

Erken evre meme kanserinde revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) tekniği ile kemik iliği mikrometastazlarının araştırılması

Detection of bone marrow micrometastases by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in patients with early breast cancer

Neslihan CABIOĞLU,¹ Engin Okan YILDIRIM,¹ Özlem BİTİŞİK,² Hülya YAZICI,² Mahmut MÜSLÜMANOĞLU,¹ Nejat DALAY,² Abdullah İĞÇİ,¹ Vahit ÖZMEN,¹ Temel DAĞOĞLU,¹ Mustafa KEÇER¹

¹İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı; ²İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı

AMAÇ

Meme kanserinde kemik iliği mikrometastazı saptanmasında sitokeratin 19 (CK19) ve DF3 gen ekspresyonlarının araştırıldığı moleküler bir yöntemin etkinliğini değerlendirmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Klinik olarak aksilla negatif olan 28 erken evre meme kanserli hastadan alınan kemik iliği aspiratlarında revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) tekniğiyle CK19 ve DF3 genlerine özgü iki ayrı primer kullanılarak mikrometastatik kanser hücresi araştırıldı.

BULGULAR

Hastaların ortanca yaşı 47,5'tir (32-86). RT-PCR çalışmalarında negatif kontrol olarak kullanılan kronik miyeloid lösemili kemik iliği örneklerinin keratin 19 ekspresyonunun pozitif ve DF3 ekspresyonunun ise negatif bulunması üzerine, sonraki deneylerde DF3 primeri kullanıldı. Yirmi sekiz hastanın 18'inde (%64) DF3 pozitif olarak saptandı. DF3 pozitifliği ile hastaların evresi, tümör büyüklüğü (<2 cm ve >2 cm), aksiller tutulum, ER/PR pozitifliği ve HG veya NG yüksekliği gibi parametreler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı.

SONUÇ

Erken evre meme kanserli hastalarda kemik iliğinde RT-PCR ile DF3 gen ekspresyonunun varlığının araştırılması yoluyla mikrometastaz saptanması tekniğinin, spesifikliğinin ve duyarlılığının yüksek olması nedeniyle etkin bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Kemik iliği metastazları; meme kanseri; mikrometastaz; revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu.

OBJECTIVES

The aim of this study was to determine the feasibility of a molecular assay by investigating cytokeratin 19 (CK-19) and DF3 gene expressions in detection of occult cancer cells in bone marrow in patients with breast cancer.

METHODS

Transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assays were carried out for the detection of CK19 and DF3 mRNA transcripts in bone marrow samples of 28 clinically axillary negative patients with early breast cancer.

RESULTS

Median age of patients was 47.5 (range, 32-86). Due to the high false positivity rate of the CK19-RT-PCR assay, and negative findings by the DF3-RT-PCR assay in bone marrow samples of patients with chronic myelogenous leukemia as negative controls, DF3 expression was tested in further RT-PCR assays. Eighteen patients (64%) were found to harbor DF3-positivity in bone marrow samples. No statistically significant associations could be found between DF3-positivity and other parameters including stage, tumor size (<2 cm vs >2 cm), axillary involvement, ER/PR positivity, and high histologic or nuclear grade.

CONCLUSION

Our results suggest that testing DF3 expression by RT-PCR technique seems to be a reliable method in detection of micrometastatic cells in bone marrow in patients with early breast cancer because of its high specificity.

Key words: Bone marrow metastasis; breast cancer; micrometastasis; reverse transcriptase polymerase chain reaction.

*Neslihan Cabioğlu, Engin Okan Yıldırım ve Özlem Bitişik bu çalışmaya eşit katkıda bulunmuştur.

İletişim (Correspondence): Dr. Neslihan CABIOĞLU, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 1. Cerrahi Kliniği, İstanbul, Turkey.
Tel: +90 - 212 - 529 44 00 Faks (Fax): +90 - 212 - 589 62 29 e-posta (e-mail): neslicab@yahoo.com

Günümüze dek yapılan pek çok geniş kapsamlı klinik çalışmada meme kanserinde kemik iliği mikrometastazlarının kötü prognostik faktör olduğu ortaya konmuştur.^[1-5] Braun ve ark. tarafından yayınlanan 4703 hastayı kapsayan metaanalizde, operabl evre I/II/III meme kanserinde immünohistokimyasal yöntemle saptanan kemik iliği metastazı oranı yaklaşık %31 olarak bildirilmiştir.^[4] Bu hastalarda çok değişkenli analizde kemik iliği metastazları diğer faktörlerden bağımsız olarak genel ve meme kanseri spesifik sağkalım oranlarıyla da ters orantılı olarak bulunmuştur.^[4]

Bu çalışmaların çoğunda kemik iliğinde mikrometastatik kanser hücreleri pansitokeratin antikoları kullanılarak immünohistokimyasal yöntemlerle morfolojik olarak belirlenmiştir.^[1-6] Bu teknikte 10^5 kemik iliği hücresinde 1 kanser hücresi saptamak mümkündür.

İmmünohistokimyasal yöntemlerin yanı sıra yeni ve daha hassas tekniklerle sitokeratin-19 (CK19) gibi sitokeratin primerleri kullanılarak revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile 10^6 'da bir kanser hücresi veya çeşitli sitokeratin antikoları kullanılarak immünomagnetik zenginleştirme yöntemleriyle 10^7 - 10^8 mononükleer hücrede bir kanser hücresi saptamak mümkün olmuştur.^[7-10] Ancak bu tekniklerin bir dezavantajı CK19 gibi sitokeratinlerin mononükleer hücrelerde de ekspres olmasından dolayı yalancı pozitifliklerin görülmesidir.^[7,11,12]

Bu nedenle CK19 geni yerine çeşitli müsin genleri (MUC5B, MUC1, DF3) veya MAGE-A multimer paneli gibi yalancı pozitiflik oranı düşük diğer meme kanseri antijenlerine özgü gen bölgelerinin kullanılması araştırılmaktadır.^[13-18]

Bu çalışmadaki amacımız, erken evre meme kanserli hastalardan alınan kemik iliği örneklerinde rutin kullanılan CK19^[19-29] ile daha az sıklıkla kullanılan DF3^[21,30] gen ekspresyonlarının RT-PCR tekniği ile araştırılarak bu tekniğin kanser hücrelerini saptamadaki teknik açıdan uygulanabilirliğini ve spesifikliğini incelemektir. Ayrıca bu teknikte saptanan kemik iliği mikrometastazlarının hasta ve tümör özellikleriyle ilişkisi de araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Meme Hastalıkları Tedavi ve Araştırma Merkezi'ne ardışık başvuran aksillası klinik olarak negatif 28 hasta çalışmaya alındı. Hastaların uzak metastaz değerlendirilmesi için rutin biyokimya, akciğer grafisi, kemik sintigrafisi ve karaciğer ultrasonografisi tetkikleri istendi. Hastaların tümü, kemik iliği alınacağına dair ameliyat öncesi Helsinki Deklarasyonu Hasta Hakları Bildirgesine uygun olarak uygulanacak işlem hakkında bilgilendirildi ve yazılı izinleri alındı. Hastalardan genel anestezi altında ameliyat öncesi her iki spina iliaka anterior superior ve sternumdan (manibrium ve korpustan ayrı ayrı olmak üzere) Gallini kemik iliği aspirasyon iğnesi (KM-1,6-3,5) kullanılarak heparinize edilmiş enjektörlere toplam 10 cc kemik iliği materyali ile eş zamanlı olarak EDTA'lı tüplere 10'ar ml'lik periferik kan örneği alındı. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak MCF-7 meme kanseri hücre soyu, negatif kontrol olarak ise kronik miyeloid lösemili (KML) 5 hastanın kemik iliği hücreleri kullanıldı.

Alınan kemik iliği örnekleri, %0,9'luk sodyum klorür solüsyonu ile 1:1 oranında sulandırıldıktan sonra kemik iliği mononükleer hücrelerinin Ficoll Histopaque yoğunluk gradienti yöntemi ile ayrılmasını takiben çalışmanın yapılacağı zamana dek nitrojen tankında -176 °C'de saklandı. Saklanan hücre pelletleri direkt olarak Trizol çözeltisi (GIBCO-BRL) ile muamele edilerek RNA izole edildi. RNA kalitesi %1,5'lik agarozda kontrol edildikten sonra, 1-5 µg RNA Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit (Fermentas, EU) kullanılarak cDNA'ye dönüştürüldü. CK19 gen ekspresyonunu belirlemek için iki aşamalı, DF3 gen ekspresyonunu belirlemek için ise tek aşamalı PCR kullanıldı.

İlk olarak, hazırlanan cDNA'ların 1 µl'si birinci aşama PCR için CK19 genine özgü eksternal primerler (A ve B primer setleri CK19 *External Forward*: 5'- AAGCTAACCATGCAGAACCCTCAACGACCGC-3', CK19 *External Reverse*: 5'- TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGCC-3') varlığında amplifiye edildi. İkinci aşama PCR reaksiyonunda ise, birinci aşama PCR reaksiyonu

sonucu oluşan PCR ürünleri (1 µl) internal primer çiftleriyle (CK19 *Internal Forward*: 5'- TCC-CGCGACTACAGCCACTACTACACGACC-3', CK19 *Internal Reverse*: 5' CGCGACTTGAT-GTCCATGAGCCGCTGGTAC-3') amplifikasyona sokuldu.

DF3 gen ekspresyonunu belirlemek için ise tek aşamalı PCR yapıldı (DF3 *Forward*: 5'- CA-CAGTGCTTACAGCTACCA-3', DF3 *Reverse*: AGGTGGCAGCTGAACCTGAA-3'). Her iki gen ve aşama için PCR işlemleri 95 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakikadan oluşan 30 çevrim sonunda 72 °C'de 10 dakikalık inkübasyonla tamamlandı. İkinci aşama PCR sonucunda PCR ürünleri (10 µl) %2'lik agaroz jelde yürütülerek, gen amplifikasyon varlığına bakılarak mikrometastaz varlığı değerlendirildi.

Tüm istatistiksel analizler SPSS 15.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL) programı kullanılarak yapıldı. Hasta ve tümör özellikleriyle DF3 pozitifliği arasındaki korelasyonda çift yönlü Fisher testi kullanıldı, p<0,05 değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya 13'ü evre I (%46,4) ve 15'i evre II (%53,6) olmak üzere 28 hasta alındı. Hastaların ortanca yaşı 47,5'tir (32-86). Hastaların demografik, klinik ve tümör özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

CK19 Gen Ekspresyonu

Meme kanserli 28 hasta ve kontrol olarak 5 KML hastasından elde edilen kemik iliği örnekleri CK19 ve DF3 (müsin benzeri) genlerine özgü primerleri kullanılarak RT-PCR tekniğiyle söz konusu genlerin ekspresyonu araştırıldı. CK19 primerleri kullanılarak incelenen kemik iliği örneklerinin tümünde bu genin ekspresyonunun saptanmış olması nedeni ile yalancı pozitiflikten şüphelenildi ve örnekler ilk olarak 1:10⁶ düzeyinde sulandırılarak tekrar incelendi. Ancak ikinci inceleme aşamasında da bir önceki ile aynı sonuçlar elde edildiğinden CK19 geninin bu çalışma için uygun olmadığı sonucuna varıldı. Bunun üzerine, ikinci primer seçimi olarak literatürde yalancı po-

zitiflik bildirilmeyen DF3 primerinin kullanılabilceği düşünöldü.

DF3 Gen Ekspresyonu

DF3 primerleri ile çalışmaya başlamadan önce primer seti öncelikle çalışmamızda negatif kontrol olarak kullanılan bütün KML kemik iliği ve normal kişilerin periferik kan örneklerinde ve pozitif kontrol olarak kullanılan MCF-7 meme kanseri hücre soyunda test edildi. Negatif kontrol olarak kullanılan örneklerde DF3 gen ekspresyonuna rastlanmazken, pozitif kontrol olarak kullanılan MCF-7 hücre soyunda DF3 gen ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 1). DF3 gen primerlerinin çalışmamız için uygun olduğu saptandıktan sonra, çalışma hastalarına ait kemik iliği örneklerinde DF3 gen ekspresyonunun varlığı incelendi.

Çalışmamızda 28 hastanın 18'inde (%64) DF3 gen ekspresyonu saptandı (Şekil 1). On üç evre I meme kanserli hastanın 7'sinde (%54) ve 15 evre II hastanın 11'inde (%73) DF3 pozitifliği bulunurken, aksiller lenf nodu negatif 13 hastanın 8'inde (%62) ve lenf nodu tutulumu olan 15 hastanın ise 10'unda (%67) DF3 pozitifliği saptandı. DF3 geni

Tablo 1

Hastaların klinik ve tümör özellikleri

Hasta özellikleri (n=28)	Sayı (%)
Ortanca yaş (min-max)	47,5 (32-86)
Menapoz durumu	
Premenapoz	12 (42,8)
Postmenapoz	16 (57,2)
Tümör büyüklüğü	
<2 cm	14 (50)
>2 cm	14 (50)
Aksiller tutulum	
Negatif	13 (46,4)
Pozitif	15 (54,6)
Tümör histopatolojisi	
Duktal	12 (42,8)
Lobuler	1 (3,6)
Kombine	15 (53,6)
Nükleer/Histolojik grad	
Orta	14 (50)
Yüksek	14 (50)

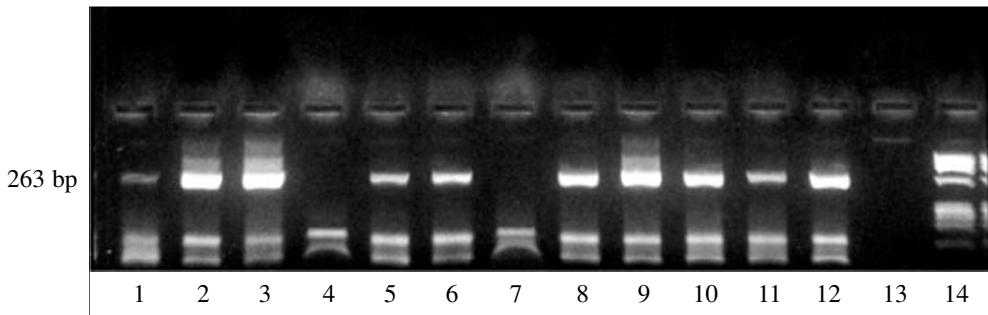
ekspresyon varlığı ile hastaların evresi, tümör büyüklüğü (<2 cm ve >2 cm), aksiller tutulum, ER/PR pozitifliği, ve HG, NG gibi hasta ve tümör özellikleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 2).

TARTIŞMA

Meme kanserinin evrelendirilmesinde tümör büyüklüğü ve aksiller lenf nodu tutulumu en önemli ve kuvvetli prognostik faktörlerdir.^[31] AJCC 2002 meme kanseri evreleme sınıflandırmasında sentinel lenf nodlarının değerlendirilmesinde sitokeratin antikorlarıyla immünohistokimyasal tekniklerin yanısıra RT-PCR ile moleküler yöntemlerle mikrometastaz saptanması gündeme gelmiştir.^[31] İmmünohistokimyasal yöntemlerle saptanan kemik iliği mikrometastazlarının varlığının da özellikle erken evre meme kanserli hastalarda ek kötü bir prognostik faktör olduğu bilinmektedir.^[1-4] Günümüzde kemik iliğinde mikrometastaz tayininde sitokeratin antikorları kullanılarak yapılan immünohistokimyasal yöntemlerin yanı sıra, RT-PCR veya immüno-magnetik zenginleştirme tekniği ile kombine edilen RT-PCR/immünohistokimya/flow-sitometri gibi çok daha duyarlı yöntemler kullanılmaktadır.^[7-10,23] Metastatik hücrelerin RT-PCR yöntemiyle $1/5 \times 10^5 - 10^7$ arasında bir hassasiyetle gösterilebileceği bilinmektedir.^[30] Ancak sözkonusu yöntemlerdeki aşılması gereken en büyük sorun yalancı pozitifliktir. Biz bu çalışmamızda meme kanserli hastalarda kemik iliği mikrometastazlarının saptanmasında RT-PCR yöntemi

kullanılarak CK19 ve münin benzeri DF3 gen ekspresyonlarının uygulanabilirliğini ve hastaların diğer prognostik faktörleriyle ilişkisini araştırdık.

RT-PCR çalışmalarında en çok sitokeratin anti-jenlerine ait primerler kullanılmaktadır. Periferik kan ve kemik iliğinde dolaşan meme kanseri hücrelerinin saptanmasında sıklıkla kullanılan sitokeratin gen (CK2, CK8, K18, CK19, CK20) ekspresyonları incelenmektedir. Ancak sitokeratin genleri mononükleer hücreler, endotel hücreleri ve fibroblastlar gibi hematolojik hücreler tarafından da eksprese edilmektedir. Bu nedenle CK19 epitelyal kaynaklı tümör hücrelerini saptamada en sık kullanılan birkaç belirteçten biri olmasına rağmen yalancı pozitiflik verebilmektedir.^[32] Çalışmamızda literatürdeki mevcut bilgilere paralel olarak bizim hasta ve kontrol grubumuzda da CK19 gen ekspresyonunun yalancı pozitif sonuçlar verdiği saptanmıştır.^[11,12,28] Bu yalancı pozitifliğin olası nedenleri, metodolojik kontaminasyon, kemik iliğinin alınması esnasında ciltten epitelyal hücre kontaminasyonu ve periferik kök hücrelerde normalde önemsenmeyecek kadar az miktardaki CK19 ekspresyonunun metodun hassasiyeti nedeniyle saptanması olabileceği düşünüldü. CK19 ile yalancı pozitiflik elde etmiş çalışmalara dayanarak,^[11,12,28] bu yayınlarda önerildiği gibi lizat örneklerindeki muhtemel bir kontaminasyonu ortadan kaldırmak için benzer şekilde dilüsyon çalışmaları da denendi. Literatürde bildirilen^[11] $1/5$ cDNA dilüsyonunun yanısıra $1/10^6$ 'ya kadar seri titrasyonlar yapmamıza rağmen kontrol örneklerde ya-



Şekil 1. DF3 genine özgü primerler kullanılarak elde edilen RT-PCR ürünlerinin elektroforetik görünümü (3 no'lu çıktı pozitif kontrol, 4 no'lu çıktı negatif kontrol, diğerleri hastalara ait olmak üzere 7 ve 13 no'lu çıktılar negatif ve geri kalanları pozitif bant olarak değerlendirilmiştir).

Tablo 2

Hastaların klinik ve tümör özelliklerine göre DF3 gen ekspresyonu dağılımı

Hastaların klinik ve tümör özellikleri	DF3-negatif Sayı (Yüzde)	DF3-pozitif Sayı (Yüzde)	<i>p</i>
Aksiler nod tutulumu			0,999
Negatif	5 (38)	8 (62)	
Pozitif	5 (33)	10 (67)	
Tümör büyüklüğü			0,236
<2 cm	7 (50)	7 (50)	
>2 cm	3 (21)	11 (79)	
Evre			0,433
I	6 (46)	7 (54)	
II	4 (36)	11 (64)	
Histolojik/Nükleer grad			0,433
HG/NG orta	4	11	
HG/NG yüksek	6	7	
Estrojen reseptörü			0,674
ER (-)	3 (42,8)	4 (51,2)	
ER (+)	7 (33,4)	14 (66,6)	
Progesteron reseptörü			0,097
PR (-)	6 (60)	4 (40)	
PR (+)	4 (22,2)	14 (77,8)	
Adjuvan kemoterapi			0,412
Var	5 (50)	5 (50)	
Yok	5 (28)	13 (72)	

lanıcı pozitifliğin sebat ettiği saptanınca laboratuvarımız ve bu yöntem şartlarında CK19 primeri ile çalışılmamasına karar verildi.

Datta ve ark.ları tarafından yapılan çalışmada RT-PCR yöntemiyle CK-19 ekspresyonu araştırılarak yüksek doz kemoterapiyle birlikte olog kemik iliği nakli uygulanmış meme kanseri hastalarının kemik ilikleri sitoferez yöntemiyle alınarak meme kanseri hücresi aranmıştır.^[3,3] Bu çalışmada normal periferik kan örneklerinde ve kemik iliğinde CK19 ekspresyonu tespit edilmemiş olmasına karşın, bu konuda daha sonra yapılan başka bir yayında aynı yöntem kullanılmasına karşın yüksek yalancı pozitiflik saptanmıştır.^[3,4] CK19-RT-PCR yöntemindeki yalancı pozitifliklerin CK19 psödojeninden de kaynaklanabileceği ve bunun kontaminasyonunu elimine etmek için RT-PCR yönteminde buna yönelik modifikasyonlar yapmak gerektiği de bildirilmiştir.^[3,5] Günümüzde

CK19 gen ekspresyonu daha çok *real-time* RT-PCR yöntemiyle kantitatif olarak bakılmakta ve bu yöntem şartlarında yöntemin spesifikliğinin güvenilir olduğu bildirilmektedir.^[22,24,25,28]

Çalışmamızda CK19 primeri kullanılarak yüksek yalancı pozitiflik saptanması üzerine, literatürde henüz yalancı pozitiflik bildirilmeyen müsin benzeri glikoprotein grubunda yer alan DF3 antijenine ait DF3 primerinin kullanılması düşünüldü.^[30] Negatif kontrol örneklerde yaptığımız ön çalışmada da yalancı pozitiflik saptanmaması üzerine PCR grubundaki tüm hastalarda kemik iliği örneklerinin değerlendirilmesinde DF3 primeri kullanıldı. DF3'ün yalancı pozitiflik oranının bulunmaması gelecekte RT-PCR çalışmalarında sık kullanılan sitokeratin primerlerine iyi bir alternatif olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, evre I ve evre II toplam 28 has-

KAYNAKLAR

tadan 18'inde (%64) DF3 pozitifliği saptandı. Kemik iliğinde RT-PCR yöntemiyle saptanan mikrometastaz çalışmalarında diğer çalışmalarda da benzer olarak operabl meme kanserinde %32-61 arasında değişen pozitiflik oranları bildirilmiştir.^[23-25,27,36] Bu değerler immünohistokimyasal yöntemlerle %29-36 civarında saptanan kemik iliği tutulum yüzdelerinden çok daha yüksektir.^[1-4] RT-PCR gibi çok duyarlı yöntemlerle saptanan kemik iliği pozitifliklerinin prognostik önemi konusunda az sayıda çalışmada kötü prognostik faktör olduğu ve hastaliksız ve genel sağkalımı olumsuz etkilediği bildirilmiştir.^[5,37] Ancak bu konuda öncelikle kullanılan RT-PCR yöntemlerinin standardizasyonuna ve daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Benoy ve ark.nın^[25] operabl meme kanserli hastalarda kantitatif RT-PCR yöntemiyle kemik iliği metastazlarını değerlendirmek üzere yaptıkları bir çalışmada, CK19 gen ekspresyonu ile sadece tümör vaskülarizasyonu arasında bir korelasyon bulunmuş, diğer tümör özellikleri ile bir ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızda da literatürdekine benzer olarak DF3 ekspresyonu pozitif kemik iliği ile evre, tümör büyüklüğü, aksiller lenf nodu tutulumu ve yüksek tümör gradı gibi faktörler arasında bir ilişkisi bulunamamıştır.

Sonuç olarak, RT-PCR yöntemiyle DF3 gen ekspresyonu saptanarak kemik iliği mikrometastazlarının belirlenmesinin spesifik ve duyarlı bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle RT-PCR yöntemi ile DF3 gen ekspresyonunun tek başına veya diğer ilave gen ekspresyonları ile combine edilerek gösterilmesi ile kemik iliği pozitiflikleri saptanabilir. Bu hassas yöntemlerle saptanan kemik iliği pozitifliklerinin prognostik önemi ise ileride yapılacak geniş çalışmalarla belirlenecektir.

Teşekkür

Bu proje, 873/090896 sayılı ve "Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Magnetik Rezonans Görüntüleme Teknikleriyle Erken Evre Meme Kanserinde Kemik İliği Metastazlarının Araştırılması" başlıklı proje nedeniyle İ.Ü. Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

1. Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342(8):525-33.
2. Gerber B, Krause A, Müller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, et al. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 2001;19(4):960-71.
3. Braun S, Cevatli BS, Assemi C, Janni W, Kantenich CR, Schindlbeck C, et al. Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2001;19(5):1468-75.
4. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(8):793-802.
5. Benoy IH, Elst H, Philips M, Wuyts H, Van Dam P, Scharpé S, et al. Prognostic significance of disseminated tumor cells as detected by quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction in patients with breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2006;7(2):146-52.
6. Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* 2006;107(5):885-92.
7. Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Holen I. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol* 2004;57(9):903-11.
8. Baker M, Gillanders WE, Mikhitarian K, Mitas M, Cole DJ. The molecular detection of micrometastatic breast cancer. *Am J Surg* 2003;186(4):351-8.
9. Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S, et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol* 1998;26(3):252-64.
10. Cabioglu N, Igci A, Yildirim EO, Aktas E, Bilgic S, Yavuz E, et al. An ultrasensitive tumor enriched flow-cytometric assay for detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with breast cancer. *Am J Surg* 2002;184(5):414-7.
11. Ko Y, Grünwald E, Totzke G, Klinz M, Fronhoffs S, Gouni-Berthold I, et al. High percentage of false-positive results of cytokeratin 19 RT-PCR in blood: a model for the analysis of illegitimate gene expression.

- Oncology 2000;59(1):81-8.
12. JA Lopez Guercero, P. Bolufer-Gilabert M. Sanz Alanso, E. Barragan-Gonzales, et al. Minimal illegitimate levels of cytokeratin K19 expression in mononuclear blood cells MNBC detected by a RT-PCR method. *Clinic Chimica Acta* 1997;263:105-116.
 13. Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernández P, et al. 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;36(6):717-23.
 14. Bosma AJ, Weigelt B, Lambrechts AC, Verhagen OJ, Pruntel R, Hart AA, et al. Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes. *Clin Cancer Res* 2002;8(6):1871-7.
 15. Berois N, Varangot M, Sónora C, Zarantonelli L, Pressa C, Laviña R, et al. Detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells using an RT-PCR assay of MUC5B mRNA. *Int J Cancer* 2003;103(4):550-5.
 16. Kufer P, Zippelius A, Lutterbüse R, Mecklenburg I, Enzmann T, Montag A, et al. Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. *Cancer Res* 2002;62(1):251-61.
 17. Dent GA, Civalier CJ, Brecher ME, Bentley SA. MUC1 expression in hematopoietic tissues. *Am J Clin Pathol* 1999;111(6):741-7.
 18. Silva AL, Tomé MJ, Correia AE, Passos-Coelho JL. Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietic products. *Ann Oncol* 2002;13(3):422-9.
 19. Bossolasco P, Ricci C, Farina G, Soligo D, Pedretti D, Scanni A, et al. Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-pCR for the mammaglobin gene. *Cancer Detect Prev* 2002;26(1):60-3.
 20. Varangot M, Barrios E, Sónora C, Aizen B, Pressa C, Estrugo R, et al. Clinical evaluation of a panel of mRNA markers in the detection of disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer. *Oncol Rep* 2005;14(2):537-45.
 21. Hayes DF, Mesa-Tejada R, Papsidero LD, Croghan GA, Korzun AH, Norton L, et al. Prediction of prognosis in primary breast cancer by detection of a high molecular weight mucin-like antigen using monoclonal antibodies DF3, F36/22, and CU18: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 1991;9(7):1113-23.
 22. Ismail MS, Wynendaele W, Aerts JL, Paridaens R, Gaafar R, Shakankiry N, et al. Detection of micrometastatic disease and monitoring of perioperative tumor cell dissemination in primary operable breast cancer patients using real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res* 2004;10(1 Pt 1):196-201.
 23. Zhong XY, Kaul S, Lin YS, Eichler A, Bastert G. Sensitive detection of micrometastases in bone marrow from patients with breast cancer using immunomagnetic isolation of tumor cells in combination with reverse transcriptase/polymerase chain reaction for cytokeratin-19. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126(4):212-8.
 24. Slade MJ, Smith BM, Sinnett HD, Cross NC, Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(3):870-9.
 25. Benoy IH, Salgado R, Elst H, Dam PV, Weyler J, Marck EV, et al. Relative microvessel area of the primary tumor, and not lymph node status, predicts the presence of bone marrow micrometastases detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with clinically non-metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;7:210-9.
 26. Tokunaga E, Ishida M, Kimura Y, Maehara Y. Correlation with bone metastasis and high expression of CK 19 mRNA measured by quantitative RT-PCR in the bone marrow of breast cancer patients. *Breast J* 2003;9(5):440-2.
 27. Aerts J, Wynendaele W, Paridaens R, Christiaens MR, van den Bogaert W, van Oosterom AT, et al. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood. *Ann Oncol* 2001;12(1):39-46.
 28. Lambrechts AC, Bosma AJ, Klaver SG, Top B, Perebolte L, van't Veer LJ, et al. Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999;56(3):219-31.
 29. Balducci E, Azzarello G, Valori L, Toffolatti L, Bolgan L, Valenti MT, et al. A new nested primer pair improves the specificity of CK-19 mRNA detection by RT-PCR in occult breast cancer cells. *Int J Biol Markers* 2005;20(1):28-33.
 30. 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;117(1):95-101.
 31. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry

- D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(17):3628-36.
32. Traweek ST, Liu J, Battifora H. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1993;142(4):1111-8.
33. Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12(3):475-82.
34. Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1992;140(2):427-47.
35. Ruud P, Fodstad O, Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer* 1999;80(1):119-25.
36. Jung YS, Lee KJ, Kim HJ, Yim HE, Park JS, Soh EY, et al. Clinical significance of bone marrow micrometastasis detected by nested rt-PCR for keratin-19 in breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33(4):167-72.
37. Masuda TA, Kataoka A, Ohno S, Murakami S, Mimori K, Utsunomiya T, et al. Detection of occult cancer cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative RT-PCR assay for cytokeratin-7 in breast cancer patients. *Int J Oncol* 2005;26(3):721-30.