm bis einschließlich 2,0 cm</b>
<b>T2</b>	<b>&gt; 2 cm bis einschließlich 5 cm</b>
<b>T3</b>	<b>&gt; 5 cm</b>
<b>T4</b>	<b>Infiltration von Brustwand oder Haut</b>
<b>T4a</b>	<b>Infiltration von Brustwand</b>
<b>T4b</b>	<b>Hautödem, Ulzeration, Satellitenknötchen der Haut</b>
<b>T4c</b>	<b>4a und 4b</b>
<b>T4d</b>	<b>Inflammatorisches Mammakarzinom</b>

Tabelle 4: T- Klassifikation (2002)

In Hinblick auf die Prognose des Mammakarzinoms konnte in neuester Zeit bestätigt werden, dass das Lebensalter einer Patientin zum Zeitpunkt der Diagnosestellung den wohl wichtigsten Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben darstellt [3]. Somit hat eine sehr junge Patientin, die an einem Mammakarzinom erkrankt, eine wesentlich schlechtere Prognose als ihre

älteren Geschlechtsgenossinnen. Einen weiteren sehr wichtigen Prognosefaktor stellt der Lymphknotenbefall dar. Bei etwa der Hälfte aller Brustkrebsfälle können Krebszellen in den Lymphdrüsen nachgewiesen werden. Die Prognose ist umso schlechter, je mehr Lymphknoten befallen sind.

Bei den anderen 50% der Erkrankungsfälle sind keine Tumorzellen in den axillären Lymphknoten nachweisbar.

Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der verschiedenen Prognosefaktoren und die verschiedenen Risikoeinschätzungen:

<b>Prognosefaktoren</b>	<b>Niedriges Risiko <sup>1</sup></b>	<b>Mittleres Risiko <sup>1</sup></b>	<b>Hohes Risiko <sup>2</sup></b>
<b>Nodalstatus</b>	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>	<b>positiv</b>
<b>Tumorgröße</b>	<b>T1a/ T1b</b>	<b>T1c</b>	<b>T2</b>
<b>Grading</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>
<b>Rezeptoren</b>	<b>ER u/o PgR +</b>	<b>ER u/o PgR +</b>	<b>ER und PrR +</b>
<b>Alter</b>	<b>&gt; 35 Jahre</b>	<b>&gt; 35 Jahre</b>	<b>&lt; 36 Jahre</b>

Tabelle 5: Risikogruppen nach St. Gallen 2001 (<sup>1</sup>, alle Kriterien müssen erfüllt sein; <sup>2</sup>, ein Kriterium muss erfüllt sein) [3]

## **1.8 Zielsetzung**

Abgesehen von der so wichtigen nodulären Metastasierung konzentriert sich der Ansatz dieser Studie auf die Metastasierung über den Blutweg. Denn auch eine primäre Ausbreitung von Tumorzellen über die Blutbahn spielt eine entscheidende Rolle für die Prognose der betroffenen Patientin. Die sich über den Blutkreislauf ausbreitenden Tumorzellen können früher oder später zu einem erneuten Auftreten des Tumorgeschehens führen.

Wie bereits erwähnt haben Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen generell gesehen eine bessere Prognose.

Tatsächlich jedoch entwickeln etwa 30 bis 40% der bei Diagnosestellung nodal negativen Patientinnen, also der Patientinnen, bei denen keine Tumorzellen in den untersuchten Lymphknoten nachgewiesen werden konnten, innerhalb eines Zeitraumes von fünf bis zehn Jahren trotzdem ein Rezidiv [22, 33, 45].

Die Rezidive können am Ort des Primärtumors oder der Narbe als Lokal- oder Narbenrezidiv, aber auch an anderen Stellen des Körpers als Fernmetastasen auftreten. So stellt das Skelettsystem die am häufigsten von Metastasen betroffene Lokalisation dar [62]. Aber auch Organe wie die Leber oder das Gehirn können befallen sein.

Diese Tatsache führt zu der Annahme, dass in solchen Fällen ein anderer Ausbreitungsweg der Tumorzellen als über die Lymphbahn vorhanden war.

Patientinnen, die eine hämatogene Metastasierung erleiden, sterben mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit schließlich an dieser Erkrankung. Deshalb sollten diese Patientinnen durch weitere Untersuchungsmethoden früh entlarvt werden, um ihnen schnell die Möglichkeit einer lebensverlängernden Therapie anbieten zu können.

Die Metastasierung ins Knochenmark bei Patientinnen mit Mammakarzinom wurde erstmals von Redding et al, 1983 untersucht. Cote et al, 1991 erbrachten den Beweis, dass Mikrometastasen im Knochenmark ein früheres Rezidiv eines Mammakarzinoms vorhersagen würden [16].

Verschiedene andere Untersucher berichteten über sehr sensitive molekularbiologische Methoden, um Mikrometastasen im Blut, Knochenmark und Lymphknotengewebe mit Hilfe der Reversen- Transkriptase- Polymerase-Ketten-Reaktion (RT- PCR) nachzuweisen [11, 17, 20, 23, 24, 32, 37, 39, 43, 51, 54, 55, 56, 74, 75, 76, 92, 94].

Für diese Studie wurden Knochenmarksaspirate von Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht.

Das Ziel der Studie war es Marker zu evaluieren, um Tumorzell- mRNA im Knochenmark mit Hilfe der nested- Reversen- Transkriptase- Polymerase-Ketten- Reaktion (nested- RT- PCR) nachzuweisen.

Um die Tumorzell- mRNA mit Hilfe dieser Methode nachweisen zu können, wurden aus der Literatur verschiedene bereits untersuchte Primer ausgewählt. Primer sind molekulare Marker, die einen bestimmten Genabschnitt am Anfang und am Ende kennzeichnen. Dieser Genabschnitt kann dann in einer PCR vervielfältigt werden.

Im Abschnitt Material und Methoden wird dies noch genauer erläutert werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Knochenmarksaspirate**

Untersucht wurden Knochenmarksaspirate von 80 Patientinnen, die im Zeitraum von Januar bis Dezember 1999 an einem Mammakarzinom in der Universitäts-Frauenklinik operiert wurden. Keine dieser Patientinnen hatte eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten.

Bei allen Patientinnen lag die schriftliche Einwilligung zur intraoperativen Knochenmarksaspiration aus dem Beckenkamm vor.

Das gewonnene Material wurde unter sterilen Verhältnissen in ein Gefäß gegeben und halbiert, wobei die eine Hälfte der Universitäts- Frauenklinik zur Anfertigung einer immunhistologischen Untersuchung überlassen, und die andere Hälfte dem Institut für Pathologie zur Durchführung einer PCR-Untersuchung übergeben wurde. Im Institut für Pathologie wurde dann das Material zentrifugiert, und der entstandene Überstand wurde jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei - 70°C eingefroren.

#### **2.1.2 Positivkontrollen**

Als Positivkontrollen dienten die zwei Mammakarzinom- Zelllinien 24 und 26. Diese wurde freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat. Gückel aus der Universitäts- Frauenklinik zur Verfügung gestellt. Eine weitere Positivkontrolle stellten Mammakarzinom- Zellen (skBR 3) dar, die das Institut für Pathologie ebenfalls von der Frauenklinik erhielt.

Daraus wurde gesamtRNA extrahiert und eine PCR mit den später beschriebenen Primern durchgeführt. Hierdurch sollte die Funktion der Primer kontrolliert werden.

### 2.1.3 Negativkontrollen

Die Extraktion von RNA, die cDNA- Synthese und insbesondere die PCR- Vorbereitung fanden immer in verschiedenen Räumlichkeiten statt, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren. Die darauf folgenden PCRs wurden dann aus den gleichen Gründen wiederum in einem anderen Raum pipettiert.

Als Negativkontrolle diente destilliertes und autoklaviertes Wasser ohne Zusatz von RNA (no template control).

Die gesamtRNA, welche aus tumorfreien Lymphknoten von Patienten mit malignen Melanomen extrahiert (sechs verschiedene Patienten) und von Herrn Dr. med. Blaheta aus der Universitäts- Hautklinik in Tübingen bereitgestellt wurde, dienten als Negativkontrollen für die anfängliche Austestung der Primer zur Amplifikation der cDNA der Gene Mammaglobin, Maspin, CEA und Zytokeratin 20. In der Universitäts- Hautklinik wurde die RNA mit Hilfe der Methode nach Chomczynsky und Sacchi 1987 [14] extrahiert.

Tabelle 6 zeigt nochmals eine kurze Zusammenfassung aller verwendeten Materialien:

<b>Material</b>	<b>n=</b>	<b>Art des Materials</b>
<b>Positivkontrollen</b>	<b>3</b>	<b>2 Mammakarzinom- Zelllinien, Mammakarzinom- Zellen</b>
<b>Negativkontrollen</b>	<b>6</b>	<b>tumorfreie Lymphknoten von Melanom- Patienten</b>
<b>Patienten- Proben</b>	<b>80</b>	<b>Knochenmarksaspirate</b>

Tabelle 6: Verwendete Materialien

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Extraktion von RNA

Bei den Knochenmarksaspiraten lag ein Gesamtvolumen von ca. 200 µl vor.

Eine Zugabe von 400 µl Solution D (4 M Guanidinium Thiozyanat; 25 mM Na-Acetat, pH 7; 0,5% N Lauryl Sarcosyl; 0,1% 2- Mercaptoethanol) zu jeder einzelnen Probe sollte einen Abbau von RNA durch Inhibition der Ribonuklease durch das 4- molar Guanidinium verhindern. Zur Herstellung der Solution D wurde stets mit Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)- vorbehandeltes Wasser verwendet. DEPC ist ebenfalls ein Ribonukleaseinhibitor. Dadurch wurde eine Inaktivierung der möglicherweise im Wasser enthaltenen RNasen bewirkt.

Die Proben wurden zu Beginn der RNA- Isolierung langsam auf Eis aufgetaut, um eine Degradierung der RNA zu minimieren. Nach dem Auftauen wurden die Proben jeweils dreimal in flüssigem  $\text{NH}_2$  schockgefroren und wieder aufgetaut, um die Zellmembranen aufzubrechen. Schließlich wurde zu jeder Probe nacheinander 40 µl 2 M Na- Acetat, 400 µl wassergesättigtes Phenol (pH 4,5) und 80 µl Chloroform/ Isoamylalkohol (25:1) zugegeben.

Dieses Gemisch wurde anschließend gevortexed, zentrifugiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der die RNA enthaltende Überstand vorsichtig abpipetiert und in ein zweites Reaktionsgefäß überführt. Die RNA- Ausbeute wurde durch Zugabe von 100 µl  $\text{dH}_2\text{O}$  zur Phenolphase in das erste Reaktionsgefäß und ein erneutes Vortexen und Zentrifugieren gesteigert. Die wässrige Oberphase wurde nun erneut abpipetiert und ebenfalls in das zweite Reaktionsgefäß überführt. Die phenolhaltige Unterphase des ersten Reaktionsgefäßes konnte jetzt verworfen werden. Zur Fällung der gesamtRNA wurde nun in das zweite Reaktionsgefäß Isopropanol zugegeben. Dieser Inhalt wurde dann durch Umkippen der Reaktionsgefäße gemischt und anschließend für mindestens zwei Stunden bei - 20°C inkubiert. Eine Fällung entsteht unter diesen Bedingungen, da das Isopropanol nicht gefrieren kann und die in den

Reaktionsgefäßen enthaltene RNA deshalb ausfällt.

Nach zehn bis 30-minütigem Zentrifugieren bei 4°C konnte der Isopropanolüberstand vorsichtig abgegossen werden. Zur Reinigung der entstandenen RNA- Pellets wurden diese in 180 µl eisgekühltem 75 prozentigem H<sub>2</sub>O- DEPC- gesättigtem Ethanol geschwenkt und für fünf Minuten bei 4°C rezentrifugiert.

Danach wurde der Ethanolüberstand vorsichtig abgeschüttet, und die Pellets wurden für fünf bis zehn Minuten in einer Vakuumpumpe getrocknet. Die Pellets wurden schließlich in 30 µl H<sub>2</sub>O- DEPC resuspendiert, indem das DEPC-Wasser in die Pipette mehrmals aufgezogen und mit dem RNA- Pellet gründlich vermischt wurde.

Im Anschluss an dieses Vorgehen wurden die Reaktionsgefäße gevortexed, zentrifugiert und bis zur cDNA- Synthese auf Eis gelagert.

Zuvor wurde die RNA- Konzentration in einem Photometer bei 260 nm gemessen, um später die gewünschte Menge an gesamtRNA in die cDNA- Synthese einsetzen zu können.

### **2.2.2 Auswahl der PCR- Primer**

Zur Identifizierung der eventuell im Knochenmarksaspirat vorhandenen disseminierten Tumorzellen wurden vier Markergene ausgewählt: Mammaglobin, Maspin, Carcinoembryonales Antigen und Zytokeratin 20. Die PCR- Primer zur Amplifikation dieser Gene wurden anhand von aktuellen Veröffentlichungen ausgewählt, wie z.B. Mammaglobin, das einen guten Marker für den Nachweis von Mikrometastasen in axillären Lymphknoten darstellen soll [49, 89].

Die Qualität der extrahierten RNA wurde durch Amplifikation der sogenannten housekeeping- Gene beta- 2- Mikroglobulin (β-2-MG) und Porphobilinogen- Deaminase (PBGD) überprüft.

Wichtig bei der Auswahl der Primer war, dass sie entweder „Intron- übergreifend“ oder in verschiedenen Exonen lokalisiert waren.

Nur so konnte amplifizierte DNA von amplifizierter cDNA aufgrund der unterschiedlichen Länge der Amplifikate unterschieden werden. Weiterhin sollten die Marker für das untersuchte Mammagewebe spezifisch sein.

Die Primer wurden hergestellt von MWG-Biotech AG, Anzinger Straße 7, Ebersberg, Deutschland.

Maspin gehört zur Familie der Serine. Dies sind Proteinase- Inhibitoren, zu denen auch die Plasminogen- Aktivator- Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 sowie das alpha- 1- Antitrypsin gehören [40]. Proteinase- Inhibitoren spielen eine bedeutende Rolle bei der Tumorerkrankung und der Metastasierung [40]. Proteinase bauen die extrazelluläre Matrix ab, während ihre Inhibitoren den gegenteiligen Prozess bewältigen. Die oben genannten Formen von Proteinase wurden im Zusammenhang mit Brustkrebs und anderen malignen Tumoren bereits erforscht [19, 25, 65].

Das Maspin- Gen wurde ursprünglich aus normalem Brustdrüsengewebe isoliert [95]. Es befindet sich auf Chromosom 18q21.3- q23 und besitzt Tumorsuppressoraktivität [39]. Damit liegt es in der selben Region wie das Plasminogen- Aktivator- Inhibitor- Gen 2, die Tumorsuppressorgene DCC (deleted in colorectal cancer) [70], die squamous cell carcinoma Antigene SCCA- 1 und 2 [73] und das Bcl- 2- Gen, das bei bestimmten Non- Hodgkin- Lymphomen verändert ist [35].

Für Maspin wurde ein hemmender Effekt auf die Angiogenese, die Tumorerkrankung und die Metastasierung beschrieben. Die Aktivität von Maspin soll in Karzinomzellen im Vergleich zu normalem Mammagewebe herunterreguliert, aber nicht gestoppt sein. Sie soll aber mit steigender Tumorerkrankung weiter abfallen [40]. Auch eine Karzinomentwicklung werde dadurch begünstigt [95]. Diese Veröffentlichungen machte Maspin zu einem interessanten diagnostischen und prognostischen Marker, weshalb wir ihn in die Studie mit aufnehmen.

Das humane Mammaglobin (hMAM) gehört zur Familie der epithelialen Sekretproteine, die auch Proteine wie das Steroid- bindende Protein der

Prostata (Prostatein) Subunit C3 (rPSC3) der Ratte [63], das menschliche Clara- Zell 10- Kilodalton- Protein (CC10) [47] und das Uteroglobulin des Kaninchens (rUG) [46] beinhaltet [87]. Es ist auf dem Chromosom 11q12.3-13.1 lokalisiert und kodiert hier für ein Glykoprotein [89].

Die Aminosäuresequenz des humanen Mammaglobins (hMAM) zeigt homologe Strukturen zur Uteroglobulin- Familie. Die Expression des hMAM soll auf ausgereiftes Brustdrüsengewebe, sowie auf Mammakarzinom- Zelllinien beschränkt sein [87]. Mammaglobin sei jedoch im Vergleich zu nicht maligne verändertem Mammagewebe in primären Mammakarzinomen häufig überexprimiert [88]. Diese brustspezifische Expression dieses Sekretproteins und vor allem die Überexpression in primären Mammatumoren macht Mammaglobin zu einem interessanten Marker im Zusammenhang mit dem Management des Mammakarzinoms [87].

Das Zytokeratin 20 ist eines von mehr als 20 bekannten Isotypen von Intermediär- Filament- Proteinen. Diese Intermediär- Filament- Proteine werden von gesundem und malignem Mammagewebe exprimiert, außerdem noch von anderen epithelialen Zellen und sich davon ableitenden Malignomen [57].

Maligne Zellen behalten die Intermediär- Filamente ihrer Vorläufer- Zellen bei. Deshalb wurden die Zytokeratine verwendet, um neoplastische Zellen mit epithelialeem Ursprung nachweisen zu können [12].

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) gehört der Gruppe der onkofetalen Tumorantigene an. Es stellt ein von normalerweise embryonalen Zellen synthetisiertes und sezerniertes Glykoprotein dar.

Das CEA ist ein in der Inneren Medizin, aber auch in der Chirurgie oftmals eingesetzter, jedoch nicht spezifischer Tumormarker. Er soll in 40 bis 70% der Fälle bei Karzinomen des Kolons, des Magen, des Pankreas und eben auch der Mamma während der Tumorentstehung und - progression erhöht sein [24]. CEA wird von der Mehrheit der Mammakarzinome exprimiert [49].

### 2.2.3 cDNA- Synthese

Die extrahierte gesamtRNA jeder einzelnen Probe wurde entweder umgehend zur cDNA- Synthese weiter verwendet oder sofort bei - 80°C eingefroren, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Ca. 1500 ng dieser gesamtRNA wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl einer Reversen- Transkriptase- Reaktion zugeführt. In dieser Reaktion wird komplementär zum vorhandenen RNA- Einzelstrang ein DNA- Doppelstrang gebildet. Dazu ist die Zugabe des nötigen Ausgangsmaterials, Nukleinsäurebasen, des prozessierenden Enzyms Reverse Transkriptase, eines reversen Primers zur Eingrenzung des zu transkribierenden Stückes und eine entsprechende Pufferung des Gemisches notwendig. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA- abhängige DNA- Polymerase. Sie synthetisiert unter den gegebenen Bedingungen mit einer als Einzelstrang vorliegenden RNA als Matrize in 5'- 3'- Richtung eine komplementäre DNA = copy DNA (cDNA). In dieser RT- Reaktion wurden die vier ausgesuchten back- Primer in einen Ansatz gegeben, anstatt für jeden einzelnen Primer eine RT- Reaktion durchzuführen. In dieser „multiplex RT- Reaktion“ konnte gezeigt werden, dass der zeitliche und materielle Aufwand reduziert werden kann und ebenso das Risiko der Kontamination. Die Grundlage bildete ein Ansatz aus 1,5 µl DEPC- H<sub>2</sub>O und 0,5 µl des jeweiligen back- Primers. Dieser Mix aus DEPC- H<sub>2</sub>O, spezifischen back- Primern und RNA wurde dann für zehn Minuten bei 65 °C in einem Wärmeblock inkubiert. Dies bewirkte eine Entfaltung des RNA- Stranges und erleichterte die Anlagerung an den RNA- Einzelstrang. Die Proben wurden dann sofort auf Eis gestellt, was das Wiedereinfalten der RNA verhinderte.

Dem Reaktionsprodukt wurden nun 4 µl 5x First-Strand Buffer, 2 µl dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) in DEPC- H<sub>2</sub>O, 1,5 µl DEPC- H<sub>2</sub>O und 0,5 µl aus dem Affen- Myeloblastosis- Virus (AMV) gewonnene Reverse Transkriptase (AGS, Heidelberg, FRG) zugegeben. Das komplette Reaktionsgemisch wurde anschließend bei 41°C für eine Stunde inkubiert.

In dieser Zeit konnte sich, prozessiert durch die Reverse Transkriptase, durch Anlagerung der komplementären Basen der komplementäre Strang ausbilden. Dann wurden die Reaktionsgefäße zur Beendigung der Reaktion für fünf Minuten in eine 95 °C heiße Wärmeplatte gestellt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung in der nachfolgenden PCR bei - 20°C eingefroren.

#### **2.2.4 RT- PCR**

Zum Nachweis Karzinomzell- spezifischer Transkripte wurde die cDNA amplifiziert. Die dafür eingesetzten back- Primer entsprachen denen, die bereits für die cDNA- Synthese verwendet wurden. Jede Patientenprobe wurde mit vier Primerpaaren in getrennten Reaktionen untersucht.

Die Amplifikate mussten eine bestimmte Länge aufweisen, damit für die anschließende nested- RT- PCR ausreichend Bindungsstellen vorhanden waren und insbesondere die zu identifizierenden Spicestellen sicher eingeschlossen waren.

In die RT- PCR wurden 2 µl cDNA (dies entspricht 150 ng) eingesetzt.

Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 10 x Puffer (10 mM Tris- HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 50 mM MgCl), 10 pM dNTP-Mix (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland), je 15 pM PCR- Primer und 1 U thermostabiler DNA- Polymerase (AmpliTaq Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland).

Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Schließlich wurde mit diesem Ansatz eine PCR durchgeführt. Es wurde eine PCR- Reaktion mit 40 Amplifikationszyklen ausgewählt. Das ausgewählte PCR- Programm bestand wie bei allen PCR- Läufen aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Am Anfang stand die Denaturierung der DNA bei 94°C.

In diesem Abschnitt der PCR trennen sich beide Stränge der Template- DNA. Anschließend wurde die Temperatur auf 56°C gesenkt, so dass die Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template- DNA stattfinden konnte.

Danach wurde die Temperatur auf 72°C erhöht, was genau dem Temperaturoptimum der verwendeten Taq- Polymerase zur Erzeugung der Komplementärstränge entsprach. Der Primer wurde in diesem Schritt verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorlag, die der ursprünglichen Template- DNA exakt glich.

Im Anschluss an die PCR- Zyklen wurden die Reaktionsgefäße im PCR- Gerät auf 4°C heruntergekühlt und dann bei dieser Temperatur gehalten bis die Proben weiter verwendet wurden.

### **2.2.5 Nested- RT- PCR**

Nach der ersten PCR wurden nun 2 µl dieses Produktes in eine nested- RT- PCR eingesetzt. Mit Hilfe ausgewählter nested- Primer wurde in dieser Reaktion ein kleinerer DNA- Abschnitt innerhalb des ausgesuchten Genabschnitts amplifiziert.

Durch diesen Vorgang erhöht sich die Sensitivität um den Faktor  $10^2$  bis  $10^3$ , da zwei PCRs durchgeführt werden. Ebenso erhöht sich die Spezifität, da hier vier Primer spezifisch binden müssen und die nested Primer nur ein sehr kleines Template dafür haben.

Ein Mix aus dH<sub>2</sub>O, 10 x Buffer + 50 mM MgCl, 10 pM dNTPs, 15 pM des forward Primers, 15 pM des backward- Primers und 1 U Taq- Gold (AmpliAq® Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) dienten auch hier wiederum als Reaktionsgrundlage. Auch hier wurden 40 Zyklen bei 56°C Annealingtemperatur durchlaufen.

### **2.2.6 Gelelektrophorese**

Die PCR- Produkte wurden schließlich mit Hilfe der Gelelektrophorese ausgewertet. Dazu wurden zweiprozentige Agarosegele hergestellt.

Das Agarosepulver (SeaKem Agarose ME Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) wurde in 1 x TBE (10,8 g/l Tris Base, 5,5 g/l Borsäure, 0,74 g/l

Na<sub>2</sub> EDTA) durch Erhitzen der Mischung gelöst und schließlich heiß in die entsprechenden Gelkammern mit Kämmen eingefüllt. Zur Darstellung der Banden unter UV- Licht musste dem Agarosegel zuvor 10 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel beigefügt werden. Die Gele wurden im Anschluss daran für ca. eine halbe Stunde zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurden die Gele in die Elektrophoresekammern eingesetzt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. In die im Gel vorhandenen Taschen konnte nun das PCR- Produkt in einem Volumen von 10 µl zusammen mit 2 µl eines 2 x - Loading buffers (6 x Loading buffer, 87 prozentiges Glycerin, dH<sub>2</sub>O, 1:1:1) pipettiert werden. Es folgte die elektrophoretische Auftrennung. Um eine anschließende Auswertung der Länge der PCR- Produkte zu ermöglichen, wurde beidseits der Patientenproben ein Längenstandard (Hae III verdaute ΦX-DNA, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) aufgetragen, der jeweils als rechte und linke Begrenzung im Gel erschien.

### **2.2.7 Fotografieren der Gele**

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele zur Sichtbarmachung der Amplifikationsprodukte schließlich unter UV- Licht fotografiert und somit dokumentiert.

Anhand der Bilder konnte nun eine Auswertung und eine Zuordnung der Spliceprodukte erfolgen.

### **2.2.8 Aufreinigung**

Zur Aufreinigung der PCR- Produkte wurden die restlichen 40 µl des PCR- Produktes wie unter 2.2.6 beschrieben auf ein zweiprozentiges Agarosegel aufgetragen und schließlich elektrophoretisch aufgetrennt. Hier wurde jedoch im Gegensatz zu den sonst verwendeten TBE- Gelen ein TAE- Gel benötigt. Dieses unterscheidet sich dadurch, dass hier anstatt der Borsäure ein Acetat als Puffer dient.

Unter UV- Licht wurden dann die spezifischen Amplifikationsprodukte mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und die Amplifikate konnten nun mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN®, Hilden, Deutschland) aus der Agarose extrahiert werden.

Dazu wurde zuerst das ausgeschnittene Agarosestück in ein vorher gewogenes steriles 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dieses Reaktionsgefäß wurde wieder gewogen, um das Gewicht des Gelstückes zu ermitteln. Entsprechend dieser Differenz wurde das dreifache Volumen in  $\mu\text{l}$  an QIAgen- Buffer hinzu gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend für zehn Minuten bei  $50^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um die Agarose zu verflüssigen. Durch einen Farbindikator konnte der pH- Wert des Reaktionsgemisches kontrolliert werden.

Wenn der gewünschte pH- Wert von 7,5 nicht vorlag, musste dieser durch Zugabe von 3 M Natrium- Acetat (pH 5,0) noch angeglichen werden.

Schließlich wurde in den flüssigen Reaktionsgefäßinhalt ein Gel- Volumen Isopropanol hinzugegeben und kurz gevortext. Der gesamte Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde dann auf die Säule pipettiert. Das Maximum an Säulenkapazität betrug  $800 \mu\text{l}$ . Das Reaktionsgefäß wurde nun für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert.

Im Anschluss daran wurde das Reaktionsgefäß mit dem abzentrifugierten Agarosegel verworfen. Die DNA enthaltende Säule wurde in ein neues steriles Reaktionsgefäß gestellt. Danach wurden  $500 \mu\text{l}$  des QIAgen- Buffers in das Reaktionsgefäß gegeben, und es wurde nochmals zentrifugiert. Dadurch wurde ein vollständiges Herauslösen der Agarose aus der Säule erreicht.

Um nun die DNA aus der Säule auszuwaschen, wurden  $750 \mu\text{l}$  Buffer PE auf die Säule pipettiert und zentrifugiert. Der abzentrifugierte Rest wurde verworfen, und es wurde noch einmal zentrifugiert. Jetzt wurde das Reaktionsgefäß verworfen und die Säule in ein steriles  $1,5 \text{ ml}$  Gefäß überführt. Zum Eluieren wurden dann  $30 \mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$  oder EB ( $10 \text{ mM}$  Tris-Cl, pH 8,5) zugegeben und ca. fünf Minuten gewartet. In dieser Zeit konnte sich die DNA an das Wasser binden und somit besser aus der Säule ausgeschleust werden. Im Anschluss daran wurde wieder zentrifugiert.

Zur Qualitätskontrolle der DNA wurden schließlich circa 7 µl der eluierten DNA auf ein zwei Prozentiges TBE- Gel aufgetragen und wiederum in einer Elektrophorese aufgetrennt.

Nach dem Fotografieren konnten nun die Basenpaarlängen und das erhaltene Produkt verglichen werden. Bei Übereinstimmung der Ergebnisse konnte der Rest der DNA dann schließlich sequenziert werden.

### **2.2.9 Sequenzierung**

Die extrahierten Amplifikationsprodukte wurden zur Sequenzierung mit einem Big Dye Terminator Kit (ABI, Weiterstadt, Deutschland) und dem jeweiligen back- Primer der ersten PCR in einer Konzentration von 5 pmol amplifiziert.

Die Auftrennung und Analyse erfolgte in einem Harnstoff- Polyacryl- Sequenziergel in einem Laser- Fluoreszenz- DNA- Sequenzer (ABI, Weiterstadt, Deutschland).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Housekeeping-Gen- Primer

Die housekeeping- Gen- Primer beta- 2- Mikroglobulin ( $\beta$ -2-MG) und Porphobilinogen- Deaminase (PBGD) dienten der wiederholten Qualitätssicherung der verwendeten RNA beziehungsweise cDNA. Nur die Knochenmarksaspirate, die in den housekeeping- Gen- Primern ein Amplifikationsprodukt aufwiesen, wurden in die Arbeit aufgenommen.

Die Tabellen 7 und 8 zeigen die Basensequenzen dieser Primer.

Für die RT- PCR und die zweifache Amplifikation wurden jeweils die gleichen Primer- Paare verwendet.

##### 3.1.1 beta- 2- Mikroglobulin

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUENZ</b>
<b><math>\beta</math>-2- MG SE</b>	<b>5' - AGC GTA CTC CAA AGA TTC AGG TT- 3'</b>
<b><math>\beta</math>-2- MG AS</b>	<b>5' - ATG ATG CTG CTT ACA TGT CTC GAT- 3'</b>

Tabelle 7: Basensequenzen der housekeeping- Gen- Primer beta-2- Mikroglobulin  $\beta$ -2-MG 2 SE (sense) und  $\beta$ -2-MG AS (antisense)

Der Marker beta- 2- Mikroglobulin wurde wie die anderen Marker zuerst an sechs verschiedenen tumorfreien Lymphknoten von Patienten mit malignen Melanomen aus der Universitäts- Hautklinik Tübingen untersucht. Hier musste bei allen Proben ein Amplifikationsprodukt nachweisbar sein. Dies war bei allen Lymphknoten der Fall, wie in Abbildung 1 zu sehen ist:

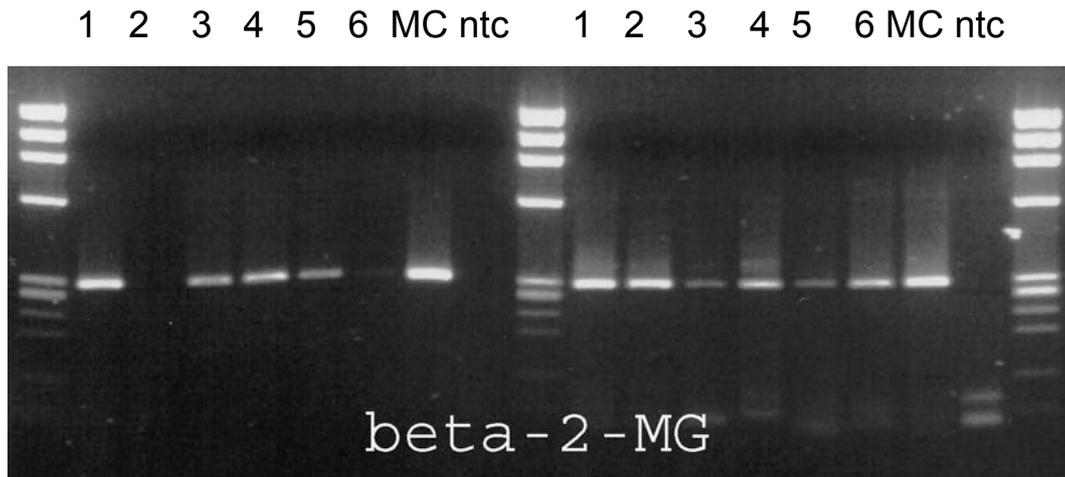


Abbildung 1: 1-6, tumorfreie Lymphknoten von Patienten mit malignen Melanomen; MC, Mammakarzinom; ntc, no template control (306 bp)

Auf der linken Hälfte der Abbildung 1 ist die RT- PCR zu sehen. Hier war noch nicht bei allen Proben eine Bande sichtbar. Nach zweifacher Amplifikation mit denselben Primerpaaren wiesen aber schließlich alle Lymphknoten ein Amplifikationsprodukt mit der Länge von 306 Basenpaaren auf (rechte Hälfte der Abbildung 1).

Diese sechs Lymphknoten wurden auch für das andere housekeeping- Gen-Primer- Paar PBGD se/ pbgd 3.1 R und die zu untersuchenden Marker Maspin, Mammaglobin, Carcinoembryonales Antigen und Zytokeratin 20 verwendet.

Abbildung 2 zeigt die Austestung der Primer für das housekeeping- Gen beta-2- Mikroglobulin zusätzlich zu einem Lymphknoten an zwei Mammakarzinomen aus der Universitäts- Frauenklinik und an genomischer DNA:

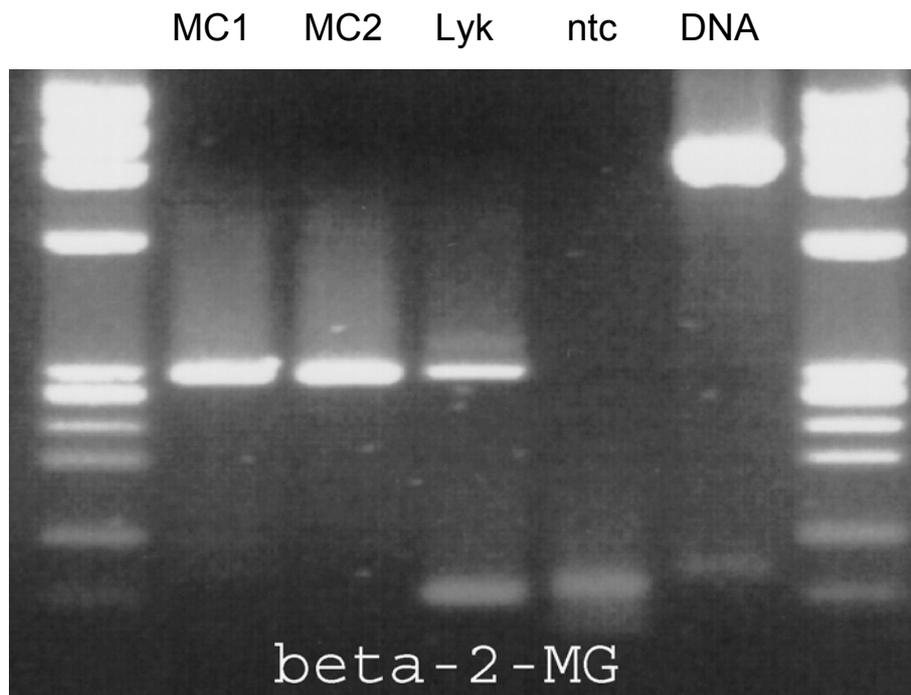


Abbildung 2: Primeraustestung an zwei Mammakarzinomen (MC1 und 2, cDNA), einem Lymphknoten (Lyk, cDNA) und an genomischer DNA; ntc, no template control (**306 bp**)

Man sieht hier deutlich die unterschiedliche Höhe der Produkte von cDNA (306 Basenpaare) und DNA (933 Basenpaare) nach Amplifikation.

In Abbildung 3 sind 15 der 80 Knochenmarksaspirate nach Amplifikation mit den beta-2- Mikroglobulin- Primern dargestellt.

Es wurden immer dieselben 15 Knochenmarksaspirate für die Bilddarstellung der Ergebnisse der untersuchten Marker verwendet.

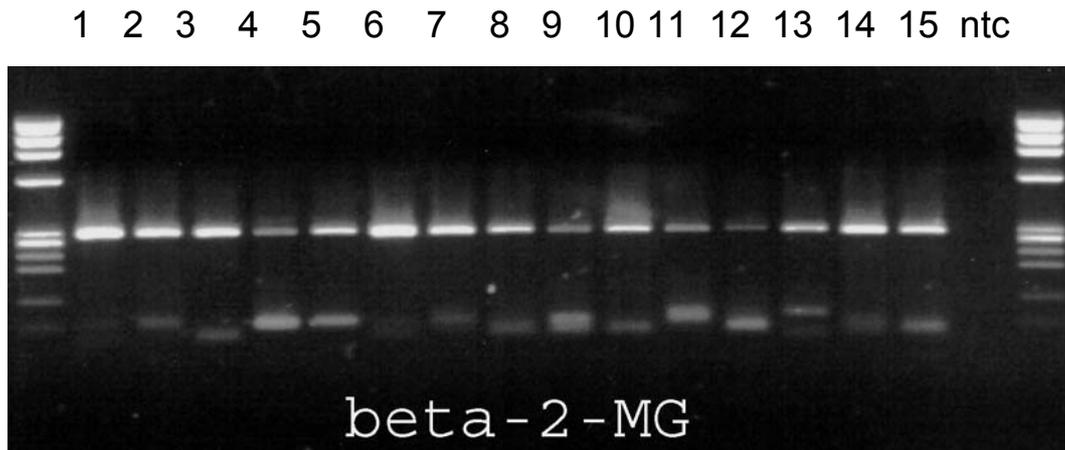


Abbildung 3: 1-15, Knochenmarksaspirate nach beta- 2- MG- Amplifikation; ntc, no template control (**306 bp**)

Alle untersuchten Knochenmarksaspirate zeigen eine Bande bei 306 Basenpaaren.

### 3.1.2. Porphobilinogen- Deaminase

PRIMER	SEQUENZ
PBGD se	5` - AGA GTG ATT CGC GTG GGT ACC- 3`
pbgd 3.1 R	5` - GGC TCC GAT GGT GAA GCC- 3`

Tabelle 8: Basensequenzen der housekeeping- Gen- Primer PBGD se (sense) und pbgd 3.1 R (reverse = antisense)

Auch dieser Marker wurde an den sechs ausgewählten Lymphknoten der Melanom- Patienten getestet und zeigte ebenfalls gute Ergebnisse.

Alle Lymphknoten wiesen spätestens nach der zweifachen Amplifikation mit denselben Primerpaaren (rechte Hälfte der Abbildung 4) eine Bande auf der Höhe von 281 Basenpaaren auf (Abbildung 4).

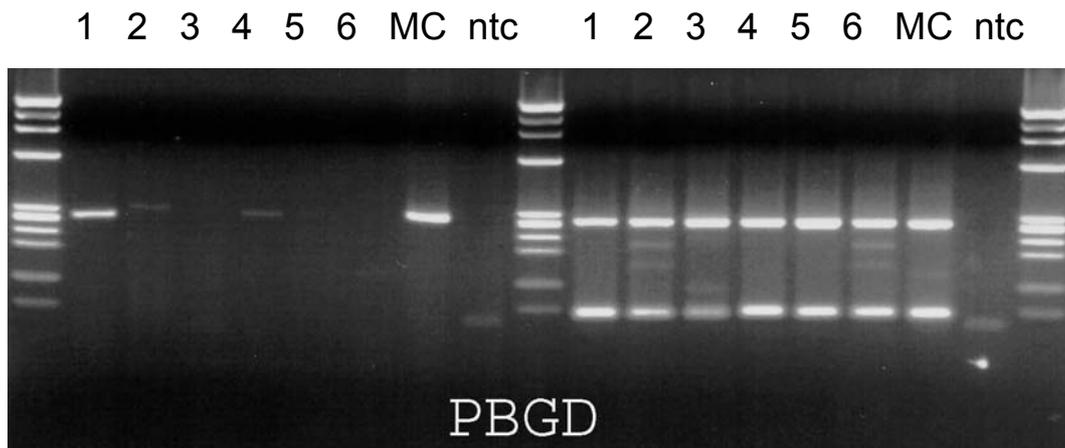


Abbildung 4: 1-6, tumorfreie Lymphknoten von Patienten mit malignen Melanomen; MC, Mammakarzinom ; ntc, no template control (281 bp)

Auch bei diesem Primer wurde die DNA mit untersucht.

Hier ist die unterschiedliche Höhe der cDNA- und der DNA- Bande deutlich zu erkennen (Abbildung 5).

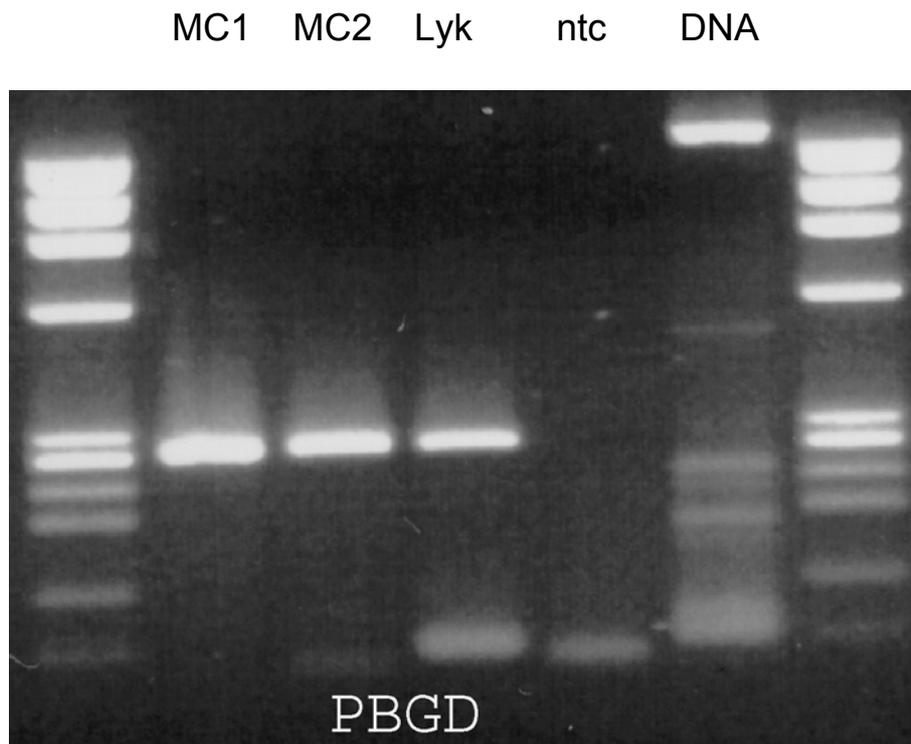


Abbildung 5: Primeraustestung an zwei Mammakarzinomen (MC1 und 2, cDNA), einem Lymphknoten (Lyk, cDNA) und an genomischer DNA; ntc, no template control (**281 bp**)

Das Amplifikationsprodukt der cDNA beträgt 281 Basenpaare. Das der DNA dagegen befindet sich auf der Höhe von über 1353 Basenpaaren.

Die 15 Knochenmarksaspirate waren ebenfalls alle positiv für den Marker PBGD (Abbildung 6).

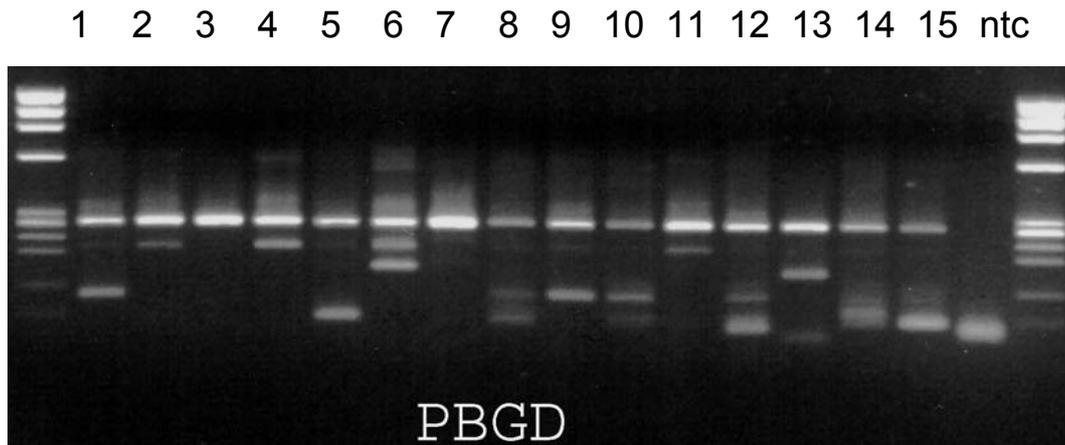


Abbildung 6: 1-15, Knochenmarksaspirate nach PBGD- Amplifikation; ntc, no template control (**281 bp**)

### 3.2 Maspin

Tabelle 9 zeigt die Basensequenzen der aus der Literatur [38] ausgewählten und in der Arbeit verwendeten Primer für die RT- PCR und die nested- RT- PCR.

PCR	PRIMER	SEQUENZ
RT-PCR	Maspin 1F	5'- TCA AGC GGC TCT ACG TAG AC- 3'
	Maspin 1B	5'- CCT CCA CAT CCT TGG GTA GT- 3'
nested- RT- PCR	Maspin 2F	5'- GAT CTC ACA GAT GGC CAC TT- 3'
	Maspin 2B	5'- GCA CTG GTT TGG TGT CTG TC- 3'

Tabelle 9: Basensequenz Maspin (F= forward primer; B= backward primer)

Das gesuchte Produkt der Maspin Reversen- Transkriptase (RT)- Polymerase- Ketten- Reaktion mit den RT- PCR- Primern Maspin 1F/ 1B hat eine Länge von 447 Basenpaaren. Das Produkt der nested- RT- PCR beträgt 175 Basenpaare. In einer Verdünnungsreihe konnten Maspin- Transkripte bis zu einer Verdünnung von bis zu  $10^{-1}$  nachgewiesen werden (Abbildung 7), was im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Daten liegt. Die erste Stufe entspricht einem RNA- Gehalt von 150 ng.

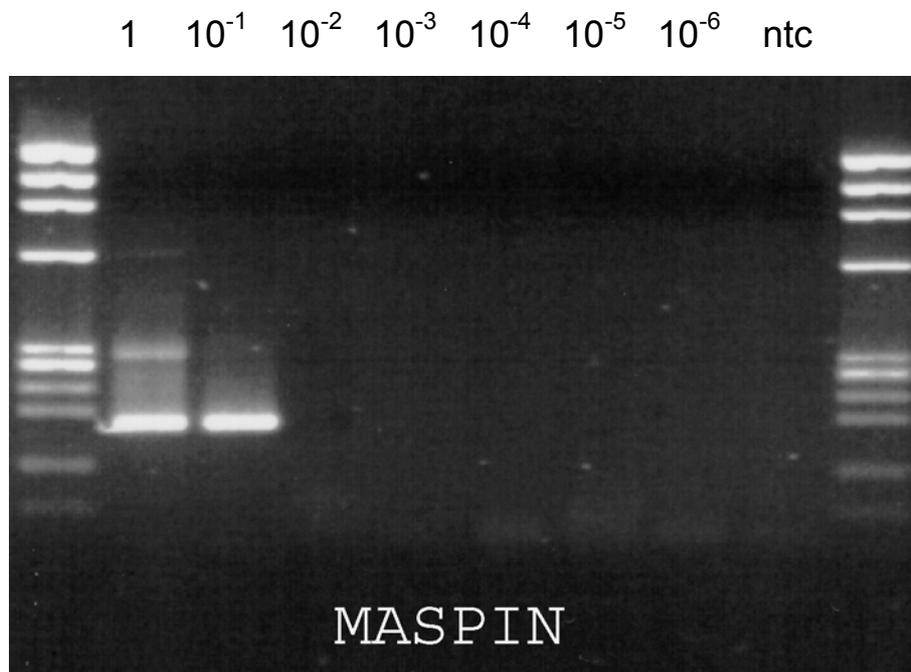


Abbildung 7: Verdünnungsreihe Maspin (nested- RT- PCR, **175 bp**); ntc, no template control

Alle zu untersuchenden Primer wurden an den sechs tumorfreien Lymphknoten der Patienten mit malignen Melanomen untersucht um auszuschließen, dass sie bereits hier ein Amplifikationsprodukt aufweisen.

Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse von RT- PCR und nested- RT- PCR an den Lymphknoten der Patienten aus der Universitäts- Hautklinik:

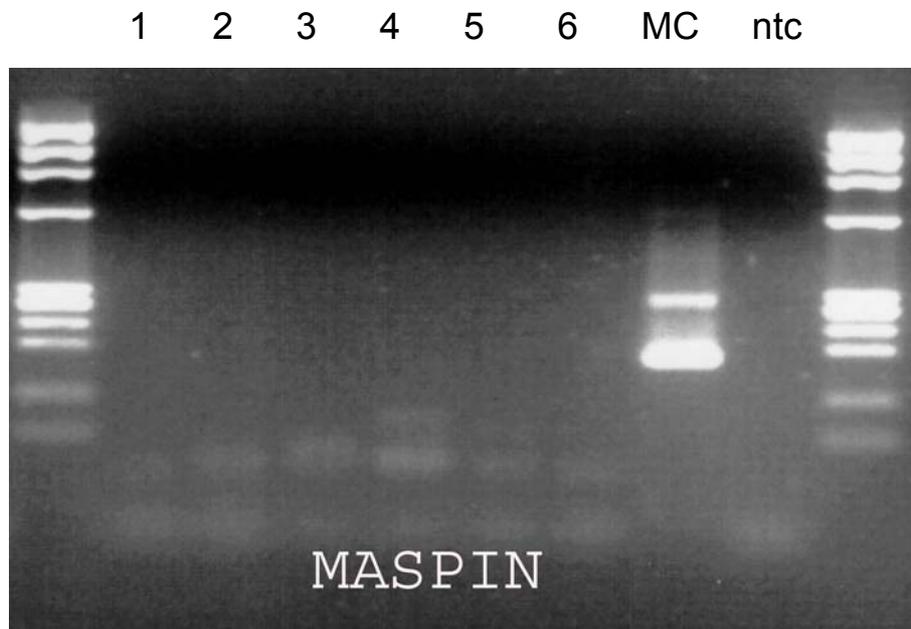


Abbildung 8: 1-6, tumorfreie Lymphknoten von Patienten mit malignen Melanomen; MC, Mammakarzinom; ntc, no template control (nested- RT- PCR, **175 bp**)

In Abbildung 8 kommt die Bande des untersuchten Mammakarzinoms nach nested- RT- PCR bei 175 Basenpaaren zur Darstellung.

Alle sechs getesteten Lymphknoten wiesen kein Amplifikationsprodukt für Maspin auf. Dies war die Voraussetzung dafür, dass dieser Marker für die Arbeit ausgewählt wurde.

Danach wurden die Maspin- Primer zur Amplifikation von cDNA an Mammakarzinom- Gewebe eingesetzt.

Abbildung 9 zeigt die Resultate der nested- RT- PCR mit den zugehörigen Maspin- Primern an zwei verschiedenen Mammakarzinom- Proben, an einem Lymphknoten sowie an genomischer DNA:

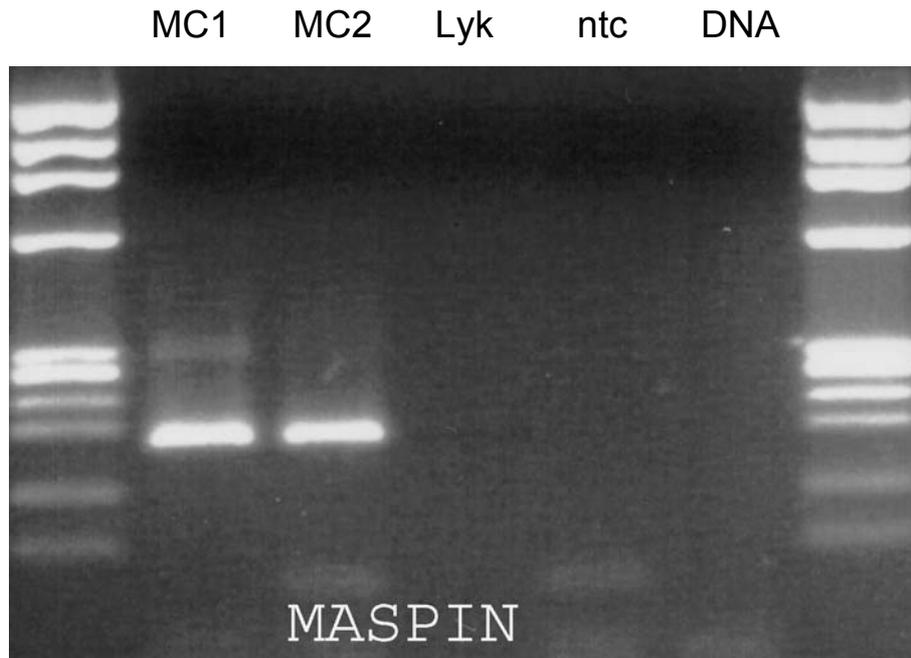


Abbildung 9: Primeraustestung an zwei Mammakarzinomen (MC1 und 2, cDNA), einem Lymphknoten (Lyk, cDNA) und an genomischer DNA; ntc, no template control (nested- RT- PCR, **175 bp**)

Hier konnte in den untersuchten Mammakarzinom- Proben für Maspin cDNA ein spezifisches Produkt von 175 Basenpaaren nachgewiesen werden. Der getestete Lymphknoten war negativ. Für die genomische DNA war mit den ausgewählten Primerpaaren kein Amplifikationsprodukt entstanden. Die Primer waren so gewählt, dass ihre Basensequenzen Intron- übergreifend waren. So konnte für die genomische DNA kein Amplifikationsprodukt entstehen.

In den von uns untersuchten 80 Knochenmarksaspiraten konnten in 24 Fällen (30%) Maspin mRNA nachgewiesen werden. Abbildung 10 zeigt die Anzahl der Maspin- mRNA positiven Fälle, eingeteilt nach Tumorstadien:

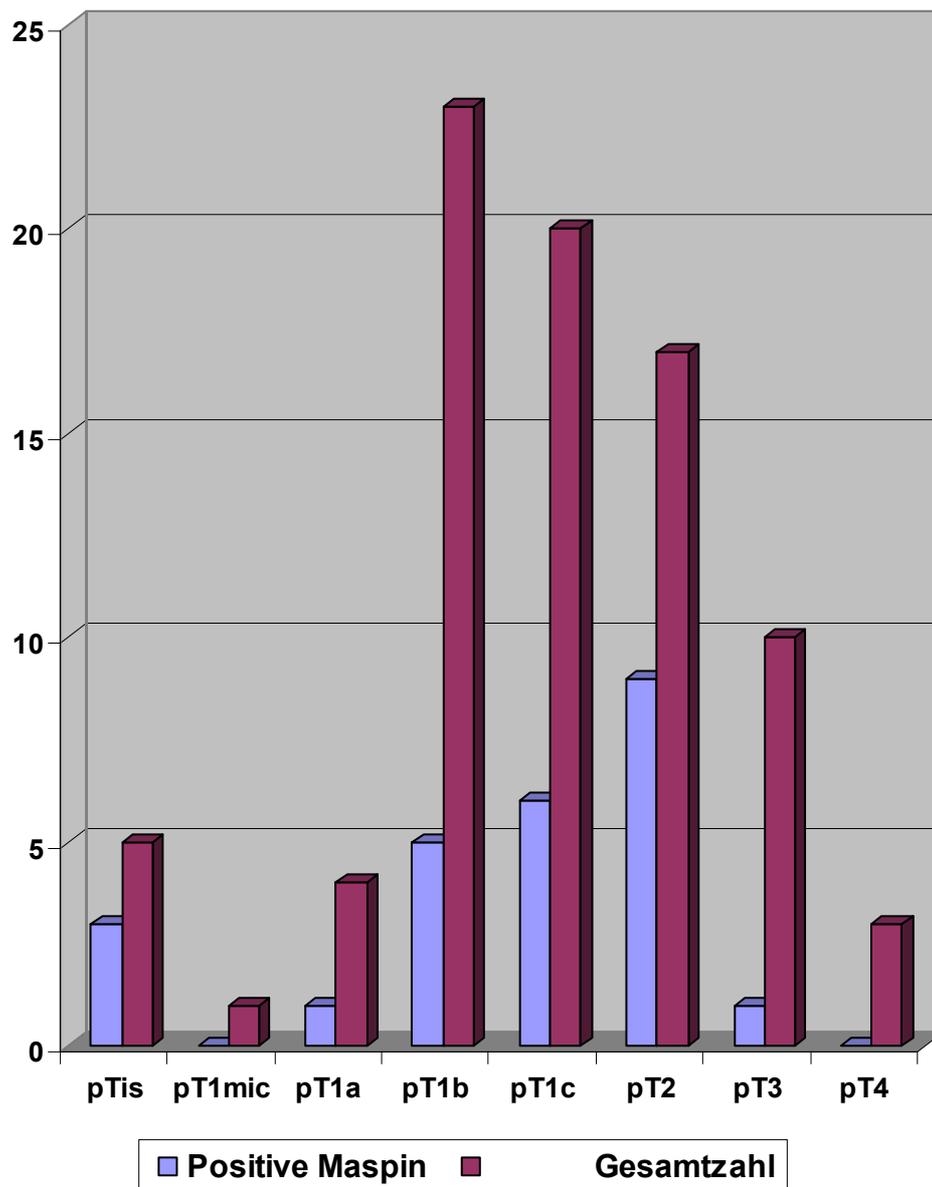


Abbildung 10: Anzahl positiver Proben Maspin

Tabelle 10 zeigt die Anzahl der positiven Fälle für Maspin- mRNA für die einzelnen Tumorstadien getrennt aufgelistet:

Tumorstadium	Positive Maspin	Gesamtzahl	%
pTis	3	5	60
pT1mic	0	1	0
pT1a	1	4	25
pT1b	5	23	21,7
pT1c	6	20	30
pT2	9	17	52,9
pT3	1	10	10
pT4	0	3	0

Tabelle 10: Anzahl positiver Proben Maspin

Abbildung 11 zeigt eine Auswahl der positiven Knochenmarksaspirate nach einer nested- RT- PCR:

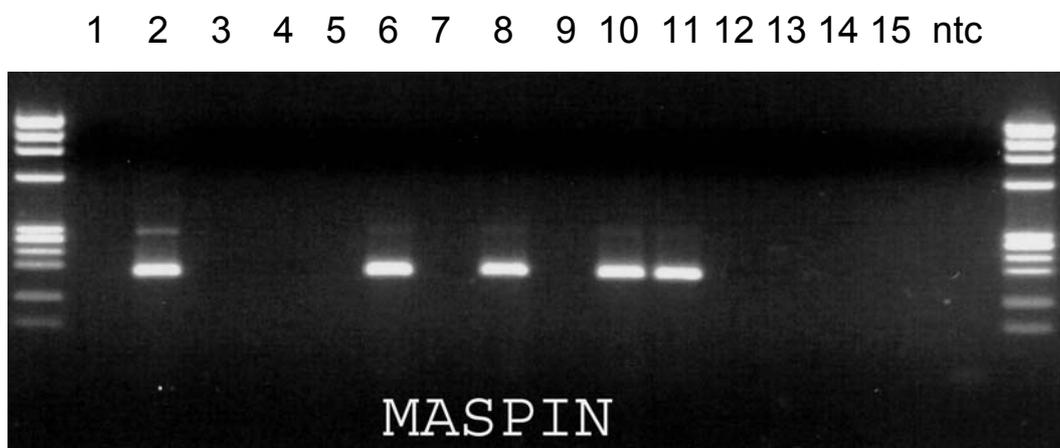


Abbildung 11: 1-15, Knochenmarksaspirate nach Maspin- Amplifikation; ntc, no template control (nested- RT- PCR, 175 bp)

### 3.3 Humanes Mammaglobin

In Tabelle 11 sind die Basensequenzen der verwendeten Mammaglobin- Primer für die RT-PCR und die nested- RT- PCR aufgeführt:

PCR	PRIMER	SEQUENZ
RT-PCR	MaGlo 1F*	5'- CAG CGG CTT CCT TGA TCC TTG- 3'
	MaGlo 1B'	5'- ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG- 3'
nested- RT-PCR	MaGlo 2F*	5'- TGA ACA CCG ACA GCA GCA G- 3'
	MaGlo 2B'	5'- TCC GTA GTT GGT TTC TCA CC- 3'

Tabelle 11: Basensequenzen Mammaglobin (F= forward primer, B= backward primer)

Das gesuchte Produkt der Mammaglobin- RT- PCR beträgt 429 Basenpaare, das der nested- RT- PCR 301 Basenpaare.

Abbildung 12 zeigt die Verdünnungsreihe von Mammaglobin:

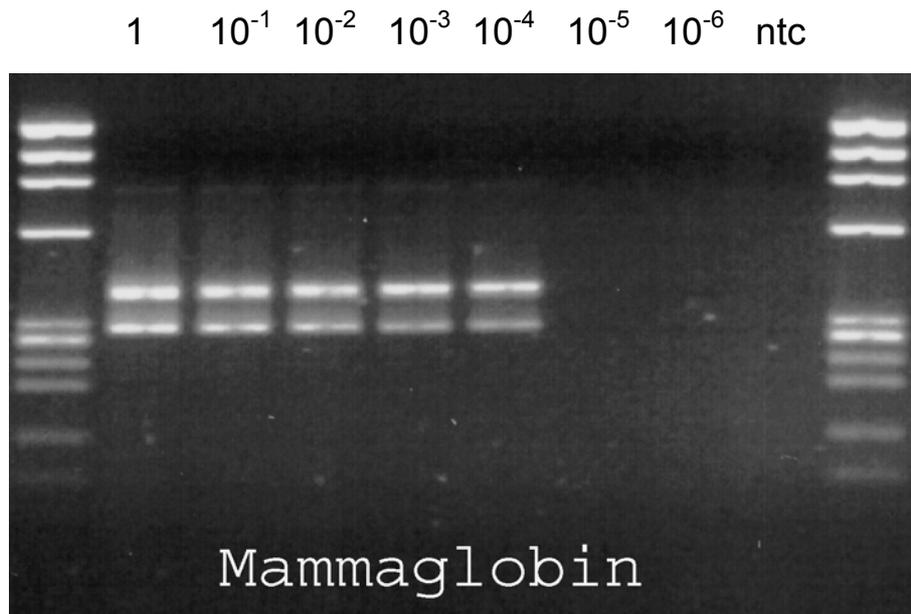


Abbildung 12: Verdünnungsreihe Mammaglobin (nested- RT- PCR, **301 bp**); ntc, no template control

Der Marker Mammaglobin konnte bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-4</sup> nachgewiesen werden. Dies stellt die beste Nachweisgrenze aller untersuchten Marker dieser Arbeit dar.

Wie bei den anderen untersuchten Genen wurden auch die Mammaglobin-Primer zuerst an cDNA aus Lymphknotengewebe der Melanom- Patienten getestet.

Hierzu Abbildung 13:

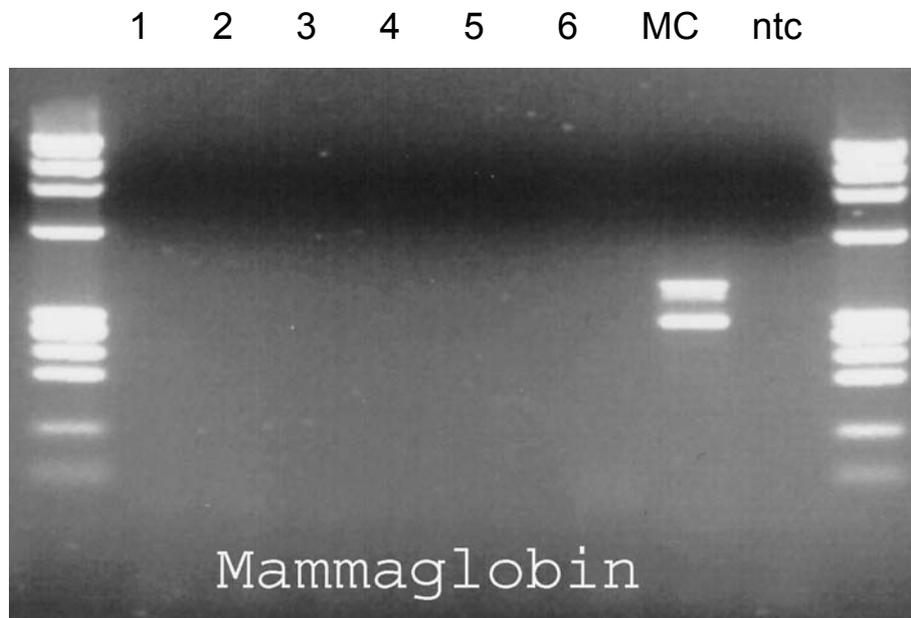


Abbildung 13: 1-6, tumorfreie Lymphknoten von Patienten mit malignen Melanomen; MC, Mammakarzinom; ntc, no template control (nested- RT- PCR, **301bp**)

Hier kommt nur das getestete Mammakarzinom zur Darstellung. Die sechs untersuchten Lymphknoten sind alle negativ.

Danach wurden die Mammaglobin- Primer an cDNA aus Mammakarzinom-Gewebe und an genomischer DNA getestet, wie in Abbildung 14 gezeigt:

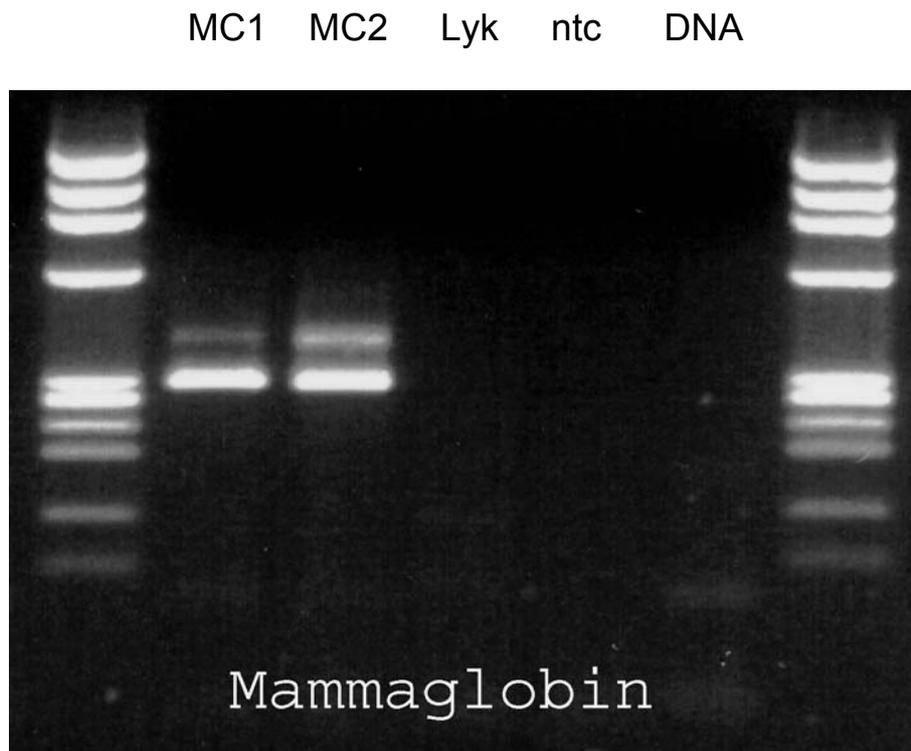


Abbildung 14: Primeraustestung an zwei Mammakarzinomen (MC1 und 2, cDNA), einem Lymphknoten (Lyk, cDNA) und an genomischer DNA; ntc, no template control (nested- RT- PCR, **301 bp**)

Die beiden Mammakarzinome zeigen nach nested- RT- PCR jeweils ein Amplifikationsprodukt mit der Länge von 301 Basenpaaren. Der Lymphknoten ist negativ. Die genomische DNA konnte mit diesen Primer- Paaren ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Von den 80 untersuchten Patientinnen konnte nur in 2 Fällen (2,5%) ein Mammaglobin- Transkript nachgewiesen werden. Ein Fall war ein Mammakarzinom im Stadium pT1b, der andere Fall war ein T4- Tumor (Abbildung 15).

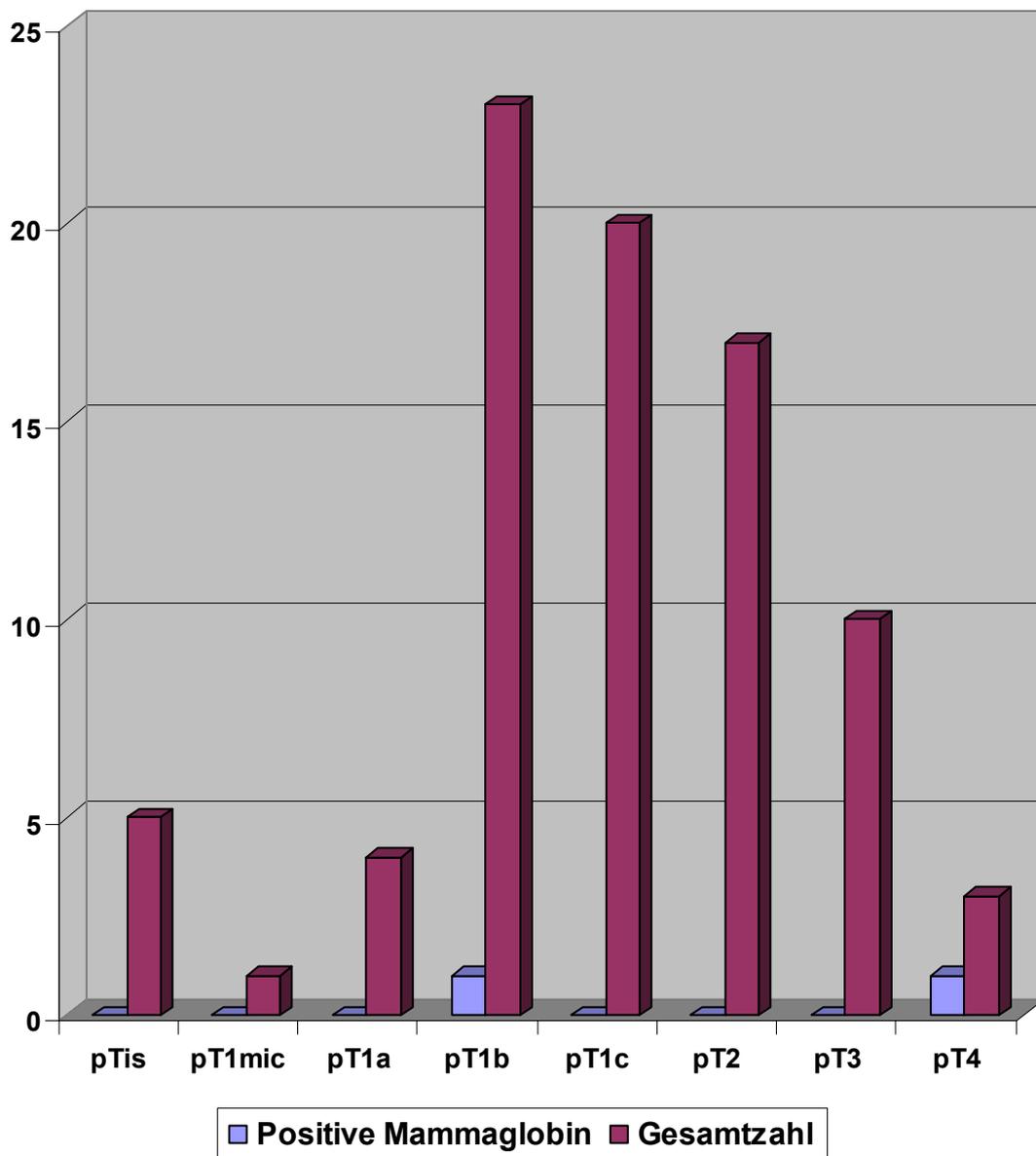


Abbildung 15: Anzahl positiver Proben Mammaglobin

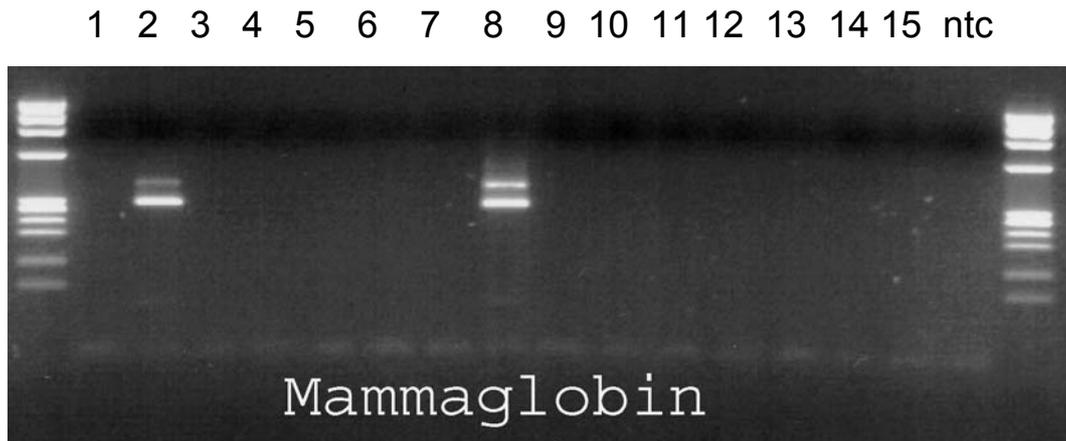


Abbildung 16: 1-15, Knochenmarksaspirate nach Mammaglobin- Amplifikation; ntc, no template control (nested- RT- PCR, **301 bp**)

Auffällig war jedoch die Tatsache, dass diese beiden Patientinnen zwei und vier Jahre nach der Primärdiagnose Rezidive in Milz, Nebenniere, Leber, Lymphknoten, Knochenmark und Gehirn erlitten. Beide Patientinnen wiesen bei Primärdiagnose bereits Knochenmetastasen auf. Eine der Patientinnen litt zusätzlich an einer Peritonealkarzinose.

In Abbildung 17 ist die Lokalisation der Metastasen nochmals dargestellt:

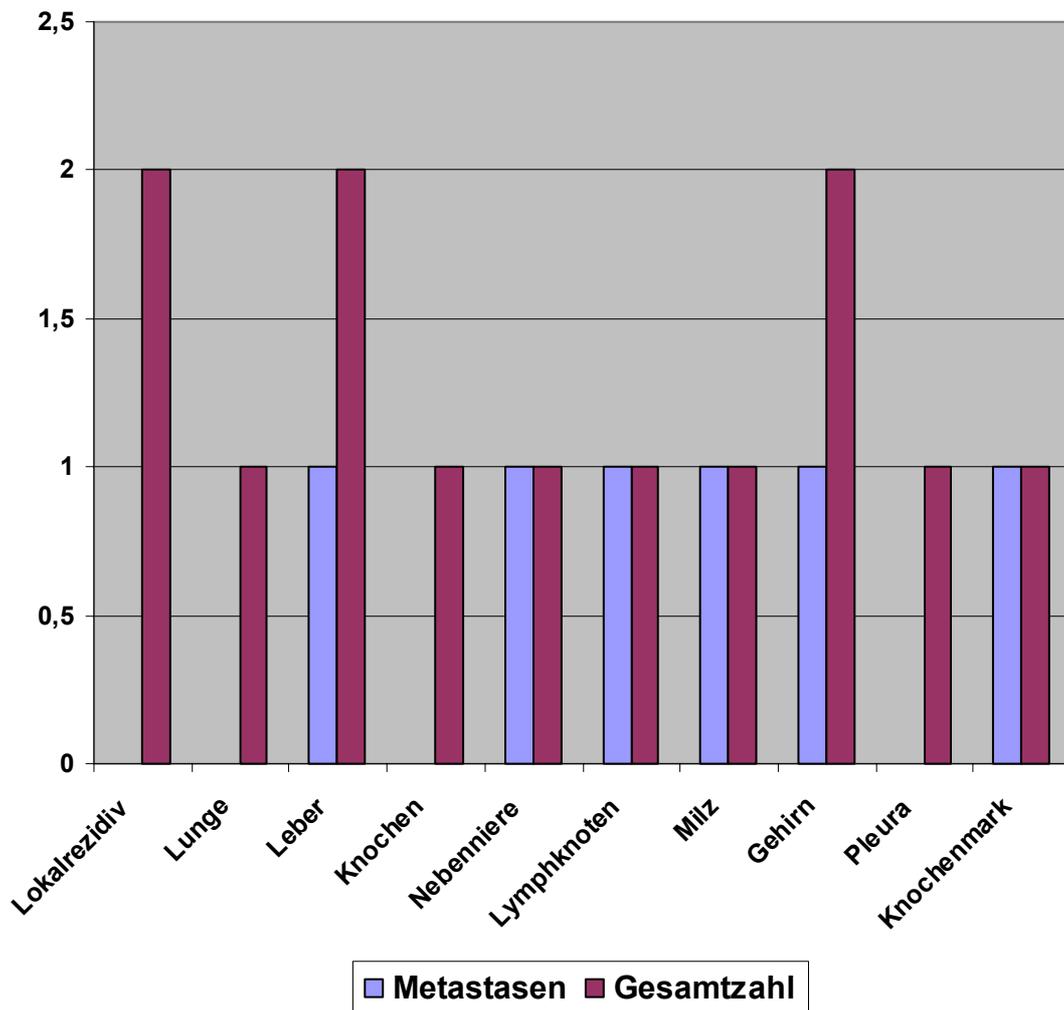


Abbildung 17: Lokalisation der Rezidive

### 3.4 Zytokeratin 20

Tabelle 12 zeigt die aus der Literatur ausgewählten Basensequenzen der verwendeten Zytokeratin 20- Primer für die RT- PCR und die nested- RT- PCR:

<b>GEN</b>	<b>PRIMER</b>	<b>SEQUENZ</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>CK 20 1F</b>	<b>5'- CCC ATC TCA GCA TGA AAG AGT CT- 3'</b>
	<b>CK 20 1B</b>	<b>5'- ACG ACC TTG CCA TCC ACT ACT- 3'</b>
<b>nested- RT-PCR</b>	<b>CK 20 2F</b>	<b>5'- AGG AGA CCA AGG CCC GTT AC - 3'</b>
	<b>CK 20 2B</b>	<b>5'- TGC TTA ACT GAT ATT CTG TAG TTT TTA CGT- 3'</b>

Tabelle 12: Basensequenzen CK20 (F= forward primer, B= backward Primer)

Das gesuchte Produkt der RT- PCR beträgt 334 Basenpaare, das der nested- RT- PCR 220 Basenpaare.

Die sechs getesteten Lymphknoten aus der Universitäts- Hautklinik wiesen für die verwendeten Zytokeratin 20- Primer kein Amplifikationsprodukt auf.

Positiv war nur das getestete Mammakarzinom.

Abbildung 18 zeigt die Verdünnungsreihe von CK20:

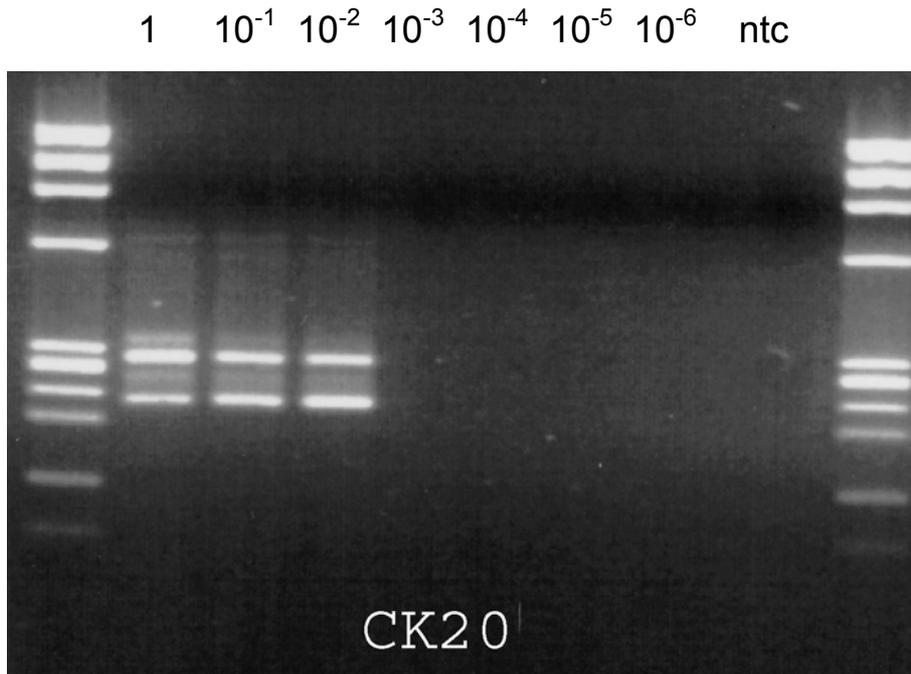


Abbildung 18: Verdünnungsreihe CK20 (nested- RT- PCR, **220 bp**); ntc, no template control

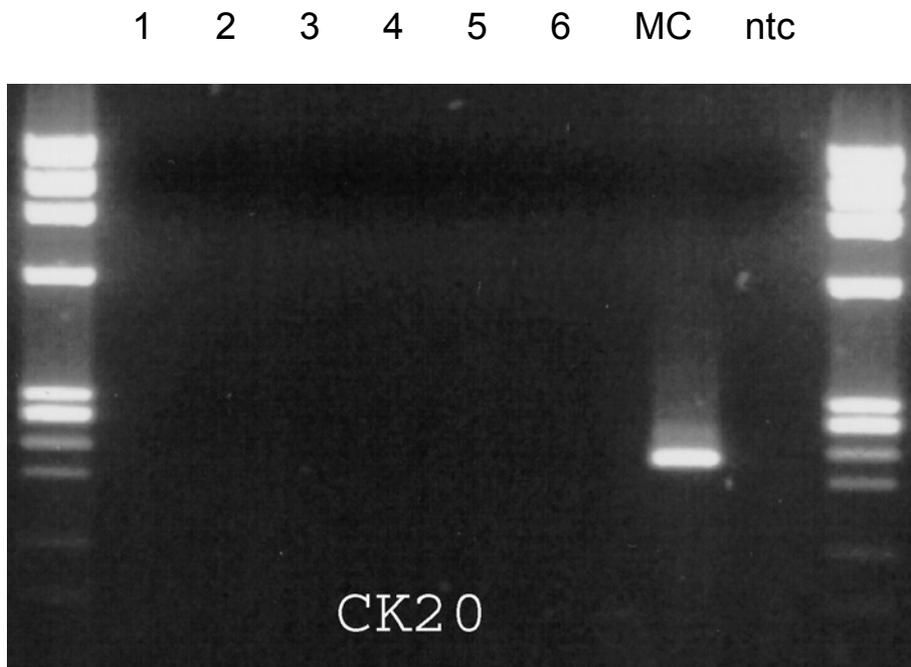


Abbildung 19: 1-6, tumorfreie Lymphknoten von Patienten mit malignen Melanomen; MC, Mammakarzinom; ntc, no template control (nested- RT- PCR, **220 bp**)

Es waren wiederum alle Lymphknoten negativ. Nur das getestete Mammakarzinom zeigte ein Amplifikationsprodukt (Abbildung 19).

Die Austestung an genomischer DNA brachte mit den verwendeten Primern kein positives Ergebnis (Abbildung 20). Es wurden weit Intron- übergreifende Primer verwendet.

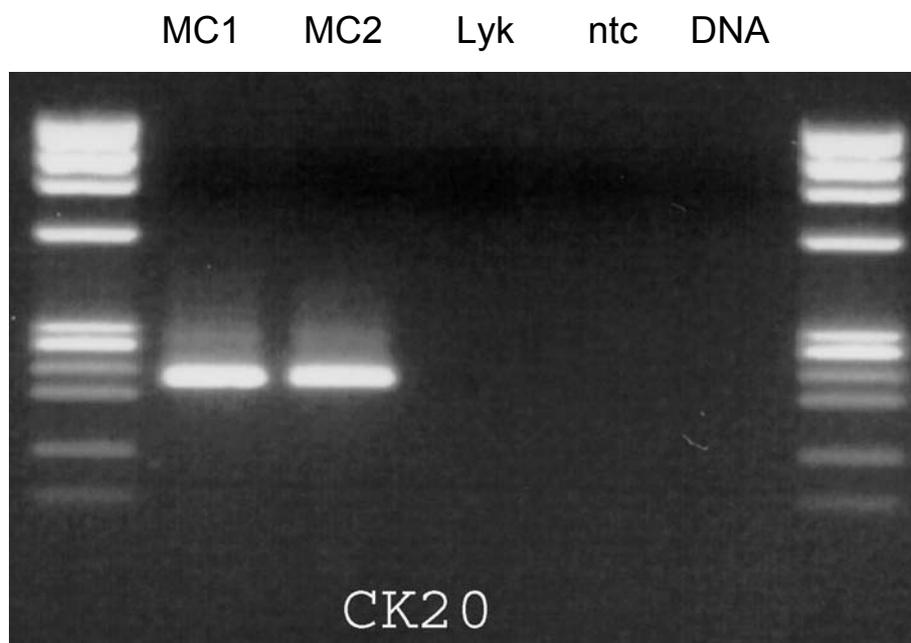


Abbildung 20: Primeraustestung an zwei Mammakarzinomen (MC1 und 2, cDNA), einem Lymphknoten (Lyk, cDNA) und an genomischer DNA; ntc, no template control (nested- RT- PCR, **220 bp**)

Von den getesteten 80 Knochenmarksaspiraten waren 35 (43,8%) positiv für CK20. Die meisten davon betrafen das Tumorstadium pT1c und pT2, wie in der zugehörigen Abbildung 21 zu sehen ist.

In Tabelle 13 ist die Anzahl der positiven Knochenmarksaspirate für jedes Tumorstadium einzeln aufgeführt.

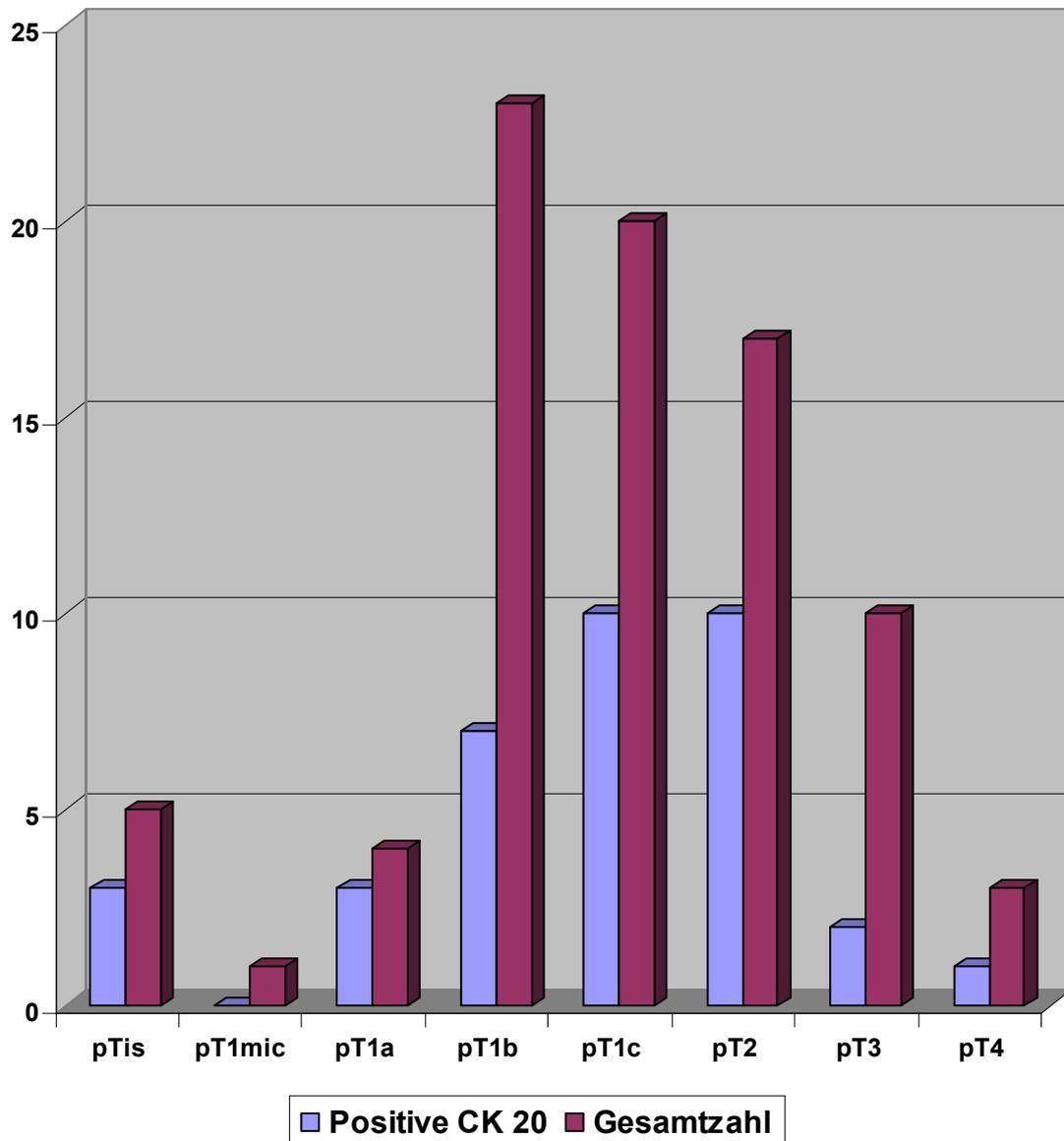


Abbildung 21: Anzahl positiver Proben CK20

Tumorstadium	Positive CK20	Gesamtzahl	%
pTis	3	5	60
pT1mic	0	1	0
pT1a	3	4	75
pT1b	7	23	30,4
pT1c	10	20	50
pT2	10	17	58,8
pT3	2	10	20
pT4	1	3	33,3

Tabelle 13: Anzahl positiver Proben CK20

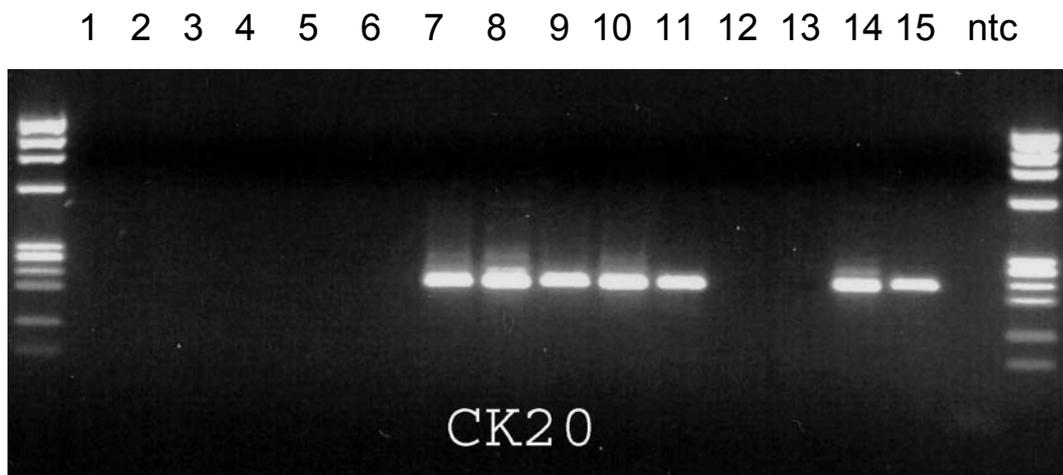


Abbildung 22: 1-15, Knochenmarksaspirate nach CK20- Amplifikation; ntc, no template control (nested- RT- PCR, 220 bp)

### 3.6 Carcinoembryonales Antigen

In Tabelle 14 sind die Basensequenzen der CEA- Primer dargestellt:

PCR	PRIMER	SEQUENZ
RT-PCR	CEA 1F	5'- TTC TCC TGG TCT CTC AGC TGG- 3'
	CEA 1B	5'- TGG TCT CGA TCT CTG GTC AGA G- 3'
nested- RT-PCR	CEA 2F	5'- ACT GTC GGC ATC ATG ATT GG- 3'
	CEA 2B	5'- GAC TGT AGC TGT TGC AAA TGC- 3'

Tabelle 14: Basensequenzen Carcinoembryonales Antigen

Die gesuchten PCR- Produkte betragen für die RT- PCR 215 Basenpaare und für die nested- RT- PCR 130 Basenpaare.

Abbildung 23 zeigt die Verdünnungsreihe von CEA:

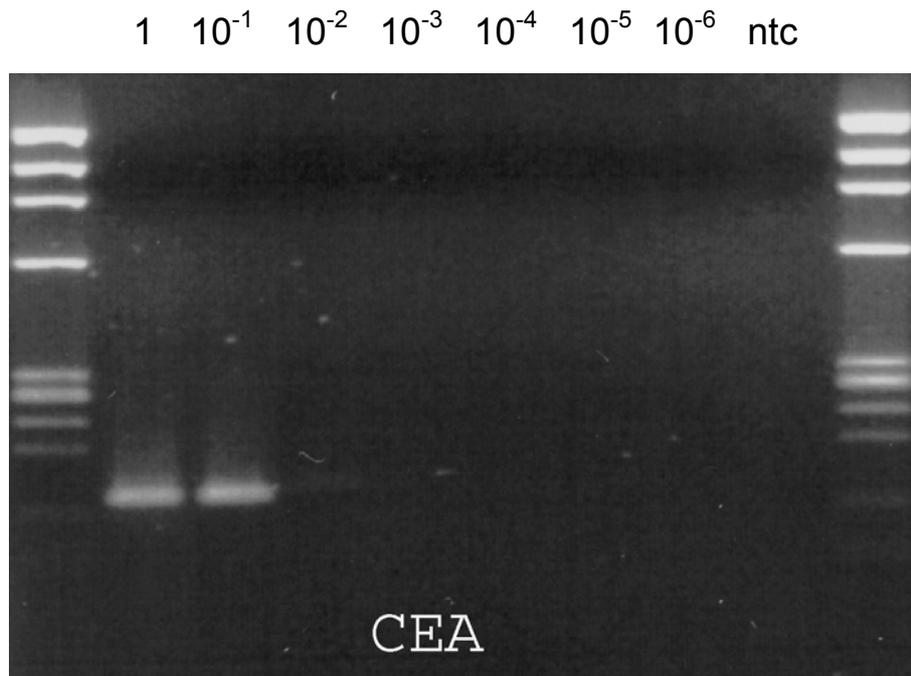


Abbildung 23: Verdünnungsreihe CEA (nested- RT- PCR, **130 bp**); ntc, no template control

Dieser Marker konnte ebenfalls mit in die Arbeit aufgenommen werden, weil auch bei der Austestung der zugehörigen Primer für die RT- PCR und die nested- RT- PCR an den sechs Lymphknoten von Melanom- Patienten keine Amplifikationsprodukte erschienen.

Die Austestung der Primer an genomischer DNA ergab wie erwartet, dass die cDNA der Mammakarzinome und die getestete genomische DNA eine unterschiedliche Höhe aufweisen.

Dies zeigt Abbildung 24:

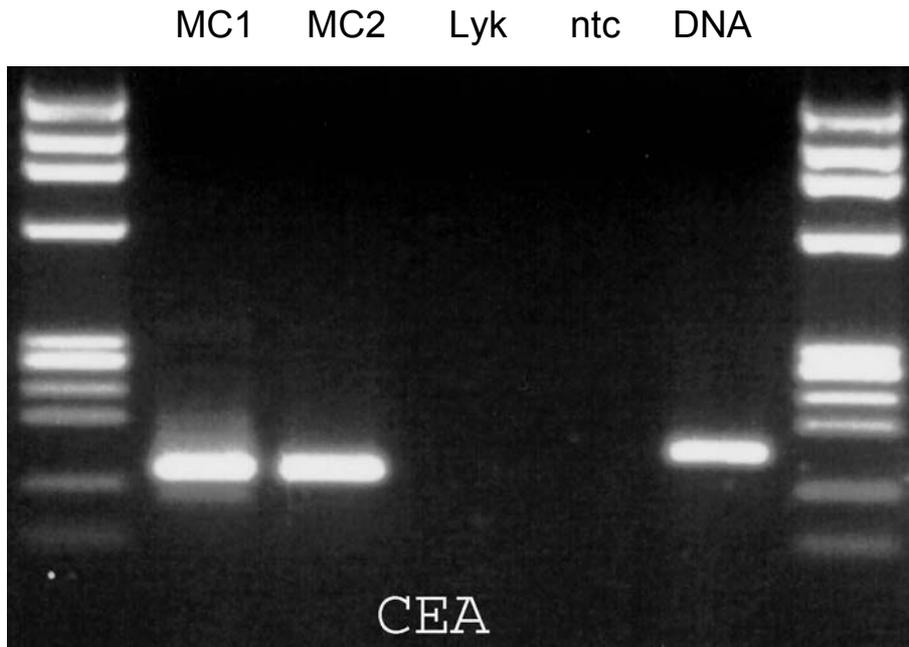


Abbildung 24: Primeraustestung an zwei Mammakarzinomen (MC1 und 2, cDNA), einem Lymphknoten (Lyk, cDNA) und an genomischer DNA; ntc, no template control (nested- RT- PCR, **130 bp**)

Von den getesteten 80 Knochenmarksaspiraten waren 71 (88,75%) positiv für CEA.

Es waren alle Tumorstadien gleichermaßen betroffen (Abbildung 25 und Tabelle 15).

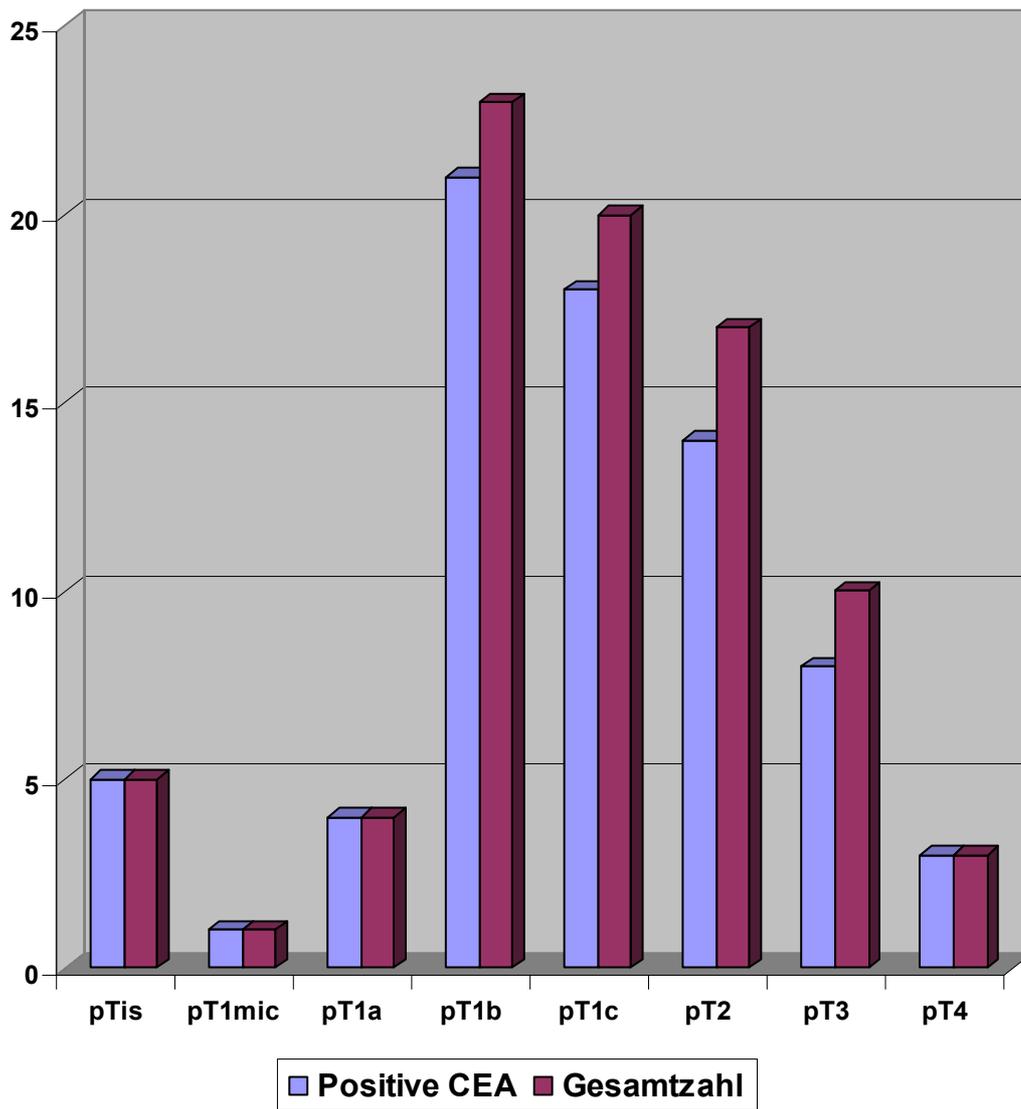


Abbildung 25: Anzahl positiver Proben CEA

Tumorstadium	Positive CEA	Gesamtzahl	%
pTis	5	5	100
pT1mic	1	1	100
pT1a	4	4	100
pT1b	21	23	91,3
pT1c	18	20	90
pT2	14	17	82,3
pT3	8	10	80
pT4	3	3	100

Tabelle 15: Anzahl positiver Proben CEA

Abbildung 26 zeigt eine Auswahl der positiven Knochenmarksaspirate für CEA:

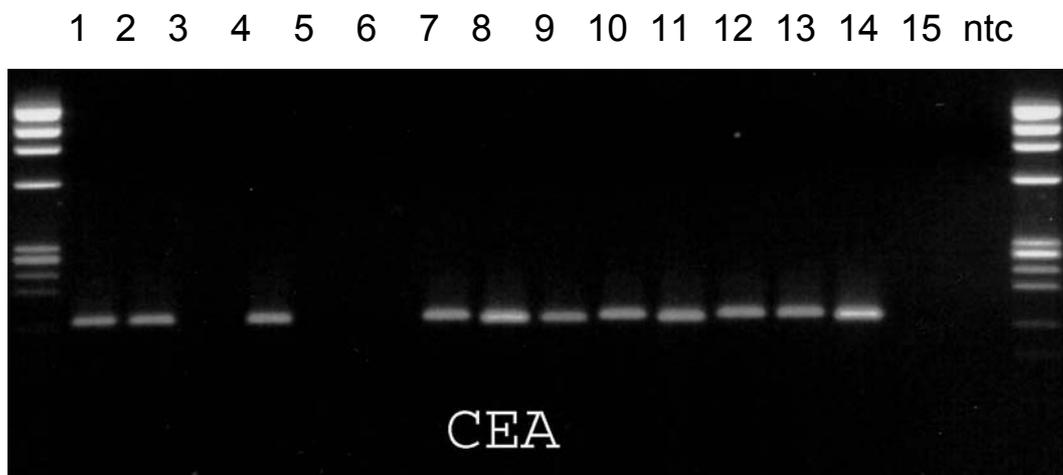


Abbildung 26: 1-15, Knochenmarksaspirate nach CEA- Amplifikation; ntc, no template control (nested- RT- PCR, 130 bp)

In Tabelle 16 sind alle Ergebnisse der untersuchten Knochenmarksaspirate nochmals zusammengefasst:

<b>Primer</b>	<b>Anzahl Positive</b>	<b>KMA, n=</b>	<b>%</b>
<b>Maspin</b>	<b>24</b>	<b>80</b>	<b>30</b>
<b>Mammaglobin</b>	<b>2</b>	<b>80</b>	<b>2,5</b>
<b>CK20</b>	<b>35</b>	<b>80</b>	<b>44</b>
<b>CEA</b>	<b>71</b>	<b>80</b>	<b>89</b>

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse; KMA, Knochenmarksaspirate

## 4. Diskussion

Patientinnen mit Mammakarzinom, die einer chirurgischen Therapie unterzogen worden sind und bei denen keine Metastasen in den axillären Lymphknoten oder an anderer Stelle nachgewiesen werden konnten, weisen trotzdem eine Rezidivrate von 30 bis 50 % über den Zeitraum von fünf bis zehn Jahren auf [7,8,27,28,33,91].

Nach einer chirurgischen Entfernung des Primärtumors können disseminierte Tumorzellen in der lymphatischen aber auch in der systemischen Zirkulation fortbestehen. Diese unentdeckten disseminierten Tumorzellen werden für ein späteres Rezidiv des Mammakarzinoms verantwortlich gemacht [52].

Bei Patientinnen mit Mammakarzinom ohne Lymphknotenmetastasen wurden im Knochenmark nachgewiesene Tumorzellen mit einem schnelleren Fortschreiten der Erkrankung und einer niedrigeren Überlebensrate assoziiert [18, 41].

Die Annahme, dass das Mammakarzinom also teilweise bereits zum Diagnosezeitpunkt als eine systemische Erkrankung anzusehen ist, legt die Untersuchung auch anderer Gewebearten als nur des Primärtumors und der axillären Lymphknoten nahe. Durch diese zusätzlichen Untersuchungen von Blut oder auch von Knochenmark kann möglicherweise die anschließend durchgeführte Therapie mitbestimmt und dadurch die Prognose der Patientinnen unter Umständen positiv beeinflusst werden.

So wurde die Reverse- Transkriptase- Polymerase- Ketten- Reaktion als eine überaus sensitive Methode für den Nachweis von Mikrometastasen in den axillären Lymphknoten sowie im Blut und Knochenmarksaspirat von Brustkrebs-Patientinnen eingesetzt [51, 55, 74, 75]. Ghossein und Rosai, 1996 bezeichneten die Polymerase- Kettenreaktion als eine bis zu hundertfach sensitivere Methode im Vergleich zu anderen konventionellen Techniken, um zirkulierende Tumorzellen und Mikrometastasen nachzuweisen.

Auch Sabbatini et al, 2000 beschrieben, dass die Polymerase- Ketten- Reaktion eine schnelle Methode mit einer zehn bis hundertfach höheren Sensitivität als zum Beispiel die routinemäßig durchgeführten immunologischen Methoden darstelle.

Die Zytokeratin RT- PCR beispielsweise wurde schon früh angewendet, um zirkulierende Tumorzellen bei Patientinnen mit Mammakarzinom zu entdecken [17].

Bis heute ist allerdings kein eindeutig Mammakarzinom- spezifisches Markergen für die RT- PCR bekannt, um disseminierte Karzinomzell- mRNA beispielsweise im Blut von Mammakarzinom- Patientinnen nachzuweisen [82].

Sehr häufig sind in der Literatur Berichte über falsch- positive Resultate bei praktisch allen untersuchten Markergenen zu finden.

So konnten auch im Blut oder im Knochenmark gesunder Probanden mittels RT- PCR Transkripte verschiedener „Markergene“ nachgewiesen werden.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, in Anbetracht des Fehlens eines spezifischen Markers, die aus der Literatur ausgewählten viel versprechenden Markergene Maspin, Mammaglobin, Zytokertin 20 und das Carcinoembryonale Antigen am eigenen Untersuchungsmaterial, nämlich Knochenmarksaspiraten von 80 Patientinnen mit Mammakarzinomen verschiedener Stadien, zu evaluieren.

Seit der Studie von Luppi et al, 1996 [39] wurde der Marker Maspin immer wieder an unterschiedlichen Materialien mit der gleichen Fragestellung untersucht. Ist er spezifisch für Mammagewebe und den davon abstammenden Zellen? Oder kann er auch in anderen Geweben, wie zum Beispiel in Lymphknotengewebe, nachgewiesen werden?

Zou et al, 1994 beschrieben, dass das Genprodukt Maspin von gesundem Mammaepithel aber nicht von den meisten Mammakarzinom- Zelllinien exprimiert würde. Analysiere man Proben von Mammakarzinomen, dann ginge die Maspin- Expression bei weit fortgeschrittenen Karzinomen schließlich verloren. Dies unterstütze die Hypothese, dass Maspin eigentlich ein Tumorsuppressorgen sei.

In anderen Studien konnte durch eine RT- PCR jedoch eindeutig eine Maspin- Expression, auch bei fortgeschrittenen Mammakarzinomen und in der Mammakarzinom- Zelllinie MCF- 7 nachgewiesen werden [39].

Dies könnte man vielleicht teilweise durch die hohe Sensitivität dieser Methode erklären. Hier entsteht jedoch wieder ein Konflikt durch die Tatsache, dass eine starke Maspin- Expression einen Schutz durch die Funktion als Proteinase- Inhibitor, der verschiedene Enzyme blockiert, bieten müsste und somit in weit fortgeschrittenen Karzinomen nicht nachweisbar sein sollte.

In unserer Arbeit konnten Maspin- Transkripte in den getesteten Mammakarzinom- Proben sowie in den untersuchten Knochenmarksaspiraten nachgewiesen werden.

Einige Autoren berichteten von falsch- positiven Ergebnissen. Sie konnten Maspin- Transkripte in Lymphknoten und im Blut deren Kontrollgruppe und, interessanterweise, ebenso im Blut von Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen nachweisen [38, 45, 49].

Falsch- positive Ergebnisse waren in den in dieser Arbeit getesteten sechs tumorfreien Kontroll- Lymphknoten von Melanom- Patienten aus der Universitäts- Hautklinik nicht zu verzeichnen. Maspin- Transkripte wurden in allen untersuchten Mammakarzinomen und Zelllinien, aber in keinem der sechs Kontroll- Lymphknoten nachgewiesen. Ebenso konnten Maspin- Transkripte in 24 der 80 (30%) Knochenmarksaspirate gefunden werden.

Luppi et al, 1996 wiesen ebenfalls in allen untersuchten Mammatumoren und Metastasen Maspin- Transkripte nach. Von den untersuchten 20 Knochenmarksaspiraten von Patientinnen im Tumorstadium T4 waren drei (15%) in einer Maspin- RT- PCR klar positiv.

Von unseren drei Patientinnen mit T4- Tumoren zeigte jedoch keines der Knochenmarksaspirate ein Maspin- Amplifikationsprodukt nach nested- RT- PCR. 18 von 55 (32%) der von uns untersuchten Maspin- positiven Knochenmarksaspirate stammten von nodal negativen (N0) Mammakarzinomen. Die restlichen sechs Proben sind Mammakarzinome der Stadien N1b, N1bi und N1biii.

Von diesen 24 Maspin- positiv getesteten Knochenmarksaspiraten wies nur eine Patientin (4%) bei Primärdiagnose Fernmetastasen (M1) auf. Diese Patientin entwickelte schließlich weitere Fernmetastasen nach einem und nach drei Jahren.

Von den 56 Knochenmarksaspiraten der Patientinnen, die Maspin- negativ waren, zeigten im Verlauf jedoch fünf Patientinnen (9%) die Entstehung einer Fernmetastasierung.

Der Marker Maspin konnte also nur eine der sechs Patientinnen (17%), die eine Fernmetastasierung entwickelten, identifizieren.

Ballestrero et al, 2001 beschrieben für Maspin eine Spezifität von 100%, da alle Knochenmarksaspirate gesunder Probanden negativ getestet wurden. Maspin sei demnach ein verlässlicher Marker, um eine eventuelle Metastasierung ins Knochenmark nachzuweisen.

Da in unserer Studie keine falsch- positiven Ergebnisse in den Kontroll-Lymphknoten (= Negativkontrollen) zu verzeichnen waren, kann diese Spezifität hier ebenfalls angenommen werden.

Aufgrund der doch relativ kleinen Fallzahlen, insbesondere des Tumorstadiums T4, kann eine genaue Aussage über die Sensitivität dieses Markers vor allem in diesem Stadium nicht gemacht werden.

Die cDNA des humanen Mammaglobins (hMAM) wurde im Jahre 1996 isoliert und von Watson und Fleming, 1996 erforscht [82]. Sie konnten Mammaglobin-Transkripte in gesundem und maligne verändertem Mammagewebe sowie in Mammakarzinom- Zelllinien nachweisen. In ihrer Studie waren 23% der Biopsien von Mammakarzinomen Mammaglobin- positiv. Die getesteten Lymphknoten, die als Negativkontrollen untersucht wurden, zeigten keine Mammaglobin- Amplifikate.

Zach et al, 1999 untersuchten 114 Proben peripheren Blutes von Mammakarzinom- Patientinnen in einer RT- PCR und konnten in 29 Fällen (25%) eine hMAM- mRNA- Expression nachweisen. 38% dieser Patientinnen wiesen ein bereits metastasiertes Mammakarzinom auf. Allerdings wurden auch

in zwei von 41 Fällen (5%) bei Patienten mit anderen malignen Grunderkrankungen hMAM- Transkripte nachgewiesen. Eine dieser Patientinnen litt an einem Schilddrüsenkarzinom, die andere an einem Mantelzell- Lymphom. Somit erwies sich der Marker Mammaglobin in ihrer Studie als deutlich weniger gewebespezifisch als, aufgrund voriger Literaturangaben, erwartet. Da sich die hMAM- Expression jedoch auf Krebspatientinnen beschränkte, könnte Mammaglobin zumindest als malignomspezifisch bezeichnet werden [82].

Suchy et al, 2000 untersuchten Blutproben von 98 Mammakarzinom-Patientinnen in einer RT- PCR. Elf dieser 98 Proben (11%) waren hMAM positiv. Insgesamt hatten 23 der 98 Patientinnen (23%) Fernmetastasen, darunter sechs der elf RT- PCR- positiven Patientinnen. Keine der 21 Proben gesunder freiwilliger Probanden enthielten hMAM- Transkripte.

In ihrer Studie untersuchten Suchy et al darüber hinaus Zelllinien verschiedener anderer humaner Karzinome, zum Beispiel der Mamma, des Kolons, der Leber, der Lunge und der Ovarien. Die stärkste mRNA- Expression wurde dabei in der Mammakarzinom- Zelllinie EFM-192 gefunden. Eine mRNA- Expression von Mammaglobin war allerdings auch in Tumor- Zelllinien anderer Organe nachweisbar. In 21 (Kontroll-) Blutproben gesunder freiwilliger Frauen konnten dagegen keine hMAM- Transkripte nachgewiesen werden. Mammaglobin war in dieser Arbeit somit nicht spezifisch für das Mammakarzinom. Falsch- positive Ergebnisse traten allerdings nicht auf.

Ooka et al, 2000 und Aihara et al, 1999 untersuchten verschiedene Marker wie zum Beispiel die Zytokeratine 19 und 20, das Mammaglobin, das Prostata Spezifische Antigen (PSA) und das Carcinoembryonale Antigen (CEA) im Zusammenhang mit dem Nachweis von Mikrometastasen in axillären Lymphknoten. Sie zeigten, dass der Marker Mammaglobin der sensitivste und verlässlichste dieser untersuchten Marker beim Nachweis von Mammakarzinomzellen sei.

Bei Ooka et al, 2001 waren 33 von 111 (30%) Knochenmarksaspiraten von Mammakarzinom- Patientinnen positiv für Mammaglobin.

Acht dieser 33 Patientinnen (24%) erlitten im Verlauf Fernmetastasen. Bei den übrigen 78 Patienten mit negativ getesteten Knochenmarksaspiraten traten in sechs Fällen (8%) im follow-up Fernmetastasen auf.

Auch in unserer Arbeit war Mammaglobin spezifisch für Mammagewebe. Die untersuchten tumorfreien Lymphknoten der Melanom- Patienten zeigten keine hMAM- Amplifikate. Enttäuschend waren jedoch die Ergebnisse bei den untersuchten Knochenmarksaspiraten. Nur in zwei von 80 Proben (2,5%) waren Mammaglobin- Amplifikate nachweisbar. Diese Patientinnen entwickelten jedoch beide innerhalb von zwei und vier Jahren nach Primärdignose eine Fernmetastasierung.

Von den 78 hMAM- negativ getesteten Knochenmarksaspiraten entwickelten vier Patientinnen (5%) Fernmetastasen. Diese vier Patientinnen konnten mit Hilfe des Markers Mammaglobin somit nicht identifiziert werden.

Das Zytokeratin 20 (CK20) wurde in der Literatur als ein mRNA- Marker für den Nachweis von Mikrometastasen vor allem bei Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen beschrieben [12, 32, 79, 80].

Bostick et al, 1998 untersuchten Sentinel- Lymphknoten von Patientinnen mit Mammakarzinom. In ihrer Arbeit war das Zytokeratin 20 der einzige Marker, der nicht im Blut, Knochenmark oder Lymphknoten gesunder Probanden nachgewiesen werden konnte. Ebenso testeten sie verschiedene Mammakarzinom- Zelllinien. Sie konnten schließlich in allen vier untersuchten Mammakarzinom- Zelllinien, in sechs von acht (75%) primären Mammakarzinomen und in drei von 22 (14%) Sentinel- Lymphknoten CK20- Transkripte nachweisen. Sie bezeichneten das Zytokeratin 20 daher als einen geeigneten Marker, um disseminierte Tumorzellen im peripheren Blut bei Mammakarzinom- Patientinnen nachzuweisen.

Von den in unserer Arbeit getesteten 80 Knochenmarksaspiraten waren 35 (44%) positiv für Zytokeratin 20. Auch für diesen Marker waren keine falsch-positiven Ergebnisse zu verzeichnen. Mit Hilfe des Markers Zytokeratin 20 konnte eine der sechs Patientinnen, die eine Fernmetastasierung entwickelten, identifiziert werden.

Die RT-PCR zum Nachweis des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) wurde erstmals von Gerhard et al, 1994 eingesetzt [24]. Das Carcinoembryonale Antigen konnte von vornherein nicht als tumorspezifisch für das Mammakarzinom bezeichnet werden, da es bei anderen Karzinomen, wie zum Beispiel dem Kolon-, Magen-, und Pankreaskarzinom bereits einen Tumormarker darstellt. Gerhard et al, 1997 beschrieben, dass das CEA in 40-70% dieser Karzinome sowie beim Mammakarzinom exprimiert würde. Sie benutzten die Polymerase-Ketten-Reaktion, um spezifische CEA-exprimierende Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit kolorektalen Karzinomen, Pankreas- und Magenkarzinom nachzuweisen. Bei Liefers et al, 1998 diente die Expression von CEA-mRNA in Lymphknoten von Patienten mit kolorektalen Karzinomen als prognostisches Hilfsmittel.

Trotzdem wurde das Carcinoembryonale Antigen immer wieder auch im Zusammenhang mit Brustkrebs und dem Nachweis von Tumorzellen in Organismus von Mammakarzinom-Patientinnen untersucht.

Berois et al, 2000 untersuchten die Knochenmarksaspirate von 42 Patientinnen und konnten in zwölf von 42 Fällen (29%) ein CEA-Transkript nachweisen. Die CEA-RT-PCR zeigte in ihrer Studie eine gute Korrelation mit einem positiven Lymphknoten-Status. Aber auch in 17% wurden positive Ergebnisse bei negativem Lymphknoten-Status nachgewiesen. Berois et al hielten den Marker CEA und die Methode für geeignet, um disseminierte Tumorzellen bei Brustkrebs-Patientinnen nachzuweisen.

Bostick et al, 1998 gestanden diesem Marker keinen diagnostischen Nutzen im Zusammenhang mit einem Tumorzellnachweis beim Mammakarzinom zu. Sie berichteten von sechs positiven CEA-Amplifikaten in Blutproben von 13 (46%) gesunden Personen und von drei CEA-positiven Lymphknoten bei drei gesunden Personen. Diese falsch-positiven Ergebnisse in Blut und Lymphknotengewebe gesunder Probanden zeige, dass CEA kein geeigneter Marker für diesen Zweck sei.

Falsch- positive Ergebnisse wurden in unserer Arbeit nicht gefunden, denn keiner der untersuchten Lymphknoten der Melanom- Patienten aus der Universitäts- Hautklinik zeigte ein CEA- Transkript.

Die Studie von Lopez- Guerrero et al 1999 wies ebenfalls keine falsch- positiven Ergebnisse auf. Sie untersuchten 84 Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom Stadium II-III. Sie erhielten in 70% der Fälle ein CEA- Transkript. Das Carcinoembryonale Antigen war in ihrer Studie der einzige spezifische Marker.

Min et al, 1998 konnten in 71% der Mammakarzinome ein CEA- Transkript nachweisen. Alle getesteten tumorfreien Lymphknoten waren negativ.

71 der untersuchten 80 (89%) Knochenmarksaspirate dieser Studie waren CEA- positiv. Die positiven Proben waren in allen Tumorstadien vertreten, sodass die CEA- Expression für kein Tumorstadium auffallend spezifisch war. Dasselbe gilt für den Lymphknotenbefall und den Grad der Metastasierung. Die sehr hohe Anzahl der positiven Knochenmarksaspirate lässt jedoch Zweifel aufkommen, ob es sich in allen Fällen tatsächlich um den Nachweis von disseminierten Mammakarzinom- Zellen handeln kann.

Was die Anzahl der Patientinnen mit Fernmetastasen angeht, so konnten mit dem Marker CEA vier von sechs Fällen (67%) identifiziert werden.

Mit Hilfe der vier untersuchten Marker Maspin, Mammaglobin, Zytokeratin 20 und Carcinoembryonales Antigen waren in dieser Arbeit keine falsch- positiven Ergebnisse zu verzeichnen. Wegen der relativ geringen Anzahl an Negativkontrollen, die durch die sechs tumorfreien Lymphknoten von Melanom- Patienten aus der Universitäts- Hautklinik repräsentiert wurden, sollte die sich daraus ergebende Spezifität aller Marker von 100% jedoch kritisch angesehen werden. Die Tauglichkeit der einzelnen Marker für den Nachweis disseminierter Tumorzellen könnte möglicherweise in weiteren Studien noch genauer untersucht werden.

Wünschenswert wäre in diesem Zusammenhang jedoch ein längeres follow- up der untersuchten Patientengruppe, um eine genaue Beurteilung des Verlaufs der Erkrankung ermöglichen zu können.

Die hier angewendete Methode des Nachweises von disseminierten Tumorzellen im Knochenmarksaspirat von Patientinnen mit Mammakarzinom mittels der nested- RT- PCR kann zum jetzigen Zeitpunkt auch durch das doch relativ kurze follow- up nicht als ausreichend evaluiert angesehen werden, um sicher Patientinnen mit fortgeschrittenem Tumorleiden zu identifizieren oder gar prognostische Aussagen über ein mögliches Auftreten von Metastasen oder Rezidiven zu machen, die eine prophylaktische (Chemo-) Therapie rechtfertigen würde.

## 5. Zusammenfassung

Wie bei anderen Malignomen wird auch beim Mammakarzinom seit Jahren nach Markergenen gesucht, die über ihren Nachweis von disseminierten Tumorzellen eine systemische Ausbreitung der Grunderkrankung anzeigen mit daraus resultierendem erhöhtem Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen und Rezidiven.

Ziel ist es, Patientinnen zu identifizieren, die einer aggressiveren adjuvanten Therapie bedürfen, beziehungsweise diese nicht benötigen.

Als potentielle Markergene werden unter anderem Maspin, Mammaglobin, Zytokeratin 20 (CK20) und das Carcinoembryonale Antigen (CEA) in der Literatur diskutiert. Dabei tauchten immer wieder Literaturberichte auf, die über falsch- positive Ergebnisse bei gesunden Kontrollpersonen berichteten.

So ist für das Mammakarzinom bis heute kein spezifisches Markergen bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Tauglichkeit der einzelnen oben genannten Markergene zum Nachweis disseminierter Tumorzellen in Knochenmarksaspiraten von 80 Patientinnen mit Mammakarzinomen unterschiedlicher Stadien mittels nested- RT- PCR untersucht werden.

Die PCR Primer und Reaktionsbedingungen wurde durch Untersuchung nativen Mammakarzinomgewebes sowie zwei verschiedener Mammakarzinom-Zelllinien etabliert.

Als Negativkontrollen standen tumorfreie Lymphknoten von Patienten mit malignen Melanomen zur Verfügung.

Die strukturelle Intaktheit der extrahierten gesamtRNA wurde durch Amplifikation der beiden sogenannten housekeeping Gene beta- 2- Mikroglobulin ( $\beta$ -2-MG) und Porphobilinogen Deaminase (PBGD) überprüft. Spezifische Transkripte aller vier ausgewählten Markergene waren jeweils in den Mammakarzinomgeweben und den Zelllinien nachweisbar, nicht dagegen in den Kontroll- Lymphknoten.

Im gesamten Patientinnenkollektiv wurden Transkripte von Maspin in 24 Fällen (30%), Transkripte von Mammaglobin in zwei Fällen (2,5%), Transkripte von CK20 in 35 Fällen (44%) und Transkripte von CEA in 71 Fällen (89%) nachgewiesen. Es war dabei keine eindeutige Korrelation zu bestimmten Tumorstadien erkennbar.

Von sechs Patientinnen mit bereits manifesten Fernmetastasen wies eine Patientin ein Transkript von Maspin auf, und zwei Patientinnen wiesen Transkripte von Mammaglobin auf. Bei einer Patientin konnte ein Transkript von CK20 nachgewiesen werden, und bei vier Patientinnen Transkripte von CEA.

Diese Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant von der Prävalenz dieser Transkripte im Gesamtkollektiv.

Ob sich für die gefundenen Ergebnisse nach einer längeren Nachbeobachtungsphase eindeutige Korrelationen zwischen Markergennachweis und metastasiertem/ rezidiviertem Mammakarzinom ergeben hätten, bleibt ungeklärt, da sich eine solche Nachbeobachtung über viele Jahre ohne adjuvante Therapie schon aus ethischen Gründen verbietet. Zusammenfassend kann auch nach den Ergebnissen dieser Studie keine besondere Empfehlung zu einem der untersuchten Markergene gemacht werden, und der Einsatz molekularbiologischer Methoden zum Nachweis einer Tumorzell dissemination mit daraus möglicherweise resultierenden therapeutischen Konsequenzen ist zu diesem Zeitpunkt äußerst kritisch zu bewerten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aihara T, Fijiwara Y, Ooka M, Sakita I, Tamaki Y, Monden M  
Mammaglobin B as a novel marker for detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by reverse transcription- polymerase chain reaction  
Breast Cancer Res Treat 1999 Nov; 58 (2): 137-140
  
2. Ballestrero A, Coviello DA, Garuti A, Nencioni A, Fama A, Rocco I, Bertorelli R, Farrando F, Gonella R, Patrone F  
Reverse- transcriptase polymerase chain reaction of the maspin gene in the detection of bone marrow breast carcinoma cell contamination  
Cancer 2001, Oct 15; 92 (8): 2030-2035
  
3. Beckmann MW, Fasching PA, Weiss JM, Ortman O  
Update Primäres Mammakarzinom 2003  
Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 63, 24. Refresher , IV/ 2003; 65-92
  
4. Beckmann MW, Schulz- Wendtland R  
Mammadiagnostik Teil 1  
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2001; 61: R1-R15
  
5. Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernandez P, Krygier G, Simonet F, Barrios E, Muse I, Osinaga E  
Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer.  
Comparison of CK19, MUC1 and CEA using RT- PCR  
Eur J Cancer 2000 Apr; 36 (6): 717-723
  
6. Bilchert- Toft M, Simola MG, Cataliotti I, O`Higgins N  
Principles and guidelines for surgeons- management of symptomatic breast cancer. European Society of Surgical Oncology  
Eur J Surg Oncol 1997 Apr; 23 (2): 101-109
  
7. Bland KI, Copeland EM  
The Breast: Comprehensive Management of benign and malignant diseases  
Philadelphia: WB Saunders, 1991

8. Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, Hoon DS  
Limitations of specific reverse- transcriptase polymerase chain reaction markers  
in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer  
patients  
J Clin Oncol 1998 Aug; 16 (8): 2632-2640
  
9. Boyd NF, Lockwood GA, Martin LJ, Knight JA, Jong RA, Fishell E, Byng JW,  
Yaffe MJ, Tritchler DL  
Mammographic densities and risk of breast cancer among subjects with a family  
history of this disease  
J Natl Cancer Inst 1999 Aug 18; 91(16): 1404-1408
  
10. Brekelmans CT, Seynaeve C, Bartels CC, Tilanus-Linthorst MM, Meiers-  
Heijboer EJ, Crepin CM, van Geel AA, Menke M, Verhoog LC, van den  
Ouweland A, Obdejin IM, Klijn JG; Rotterdam Committee for Medical and  
Genetic Counseling  
Effectiveness of breast cancer surveillance in BRCA1/2 gene mutation carriers  
and women with high familial risk  
J Clin Oncol 2001 Feb 15; 19 (4): 924-930
  
11. Brown DC, Purushotham AD, Birnie GD, George WD  
Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast  
cancer by use of reverse transcription and polymerase chain reaction  
Surgery 1995 Jan; 117: 96-101
  
12. Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B and Selby P  
Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-  
polymerase chain reaction  
Br J Cancer 1995 Feb; 71(2): 278-281
  
13. Cady B  
A contemporary view of axillary dissection  
Ann Surg 2000 Jul; 232 (1): 8-9
  
14. Chomczynsky P, Sacchi N  
Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-  
chloroform extraction  
Anal Biochem 1987; 162: 156-159

15. Claus EB, Risch N, Thompson WD  
Autosomal dominant inheritance of early onset breast cancer.  
Implications for risk predictions  
Cancer 1994 Feb 1; 73 (3): 643-651
16. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP  
Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection  
of occult bone marrow micrometastases  
J Clin Oncol 1991 Oct; 9 (19): 1749-1756
17. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS  
Sensitive detection of occult breast cancer by reverse- transcriptase  
polymerase chain reaction  
J Clin Oncol 1994 Mar; 12 (3): 475-482
18. Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G  
Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer.  
A prognostic factor for distant metastasis  
J Clin Oncol 1992 Oct; 10 (10): 1534-1539
19. Duffy MJ, Reilly D, O`Sullivan C, O`Higgins N, Fennelly JJ, Andreasen P  
Urokinase- plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in  
breast cancer  
Cancer Res 1990 Nov 1; 50(21): 6827-6829
20. Eltahir EM, Mallinson DS, Birnie GD, Hagan C, George WD, Purushotham  
AD  
Putative markers for the detection of breast carcinoma cells in blood  
Br J Cancer 1998 Apr; 77 (8): 1203-1207
21. Fasching PA, Aichinger U, Schutz- Wendtland R  
Mammadiagnostik Teil 2  
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2002; 61: R17-R32
22. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Mamounas E,  
Smith R, Begovic M, Dimitruv NV, Margolese RG, Kardinal CG, Kavanah MT,  
Fehrenbacher L, Oishi RH  
Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant  
Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial  
Lancet 1999 Jun 12; 353 (9169): 1993-2000

23. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B  
Differential expression of alternatively spliced c-erb-2 mRNA in primary tumors, lymph node metastases, and bone marrow micrometastases from breast cancer patients  
Biochem Biophys Res Commun 1998 Jun 18; 247 (2): 319-323
24. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagner C, Neumaier M  
Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction  
J Clin Oncol 1994 Apr; 12(4): 725-729
25. Gettins P, Patston PA, Schapira M  
Structure and mechanism of serpins  
Hematol Oncol Clin North Am 1992 Dec; 6(6): 1393-1408
26. Ghossein RA, Rosai J  
Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells  
Cancer 1996 Jul; 78 (1): 10-16
27. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL  
Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer  
Ann Surg 1994 Sep; 220(3): 391-401
28. Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, Morton DL, Evans SW, Krasne DL  
Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy  
Ann Surg 1995 Sep; 222 (3): 394-399; Discussion 399-401
29. Giuliano AE  
Sentinel lymphadenectomy in primary breast carcinoma: an alternative to routine axillary dissection  
J Surg Oncol 1996 Jun; 62 (2): 75-77
30. Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, Statman R  
Sentinel lymphadenectomy in breast cancer  
J Clin Oncol 1997 Jun; 15 (6): 2345-2350

31. Grünewald K, Haun M, Urbanek M, Fiegl M, Müller-Holzner E, Gunsilius E, Dünser M, Marth C, Gastl G  
Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19  
Lab Invest 2000 Jul; 80 (7): 1071- 1077
32. Gunn J, McCall JL, Yun K, Wright PA  
Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse- transcription polymerase chain reaction  
Lab Invest 1996 Oct; 75(4): 611-616
33. Hellmann S  
Karnofsky Memorial Lecture. Natural history of small breast cancers.  
J Clin Oncol 1994 Oct; 12 (10): 2229-2234
34. Horton R  
Screening mammography- an overview revisited  
Lancet 2001 Oct; 358 (9290): 1284-1285
35. Le Beau MM, Overhauser J, Straub RE, Silverman G, Gilliam TC, Ott J, O`Connell P, Francke U, Geurts van Kessel A  
Report of the first international workshop on human chromosome 18 mapping  
Cytogenet Cell Genet 1993; 63(2): 78-96
36. Liefers GJ, Cleton- Janse AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ, Tollenaar RA  
Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer  
N Engl J Med 1998 Jul; 339 (4): 223-228
37. Lockett MA, Baron PL, O`Brien PH, Elliott BM, Robison JG, Maitre N, Metcalf JS, Cole DJ  
Detection of occult breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes using a multimarker reverse transcriptase- polymerase chain reaction panel  
J Am Col Surg 1998 Jul; 187 (1): 9-16

38. Lopez- Guerrero JA, Gilabert PB, Gonzalez EB, Sanz Alonso MA, Perez JP, Talens AS, Oraval EA, de la Rubia Comos J, Boix SB  
Use of reverse- transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for carcinoembryonic Antigen, cytokeratin 19, and maspin in the detection of tumor cells in leukapheresis products from patients with breast cancer: comparison with immunocytochemistry  
J Hematother 1999 Feb; 8 (1): 53-61
39. Luppi M, Morselli M, Bandieri E, Federico M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari MG, Savarino M, Frassoldati A, Torelli G  
Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse- transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene  
Ann Oncol 1996 Aug; 7(6): 619-624
40. Maass N, Teffner M, Rosel F, Pawaresch R, Jonat W, Nagasaki K, Rudolph P  
Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumor progression in ductal carcinomas of the breast  
J Pathol 2001 Oct; 195(3): 321-326
41. Mansi JL, Berger U, Easton D, McDonnell T, Redding WH, Gazet JC, McKinna A, Powles TJ, Coombes RC  
Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases  
Br Med J (Clin Res Ed) 1987 Oct 31; 295 (6606): 1093-1096
42. Markie D, Jones TA, Sheer D, Bodmer WF  
A somatic cell hybrid panel for regional mapping of human chromosome 18  
Genomics 1992 Oct; 14(2): 431-436
43. Matsumara Y, Tarin D  
Significance of CD-44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation  
Lancet 1992 Oct 31; 340 (8827): 1053-1058
44. Merrie AE, Yun K, McCall JL  
Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA in lymph nodes from patients with colorectal cancer  
N Engl J Med 1998; 339: 1642-1644

45. Merrie AE, Yun K, Gunn J, Phillips LV, McCall JL  
Analysis of potential markers for detection of submicroscopic lymph node metastases in breast cancer  
Br J Cancer 1999 Aug; 80 (12): 2019-2024
46. Miele L, Cordella- Miele E, Mukherjee AB  
Uteroglobin: structure, molecular biology, and new perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor  
Endocr Rev 1987 Nov; 8 (4): 474- 490
47. Miele L, Cordella- Miele E, Mantile G, Peri A, Mukherjee AB  
Uteroglobin and uteroglobin-like proteins: the uteroglobin family of proteins  
J Endocrinol Invest 1994 Sep; 17 (8): 679-692
48. Miki Y, Swenson J, Shattuck –Eidens D, Futreal PA, Harsham K, Tavtigian S, Liu O, Cichran C, Bennett LM, Ding W  
A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA 1  
Science 1994 Oct 7; 266 (5182): 66-71
49. Min CJ, Tafra L, Verbanac KM  
Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes  
Cancer Res 1998 Oct 15; 58(20): 4581-4584
50. Minckwitz von G, Brunnert K, Costa SD, Friedrichs K, Jackisch C, Gerber B, Harbeck N, Junkermann H, Möbus V, Nitz U, Schaller G, Scharl A, Thomssen C, Untch M; Consensus of the AGO Organ Commission “Mamma”  
Zentralbl Gynäkol 2002 May; 124 (5): 293-303
51. Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akiyoshi T  
Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction  
Cancer Res 1995 Aug 1; 55(15): 3417-3420

52. Mori MK, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shirashi T, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T

Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription- polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas

J Clin Oncol 1998 Jan; 16 (1): 128-132

53. NHS Cancer Screening programmes

Breast screening (UK)

Annual Review; [www.cancerscreening.nhs.uk](http://www.cancerscreening.nhs.uk), 2003

54. Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H

The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase- polymerase chain reaction

Cancer 1994 Sep 1; 74 (5): 1595-1600

55. Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H

Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase- polymerase chain reaction. Comparison between MUC 1 mRNA and Keratin 19 mRNA amplification.

Am J Path 1996 Feb; 148 (2): 649-656

56. Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H

Histologic characteristics of breast cancer with occult lymph node metastases detected by keratin 19 mRNA reverse transcriptase polymerase chain reaction

Cancer 1996 Sep 15; 78 (6): 1235-1240

57. Novaes M, Bendit I, Garicochea B, del Giglio A

Reverse transcriptase- polymerase chain reaction analysis of cytokeratin 19 expression in the peripheral blood mononuclear cells of normal female blood donors

Mol Pathol 1997 Aug; 50(4): 209-211

58. Nystrom L, Anderson I, Bjurslam N, Frisell J, Nordenskjold B, Rutqvist LE

Long- term effects of mammography screening: update overview of the Swedish randomized trials

Lancet 2002 Mar 16; 359 (9310): 909-919

59. Ooka M, Tamaki Y, Sakita I, Fujiwara Y, Yamamoto H, Miyake Y, Sekimoto M, Ohue M, Sugita Y, Miyoshi Y, Ikeda N, Noguchi S, Monden M  
Bone marrow micrometastases detected by RT-PCR for mammaglobin can be an alternative prognostic factor of breast cancer  
Breast Cancer Res Treat 2001 May; 67 (2): 169-175

60. Ooka M, Sakita I, Fujiwara Y, Tamaki Y, Yamamoto H, Aihara T, Miyazaki M, Kadota M, Masuda N, Sugita Y, Iwao K, Monden M  
Selection of mRNA markers for detection of lymph node micrometastases in breast cancer patients  
Oncol Rep 2000 May-Jun; 7 (3): 561-566

61. Oppelt PG, Beckmann MW  
Risikofaktoren und – beurteilung in der Menopause  
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 2001; 61: 257-267

62. Papac R  
Bone marrow metastases. A review  
Cancer 1994 Dec; 74 (9): 2403-2413

63. Parker MG, White R, Hurst H, Needham M, Tilly R  
Prostatic steroid-binding protein. Isolation and characterization of C3 genes.  
J Biol Chem 1983 Jan 10; 258 (1): 12-15

64. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA  
Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis  
Int J Cancer 1997 May 29; 71 (5): 800-809

65. Potempa J, Korzus E, Travis J  
The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function and regulation  
J Biol Chem 1994 Jun 10; 269(23): 15957-15960

66. Recht A  
Should irradiation replace dissection for patients with breast cancer with clinically negative axillary lymph nodes?  
J Surg Oncol 1999 Dec; 72 (4): 184- 192

67. Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ  
Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer  
Lancet 1983 Dec 3; 2(8362): 1271-1274

68. Renton SC, Gazet IC, Ford HT, Corbishley C, Sutcliffe R  
The importance of the resection margin in conservative surgery for breast cancer  
Eur J Surg Oncol 1996 Feb; 22 (1): 17-22

69. Sabbatini R, Federico M, Morselli M, Depennoi R, Cagossi K, Luppi M, Torelli G, Silingardi V  
Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction of maspin in patients with breast cancer undergoing conventional- dose chemotherapy  
J Clin Oncol 2000 May; 18 (9): 1914-1920

70. Sager R, Sheng A, Anisowicz A, Sotiropoulou G, Zou Z, Stenman G, Swisshelm K, Chen Z, Hendrix MJ, Pemberton P  
RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm  
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1994; 59: 537-546

71. Schmidt- Mattiesen, Bastert, Wallwiener  
Gynäkologische Onkologie  
Kapitel 11, Seite 105-148  
Schattauer- Verlag, 6. Auflage 2000

72. Schmutzler RK, Beckmann MW, Kiechle M  
Prävention: Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom  
Deutsches Ärzteblatt 2002; 99(20): A 1372/ B 1146/ C 1071

73. Schneider SS, Schick C, Fish KE, Miller E, Pena JC, Treter SD, Hui SM, Silverman GA  
A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene  
Proc Natl Acad Sci USA 1995 Apr 11; 92(8): 3147- 315

74. Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, Shousha S, Sinnett HD, Coombes RC

Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction

Cancer Research 1994 Jun 1; 54(11): 2986-2990

75. Schoenfeld A, Luqmani Y, Sinnett HD, Shousha S, Coombes RC

Keratin 19 mRNA measurement to detect micrometastases in lymph nodes in breast cancer patients

Br J Cancer 1996 Nov; 74(10): 1639-1642

76. Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, Sinnett HD, Gazet JC, Sacks N, Bender HG, Luqmani Y and Coombes RC

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 1997 May; 33 (6): 854-861

77. Sheng S, Pemberton PA, Sager R

Production, purification, and characterization of recombinant maspin proteins

J Biol Chem 1994 Dec 9; 269 (49): 30988-30993

78. Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ; American Cancer Society

American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer

CA Cancer J Clin 2003 Jan-Feb; 53 (1): 27- 43

79. Soeth E, Roder C, Juhl H, Kruger U, Kremer B, Kalthoff H

The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20- specific nested reverse- transcriptase polymerase- chain reaction is related to the stage of disease

Int J Cancer 1996 Aug; 69(4): 278-282

80. Soeth E, Vogel J, Roder C, Juhl H, Marxsen J, Kruger U, Henne- Bruns D, Kremer B, Kalthoff H

Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR

Cancer Res 1997 Aug 1; 57(15): 3106-3110

81. Stoutjesdijk MJ, Boetes C, Jager GJ, Beex L, Bult P, Hendriks JH, Laheij RJ, Massuger L, van Die LE, Wobbes T, Barentsz JO  
Magnetic resonance imaging and mammography in women with hereditary risk of breast cancer  
J Natl Cancer Inst 2001 Jul 18; 93 (14): 1095-1102

82. Suchy B, Austrup F, Driesel G, Eder C, Kusiak I, Uciechowski P, Grill HJ, Giesing M  
Detection of mammaglobin expressing cells in blood of breast cancer patients  
Cancer Lett 2000 Oct 1; 158(2): 171-178

83. Tilanus- Linthorst MM, Bartels CC, Obeijin AI, Oudkerk M  
Earlier detection of breast cancer by surveillance of women and familial risk  
Eur J Cancer 2000 Mar; 36 (4): 514-519

84. Van der Steene J, Soete G, Storme G  
Adjuvant radiotherapy for breast cancer significantly improves overall survival: the missing link  
Radiother Oncol 2000 Jun; 5 (3): 263-272

85. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrida S, Bedoni M, Costa A, de Cicco C, Geraghty JG, Luini A, Sacchini V, Veronesi P  
Sentinel- node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph- nodes  
Lancet 1997 Jan 28; 349 (9069): 1864-1867

86. Warner E, Plewes DB, Shumak RS, Catzavelos GC, Di Prospero LS, Yaffe MJ, Goel V, Ramsay E, Chart PL, Cole DE, Taylor GA, Cutrara M, Samuels TH, Murphy JP, Murphy JM, Narod SA  
Comparison of breast magnetic resonance imaging, mammography, and ultrasound for surveillance of women of high risk for hereditary breast cancer  
J Clin Oncol 2001 Aug 1; 19 (15): 3524- 3531

87. Watson MA, Fleming TP  
Mammaglobin, a mammary- specific member of the uteroglobin family, is overexpressed in human breast cancer  
Cancer Res 1996 Feb 15; 56(4): 860-865

88. Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP  
Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin family localized to chromosome 11q13  
Oncogene 1998 Feb 12; 16 (6): 817- 824

89. Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Fleming PP  
Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer  
Cancer Res 1999 Jul 1; 59 (13): 3028- 3031

90. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Averill D  
Localisation of a breast cancer susceptibility gene, BRCA 2, to chromosome 13q12-13  
Science 1994 Sep 30; 265 (5181): 2088-2090

91. Yeu- Tsu L  
Patterns of metastasis and natural courses of breast carcinoma  
Cancer Metastasis Rev 1985; 4(2): 153-172

92. Yun K, Gunn J, Merrie A, Phillips LV, McCall JL  
Keratin 19 mRNA is detectable by RT-PCR in lymph nodes of patients without breast cancer  
Br J Cancer 1997; 76 (8): 1112-1113

93. Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D  
Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA  
J Clin Oncol 1999 Jul; 17(7): 2015-2019

94. Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, Oberneder R, Schlimok G, Riethmuller G, Pantel K  
Limitation of reverse- transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow  
J Clin Oncol 1997 Jul; 15 (7): 2701- 2708

95. Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJC, Thor A, Neveu M, Rafidi K, Seftor E, Sager R  
Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human epithelial cells  
Science 1994 Jan 28; 263(5146): 526-529

# Danksagung

Herrn Professor Dr. B. Bültmann danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung während meines Praktischen Jahres.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Sotlar für die langjährige gute Zusammenarbeit, für seine geduldige Betreuung während der Durchführung der Arbeit und für die Durchsicht des Manuskripts.

Frau Barbara Mankel möchte ich meinen Dank für die gute Einarbeitung in die Methoden der molekularen Pathologie aussprechen.

Allen Mitarbeitern des Pathologischen Institutes insbesondere Herrn Perikles Kosmedis möchte ich für eine immer freundliche Arbeitsatmosphäre, für die große Hilfsbereitschaft, die flexible Zusammenarbeit und ein immer offenes Ohr, nicht nur für schwierige molekularpathologische Fragen und Sorgen danken.

Das Untersuchungsmaterial wurde freundlicherweise von Herrn Dr. R. Emig aus der Universitäts- Frauenklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Ich bedanke mich für diese Zusammenarbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Freunden, die mich mit Rücksichtnahme und Verständnis durch das Studium begleitet haben und mir bei der Verwirklichung dieser Arbeit zur Seite standen.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und meinen beiden Brüdern, die mich die ganze Zeit über unterstützten.

# Lebenslauf

**Elena Sandra Hartmann**

**Geburtsdatum und -ort:** 29. April 1976 in VS- Schwenningen

**Schulbildung:**

1982-1986	Gartenschule Schwenningen
1986-1995	Gymnasium am Deutenberg Schwenningen
1995	Abitur
1996	Soziales Jahr

**Studium:**

1997	Studium der Humanmedizin an der Eberhard- Karls- Universität Tübingen
1999	Ärztliche Vorprüfung
2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
28.05.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung