

**Von einzelnen disseminierten Tumorzellen zur Metastase:  
Genomische Analyse der minimalen Resterkrankung des  
Mammakarzinoms**

Dissertation

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.),

angefertigt am Institut für Immunologie

Vorstand: Prof. Dr. G. Riethmüller



vorgelegt von  
Oleg Schmidt-Kittler  
aus München  
Februar 2003

Dissertation eingereicht: 05.02.2003

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. T. Cremer

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. E. Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2003

## Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung .....	5
1.1	Das Mammakarzinom .....	5
1.2	Genomische Untersuchung des Mammakarzinoms .....	10
1.3	Minimal residuale Krebserkrankung .....	13
1.4	Genomische Charakterisierung einzelner Zellen .....	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	16
2	Kooperationspartner, Patientinnen, Methoden und Material .....	18
2.1	Kooperationspartner .....	18
2.2	Patientinnen .....	19
2.3	Methoden .....	20
2.3.1	Aufbereitung des Knochenmarks .....	20
2.3.2	Immunozytochemische Färbung .....	20
2.3.3	Isolierung einzelner Tumorzellen .....	21
2.3.4	Einzelzell-PCR .....	22
2.3.5	Kontroll-PCR .....	23
2.3.6	Agarose Gelelektrophorese .....	24
2.3.7	Alu-PCR .....	24
2.3.8	Nicktranslation .....	25
2.3.9	Markierungs-PCR .....	25
2.3.10	Vergleichende genomische Hybridisierung .....	26
2.3.11	Präparation von Metaphasechromosomen .....	28
2.3.12	Hämatoxylin Färbung von Gewebeschnitten und Mikrodissektion .....	29
2.3.13	LOH-Analyse .....	29
2.3.14	Hybridisierung auf Nylonmembranen .....	31
2.3.15	Bioinformatische Auswertung der CGH-Daten .....	32
2.3.16	Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse .....	36
2.3.17	Statistische Berechnungen .....	37
2.4	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	38
2.5	Enzyme, Chemikalien, Geräte, Material, Oligonukleotide und Puffer .....	39
3	Ergebnisse .....	44
3.1	Etablierung der Einzelzell-PCR-Methode .....	44
3.2	CGH mit Einzelzell-PCR-Produkten .....	48

---

3.3	Genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen.....	56
3.3.1	Detektion disseminierter Tumorzellen .....	56
3.3.2	CGH-Aberrationen disseminierter Tumorzellen .....	61
3.3.3	M <sub>0</sub> - / M <sub>1</sub> -Klassifizierung disseminierter Tumorzellen.....	65
3.4	Vergleich der genomischen Veränderungen von disseminierten Tumorzellen und Primärtumor .....	71
3.4.1	CGH von disseminierten Tumorzellen und Primärtumor.....	71
3.4.2	Subchromosomale Deletionen in disseminierten Tumorzellen und den Primärtumoren .....	76
3.4.3	Unterschiede lymphogen und hämatogen disseminierter Tumorzellen.....	78
4	Diskussion.....	80
4.1	Einzelzell-PCR und CGH .....	80
4.2	Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark.....	82
4.3	Modell der Brustkrebs Metastasierung .....	84
5	Zusammenfassung.....	92
6	Literaturverzeichnis .....	93
7	Danksagung.....	102
8	Lebenslauf.....	103
9	Publikationen und Patente.....	104

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

Brustkrebs ist mit 26,4% der jährlichen Krebsneuerkrankungen die häufigste Krebserkrankung der Frau, was einer Inzidenz von 45.800 Personen bezogen auf das Bundesgebiet entspricht (RKI, 2000). 1997 und 1998 betrug die Anzahl der durch Mammakarzinom bedingten Todesfälle in Deutschland durchschnittlich 18.035, das ist ein Anteil von 17,4% an den krebsbedingten Todesfällen der Frauen (Statistisches-Bundesamt, 1997; Statistisches-Bundesamt, 1998). Dabei ist die jährliche Mortalitätsrate seit Einführung des Krebsregisters 1967 im alten Bundesgebiet von 35 auf 45 pro 100.000 leicht angestiegen (Statistisches-Bundesamt, 1997). Die mittlere Überlebenszeit nach der Diagnose eines Mammakarzinoms beträgt 6,4 Jahre (Engel *et al.*, 2000). Insgesamt zeigen die epidemiologischen Daten, daß sich, trotz der enormen klinischen und wissenschaftlichen Anstrengungen bessere Therapien zur Bekämpfung des Mammakarzinoms zu entwickeln, nur ein geringer Erfolg für die betroffenen Patientinnen eingestellt hat (Cole *et al.*, 2001).

### Histologie der Mamma

Die Glandula mammaria wird im Embryo bereits in der 14. Schwangerschaftswoche angelegt (Howard & Gusterson, 2000). Dabei entsteht durch Involution der Ektodermis eine Knospe, die sich während der weiteren Embryogenese in ein verzweigtes System aus Ducti lactiferi differenziert. Man unterscheidet im Ductus lactiferi die luminalen Zellen sowie die darunter liegenden myoepithelialen Zellen, welche den Kontakt zur Basalmembran herstellen und phänotypisch glatten Muskelzellen ähneln. Die Ducti lactiferi sind in mesenchymales Stroma eingebettet, welches einen individuell verschiedenen Anteil an Fettgewebe enthält. In der Pubertät findet in der weiblichen Mamma eine mit Größenzunahme einhergehende weitere Verzweigung der Ducti lactiferi statt, sowie eine weitere Ausdifferenzierung der Tubuli-Enden zu Alveolen, die sich in Lobuli organisieren. Die Zellen dieser tubualveolären Einzeldrüsen oder Lobuli glandulae mammariae sind in der laktierenden Mamma das funktionell Milch sezernierende Gewebe und erreichen erst bei der schwangeren Frau ihre vollendete Ausprägung. Jeder Schwangerschaftszyklus ist mit einer Differenzierung der Lobuli sowie einer darauf folgenden Involution verbunden, so daß die Mamma ein sich ständig veränderndes, dynamisches Organ ist. Nach der Menopause ist eine weitergehende Involution zu beobachten, die sowohl die Anzahl der Tubuli als auch der tubualveolären

Lobuli betrifft. Darüber hinaus wird das intralobuläre Stroma, welches die Alveolen umgibt, weitgehend durch Kollagen und das interlobuläre Bindegewebe durch Fettgewebe ersetzt. Im männlichen Organismus bleibt eine Entwicklung der Mamma, abgesehen von krankhaften Sonderfällen, die meist durch hormonelle Störungen bedingt sind, aus.

In der Mamma treten eine Vielzahl gutartiger Veränderungen auf, die ca. 76% der klinisch vorstelligen Patienten mit Beschwerden der Mamma betreffen (Mallon *et al.*, 2000). Darunter fallen insbesondere Entzündungen und benigne Tumore. Letztere sind überwiegend verkalkende Fibrozysten, welche mit den in der Vorsorgeuntersuchung verwendeten bildgebenden Verfahren oft nicht von den Frühstadien des Mammakarzinoms zu unterscheiden sind. Fibroadenome sind gerade in jugendlichen Patientinnen häufige, proliferative Veränderungen des intralobulären Stromas, die meist das epitheliale Drüsengewebe einbeziehen. Obwohl sie als Neoplasie bzw. Tumor zu bezeichnen sind, werden sie wegen ihres überwiegend mesenchymalen Ursprungs als gutartige Wucherungen angesehen, die aus histologischer Sicht durch die Beteiligung sowohl der luminalen als auch der myoepithelialen Zellen definiert werden. Die Mammakarzinome gehen im Gegensatz dazu allein aus den luminalen Zellen hervor, ausgenommen der äußerst seltenen Myoepitheliome.

### **Progression des Mammakarzinoms**

Die lokale Progression des Mammakarzinoms wird in drei Abschnitte eingeteilt (Tavassoli & Stratton, 2002). Sie beginnt mit einer Hyperplasie des Epithels, die sich über das *in situ* Karzinom zum invasiven Karzinom entwickeln kann. Da die lokalen Tumore in der Mehrzahl der Fälle durch chirurgische Eingriffe entfernt werden können, begründet sich die Mortalität des Mammakarzinoms meist in der Entstehung von lymphogenen oder hämatogenen Metastasen, das heißt in der systemischen Ausbreitung des Karzinoms. Die Klassifizierung des Mammakarzinoms beruht auf histo-pathologischen Merkmalen von Gewebepreparaten, die mit dem klinischen Verlauf der Patientinnen korrelieren. Hyperplasien der luminalen Zellen in den tubualveolären Lobuli, welche sich in mehrschichtigen Epithelien manifestieren, treten relativ häufig auf und werden entsprechend als normale Hyperplasien angesehen (in der englischsprachigen Literatur werden sie mit usual ductal hyperplasia UDH bezeichnet). In 3,6% der Brustbiopsien werden atypische duktale Hyperplasien diagnostiziert (ADH) (Tavassoli & Norris, 1990). Sie sind mit einer vier bis fünffach erhöhten Inzidenz des Mammakarzinoms im Vergleich zur Gesamtbevölkerung assoziiert und zeigen uniforme Zellhaufen mit hyperchromatischen Zellkernen, die insgesamt kaum die Größe von 3 mm überschreiten und von runden „duktalem“ Aussparungen unterbrochen sind. Aus

histologischer Sicht ist die atypische Hyperplasie eine Übergangsform zum *Carcinoma in situ*, wobei eine scharfe Abgrenzung zum Teil nicht möglich ist (Schnitt *et al.*, 1992). Das *in situ* Karzinom wird nach seiner Morphologie in das duktales und lobuläres *Carcinoma in situ* eingeteilt (DCIS bzw. LCIS). Das duktales *Carcinoma in situ* macht 80% der Fälle aus und bildet tubuläre Strukturen, während das seltenere lobuläre *Carcinoma in situ* aufgrund eines charakteristischen Adhäsionsdefizites der Zellen aus einem lockeren Zellhaufen ohne festen Verbund besteht, der lose das Lumen der tubuloalveolären Lobuli ausfüllt. Beide Formen des *Carcinoma in situ* entstehen in den tubuloalveolären Lobuli, obwohl die Unterscheidung in duktales und lobuläres vielleicht anderes suggeriert, und führen ohne Therapie in ca. 30% der Patientinnen zu einem invasiven Tumor.

Sobald das Karzinom die Basalmembran durchbricht, welche das Drüsenepithel vom mesenchymalen intralobulären Stroma abgrenzt, liegt per Definition ein invasives Mammakarzinom vor. Auch hier können verschiedene Typen unterschieden werden, deren Prognose zum Teil unterschiedlich ist. Die weitaus häufigste Form (80%) ist das duktales Karzinom, auch als Karzinom ohne speziellen Typ bezeichnet, welches alle Mammakarzinome umfaßt, die keinem anderen Typ zugeordnet werden können (Not otherwise specified NOS). Infolgedessen ist das duktales Karzinom morphologisch recht heterogen. Das lobuläre Karzinom wird in etwa 10% der Mammakarzinome beobachtet und entsteht aus den lobulären *Carcinoma in situ* Vorstufen. Es zeichnet sich durch ein charakteristisches Infiltrierungsmuster auf, wobei Ketten aus einzelnen, hintereinanderliegenden Zellen in das Gewebe infiltrieren („Indian“ filling pattern). Neben dem lobulären Karzinom werden noch das tubuläre-, muzinöse-, medulläre- und papilläre- Mammakarzinom als spezielle Typen differenziert, die bis auf das papilläre Karzinom eine bessere Prognose als die duktales und lobulären Karzinome haben (Deos & Norris, 1982; Jensen *et al.*, 1997; Diab *et al.*, 1999; Middleton *et al.*, 1999; Paterakos *et al.*, 1999).

### **Prognostische und prädiktive Faktoren des Mammakarzinoms**

Um therapeutische und prognostische Aussagen in der Klinik zu erleichtern, werden die duktales und lobulären Karzinome, die zusammen ca. 90% aller Fälle ausmachen, in Gruppen unterschiedlicher klinischer Relevanz unterteilt. Dazu dient erstens das TNM-Stadium (Sobin & Wittekind, 1997), welches die Tumorgroße, die Art und Anzahl der befallenen Lymphknoten und das Vorliegen von Metastasen klassifiziert (standardisiert von der Union Internationale Contre le Cancer, kurz UICC). In Europa wird zweitens die rein histologisch-morphologische Einteilung nach Elston verwendet (Elston & Ellis, 1991), die mit dem

Anglizismus „Grading“ belegt ist. In den USA ist eine kombinierte Einteilung (Stage I-IV) nach Bloom und Richardson gebräuchlich (Bloom & Richardson, 1957).

Das entgeltige TNM-Stadium wird postoperativ erhoben und dann mit dem Präfix „p“ versehen. Der Primärtumor wird klassifiziert in: Kein nachweisbarer Primärtumor (pT<sub>0</sub>), Tumor kleiner 2 cm (pT<sub>1</sub>), Tumor zwischen 2 und 5 cm (pT<sub>2</sub>), Tumor größer 5 cm (pT<sub>3</sub>) und Tumore mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut (pT<sub>4</sub>). Damit assoziiert ist ein relatives Zehnjahresüberleben von 75,7% pT<sub>1</sub>, 57% pT<sub>2</sub>, 36,3% pT<sub>3</sub> und 26,3% pT<sub>4</sub> (Engel *et al.*, 2001). Die Klassifizierung der regionären Lymphknoten lautet: pN<sub>0</sub>, keine Lymphknotenmetastasen; pN<sub>1</sub>, Metastasen in beweglichen axillären Lymphknoten; pN<sub>2</sub>, an Strukturen fixierte axilläre Lymphknotenmetastasen; pN<sub>3</sub>, Metastasen entlang der Arteria mammaria interna. Dabei ist die Anzahl der befallenen Lymphknoten der wichtigste Prognosefaktor. Sind keine Lymphknotenmetastasen festzustellen, liegt das Zehnjahresüberleben bei 82,3%, während in demselben Zeitraum nur 21,1% der Patientinnen mit zehn oder mehr befallenen Lymphknoten überleben (Engel *et al.*, 2001). Außerdem wird das Auftreten von Fernmetastasen dokumentiert: pM<sub>0</sub>, keine Fernmetastase und pM<sub>1</sub>, Vorliegen einer Fernmetastase, wobei die häufigsten Orte der Metastasierung Knochen (70%), Lunge (60%) und Leber (50%) sind.

Das Grading richtet sich bei dem in Europa verwendeten System nach dem Ausmaß der Tubulusformation, dem Pleomorphismus der Zellkerne und der Teilungsrate bzw. der Anzahl der sichtbaren Mitosen (Elston & Ellis, 1991; Ellis *et al.*, 1992; Sloane *et al.*, 1998). Je nach Beurteilung wird dem Tumor ein Grading von G1, relativ gut differenziert mit unauffälligen Zellkernen und verbreiteter Tubulusausbildung bis G3, Kernpolymorphie und hohe Mitoserate weitgehend ohne Tubuli, bzw. eine Übergangsform G2 zugeordnet. Das Grading ist unabhängig von dem TNM-Stadium ein prognostischer Faktor, der mit einem Zehnjahresüberleben von G1 87,9%, G2 69,7% und G3 49,6% korreliert (Engel *et al.*, 2001).

Ein vielversprechender Ansatz eine besser auf den Patienten angepaßte Prognose und Therapie zu erreichen ist die molekulare Charakterisierung der Tumore. Mutationen des Tumorsuppressorgens p53, die in ca. 22% der Mammakarzinome gefunden werden, verschlechtern das Fünfjahresüberleben von 80% auf 59% (Bergh *et al.*, 1995). Hinzu kommt, daß die durch eine p53-Mutation verursachte Apoptoseresistenz des Tumor die Therapiewirkung von Tamoxifen verhindert, so daß in diesen Fällen von einer entsprechenden Medikation abgeraten wird. Ein bedeutender Fortschritt in der Klassifikation bzw. Prognose des Mammakarzinoms wurde durch die Expressionsanalyse in Verbindung mit der Microarray-Technologie erreicht. Mit bioinformatischen Verfahren können aus

Expressionsprofilen Gengruppen extrahiert werden deren Expressionsniveau mit bestimmten Eigenschaften des Tumors korreliert, wobei die deutlichste Abgrenzung zwischen Östrogen positiven und negativen Tumoren besteht (Martin *et al.*, 2000; Perou *et al.*, 2000; Gruvberger *et al.*, 2001; West *et al.*, 2001). Diese auf Expressionsebene definierten Gruppen der Mammakarzinome ermöglichen, korreliert mit den Überlebensdaten, individuelle Prognosen für die betroffenen Patientinnen (Sorlie *et al.*, 2001). Die Leistung dieser neuen molekularen Taxonomie des Mammakarzinoms konnte soweit gesteigert werden, daß mit einer Sensitivität von 91% und einer Spezifität von 73% das metastasierende Karzinom in Lymphknoten negativen Patientinnen vorhergesagt werden kann, so daß die adjuvante Behandlung bei den verbleibenden Patientinnen als verzichtbar erscheint (van 't Veer *et al.*, 2002).

Neben diesen prognostischen Markern gibt es nur sehr wenige prädiktive Faktoren welche das Ansprechen einer bestimmten Therapie vorhersagen. Von Bedeutung ist dabei der in 27% der Lymphknoten-positiven Mammakarzinome amplifizierte Wachstumsfaktorrezeptor HER-2/*neu*, da er die Möglichkeit einer Herceptin-Antikörpertherapie eröffnet, jedoch auch mit einem signifikant verringerten Überleben korreliert ist (Slamon *et al.*, 1989).

### **Therapie des Mammakarzinoms**

Nach den Konsensusrichtlinien, welche auf der siebten internationalen Tagung zur Adjuvanten Therapie des primären Mammakarzinoms erarbeitet wurden (Aapro, 2001), werden nach dem chirurgischen Eingriff alle Patientinnen zusätzlich mit einer adjuvanten Polychemotherapie behandelt. Eine Ausnahme davon bilden nur die Patientinnen mit Tumoren kleiner 1 cm in Verbindung mit einem negativen Lymphknotenbefund, da diese Gruppe eine so günstige Prognose hat, daß der chirurgische Eingriff als ausreichend angesehen wird. Anschließend an die Chemotherapie ist die hormonelle Therapie der Östrogen- oder Progesteronrezeptor-positiven Tumore mit Tamoxifen Standard. Dadurch wird der hormonelle Wachstumsreiz durch die endokrinen Hormone unterbunden. Die lokale Bestrahlung der befallenen Brust wird nur bei Hochrisikopatientinnen empfohlen, d.h. bei vier oder mehr positiven Lymphknoten (NIH, 2000; Eifel *et al.*, 2001).

Die Therapieerfolge der üblichen Chemotherapie Behandlungsschemata belaufen sich auf eine 15%ige Reduktion der Mortalität und eine 25%ige Reduktion der Rezidive (Early-Breast-Cancer-Trialists, 1998a). Umgekehrt betrachtet, wird das 10-Jahresüberleben der Patientinnen ohne Lymphknotenbefall von 71% auf 78% gehoben (eine absolute Verbesserung von 7%) und das der Lymphknoten positiven Patientinnen von 42% auf 53% gesteigert (Verbesserung um 11%). Die hormonelle Therapie durch fünfjährige Tamoxifen-Gabe erreicht bei den Östrogenrezeptor-positiven Patientinnen darüber hinaus eine Reduktion

der Rezidivrate von 47% sowie der Mortalität von 26% innerhalb eines Zeitraums von 10 Jahren (Early-Breast-Cancer-Trialists, 1998b). Wiederum bezogen auf das Gesamtkollektiv bedeutet dies eine Verbesserung des 10 Jahresüberlebens von 73,3% auf 78,9% bei den Lymphknoten-negativen und von 50,5% auf 61,4% der Lymphknoten-positiven Patientinnen. Wie aus diesen Zahlen hervorgeht, profitieren letztlich von einer adjuvanten Therapie nur 6 - 11% der Patientinnen, während 70% bzw. 40% der Lymphknoten negativen / positiven Patientinnen auch ohne Therapie überleben und entsprechend 22% / 47% trotz Therapie nicht geheilt werden können. Daher sind die Bestrebungen groß, diejenigen Patienten besser zu bestimmen, welche von adjuvanten Therapien erfolgreich behandelt werden können und den verbleibenden ca. 90% diese belastenden und mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität verbundenen Therapien zu ersparen.

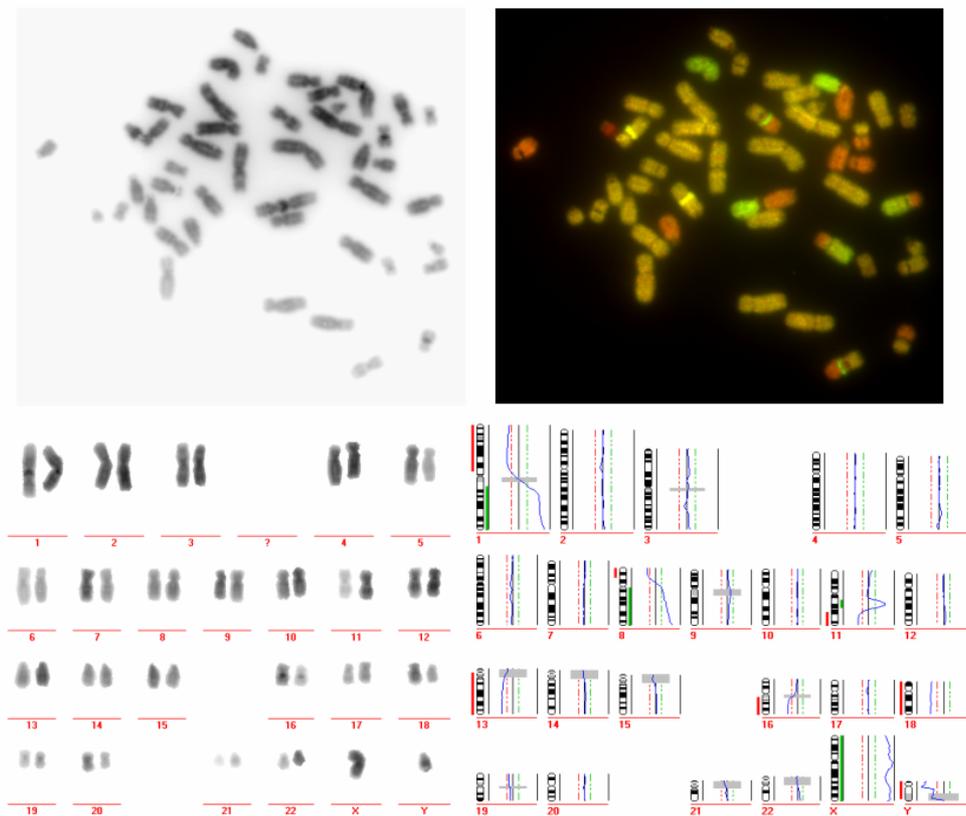
## 1.2 Genomische Untersuchung des Mammakarzinoms

Zur globalen Analyse des Genoms von Tumoren wurden diverse Methoden entwickelt, die entweder direkt die Konstitution der Metaphasen des Tumors analysieren oder indirekt den Nachweis von genomischen Aberrationen erbringen. Die älteste Methode ist die sorgfältige Untersuchung des Karyotyps auf Translokationen, Inversionen, Deletionen und homogen gefärbte Regionen (Denver-Conference, 1960; Patau, 1960). Die *in situ* Hybridisierungstechnik auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kerne der Tumore kann im Gegensatz dazu gerade kleinere Amplifikationen sehr zuverlässig nachweisen sowie zum Teil auch Translokationen bei entsprechender Wahl der Hybridisierungsproben („Fluoreszenz in situ hybridization“ FISH) (Pinkel *et al.*, 1986). Allerdings sind eine Detektion von Deletionen und die simultane Analyse größerer genomischer Abschnitte nur schwer möglich. Diese Einschränkung wird umgangen, wenn anstelle kleinerer definierter Hybridisierungsproben chromosomenspezifische Sonden eingesetzt werden. Mit Hilfe geeigneter Kombinationen von mindestens fünf Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich alle 23 humanen Chromosomen differentiell markieren („Painting probes“), so daß auf einer Metaphase des Tumors alle Translokationen sowie die größeren Deletionen und Amplifikationen dargestellt werden können. Die Auswertung dieser komplexen Hybridisierungen kann einerseits durch die Analyse der emittierten Fluoreszenzspektren der einzelnen chromosomenspezifischen Farbstoffkombinationen geschehen (Spektral Karyotyping, SKY, (Schrock *et al.*, 1996)) oder durch entsprechende Fluoreszenzfilter mit welchen die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe direkt unterschieden werden können (Multiplex-

FISH (Speicher *et al.*, 1996; Eils *et al.*, 1998)). Die vorhergehend angeführten Methoden, mit Ausnahme der Interphase FISH, benötigen allerdings aus dem zu untersuchenden Tumor bzw. Gewebe eine Metaphasepräparation - eine Voraussetzung die bei soliden Tumoren oft nicht gegeben ist.

Die Analyse der aus dem Tumorgewebe isolierten genomischen DNA bietet eine von den Metaphasen des Tumors unabhängige Alternative. Durch die Anwendung spezifischer oder globaler PCRs sind viele Methoden zur Detektion von Mutationen und Aberrationen in der Tumor-DNA entstanden. Eine in der Tumorgenetik verbreitete Methode ist die Darstellung des Verlustes von polymorphen DNA-Markern. Sie wird zur Identifizierung von Deletionen in der Tumor-DNA genutzt (LOH „Loss of heterozygosity“). Dazu können einerseits Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) (Dracopoli & Fogh, 1983; Meltzer *et al.*, 1991) oder polymorphe Dinukleotid-Wiederholungen (Weissenbach *et al.*, 1992; Thibodeau *et al.*, 1993) verwendet werden. Allerdings muß für jeden zu untersuchenden Patienten erst Normalgewebe analysiert werden um die informativen DNA-Marker zu charakterisieren, so daß meist nur eine Auswahl der möglichen Marker für die LOH-Analyse zur Verfügung steht.

Ein differentieller Ansatz, der die Analyse des gesamten Genoms auf numerische Aberrationen erlaubt, ist die komparative Hybridisierung der global amplifizierten Tumor-DNA sowie einer geeigneten Referenz-DNA auf humane Metaphasen („Comparative Genomic Hybridization“ oder CGH) (Kallioniemi *et al.*, 1992; du Manoir *et al.*, 1993; Joos *et al.*, 1993; Kallioniemi *et al.*, 1994b). Dabei wird die genomische DNA des Tumors mit einem Hapten markiert und zusammen mit einer differentiell markierten Referenz-DNA auf humane Metaphasen eines gesunden Spenders hybridisiert. Die an die Metaphasen durch Basenpaarung angelagerten DNA-Proben werden anschließend durch zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe angefärbt und durch die passende Wahl von Fluoreszenzfiltern getrennt digital fotografiert. Mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung lassen sich die Intensitätsunterschiede der Tumor- und Referenz-DNA-Hybridisierungen auf der Basis der erzeugten Digitalaufnahmen berechnen und graphisch darstellen (Siehe Abbildung 1). Der wesentliche Vorteil dieser Technik ist, daß alle numerischen Aberrationen des gesamten Genoms in einem Experiment mit einer Auflösung von 10 bis 20 Mb dargestellt werden können, ohne von dem zu untersuchenden Tumor Zellkulturen bzw. Metaphasen gewinnen zu müssen, wie dies bei Karyogramm-Analysen der Fall ist.



**Abbildung 1 Das Prinzip der CGH**

Zwei differenziell markierte DNA-Proben werden auf humane Metaphasen hybridisiert und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen. Die mit DAPI gegengefärbten Chromosomen werden in ein Schema sortiert und das CGH-Profil anschließend mittels Computer berechnet.

### **Korrelation genomischer Aberrationen mit der Progression des Mammakarzinoms**

Ein wesentliches Ziel der genomischen Untersuchungen des Mammakarzinoms ist die Identifikation der Aberrationen, welche mit der malignen Progression einhergehen. In Anlehnung an die Studien zum Kolonkarzinom durch Vogelstein (Kinzler & Vogelstein, 1996) soll mit dem Vergleich verschiedener histologischer Stadien ein zeitlich koordiniertes Bild der genomischen Aberrationen nachgezeichnet werden. Beginnend mit den Hyperplasien der Mamma zeigte sich, daß bereits in Tumorschnitten mit anteilig normalen (UDH) und atypischen (ADH) Hyperplasien durch CGH detektierbare genomische Aberrationen vorliegen, wobei als häufigste Aberration eine Deletion von Chromosom 16q in 55% der Fälle gefunden wurde (Gong *et al.*, 2001). Die Tatsache, daß genomische Aberrationen sehr früh in der Tumourprogression auftreten, wird durch LOH-Analysen bestätigt. Bereits in dem Tumor benachbarten, morphologisch normalen Drüsen konnte in 27% der untersuchten Proben einen Allelverlust detektiert werden (Deng *et al.*, 1996), des weiteren in 37% der UDH- und 42% der ADH-Proben (O'Connell *et al.*, 1998). Die frühen Hyperplasien der luminalen Zellen in

den tubualveolären Lobuli sind allerdings nur mit einer sehr leichten Erhöhung des Erkrankungsrisikos korreliert, obwohl histologisch fließende Übergänge von der atypischen Hyperplasie zum *Carcinoma in situ* bestehen. Entsprechend legen die genomischen Untersuchungen des *Carcinoma in situ* eine lineare Progression von den Hyperplasien zum Mammakarzinom nahe. Es treten unter anderem 1q und 17q Amplifikationen mit 26-60% bzw. 29-56% relativ häufig auf, die typischerweise auch in den invasiven Mammakarzinomen gefunden werden (Buerger *et al.*, 1999a; Moore *et al.*, 1999; Aubele *et al.*, 2000). Die charakteristischen Aberrationen des invasiven Mammakarzinoms sind durch mehrere Studien mit insgesamt 546 Primärtumoren relativ übereinstimmend beschrieben worden. Darunter fallen die Amplifikationen von 1q (57-83%), 8q (30-90%), 16p (38-40%), 17q (18-67%) und 20 (18-39%), sowie die Deletionen von 8p (26-52%), 13q (25-45%), 16q (26-71%) und 17p (22-61%) (Kallioniemi *et al.*, 1994a; Nishizaki *et al.*, 1997a; Hermsen *et al.*, 1998; Tirkkonen *et al.*, 1998; Buerger *et al.*, 1999b; Roylance *et al.*, 1999; Waldman *et al.*, 2000; Buerger *et al.*, 2001). Werden vergleichend zu dem Primärtumor Metastasen untersucht, sind die CGH-Daten der Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen etwas unterschiedlich. Lymphknoten-Metastasen teilen die meisten Aberrationen des Primärtumors, weisen darüber hinaus aber noch zusätzliche CGH Veränderungen auf, wie z.B. den Verlust von Chromosom 18q (Nishizaki *et al.*, 1997b). Dieses Resultat kann wiederum mit einer linearen Progression in Einklang gebracht werden. Die CGH-Ergebnisse der Fernmetastasen zeigen im Gegensatz dazu bei einem Viertel der untersuchten Fälle nahezu keine gemeinsamen Aberrationen mit dem dazu gehörigen Primärtumor (Kuukasjarvi *et al.*, 1997a), obwohl die durchschnittliche Aberrationsfrequenz der typischen Loci (siehe oben) keine signifikanten Unterschiede zeigen. Es muß daher im Fall der Fernmetastasen zumindest bei einigen Patientinnen eine frühe Diversifikation zwischen Primärtumor und Metastasen erfolgen. Eine Möglichkeit, die Beziehungen zwischen Primärtumor und Metastasen weiter aufzuklären, bietet die Analyse der residualen disseminierten Tumorzellen, die Zwischenglieder der systemischen Tumorerkrankung darstellen.

### 1.3 Minimal residuale Krebserkrankung

Die Diagnose der minimalen residualen Krebserkrankung bezieht sich auf den 1981 erbrachten Nachweis von epithelialen Zellen im Knochenmark bei Karzinompatienten (Dearnaley *et al.*, 1981; Mansi *et al.*, 1987; Schlimok *et al.*, 1987) und hat mittlerweile unter der Bezeichnung pM<sub>(i)</sub> Eingang in die TNM-Klassifikation gefunden (Hermanek, 1994;

Wittekind & Wagner, 1997). Die zum Nachweis der disseminierten Tumorzellen verwendeten immunzytochemischen Färbungen machen sich den Umstand zu nutze, daß epitheliale Marker in den mesenchymalen Geweben des Knochenmarks, Lymphknotens sowie im Blut nicht exprimiert werden (Pantel *et al.*, 1994). In den relevanten klinische Studien wurden einerseits Immunglobuline gegen humane Milchfett-Globuline und Mucine eingesetzt (E29 spezifisch für das epitheliale Membranantigen und BM-2 welcher das epitheliale Mucin TAG-12 erkennt), andererseits monoklonale Antikörper gegen epitheliale Zytoskelettbestandteile (A45-B/B3 gegen ein gemeinsames Epitop der Zytokeratine 8, 18 und 19 und CK2 mit einer Spezifität gegen das Zytokeratin 18).

### **Prognostische Bedeutung der minimal residualen Erkrankung**

Es wurde gezeigt, daß Tumorzellen postoperativ und auch nach adjuvanter Therapie im Knochenmark, Lymphknoten und Blut persistieren (Gath & Brakenhoff, 1999; Pantel *et al.*, 1999; Janni *et al.*, 2000; Tsavellas *et al.*, 2001). Damit ergibt sich die Frage, welche klinische Bedeutung den disseminierten Zellen zukommt. Durch die unterschiedlichen immunzytochemischen Nachweissysteme und den entsprechend differentiellen Protokollen, zeigen sich allerdings auch Variationen in den prognostischen Aussagen, die hier am Beispiel des Mammakarzinoms aufgeführt werden sollen: Das epitheliale Membranantigen (EMA) als Marker der disseminierten Tumorzellen ergab in vier Studien an 892 Mammakarzinompatientinnen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der minimal residualen Tumorerkrankung und dem Rezidivfreien- bzw. Gesamtüberleben (Cote *et al.*, 1991; Harbeck *et al.*, 1994; Mansi *et al.*, 1999; Gebauer *et al.*, 2001). In der multivariaten Analyse wurde jedoch festgestellt, daß entweder EMA-positive Zellen im Knochenmark nicht unabhängig von anderen prognostischen Faktoren sind (Cote *et al.*, 1991; Mansi *et al.*, 1999) oder weniger aussagekräftig im Vergleich zur Tumorgröße und dem Lymphknotenstatus (Harbeck *et al.*, 1994; Gebauer *et al.*, 2001). Eine Studie des Mammakarzinoms mit 727 Patientinnen konnte anhand des BM-2 Antikörpers einen signifikanten und unabhängigen prognostischen Einfluß der im Knochenmark detektierten Zellen nachweisen, aber auch hier hatte der Nodalstatus und die Progesteronrezeptor-Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben deutlich mehr Gewicht (Diel *et al.*, 1996). Der A45-B/B3-Antikörper zeigte ebenfalls in zwei klinischen Studien des Mammakarzinoms mit insgesamt 641 Patientinnen eine signifikante Korrelation von Zytokeratin-positiven Zellen und dem Auftreten von Metastasen bzw. dem Überleben (Braun *et al.*, 2000; Janni *et al.*, 2001). Der Nachweis disseminierter Tumorzellen war neben der Tumorgröße und Östrogenrezeptorstatus der bedeutendste unabhängige prognostische Faktor (Braun *et al.*, 2000). Vergleichbare

prospektive Studien des Mammakarzinoms liegen im Falle des CK2-Antikörpers nicht vor. Dennoch zeigen Studien zum nicht kleinzelligen Lungenkarzinom und Colonkarzinom auch mit diesem Antikörpersystem signifikante Korrelationen mit dem Rezidiv-freiem Überleben (Lindemann *et al.*, 1992; Pantel *et al.*, 1996) sowie mit dem Gesamtüberleben beim Magenkarzinom (Jauch *et al.*, 1996). Interessanterweise wurden jedoch drei Studien am nicht kleinzelligen Lungenkarzinom, Prostata- und Magenkarzinom publiziert, welche zu keinem signifikanten prognostischen Ergebnis der CK2-positiven Zellen im Knochenmark kommen (Weckermann *et al.*, 2001; Heiss *et al.*, 2002; Osaki *et al.*, 2002).

### **Molekulare Analyse disseminierter Tumorzellen**

Um einerseits den direkten Beweis zu erbringen, daß es sich bei den epithelialen Zellen im Knochenmark um disseminierte Tumorzellen handelt und um andererseits erste Erkenntnisse über die Biologie dieser Zellen zu gewinnen, wurden Zytokeratin-positive Zellen genetisch und immunzytochemisch genauer analysiert. Es konnte mittels immunzytochemischen Doppelfärbungen, sowie durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) eine Amplifikation des ErbB2 Onkogens in den disseminierten Zellen des Mammakarzinoms detektiert werden (Pantel *et al.*, 1993; Muller *et al.*, 1996; Putz *et al.*, 1999; Braun *et al.*, 2001b) sowie durch spezifische Einzelzell-PCR eine Ki-*ras* Mutation in den Zytokeratin-positiven Zellen des Pankreas- und Rektalkarzinoms (Dietmaier *et al.*, 1999). Aus dem Knochenmark von Mamma-, Prostata-, Lungen-, Colon- und Ösophaguskarzinompatienten konnten Zelllinien durch SV40 Transfizierung der Zytokeratin positiven Zellen generiert werden (Pantel *et al.*, 1995) die, wie anhand einer Ösophaguszelllinie exemplarisch durch Multiplex-FISH gezeigt, auch genomische Aberrationen, inklusive Translokationen, aufweisen (Hosch *et al.*, 2000). Somit ist ein maligner Ursprung der Zytokeratin-positiven Zellen erwiesen. Das biologische Verständnis der Disseminierung und Metastasierung bleibt allerdings sehr lückenhaft.

## **1.4 Genomische Charakterisierung einzelner Zellen**

Die CGH-Methode erscheint für die genomische Charakterisierung einzelner Zellen besonders geeignet, da sie ein globales Bild aller unbalancierten chromosomalen Veränderungen liefert. Es ist jedoch zu beachten, daß die CGH nur quantitative Veränderungen der Tumor DNA größer 10-20 Mb detektiert, d.h. kleinere Aberrationen, sowie Inversionen, balancierte Translokationen und Punktmutationen nicht dargestellt werden. Die Anwendung der CGH-Technik erfordert zwischen 0,5 und 1 µg DNA um zufriedenstellende Hybridisierungsergebnisse zu erhalten (Kallioniemi *et al.*, 1992). Daher ist

eine globale Amplifikation des Genoms der einzelnen Zellen, die nur etwa 6 pg DNA enthalten (Morton, 1991), zwingend notwendig. Die Polymerase Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“ PCR) (Saiki *et al.*, 1985) ist daher grundlegend, nur sie bietet die Möglichkeit eine ausreichende Menge der DNA-Probe zu gewinnen.

Speziell zur genomischen Analyse einzelner Zellen wurde die Primerextensions-Preamplifikation entwickelt („Primer-Extension Preamplification“ PEP) (Zhang *et al.*, 1992; Dietmaier *et al.*, 1999). Dabei wird durch degenerierte Oligonukleotide eine lineare Amplifikation des Genoms der Einzelzelle erreicht, so daß nachfolgend ca. 30 spezifische PCR's durchgeführt werden können. Zwar ist die Prä-amplifikation des Genoms global, doch ist die Effizienz zu gering, um das Produkt direkt für die CGH zu verwenden. Die verbreitetste Methode für eine globale Amplifikation ist daher die Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden als PCR-Primer. Sie ermöglichen eine globale Amplifikation, da durch die hohe Zahl an Primerbindungsstellen (bei sechs degenerierten Basen rechnerisch über 700000 beim Menschen) das gesamte Genom abgedeckt und damit amplifiziert werden kann {„Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR“ DOP-PCR (Telenius *et al.*, 1992); „PCR with tagged random primers“ T-PCR (Grothues *et al.*, 1993)}. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem relativ einfachen Protokoll sowie der guten Reproduzierbarkeit und Sensitivität. Die DOP-PCR ermöglicht eine Kombination der globalen Amplifikation einzelner Zellen mit der CGH Technik (Wells *et al.*, 1999). Wie die Ergebnisse zeigen, sind Trisomien verlässlich erkennbar, was eine erfolgreich Anwendung dieser Technik in der Präimplantationsdiagnostik ermöglichte (Wilton *et al.*, 2001). Allerdings wurden lokale Unterrepräsentationen der Test-DNA beobachtet, die sich in artifiziellen Deletionen im Bereich der Telomere manifestieren. Darüber hinaus zeigten wiederholte CGH-Experimente, jeweils ausgehend von demselben PCR-Produkt, eine gewisse Variabilität, so daß subchromosomale Aberrationen nicht aufgelöst werden können (Voullaire *et al.*, 1999). Eine mögliche Ursache dieser Effekte ist, daß die degenerierten Oligonukleotide während der ersten PCR-Zyklen zu selten binden und so nur ein Teil der Fragmente wirkungsvoll amplifiziert wird. Die Folge ist ein zufälliger Verlust von genomischem Material, der zu inhomogenen Hybridisierungen führt - ein Umstand, der bei dem Einsatz von größeren DNA-Mengen nicht zur Ausprägung kommt.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Thema dieser Dissertation ist die Analyse der systemischen Tumorprogression von Mammakarzinompatientinnen. Es soll ein besseres Verständnis des malignen Ursprungs, der

Klonalität, des Zeitpunktes der systemischen Ausbreitung und der möglichen ektopen Evolution von Tumorzellen erreicht werden. Zu diesem Zweck sollten einzelne disseminierte Tumorzellen molekular analysiert werden, da ihr Nachweis mit einer schlechten klinischen Prognose korreliert. Da einerseits kaum molekulare Vorkenntnisse über die disseminierten Tumorzellen vorliegen um Onco- bzw. Tumorsuppressorgene zu antizipieren, deren Mutation im Disseminierungsprozess eine Rolle spielen, andererseits aber die genomischen Aberrationen des Mammakarzinoms von den hyperplastischen Vorstufen bis zu den Metastasen relativ gut beschrieben sind, wurde das Gewicht nicht auf die Detektion von Mutationen einzelner Gene gelegt, sondern auf eine möglichst globale Untersuchung der genomischen Aberrationen. Daraus leiten sich zwei Aufgabestellungen ab: Erstens die Entwicklung einer PCR-Methode, mit deren Hilfe das Genom einzelner Zellen global amplifiziert und mit der CGH-Technik verbunden werden kann, da zu Beginn dieser Dissertation kein geeignetes Protokoll verfügbar war. Daran anknüpfend die Analyse der genomischen Veränderungen Zytokeratin-positiver Zellen aus dem Knochenmark von Patientinnen mit einem Mammakarzinom, deren Erfolg direkt von einer unverfälschten und effizienten PCR-Amplifikation einzelner Zellen abhängt.

## 2 Kooperationspartner, Patientinnen, Methoden und Material

### 2.1 Kooperationspartner

Die in dieser Dissertation bearbeiteten Patientinnenproben wurden durch kooperierende Kliniken und pathologische Institute zugänglich. Die bioinformatischen Berechnungen wurden am DKFZ Heidelberg durchgeführt.

#### Bioinformatik

Dr. Thomas Ragg	phase-it Intelligent Solutions AG 69115 Heidelberg
Dr. Martin Granzow	phase-it Intelligent Solutions AG 69115 Heidelberg
PD Dr. Roland Eils	Deutsches Krebsforschungszentrum 69120 Heidelberg

#### Klinik

Dr. Angela Daskalakis	Zentralklinikum Augsburg II Medizinische Klinik 86156 Augsburg
PD Dr. Andre Ahr	Universitäts Frauenklinik Frankfurt 60590 Frankfurt
Dr. Detlev Harich	Klinik Bad Trissl 83080 Oberaudorf

#### Pathologie

Prof. Dr. Hans Arnholdt	Zentralklinikum Augsburg Institut für Pathologie 86156 Augsburg
Prof. Dr. Joachim Diebold	Institut für Pathologie Ludwig-Maximilians-Universität 80337 München

## 2.2 Patientinnen

Code	Klassifikation initial	Typ	Her2/neu	Östrogen	Progesteron	Knochenmark	Primärtumor	Lymphknoten
001	pT2 pN1b (2/10) MO G2	duktal	überexprimiert	positiv	positiv	1 aberrante Zelle		
002	pT1c(m) pN1 (3/14) MO G2	lobulär				1 aberrante Zelle	analysiert	analysiert
003	T1c NO MO G2	lobulär				2 aberrante & 1 normale Zelle	analysiert	
004	pT2 pN2 (34/34) MO	lobulär	überexprimiert	positiv		1 aberrante Zelle		
005	pT1 pNO (0/13) MO G2	duktal				1 aberrante Zelle		
006	pT1 pNO (0/20) G2 MO	duktal	überexprimiert	positiv	negativ	1 aberrante Zelle	analysiert	
007	T1b NO MO G1	lobulär				1 aberrante & 1 normale Zelle		
008	pT2 G2 pN1bii (8/12) pMO	lobulär	überexprimiert	positiv		5 aberrante Zellen		
009	pT1c pNO (0/15) pMO G2	duktal	überexprimiert	positiv	negativ	1 aberrante Zelle		
010	pT2(i,s) pN1a (1/14) MO G3	duktal	überexprimiert	positiv	negativ	1 aberrante & 2 normale Zellen		
011	pT1b(is) pNO (0/15) pMO G2	duktal	überexprimiert	positiv	positiv	1 aberrante & 1 normale Zelle		
012	ypT2(m) pN1biii (13/23) pMO G2	lobulär	normal	negativ	negativ	3 aberrante & 2 normale Zellen	analysiert	analysiert
013	pT mic pNO (0/12) MO G2	duktal	normal	positiv	negativ	1 aberrante Zelle		
014	yT3 yN1 MO G3	duktal				1 aberrante & 1 normale Zelle	analysiert	analysiert
015	T2 N1 MO G2	duktal				1 aberrante Zelle	analysiert	analysiert
016	pT1b pNO (0/14) MO G1	duktal				2 aberrante & 3 normale Zellen		
017	pT1c pN1 (1/16) MO G2	duktal				2 aberrante & 2 normale Zellen	analysiert	
018	pT3(is) pN1biv (1/28) pMO G3	duktal	normal	negativ	positiv	3 aberrante & 4 normale Zellen		
019	pT1c pNbi (1/15) MO G2	lobulär	normal	positiv	negativ	1 aberrante Zelle	analysiert	analysiert
020	pT3(m) pN2 (9/11) MO G2	duktal	normal	positiv	negativ	1 aberrante Zelle		
021	yT1c yNO MO G3	duktal				1 aberrante & 4 normale Zellen		
022	pT1a(is) pNO (0/18) pMO G2		überexprimiert	positiv	negativ	1 aberrante & 1 normale Zelle		
023	ypT2 ypN1bii (7/13) MO G2	lobulär	überexprimiert	positiv	negativ	1 aberrante Zelle		
024	links pT1c NO (0/14) MO G2	duktal	normal	negativ	negativ	1 aberrante Zelle	analysiert	
025	rechts pT2 pNO (0/17) pMO G3							
026	pT1c pNO MO G3					3 aberrante Zellen	analysiert	
027	ypT1b pNx MO G3 R0					2 aberrante Zellen		
027	links pT1b pNO (0/12) MO G2					2 aberrante & 1 normale Zelle	analysiert	
028	rechts pT3 pN1 (15/15) MO G2							
028	pT1c pNO MO	duktal				2 aberrante Zellen		
029	pT2 pN1cbiii (8/16) pMO G2	duktal	überexprimiert	positiv	negativ	1 aberrante Zelle		
030	pT2 pN1bii (11/16) pMO G2	lobulär	überexprimiert	negativ	negativ	1 aberrante Zelle	analysiert	analysiert
101	links pT3 pN1bii (17/18) M1 G3	duktal	normal	negativ	positiv	10 aberrante Zellen	analysiert	
102	rechts pT2 pN1bii (13/19) pMO G2							
102	pT4b pN2 pMO G2 bei Punktion M1	sonstige				3 aberrante Zellen	analysiert	
103	T2 NO MO G3 bei Punktion M1	lobulär				5 aberrante Zellen		
104	pT4 pNx M1 Gx					4 aberrante Zellen	analysiert	
105	pT1c pN1biv (20/22) G2 M1	duktal	überexprimiert	positiv	positiv	1 aberrante & 1 normale Zelle	analysiert	
106	pT3 pN2 MO G2-3 bei Punktion M1	duktal				1 aberrante Zelle	analysiert	
107	M1					1 aberrante Zelle		
108	M1					2 aberrante Zellen		
109	cT1 N1 M1	duktal	überexprimiert	positiv	negativ	1 aberrante Zelle	analysiert	
110	t2N1biiiM1Gx					1 aberrante Zelle		
111	pT2 N1bi (3/15) MO G2 bei Punktion M1	duktal	überexprimiert	positiv	positiv	5 aberrante Zellen		
112	pT2 N1b MO G2 bei Punktion M1	duktal				4 aberrante Zellen		
113	M1					5 aberrante Zellen		
114	M1					1 aberrante Zelle		
115	M1					11 aberrante & 1 normale Zelle	analysiert	
116	M1					1 aberrante Zelle		
117	M1					3 aberrante Zellen		
118	M1					4 aberrante Zellen		
119	pT1 pNO pMO G1 bei Punktion M1	duktal				2 aberrante Zellen		
120	pT1c pNO (0/17) G2 M1	duktal	überexprimiert	positiv	negativ	3 aberrante Zellen	analysiert	
121	pT1c pN1biv (14/14) pM1 G2	duktal	überexprimiert	positiv	negativ	2 aberrante & 1 normale Zelle	analysiert	
122	pT3 N1b (14/21) MO G2 bei Punktion M1	duktal	überexprimiert	negativ	negativ	3 aberrante Zellen	analysiert	
123	pT3 pN1 pMO G3 bei Punktion M1	lobulär				2 aberrante & 2 normale Zellen	analysiert	
201	pT2 pN1bi (1/19) MO G2	lobulär	überexprimiert	positiv	positiv	1 normale Zelle	analysiert	
202	pT1b(is) pNO (0/15) pMO G1	duktal	normal	positiv	positiv	2 normale Zellen	analysiert	
203	pT2(is) pNO (0/20) MO G2	duktal	überexprimiert	positiv	positiv	4 normale Zellen	analysiert	
204	pT2 pN1b (1/24) pMO G2	duktal				2 normale Zellen		
205	T1c NO MO G1	duktal				1 normale Zelle		
206	pT2(m, is) pN1b (1/18) pMO G3	duktal	normal	negativ	negativ	1 normale Zelle		
207	yT2 yNO MO G3	lobulär				1 normale Zelle		
208	T1c NO MO G2	duktal				1 normale Zelle		
209	pNO (0/19) MO	lobulär	überexprimiert	positiv	negativ	1 normale Zelle		
210	T2 NO MO G3	lobulär				1 normale Zelle		
211	pN1bix (2/12) MO	sonstige				1 normale Zelle		
212	pT1c pNO (0/25) pMO G2	duktal	überexprimiert	positiv	positiv	1 normale Zelle		
213	pT1c pNO (0/24) MO G2	duktal	normal	negativ	positiv	1 normale Zelle		
214	pT2 pNO (0/10) pMO G3	duktal	überexprimiert	positiv	positiv	1 normale Zelle		
215	pT1c pNO (0/11) pMO G2	duktal	normal	positiv	negativ	1 normale Zelle		
216	pT1b pNO (0/10) pMO G2	duktal	überexprimiert	positiv	positiv	1 normale Zelle		
217	pT2 N1 (7/17) MO G2					1 normale Zelle		
218	yT0 yNO MO G0	duktal				1 normale Zelle		
219	yT3 yN1 MO G1	lobulär				1 normale Zelle		
220	pT2 pN2 (18/18) MO G2	lobulär	überexprimiert	negativ	negativ	1 normale Zelle		
221	cT2c NOc MO G3	duktal				1 normale Zelle		
222	MO	sonstige				2 normale Zellen		
223	MO					2 normale Zellen		
224	pT1c(m, is) pN1bi (2/18) pMO G3	duktal	normal	negativ	negativ	2 normale Zellen		
225	pN1b i.v. (1/18) MO G3	duktal	überexprimiert	positiv	positiv	3 normale Zellen		
226	links pT2 pNO (0/18) pMO G2	lobulär	überexprimiert	positiv	positiv	1 normale Zelle		
227	rechts pT4b pN1bi MO G2-3 bei Punktion M1							
227	T1b N1 M1 G2	duktal				1 normale Zelle		
228	pT1b pNO (0/9) pMx G2	duktal	überexprimiert	positiv	negativ	1 normale Zelle		
229	pT2 pNO (0/10) G2	duktal	überexprimiert	positiv	negativ	1 normale Zelle		
230	links pT1c pNO (0/11) pMx G2		überexprimiert	positiv	negativ	1 normale Zelle		

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Aufbereitung des Knochenmarks

Das Knochenmark wird in einem 50 ml Falcon zunächst mit Hank's Salzlösung auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 170 g zentrifugiert, um grobe Verunreinigungen wie z.B. Fett sowie Thrombozyten zu entfernen. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 7 ml PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wird vorsichtig mit 7 ml Percoll 50 überschichtet und 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Die aus mononukleären Zellen bestehende Interphase wird in ein frisches Falcon-Reaktionsgefäß überführt, mit PBS aufgefüllt und 10 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit ca. 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je 500.000 Zellen werden auf die beiden Flächen eines Haft-Objektträgers aufgetragen. Die Zellen sedimentieren innerhalb 1 h, das überständige PBS wird abgenommen und der Haftobjektträger über Nacht getrocknet.

### 2.3.2 Immunozytochemische Färbung

Den Protokollen der drei verwendeten Antikörper-Systemen sind einige Schritte gemeinsam: Nach der Equilibrierung der Präparate in PBS wurden unspezifische Bindungsstellen 20 min mit 10%igen humanen AB-Serum blockiert, nach jeder Antikörperinkubation erfolgte ein dreimaliges Waschen in PBS und die Zellen wurden zum Abschluß der Färbung mit 1% PFA für 5 min fixiert. Bei jeder Färbung wurde als Positivkontrolle ein Präparat der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mitgeführt, als Negativkontrolle diente ein Patientenpräparat, bei dem anstelle des Zytokeratinantikörpers ein Antikörper gleichen Isotyps (IgG<sub>1</sub>) verwendet wurde, in der Regel MOPC 21, der mit keinem menschlichen Antigen reagiert.

#### A45-APAAP / CK2-APAAP

Pro Auftragsfläche des Haftobjektträgers wurden 250 µl Primärantikörperverdünnung in 10%igen humanen AB-Serum aufgetragen und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Folgende Antikörper wurden dabei in den jeweiligen Verdünnungen verwendet:

A45-B/B3 ( $\alpha$ -pan-Cytokeratin)	2 µg/ml
CK2 ( $\alpha$ -Cytokeratin 18)	2,5 µg/ml
MOPC 21 (IgG <sub>1</sub> -Isotypkontrolle)	2 µg/ml

Mit Hilfe des Brückenantikörpers Z259 (30 min 160 µg/ml) wurde der APAAP- Komplex (30 min 1,5 µg/ml) an die Primärantikörper gekoppelt und 10 min mit BCIP/NBT enzymatisch entwickelt. Abschließend wurde 5 min mit 1% PFA fixiert.

#### **A45 Fab-Kit**

Die Verwendung des Epimet-Kits erfolgte wie vom Hersteller empfohlen, unter Verwendung der im Kit bereitgestellten Reagenzien. Die einzige Modifikation des Kit's war der Austausch des Färbesubstrats, es wurde ebenfalls BCIP/NBT verwendet. In dem Kit-System wird ein A45 F<sub>ab</sub>-Fragment eingesetzt, welches bereits direkt mit der Alkalischen-Phosphatase konjugiert ist. Nach der Antikörperinkubation erfolgt unmittelbar die enzymatische Entwicklung.

### **2.3.3 Isolierung einzelner Tumorzellen**

Zytokeratin positive Zellen werden mit einem Mikromanipulator von den Haftobjektträgern isoliert. Dazu wird der Haftobjektträger unter einem Invertmikroskop eingespannt und mit PBS + 0,5% Tween überschichtet. Unter mikroskopischer Beobachtung können die Zytokeratin positiven Zellen mit einer feinen Glaskapillare von dem Haftobjektträger gelöst und in einen neuen Tropfen PBS 0,5% Tween transferiert werden. In einem 200 µl Reaktionsgefäß wird 2 µl Proteinase K Mix vorgelegt:

0,2 µl	OnePhorAll plus Puffer
0,13 µl	Tween 10%
0,13 µl	Igepal 10%
0,26 µl	Proteinase K 10 mg/ml
1,28 µl	H <sub>2</sub> O

Anschließend überführt man die Zelle mit einer Pipette in das 200 µl Reaktionsgefäß. Das zelluläre Protein wird in dem Proteinase K-Mix 10 h bei 42°C in einer PCR-Maschine verdaut. Es folgt die Inaktivierung der Proteinase K bei 80°C für 10 min.

### 2.3.4 Einzelzell-PCR

Die Fragmentierung des Genoms erfolgt durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym Mse I (Schnittstelle: T▼TAA) bei 37°C für 3 h in einer MJ-Research PCR-Maschine. Zu der Proteinase K verdauten Zelle wird in das Reaktionsgefäß von Schritt 2.3.3 zugefügt:

0,2 µl	OnePhorAll plus Puffer
0,2 µl	Mse I 50 U/µl
1,6 µl	H <sub>2</sub> O

Nach der Reaktion wird das Mse I-Enzym bei 65°C in 5 min inaktiviert. An die, durch Mse I generierten, 5' TA-Überhänge wird ein Adapter ligiert, aus den zwei Oligonukleotiden LIB1 und ddMse11 (HPLC gereinigt). Vor der Ligation wird durch langsames Abkühlen die Basenpaarung des Adapters erzielt. Dazu wird 0,5 µl LIB1 100 µM und 0,5 µl ddMse11 100 µM mit 0,5 µl OPA und 1,5 µl H<sub>2</sub>O gemischt und in einem in der PCR-Maschine programmierten Gradienten (65°C bis 15°C für je 1 min pro Temperaturschritt) inkubiert, wobei die Oligonukleotide eine Basenpaarung eingehen können. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 15°C durch Zugabe des Adapters sowie von 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U) und 1 µl ATP 10 mM in das Reaktionsgefäß der Mse I fragmentierten Zelle. Nach der Inkubation über Nacht wird die fragmentierte und an den Adapter ligierte DNA der Zelle mit einem PCR-Mix aufgefüllt:

3 µl	Expand-Long-Template Puffer 1
2 µl	10 mM dNTP
1 µl	Expand-Long-Template PolMix 3,5 U/µl
35 µl	H <sub>2</sub> O

Der erste Schritt des PCR-Programmes ist, abweichend zu gewöhnlichen Protokollen, eine Inkubation bei 68°C für 3 min. In dieser Zeit findet eine Auffüllreaktion der 3' rezessiven Enden der Fragment-Adapter-Konstrukte statt, so daß in der Folge eine komplementäre LIB1-Primerbindungsstelle entsteht. Das PCR-Programm im MJ-Research ist:

	1 Zyklus	15 Zyklen	8 Zyklen	22 Zyklen	1 Zyklus
94°C		40 sec	40 sec	40 sec	
57°C – 65°C		57°C 30 sec	57°C 30 sec + 1°C / Zyklus	65°C 30 sec	
68°C	3 min	1 min 30 sec + 1 sec / Zyklus	1 min 45 sec + 1 sec / Zyklus	1 min 53 sec + 1 sec / Zyklus	3 min 40 sec

Das Amplifikat ist bei -20°C stabil. Es dient als Ausgangsmaterial für alle weiteren Untersuchungen der Einzelzellen.

### 2.3.5 Kontroll-PCR

Die Qualität des primären PCR-Produktes aus Abschnitt 2.3.4 läßt sich mit dem Nachweis spezifischer genomischer Mse I-Fragmente bestimmen. Als qualitativ gut haben sich erfahrungsgemäß primäre PCR Produkte erwiesen, deren spezifische Kontroll-PCR's auf zwei repräsentative Mse I-Fragmente positiv waren. Als noch ausreichend für CGH-Experimente sind primäre PCR-Produkte die in einer von zwei spezifischen PCR-Reaktionen positiv waren. Der spezifische PCR-Ansatz besteht aus:

1 µl	PCR-Puffer (10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris pH 8,5, 500 mM KCl, dNTP 1 mM)
0,5 µl	Primer 1
0,5 µl	Primer 2
0,25 µl	BSA
0,1 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
7,75 µl	H <sub>2</sub> O

Als Primerpaare wurden verwendet: Für Einzelzellamplifikate p53 Exon 2/3 und CK 19, für lasermikrodissektierte Proben  $\alpha$ -cat und Plako. Die PCR Programmschritte im MJ-Research sind:

	1 Zyklus	15 Zyklen	25 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	15 sec	15 sec	
58°C	30 sec	30 sec	30 sec	
72°C	2 min	20 sec	30 sec	2 min

### 2.3.6 Agarose Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die universell verwendete Gelkonzentration betrug 1,5% Agarose in TBE. Die PCR-Proben werden mit 1 µl Sybr-Gold (Stock solution 1:1600 verdünnt) und 2 µl Dye (0,3% Orange G, 25% Ficoll in TBE) gemischt und in die Geltaschen geladen. Das Elektrophorese-Netzgerät wird auf 160 V, 400 mA eingestellt und die Proben in 45 min mit einem Horizontal-Gelelektrophorese-System aufgetrennt. Auf einem UV-Schirm mit CCD-Kamera wird das Gel digitalisiert und ein Ausdruck auf einem Hitze-Drucker erstellt.

### 2.3.7 Alu-PCR

Die Alu-PCR erlaubt eine globale Amplifikation genomischer DNA humanen Ursprungs. Diese Spezifität ist eine Konsequenz der verwendeten Primer, die komplementär zu Sequenzen der humanen Alu-Familie sind. Es wurde ein laboreigener, nicht publizierter Ansatz verwendet:

5 µl	Expand-Long-Template-Buffer 3
2,5 µl	Primer Alu I
2,5 µl	Primer Alu II
2,5 µl	Primer Alu III
2,5 µl	Primer Alu IV
2,5 µl	Primer CT20
2,5 µl	10 mM dNTP
0,5 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
27,5 µl	H <sub>2</sub> O
1 µl	Template-DNA

PCR-Programm:

	1 Zyklus	30 Zyklen	1 Zyklus
94°C	5 min	1 min	
45°C		30 sec	
72°C		4 min	4 min

### 2.3.8 Nicktranslation

Zur PCR unabhängigen Digoxigenin-Markierung wurde die Nicktranslation angewendet. Dazu wurde ein Reaktionsansatz aus

2 µg	Deoxyribonukleinsäure aus humaner Plazenta
10 µl	NT-Puffer (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM MgSO <sub>4</sub> , 1mM DTT und 500 µg/ml BSA Fraktion V)
10 µl	100 mM β-Mercaptoethanol
5 µl	AGC-Mix (je 1 mM dATP, dGTP und dCTP)
2 µl	1 mM Digoxigenin-11-dUTP
13 µl	DNase I (1:1000 verdünnt von 3 mg/ml Stock)
2 µl	<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I 10 U/µl
56 µl	H <sub>2</sub> O

hergestellt und 1 h bei 15°C inkubiert. Die angestrebte Fragmentgröße der Plazenta-DNA von ca. 1-2 kb wurde durch Gelelektrophorese überprüft und die Reaktion durch Zugabe von 1/10 Volumen Stop-Mix (0,1% Bromphenolblau, 0,5% Dextranblau, 100 µM NaCl, 20 mM EDTA und 20 mM Tris-HCl pH 7,5) beendet.

### 2.3.9 Markierungs-PCR

Die primären PCR-Produkte der Einzelzellen werden in Anwesenheit von Deoxynukleotid-Derivaten (Digoxigenin-11-dUTP zur Markierung der Einzelzelle und Biotin-16-dUTP zur Markierung der Referenz-DNA) reamplifiziert. Dadurch können die Reamplifikate, nach der Hybridisierung auf humane Metaphasen (CGH siehe 2.3.10), mittels geeigneter Detektionssysteme durch Fluoreszenz nachgewiesen werden. Der Reamplifikationsansatz besteht aus:

4 µl	Expand-Long-Template Puffer 1
4 µl	LIB1 10 µM
1,4 µl	7/8 dNTP-Mix (8,75 mM dTTP; je 10 mM dATP, dCTP und dGTP)
1,75 µl	1 mM Biotin-dUTP (Referenz) oder 1 mM Digoxigenin-dUTP (Tumor)
1 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
29 µl	H <sub>2</sub> O

Zu dem Markierungs-PCR-Mix wird 0,5 µl primäres PCR-Produkt als Template zugegeben. Die MJ-Research PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

	1 Zyklus	10 Zyklen
94°C	1 min	30 sec
60°C	30 sec	30 sec
72°C	2 min	72°C 2 min + 20 sec / Zyklus

Der LIB1 Primer wurde nach der Reamplifikation durch einen Restriktionsverdau mit Tru I (Isozym von Mse I, Schnittstelle entsprechend T<sup>v</sup>TAA) abgetrennt, um mögliche Interferenzen bei der CGH auszuschließen. Dazu wurde zu dem Reamplifikat (40 µl) 2 µl Puffer R und 2 µl Tru I (50 U/µl) zugegeben und bei 65°C für 23 h inkubiert.

### 2.3.10 Vergleichende genomische Hybridisierung

Die Test-DNA (üblicherweise die primären PCR-Produkte der einzelnen disseminierten Tumorzellen) und die Referenz-DNA (Pool aus fünf bis zehn primären PCR-Produkten von normalen diploiden Zellen) werden wie in Abschnitt 2.3.9 beschrieben mit Biotin-dUTP bzw. Digoxigenin-dUTP markiert. Die Reamplifikate von Test- und Referenz-DNA werden über Nacht bei -20°C gefällt:

40 µl	PCR-Produkt der Tumor-DNA
40 µl	PCR-Produkt der Referenz-DNA
75 µl	1 µg/µl C <sub>0</sub> t-1 DNA
10 µl	10 µg/µl Heringssperm DNA
15 µl	3 M NaAc pH 5,2
360 µl	100% EtOH

Am nächsten Tag wird die präzipitierte DNA 45 min bei 4°C und 14.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, das DNA-Pellet einmal mit 700 µl EtOH 70% gewaschen, erneut 10 min zentrifugiert und luftgetrocknet. Das Pellet wird in 6 µl 100% Formamid in einem Wasserbad bei 37°C mindestens 1 h gelöst und mit 6 µl Master-Mix (4x SSC, 30% Dextran Sulfat Mr > 500000) gemischt. Die Denaturierung der DNA-Probe erfolgt in einem Heizblock bei 78°C für 6 min. Der C<sub>0</sub>t-1 DNA gibt man im Folgenden 1 h Zeit mit der

repetitiven DNA der Test- bzw. Referenz-DNA zu hybridisieren, um deren störenden Einfluß auf die CGH zu unterbinden.

Parallel zur Herstellung der oben beschriebenen DNA-Probe wird ein geeigneter Metaphase-Objektträger (siehe 2.3.11) von Zytoplasmaresten und RNA befreit und die chromosomale DNA denaturiert. Dazu wird der Metaphase-Objektträger in 2x SSC equilibriert und 1 h bei 37°C mit 200 µl RNase A (100 µg/ml in 2x SSC) inkubiert. Die RNase A wird durch dreimaliges Waschen in 2x SSC entfernt. In einem Wasserbad werden 100 ml 10 mM HCl auf 37°C erwärmt, 50 µl Pepsin-Lösung (100 mg/ml in H<sub>2</sub>O) bei Erreichen der Temperatur zugegeben und der Metaphase-Objektträger 2 bis 4 min in der Pepsin-HCl Lösung, je nach Stärke der Zytoplasmareste, inkubiert. Der Pepsinverdau wird durch zweimaliges Waschen in PBS gestoppt. Die Fixierung des verbliebenen Chromatingerüsts mit 200 µl PFA-Lösung (50 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS mit 1% PFA) ist nötig, um die Chromosomenstruktur für die folgende Denaturierung zu stabilisieren. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 85% und 100% EtOH) wird der Objektträger dehydriert. In einem Wasserbad werden 100 ml Formamid-Lösung (70 ml 100% Formamid, 10 ml 20x SSC, 20 ml H<sub>2</sub>O, eingestellt auf pH 7,5) auf 70°C erhitzt und der Metaphase-Objektträger darin für 1 min 45 sec bis 2 min denaturiert. Die Denaturierungszeit ist durch Erfahrung zu ermitteln und insbesondere der Kondensation der Chromosomen und der Intensität des Pepsinverdaus anzupassen. Der Metaphase-Objektträger wird durch eine erneute aufsteigende Alkoholreihe getrocknet und die zu hybridisierende DNA-Probe aufgebracht. Das Hybridisierungsfeld wird durch ein 18x18 mm großes Deckgläschen abgedeckt und begrenzt sowie mit großzügig aufgebrachtem Montagekleber (Fixogum) verschlossen. Die Hybridisierung läuft über zwei bis drei Nächte in einem Wasserbad bei 37°C ab, wobei darauf zu achten ist, daß durch Kondenswasser das Fixogum nicht gelöst und die DNA-Probe gewegewaschen wird.

Nach der Hybridisierung wird vorsichtig das Deckgläschen über dem Hybridisierungsfeld abgenommen und das zähflüssige Dextransulfat durch kräftiges schwenken in 4x SSC entfernt. Anschließend wird der Objektträger je dreimal in Formamid-Lösung (150 ml Formamid 100%, 30 ml 20x SSC, 120 ml H<sub>2</sub>O, eingestellt auf pH 7,5) und danach in 1x SSC bei 42°C gewaschen. Vor dem Nachweis der Hybridisierung wird der Objektträger in 1x PBS + 0,2% Tween equilibriert und die Proteinbindungsstellen auf dem Glas für 45 min mit 1 ml 3% Superblock-Lösung (1x PBS pH 7,5, 0,2% Tween, 3% BSA Fraktion V, 5% FCS) abgesättigt. Die überschüssige Superblock-Lösung wird mit PBS + 0,2% Tween weggespült und der Objektträger mit einem Gemisch aus 20 µl Anti-Digoxigenin-FITC, 2 µl Avidin-

Cy 3.5 und 185  $\mu$ l 1% Superblock-Lösung (1x PBS pH 7,5, 0,2% Tween, 1% BSA Fraktion V, 5% FCS) für 45 min bei 37°C im dunkeln inkubiert, wiederum abgedeckt durch ein 24x55 mm Deckglas. Durch dreimaliges waschen bei 42°C in 4x SSC + 0,2% Tween werden die nicht gebundenen Fluorochrome entfernt und die Chromosomenbänderung anschließend mit einer zweiminütigen DAPI Färbung (1 ml 4x SSC + 0,2% Tween, 10  $\mu$ g DAPI) dargestellt. Der Objektträger wird kurz mit destilliertem Wasser gespült, um bei der Trocknung die Bildung von Salzkristallen zu verhindern und unter Vectashield H-1000 eingedeckelt.

Die CGH Auswertung erfolgt durch die Kombination eines Fluoreszenzmikroskops mit einer CCD-Kamera und entsprechender EDV (alle Komponenten wurden von Leica bezogen). Mit der Software Leica-QFISH werden von 12 bis 15 geeigneten Metaphasen digitalisierte Bilderserien (Image Stacks) mit den Fluoreszenzfiltern DAPI, FITC und Cy3.5 aufgenommen. Die Chromosomen der digitalisierten Metaphasen können mit Hilfe der Leica-QCGH Software in ein Chromosomenschema sortiert werden. Die Software vergleicht nach Normalisierung die entlang jedes Chromosoms integrierte Fluoreszenzintensität der Kanäle FITC (Test-DNA) und Cy 3.5 (Referenz-DNA). Das durchschnittliche Verhältnis aller ausgewerteten Metaphasen einer Hybridisierung kann graphisch in einem CGH Profil dargestellt werden. Ist das Fluoreszenzintensitätsverhältnis FITC/Cy 3.5 größer als 1,25 bzw. kleiner als 0,75 liegt ein Gewinn oder Verlust im entsprechenden Chromosomenabschnitt vor.

### **2.3.11 Präparation von Metaphasechromosomen**

Einem gesunden männlichen Spender werden 20 ml Blut abgenommen. Das Blut wird mit Lymphozyten-Kulturmedium (250 ml RPMI Medium ohne L-Glutamin, 15% FCS, Penicillin 200 U/ml, Streptomycin 200 U/ml, L-Glutamin 2 mM, 3 mg Phytohemagglutinin) vermischt, in 10 ml Kulturfläschchen verteilt und drei Nächte in einem 37°C CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Eine Stunde vor dem Ende der Inkubation wird in jede Zellkulturflasche 100  $\mu$ l Colcemidlösung (10  $\mu$ g/ml) zugegeben, um die Zellteilung in der Metaphase zu arretieren. Anschließend werden die Lymphozytenkulturen in 15 ml Falkons transferiert, die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und für 8 min bei 37°C mit 10 ml hypotoner Lösung behandelt (75 mM KCl). Die gequollenen Zellen werden erneut abzentrifugiert und in eiskaltem Fixativ (7,5 ml Methanol, 2,5 ml Eisessig 100%) sehr vorsichtig resuspendiert. Die Reste der lysierten Erythrozyten werden durch zweimaliges zentrifugieren und waschen in 10 ml Fixativ entfernt, danach können die Zellsuspensionen in 3 ml Fixativ bei -20°C einige Monate gelagert werden.

Zur Herstellung von Metaphasen-Objektträgern werden Glasobjektträger über Nacht in einer Küvette mit 70% EtOH entfettet und gereinigt. Vor dem Auftropfen der Metaphase-Lymphozyten wird der Alkohol abgegossen und die Objektträger in destilliertem Wasser auf 4°C abgekühlt. Das Auftropfen der in Methanol-Eisessig fixierten Lymphozytenkultur erfolgt mit einer Transferpipette aus einem Abstand von cirka einem halben Meter. Das verbleibende Fixativ wird durch Inkubation des Objektträgers auf einer Heizplatte verdampft. Dabei wird die Umgebungsluft künstlich durch gleichzeitiges auflegen von feuchten Tüchern mit Wasserdampf angereichert, was die Qualität der Metaphasepräparationen verbessern soll.

### **2.3.12 Hämatoxylin Färbung von Gewebeschnitten und Mikrodissektion**

Mit Hilfe eines Mikrotoms bzw. Kryotoms werden 5 µm dicke Schnitte von Paraffin eingebetteten oder kryokonservierten Tumor- und Lymphknotenproben angefertigt. Diese werden entweder zur späteren Laser-Mikrodissektion auf Polyethylen-Membran (1,35 µm) bespannten Objektträgern oder zur Verwendung als Referenzschnitte auf gewöhnliche Glasobjektträger aufgebracht. Die Paraffinschnitte werden 30 min mit 100% Xylol deparaffinisiert. Die Kernfärbung erfolgt nach einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 85% und 70%) mit 0,1% Hämatoxylinlösung (Mayer's) für 3 min und anschließender Bläuung in Leitungswasser für 30 min. Die Referenzschnitte werden zusätzlich mit 0,1% Eosin gefärbt, die aufgrund der negativen Wechselwirkung mit der nachfolgenden Einzelzell-PCR bei den Folienschnitten in der Regel vermieden wird. Die Schnitte werden durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Während die Folienschnitte zum Zwecke der Lasermikrodissektion über Nacht bei 42°C trocknen, werden die Referenzschnitte mit Eukitt eingedeckelt.

Die Tumoreale der Proben werden anhand der Referenzschnitte aufgesucht und die entsprechenden Bereiche der Folienschnitte unter Verwendung eines PALM-Laser-Microbeam-Systems dissektiert. Die ausgelaserten Tumorgewebe-Folienstückchen werden mit einem Laserpuls in einen PCR-Öl Tropfen, befindlich in einem PCR-Gefäßdeckel, katapultiert, der dann durch Zentrifugation in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt werden kann. Die Amplifikation der genomischen DNA erfolgt wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

### **2.3.13 LOH-Analyse**

Die polymorphen DNA-Marker werden mit einer spezifischen PCR amplifiziert und die Produkte auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Im Bereich des E-cadherin wurden vier Marker analysiert: D16S3095, D16S485, D16S511 und D16S505. RB1CC1 wurde anhand von zwei Markern untersucht: D8S567 und D8S591. Der PCR-Ansatz entspricht demjenigen

der Kontroll-PCR (siehe Abschnitt 2.3.5). Die Robocycler-PCR-Maschine wird wie folgt programmiert:

	1 Zyklus	14 Zyklen	29 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	40 sec	40 sec	
55°C	30 sec	30 sec	30 sec	
72°C	2 min	20 sec	30 sec	2 min

In einem vertikalen Gelelektrophorese-System wird ein 7% Acrylamidgel gegossen:

Gel-Mischung:

30 ml	7% Acrylamid-Stocklösung
300 µl	10% Ammoniumpersulfat
25 µl	TEMED

7% Acrylamid-Stocklösung:

233 ml	30% Acrylamid (Biorad)
320 ml	100% Formamid (Merk)
336 g	Harnstoff (ergibt 5,6 M)
200 ml	5x TBE (445 mM Tris-Borat pH 8,3; 10 mM EDTA)
	add H <sub>2</sub> O auf 1 l

Um die nachfolgende Ablösung und Haftung des Gels an den Glasplatten zu kontrollieren wird je eine Platte vor dem Gießen des Gels mit Repel-Silan (2% Dimethyldichlorosilan in Octamethyl-cyclo-octasilane) bzw. 20% Bind-Silan ( $\gamma$ -Methacryloxy-propyl-trimethoxysilan) in 1,2 M Natriumacetat behandelt. Nach der Polymerisation des Acrylamids wird das Gel in die vertikal Elektrophoresevorrichtung eingespannt, diese mit 1x TBE befüllt und 30 min bei 1700 V vorgewärmt. Die PCR-Produkte und der 50 bp DNA-Größenmarker werden während dessen 1:1 mit Laufpuffer gemischt und 5 min bei 94°C denaturiert.

Laufpuffer:

5 ml	100% Formamid
250 µl	BPB + XF (10 mg Bromphenolblau und 10 mg Xylencyanol in 1 ml H <sub>2</sub> O)
100 µl	0,5 M EDTA

In die Geltaschen werden ca. 5 µl Probe geladen und die PCR-Produkte ca. 1 h, in Abhängigkeit der Fragmentgröße, bei 1700 V aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird die mit Repel-Silan behandelte Glasplatte vorsichtig abgehoben und das Polyacrylamidgel mit 2 µl Sybr-Green in 20 ml 1x TBE 10 min gefärbt. Das Gel wird abschließend mit einem FlourImager SI digital aufgenommen.

### 2.3.14 Hybridisierung auf Nylonmembranen

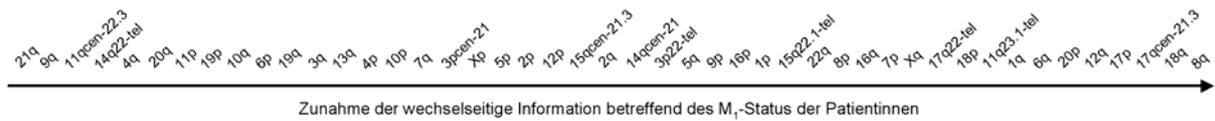
Auf einer Nylonmembran werden DNA-Zielsequenzen immobilisiert, um sie mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Probe zu hybridisieren. Die Zielsequenzen und Hybridisierungsproben können dabei komplexer Natur sein oder aus spezifischen DNA-Fragmenten bestehen. Zur Denaturierung und Immobilisierung der Ziel-DNA's werden diese mit dem gleichen Volumen 1 M NaOH gemischt und jeweils 2 µl auf die Nylonmembran aufgebracht. Um die DNA kovalent an die Membran zu binden folgt eine UV-Bestrahlung mit 120 mJ für 2 min. Die fertige Nylonmembran wird in 2x SSC gewaschen, in eine Hybridisierungsröhre überführt und in einer Roller-Vorrichtung mit 6 ml Dig-Easy Lösung in einem Hybridisierungsofen bei 42°C 20 min blockiert. Die Digoxigenin-markierte DNA-Probe kann währenddessen in 500 µl Dig-Easy bei 95°C für 5 min denaturiert werden. Die Probe wird anschließend in die Hybridisierungsröhre zugegeben und die Membran für eine Nacht bei 42°C hybridisiert. Als Sonderfall kann auch Digoxigenin-markierte DNA direkt auf der Membran immobilisiert werden, um z.B. Markierungsintensitäten von PCR-Produkten zu vergleichen. In diesem Fall wird die Membran unmittelbar entwickelt.

Vor der Chemilumineszenz-Entwicklung der Membran müssen unspezifisch hybridisierte DNA-Sequenzen durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt werden. Dazu wird die Salzkonzentration der auf 68°C erwärmten Waschlösungen schrittweise reduziert. Beginnend mit kurzem Waschen in 2x SSC und 1x SSC, wird die Membran 15 min mit 0,5x SSC rollend gewaschen und anschließend zwei mal 30 min mit 0,1x SSC. Nach diesen Waschschritten überführt man die Membran aus der Hybridisierungsröhre in eine geeignete Schale, in der sie mit Puffer 1 (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) equilibriert wird. Vor der Zugabe von 2,5 µl Anti-Digoxigenin-F<sub>ab</sub> Alkalische-Phosphatase-konjugiertem Antikörper wird die Membran mit 1% Block 30 min blockiert und dann mit dem Antikörper für weitere 30 min schaukelnd inkubiert. Überschüssiges Antikörper-Konjugat wird durch wiederholtes, 15 min Waschen in Puffer 1 + 0,3% Tween entfernt. Die Membran equilibriert anschließend in Puffer 3 (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl) und wird in einer Folie mit 10 µl CSPD in 1 ml Puffer 3 bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Die Membran wird in eine neue Folie transferiert und das CSPD 15 min bei 37°C aktiviert. In einer Filmbox findet die Belichtung eines Röntgenfilmes statt, die Belichtungszeit kann durch verschiedene Auflagezeiten des Films optimiert werden.

### 2.3.15 Bioinformatische Auswertung der CGH-Daten

#### Ermittlung der $M_1$ -Zuordnungswahrscheinlichkeit durch „Bayesian-learning“ Netzwerke

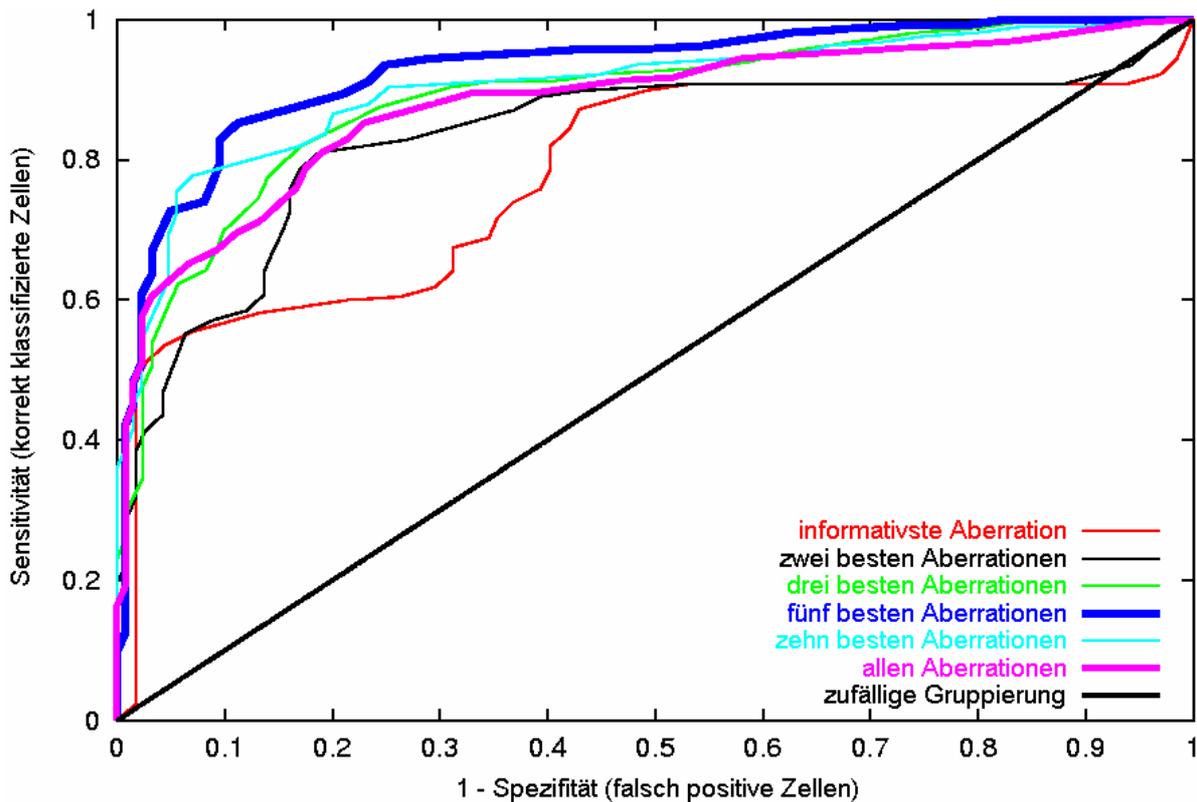
Für die  $M_0$ - /  $M_1$ -Klassifizierung disseminierter Tumorzellen durch ein „Bayesian-learning“ Netzwerk müssen die CGH-Aberrationen der Zellen ermittelt werden, welche möglichst viel Information über den  $M_1$ -Status der Patientinnen beinhalten aus denen sie isoliert wurden. Nur diese sollte das Netzwerk als Eigenschaften der disseminierten Tumorzellen berücksichtigen. Werden zu viele CGH-Veränderungen als Merkmal verwendet, reduziert sich das Verhältnis der CGH-Datensätze pro analysierte Aberration, so daß die Gewichtung der einzelnen CGH-Veränderungen für die Klassifizierung unsicher wird. Darüber hinaus kann eine zu komplizierte Klassifizierungsfunktion errechnet werden, deren Vorhersagekraft durch das Rauschen in den Daten vermindert wird. Daher wurden zuerst die 46 differenzierten chromosomalen Loci, die aus den CGH-Profilen der Zellen entnommen worden waren, gemäß ihres sich addierenden Informationsgehalts betreffend des  $M_1$ -Status der disseminierten Tumorzellen bewertet, um die für die Klassifizierung günstigsten CGH-Aberrationen zu selektieren. Ausgehend von der 8q-Amplifikation wurde für jede einzelne Zelle eine weitere CGH-Aberration gesucht, welche die verbleibende Unsicherheit betreffend des metastatischen Status dieser Zelle am stärksten reduziert. Dieser Wert kann als eine Wahrscheinlichkeit ausgedrückt werden. Die Aberration, die gemittelt über alle Zellen die stärkste Reduktion der Irrtumswahrscheinlichkeit erbrachte, wurde dann mit der 8q-Amplifikation kombiniert und nun ausgehend von diesem Aberrationspaar wiederum in allen Zellen die nächst informative Aberration bestimmt. Dieser Algorithmus wurde wiederholt, bis alle CGH-Veränderungen nach ihrem wechselseitigen Informationsbeitrag gelistet werden konnten (siehe Abbildung 2). Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist zum Beispiel nicht etwa die 1q Amplifikation das nach 8q beste Klassifizierungskriterium, obwohl sie mit 71% die absolut häufigste Aberration in den  $M_1$ -Zellen darstellt. Die Gründe dafür liegen zum einen darin, daß auch 30% der  $M_0$ -Zellen diese Aberration aufweisen und deshalb die Korrelation mit dem metastatischen Status relativ niedrig ist. Zum anderen begründet es sich aber daraus, daß 8q und 1q häufig gemeinsam auftreten und so die 1q-Amplifikation keinen zusätzlichen Informationsgehalt hinsichtlich des  $M_1$ -Status besitzt. Der wechselseitige Informationsgehalt der CGH-Veränderungen kann also nicht über deren Frequenz erschlossen werden.



## Abbildung 2 Wechselseitiger Informationsgehalt der CGH-Veränderungen

Gemäß des im Text beschriebenen Algorithmus sind die CGH-Veränderungen nach dem zunehmenden wechselseitigen Informationsgehalt angeordnet, welcher ihnen bei der Unterscheidung von  $M_0$ - und  $M_1$ -disseminierten Tumorzellen zukommt.

Das neuronale Netzwerk errechnet mittels der CGH-Aberrationen einer Zelle die Wahrscheinlichkeit dafür, daß diese aus einer  $M_1$ -Patientin isoliert wurde. Während der Trainingsphase des Netzwerks wird ein statistisches Modell erstellt, welches die Abhängigkeit der Aussage (in diesem Fall der metastatische Status) von den Parametern (hier die CGH-Aberrationen der Zellen) abbildet. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Leistungsfähigkeit eines neuronalen Netzwerkes im Zuge der Lernphase zu optimieren: Man kann zum Beispiel versuchen, mittels des Trainings-Datensatzes den Unterschied zwischen der Vorhersage des Modells und dem tatsächlichen Status zu minimieren. Weil in den meisten praktischen Anwendungen die Zahl der zum Lernen zur Verfügung stehenden Datensätze relativ begrenzt ist, sind Verzerrungen in diesen Daten gegenüber dem Gesamtkollektiv jedoch eher die Regel. Dann „paßt“ die errechnete Funktion zwar exakt auf den gelernten Datensatz, Vorhersagen von ungesehenen Daten können aber mit einem erheblichen Fehler belastet sein. Deswegen wurde für die bioinformatische Analyse der CGH-Veränderungen ein neuronales Netzwerk verwendet, welches einen Regulierungsterm enthält. Dabei wird versucht, einen Kompromiß zwischen der Komplexität der errechneten Funktion und dem tolerierten Fehler der Vorhersage bei den zum Training verwendeten Daten zu finden. Dieser Kompromiß wird durch einen Gewichtungsfaktor der Komplexität ausgedrückt, der um so größer ist, je mehr Parameter in die Funktion eingehen. Dadurch wird die gelernte Funktion geglättet, was bedeutet, daß sich Ausreißer oder Verzerrungen in dem Trainingsdatensatz weniger störend auswirken und damit die Vorhersage von neuen Datensätzen verbessert wird. Der Vorteil des „Bayesian-learning“ Algorithmus ist, daß der für die Leistungsfähigkeit des Netzwerks wichtige Gewichtungsfaktor während des Trainings bestimmt werden kann.



**Abbildung 3** Vergleich der Vorhersagekraft verschiedener neuronaler Netzwerke

In sechs Stufen wurde, beginnend mit der informativsten- bis hin zu allen CGH-Veränderungen, Bayesian-learning Netzwerke trainiert und deren Leistungsfähigkeit in Bezug auf Spezifität und Sensitivität verglichen. Auf der X-Achse ist der Anteil der  $M_0$ -Zellen aufgetragen, die fälschlich als  $M_1$  klassifiziert wurden (1 - Spezifität). Die Y-Achse gibt den Anteil der korrekt vorhergesagten  $M_1$ -Zellen wieder (Sensitivität).

Um letztlich zu entscheiden, welche Anzahl von Parametern die höchste Modellwahrscheinlichkeit mit sich bringt, werden mehrere Netzwerke verglichen. Dazu wurden von den oben beschriebenen, gemäß ihrer wechselseitigen Information geordneten CGH-Aberrationen entweder nur die 8q Amplifikation, oder die zwei, drei, fünf und zehn aussagekräftigsten Aberrationen oder aber alle Aberrationen für die Klassifizierung verwendet. Das Training der unterschiedlichen Netzwerke sowie die Auswertung ihrer Vorhersagekraft verlief in neun Runden von Lern- und Testdurchläufen, wobei jeweils ein Neuntel der CGH-Daten als Testgruppe diente, während mit dem größeren Teil der CGH-Aberrationen die Modellfunktion errechnet wurde. Um die Vorhersagekraft der Netzwerke zu messen, wurde die Sensitivität und Spezifität über die neun Testdurchläufe gemittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3 durch den Graphen der richtig klassifizierten Zellen gegenüber den „fälschlich“ als  $M_1$  klassifizierten Zellen dargestellt (die Graphik wurde durch eine „Receiver Operating Characteristics“ Auswertung erzeugt). Wie aus der Abbildung hervorgeht, erreichte die Klassifizierung mit den fünf informativsten genomischen

Aberrationen, d.h. 8q Gewinn, 18q Verlust, 17qcen-21.3 Gewinn, 17p Verlust und 12q Verlust, die höchste Vorhersagekraft des metastatischen Status der klassifizierten Zellen, da sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität hoch war. Dies kommt durch den steilen Anstieg der Kurve zum Ausdruck.

Jede disseminierte Tumorzelle wurde im Folgenden alleine mit dem validierten neuronalen Netzwerk klassifiziert und auf diese Weise dem größtmöglichen Trainingsdatensatz, bestehend aus allen verbleibenden Zellen, gegenübergestellt. Dadurch erhält jede Zelle einen präzisen p-Wert von einer M<sub>1</sub>-Patientin zu stammen (siehe Tabelle I).

Status	p-Wert	Zelle	Status	p-Wert	Zelle	Status	p-Wert	Zelle
M0	0.0060	008-1	M1	0.2005	112-3	M1	0.9716	101-1
M0	0.0124	003-1	M1	0.2265	112-1	M1	0.9817	119-1
M0	0.0124	015	M1	0.2356	115-5	M1	0.9817	114
M0	0.0151	018-1	M1	0.2356	103-5	M1	0.9828	101-10
M0	0.0356	026-2	M0	0.3264	018-3	M1	0.9851	122-2
M0	0.0356	020	M1	0.3758	102-2	M1	0.9851	103-1
M0	0.0356	008-3	M1	0.3758	102-1	M1	0.9880	111-1
M0	0.0356	016-2	M1	0.5587	101-9	M1	0.9880	123-1
M0	0.0356	001	M0	0.5811	024	M1	0.9880	115-7
M0	0.0784	014	M0	0.6033	006	M1	0.9880	115-10
M0	0.1087	008-4	M1	0.6656	110	M1	0.9880	108-1
M0	0.1087	008-2	M1	0.6768	101-4	M1	0.9880	118-2
M0	0.1087	008-5	M0	0.7098	027-1	M1	0.9880	117-3
M0	0.1570	019	M0	0.7098	027-2	M1	0.9909	103-2
M0	0.1679	011	M1	0.7283	121-2	M1	0.9910	113-4
M0	0.2005	022	M0	0.7671	023	M1	0.9910	113-2
M0	0.2005	010	M1	0.7671	121-1	M1	0.9910	113-5
M0	0.2005	007	M1	0.7671	120-1	M1	0.9910	113-3
M0	0.2005	016-1	M1	0.7671	112-4	M1	0.9910	104-3
M0	0.2005	018-2	M1	0.7671	103-3	M1	0.9910	104-4
M0	0.2005	003-2	M1	0.8018	103-4	M1	0.9910	113-1
M0	0.2005	017-1	M0	0.8036	013	M1	0.9937	118-1
M0	0.2005	021	M1	0.8036	111-2	M1	0.9969	104-1
M0	0.2005	009	M1	0.8036	111-4	M1	0.9978	122-3
M0	0.2005	012-2	M1	0.8036	115-8	M1	0.9982	117-2
M0	0.2005	026-1	M1	0.8036	115-11	M1	0.9991	122-1
M0	0.2005	002	M1	0.8036	118-4	M1	0.9991	115-9
M0	0.2005	025-1	M1	0.8036	106	M1	0.9991	115-1
M0	0.2005	012-1	M1	0.8036	117-1	M1	0.9991	115-3
M0	0.2005	004	M1	0.8341	112-2	M1	0.9991	115-6
M0	0.2005	030	M1	0.8713	111-3	M1	0.9991	115-4
M0	0.2005	005	M1	0.8713	107	M1	0.9991	115-2
M0	0.2005	028-1	M0	0.9235	017-2	M1	0.9991	118-3
M0	0.2005	028-2	M1	0.9420	119-2	M1	0.9994	105
M0	0.2005	025-2	M1	0.9420	116	M1	0.9996	104-2
M0	0.2005	025-3	M1	0.9653	111-5	M1	0.9998	109
M0	0.2005	029	M1	0.9716	101-3	M1	1.0000	123-2
M1	0.2005	108-2	M1	0.9716	101-6			

**Tabelle I M<sub>1</sub>-Zuordnungswahrscheinlichkeit der disseminierten Tumorzellen**

Die M<sub>0</sub>-Patientinnen sind mit Nummernschlüsseln von 001-030 identifiziert, den M<sub>1</sub>-Patientinnen werden die Schlüssel 101-123 zugeordnet. Die disseminierten Tumorzellen sind mit dem Patientinnenschlüssel bezeichnet, der bei Patientinnen mit mehreren Zellen durch die Nummer der Zelle erweitert wird. In Grau unterlegt ist der Bereich von  $p = 0,22$  bis  $0,75$ , welcher in Abbildung 20 das Cluster 2 bildet. Mit dem Pfeil ist der p-Wert 0,5 markiert.

### **Klassifizierung der Patientinnen anhand der klinischen Routinevariablen ihrer Primärtumore**

Mit den verfügbaren Datensätzen von 39 Patientinnen wurde wie im obigen Abschnitt der wechselseitige Informationsgehalt der verschiedenen klinischen Routinevariablen bestimmt. Daraus folgte, daß die Tumorgroße und der Lymphknotenstatus für die betrachteten Patientinnen die aussagekräftigsten Variablen sind. Basierend auf diesen beiden Prognosemarkern errechnet das neuronale „Bayesian-learning“ Netzwerk anschließend eine  $M_1$ -Zuordnungswahrscheinlichkeit für jede Patientin, die als p-Wert ausgedrückt wird. Die Datensätze der übrigen Patientinnen dienen dabei jeweils zum Training des Netzwerkes. Um in dem angestrebten Vergleich dieselben Bedingungen für beide Datensätze zu erreichen, wurden auf der anderen Seite nur die CGH-Daten der gleichen 39 Patientinnen berücksichtigt, deren klinische Routinevariable in die Analyse eingegangen waren. Dem liegt die Tatsache zugrunde, daß die Klassifizierung mit einer steigenden Datenmenge immer präziser wird, so daß die Zahl der analysierten Patientinnen gleich sein muß.

#### **2.3.16 Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse**

Die hierarchische Ähnlichkeitsanalyse von CGH-Datensätzen erfolgte mit Hilfe der Cluster und TreeView Software (Eisen *et al.*, 1998), welche kostenfrei auf der Internetseite <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm> zur Verfügung gestellt wird. Die CGH-Daten werden dazu in eine Microsoft-Excel-Tabelle überführt, die als Textdatei (Dateiextension \*.txt) gespeichert wird. Dabei werden in die Spalten der Tabelle die einzelnen CGH-Experimente eingetragen und in die Zeilen die differenzierten chromosomalen Loci. Gewinne und Verluste werden in den entsprechenden Kästchen durch Zahlenwerte ausgedrückt (+3 Gewinn, -3 Verlust). In alle verbleibenden Kästchen, welche nicht veränderte chromosomale Loci repräsentieren, wird der Wert „0“ geschrieben. Die Tabelle kann in dieser Form in das Cluster-Program eingelesen und nach der Complete-Linkage-Clustering-Methode gruppiert werden. Das Ergebnis der Gruppierung kann durch das TreeView-Program graphisch dargestellt werden, wobei zu beachten ist, daß die +3-Werte (Gewinne) standardmäßig als rote Kästchen erscheinen und die -3-Werte (Verluste) entsprechend grün. Diese zu den gebräuchlichen Konventionen der CGH gegenläufige Darstellung kann im Menüpunkt Optionen verändert werden. Dem eigentlichen Cluster ist ein hierarchisches Dendrogramm zugeordnet, in dem die Ähnlichkeit zwischen zwei Datensätzen in der Höhe des Bäumchens ausgedrückt wird, in welchem beide gerade enthalten sind. Im Dendrogramm benachbarte

Datensätze sind also in der Regel ähnlicher, diese Vereinfachung gilt allerdings nicht an den Grenzen der übergeordneten Bäumchen. Da in dem Dendrogramm die gesamte Information der Ähnlichkeitsanalyse enthalten ist, wurde bei der Darstellung auf das eigentliche Cluster verzichtet.

### 2.3.17 Statistische Berechnungen

#### Student's *t*-Test

Mit dem Student's *t*-Test wurde überprüft, ob sich die durchschnittliche Anzahl der CGH-Aberrationen zwischen zwei Kollektiven signifikant unterscheidet. Verglichen wurden die disseminierten Tumorzellen der M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Patientinnenkollektive, die Primärtumore der M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Patientinnenkollektive und die disseminierten Tumorzellen mit den Primärtumoren. Außerdem wurde der Durchschnitt der Mono- und Trisomien mit den unterschiedlichen Arten von Chromosomenbrüchen der M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-disseminierten Tumorzellen verglichen. Das verwendete Programm wird im Internet unter <http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html> bereitgestellt.

#### $\chi^2$ -Test

Mit dem  $\chi^2$ -Test wurde berechnet, ob sich zwei Kollektive in Bezug auf eine Eigenschaft signifikant unterscheiden. Darunter fiel:

- 1.) Der Vergleich der Zytokeratin-positiven Zellen in den M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Knochenmarksaspiraten insgesamt bzw. getrennt nach den drei unterschiedlichen Antikörpersystemen
- 2.) die Verteilung der CGH-normalen Zellen in den unterschiedlichen Gruppen.
- 3.) die Korrelation zwischen den bioinformatischen Clustern und den klinischen Routinevariablen.
- 4.) der Vergleich der Häufigkeit einzelner CGH-Aberrationen zwischen den disseminierten Tumorzellen oder Primärtumore der beiden M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Patientinnenkollektive in Verbindung mit der Bonferroni-Korrektur (bei Werten in den einzelnen Gruppen größer fünf, ansonsten Fisher Exact Test, siehe unten).

Die Berechnung erfolgte auf der Internetseite

[http://www.georgetown.edu/cball/webtools/web\\_chi.html](http://www.georgetown.edu/cball/webtools/web_chi.html).

### Fisher Exact Test

Der Fisher Exact Test wurde angewendet, wenn die zu vergleichenden Gruppen zu klein für die Verwendung des  $\chi^2$ -Test waren, also weniger als fünf Mitglieder hatten. Dies war insbesondere bei dem Vergleich einzelner CGH-Aberrationen zwischen den disseminierten Tumorzellen und den Primärtumoren des M<sub>0</sub>-Kollektivs der Fall. Es wurde das Programm der Internetseite <http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact.html> verwendet.

### Bonferroni-Korrektur

Die Bonferroni-Korrektur wurde im Falle zweier identischer Kollektive durchgeführt, aus denen mehrere Variablen auf Signifikanz überprüft werden sollten. Damit wird gewährleistet, daß die Summe aller berechneten p-Werte statistisch Signifikant bleibt und so von einem tatsächlichen Unterschied zwischen den beiden Kollektiven gesprochen werden kann. Dies galt insbesondere für die CGH-Daten der M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-disseminierten Tumorzellen, deren Aberrationsfrequenzen an 46 verschiedenen chromosomalen Loci verglichen wurden. Die Korrektur bedeutet die Multiplikation der errechneten p-Werte mit der Anzahl der durchgeführten Tests. Die Bonferroni-Korrektur kann auch auf der Internetseite <http://home.clara.net/sisa/bonfer.htm> berechnet werden.

## 2.4 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Formelgrößen wurden mit dem international gebräuchlichen SI-Einheiten und chemische Elemente gemäß ihrer Bezeichnung im Periodensystem abgekürzt. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache wurde gemäß Duden verfahren.

A	Adenin
BCIP	5-Bromo-4-chloroindol-3-ol Dihydrogenphosphatester Mono-p-toluidiniumsalz
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy-xyloxy- chloro) tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ] decan-4-yl)phenyl phosphate
DAPI	4',6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dig	Digoxigenin
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
FCS	Fötalen Kälberserum
FITC	Fluorescein
G	Guanin
g	Beschleunigung

h.....	Stunde
min.....	Minute
MOPC.....	Mouse Oocyte Plasmocytom
NBT.....	p-Nitroblue-tetrazoliumchlorid
ni.....	nicht informativ
PBS.....	Phosphatbuffer-Saline
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
PFA.....	Paraformaldehyd
PHA.....	Phytohämagglutinin
RNA.....	Ribonucleinsäure
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
sec.....	Sekunde
SSC.....	Salins-Sodiumcitrat
TBE.....	Tris-Borat-EDTA Puffer
TEMED.....	Tetramethylethylendiamin
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)
T.....	Thymin
Upm.....	Umdrehungen pro Minute

## 2.5 Enzyme, Chemikalien, Geräte, Material, Oligonukleotide und Puffer

### Enzyme und Antikörper

A45-B/B3.....	Micromet, München
Anti-Dig-AP F <sub>ab</sub> (Dig Luminescent Detection Kit).....	Roche, Mannheim
Anti-DIG-Flourescein.....	Roche, Mannheim
APAAP.....	Dako, Hamburg
Avidin-Cy3.5.....	Roche, Mannheim
Biotin-16-dUTP.....	Roche, Mannheim
CK2.....	Chemicon, Hofheim
DNA-Polymerase I ( <i>E. coli</i> ).....	New England Biolabs, Frankfurt
DNase I.....	New England Biolabs, Frankfurt
Epimet-Kit.....	Micromet, München
Expand Long Template.....	Roche, Mannheim
MOPC 21.....	Sigma, Deisenhofen
Mse I 50 U/µl.....	New England Biolabs, Frankfurt
Pepsin.....	Roche, Mannheim
Proteinase K.....	Roche, Mannheim
RNase A.....	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase.....	Roche, Mannheim
Taq-Polymerase.....	Roche, Mannheim
Tru I.....	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Z259.....	Dako, Hamburg

### Chemikalien

AB-Serum.....	Biotest, Dreieich
Acrylamid 30%.....	BioRad, München
Agarose GTG Seakem.....	Biozym, Hess. Oldendorf

Ammoniumpersulfat.....	Amersham Biosciences, Freiburg
ATP .....	Roche, Mannheim
BCIP/NBT (AP Color Reagent).....	BioRad, München
Bind-Silan.....	Amersham Biosciences, Freiburg
Blocklösung (Dig Luminescent Detection Kit).....	Roche, Mannheim
Borsäure .....	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau .....	Sigma, Deisenhofen
BSA für PCR.....	Roche, Mannheim
BSA Fraktion V.....	Paesel + Lorei, Hanau
Colcemid .....	Sigma, Deisenhofen
CSPD (Dig Luminescent Detection Kit).....	Roche, Mannheim
DAPI.....	Roche, Mannheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP .....	Amersham Biosciences, Freiburg
Dextranblau .....	Sigma, Deisenhofen
Dextran Sulfat .....	Sigma, Deisenhofen
Dig Luminescent Detection Kit.....	Roche, Mannheim
Dig-Easy (Dig Luminescent Detection Kit).....	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP stabil .....	Roche, Mannheim
DNA-Größenmarker.....	Invitrogen, Karlsruhe
DNA von humaner Placenta.....	Sigma, Deisenhofen
DTT .....	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA .....	Sigma, Deisenhofen
Eisessig 100% .....	Merck, Darmstadt
Eosin.....	Sigma, Deisenhofen
Ethanol unvergällt .....	JT Baker, Griesheim
Ethanol vergällt .....	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid .....	Sigma, Deisenhofen
Eukitt.....	O. Kindler GmbH, Freiburg
FCS.....	PAA Laboratories, Cölbe
Formamid .....	Merk, Darmstadt
L-Glutamin .....	Sigma, Deisenhofen
Hämatoxylinlösung (Mayer's) .....	Sigma, Deisenhofen
Hank's Salzlösung .....	Biochrom KG, Berlin
Harnstoff.....	Sigma, Deisenhofen
Hering Sperm DNA.....	Invitrogen, Karlsruhe
Human C <sub>0</sub> t-1 DNA .....	Invitrogen, Karlsruhe
Igepal.....	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol.....	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid.....	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat .....	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid.....	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumsulfat .....	Merk, Darmstadt
Maleinsäure .....	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol .....	Sigma, Deisenhofen
Methanol.....	Merk, Darmstadt
Montagekleber (Fixogum).....	Marabu, Tamm
Natriumazetat .....	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid.....	Merk, Darmstadt
Natriumcitrat .....	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid-Plätzchen .....	Merk, Darmstadt
OPA Plus.....	Amersham Biosciences, Freiburg

Orange G .....	Sigma, Deisenhofen
PCR-Öl .....	Sigma, Deisenhofen
Penicillin .....	Sigma, Deisenhofen
Percoll 50 .....	Amersham Biosciences, Freiburg
Paraformaldehyd .....	Merk, Darmstadt
Phytohämagglutinin M-From .....	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol/Chloroform .....	Roth, Karlsruhe
Repel-Silan .....	Amersham Biosciences, Freiburg
RPMI ohne L-Glutamin .....	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend) .....	Merk, Darmstadt
SDS .....	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin .....	Sigma, Deisenhofen
SYBR Gold .....	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
SYBR Green .....	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
TEMED .....	Amersham Biosciences, Freiburg
Tween 20 .....	Sigma, Deisenhofen
TRIS .....	Sigma, Deisenhofen
Vectashield .....	Linearis, Hamburg
Wasser (LiChrosolv für Chromatographie) .....	Merk, Darmstadt
Xylencyanol .....	Sigma, Deisenhofen
Xylol .....	Roth, Karlsruhe

### Geräte

Brutschrank .....	Heraeus 6000
CCD-Kamera (Agarose-Gel) .....	INTAS
CCD-Kamera (CGH) .....	Photometrix
Fluoreszenzmikroskop .....	Leica DMXA-RF8
FlourImager .....	FlourImager SI Molecular Dynamics
Heizblock .....	Thermomixer 5436, Eppendorf
Heizplatte .....	Bachofer
Horizontal Gelelektrophorese .....	Invitrogen
Hybridisierungsofen .....	Shake `n` Stak, Hybaid
Invertmikroskop .....	Leica DM IRB
Kryotom .....	Leica Jung Frigocut 2800 E
Lasermikroskop .....	P.A.L.M., Bernried
Mikromanipulator .....	Microinjector 5242, Eppendorf
Mikrotom .....	Leica RM 2025
MJR PCR-Maschine .....	Peltier Thermal Cycler PTC-200
Robocycler-PCR-Maschine .....	Robocycler Gradient 96, Stratagene
Spannungsquelle (Agarose-Gel) .....	EPS 200, Pharmacia Biotech
Spannungsquelle (LOH) .....	2297 Macrodrive S, LKB Bromma
Thermoprinter .....	Sony
UV-Schirm .....	INTAS
UV Stratalinker .....	Stratagene UV Stratalinker 2400
Vertical Gelelektrophorese .....	Owl Separation System
Wasserbad .....	Lauda MT2

**Verbrauchsmaterialien**

Deckgläschen .....	Langenbrinck
Falcon .....	Sarsted
Filmbox .....	Siemens
Glas-Küvetten.....	Roth
Haft-Objektträger .....	Micromet, München
Hybridisierungsröhren.....	Biometra
Kulturfläschchen (Cellstar) .....	Greiner
Nylonmembran.....	Roche, Mannheim
Objektträger (Mattrand) .....	Langenbrinck
Pipetten.....	Gilson
Polyethylenmembran.....	P.A.L.M. Microlaser Technologies
Reaktionsgefäße 1,5 ml .....	Eppendorf
Reaktionsgefäße 200 µl.....	Thermo-Fast 96, Abgene
Transferpipetten .....	Sarsted
Röntgenfilm (Biomax Light).....	Kodak

**Oligonukleotide und Primer**

LIB1 .....	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
ddMse11 .....	TAA CTG ACA G-dideoxy C
Mse21 .....	AGT GGG ATT CCG CAT GCT AGT
Mse12 .....	TAA CTA GCA TGC
p53 exon2/3-5' .....	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC
p53 exon2/3-3' .....	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA
CK 19-5' .....	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C
CK 19-3' .....	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG
Alu I.....	CTG GGC GAC AGA GCG AGA
Alu II .....	CGG CCT CCC AAA GTG CTG
Alu III.....	GGT GGC TCA CGC CTG TAA TC
Alu IV.....	GAG ACG GAG TCT CGC TCT G
CT 20.....	CTC TCT CTC TCT CTC TCT CT
α-cat-5' .....	CAC CTA TTC GAC CTA ATG AC
α-cat-3' .....	TGA AGT CCT CTC CAA CGT G
Plako-5' .....	CAG TTA GCC AAG ATA ATG CC
Plako-3' .....	CTC ATA AGG GGA TAA AGG AC
D8S567-5' .....	AGA AGC AGA GAA GAG CTT CTG
D8S567-3' .....	CTG TAA GTT CTT TCT AAG CAA ACA
D8S591-5' .....	ACT TTG AAT GGT ATT TCA ATG TC
D8S591-3' .....	CAG TTA AAA CAA GGT CAA ACA TA
D16S3095-5' .....	TAT AGT TTG TGT CCC CCG AC
D16S3095-3' .....	TCA GTT GGA AGA TGA GTT GG
D16S485-5' .....	AGG CAA TTT GTT ACA GAG CC
D16S485-3' .....	AGT AAT AAT GTA CCT GGT ACC
D16S511-5' .....	CAG AGG CCT CAT TTT CTA ACC
D16S511-3' .....	TGC TAC ATA AAG AGG GAG GC
D16S505-5' .....	CTT CTG ATG GTG TCC GGC TA
D16S505-3' .....	CTA AAT CCA GTG ACT GGC GT

Alle Oligonukleotide wurden von Metabion, München, synthetisiert.

**Puffer**

PBS (Phosphatbuffer-Saline):	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
	NaCl	150 mM
	pH	7,4
SSC (Saline-Sodiumcitrat):	NaCitrat	15 mM
	NaCl	150 mM
	pH	7,4
TBE (Tris-Borat-EDTA Puffer):	Tris	89 mM
	Borat	89 mM
	EDTA	2 mM
	pH	8,3

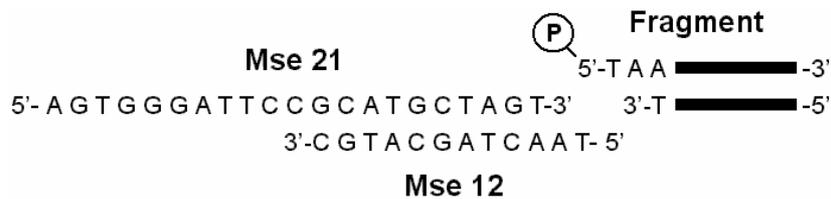
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der Einzelzell-PCR-Methode

Genomische Analysen einzelner Zellen sind ohne vorhergehende globale Amplifikation der DNA nur begrenzt durchführbar. Mit sehr sensitiven PCR-Methoden können zwar spezifische genomische Sequenzen aus einer einzelnen Zelle amplifiziert werden, die Analyse mehrerer Sequenzen setzt jedoch die vorhergehende universelle Amplifikation des Genoms voraus. Das global amplifizierte Genom der Einzelzelle ist dabei meist nur ein Ausgangspunkt der eigentlichen genomischen Untersuchungen, so daß die Anforderungen, welche an die globale Amplifikation gestellt werden, von dem jeweiligen Verwendungszweck abhängig sind. Die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) basiert auf einem quantitativen Vergleich von Tumor- und Referenz-DNA. Dies impliziert die Notwendigkeit einer homogenen bzw. gleichmäßigen Amplifikation der Einzelzell-DNA. Obwohl es mit der DOP-, PEP- und Alu-PCR Methoden gibt, die DNA aus Einzelzellen amplifizieren, führen die genannten Methoden zu mehr oder weniger starken Verzerrungen der Repräsentation, so daß die Kombination mit der Einzelzell-PCR mit einer CGH schwierig bzw. unmöglich ist. Es wurde daher die Adapter-Linker-PCR auf Einzelzellebene als eine Alternative zur DOP-PCR etabliert. Diese PCR-Methode beginnt mit einem Restriktionsverdau des Genoms, um an die entstandenen Schnittstellen einen Adapter zu ligieren, welcher in der anschließenden PCR auch als Primer dient. Unter der Prämisse, daß die Länge der erzeugten genomischen Fragmente im gesamten Genom gleichverteilt ist, kann eine homogene Amplifikationseffizienz erreicht werden. Wird ein geeignetes Restriktionsenzym gefunden, daß die genomische DNA komplett und gleichmäßig verdaut, sollten daher die numerischen Verhältnisse des Genoms gewahrt bleiben.

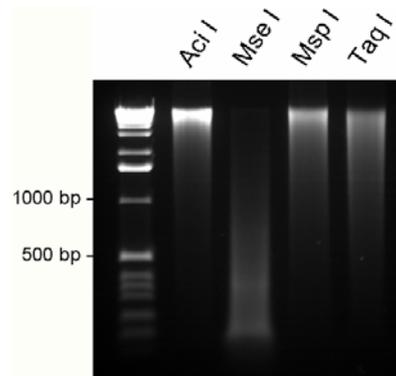
Vor der eigentlichen Amplifikation mittels Adapter-Linker-PCR muß das Genom der Einzelzelle mit einem Restriktionsenzym fragmentiert und der Adapter an die Schnittstellen ligiert werden. Die zu untersuchende Zelle wird dazu mit einem Mikromanipulator isoliert und in ein Reaktionsgefäß überführt (Abbildung 16). Anschließend wird die Zelle mit einer Proteinase verdaut und so die Degradation der Zell- und Kernmembran sowie der Abbau des Chromatins bewirkt. Dadurch wird die DNA für den anschließenden Restriktionsverdau zugänglich. Es ist für eine homogene PCR-Amplifikation hilfreich, wenn die zu amplifizierenden DNA-Fragmente nicht zu groß sind, damit Unterschiede in der PCR-

Effizienz zwischen großen und kleinen Fragmenten nicht entstehen können. Außerdem muß das Restriktionsenzym eine freie Phosphatgruppe generieren, damit das obere Oligonukleotid des Adapters ligiert werden kann (Abbildung 4). In Folge dessen wurden die Restriktionsenzyme Aci I (Schnittstelle C<sup>∇</sup>CGC), Msp I (Schnittstelle C<sup>∇</sup>CGG), Taq<sup>α</sup> I (Schnittstelle T<sup>∇</sup>CGA) und Mse I (Schnittstelle T<sup>∇</sup>TAA) auf den vollständigen Verdau der chromosomalen DNA getestet. Wie aus der Abbildung 5 ersichtlich, schneidet insbesondere Mse I die genomische DNA quantitativ, da die Länge der DNA Fragmente von 150-1500 bp im erwarteten Bereich liegt.



#### Abbildung 4 Die Adapter-Ligation.

Die basengepaarten Oligonukleotide Mse21 und Mse12 ergänzen die Mse I-Schnittstellen der genomischen Fragmente. Mse21 wird ligiert, da am 5'-Ende des genomischen Fragments eine Phosphatgruppe vorliegt.

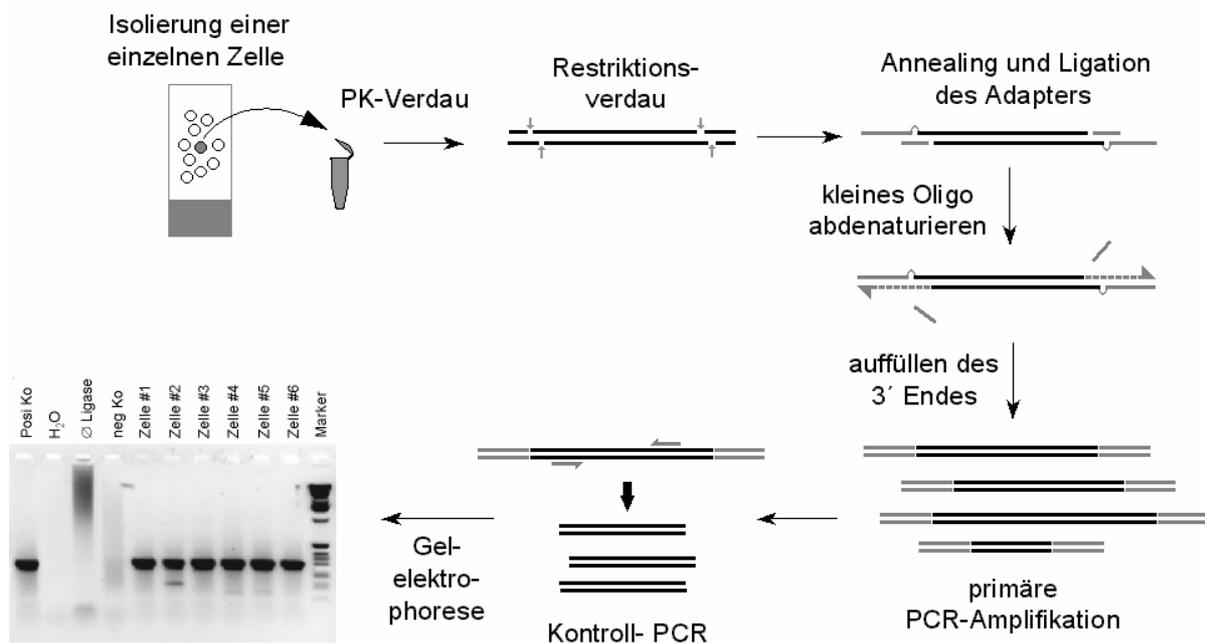


#### Abbildung 5 Restriktionsverdau hochmolekularer genomischer DNA

Mit jeweils 5 U der vier Restriktionsenzyme wurden 2 µg humane Placenta-DNA über drei Stunden bei 37°C verdaut und die Fragmentgröße anschließend mit einem 1,5% Agarosegel bestimmt.

An die mit Mse I erzeugten Schnittstellen wird dann ein Adapter, bestehend aus zwei Oligonukleotiden, ligiert. Die Sequenz der Adapter-Oligonukleotide sollte dabei so gewählt werden, daß sie auf nativer humaner genomischer DNA kein spezifisches PCR-Produkt amplifizieren, da dieses sonst möglicherweise stark überrepräsentiert wäre und die gewünschte homogene Amplifikation nicht mehr gewährleistet ist. Das längere 21 bp Oligonukleotid (Mse21) wird durch die T4-DNA-Ligase an die Phosphatgruppe des

5' Überhangs der Mse I-Schnittstelle ligiert. Das kürzere 12 bp Oligonukleotid (Mse12) ist komplementär zu Mse21 und ergänzt an seinem 5' Ende durch zwei Basen die Mse I-Schnittstelle der genomischen DNA-Fragmente (Abbildung 4). Durch das Mse12-Oligonukleotid kann der Adapter während der Ligation mit den zwei überhängenden Basen der Mse I-Schnittstelle eine Basenpaarung eingehen und so an seinem Platz halten, dadurch wird die Ligation verbessert. Nachdem das Mse21 Oligonukleotid des Adapters an die genomischen Mse I-Fragmente ligiert wurde, kann der rezessive DNA-Strang aufgefüllt werden, damit eine zu Mse21 komplementäre Primerbindungsstelle entsteht. Dazu werden die PCR-Reagenzien zur ligierten Probe addiert und diese bei 68°C ca. 1 min inkubiert. Das 12 bp lange Mse12-Oligonukleotid denaturiert bei dieser Temperatur, so daß, nach der Zugabe einer DNA-Polymerase, das rezessive Ende des unteren DNA-Strangs aufgefüllt wird (siehe Abbildung 6). Damit entstehen zu Mse21 komplementäre Sequenzen am 3' Ende der Fragmente, welche im nächsten Zyklus als Primerbindungsstellen dienen, so daß die Fragmente dann exponentiell amplifiziert werden können.



**Abbildung 6 Von der Zellisolation zur globalen Genomrepräsentation: Schematische Darstellung der Adapter-Linker-PCR**

*Die detaillierte Beschreibung der Adapter-Linker-PCR befindet sich in Abschnitt 2.3.4, sowie im Text.*

Um Verluste von genomischen Fragmenten möglichst zu vermeiden, werden alle Reaktionen von der Ligation bis zur PCR in demselben Reaktionsgefäß durchgeführt. Dies bedeutet, daß die Volumina zu Beginn der Einzelzell-PCR relativ klein sind (3 µl während des

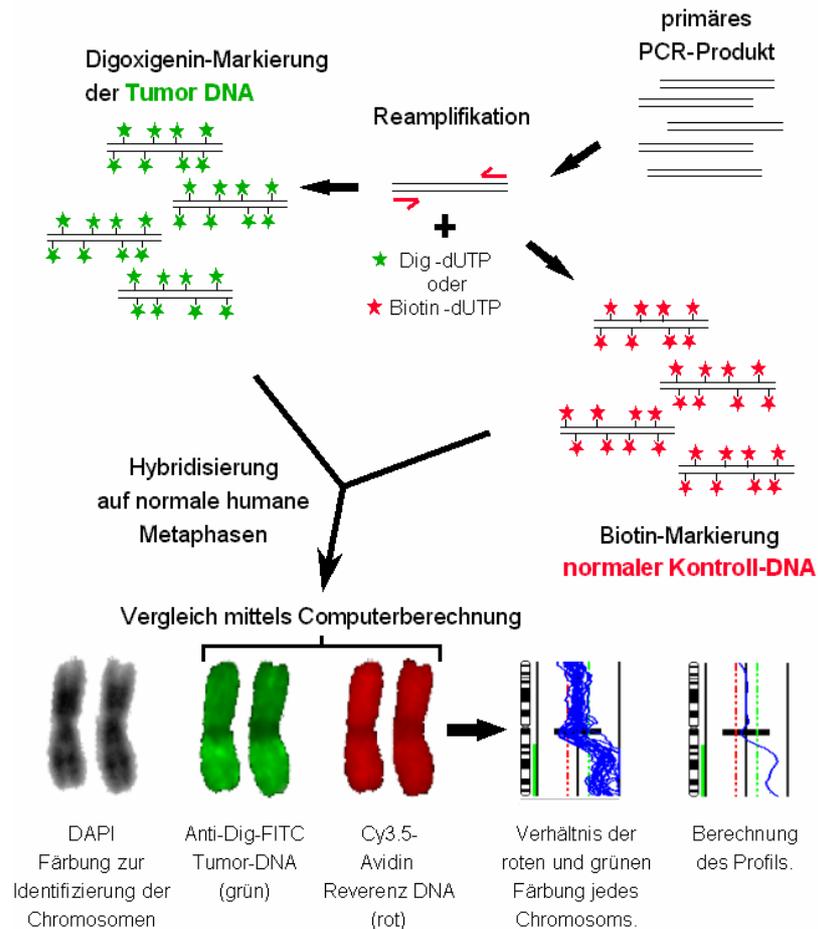
Proteinase K-Verdau). Das Restriktionsenzym Mse I (in 2 µl Volumen) sowie der Adapter mit T4-DNA-Ligase (5 µl Volumen) und die 40 µl PCR Mix wurden sukzessive ergänzt. Als Konsequenz daraus müssen die Proteinase, das Restriktionsenzym und die Ligase in einem Puffer arbeiten. Als ein guter Kompromiß hat sich der Puffer One-Phor-All-plus (Pharmacia) herausgestellt, in dem alle verwendeten Enzyme aktiv sind. Da ein möglichst vollständiger Reaktionsablauf für die Effizienz der Methode unerlässlich ist, werden alle Enzyme in konzentrierter Form eingesetzt. In der PCR wird schließlich der TaqLongTemplate Puffer ① verwendet. Da die Salzkonzentration des One-Phor-All-plus Puffers über dem Optimum der TaqLongTemplate Polymerase liegt, wurde die Menge des PCR-Puffers etwas reduziert um die Salzkonzentration in den optimalen Bereich zu bringen. Die aufeinander folgenden enzymatischen Schritte der Adapter-Linker-PCR können sich allerdings negativ beeinflussen, wenn die eingesetzten Enzyme nach der Reaktion nicht inaktiviert werden. Denn durch eine Restaktivität der Proteinase K kann eine Aktivitätsminderung von Mse I durch den proteolytischen Verdau des Enzyms hervorgerufen werden und die fehlende Inaktivierung von Mse I führt wiederum zum erneuten Verdau der rekonstituierten Mse I-Schnittstelle. Mangelhafte Inaktivierung führt daher zu schlechten Ergebnissen oder gar zum völligen Mißlingen der Amplifikation.

Die Zugabe der DNA-Polymerase nach der Hitzedenaturierung des kleinen Mse12-Oligonukleotids ist nötig, da dieses anderenfalls während der Vorbereitung der PCR unerwünschterweise durch Polymerisation verlängert werden kann. Zum einen entsteht in diesem Fall an dem rezessiven DNA-Strang des genomischen Fragments keine Primerbindungsstelle, weil das Mse12-Oligonukleotid nicht ligiert wird, zum anderen besitzt das auf diesem Weg verlängerte Mse12-Oligonukleotid die gleiche Annealing-Temperatur wie der Mse21-Primer und kann in den folgenden PCR-Zyklen um den freien Primer konkurrieren, was einer inhibitorischen Wirkung gleichkommt. Daher muß der Reaktionsansatz vor der Zugabe der DNA-Polymerase erst auf 68°C erwärmt werden, so daß die Bindungsenergie des Mse12 Oligonukleotides von ca. 34°C weit überschritten wird, wodurch dieser denaturiert und so das rezessive 3' Ende des genomischen Fragments für die Polymerisation einer Primerbindungsstelle frei ist. In der Praxis bedeutet dies, daß die Reaktionsgefäße in der PCR-Maschine bei 68°C geöffnet werden müssen, damit die DNA-Polymerase ergänzt werden kann. Damit besteht die Gefahr der Kontamination und des Verdampfens des Reaktionsgemischs, wodurch sich, besonders bei der simultanen Bearbeitung mehrerer Proben, die Qualität des PCR-Produktes verschlechtert. Die nachträgliche Zugabe der DNA-Polymerase konnte jedoch durch die Änderung des Adapter-

Designs vermieden werden, indem das kleinere Hilfs-Oligonukleotid nun mit einem Dideoxy-Cytidin am 3' Ende synthetisiert wurde. So kann das kleine Oligonukleotid des Adapters zu keinem Zeitpunkt verlängert werden. Die Sequenz der beiden Adapter-Oligonukleotide wurde daher leicht geändert in LIB1 und ddMse11.

### 3.2 CGH mit Einzelzell-PCR-Produkten

Die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) wurde 1992 (Kallioniemi *et al.*, 1992) eingeführt und seitdem erschienen ca. 4500 Publikationen mit dieser Technik (nach einer Recherche in der National Library of Medicine), so daß ein gut etabliertes CGH-Protokoll zur Verfügung stand und weitestgehend übernommen werden konnte. Anpassungsbedarf an die Adapter-Linker-PCR-Produkte bestand in der Markierung der Hybridisierungsproben. Üblicherweise werden hochmolekulare Hybridisierungsproben in einer Nicktranslation durch eine Endonuklease (DNase I) geschnitten. Diese Doppelstrangschnitte werden von der 5'→3' Exonukleaseaktivität der *E. coli* DNA-Polymerase I vergrößert und dabei gleichzeitig das freie 3'-Ende durch Neupolymerisation mit Hapten-konjugierten Nukleotidderivaten markiert. Entsprechend reduziert sich die ursprüngliche Fragmentlänge der DNA-Probe deutlich. Dieser Begleiteffekt ist bei hochmolekularen Proben durchaus erwünscht, da das Optimum der Fragmentlänge in der CGH 600-2000 bp beträgt (Kallioniemi *et al.*, 1992; Kallioniemi *et al.*, 1994b). Die Einzelzell-PCR-Produkte sind bereits durch den Mse I-Verdau etwas unterhalb des optimalen Größenbereichs (100-1500 bp). Daher ist es eher von Nachteil, die Größe der Fragmente durch Nicktranslation zusätzlich zu verkleinern. Statt dessen können die Haptengekoppelten Nukleotide auch durch eine PCR in die Hybridisierungsproben inkorporiert werden. Da die Einzelzell-PCR-Produkte an ihren Enden eine uniforme Adaptersequenz tragen, kann mit den Primern Mse21 bzw. LIB1 eine PCR-Markierung des primären PCR-Produktes erreicht werden (siehe Abbildung 7). Zur PCR-Markierung wurde 1/3 und 1/7 Hapten-dUTP in 350 µM dNTP-Endkonzentration getestet. Weder die Qualität der Reamplifikation, noch die Intensität der Markierung unterschieden sich deutlich (siehe Abbildung 8). Daher wurde in kleinen Schritten die Hapten-Konzentration von 1/7 bis 1/10 weiter reduziert und die resultierenden Fluoreszenzintensitäten der CGH durch optische Auswertung verglichen. Bei einem Achtel der gesamt dTTP-Konzentration (43,75 µM Hapten-dUTP) wurde die relativ höchste Fluoreszenzintensität beobachtet und diese Konzentration im Folgenden als Standard verwendet, auch wenn sich die Differenzen zwischen den Markierungen als sehr gering darstellten.

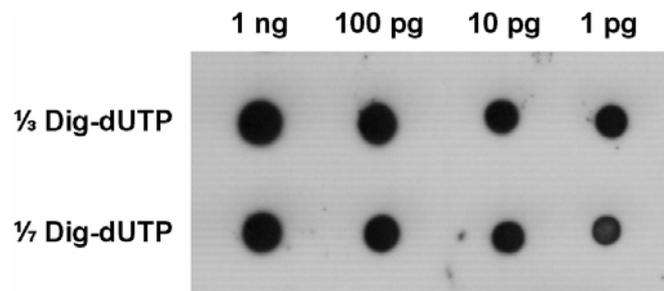


**Abbildung 7 Schematische Darstellung der CGH-Markierung und Hybridisierung**

Die primären PCR-Produkte der Referenz- und Tumor-Probe werden in Anwesenheit von Digoxigenin- bzw. Biotin-dUTP in einer PCR markiert. Die Haptene werden nach dem Abschluß der Hybridisierung mit Anti-Dig-FITC bzw. Avidin-Cy3.5 nachgewiesen und die Fluoreszenzintensitäten durch Computerberechnung in ein Verhältnis gesetzt, welches graphisch in dem CGH-Profil dargestellt wird.

Die DNA-Menge, welche für ein gutes Hybridisierungssignal in die CGH eingesetzt werden mußte, betrug im Falle der Adapter-Linker-PCR mindestens 5 µg, was einem PCR-Volumen von ca. 20 µl entsprach. Setzte man, wie im Falle der Nicktranslation üblich, nur 0,5 bis 1 µg DNA in die CGH ein, war eine sehr granuläre Färbung der Chromosomen zu beobachten, bei gleichzeitig schwachen Intensitäten der Hybridisierungssignale. Die Homogenität des Signals konnte weiter gesteigert werden, wenn 10 µg markierte DNA hybridisiert wurden. Über diese DNA-Menge hinaus, ergab eine zusätzliche Steigerung nur noch geringe Verbesserungen der Hybridisierungsintensität, so daß 40 µl PCR-Produkt das Optimum darstellten. Verglichen mit der Nicktranslation hochmolekularer DNA ist also erheblich mehr Produkt der Einzelzell-PCR nötig, um die gleiche Hybridisierungsqualität zu erreichen. Das kann einerseits in der geringeren Fragmentlänge begründet sein (ca. 250 bp im Falle der Adapter-Linker-PCR

verglichen mit 600-2000 bp der Nicktranslation). Andererseits entsteht bei einer PCR auch unerwünschtes Produkt, wie zum Beispiel Primerdimere. Daher kann von der eingesetzten DNA-Menge nicht direkt auf den Anteil der Fragmente geschlossen werden, die tatsächlich humanen Ursprungs sind und hybridisieren.



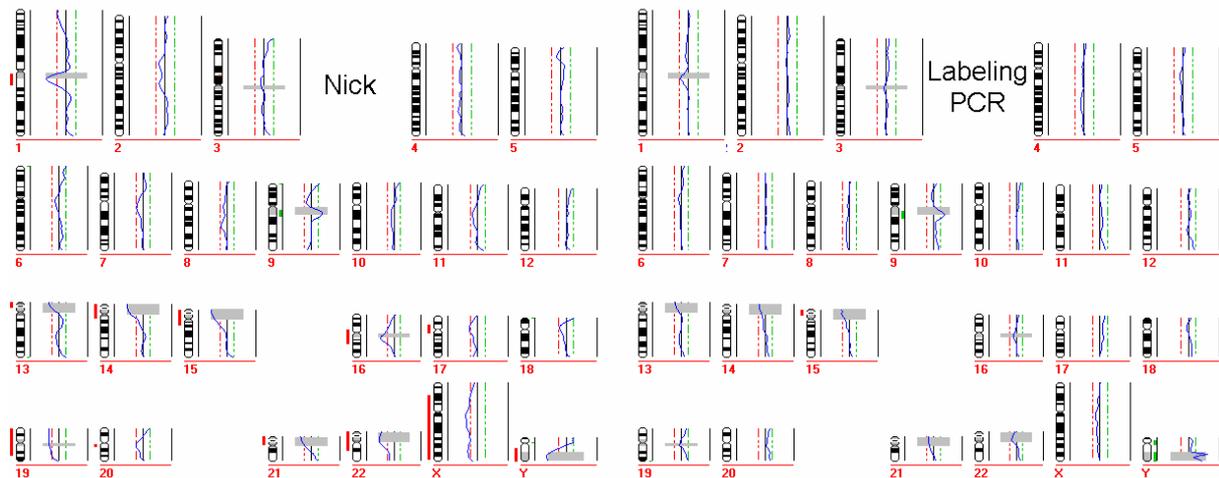
### Abbildung 8 Effizienz der PCR-Markierung

Das Adapter-Linker-PCR-Produkt wird durch eine Reamplifikation mit Digoxigenin markiert. Der Einbau des Digoxigenin-dUTP's im Verhältnis von 1/3 und 1/7 in Relation zur gesamten Nukleotidkonzentration wurde nach Auftropfen und Antikörperreaktion auf einer Nylonmembran mit einer Chemilumineszenz-Reaktion verglichen. Es wurden zwischen 1 pg und 1 ng des markierten PCR-Produktes aufgetragen.

### Qualitätskontrollen

Die Adapter-Linker-PCR wurde mit dem Ziel entwickelt, ein PCR-Produkt aus Einzelzellen zu erhalten, welches den Anforderungen der CGH genügt. Ob dies gelungen ist, sollte mit einer Reihe von Kontrollexperimenten überprüft werden. Die homogene Amplifikation des Genoms wurde an normalen diploiden Zellen getestet, die, wie gefordert, keine CGH-Aberrationen zeigten. Die Hybridisierung von Adapter-Linker-PCR-Produkten fünf einzelner, aus dem peripheren Blut gesunder Spender gewonnener Lymphozyten ergab gegenüber Adapter-Linker-PCR amplifizierter humaner Plazenta-DNA als Referenz in allen Fällen normale CGH-Profile. Werden jedoch bestimmte genomische Abschnitte mit der Adapter-Linker-PCR in Relation zu anderen bevorzugt amplifiziert, zum Beispiel weil in einigen chromosomalen Banden die Mse I-Schnittstellen über- bzw. unter-repräsentiert sind oder die DNA schlechter zugänglich ist, muß dies nicht zwangsläufig zu artifiziellen CGH-Aberrationen führen, wenn die Einzelzellprobe und die Referenz-DNA die gleichen quantitativen Schwankungen aufweisen. Daher wurde ein PCR-markiertes Adapter-Linker-PCR-Produkt einerseits mit einer durch Nicktranslation markierten Referenz-DNA und andererseits mit einer ebenfalls Adapter-Linker-PCR markierten Referenz-DNA hybridisiert und das Ergebnis der CGH-Experimente verglichen. Wie aus Abbildung 9 hervorgeht,

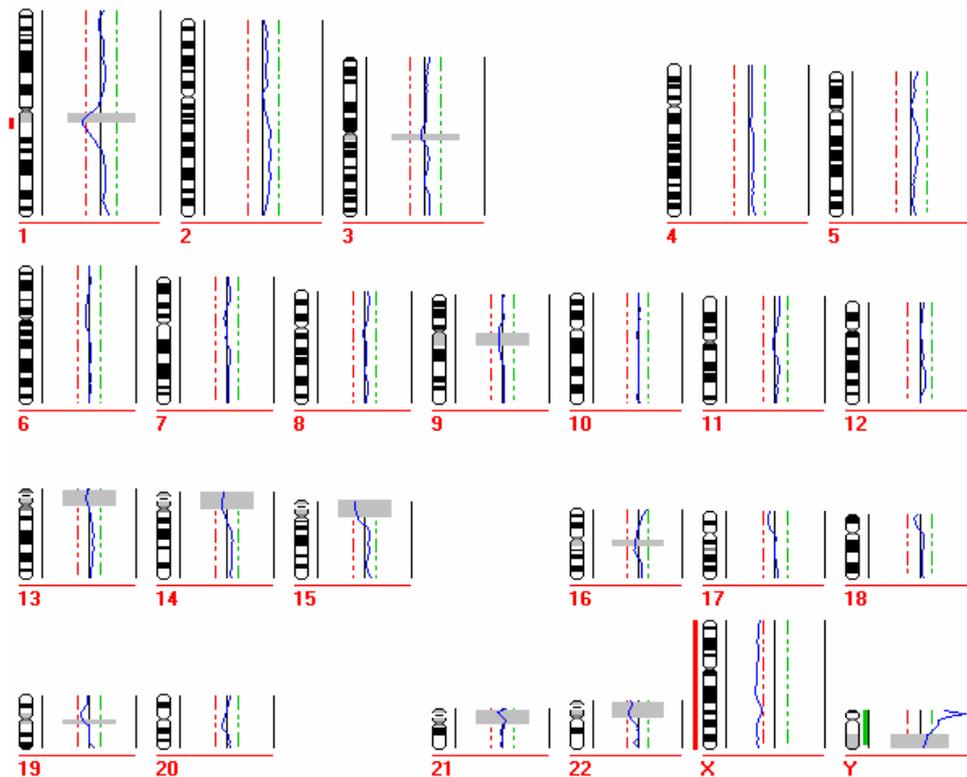
ergaben beide Markierungsmethoden, von dem problematischen kurzen Arm des Chromosoms 19 abgesehen, normale CGH-Profile. Das Adapter-Linker-PCR-Produkt ist damit für die CGH ausreichend homogen, wobei mögliche kleinere lokale Schwankungen durch das begrenzte Auflösungsvermögen der CGH kaschiert werden. Aus Gründen der einfacheren Handhabung und der besseren Hybridisierung, wurde im Folgenden die Referenz-DNA mittels PCR markiert.



### Abbildung 9 Abhängigkeit des CGH-Profiles von der Markierungsreaktion der Referenz-DNA

Das primäre Amplifikat derselben Einzelzelle wurde in beiden CGH-Experimenten mit PCR markiert. Als Referenz-DNA diente Placenta-DNA die durch Nicktranslation (linkes Profil) oder PCR-Reamplifikation (rechtes Profil) markiert wurde.

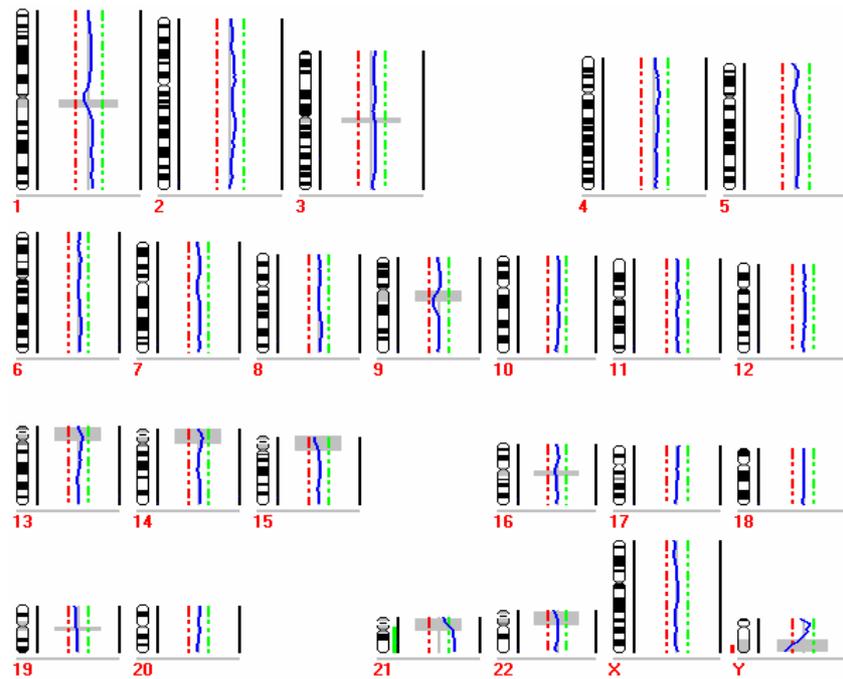
Wie in der Einleitung beschrieben und wie im Abschnitt 3.3.1 näher ausgeführt wird, ist die Detektion der disseminierten Tumorzellen an eine immunzytochemische Färbung gebunden. Es mußte daher ausgeschlossen werden, ob dieser manipulative Schritt sowie die Behandlung der Zellen mit Paraformaldehyd und dem Färbesubstrat BCIP/NBT, einen negativen Einfluß auf die Qualität der DNA und damit auf die Homogenität der Adapter-Linker-PCR hat. Dazu wurden periphere Erythroblasten aus dem Nabelschnurblut eines gesunden Neugeborenen auf Objektträgern immobilisiert und mit einem Antikörper gegen fötales Hämoglobin (Hb-F) immunzytochemisch durch das Alkalische-Phosphatase-Antialkalische-Phosphatase-System mit BCIP/NBT gefärbt. Die resultierenden CGH-Experimente von fünf gefärbten Zellen ergaben, wie in Abbildung 10 exemplarisch dargestellt, ein normales Profil.



**Abbildung 10** Einfluß der BCIP/NBT-Färbung auf das CGH-Profil einer normalen Einzelzelle

Der Einfluß der BCIP/NBT-Färbereagenzien auf die Adapter-Linker-PCR wurde durch CGH überprüft. Aus dem Nabelschnurblut gewonnene, embryonale Erythroblastenvorläufer wurden mit einem Antikörper gegen fötales Hämoglobin gefärbt und mit dem Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-System durch BCIP/NBT gefärbt. Das Genom fünf einzelner Hb-F positiver Zellen wurde mittels CGH analysiert (Test-DNA:  $\Gamma$ , Referenz-DNA: E).

Nachdem sich das Adapter-Linker-PCR-Produkt auch nach der immuncytochemischen Färbung als geeignet für die CGH herausgestellt hatte, sollte im Anschluß die Sensitivität der Adapter-Linker-PCR an Zellen mit kleinen und definierten numerischen genomischen Veränderungen bestimmt werden. Wie aus Abbildung 11 ersichtlich, ist die numerische Auflösung der Einzelzell-CGH hoch genug, um zwei bzw. drei Kopien eines Chromosoms quantitativ zu differenzieren. Im Vergleich dazu ist der Nachweis von Deletionen und über Trisomien hinausgehende Amplifikationen in einem ansonsten diploiden Chromosomensatz weniger anspruchsvoll, da die quantitativen Unterschiede mindestens 1:2 oder mehr betragen.



**Abbildung 11** CGH-Profil eines Lymphozyten von einem Patienten mit Trisomie 21

*Aus einer Blutprobe eines Patienten mit Down-Syndrom wurden einzelne Lymphozyten isoliert und mittels Adapter-Linker-PCR amplifiziert. Das CGH-Profil einer dieser Zellen ist dargestellt ( $\Gamma:\Gamma$ ).*

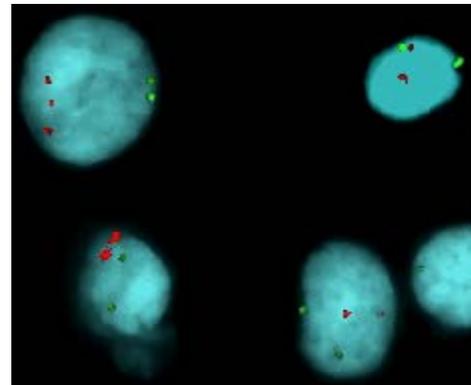
Anhand der weit verbreiteten und deshalb gut charakterisierten Zelllinie MCF-7 sollte schließlich die Reproduzierbarkeit von Komplex-veränderten CGH-Profilen aus unabhängigen Einzelzell-PCR-Amplifikationen demonstriert werden. Da die meisten Zelllinien in Bezug auf die chromosomalen Veränderungen heterogen sind und außerdem oft in verschiedenen Labors unterschiedliche Klone existieren, wurde als Vergleich eine klassische CGH aus der MCF-7 Zellkultur des Labors, mittels Nicktranslation von 1  $\mu\text{g}$  chromosomaler DNA, durchgeführt. Daneben wurden fünf einzelne MCF-7 Zellen isoliert, eine Adapter-Linker-PCR durchgeführt und diese dem etablierten Protokoll hybridisiert. Die in der Tabelle II zusammengefaßten Gewinne und Verluste zeigen, daß eine große Übereinstimmung der CGH-Aberrationen zwischen der extrahierten DNA-Probe und den Einzelzellamplifikaten besteht, sich aber in keinem Fall ein identisches CGH-Profil ergab. So wurde z.B. die 2p Amplifikation nur in einer einzigen MCF-7 Zelle nachgewiesen (siehe Tabelle II). Ob es sich hierbei um artifizielle, durch die Adapter-Linker-PCR hervorgerufene Aberrationen oder um eine echte Heterogenität der Zellpopulation handelt, wurde von einer CGH unabhängigen, exemplarischen Überprüfung des 2p Gewinns durch Interphase FISH ermittelt. Das von Dr. Michael Speicher durchgeführte Experiment zeigte, daß in ca. 16% der MCF-7 Zellen ein Gewinn von Chromosom 2p vorlag (siehe Abbildung 12) und daher kein Grund bestand, die Reproduzierbarkeit der Einzelzell-PCR in Frage zu stellen. Vielmehr

besteht die Möglichkeit, daß die Einzelzell-CGH, im Gegensatz zur klassischen CGH, Aberrationen in Subpopulationen besser darstellen kann.

**Tabelle II MCF7-Zellkultur CGH-Experimente**

	Gewinne								Verluste									
<b>Pool</b>	3q	8q	11	15	19q	20q	3p	8p	14	17p	18q	22q						
<b>Zelle 1</b>	2p	3q	8q	11	15	19q	20q	3p	8p	14	17p	18q	22q					
<b>Zelle 2</b>	3q	5p	8q	11	13	15	19q	20q	3p	8p	14	17p	18	19p	22q			
<b>Zelle 3</b>	3q	5p	8q	11	13	15	19q	20q	3p	6	8p	12q	14	17p	18q	19p	21q	22q
<b>Zelle 4</b>	3q	4	8q	11	12p	13	15	19q	20q	3p	6	8p	14	17p	18q	19p	21q	22q
<b>Zelle 5</b>	3q	5p	8q		13	15	19q	20q	3p	4	6	8p	14	17p	18q	19p	21q	22q

	1x 2p	1x 2p	2x 2p	2x 2p	2x 2p	3x 2p	3x 2p	4x 2p	4x 2p
	1x 2q	2x 2q	1x 2q	2x 2q	3x 2q	2x 2q	3x 2q	2x 2q	3x 2q
MCF7	6	0	2	70	0	16	3	2	1
PBL	1	3	4	89	1	1	1	0	0



**Abbildung 12 Validierung des 2p Gewinns in einer MCF7-Subpopulation durch FISH**

Aus einer MCF7-Zellkultur wurden Cytospin-Präparate hergestellt. Es wurde mit einer 2p-Sonde (rote Fluoreszenz) und einer 2q-Sonde (grüne Fluoreszenz) hybridisiert (Bild links). Hundert Zellen wurden ausgezählt, dabei wurden in 16% der MCF7-Zellen drei 2p-Hybridisierungssignale detektiert (Tabelle rechts). Eine PBL-Kultur diente als Referenz.

### Probleme der Hapten-Markierung

Nach der Hybridisierung einiger disseminierter Tumorzellen traten in ca. 50% der CGH-Profile sich stereotyp wiederholende „Aberrationen“ auf, insbesondere auf Chromosom 4, 5, 6 und 12, die einen sehr charakteristischen Gewinn aufwiesen (siehe Abbildung 13). Da diese „Aberrationen“ im Vergleich mit Literaturdaten des Mammakarzinoms nicht beschrieben wurden und häufig in Kombination auftraten, ergab sich der Verdacht, daß möglicherweise trotz der oben angeführten Kontrollexperimente ein Artefaktproblem vorlag. Im Folgenden wurde die PCR-Reamplifikation neu eingestellt und validiert, mit dem Ergebnis, daß der Einbau von Digoxigenin-dUTP in das Einzelzell-PCR-Produkt keine Artefakte verursachte, dahingegen aber die Markierung des selben Amplifikates mit Biotin-dUTP. Der PCR-Einbau

von Biotin-dUTP in die Referenz-DNA ergab im Gegensatz dazu keine Probleme. Die CGH-Experimente der disseminierten Tumorzellen, in denen die beschriebenen Artefakte aufgetreten waren, wurden mit dem optimierten Markierungsprotokoll wiederholt und es konnte demonstriert werden, daß durch die verbesserte Markierungs-PCR dieses Problem gelöst werden konnte (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13** CGH-Profile vor und nach Umstellung der PCR-Markierung

Die CGH-Profile von Einzelzellen, welche mit Biotin reamplifiziert wurden, weisen einige auffällige, sich wiederholende Amplifikationen auf (Profile auf der linken Seite). Diese Aberrationen wurden nicht beobachtet, wenn das Einzelzell-Amplifikat mit Digoxigenin markiert wurde (Profile auf der rechten Seite). Oben sind die CGH-Profile derselben Zytokeratin positiven Zelle, welche wie sich zeigt keine CGH-Veränderungen aufweist, mit Biotin und Digoxigenin Markierung dargestellt. Unten sind die CGH-Profile einer disseminierten Tumorzelle mit CGH-Aberrationen dargestellt.

### 3.3 Genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen

#### 3.3.1 Detektion disseminierter Tumorzellen

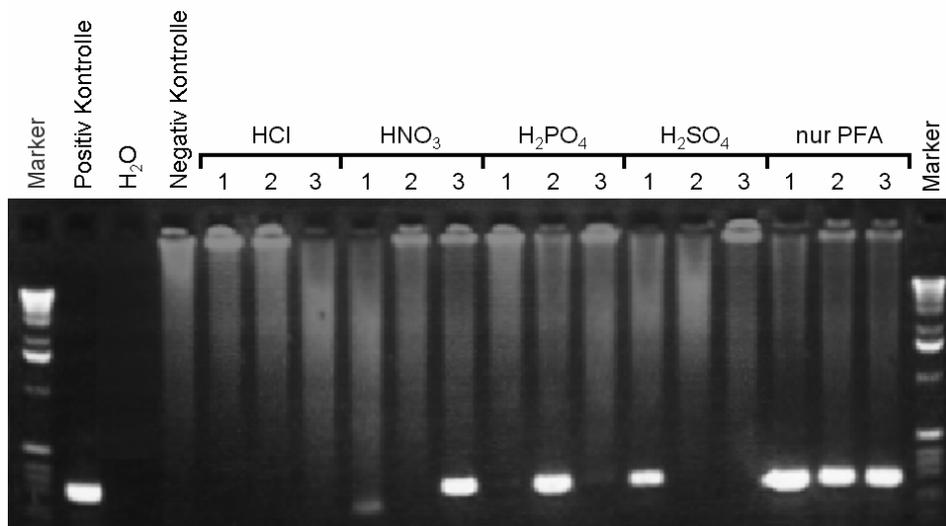
Disseminierte Tumorzellen kommen in Knochenmarksaspiraten in einer äußerst niedrigen Frequenz vor, so daß zu ihrer Detektion eine Anreicherung und eine immunzytochemische Färbung nötig sind. Dazu wurden die disseminierten Tumorzellen mit Hilfe einer Perkollidichtegradienten-Zentrifugation von Zellen, deren Dichte 1,065 g/ml überschritt (darunter befinden sich vorwiegend Erythrozyten und Granulozyten), getrennt (Klein, 1997). Die mononukleären Zellen der gewonnenen Interphase wurden dann auf Glasobjektträgern immobilisiert, wobei grundsätzlich zwei Möglichkeiten bestanden: Eine Zentrifugation der Zellen auf Glasobjektträger (Cytospin) oder eine Sedimentation auf Adhäsionsobjektträger, deren positive Oberflächenladung die Bindung der äußerlich negativen Zellmembran unterstützt. Der Vorteil des letzteren Systems lag in der reversiblen Bindung der Zellen, die durch Zugabe von Detergentien gelockert werden konnte und so eine Isolierung der disseminierten Tumorzellen durch Mikromanipulation nach der Immunzytochemie ermöglichte. Die Haltbarkeit der getrockneten Haftobjektträger-Knochenmarkpräparate betrug dabei mehrere Monate, so daß eine unkomplizierte Zwischenlagerung möglich war. So konnte ein Großteil der Knochenmarkaufbereitungen direkt in den kooperierenden Kliniken durchgeführt werden.

#### Wahl eines geeigneten Färbesubstrats

Der immunzytochemische Nachweis disseminierter Tumorzellen basiert auf Antikörpern gegen epitheliale Zytokeratine, die im mesenchymalen Knochenmark physiologischerweise nicht exprimiert werden. Die Färbung der Zytokeratin-positiven Zellen geschieht schließlich durch die Zugabe eines Substrates, welches von der Alkalischen-Phosphatase in einen unlöslichen Farbstoff umgesetzt wird und sich an der Zelle ablagert. Meist wird als Substrat eine mit Salzsäure aktivierte Neufuchsinlösung verwendet.

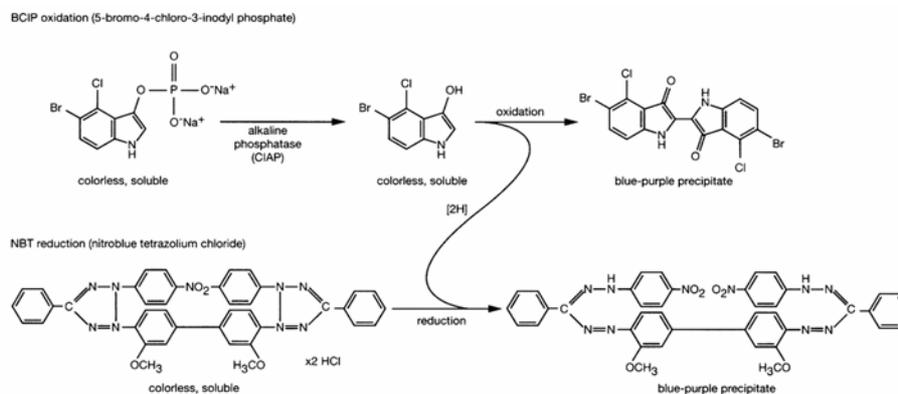
Im Gegensatz zu ungefärbten Kontrollzellen ergaben die ersten Alu-PCR-Amplifikationen von Zytokeratin-positiven Einzelzellen in der Qualitätskontrolle ein negatives Resultat. Dies führte zu der Überlegung, daß der stark saure pH-Wert der Neufuchsinlösung von 1-2 die DNA depurinert. Wird die DNA der Zellen durch die Färbung geschädigt, ist eine reproduzierbare Einzelzell-Amplifikation nicht möglich. Daher wurden neben der üblicherweise für die Neufuchsin-Aktivierung verwendeten Salzsäure auch die etwas milderen Salpeter- und Phosphorsäuren getestet und das PCR-Ergebnis mit lediglich Paraformaldehyd-fixierten MCF7-Zellen verglichen. Wie aus der Abbildung 14 ersichtlich,

brachte keine dieser Säuren ein befriedigendes Ergebnis, so daß angenommen werden mußte, daß die Schädigung der DNA nicht alleine durch den sauren pH-Wert, sondern auch von Neufuchsin direkt hervorgerufen wurde. Neufuchsin konnte durch den Farbstoff BCIP/NBT ersetzt werden. Dieser wird im Vergleich zu Neufuchsin nach der Dephosphorylierung durch eine Redoxreaktion in einen blauen Farbstoffniederschlag umgesetzt und zeigte keine negative Auswirkung in der PCR (siehe Abbildung 15). Ein kleiner, tolerierbarer Nachteil von BCIP/NBT ist dessen dunkelblaue Farbe, welche die zellulären Strukturen bei starken Färbungen überdecken kann (Abbildung 16).



**Abbildung 14** Einfluß Neufuchsin-aktivierender Säuren auf das PCR-Ergebnis

Mit dem A45-APAAP-System wurde an MCF-7 Zellen eine Zytokeratinfärbung durchgeführt. Zur Entwicklung der Färbung wurde Neufuchsin mittels HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aktiviert und das Alu-PCR-Ergebnis im Vergleich zu lediglich mit Paraformaldehyd fixierten Zellen bewertet. Gezeigt ist die Kontroll-PCR mit den p53 exon2/3 Primern.



**Abbildung 15** BCIP/NBT

Umsetzung von BCIP/NBT durch die Alkalische-Phosphatase (Darstellung aus *Molecular Cloning, Third Edition, Volume 3, A9.40*).



**Abbildung 16 Zytokeratin-positive Zelle mit Mikromanipulations-Kapillare nach BCIP/NBT-Entwicklung**

*Auf dem Bild ist eine Zytokeratin positive Zelle zu erkennen, welche von ungefärbten Zellen des Knochenmarks umgeben ist. Die Isolierung erfolgt durch Einsaugen in eine Kapillare (links im Bild), die von einem Mikromanipulationsgerät gesteuert wird.*

### **Vergleich dreier Antikörpersysteme**

Nachdem neben der Einzelzell-PCR und der CGH-Analyse, auch geeignete Protokolle zur Probenaufbereitung, Lagerung und Färbung zur Verfügung standen, wurden insgesamt 371 Knochenmarkaspirate auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Dazu wurden die monoklonalen Antikörper A45-F<sub>ab</sub> bzw. A45-B/B3, die ein gemeinsames Epitop der Zytokeratine 8, 18 und 19 binden, sowie der monoklonale Antikörper CK2, spezifisch für Zytokeratin 18, gewählt. Der A45-F<sub>ab</sub>-Antikörper ist direkt mit dem Enzym Alkalische-Phosphatase konjugiert, während die Bindung des A45-B/B3- und CK2-Antikörpers über einen Brückenantikörper mit dem Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) System nachgewiesen wird. Bei der immunzytochemischen Untersuchung fanden sich in 99 Aspiraten Zytokeratin-positive Zellen (26,7%). Von 83 der 99 Zytokeratin-positiven Patienten (83,8%) konnten insgesamt 189 Einzelzellen isoliert, amplifiziert und mittels CGH charakterisiert werden. In 121 dieser Zellen zeigten sich CGH-Aberrationen (64,0%), während 68 Zytokeratin-positive Zellen ein balanciertes CGH-Profil hatten (36,0%). Anschließend wurde untersucht, ob sich die verschiedenen Antikörpersysteme in der Frequenz der Zytokeratin-positiven Aspirate und in dem Anteil der detektierten Zellen mit nachweisbaren CGH-Aberrationen unterscheiden. Zur Ermittlung der Nachweisrate mußte allerdings ein Teil der Patientinnen des Zentralklinikums Augsburg ausgeschlossen werden, da von dort anfänglich selektiv nur Proben mit Zytokeratin-positiven Zellen weitergeleitet worden waren, wodurch die Detektionsrate nach oben verfälscht worden wäre. Der Vergleich

der Nachweisrate ergab, daß die CK2-APAAP Färbung 36,9% positive Knochenmarkbefunde aufwies, die A45-APAAP Färbung 27,1% und der A45-F<sub>ab</sub>-Kit lediglich 15% positive Aspirate (siehe Tabelle III). Die CK2- und A45-APAAP Systeme sind daher in Bezug auf die Nachweisrate dem A45-F<sub>ab</sub>-Kit deutlich überlegen ( $p < 0,001$ ). Die Frequenz der Zytokeratin-positiven Zellen mit CGH-Aberrationen gegenüber den Zellen mit einem ausgeglichenem CGH-Pofil, war zwischen den drei Antikörpersystemen ebenfalls sehr unterschiedlich ( $p < 0,001$ ). Tabelle IV zeigt, daß hier allerdings der A45-F<sub>ab</sub>-Kit mit 80,5% die höchste Spezifität erreichte. Die Ergebnisse der A45-APAAP und CK2-APAAP Systeme lagen im selben Bereich von 50,0% und 53,1%.

**Tabelle III Zytokeratin positive Knochenmarkaspirate**

	Patienten	positive Aspirate	Isotyp +
A45 Kit	187	28 (15,0%)	0 (0%)
A45 APAAP	59	16 (27,1%)	4 (6,8%)
CK2 APAAP	92	34 (36,9%)	7 (7,6%)
Summe	338	78 (23,1%)	

}  $p < 0,001$  }  $p < 0,05$   
} nicht signifikant

**Tabelle IV Verteilung der CGH-normalen Zellen**

	normale Zellen	CGH+ Zellen
A45 Kit	15/77 (19,5%)	62/77 (80,5)
A45 APAAP	8/16 (50,0%)	8/16 (50,0%)
CK2 APAAP	45/96 (46,9%)	51/96 (53,1%)
Summe	68/189 (36,0)	121/189 (64,0)

}  $p < 0,001$  }  $p < 0,025$   
} nicht signifikant

Die Analyse der mit den verschiedenen Antikörpern gefärbten Patientinnenkollektive ergab, daß keine gleichmäßige Verteilung der metastasierten Patientinnen bestand. Die Nachweisrate ist jedoch vom analysierten Patientenkollektiv abhängig, weil der Median der Zytokeratin-positiven Zellen in den Knochenmarkaspiraten der M<sub>1</sub>-Patientinnen sieben betrug, im Gegensatz zu einer Zelle in den M<sub>0</sub>-Patientinnen (siehe Tabelle V). Die Wahrscheinlichkeit eines positiven Befundes war also in der ersten Gruppe höher. Da jedoch von den Patientinnen, deren Knochenmark keine Zytokeratin-positiven Zellen aufwies, der M-Status nicht bekannt war, konnte die Nachweisrate für die M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Patientinnen nicht getrennt aufgeschlüsselt werden. Betrachtete man allerdings alleine die CGH-analysierten Zellen, so ergab sich, daß die Rate der CGH-normalen Zellen im Stadium M<sub>1</sub> bei allen drei

Antikörpersystemen gleichbleibend niedrig war, nämlich zwischen 7,8% und 14,3% (siehe Tabelle VI). Im Stadium  $M_0$  waren die Unterschiede in der Frequenz der CGH-normalen Zellen etwas größer, ihr Anteil schwankte zwischen 77,8% (A45-APAAP) und 42,3% (A45- $F_{ab}$ -Kit). Bei dem Befund von 7 CGH-normalen Zellen gegenüber 2 CGH-veränderten Zellen (77,8%) im Falle des A45-APAAP Systems sollte die geringe Zahl der analysierten Zellen bedacht werden. Die Möglichkeit liegt nahe, daß es sich hier um das statistische Phänomen der kleinen Stichprobe handelt, zumal der  $\chi^2$ -Test für die Schwankung der Spezifitäten der Antikörper keine Signifikanz ergibt. Daher wird ein Mittelwert von 57% CGH-normaler Zellen bei  $M_0$ -Patientinnen und 8,5% bei  $M_1$ -Patientinnen angenommen. Zusammenfassend war das Ergebnis der oben dargestellten immunhistochemischen Färbungen, daß sich die drei verglichenen Antikörpersysteme (CK2-APAAP, A45-B/B3-APAAP und A45- $F_{ab}$ -Kit) kaum unterschieden, wenn das  $M_0$ - und  $M_1$ -Patientinnenkollektiv getrennt analysiert wurde, abgesehen von der etwas geringeren Nachweisrate des A45- $F_{ab}$ -Kit. Die  $M_0$ - und  $M_1$ -Patientinnenkollektive unterschieden sich untereinander allerdings erheblich, erstens durch eine höhere Frequenz der Zytokeratin-positiven Zellen, und zweitens durch einen höheren Prozentsatz dieser Zellen mit CGH-Veränderungen.

**Tabelle V** Anzahl der Zytokeratin-positiven Zellen in Abhängigkeit des Krankheitsstadiums

	Bereich	Durchschnitt	Median
$M_0$ -Patientinnen	1 - 20 Zellen	$2,5 \pm \sigma 3,2$	1
$M_1$ -Patientinnen	1 - ca. 1200 Zellen	$176 \pm \sigma 352$	7

}  $p < 0,0003$

**Tabelle VI** CGH-normale und CGH-veränderte Zellen der  $M_0$ - bzw.  $M_1$ -Patientinnen

$M_0$	normal	CGH+
A45 Kit	11/26 (42,3%)	15/26 (57,7%)
A45 APAAP	7/9 (77,8%)	2/9 (22,2%)
CK2 APAAP	43/72 (59,7%)	29/72 (40,3%)

} nicht signifikant }  $p < 0,001$   
}  $p < 0,02$   
}  $p < 0,0001$

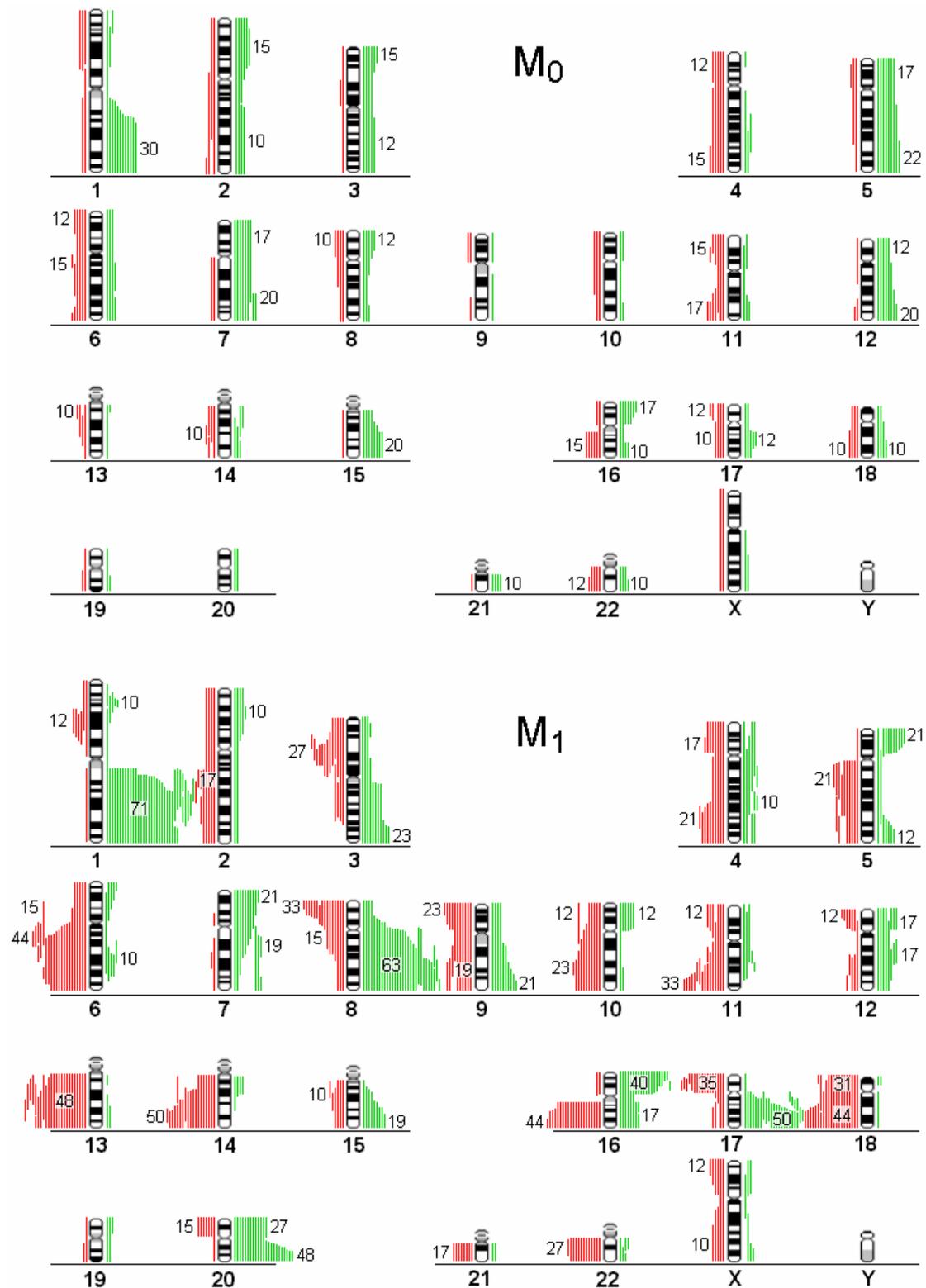
$M_1$	normal	CGH+
A45 Kit	4/51 (7,8%)	47/51 (92,2%)
A45 APAAP	1/7 (14,3%)	6/7 (85,7%)
CK2 APAAP	2/24 (8,3%)	22/24 (91,7%)

} nicht signifikant }



In Abbildung 18 sind die CGH-Veränderungen aller disseminierten Tumorzellen dargestellt, wobei eine Trennung zwischen den Zellen der Rezidiv-freien ( $M_0$ ) und der Patientinnen mit klinisch manifesten Metastasen ( $M_1$ ) erfolgte. Da bei diesem Vergleich primär die verschiedenen Aberrationsmuster interessierten, wurden jedoch diejenigen Zellen einer Patientin zusammengefaßt, die identische CGH-Profile zeigten, so daß ein Übergewicht der Zellen einiger weniger Patientinnen vermieden werden konnte. Aus Abbildung 18 geht ein deutlicher Unterschied zwischen den disseminierten Tumorzellen der betrachteten Patientinnenkollektive im Bezug auf die Anzahl der Aberrationen pro Zelle hervor ( $M_0$   $5,9 \pm \sigma 4,1$  im Vergleich zu  $M_1$   $12,8 \pm \sigma 5,4$ ;  $p < 0,001$ ). Dies ist die Konsequenz einer signifikant höheren Aberrationsfrequenz der  $M_1$ -disseminierten Tumorzellen an zwölf chromosomalen Loci: 1q, 8q, 17q, 20q Gewinn und 13q, 14q, 18q Verlust ( $p < 0,001$ ). Sie werden für das Genom der  $M_1$ -Zellen als typisch erachtet und traten in über 40% der analysierten Zellen auf. Im Vergleich dazu erwies sich die Amplifikation von 1q mit 30% als die häufigste Aberration der  $M_0$ -Zellen, gefolgt von den Gewinnen des Chromosoms 5q, 7q, 12q und 15q mit jeweils 20%. Die Amplifikationen von 3p, 5q und 18q traten bei den  $M_0$ -Zellen, in Relation zu den  $M_1$ -Zellen, etwas häufiger auf, erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Als Ergebnis zeigte sich, daß die metastatische Tumorerkrankung mit einem genomischen Aberrationsmuster der disseminierten Tumorzellen verbunden war, welches von dem entsprechenden der  $M_0$ -Patientinnen klar unterschieden werden konnte.

Damit stellte sich die Frage nach den wirksamen Mutationsmechanismen in den verglichenen disseminierten Zellpopulationen, worauf im nächsten Absatz kurz eingegangen wird. Daran anschließend folgt eine ausführliche bioinformatische Auswertung der CGH-Aberrationen, um klare Unterscheidungskriterien der  $M_0$ - und  $M_1$ -disseminierten Tumorzellen zu erarbeiten. Mit ihrer Hilfe soll später die an dieser Stelle fehlende Analyse nachgereicht werden, inwiefern die unterschiedlichen Aberrationsmuster zum Beispiel durch die Tumorgroße, den Lymphknotenstatus oder das Grading bedingt sind. Faktoren, die ebenfalls mit der metastatischen Tumorerkrankung korrelieren.

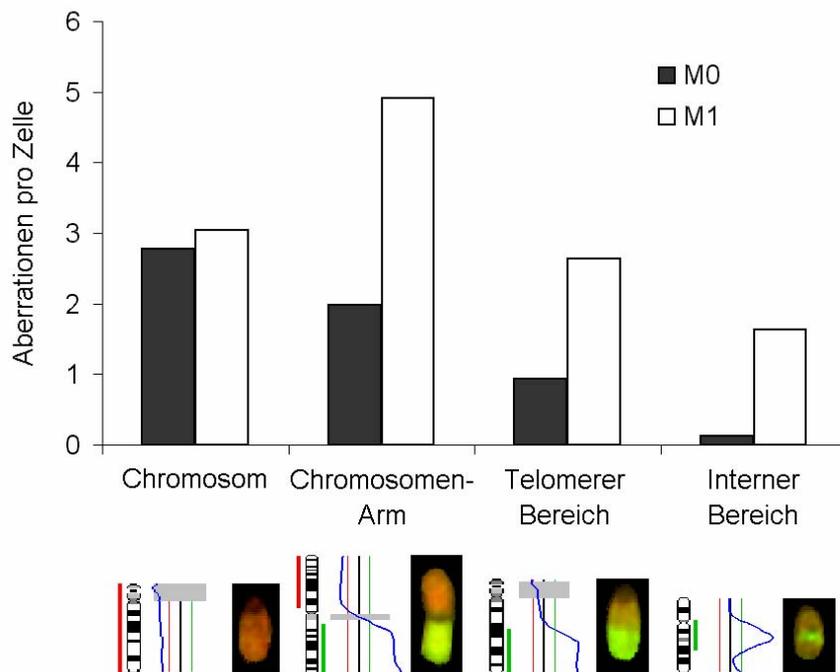


**Abbildung 18** CGH-Ergebnisse der M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-disseminierten Tumorzellen

Neben den Ideogrammen sind links die Deletionen jeder Zelle als rote Striche dargestellt, die Amplifikationen entsprechend rechts und grün. Die prozentualen Aberrationsfrequenzen sind neben den entsprechenden chromosomalen Loci angegeben, wobei Werte unter 10% vernachlässigt wurden. Das obere schematische Karyogramm bezieht sich auf die disseminierten Tumorzellen der M<sub>0</sub>-, das untere auf diejenigen der M<sub>1</sub>-Patientinnen. Zellen einer Patientin mit identischen CGH-Veränderungen wurden in einem Profil zusammengefasst.

### Unterschiede der genomischen Mutationsmechanismen

Der Vergleich der Häufigkeit eines Gewinns oder Verlustes des ganzen Chromosoms bzw. Chromosomenarms, eines telomeren Chromosomenfragmentes oder internen Bereiches kann unterschiedliche Mutationsmechanismen der disseminierten Tumorzellen im M<sub>0</sub>- oder M<sub>1</sub>-Stadium aufdecken. Wie aus Abbildung 19 hervorgeht, waren insbesondere die Chromosomenbrüche, die den Translokationen von genomischem Material zugrunde liegen, in den M<sub>1</sub>-Zellen signifikant häufiger ( $p < 0,0001$ ). Da die Chromosomenbrüche ab einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen aufgrund der Telomerverkürzung stark zunehmen (genomische Krise, (Romanov *et al.*, 2001)), kann daraus abgeleitet werden, daß die Mehrzahl der disseminierten Tumorzellen des M<sub>0</sub>-Stadiums diese Krise noch nicht erreicht hatten, sich also in einem relativ frühen Stadium der malignen Transformation befanden.



**Abbildung 19 Differenzierung chromosomaler Aberrationstypen**

Aberrationen, die auf Chromosomenbrüche zurückzuführen sind, wurden von Aneusomien unterschieden. Drei Arten der Bruchpunkte wurden differenziert: Brüche am Centromer, Brüche zwischen Centromer und Telomer, sowie multiple Brüche die begrenzte numerische Veränderungen innerhalb eines Chromosomenarms erzeugen. Oben ist die durchschnittliche Zahl der jeweiligen Aberrationen pro Zelle, getrennt nach M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Zellen, dargestellt. Unten sind Beispiele der unterschiedenen Aberrationen aufgeführt.

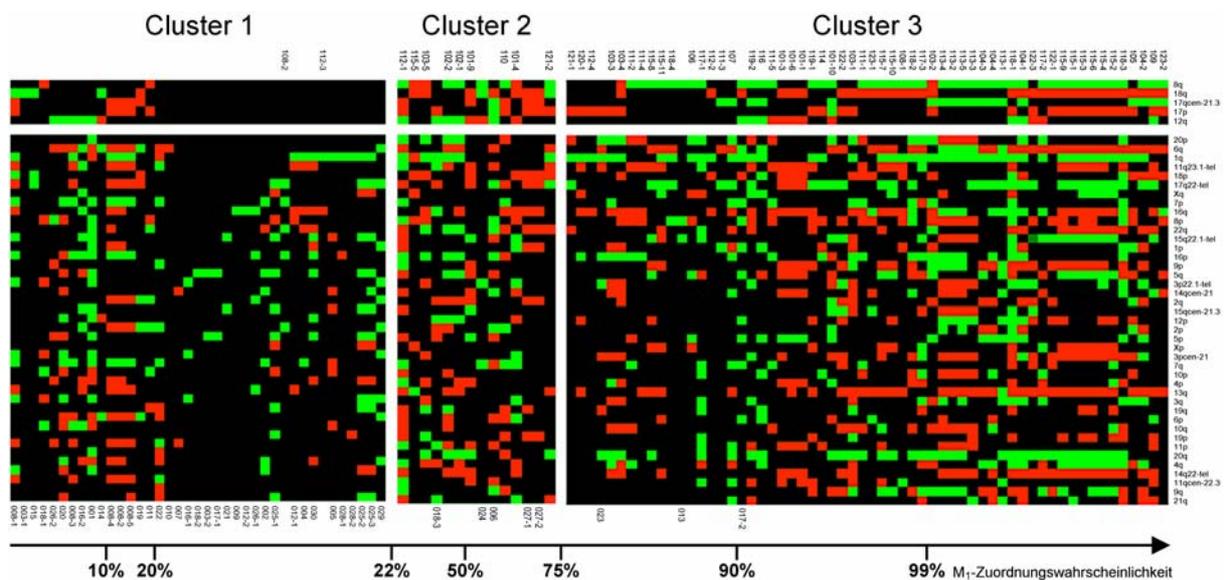
### 3.3.3 M<sub>0</sub>- / M<sub>1</sub>-Klassifizierung disseminierter Tumorzellen

Die genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen, wie sie in Abschnitt 3.3.2 erfolgt ist, sollte Aberrationen definieren, die für das M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Tumorstadium typisch sind. An der Existenz eines charakteristischen Aberrationsmusters der M<sub>0</sub>-Zellen kann nach Abbildung 18 gezweifelt werden, insbesondere wenn man sich die hohe Zahl der Zytokeratin-positiven Zellen ohne nachweisbare CGH-Aberrationen vergegenwärtigt. Offensichtlich waren typische genomische Veränderungen in den M<sub>1</sub>-Zellen. Im Folgenden wird es darum gehen, die unterschiedlich häufigen CGH-Aberrationen zu benutzen, um die disseminierten Tumorzellen den M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Patientinnen korrekt zuzuordnen.

Die einfachste Möglichkeit die disseminierten Tumorzellen in eine metastatische M<sub>1</sub>-Gruppe bzw. eine M<sub>0</sub>-Gruppe einzuteilen, ist durch die Unterschiede in den CGH-Aberrationsfrequenzen einzelner chromosomaler Loci gegeben. Zum Beispiel hatten 47 von 74 M<sub>1</sub>-Zellen eine 8q Amplifikation, während diese Aberration nur in 3 von 46 M<sub>0</sub>-Zellen auftrat. Allein dadurch konnten 62,7% der metastatischen Tumorzellen dem richtigen Stadium zugeordnet werden und nur 6,5% der M<sub>0</sub>-Zellen wurden „fälschlicherweise“ als M<sub>1</sub> klassifiziert. Es lag jedoch nahe, daß diese Klassifizierung verbessert werden könnte, wenn nicht nur die Frequenz einer einzelnen Aberration, sondern bestimmte Kombinationen von CGH-Veränderungen für die Klassifizierung berücksichtigt würden. Die Bioinformatik hat dafür mathematische Verfahren entwickelt, die entweder eine Gruppierung anhand der relativen Ähnlichkeit der Aberrationsmuster erreichen oder die Klassifizierung durch lernende neuronale Netzwerke erzeugt wird, die mit gewünschten Vorgaben trainiert werden können. Das erste, hierarchische Verfahren berücksichtigt keine anderen Kriterien außer dem Aberrationsmuster, es wird auch mit dem englischen Ausdruck „unsupervised clustering“ bezeichnet. Bei dem zweiten Verfahren kann der Experimentator die Aberrationsmuster mit einer zugehörigen Eigenschaft als positiv oder negativ belegen, zum Beispiel die Information anfügen, ob ein CGH-Profil einer Zelle einer M<sub>0</sub>- oder M<sub>1</sub>-Patientin entstammt. Dieses Verfahren ist daher in der englischsprachigen Literatur auch als „supervised clustering“ bekannt. Für das Ziel, eine Klassifizierung der disseminierten Tumorzellen in M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Zellen zu erreichen, ist die reine Ähnlichkeit der CGH-Profile nicht die entscheidende Information, weshalb für die Einteilung der Zellen „Bayesian learning“ Netzwerke (Ragg, 2001) verwendet wurden. Die bioinformatischen Berechnungen wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Ragg durchgeführt.

## Bayesian-learning Klassifizierung

Für jede disseminierte Tumorzelle wurde von dem „Bayesian learning“ Netzwerk anhand fünf informativer CGH-Aberrationen (8q Gewinn, 18q Verlust, 17qcen-21.3 Gewinn, 17p Verlust und 12q Verlust) eine Wahrscheinlichkeit errechnet, aus einer M<sub>1</sub>-Patientin isoliert worden zu sein (siehe Abschnitt 2.3.15 für die Beschreibung des bioinformatischen Verfahrens). Das „Bayesian learning“ Netzwerk erreichte anhand der ermittelten Wahrscheinlichkeitswerte eine deutliche Trennung der Zellen in Bezug auf den M-Status der zugehörigen Patientinnen, die sich in einem relativ steil ansteigenden Verhältnis von Sensitivität zu Spezifität ausdrückt (Abbildung 3, Abschnitt 2.3.15). Allerdings war eine Unsicherheit der Klassifizierung in dem Bereich von  $p > 0,22$  bis  $p < 0,75$  zu erkennen. Wurde dieser Umstand berücksichtigt, entstanden drei Gruppen: 39 disseminierte Tumorzellen mit M<sub>1</sub>-Zuordnungswahrscheinlichkeit kleiner 22%, 14 Zellen zwischen 22% und 75% und schließlich eine Gruppe von 60 Zellen, deren Wahrscheinlichkeit von einem M<sub>1</sub> Patienten zu stammen, größer als 75% ist (siehe Abbildung 20).



In dem Cluster 1 befanden sich zwei  $M_1$ -Zellen die keine der fünf informativen Aberrationen beinhalteten. Es existierten jedoch von den beiden betreffenden  $M_1$ -Patientinnen auch Zellen in Cluster 3. Drei Zellen von  $M_0$ -Patientinnen wurden dem Cluster 3 zugeordnet, davon besaß eine dieser Patientinnen auch eine Zelle im Cluster 1. Anhand der Abbildung 20 können die wichtigsten Entscheidungskriterien des neuronalen Netzwerks nachvollzogen werden. Die Zelle 123-2 erreichte eine 100%  $M_1$ -Zuordnungswahrscheinlichkeit, da sie vier der fünf informativen CGH-Aberrationen aufwies (8q & 17qcen-21.3 Amplifikation und 18q & 17p Deletion). Mit abnehmenden p-Werten trat eine geringere Anzahl informativer Aberrationen auf, wobei in Cluster 3 auch zu den fünf informativen Aberrationen gegenläufige Veränderungen toleriert wurden, wie zum Beispiel eine 8q-Deletion oder 17p-Amplifikation, wenn zumindest zwei der übrigen entscheidenden Aberrationen vorhanden waren (Zelle 101-10, 103-2 und 103-4). Es wurde auch deutlich, daß die 8q-Amplifikation eine hohe Wertigkeit bei der Berechnung der  $M_1$ -Zuordnungswahrscheinlichkeit einnahm. Doch war auch ein hoher p-Wert ohne diese CGH-Veränderung möglich, wenn an 17qcen-21.3 eine Amplifikation vorlag (Zelle 105  $p=0.9994$ ). In der Kombination mit 8q wurde entsprechend die 17qcen-21.3-Amplifikation höher bewertet als die 18q-Deletion. Die 12q-Deletion hatte nur einen geringen Einfluß auf die Klassifizierung der Zellen in das Cluster 3, da sowohl Gewinne als auch Verluste an diesem Locus auftraten, allerdings immer in Verbindung mit anderen Aberrationen. Diese war eher in der Hinsicht informativ, daß Zellen mit 12q-Amplifikation, ohne zusätzliche relevante CGH-Veränderungen, nicht als  $M_1$ -Zellen klassifiziert wurden. Das Cluster 2 bestand aus Zellen, die an einem oder zwei der fünf informativen Loci dem Muster gegenläufige Veränderungen besaßen, gleichzeitig aber eine entsprechende Zahl dem Schema konforme Aberrationen. Das betraf fünf  $M_0$ - und neun  $M_1$ -Zellen. Das Cluster 1 setzte sich schließlich aus den Zellen zusammen, die keine der informativen Aberrationen hatten oder 8q- und 17qcen-21.3-Deletionen bzw. 18q-Amplifikationen aufwiesen, die nicht von Cluster 3-typischen Aberrationen gepaart wurden und daher zu sehr niedrigen  $M_1$ -Zuordnungswahrscheinlichkeiten führten.

Die Leistungsfähigkeit der Klassifizierung kann durch den Vergleich mit der Gruppierung anhand der 8q-Amplifikation beurteilt werden, welcher zu Beginn dieses Abschnitts angestellt wurde. Setzte man den Schwellenwert dafür, daß eine  $M_1$ -Zelle korrekt gruppiert wurde bei  $p = 0,5$  an, so lag die Sensitivität der „Bayesian learning“ Berechnung bei ca. 90% und die Spezifität bei nahezu 85% (siehe Tabelle VII). Die Sensitivität wurde also um 20% Punkte gesteigert Dies allerdings auf Kosten der Spezifität, die um ca. 10% sank. Je nach Fragestellung, für eine prognostische Aussage wäre zum Beispiel eine möglichst hohe

Sensitivität von Bedeutung, kann durch Variation des Schwellenwertes die Klassifizierung zugunsten der Sensitivität oder Spezifität beeinflusst werden. Das Cluster 2 bestand sowohl aus  $M_0$ - als auch  $M_1$ -disseminierten Tumorzellen, welche das neuronale Netzwerk anhand ihrer CGH-Veränderungen nicht eindeutig den Metastase-freien bzw. den metastasierten Patientinnen zuordnen konnte (14 von 113 Zellen, also etwa 12%). Die Anpassung des Schwellenwertes an die untere bzw. obere Grenze des Cluster 2 erzielte entsprechend entweder eine höhere Sensitivität oder Spezifität. Damit konnte eine Sensitivität von annähernd 100% erreicht werden (Schwellenwert bei  $p = 0,22$ ) oder eine Spezifität von über 90% (Schwellenwert bei  $p = 0,75$ ) (siehe Tabelle VII).

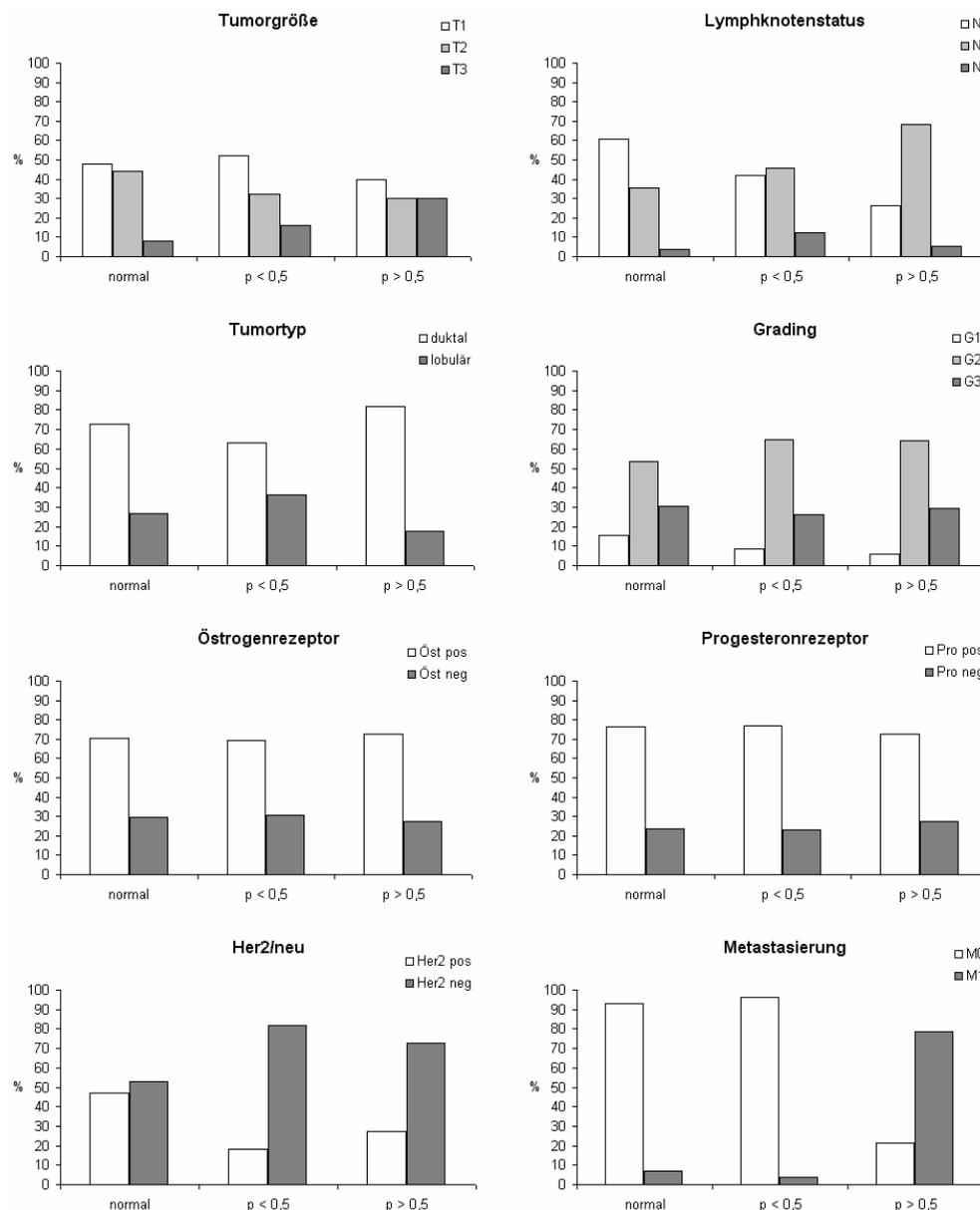
**Tabelle VII Vorhersagegenauigkeit des  $M_1$ -Status disseminierter Tumorzellen anhand fünf informativer CGH-Veränderungen im Vergleich zur 8q Amplifikation**

	8q Amplifikation	p-Wert 0,75	p-Wert 0,5	p-Wert 0,22
Sensitivität	62,7%	83,8%	89,7%	97,1%
Spezifität	93,5%	93,3%	84,4%	82,2%

### **Einfluß klinischer Routinevariablen auf die $M_0$ - / $M_1$ -Klassifikation**

Bisher wurde gezeigt, daß die CGH-Aberrationen eine Klassifizierung der disseminierten Tumorzellen in eine  $M_0$ - und eine  $M_1$ -Population mit einer hohen Sensitivität und Spezifität erlauben. Wie sich die prognostischen Marker der Tumorerkrankung, wie zum Beispiel die Anwesenheit von befallenen Lymphknoten, die Größe des Primärtumors, die Tumorphistologie (Grading), sowie der Tumortyp in den Patientinnen verteilen, wurde nicht berücksichtigt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß auch diesen Charakteristika der Tumorerkrankung bestimmte aberrante Genotypen zugrunde liegen, welche mit der bioinformatischen  $M_0$ - /  $M_1$ -Klassifizierung interferieren. Einige Studien zeigten auch signifikante Unterschiede des Transkriptom in Tumoren die positiv bzw. negativ in Bezug auf bestimmte prädiktive Marker, wie zum Beispiel des Östrogenrezeptors und des Progesteronrezeptors, waren bzw. eine Überexpression des Her2/neu Wachstumsfaktorrezeptors aufweisen (Martin *et al.*, 2000; Perou *et al.*, 2000; Gruvberger *et al.*, 2001; West *et al.*, 2001; van 't Veer *et al.*, 2002). Daher ist, neben dem Vergleich prognostischer Merkmale des Tumors, die Expression prädiktiver Markerproteine in den Patientinnen interessant. Um die Unabhängigkeit der  $M_0$ - und  $M_1$ -Klassifizierung von den prognostischen und prädiktiven Tumormarkern zu zeigen, wurde die Frequenz dieser Tumormarker in den folgenden drei Gruppen verglichen: Den Patientinnen mit ausschließlich

Zytokeratin-positiven aber CGH-normalen Zellen (normale Zellen), den Patientinnen, deren disseminierte Tumorzellen CGH-Aberrationen zeigten und die eine  $M_1$ -Zuordnungswahrscheinlichkeit von kleiner 50% haben ( $M_0$ -ähnliche Zellen), und den Patientinnen mit mindestens einer Zelle, für deren CGH-Profil eine  $M_1$ -Zuordnungswahrscheinlichkeit größer 50% errechnet wurde ( $M_1$ -ähnliche Zellen).



**Abbildung 21 Korrelation zwischen prognostischen und prädiktiven Tumormarkern und dem Genom disseminierter Tumorzellen**

Die Verteilung etablierter Primärtumoreigenschaften mit prognostischer oder prädiktiver Relevanz auf drei Patientinnengruppen: Patientinnen mit Zellen ohne CGH-Veränderungen, Patientinnen mit Zellen mit einer  $M_1$ -Zuordnungswahrscheinlichkeit  $p < 0,5$  und Patientinnen mit Zellen mit einer  $M_1$ -Zuordnungswahrscheinlichkeit  $p > 0,5$ . Der einzig signifikante Unterschied der verglichenen Patientinnengruppen ist die Anwesenheit von Metastasen ( $p < 0,001$ ).

Wie in Abbildung 21 dargestellt, ließen sich keine oder nur sehr geringe Unterschiede zwischen diesen drei Patientinnengruppen in Bezug auf den Tumortyp, den Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie die drei Gradingstufen erkennen. Die Überexpression des Wachstumsfaktors Her2/neu schien in den Patientinnen mit CGH-veränderten Zellen häufiger aufzutreten, erreichte jedoch im  $\chi^2$ -Test keine statistische Signifikanz. Dies galt ebenso für die Primärtumore und die befallenen Lymphknoten, deren Größe bzw. Anzahl mit dem Auftreten M<sub>1</sub>-ähnlicher Zellen nur leicht zunimmt. Die einzige statistisch signifikante Differenz zwischen den Patientinnen mit CGH-normalen und M<sub>0</sub>-ähnlichen Zellen auf der einen Seite, gegenüber denen als M<sub>1</sub> klassifizierten Zellen auf der anderen Seite, war der metastatische Status ( $p < 0,001$ ).

### **Vergleichende M<sub>0</sub>- / M<sub>1</sub>-Klassifikation von Prognosemarkern und CGH-Veränderungen**

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, daß die fünf informativen CGH-Aberrationen, die als Grundlage der Klassifizierung der disseminierten Tumorzellen dienen (8q Gewinn, 18q Verlust, 17qcen-21.3 Gewinn, 17p Verlust und 12q Verlust), mit keinem klinischen Tumormarker außer dem metastatischen Status korrelieren. Hier soll an 39 Patientinnen, deren vollständige klinische Daten vorlagen, verglichen werden, ob die Patientinnen besser anhand der informativen CGH-Aberrationen oder der prognostischen und prädiktiven Marker in eine M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Gruppe klassifiziert werden können. Um diesen Vergleich zu ermöglichen, wurde dieselbe bioinformatische Vorgehensweise mit den klinischen Tumormarkern dieser 39 Patientinnen durchgeführt, wie sie für die CGH-Aberrationen angewendet wurde (siehe Abschnitt 0). Der Lymphknotenstatus und die Größe des Primärtumors erwiesen sich als die aussagekräftigsten klinischen Marker. Die bioinformatische M<sub>0</sub>- / M<sub>1</sub>-Klassifizierung anhand dieser beiden Tumormarker wurde in der Tabelle VIII mit den fünf informativen CGH-Aberrationen der gleichen 39 Patientinnen verglichen. Die Sensitivität der Erkennung von M<sub>1</sub>-Patientinnen betrug im Falle der klinischen Routinevariablen nur 10%. Es ist also offensichtlich, daß in dem untersuchten Patientinnenkollektiv mit den klinischen Tumormarkern die Vorhersage des metastatischen Status kaum möglich war. Im Gegensatz dazu erreichte die Vorhersage des M-Status der Patientinnen mittels der fünf informativen CGH-Aberrationen eine Sensitivität von 70-80%. Da die statistische Auswertung nur mit den CGH-Daten einer einzigen Zelle pro Patientin durchgeführt wurde, war sie bei den Patientinnen mit mehreren Zellen einer gewissen Schwankung unterworfen, je nachdem ob eine für den jeweiligen M-Status der Patientin typische oder weniger charakteristische Zelle gewählt wurde. Die Spezifität, also die Vorhersage des M<sub>0</sub>-Status, liegt bei beiden Klassifizierungen im Bereich von 86-90%. Das

heißt, die höhere Sensitivität der Vorhersage des Patientinnenstatus mittels der CGH-Aberrationen war nicht durch die Zunahme der falsch positiven Patientinnen bedingt. Da sich mit zunehmender Datenmenge die Vorhersage verbessert, wurde die Klassifikation zusätzlich mit allen 53 Patientinnen mit CGH-veränderten disseminierten Tumorzellen durchgeführt (Tabelle VIII). Die Sensitivität der Vorhersage stieg unter diesen Voraussetzungen von 70-80% auf 78-95%, also noch einmal um etwa 10%.

**Tabelle VIII M<sub>0</sub>- / M<sub>1</sub>-Klassifizierung mit Prognosemarkern und CGH-Veränderungen**

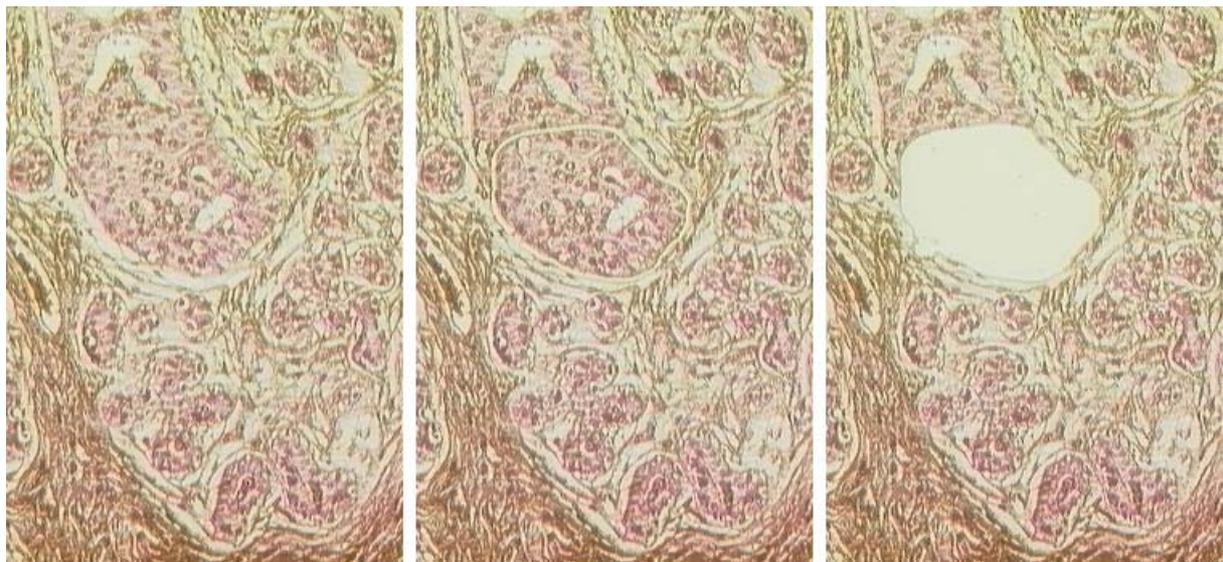
	Direkter Vergleich von 39 Patientinnen			Alle Patientinnen	
	Prognose- marker	Vorhersage anhand der disseminierten Tumorzellen		beste	schlechteste
		beste	schlechteste		
Sensitivität	10,0%	80,0%	70,0%	95,6%	78,3%
Spezifität	89,7%	86,2%	82,8%	83,3%	80,0%

### 3.4 Vergleich der genomischen Veränderungen von disseminierten Tumorzellen und Primärtumor

#### 3.4.1 CGH von disseminierten Tumorzellen und Primärtumor

Einen anderen Aspekt der deskriptiven genomischen Untersuchung stellt die Analyse der verwandtschaftlichen oder klonalen Beziehungen zwischen den disseminierten Tumorzellen und dem Primärtumor dar. Wenn an der grundlegenden Hypothese festgehalten wird, daß die disseminierten Tumorzellen ein Zwischenglied der Krebserkrankung auf dem Wege vom Primärtumor zur Metastase sind, kann sich aus dieser verwandtschaftlichen Beziehung ein Einblick in den Metastasierungsprozess ergeben. Interessant ist dabei einerseits der relative Zeitpunkt der systemischen Ausbreitung von Tumorzellen. Zum anderen, ob die deutlichen Unterschiede der CGH-Aberrationen zwischen den disseminierten Tumorzellen der M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Patientinnen durch ebensolche Unterschiede in den Primärtumoren bedingt sind oder auf eine unabhängige ektope Entwicklung der disseminierten Tumorzellen zurück geführt werden müssen. Von 25 Patientinnen (14 M<sub>0</sub> und 11 M<sub>1</sub>) mit CGH-veränderten disseminierten Tumorzellen und 3 M<sub>0</sub>-Patientinnen mit CGH-normalen Zytokeratin-positiven Zellen wurde der Primärtumor mittels CGH analysiert. Zur Amplifikation der durch Mikrodisektion gewonnenen Tumor-DNA (Abbildung 22) diente die Adapter-Linker-PCR-Technik. In allen Primärtumoren konnten CGH-Veränderungen detektiert werden, die in Abbildung 23 dargestellt sind. Wie aus dem Vergleich mit den publizierten CGH-Daten des invasiven

Mammakarzinoms hervorgeht (Kallioniemi *et al.*, 1994a; Nishizaki *et al.*, 1997a; Hermsen *et al.*, 1998; Tirkkonen *et al.*, 1998; Buerger *et al.*, 1999b; Roylance *et al.*, 1999; Waldman *et al.*, 2000; Buerger *et al.*, 2001), lagen die Aberrationsfrequenzen, mit der Ausnahme von 8p und 16p, innerhalb der beschriebenen Größenordnung (siehe Tabelle IX). Das untersuchte Kollektiv an Primärtumoren kann daher als repräsentativ angesehen werden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, wenn aus den erhobenen Daten allgemeine Schlüsse gezogen werden sollen.

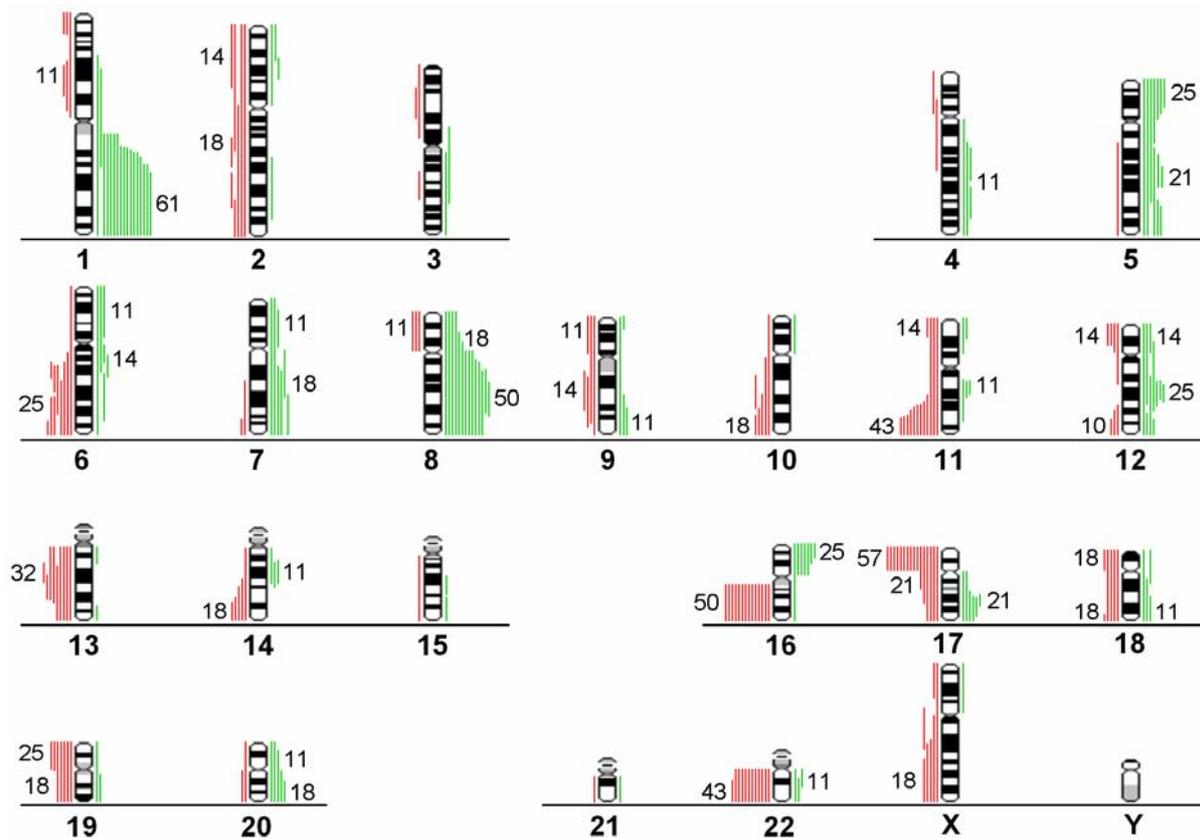


**Abbildung 22 Laser-mikrodissektion**

*Tumorgewebe eines sich auf einer Polyethylenmembran befindlichen, Hämatoxylin & Eosin gefärbten Primärtumorschnittes (duktales Mammakarzinom) wurde mittels eines fokussierten Laserstrahls ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß transferiert. Links: Schnitt vor der Mikrodissektion. Mitte: nach dem Ausschneiden des Tumoreals. Rechts: das Tumorgewebe wurde selektiv herauskatapultiert.*

**Tabelle IX Vergleich der CGH-Veränderungen der untersuchten Primärtumore mit den publizierten Daten zum Mammakarzinom (verwendete Literatur siehe Text)**

	Gewinne in %			Verluste in %	
	PT	publiziert		PT	publiziert
1q	61	57-83	8p	11	26-52
8q	50	30-90	13q	32	25-45
16p	25	38-40	16q	50	26-71
17q	21	18-67	17p	57	22-61
20q	18	18-39			



**Abbildung 23** CGH-Ergebnisse der untersuchten Primärtumore

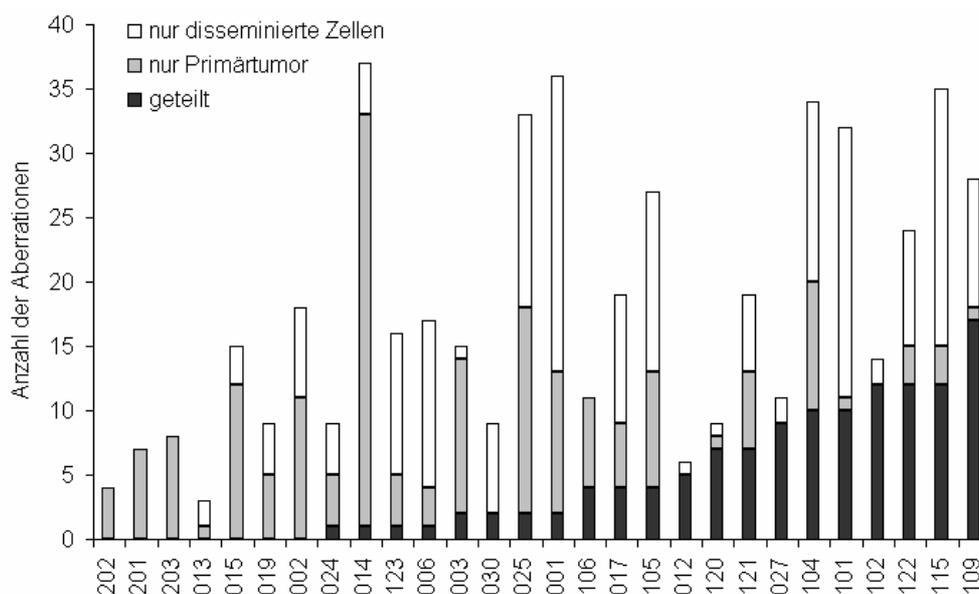
Die Häufigkeit und Ausdehnung der CGH-Veränderungen der 28 Primärtumore sind im Histogramm dargestellt. Rote Striche links der Chromosomen symbolisieren Deletionen, grüne Striche auf der rechten Seite stehen für Gewinne. Die prozentualen Aberrationsfrequenzen sind neben den entsprechenden chromosomalen Loci angegeben, wobei Werte unter 10% vernachlässigt wurden.

### Bayesian-learning Klassifizierung der Primärtumore

Im Folgenden soll geklärt werden, ob die Primärtumore der  $M_0$ - und  $M_1$ -Patientinnen differentielle Aberrationsmuster aufweisen, welche ursächlich für die Unterschiede der disseminierten Tumorzellen sein könnten. Da mit dem „Bayesian-learning“ Netzwerk in Abschnitt 3.3.3 die informativsten Differenzen bereits identifiziert wurden, war es naheliegend, die Primärtumore zusammen mit den CGH-veränderten disseminierten Tumorzellen der selben Patientinnen der gleichen bioinformatischen  $M_0$ - /  $M_1$ -Klassifikation zu unterwerfen. Die Hälfte der 14  $M_0$ - und 11  $M_1$ -Primärtumore wurden dem Cluster 3 zugeordnet (siehe Abbildung 24). Während die verbliebenen  $M_0$ -Primärtumore überwiegend dem Cluster 1 zugerechnet wurden, verteilten sich die restlichen  $M_1$ -Tumoren zwischen Cluster 1 und 2 annähernd gleich. Dieser Unterschied der Verteilung war im  $\chi^2$ -Test statistisch nicht signifikant. Da vergleichende Klassifikationen durch neuronalen Netzwerke mit der gleichen Zahl an Datensätzen durchgeführt werden müssen, wurde immer nur eine



disseminierten Tumorzellen und dem Primärtumor nahezu identische genomische Veränderungen. Die Heterogenität der verbleibenden 12 M<sub>0</sub>-Patientinnen betraf dagegen über 90% der detektierten CGH-Aberrationen und über 60% im Falle der M<sub>1</sub>-Patientinnen. Daraus geht hervor, daß bei den meisten M<sub>0</sub>-Patientinnen keine engere klonale Verwandtschaft der systemisch verbreiteten Tumorzellen mit ihrem autologen Primärtumor besteht. Die Verhältnisse der M<sub>1</sub>-Patientinnen waren allerdings nicht in gleicher Weise eindeutig, da die trennenden von den gemeinsamen CGH-Aberrationen zahlenmäßig aufgewogen wurden.



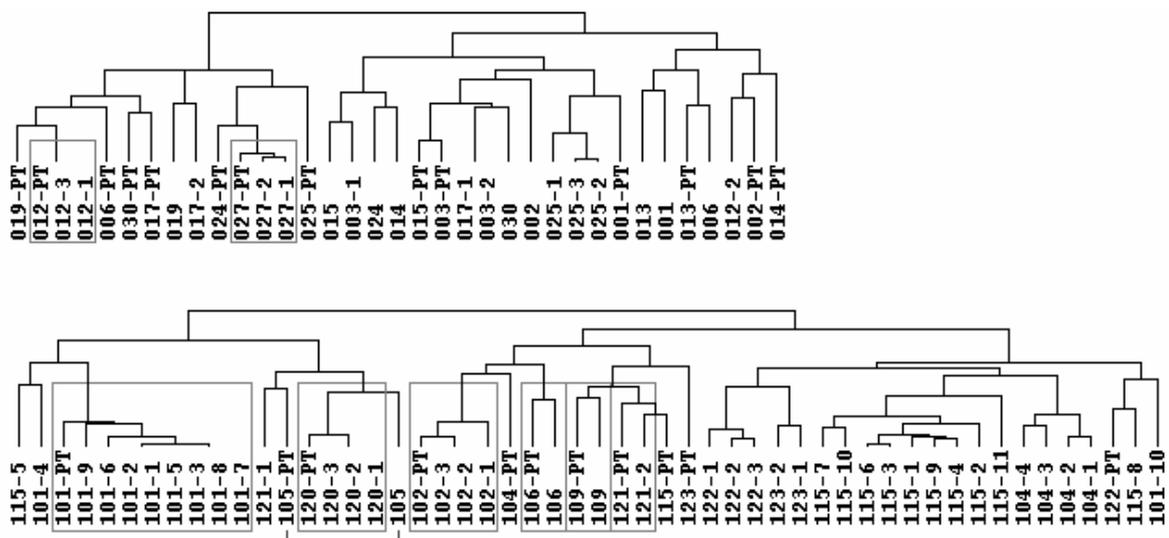
**Abbildung 25 Häufigkeit geteilter und nicht-geteilter CGH-Veränderungen von Primärtumor und disseminierten Tumorzellen**

*Angegeben ist die absolute Zahl der detektierten CGH-Veränderungen. CGH-Veränderungen, welche sowohl im Primärtumor als auch in den zugehörigen disseminierten Tumorzellen der Patientinnen auftraten, wurden als geteilte Aberrationen gewertet. Alle nicht-geteilten Veränderungen, die jeweils nur in dem Primärtumor oder den disseminierten Tumorzellen nachgewiesen wurden, sind als trennende Aberrationen ebenfalls dargestellt.*

### Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse

Die Ergebnisse der Auszählung von geteilten bzw. divergenten CGH-Aberrationen wurde durch die hierarchische Gruppierung nach Ähnlichkeit der CGH-Profile bestätigt (Abbildung 26). Die beiden M<sub>0</sub>-Patientinnen #012 und #027, deren Primärtumore und disseminierte Tumorzellen wenig trennende Aberrationen zeigten, waren auch hier gemeinsam gruppiert. Dies stand im Gegensatz zu zwölf M<sub>0</sub>-Patientinnen, zwischen deren Tumorentitäten keine Verwandtschaft errechnet wurde. Die Primärtumore und die disseminierten Tumorzellen der metastatischen Patientinnen wurden ebenfalls unter Einbeziehung aller detektierten CGH-

Aberrationen hierarchisch nach Ähnlichkeit gruppiert (siehe Abbildung 26). Es ergab sich bei sechs  $M_0$ -Patientinnen (#101, #102, #106, #109, #120 und #121) eine Ähnlichkeit, die durch eine Gruppierung in einem Bäumchen des dritten oder höheren Grades im Dendrogramm zum Ausdruck kam. Bei einer Patientin wurde eine etwas entferntere Beziehung innerhalb eines Bäumchens zweiten Grades angezeigt (#105). Daraus geht hervor, daß in sieben der elf untersuchten  $M_1$ -Tumore eine Verwandtschaft der disseminierten Tumorzellen und des Primärtumors bestand.



**Abbildung 26 Hierarchische Ähnlichkeit von disseminierten Tumorzellen und Primärtumor**

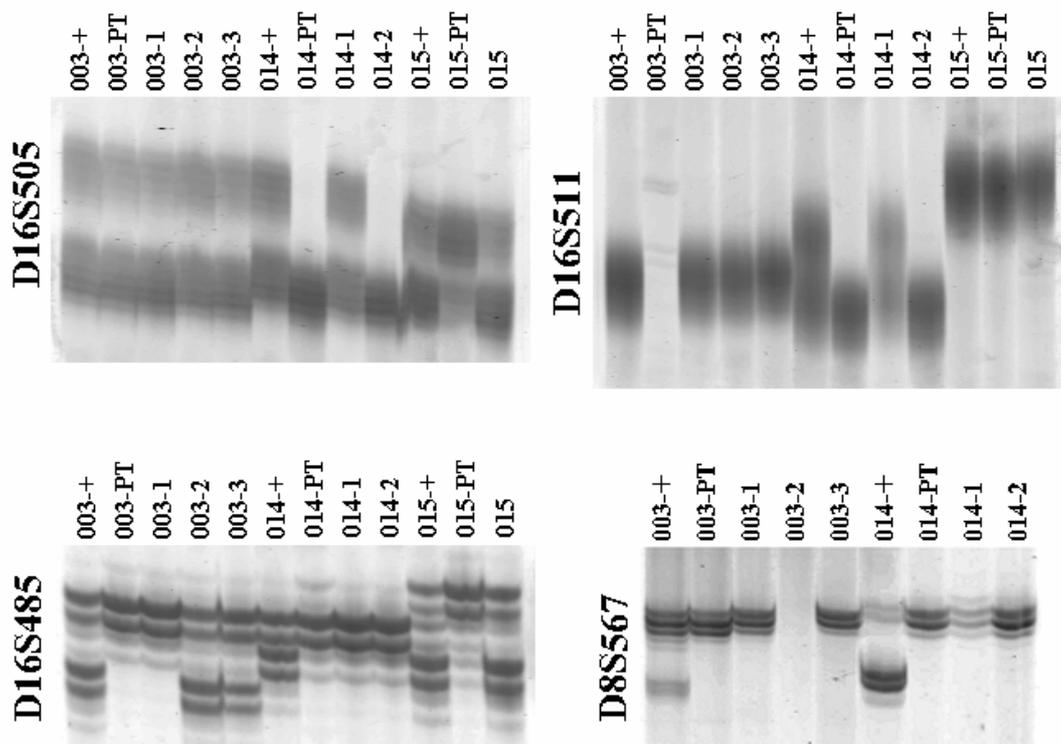
Das obere Dendrogramm zeigt die disseminierten Tumorzellen und Primärtumore von 14  $M_0$ -Patientinnen, das untere Dendrogramm die entsprechenden Tumorentitäten von 11  $M_1$ -Patientinnen. Mit den grauen Boxen sind Patientinnen markiert, die gemeinsame CGH-Aberrationen in dem Primärtumor und den disseminierten Tumorzellen aufweisen. Die Klammer kennzeichnet eine entferntere Ähnlichkeit bei Patientin #105.

### 3.4.2 Subchromosomale Deletionen in disseminierten Tumorzellen und den Primärtumoren

In der Mehrzahl der  $M_0$ -Patientinnen konnte durch die CGH-Analyse keine klonale Beziehung zwischen dem Primärtumor und den disseminierten Tumorzellen festgestellt werden. Es wurde daher versucht die klonale Verwandtschaft der in Frage stehenden Tumorentitäten, durch den gemeinsamen Verlust polymorpher DNA-Marker in Nachbarschaft des *E-cadherin* (CDH1) und *RB1CC1* Gens, deren somatische Mutation in über 20% der Mammakarzinome beschrieben wurde (Lindblom *et al.*, 1993; Chano *et al.*, 2002), nachzuweisen. Insbesondere die Mutation des *E-Cadherins* gilt als ein relativ frühes Ereignis

in der Genese des Mammakarzinoms, so daß die Möglichkeit eines gemeinsamen Verlustes auch bei einer entfernten klonalen Verwandtschaft gegeben ist (Shen *et al.*, 2000).

Es wurden fünf von sieben M<sub>0</sub>-Patientinnen, deren Normalgewebeprobe vorlag und in denen weder der Primärtumor noch die disseminierten Tumorzellen an 16q22.1 eine Deletion in der CGH zeigten, mit vier polymorphen Markern auf den heterozygoten Verlust von *E-cadherin* untersucht. In zwei Patientinnen (#003 & #014) konnte ein Verlust detektiert werden (siehe Abbildung 27 und Tabelle X). Im Bereich des *RBICC1* auf 8q11.2, konnten sieben der insgesamt 14 zur Verfügung stehenden M<sub>0</sub>-Patientinnen an zwei polymorphen Markern auf den Verlust von *RBICC1* getestet werden. Während hier ebenfalls bei Patientin #003 & #014 eine Heterozygotie festgestellt wurde (Abbildung 27 und Tabelle X), zeigten fünf Patientinnen an den entsprechenden Markern keinen Polymorphismus. Die Qualität der PCR-Produkte der verbleibenden Patientinnen erwies sich für diese allelspezifische Untersuchung als nicht ausreichend, da entweder von der Primärtumorprobe oder den Einzelzell-PCR-Produkten die Marker nicht zu amplifizieren waren.



**Abbildung 27** LOH-Analyse im Bereich der Gene *E-Cadherin* und *RBICC1*

Die PCR-Produkte der drei *E-Cadherin* Marker D16S505, D16S511 und D16S485, sowie der *RBICC1* Marker D8S567 wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die als Referenz dienende Normalgewebeprobe der Patientinnen ist mit einem „+“ gekennzeichnet, die Primärtumore und disseminierten Tumorzellen sind mit den durchgängig verwendeten Schlüsselzeichen versehen.

Zusammenfassend ergab sich bei den beiden Patientinnen #003 und #014, wie aus Abbildung 27 hervorgeht, an zwei bzw. vier polymorphen Markern die gemeinsame Deletion eines Allels in den disseminierten Tumorzellen sowie dem Primärtumor. Damit ist eine klonale Verwandtschaft in diesen Patientinnen, die anhand der CGH-Aberrationen nicht zu erkennen war, sehr wahrscheinlich. Insbesondere in der Zelle 014-2 konnten mit der begrenzten Auflösung der CGH keine genomischen Veränderungen detektiert werden.

**Tabelle X Ergebnisse der LOH-Analyse mit sechs DNA-Markern**

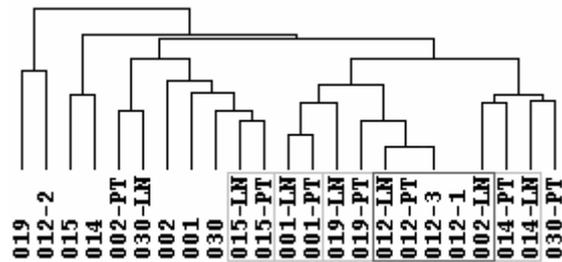
Chromosomale Position (kbp)	Marker	003-PT	003-1	003-2	003-3	014-PT	014-1	014-2
55000-74300	CDH8/CDH11/CDH5/CDH16/CDH3/CDH1/CDH13							
60648	D16S3095	LOH	+	+	+	+	+	+
62627	D16S485	LOH	LOH	+	+	LOH	LOH	LOH
72516	D16S505	+	+	+	+	LOH	+	LOH
72543	D16S511	ni	ni	ni	ni	LOH	+	LOH
52820-52910	RB1CC1							
52475	D8S567	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH	LOH
ca. 53600	D8S591	+	+	+	+	ni	ni	ni

*LOH kennzeichnet einen Allelverlust im Primärtumor bzw. in den disseminierten Tumorzellen. Das „+“-Zeichen steht für den Nachweis beider polymorpher Allele, während „ni“ nicht informative DNA-Marker benennt.*

### 3.4.3 Unterschiede lymphogen und hämatogen disseminierter Tumorzellen

Nachdem in den vorausgehenden beiden Abschnitten vor allem in den M<sub>0</sub>-Patientinnen eine nur entfernte klonale Beziehung zwischen dem Primärtumor und den disseminierten Tumorzellen festgestellt wurde, sollte abschließend untersucht werden, ob bei der lymphogenen Tumorstreuung eine engere klonale Verwandtschaft besteht. Dazu wurden aus sieben M<sub>0</sub>-Patientinnen mit regionaler Lymphknotenmetastasierung jeweils ein vom Tumor befallener Lymphknoten mikrodisektiert und die Tumor-DNA mittels Adapter-Linker-PCR amplifiziert. Die CGH-Profile des Lymphknoten-Metastase, der entsprechenden Primärtumore und der dazugehörigen disseminierten Tumorzellen wurden wiederum mittels einer hierarchischen Gruppierung auf Ähnlichkeit analysiert. Wie das Dendrogramm in Abbildung 28 zeigt, waren die befallenen Lymphknoten und Primärtumore der Patientinnen #001, #014, #015 und #019 untereinander ähnlicher, verglichen mit den entsprechenden disseminierten Tumorzellen. In Patientin #012 war eine Verwandtschaft über alle

Tumorproben vorhanden, im Gegensatz zu den Patientinnen #002 und #030, deren Tumorentitäten wenig gemeinsame CGH-Aberrationen besaßen. Daraus geht hervor, daß in der Mehrzahl der untersuchten Patientinnen die lokalen Metastasen eine gegenüber der hämatogenen Tumorstreuung unabhängige Metastasierung darstellten.



**Abbildung 28 Genomische Ähnlichkeit von loko-regionären Lymphknotenmetastasen, Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen**

Von sieben  $M_0$ -Patientinnen wurden, zusätzlich zu den disseminierten Tumorzellen und dem Primärtumor, Tumor-befallene Lymphknoten mit der CGH analysiert. Die Patientinnen mit genomisch sehr ähnlichen Primärtumor- und Lymphknotenproben sind durch eine graue Box hervorgehoben. Die schwarze Box kennzeichnet eine Patientin, deren disseminierte Tumorzellen sowohl mit dem Primärtumor als auch mit der Lymphknotenmetastase nahe verwandt sind. Die Lymphknotenproben sind mit -LN bezeichnet.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einzelzell-PCR und CGH

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation war die genomische Untersuchung einzelner disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark von Brustkrebs Patientinnen mit Hilfe der CGH. Diese beruht auf dem Vergleich normalisierter Fluoreszenzintensitäten zwischen einer Tumor-DNA-Probe und einer normalen, euploiden Referenz-DNA (Kallioniemi *et al.*, 1992; du Manoir *et al.*, 1993; Joos *et al.*, 1993; Kallioniemi *et al.*, 1994b). Die technische Voraussetzung zur Herstellung dieser Tumor-DNA-Probe ist die globale Amplifikation der genomischen DNA einer einzelnen Tumorzelle. Die PCR mit degenerierten Oligonukleotiden (DOP-PCR; (Telenius *et al.*, 1992)) war die einzige Technik, welche zu Beginn dieser Arbeit die Amplifikation geringer DNA-Mengen erlaubte (Speicher *et al.*, 1993; Speicher *et al.*, 1995; Kuukasjarvi *et al.*, 1997b). Allerdings waren 50 pg genomische DNA, äquivalent zu zwei polyploiden Tumorzellen, erforderlich, um erfolgreiche CGH-Hybridisierungen durchzuführen. Die reproduzierbare Amplifikation einzelner euploider Zellen zum Zwecke der CGH gelang jedoch nur bedingt (Kuukasjarvi *et al.*, 1997b). Dieses Problem mußte bewältigt werden, um die genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen zu ermöglichen. Von weiteren Optimierungsversuchen der DOP-PCR wurde abgesehen, da offensichtlich die stochastische Bindungswahrscheinlichkeit der degenerierten Oligonukleotide diese Methode bei geringen Templatemengen technisch limitiert.

Eine differentielle globale Amplifikationstechnik ist die Adapter-Linker-PCR (Kinzler & Vogelstein, 1989; Ludecke *et al.*, 1989; Saunders *et al.*, 1989; Johnson, 1990; Chang *et al.*, 1992). Sie wurde vor allem für die Herstellung Chromosomen-spezifischer DNA-Repräsentationen (Kao & Yu, 1991; Boei *et al.*, 1994) und im Zuge der Subtraktions-Hybridisierung („Representational Difference Analysis“ oder RDA) (Lisitsyn & Wigler, 1993; Diatchenko *et al.*, 1996) entwickelt. Ausgehend von diesem PCR-Prinzip gelang es, durch die sequentielle Abfolge der enzymatischen Schritte in einem einzigen Reaktionsgefäß unter Verwendung eines universellen Puffersystems, Amplifikate von einzelnen Zellen zu erzeugen, die den qualitativen Anforderungen der CGH genügten. Eine homogene und effiziente Amplifikation wird von einigen technischen Besonderheiten der Adapter-Linker-PCR begünstigt: Erstens ermöglicht die Ligation eines Adapters an die entstandenen Restriktionsschnittstellen die Verwendung eines universellen Primers. Damit ist im Gegensatz

zu degenerierten Primern ausgeschlossen, daß die Amplifikationseffizienz bestimmter Fragmente aufgrund unterschiedlicher Annealing-Temperaturen variiert. Zweitens wird die PCR-Effizienz durch ein häufig schneidendes Restriktionsenzym und demzufolge kleinen zu amplifizierenden Fragmenten, gesteigert. Da die Effizienz der Amplifikation auch von der Fragmentgröße abhängt, ist die homogene Verteilung der Restriktionsschnittstellen ein entscheidender Faktor für die gleichmäßige Repräsentation des Genoms. Von der Vielzahl potentiell geeigneter Restriktionsenzyme erwies sich Mse I als besonders günstig, weil seine Schnittstelle 5'-TTAA-3' im Genom durchschnittlich alle 256 bp vorkommt und das Enzym eine sehr hohe Aktivität besitzt.

Mit der Kombination von Adapter-Linker-PCR und CGH konnten Trisomien in einzelnen Zellen verlässlich nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11). Die Homogenität und Komplexität der erzeugten genomischen Repräsentation erlaubte darüber hinaus auch die Darstellung von subchromosomalen Deletionen und Gewinnen. Ausgewählte CGH-Aberrationen konnten am Beispiel einer MCF-7 Zelllinie durch FISH verifizieren werden (siehe Tabelle II und Abbildung 12). Die Adapter-Linker-Einzelzell-PCR ermöglichte es damit erstmals, die sehr sensitiven und spezifischen immunzytochemischen Nachweisverfahren für disseminierte Tumorzellen mit molekular-biologischen Untersuchungen zu kombinieren. Für diese Ergänzung von Nachweis und genomischer Analyse einzelner Tumorzellen im Knochenmark ist es jedoch von Bedeutung, daß die Qualität der DNA nicht durch den Kontakt mit reaktiven Chemikalien leidet. Mit der Einführung von BCIP/NBT als Substrat der Alkalischen-Phosphatase konnte ein schonender Nachweis der Antikörperreaktion etabliert werden, der keine negativen Auswirkungen auf die PCR-Amplifikation und CGH zeigte (siehe Abbildung 10). Durch die Optimierung der Verfahren wurde außerdem erreicht, daß Zellsuspensionen auf Objektträgern reversibel immobilisiert, fixiert und archiviert werden konnten. Der praktische Umgang mit Knochenmarkaspiraten vereinfachte sich dadurch in einem Maße, daß die Probenaufbereitung zum Teil auch in klinische Routinelaboratorien ausgelagert werden konnte.

Die Hapten-Markierung der primären PCR-Produkte, die zum Nachweis der Hybridisierung auf den Metaphasechromosomen notwendig ist, erwies sich als kritisch. Es wurden in einigen CGH-Experimenten artifizielle Amplifikationen beobachtet, die an Chromosom 4q, 5q, 6q und 12q stereotyp auftraten. Sie deckten sich zum Teil mit DAPI-Banden, welche kennzeichnend für AT-reiche Regionen sind. In diesen Regionen überwiegen wahrscheinlich aufgrund der Mse I-Schnittstelle (TTAA) kleinere Fragmente, deren Markierungsdichte mit Digoxigenin- oder Biotin-dUTP gleichzeitig relativ hoch ist. Es ist also denkbar, daß die

geringfügig größere Molmasse von Digoxigenin-dUTP gegenüber Biotin-dUTP (1106,7 g/mol bzw. 971.5 g/mol) oder die unterschiedlichen chemischen Strukturen die Markierung in diesen genomischen Regionen beeinflussen können. Dieses Problem löste sich durch die Umkehrung des Hapteneinbaus: Einzelzell-PCR-Produkte wurden im Folgenden mit Digoxigenin-dUTP und die Referenz-DNA mit Biotin-dUTP markiert (siehe Abbildung 13). Mit dem überarbeiteten Protokoll wurden nach Wiederholung der Hybridisierungen keine artifiziellen Aberrationen mehr beobachtet (siehe Abbildung 13). Der störende Einfluß des Biotin-dUTP wirkte sich bei der Amplifikation der Referenz-DNA von fünf bis zehn Zellen offenbar nicht aus.

Eine andere Quelle artifizieller CGH-Veränderungen sind generell der Telomerbereich von Chromosom 1p und der kurze Arm von Chromosom 19 (Kallioniemi *et al.*, 1994b). Diese Regionen stellten sich insbesondere schlecht dar, wenn das Adapter-Linker-PCR-Produkt mit einer durch Nicktranslation markierten Referenz-DNA hybridisiert wurde (siehe Abbildung 9). Im Gegensatz dazu konnte eine Adapter-Linker-PCR generierte Referenz-DNA das Hybridisierungsergebnis verbessern. Trotzdem war in einigen Hybridisierungen das CGH-Profil im Bereich von 19p nicht eindeutig zu interpretieren, in diesen Fällen wurde angenommen, daß keine Aberration vorliegt.

Mittlerweile ist es auch unter Verwendung der DOP-PCR gelungen, einzelne Zellen im Rahmen der Pränataldiagnostik zu amplifizieren und mittels CGH zu analysieren (Voullaire *et al.*, 1999). Es muß jedoch bemerkt werden, daß diese CGH-Profile lokale Inhomogenitäten zeigen, die darauf hindeuten, daß Schwankungen in der Repräsentation des Genoms auftreten. Die ohnehin begrenzte Auflösung der CGH von etwa 10 Mb wurde infolge dessen noch weiter reduziert, so daß nur Trisomien ganzer Chromosomen sicher detektiert werden konnten. Diese Einschränkung ist für die genomische Untersuchung von Tumorzellen jedoch nicht tolerierbar, da hier, im Gegensatz zur Pränataldiagnostik (Wilton *et al.*, 2001), häufig auch subchromosomale Deletionen und Amplifikationen auftreten (Teixeira *et al.*, 2002). Dies unterstreicht die Bedeutung einer homogenen Amplifikation des Genoms einzelner Zellen und die Leistungsfähigkeit der Adapter-Linker-PCR.

## 4.2 Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Für den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark stehen eine Vielzahl von Antikörpern zur Verfügung, deren Gemeinsamkeit die Erkennung epithelialer Marker ist. In klinischen Studien, die eine prognostische Relevanz der disseminierten Tumorzellen belegen,

wurden vor allem Immunglobuline gegen das epitheliale Membranantigen (EMA, ein Mitglied der humanen Milchfett-Globuline) (Cote *et al.*, 1991; Harbeck *et al.*, 1994; Mansi *et al.*, 1999; Gebauer *et al.*, 2001), der monoklonale Antikörper A45-B/B3 gegen ein gemeinsames Epitop der Zytokeratine 8, 18 und 19 (Braun *et al.*, 2000; Thorban *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2001a; Janni *et al.*, 2001; Weckermann *et al.*, 2001) sowie der monoklonale CK2-Antikörper mit einer Spezifität gegen das Zytokeratin 18 (Weckermann *et al.*, 2001; Heiss *et al.*, 2002; Osaki *et al.*, 2002) verwendet. Seltener eingesetzt wurde der Antikörper BM-2 (auch 2E11, Erkennung des epithelialen Mucin TAG-12) (Diel *et al.*, 1996). Die EMA und BM-2 Antikörper haben jedoch im Vergleich zu A45-B/B3 und CK2 eine geringere Spezifität, da auch Zellen hämatopoetischen Ursprungs in 27% bis 43% der Knochenmarkaspirate diese Marker exprimieren (Pantel *et al.*, 1994). Daher ist eine zusätzliche zyto-morphologische Begutachtung der EMA und BM-2 Färbung notwendig, die jedoch subjektiven Schwankungen unterworfen ist.

Zum Zweck der genomischen Charakterisierung disseminierter Tumorzellen wurden daher die A45-B/B3 und CK2-Antikörper gewählt, deren Bindung mit dem Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-System (APAAP) nachgewiesen wird. Zusätzlich wurde ein Direktkonjugat der Alkalischen-Phosphatase mit einem A45-F<sub>ab</sub>-Fragment eingesetzt, das als Kit-System kommerziell erhältlich ist. Das A45-Kit-System macht die Verwendung der Brücken-Antikörper des APAAP-Systems überflüssig, was, neben der einfacheren Handhabung, die Spezifität der Färbung erhöhen soll. Insgesamt konnten in 99 von 371 Mammakarzinom-Patientinnen Zytokeratin-positive Zellen nachgewiesen werden (26,7%). Schlüsselt man die Positivitätsrate nach den verwendeten Antikörpersystemen auf, zeigte sich zwischen den mit APAAP prozessierten Antikörpern CK2 und A45-B/B3 kein signifikanter Unterschied (36,9% bzw. 27,1%). Jedoch erreichten beide signifikant höhere Werte als das A45-F<sub>ab</sub> Kit-System ( $p < 0,001$ ). Dieses detektierte lediglich in 15,0% der Aspireate Zytokeratin-positive Zellen (siehe Tabelle III). Der Anteil der positiven Isotypkontrollen (MOPC 21) betrug mit dem APAAP-Nachweissystem maximal 7,6%, was im Einklang mit früheren Studien steht (Schlimok *et al.*, 1987; Pantel *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 2000). Der Kontrollantikörper des Epimet-Kits (Anti-FITC) zeigte dagegen nie eine positive Färbung. Dies verdeutlicht, daß sich mit dem A45-F<sub>ab</sub>-Fragment zwar falsch positive Färbungen vermeiden ließen, jedoch, unabhängig vom Epitop, das APAAP-Nachweissystems eine deutlich höhere Sensitivität erreichte. Die Positivitätsrate des CK2-Antikörpers (36,9%) bewegte sich im Bereich veröffentlichter Daten des Mammakarzinoms (33%) (Pantel *et al.*, 1994). Dagegen lag die Frequenz der A45-B/B3-APAAP positiven Zellen mit 27,1%

unterhalb der vergleichbaren Studien (38-41%, (Braun *et al.*, 2000; Janni *et al.*, 2001)). Eine Arbeit, welche die Positivitätsrate der A45-B/B3- und CK2-Antikörper im Knochenmark von Mammakarzinom Patientinnen ebenfalls direkt verglich, beschreibt, daß der A45-B/B3 Antikörper eine deutlich höhere Positivitätsrate gegenüber CK2 besitzt (Steigerung von 45%) (Pantel *et al.*, 1994). Es wurde daher auf eine verminderte Expression des von dem CK2-Antikörper detektierten Zytokeratin 18-Moleküls geschlossen. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden.

### **4.3 Modell der Brustkrebs Metastasierung**

Die im folgenden diskutierten genomischen Daten der 189 Zytokeratin-positiven Zellen aus Knochenmarksaspiraten von 386 Mammakarzinom Patientinnen sprechen für eine frühe Disseminierung von Tumorzellen und einer vom Primärtumor frühzeitig unabhängigen Progression zu klinisch manifesten Metastasen:

#### **Zytokeratin-positive Zellen ohne CGH-Veränderungen**

Die CGH-Analyse zeigte, daß in den M<sub>0</sub>-Patientinnen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Prozentsatz CGH-veränderter Zellen, die mit dem A45-Kit (58%) und dem CK2-APAAP System (40%) gefärbt wurden, bestand (siehe Tabelle VI). Mit dem A45-APAAP System konnten nur 16 Zytokeratin-positive Zellen detektiert werden, wobei sich aus der Frequenz der detektierten Zellen mit CGH-Aberrationen keine signifikante Abweichung gegenüber dem A45-Kit und CK2-APAAP ergab. Ein sehr auffälliges Ergebnis der Analyse war, daß in etwa der Hälfte der Zytokeratin-positiven Zellen von M<sub>0</sub>-Patientinnen keine CGH-Veränderungen zu detektieren waren. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den M<sub>1</sub>-Patientinnen in 91% der Zellen CGH-Aberrationen (A45-Kit,  $p = 0,001$ ; A45-APAAP,  $p = 0,02$ ; CK2-APAAP,  $p = 0,0001$ ; siehe auch Tabelle VI). Der Anteil der CGH-normalen Zellen lag bei den M<sub>0</sub>-Patientinnen mit 40% bis 60% erheblich oberhalb des Bereichs der Isotypkontrolle, unspezifische Färbungen sollten jedoch beide M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Patientinnenkollektive gleichermaßen betreffen. Dieses Ergebnis legt nahe, daß die Zytokeratin-positiven Zellen häufig chromosomale Aberrationen, Punktmutationen oder epigenetische Veränderungen aufweisen, welche mit der CGH, die eine Auflösung von nur 10 Mb besitzt, nicht zu detektieren sind. An dem Beispiel einer M<sub>0</sub>-Patientin mit zwei disseminierten Tumorzellen konnte durch LOH-Analyse gezeigt werden, daß eine Zytokeratin-positive Zelle mit einem ausgeglichenen CGH-Profil von dem Primärtumor abstammte, da sie in allen vier polymorphen DNA-Markern der E-cadherin und RB1CC1

Gene das gleiche Allel wie der Primärtumor verloren hatte (siehe Tabelle X). Dies unterstützt die Hypothese, daß zumindest einige der CGH-normalen, Zytokeratin-positiven Zellen tatsächlich Tumorzellen sind.

### **Aberrationsmuster disseminierter Tumorzellen und genomische Krise**

Das erste Ergebnis der genomischen Charakterisierung Zytokeratin-positiver Zellen aus dem Knochenmark des Mammakarzinoms war der signifikante Unterschied der Anzahl der CGH-Aberrationen zwischen den disseminierten Tumorzellen der M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Patientinnen (M<sub>0</sub>-Zellen  $5,9 \pm \sigma 4,1$ ; M<sub>1</sub>-Zellen  $12,8 \pm \sigma 5,4$ ;  $p < 0,001$ ). Im Vergleich zu den M<sub>0</sub>-Zellen traten zweitens in den disseminierten M<sub>1</sub>-Tumorzellen sechs CGH-Aberrationen signifikant häufiger auf: 8q sowie 13q, 14q, 17q, 18q und 20q ( $p < 0,05$ ; Bonferroni korrigiert). Auffällig ist, daß die Frequenz der Gewinne und Verluste ganzer Chromosomen zwischen den disseminierten Tumorzellen der M<sub>0</sub>- und M<sub>1</sub>-Patientinnen konstant blieb. Die Verdopplung der CGH-Aberrationen bei den Zellen der M<sub>1</sub>-Patientinnen ist allein durch die Zunahme der Veränderungen auf Chromosomenarmen bzw. Teilen bedingt, sowie durch Amplifikationen und Deletionen scharf umgrenzter Regionen, die nur wenige chromosomale Banden umfassen (siehe Abbildung 19). Dieser Umstand weist darauf hin, daß besonders in den M<sub>1</sub>-disseminierten Tumorzellen Aberrationsmechanismen aktiv sind, die mit der Telomerfunktion in Verbindung gebracht werden können. Die Telomere, deren Länge durch die Telomerase aufrechterhalten wird, sind für die Wahrung der genomischen Integrität von zentraler Bedeutung. Da die Telomerase im Wesentlichen nur in der Keimbahn aktiv ist (Kim *et al.*, 1994), kommt es im Zuge der somatischen Zellteilung zur Telomerverkürzung, welche letztlich eine Veränderung der Telomerstruktur zur Folge hat und die sogenannte Seneszenz der Zellen auslöst (Hayflick, 1968; de Lange, 2002; Karlseder *et al.*, 2002). Humane epitheliale Zellen können die Seneszenz, im Gegensatz zu Fibroblasten, relativ rasch durch die Inaktivierung von p16, p19 oder p53 überwinden (Huschtscha *et al.*, 1998; Lundberg *et al.*, 2000; Romanov *et al.*, 2001). Die weitere Telomerverkürzung mündet schließlich, wahrscheinlich über eine DNA-Ligase IV vermittelte End-zu-End Ligation, in eine hohe Frequenz von dicentrischen Chromosomen, die in der anschließenden Segregation zu chromosomalen Brüchen führen (van Steensel *et al.*, 1998; DePinho, 2000; de Lange, 2002). Dieses Stadium, das als genomische Krise bezeichnet wird, kann erst durch die Reaktivierung der Telomerase und der daraus resultierenden Restabilisierung des Genoms verlassen werden. Ein Vorgang, der bei den meisten Karzinomen beobachtet wird (Counter *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1994). Die in den M<sub>1</sub>-disseminierten Tumorzellen beobachtete relativ hohe Zahl an Chromosomenbrüchen legt den Schluß nahe, daß die genomische Krise von diesen Zellen

bereits durchlaufen wurde. Dagegen schien in den  $M_0$ -disseminierten Tumorzellen die mit der genomischen Krise verbundene Selektion eines immortalen Zellklons (Maser & DePinho, 2002) noch nicht vollendet, da sie viel weniger chromosomale Umlagerungen mit Beteiligung der Telomere aufwiesen. Es muß also davon ausgegangen werden, daß Zellen den Primärtumor verlassen können entweder bevor dieser durch Proliferation stark expandiert und die genomische Krise durchläuft, oder nach der klonalen Expansion des Primärtumors ausschließlich eine Subpopulation zur Disseminierung befähigt ist, die nur wenige genomische Aberrationen aufweist.

### **Verwandtschaft disseminierter Tumorzellen zum Primärtumor und den Lymphknotenmetastasen**

Die genomische Charakterisierung der Primärtumore von 25 der Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen ergab keinen Anhaltspunkt dafür, daß man die signifikante Differenz zwischen der Anzahl der CGH-Veränderungen bei den  $M_0$ - und  $M_1$ -disseminierten Tumorzellen allein auf entsprechende Unterschiede der Primärtumore dieser Patientinnenkollektive zurückzuführen kann (Durchschnitt der CGH-Aberrationen der  $M_0$ -Primärtumore  $10,4 \pm \sigma 7,98$ ;  $M_1$ -Primärtumore  $15,5 \pm \sigma 6,4$ ;  $p = 0,098$ ). Die bioinformatische Analyse zeigte vielmehr, daß etwa die Hälfte der Primärtumore, unabhängig von dem metastatischen Status der Patientinnen, den  $M_1$ -disseminierten Tumorzellen ähneln (siehe Abbildung 24). Zwischen dem Primärtumor und den disseminierten Tumorzellen von 14  $M_0$ -Patientinnen bestand nur in zwei Fällen eine klonale Beziehungen (siehe Abbildung 26). Die durchschnittliche Zahl der Aberrationen unterschied sich dagegen nicht signifikant zwischen den  $M_0$ -disseminierte Tumorzellen ( $8,48 \pm \sigma 6,43$ ) und den  $M_0$ -Primärtumoren ( $10,4 \pm \sigma 7,98$ ) ( $p = 0,45$ ). In den  $M_0$ -Patientinnen war also zu beobachten, daß der dominante Zellklon des Primärtumors und die disseminierten Tumorzellen des gleichen  $M_0$ -Patientinnenkollektivs, ab dem Zeitpunkt der Disseminierung, unterschiedliche Aberrationen akkumulierten. In der Gruppe der  $M_1$ -Patientinnen waren die Übereinstimmungen von disseminierten Tumorzellen und dem Primärtumor stärker ausgeprägt: In sieben von 11 Patientinnen bestand eine erkennbare Ähnlichkeit. Ein ebenso interessantes Resultat war, daß in den verbleibenden vier  $M_1$ -Patientinnen nur wenige Gemeinsamkeiten zwischen Primärtumor und disseminierten Tumorzellen bestanden (siehe Abbildung 25). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß eine vom Primärtumor unabhängige systemische Evolution der disseminierten Tumorzellen zur etablierten Metastase möglich ist. Die systemische Tumorerkrankung der untersuchten  $M_1$ -Patientinnen trat fast ausschließlich synchron mit dem Primärtumor auf. Es kann vermutet werden, daß eine noch geringere Verwandtschaft zwischen dem Primärtumor und den

systemisch gestreuten Tumorzellen in den Patientinnen mit einer metachron entwickelten Metastase vorliegt. Aus der Untersuchung lokaler Lymphknotenmetastasen in sieben M<sub>0</sub>-Patientinnen ging hervor, daß in der Mehrzahl der Patientinnen nicht derselbe Tumorzellklon der die lokalen Lymphknoten befallen hat, auch in das Knochenmark streute: In vier der sieben Fälle war die lokale Tumorstreuung den entsprechenden Primärtumoren ähnlicher als den disseminierten Tumorzellen. In zwei Patientinnen zeigten sich divergente Aberrationen in allen untersuchten Tumorentitäten. Nur in einem Fall lag eine nahezu vollständige Übereinstimmung der CGH-Veränderungen in dem befallenen Lymphknoten, dem Primärtumor und den disseminierten Tumorzellen vor.

### **Disseminierte Tumorzellen repräsentieren die systemische Tumorerkrankung**

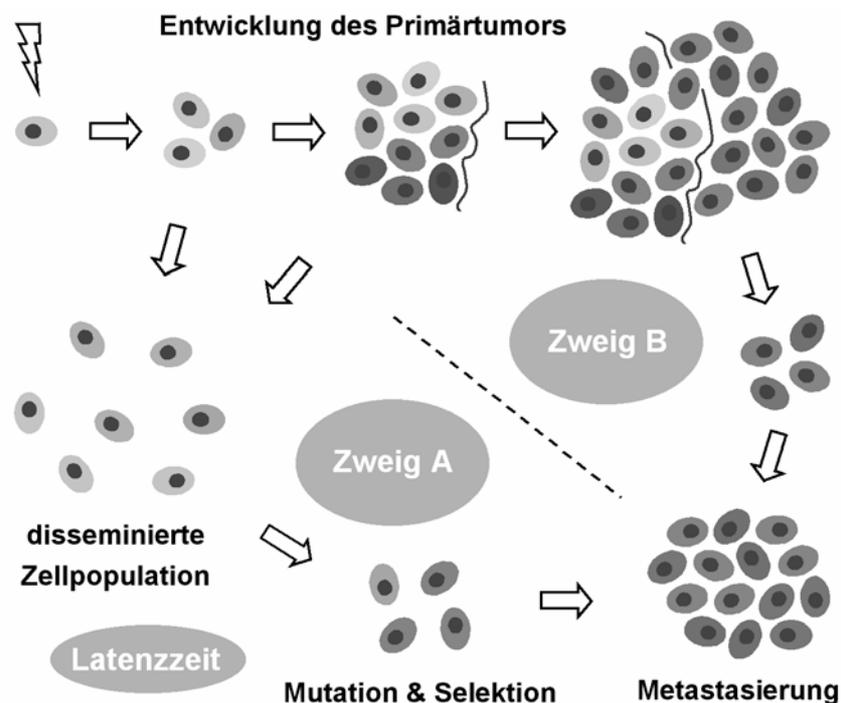
Die Validität der Aussagen die auf der Grundlage der hier erhobenen CGH-Daten abgeleitet werden können, hängt in einem großen Maße davon ab, ob es gelungen ist, die für den metastatischen Krankheitsverlauf relevanten disseminierten Tumorzellen zu analysieren. Da Nachuntersuchungen für eine retrospektive Analyse des Rezidiv-freien Überlebens der Patientinnen bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit noch nicht zur Verfügung standen, wurde versucht, den Zustand der aktuellen systemischen Erkrankung anhand der CGH-Veränderungen disseminierter Tumorzellen vorherzusagen. Mit bioinformatischen Berechnungen konnten fünf informative CGH-Aberrationen identifiziert werden (Amplifikation von 8q, 17qcen-21.3 und 12q; Deletion von 18q und 17p), welche das Metastasierungsstadium in 78-96% der M<sub>1</sub>-Patientinnen mit über 80%er Sicherheit korrekt anzeigten (siehe Abbildung 20 und Tabelle VIII). Die Schwankung der Sensitivität erklärt sich durch die Anwesenheit mehrerer disseminierter Tumorzellen. In Abhängigkeit, ob für die Berechnung eine Tumorzelle herangezogen wurde, deren CGH-Aberrationen für das entsprechende Erkrankungsstadium der Patientin kennzeichnend oder weniger charakteristisch waren, errechnete sich ein unterschiedlicher p-Wert. Ist die Erfassung möglichst aller metastatischer Patientinnen anhand der CGH-Aberrationen disseminierter Tumorzellen erwünscht, also die zuverlässige Vorhersage einer Metastase, muß die Unsicherheit der bioinformatischen Klassifizierung in dem Bereich zwischen  $p = 0.22$  und  $p = 0,75$  berücksichtigt werden (Cluster 2 in Abbildung 20). Auf Grundlage des mit  $p = 0,22$  festgelegten Schwellenwertes, reflektierten 111 der 121 CGH-veränderten disseminierten Tumorzellen die systemische Erkrankung der zugehörigen Patientinnen (92%). Wurde für alle Patientinnen, deren CGH-veränderte disseminierte Tumorzellen eine M<sub>1</sub>-Zuordnungswahrscheinlichkeit von  $p = 0.22$  überschritten, das Vorliegen einer Metastase angenommen, stieg die korrekte Vorhersage der M<sub>1</sub>-Zugehörigkeit auf 91-100%, während die Spezifität mit

77-83% auf einem hohen Niveau blieb. Nur in zwei von 23 M<sub>1</sub>-Patientinnen wurde jeweils eine disseminierte Tumorzelle isoliert, die zu einer falschen Klassifizierung führte. In beiden dieser M<sub>1</sub>-Patientinnen wurden jedoch auch disseminierte Tumorzellen detektiert, deren berechnete M<sub>1</sub>-Wahrscheinlichkeit über  $p = 0,22$  lag. Umgekehrt wurden acht von 46 CGH-veränderten M<sub>0</sub>-Zellen der metastatischen Gruppe zugeordnet, so daß fünf bis sieben von 30 M<sub>0</sub>-Patientinnen als M<sub>1</sub> klassifiziert wurden (17-23%). Da nur sieben der 68 Zytokeratin-positiven Zellen ohne CGH-Veränderungen aus M<sub>1</sub>-Patientinnen isoliert wurden, kann in diesem Fall mit 90% Sicherheit der M<sub>0</sub>-Status der betreffenden Patientinnen geschlußfolgert werden. Im Vergleich zur genomischen Analyse disseminierter Tumorzellen konnte mit den für die Prognose besten klinischen Routinevariablen (Tumorgröße und Nodalstatus) bei gleicher bioinformatischer Auswertung, nur in 10% der M<sub>1</sub>-Patientinnen eine korrekte Aussage über das Vorliegen einer Metastase getroffen werden.

### **Metastasierungsmodell**

Die wenigen bzw. fehlenden CGH-Veränderungen der disseminierten Tumorzellen, die im Kontrast zu den zahlreichen bei Metastasen beschriebenen Aberrationen stehen (Kuukasjarvi *et al.*, 1997a; Nishizaki *et al.*, 1997b), können nicht in das von Vogelstein entworfene Modell der linearen Tumorprogression integriert werden (Vogelstein *et al.*, 1988). In Abbildung 29 ist daher ein Modell skizziert, das anhand der gewonnenen Daten aufgestellt wurde: Tumorzellen disseminieren zu einem frühen Zeitpunkt vom Primärtumor und entwickeln sich in der Folge unabhängig zu einem metastatischen Tumorzellklon. Im direkten Vergleich des Primärtumors mit den disseminierten Tumorzellen der M<sub>0</sub>-Patientinnen zeigte sich ein signifikantes Überwiegen der 1q Amplifikation bzw. 17p Deletion (1q  $p = 0,04$ ; 17p  $p = 0,03$ ). Anscheinend werden in dem dominanten Klon des Primärtumors Eigenschaften selektiert, die sich ungünstig auf die Disseminierung auswirken. Nach der chirurgischen Resektion des Primärtumors, wird die Möglichkeit der fortwährenden Tumorzellstreuung unterbunden. In den Patientinnen verbleiben die disseminierten Tumorzellen und in einigen Fällen auch Teile des vom Tumor befallenen Lymphknotensystems. Die Gegenüberstellung von Lymphknotenmetastasen und disseminierten Tumorzellen zeigte wiederum, daß auch hier in den M<sub>0</sub>-Patientinnen in der Regel keine engere klonale Verwandtschaft besteht (siehe Abbildung 28). Wie aus der Analyse der Chromosomenbrüche hervorging, zeigte das Genom der M<sub>1</sub>-disseminierten Tumorzellen Anzeichen einer überwundenen genomischen Krise, während dieses Stadium in der Mehrzahl der M<sub>0</sub>-Zellen noch nicht vollständig durchlaufen wurde. Diese Ergebnisse führen zu der These, daß Tumorzellen früh disseminieren und sich anschließend parallel und unabhängig von dem Primärtumor zu Fernmetastasen entwickeln

können (Zweig A in Abbildung 29). Andererseits wiesen zwei der 14 M<sub>0</sub>-Patientinnen, deren Primärtumor und disseminierte Tumorzellen analysiert wurden, fast ausschließlich die gleichen CGH-Veränderungen auf, so daß der derselbe Tumorzellklon sowohl lokal proliferieren, als sich auch systemisch ausbreiten kann (siehe Abbildung 26 und Zweig B in Abbildung 29). Anhand des M<sub>1</sub>-Patientinnenkollektivs, ließen sich die aufgestellten Hypothesen verifizieren. In vier der elf Patientinnen stellten die disseminierten Tumorzellen auch in diesem Erkrankungsstadium einen vom Primärtumor separaten Tumorzellklon dar (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 29 Modell der Metastasierung**

Die Primärtumorentwicklung ist im oberen Teil des Schemas dargestellt. Die zunehmende Zahl an genomischen Aberrationen im Laufe der Tumorprogression ist durch den Übergang von helleren zu dunkleren Grautönen der Zellen angedeutet. Der Zweig A versucht den Befund von relativ früh disseminierten Tumorzellen zu berücksichtigen, die kaum geteilte Aberrationen mit dem Primärtumor aufweisen. Nach der chirurgischen Entfernung des Primärtumors verbleiben diese Tumorzellen in der Patientin, so daß aus diesem Tumorzellreservoir während einer Latenzzeit unabhängig vom Primärtumor ein maligner Zellklon selektiert werden kann, der letztlich die Metastasierung initiiert. In Zweig B, das dem linearen Modell entspricht (Kinzler & Vogelstein, 1996), disseminiert der dominante Tumorzellklon direkt und proliferiert weiter zur Metastase. Letzteres Szenario wird in den Patientinnen angenommen, deren Primärtumor und disseminierten Tumorzellen viele geteilte CGH-Veränderungen besitzen.

Die signifikante Zunahme an CGH-Aberrationen pro Zelle sowie die erhöhte Frequenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark der Patientinnen im Übergang vom Stadium M<sub>0</sub> zu M<sub>1</sub>, könnte damit erklärt werden, daß etablierte Metastasen ebenfalls Tumorzellen streuen.

Wie aus Tabelle IV und Abbildung 20 hervorgeht, wurden jedoch in einigen M<sub>1</sub>-Patientinnen in Kombination zu den charakteristischen M<sub>1</sub>-Tumorzellen Zytokeratin-positive Zellen ohne CGH-Aberrationen detektiert bzw. disseminierte Tumorzellen, welche aufgrund ihrer geringen Anzahl an CGH-Veränderungen der M<sub>0</sub>-Zellpopulation glichen. Die früh disseminierten Tumorzellen des Primärtumors sind daher persistent und werden von den gestreuten Zellen der Metastase – die ein entsprechend metastatisches CGH-Aberrationsmuster besitzen – lediglich überlagert.

### **Beitrag des Modells zum Verständnis der Metastasierung**

Die notwendigen Eigenschaften von Tumorzellen, welche eine unkontrollierte Proliferation bis zur Entstehung eines Primärtumors erlauben, sind klar definiert: Der Erwerb eines konstitutiven mitotischen Signals, die Unempfindlichkeit gegenüber inhibitorischen Signalen, die Ausschaltung der natürlichen Apoptose und die Fähigkeit durch Angiogeneese den Zugang zu Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten (Hanahan & Weinberg, 2000). Dagegen wird kontrovers diskutiert, ob Mutationen die einen Primärtumor zur Metastasierung befähigen selektiert werden können (Bernards & Weinberg, 2002; Edwards, 2002; Sherley, 2002). Es wurde postuliert, daß die Fähigkeit zur Metastasierung nicht spät in der Tumorprogression festgelegt wird, wie von Kinzler & Vogelstein, 1996 ursprünglich vorgeschlagen, sondern es sich um eine pleiotrope Genfunktion bekannter Onkogene handelt, die auch die Proliferation der Tumorzellen begünstigen und dadurch selektierbar sind (Bernards & Weinberg, 2002). In Abhängigkeit, welche Gene aktiviert bzw. inhibiert sind, hat der Tumor damit intrinsisch eine unterschiedliche Neigung zur Metastasierung. Diese differentiellen Wege der malignen Transformation wurden durch Expressionsprofile aufgezeigt, welche mit einer 90% Sicherheit die Entstehung von Metastasen in einem frühen Stadium der Primärtumorentwicklung prognostizieren können (van 't Veer *et al.*, 2002; Ramaswamy *et al.*, 2003). Diese Untersuchungen lassen jedoch offen, wann die Streuung von Tumorzellen einsetzt und welche Aberrationen bei der Disseminierung selektioniert werden. Vor allem in dem Fall, daß die Eigenschaft zur Metastasierung früh festgelegt wird, ist die Frage, ob die Entwicklung der Metastasen dann auch unabhängig von der weiteren Entwicklung des Primärtumors ablaufen kann. Die Analyse der Zytokeratin-positiven Zellen zeigte die Möglichkeit einer frühen Disseminierung und unabhängigen Progression von Tumorzellen auf und ist in Abbildung 29 zusammengefaßt. Das Modell fügt dem Verständnis der Metastasierung wertvolle Erkenntnisse bei, denn es liefert eine Erklärung für die häufig beobachtete Tatsache, daß in vielen Patientinnen nach einer Latenzzeit Metastasen auch bei einer frühzeitigen Operation und Therapie auftreten (Demicheli, 2001). Die Zeit bis zum

Rezidiv ist die Konsequenz daraus, daß die genomische Krise von den meisten M<sub>0</sub>-disseminierten Tumorzellen noch nicht durchlaufen wurde und die Selektion eines malignen Tumorzellklons daher nicht abgeschlossen ist. Hochauflösende genomische Untersuchungen und Expressionsanalysen früh disseminierter Tumorzellen sollen in Zukunft ermöglichen, diejenigen Gene zu identifizieren, welche die Metastasierung der Tumorerkrankung festlegen. Damit verbunden ist die Hoffnung, Ansatzpunkte einer systemischen Therapie zu finden, welche die betroffenen Patientinnen, durch Eliminierung der disseminierten Tumorzellen, wirksam von ihrer Tumorerkrankung heilen.

## 5 Zusammenfassung

Trotz der Resektion von Mammakarzinomen in kurativer Absicht entwickeln sich häufig Fernmetastasen. Dieser Befund zeigt, daß nach der Operation disseminierte Tumorzellen im Körper verbleiben, deren systemische Progression zur Entwicklung von Rezidiven führt. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark korreliert beim Mammakarzinom mit einer signifikant schlechteren Prognose der betroffenen Patientinnen. Es ist das Thema der vorliegenden Dissertation, erste Einblicke in die Biologie der Tumorzeldisseminierung und die systemische Tumorprogression zu erlangen. Dies wurde ermöglicht, da im Zuge der Arbeit eine PCR-Technik etabliert werden konnte, die eine Amplifikation des Genoms von Einzelzellen erlaubte, die mit der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) kombiniert werden konnte. Es fanden sich in jeweils der Hälfte der disseminierten Tumorzellen der Patientinnen im nicht-metastatischen Stadium ( $M_0$ ) balancierte CGH-Profile oder einige wenige Aneusomien. Chromosomenbrüche wurden vergleichsweise selten beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten die disseminierten Tumorzellen der Patientinnen mit einem metastasierten Karzinom ( $M_1$ ) signifikant häufiger CGH-Veränderungen, die darüber hinaus dem typischen Aberrationsmuster des Mammakarzinoms entsprachen. Die ergänzende CGH-Analyse der Primärtumore ergab in den  $M_0$ -Patientinnen eine geringe Verwandtschaft zu den disseminierten Tumorzellen. Die Verwandtschaft des Primärtumors mit den gestreuten Tumorzellen der  $M_1$ -Patientinnen war dagegen stärker ausgeprägt, aber auch hier konnte die systemische Ausbreitung divergenter Tumorzellklone beobachtet werden. Diese Ergebnisse machen die frühe Disseminierung von Tumorzellen in vielen Patientinnen wahrscheinlich. Daraus geht hervor, daß erstens eine spätere Metastasenbildung sehr früh angelegt werden kann. Zweitens ist davon auszugehen, daß von diesen früh disseminierten Tumorzellen eine Progression bis zur Entwicklung einer Metastase auch dann möglich ist, wenn der Primärtumor chirurgisch entfernt wurde. Die teilweise geringe Verwandtschaft disseminierter Tumorzellen zum Primärtumor verdeutlicht, daß die Analyse der systemisch gestreuten Tumorzellen für eine erfolgreiche adjuvante Therapie von Bedeutung ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aapro M. S. (2001). Adjuvant therapy of primary breast cancer: a review of key findings from the 7th international conference, St. Gallen, February 2001. *Oncologist* **6**: 376-85.
- Aubele M., Mattis A., Zitzelsberger H., Walch A., Kremer M., Welzl G., Hofler H., and Werner M. (2000). Extensive ductal carcinoma In situ with small foci of invasive ductal carcinoma: evidence of genetic resemblance by CGH. *Int J Cancer* **85**: 82-6.
- Bergh J., Norberg T., Sjogren S., Lindgren A., and Holmberg L. (1995). Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* **1**: 1029-34.
- Bernards R., and Weinberg R. A. (2002). A progression puzzle. *Nature* **418**: 823.
- Bloom H., and Richardson W. (1957). Study of 1,409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br. J. Cancer* **11**: 359-377.
- Boei J. J., Balajee A. S., de Boer P., Rens W., Aten J. A., Mullenders L. H., and Natarajan A. T. (1994). Construction of mouse chromosome-specific DNA libraries and their use for the detection of X-ray-induced aberrations. *Int J Radiat Biol* **65**: 583-90.
- Braun S., Pantel K., Muller P., Janni W., Hepp F., Kantenich C. R., Gastroph S., Wischnik A., Dimpfl T., Kindermann G., Riethmuller G., and Schlimok G. (2000). Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* **342**: 525-33.
- Braun S., Schindlbeck C., Hepp F., Janni W., Kantenich C., Riethmuller G., and Pantel K. (2001a). Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J Clin Oncol* **19**: 368-75.
- Braun S., Schlimok G., Heumos I., Schaller G., Riethdorf L., Riethmuller G., and Pantel K. (2001b). ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* **61**: 1890-5.
- Buerger H., Mommers E. C., Littmann R., Simon R., Diallo R., Poremba C., Dockhorn-Dworniczak B., van Diest P. J., and Boecker W. (2001). Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. *J Pathol* **194**: 165-70.
- Buerger H., Otterbach F., Simon R., Poremba C., Diallo R., Decker T., Riethdorf L., Brinkschmidt C., Dockhorn-Dworniczak B., and Boecker W. (1999a). Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol* **187**: 396-402.
- Buerger H., Otterbach F., Simon R., Schafer K. L., Poremba C., Diallo R., Brinkschmidt C., Dockhorn-Dworniczak B., and Boecker W. (1999b). Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol* **189**: 521-6.
- Chang K. S., Vyas R. C., Deaven L. L., Trujillo J. M., Stass S. A., and Hittelman W. N. (1992). PCR amplification of chromosome-specific DNA isolated from flow cytometry-sorted chromosomes. *Genomics* **12**: 307-12.
- Chano T., Kontani K., Teramoto K., Okabe H., and Ikegawa S. (2002). Truncating mutations of RB1CC1 in human breast cancer. *Nat Genet* **31**: 285-8.
- Cole B. F., Gelber R. D., Gelber S., Coates A. S., and Goldhirsch A. (2001). Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised clinical trials with quality-adjusted survival analysis. *Lancet* **358**: 277-86.
- Cote R. J., Rosen P. P., Lesser M. L., Old L. J., and Osborne M. P. (1991). Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* **9**: 1749-56.

- Counter C. M., Avilion A. A., LeFeuvre C. E., Stewart N. G., Greider C. W., Harley C. B., and Bacchetti S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* **11**: 1921-9.
- de Lange T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**: 532-40.
- Dearnaley D. P., Sloane J. P., Ormerod M. G., Steele K., Coombes R. C., Clink H. M., Powles T. J., Ford H. T., Gazet J. C., and Neville A. M. (1981). Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* **44**: 85-90.
- Demicheli R. (2001). Tumour dormancy: findings and hypotheses from clinical research on breast cancer. *Semin Cancer Biol* **11**: 297-306.
- Deng G., Lu Y., Zlotnikov G., Thor A. D., and Smith H. S. (1996). Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science* **274**: 2057-9.
- Denver-Conference (1960). A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *Lancet* **1**: 1063-1065.
- Deos P. H., and Norris H. J. (1982). Well-differentiated (tubular) carcinoma of the breast. A clinicopathologic study of 145 pure and mixed cases. *Am J Clin Pathol* **78**: 1-7.
- DePinho R. A. (2000). The age of cancer. *Nature* **408**: 248-54.
- Diab S. G., Clark G. M., Osborne C. K., Libby A., Allred D. C., and Elledge R. M. (1999). Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *J Clin Oncol* **17**: 1442-8.
- Diatchenko L., Lau Y. F., Campbell A. P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E. D., and Siebert P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6025-30.
- Diel I. J., Kaufmann M., Costa S. D., Holle R., von Minckwitz G., Solomayer E. F., Kaul S., and Bastert G. (1996). Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* **88**: 1652-8.
- Dietmaier W., Hartmann A., Wallinger S., Heinmoller E., Kerner T., Endl E., Jauch K. W., Hofstadter F., and Ruschoff J. (1999). Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol* **154**: 83-95.
- Drapopoli N. C., and Fogh J. (1983). Polymorphic enzyme analysis of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* **70**: 469-76.
- du Manoir S., Speicher M. R., Joos S., Schrock E., Popp S., Dohner H., Kovacs G., Robert-Nicoud M., Lichter P., and Cremer T. (1993). Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* **90**: 590-610.
- Early-Breast-Cancer-Trialists (1998a). Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* **352**: 930-42.
- Early-Breast-Cancer-Trialists (1998b). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* **351**: 1451-67.
- Edwards P. A. (2002). Metastasis: the role of chance in malignancy. *Nature* **419**: 559-60; discussion 560.
- Eifel P., Axelson J. A., Costa J., Crowley J., Curran W. J., Jr., Deshler A., Fulton S., Hendricks C. B., Kemeny M., Kornblith A. B., Louis T. A., Markman M., Mayer R., and Roter D. (2001). National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst* **93**: 979-89.

- Eils R., Uhrig S., Saracoglu K., Satzler K., Bolzer A., Petersen I., Chassery J., Ganser M., and Speicher M. R. (1998). An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* **82**: 160-71.
- Eisen M. B., Spellman P. T., Brown P. O., and Botstein D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14863-8.
- Ellis I. O., Galea M., Broughton N., Locker A., Blamey R. W., and Elston C. W. (1992). Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **20**: 479-89.
- Elston C. W., and Ellis I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**: 403-10.
- Engel J., Schmidt M., Schubert-Fritschle G., Tretter W., and Hölzel D. (2000). "Jahresbericht 1999 des klinisch-epidemiologischen Krebsregisters am Tumorzentrum München - Schwerpunkt: Gynäkologische Tumoren," W. Zuckschwerdt Verlag, München.
- Engel J., Schubert-Fritschle G., and Hölzel D. (2001). Epidemiologie. In "Mammakarzinome" (H. Sauer, Ed.), W. Zuckschwerdt Verlag, München.
- Gath H. J., and Brakenhoff R. H. (1999). Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* **18**: 109-26.
- Gebauer G., Fehm T., Merkle E., Beck E. P., Lang N., and Jager W. (2001). Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* **19**: 3669-74.
- Gong G., DeVries S., Chew K. L., Cha I., Ljung B. M., and Waldman F. M. (2001). Genetic changes in paired atypical and usual ductal hyperplasia of the breast by comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* **7**: 2410-4.
- Grothues D., Cantor C. R., and Smith C. L. (1993). PCR amplification of megabase DNA with tagged random primers (T-PCR). *Nucleic Acids Res* **21**: 1321-2.
- Gruvberger S., Ringner M., Chen Y., Panavally S., Saal L. H., Borg A., Ferno M., Peterson C., and Meltzer P. S. (2001). Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* **61**: 5979-84.
- Hanahan D., and Weinberg R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Harbeck N., Untch M., Pache L., and Eiermann W. (1994). Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* **69**: 566-71.
- Hayflick L. (1968). Human cells and aging. *Sci Am* **218**: 32-7.
- Heiss M. M., Simon E. H., Beyer B. C., Gruetzner K. U., Tarabichi A., Babic R., Schildberg F. W., and Allgayer H. (2002). Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. *J Clin Oncol* **20**: 2005-16.
- Hermanek P. (1994). What's new in TNM? *Pathol Res Pract* **190**: 97-102.
- Hermesen M. A., Baak J. P., Meijer G. A., Weiss J. M., Walboomers J. W., Snijders P. J., and van Diest P. J. (1998). Genetic analysis of 53 lymph node-negative breast carcinomas by CGH and relation to clinical, pathological, morphometric, and DNA cytometric prognostic factors. *J Pathol* **186**: 356-62.
- Hosch S., Kraus J., Scheunemann P., Izbicki J. R., Schneider C., Schumacher U., Witter K., Speicher M. R., and Pantel K. (2000). Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. *Cancer Res* **60**: 6836-40.
- Howard B. A., and Gusterson B. A. (2000). Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**: 119-37.

- Huschtscha L. I., Noble J. R., Neumann A. A., Moy E. L., Barry P., Melki J. R., Clark S. J., and Reddel R. R. (1998). Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **58**: 3508-12.
- Janni W., Gastroph S., Hepp F., Kentenich C., Rjosk D., Schindlbeck C., Dimpfl T., Sommer H., and Braun S. (2000). Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma. *Cancer* **88**: 2252-9.
- Janni W., Hepp F., Rjosk D., Kentenich C., Strobl B., Schindlbeck C., Hantschmann P., Sommer H., Pantel K., and Braun S. (2001). The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer* **92**: 46-53.
- Jauch K. W., Heiss M. M., Gruetzner U., Funke I., Pantel K., Babic R., Eissner H. J., Riethmueller G., and Schildberg F. W. (1996). Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* **14**: 1810-7.
- Jensen M. L., Kiaer H., Andersen J., Jensen V., and Melsen F. (1997). Prognostic comparison of three classifications for medullary carcinomas of the breast. *Histopathology* **30**: 523-32.
- Johnson D. H. (1990). Molecular cloning of DNA from specific chromosomal regions by microdissection and sequence-independent amplification of DNA. *Genomics* **6**: 243-51.
- Joos S., Scherthan H., Speicher M. R., Schlegel J., Cremer T., and Lichter P. (1993). Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet* **90**: 584-9.
- Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Piper J., Tanner M., Stokke T., Chen L., Smith H. S., Pinkel D., Gray J. W., and Waldman F. M. (1994a). Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2156-60.
- Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J. W., Waldman F., and Pinkel D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**: 818-21.
- Kallioniemi O. P., Kallioniemi A., Piper J., Isola J., Waldman F. M., Gray J. W., and Pinkel D. (1994b). Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **10**: 231-43.
- Kao F. T., and Yu J. W. (1991). Chromosome microdissection and cloning in human genome and genetic disease analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1844-8.
- Karlseder J., Smogorzewska A., and de Lange T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* **295**: 2446-9.
- Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., and Shay J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-5.
- Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1989). Whole genome PCR: application to the identification of sequences bound by gene regulatory proteins. *Nucleic Acids Res* **17**: 3645-53.
- Kinzler K. W., and Vogelstein B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-70.
- Klein C. (1997). Anreicherung und molekulare Charakterisierung einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Karzinompatienten. In "Institut für Immunologie", pp. 103, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Kuukasjarvi T., Karhu R., Tanner M., Kahkonen M., Schaffer A., Nupponen N., Pennanen S., Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., and Isola J. (1997a). Genetic heterogeneity and

- clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* **57**: 1597-604.
- Kuukasjarvi T., Tanner M., Pennanen S., Karhu R., Visakorpi T., and Isola J. (1997b). Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **18**: 94-101.
- Lindblom A., Rotstein S., Skoog L., Nordenskjold M., and Larsson C. (1993). Deletions on chromosome 16 in primary familial breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Cancer Res* **53**: 3707-11.
- Lindemann F., Schlimok G., Dirschedl P., Witte J., and Riethmuller G. (1992). Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* **340**: 685-9.
- Lisitsyn N., and Wigler M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**: 946-51.
- Ludecke H. J., Senger G., Claussen U., and Horsthemke B. (1989). Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* **338**: 348-50.
- Lundberg A. S., Hahn W. C., Gupta P., and Weinberg R. A. (2000). Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 705-9.
- Mallon E., Osin P., Nasiri N., Blain I., Howard B., and Gusterson B. (2000). The basic pathology of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**: 139-63.
- Mansi J. L., Berger U., Easton D., McDonnell T., Redding W. H., Gazet J. C., McKinna A., Powles T. J., and Coombes R. C. (1987). Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases. *Br Med J (Clin Res Ed)* **295**: 1093-6.
- Mansi J. L., Gogas H., Bliss J. M., Gazet J. C., Berger U., and Coombes R. C. (1999). Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* **354**: 197-202.
- Martin K. J., Kritzman B. M., Price L. M., Koh B., Kwan C. P., Zhang X., Mackay A., O'Hare M. J., Kaelin C. M., Mutter G. L., Pardee A. B., and Sager R. (2000). Linking gene expression patterns to therapeutic groups in breast cancer. *Cancer Res* **60**: 2232-8.
- Maser R. S., and DePinho R. A. (2002). Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* **297**: 565-9.
- Meltzer S. J., Yin J., Huang Y., McDaniel T. K., Newkirk C., Iseri O., Vogelstein B., and Resau J. H. (1991). Reduction to homozygosity involving p53 in esophageal cancers demonstrated by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 4976-80.
- Middleton L. P., Tressera F., Sobel M. E., Bryant B. R., Albuquerque A., Grases P., and Merino M. J. (1999). Infiltrating micropapillary carcinoma of the breast. *Mod Pathol* **12**: 499-504.
- Moore E., Magee H., Coyne J., Gorey T., and Dervan P. A. (1999). Widespread chromosomal abnormalities in high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. Comparative genomic hybridization study of pure high-grade DCIS. *J Pathol* **187**: 403-9.
- Morton N. E. (1991). Parameters of the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7474-6.
- Muller P., Weckermann D., Riethmuller G., and Schlimok G. (1996). Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **88**: 8-16.
- NIH (2000). Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *NIH Consensus Statement* **17**: 1-42.
- Nishizaki T., Chew K., Chu L., Isola J., Kallioniemi A., Weidner N., and Waldman F. M. (1997a). Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* **74**: 513-7.

- Nishizaki T., DeVries S., Chew K., Goodson W. H., 3rd, Ljung B. M., Thor A., and Waldman F. M. (1997b). Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **19**: 267-72.
- O'Connell P., Pekkel V., Fuqua S. A., Osborne C. K., Clark G. M., and Allred D. C. (1998). Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *J Natl Cancer Inst* **90**: 697-703.
- Osaki T., Oyama T., Gu C. D., Yamashita T., So T., Takenoyama M., Sugio K., and Yasumoto K. (2002). Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **20**: 2930-6.
- Pantel K., Cote R. J., and Fodstad O. (1999). Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* **91**: 1113-24.
- Pantel K., Dickmanns A., Zippelius A., Klein C., Shi J., Hoechtlen-Vollmar W., Schlimok G., Weckermann D., Oberneder R., Fanning E., and et al. (1995). Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* **87**: 1162-8.
- Pantel K., Izbicki J., Passlick B., Angstwurm M., Haussinger K., Thetter O., and Riethmuller G. (1996). Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* **347**: 649-53.
- Pantel K., Schlimok G., Angstwurm M., Weckermann D., Schmaus W., Gath H., Passlick B., Izbicki J. R., and Riethmuller G. (1994). Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* **3**: 165-73.
- Pantel K., Schlimok G., Braun S., Kutter D., Lindemann F., Schaller G., Funke I., Izbicki J. R., and Riethmuller G. (1993). Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* **85**: 1419-24.
- Patau K. (1960). The identification of individual chromosomes, especially in man. *Am J Hum Genet* **12**: 250-276.
- Paterakos M., Watkin W. G., Edgerton S. M., Moore D. H., 2nd, and Thor A. D. (1999). Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a prognostic study. *Hum Pathol* **30**: 1459-63.
- Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O., and Botstein D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747-52.
- Pinkel D., Straume T., and Gray J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 2934-8.
- Putz E., Witter K., Offner S., Stosiek P., Zippelius A., Johnson J., Zahn R., Riethmuller G., and Pantel K. (1999). Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* **59**: 241-8.
- Ragg T. (2001). Bayesian Learning and Evolutionary Parameter Optimization. In "Advances in Artificial Intelligence" (F. Baader, G. Brewka, and T. Eiter, Eds.), pp. 48-62, Springer, Heidelberg.
- Ramaswamy S., Ross K. N., Lander E. S., and Golub T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* **33**: 49-54.
- RKI (2000). Krebskrankheiten. *Robert Koch Institut* [www.rki.de](http://www.rki.de).

- Romanov S. R., Kozakiewicz B. K., Holst C. R., Stampfer M. R., Haupt L. M., and Tlsty T. D. (2001). Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* **409**: 633-7.
- Roylance R., Gorman P., Harris W., Liebmann R., Barnes D., Hanby A., and Sheer D. (1999). Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res* **59**: 1433-6.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., and Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-4.
- Saunders R. D., Glover D. M., Ashburner M., Siden-Kiamos I., Louis C., Monastirioti M., Savakis C., and Kafatos F. (1989). PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: a comparison with conventional microcloning. *Nucleic Acids Res* **17**: 9027-37.
- Schlimok G., Funke I., Holzmann B., Gottlinger G., Schmidt G., Hauser H., Swierkot S., Warnecke H. H., Schneider B., Koprowski H., and et al. (1987). Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8672-6.
- Schnitt S. J., Connolly J. L., Tavassoli F. A., Fechner R. E., Kempson R. L., Gelman R., and Page D. L. (1992). Interobserver reproducibility in the diagnosis of ductal proliferative breast lesions using standardized criteria. *Am J Surg Pathol* **16**: 1133-43.
- Schrock E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M. A., Ning Y., Ledbetter D. H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., and Ried T. (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* **273**: 494-7.
- Shen C. Y., Yu J. C., Lo Y. L., Kuo C. H., Yue C. T., Jou Y. S., Huang C. S., Lung J. C., and Wu C. W. (2000). Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res* **60**: 3884-92.
- Sherley J. L. (2002). Metastasis: objections to the same-gene model. *Nature* **419**: 560; discussion 560.
- Slamon D. J., Godolphin W., Jones L. A., Holt J. A., Wong S. G., Keith D. E., Levin W. J., Stuart S. G., Udove J., Ullrich A., and et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**: 707-12.
- Sloane J. P., Amendoeira I., Apostolikas N., Bellocq J. P., Bianchi S., Boecker W., Bussolati G., Coleman D., Connolly C. E., Dervan P., Eusebi V., De Miguel C., Drijkoningen M., Elston C. W., Faverley D., Gad A., Jacquemier J., Lacerda M., Martinez-Penuela J., Munt C., Peterse J. L., Rank F., Sylvan M., Tsakraklides V., and Zafrani B. (1998). Consistency achieved by 23 European pathologists in categorizing ductal carcinoma in situ of the breast using five classifications. European Commission Working Group on Breast Screening Pathology. *Hum Pathol* **29**: 1056-62.
- Sobin L. H., and Wittekind C. (1997). "TNM Classification of Malignant Tumors," John Wiley & Sons, Inc., New-York.
- Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Thorsen T., Quist H., Matese J. C., Brown P. O., Botstein D., Eystein Lonning P., and Borresen-Dale A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10869-74.
- Speicher M. R., du Manoir S., Schrock E., Holtgreve-Grez H., Schoell B., Lengauer C., Cremer T., and Ried T. (1993). Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed,

- paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA- amplification. *Hum Mol Genet* **2**: 1907-14.
- Speicher M. R., Gwyn Ballard S., and Ward D. C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* **12**: 368-75.
- Speicher M. R., Jauch A., Walt H., du Manoir S., Ried T., Jochum W., Sulser T., and Cremer T. (1995). Correlation of microscopic phenotype with genotype in a formalin-fixed, paraffin-embedded testicular germ cell tumor with universal DNA amplification, comparative genomic hybridization, and interphase cytogenetics. *Am J Pathol* **146**: 1332-40.
- Statistisches-Bundesamt (1997). Todesursachenstatistik in Dtl. In "Fachserie 12 (Gesundheitswesen)" (Metzler, and Poeschel, Eds.).
- Statistisches-Bundesamt (1998). Todesursachenstatistik in Dtl. In "Fachserie 12 (Gesundheitswesen)" (Metzler, and Poeschel, Eds.).
- Tavassoli F. A., and Norris H. J. (1990). A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer* **65**: 518-29.
- Tavassoli F. A., and Stratton M. R. (2002). "Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs," International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Teixeira M. R., Pandis N., and Heim S. (2002). Cytogenetic clues to breast carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* **33**: 1-16.
- Telenius H., Carter N. P., Bebb C. E., Nordenskjold M., Ponder B. A., and Tunnacliffe A. (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* **13**: 718-25.
- Thibodeau S. N., Bren G., and Schaid D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**: 816-9.
- Thorban S., Rosenberg R., Busch R., and Roder R. J. (2000). Epithelial cells in bone marrow of oesophageal cancer patients: a significant prognostic factor in multivariate analysis. *Br J Cancer* **83**: 35-9.
- Tirkkonen M., Tanner M., Karhu R., Kallioniemi A., Isola J., and Kallioniemi O. P. (1998). Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* **21**: 177-84.
- Tsavellas G., Patel H., and Allen-Mersh T. G. (2001). Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. *Br J Surg* **88**: 1307-20.
- van Steensel B., Smogorzewska A., and de Lange T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**: 401-13.
- van 't Veer L. J., Dai H., van de Vijver M. J., He Y. D., Hart A. A., Mao M., Peterse H. L., van der Kooy K., Marton M. J., Witteveen A. T., Schreiber G. J., Kerkhoven R. M., Roberts C., Linsley P. S., Bernards R., and Friend S. H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**: 530-6.
- Vogelstein B., Fearon E. R., Hamilton S. R., Kern S. E., Preisinger A. C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. M., and Bos J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**: 525-32.
- Voullaire L., Wilton L., Slater H., and Williamson R. (1999). Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* **19**: 846-51.
- Waldman F. M., DeVries S., Chew K. L., Moore D. H., 2nd, Kerlikowske K., and Ljung B. M. (2000). Chromosomal alterations in ductal carcinomas in situ and their in situ recurrences. *J Natl Cancer Inst* **92**: 313-20.
- Weckermann D., Muller P., Wawroschek F., Harzmann R., Riethmuller G., and Schlimok G. (2001). Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value. *J Urol* **166**: 699-703.

- Weissenbach J., Gyapay G., Dib C., Vignal A., Morissette J., Millasseau P., Vaysseix G., and Lathrop M. (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* **359**: 794-801.
- Wells D., Sherlock J. K., Handyside A. H., and Delhanty J. D. (1999). Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* **27**: 1214-8.
- West M., Blanchette C., Dressman H., Huang E., Ishida S., Spang R., Zuzan H., Olson J. A., Jr., Marks J. R., and Nevins J. R. (2001). Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11462-7.
- Wilton L., Williamson R., McBain J., Edgar D., and Voullaire L. (2001). Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* **345**: 1537-41.
- Wittekind C., and Wagner G. (1997). "TNM-Klassifikation maligner Tumoren," Springer-Verlag, Heidelberg.
- Zhang L., Cui X., Schmitt K., Hubert R., Navidi W., and Arnheim N. (1992). Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5847-51.

## 7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Gert Riethmüller danke ich für die anhaltende Unterstützung und das große Interesse an meiner Arbeit, sowie für das Vertrauen welches er mir bei meiner Einstellung am Institut und den Höhen und Tiefen der täglichen Arbeit stetig entgegenbrachte.

Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer möchte ich danken für die Bereitschaft sich als Doktorvater dieser Dissertation zur Verfügung zu stellen, für die Vertretung meiner Promotion an der Biologischen Fakultät der LMU München und für die Erstellung des Erstgutachtens.

Frau Prof. Dr. E. Weiß danke ich für Ihr Interesse und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Dr. Christoph Klein möchte ich danken für die kompetente Betreuung der Arbeit, für das umfassende Know-how bei allen fachlichen und praktischen Fragen, für die Überlassung des Themas, für die Freiräume des selbständigen Arbeitens und für die persönliche freundschaftliche Zusammenarbeit. Weiterhin möchte ich Dr. Christoph Klein danken für seinen Einsatz um die Finanzierung des Projektes, meiner Stelle und die Ermöglichung zahlreicher Kongreßteilnahmen.

In ganz besonderem Maße danke ich den untersuchten Patientinnen, die mit ihrer Einwilligung zur teilweisen Verwendung ihrer Knochenmarkaspirate für die Forschung diese Arbeit ermöglichten.

Ich bedanke mich bei den Kooperationspartnern des Labors für die bioinformatischen Berechnungen und für die Bereitstellung der Patientenproben sowie der archivierten Primär- bzw. Lymphknotenproben.

Simone Pentz danke ich für den guten Start in meine praktische Arbeit, den Sie durch Ihre umfassende Kenntnis des Laboralltags ermöglichte und für die Unterstützung bei den immunzytochemischen Färbungen. Manfred Meyer danke ich für die Hilfe bei den LOH-Analysen und Elke Burghart für die Anfertigung der Mikrotomschnitte. Christiane Reindl und Dr. Jürgen Kraus danke ich für die Vermittlung wichtiger praktischer Kenntnisse der Metaphase-Hybridisierung, ohne die die Erlernung der CGH sehr erschwert worden wäre. Allen Arbeitsgruppen-Mitgliedern und Angehörigen des Institutes möchte ich für die schöne Zeit am Institut für Immunologie danken und für die vielen Hilfestellungen die ich von ihnen erhalten habe.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich herzlich für die uneingeschränkte Unterstützung meiner Existenz.

Für das wiederholte kritische Lesen der Dissertation und die vielen wertvollen Kommentare bedanke ich mich herzlich bei Christoph Klein, Nikolas Stoecklein und Thomas Blankenstein.

Meinen Freunden Nikolas Stoecklein, Thomas Blankenstein, Manfred Meyer, Nicole Wendler, Andrea Eberharter, Susanne Steinhaus und Karina Petat-Dutter danke ich sehr für die vielen gemeinsamen Aktivitäten innerhalb und außerhalb des Labors, insbesondere für die unzähligen Diskussionen im „Mariandl“.

## 8 Lebenslauf

Name:	Oleg Andreas Schmidt-Kittler
Geburtstag:	15.09.1971
Geburtsort:	München
Familienstand:	ledig
1978 – 1981	Besuch der Freien Waldorfschule München
1981 – 1991	Besuch der Freien Waldorfschule Mainz
05.1991	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife „gut“ (1,6)
1.10.1991 - 31.12.1992	Zivildienst an der Camphill Dorfgemeinschaft Lehenhof, Deggenhausertal.
09.1992 – 09.1997	Studium der Diplom-Biologie an der Philipps-Universität Marburg.
07.1994	Diplom-Vorprüfung „gut“ (1,7)
09.1996	Diplom-Hauptprüfung „sehr gut“ (1,2)
09.96 – 12.96	ERASMUS-Studentenaustausch an der Microbiology Unit (Department of Biochemistry) der Universität Oxford. Thema unter der Leitung von Prof. Dr. D. Sherratt: „Construction and functional analysis of hybrid-proteins of the site directed recombinases XerC and XerD in <i>E. coli</i> “
01.1997 – 08.1997	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg mit dem Thema: „Molekulare und physiologische Analyse des <i>bsaA</i> -Gens von <i>Bacillus subtilis</i> “ Bewertung: „sehr gut“ (1,3)
Seit 10.1997	Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. G. Riethmüller und der Betreuung von Dr. C. Klein mit dem Thema „Genomische Charakterisierung einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen“.

## 9 Publikationen und Patente

- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G. (1999). Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4494-9.
- Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K, Offner S, Geigl JB, Schmidt-Kittler O, Wendler N, Passlick B, Huber RM, Schlimok G, Baeuerle PA, Riethmuller G. (2002). Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* **20**: 387-92.
- Stoecklein NH, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, Diebold J, Schardt JA, Izbicki JR, Klein CA. (2002). SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chainreaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *Am J Pathol* **161**: 43-51.
- Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmuller G. (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* **360**: 683-9.
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJF, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Müller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmüller G, Eils R, Klein CA. (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7737-42.
- Ulmer A, Schmidt-Kittler O, Fischer J, Ellwanger U, Rassner G, Riethmüller G, Fierlbeck G, Klein CA. (2004). Immunomagnetic enrichment, genomic characterisation and prognostic impact of single circulating melanoma cells. *Clinical Cancer Res.* **In press.**

### Poster Präsentationen:

- Oleg Schmidt-Kittler, Michael R. Speicher, Simone Baier, Gert Riethmüller, Christoph Klein. (1998). A new method for whole genome amplification of single cells allows comparative genomic hybridization of individual disseminated carcinoma cells. *2nd International Symposium on Minimal Residual Cancer. Berlin*
- Oleg Schmidt-Kittler, Julian Schardt, Günter Schlimok, Gert Riethmüller and Christoph Klein. (1999). Genomic characterisation of early disseminated tumor cells isolated from bone marrow of breast cancer patients. *Beyond the Identification of Transcribed Sequences, 9<sup>th</sup> Annual Workshop. Washington DC.*
- Oleg Schmidt-Kittler, Angela Daskalakis, Andre Ahr, Julie Waldispühl, Gert Riethmüller and Christoph A. Klein. (2001). Whole genome analysis of single disseminated tumor cells isolated from bone marrow of breast cancer patients. *AACR Oncogenomics: Dissecting Cancer Through Genome Research. Tucson, Arizona.* Oleg Schmidt-Kittler, Thomas Ragg, Angela Daskalakis, Martin Granzow, Andre Ahr, Manfred Kaufmann, Joachim Diebold, Hans Arnholdt, Peter Müller, Joachim Bischoff, Detlev Harich, Günter Schlimok, Gert Riethmüller, Roland Eils and Christoph A. Klein. (2002). From occult

---

residual cells to overt metastasis: Genetic evolution of single disseminated breast cancer cells. *AACR Oncogenomics: Dissecting Cancer Through Genome Research*. **Dublin, Ireland**. Der Abstract wurde mit dem AACR-AstraZeneca Scholar-in-Training Travel Award ausgezeichnet.

**Vorträge:**

Oleg Schmidt-Kittler. (2001). The genetic instability of single disseminated tumor cells correlates with disease stage in breast cancer patients. *3<sup>rd</sup> International Symposium on Minimal Residual Cancer*. **Hamburg**.

Oleg Schmidt-Kittler. (2002). DNA sequence analysis of single cells. *Analytica Conference*. **München**.

**Patent:**

DNA Amplification of a Single Cell (DNS Amplifizierung aus einzelnen Zellen)

Europäische Patent Nr.: 1 109 938 B1

Internationale Patent Nr.: WO 00/17390

Eigentümer: Micromet AG

Erfinder: Christoph Klein, Oleg Schmidt-Kittler

Vertretung: Vossius & Partner

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Oleg Schmidt-Kittler, an Eides statt, daß ich die vorgelegte Doktorarbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen angefertigt habe.

München, den 3.02.03

---