

Tanja Borchers
Dr. med.

Geboren am 09.11.1969 in Mannheim
Reifeprüfung am 18.05.1989 in Neustadt an der Weinstraße
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1990 bis WS 1996
Physikum am 24.03.1992 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg (Paris, Luzern)
Staatsexamen am 20.11.1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Frauenheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Bastert

Der Tumorzell-Nachweis im Knochenmark bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom kann die frühzeitige Definition einer Risikogruppe und damit die Verbesserung der individuellen Therapieplanung ermöglichen. Zunehmende Bedeutung kommt dem Tumorzell-Nachweis im Rahmen von Screening und Purgung von Knochenmarksproben bei autologen Knochenmarks-Transplantationen und für die Kontrolle von Therapieerfolgen zum Beispiel nach Hochdosis-Chemotherapie zu. Immunzytochemische Verfahren wurden zur Detektion und Visualisierung von metastatischen Zellabsiedelungen im Knochenmark bereits erfolgreich eingesetzt. Problematisch sind Sensitivität und Spezifität der Nachweisverfahren, da die Tumorzellkontamination des Knochenmarks sehr gering sein kann, und viele kommerzielle Marker zu Kreuzreaktivitäten mit normalen Knochenmarkszellen führen.

Gegenstand dieser Arbeit war die methodische Entwicklung der Immunmagnetischen Separation als neues und effizientes Verfahren zur Tumorzellsuche im Knochenmark von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und die klinische Prüfung dieser Technik an circa 60 Patientinnen-Proben.

Magnetobeads mit den Größen 280µm (MB280) und 450µm (MB450) wurden initial an die MAK BM2 und BM7 kovalent gekoppelt und in Vorversuchen mit T_{47D}- Zellen die Bindungskapazität und die Fähigkeit zur selektiven Separation von Tumorzellen getestet, um die effektivste MB-MAK-Kombination zu erfassen. Durch Zumischung einer definierten Anzahl von T_{47D}- Zellen zur MB/Zell-Fraktion konnte die Effizienz der IMS anhand einer „Wiederfindungsrate“ bestimmt werden. Die IMS wurde im Laufe von Versuchsreihen für die Parameter Konzentrationsverhältnis MB/Zellzahl, Inkubationszeit der MB-Zell-Suspension, Inkubationstemperatur, Anzahl der Waschschritte am Magneten, notwendige Kontroll-Cytospins, Fixierung der Zellen und Färbung optimiert. Die ausgewählten MAK repräsentieren die wichtigsten AG-Klassen, die zur Charakterisierung von Mammakarzinomen eingesetzt werden können: BM2/BM7 als Anti-Muzin-

MAK reagieren mit einem hochmolekularen zellmembranständigen AG, welches in über 96% der Mammakarzinome stark exprimiert wird. Der CAM5.2 ist ein Anti-Zytokeratin-MAK gegen intermediäre Zellfilamente bei Zellen epithelialen Ursprungs und der MOC31 ist ebenfalls ein MAK gegen ein epitheliales Oberflächen-AG. Die MAK wurden in Ihrer Eignung für die IMS gegeneinander ausgetestet. Im Anschluß wurde die Methode an 59 Proben von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und 10 Proben von Patientinnen mit erfolgter Metastasierung zum Punktionszeitpunkt angewandt und statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse der IMS wurden photographisch dokumentiert.

Als günstigste Kopplungsform wurde die Kombination MB280-BM2/BM7 ermittelt, eingesetzt in einer Konzentration von 6×10^6 MB auf 2×10^7 Zellen. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei RT. Nach zwei Waschungen am Magneten erfolgte die anschließende Fixierung mit Formalin/Methanol (Lagerung bei -80°C), optimale Färbeergebnisse für die IMS lieferte die APAAP-Technik. Im MAK-Vergleich zum Nachweis von positiv markierten Tumorzellen im Knochenmark zeigten die MAK BM2/BM7 eine 100%ige Sensitivität, genauso der CAM5.2, dagegen der MOC31 nur 57% (kleines Vergleichskollektiv). Unspezifisch gefärbte Einzelzellen wurden nur bei den Anti-Muzin-MAK in etwa 7% der Fälle beobachtet. Eine FACS-Analyse zur Oberflächen-Expression des MUC1-Gens zeigte, daß die MAK BM2 und BM7 selektiv Untergruppen der erythropoetischen Reihe erkennen. Diese Erkenntnis ermöglicht über die Eliminierung des erythrozytären Zellmaterials die Steigerung der Spezifität der IMS. Für die Frage ob es sich bei den markierten Zellen um Tumorzellen handelt oder nicht, waren diese unspezifischen Markierungen nicht entscheidend, da die homogene Zellmorphologie gegen einen malignen Ursprung sprach. Ein Tumorzell-Nachweis mit der IMS bei den Patientinnen-Proben mit primärem Mammakarzinom erfolgte in 40,6% (24/59) der Fälle. Nach einem medianen Nachbeobachtungszeitraum von 28,5 Monaten mußten bei 12 Patientinnen Organmanifestationen eines Rezidivs diagnostiziert werden, 83% (10/12) waren IMS-positiv, die Fälle mit ossärer Metastasierung waren alle IMS-positiv (6/6). Im MAK-positiven Kollektiv entwickelten 42% Metastasen versus 8,6% Metastasen im MAK-negativen Kollektiv. Die Metastasierung im tumorzellpositiven Kollektiv trat deutlich früher auf als im tumorzellnegativen Kollektiv (10,1 Monate versus 19,5 Monate). Unter den Patientinnen mit Metastasierung konnte bei 3 von 4 Fällen im N0-Stadium der Tumorzell-Nachweis erbracht werden. Vor allem für dieses Kollektiv der nodal-negativen Fälle ist der prognostische Wert des Nachweises bedeutend. Die Detektionsrate im Kollektiv der Frauen die zum Punktionszeitpunkt bereits ein Rezidiv erlitten hatte liegt bei 50% (gegenüber 40,6% für die Patientinnen mit Primärkarzinom). Diese Auswertung zeigt auch für das relativ kleine Kollektiv den prädiktiven Wert und die Aussagekraft des Tumorzell-Nachweises mit der IMS an. Um die IMS als Methode zum Nachweis von Tumorzellen zu testen, wurden in standardisierten Verdünnungsreihen Tumorzellen (T_{47D}) zu den Proben dazugemischt. Es zeigte sich der reproduzierbar zuverlässige Nachweis von Tumorzellen auch bei geringer Kontamination (bis zu 96% bei einem Erwartungswert von 20 Tumorzellen). Eine untere Nachweisgrenze für die Wiederfindung wurde nicht ermittelt, dazu sind weitere Modellversuche mit logarithmischen Verdünnungsstufen notwendig. Der errechnete Anreicherungsfaktor (erfasst die Anreicherung von Tumorzellen bei Elimination von normalen Leukozyten) von 153 zeigt ebenfalls präklinisch einen positiven Trend auf.

Die vorliegenden Ergebnisse implizieren an weiterführenden Fragestellungen zum Beispiel eine verbesserte Kontrolle unspezifischer Bindungen, oder den Einsatz eines MAK-Cocktails zur

Steigerung der Sensitivität und Spezifität. Weitere Einsatzmöglichkeiten für die IMS ergeben sich aus der Kombination mit der PCR, oder durch den Nachweis von Tumorzellen im peripheren Blut im Rahmen des autologen Stammzell-Supports. Die prognostische Bedeutung des Tumorzell-Nachweises im Knochenmark ist in der neueren Literatur unumstritten. Die Durchführung der Knochenmarks-Punktion ist komplikationsarm und wenig belastend. Zudem konnte die IMS gut in die Laborroutine integriert werden. Die weitere Verbesserung der Methodik und eine breitere Anwendung der IMS kann empfohlen werden.