

Nachweis und molekulare Charakterisierung EpCAM-positiver Zellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen



DISSERTATION

**ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.)**

**DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

vorgelegt von

Gundula Haunschmid

aus Regensburg

im Jahr 2013

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von September 2008 bis April 2013 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christoph Klein am Lehrstuhl für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren am Klinikum der Universität Regensburg.

Dissertation eingereicht: **Juni 2013**

Die Arbeit wurde angeleitet von: **Herrn Prof. Dr. Christoph Klein**

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: **Herr Prof. Dr. Sigurd Elz**

1. Gutachter (1. Prüfer): **Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann**

2. Gutachter (2. Prüfer): **Herr Prof. Dr. Christoph Klein**

3. Prüfer: **Herr Prof. Dr. Achim Göpferich**

**Wer kämpft, kann verlieren.
Wer nicht kämpft, hat schon verloren.**

*Bertolt Brecht
(1898-1956)*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1 Tumor und Metastasierung – ein kurzer Überblick	1
1.2 Epidemiologie des Mammakarzinoms	2
1.3 Einteilung und Klassifikation des Mammakarzinoms	3
1.4 Prognose und Therapie des Mammakarzinoms	5
1.5 Minimale Resterkrankung (MRD)	8
1.6 Detektion und klinische Relevanz disseminierter Tumorzellen	9
1.7 Molekulare Analyse disseminierter Tumorzellen	12
1.8 Zielsetzung	13
2. Kooperationspartner, humane Proben und Materialien.....	15
2.1 Kooperationspartner.....	15
2.2 Knochenmarkaspirate und Lymphknoten	15
2.3 Materialien	16
2.3.1 Enzyme, Chemikalien, Reagenzien und Kits	16
2.3.2 Puffer, Lösungen und Medien.....	18
2.3.3 Antikörper.....	22
2.3.4 Oligonukleotide und Primer.....	23
2.3.5 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.3.6 Geräte	25
2.3.7 Datenbanken und Software	25
3. Methoden.....	27
3.1 Aufbereitung von primärem humanem Gewebe	27
3.1.1 Aufarbeitung von Knochenmarkproben.....	27
3.1.2 Aufarbeitung von Lymphknoten	29
3.2 Immunzytochemie.....	29
3.2.1 Doppelfärbung gegen EpCAM und Zytokeratine auf Haftobjekträgern	29
3.2.2 Suspensionsfärbung gegen EpCAM	30
3.3 Isolierung von EpCAM ⁺ Einzelzellen	30
3.4 Amplifikation von Transkriptom und Genom der gleichen Zelle	32
3.4.1 Isolierung und Amplifikation des Transkriptoms	32
3.4.2 Aufarbeitung der genomischen DNA.....	33

3.5 Qualitätskontrolle der Amplifikation von Transkriptom und Genom.....	35
3.6 Genspezifische PCR zur Überprüfung ausgewählter Transkripte	35
3.7 Markierungs-PCR (WTA-Produkt) für die <i>Microarray</i> -Analyse	36
3.8 Markierungs-PCR (WGA-Produkt) für die mCGH	37
3.9 Restriktionsverdau der PCR-Fragmente.....	38
3.10 Agarose Gelelektrophorese	38
3.11 Vergleichende genomische Hybridisierung (mCGH)	40
3.11.1 Präparation von Metaphasenchromosomen	40
3.11.2 Hybridisierung der markierten WGA-Produkte	41
3.11.3 Auswertung	42
3.12 <i>Microarray</i> -Analyse	44
3.12.1 Hybridisierung auf humane Agilent-Arrays.....	44
3.12.2 Auswertung der Genexpressionsdaten.....	45
3.13 Statistische Auswertung.....	47
3.14 Verwendete Standardprotokolle.....	49
3.14.1 Zellkultur.....	49
3.14.2 Fixierung von Zellen in Suspension mit Saponin.....	49
4. Ergebnisse	51
4.1 Nachweis von EpCAM und CK auf DCC	52
4.1.1 Etablierung einer EpCAM/Zytokeratin-Doppelfärbung.....	52
4.1.1.1 EpCAM-Einzelfluoreszenzfärbung und intrazelluläre Spezifität.....	52
4.1.1.2 Zytokeratin-Einzelfluoreszenz-Färbung.....	57
4.1.1.3 Austestung verschiedener Blockierungsritte.....	58
4.1.1.4 EpCAM/CK-Doppelfärbung mit zusätzlicher Kernfärbung	58
4.1.2 Analyse von Patientenproben mit der Doppelfärbung	61
4.2 Analyse von Patientenproben mit der EpCAM-Suspensionsfärbung	63
4.2.1 Aufarbeitung der Knochenmarkaspirate.....	63
4.2.2 Detektion von EpCAM ⁺ Zellen in Knochenmark	67
4.2.3 Korrelation der EpCAM-Färbeergebnisse mit den klinischen Daten.....	70
4.2.4 Aufarbeitung und Detektion von EpCAM ⁺ Zellen in Lymphknoten.....	74
4.2.5 Gepaarte Knochenmarkproben.....	74
4.3 Isolation, Amplifikation und Qualitätskontrolle von EpCAM ⁺ Einzelzellen	77
4.4 Überprüfung der Expression ausgewählter Transkripte	81
4.4.1 Etablierung der genspezifischen PCR für ausgewählte Transkripte	81
4.4.2 Genspezifische PCR mit epithelialen und ausgewählten Transkripten.....	83
4.4.3 Korrelation der Transkript-Analysen mit klinischen Daten	88
4.5 Untersuchung der genomischen DNA der EpCAM ⁺ Einzelzellen.....	89
4.5.1 mCGH-Analyse von EpCAM ⁺ Zellen im Knochenmark	89
4.5.1.1 Transkript-Ergebnisse unter Einbeziehung des mCGH-Status.....	91

4.5.2 Vergleich EpCAM ⁺ und CK ⁺ disseminierter Krebszellen.....	94
4.5.3 mCGH Ergebnisse von EpCAM ⁺ Zellen in Lymphknoten	101
4.6 Untersuchung der Genexpression der EpCAM-positiven ⁺ Einzelzellen	101
5. Diskussion	107
6. Zusammenfassung	123
7. Literaturverzeichnis.....	125
8. Danksagung	135
9. Eidesstattliche Erklärung	136
10. Anhang.....	137
10.1 Klassifikation des Mammakarzinoms	137
10.2 Gradienten-PCR von PKM1 und PKM2	139
10.3 Chromosomeneinteilung nach ISCN.....	140
10.4 Vergleich CK-Transkript positiver und negativer EpCAM ⁺ Zellen	141
10.5 mCGH-Profile	142

Abkürzungsverzeichnis

-	negativ	ISCN	Internationales Nomenklatursystem für Humanzygoten
+	positiv	KM	Knochenmark
α	anti	LOH	Verlust der Heterozygotie
A	Adenin	M ₀	ohne klinisch manifeste Metastasen
Abb	Aberration	M ₁	mit klinisch manifesten Metastasen (Fernmetastasen)
adjp	adjustierter/korrigierter <i>p</i> -Wert	MACS	immunomagnetische Zellseparation
AJCC	American Joint Committee on Cancer	Mb	Megabase
Amp	Amplifikation	MCF-7	Michigan Cancer Foundation - 7
APC	Allophycocyanin	mCGH	Metaphasen-CGH
bio	Biotin	MC-x-y	Zellcodierung: Mammakarzinom-Patient x-Zelle y
bp	Basenpaar	min	Minute
BSA	Rinderserumalbumin	MNZ	mononukleäre Zellen
C	Cytosin	MOPC	Maus Eizellen-Plasmozytom
CGH	komparative genomische Hybridisierung	MRD	minimale Resterkrankung
CK	Zytokeratin	MW	arithmetisches Mittel (\bar{x})
DAPI	4',6'-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid	n	Anzahl
DCC	disseminierte Krebszelle	PBL	periphere Blutlymphozyten
DCIS	duktales Carcinoma <i>in situ</i>	PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
dd	didesoxy	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Del	Deletion	PNA	Poly-T-Peptid-Nukleinsäure
Dig	Digoxygenin	PR	Progesteronrezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PT	Primärtumor
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	RE	Restriktionsendonuklease
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor	RNA	Ribonukleinsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition	rpm	Umdrehungen pro Minute
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül	RT	Raumtemperatur
EpEX	extrazelluläre Domäne von EpCAM	SD	Standardabweichung (σ)
EpIC	intrazelluläre Domäne von EpCAM	SDS	Natriumdodecylsulfat
ER	Estrogenrezeptor	sec	Sekunde
FCS	Fötales Kälberserum	SLN	Sentinel-Lymphknoten
FDR	<i>false-discovery-rate</i>	SM	<i>sex mismatch</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	SSC	Natriumcitrat-Kochsalzlösung
FITC	Fluorescein-isothiocyanat	T	Thymin
G	Guanin	T _A	Annealing-Temperatur
g	Beschleunigung	TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
GlyA	Glycophorin A	U	Uracil
GnRH	Gonadorelin (Gonadotropin Releasing-Hormon)	U	Unit (Aktivitätseinheit Restriktionsenzym)
h	Stunde	UICC	Union for International Cancer Control
HD	gesunder Spender	WGA	Amplifikation des Gesamtgenoms
HL60	menschliche Promyeloblasten-Zelllinie	wt	Wildtyp
ICH	Immunhistochemie	WTA	Amplifikation des Gesamttranskriptoms

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Model der parallelen Progression	8
Abbildung 2: Übersicht der verschiedenen Phasen vor und nach der Dichtegradienten-Zentrifugation	27
Abbildung 3: Schematische Darstellung der immunomagnetischen Zellseparation (MACS)	28
Abbildung 4: Fluoreszenz-Invertmikroskop zur Isolierung von Einzelzellen.....	31
Abbildung 5: Isolierung von Einzelzellen	31
Abbildung 6: Objektträger mit Metaphasen-Präparation.....	41
Abbildung 7: Auswertung der mCGH am Fluoreszenzmikroskop	43
Abbildung 8: Hybridisierung des markierten WTA-Produktes und anschließender Scavorgang.....	46
Abbildung 9: Experimentelle Übersicht.....	51
Abbildung 10: Suspensionsfärbung mit EpIC und EpEX (MCF-7)	54
Abbildung 11: Färbung mit EpIC und EpEX an fixierten Zellen (HL60+).....	55
Abbildung 12: Färbung mit EpIC und EpEX auf Haftobjektträger (MCF-7)	56
Abbildung 13: EpIC- und EpEX-Färbung – Detailaufnahme	56
Abbildung 14: EpCAM/CK-Doppelfärbung auf Haftobjektträger	60
Abbildung 15: EpCAM/CK-Doppelfärbung auf Haftobjektträger	62
Abbildung 16: Überblick über die versch. Aufarbeitungswege der eingegangenen Knochenmarkaspirate	66
Abbildung 17: EpCAM ⁺ Zellen in M ₀ , M ₁ und HD-Knochenmarkproben	68
Abbildung 18: Vergleich der Anzahl an EpCAM ⁺ Zellen in 10 ⁶ untersuchten Zellen	69
Abbildung 19: Alter zum Zeitpunkt der Primäroperation der Subtypen.	72
Abbildung 20: Vergleich der Anzahl an EpCAM ⁺ und CK ⁺ Zellen der gepaarten Proben.....	76
Abbildung 21: Beispiel der Qualitätskontrolle von WTA- und WGA-Produkt.....	78
Abbildung 22: Einteilung der 423 EpCAM ⁺ und EpCAM ⁻ Einzelzellen hinsichtlich ihrer Qualität.	80
Abbildung 23: Übersicht der Verwendung der EpCAM ⁺ Einzelzellen für die molekulare Charakterisierung	81
Abbildung 24: Sequenzausschnitt HER2 (Exon 15-18)	82
Abbildung 25: Sequenzausschnitt PKM1 und PKM2.	82
Abbildung 26: Restriktionsverdau der HER2- und PKM-Amplifikate.....	83
Abbildung 27: Restriktionsverdau von Transkripten ausgewählter Gene.....	83
Abbildung 28: Expression von ausgewählten Transkripten in Zellpools	84

Abbildung 29: Expression von ausgewählten Transkripten in 32 EpCAM ⁻ und 151 EpCAM ⁺ M ₀ Zellen (Suspensionsfärbung).....	85
Abbildung 30: Gesamtübersicht der Expression von epithelialen Transkripten	86
Abbildung 31: Gesamtübersicht der epithelialen Transkript Phänotypen.....	86
Abbildung 32: Expression von ausgewählten Transkripten.....	87
Abbildung 33: Expression von ausgewählten Transkripten CD45-negativer und CD45-positiver Zellen.	88
Abbildung 34: Übersicht der mCGH Ergebnisse.....	90
Abbildung 35: Balancierte und aberrante mCGH Profile.....	91
Abbildung 36: Expression von ausgewählten Transkripten 46 aberranter und balancierter M ₀ Zellen	92
Abbildung 37: Gesamtübersicht der Expression von ausgewählten Transkripten unter Einbeziehung der mCGH Ergebnisse.	92
Abbildung 38: Histogramm der mCGH Aberrationen aller M ₀ und M ₁ DCC	95
Abbildung 39: Vergleich von EpCAM ⁺ und CK ⁺ M ₀ und M ₁ DCC	97
Abbildung 40: Hierarchische-Clusteranalyse der mCGH-Aberrationen aller aberranten EpCAM ⁺ DCC	100
Abbildung 41: mCGH Profil einer EpCAM ⁺ Zelle aus dem Lymphknoten einer M ₀ Mammakarzinom-Patientin.	101
Abbildung 42: Heatmap der Genexpressionsergebnisse.....	103
Abbildung 43: Validierung der Genexpressionsergebnisse mit der genspezifischen PCR.....	104
Abbildung 44: Ward-Clustering der Genexpressionsdaten von 29 aberranten EpCAM ⁺ DCC.....	105
Abbildung 45: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.....	124
Abbildung 46: Gradienten-PCR von PKM1 und PKM2.....	139
Abbildung 47: Chromosomeneinteilung nach ISCN.....	140
Abbildung 48: Histogramm der mCGH Aberrationen aller CK-Transkript-positiven bzw. -negativen M ₀ DCC	141

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der durch Genexpressionsanalysen identifizierten molekularen Subtypen	4
Tabelle 2: Mammakarzinom-Subtypen nach ER-, PR-, HER2-, CK5/6-, EGFR- und Ki67-Status	4
Tabelle 3: Mammakarzinom-Subtypen nach Estrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor- und HER2-Status.....	5
Tabelle 4: Prognose der sechs Mammakarzinom-Subtypen.....	6
Tabelle 5: Immunhistochemische Subtypen des Mammakarzinoms und therapeutische Empfehlungen	7
Tabelle 6: Verwendete Enzyme, Chemikalien, Reagenzien und Kits	16
Tabelle 7: Verwendete Antikörper	22
Tabelle 8: Oligonukleotide und Primer für spezifische PCR.....	23
Tabelle 9: Oligonukleotide und Primer für die primäre Amplifikation humaner cDNA und gDNA	24
Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 11: Benutzte Geräte	25
Tabelle 12: Verwendete Datenbanken und Software	25
Tabelle 13: Absorption und Emission aller verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	30
Tabelle 14: PCR-Programm für die Primäramplifikation der cDNA	33
Tabelle 15: PCR-Programm für die Primäramplifikation genomischer DNA.....	34
Tabelle 16: PCR-Ansatz für die Durchführung der Qualitätskontrolle	35
Tabelle 17: PCR-Programm für die Qualitätskontrolle von WTA- und WGA-Produkt.....	36
Tabelle 18: Genspezifische PCR - ausgewählte Gene	36
Tabelle 19: Ansatz für die WTA-Produkt Markierung.....	36
Tabelle 20: PCR-Programm zur WTA-Produkt Markierung.....	37
Tabelle 21: Ansatz für die WGA-Produkt Markierung.....	37
Tabelle 22: PCR-Programm zur WGA-Produkt Markierung	38
Tabelle 23: PCR-Ansatz für den Restriktionsverdau	38
Tabelle 24: Verwendete Restriktionsenzyme und Inkubations- bzw. Inaktivierungsparameter	39
Tabelle 25: Ansatz der Fällung von Test- und Referenz-DNA	41
Tabelle 26: Zusammensetzung des Antikörpermix	42
Tabelle 27: Zusammensetzung des Hybridisierungs-Mix.....	45
Tabelle 28: Verwendete Zelllinien und Medien.....	49
Tabelle 29: Übersicht der getesteten Verdünnungen und Antikörper	52
Tabelle 30: Übersicht der verwendeten Antikörper zum Vergleich von EpIC und EpEX	53
Tabelle 31: Übersicht der getesteten Verdünnungen und Antikörper: CK-Fluoreszenzfärbung	57

Tabelle 32: Kreuztest-Versuche zur Überprüfung der Kreuzreakтивität der Antikörper	59
Tabelle 33: Übersicht der verwendeten Antikörper für die EpCAM/CK-Fluoreszenzfärbung.....	59
Tabelle 34: Klinische Daten zu den Knochenmark-Haftobjektträgern aus Augsburg	61
Tabelle 35: Ergebnisse der EpCAM/CK-Doppelfärbung von 37 Patientenproben	63
Tabelle 36: Herkunft und Aufarbeitung der eingegangenen Knochenmarkaspirate	64
Tabelle 37: Kennzahlen während der Knochenmarkaufarbeitung und Anzahl der mit dem EpCAM-Antikörper gefärbten Zellen.....	65
Tabelle 38: Aufarbeitung der Knochenmarkproben.....	66
Tabelle 39: EpCAM-positive Zellen im Knochenmark	67
Tabelle 40: EpCAM Positivität abhängig von der Aufarbeitungszeit (Zeitintervall) und der Dichte der Gradienten	68
Tabelle 41: Klinische Daten und histopathologische Charakteristika der bearbeiteten Patientenproben.....	70
Tabelle 42: EpCAM ⁺ Zellen zu verschiedenen OP-Zeitpunkten und innerhalb der Mammakarzinom-Subtypen ..	72
Tabelle 43: Korrelation klinischer Daten der M ₀ Patientinnen mit dem EpCAM-Färbeergebnis	73
Tabelle 44: Patientendaten zu den gepaarten Knochenmarkproben	75
Tabelle 45: Isolierte Zellen aus Knochenmarkproben und Lymphknoten.....	77
Tabelle 46: Ergebnisse der Qualitätskontrolle von WTA- und WGA-Produkten der Knochenmarkzellen.....	79
Tabelle 47: Ergebnisse der Qualitätskontrolle von WTA- und WGA-Produkten der Lymphknotenzellen.	79
Tabelle 48: Gesamtzahl an Zellen mit guter Qualität des WTA- und WGA-Produktes	79
Tabelle 49: Vergleich der WTA-Produktqualität hinsichtlich der Aufarbeitungszeit (Zeitintervall)	80
Tabelle 50: Gesamtübersicht der EpCAM/CK-Transkript-Gruppen	87
Tabelle 51: Korrelation von klinischen Daten mit den Ergebnissen der genspezifischen PCR.	89
Tabelle 52: Überprüfung der Korrelation klinischer Daten mit den Ergebnissen der genspezifischen PCR der gesicherten M ₀ DCC	93
Tabelle 53: Vergleich der EpCAM- und CK-DCC-Kollektive in Hinsicht auf Patientenzahl, Zellzahl pro Patientin	94
Tabelle 54: Auflistung der adjp-Werte beim Vergleich von EpCAM ⁺ oder CK ⁺ M ₀ und M ₁ DCC.....	96
Tabelle 55: Korrelation von Aufarbeitungscharakteristika und klinischen Daten mit dem mCGH-Status	98
Tabelle 56: Metastasierung und genomische Aberrationen der M ₁ Patientinnen	99
Tabelle 57: Verteilung der DCC im Genexpressionscluster und mCGH-Cluster.	106
Tabelle 58: Vergleich der genetischen Aberrationen von Primärtumor und DCC	117
Tabelle 59: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms.....	137
Tabelle 60: Stadieneinteilung nach UICC	137
Tabelle 61: Grading des Mammakarzinoms.....	138
Tabelle 62: Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner.....	138
Tabelle 63: Score-Werte bei der HER2 Immunohistochemie.....	138

1. Einleitung

1.1 Tumor und Metastasierung – ein kurzer Überblick

Als Tumor wird eine „örtlich umschriebene Zunahme des Gewebevolumens“ definiert (*Hildebrandt et al., 1997*). Im engeren Sinn spricht man von einem unkontrollierten Zellwachstum (Neoplasie) im Körper. Dabei kann es sich um eine gutartige (benigne) oder um eine bösartige (maligne) Neoplasie handeln, welche auch als Krebs bezeichnet wird. Kennzeichnend für diese malignen Tumoren ist ihr invasives Wachstum, ihre Fähigkeit das umliegende Gewebe zu infiltrieren und über die Blutbahn (hämatogen) und/oder über Lymphgefäß (lymphogen) zu streuen und schließlich in anderen Geweben Tochtergeschwulste (Metastasen) zu bilden. Aus epithelialen Geweben hervorgegangene Tumoren werden als Karzinome bezeichnet, wie z.B. das Mammakarzinom oder das Prostatakarzinom. Gestreute (disseminierte) Krebszellen, die sich in anderen Organen ansiedeln und proliferieren, werden Metastasen oder Sekundärtumoren genannt, die ursprüngliche Neoplasie wird als Primärtumor bezeichnet. Ausgelöst durch DNA-Schäden, die zum Wachstum und Überlebensvorteil von Zellen führen, beginnt der Prozess der Karzinogenese (*Greaves, 2002*). Charakteristisch für einen malignen Tumor ist neben der genetischen Instabilität die Fähigkeit zur Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Wachstumsfaktor-unabhängiges Wachstum, eine Unempfindlichkeit gegenüber Wachstums-Hemmssignalen, die Umgehung der Apoptose, ein grenzenloses Replikationspotential, die fortwährende Angiogenese (Blutgefäßneubildung) sowie das Eindringen in umliegendes Gewebe, gefolgt von der Metastasierung (*Hanahan und Weinberg, 2000; Loberg et al., 2007*). Die meisten Patienten sterben nicht aufgrund des Primärtumors, sondern in Folge der Metastasierung in andere Organe (*Bendre et al., 2003; Loberg et al., 2007*). Die Metastasierung ist ein mehrstufiger Prozess, der sich aus dem Ablösen von Zellen des Primärtumors, dem Eintritt dieser Zellen ins Blutsystem inklusive dem Transport in entfernte Organe und dem Austritt aus dem Blutsystem zusammensetzt (*Fidler, 2003*). Unter geeigneten Bedingungen proliferieren die Tumorzellen in dem fremden Organ und initiieren die Angiogenese. Der erste Schritt der Metastasierung, der bereits im Primärtumor stattfindet, ist die Veränderung der zellspezifischen Eigenschaften der Zellen durch die epithelial-mesenchymale Transition (EMT, *Weinberg, 2007*). Durch das Aneignen von mesenchymalen Eigenschaften erlangen epitheliale Tumorzellen die Fähigkeit zu migrieren. Dieser mehrschrittige Prozess der Metastasierung ist jedoch nur selten erfolgreich, wobei die Effizienz von Stufe zu Stufe abnimmt (*Luzzi et al., 1998; Valastyan und Weinberg, 2011*). Im Mausmodel konnte gezeigt werden, dass nur 0,01 % injizierter Krebszellen in der Lage sind

eine Makrometastase zu bilden (*Fidler, 1970*). Bis jetzt ist nicht bekannt, welche Zellen alle Schritte bis zur Metastasierung erfolgreich absolvieren können und welche genetischen Eigenschaften dazu essentiell sind. Werden bei den Patienten Metastasen diagnostiziert, ist im Allgemeinen nur noch eine palliative Therapie möglich. Deswegen ist die Entwicklung von Medikamenten, die das Auswachsen dieser metastatischen Vorläuferzellen zu Metastasen verhindern, von äußerster Bedeutung.

1.2 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit einer Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen) von rund 72.000 die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland und die vierthäufigste Todesursache (*Bertz et al., 2010; Statistisches Bundesamt, 2013*). Seit 1980 ist die Inzidenzrate deutschlandweit um ca. 65 % gestiegen (*Bertz et al., 2010*), weltweit hat sie sich mehr als verdoppelt (*Forouzanfar et al., 2011*). In Deutschland ist der Anstieg unter anderem auf die Einführung des Mammographie-Screenings zwischen 2005 und 2008 zurückzuführen. Dadurch werden Vorstufen und (benigne) Tumoren bereits in einem sehr frühen Stadium detektiert. Darüber hinaus sank die Mortalität leicht (*Bertz et al., 2010*), die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 81 % und 86 % (*Bertz et al., 2010; Hiripi et al., 2012; TRM, 2013a*). In Deutschland verstarben im Jahr 2011 17.815 Frauen an bösartigen Neubildungen der Brustdrüse, was 17,5 % der krebsbedingten Todesfälle bei Frauen entspricht (*Statistisches Bundesamt, 2013*). Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnose beträgt 63 Jahre, wobei knapp 40 % der Patientinnen vor dem 60. Lebensjahr diagnostiziert werden (*Bertz et al., 2010; TRM, 2013a*). Bei Männern ist die Erkrankungsrate mit einer Inzidenz von 1,3 je 100.000 Männer sehr gering (*Bertz et al., 2010*). Weltweit steht das Mammakarzinom mit 458.000 Todesfällen auf Platz fünf der krebsbezogenen Todesfälle (Stand: 2008, *WHO, 2013*).

Bei der hereditären Form des Mammakarzinoms liegt eine familiäre Vorbelastung vor. Zwischen 5 und 10 % der Patientinnen sind von dieser Form betroffen (*Lynch et al., 2012*), bei der auch ein erhöhtes Risiko für Ovarialkarzinome festgestellt werden konnte. Als Ursache hierfür sind Mutationen in Suszeptibilitätsgenen zu sehen. Die zwei bekanntesten sind die Tumorsuppressor-Gene „*breast cancer 1*“ (*BRCA1*) und „*breast cancer 2*“ (*BRCA2*), die für ca. 25-55 % der familiären Erkrankungen verantwortlich sind (*Thomssen und Wand, 2012*). Frauen mit Mutationen in diesen beiden Genen entwickeln mit einer Wahrscheinlichkeit von 50-80 % im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom (*Roy et al., 2012*). Daneben tritt die sporadische Form des Mammakarzinoms auf. Als Risikofaktoren hierfür gelten unter anderem das Auftreten der Menarche vor dem elften Lebensjahr oder der

Eintritt der Menopause nach dem 54. Lebensjahr. Ebenso haben Frauen, die zum Zeitpunkt der ersten Lebendgeburt über 40 Jahre alt sind, keine Kinder bekommen haben, nicht gestillt oder exogene Hormone eingenommen haben, ein höheres Erkrankungsrisiko (*Veronesi et al., 2005*).

1.3 Einteilung und Klassifikation des Mammakarzinoms

Als präinvasives Stadium des Mammakarzinoms wird das Carcinoma *in situ* angesehen. Am häufigsten tritt die duktale Form (DCIS) auf, bei der die Neoplasie auf das Innere der Milchgänge beschränkt ist. Dabei hat nach der derzeit anerkannten klinischen Auffassung die Überschreitung der natürlichen Gewebsgrenze durch die Basalmembran noch nicht stattgefunden. Findet diese Überschreitung statt, spricht man vom invasiven Mammakarzinom. Die histologische Einteilung unterscheidet im Wesentlichen zwischen dem invasiv duktalen Karzinom, welches bei 80 % der Patientinnen auftritt, und den invasiv lobulären, tubulären, medullären, muzinösen und papillären Karzinomen (*Lakhani et al., 2012*).

Die Grundlage für die Einteilung in unterschiedliche Krankheitsstadien bildet die TNM-Klassifikation, welche von der AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) und UICC (*Union for International Cancer Control*) erarbeitet wurde (*UICC, 2009; AJCC, 2010*). Dabei wird der Durchmesser des Primärtumors (T), der Befall der regionalen Lymphknoten der Brust oder Achselhöhle (N) sowie das Vorliegen von Fernmetastasen (M) bestimmt. Durch Indexzahlen werden verschiedene Ausbreitungsstadien definiert, z.B. steht M₁ für das Vorhandensein von Fernmetastasen, wogegen bei einem M₀-Stadium keine Fernmetastasen vorliegen (Anhang Tabelle 59). In den USA wird die TNM-Klassifikation zu fünf Stadien zusammengefasst (UICC-Stadium 0-IV, Anhang Tabelle 60, *UICC, 2009*).

Mit dem Differenzierungsgrad (*Grading G*) nach Elston und Ellis erfolgt eine histologisch-morphologische Einteilung anhand der Tubulusformation, der Kernpolymorphie und der Mitoserate (*Elston und Ellis, 1991*). Dazu wird jeweils ein *Score* zwischen eins und drei bestimmt, die Addition dieser Werte ergibt den Malignitätsgrad (Anhang Tabelle 61).

Endokrines Ansprechen und damit die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus von Estrogen (ER) und Progesteron (PR) wird mit Hilfe des Immunreaktiven *Score* (IRS) nach Remmele und Stegner bestimmt, welcher aus dem Produkt von Färbeintensität und dem Prozentsatz positiver Zellen gebildet wird (Anhang Tabelle 62, *Remmele und Stegner, 1987*). Die Bewertung als ER⁺ bzw. PR⁺ erfordert mindestens 10 % positive Zellen, also einen IRS von mindestens zwei. Neueste Empfehlungen gehen sogar soweit, dass Patientinnen mit

Tabelle 1: Eigenschaften der durch Genexpressionsanalysen identifizierten molekularen Subtypen des Mammakarzinoms, modifiziert nach Eroles et al., 2012

Molekularer Subtyp	Häufigkeit [%]	ER, PR, HER2	CK 5/6, EGFR	Proliferationsgene	Charakteristische Gene	Histologischer Grad	TP53 Mutationen	Prognose
Luminal A	50-60	ER+, PR+, HER2-	-,-	niedrig	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1	niedrig	niedrig	exzellent
Luminal B	10-20	ER ^{+/−} , PR ^{+/−} , HER2 ^{+/−}	-,-	hoch	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B	mittel/hoch	mittel	mittel/schlecht
Normal breast-like	5-10	ER ^{+/−} , HER2-	+,-	niedrig	PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7	niedrig	niedrig	mittel
Basal-like	10-20	ER-, PR-, HER2-	+,-	hoch	KRT5, CDH3, ID4, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2	hoch	hoch	schlecht
Claudin-low	12-14	ER-, PR-, HER2-	+,-	hoch	CD44, SNAI3	hoch	hoch	schlecht
HER2-enriched	10-15	ER-, PR-, HER2 ⁺	+,-	hoch	ERBB2, GRB7	hoch	hoch	schlecht

≥1 % positiver Zellen als positiv zu werten und damit endokrin zu behandeln sind (Goldhirsch et al., 2009).

Des Weiteren wird der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor 2 (*HER2*, *ERBB2*) untersucht, welcher die Zellproliferation stimuliert und die Apoptose hemmt. Mit Hilfe von Immunhistochemie (IHC) und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wird getestet, ob die Tumorzellen *HER2* überexprimieren (Wolff et al., 2007). Basierend auf der Färbeintensität wird ein Score zwischen null und drei vergeben (Anhang Tabelle 63). Patientinnen mit dem Score 3+ werden als stark positiv gewertet, bei einem schwach positiven Ergebnis (Score 2+) wird zusätzlich mit Hilfe der FISH die *HER2*-Amplifikation geprüft (Diaz, 2001).

Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Sotiriou et al., 2003) konnte das Mammakarzinom weiter charakterisiert werden. Hierbei ermöglicht die Expression charakteristischer Gene die Einteilung in sechs Untergruppen (Tabelle 1). In Folge dessen wurden Marker identifiziert, deren Hilfe die annähernd immunhistochemische Einteilung dieser sechs Subtypen ermöglichte.

Tabelle 2: Mammakarzinom-Subtypen nach Estrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor-, HER2-, CK5/6-, EGFR- und Ki67-Status, Häufigkeitswerte basierend auf Kennecke et al., 2010

Subtyp	ER/PR	HER2	CK5/6	EGFR	Ki67	Häufigkeit [%]
Luminal A	+/+	-			< 14 %	44,0
Luminal B	+/+	-			≥ 14 %	24,0
Luminal HER2	+/+	+				6,5
fünffach negativ (non-basal)	-,-	-	-	-		8,6
Core-basal-like	-,-	-	+	+		9,8
HER2 ⁺ (angereichert)	-,-	+				7,1

Tabelle 3: Mammakarzinom-Subtypen nach Estrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor- und HER2-Status, Häufigkeitswerte basierend auf Schnitt, 2010

Subtyp	Hormonrezeptorstatus	HER2-Status	Grading	Häufigkeit [%]
Luminal A	ER ⁺ /PR ⁺	HER2 ⁻	niedrig	63,0
Luminal B	ER ⁺ /PR ⁺	HER2 ⁺	> Luminal A	7,0
<i>Triple negativ/Basal-like</i>	ER ⁻ /PR ⁻	HER2 ⁻	meist hoch	15,0
HER2 ⁺ (angereichert)	ER ⁻ /PR ⁻	HER2 ⁺	meist hoch	15,0

Neben den Routine-Markern ER, PR und HER2 wurden Zytokeratin 5/6, der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR und der Proliferationsmarker Ki67 als zusätzliche Marker verwendet (Tabelle 2). In der Routine werden die drei immunhistochemischen Standardmarker verwendet, die eine Einteilung in vier Subtypen des Mammakarzinoms ermöglichen (Tabelle 3, Schnitt, 2010; Gruver et al., 2011). Auch für die vorliegende Arbeit wurde diese Einteilung verwendet.

1.4 Prognose und Therapie des Mammakarzinoms

Bei ungefähr 6 % der Patientinnen werden bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Metastasen detektiert, bei 20-50 % der anfänglichen M₀ Patientinnen tritt im Lauf der Erkrankung eine Metastasierung auf (Cardoso und Castiglione, 2009; Lu et al., 2009; SEER, 2013). Das Risiko ist abhängig von den Tumorcharakteristika zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, wie TNM-Status, Hormonrezeptorstatus (Alanko et al., 1985) und HER2-Status (S. Chia et al., 2008). Die vier Organe, in denen zuerst Metastasen beobachtet werden, sind der Knochen (41 %), die Lunge (22 %), die Leber (7 %) und das Gehirn (7 %, Berman et al., 2013). Je weiter fortgeschritten der T-Status des Tumors ist, desto geringer ist die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate (TRM, 2013b). Ebenso hat die Ausbreitung des Tumors im Körper einen Einfluss auf die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate. So fällt sie bei Patientinnen mit Lymphknoten-Befall geringer aus als bei lediglich lokaler Erkrankung. Treten Fernmetastasen auf, verringert sich die Fünf-Jahres-Überlebensrate drastisch auf bis zu 26 % (Lu et al., 2009). Unterteilt in die verschiedenen Arten der Progression ist eine Abnahme der Überlebensrate in der folgenden Reihenfolge zu beobachten: Lokalrezidiv, Lymphknotenrezidiv, Fernmetastase (TRM, 2013b). In einer Auswertung von mehreren Studien wurden bei 10.159 Patientinnen die sechs Subtypen untersucht, die immunhistochemisch bestimmt wurden (Tabelle 2). Bei Patientinnen mit Luminal HER2⁻ Tumoren blieb die Sterblichkeitsrate im Verlauf der Beobachtungsphase gleich, wogegen bei Luminal HER2⁺ und non-luminal Tumoren die Sterblichkeitsraten in den ersten fünf Jahren

Tabelle 4: Prognose der sechs Mammakarzinom-Subtypen. *Fernmetastasierung; basierend auf (Kennecke et al., 2010)

Subtyp	Zehn-Jahres-Überlebensrate [%]	Überleben nach Detektion der ersten Fernmetastase [Jahre]	Rezidivrate* in 15 Jahren [%]
Luminal A	70,0	2,2	27,8
Luminal B	54,4	1,6	42,9
Luminal HER2	46,1	1,3	47,9
fünffach negativ (<i>non-basal</i>)	62,6	0,9	35,1
Core-basal-like	52,6	0,5	43,1
HER2 ⁺ (angereichert)	48,1	0,7	51,4

nach Diagnose leicht anstieg, um dann langsam abzunehmen (Tabelle 4, Blows et al., 2010). Ebenfalls unterscheiden sich die Subtypen hinsichtlich des Auftretens von Metastasen signifikant. So treten bei Patientinnen mit *Triple* negativen Tumoren eher (Median 27,5 Monate) Hirnmetastasen auf als bei Patientinnen aller anderen Subtypen (Sperduto et al., 2013). Bei den luminalen Tumoren sind dagegen eher Knochenmetastasen nachweisbar (Smid et al., 2008). Auch die Einteilung mit Hilfe der Genexpressionsdaten bestätigte, dass sich die Subtypen hinsichtlich des Überlebens der Patientinnen unterscheiden (Tabelle 1, Prat et al., 2010).

Bei der Behandlung des Mammakarzinoms wird in erster Linie die chirurgische Entfernung des Tumors und eventuell zusätzlich die Entfernung befallener axillärer Lymphknoten angestrebt. Sollte eine präoperative (neoadjuvante) medikamentöse Therapie stattgefunden haben, findet die Operation direkt anschließend statt. Bei etwa 70 % der Karzinome kann brusterhaltend operiert werden (Winzer, 2005), wobei anschließend fast immer eine Strahlentherapie empfohlen wird. In den restlichen Fällen muss die Mastektomie durchgeführt werden. Als Kontrolle, ob der Tumor vollständig entfernt werden konnte, wird die Resektion (R) angegeben. R0 bedeutet, dass kein Tumorgewebe am Resektionsrand mehr nachweisbar war, bei R1 sind histopathologisch noch Tumoranteile detektierbar. Anschließend können die befallene Brustseite, der Thorax, die Axilla und weitere Lymphabflusswege gezielt bestrahlt werden, um die Rezidivrate zu senken. Als systemische Therapie werden Chemotherapeutika, die endokrine Therapie und zielgerichtete Antikörper eingesetzt. Die vorausgegangene Klassifizierung des Mammakarzinoms dient hierbei als Grundlage der Therapieentscheidung. Als Zytostatika werden Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil, Anthracycline oder Taxane verwendet. Durch die endokrine Therapie soll die Proliferation der Tumorzellen gehemmt werden. Es finden selektive Estrogenrezeptormodulatoren (Tamoxifen, Raloxifen) und Aromatasehemmer (Anastrozol, Letrozol, Exemestan) bei postmenopausalen Frauen und GnRH-Analoga (Goserelin, Buserelin) im

prämenopausalen Stadium Anwendung. Bei 15-20 % der Mammakarzinome liegt eine HER2-Überexpression vor (*Khasraw und Bell, 2012*). Diese Patientinnen werden mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) behandelt. Trastuzumab ist außerdem für die Therapie bei metastasierten Patientinnen zugelassen. Sind bereits Knochenmetastasen aufgetreten, werden Bisphosphonate (Zoledronsäure, Ibandronsäure) verabreicht. Bei metastasierten HER2+ Tumoren kann eine Therapie mit dem Angiogenese-Hemmer Bevacizumab (Avastin®) angezeigt sein.

Die genaue Einteilung des Mammakarzinoms hat zu neuen Therapieempfehlungen geführt, bei denen die Behandlungsstrategie aufgrund molekularer individueller Eigenschaften des Tumors getroffen wird. So wurden auf der Konsensus-Konferenz 2011 in St. Gallen Therapieempfehlungen für vier Subklassifizierungen des Mammakarzinoms gegeben (Tabelle 5, *Goldhirsch et al., 2011*). Daneben wird auch weiterhin die TNM-Klassifizierung, die anatomische Ausbreitung und das Alter bzw. der Menopausenstatus der Patientin berücksichtigt.

Zudem liefern aktuelle Studien Hinweise darauf, dass die Subtypen unterschiedlich auf neue Therapien ansprechen und dies in klinischen Studien berücksichtigt werden muss (*Curigliano et al., 2012*). So gibt es erste Hinweise, dass vor allem Patientinnen mit *Triple* negativen Tumoren von einer Bevacizumab Therapie profitieren (*O'Shaughnessy et al., 2010*).

Trotz des wissenschaftlichen Fortschritts in der Klassifizierung des Mammakarzinoms werden in der Routinediagnostik meist nur die klassischen immunhistochemischen Marker verwendet und daraus die Therapieentscheidung abgeleitet. Zukünftig werden das bessere Verständnis der molekularen Strukturen, des therapeutischen Ansprechens und eventuell eine weitere Unterteilung der Subtypen mit Hilfe neuerer Genexpressionsanalysen oder

Tabelle 5: Immunhistochemische Subtypen des Mammakarzinoms und therapeutische Empfehlungen, modifiziert nach Goldhirsch et al., 2011

Molekular-biologischer Subtyp	Klinisch-pathologische Definition	Behandlung
Luminal A	Luminal A ER und/oder PR: positiv HER2: negativ Ki67: niedrig, < 14%	Hormontherapie Selten Indikation für eine Chemotherapie; Entscheidung gemäß der prognostischen Parameter, z.B. Lymphknotenbefall
	Luminal B, HER2 negativ ER und/oder PR: positiv HER2: negativ Ki67: hoch	Hormontherapie Chemotherapie gemäß der prognostischen Parameter, dem Expressionsniveau der Hormonrezeptoren und gemäß dem Wunsch der Patientin
Luminal B	Luminal B, HER2 positiv ER und/oder PR: positiv HER2: überexprimiert oder amplifiziert	Chemotherapie + Anti-HER2, anschließend Hormontherapie
HER2 (angereichert)	HER2 positiv, non luminal ER, PR: negativ HER2: überexprimiert oder amplifiziert	Chemotherapie + Anti-HER2 mit Ausnahme von Patientinnen mit sehr geringem Risiko (z.B. pT _{1a} , N ₀)
Basal-like	Triple negativ, duktal ER, PR: negativ HER2: negativ	Chemotherapie

zusätzlichen Genomanalysen den nächsten Schritt zu einer personalisierten Therapie des Mammakarzinoms ermöglichen. Durch eine bessere Abschätzung des individuellen Risikos und der zu erwartenden Wirkung adjuvanter Therapien kann die Prognose der einzelnen Patientin weiter verbessert werden.

1.5 Minimale Resterkrankung (MRD)

Obwohl sehr wenige Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Makrometastasen aufweisen, sind bei einigen Patienten im Blut zirkulierende (*circulating tumour cell* - CTC) und/oder disseminierte Krebszellen (*disseminated cancer cell* - DCC) im Knochenmark oder in Lymphknoten detektierbar. Das Vorliegen dieser Zellen wird auch als minimale Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD) bezeichnet, weil sie bei den Routineuntersuchungen nicht erkannt werden und oft erst nach mehreren Jahren zur Bildung von Metastasen führen.

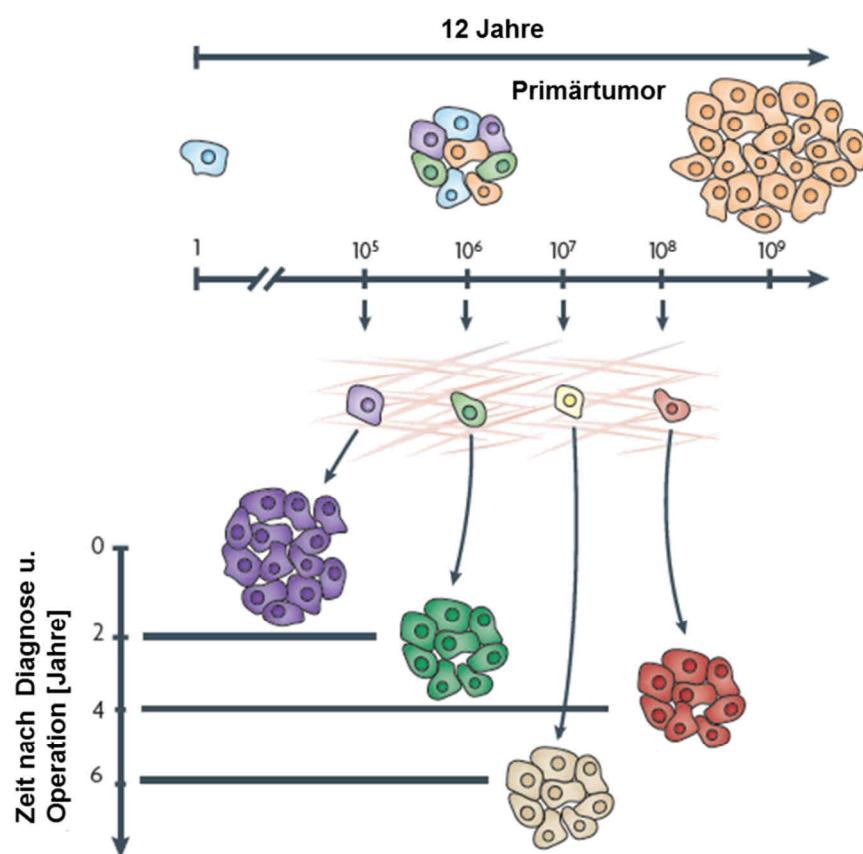


Abbildung 1: Modell der parallelen Progression: Im oberen Teil der Abbildung ist die Entwicklung des Primärtumors gezeigt, die bis zur Detektion durchschnittlich zwölf Jahre dauert. Bereits vor der Diagnose disseminieren genetisch unterschiedliche Zellen (angedeutet durch verschiedene Farben) zu verschiedenen Zeitpunkten vom Primärtumor. Diese DCC wandern in unterschiedliche Organe und wachsen dort parallel mit unterschiedlicher Differenzierungsrate (unterer Teil der Abbildung). Die genetischen Veränderungen der Metastasen unterscheiden sich dabei von denen des Primärtumors. Modifiziert nach Klein, 2009

Die therapeutische Strategie der Behandlung von Karzinompatienten wird aufgrund der Charakterisierung des Primärtumors festgelegt. Dies beruht auf dem Modell der linearen Tumorprogression (*Fearon und Vogelstein, 1990*), welches davon ausgeht, dass die Disseminierung von Tumorzellen erst zu einem sehr späten Zeitpunkt stattfindet. Zu diesem Zeitpunkt besitzt der Tumor schon seinen vollständigen malignen Phänotyp und der Großteil der Zellen hat zusätzliche Mutationen erworben. Daher wird z.B. eine adjuvante Therapie mit Trastuzumab (Herceptin[®]), einem monoklonalen Antikörper gegen *ERBB2* (*HER2*), nur bei Mammakarzinom-Patientinnen empfohlen, deren Tumor eine Amplifikation von *HER2* aufweist. Dies geschieht unter der Annahme, dass CTC und DCC die gleichen Zielstrukturen des Primärtumors aufweisen. Dass dies in knapp 50 % der untersuchten Mammakarzinom-Patientinnen bezüglich des HER2-Status nicht zutrifft, konnte erst kürzlich gezeigt werden (*Hartkopf et al., 2013*). Es besteht eine Diskrepanz zwischen den Eigenschaften des Primärtumors und den CTC bzw. DCC. Tatsächlich unterscheidet sich der Primärtumor in bis zu 85 % der Fälle in der Anzahl und Art der genetischen Veränderungen (Punktmutationen, Verlust der Heterozygotie (LOH) und chromosomale Aberrationen) von der dazugehörigen Metastase (*Stoecklein und Klein, 2010*). Daraus lässt sich schließen, dass die DCC schon sehr früh in der Entwicklung des Tumors disseminieren und die vom Primärtumor unterschiedlichen Veränderungen erst zu einem späteren Zeitpunkt angeeignet werden (Abbildung 1). Dieses Modell ist auch als das Modell der parallelen Tumorprogression bekannt (*Klein, 2009*). Es wird geschätzt, dass die Metastasierung bis zu sechs Jahre vor der Diagnose stattfindet (*Engel et al., 2003; Klein und Holzel, 2006*). Dabei metastasieren vor allem Prostata-, Mamma- und Lungenkarzinome bevorzugt ins Knochenmark (*Mundy, 2002*). Seit einigen Jahren ist die Detektion epithelialer Zellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen Teil der TNM-Klassifikation. Unter der Bezeichnung T_{1mi} werden Mikroinvasionen $\leq 0,1$ cm angegeben (Anhang Tabelle 59).

1.6 Detektion und klinische Relevanz disseminierter Tumorzellen

DCC können im Blut, Knochenmark und Lymphknoten von Tumorpatienten detektiert werden. In diesen Organen kommen vor allem hämatopoetische mesenchymale Zellen vor. Daher können DCC mit einem Antikörper gegen epitheliale Zytokeratine (z.B. CK8, CK18, CK19) oder das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) detektiert werden (*Schlomok et al., 1987; Malzahn et al., 1998; Woelfle et al., 2005*). Zytokeratine sind die Intermediärfilamente der epithelialen Zellen und ermöglichen die mechanische Stabilität der Zelle. Damit und durch den Kontakt der Zellen untereinander sorgen sie für die Funktionsfähigkeit der epithelialen Gewebe. Insgesamt sind 54 verschiedene menschliche Zytokeratin-Gene bekannt, durch die die betroffenen Zellen als epithelial charakterisiert werden können (*Moll et*

al., 2008). Diese charakteristische Expression wird vom Tumor beibehalten und so können Antikörper gegen die Zytokeratine 5, 7, 8/18, 19 und 20 als Differenzierungsmarker bei der Diagnose des Primärtumors und zur Detektion von disseminierten Zellen genutzt werden (Moll et al., 2008).

Bei EpCAM handelt es sich um das erste entdeckte Tumor-assoziierte Antigen, welches mit einem monoklonalen Antikörper identifiziert wurde (Herlyn et al., 1979). EpCAM ist ein transmembranäres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa und besteht aus 314 Aminosäuren. Diese sind unterteilt in eine große Extrazellulärdomäne (EpEX, 242 Aminosäuren), einen Transmembranbereich und eine kurze Intrazellulärdomäne (EpIC, 26 Aminosäuren, Strnad et al., 1989). EpCAM wird häufig von einschichtigen Epithelien, Vorläuferzellen, embryonalen und Gewebs-Stammzellen überexprimiert (Denzel et al., 2009) und spielt physiologisch eine Rolle bei der homotypischen Zell-Zell-Adhäsion (Munz et al., 2009). Daneben wird EpCAM auch von der Mehrheit der Karzinome überexprimiert, wobei die Expression u.a. in Mammakarzinomen mit einer verringerten metastasefreien bzw. Gesamtüberlebenszeit assoziiert ist (Spizzo et al., 2002; Spizzo et al., 2004; Schmidt et al., 2011; Saadatmand et al., 2013; Soysal et al., 2013). Außerdem haben Studien eine Rolle in der Signaltransduktion (Maetzel et al., 2009) und Förderung der Gentranskription und Zellproliferation nachgewiesen (Munz et al., 2004). Durch die Fähigkeit zur Hochregulation der Proto-Onkogene c-myc und Cyclin A/E besitzt EpCAM onkogenes Potential. Zusätzlich wird EpCAM häufig von Krebsstammzellen exprimiert (Gires et al., 2009). Bereits 2009 wurde der monoklonale EpCAM-Antikörper Catumaxomab (Removab[®]) zur Behandlung von malignem Aszites bei Patienten mit EpCAM⁺ Karzinomen zugelassen, für die keine Standardtherapie zur Verfügung steht. Catumaxomab ist ein trifunktionaler Antikörper, der spezifisch an EpCAM⁺ Tumorzellen, an T-Zellen sowie an akzessorische Zellen bindet.

Bei der Detektion von DCC in mesenchymalen Organen hat EpCAM den Vorteil, dass es ein Oberflächenprotein ist. Dies ist eine Voraussetzung zur Isolierung des Transkriptoms der DCC, da die Identifikation der Zellen im nichtpermeabilisierten lebenden Zustand möglich ist. Sowohl CK⁺ als auch EpCAM⁺ Zellen sind sehr selten im Knochenmark (ein bis zwei Zellen in 1 Million gefärbter Zellen). CK⁺ Zellen können in ca. 26-38 % der Mammakarzinom-Patientinnen detektiert werden (Braun et al., 2000b; Schmidt-Kittler et al., 2003; Braun et al., 2005; Falck et al., 2012), EpCAM⁺ Zellen werden in ca. 85 % der Patientinnen mit teilweise fortgeschrittenem Mammakarzinom nachgewiesen (Pierga et al., 2005; Hartmann, 2006). Ein Zusammenhang zwischen dem Auffinden von CK⁺ oder EpCAM⁺ DCC und der Metastasierungs-Wahrscheinlichkeit bzw. einer kürzeren Überlebenszeit wurde nachgewiesen (Riethdorf et al., 2008). Dabei war das Auffinden von CK⁺ DCC bei Mammakarzinom-Patientinnen ein prognostischer Faktor für die Entwicklung von

Knochenmetastasen und Metastasen in entfernten Organen (*Braun et al., 2000b; Braun et al., 2005*) bzw. für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben (*Harbeck et al., 1994; Wiedswang et al., 2003*). Auch für EpCAM⁺ Zellen im Knochenmark verschiedener Tumortypen konnte ein unabhängiger prognostischer Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden (*Izbicki et al., 1997; Kubuschok et al., 1999; Rosenberg et al., 2004*). Studien zur prognostischen Relevanz von EpCAM⁺ Zellen beim Mammakarzinom fehlen jedoch bisher. Dennoch ist allein die Expression epithelialer Marker nicht ausreichend für den Nachweis einer Tumorzelle, da CK⁺ (*Braun et al., 2000b; Braun et al., 2005; Krag et al., 2009*) und EpCAM⁺ (*Buhring et al., 1996; Klein et al., 2002b; Lammers et al., 2002; Choesmel et al., 2004*) Zellen in einzelnen Fällen auch im Knochenmark von gesunden Individuen gefunden werden können. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um hämatopoetische Zellen, die epitheliale Marker exprimieren (*Buhring et al., 1996; Choesmel et al., 2004*). Deshalb sind weitere molekulargenetische Untersuchungen zum Nachweis nötig.

Im Vergleich zu den DCC sind CTC seltener nachweisbar. Die Detektion erfolgt ebenfalls über Antikörper gegen epitheliale Antigene, z.B. mit Hilfe eines von der FDA zugelassenen standardisierten Analysesystems (CellSearch[®]), welches CTC bei Patienten mit metastasiertem Mamma-, Colon- und Prostatakarzinom detektiert (*Hayes et al., 2006; Riethdorf et al., 2007*). Dabei werden EpCAM⁺ Zellen aus dem Blut angereichert und mit Antikörpern gegen CD45 und CK8/CK18/CK19 gefärbt. CD45⁺ Zellen werden als Leukozyten definiert und ausgeschlossen. Die Anzahl an epithelialen CK⁺ Zellen wird automatisch ermittelt. Bei metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen stellt die Anzahl der gefundenen CTC einen unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben und progressionsfreie Überleben vor Beginn der Therapie dar (*Cristofanilli et al., 2004; Cristofanilli et al., 2005*). Außerdem konnte gezeigt werden, dass noch Jahre nach der Entfernung des Primärtumors CTC und DCC detektierbar sind (*Naumov et al., 2002; Meng et al., 2004*). Der Nachweis von CK⁺ Zellen nach der operativen und adjuvanten Therapie ist prognostisch relevant (*Wiedswang et al., 2004; Janni et al., 2005*). Ob CTC oder DCC dabei zur Therapie begleitenden Überwachung und Voraussage der Tumorprogression genutzt werden können, muss noch eruiert werden. Hierbei besitzen CTC gegenüber DCC den Vorteil, dass die Gewinnung von peripherem Blut einfach und, im Vergleich zur Knochenmarkpunktion, nicht invasiv durchgeführt werden kann. Dadurch sind wiederholte Analysen einfacher zu verwirklichen. Aus klinischer Sicht überwiegt aktuell jedoch die Aussagekraft der DCC bei M₀ Mammakarzinom-Patientinnen (*Pierga et al., 2004; Wiedswang et al., 2006; Riethdorf und Pantel, 2008*).

Im Kampf gegen die MRD konnten bis jetzt u. a. mit Hilfe molekularer Therapeutika keine großen Erfolge verzeichnet werden (*Untch et al., 2008*). Die Bildung von Metastasen ist für

einen Großteil der krebsbedingten Sterblichkeit bei Mammakarzinom-Patientinnen verantwortlich (Bendre et al., 2003). Meist können DCC bei Mammakarzinom-Patientinnen bei einer adjuvanten Therapie nicht eliminiert werden (Braun et al., 2000a). Eine Ursache dafür könnte die Heterogenität der DCC sein (Klein et al., 2002a), da sich bereits die detektierten DCC einer einzelnen Patientin in ihren Aberrationen unterscheiden (Schmidt-Kittler et al., 2003; Stoecklein et al., 2008). Welche Eigenschaften diese Zellen dazu befähigen, Jahre später zu einer Metastase auszuwachsen, sind nicht bekannt. Die Charakterisierung dieser Zellen ist daher wichtig, um frühe Veränderungen zu identifizieren, die es den Zellen ermöglichen zu disseminieren und evtl. zu metastasieren. Möglicherweise können so neue Zielstrukturen für künftige Therapieansätze gewonnen werden.

1.7 Molekulare Analyse disseminierter Tumorzellen

Dass das Vorhandensein von DCC mit dem Überleben assoziiert ist, wurde im vorigen Abschnitt beschrieben. Jedoch orientiert sich die Therapie des Mammakarzinoms aktuell an den molekularen Strukturen des Primärtumors und nicht an den DCC, den Vorläuferzellen der Metastasen. Um zukünftig die Therapie auch auf die DCC abzustimmen, sind Fortschritte in der Molekularbiologie nötig. Eine Voraussetzung dafür ist die Existenz von Methoden zur Genom- und Transkriptomanalyse von Einzelzellen, da die geringe DNA-Menge einer einzelnen Zelle von nur etwa 6 pg (Morton, 1991) eine Schwierigkeit darstellt. Daher ist die Amplifikation von Transkriptom und Genom eine Vorbedingung für die Einzelzellanalyse (Klein et al., 2002b; Hartmann und Klein, 2006).

Anschließend kann das Genom der Einzelzelle beispielsweise mit der mCGH (*metaphase Comparative Genomic Hybridization*, komparative genomische Hybridisierung) untersucht werden (Schmidt-Kittler et al., 2003). Damit können Veränderungen in der Kopienzahl von Chromosomen bzw. Deletionen und Amplifikationen von Teilstücken detektiert werden. Für die Untersuchung der Genexpression einer Einzelzelle können *Microarrays* verwendet werden. Hierbei erfolgt eine Hybridisierung der markierten amplifizierten Produkte an 44.000 Oligonukleotide. Anschließend wird die Bindung der markierten Produkte gemessen und so der Genexpressions-Status ermittelt.

1.8 Zielsetzung

Trotz zahlreicher Fortschritte in der Therapie des Mammakarzinoms verhelfen systemische Therapien oft nicht zum gewünschten Erfolg. Die meisten Patientinnen versterben an den im Laufe der Erkrankung auftretenden Metastasen. Da disseminierte Krebszellen (DCC) die Zielzellen systemischer Therapien darstellen, bedarf es einer genauen Charakterisierung dieser DCC. Das Ziel dieser Arbeit war die Isolation und molekulare Charakterisierung der DCC. Zur Detektion wurde in dieser Arbeit ein Antikörper gegen den Oberflächenmarker EpCAM gewählt, der die Isolation lebender Zellen und dadurch, neben der Genomanalyse, auch die Transkriptomanalyse der Einzelzellen ermöglicht. Zunächst sollte geklärt werden, ob mit diesem Marker geeignete Zellen detektiert werden können. Zu diesem Zweck sollte eine Doppelfärbung gegen EpCAM und Zytokeratin (CK), dem am häufigsten verwendeten Antigen zur Detektion von DCC im Knochenmark, durchgeführt werden. Da auch im Knochenmark von gesunden Spendern EpCAM⁺ Zellen auftreten, war nicht klar, wie groß der Anteil an Tumorzellen in den detektierten EpCAM⁺ Zellen tatsächlich ist. Aus diesem Grund sollte, neben den Knochenmarkproben von Mammakarzinom-Patientinnen, auch Knochenmark von gesunden Spenderinnen untersucht werden, um diese EpCAM⁺ Zellen zu analysieren, zu charakterisieren und molekulare Marker zu definieren, die eine Abgrenzung erlauben. Außerdem sollte Knochenmark von Patientinnen ohne manifeste Metastasen (M_0) und mit manifesten Metastasen (M_1) untersucht werden, um einen Vergleich zwischen der okkult systemischen und manifest systemischen Krebserkrankung zu ermöglichen. Mit Hilfe der zur Verfügung gestellten klinischen Daten sollten die Tumorcharakteristika der Patientinnen bei der Auswertung berücksichtigt und eine nähere Klassifizierung ermöglicht werden. Die Charakterisierung der detektierten EpCAM⁺ Zellen sollte sowohl anhand der Analyse des gesamten Genoms auf chromosomale Aberrationen als auch mit Hilfe der Genexpressionsanalyse erfolgen. Der Vergleich von Genotyp und Phänotyp der DCC von M_0 und M_1 Patientinnen sollte die Identifizierung von möglichen charakteristischen Aberrationen bzw. Genen, die mit der Tumorprogression zu einem metastatischen Phänotyp assoziiert sind, ermöglichen. Schließlich sollten auch die Genotypen EpCAM⁺ und CK⁺ DCC miteinander verglichen werden.

2. Kooperationspartner, humane Proben und Materialien

2.1 Kooperationspartner

Bereits präparierte Haftobjekträger mit humanen Knochenmarkaspiraten wurden von Dr. Daniel Oruzio (II. Medizinische Klinik, Zentralklinikum Augsburg) bereitgestellt.

Humane Knochenmarkaspirate von Mammakarzinom-Patientinnen wurden von Dr. Brigitte Rack, Dr. Thomas Blankenstein (beide Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum Innenstadt der LMU München), sowie Dr. Stefan Buchholz (Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Caritas-Krankenhaus St. Josef Regensburg), Prof. Dr. Helga Bernhard (Medizinische Klinik V – Onkologie und Hämatologie, Klinikum Darmstadt), Prof. Dr. Günter Schlimok und Dr. Daniel Oruzio (beide II. Medizinische Klinik, Zentralklinikum Augsburg) zur Verfügung gestellt. Von Dr. Stefan Buchholz wurden, zusätzlich zu den Knochenmarkaspiraten, vereinzelt Lymphknoten der operierten Patientinnen bereitgestellt. Humane Knochenmarkaspirate von weiblichen Kontrollen wurden von Prof. Dr. Michael Nerlich (Abteilung für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) und Dr. Matthias Maak (Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar, TU München) zur Verfügung gestellt.

Die Knochenmarkaspirate und Lymphknoten wurden in sterilen Behältnissen, meist bei Raumtemperatur bzw. in den Sommermonaten häufig gekühlt, zur Aufarbeitung an den Lehrstuhl für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren am Universitätsklinikum in Regensburg gebracht. Um die Gerinnung der Knochenmarkproben zu verhindern, wurden sie mit einem Antikoagulanz (Heparin) versetzt. Die Grundlage der Verwendung dieser Patientenproben für die Forschung beruht auf dem Ethikvotum 07/079.

2.2 Knochenmarkaspirate und Lymphknoten

In dieser Arbeit wurden Haftobjekträger mit Knochenmarkpräparationen von 42 Mammakarzinom-Patientinnen untersucht, die zwischen 2007 und 2008 operiert wurden. Des Weiteren wurden Knochenmarkaspirate von 96 M₀ und sieben M₁ Mammakarzinom-Patientinnen analysiert. Es standen außerdem Lymphknoten-Proben von 15 Patientinnen zur Verfügung. Von einer Patientin (MC-947) war eine solide Knochenmetastase verfügbar. Die klinischen Parameter dieser Patientinnen wurden, soweit verfügbar, von den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden 21 Knochenmarkproben von

gesunden Spenderinnen untersucht. Die für diese Arbeit verwendeten Knochenmarkaspirate und Lymphknoten sind zwischen September 2008 und Dezember 2012 eingegangen.

2.3 Materialien

2.3.1 Enzyme, Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 6: Verwendete Enzyme, Chemikalien, Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Firma
Acetonitril	Sigma
Acrylamid, 40 %	Merck
Adenosintriphosphat (ATP), 100 mM	Roche Diagnostics GmbH
Agarose	Sigma
Albumin Rinderserum (BSA), Fraktion V	Sigma
Albumin Rinderserum (BSA), Mol-Biol. 20 mg/ml	Roche Diagnostics GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Blockierungsreagenz	Roche
Borsäure (H_3BO_3)	J.T. Baker
C ₀ t-1-DNA, 1 mg/ml	Molecular Probes
C ₀ t-1-DNA, 1 mg/ml	Roche
Colcemidlösung, KaryoMAX, 10 µg/ml	GibcoBRL
Deoxy-Uridintriphosphat konjugiert mit Biotin (bio-dUTP), 1 mM	Roche
Desoxy-Adenosintriphosphat (dATP), 100 mM	GE Healthcare GmbH
Desoxy-Cytosin-Triphosphat (dCTP) konjugiert mit Biotin (bio-dCTP), 0,4 mM	Molecular Probes
Desoxy-Cytosin-Triphosphat (dCTP), 100 mM	GE Healthcare GmbH
Desoxy-Cytosin-Triphosphat konjugiert mit Digoxigenin (dig-dCTP), 1 mM	Perkin Elmer
Desoxy-Guanin-Triphosphat (dGTP), 100 mM	GE Healthcare Europe GmbH
Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Heringssperma, 10 mg/ml	Molecular Probes
Desoxy-Thymidintriphosphat (dTTP), 100 mM	GE Healthcare GmbH
Desoxy-Uridintriphosphat konjugiert mit Digoxigenin (dig-dUTP), 1 mM	Roche
Dextransulfat, Natrium	Sigma
4',6'-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI), 10 mg	Roche
Dichloro-dimethyl-silan, 2% und 1,1,1-Trichlorethan	Merck
DNA Größenstandard 2-Log-DNA-ladder	Molecular Probes
DNA Größenstandard low molecular weight DNA ladder	Molecular Probes
DNA Ligase T4, 5 U/µl	Roche
DNA Polymerase PanScript, 5 U/µl	Pan Biotech
DNA Taq-Polymerase, 5 U/µl	Roche
DTT (Dithiothreitol), 0,1 M	Molecular Probes
Eisessig	Merck
Ethanol, 100 %	J.T.Baker
Ethidiumbromid, 1 %	Fluka
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz	J.T. Baker
Expand long template PCR system (Puffer 1 und PolMix 5U/µl)	Roche Diagnostics GmbH
Ficoll Paque Plus	GE Healthcare Europe GmbH
Formamid	Merck

Fötales Kälberserum (FCS)	Pan Biotech
G418 (Geneticin), 1 mg/ml	Sigma
GelPilot DNA Loading Dye, 5x	Quiagen
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent
Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent
Goat serum	Molecular Probes
H ₂ O, HPLC grade	Biochrom AG
H ₂ O, mit Diethyldicarbonat (DEPC) behandelt	Molecular Probes
Hanks Salt Solution 10x, mit Phenolrot	Biochrom AG
Hanks Salt Solution, HBSS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , ohne Phenolrot, 0,35 g/l NaHCO ₃	Biochrom AG
HL60_EpCAM: (EpCAM ⁺ : transfiziert mit EpCAM)	Judith P. Johnson, Institut für Immunologie, LMU München
HL60_wt (EpCAM): Human promyelocytic leukemia cells - Promyeloblasten Zelllinie	ATCC® CCL-240™
humane AB-Serum	Biotest AG
Igepal CA-630	Sigma
Image-iT™ FX Signal Enhancer	Molecular Probes
Kaliumacetat, 5 M	Sigma
Kaliumchlorid (KCl), 1 M	Fluka
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
L-Glutamin (L-Glu), 200 µM	PAA
Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color	Agilent
Magnesium-Aacetat, 1 M	Fluka
Magnesiumchlorid, MgCl ₂ , 1 M	Sigma
Maleinsäure	Sigma
MCF-7	ATCC® HTB-22™
Methanol	Merck
Mineralöl	Sigma
mTRAP lysis buffer	Active Motif
mTRAP PNA (Peptid-Nukleinsäure konjugiert mit Biotin)	Active Motif
mTRAP Protease	Active Motif
mTRAP Streptavidin Beads	Active Motif
Natriumacetat (pH 5,2), 3 M	Calbiochem
Natriumchlorid (NaCl), 0,9 %	B.Braun
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10%	Ambion
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
PCR Purification Kit	Quiagen
Penicillin, 10.000 U/ml + Streptomycin, 10 µg/ml (Pen/Strep, 100x)	Sigma
Pepsin, 1 g	Roche
Pepton	GibcoBRL
Percoll	GE Healthcare Europe GmbH
Phytohämagglutinin-M	Molecular Probes
Proteinase K, 21,4 mg/ml	Roche
Reaktionspuffer für RE (NEB Puffer 1), 10x	New England Biolabs
Reaktionspuffer für RE (NEB Puffer 4), 10x	New England Biolabs
Reaktionspuffer für RE (R Puffer) für BSA, 10x	Fermentas
Reaktionspuffer für RT SS II (FS Puffer), 5x	Molecular Probes
Restriktionsendonuklease (RE) BsmAI, 5.000 U/ml	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease (RE) HaeIII, 10.000 U/ml	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease (RE) Hpy188III, 5.000 U/ml	New England Biolabs

Restriktionsendonuklease (RE) HpyCH4V, 5.000 U/ml	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease (RE) Msel, 50.000 U/ml	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease (RE) NialIII, 10.000 U/ml	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease (RE) Psil, 5.000 U/ml	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease (RE) PstI, 20.000 U/ml	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease (RE) TruI1, 50 U/µl	Fermentas
Reverse Transcriptase Super Script II (SSII) 200 U/µl	Molecular Probes
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Sigma
RNA Spike-In Kit, One-Color	Agilent
RPMI 1640 Medium	Pan Biotech
Salzsäure (HCl), 37 % (12 M)	J.T.Baker
Saponin	Sigma
TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) 30 U/µl	USB
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	AppliChem
Trinatriumcitrat Dihydrat	AppliChem
Tris	AppliChem
Tris-Aacetat	Sigma
Tris-HCl, molecular biology grade (pH 8), 1 M	Sigma
tRNA, 100 mg	Roche
Trypanblau	VWR International GmbH
Trypsin, 0,5 % + EDTA, 0,2 % in 1xPBS (Trypsin/EDTA)	PAA
Tween-20	Sigma
Vectashield, 10 ml	Vector Laboratories

2.3.2 Puffer, Lösungen und Medien

10 % AB Serum in 1x PBS/2 % Pepton

5 ml AB Serum in 45 ml 1x PBS / 2 % Pepton

Antikörperlösung für die mCGH, CGHAb

100 mg BSA (Fraktion V) in 500 µl FCS, 9,5 ml 1x PBS/0,2 % Tween 20

10 % Blockierungsreagenz

50 g Blockierungsreagenz in 500 ml Maleinsäure-Puffer

Blocklösung für die mCGH

3 g BSA (Fraktion V), 5 ml FCS, 95 ml 1x PBS/0,2 % Tween 20

cDNA-Igepal Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 0,25 % Igepal)

0,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,75 ml 1 M KCl, 1 ml 0,1 M DTT, 25 µl Igepal und 7,73 ml H₂O (DEPC)

cDNA-Tween 20 Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 0,25 % Tween 20)

0,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,75 ml 1 M KCl, 1 ml 0,1 M DTT, 50 µl Tween 20 und 7,75 H₂O (DEPC)

30 % Dextransulfat in 4x SSC

3 g Dextransulfat in 10 ml 4x SSC

2 mM dGTP

20 µl 100 mM dGTP, 980 µl H₂O (DEPC)

1 mM DTT

0,1 ml 0,1 M DTT, 9,9 ml H₂O (DEPC)

4 x 10 mM dNTP

10 µl 100 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP und 60 µl H₂O (HPLC)

7/8 dNTP 38,75 mM (10 mM dATP, dCTP, dGTP, 8,75 mM dTTP)

Je 5 µl 100 mM dATP, dCTP, dGTP, 4,375 µl 100mM dTTP und 30,63 µl H₂O (HPLC)

2/7 dNTP (10 mM dATP, dGTP, 8,4 mM dTTP, dCTP)

Je 5 µl 100 mM dATP, dGTP, je 4,2 µl 100mM dTTP, dCTP und 31,6 µl H₂O (HPLC)

0,5 M EDTA, pH 7,4

18,61 g EDTA in 95 ml H₂O (aq. dest.), pH 7,4, ad 100 ml mit H₂O, sterilfiltrieren

70 % Etanol

70 ml absoluter Ethanol, 30 ml H₂O (aq. dest.)

Fixativ

1,5 l Methanol, 0,5 l Eisessig (Verhältnis 3:1)

20 % Formamid

2 ml Formamid, 8 ml H₂O (DEPC)

70 % Formamid in 2x SSC, pH 7,3

70 ml Formamid, 10 ml 20x SSC, 20 ml H₂O (aq. dest.)

1 M HCl

83,3 ml 12 M HCl, 916,7 ml H₂O (aq. dest.)

10 mM HCl, pH 2

10 ml 1 M HCl, 990 ml H₂O (aq. dest.), pH 2

10 % Igepal

1 ml Igepal CA-630 (100 %), 9 ml H₂O (DEPC)

0,075 M KCl

5,6 g KCl in 500 ml H₂O (aq. dest.)

1 M KH₂PO₄, pH 7

1,36 g KH₂PO₄ in 10 ml H₂O (DEPC), pH 7, sterilfiltrieren

MACS Puffer (0,5 % BSA, 2 mM EDTA in 1x PBS)

2,5 g BSA (Fraktion V), 2 ml 0,5 M EDTA (pH 7,4) in 500 ml 1x PBS

Maleinsäure-Puffer, pH 7,5

5,8 g Maleinsäure, 4,38 g NaCl ad 500 ml H₂O (aq. dest.), pH 7,5

40 mM MgCl₂

0,4 ml 1 M MgCl₂, 9,6 mL H₂O (DEPC)

10x OPA (onePhorAll) Puffer (100 mM Tris-acetat, 100 mM Magnesiumacetat, 500 mM Kaliumacetat)

1,18 g Tris-Acetat in 8,8 ml H₂O (HPLC), pH 7,5, 1 ml 1 M Magnesiumacetat, 200 µl 5 M Kaliumacetat, sterilfiltrieren

10x PBS (85 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, 1,5 M NaCl)

180 g NaCl, 28,66 g Na₂HPO₄, 5,34 g KH₂PO₄ in 2 l H₂O (aq. dest.)

1x PBS/2 % Pepton

2 g Pepton in 100 ml 1x PBS

1x PBS + 0,2 % Tween 20, pH 7,4

100 ml 10x PBS, 898 ml H₂O (aq. dest.), pH 7,4, 2 ml Tween 20

10x PCR Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 500 mM KCl, 10 mM MgCl₂)

5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,5), 25 ml 1 M KCl, 500 µl 1 M MgCl₂ und 19,5 ml H₂O (HPLC)

10x PCR Puffer + 4 x 1 mM dNTP

Je 5 µl 100 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP und 480 µl 10x PCR-Puffer

100 mg/ml Pepsin

1 g Pepsin in 10 ml H₂O (HPLC)

100 % Percoll, pH 7,4

45 ml Percoll, 4,05 ml HSS mit Phenolrot; pH 7,4, sterilfiltrieren

65 % Percoll

32,5 ml 100 % Percoll (pH 7,4), 17,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung

37,5 µM Poly-T PNA-bio

15 nmol Poly-T PNA-bio in 400 µl H₂O (DEPC)

Polyacrylamid-Träger 0,25 %

40 ml 6,25 % Acrylamid, 100 µl 0,5 M EDTA (pH 8), 2 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 333 µl 3 M Natriumacetat (pH 7,0), 47,6 ml H₂O (HPLC), 0,5 g APS, 50 µl TEMED

20 µg/µl Protease

8 mg Protease in 400 µl H₂O (DEPC)

Proteinase K, 10 mg/ml

46 µl Proteinase K (21,4 mg/ml), 54 µl H₂O (HPLC)

RPMI1640 + 10 % FCS + 2 mM L-Glu + 1x Pen/Strep

500 ml RPMI1640, 55 ml FCS, 5,5 ml 200 mM L-Glu, 5,5 ml 100x Pen/Strep

20x SSC (300 mM Natriumcitrat, 3 M NaCl)

175,3 g NaCl, 88,2 g Tri-natriumcitratdihydrat in 1 l H₂O (aq. dest.), pH 7

4x SSC + 0,2 Tween-20, pH 7,4

200 ml 20x SSC, 798 ml H₂O (aq. dest.), pH 7,4, 2 ml Tween 20

2x SSC + 0,1 % SDS

50 ml 20x SSC, 5 ml 10 % SDS, 445 ml H₂O (aq. dest.)

Tailing-Waschpuffer (50 mM KH₂PO₄, 1 mM DTT, 0,25 % Igepal)

0,5 ml 1 M KH₂PO₄ (pH 7), 100 µl 0,1 M DTT, 25 µl Igepal und 9,38 ml H₂O (DEPC)

10x TBE (0,9 M Tris, 0,9 M H₃BO₃, 20 mM EDTA)

539 g Tris, 275 g Borsäure, 37 g EDTA in 5 l H₂O (aq. dest.)

1 M Tris

60,57 g Tris in 500 ml H₂O (aq. dest.)

25 µg/µl tRNA

100 mg tRNA in 4 ml H₂O (DEPC)

2x Trypsin/EDTA in 1x PBS

10 ml 10x Trypsin / EDTA, 40 ml 1x PBS

10 % Tween 20

1 ml Tween 20, 9 ml H₂O (HPLC)

2.3.3 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
α-APC-Micro-beads	130-090-855	Miltenyi Biotec GmbH
Avidin-Cy3.5, 1 mg/ml	A003-12	Rockland Immunochemicals
α-CD11b-APC	130-091-241	Miltenyi Biotec GmbH
α-CD235a (Glycophorin A)-Micro-beads	130-050-501	Miltenyi Biotec GmbH
α-CD326 (EpCAM HEA 125)-PE	130-091-253	Miltenyi Biotec GmbH
α-CD33-APC	MHCD3305	Molecular Probes
α-CD45-APC	MHCD4505-4	Molecular Probes
DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole-dihydrochloride)	5268826001	Roche Diagnostics
α-Digoxigenin-Fluorescein, Fab fragments, 200 µg/ml	11 207 741 910	Roche
α-Fluorescein Alexa Fluor 488, goat IgG Fraktion, 1 mg/ml	A11096	Molecular Probes
EpCAM 3B10 C9, mouse monoclonal antibody	-	Micromet
EpCAM 3B10 C9, mouse monoclonal antibody, biotinyliert *	-	Micromet
Epithelial Antigen (EpCAM, C-term) rabbit monoclonal antibody	1144-1	Epitomics
Fluorescein (FITC) conjugated Streptavidin, 1,8 mg/ml	016-090-084	Jackson Immuno Research
goat α-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488, F(ab) ₂ Fragment, 2 mg/ml	A-11017	Molecular Probes
goat α-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488, highly cross-adsorbed, 2 mg/ml	A-11029,	Molecular Probes
goat α-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488, 2 mg/ml	A-11001	Molecular Probes
goat α-mouse IgG Cy3, F(ab) ₂ Fragment, 0,7 mg/ml	115-166-006	Jackson ImmunoResearch
goat α-rabbit Cy3-conjugated Affinity Pure F(ab) ₂ IgG (H+L), 1,5 mg/ml	111-166-003	Jackson ImmunoResearch
goat α-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 555 F(ab) ₂ , highly cross-adsorbed, 2 mg/ml	A-21429	Molecular Probes
Hoechst 33342 (Bisbenzimid H33342)	H1399	Molecular Probes
Isotype control IgG1κ biotinyliert, 1 mg/ml*	M 9269	Sigma
Isotype control Mouse IgG1/FITC, 100 mg/l	X0927	Dako
Isotype control Mouse IgG1κ , 1 mg/ml	M 9269	Sigma
Isotype control rabbit IgG	Iso 1247	Epitomics
Mouse monoclonal antibody A45-B/B3 biotinyliert*, 0,2 mg/ml	R002A	Micromet (AS Diagnostik)
Mouse monoclonal antibody A45-B/B3, 0,2 mg/ml	R002A	Micromet (AS Diagnostik)
Mouse monoclonal α-human Epithelial Antigen/FITC (BerEP4-FITC), 100 mg/l	F0860	Dako
Streptavidin Alexa Fluor 488, 1 mg/ml	S11223	Molecular Probes
Streptavidin-Cy3, 1,8 mg/ml	016-160-084	Jackson ImmunoResearch

* Biotinylierung wurde in der Arbeitsgruppe durchgeführt

2.3.4 Oligonukleotide und Primer

Tabelle 8: Oligonukleotide und Primer für spezifische PCR: verwendete Konzentration: 8 µM

Gen/Marker	Position	Zielstruktur	Oligo	Sequenz	Fragment [bp]	T _A [°C]
<i>ACTB</i>	7p15-12	cDNA	5'	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	540	58
			3'	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC		
<i>D5S2117</i>	5q31.1	gDNA	5'	CCAGGTGAGAACCTAGTCAG	140	58
			3'	ACTGAGTCTCCAACCATGG		
<i>EEF1A1</i>	6q14.1	cDNA	5'	TGCCCCAGGACACAGAGACT	290	58
			3'	CTGTGTCGGGTTGTAGCCA		
<i>EPCAM</i>	2p21	cDNA	5'	AAAGTTGCGGACTGCACTT	161	55
			3'	AGCCCACATCAGCTATGTCCA		
<i>ERBB2Δ16 (I)</i>	17q12	cDNA	5'	CCTACATGCCCATCTGGAAG	wt: 145 Δ: 97	62
			3'	GCAGAGATGATGGACGTCAG		
<i>ERBB2Δ16 (II)</i>	17q12	cDNA	5'	GCCTGTGCCCACTATAAGGA	wt: 236 Δ: 188	62
			3'	ACCAGCAGAACATGCCAACCA		
<i>ERBB2Δ16 (III)</i>	17q12	cDNA	5'	CAACTGCACCCACTCCCC	97	62
			3'	CTTGATGAGGATCCCAAAGACC		
<i>ERBB2Δ16 (IV)</i>	17q12	cDNA	5'	GCACCCCCTCTGACG	400	62
			3'	CCCACACCAGCCATCACGTA		
<i>GAPDH</i>	12p13	cDNA	5'	AATCCCATACCATCTCCAG	384	58
			3'	GCCATCACGCCACAGTTCC		
<i>HBB</i>	11p15.5	cDNA	5'	AAGCTGCTTCTGCTGTC	109	63
			3'	AGGCAGAACATCCAGATGCTCA		
<i>KRT5</i>	12q	cDNA	5'	GGAGCTCATGAAACACCAAGC	103	64
			3'	TGGTCCAACTCCTTCTCAC		
<i>KRT6a</i>	12q12-q13	cDNA	5'	GTGAGGAGTGCAGGCTGAAT	154	64
			3'	CCAAGACCCTGCCATAGGA		
<i>KRT8</i>	12q13	cDNA	5'	GCGTACAGAGATGGAGAACGA	150	58
			3'	AGCTCCGGATCTCCTCTT		
<i>KRT14</i>	17q12-q21	cDNA	5'	CGCAGTCATCCAGAGATGTG	182	62
			3'	GGGATCTTCAGTGGATCT		
<i>KRT18</i>	12q13	cDNA	5'	GGAAGATGGCGAGGACTTA	157	55
			3'	CCTGCTCTGCTGGCTTAAT		
<i>KRT19</i>	17q21.2	cDNA	5'	AGCCGGACTGAAGAATTGAA	162	62
			3'	TTCTGCCAGTGTGCTTCCA		
<i>KRT19P1</i>	6q13	gDNA	5'	GAAGATCCGCGACTGGTAC	614	58
			3'	TTCATGCTCAGCTGTGACTG		
<i>PKM1 (I)</i>	15q22	cDNA	5'	TGAAGAACTGTGCGAGCCTC	131	62
			3'	GAGCAGACCTGCCAGACTCC		
<i>PKM2 (I)</i>	15q22	cDNA	5'	TGAGGAACCTCGCCGCCTGG	131	62
			3'	GAGCAGACCTGCCAGACTTG		
<i>PKM1 (II)</i>	15q22	cDNA	5'	AGGCAGCCATGTTCCACCGC	159	62
			3'	GAGCAGACCTGCCAGACTCC		
<i>PKM2 (II)</i>	15q22	cDNA	5'	AGGCTGCCATCTACCACTTG	159	62
			3'	GAGCAGACCTGCCAGACTTG		
<i>PTPRC</i>	1q31-32	cDNA	5'	TTAGGGACACGGCTGACTTC	106	62
			3'	GCTTGGCCCTGTACAAATA		
<i>S100A11</i>	1q21	cDNA	5'	TGCCTTCACAAAGAACCGAGA	116	57
			3'	GGCCACCAATCAGATTAAGAA		
<i>TP53</i>	17p13.1	gDNA	5'	GAAGCGTCTCATGCTGGATCC	374	58
			3'	CAGCCCAACCCTTGTCCCTTA		

Tabelle 9: Oligonukleotide und Primer für die primäre Amplifikation humarer cDNA und gDNA

Oligonukleotid	Zielstruktur	Sequenz
CFL15CN8	cDNA	5'-CCCCCCCCCCCGTCTAGANNNNNNNN-3'
CFL15CT24	cDNA	5'-CCCCCCCCCCGGTCTAGATTTTTTTTTTTTTVN-3' *
CP2	cDNA	5'-TCAGAATTGATGCCCGCCGCCGCC-3'
CP2-Cy5	cDNA	5'-3CAGAA3TCA3GCCXCCCXCCXCCCX-3' **
LIB1	gDNA	5'-AGTGGGATTCTGCTGTCAGT-3'
ddMse11	gDNA	5'-TAAC TGACAG ddC-3'

* V=A/C/G; N=A/C/T/G

** 3=Cy5-dU, X=Cy5-dC

2.3.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Acht-Feld-Objekträger	Fisher Scientific
Agilent whole human genome (4 x 44k) oligo microarray kit with sure print technology	Agilent Technologies
Deckgläser, 18 x 18 mm; 24 x 60 mm; 76 x 26 mm	Menzel
Diagnostik-Objekträger (Haftobjekträger)	Roth
Filter 0,22 µm	Millipore
Filterspitzen	Biozym
Gasketslide für Microarray	Agilent
Glasflaschen	Schott
Glasobjekträger, geschliffen	Roth
Hämacytometer Deckgläser 20 x 26 mm	Schubert & Weiss OMNILAB
Hellendahl-Küvette	Roth
Kryoröhrchen	Nalgene
MACS Separation Columns-LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH
Microtubes, Kunststoff	Thermo
Mikro-Hämatokrit-Kapillare	Brand GmbH & Co KG
Montagekleber (Fixogum)	Marabu
Neubauer-Zählkammer	Schubert & Weiss OMNILAB
Pasteurpipetten, Kunststoff	Sarstedt
96-PCR Platte	Peqlab - Biotechnologie GmbH
Pipetten	Gilson
Polypropylen-Reaktionsgefäß (0,2 ml)	Eppendorf
Polypropylen-Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Polypropylen-Reaktionsgefäß, silanisiert * (0,2 ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten, Kunststoff, steril	Greiner Bio-One
Zellkultur-Flaschen	Sarstedt
Zellsieb (Porengröße 40 µm)	BD Falcon
Zentrifugenröhrchen, steril	Greiner Bio-One

* Silanisierung wurde in der Arbeitsgruppe durchgeführt

2.3.6 Geräte

Tabelle 11: Benutzte Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Arrayscanner Axon Gene Pix 4400A	MDS Analytical Technologies
Brutschrank	Thermo Scientific
Fluoreszenzmikroskop, DMRXA	Leica
Gelkammer, Elektrophoresegerät PerfectBlue Gelsystem	Peqlab - Biotechnologie GmbH
Hybridisationsofen	Biometra GmbH
Hybridisierungsofen + Rotatorenhalter	Agilent
Invertmikroskop	OPTECH
Magnetrührer	CLN - Chemikalien und Laborbedarf Nierle
Magnetständer für 0,2 ml Tubes	Dynal
Magnetständer für immunomagnetische Separation, MACS	Miltenyi Biotec GmbH
Medimachine	DAKO
Mikroskop, Axioskop 40 Zeiss	Zeiss
Mikrozentrifuge	Grant Bio / Kisker
NanoDrop 2000c	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer	Schubert & Weiß, OMNILAB
Orbitalschüttler	Schmidt
PCR-Maschine	BioRad Laboratories GmbH
pH-Meter	Sartorius AG
Pipettierhilfe	Brand
Thermomixer	Eppendorf
UV Belichtung	Intas
Vortexer	VELP Scientifica
Waagen, elektronische	Kern
Wasserbad	Memmert

2.3.7 Datenbanken und Software

Tabelle 12: Verwendete Datenbanken und Software

Datenbank / Software	Website / Firma
Axio Vision LE	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen
BLAST NCBI	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Cyto Vision / Genus	Applied Imaging, USA
GenePixPro 7.0, Molecular Devices	Molecular Devices, USA
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software Inc., San Diego, USA http://www.graphpad.com/
NEBcutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
Progenetix oncogenomic online resource	http://www.progenetix.org
PubMed - NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
R-Bioconductor – Open Source Software for Bioinformatics	http://www.bioconductor.org/
STATA – Statistics / Data Analysis	StataCorp LP, Texas, USA; http://www.stata.com

3. Methoden

3.1 Aufbereitung von primärem humanem Gewebe

Das Ziel der folgenden Aufarbeitung ist die Abtrennung von extrazellulären Bestandteilen (z.B. Serum, Fett) und unerwünschten zellulären Bestandteilen (Thrombozyten, Erythrozyten, Granulozyten). Die mononukleären Zellen (MNZ) werden angereichert, um bei der späteren Suspensionsfärbung mit höherer Wahrscheinlichkeit eine disseminierte Krebszelle zu detektieren. Die Patientenproben werden nach Anlieferung innerhalb von 2-5 h bei 4 °C oder auf Eis aufgearbeitet. Zelluläre Prozesse, die die Genexpression der Zellen verändern könnten, sollen dadurch verringert werden.

3.1.1 Aufarbeitung von Knochenmarkproben

Es werden 5-10 ml Knochenmark in einem 50 ml Zentrifugenrörchen mit Hank's Salzlösung auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 170 x g zentrifugiert. Der Überstand, der Fett und Thrombozyten enthält, wird verworfen. Dieser Waschschritt wird ein weiteres Mal wiederholt. Proben mit sichtbaren Gerinnseln werden verworfen. Das Pellet wird mit 9 ml Hank's Salzlösung resuspendiert. In ein Zentrifugenrörchen werden 6 ml Percoll 65 % (bzw. Ficoll, Percoll 60 % mit einer Dichte von jeweils $1,077 \text{ g/cm}^3$ oder Percoll 70 % mit einer Dichte von $1,089 \text{ g/cm}^3$) vorgelegt und die Zellsuspension vorsichtig überschichtet, so dass zwei Phasen entstehen (Abbildung 2). Anschließend wird 20 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die 65 % Percoll Lösung hat eine Dichte von $1,083 \text{ g/cm}^3$. Granulozyten mit einer Dichte von $1,080\text{-}1,095 \text{ g/cm}^3$ und Erythrozyten ($1,09\text{-}1,11 \text{ g/cm}^3$) können den Gradienten passieren (Muñoz und Leff, 2006). Die Interphase (Abbildung 2) mit den MNZ wird vorsichtig entnommen und in

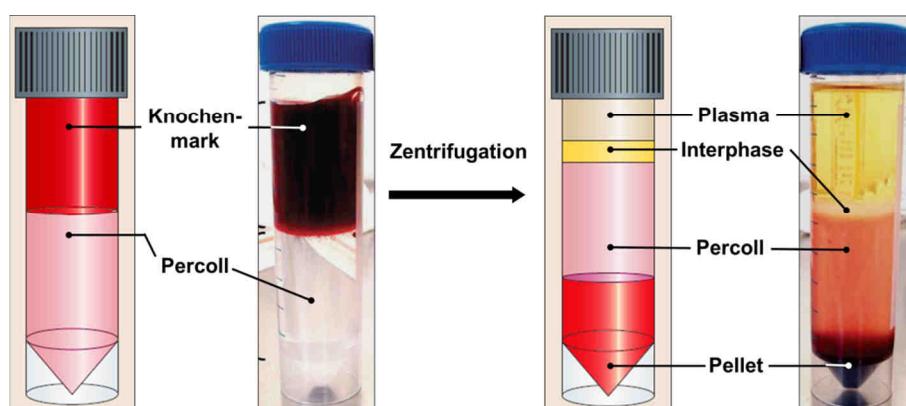


Abbildung 2: Übersicht der verschiedenen Phasen vor und nach der Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Zellsuspension wird auf Percoll 65 aufgetragen. Nach der Zentrifugation befinden sich Erythrozyten und Granulozyten im Sediment, mononukleäre Zellen (MNZ) in der Interphase. Modifiziert nach Pantel und Brakenhoff, 2004

ein 50 ml Zentrifugenröhren überführt. Nach Auffüllen mit PBS (pH 7,4) wird 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 2-5 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahl wird mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, wobei tote Zellen mit einer Trypanblau-Färbung ausgeschlossen werden. Bei kleinen Zellzahlen werden die Zellen anschließend gefärbt. Beträgt die Zellzahl mindestens 10^7 wird die immunomagnetische Zellseparation (MACS) angeschlossen. Mit diesem Verfahren werden zielgerichtet spezifische Zellpopulationen aus heterogenen Suspensionen abgetrennt (negative Selektion, Abbildung 3). Dazu wird die Zellsuspension 5 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Pro 10^7 MNZ werden die Zellen mit 10 µl α -CD11b-APC (Allophycocyanin), jeweils 5 µl α -CD45-APC und α -CD33-APC in 90 µl MACS Puffer für 10 min inkubiert. Überschüssige Antikörper werden durch Waschen mit dem zehnfachen Volumen an MACS Puffer entfernt. Für die 15 minütige Inkubation mit den Sekundärantikörpern werden 20 µl α -APC-Beads und 20 µl α -GlyA-Beads (Glycophorin A) in 60 µl MACS Puffer gemischt. Nach dieser Bead-gekoppelten Antikörperinkubation werden überschüssige paramagnetische Partikel (Beads) durch Waschen mit zehnfachem Volumen an MACS Puffer entfernt. Das Pellet wird in 1 ml MACS Puffer resuspendiert und über ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) in ein neues Zentrifugenröhren filtriert. So werden Zellaggregate abgetrennt, die die Säule verstopfen könnten. Nun werden die bead-markierten Zellen auf eine Säule im Magnetfeld aufgetragen und so immobilisiert, wodurch hämatopoetische Zellen abgetrennt werden sollen. Das Eluat (Negativfraktion) wird

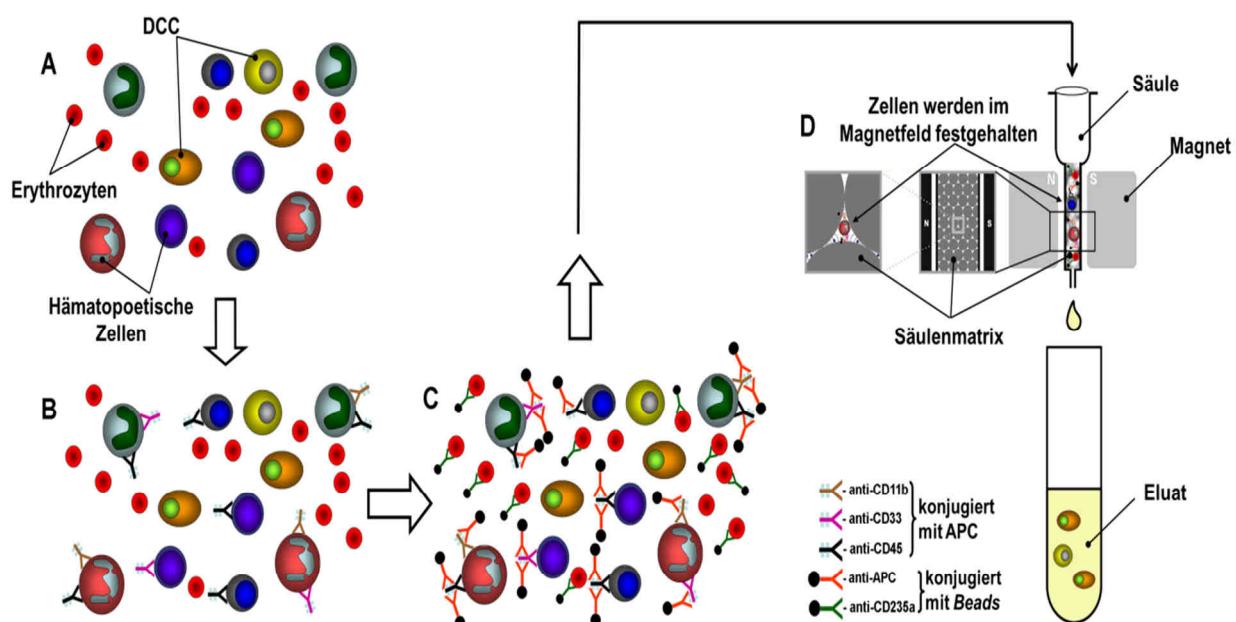


Abbildung 3: Schematische Darstellung der immunomagnetischen Zellseparation (MACS): Die heterogene Knochenmark-Zellsuspension (**A**) wird mit primären Antikörpern gegen ausgewählte Oberflächenproteine markiert (**B**). Anschließend werden die mit paramagnetischen Partikeln (*Beads*) konjugierten sekundären Antikörper zugegeben (**C**). Die unmarkierten Zellen werden im Magnetfeld abgetrennt, die *Bead*-konjugierten Zellen im Magnetfeld festgehalten (**D**). Modifiziert nach Gužvić, 2011 und Milteny, 2011

gesammelt und die Säule dreimal mit MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wird die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.1.2 Aufarbeitung von Lymphknoten

Das Lymphknotengewebe wird mit einem Skalpell zerkleinert und die gewonnenen Zellstücke portionsweise mit 1 ml Nährmedium (RPMI 1640 + L-Glutamin) in ein steriles Behältnis (50 µm) gegeben. Anschließend werden die Zellstücke mit Hilfe einer Mediomaschine 1 min mechanisch vereinzelt. Die entstandene Zellsuspension wird mit Hank's Salzlösung auf 35 ml aufgefüllt und 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die MNZ mit einem Percoll 60 % Gradienten (Dichte 1,077 g/cm³) aufgetrennt. Nach anschließendem Waschen werden die Zellen gezählt und mit dem EpCAM-Antikörper HEA125-PE gefärbt.

3.2 Immunzytochemie

3.2.1 Doppelfärbung gegen EpCAM und Zytokeratine auf Haftobjektträgern

Mit Hilfe einer Doppelfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die epithelialen Antigene CK8/CK18/CK19 sowie EpCAM werden DCC in Knochenmarkpräparationen auf Haftobjektträgern detektiert. Je Patientin werden 2 Millionen Zellen gefärbt und zusätzlich jeweils 1 Million für die Isotypkontrolle verwendet. Im ersten Schritt werden durch eine Inkubation mit 10 % humanem AB-Serum in PBS unspezifische Bindungen blockiert. Dies wird über Nacht (ca. 15 Stunden) in einer feuchten Kammer bei 4 °C durchgeführt. Anschließend werden die Haftobjektträger mit den Primärantikörpern A45-B/B3 gegen CK (2 µg/ml) und E144 gegen EpCAM (Konzentration nicht bekannt, 1:100 verdünnt in 10 % AB-Serum in PBS) für 45 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Je Auftragsfläche des Haftobjektträgers werden 250 µl Antikörperferverdünnung verwendet. Nach dreimaligem Waschen von je 3 min mit PBS in einer Hellendahl-Küvette auf dem Orbitalenschüttler, erfolgt die Inkubation mit den Sekundärantikörpern α-Maus-Alexa 488 und α-Kaninchen-Alexa 555 (15 µg/ml bzw. 20 µg/ml). Die 30 minütige Inkubation sowie alle weiteren Schritte erfolgen lichtgeschützt. Nach erneutem dreimaligem Waschen findet die Kernfärbung mit Hoechst 33342 (0,25 µg/ml) statt. Nach Inkubation von 1 min wird zweimal mit PBS gewaschen. Abschließend werden die Zellen mit 1 % Paraformaldehyd für 5 min fixiert und nach erneutem dreimaligem Waschen bis zur weiteren Verwendung in einer Hellendahl-Küvette mit PBS gelagert. Die Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper (Alexa 488 und Alexa 555) ermöglichen die Visualisierung (Tabelle 13). Als Positivkontrolle werden Haftobjektträger mit Zellen der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7, 1:100 gemischt

Tabelle 13: Absorption und Emission aller verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe; basierend auf ABCAM, 2013

Fluoreszenzfarbstoff	Wellenlänge Absorption [nm]	Wellenlänge Emission [nm]	Filter*	Farbe
Hoechst 33342	343	483	DAPI	Blau
DAPI	345	455	DAPI	Blau
Alexa Fluor 488	494	517	FITC	Grün
Fluorescein FITC	495	518	FITC	Grün
PE (R-phycoerythrin)	480; 565	578	Cy3	Orange
Alexa Fluor 555	556	573	Cy3	Orange
Cy3.5	581	596	Cy5	Rot
Cy5 **	650	670	Cy5	Rot

* Filter bei Verwendung des Zeiss Mikroskop; ** nur im Mikroskop sichtbar

mit peripheren Blutlymphozyten (PBL), verwendet. Als Negativkontrolle dienen Präparate desselben Patienten, die mit zwei Antikörpern des gleichen Isotyps gefärbt werden (Isotypkontrolle). Diese reagieren mit keinem menschlichen Antigen. Für die CK-Färbung wird Maus IgG1k (2 µg/ml) und für die EpCAM-Färbung Kaninchen IgG (Konzentration nicht bekannt, 1:100 verdünnt in 10 % AB-Serum in PBS) verwendet. Bei jeder Färbung werden Positivkontrolle und Isotypkontrolle parallel mit der Patientenprobe gefärbt. Nur Patienten mit negativer Isotypkontrolle werden auf EpCAM- und CK-positive Zellen untersucht.

3.2.2 Suspensionsfärbung gegen EpCAM

Wenn möglich werden 2 Millionen Zellen gefärbt. Dazu werden die Zellen mit PBS gewaschen und das Pellet in 10 % AB-Serum in 2 % Pepton/PBS resuspendiert. Nach der Zugabe von 2 µl des EpCAM-Antikörpers HEA125-PE (Konzentration nicht bekannt) werden die Zellen 15 min bei 4 °C rollend inkubiert. Die Suspension wird 5 min bei 500 x g abzentrifugiert und anschließend in 1000 µl PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 5 min bei 500 x g wird der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen. Die Suspension wird bei entsprechender Vergrößerung und geeigneter Wellenlänge (Tabelle 13) nach EpCAM⁺ Zellen untersucht. Bis Anfang 2009 wurde der EpCAM-Antikörper 3B10 in Kombination mit Cy3 bei 10,6 % aller Knochenmarkproben verwendet. Da dieser Antikörper nicht mehr verfügbar war, wurde statt 3B10 der Antikörper HEA125-PE verwendet, der an die gleiche Domäne bindet. Eine Isotypkontrolle wurde für die EpCAM-Suspensionsfärbung nicht routinemäßig durchgeführt, da nicht immer ausreichend Zellen für eine zusätzliche Färbung verfügbar waren und alle zu Beginn durchgeföhrten Isotypkontrollen negativ waren.

3.3 Isolierung von EpCAM⁺ Einzelzellen

Gefärbte EpCAM⁺ Zellen werden mit einem Mikromanipulator von einem Acht-Feld-Objektträger isoliert (Abbildung 4). Dazu wird der unter einem Invertmikroskop eingespannte

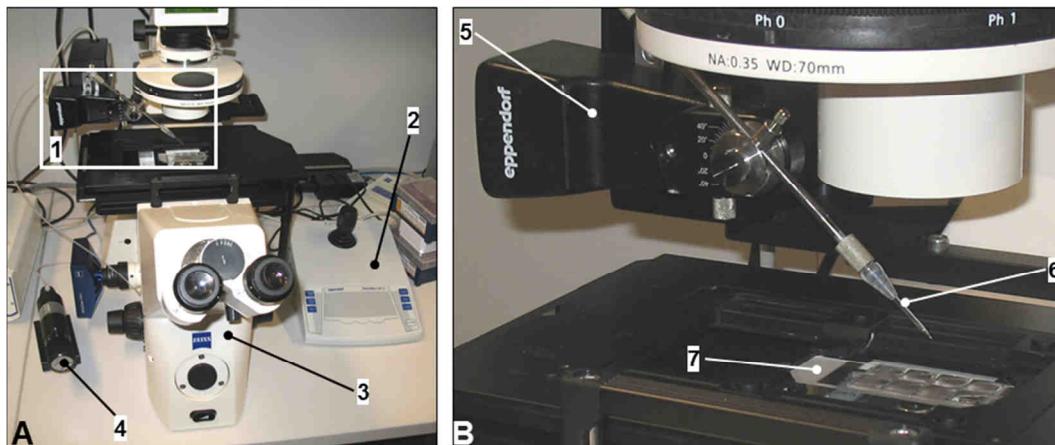


Abbildung 4: Fluoreszenz-Invertmikroskop zur Isolierung von Einzelzellen: **A:** Mikroskop und Vorrichtung zur Isolation von Einzelzellen: (1) Mikromanipulator mit Kapillare, (2) Bedienelement für den Mikromanipulator, (3) Mikroskop, (4) Pumpe; **B:** Objektträger mit Patientenprobe: (5) Mikromanipulator, (6) Kapillare, (7) Acht-Feld-Objektträger; Verwendung mit freundlicher Genehmigung von M. Gužvić

Objektträger zuerst mit BSA (20 mg/ml) gespült, um die Haftung der Zelle auf der Oberfläche zu verringern. Die gefärbte Zellsuspension wird so mit PBS verdünnt, dass ca. 300.000 Zellen in 200 µl auf einem Feld vorhanden sind. Ein zusätzliches Feld wird mit 200 µl PBS gefüllt und als Pickfeld benutzt. EpCAM⁺ Zellen werden mit einer FCS benetzten Glaskapillare (verhindert die Adhäsion der Zellen an Glas) eingesaugt und in das Pickfeld transferiert (Abbildung 5). Unter mikroskopisch gestützter visueller Kontrolle wird jede Einzelzelle mit einer 2 µl-Pipette eingesaugt und in 4,4 µl Lyse Mix (10 ng tRNA in Lysispuffer) aufgenommen. Als Negativkontrolle wird bei jeder Patientin eine Probe des Puffers auf dem Pickfeld (Pickkontrolle) genommen, um Kontaminationen des Puffers bzw. Verunreinigungen des Pickfeldes auszuschließen. Dies wird nach dem Picken der Zellen vom Pickfeld durchgeführt, in welchem die mit der Kapillare aufgesaugten Zellen in die Pipette überführt worden sind. Bis zur weiteren Bearbeitung werden die Zellen bei -80 °C gelagert. Die

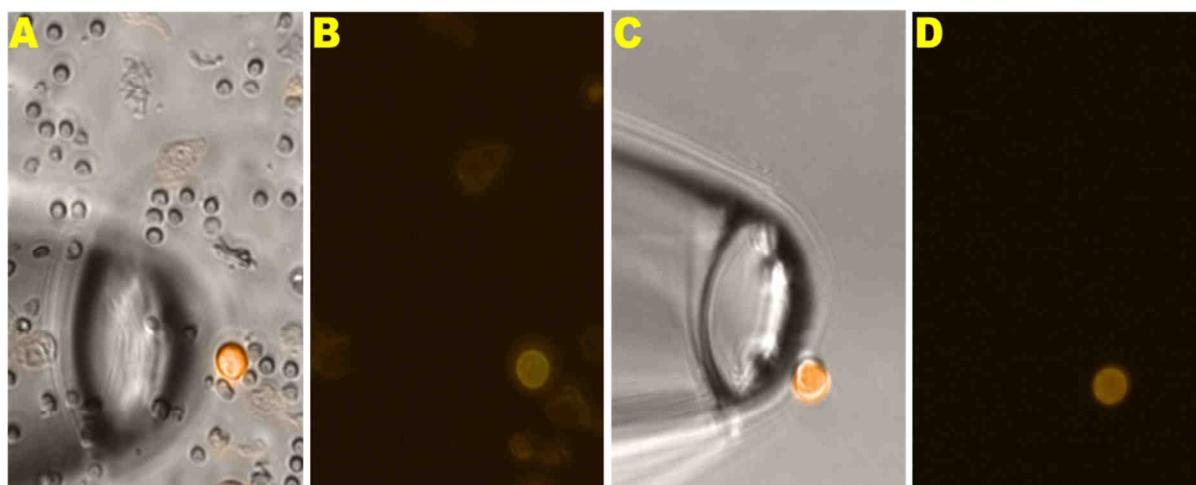


Abbildung 5: Isolierung von Einzelzellen: Nachdem die umliegenden ungefärbten Zellen verschoben wurden, wird die gefärbte Zelle mit der Kapillare angesaugt und ins Pickfeld transferiert. **A+B:** Gefärbte Zelle in der Suspension (**A:** Überlagerung Hellfeld, Cy3; **B:** Cy3), **C+D:** gefärbte Zelle nach dem Transfer ins Pickfeld (**C:** Überlagerung Hellfeld, Cy3; **D:** Cy3)

Negativkontrolle wird analog der Patientenzellen behandelt und bis zur Qualitätskontrolle von WTA-Produkt und WGA-Produkt mitgeführt. Nur bei negativem PCR-Ergebnis der Negativkontrolle werden die isolierten Zellen für die weiteren Analysen verwendet.

3.4 Amplifikation von Transkriptom und Genom der gleichen Zelle

3.4.1 Isolierung und Amplifikation des Transkriptoms

Das Ziel dieser Methode ist die Isolierung der gesamten mRNA einer einzelnen Zelle (0,1-6 pg mRNA) und deren Transkription in cDNA. Mittels PCR wird die cDNA anschließend amplifiziert, um für mehrere Analysen zur Verfügung zu stehen. Das verwendete Protokoll basiert mit geringfügigen Änderungen auf der von der Arbeitsgruppe veröffentlichten Methode (*Klein et al., 2002b; Klein et al., 2003; Hartmann und Klein, 2006*). Als Grundlage dafür dient die spezifische Isolation von mRNA mit Hilfe von Poly-T-Peptid-Nukleinsäure (PNA), die an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet.

Zuerst werden zu jeder aufgetauten Probe 1 µl Lysispuffer, 1 µg Protease und 1 µl biotinylierte PNA (37,5 µM) zugegeben und in der PCR-Maschine ein Temperaturprogramm gestartet (10 min 45 °C zum Verdau der Proteine, 1 min 75 °C, um die Sekundärstruktur der mRNA aufzuheben und die Protease zu inaktivieren und 10 min 22 °C zur Lyse und Freisetzung des Zellinhalts und Bindung der PNA-Oligos an die mRNA). Mit Hilfe von *Beads* ist dann eine Trennung von mRNA und den übrigen Bestandteilen (inkl. gDNA) im Magnetfeld möglich. Dazu werden 4 µl Streptavidin-*Beads* zugegeben und die Proben 45 min bei RT gerollt. Durch die Bindung der Streptavidin-*Beads* an Biotin entstehen mRNA-PNA Komplexe. Zu jeder Probe werden 10 µl cDNA-Igepal-Waschpuffer gegeben und die *Beads* an einem Magnetständer an der Gefäßwand immobilisiert. Der Überstand wird abgenommen und zur Aufarbeitung der genomischen DNA in ein silanisiertes Reaktionsgefäß mit 0,8 µl Polyacrylamid-Carrier überführt (Kapitel 3.4.2). Der Waschschnitt wird mit 20 µl cDNA-Tween-Waschpuffer und anschließend mit 20 µl cDNA-Igepal-Puffer wiederholt. Beide Überstände werden gesammelt und mit dem ersten vereinigt. Die isolierte mRNA wird mit Hilfe von Primern, die komplementär zum Poly-A-Schwanz sind, *revers* in cDNA transkribiert. So wird auch die 5'-Bindungsstelle für die späteren Primer, die während der globalen Amplifikation genutzt werden, eingefügt. Dazu werden die *Beads* in 2 µl 5x Reverse Transcription-Puffer, 1 µl DTT (0,1 M), 0,5 µl Igepal 10 %, 0,5 µl Wasser und 6 µl Primer resuspendiert. Es wird eine Primerkombination aus 3 µl CFL15CT24 (100 µM) und 3 µl CFL15CN8 (200 µM) verwendet. DTT verhindert als SH-Gruppen-Donator die Oxidation der Probe, das Detergenz Igepal die Aggregation der *Beads*. Die Primer werden für 10 min bei

RT angelagert, anschließend 2 µl 5x Reverse Transcription-Puffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTPs (4x 10 mM), 5 µl Wasser und 200 U Superscript II Reverse Transcriptase zugegeben und die Reaktionsgefäße 45 min bei 44 °C im Ofen rotiert. Nach der cDNA-Synthese werden die *Beads* am Magneten in 20 µl *Tailing*-Waschpuffer gewaschen, in 10 µl *Tailing*-Mix (4 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT, 0,2 mM dGTP, 10 mM KH₂PO₄) resuspendiert und der Ansatz mit 40 µl PCR-Öl überschichtet. Dies soll das Verdampfen der Probe bei den nachfolgenden Schritten verhindern. Eine PCR-Maschine wird auf 94 °C vorgewärmt und die Proben darin 4 min denaturiert. Im Anschluss werden sie direkt auf Eis gestellt, 24 U Terminal-Deoxynukleotid-Transferase (TdT) unter die Ölschicht zugegeben und die *Tailing*-Reaktion bei 37 °C für 60 min durchgeführt. Dadurch erfolgt die terminale Addition eines Poly-G-Schwanzes am 3'-Ende der cDNA und damit die Bildung einer zweiten Bindungsstelle für die Primer der globalen Amplifikation. Nach Inaktivierung der TdT bei 70 °C für 5 min werden 4 µl Expand Long Template Puffer 1, 7,5 µl Formamid 20 % und 24 µl Wasser zugegeben. Letztendlich wird die mRNA mit Hilfe der genannten Primer in einer PCR amplifiziert. Dazu werden die Proben in die PCR-Maschine transferiert und das PCR-Programm zur Amplifikation der cDNA gestartet (Tabelle 14). Bei Erreichen der 78 °C werden 2,5 µl CP2-Primer 24 µM, 1,75 µl dNTPs (10 mM) und 17,5 U Expand Long Template PolMix zugefügt. Das PCR-Produkt ist bei -20 °C stabil und dient als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen.

Tabelle 14: PCR-Programm für die Primäramplifikation der cDNA

	Temperatur	Dauer
1.	78 °C	0:30 min
2.	94 °C	0:15 min
3.	65 °C	0:30 min
4.	68 °C	2:00 min
5.	zurück zu 2., 19 Mal	
6.	94 °C	0:15 min
7.	65 °C	0:30 min
8.	68 °C	2:30 min + 10 sec/Zyklus
9.	zurück zu 6., 20 Mal	
10.	68 °C	7:00 min
11.	4 °C	∞

3.4.2 Aufarbeitung der genomischen DNA

Die Methode beruht auf dem publizierten Verfahren zur Aufarbeitung der genomischen DNA (*Klein et al., 1999; Stoecklein et al., 2002*). Dabei wird die gDNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen fragmentiert. An diese Fragmente, die *sticky ends* enthalten, werden Oligonukleotid-Adapter ligiert und so die Primer-Bindungsstelle für die anschließende

Amplifizierung eingefügt. Der DNA-Gehalt einer Zelle (7-8 pg) wird somit auf einige µg vervielfältigt.

Die gDNA aus den Überständen der mRNA-Waschschrifte (Absatz 3.4.1) wird in einem silanisierten Gefäß gesammelt, in dem 0,8 µl Polyacrylamid-Carrier (0,25 %) vorgelegt wurden. Die Silan-Beschichtung soll das Anhaften der DNA an die Kunststoffwände verringern. Die DNA wird mit 120 µl 100 %-igen Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Fällung wird für 45 min bei 20.800 x g und 4 °C abzentrifugiert, die Flüssigkeit bis auf 10 µl abgenommen und durch 180 µl 70 %-igen Ethanol ersetzt. Die Proben werden 10 min bei RT geschüttelt und dann 10 min bei 20.800 x g zentrifugiert. Dieser Waschschnitt wird noch zweimal wiederholt, dann wird der Alkohol komplett abgenommen, das Pellet kurz getrocknet und anschließend in 3,48 µl Wasser über Nacht auf dem Schüttler bei RT rückgelöst. Danach werden 0,5 µl OnePhorAll-Puffer (OPA 10x), je 0,13 µl Tween 10 % und Igepal 10 % sowie 2,6 µg Proteinase K zugegeben und der Verdau für 15 h bei 42 °C in der PCR-Maschine durchgeführt. Bei diesem Schritt werden die Proteine verdaut und die DNA freigesetzt. Anschließend wird die Proteinase K 10 min bei 80 °C inaktiviert. Die freigesetzte DNA wird mit 12.500 U Msel und 0,25 µl Wasser bei 37 °C für 3 h in der PCR-Maschine verdaut, anschließend das Enzym bei 65 °C in 5 min inaktiviert. Msel fragmentiert die gDNA. Während des Verdaus wird der Ligationsansatz bestehend aus 0,5 µl OPA-Puffer (10x), jeweils 0,5 µl LIB1- und ddMse11-Oligonukleotid (beide 100 µM) und 1,5 µl Wasser in der PCR-Maschine einem Temperaturgradienten zur Basenpaarung unterworfen (65 °C bis 15 °C für je 1 min pro Temperaturschritt, Tabelle 15). So wird ein doppelsträngiger Oligonukleotid-Komplex (Adapter) gebildet. Der Ansatz wird zusammen mit 5 U T4 DNA-Ligase und 1 µl ATP (10 mM) zum Produkt des Msel-Verdaus gegeben (Endvolumen 10 µl) und über Nacht bei 15 °C ligiert. Bei diesem Schritt werden die hybridisierten Adapter an die

Tabelle 15: PCR-Programm für die Primäramplifikation genomischer DNA

	Temperatur	Dauer
1.	68 °C	3:00 min
2.	94 °C	0:40 min
3.	57 °C	0:30 min
4.	68 °C	1:30 min + 1 sec/Zyklus
5.	zurück zu 2., 14 Mal	
6.	94 °C	0:40 min
7.	57 °C – 65 °C	0:30 min + 1 °C/Zyklus
8.	68 °C	1:45 min + 1 sec/Zyklus
9.	zurück zu 6., achtmal	
10.	94 °C	0:40 min
11.	65 °C	0:30 min
12.	68 °C	1:53 min + 1 sec/Zyklus
13.	zurück zu 10., 22 Mal	
14.	68 °C	3:40 min
15.	4 °C	∞

gDNA-Fragmente ligiert. Nach der Ligation wird der Ansatz zur Primäramplifikation mit 3 µl Expand Long Template Puffer 1, 2 µl dNTPs (10 mM), 35 µl Wasser und 5 U Expand LongTemplate PolMix aufgefüllt. Das PCR-Produkt ist bei -20 °C stabil und dient als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen.

3.5 Qualitätskontrolle der Amplifikation von Transkriptom und Genom

Im Anschluss an die globale Amplifikation des Einzelzell-Transkriptoms und -Genoms wird die Vollständigkeit der primären PCR überprüft. Damit soll die Qualität des WTA (Amplifikation des Gesamttranskriptoms, *whole transcriptome amplification*)-Produktes und des WGA (Amplifikation des Gesamtgenoms, *whole genome amplification*)-Produktes geprüft werden, um zu entscheiden, welche Zellen für weitere Analysen benutzt werden können. Für die Qualitätskontrolle des Transkriptoms wird die Expression von verschiedenen „Housekeeping“-Genen (β -Actin (*ACTB*), EF1 α (*EEF1A1*), *GAPDH*) untersucht. Zur Qualitätssicherung des Genoms werden spezifische *MseI* Fragmente mit den Markern p53 (*TP53*), Pseudogen CK19 (*KRT19P1*) und D5S2117, die sich auf unterschiedlichen Chromosomen befinden, überprüft. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 8 gezeigt. Weist eine Zelle in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese die spezifische Bande für mindestens zwei Marker auf, so wird sie für weitere Analysen verwendet. Der Reaktionsansatz zur Qualitätskontrolle wird vorbereitet und einem PCR-Programm unterzogen (Tabelle 16, Tabelle 17). Bei den genannten Primern wird eine Annealing-Temperatur (T_A) von 58 °C gewählt.

Tabelle 16: PCR-Ansatz für die Durchführung der Qualitätskontrolle

PCR	1x (µl)
PCR Puffer+dNTPs	1,00
5'-Primer (8 µM)	0,50
3'-Primer (8 µM)	0,50
BSA (20 µg/µl)	0,25
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,10
H ₂ O (HPLC)	7,25
Σ	9,6

3.6 Genspezifische PCR zur Überprüfung ausgewählter Transkripte

Mit Hilfe der genspezifischen PCR wurde die Expression von ausgewählten Genen (Tabelle 18) geprüft und analysiert. Die Beschreibung der verwendeten Primer und der jeweiligen Annealing-Temperaturen (T_A) ist in Tabelle 8 angegeben. Das WTA-Produkt wurde in einer 1:5 Verdünnung verwendet, die experimentelle Vorgehensweise entspricht Kapitel 3.5.

Tabelle 17: PCR-Programm für die Qualitätskontrolle von WTA- und WGA-Produkt

	Temperatur	Dauer
1.	94 °C	2:00 min
2.	T_A	0:30 min
3.	72 °C	2:00 min
4.	94 °C	0:15 min
5.	T_A	0:30 min
6.	72 °C	0:20 min
7.	zurück zu 4., 14 Mal	
8.	94 °C	0:15 min
9.	T_A	0:30 min
10.	72 °C	0:30 min
11.	zurück zu 8., 24 Mal	
12.	72 °C	2:00 min
13.	4 °C	∞

Tabelle 18: Genspezifische PCR - ausgewählte Gene

Gen	Name/Synonym
EPCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül, CD326
KRT5	CK5/Zytokeratin 5
KRT6a	CK6a/Zytokeratin 6a
KRT8	CK8/Zytokeratin 8
KRT14	CK14/Zytokeratin 14
KRT18	CK18/Zytokeratin 18
KRT19	CK19/Zytokeratin 19
PTPRC	CD45
PKM1	Pyruvatkinase M1
PKM2	Pyruvatkinase M2
ERBB2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 (<i>HER2</i>)
ERBB2Δ16	Exon-16 Spleißvariante von <i>ERBB2</i>
HBB	Hämoglobin beta
S100A11	S100 calcium binding protein A11, Calgizzarin

3.7 Markierungs-PCR (WTA-Produkt) für die *Microarray-Analyse*

Im Gegensatz zur Markierung durch den Einbau von gekennzeichneten Nukleotidderivaten werden für die Markierung des WTA-Produktes mit Cy5 markierte Primer verwendet. Der

Tabelle 19: Ansatz für die WTA-Produkt Markierung

PCR	1x (µl)
Roche Puffer 1	5,00
Formamid 20 %	7,50
CP2-Cy5 20 µM	5,00
dNTP-Mix (10 mM)	1,75
Polymerase Mix (5 U/µl)	0,75
H ₂ O	28,00
<i>Template</i>	1,00
Σ	49,00

Tabelle 20: PCR-Programm zur WTA-Produkt Markierung

	Temperatur	Dauer
1.	95 °C	1:00 min
2.	94 °C	0:15 min
3.	60 °C	1:00 min
4.	65 °C	3:30 min
5.	zurück zu 2., zehnmal	
6.	94 °C	0:15 min
7.	60 °C	1:00 min
8.	65 °C	3:30 min + 10 sec/Zyklus
9.	zurück zu 6., zweimal	
10.	65 °C	7:00 min
11.	4 °C	∞

Reaktionsansatz zur Markierung wird vorbereitet und einem PCR-Programm unterzogen (Tabelle 19, Tabelle 20).

3.8 Markierungs-PCR (WGA-Produkt) für die mCGH

Durch den Einbau von Nukleotidderivaten während einer Reamplifikations-PCR werden die Primäramplifikate zur Detektion nach einer Hybridisierung markiert. Das Verfahren basiert auf der PCR mit abweichender dTTP Konzentration in der dNTP Mischung (12,5 %) und die zusätzliche Verwendung von modifizierten dUTP (konjugiert mit Digoxigenin bzw. Biotin). Die Test-DNA wird dabei Digoxigenin-, die Referenz-DNA Biotin-markiert. Als Referenz dient diploide DNA, die von Leukozyten des peripheren Blutes von gesunden Spendern (PBL) gewonnen wird (Zellpool: 20-100 normale Leukozyten). Für die Mammakarzinom-Proben wird ein weibliches WGA-Produkt, für die Proben aus EpCAM⁺ Zellen ein männliches WGA-Produkt verwendet (*sex mismatch*, interne Kontrolle der mCGH). Der Reaktionsansatz zur Markierung wird vorbereitet und einem PCR-Programm unterzogen (Tabelle 21, Tabelle 22). Im Anschluss an die PCR wird für die Hybridisierung genomicscher DNA der Lib1 Primer durch einen Restriktionsverdau abgetrennt. Dadurch sollen mögliche störende Einflüsse des Adaptors bei der mCGH ausgeschlossen werden. Dazu werden zu den genomicschen

Tabelle 21: Ansatz für die WGA-Produkt Markierung

PCR	1x (µl)
Roche Puffer 1	4,00
Lib1 10 µM	8,00
7/8 dNTP-Mix (38,75 mM)	1,50
markiertes dUTP 1 mM	1,75
Roche Taq (32 U/µl)	0,75
H ₂ O	24,00
<i>Template</i>	1,00
Σ	41,00

Tabelle 22: PCR-Programm zur WGA-Produkt Markierung

	Temperatur	Dauer
1.	94 °C	1:00 min
2.	60 °C	0:30 min
3.	72 °C	2:00 min
4.	94 °C	0:30 min
5.	60 °C	0:30 min
6.	72 °C	2:00 min + 20 sec/Zyklus
7.	zurück zu 4., zehnmal	
8.	4 °C	∞

Reamplifikaten 2 µl Puffer R (10x) und 50 U *Tru1I* hinzugefügt und bei 65 °C für 3 h inkubiert. *Tru1I* ist ein Isozym von *MseI*.

3.9 Restriktionsverdau der PCR-Fragmente

Mit dem Restriktionsverdau der DNA wird die Identität der PCR-Fragmente bestätigt. Die Sequenz wird mit dem Programm *NEBcutter* auf Restriktionsendonuclease-Schnittstellen geprüft. Die Enzyme werden so gewählt, dass zwei Fragmente entstehen, von denen eines ca. 66 % der ursprünglichen Länge des Gesamtfragments besitzt. Für die verschiedenen PCR-Produkte werden unterschiedliche Enzyme und Temperaturen verwendet (Tabelle 24). Die Reaktionsansätze für den Verdau und die Verdaukontrolle werden vorbereitet (Tabelle 23) und nach erfolgtem Verdau die Ergebnisse des Restriktionsverdaus in einem 3 %-igen Agarosegel getrennt.

Tabelle 23: PCR-Ansatz für den Restriktionsverdau

	Enzymverdau (µl)	Verdaukontrolle (µl)
PCR Reaktion	15,0	15,0
NEB Puffer	3,0	3,0
BSA (10 mg/ml) *	0,3	0,3
Restriktionsenzym	3,0	0
H ₂ O (HPLC)	8,7	11,7
Σ	30,0	30,0

* falls kein BSA benötigt wird, durch H₂O ersetzen

3.10 Agarose Gelelektrophorese

Mit der Agarose Gelelektrophorese wird der Erfolg der Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente analysiert. Negativ geladene Fragmente werden nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Für die Qualitätskontroll-PCR werden 1,5 %-ige Agarose-Gele (1,5 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer) verwendet, für die genspezifische PCR 3 %-ige Agarose-Gele, um eine deutlichere Auftrennung der Fragmente zu erhalten. Es werden 100 µl Gemisch in

einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben erhitzt bis die Mischung klar wird und mit 5 µl Ethidiumbromid (1 %) versetzt. Anschließend wird die Flüssigkeit in ein Gelkammer-Tray gefüllt, in dem Kämme zur Formierung von Lauftaschen eingelegt wurden. Die PCR-Proben (10 µl) werden mit 3 µl Dye/Ladepuffer (0,3 % Orange G, 25 % Ficoll in TBE) versetzt und nach Aushärtung des Gels in die präformierten Geltaschen geladen. Das Elektrophorese-Netzgerät wird auf 160 V und 400 mA für 45 min eingestellt, um die Amplifikate der PCR in einem Horizontal-Gelelektrophorese-System aufzutrennen. Das Ergebnis der Auftrennung wird auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht und mittels einer Kamera digitalisiert.

Tabelle 24: Verwendete Restriktionsenzyme und Inkubations- bzw. Inaktivierungsparameter

Gen	Restriktions-Enzym	NEB Puffer	BSA	Inkubation Zeit [h]	Inkubation Temperatur [°C]	Inaktivierung Zeit [min]	Inaktivierung Temperatur [°C]	Größe der Verdau-fragmente [bp]
<i>EPCAM</i>	Hpy188III	4	+	3	37	20	65	96 + 65
<i>KRT5</i>	HaeIII	4	-	3	37	20	80	80 + 23
<i>KRT6a</i>	HaeIII	4	-	3	37	20	80	112 + 42
<i>KRT8</i>	Hpy188III NlaIII	4 4	+	3 3	37 37	20 20	65 65	116 + 34 89 + 61
<i>KRT14</i>	HpyCH4V	4	-	3	37	20	65	120 + 62
<i>KRT18</i>	HpyCH4V BsmAI	4 4	- -	3 3	37 55	20 20	65 80	102 + 55 104 + 53
<i>KRT19</i>	HpyCH4V	4	-	3	37	20	65	114 + 48
<i>PTPRC</i>	NlaIII	4	+	3	37	20	65	72 + 34
<i>PKM1</i>	PstI	4	-	3	37	20	65	78 + 53
<i>PKM2</i>	PstI	3	+	3	37	20	80	85 + 46
<i>ERBB2</i>	HpyCH4V	4	-	3	37	20	65	80 + 65
<i>ERBB2Δ16</i>	HpyCH4V	4	-	3	37	20	65	64 + 33

3.11 Vergleichende genomische Hybridisierung (mCGH)

Durch die Markierung mit modifizierten Nukleotiden (0) kann das einzelsträngige WGA-Produkt durch eine kompetitive Hybridisierung mit dem Referenz-WGA-Produkt verglichen werden.

3.11.1 Präparation von Metaphasenchromosomen

Es werden 20 ml heparinisiertes Blut eines gesunden männlichen Spenders mit Lymphozyten-Kulturmedium (250 ml RPMI Medium, 37,5 ml FCS, 5 ml 100x Penicillin/Streptomycin, 2,5 ml L-Glutamin (200 mM), 3 ml Phytohämagglutinin) vermischt, in 10 ml Kulturfläschchen verteilt und 72 h bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die Kulturfläschchen werden alle 24 h geschüttelt. Durch Phytohämagglutinin wird die Teilung der Leukozyten stimuliert. Zur Arretierung der Chromosomen in der Metaphase werden anschließend 100 µl Colcemidlösung (10 µg/ml) zugegeben und weitere 45 min im Brutschrank inkubiert. Dieser Mitose-Hemmstoff verhindert die Ausbildung der Spindelfasern. Darauf werden die Lymphozytenkulturen in 15 ml Zentrifugenröhren transferiert, die Zellen durch Zentrifugation (453 x g, 10 min) pelletiert, in 10 ml hypotoner Lösung resuspendiert (75 mM KCl, 37 °C) und 8 min bei 37 °C inkubiert. Die gequollenen Zellen werden erneut abzentrifugiert und in 10 ml -20 °C kaltem Fixativ (Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1) vorsichtig resuspendiert. Eisessig führt zur Lyse der Erythrozyten, Methanol denaturiert die Proteine (u.a. Histone) und dehydriert die Probe. Die Reste der lysierten Erythrozyten werden durch zweimaliges Zentrifugieren und Waschen in 10 ml Fixativ entfernt, danach kann die Zellsuspension in 2 ml Fixativ bei -20 °C bis zum Auftröpfen auf Objektträger gelagert werden.

Zur Herstellung von Metaphasen-Objektträgern werden Glasobjektträger in einer Küvette mit 100 % EtOH über Nacht entfettet und gereinigt. Vor dem Auftröpfen der Metaphasen-Lymphozyten, die mit 10 ml Fixativ gewaschen wurden, wird der Alkohol abgegossen und die Objektträger in destilliertem Wasser 5 min bei -20 °C gekühlt. Das Auftröpfen der in Methanol-Eisessig fixierten Lymphozytenkultur erfolgt mit einer Pasteurpipette aus einem Abstand von ca. einem halben Meter. Dadurch platzt der Kern und die Metaphasen-Chromosomen werden freigesetzt (Abbildung 6). Das verbleibende Fixativ wird durch Inkubation des Objektträgers auf einer Heizplatte 3 h verdampft. Dabei wird die Umgebungs-luft künstlich durch gleichzeitiges Auflegen von feuchten Tüchern mit Wasserdampf angereichert, was die Qualität der Metaphasenpräparation verbessern soll. Die Objektträger werden bis zur weiteren Verwendung in 100 % EtOH bei 4 °C gelagert.

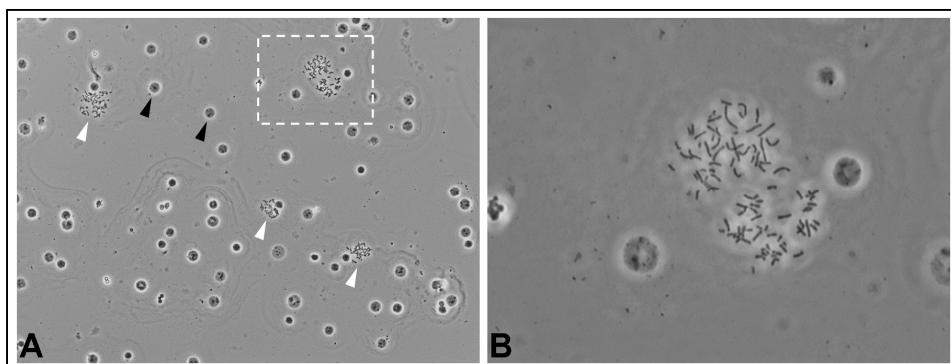


Abbildung 6: Objektträger mit Metaphasen-Präparation: **A:** Die weißen Pfeile zeigen einzelne Metaphasen, die schwarzen Pfeile zeigen Zellkerne, die sich in der Interphase befinden. **B:** Vergrößerter Ausschnitt aus **A**; Abbildung von zwei Metaphasen, die nebeneinander liegen. *Verwendung mit freundlicher Genehmigung von M. Gužvić*

3.11.2 Hybridisierung der markierten WGA-Produkte

Das, wie in Abschnitt 0 beschrieben, markierte Test-WGA-Produkt und das Referenz-WGA-Produkt werden über Nacht bei -20 °C gefällt (Tabelle 25). Die Fällung wird für 45 min bei 20.817 x g und 4° C abzentrifugiert, das Pellet mit 700 µl EtOH 70 % gewaschen, weitere 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pelett wird luftgetrocknet und in 7 µl 100 % Formamid bei 37° C 45 min unter Schütteln (600 rpm) gelöst. Formamid soll die Temperatur der Probe bei der Hybridisierung mit den Chromosomen reduzieren. Darauf werden 7 µl einer Lösung aus 30 %-igem Dextranulfat in 4x SSC zugegeben und weitere 30 min bei 37 °C geschüttelt. Dextranulfat bindet H₂O und führt dadurch zu einer höheren lokalen DNA-Konzentration, was zu einer Verkürzung der Hybridisierungsdauer führt. Anschließend wird die DNA bei 78 °C für 6 min denaturiert und die C₀t-1 DNA 30 min bei 37 °C mit den repetitiven Anteilen der DNA prähybridisiert. Dies soll deren störenden Einfluss auf die mCGH verhindern.

Parallel dazu wird ein Metaphasen-Objektträger von Zytoplasma-Resten und RNA befreit und die darauf befindliche chromosomal DNA denaturiert. Zuerst werden die Objektträger in

Tabelle 25: Ansatz der Fällung von Test- und Referenz-DNA

	1x (µl)
PCR-Amplifikat der Test-DNA (2x)	80
PCR-Amplifikat der Referenz-DNA	40
human C ₀ t-1 DNA (1 µg/µl) <i>Roche</i>	90
human C ₀ t-1 DNA (1 µg/µl) <i>Molecular Probes</i>	30
Herringsperm-DNA (10 µg/µl)	15
Natriumacetat (3 M, pH 5,2)	27
EtOH 100 % (eisgekühlt)	600
Σ	882

2x SSC (pH 7,4) gewaschen und mit 50 µl Pepsin (100 µg/µl) in 100 ml HCl (10 mM, pH 2,0) bei 37 °C für 4 min inkubiert. Bei diesem Schritt werden die Proteine verdaut. Der Verdau wird durch dreimaliges Waschen in PBS gestoppt, der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 85 % und 100 % Ethanol) bei 4 °C dehydriert und getrocknet. In einem Wasserbad werden 100 ml 70 % Formamid in 2x SSC (pH 7,2) auf 70 °C erhitzt und der Objektträger darin für 1 min 50 sec denaturiert. Der Objektträger wird erneut in einer aufsteigenden Alkoholreihe getrocknet, der DNA-Hybridisierungsansatz aufgetragen und das Hybridisierungsfeld durch ein Deckglas (18 x 18 mm) abgedeckt und mit Gummikleber (Fixogum) verschlossen. Die Hybridisierung findet 48 h bei 37 °C in feuchter Atmosphäre statt. Nach der Hybridisierung wird vorsichtig das Deckgläschen über dem Hybridisierungsfeld abgenommen und der Objektträger viermal jeweils 5 min in 4x SSC + 0,2 % Tween (42 °C) in einer Hellendahl-Küvette auf dem Orbitalschüttler gewaschen. Anschließend wird dreimal jeweils 5 min mit 1x SSC (60 °C) auf dem Schüttler gewaschen. Nach einem Umpufferungs-Schritt in PBS + 0,2 % Tween (42 °C) werden die unspezifischen Bindungsstellen für 30 min mit 1 ml Block-Lösung (PBS pH 7,4 + 0,2 % Tween, 3 % BSA, 5 % FCS) bei 37 °C abgesättigt. Die überschüssige Block-Lösung wird mit PBS + 0,2 % Tween (42 °C) entfernt und der Objektträger mit 200 µl Antikörpermix (Tabelle 26) unter einem Deckglas 60 min bei 37 °C unter Lichtschutz inkubiert. Überschüssiger Antikörper wird in drei 5 min Waschschritten bei 42 °C in 4x SSC + 0,2 % Tween unter Lichtschutz entfernt. Anschließend wird die DNA 3 min mit 1 ml DAPI-Lösung (1 µg/ml in 4x SSC + 0,2 % Tween) angefärbt, um die Chromosomenänderung sichtbar zu machen. Der Objektträger wird kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, im Dunkeln getrocknet und mit Vectashield H-1000 eingedeckelt. Dies verhindert das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe.

Tabelle 26: Zusammensetzung des Antikörpermix

	1 x	
Antikörperlösung für mCGH	178	µl
α-Digoxigenin-FITC (200 µg/ml)	20	µl
Avidin-Cy3.5 (1 mg/ml)	2	µl
Σ	200	µl

3.11.3 Auswertung

Zur Auswertung der mCGH wird an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRXA, Öl-Immersion) mit 100-facher Vergrößerung von ca. 20 geeigneten Metaphasen jeweils ein Bild mit den Fluoreszenzfiltern für DAPI, FITC und Cy3.5 aufgenommen (Tabelle 13, Abbildung 7). Die Chromosomen der digitalisierten Metaphasen können mit geeigneter Software (*CytoVision/Genus*, Applied Imaging) in ein Karyogramm sortiert werden.

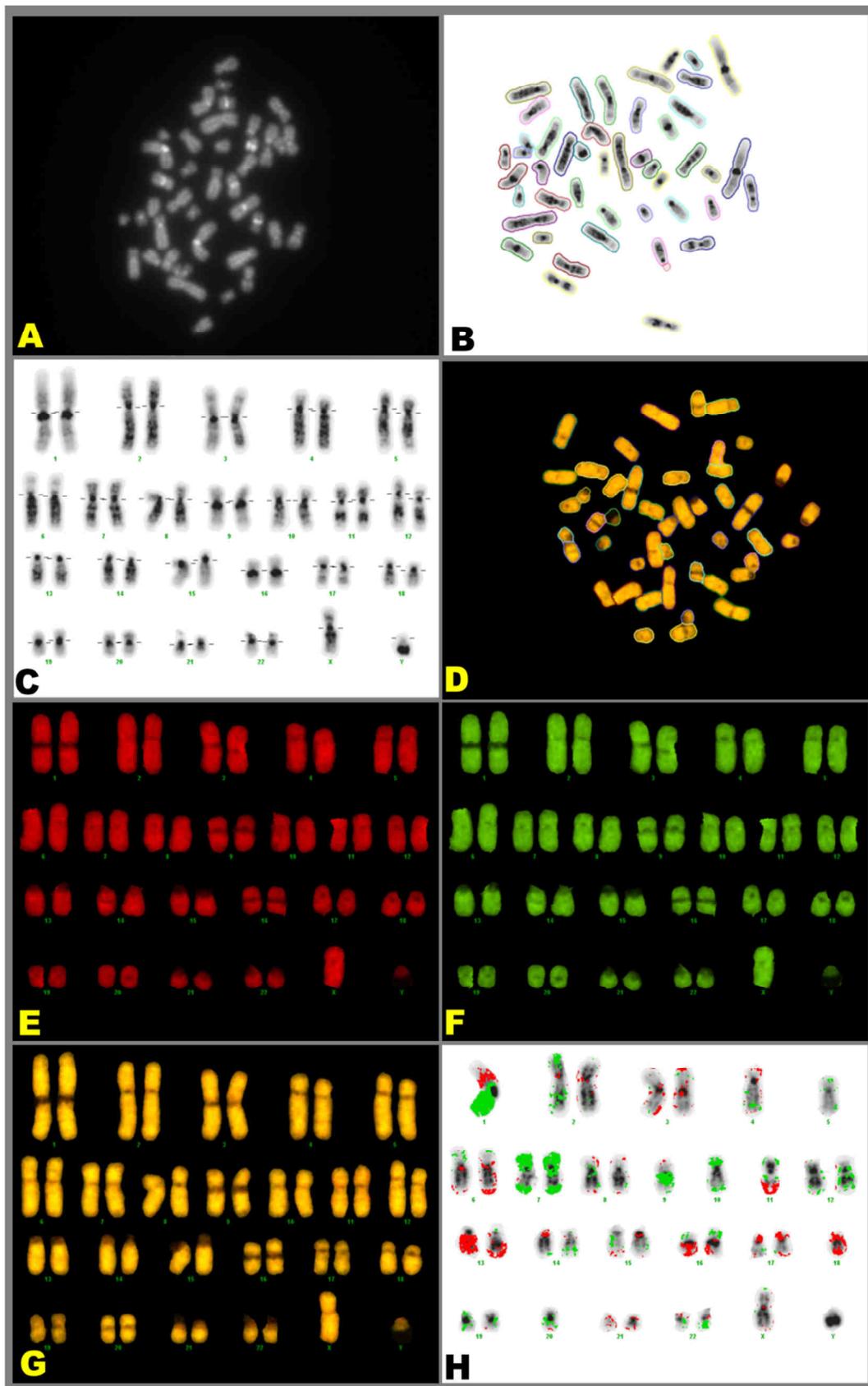


Abbildung 7: Auswertung der mCGH am Fluoreszenzmikroskop: Von geeigneten Metaphasen wird jeweils ein Bild mit den Fluoreszenzfiltern für DAPI, FITC und Cy3.5 aufgenommen. **A:** Metaphase, DAPI; **B:** einzelne Chromosomen einer Metaphase mit Bänderung, unsortiert; **C:** einzelne Chromosomen mit Bänderung, sortiert; **D:** Metaphase, Überlagerung FITC und Cy3.5; **E:** einzelne Chromosomen sortiert, Cy3.5; **F:** einzelne Chromosomen sortiert, FITC; **G:** einzelne Chromosomen sortiert, Überlagerung FITC und Cy3.5; **H:** einzelne Chromosomen sortiert, Bänderung mit artifiziell gefärbter Überlagerung

Nach softwareunterstützter Normalisierung wird das Fluoreszenzverhältnis (Test-DNA/Referenz-DNA: FITC/Cy3.5) aller analysierten Chromosomen in einem mCGH-Profil dargestellt. Ein Gewinn (Amplifikation) bzw. Verlust (Deletion) von genomischer DNA gegenüber der Test-DNA wird angezeigt, wenn das Fluoreszenzverhältnis den Wert 1,25 überschreitet bzw. 0,75 unterschreitet. Heterochromatinbereiche wie die p-Arme der Chromosomen 13, 14, 15, sowie Chromosom Y werden nicht ausgewertet. Um kumulative mCGH-Profile zu erhalten, werden die erhaltenen genomischen Aberrationen der einzelnen mCGH-Analysen nach den Richtlinien der ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1995*, Abbildung 47) entsprechend der Anforderung für das webbasierte mCGH-Analyseprogramm *Progenetix* (*Baudis und Cleary, 2001*) in Tabellenform gebracht. Nach dem Hochladen der Tabelle wird das Format „*ISCN annotation table*“ und die Technik „*chromosomal CGH*“ ausgewählt, um die genomischen Aberrationen in einem kumulativen mCGH-Profil zu visualisieren. Dabei werden alle weiteren voreingestellten Parameter übernommen.

Hierarchisches Clustering der mCGH-Daten

Das hierarchische (*bottom-up*) *complete linkage* Clustering wird unter Verwendung der euklidischen Distanz durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Inka Appel unter Verwendung der Software *R-Bioconductor*.

3.12 Microarray-Analyse

Dieses Verfahren basiert auf dem Prinzip der bereits veröffentlichten Methode (*Hartmann und Klein, 2006*). Dabei wird das markierte WTA-Produkt gereinigt, denaturiert und auf einen *Microarray* hybridisiert. In dieser Arbeit wird eine Einfarbentechnologie angewandt. Auf den *whole human genome Microarrays (4x44k)* von Agilent befinden sich 19.596 eingetragene *Target Entrez Gene RNAs*. Als Positivkontrolle dienen interne Kontrollen.

3.12.1 Hybridisierung auf humane Agilent-Arrays

Das, wie in Abschnitt 3.7 beschrieben, markierte WTA-Produkt wird mit dem Qiagen PCR Purification Kit aufgereinigt. Dazu werden 500 µl PB-Puffer mit 50 µl markierter Probe gemischt, *gevortexed* und auf eine Säule gegeben. Anschließend wird 1 min bei 15.871 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Waschschrift wird mit 700 µl PE-Waschpuffer wiederholt. Darauf wird die Säule 1 min bei 15.871 x g trocken zentrifugiert und in ein neues Eppendorf-tube überführt. Mit 45 µl EB-Puffer wird das WTA-Produkt für 10 min inkubiert und 1 min bei 15.871 x g abzentrifugiert. Von der aufgereinigten Probe werden 3 µl

entnommen, um mit Hilfe eines Spektrophotometers die Konzentration und Einbaurate zu bestimmen. Zu den bei 95 °C (5 min) denaturierten Proben werden 74 µl Hybridisierungs-Mix (Tabelle 27) vorsichtig auf Eis zupipettiert und 30 sec bei 18.407 x g abzentrifugiert. Pro *Microarray* werden vier Proben je 100 µl in die entsprechenden Felder des *Gasketslides* (Abbildung 8) pipettiert, der *Microarray* auf den *Gasketslide* gelegt und die Hybridisierungskammer verschlossen. Die Hybridisierung erfolgt 17 h bei 65 °C rotierend im Hybridisations-Ofen. Anschließend wird der *Microarray* in Waschpuffer 1 gespült und 1 min in einer weiteren Küvette mit Waschpuffer 1 lichtgeschützt auf dem Schüttler (130 rpm) gewaschen. Der stringente Waschschnitt mit Waschpuffer 2 (37 °C) wird ebenfalls 1 min auf dem Schüttler durchgeführt. Zum Trocknen wird der *Microarray* 30 sec in Acetonitril getaucht. Anschließend wird der Array gescannt und die Daten ausgewertet.

Tabelle 27: Zusammensetzung des Hybridisierungs-Mix

1x (µl)	
2x Hi-RPM Hybridisation Buffer	55
10x GE Blocking Agent	11
Tween 25 %	4
Igepal 25 %	4
Σ	74

3.12.2 Auswertung der Genexpressionsdaten

Die Daten der *Array-Slides* werden mit Hilfe eines Scanners (Axon Gene Pix 4400A) erfasst. Dazu berechnet die Software (*GenePixPro 7.0*, Molecular Devices) die Intensität der emittierten Fluoreszenz, die nach Anregung durch einen Laser mit Licht im geeigneten Wellenlängenbereich (650 nm, Tabelle 13) zustande kommt. Helligkeit und Kontrast werden automatisch eingestellt. Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte durch Inka Appel unter Verwendung der Software *R-Bioconductor*. Die Rohdaten werden zuerst Hintergrundkorrigiert (*Ritchie et al., 2007*) und Quantil-normalisiert (*Bolstad et al., 2003*). Bei der Quantil-Normalisierung wird zunächst ein Medianarray generiert. Die Rohdaten und der Medianarray werden sortiert und jedem Rang in den Rohdaten der entsprechende Wert aus dem Medianarray zugewiesen. Anschließend werden die Rohdaten in ihre ursprüngliche Reihenfolge gebracht. Somit besitzt jeder normalisierte Array die gleiche Verteilung, die Verteilung des Medianarray. Die differentielle Genexpressionsanalyse wird unter Verwendung des *limma-packages* durchgeführt (*Smyth, 2004*). Um *fold changes* und Teststatistik mit korrespondierenden *p*-Werten zu schätzen, wird für jedes Gen ein lineares Modell gebaut. Die *p*-Werte werden anschließend auf multiples Testen korrigiert (*Benjamini Y., 1995*). Weiterhin werden die Top 100 variabelsten Gene der Zellen mit Hilfe des Ward-Clustering unter Verwendung der euklidischen Distanz geclustert.

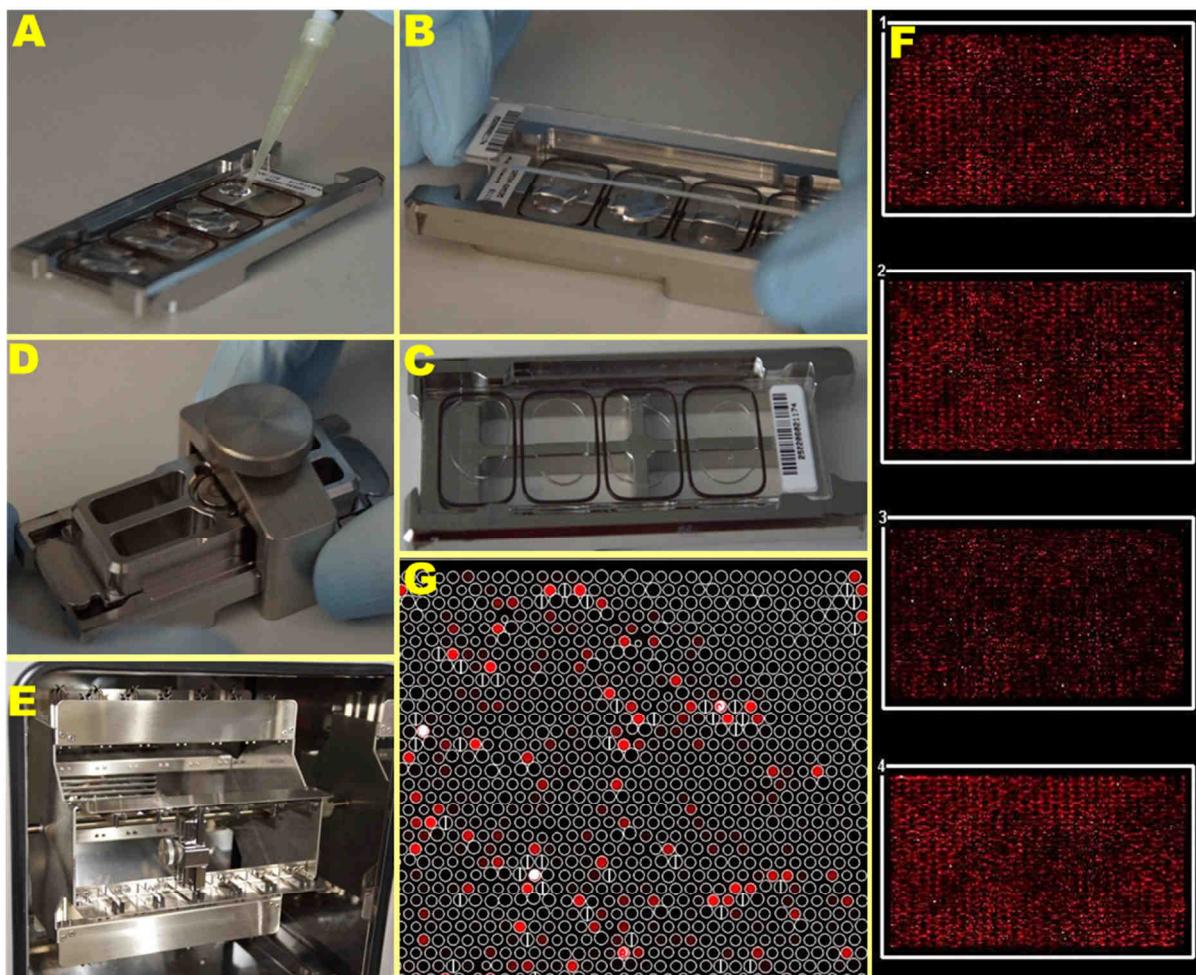


Abbildung 8: Hybridisierung des markierten WTA-Produktes und anschließender Scancvorgang: **A:** Auf ein Feld des Gasketslides werden 100 µl Probe pipettiert (ein Gasketslide besteht aus vier Feldern). **B:** Der Microarray wird über den Gasketslide gelegt. **C:** Auf der Microarray-Fläche sollten keine Luftblasen vorhanden sein. **D:** Der Microarray wird in die Hybridisationskammer eingespannt und im Hybridisations-Ofen (**E**) rotiert. Nach dem anschließenden Spülen werden die Arrays gescannt. **F:** Mit Hilfe der Software wird eine Schablone über den Array-Bereich gelegt, um die Spots einzugrenzen. Dies wird für alle vier Microarray-Flächen auf dem Slide mit Hilfe von vorhandenen Markierungspunkten durchgeführt (**G**).

3.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit der Statistiksoftware *STATA*. Für die Darstellung der Stripplots (*one-way-dot-plot*) wird die Software *GraphPad Prism 5.04* verwendet.

Student's t-Test

Mit dem Student's *t*-Test werden die gemessenen Größen der EpEX- und EpIC-Färbung verglichen.

Kruskal-Wallis-Test

Mit diesem Test werden ordinal- oder intervalverteilte Daten mehrerer Untergruppen auf Unterschiede geprüft. So wird untersucht, ob signifikante Unterschiede beim Alter zum Zeitpunkt der Primäroperation zwischen den verschiedenen Mammakarzinom-Subtypen bestehen.

Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Hiermit werden nicht-normalverteilte Datensätze auf signifikante Unterschiede geprüft. Mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wird überprüft, ob sich die Anzahl an mCGH-Veränderungen (Aberrationen, Deletionen und Amplifikationen) zwischen zwei verschiedenen Gruppen bzw. Kollektiven signifikant unterscheiden. Verglichen werden die EpCAM⁺ und CK⁺ DCC von M₀ und M₁ Patientinnen. Ebenso werden die Anzahl an EpCAM⁺ Zellen in den verschiedenen Knochenmarkproben verglichen. Außerdem wird untersucht, ob signifikante Unterschiede beim Alter zum Zeitpunkt der Primäroperation zwischen zwei Mammakarzinom-Subtypen bestehen.

χ^2 -Test nach Pearson

Mit dem χ^2 -Test werden folgende Gruppen kategorialer Variablen auf signifikante Unterschiede getestet:

- der Vergleich der Färbeergebnisse mit den klinischen Daten
- der Vergleich der Positivität bestimmter Marker in unterschiedlichen Zellgruppen (M₀, M₁, HD)
- der Vergleich der EpCAM-Positivität nach unterschiedlichen Parametern während der Aufarbeitung
- der Vergleich der Ergebnisse der genspezifischen-PCRs mit klinischen Daten

Treten in den einzelnen Gruppen Werte unter fünf auf, wird der Fisher's exact test angewendet.

Fisher's exact test (2-seitig)

Dieser Test wird eingesetzt, wenn die einzelnen Gruppen zu klein für den χ^2 -Test sind:

- der Vergleich der Färbeergebnisse mit den klinischen Daten
- die Korrelation der mCGH-Ergebnisse mit den klinischen Daten
- der Vergleich der Positivität bestimmter Marker in unterschiedlichen Zellgruppen (M_0 , M_1 , HD)
- die Korrelation der Ergebnisse der genspezifischen-PCR mit klinischen Daten
- der Vergleich der mCGH Daten für verschiedene Gruppen (M_0 , M_1); Für die Auswertung werden die p -Werte auf multiples Testen korrigiert (Benjamini Y., 1995). Dazu wird eine *false discovery rate* (FDR) <10 % festgesetzt. Die Grundlage hierfür ist, dass das Hintergrundrauschen bei Einzelzellen höher ist.

Korrelationskoeffizienten

Korrelationskoeffizienten werden berechnet, um den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen verschiedenen Daten zu ermitteln.

- Für die Korrelation der Qualität von WTA- mit WGA-Produkt wird der Korrelationskoeffizient nach Spearman (ρ) verwendet.
- Für die Korrelation der Expressionsdaten mit den PCR-Ergebnissen wird der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) verwendet.

Falls nicht anders gekennzeichnet, wird bei allen statistischen Auswertungen ein p -Wert von <0,05 als statistisch signifikant bezeichnet. Als hochsignifikant wird ein p -Wert von <0,01 und als höchstsignifikant ein p -Wert von <0,001 bezeichnet. Diese Signifikanzniveaus sind in den Abbildungen mit einem, zwei oder drei Sternen dargestellt. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit „ns“ gekennzeichnet. In einigen Fällen wird der korrigierte p -Wert ($adjp$) verwendet und bis zu einem Wert von 0,10 als statistisch signifikant bezeichnet. Dies ist durch Klammern um den Stern (*) erkenntlich.

3.14 Verwendete Standardprotokolle

3.14.1 Zellkultur

Es wird nach einem Standardprotokoll der Zellkultur gearbeitet (*Sambrook und Russell, 2000*). Eine Auflistung der verwendeten Zelllinien und der dazugehörigen Medien enthält Tabelle 28.

Tabelle 28: Verwendete Zelllinien und Medien

Zelllinie	Zellkultur-Medium
MCF-7	RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % PenStrep, 2 mM L-Glutamin
HL60_wt	RPMI 1640, 5 % FCS, 1 % PenStrep, 2 mM L-Glutamin
HL60_EpCAM	RPMI 1640, 5 % FCS, 1 % PenStrep, 2 mM L-Glutamin, G418 (1 mg/ml)

3.14.2 Fixierung von Zellen in Suspension mit Saponin

Es wird nach A. Radbruch verfahren (*Radbruch, 2000*).

4. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war, die disseminierten Krebszellen (DCC) aus dem Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen zu charakterisieren, die mit einem Antikörper gegen das epitheliale Adhäsionsmolekül (EpCAM) isoliert wurden. Die EpCAM-Suspensionsfärbung ermöglichte die Analyse von Transkriptom und Genom derselben Zelle. Daneben sollten auch EpCAM⁺ Zellen aus dem Knochenmark gesunder Spender analysiert werden (Abbildung 9).

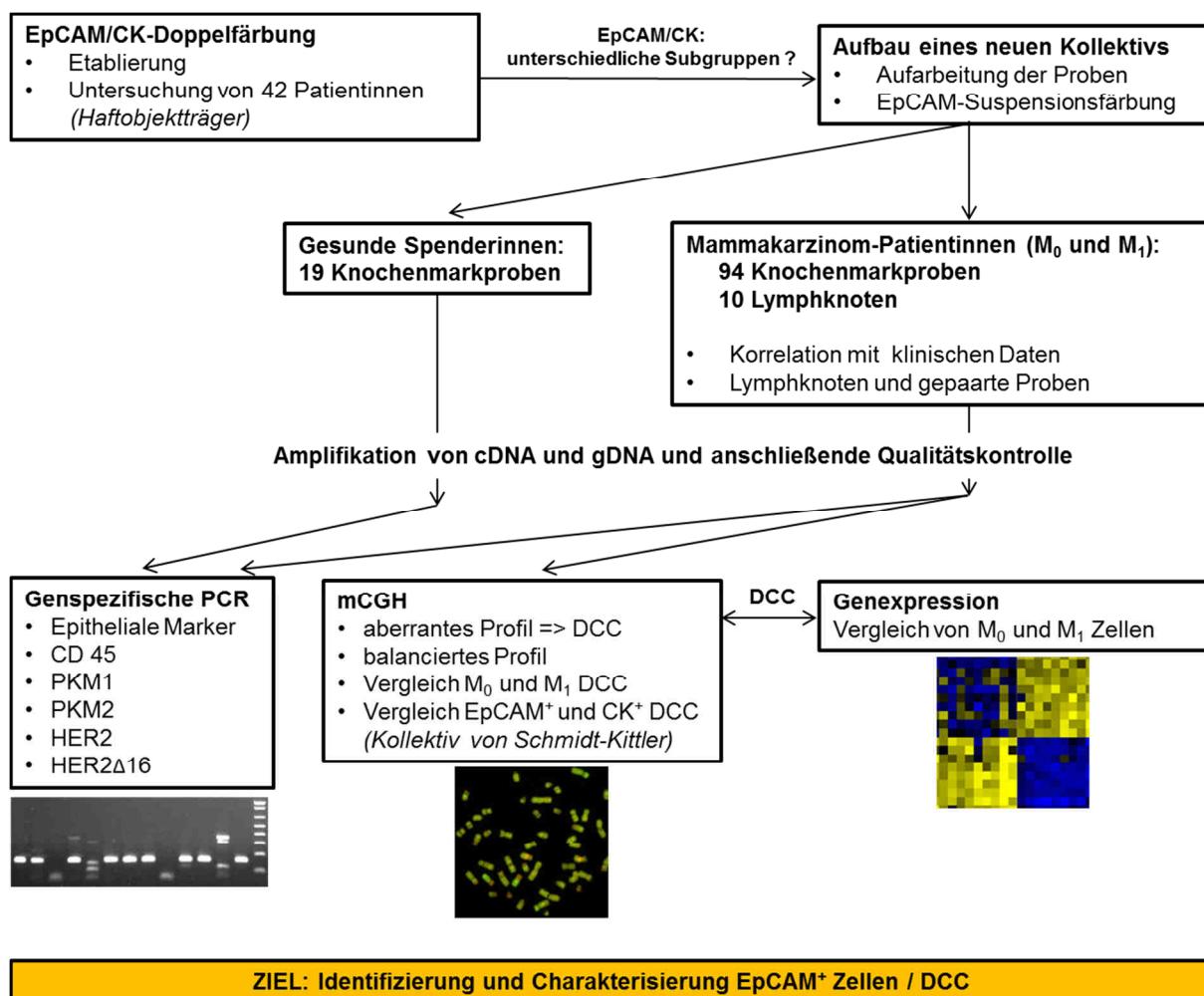


Abbildung 9: Experimentelle Übersicht

4.1 Nachweis von EpCAM und CK auf DCC

Um die Inzidenz von Zytokeratin-positiven (CK^+) und EpCAM⁺ Zellen im Knochenmark zu vergleichen, wurde vorab eine Doppelfärbung etabliert. Für die geplante Färbung von Knochenmarkproben mit einem EpCAM-Antikörper und dem späteren Vergleich mit CK^+ Zellen sollte herausgefunden werden, ob ein grundlegender Unterschied in der Detektionsrate von CK^+ und EpCAM⁺ Zellen besteht und es sich bei beiden Zelltypen um verschiedene Populationen handelt. Deshalb wurde eine spezifische Doppelfärbung etabliert, mit der humanes Knochenmark auf Haftobjektträgern nach beiden Antigenen auf DCC untersucht werden konnte.

4.1.1 Etablierung einer EpCAM/Zytokeratin-Doppelfärbung

4.1.1.1 EpCAM-Einzelfluoreszenzfärbung und intrazelluläre Spezifität

Zunächst wurde die Einfachfärbung mit dem EpCAM-Antikörper E144 etabliert. Anschließend wurde die Spezifität von E144 (Bindung an die intrazelluläre Domäne, EpIC) mit dem EpCAM-Antikörper Ber-EP4, der an die extrazelluläre Domäne (EpEX) bindet, verglichen. Ziel war es zu bestätigen, dass E144 spezifisch die intrazelluläre Domäne erkennt. Als Positivkontrolle wurden die Zelllinien MCF-7 und HL60_EpCAM verwendet. Als Negativkontrolle diente HL60_wt. Die Kernfärbung wurde mit DAPI oder Hoechst 33342 durchgeführt. Mit Hilfe von DAPI konnten bei der Suspensionsfärbung tote Zellen identifiziert werden, da der Antikörper in Suspension nur den Kern toter Zellen färbt.

EpCAM-Einzelfluoreszenz-Färbung

Als Primärantikörper wurde der Kaninchen-Antikörper E144 verwendet, der spezifisch an die C-terminale Domäne von EpCAM bindet. Dieser wurde in unterschiedlichen Verdünnungen getestet (Inkubation 30 min) und mit zwei verschiedenen Sekundärantikörpern kombiniert (Tabelle 29). Die Färbung erfolgte analog Kapitel 3.2.1, wobei die Blockierung 20 min

Tabelle 29: Übersicht der getesteten Verdünnungen und Antikörper: EpCAM-Fluoreszenzfärbung;
Konzentration des Antikörpers E144 nicht bekannt

Primärantikörper	Sekundärantikörper
E144 Kaninchen (1:50)	α -Kaninchen-Cy3 F(ab) ₂ (15 µg/ml)
E144 Kaninchen (1:100)	α -Kaninchen-Alexa 555 (20 µg/ml)
E144 Kaninchen (1:250)	
E144 Kaninchen (1:500)	

stattfand. Alle Isotypkontrollen waren negativ. Die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte, dass die Primärantikörper-Verdünnung von 1:500 nicht alle MCF-7-Zellen färbte, bei 1:250 war teilweise nur eine schwache Färbung sichtbar. Jedoch waren zwischen 1:100 und 1:50 keine Unterschiede hinsichtlich der Fluoreszenzintensität erkennbar. Daher wurde für alle weiteren Färbungen die Verdünnung 1:100 gewählt. PBL wurden nicht gefärbt. Die Verwendung des Sekundärantikörpers α -Kaninchen-Alexa 555 lieferte eine stärkere Fluoreszenz als die Färbung mit α -Kaninchen-Cy3. Zusätzlich wurde ein Direktvergleich beider sekundärer Antikörper mit Haftobjekträgern, auf denen Patientenknochenmark mit MCF-7 1:100 gemischt wurden, durchgeführt. Hier zeigte sich ein deutlicher Vorteil von Alexa 555. Bei der Färbung von Patienten-Knochenmark war die Färbung mit Cy3 nur sehr schwach erkennbar, wohingegen sich Alexa 555 deutlich vom Hintergrund abhob (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren Färbungen mit dem EpCAM-Antikörper E144 (α -EpIC) wurde daher der Sekundärantikörper α -Kaninchen-Alexa 555 verwendet.

Intrazelluläre Spezifität des EpCAM Antikörpers E144

Zuerst wurde überprüft, ob α -EpIC unspezifisch die extrazelluläre EpCAM Domäne färbt. Dazu wurde eine Suspensionsfärbung mit den Zelllinien MCF-7 und HL60_EpCAM (1:20 verdünnt mit PBL) analog der Suspensionsfärbung gegen EpCAM durchgeführt (Kapitel 3.2.2, Tabelle 30). Beide Zellsuspensionen wurden gleichzeitig mit beiden Primärantikörpern gefärbt. Anschließend wurde jeweils ein Teil mit 1 ml DAPI- (0,2 ng/ml) oder Hoechst 33342-Lösung (1,25 ng/ml) inkubiert, um Zellen mit nicht intakter Zellmembran zu identifizieren. Die Auswertung im Cy3-Kanal zeigte bei beiden Zelllinien keine gefärbten lebenden Zellen, da E144 bei intakten Zellen nicht ins Innere der Zelle gelangen kann. Im FITC-Kanal war eine Färbung der extrazellulären Domäne durch Ber-EP4 sichtbar. Durch die DAPI-Färbung erkenntliche tote Zellen waren vereinzelt positiv im Cy3 Kanal. Durch die zerstörte Zellmembran gelangte der Antikörper in die Zelle (Abbildung 10A-D). PBL wurden nicht gefärbt. Dies lässt folgern, dass keine unspezifische Färbung der extrazellulären Domäne durch E144 stattgefunden hat.

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die Lokalisation der intrazellulären EpCAM-Domäne von der extrazellulären Domäne hinsichtlich der Färbung durch α -EpIC und α -EpEX unter-

Tabelle 30: Übersicht der verwendeten Antikörper zum Vergleich von EpIC und EpEX

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Isotypkontrolle
EpIC: E144: α -EpCAM-Kaninchen Konzentration nicht bekannt, 1:100	α -Kaninchen-Alexa 555 20 μ g/ml	Kaninchen IgG Konzentration nicht bekannt, 1:100
EpEX: Ber-EP4: α -EpCAM-FITC 5 mg/ml	α -FITC-Alexa 488 10 μ g/ml	Maus IgG ₁ 1 μ g/ml

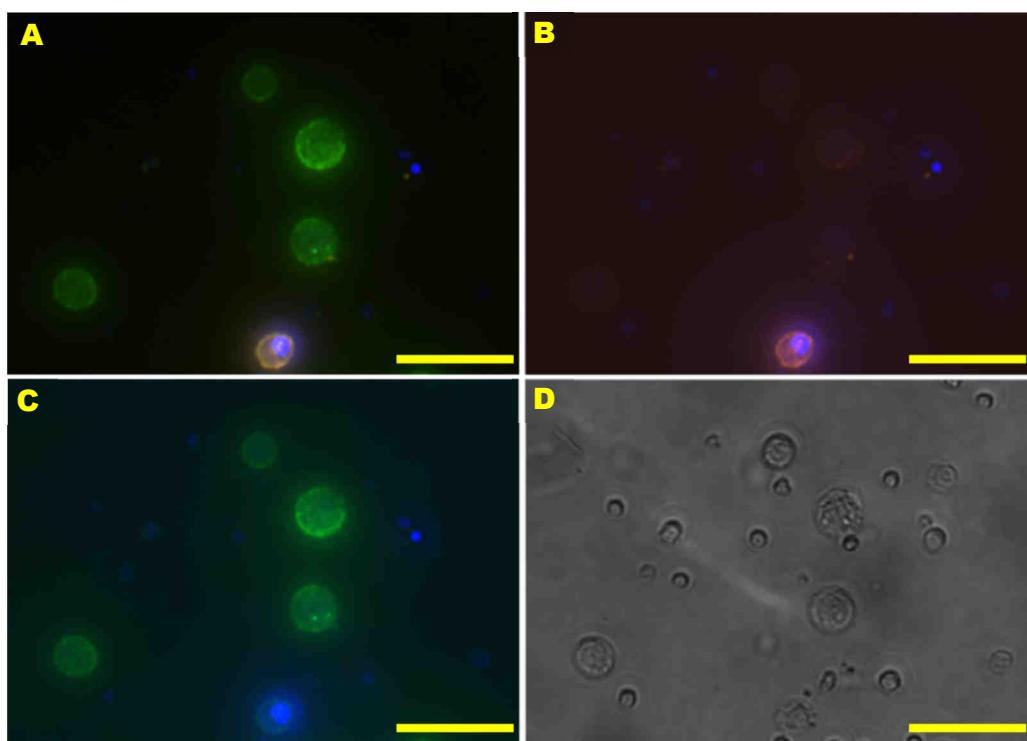


Abbildung 10: Suspensionsfärbung mit EpIC und EpEX (MCF-7): In Suspension konnte nur die extrazelluläre EpCAM-Domäne gefärbt werden. Die tote (geplatzte) Zelle unten ist stark DAPI gefärbt und zusätzlich EpIC positiv, da der Antikörper aufgrund der defekten Zellwand ins Zellinnere gelangen konnte; **A:** Überlagerung Cy3, FITC, DAPI; **B:** Überlagerung Cy3, DAPI; **C:** Überlagerung: FITC, DAPI; **D:** Hellfeld; α -EpIC (*E144*, orange), α -EpEX (*Ber-EP4*, grün), DAPI (blau); Skala 50 μ m; Belichtung 5 sec

scheidet. Dazu wurde die oben genannte Färbung mit permeabilisierten, fixierten Zellen durchgeführt. Hierfür wurde zuerst der EpIC-Antikörper in Anwesenheit von Saponin zugegeben und nach dem Waschen mit dem EpEX-Antikörper gefärbt. Diese Reihenfolge ist essentiell, da die Permeabilisierung reversibel ist und sich die Zellen in Abwesenheit von Saponin wieder verschließen. Sowohl die EpEX- als auch die EpIC-Färbung lieferte stark gefärbte doppelpositive MCF-7 und HL60_EpCAM Zellen. Bei vielen Zellen war deutlich ein Größenunterschied zwischen der extrazellulären EpEX- und der intrazellulären EpIC-Färbung sichtbar, die durch die unterschiedliche Lokalisation beider EpCAM-Domänen zu erklären ist (Abbildung 11A-D). Es ist eine linienartige grüne Membranfärbung (α -EpEX) zu erkennen. Im Vergleich dazu lieferte α -EpIC eine rote, eher ungeordnete Färbung im Inneren der Zelle. Mit der Software *Axio Vision LE* wurde diese Zelle vermessen und dreimal der Durchmesser der Zelle bestimmt (Abbildung 11E-H). Das arithmetische Mittel betrug für EpIC 18,3 μ m ($\sigma=0,37$ μ m) und für EpEX 18,8 μ m ($\sigma=0,30$ μ m), was signifikant unterschiedlich war ($p=0,022$, *Student's t-Test*). Unter gleichen Bedingungen wurde eine EpIC/EpEX-Doppelfärbung auf Haftobjektträgern durchgeführt. Das Ergebnis war eine deutliche Färbung der intrazellulären und extrazellulären Domäne durch beide Antikörper (Abbildung 12A-D). Bei 100-facher Vergrößerung einer gefärbten MCF-7 Zelle war erkennbar, dass um den Zellkern mehr rote Punkte (EpIC-Färbung) vorhanden waren, im Vergleich zur eher gelben Membranfärbung (gleichmäßige Überlagerung von EpEX (grün) und EpIC (rot), Abbildung

13C). Alle beschriebenen Färbungen wurden zur Kontrolle mit HL60_wt Zellen durchgeführt und erwiesen sich als negativ. Die Isotypkontrollen waren ebenfalls negativ.

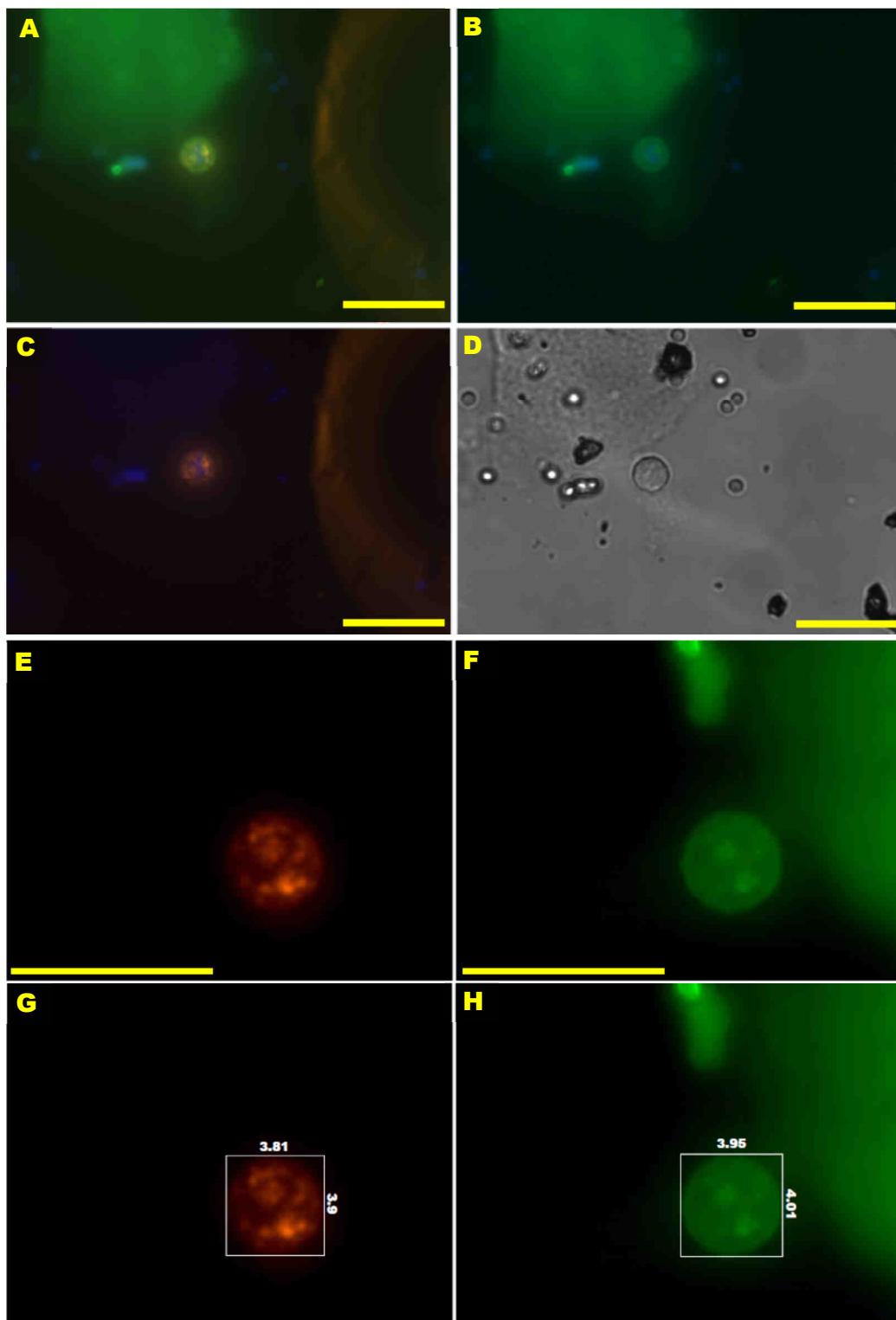


Abbildung 11: Färbung mit EpIC und EpEX an fixierten Zellen (HL60+): Färbung der intrazellulären und extrazellulären EpCAM-Domäne. Die EPIC und EpEX positive Zelle zeigt einen Größenunterschied zwischen dem EpEX- und EpIC-Färbebereich; **A:** Überlagerung Cy3, FITC, DAPI; **B:** Überlagerung FITC, DAPI; **C:** Überlagerung: Cy3, DAPI; **D:** Hellfeld; **E+G:** Cy3, Vergrößerung und Messrahmen 3,81 x 3,90 (relative Einheit); **F+H:** FITC, Vergrößerung und Messrahmen 3,95 x 4,01 (relative Einheit); α -EpIC (E144, orange), α -EpEX (Ber-EP4, grün), DAPI (blau); Skala 50 μ m; Belichtung 3 sec

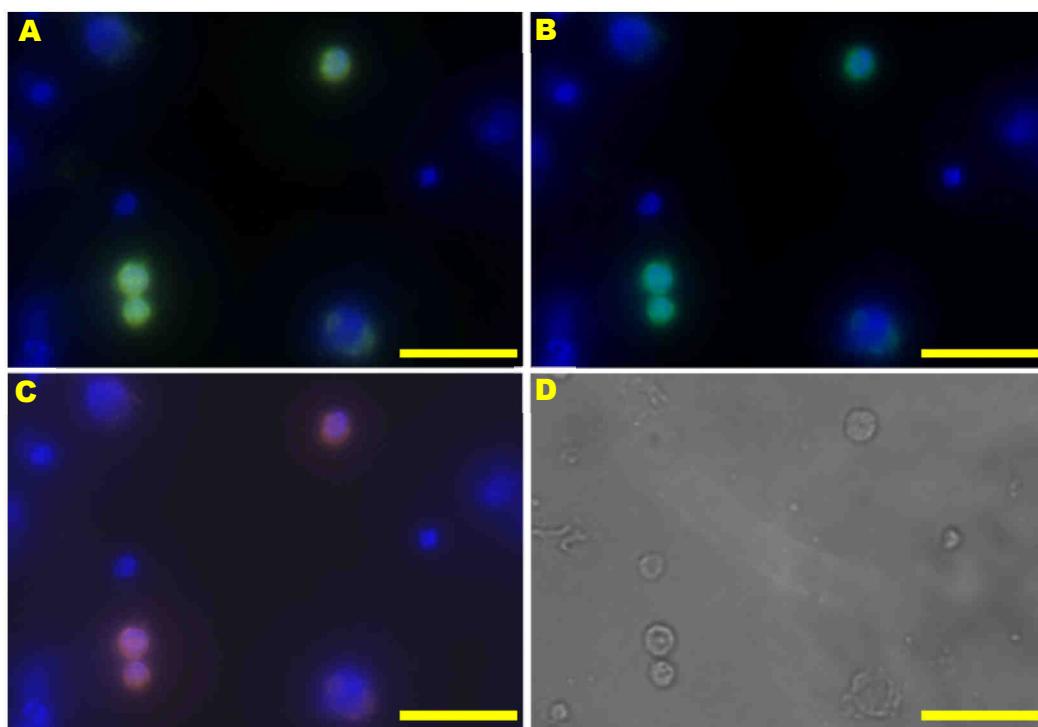


Abbildung 12: Färbung mit EpIC und EpEX auf Haftobjektträger (MCF-7): Färbung der intrazellulären und extrazellulären EpCAM-Domäne. **A:** Überlagerung Cy3, FITC, DAPI; **B:** Überlagerung: FITC, DAPI; **C:** Überlagerung: Cy3, DAPI; **D:** Hellfeld; α -EpIC (E144, orange), α -EpEX (Ber-EP4, grün), Hoechst (blau); Skala 50 μ m; Belichtung 3,2 sec

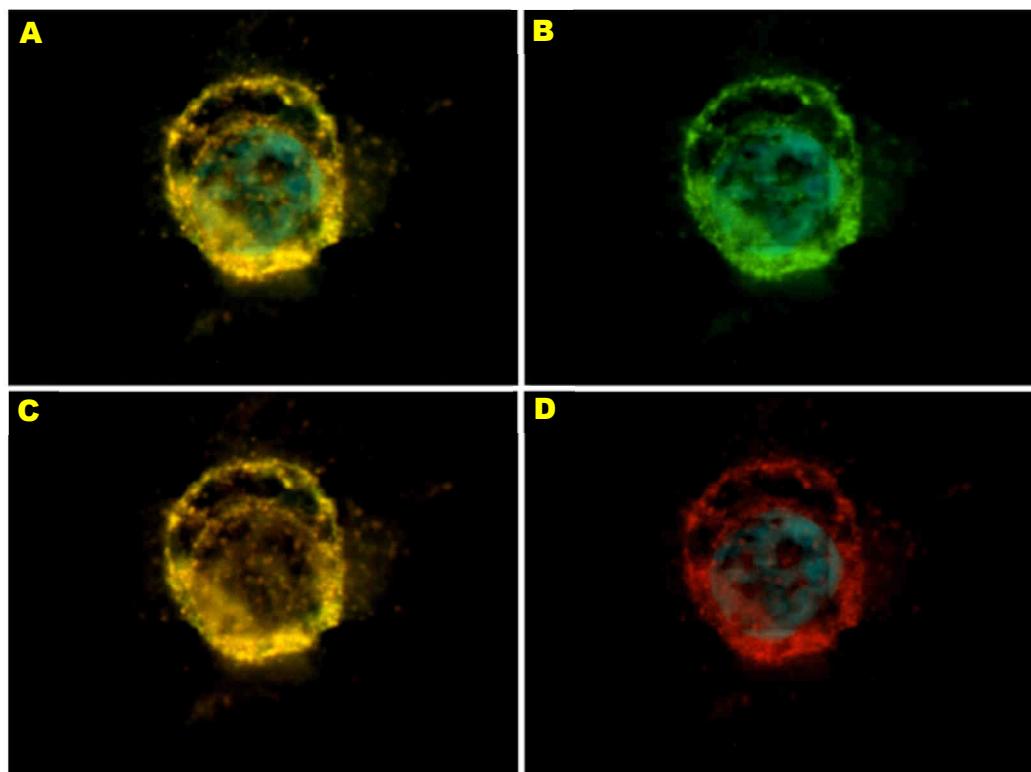


Abbildung 13: EpIC- und EpEX-Färbung – Detailaufnahme: Färbung der intrazellulären und extrazellulären EpCAM-Domäne (Haftobjektträger, MCF-7). **A:** Überlagerung Cy3, FITC, DAPI; **B:** Überlagerung: FITC, DAPI; **C:** Überlagerung Cy3, FITC; Zwischen der gelben Membranfärbung (gleichmäßige Überlagerung von grün (EpEX) und rot (EpIC)) und der eher rötlichen Färbung im Inneren der Zelle sind deutliche Unterschiede erkennbar. **D:** Überlagerung Cy3, DAPI; α -EpIC (E144, rot), α -EpEX (Ber-EP4, grün), Hoechst (blau); 100-fache Vergrößerung

Damit konnte nicht nur gezeigt werden, dass α -EpIC spezifisch die intrazelluläre Domäne färbt und α -EpEX die extrazelluläre Domäne, sondern es konnte auch die unterschiedliche Lokalisation der EpCAM-Domänen durch die Färbebereiche verdeutlicht werden. Aufgrund dieser Ergebnisse, der monoklonalen Herkunft aus dem Kaninchen und der besseren Farbkombinationsmöglichkeiten wurde der EpIC-Antikörper E144 für die Doppelfärbung verwendet.

4.1.1.2 Zytokeratin-Einzelfluoreszenz-Färbung

Für die Etablierung der CK-Färbung wurden verschiedene Primär- und Sekundärantikörper getestet (Tabelle 31). Die Färbung wurde analog der EpCAM-Einzelfluoreszenzfärbung durchgeführt (Kapitel 4.1.1.1). Alle Isotypkontrollen waren negativ. Die Färbung wies mit 2,0 µg/ml Primärantikörper A45-B/B3 eine stärkere Fluoreszenz und klarer gefärbte Zellen auf als mit 0,8 µg/ml. Die Verwendung der Sekundärantikörper α -Maus-Alexa 488, α -Maus-Alexa 488 *highly cross-adsorbed* oder α -Maus-Alexa 488 F(ab)₂ zeigte keine Unterschiede. In allen drei Färbungen war die Fluoreszenz überaus stark und die Zellen sehr klar gefärbt. Bei der Biotin-konjugierten Färbung verbesserte sich die Farbintensität mit steigender Konzentration des Primärantikörpers. Demnach lieferte die Konzentration 8,0 µg/ml das beste Ergebnis. Die Verwendung von Streptavidin-Alexa 488 als Sekundärantikörper führte zu stärker gefärbten Zellen als FITC-Streptavidin. Bei Letzterem war nur eine sehr schwache Färbung in der Positivkontrolle zu erkennen. PBL wurden von beiden Antikörpern nicht gefärbt. Auch hier wurde ein Direktvergleich von A45-B/B3 zusammen mit α -Maus-Alexa 488 und A45-B/B3-bio mit Streptavidin-Alexa 488 auf Haftobjektträgern mit Patientenknochenmark durchgeführt. Die A45-B/B3-Färbung in Kombination mit α -Maus-Alexa 488 lieferte eine sichtlich stärkere Färbung. Der Hintergrund war deutlich schwächer, als bei der Biotin-Färbung und auch die CK-Färbung war stärker und klarer erkennbar (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der deutlich stärkeren Färbung wurde der Primärantikörper A45-B/B3 zusammen mit dem Sekundärantikörper α -Maus-Alexa 488 für die Doppelfärbung verwendet.

Tabelle 31: Übersicht der getesteten Verdünnungen und Antikörper: CK-Fluoreszenzfärbung

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Isotypkontrolle
A45-B/B3 Maus (2,0 µg/ml)	α -Maus-Alexa 488 (20 µg/ml)	Maus IgG1κ (0,2 µg/ml)
A45-B/B3 Maus (0,8 µg/ml)	α -Maus-Alexa 488 <i>highly cross-adsorbed</i> (20 µg/ml)	
	α -Maus-Alexa 488 F(ab) ₂ (20 µg/ml)	
A45-B/B3 bio Maus (8,0 µg/ml)	Streptavidin- Alexa 488 (10 µg/ml)	Maus IgG1κ bio (4,4 µg/ml)
A45-B/B3 bio Maus (4,0 µg/ml)	FITC-Streptavidin (18 µg/ml)	
A45-B/B3 bio Maus (2,7 µg/ml)		
A45-B/B3 bio Maus (2,0 µg/ml)		

4.1.1.3 Austestung verschiedener Blockierungschritte

Bei Fluoreszenz-Färbungen von Haftobjektträgern mit Knochenmark ist häufig ein (starker) Hintergrund (vor allem im FITC-Kanal) zu beobachten. Dies kann durch unspezifische Antikörperbindungen auf dem Patientenmaterial zustande kommen. Um diesen Hintergrund zu verringern, wurden verschiedene Blockierungsvarianten mit 10 % AB-Serum ausgetestet, wodurch die unspezifischen Bindungen reduziert werden sollten. Zusätzlich wurde mit Ziegen-Serum blockiert, da beide Sekundärantikörper aus der Ziege stammen. Ebenso wurde die Blockierung mit einem Reagenz zur gezielten Signalverstärkung getestet (Image-IT Fx). Es wurden Haftobjektträger mit Patientenknochenmark (1:100 gemischt mit MCF-7) auf folgende Arten blockiert:

- 10 % AB-Serum in PBS für 20 min (Standard)
- 10 % AB-Serum + 10 % Ziegen-Serum in PBS für 20 min
- 10 % AB-Serum in PBS für ca. 15 h
- 10 % AB-Serum + 10 % Ziegen-Serum in PBS für ca. 15 h
- Image-IT Fx Signalverstärker: Inkubation für 30 min und anschließend 10 % AB-Serum in PBS für 20 min

Darauf wurde die Doppelfärbung (Kapitel 3.2.1, Inkubationszeit der sekundären Antikörper: 30 min) durchgeführt. Die Betrachtung der Ergebnisse zeigte einen deutlich reduzierten Hintergrund bei dem Blockierungsschritt von ca. 15 h mit 10 % AB-Serum. Der Hintergrund bei der Kombination AB-Serum plus Ziegen-Serum glich der Standard-Blockierung. Die Vorbehandlung mit dem Image-IT Fx Signalverstärker führte bei zwei durchgeföhrten Versuchen ebenfalls zu keiner Verbesserung. Es machte sogar den Eindruck, dass dieses Reagenz die Ablösung der Zellen vom Haftobjektträger begünstigte.

4.1.1.4 EpCAM/CK-Doppelfärbung mit zusätzlicher Kernfärbung

Aufgrund der Ergebnisse der vorausgegangenen Abschnitte wurden die EpCAM-Färbung mit dem Primärantikörper E144 in Kombination mit dem Sekundärantikörper α -Kaninchen-Alexa 555 und die CK-Färbung mit dem Primärantikörper A45-B/B3 in Kombination mit dem Sekundärantikörper α -Maus-Alexa 488 durchgeführt. Nun wurde getestet, ob beide Einzelfärbungen gleichzeitig durchgeführt werden können, um so die Färbedauer zu verkürzen. Dazu wurde zunächst die Kreuzreaktivität der verschiedenen Antikörper untereinander geprüft. Es wurde jeweils der Primärantikörper und die Isotypkontrolle der EpCAM- und der CK-Färbung mit dem jeweiligen Sekundärantikörper der anderen Färbung kombiniert (Tabelle 32). Bei vier durchgeföhrten Wiederholungen waren alle Kreuztest-Versuche negativ.

Tabelle 32: Kreuztest-Versuche zur Überprüfung der Kreuzreakтивität der Antikörper

Primärantikörper	Sekundärantikörper
A45-B/B3 Maus	α -Maus-Alexa 488
Maus IgG1k	
E144 Kaninchen	α -Kaninchen-Alexa 555
Kaninchen IgG	

Die nicht vorhandene Kreuzreaktivität erlaubte die parallele Durchführung beider Färbungen.

Als nächstes wurden die EpCAM-Einzelfärbung und anschließend die CK-Einzelfärbung auf dem gleichen Haftobjektträger (MCF-7, 1:100 in PBL) nacheinander durchgeführt. Die Isotypkontrolle wurde ebenso mit Maus IgG1k und Rabbit IgG behandelt. Die Färbeergebnisse der Doppelfärbung unterschieden sich nicht von denen der getrennt ausgeführten Färbung, die Isotypkontrolle war negativ. Die genannten Versuche wurden viermal wiederholt. Anschließend wurden beide Färbungen zusammen ausgeführt. Dazu fand die Inkubation der Primär- und Sekundärantikörper beider Färbungen gleichzeitig statt. Die Isotypkontrolle war negativ und die Färbeintensität war mit dem Ergebnis der vorherigen Färbung, bei der die zwei Färbungen nacheinander getätigt wurden, identisch. Der Versuch wurde viermal wiederholt. Außerdem verbesserte die Verlängerung der Inkubationszeit der Primärantikörper von 30 auf 45 min das Ergebnis.

Zusätzlich zur Doppelfärbung wurde eine Kernfärbung integriert, um die Zellen leichter detektieren zu können. Dazu wurde entweder Hoechst 33342 (1,25 ng/ml, 1,7 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml) oder DAPI (0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml) aufgetragen und jeweils 1 min inkubiert. Sowohl Hoechst 33342 als auch DAPI zeigten eine sehr starke Kernfärbung, die mit höherer Konzentration immer kräftiger wurde. Für die Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop war die niedrigste Konzentration ausreichend. Es wurde mit Hoechst 33342 weitergearbeitet, da gezeigt werden konnte, dass dieser eine nachfolgende genomische Analyse nicht beeinträchtigt (*Imle et al., 2009*). Abschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert.

Die etablierte Doppelfärbung wurde unter Verwendung der ausgewählten Antikörper (Tabelle 33) sowohl auf Haftobjektträger mit MCF-7 Zellen in PBL (Abbildung 14A-D) als auch auf MCF-7 in humanem Knochenmark (Abbildung 14E-H) erfolgreich durchgeführt.

Tabelle 33: Übersicht der verwendeten Antikörper für die EpCAM/CK-Fluoreszenzfärbung

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Kernfärbung	Isotypkontrolle
CK8, CK18, CK19	A45-B/B3	α -Maus-Alexa 488	Hoechst 33342	Maus IgG1k
EpCAM	E144	α -Kaninchen-Alexa 555	Hoechst 33342	Kaninchen IgG

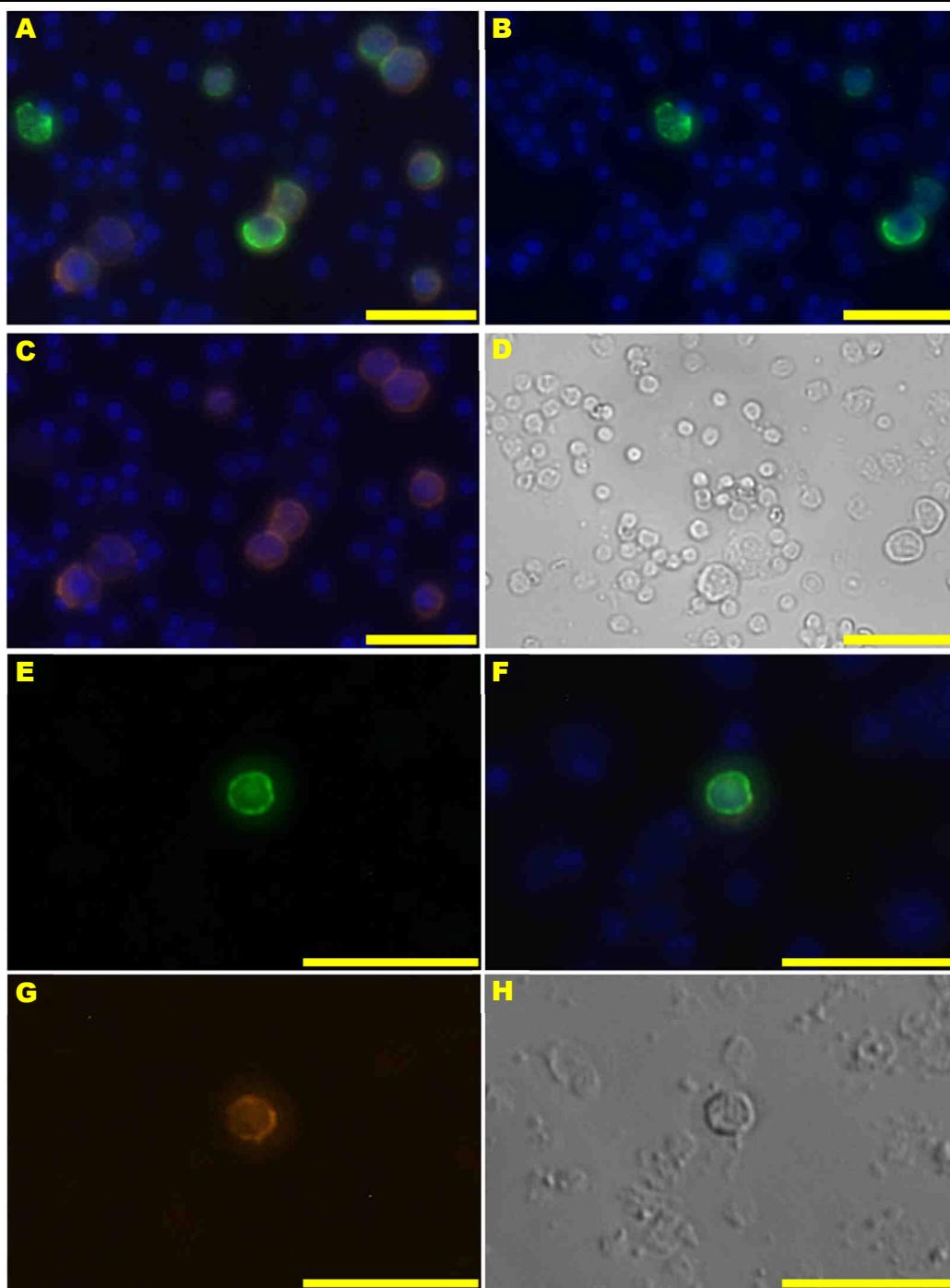


Abbildung 14: EpCAM/CK-Doppelfärbung auf Haftobjektträger: Doppelfärbung von EpCAM und CK mit MCF-7 Zellen in PBL (A-D) und 1:100 in humanem Knochenmark (F-H). **A:** Überlagerung Cy3, FITC, DAPI; **B:** Überlagerung FITC, DAPI; **C:** Überlagerung: Cy3, DAPI; **D:** Hellfeld; **E:** FITC; **F:** Überlagerung Cy3, FITC, DAPI; **G:** Cy3; **H:** Hellfeld; α -EpIC (E144, orange), CK (A45-B/B3, grün), Hoechst (blau); Skala 50 μ m

4.1.2 Analyse von Patientenproben mit der Doppelfärbung

Die im vorigen Abschnitt (4.1.1) etablierte Doppelfärbung gegen EpCAM und CK wurde nun dazu verwendet das Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen zu untersuchen. Dazu wurden bereits präparierte Haftobjektträger von 42 Patientinnen aus Augsburg gefärbt

Tabelle 34: Klinische Daten zu den Knochenmark-Haftobjektträgern aus Augsburg; PT: Primärtumor

		Patienten	[%]
Geschlecht	weiblich	42	100,0
	männlich	0	0
Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	31-40 Jahre	2	4,8
	41-50 Jahre	8	19,1
	51-60 Jahre	10	23,8
	61-70 Jahre	14	33,3
	>70 Jahre	5	11,9
	nicht bekannt	3	7,1
Lokalisation Mammakarzinom	rechts	15	35,7
	links	22	52,4
	beidseitig ¹	2	4,8
	unbekannt	3	7,1
Knochenmarkpunktion bei	Primäroperation	36	85,7
	Rezidiv	2	4,8
	Fernmetastasierung	1	2,4
	nicht bekannt	3	7,1
Vorhandensein von Fernmetastasen	M ₀	35	83,3
	M ₁	1	2,4
	nicht bekannt	6	14,3
Ausdehnung PT²	pT ₁	19	45,2
	pT ₂	19	45,2
	nicht bekannt	4	9,6
Nodalstatus	N ₀	25	59,6
	N ₁₋₃	14	33,3
	nicht bekannt	3	7,1
Differenzierungsgrad	G1	4	9,5
	G2	20	47,6
	G3	15	35,7
	nicht bekannt	3	7,2
Resektionsrand	R0	35	83,3
	R1	1	2,4
	nicht bekannt	6	14,3
Histologie	invasiv duktal	31	73,8
	invasiv lobulär	6	14,3
	sonstige ³	2	4,8
	nicht bekannt	3	7,1
Hormonrezeptorstatus PT	negativ	8	19,1
	positiv	31	73,8
	nicht bekannt	3	7,1
HER2-Rezeptorstatus PT	negativ	35	83,3
	positiv	4	9,5
	nicht bekannt	3	7,2
Subtyp	Luminal A	30	71,4
	Luminal B	2	4,8
	Triple negativ	5	11,9
	HER2 ⁺	2	4,8
	nicht bekannt	3	7,1

¹ Daten des Rezidivs bzw. weiter fortgeschrittenen Tumors sind gelistet

² zwei Patientinnen erhielten vor dem Staging eine neoadjuvante Chemotherapie

³ invasiv tubulär, invasiv medullär

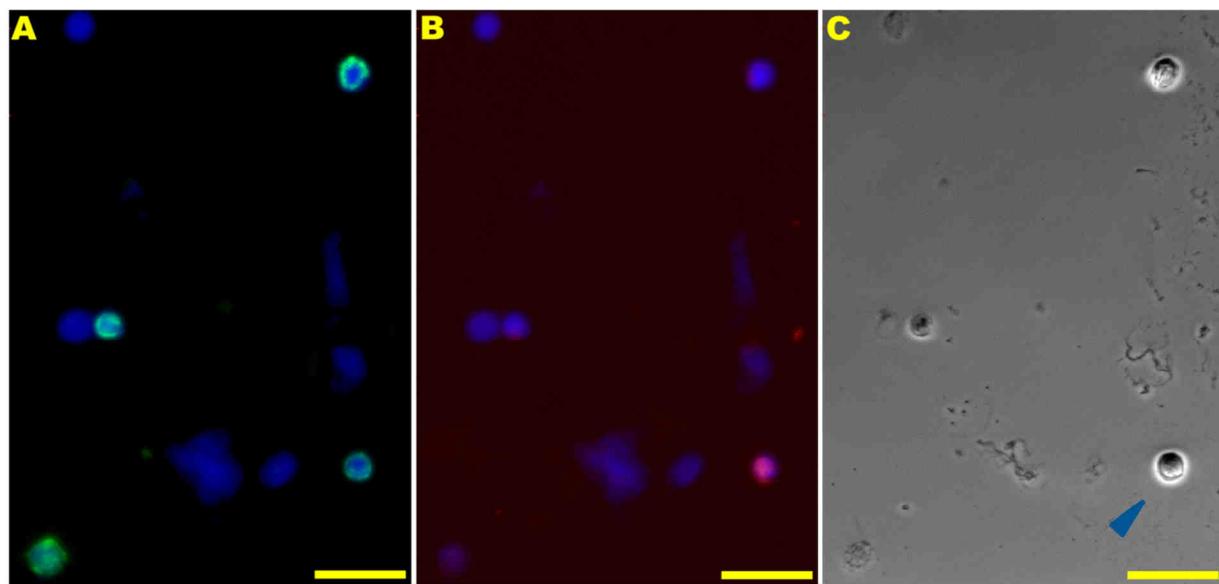


Abbildung 15: EpCAM/CK-Doppelfärbung auf Haftobjekträger: EpCAM und CK Doppelfärbung von Knochenmark einer M₁ Patientin. Isoliert wurde die rechte EpCAM⁺/CK⁺ Zelle, die mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet wurde, sowie zwei CK⁺ Zellen. **A:** Überlagerung FITC, DAPI; **B:** Überlagerung Cy3, DAPI; **C:** Hellfeld; α -Ep/C (E144, orange), CK (A45-B/B3, grün), Hoechst (blau); Skala 50 µm

(Tabelle 34). Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob es sich bei EpCAM⁺ und CK⁺ Zellen um unterschiedliche Subpopulationen handelt. Wären größtenteils doppelpositive Zellen zu finden, ließe sich vermuten, dass es sich dabei um eine Population handelt. In zwei Fällen war die Isotypkontrolle positiv und die Färbung wurde nicht gewertet. Bei weiteren drei Patientinnen konnte die Färbung nicht ausgewertet werden, da der Zellrasen auf dem Objektträger zu dicht bzw. die Anzahl kaputter, toter Zellen zu hoch für eine Beurteilung war, so dass am Ende 37 Patientinnen ausgewertet werden konnten.

Mit Hilfe der EpCAM/CK-Doppelfärbung (Abbildung 15) wurden in den Knochenmarkpräparaten verschiedene Zellpopulationen detektiert, die sich höchst signifikant ($p<0,001$, *Fisher's exakt test*) unterschieden (Tabelle 35). Es war deutlich erkennbar, dass sich zwei Gruppen absetzten. Waren die Zellen CK⁻, so waren sie häufig auch EpCAM⁻, CK⁺ Zellen dagegen waren immer auch EpCAM⁺. Bei 43,3 % der Patientinnen wurden EpCAM⁺/CK⁺ Zellen gefunden. Der Median der gefundenen EpCAM⁺ oder CK⁺ Zellen je Patientin betrug 1,5 pro 10^6 gefärbter Zellen (Bereich 1-3). Bei einer doppelpositiven Patientin wurde zusätzlich eine einfach-EpCAM⁺ Zelle detektiert. Insgesamt wurden vier einfach-EpCAM⁺ Zellen gefunden und 27 doppelpositive. Die EpCAM-Detektionsrate betrug 51,4 %, die CK-Detektionsrate 43,2 %. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich nicht um zwei verschiedene Zellpopulationen handelt. Da alle gefundenen CK⁺ Zellen ebenfalls EpCAM⁺ waren, ist davon auszugehen, dass bei der alleinigen Verwendung eines Antikörpers gegen das Antigen EpCAM, die gleiche Zellpopulation detektiert werden kann. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Färbeergebnis (EpCAM/CK getrennt bzw. kombiniert) und klinischen Parametern (u.a. G, T, N, M) gefunden werden (Daten nicht

gezeigt). Die Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Nina Patwary durchgeführt, die die detektierten Zellen im Rahmen ihrer Promotionsarbeit isoliert und weiter charakterisiert hat.

Tabelle 35: Ergebnisse der EpCAM/CK-Doppelfärbung von 37 Patientenproben; angegeben ist die Anzahl der positiven Proben neben der Gesamtzahl an auswertbaren Proben und in Klammern der Prozentwert für jedes Feld

	EpCAM ⁻	EpCAM ⁺
CK ⁻	18 / 37 (48,6 %)	3 / 37 (8,1 %)
CK ⁺	0 / 37 (0 %)	16 / 37 (43,3 %)

4.2 Analyse von Patientenproben mit der EpCAM-Suspensionsfärbung

Das Ziel dieser Arbeit war es, disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen im Stadium M₀ (ohne nachweisbare Fernmetastasen) zu detektieren und diese zu charakterisieren. Dazu wurde ein neues Patientenkollektiv mit M₀ Patientinnen aufgebaut. Zum Vergleich wurde sowohl das Knochenmark von Patientinnen mit nachweisbaren Fernmetastasen (M₁) untersucht als auch zur Kontrolle das Knochenmark von gesunden Spenderinnen (*healthy donor*: HD). In dieser Arbeit wurde ein Antikörper gegen das auf der Zellmembran befindliche EpCAM verwendet, um Zellen epithelialen Ursprungs zu detektieren. So konnten die Analyse des Genoms und Transkriptoms der gleichen Zelle und damit eine weitergehende Charakterisierung der DCC erfolgen. Zusätzlich wurden auch Lymphknoten zur Verfügung gestellt, die ebenfalls aufgearbeitet und auf DCC untersucht wurden.

4.2.1 Aufarbeitung der Knochenmarkaspirate

Insgesamt wurden 96 Knochenmarkproben von M₀ Patientinnen, sieben von M₁ Patientinnen und 21 von gesunden Spenderinnen zur Verfügung gestellt. Der Großteil der Proben kam aus den Kliniken München und Regensburg (Abbildung 29). Elf Proben (8,9 %) wurden nicht aufgearbeitet, weil sie bereits bei der Ankunft geronnen waren. Insgesamt konnten 113 Knochenmarkaspirate, davon 87 von M₀ Mammakarzinom-Patientinnen, sieben von M₁ Patientinnen und 19 Knochenmarkaspirate von gesunden Spenderinnen untersucht werden (Abbildung 29). Das abgenommene Volumen des Aspirates variierte dabei zwischen 2 und 34 ml, der Median betrug 10 ml (Tabelle 37). Eine Ausnahme bildete eine M₁ Patientin mit manifesten Knochenmetastasen (MC-947). Von dieser Patientin konnte eine solide Metastase vom rechten Hüftkopf entnommen werden, die zu Beginn der Aufarbeitung mit der Medimaschine zerkleinert wurde. Die weitere Aufarbeitung entsprach der im Methodenteil beschriebenen Knochenmark-Aufarbeitung (Kapitel 3.1.1).

Tabelle 36: Herkunft und Aufarbeitung der eingegangenen Knochenmarkaspirate

Klinikum	Art	Eingang	[%]	Verwertbare Proben	[%]
München - Frauenheilkunde	M ₀ + M ₁	42	33,9	38	33,6
Regensburg - Frauenheilkunde	M ₀	35	28,2	31	27,4
Augsburg - Med. Klinik II	M ₀	20	16,1	19	16,8
Regensburg - Chirurgie	HD + M ₁	11	8,9	10	8,9
München - Chirurgie	HD	11	8,9	10	8,9
Darmstadt - Med. Klinik V	M ₀ + M ₁	5	4,0	5	4,4
Summe		124	100,0	113	100,0

Die Aufarbeitung von über 50 % der M₀ und fast aller HD Proben erfolgte innerhalb von zwölf Stunden nach der Punktions. Diese Proben kamen aus Regensburg oder wurden per Kurier nach Regensburg gebracht. Dagegen wurde der Großteil (85,7 %) der M₁ Proben 12-24 h nach der Operation aufbereitet (Tabelle 37). Dies lag daran, dass diese Proben meist aus dem Klinikum Darmstadt kamen und deshalb über Nacht transportiert wurden.

Es wird empfohlen, die Punktions des Knochenmarks am rechten und linken Beckenkamm durchzuführen (*Fehm et al., 2006*). Diese bilaterale Abnahme erfolgte bei 52,9 % der M₀ Patientinnen, während bei einem Teil der Patientinnen Knochenmark nur von einer Seite entnommen wurde. Meist war in diesen Fällen die Abnahme auf der anderen Beckenseite erfolglos oder es sprachen medizinische Gründe gegen die beidseitige Punktions. Bei 47,4 % der gesunden Spender stand nur Knochenmark von einer Seite zur Verfügung, was auf die Art der Gewinnung zurückzuführen ist. Bei der Hüftoperation wurde diesen Patientinnen Knochenmark von der Seite abgenommen, auf der das neue Hüftgelenk eingesetzt wurde. Geschah dies einseitig, wurde nur von einer Seite Knochenmark gewonnen. Der hohe Anteil an Fällen mit unbekanntem Punktionsort ist meist auf operationstechnische Gründe der Hygiene zurückzuführen. Meist wurde vor der Operation punktiert und das Knochenmark aus dem Operationssaal gereicht. Unter diesen sterilen Umständen bestand für die Operateure oft nicht die Möglichkeit den Punktionsort zu notieren. Dies war wiederum von Klinikum zu Klinikum unterschiedlich und abhängig von der jeweiligen Operation. Beidseitig gewonnenes Knochenmark wurde vor der Aufarbeitung gemischt.

War ein Befund über den Nachweis von CK⁺ Zellen erwünscht, wurden die eingegangenen Knochenmarkaspirate bei ausreichender Zellzahl nach dem ersten Waschschritt geteilt. Diese Proben wurden mit Hilfe von verschiedenen Gradienten aufgearbeitet (Abbildung 16). Knochenmarkproben von gesunden Spenderinnen waren allein für die Forschung bestimmt, deswegen konnten diese Proben abhängig von der Zellzahl immunomagnetisch sortiert werden (Tabelle 38) aufgeführt. Der Großteil der Proben wurde mit dem Dichtegradienten Percoll 65 aufgearbeitet (M₀: 51,7 %, M₁: 85,7 % und HD: 94,7 %).

Tabelle 37: Kennzahlen während der Knochenmarkaufarbeitung und Anzahl der mit dem EpCAM-Antikörper gefärbten Proben: Zeitintervall zwischen Punkt und Screening sowie Punktsort der Knochenmarkaspirate, Volumen, Anteil der Erythrozyten an der Gesamtzellzahl und Anteil der Zellen, die nach der MACS zurückgewonnen wurden von 87 M₀, sieben M₁ und 19 HD Knochenmarkproben: n: absolute Anzahl an Proben; MACS: immunomagnetische Zellseparation; MW: arithmetisches Mittel; SD: Standardabweichung

		M ₀ [n]	M ₀ [%]	M ₁ [n]	M ₁ [%]	HD [n]	HD [%]
Zeitintervall	0-12 h	44	50,6	1	14,3	18	94,7
	12-24 h	37	42,5	6	85,7	1	5,3
	> 24 h	6	6,9	0	0	0	0
Punktion Beckenkamm	rechts	5	5,8	1	14,3	5	26,3
	links	1	1,1	1	14,3	4	21,1
	beidseitig	46	52,9	0	0	3	15,8
	unbekannt	35	40,2	5	71,4	7	36,8
		M₀		M₁		HD	
Volumen KM [ml]	MW	11,3		10,1		14,2	
	SD	6,6		6,3		5,0	
	Median	10,0		10,5		13,0	
	Bereich	2,0-34,0		2,0-17,5		7,5-22,0	
Anteil Erythrozyten [%]	MW	37,3		29,2		40,6	
	SD	19,6		28,2		20,2	
	Median	35,0		40,0		39,9	
	Bereich	0-89,0		0-63,0		5,3-88,3	
Anteil MACS [%]	MW	10,8		5,3		15,5	
	SD	13,7		7,1		24,5	
	Median	5,0		2,4		4,5	
	Bereich	0-61,0		0-18,0		0-86,7	
Screening Anzahl [x10⁶]	MW	1,8		0,8		1,7	
	SD	0,7		1,0		0,6	
	Median	2,0		0,2		2,0	
	Bereich	0,01-3,9		0,01-2,0		0,2-2,3	

Für die weiteren Auswertungen wurden die Gradienten aufgrund der teilweise geringen Fallzahlen nach ihrer Dichte zusammengefasst. Ficoll und Percoll 60 haben eine Dichte von 1,077 g/cm³, die Dichte von Percoll 65 und Percoll 70 ist größer (1,083 g/cm³ bzw. 1,089 g/cm³). Wenn die anschließende Gesamtzahl an mononukleären Zellen (MNZ) mindestens 10⁷ betrug, wurde die immunomagnetische Zellseparation (MACS) durchgeführt. Es wurden insgesamt 76 von 113 Knochenmarkproben (67 %) immunogenetisch separiert (Tabelle 38). Nach dem Dichtegradienten variierte die Menge an MNZ zwischen 10⁴ Zellen und 3,6 x 10⁸ Zellen. Der Anteil der Erythrozyten an der Gesamtzahl an Zellen (Leukozyten und Erythrozyten) betrug 37,3 % bei den M₀ Proben. Der Anteil an Zellen, der nach der MACS erhalten wurde, war im Median 5,0 % der Eingangszellzahl (Tabelle 37). Wenn möglich wurden nach dem Gradienten bzw. nach der MACS 2 x 10⁶ Zellen mit dem Antikörper HEA125 gefärbt und unter dem Mikroskop nach EpCAM⁺ Zellen untersucht. Der Median der gefärbten Zellen aller Knochenmarkproben betrug 2 x 10⁶ Zellen (Bereich 0,01 x 10⁶ - 3,9 x 10⁶). Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass der Median der gefärbten

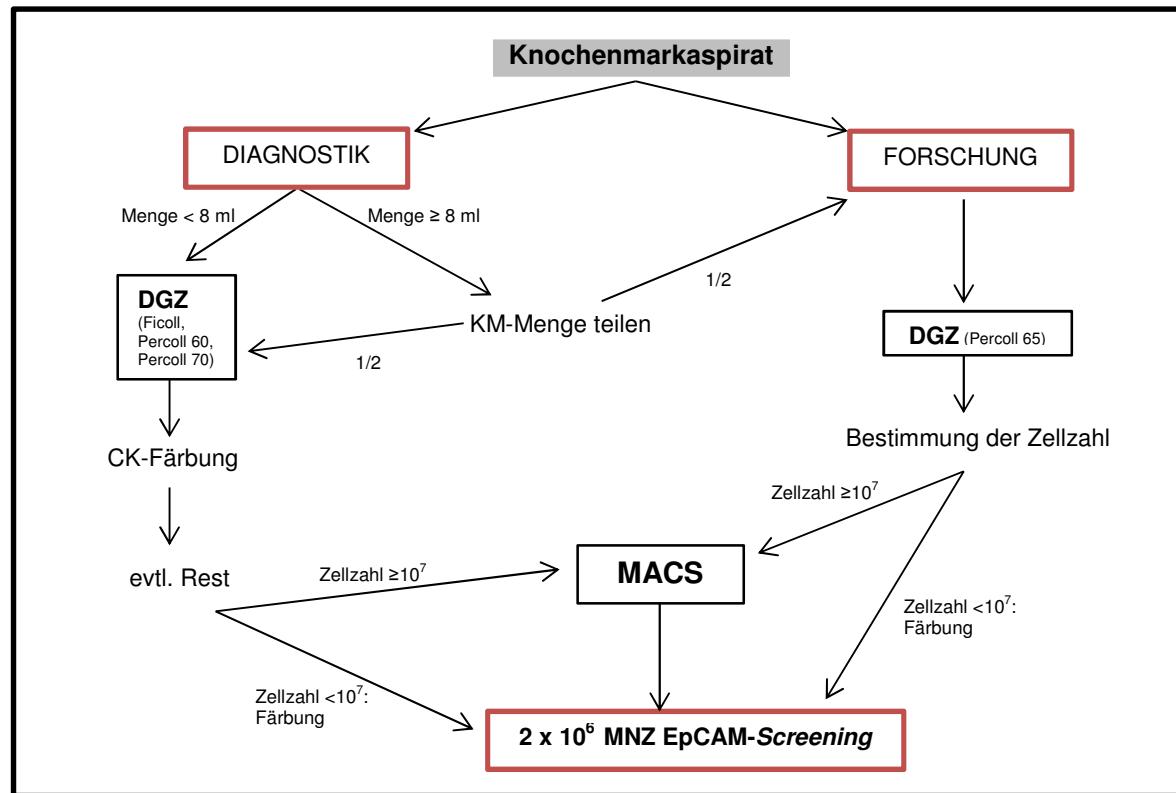


Abbildung 16: Überblick über die verschiedenen Aufarbeitungswege der eingegangenen Knochenmarkaspirate: Abhängig davon, ob ein CK-Befund erwünscht oder die komplette Probe für die Forschung bestimmt war, wurde das Knochenmark geteilt und aufgearbeitet. Bis zu 2×10^6 mononukleäre Zellen (MNZ) wurden nach der Aufarbeitung mit einem EpCAM-Antikörper gefärbt. **DGZ:** Dichtegradienten-Zentrifugation, **MACS:** immunomagnetische Zellséparation, **MNZ:** mononukleäre Zellen, **CK:** Zytokeratin, **KM:** Knochenmark

M_1 Zellen ($0,2 \times 10^6$ Zellen) im Vergleich zu den M_0 - und HD Zellen ($2,0 \times 10^6$) kleiner war (Tabelle 37). Dies lag daran, dass im Knochenmark einer M_1 Patientin aus Erfahrung immer eine hohe Anzahl an EpCAM⁺ Zellen gefunden wurde und dadurch eine kleinere Zellzahl für die Färbung ausreichte. Deshalb wurden diese seltenen Proben, die für mehrere Projekte wichtig waren, meist aufgeteilt.

Tabelle 38: Aufarbeitung der Knochenmarkproben: Die Knochenmarkproben (87 M_0 , sieben M_1 und 19 HD) wurden mit Hilfe verschiedener Gradienten aufgearbeitet, die aufgrund ihrer Dichte zusammengefasst wurden. In einigen Fällen wurde zusätzlich die MACS durchgeführt. *n:* absolute Anzahl an Proben; *p:* Dichte

	M_0 [n]	M_0 [%]	M_1 [n]	M_1 [%]	HD [n]	HD [%]	
Aufteilung KM	nein	51	58,6	5	71,4	5	26,3
	ja	36	41,4	2	28,6	14	73,7
Gradient	$\rho = 1,077 \text{ g/cm}^3$	28	32,2	1	14,3	1	5,3
	$\rho > 1,077 \text{ g/cm}^3$	59	67,8	6	85,7	18	94,7
MACS	nein	34	39,1	2	28,6	1	5,3
	ja	53	60,9	5	71,4	18	94,7

Gradient	[n]	[%]
$\rho ≥ 1,077 \text{ g/cm}^3$	37	32
$\rho ≥ 1,077 \text{ g/cm}^3 + \text{MACS}$	76	68
Σ	113	100

4.2.2 Detektion von EpCAM⁺ Zellen in Knochenmark

Bis Anfang 2009 wurden die Knochenmarkproben mit dem EpCAM-Antikörper 3B10 in Kombination mit Cy3 gefärbt (Gesamtanteil 10,6 %). Es handelte sich dabei um zwölf M₀ Proben aus Augsburg. Es wurde dann HEA125 (Gesamtanteil 89,4 %) verwendet, da der bisherige Antikörper nicht mehr verfügbar war. Dieser EpCAM-Antikörper ist direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE konjugiert, ein sekundärer Antikörper daher nicht nötig. Der Wechsel ermöglichte außerdem die Durchführung der MACS. Mit dem Antikörper 3B10 waren 16,7 % der untersuchten Knochenmarkproben EpCAM⁺. Dagegen besaß der Antikörper HEA125 eine Detektionsrate von 62,7 %. Der Unterschied in der Detektion ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Aufarbeitung der Knochenmarkproben zurückzuführen, da zu Beginn dieser Arbeit verschiedene Gradienten verwendet wurden. Weil der Anteil der mit dem Antikörper 3B10 gefärbten Proben gering war und nur vier EpCAM⁺ Zellen von zwei Patientinnen isoliert werden konnten, wurden die Ergebnisse beider Antikörper für alle weiteren Auswertungen zusammengefasst.

In 56,3 % der M₀ Knochenmarkproben konnten EpCAM⁺ Zellen gefunden werden. Wie erwartet, war bei den M₁ Patientinnen die Detektionsrate höher, alle untersuchten Knochenmarkproben waren positiv. Die Detektionsrate bei gesunden Spendern betrug 52,6 %, nur knapp 4 % unter dem M₀-Wert. Hierbei unterschieden sich die Ergebnisse der M₀ und M₁ Patientinnen signifikant ($p=0,039$, *Fisher's exakt*). Der Vergleich M₀ gegen HD war dagegen nicht signifikant ($\chi^2(1)=0,1$; $p=0,769$). Wenn möglich, wurden mindestens fünf positive Zellen pro Patientin isoliert (Tabelle 39). M₀, M₁ und HD Knochenmarkproben unterschieden sich nicht nur in der Detektionsrate EpCAM⁺ Zellen, sondern auch in deren Färbeintensität (Abbildung 17). Die EpCAM⁺ Zellen von gesunden Spendern waren im Vergleich zu M₀ Zellen nur sehr schwach gefärbt. Dagegen waren EpCAM⁺ Zellen von M₁ Patientinnen stärker gefärbt als M₀ Zellen. Der unter dem Mikroskop deutlich erkennbare Unterschied in der Färbeintensität ist auf den Fotografien jedoch nur schwer zu erkennen.

Tabelle 39: EpCAM-positive Zellen im Knochenmark: EpCAM-Positivität der 87 M₀, sieben M₁ und 19 HD Proben; *n*: absolute Anzahl an EpCAM⁺ Proben der jeweiligen Gruppe

EpCAM		M ₀	M ₁	HD
Positivität	[%]	56,3	100,0	52,6
	<i>n</i>	49	7	10
isolierte Zellen pro Patientin [n]	MW	5,0	7,7	3,1
	SD	2,9	2,8	1,6
	Median	5,0	8,0	3,0
	Bereich	1-13	3-11	1-5

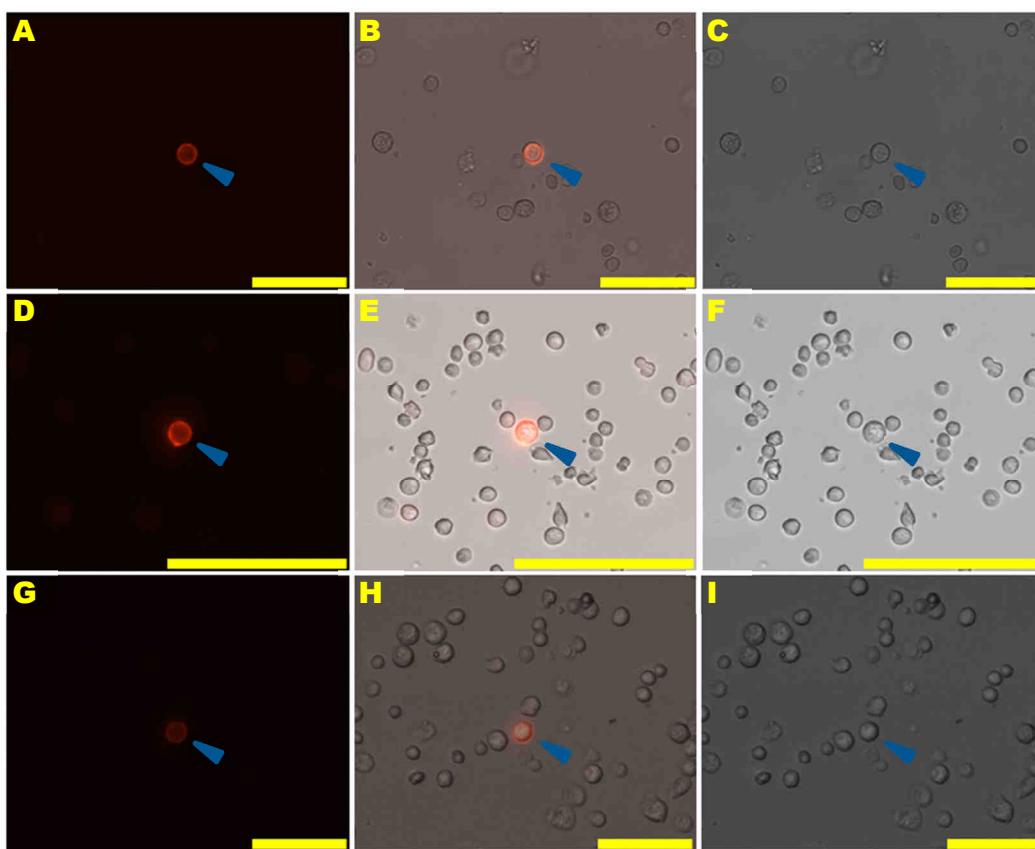


Abbildung 17: EpCAM⁺ Zellen in M₀, M₁ und HD-Knochenmarkproben: Färbung von Patientenknochenmark mit dem EpCAM-Antikörper HEA125. Die EpCAM⁺ Zellen sind mit einem blauen Pfeil markiert. **A-C:** EpCAM⁺ Zelle einer M₀ Patientin: Cy3, Überlagerung Cy3 + Hellfeld, Hellfeld; **D-F:** EpCAM⁺ Zelle einer M₁ Patientin: Cy3, Überlagerung Cy3 + Hellfeld, Hellfeld; **G-I:** EpCAM⁺ Zelle einer gesunden Spenderin: Cy3, Überlagerung Cy3 + Hellfeld, Hellfeld; 20-fache Vergrößerung, Skala 50 µm

Der Anteil an EpCAM⁺ M₀ Patientinnen nahm mit Zunahme der Aufarbeitungszeit ab (Tabelle 40). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($\chi^2(2)=3,8; p=0,148$). Dagegen war die Detektionsrate bei Patientinnen mit oder ohne durchgeföhrter MACS signifikant verschieden ($\chi^2(1)=4,6; p=0,032$). Jedoch wurden in beiden Gruppen verschiedene Gradienten bei der Aufarbeitung verwendet, wodurch die Detektionsraten nicht direkt zu vergleichen waren.

Als nächstes wurde die Anzahl an EpCAM⁺ Zellen pro 1 Million untersuchter Zellen verglichen, um zu sehen, ob sich hier die Knochenmarkaspirate von Patientinnen von den HD Proben unterschieden. Dazu wurden nur EpCAM⁺ Knochenmarkproben berücksichtigt.

Tabelle 40: EpCAM Positivität abhängig von der Aufarbeitungszeit (Zeitintervall) und der Dichte der Gradienten; n: Anzahl EpCAM⁺ Patientinnen; N: Gesamtzahl der in dieser Gruppe aufgearbeiteten Patientinnen; p: Dichte

EpCAM-Positivität	M ₀ [n/N]	M ₀ [%]	M ₁ [n/N]	M ₁ [%]	HD [n/N]	HD [%]
EpCAM ⁺	49 / 87	56,3	7 / 7	100,0	10 / 19	52,6
Zeitintervall: EpCAM⁺						
0-12 h	29 / 44	65,9	1 / 1	100,0	9 / 18	50,0
12-24 h	18 / 37	48,7	6 / 6	100,0	1 / 1	100,0
> 24 h	2 / 6	33,3	0 / 0	-	0 / 0	-
Gradient	$p \geq 1,077 \text{ g/cm}^3$	24 / 34	70,6			
	$p \geq 1,077 \text{ g/cm}^3 + \text{MACS}$	25 / 53	47,2			

Es wurden nicht nur die isolierten Zellen gezählt, sondern auch die weniger stark gefärbten addiert, die vergleichbar mit den schwach positiven Zellen in einem HD-Knochenmark waren (Abbildung 18). Da diese Gesamtanzahl EpCAM⁺ Zellen nicht von Beginn an bestimmt wurde, konnten die Werte nur für einen Teil der Proben aufgetragen werden. In einigen Fällen standen nach der Knochenmarkaufarbeitung weniger als 2 Millionen Zellen zur Verfügung. Daraus resultierten Werte für die Gesamtanzahl EpCAM⁺ Zellen pro 1 Million untersuchter Zellen zwischen null und eins. Der Vergleich der Anzahl an EpCAM⁺ Zellen zwischen M₀ und M₁ Patientinnen war signifikant ($p=0,014$) verschieden, ebenso zwischen M₀ Patientinnen und gesunden Spendern ($p=0,0497$, *Wilcoxon-Mann-Whitney*). Dies lässt vermuten, dass, auch wenn sich M₀ und HD Proben nicht in der Detektionsrate EpCAM⁺ Zellen unterschieden, dennoch ein Unterschied in der Anzahl detekтирter EpCAM⁺ Zellen bestand.

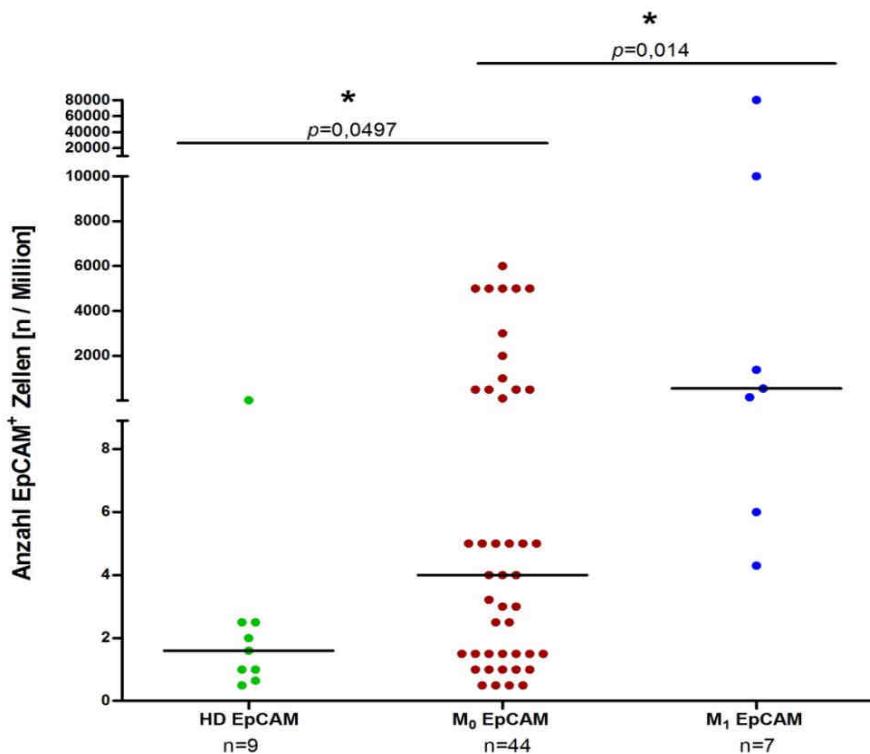


Abbildung 18: Vergleich der Anzahl an EpCAM⁺ Zellen in 10^6 untersuchten Zellen: Es wurden nur die Ergebnisse der EpCAM⁺ Knochenmarkaspirate berücksichtigt, wenn die Gesamtzahl der EpCAM⁺ Zellen bekannt war. Die y-Achse wurde dreimal geschnitten und besteht somit aus drei verschiedenen Skalen, um die unterschiedlichen Zellzahlen graphisch darzustellen. n = Anzahl der Proben in der jeweiligen Gruppe; Wilcoxon-Mann-Whitney

4.2.3 Korrelation der EpCAM-Färbeergebnisse mit den klinischen Daten

Anschließend sollte der Zusammenhang zwischen der Detektion von EpCAM⁺ Zellen und den klinischen Daten der Patientinnen untersucht werden (Tabelle 41). Mit Hilfe der klinischen Daten wurden die Patientinnen in verschiedene Subtypen und UICC Stadien eingeteilt (Tabelle 43). Es konnte festgestellt werden, dass die Häufigkeit des Auftretens der

Tabelle 41: Klinische Daten und histopathologische Charakteristika der bearbeiteten Patientenproben:
PT=Primärtumor

		Knochenmark		Lymphknoten		M ₀ [%]	M ₀ [n]
		M ₀ [n]	M ₀ [%]	M ₁ [n]	M ₁ [%]		
Geschlecht	weiblich	87	100,0	7	100,0	10	100,0
	männlich	0	0	0	0	0	0
Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	31-40 Jahre	14	16,1	0	0	3	30,0
	41-50 Jahre	24	27,6	4	57,1	6	60,0
	51-60 Jahre	19	21,8	1	14,3	0	0
	61-70 Jahre	17	19,5	0	0	0	0
	>70 Jahre	13	14,9	2	28,6	1	10,0
Lokalisation Mammakarzinom	rechts	47	54,0	1	14,3	5	50,0
	links	36	41,4	4	57,1	5	50,0
	beidseitig ¹	4	4,6	1	14,3	0	0
	nicht bekannt	0	0	1	14,3	0	0
Entnahme bei	Primäroperation	65	74,7	1	14,3	9	90,0
	Repunktion ²	19	21,8	0	0	1	10,0
	Rezidiv (lokoregionär)	1	1,1	0	0	0	0
	Rezidiv (kontralateral)	2	2,3	0	0	0	0
	Fernmetastasierung	0	0	6	85,7	0	0
Ausdehnung PT³	pT ₁	40	46,0	2	28,6	2	20,0
	pT ₂	34	39,1	3	42,9	6	60,0
	pT ₃	6	6,9	1	14,3	2	20,0
	pT ₄	2	2,3	0	0	0	0
	nicht bekannt	5	5,7	1	14,3	0	0
Nodalstatus	N ₀	62	71,3	2	28,6	8	80,0
	N ₁	18	20,7	1	14,3	2	20,0
	N ₂	4	4,6	1	14,3	0	0
	N ₃	2	2,3	2	28,6	0	0
	nicht bekannt	1	1,1	1	14,3	0	0
Differenzierungsgrad	G1	5	5,7	1	14,3	0	0
	G2	51	58,6	2	28,6	7	70,0
	G3	29	33,3	3	42,9	3	30,0
	nicht bekannt	2	2,3	1	14,3	0	0
Resektionsrand	R0	83	95,4	3	42,9	10	100,0
	R1	3	3,4	2	28,6	0	0
	nicht bekannt	1	1,1	2	28,6	0	0
Histologie	DCIS	4	4,6	0	0	0	0
	invasiv duktal	66	75,9	3	42,9	9	90,0
	invasiv lobulär	7	8,0	1	14,3	1	10,0
	Mischform	5	5,7	1	14,3	0	0
	sonstige ⁴	5	5,7	0	0	0	0
	nicht bekannt	0	0	2	28,6	0	0
Hormonrezeptorstatus PT	negativ	19	21,8	1	14,3	5	50,0
	positiv	68	78,2	6	85,7	5	50,0
HER2-Rezeptorstatus PT	negativ	74	85,1	7	100,0	8	80,0
	positiv	11	12,6	0	0	2	20,0
	nicht bekannt	2	2,3	0	0	0	0

¹ Daten des Rezidivs bzw. weiter fortgeschrittenen Tumors sind gelistet

² von 15 Patientinnen wurden zwei Knochenmarkproben zu verschiedenen Zeitpunkten zur Verfügung gestellt

³ 21 Patientinnen erhielten vor dem Staging eine neoadjuvante Chemotherapie

⁴ invasiv tubulär, invasiv muzinös, invasiv metaplastisch, invasives Adenokarzinom

einzelnen Subtypen in dem untersuchten Kollektiv annähernd den, in der Literatur beschriebenen, Werten entsprach (Tabelle 3). Bei fünf Patientinnen trat der Tumor auf beiden Seiten auf. Davon stimmten in drei Fällen die klinischen Daten beider Tumoren überein. Bei zwei Patientinnen waren die Tumorcharakteristika verschieden. Für die Patientenübersicht wurde der weiter fortgeschrittene Tumor gewertet. Von den klinischen Auswertungen wurden diese Patientinnen jedoch ausgeschlossen.

Das Alter der Patientinnen bei der Primäroperation reichte von 31 bis zu 88 Jahren. Durchschnittlich wurden die Patientinnen mit 56,6 Jahren operiert ($\sigma=13,4$). Die gesunden Spenderinnen waren mit durchschnittlich 64,7 Jahre ($\sigma=16,8$, Bereich 19-82 Jahre) ungefähr acht Jahre älter. Es stellte sich zuerst die Frage, ob das Alter der Patientinnen zwischen den EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Patientinnen verschieden war. Bezuglich des Alters konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle 43).

Anschließend wurde das Alter der Patientinnen innerhalb der Mammakarzinom Subtypen betrachtet (Abbildung 19). Für diese und alle weiteren Auswertungen wurde die nicht invasive Form DCIS als eigene Gruppe mit den Subtypen der invasiven Form des Mammakarzinoms verglichen. Es wurden alle M₀ und M₁ Patientinnen eingeschlossen, von denen der Zeitpunkt der Primäroperation bekannt war. Die Subtypen unterschieden sich hinsichtlich des Alters signifikant voneinander ($p=0,014$, Kruskal-Wallis). Das Alter der Patientinnen bei der DCIS-Erstdiagnose war signifikant verschieden von Luminal A Tumoren ($p=0,012$), Patientinnen mit *Triple* negativen-Tumoren waren ebenfalls signifikant jünger bei der Erstdiagnose als Patientinnen mit Luminal A Tumoren ($p=0,014$, Wilcoxon-Mann-Whitney).

Des Weiteren sollte die EpCAM-Positivität auch zu den unterschiedlichen Punktions-Zeitpunkten verglichen werden. Die zur Verfügung gestellten Knochenmarkaspirate der M₀ Patientinnen wurden größtenteils bei der Primäroperation entnommen (n=65). In 19 Fällen wurden die Proben bei einer Repunktion abgenommen, die zu einem späteren Zeitpunkt, z.B. bei der Nachsorge stattfand (Tabelle 42). Die Repunktion wurde zwischen 176 und 544 Tagen nach der Primäroperation durchgeführt ($\bar{x}=248,2$, $\sigma=105,8$). Zum Zeitpunkt der Repunktion waren öfter EpCAM⁺ Zellen detektierbar, Patientinnen mit lokalen Rezidiven waren immer EpCAM⁺. Dies ließ auf eine Zunahme der EpCAM⁺ Zellen im Verlauf der Tumorprogression schließen. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($\chi^2(2)=2,3$; $p=0,312$). Ebenso wurden die EpCAM-Detektionsraten für die Mammakarzinom-Subtypen berechnet (Tabelle 42). Im Knochenmark von DCIS-Patientinnen konnten in 75 %, bei *Triple* negativen Patientinnen jedoch nur in 45,5 % EpCAM⁺ Zellen gefunden werden. Der Unterschied zwischen diesen beiden Subtypen war nicht signifikant ($p=0,569$).

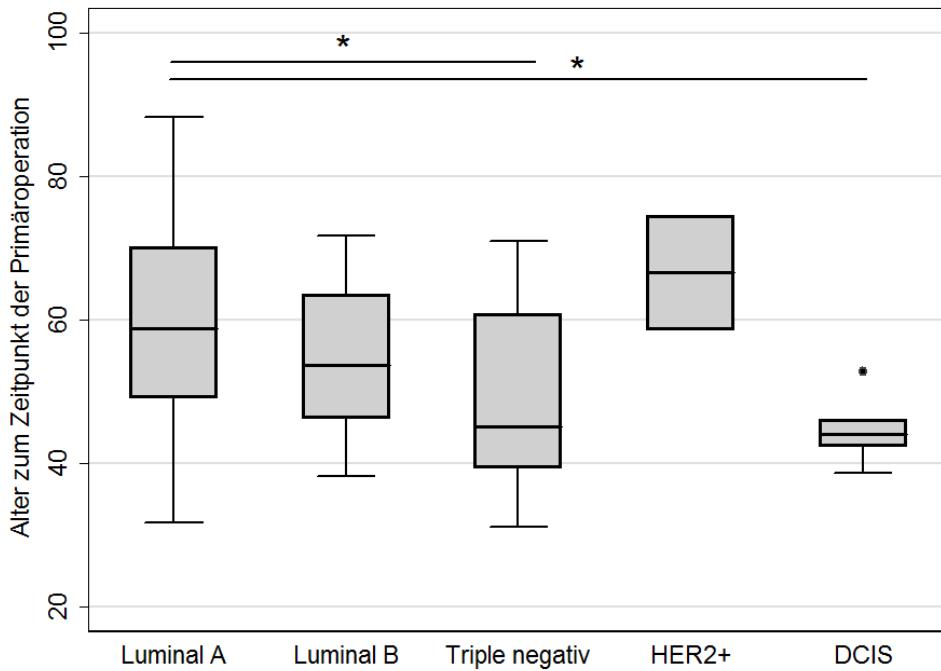


Abbildung 19: Alter zum Zeitpunkt der Primäroperation der Subtypen: Für diese Auswertung wurden alle M₀ und M₁ Patientinnen eingeschlossen, von denen der Zeitpunkt der Primäroperation bekannt war. Horizontal aufgetragen ist das Alter der Patientinnen von 63 Luminal A, sechs Luminal B, 16 Triple negativen, zwei HER2⁺ und fünf DCIS Tumoren.

Abschließend wurde das EpCAM-Färbeergebnis mit ausgewählten klinischen Parametern verglichen (Tabelle 43). Hierfür wurden nur M₀ Patientinnen berücksichtigt, denen entweder bei der Primäroperation Knochenmark entnommen wurde oder die zu einem späteren Zeitpunkt punktiert wurden. Patientinnen mit beidseitigen Tumoren, kontralateralen Rezidiven oder anderen Begleiterkrankungen wurden ausgeschlossen. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den UICC Stadien und der EpCAM-Positivität ($p=0,031$, Fisher's exakt

Tabelle 42: EpCAM⁺ Zellen zu verschiedenen OP-Zeitpunkten und innerhalb der Mammakarzinom-Subtypen; berücksichtigt wurden nur aufgearbeitete Knochenmarkproben von M₀ Patientinnen; gepaarte Proben zum Zeitpunkt der Primäroperation und eine Repunktion resultieren in unterschiedlichen Patientenzahlen; N: Gesamtzahl der in dieser Gruppe aufgearbeiteten Patientinnen

EpCAM-Positivität	M ₀ [n/N]	M ₀ [%]
EpCAM ⁺	49 / 87	56,3
OP-Zeitpunkt: EpCAM ⁺		
Primäroperation	37 / 65	56,9
Repunktion	12 / 19	63,2
lokales Rezidiv	3 / 3	100,0
EpCAM ⁺	41 / 72	56,9
Subtypen: EpCAM ⁺		
Luminal A	29 / 50	58,0
Luminal B	3 / 5	60,0
Triple negativ	5 / 11	45,5
HER2 ⁺	1 / 2	50,0
DCIS	3 / 4	75,0

test), wobei für die UICC Einteilung die fünf Übergruppen verwendet wurden, um höhere Fallzahlen in den einzelnen Gruppen zu erhalten. Zwischen dem Stadium II und dem Stadium III war ein deutlicher Anstieg der EpCAM-Positivität zu erkennen (von 25,8 % auf 61,3 %). Dieses Ergebnis erhärtet die Vermutung, dass die EpCAM-Positivität mit der Tumorprogression ansteigt.

Tabelle 43: Korrelation klinischer Daten der M₀ Patientinnen mit dem EpCAM-Färbeergebnis: Statistische Werte wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, mit dem Fisher's exakt test berechnet. PT: Primärtumor

	Patienten	[%]	EpCAM ⁺		EpCAM ⁻		p-Wert	
			Patienten	[%]	Patienten	[%]		
Alter bei Primäroperation	72	100,0	41	56,9	31	43,1	0,234	
	≤40 Jahre	11	15,3	9	81,8	2	18,2	
	41-50 Jahre	18	25,0	10	55,6	8	44,4	
	51-60 Jahre	16	22,2	7	43,8	9	56,3	
	61-70 Jahre	15	20,8	10	66,7	5	33,3	
Ausdehnung PT	>70 Jahre	12	16,7	5	41,7	7	58,3	0,131
	T ₁	34	47,2	20	58,8	14	41,2	
	T ₂	27	37,5	12	44,4	15	55,6	
Nodalstatus	T ₃ +T ₄	7	11,1	6	85,7	1	14,3	0,849
	N ₀	51	70,8	30	58,8	21	41,2	
	N ₁	16	22,2	9	56,3	7	43,8	
	N ₂	3	4,2	2	66,7	1	33,3	
Differenzierungsgrad	N ₃	1	1,4	0	0	1	100,0	0,859
	G1	5	6,9	3	60,0	2	40,0	
	G2	44	61,1	26	59,1	18	40,9	
Hormonrezeptorstatus PT	G3	22	30,6	11	50,0	11	50,0	X²(1)=0,3; p=0,559
	negativ	14	19,4	7	50,0	7	50,0	
HER2-Rezeptorstatus PT	positiv	58	80,6	34	58,6	24	41,4	1,000
	negativ	62	86,1	34	54,8	28	45,2	
UICC-Stadium	positiv	8	11,1	5	62,5	3	37,5	0,031
	UICC 0	3	4,2	3	100,0	0	0	
	UICC I	27	37,5	19	70,4	8	29,6	
	UICC II	32	44,4	13	40,6	19	59,4	
Subtyp	UICC III	8	11,1	6	75,0	2	25,0	0,914
	Luminal A	50	73,5	29	58,0	21	42,0	
	Luminal B	5	7,4	3	60,0	2	40,0	
	Triple negativ	11	16,2	5	45,5	6	54,5	
	HER2 ⁺	2	2,9	1	50,0	1	50,0	
Histologie	DCIS	4	5,6	3	75,0	1	25,0	0,898
	invasiv duktal	55	76,4	30	54,5	25	45,5	
	invasiv lobulär	6	8,3	4	66,7	2	33,3	
	sonstige	7	9,7	4	57,1	1	14,3	

4.2.4 Aufarbeitung und Detektion von EpCAM⁺ Zellen in Lymphknoten

Insgesamt wurden 15 Sentinel-Lymphknoten (SLN, *sentinel lymph node*) zur Verfügung gestellt, die bei der Primäroperation der Patientinnen entnommen wurden. Fünf Lymphknoten konnten nicht aufgearbeitet werden, da sie fälschlicherweise in Formalin transportiert wurden und deshalb für eine Molekularanalyse auf Einzelzellebene ungeeignet waren. Nicht mit Formalin behandelte Lymphknoten wurden vom Eingangslabor der Pathologie des Uniklinikums Regensburg geteilt und eine Hälfte für die Forschung zur Verfügung gestellt. Diese Hälfte wurde zerkleinert und homogenisiert (Kapitel 3.1.2). Der Lymphknoten einer Patientin (MC-1027LK) wurde ca. 30 sec nach Einlegen in Formalin aus der Flüssigkeit entnommen und routinemäßig aufgearbeitet. Dies erfolgte versuchsweise, um diese Lymphknoten-Probe nicht zu verlieren. Es konnten 120.000 Zellen nach dem Gradienten gefärbt werden. Ein Zusammenhang zwischen dieser vergleichsweise niedrigen Zellzahl und dem Kontakt mit Formalin kann nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt waren zehn Lymphknoten verwendbar und wurden innerhalb von zwölf Stunden bearbeitet. Nach der Aufarbeitung waren in der Suspension viele, mit Trypanblau gefärbte, tote Zellen. Dies war auf die Aufarbeitung des Lymphknotens in der Medimaschine zurückzuführen. Durch die bei der Zerkleinerung und Vereinzelung auftretenden Scherkräfte wurde ein Teil der Zellen zerstört. Der Anteil der toten Zellen variierte zwischen 20 % und 95 %. Alle zehn Lymphknoten konnten auf EpCAM⁺ Zellen untersucht werden. Der Median der mit dem EpCAM-Antikörper HEA125 gefärbten Zellen betrug $2,0 \times 10^6$ Zellen pro Lymphknoten (Bereich $0,12 \times 10^6$ – $2,0 \times 10^6$). In 2/10 untersuchten Lymphknoten (20 %) konnten EpCAM⁺ Zellen nachgewiesen und isoliert werden. Der Median der isolierten Zellen betrug 4,5 Zellen (Bereich 4-5). Sie wurden analog den Zellen aus dem Knochenmark aufgearbeitet. Bei sechs Patientinnen wurde bei der Operation neben dem Lymphknoten auch Knochenmark abgenommen. In drei Fällen konnten weder im Lymphknoten noch im Knochenmark EpCAM⁺ Zellen gefunden werden. Bei den restlichen drei Patientinnen waren EpCAM⁺ Zellen im Knochenmark nachweisbar, nicht jedoch im Lymphknoten.

4.2.5 Gepaarte Knochenmarkproben

Um den Verlauf der EpCAM⁺ und CK⁺ Zellen über die Zeit zu untersuchen, wurden Knochenmarkproben derselben Patientin untersucht, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten punktiert worden war. Mit Hilfe dieser gepaarten Proben sollte die Auswirkung der stattgefundenen Therapie auf das Vorhandensein von Marker-positiven Zellen analysiert werden. Von insgesamt 17 Patientinnen waren gepaarte Knochenmarkproben verfügbar. Davon wurde bei acht Patientinnen der Primärtumor bei der ersten Punktion entfernt und die zweite Punktion fand nach Abschluss der adjuvanten Therapie statt (Gruppe 1). Die

Repunktion fand nach durchschnittlich einem Jahr bei der Nachsorge statt. Bei den zwei Patientinnen in dieser Gruppe, die eine neoadjuvante Therapie bekamen, wurde erst nach erfolgter Therapie die Primäroperation mit Entfernung des Primärtumors und Abnahme des ersten Punktates durchgeführt.

Dagegen wurden neun Patientinnen im Anschluss an die erste Punktion neoadjuvant therapiert und der Primärtumor erst zum Zeitpunkt der zweiten Punktion entfernt (Gruppe 2). Bei der ersten Operation wurde lediglich der Wächterlymphknoten entfernt und der Primärtumor im Körper belassen. Anschließend erfolgte eine neoadjuvante Chemotherapie und

Tabelle 44: Patientendaten zu den gepaarten Knochenmarkproben; Gruppe 1: Entfernung des Tumors bei der Primäroperation; Gruppe 2: Entfernung des Tumors bei der zweiten Punktion; OP Intervall: Abstand zwischen beiden Operationen in Tagen; EpCAM-, CK-Befund: Ø=kein Befund verfügbar, ↑= Anstieg der detektierten Zellzahl; ↓=Abnahme der detektierten Zellzahl; -= keine Veränderung zwischen beiden Punktationen

Paar ID	Alter bei Diagnose	OP-Intervall	EpCAM	CK	Histologie	Subtyp	Grading
Gruppe 1-5	58,7	544	-	↓	invasiv papillär	Luminal B	2
Gruppe 1-6	50,6	203	Ø	↓	invasiv duktal	Luminal A	3
Gruppe 1-7	60,5	335	Ø	↓	invasiv duktal	Luminal A	3
Gruppe 1-9	60,6	439	Ø	-	invasiv duktal	Luminal B	2
Gruppe 1-11	51,9	312	↓	↓	invasiv duktal	Luminal A	3
Gruppe 1-12	54,2	209	Ø	↓	invasiv duktal	ER/PR+, HER2+	3
Gruppe 1-14	63,5	426	↓	-	invasiv duktal	Luminal B	3
Gruppe 1-17	31,0	370	Ø	↓	invasiv duktal	Luminal A	2
Gruppe 2-1	41,5	176	↑	↑	invasiv duktal	Triple negativ	3
Gruppe 2-2	36,5	190	↑	↓	invasiv duktal	Triple negativ	2
Gruppe 2-4	46,0	193	↓	Ø	Mischform (duktal+lobulär)	Luminal A	2
Gruppe 2-8	55,9	213	-	-	invasiv duktal	Triple negativ	3
Gruppe 2-10	48,8	182	-	Ø	invasiv duktal	Triple negativ	2
Gruppe 2-15	38,0	185	↑	↑	invasiv duktal	Luminal A	2
Gruppe 2-16	49,1	194	-	↑	invasiv duktal	Luminal A	2
Gruppe 2-19	38,2	179	Ø	↑	invasiv duktal	Luminal B	2
Gruppe 2-20	41,7	183	↑	Ø	invasiv duktal	Luminal A	3

Paar ID	T	N	L	R	Bestrahlung	Therapie	
Gruppe 1-5	2	0	0	0	ja	adjuvant	Chemotherapie + Antiestrogen + Herceptin
Gruppe 1-6	2	0	0	0	ja	neoadjuvant	Antiestrogen
Gruppe 1-7	3	1	1	0	ja	adjuvant	Chemotherapie + Aromataseinhibitor
Gruppe 1-9	1	0					
Gruppe 1-11	1	0	0	0	ja	adjuvant	Antiestrogen
Gruppe 1-12	2	0			nein	neoadjuvant	Chemotherapie + Herceptin
Gruppe 1-14	1	0	0	1		adjuvant	-
Gruppe 1-17	1	0	0	0	ja	adjuvant	Chemotherapie + Antiestrogen
Gruppe 2-1	2	0	0	0	ja	neoadjuvant	Chemotherapie
Gruppe 2-2	2	0	0	0	nein	neoadjuvant	Chemotherapie
Gruppe 2-4	1	0	0	0	ja	neoadjuvant	Chemotherapie
Gruppe 2-8	2	0	0	0	ja	neoadjuvant	Chemotherapie
Gruppe 2-10	2	0	0	0	ja	neoadjuvant	Chemotherapie
Gruppe 2-15	2	2	0	0	ja	neoadjuvant	Chemotherapie
Gruppe 2-16	1	1	0	0	ja	neoadjuvant	Chemotherapie
Gruppe 2-19	1	0	0	0	ja	neoadjuvant	Chemotherapie + Herceptin
Gruppe 2-20	4	0	0	0	ja	neoadjuvant	Chemotherapie

nach ca. sechs Monaten wurde der (verkleinerte) Primärtumor entfernt. Der Hauptunterschied zwischen beiden Gruppen war somit der Zeitpunkt der Entfernung des Primärtumors. In beiden Gruppen handelte es sich um invasive M₀ Tumoren. Durchschnittlich waren die Patientinnen der Gruppe 1 53,9 Jahre alt ($\sigma=10,3$) und die Repunktion fand nach 354,8 Tagen ($\sigma=116,3$) statt (Tabelle 44). Die Patientinnen aus Gruppe 2 waren durchschnittlich zehn Jahre jünger ($\bar{x}=44,0$, $\sigma=6,4$) und die Repunktion fand im Durchschnitt bereits nach sechs Monaten statt ($\bar{x}=188,3$ Tage, $\sigma=11,1$).

Wenn möglich, wurden die gepaarten Proben mit dem EpCAM-Antikörper gefärbt. Reichte das eingeschickte Patientenmaterial nur für die Routineuntersuchung aus, war dies nicht möglich. Deshalb wurde für den folgenden Vergleich auch das CK-Färbeergebnis der Routineaufarbeitung zu Hilfe genommen (Abbildung 16). Die Anzahl an EpCAM⁺ und CK⁺ Zellen in 1 Million gefärbter Zellen wurde für beide Punktionszeitpunkte jeder Patientin ermittelt. Die Anzahl an EpCAM⁺ bzw. CK⁺ Zellen zum Zeitpunkt der Primäroperation und der Repunktion wurden graphisch dargestellt und die Werte verbunden (Abbildung 20). Somit

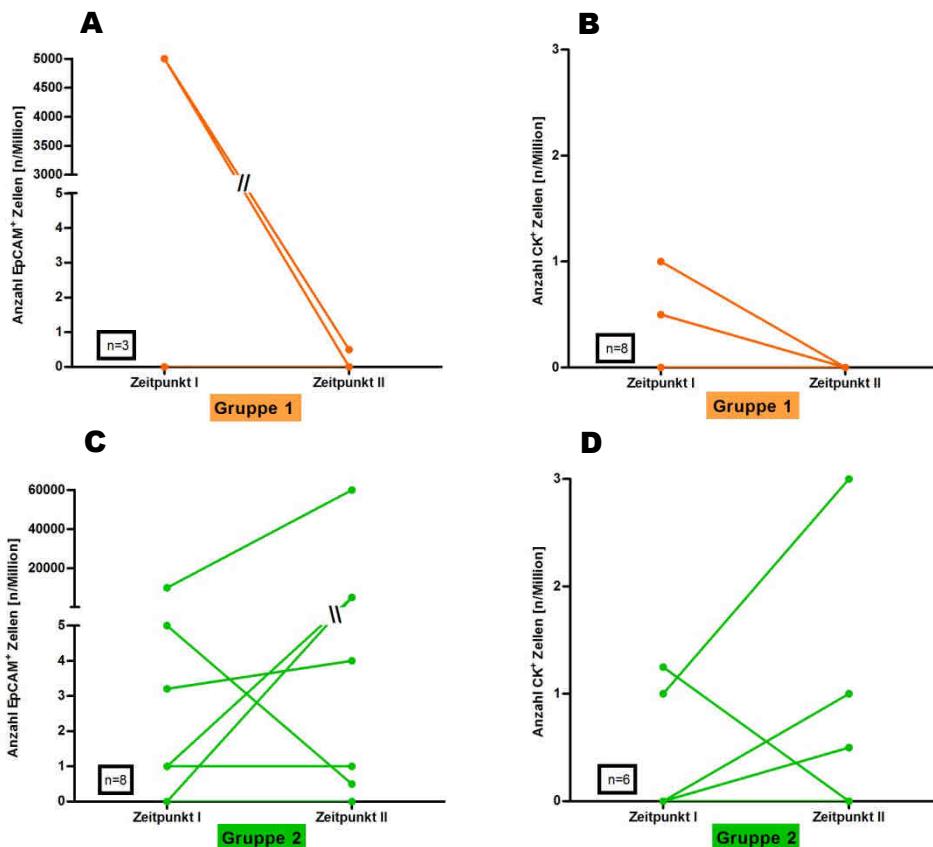


Abbildung 20: Vergleich der Anzahl an EpCAM⁺ und CK⁺ Zellen der gepaarten Proben zum Zeitpunkt der Primäroperation und einer späteren Repunktion; Aufgetragen wurde jeweils die Anzahl an EpCAM⁺ bzw. CK⁺ Zellen in 10^6 gefärbten Zellen. **A:** EpCAM⁺ Zellen Gruppe 1; **B:** CK⁺ Zellen Gruppe 1; **C:** EpCAM⁺ Zellen Gruppe 2; **D:** CK⁺ Zellen Gruppe 2; Die y-Achse wurde teilweise geschnitten und bestand somit aus zwei verschiedenen Skalen, um die unterschiedlichen Zellzahlen graphisch darzustellen. *n:* Anzahl der gepaarten Proben in den einzelnen Diagrammen

wurde die Änderung der Anzahl an EpCAM⁺ bzw. CK⁺ Zellen über die Zeit dargestellt. Bei den Patientinnen aus Gruppe 1 nahm die Anzahl an EpCAM⁺ und CK⁺ Zellen entweder ab oder blieb gleich (Abbildung 20A+B, Tabelle 44). Bei den Patientinnen aus der Gruppe 2 nahm die Anzahl an EpCAM⁺ und CK⁺ Zellen jeweils mit einer Ausnahme (zwei verschiedene Patientinnen) immer zu oder blieb gleich (Abbildung 20C+D, Tabelle 44). Dieses Ergebnis deutet auf den ersten Blick darauf hin, dass die Anzahl an EpCAM⁺ bzw. CK⁺ Zellen nach der Therapie und der Entfernung des Primärtumors abgenommen hat, jedoch bei Anwesenheit des Primärtumors während der neoadjuvanten Therapie eine Zunahme an EpCAM⁺ bzw. CK⁺ Zellen stattfand.

4.3 Isolation, Amplifikation und Qualitätskontrolle von EpCAM⁺ Einzelzellen

Um die DCC auch molekularbiologisch zu untersuchen, wurden die detektierten EpCAM⁺ Zellen mit einem Mikromanipulator einzeln isoliert und die cDNA von der gDNA getrennt (Kapitel 3.4). Neben 323 EpCAM⁺ Zellen wurden auch 107 EpCAM⁻ Zellen und 76 Zellpools mit mehreren 100-1000 Zellen isoliert (Tabelle 45). Von den gepickten 506 Einzelzellen bzw. Pools wurden 500 aufgearbeitet und einer Qualitätskontrolle unterzogen.

Da sowohl die EpCAM⁺ Einzelzellen als auch die restlichen Zellen in vergleichbarer Qualität für weitere Analysen benutzt werden sollten, musste die Qualität dieser Zellen überprüft werden. Dazu wurden PCR auf jeweils drei spezifische Sequenzen durchgeführt. Nur Zellen, die mindestens 2/3 dieser Sequenzen zeigten, wurden für weitere Analysen verwendet (Kapitel 3.5). Die Qualität des WTA-Produktes wurde mit Primern für die Transkripte *ACTB*, *EEF1A1* und *GAPDH* überprüft. Zur Qualitätskontrolle des WGA-Produktes wurden die langen Fragmente *KRT19P1*, *TP53* und *D5S2117* amplifiziert, da die Qualität des WGA-Produktes mit der Länge der Fragmente korreliert (Abbildung 21). Die isolierten Zellen wurden nach ihrer Herkunft (M_0 , M_1 , HD) und nach ihrer Art (EpCAM⁺, EpCAM⁻, Pool) unterteilt. Der Vergleich aller Zellen, die aus Knochenmarkproben isoliert wurden, verdeutlichte, dass ein Großteil der WTA- und WGA-Produkte von M_0 , M_1 und HD Zellen dreifach positiv, die Qualität somit sehr gut war (Tabelle 46). Dagegen zeigte die Mehrheit der WTA-Produkte EpCAM⁺ Zellen von Lymphknoten 0/3 Marker (Tabelle 47), die WGA-Produkte größtenteils 2/3 Marker.

Tabelle 45: Isolierte Zellen aus Knochenmarkproben und Lymphknoten

	M_0 KM [n]	M_1 KM [n]	HD KM [n]	M_0 LK [n]
EpCAM ⁺	237	46	31	9
EpCAM ⁻	76	11	17	3
Pool	55	8	10	3
Gesamt	368	65	58	15

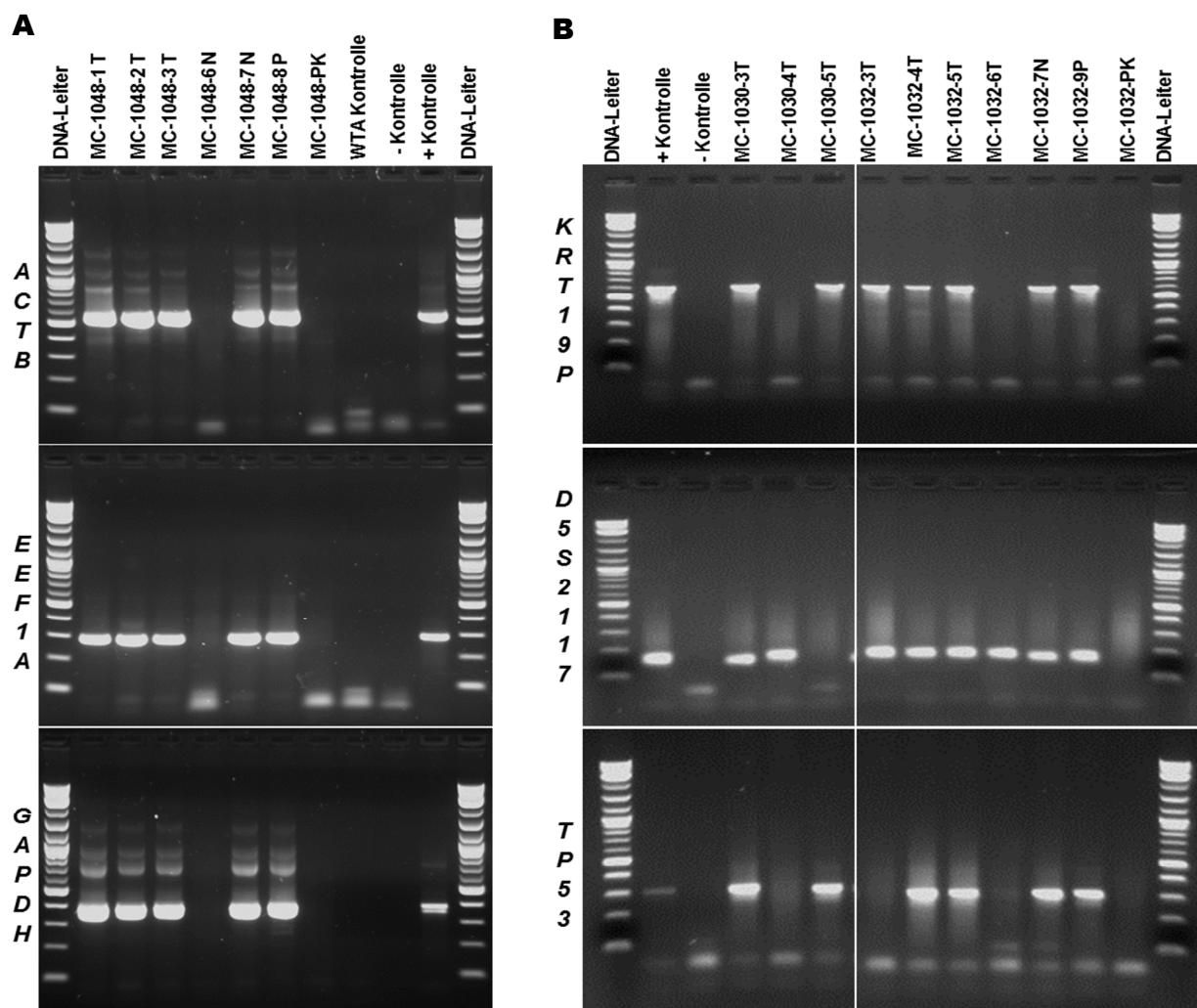


Abbildung 21: Beispiel der Qualitätskontrolle von WTA- und WGA-Produkt: **A:** Gelbilder für ACTB, EEF1A, GAPDH; **B:** Gelbilder für KRT19P1, D5S2117, TP53; T: EpCAM⁺ Zelle, N: EpCAM⁻ Zelle, P: Zellpool, PK: Pickkontrolle (Puffer des Pickfeldes), WTA-Kontrolle: Negativkontrolle der Transkriptom-Amplifikation, +/-: PCR Kontrollen; Größenstandard: 2-Log-DNA-ladder

Insgesamt wurde sowohl das WTA-Produkt als auch das WGA-Produkt von 423 Einzelzellen mit dem beschriebenen Qualitätsassay analysiert. Der Gesamtanteil an Einzelzellen (EpCAM⁺/EpCAM⁻), von denen weder das WTA- noch das WGA-Produkt für spätere Analysen benutzt werden konnte, lag bei 19,9 % (84 Zellen, Abbildung 22). Der Anteil an Zellen mit gutem WTA- und WGA-Produkt betrug 44,4 % (188 Zellen). Zusätzlich konnte auch noch der Teil, der nur gute WTA-Produktqualität zeigte (21,3 %), für die alleinige Analyse des Transkriptoms genutzt werden. Die Anzahl positiver Marker des WTA-Produktes korrelierte mit der Anzahl positiver Marker des WGA-Produktes (Korrelationskoeffizient nach Spearman: $\rho=0,236$, $p<0,001$). Daraus lässt sich schließen, dass wenn die Zelle erfolgreich isoliert werden konnte, auch ein Zusammenhang zwischen der Qualität des WTA- und des WGA-Produktes bestand.

Für die Analyse von Transkriptom und Genom der gleichen EpCAM⁺ Zelle mussten sowohl das WTA-Produkt als auch das WGA-Produkt der gleichen Zelle mindestens zweifach positiv

sein. Es konnten 148 EpCAM⁺ Zellen für die gepaarte Analyse von Transkriptom und Genom genutzt werden (Tabelle 48).

Um einen Einfluss der Aufarbeitungszeit auf die späteren Analysen auszuschließen, wurde die Qualität der Zellen auch hinsichtlich dieser Kategorie betrachtet. Dazu wurde untersucht, ob der Anteil an Einzelzellen mit guter WTA-Produktqualität mit Zunahme der Aufarbeitungs-

Tabelle 46: Ergebnisse der Qualitätskontrolle von WTA- und WGA-Produkten der Knochenmarkzellen: Horizontal aufgetragen wurde die Anzahl positiver PCR-Marker (0, 1, 2, 3) für die verschiedenen Knochenmarkproben. Angegeben wurde die absolute Anzahl [n] der Zellen für die Untergruppen und der Anteil [%] an der Gesamtzellzahl dieser Zellart.

WTA-Produkt	M ₀ KM					M ₁ KM					HD KM				
	0	1	2	3	Σ	0	1	2	3	Σ	0	1	2	3	Σ
EpCAM ⁺ [n]	44	27	36	130	237	8	7	10	21	46	5	8	7	11	31
EpCAM ⁺ [%]	18,6	11,4	15,2	54,8	100	17,4	15,2	21,7	45,7	100	16,1	25,8	22,6	35,5	100
EpCAM ⁻ [n]	19	8	13	36	76	2	6	1	2	11	4	1	4	8	17
EpCAM ⁻ [%]	25,0	10,5	17,1	47,4	100	18,2	54,6	9,0	18,2	100	23,5	5,9	23,5	47,1	100
Pool [n]	2	2	4	45	53	0	0	1	6	7	0	0	1	9	10
Pool [%]	3,8	3,8	7,6	84,8	100	0	0	14,3	85,7	100	0	0	10,0	90,0	100
<hr/>															
WGA-Produkt															
WGA-Produkt	M ₀ KM					M ₁ KM					HD KM				
	0	1	2	3	Σ	0	1	2	3	Σ	0	1	2	3	Σ
EpCAM ⁺ [n]	44	41	58	89	232	11	6	11	18	46	14	4	6	7	31
EpCAM ⁺ [%]	19,0	17,7	25,0	38,3	100	23,9	13,0	23,9	39,2	100	45,1	12,9	19,4	22,6	100
EpCAM ⁻ [n]	17	17	15	25	74	4	3	3	1	11	3	4	2	8	17
EpCAM ⁻ [%]	23,0	23,00	20,3	33,7	100	36,4	27,3	27,3	9,0	100	17,7	23,5	11,8	47,0	100
Pool [n]	1	1	1	48	51	0	0	2	5	7	0	0	0	10	10
Pool [%]	2,00	2,00	2,00	94,0	100	0	0	28,6	71,4	100	0	0	0	100,0	100

Tabelle 47: Ergebnisse der Qualitätskontrolle von WTA- und WGA-Produkten der Lymphknotenzellen: Horizontal aufgetragen wurde die Anzahl positiver PCR-Marker (0, 1, 2, 3) für die WTA- und WGA-Produkte. Angegeben wurde die absolute Anzahl [n] der Zellen für die Untergruppen und der Anteil [%] an der Gesamtzellzahl dieser Zellart.

	M ₀ -LK WTA-Produkt					M ₀ -LK WGA-Produkt				
	0	1	2	3	Σ	0	1	2	3	Σ
EpCAM ⁺ [n]	6	1	0	2	9	1	3	5	0	9
EpCAM ⁺ [%]	66,7	11,1	0	22,2	100	11,1	33,3	55,6	0	100
EpCAM ⁻ [n]	1	0	0	2	3	2	0	0	1	3
EpCAM ⁻ [%]	33,3	0	0	66,7	100	66,7	0	0	33,3	100
Pool [n]	0	0	1	2	3	0	0	0	3	3
Pool [%]	0	0	33,3	66,7	100	0	0	0	100,0	100

Tabelle 48: Gesamtzahl an Zellen mit guter Qualität des WTA- und WGA-Produktes: Angegeben ist die absolute Anzahl an Zellen mit mindestens zwei positiven Kontroll-PCR Markern von WTA- und WGA-Produkt und der Anteil dieser Zellen an der Gesamtmenge.

	M ₀ KM [n]	M ₀ KM [%]	M ₁ KM [n]	M ₁ KM [%]	HD KM [n]	HD KM [%]	M ₀ -LK [n]	M ₀ -LK [%]
EpCAM ⁺	116	48,9	21	45,7	10	32,3	1	11,1
EpCAM ⁻	28	36,8	3	27,3	9	52,9	0	0
Pool	46	83,6	7	87,5	10	100,0	3	100,0

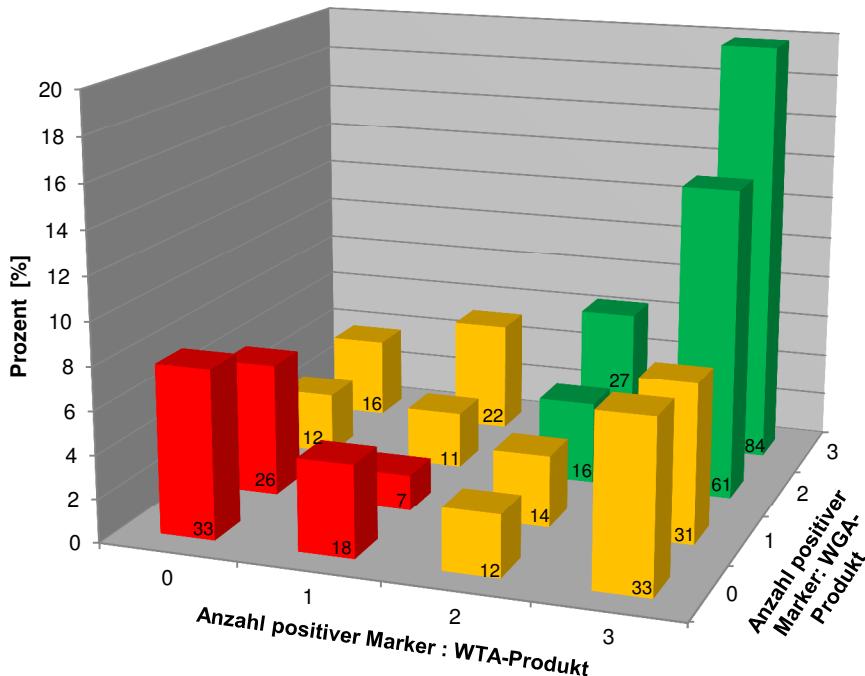


Abbildung 22: Einteilung der 423 EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Einzelzellen hinsichtlich ihrer Qualität: Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Anzahl an positiven Markern der WTA- und WGA-Produkte. Es wurden alle Einzelzellen (EpCAM⁺/EpCAM⁻) der Knochenmark- und Lymphknotenproben eingeschlossen, deren Qualität kontrolliert wurde. **rote Balken:** schlechte Qualität des WTA- und WGA-Produktes, **orange Balken:** schlechte Qualität des WTA- oder WGA-Produktes und gute Qualität in der jeweils anderen Art; **grüne Balken:** gute Qualität des WTA- und WGA-Produktes und somit Verwendung für die weitere Aufarbeitung und vergleichende Analyse des WTA- und WGA-Produktes; *Die Zahlen rechts unten an jedem Balken geben die absolute Anzahl der Zellen in der jeweiligen Gruppe an.*

zeit abnahm (Tabelle 49). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der WTA-Produktqualität und der Aufarbeitungszeit festgestellt werden. Dennoch war eine leichte Tendenz zur Abnahme der Qualität ersichtlich. Da bekannt ist, dass sich die RNA-Expression über die Zeit verändern kann, wurden Zellen, die erst nach 24 h Knochenmark-Aufarbeitungszeit isoliert wurden, nicht für die Genexpressionsanalysen verwendet.

Für die weitere molekulare Charakterisierung der potenziellen EpCAM⁺ Tumorzellen von M₀ und M₁ Patientinnen, sowie der EpCAM⁺ Zellen gesunder Spenderinnen, wurden nur Zellen mit erfolgreicher WTA bzw. WTA und WGA verwendet (Abbildung 23).

Tabelle 49: Vergleich der WTA-Produktqualität hinsichtlich der Aufarbeitungszeit (Zeitintervall); eingeschlossen wurden alle Einzelzellen von Knochenmarkproben, für die das Zeitintervall der Aufarbeitung bekannt war; N: Gesamtzahl der Zellen in dieser Gruppe

Zeitintervall	gute Qualität des WTA-Produktes		
	Anzahl [n/N]	Prozent [%]	p-Wert
0-12 h	166/244	68,0	0,838
12-24 h	109/164	66,5	
> 24 h	5/8	62,5	

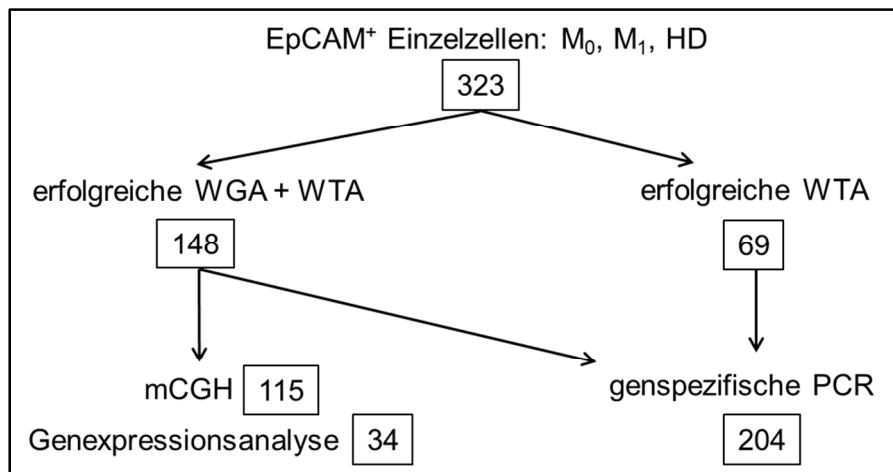


Abbildung 23: Übersicht der Verwendung der EpCAM⁺ Einzelzellen für die weitere molekulare Charakterisierung

4.4 Überprüfung der Expression ausgewählter Transkripte

4.4.1 Etablierung der genspezifischen PCR für ausgewählte Transkripte

In dieser Arbeit sollten die isolierten Einzelzellen molekularbiologisch untersucht und charakterisiert werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Expression verschiedener ausgewählter Transkripte getestet. Die genspezifische PCR für die Marker CK5, CK6a, CK8, CK14, CK18, CK19 und CD45 wurde bereits in der Arbeitsgruppe etabliert (Gužvić und Braun, unveröffentlicht). Im Folgenden wurde die genspezifische PCR für HER2wt, HER2Δ16, PKM1, PKM2, HBB und S100A11 etabliert (Tabelle 18).

Zuerst wurden für die genannten Transkripte Primer definiert und für jedes Gen eine Gradienten-PCR mit der berechneten optimalen Annealing-Temperatur (T_A) ± 5 °C durchgeführt (Standardbedingungen, Kapitel 3.6). Der Gradient lag meist zwischen 52 °C und 64 °C. Bei der optimalen Temperatur sollten klare, gut sichtbare Banden vorhanden, jedoch keine unspezifischen Fragmente amplifiziert worden sein (Anhang Abbildung 46). Als Positivkontrolle wurden WTA-Produkte von Zellpools und - nach Optimierung der Reaktionsbedingungen - Einzelzellen aus Transkript-positiven Zelllinien verwendet. Abschließend wurde ein Restriktionsverdau mit den passenden Enzymen (Tabelle 24) durchgeführt, der die Identität aller Fragmente bestätigen konnte (Abbildung 27).

Um HER2Δ16, eine Spleißvariante von HER2wt eindeutig zu detektieren, wurden acht verschiedene Primer getestet (Abbildung 24). Mit allen genannten Primer-Kombinationen konnten die gewünschten Transkripte detektiert und mit dem Restriktionsverdau bestätigt werden (Abbildung 26). Da die zusätzliche Detektion von HER2wt einen Vergleich mit dem

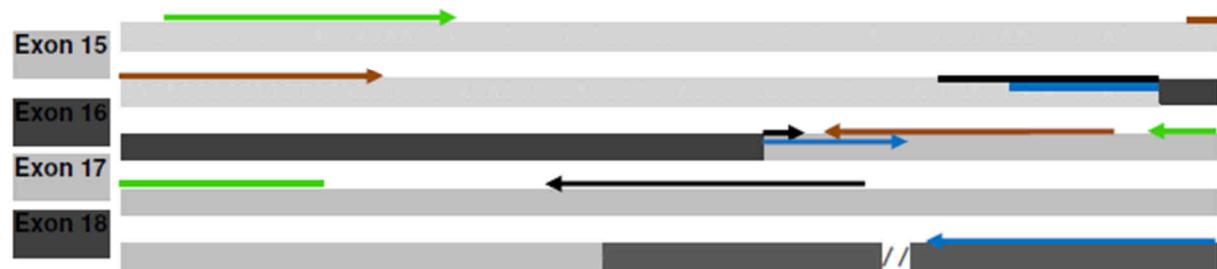


Abbildung 24: Sequenzausschnitt HER2 (Exon 15-18): Um neben dem HER2Δ16 Transkript auch HERwt zu detektieren, wurden die eingezeichneten acht Primer getestet. Mit Hilfe der blau dargestellten Primer-Kombination konnte nur die gespleißte Isoform detektiert werden, ebenso mit der schwarz dargestellten Primer-Kombination. Mit den braun und grün eingezeichneten Primerpaaren konnten beide Isoformen detektiert werden. Die Produkte unterschieden sich nur in ihrer Größe, da HER2wt zusätzlich Exon 16 einschließt und somit 48 Basenpaare länger ist. Für die Untersuchung der Patientenzellen wurde das grün dargestellte Primerpaar verwendet, um beide Transkripte anhand der Produktgröße nachzuweisen.

HER2-Status des Primärtumors ermöglichte, wurde eine Primer-Kombination für die Analyse der Patientenzellen verwendet, die beide Spleißvarianten gleichzeitig detektieren konnte.

Ebenso wurden Primer für die Pyruvatkinaise-Isoformen PKM1 und PKM2 definiert. Beide Varianten entstehen durch unterschiedliches Spleißen der gemeinsamen PKM-mRNA. Dabei schließt die Isoform PKM1 das Exon 10 aus, die Isoform PKM2 das Exon 9. Die beiden alternativ gespleißten Exons sind gleich lang (167 bp) und weisen eine starke Homologie auf. Es wurden je zwei unterschiedliche *forward*-Primer für PKM1 und PKM2 und jeweils ein *reverse*-Primer getestet (Abbildung 25). Dabei wurde versucht, innerhalb der Primersequenz möglichst große unterschiedliche Regionen einzuschließen. Wegen der gleichen Fragmentlänge war eine genaue Bestimmung mit Hilfe des Restriktionsverdaus nötig. Für beide Isoformen wurden beide Primer-Kombinationen getestet und das jeweilige PCR-Produkt durch eine Restriktionsanalyse überprüft. Die gewünschten Transkripte wurden selektiv von den jeweiligen Primern amplifiziert. Für die Analyse der Patientenzellen wurden die Primerpaare gewählt, die die kürzeren Fragmente lieferten (131 bp).

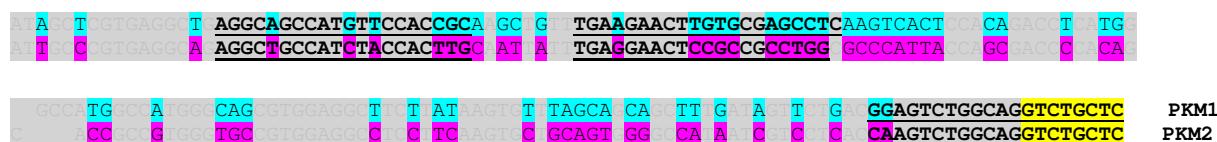


Abbildung 25: Sequenzausschnitt PKM1 und PKM2: Dargestellt wurden die Sequenzunterschiede zwischen Exon 9 (türkis, obere Reihe) bei PKM1 und Exon 10 (pink, untere Reihe) bei PKM2 und das 3'-Ende von Exon 11 (gelb). Graue Bereiche markieren übereinstimmende Sequenzen von Exon 9 und Exon 10. Jeweils zwei *forward*-Primer für PKM1 und PKM2 und jeweils ein *reverse*-Primer wurden getestet. Für die Analyse der Patientenzellen wurden die rechten *forward*-Primer verwendet, alle Primersequenzen wurden unterstrichen.

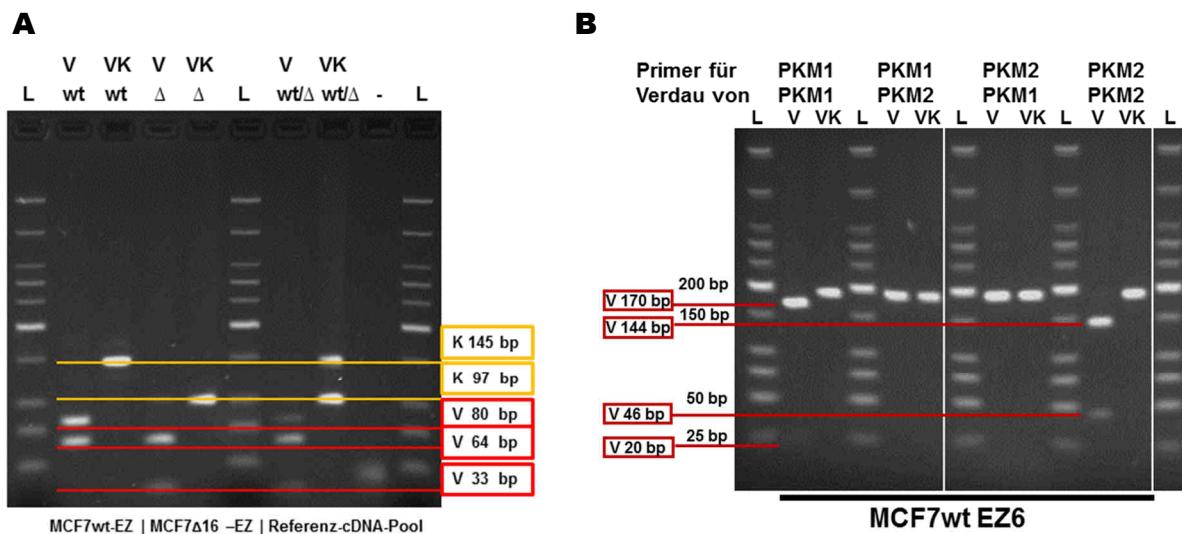


Abbildung 26: Restriktionsverdau der HER2- und PKM-Amplifikate: **A:** Verdau von HER2wt und HER2 Δ 16 mit HpyCH4V (wt: 145 bp–80 bp+65 bp; Δ: 97 bp–64 bp+33 bp) **B:** Verdau PKM1 (190 bp) mit Tth11 (170 bp+20 bp); Verdau PKM2 (190 bp) mit Pst1 (144 bp+46 bp); L: DNA-Leiter; V: Verdau; VK: Verdaukontrolle: Verdaureaktion ohne Enzym; -: Negativkontrolle; Größenstandard: low molecular weight DNA ladder

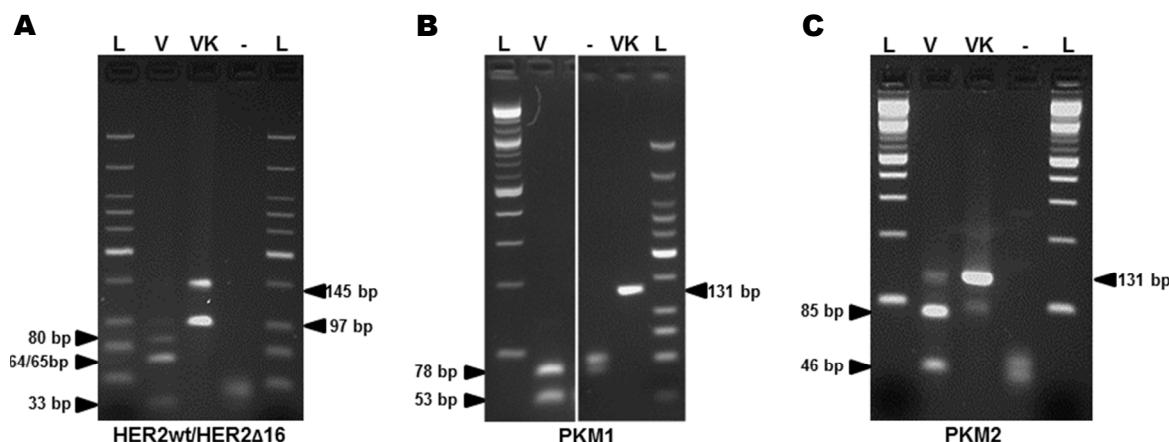


Abbildung 27: Restriktionsverdau von Transkripten ausgewählter Gene: Die eingetragenen Zahlen geben die Länge des Fragments in Basenpaaren (bp) an. **A:** Verdau mit HpyCH4V: Fragmentgrößen: HER2wt (145 bp); 80 bp+65 bp, HER2 Δ 16 (97 bp); 64 bp+33 bp; **B:** Verdau mit Psil: PKM1(131 bp); 78 bp+53 bp; **C:** Verdau mit Pst1: PKM2 (131 bp); 85 bp+46 bp; L: DNA-Leiter; V: Verdau; VK: Verdaukontrolle: Verdaureaktion ohne Enzym; -: Negativkontrolle; Größenstandard: low molecular weight DNA ladder (A+B), 2-Log-DNA-ladder (C)

4.4.2 Genspezifische PCR mit epithelialen und ausgewählten Transkripten

Nach erfolgreicher Etablierung der genspezifischen PCR sollten in diesem Abschnitt die potenziellen Tumorzellen mit Hilfe der ausgewählten Transkripte untersucht werden. Dabei wurden nur Zellen verwendet, deren WTA-Produkt mindestens zweifach positiv in der Qualitätskontrolle war und die aus Knochenmarkproben isoliert wurden, welche innerhalb von 24 h aufgearbeitet werden konnten. Bei nicht eindeutigen PCR-Ergebnissen wurde zusätzlich der Restriktionsverdau durchgeführt. Insgesamt wurde von 199 EpCAM $^+$ Zellen die genspezifische PCR durchgeführt. Der Großteil davon waren 151 EpCAM $^+$ Zellen aus

dem Knochenmark von M₀ Patientinnen. Außerdem wurden 30 EpCAM⁺ Zellen von M₁ Patientinnen und 18 EpCAM⁺ Zellen von gesunden Spenderinnen untersucht. Zusätzlich wurden 32 EpCAM⁻ Zellen sowie 41 Zellpools analysiert.

Neben dem EpCAM-Transkript wurden weitere epitheliale Marker (CK5, CK6a, CK8, CK14, CK18, CK19) untersucht, die zur Charakterisierung beitragen sollten. Um die hämatopoetischen Zellen abzugrenzen, wurde CD45, ein Marker für hämatopoetische Zellen, verwendet. Mit Hilfe von tumor-spezifischen Transkripten wurde versucht, die Tumoidentität der EpCAM⁺ Zellen zu bestätigen. Von der Pyruvatkinese-M existieren zwei Spleißvarianten, PKM1 und PKM2, wobei PKM2 eine tumor-spezifische Identität besitzen soll. Es wurden beide Transkripte untersucht. Zusätzlich wurden außerdem die tumor-spezifischen Transkripte HER2wt und HER2Δ16 untersucht.

In einem ersten Schritt wurde die Expression der ausgewählten Transkripte in 31 Zellpools aus dem Knochenmark von M₀ und M₁ Patientinnen untersucht und mit zehn Zellpools von gesunden Spenderinnen verglichen. Bis auf die basalen Zytokeratine (CK5, CK6a und CK14), CK19 und die beiden HER2-Transkripte konnten alle Marker in über 80 % der Zellpools detektiert werden (Abbildung 28). Hierbei wird deutlich, dass in einem Pool aus mehreren Zellen nahezu alle Marker exprimiert werden.

Im nächsten Schritt wurden 32 EpCAM⁻ M₀ Zellen (Suspensionsfärbung) untersucht und die Ergebnisse mit 151 EpCAM⁺ M₀ Zellen verglichen (Abbildung 29). Dabei sollte untersucht werden, ob sich die in der Suspensionsfärbung EpCAM⁻ Zellen von EpCAM⁺ Zellen unter anderem anhand ihrer EpCAM-Transkript-Expression unterschieden. Abgesehen von CD45, PKM1 und PKM2 waren die ausgewählten Transkripte seltener in den EpCAM⁻ Zellen zu

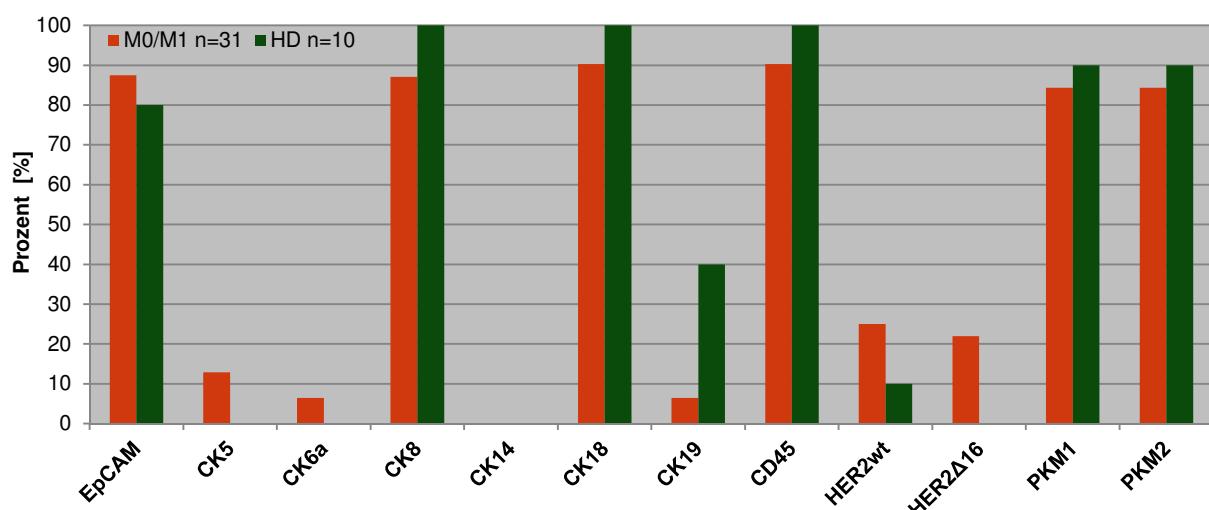


Abbildung 28: Expression von ausgewählten Transkripten in Zellpools: Aufgetragen ist der Anteil [%] der positiven Zellen für die angegebenen Transkripte in 31 M₀/M₁ Zellpools und zehn HD Zellpools

finden. Der Unterschied zwischen der Anwesenheit des EpCAM- bzw. CK8-Transkriptes bei EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Zellen war höchst signifikant ($p<0,001$) bzw. signifikant ($p=0,025$, *Fisher's exakt test*). Der signifikante Unterschied zwischen den EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Einzelzellen hinsichtlich des EpCAM-Transkriptes bestätigte die Spezifität der EpCAM-Suspensionsfärbung. Ebenfalls war die Anwesenheit von CD45 in den EpCAM⁻ Zellen signifikant höher ($\chi^2(1)=6,2$; $p=0,012$) als in den EpCAM⁺ Zellen. Überraschenderweise war das PKM2 Transkript bei den EpCAM⁻ Zellen hoch signifikant öfter ($\chi^2(1)=6,9$; $p=0,009$) exprimiert als bei den EpCAM⁺ Zellen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die verschiedenen Zellen aufgrund der Expression epithelialer Transkripte unterschieden. Dazu wurde die Häufigkeit der gefundenen Transkripte in den M₀, M₁ und HD Zellen verglichen (Abbildung 30). Es konnte kein Unterschied zwischen M₀ Zellen und HD Zellen festgestellt werden. Von den EpCAM⁺ M₀, M₁ und HD Zellen zeigten über 60 % das EpCAM-Transkript. CK14 und CK19 konnten in M₀ und HD Zellen nicht detektiert werden. Die M₁ Zellen unterschieden sich in CK8 hoch signifikant ($\chi^2(1)=11,1$; $p=0,001$) sowie in CK18 und CK19 höchst signifikant ($\chi^2(1)=37,2$; $p<0,001$ bzw. $p<0,001$, *Fisher's exakt test*) von den M₀ Zellen. Anschließend wurden die Zellen nach ihrer Expression einzelner Transkripte zu Phänotypen zusammengefasst (Abbildung 31). Diese Einteilung ermöglichte die Unterscheidung von M₀ und HD Zellen mit Hilfe der Anwesenheit von mindestens einem epithelialen Marker ($\chi^2(1)=7,3$; $p=0,007$) oder basaler Zytokeratine ($p=0,045$, *Fisher's exakt test*). Da basale Zytokeratine bei HD Zellen nicht detektiert werden konnten, wäre eine Unterscheidung anhand dieser Zytokeratine möglich. Jedoch war auch die Expression der basalen Zyt-

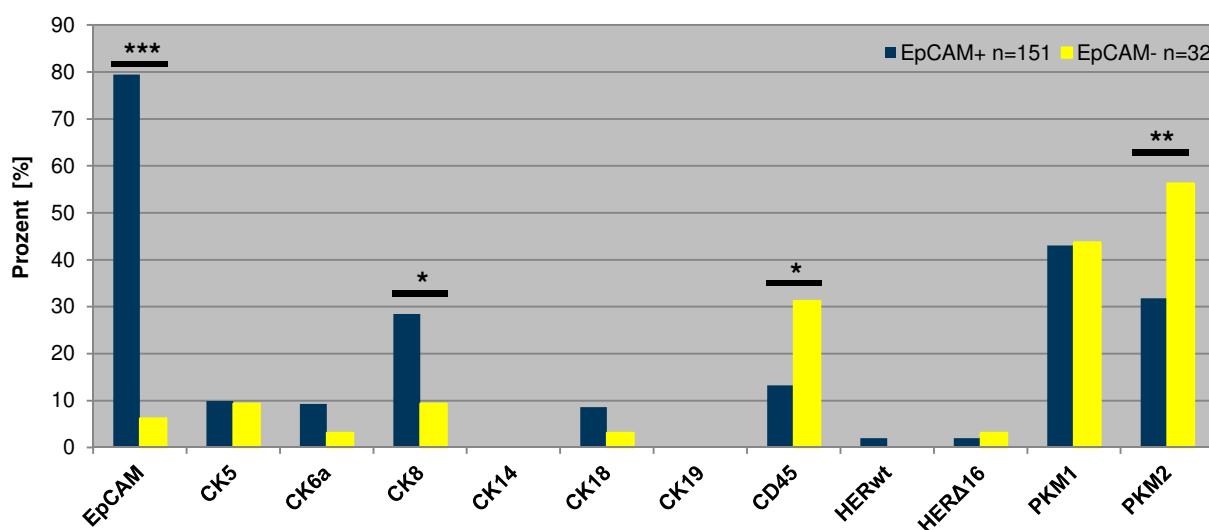


Abbildung 29: Expression von ausgewählten Transkripten in 32 EpCAM⁻ und 151 EpCAM⁺ M₀ Zellen (Suspensionsfärbung): Aufgetragen ist der Anteil [%] der positiven Zellen für die angegebenen Transkripte. Zum Vergleich wurden neben den EpCAM⁻ Zellen die Werte für die EpCAM⁺ M₀ Zellen aufgetragen (blaue Balken). Das jeweilige Signifikanzniveau des Vergleichs beider Gruppen ist darüber angegeben.

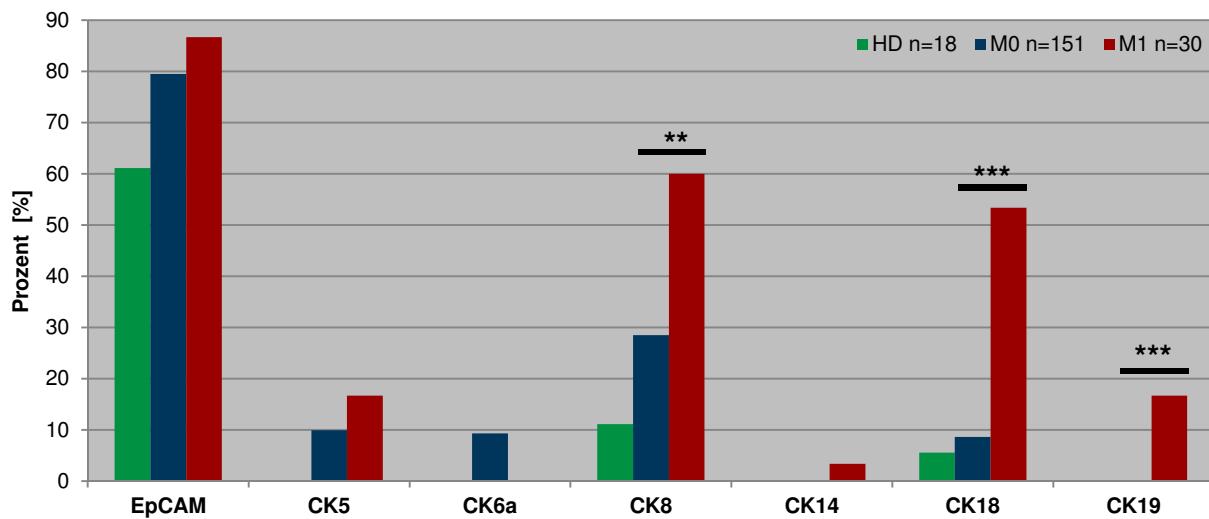


Abbildung 30: Gesamtübersicht der Expression von epithelialen Transkripten: Aufgetragen ist der Anteil [%] der positiven Zellen für die Transkripte EpCAM, CK5, CK6a, CK8, CK14, CK18 und CK19 von 18 HD, 151 M₀ und 30 M₁ Zellen. Das jeweilige Signifikanzniveau des Vergleichs HD gegen M₀ und M₁ gegen M₀ ist darüber angegeben.

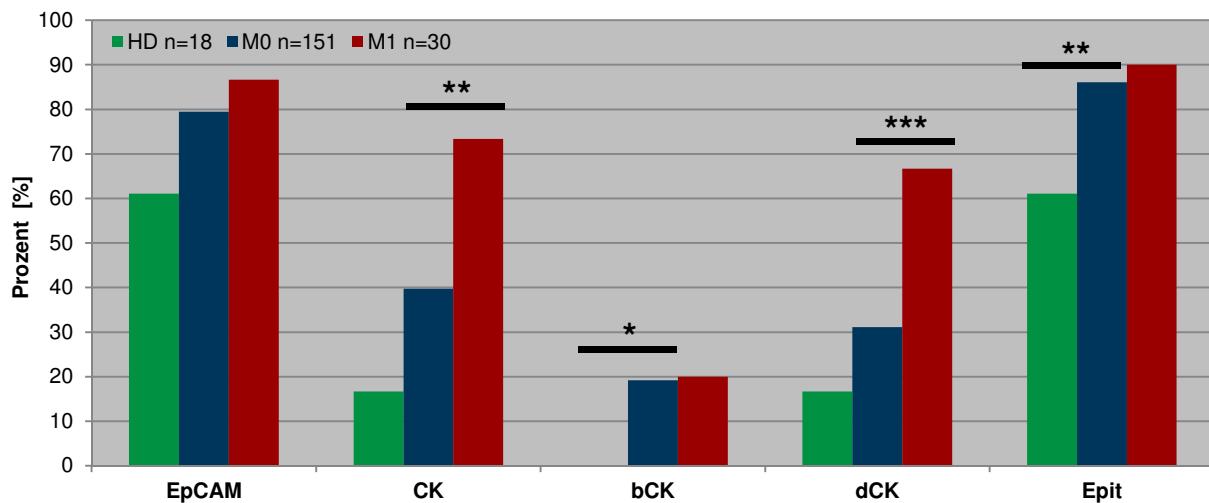


Abbildung 31: Gesamtübersicht der epithelialen Transkript Phänotypen: Aufgetragen ist der Anteil [%] der positiven Zellen für EpCAM und verschiedene Transkript Phänotypen von 18 HD, 151 M₀ und 30 M₁ Zellen. Das jeweilige Signifikanzniveau des Vergleichs HD gegen M₀ und M₁ gegen M₀ ist darüber angegeben. **CK:** mindestens ein CK-Transkript positiv; **bCK:** positiv für mindestens ein basales CK-Transkript (CK5, CK6a, CK14); **dCK:** positiv für mindestens ein differenziertes CK-Transkript (CK8, CK18, CK19); **Epit:** positiv für mind. ein epitheliales Transkript (EpCAM oder CK)

keratine in den Patientenzellen von unter 20 % für eine umfassende Unterscheidung zu gering. Bei den M₁ Zellen konnte, im Vergleich zu den M₀ Zellen, ein hoch signifikant ($\chi^2(1)=11,4; p=0,001$) höherer Anteil an Zytokeratin-positiven Zellen beobachtet werden.

Anschließend wurden die Zellen nach ihrer EpCAM- und CK-Positivität in vier Gruppen eingeteilt (Tabelle 50). EpCAM⁺ Zellen gesunder Spender waren, im Vergleich zu Patientenzellen, öfter in der Gruppe vertreten, die weder das EpCAM- noch das CK- Transkript zeigte.

Tabelle 50: Gesamtübersicht der EpCAM/CK-Transkript-Gruppen: Angegeben ist die Anzahl der positiven Zellen neben der Gesamtzahl an analysierten Zellen für die verschiedenen EpCAM/CK-Transkript-Gruppen, in Klammern ist der dazugehörige Prozentwert angegeben. Das jeweilige Signifikanzniveau des Vergleichs HD gegen M₀ und M₁ gegen M₀ wurde berechnet. ns: nicht signifikant

HD	M ₀	M ₁	p (M ₀ gegen HD)	p (M ₀ gegen M ₁)
EpCAM ⁺ /CK ⁺ 3 / 18 (16,7 %)	50 / 151 (33,1 %)	21 / 30 (70 %)	ns	<0,001 ($\chi^2(1)=14,3$)
EpCAM ⁺ /CK ⁺ 0 / 18	10 / 151 (6,6 %)	1 / 30 (3,3 %)	ns	ns
EpCAM ⁺ /CK ⁻ 8 / 18 (44,4 %)	70 / 151 (46,4 %)	5 / 30 (16,7 %)	ns	0,003 ($\chi^2(1)=9,1$)
EpCAM ⁻ /CK ⁻ 7 / 18 (38,9 %)	21 / 151 (13,9 %)	3 / 30 (10,0 %)	0,007 ($\chi^2(1)=7,3$)	ns

Dagegen war die Mehrheit der Zellen von M₁ Patientinnen in der zweifach positiven Gruppe. Trotz dieser vereinzelten Unterschiede, war die Differenzierung von M₀ und HD Zellen mit Hilfe der epithelialen Marker nicht möglich.

Daher wurde die Expression von CD45, HER2wt und HER2Δ16 sowie PKM1 und PKM2 untersucht. Erwartungsgemäß war das CD45-Transkript in den HD Zellen häufiger exprimiert, als in den M₀ Zellen ($p=0,101$, Fisher's exakt test). In M₁ Zellen konnte das CD45-Transkript nicht detektiert werden, wodurch sie sich signifikant ($p=0,049$) von den M₀ Zellen abgrenzen. Ebenfalls unterschieden sich M₁ Zellen signifikant ($p=0,001$ bzw. $p<0,001$) in der Expression von HER2wt sowie der Exon 16 gespleißten Variante HER2Δ16 von M₀ Zellen. Meistens waren beide Isoformen in den Zellen vorhanden. Die Pyruvakinase-Isoform PKM1 war sowohl in den HD als auch in den M₁ Zellen signifikant weniger ($p=0,010$ bzw. $p=0,002$) exprimiert im Vergleich zu den M₀ Zellen. Bei den M₀ Zellen nahm der Anteil Transkript-positiver Zellen von PKM1 zu PKM2 signifikant ab ($\chi^2(1)=4,1$; $p=0,043$), bei den M₁ Zellen war dagegen eine signifikante Zunahme ($p=0,010$) zu beobachten. Mit Hilfe der zusätzlichen Marker konnten charakteristische Unterschiede zwischen den M₀ und den M₁ Zellen

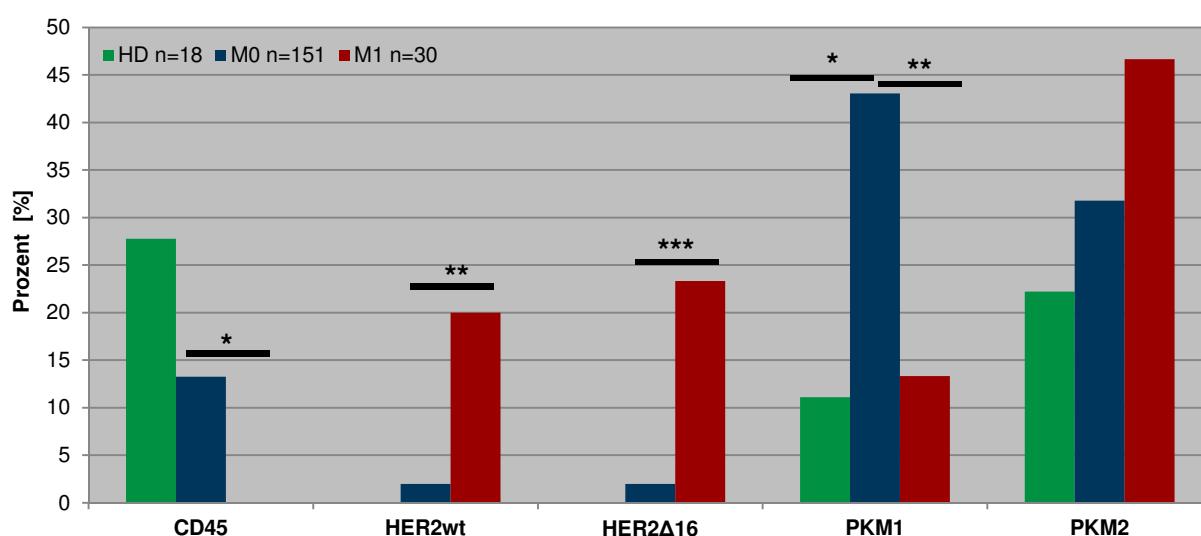


Abbildung 32: Expression von ausgewählten Transkripten: Aufgetragen ist der Anteil [%] der positiven Zellen für die Transkripte CD45, HER2wt, HER2Δ16, PKM1 und PKM2 von 18 HD, 151 M₀ und 30 M₁ Zellen. Das jeweilige Signifikanzniveau des Vergleichs HD gegen M₀ und M₁ gegen M₀ ist darüber angegeben.

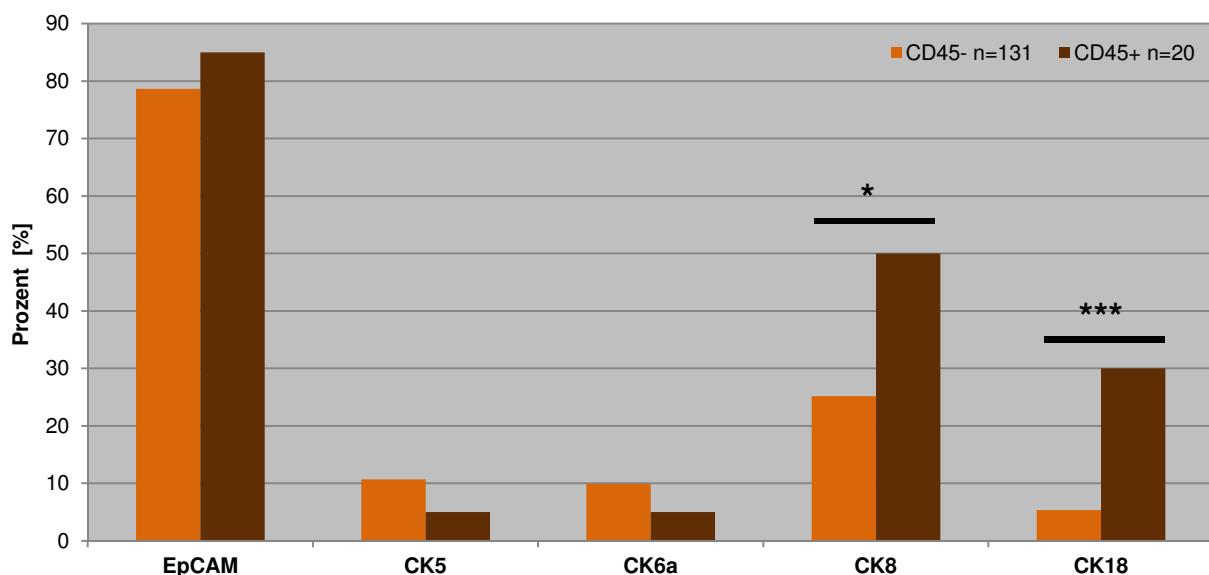


Abbildung 33: Expression von ausgewählten Transkripten CD45-negativer und CD45-positiver Zellen: Aufgetragen ist der Anteil [%] der positiven Zellen für die angegebenen Transkripte. Die in der Färbung EpCAM⁺ M₀ Zellen wurden in zwei Gruppen unterteilt: Die eine Gruppe zeigte kein CD45-Transkript, die andere Gruppe exprimierte das CD45-Transkript. Das jeweilige Signifikanzniveau des Vergleichs beider Gruppen ist darüber angegeben.

festgestellt werden. Eine klare Trennung aller HD Zellen von den Patientenzellen war jedoch mit einem oder mehreren Transkripten nicht möglich.

Abschließend sollte untersucht werden, ob CD45-Transkript-positive Zellen die epithelialen Marker EpCAM und CK in unterschiedlicher Quantität exprimieren und so eine Abgrenzung der CD45⁺ hämatopoetischen Zellen ermöglichen. Dazu wurden nur M₀ Zellen betrachtet und nach der Anwesenheit des CD45-Transkripts unterteilt. Die Transkripte CK8 und CK18 waren in den CD45⁺ Zellen signifikant öfter exprimiert ($\chi^2(1)=5,2; p=0,022$ bzw. $\chi^2(1)=13,4; p<0,001$, Abbildung 33). Dies zeigte, dass auch wenn das CD45 Transkript in den M₀ Zellen detektiert werden konnte, dieses dennoch mit den klassischen Zytokeratinen der Tumordetektion (CK8, CK18) assoziiert war.

4.4.3 Korrelation der Transkript-Analysen mit klinischen Daten

Anschließend wurde ermittelt, ob der HER2-Primärtumorstatus der Patientinnen mit dem Ergebnis der genspezifischen PCR korrelierte. Insgesamt wurden 20 Einzelzellen untersucht, die von HER2⁺ Patientinnen stammten. Es konnten weder das HER2wt-Transkript noch das 16ΔHER2-Transkript in diesen Einzelzellen nachgewiesen werden. Umgekehrt war der Primärtumor aller Patientinnen, bei denen das HER2wt-Transkript oder das 16ΔHER2-Transkript in den EpCAM⁺ Einzelzellen gefunden werden konnte, HER2 negativ.

Zudem wurden ausgewählte klinische Daten (Subtyp, Hormonrezeptorstatus, T-Status, Differenzierungsgrad, UICC-Stadium) mit den Ergebnissen der genspezifischen PCR verglichen. Hierfür wurde insbesondere CK8 und CK18 betrachtet, da dieses zwischen den M₀ und M₁ Zellen signifikant unterschiedlich exprimiert wurde. Es konnte eine Korrelation zwischen CK8 und dem Differenzierungsgrad (*Grading*), sowie dem Hormonrezeptorstatus festgestellt werden (Tabelle 51). Zudem wurde PKM2 in den verschiedenen UICC-Stadien unterschiedlich exprimiert.

Tabelle 51: Korrelation von klinischen Daten mit den Ergebnissen der genspezifischen PCR aller EpCAM⁺ M₀ Zellen; Das Auftreten verschiedener Transkripte wurde mit folgenden klinischen Charakteristika verglichen: Hormonrezeptorstatus des Estrogen- und Progesteronrezeptors, T-Status, Differenzierungsgrad und Subtyp. Aufgelistet wurden die p-Werte wenn signifikante Unterschiede bestanden.

Differenzierungsgrad	CK8 ⁻	CK8 ⁺	p
G1	2	5	0,033
G2	75	30	
G3	27	7	
Hormonrezeptorstatus	CK8 ⁻	CK8 ⁺	p
negativ	15	0	0,006
positiv	93	43	
UICC-Stadium	PKM2 ⁻	PKM2 ⁺	p
0	5	4	0,031
I	46	18	
II	19	18	
III	33	8	

4.5 Untersuchung der genomischen DNA der EpCAM⁺ Einzelzellen

Aufgrund der Expression ausgewählter Transkripte war eine Identifizierung von Tumorzellen nicht möglich. Daher wurde zur eindeutigen Identifizierung der Krebszellen eine vergleichende genomische Hybridisierung (Metaphasen-CGH, mCGH) durchgeführt, um chromosomale Aberrationen mit einer Auflösung von mindestens 10 Mbp zu detektieren (Kapitel 3.11). Zellen mit chromosomalen Aberrationen wurden als aberrant bezeichnet, Zellen ohne chromosomale Aberrationen als balanciert.

4.5.1 mCGH-Analyse von EpCAM⁺ Zellen im Knochenmark

Es wurden EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Einzelzellen von Tumorpatientinnen (M₀ und M₁) und gesunden Spenderinnen (HD) untersucht. Insgesamt 115 Zellen wurden markiert und hybridisiert. Durch experimentelle Schwankungen aufgrund der Metaphasenpräparationen war die Hybridisierung auf die Metaphasen-Objektträger nicht immer erfolgreich. In unklaren Fällen wurde die Hybridisierung wiederholt. Die Einteilung der Chromosomenbereiche und einzelnen *Loci* erfolgte nach der ISCN Version 2009 (Nicole Chia, 2009), Abbildung 47) und

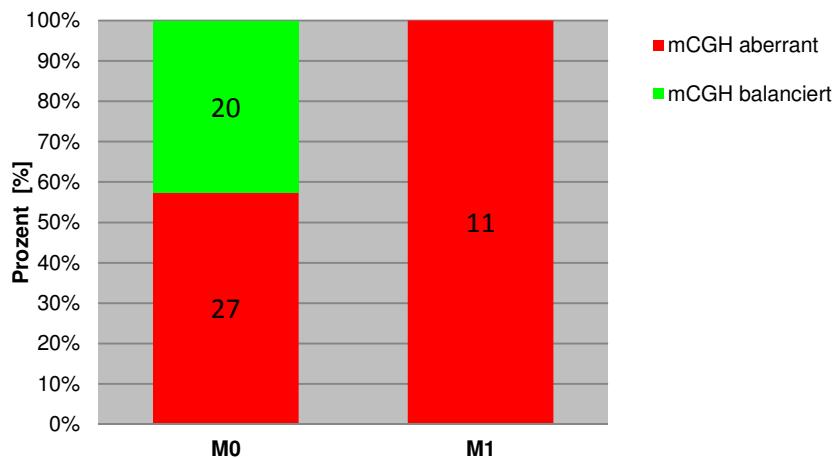


Abbildung 34: Übersicht der mCGH Ergebnisse: Aufgetragen ist der Prozentsatz der EpCAM⁺ Zellen, die mCGH Aberrationen zeigten (rot) bzw. ein balanciertes Profil hatten (grün) unterteilt in Zellen von M₀ und M₁ Patientinnen; die Zahlen innerhalb der Balken geben die absoluten Werte an

ermöglichte die Erstellung der mCGH Profile (Abbildung 35, Kapitel 10.5). Eindeutige Ergebnisse konnten von 61 Zellen (53 %) generiert werden. Alle elf untersuchten M₁ Zellen waren aberrant. Von den 47 M₀ Zellen waren 57 % aberrant und 43 % balanciert (Abbildung 34). Ebenso wurden drei EpCAM⁺ Zellen von M₀ und M₁ Patientinnen untersucht. Sie zeigten keine Aberrationen. Von zwei Zellen (einer balancierten und einer aberranten M₀ Zelle) konnten aufgrund technischer Probleme nach dem Fotografieren keine vollständigen Profile erstellt werden, obwohl die Einordnung in aberrant und balanciert möglich war. Die aberrante Zelle konnte daher nicht für die Auswertungen der genomischen Aberrationen verwendet werden und wurde auch in der klinischen Auswertung nicht berücksichtigt. Es konnte kein Profil einer HD Zelle erstellt werden, da die Hybridisierung dieser Zellen nicht erfolgreich war.

Bei acht Patientinnen wurden sowohl aberrante als auch balancierte Zellen gefunden (MC-741, MC-983, MC-1029, MC-1073, MC-1074, MC-1112, MC-1117, MC-1125). Es handelte sich um zwei Patientinnen mit DCIS und sechs mit invasiven Karzinomen (meist Luminal A oder *Triple* negativ).

Nachdem ein Teil der EpCAM⁺ Zellen anhand ihrer mCGH-Aberrationen eindeutig als Tumorzellen identifiziert wurden, konnten die 25 EpCAM⁺ DCC aus M₀ Patientinnen mit den zehn DCC aus Patientinnen mit klinisch manifesten Metastasen (M₁) verglichen werden (Abbildung 38A+B). Hierbei war deutlich erkennbar, dass die M₁ DCC häufiger chromosomale Aberrationen zeigten. Besonders häufig fanden sich Amplifikationen auf den Chromosomen 4p, 9p, 20 und 21 der M₀ DCC. Deletionen dagegen traten auf den Chromosomen 1p, 3p, 5, 9q, 17p und 19 der M₀ DCC auf. Bei den M₁ DCC waren Amplifikationen auf den Chromosomen 1q, 4, 7p, 8q, 11, 12, 17, 19, 20 und 22, Deletionen dagegen auf 1p, 3p, 8p, 11q, 13, 14q, 16q, 17p, 18 und 19 häufig. Signifikant unterschieden sich 17 Chromo-

somenabschnitte bei M₀ und M₁ DCC (*Fisher's exact test*, Korrektur auf multiples Testen, FDR<10 %, Tabelle 54A).

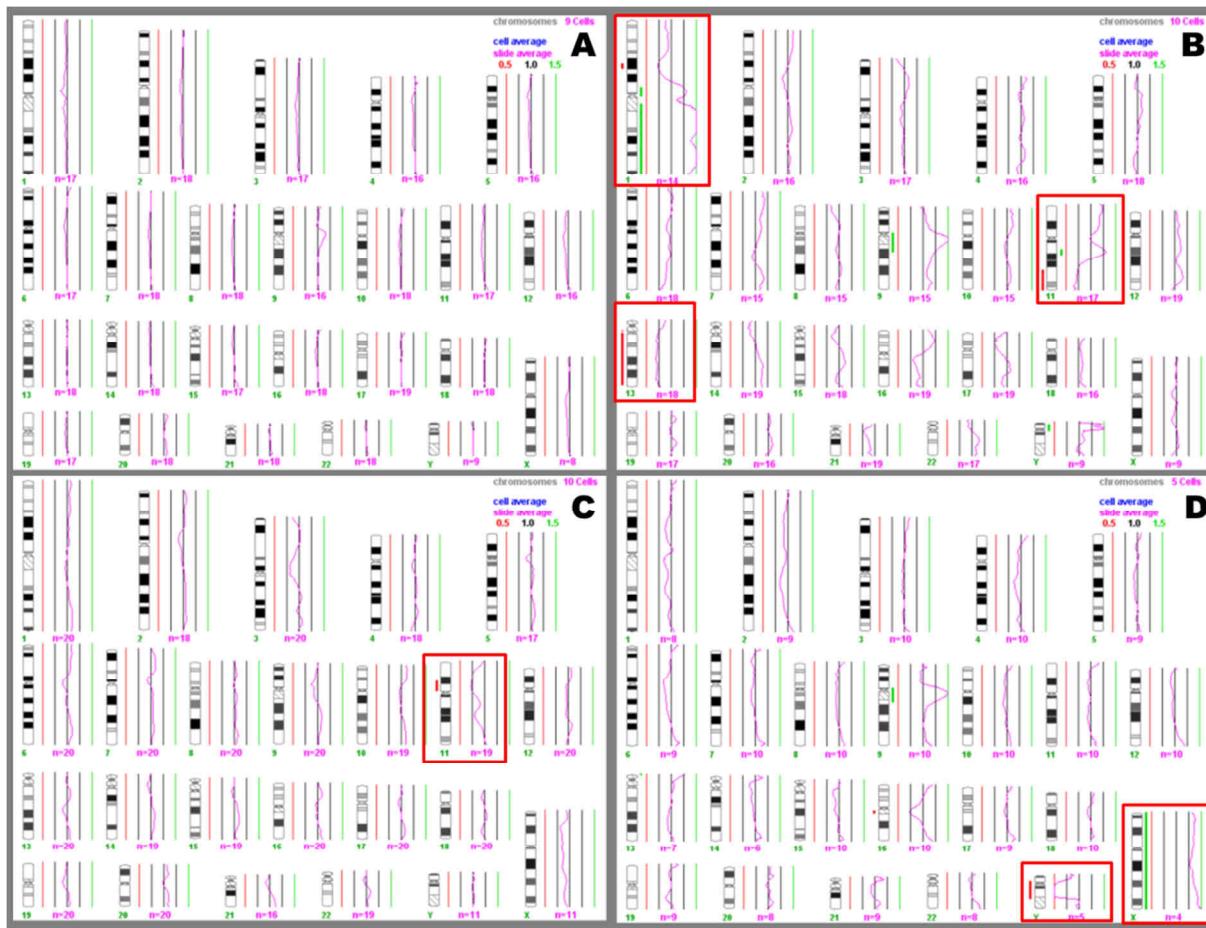


Abbildung 35: Balancierte und aberrante mCGH Profile: **A:** MC-644-1, balanciert M₀; **B:** MC-689-4, aberrant M₁; **C:** MC-1117-4, aberrant M₀; **D:** MC-741-9 EpCAM⁺ Zelle, balanciert, *sex mismatch* (Deletion des Y-Chromosoms und Amplifikation des X Chromosoms); *aberrante Chromosomen wurden rot umrahmt*

4.5.1.1 Transkript-Ergebnisse unter Einbeziehung des mCGH-Status

Da nun bekannt war, bei welchen Zellen es sich um DCC handelte, wurden die Ergebnisse der genspezifischen PCR dieser Zellen erneut betrachtet. Zum einen wurde die Transkript-Expression von aberranten und balancierten EpCAM⁺ Zellen verglichen (Abbildung 36). Der Anteil an EpCAM-Transkript-positiven Zellen war in beiden Gruppen fast gleich hoch (85,0 % bzw. 88,5 %). Auch die weiteren Marker waren bis auf CK18 nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,006$, *Fisher's exakt test*). Daraus lässt sich schließen, dass mit EpCAM sowohl aberrante als auch balancierte Zellen detektiert werden. Der Anteil an Transkript-positiven Zellen war bei den balancierten Zellen sogar höher. Bemerkenswert war die Tatsache, dass 11,5 % der CD45-positiven Zellen ein aberrantes mCGH-Profil aufwiesen und damit als Tumorzellen betrachtet werden müssen.

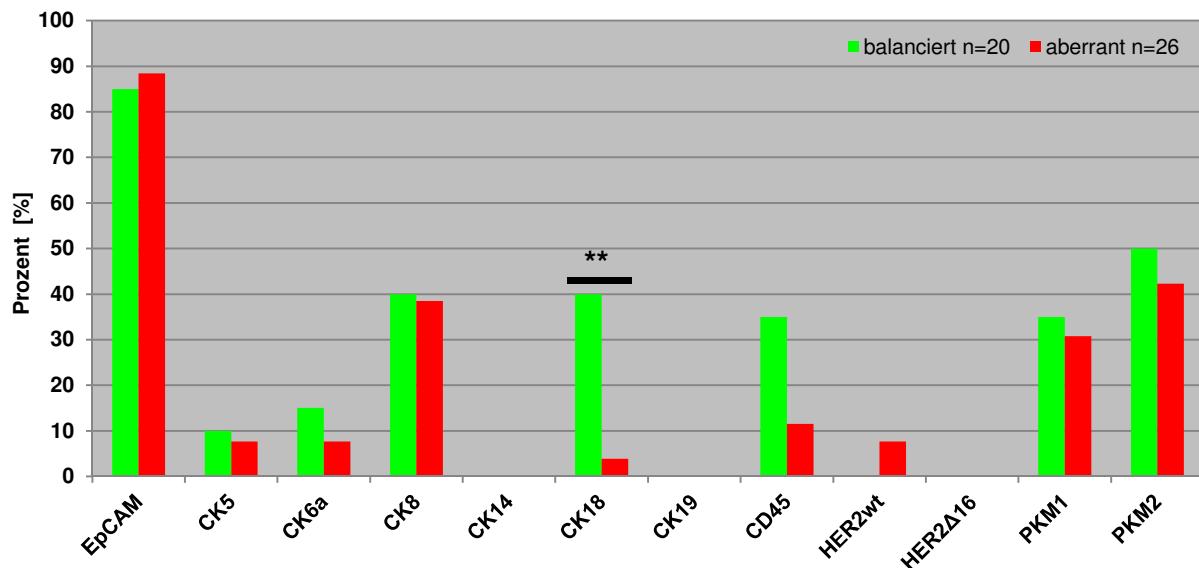


Abbildung 36: Expression von ausgewählten Transkripten 46 aberranter und balancierter M₀ Zellen: Die Expression der ausgewählten Transkripte wurde für 20 balancierte und 26 aberrante EpCAM⁺ M₀ Zellen dargestellt. Aufgetragen ist der Anteil [%] der positiven Zellen für die angegebenen Transkripte. Der schwarze Balken kennzeichnet die signifikant unterschiedliche Gruppe, das Signifikanzniveau ist darüber angegeben (Fisher's exakt test).

Zum anderen wurde der Vergleich der Expression der untersuchten Transkripte von HD und M₁ Zellen mit den nun eindeutig klassifizierten M₀ Tumorzellen wiederholt (Abbildung 37). Da alle der untersuchten M₁ Zellen mCGH-Aberrationen aufwiesen, wurden für diese Auswertung auch M₁ Zellen verwendet, von denen kein mCGH Profil erstellt wurde. Die bereits beschriebene, signifikant erhöhte Expression der Transkripte CK18 und HER2Δ16 der M₁ Zellen, im Vergleich zu den M₀ DCC, konnte bestätigt werden ($p<0,001$ bzw. $p=0,012$).

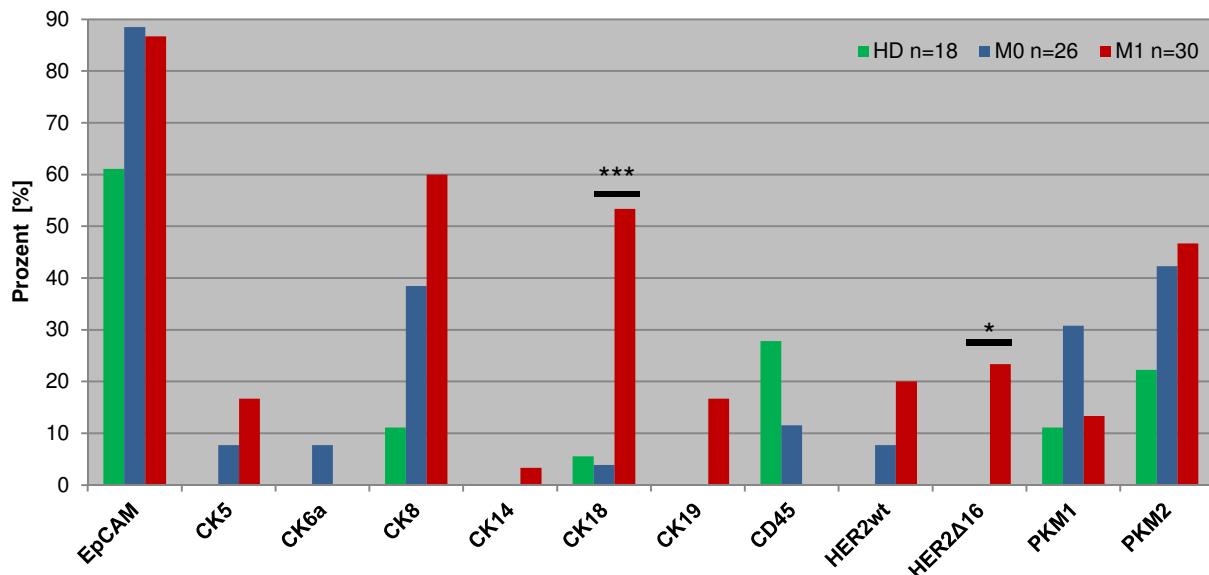


Abbildung 37: Gesamtübersicht der Expression von ausgewählten Transkripten unter Einbeziehung der mCGH Ergebnisse: Aufgetragen ist der Anteil [%] der positiven Zellen für die Transkripte EpCAM, CK5, CK6a, CK8, CK14, CK18, CK19, CD45, HER2wt, HER2Δ16, PKM1 und PKM2 von 18 HD, 26 aberranten M₀ und 30 M₁ Zellen. Das jeweilige Signifikanzniveau des Vergleichs HD gegen M₀ und M₁ gegen M₀ ist darüber angegeben.

Die Unterschiede bei der Expression von CK8 und CK19 zwischen M₀ und M₁ Zellen waren nicht mehr signifikant ($p=0,108$ bzw. $p=0,055$), zeigten jedoch einen deutlichen Trend. Zwischen HD Zellen und M₀ DCC bestanden hingegen keine signifikanten Unterschiede. Somit wird deutlich, dass die ausgewählten Transkripte auch keine Abgrenzung der identifizierten Tumorzellen von den hämatopoetischen Zellen erlaubten.

Mit den gesicherten M₀ Tumorzellen wurden auch die in 4.4.3 beobachteten Korrelationen klinischer Daten mit den Transkript-Ergebnissen überprüft (Tabelle 52). Die Korrelationen von CK8 mit dem Differenzierungsgrad und dem Hormonrezeptorstatus konnten nicht bestätigt werden, ebenso wenig die Korrelation von PKM2 mit dem UICC-Stadium. Es konnte jedoch eine Korrelation von CK8 mit dem UICC-Stadium festgestellt werden. Allerdings beschränken die niedrigen Fallzahlen bei dieser Auswertung die Aussagekraft der Assoziationen.

Abschließend wurde untersucht, ob sich die DCC, die CK-Transkripte (CK5, CK6a, CK8, CK14, CK18, CK19) in den genspezifischen PCR exprimierten, von den DCC unterschieden, die keine CK-Transkripte aufwiesen. Dazu wurden die DCC aufgrund ihrer CK-Transkript-Positivität aufgeteilt und die mCGH-Aberrationen von CK-Transkript-positiven DCC gegen CK-Transkript-negative DCC im Histogramm aufgetragen (Anhang Abbildung 48). Statistisch waren keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellbar (jeweils n=13, Daten nicht gezeigt). Dies lässt folgern, dass sich EpCAM⁺ DCC, die zusätzlich CK-Transkripte exprimierten, in ihren genetischen Aberrationen nicht von CK-Transkript-negativen Zellen unterschieden.

Tabelle 52: Überprüfung der Korrelation klinischer Daten mit den Ergebnissen der genspezifischen PCR der gesicherten M₀ DCC

UICC-Stadium	CK8 ⁻	CK8 ⁺	<i>p</i>
0	0	2	0,024
I	10	2	
II	5	4	
III	0	2	

Differenzierungsgrad	CK8 ⁻	CK8 ⁺	<i>p</i>
G1	2	2	0,848
G2	11	6	
G3	3	1	

Hormonrezeptorstatus	CK8 ⁻	CK8 ⁺	<i>p</i>
negativ	2	0	0,508
positiv	14	10	

UICC-Stadium	PKM2 ⁻	PKM2 ⁺	<i>p</i>
0	1	1	0,680
I	7	5	
II	4	5	
III	2	0	

4.5.2 Vergleich EpCAM⁺ und CK⁺ disseminierter Krebszellen

Für einen Vergleich von EpCAM⁺ und CK⁺ DCC wurden Zellen aus einem bestehenden Kollektiv herangezogen (Schmidt-Kittler et al., 2003). Diese Zellen wurden mit einem Antikörper gegen CK8 oder mit einem Antikörper gegen CK8/CK18/CK19 detektiert. Verwendet wurden die mCGH-Daten von 42 CK⁺ M₀ DCC und 58 CK⁺ M₁ DCC von insgesamt 50 Mammakarzinom-Patientinnen. Da manche Zellen aus dem Vergleichskollektiv zusammen mit einer männlichen Referenz hybridisiert wurden (*sex mismatch*), konnten die Daten für Chromosom X nicht verwendet werden.

Eine Voraussetzung für die Gegenüberstellung der beiden Kollektive war, dass die Anzahl an Zellen pro Patientin in beiden Kollektiven vergleichbar war, um zu verhindern, dass individuelle Aberrationen einer Patientin mit mehreren Zellen im Kollektiv überrepräsentiert waren. Die Anzahl an Zellen pro Patientin war hinsichtlich arithmetischem Mittel und Median für die jeweiligen Untergruppen (M₀ und M₁) vergleichbar (Tabelle 53).

Tabelle 53: Vergleich der EpCAM- und CK-DCC-Kollektive in Hinsicht auf Patientenzahl und Zellzahl pro Patientin

	Patienten	Zellen	Zellen pro Patient (MW)	Zellen pro Patient (Median)
EpCAM⁺ DCC M₀	19	25	1,3	1,0
CK⁺ DCC M₀	27	42	1,6	1,0
EpCAM⁺ DCC M₁	4	10	2,5	2,5
CK⁺ DCC M₁	23	58	2,5	3,0

Zunächst wurden die mCGH-Aberrationen aller CK⁺ DCC betrachtet. Besonders häufig fanden sich Amplifikationen auf den Chromosomen 1q, 3, 5, 7 und 12 der M₀ Zellen. Deletionen dagegen traten auf den Chromosomen 4, 6, 8p, 11, 13p, 16q, 17 und 22 der M₀ Zellen auf. Bei den M₁ Zellen waren Amplifikationen auf den Chromosomen 1q, 5p, 8q, 16p, 17q und 20, Deletionen dagegen auf 3p, 6q, 8p, 9, 10, 11q, 13, 14q, 16q, 17p, 18, 19p und 22 häufig (Abbildung 38C+D). Insgesamt 15 Chromosomen-Abschnitte unterschieden sich signifikant zwischen M₀ und M₁ Zellen (*Fisher's exact test*, Korrektur auf multiples Testen, FDR<10 %, Tabelle 54B). Es zeigte sich, dass sich das Aberrationsmuster zwischen M₀ und M₁ Patientinnen sowohl bei EpCAM⁺ als auch bei CK⁺ DCC unterschied.

Beim Vergleich der EpCAM⁺ M₀ DCC mit den CK⁺ M₀ DCC war nur die Amplifikation auf dem q-Arm des Chromosoms 1 der CK Zellen signifikant unterschiedlich (*adjp*=0,083). Der Vergleich der EpCAM⁺ M₁ DCC gegen die CK⁺ M₁ DCC zeigte signifikante Unterschiede auf 1p13 und 11q24q25, wobei es sich um Deletionen bei den EpCAM⁺ DCC handelte (Tabelle 54C+D).

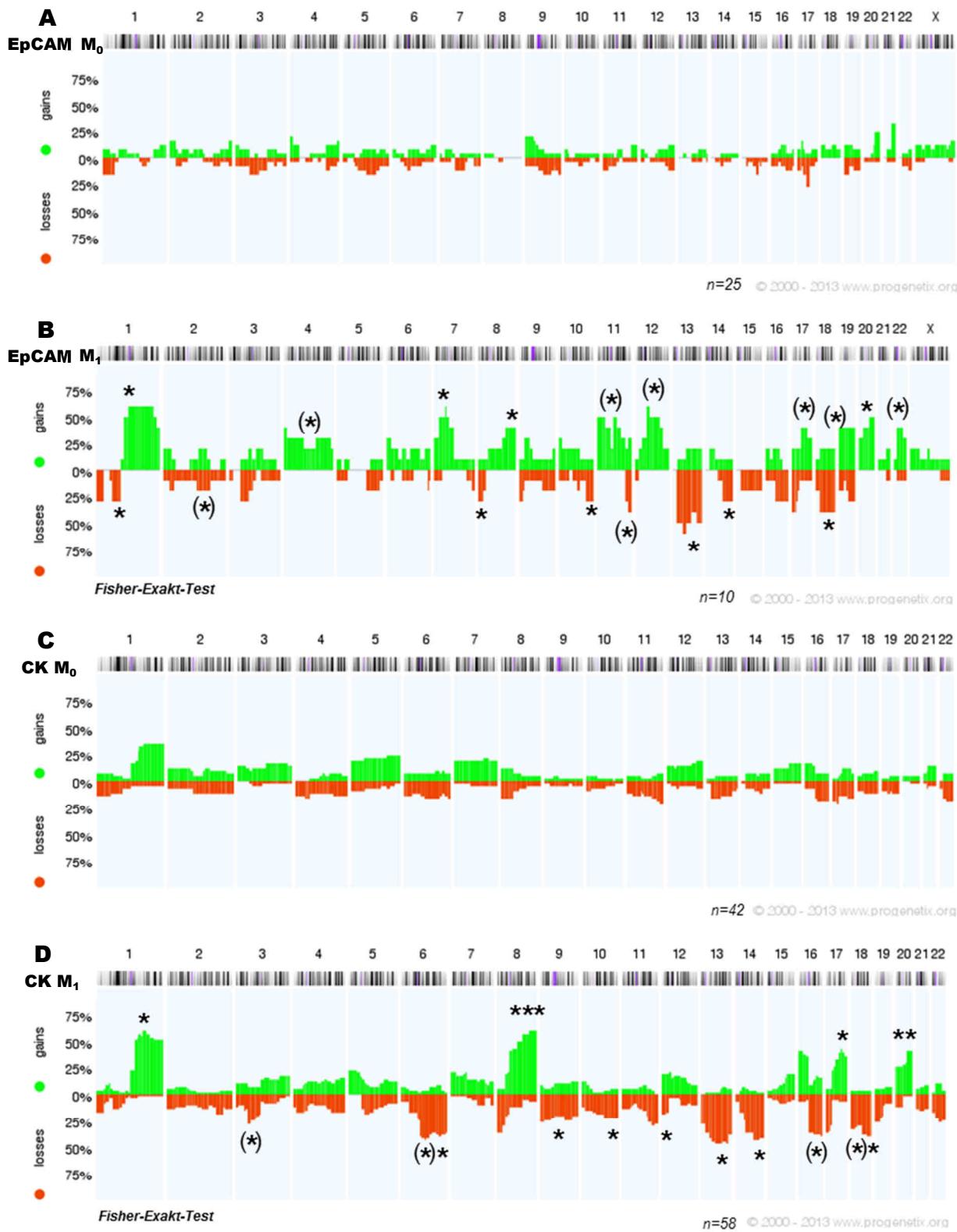


Abbildung 38: Histogramm der mCGH Aberrationen aller M₀ und M₁ DCC, dargestellt als Amplifikationen (grün) und Deletionen (rot) über den jeweiligen Chromosomen (horizontal) als prozentualer Anteil (vertikal) der jeweiligen Gruppe; **A:** 25 EpCAM⁺ M₀ Zellen; **B:** zehn EpCAM⁺ M₁ Zellen; **C:** 42 CK⁺ M₀ Zellen; **D:** 58 CK⁺ M₁ Zellen; Die Signifikanzniveaus der Vergleiche M₀ gegen M₁ (A gegen B, C gegen D) wurden jeweils im M₁-Histogramm (B,D) angegeben. (*): adjp < 0,10; Fisher's exakt test

Als nächstes wurde untersucht, ob die Gesamtzahl an Aberrationen von EpCAM⁺ und CK⁺ DCC verschieden war. Der Vergleich von 25 EpCAM⁺ M₀ DCC mit zehn EpCAM⁺ M₁ DCC zeigte, dass der Median für die Amplifikationen, Deletionen und Aberrationen der M₁ DCC mindestens doppelt so hoch war, wie für die M₀ DCC (Abbildung 39A). Die Amplifikationen waren zwischen beiden Gruppen signifikant verschieden ($p=0,012$, Wilcoxon-Mann-Whitney), die Deletionen unterschieden sich nicht signifikant ($p=0,091$).

Der Vergleich von 42 CK⁺ M₀ DCC mit 58 CK⁺ M₁ DCC zeigte, dass auch hier die Medianwerte der M₁ DCC für alle drei Parameter mindestens doppelt so groß waren, wie für die M₀ DCC (Abbildung 39B). Die Zellen unterschieden sich in ihrer Anzahl an Amplifikationen und Deletionen höchst signifikant ($p<0,001$, Wilcoxon-Mann-Whitney).

Tabelle 54: Auflistung der adjp-Werte beim Vergleich von EpCAM⁺ oder CK⁺ M₀ und M₁ DCC; A: Vergleich der Aberrationen von EpCAM⁺ M₀ und M₁ DCC; **B:** Vergleich der Aberrationen von CK⁺ M₀ und M₁ DCC; **C:** Vergleich der Aberrationen von EpCAM⁺ und CK⁺ M₀ DCC; **D:** Vergleich der Aberrationen von EpCAM⁺ und CK⁺ M₁ DCC; die Werte wurden nach der FDR sortiert. Bei größeren Chromosomenabschnitten wurde das arithmetische Mittel des adjp angegeben. (FDR auf multiples Testen adjustiert, Fisher's exact test)

A

Chromosomenabschnitt	adjp	Signifikanz-niveau
1p13q41	0,015	*
13q	0,015	*
18q	0,021	*
20p13q11.2	0,026	*
7p21q11.2	0,038	*
8q22q24.3	0,040	*
8p23p22	0,046	*
10q25	0,046	*
14q24q32	0,047	*
11q13q25 (ohne 11q23)	0,053	(*)
11p15p11.2	0,060	(*)
12p11.2q22	0,062	(*)
22q11.1q12	0,063	(*)
19q12q13.4 (ohne 13.2)	0,073	(*)
4p14q13	0,080	(*)
2q22q24	0,080	(*)
17q22	0,080	(*)

B

Chromosomenabschnitt	adjp	Signifikanz-niveau
8q	0,001	***
20 (ohne 20q11.1)	0,009	**
14q21q32	0,017	*
1q21	0,019	*
13q13q34	0,023	*
17q22q25	0,028	*
9 (ohne 9p12)	0,036	*
18q21q23	0,041	*
6q24	0,042	*
12p13	0,045	*
10q24q26	0,047	*
3p23p21 (ohne 3p22)	0,057	(*)
6q13q16	0,079	(*)
16q22q24 (ohne q23)	0,085	(*)
18p11.1	0,085	(*)

C

Chromosomenabschnitt	adjp	Signifikanz-niveau
1q23q31	0,083	(*)

D

Chromosomenabschnitt	adjp	Signifikanz-niveau
1p13	0,065	(*)
11q24q25	0,065	(*)

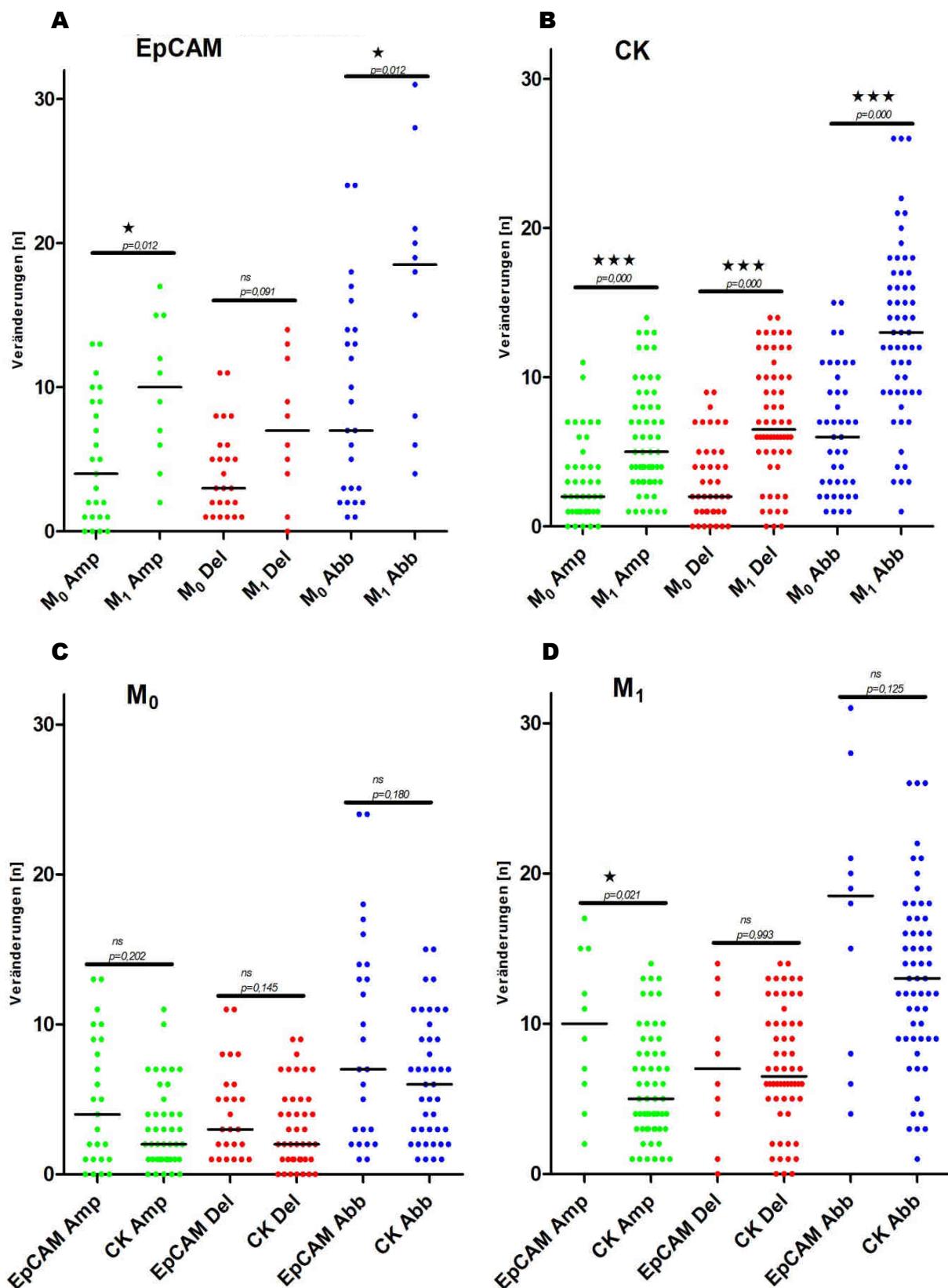


Abbildung 39: Vergleich von EpCAM⁺ und CK⁺ M₀ und M₁ DCC hinsichtlich ihrer chromosomalen Aberrationen, aufgeteilt in Amplifikationen (Amp), Deletionen (Del) und Aberrationen (Abb); **A:** 25 EpCAM⁺ M₀ DCC gegen zehn EpCAM⁺ M₁ DCC; **B:** 42 CK⁺ M₀ DCC gegen 58 CK⁺ M₁ DCC; **C:** 25 EpCAM⁺ M₀ DCC gegen 42 CK⁺ M₀ DCC; **D:** zehn EpCAM⁺ M₁ DCC gegen 58 CK⁺ M₁ DCC; Eingetragen wurden die Signifikanzniveaus der Vergleiche Amp, Del, Abb in den jeweiligen Gruppen (Wilcoxon-Mann-Whitney).

EpCAM⁺ M₀ DCC unterschieden sich von CK⁺ M₀ DCC in einer durchschnittlich höheren Anzahl an Aberrationen (Abbildung 39C), jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Beim Vergleich der EpCAM⁺ M₁ DCC mit den CK⁺ M₁ DCC wurde deutlich, dass EpCAM⁺ Zellen öfter Chromosomengewinne als -verluste zeigten. CK⁺ DCC dagegen wiesen öfter Deletionen als Amplifikationen auf. Der Median für die EpCAM⁺ Zellen war für alle drei Parameter größer, signifikant war der Unterschied zwischen den Amplifikationen beider Gruppen ($p=0,021$, Wilcoxon-Mann-Whitney, Abbildung 39D).

Tabelle 55: Korrelation von Aufarbeitungscharakteristika und klinischen Daten mit dem mCGH-Status der Patientinnen: Aufgetragen wurde die Gesamtzahl an Patientinnen der jeweiligen Gruppe und der Anteil [%] an der Gesamtgruppe sowie die p -Werte (Fisher's exact test). PT=Primärtumor

		Patienten		mCGH aberrant		mCGH balanciert		p -Wert
		Patienten	[%]	Patienten	[%]	Patienten	[%]	
Zeitintervall	27	100		19	70,4	8	29,6	0,438
	0-12 h	13	48,2	10	76,9	3	23,1	
	12-24 h	13	48,2	9	69,2	4	30,8	
Histologie	>24 h	1	3,7	0	0	1	100,0	0,414
	DCIS	2	7,4	2	100,0	0	0	
	invasiv duktal	19	70,4	14	73,7	5	26,3	
	invasiv lobulär	4	14,8	2	50,0	2	50,0	
Differenzierungsgrad	sonstige	2	7,4	1	50,0	1	50,0	0,658
	G1	3	11,1	3	100,0	0	0	
	G2	19	70,4	12	63,2	7	36,8	
	G3	4	14,8	3	75,0	1	25,0	
Ausdehnung PT	T ₁	13	48,2	10	76,9	3	23,1	0,167
	T ₂	10	37	7	70,0	3	30,0	
	T ₃	2	7,4	0	0	2	100,0	
Nodalstatus	N ₀	19	70,4	14	73,7	5	26,3	0,817
	N ₁	6	22,2	4	66,7	2	33,3	
	N ₂	2	7,4	1	50,0	1	50,0	
Hormonrezeptorstatus PT	negativ	3	11,1	2	66,7	1	33,3	1,000
	positiv	24	88,9	17	70,8	7	29,2	
HER2-Rezeptorstatus PT	negativ	24	88,9	17	70,8	7	29,2	0,320
	positiv	1	3,7	0	0	1	100,0	
Subtyp	Luminal A	21	84,0	15	71,4	6	28,6	0,489
	Luminal B	1	4,0	0	0	1	100,0	
	Triple negativ	3	12,0	2	66,7	1	33,3	
UICC-Stadium	UICC I	2	7,4	2	100,0	0	0	0,209
	UICC II	12	44,4	9	75,0	3	25,0	
	UICC III	9	33,3	7	77,8	2	22,2	
	UICC IV	4	14,8	1	25,0	3	75,0	
Neoadjuvante Therapie	nein	20	74,1	14	70,0	6	30,0	1,000
	ja	5	18,5	3	60,0	2	40,0	

Anschließend wurden die mCGH-Ergebnisse der einzelnen M₀ Patientinnen mit den klinischen Daten verglichen. Dazu wurde eine Patientin als aberrant gewertet, wenn mindestens eine der untersuchten Zellen ein aberrantes Profil aufwies. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Tabelle 55).

Abschließend wurden die genomischen Aberrationen der untersuchten EpCAM⁺ DCC auf ihre Ähnlichkeit untersucht. Das hierarchische Clusterverfahren ermöglichte eine Trennung der zehn M₁ und 25 M₀ DCC anhand der 50 Aberrationen mit der höchsten Varianz (Abbildung 40). Die Auftrennung in zwei Bäume lieferte zwei Cluster: Zellen des ersten Clusters zeigten häufiger Deletionen und Amplifikationen als Zellen des zweiten Clusters. Bei 8/15 Zellen (53 %) des ersten Clusters handelte es sich um M₁ Zellen. Dagegen waren im zweiten Cluster nur zwei M₁ Zellen vertreten (10 %), die von der gleichen Patientin stammten (MC-1122). Um mögliche Unterschiede zwischen den M₁ Patientinnen darzustellen, wurden sowohl die Metastasierungsorte als auch die genomischen Aberrationen dieser Patientinnen näher betrachtet (Tabelle 56). Es zeigte sich, dass bei der Patientin, deren Zellen im zweiten Cluster zu finden waren, keine Knochenmetastasen vorlagen. Dagegen war der Knochen bei den restlichen M₁ Patientinnen an der Metastasierung beteiligt. Beim Vergleich der Anzahl der chromosomalen Aberrationen dieser Patientin konnten keine Unterschiede zu den anderen M₁ Patientinnen festgestellt werden.

Wurden von einer Patientin mehrere Zellen für die Clusteranalyse benutzt, fielen sie in 7/9 Fällen (77,8 %) in das gleiche Cluster. Dies könnte bedeuten, dass die Knochenmetastasierung einen entscheidenden Schritt in der Tumorprogression darstellt, der es ermöglicht, den Genotyp der Zellen zu charakterisieren.

Tabelle 56: Metastasierung und genomische Aberrationen der M₁ Patientinnen

Patientin	Metastasierungsorte	Amplifikationen	Deletionen
MC-689	Knochen, Haut	1p, 2p, 3, 4p, 5p, 6p, 7p, 8q, 10p, 11, 12p, 14q, 17q, 19, 20, 21, 22, X	1p, 2, 3, 5, 6q, 7q, 8p, 9, 10q, 11q, 13q, 15q, 16, 17p, 18, X
MC-773	Knochen, Leber, Lunge, Gehirn	1q, 4p, 6p, 8p, 11p, 12q, 16p, 17, 20q	2q, 3p, 5q, 6q, 9p, 10q, 11q, 13, 14q, 18q, 19q
MC-947	Knochen, *	2p, 6p, 7p, 8q, 9, 11, 12q, 14q, 16p, 17, 19p, 20, 21q, 22q	3p, 8p, 9p, 10p, 13q
MC-1122	Leber, Haut, Weichteile	1p, 2, 3p, 4, 5, 6, 7p, 8, 9p, 10, 11, 12p, 13q, 16, 18, 20p, Xp	1p, 2p, 3p, 6p, 7, 9q, 10q, 12p, 14q, 15q, 17, 19, 21q, 22q

*: keine Information, ob weitere Metastasen vorhanden sind

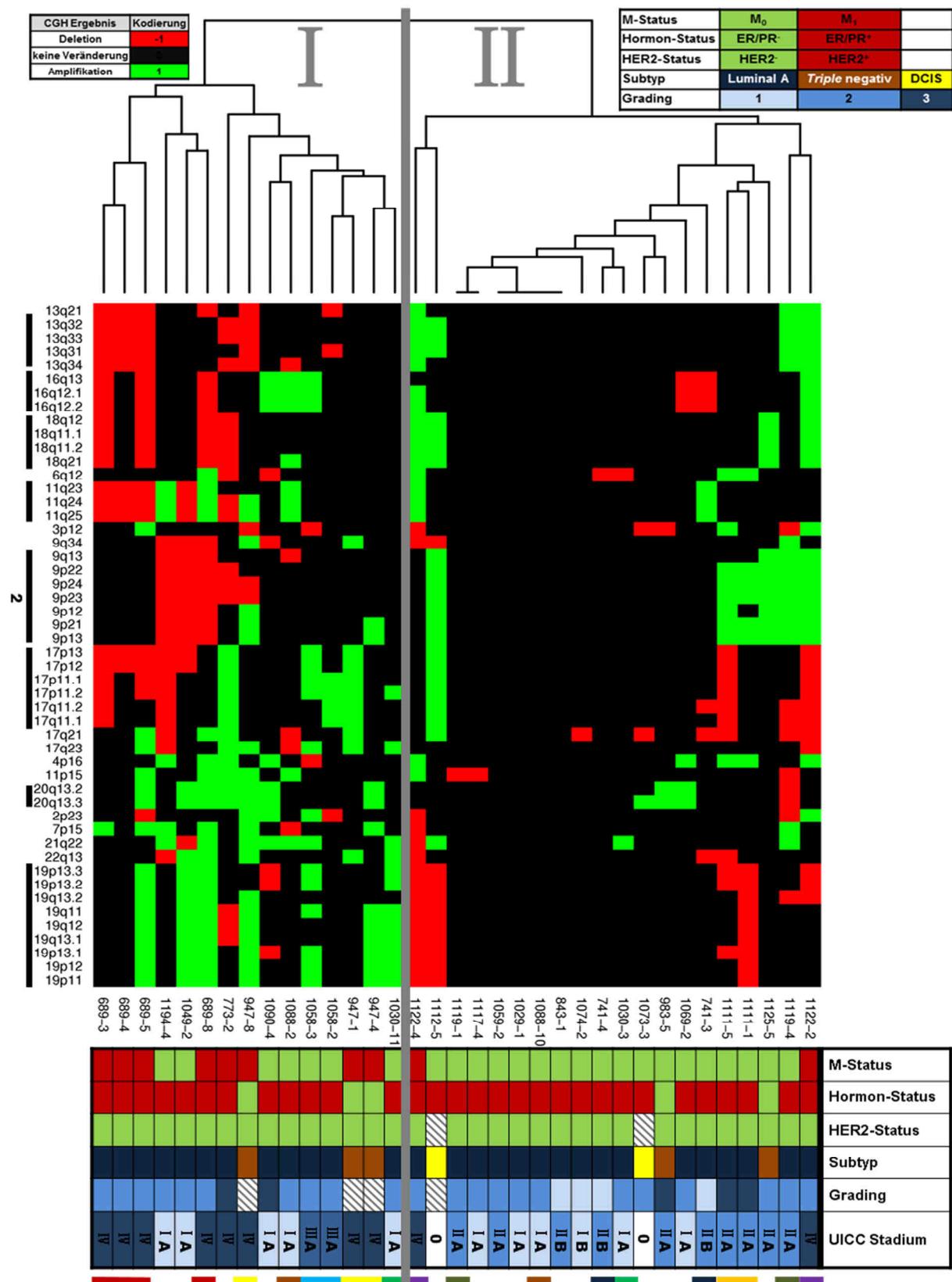


Abbildung 40: Hierarchische-Clusteranalyse der mCGH-Aberrationen aller aberranten EpCAM⁺ DCC. Die zehn M₁ und 25 M₀ DCC ließen sich nach den 50 Aberrationen (links aufgetragen) mit der höchsten Varianz in der ersten Hierarchieebene des Clusterverfahrens in zwei Gruppen einteilen. Dadurch ergaben sich neun zusammenhängende Regionen (auf den Chromosomen 9, 11, 13, 17, 18, 19) und zwölf einzelne Chromosomen-Loci, nach denen die Gruppierung erfolgte. Diese sind links durch schwarze Balken bei den 50 Aberrationen mit der höchsten Varianz gekennzeichnet. Die klinischen Daten zu den einzelnen Zellen sind in der unteren Tabelle ersichtlich. Im Falle nicht verfügbarer Patientendaten wurden die Felder grau gestreift. Mehrere Zellen einer Patientin wurden am unteren Rand der Tabelle mit einem gleichfarbigen Balken gekennzeichnet.

4.5.3 mCGH Ergebnisse von EpCAM⁺ Zellen in Lymphknoten

Von den isolierten EpCAM⁺ Zellen aus den Lymphknoten schnitten die meisten Zellen schlecht im Qualitätsassay ab. Daher konnte nur eine Zelle hybridisiert werden. Das aberrante Profil dieser Zelle (Abbildung 41) zeigte typische Mammakarzinom-Aberrationen (Amplifikation auf 1q, 8q, 16p, 20; Deletion auf 17p).

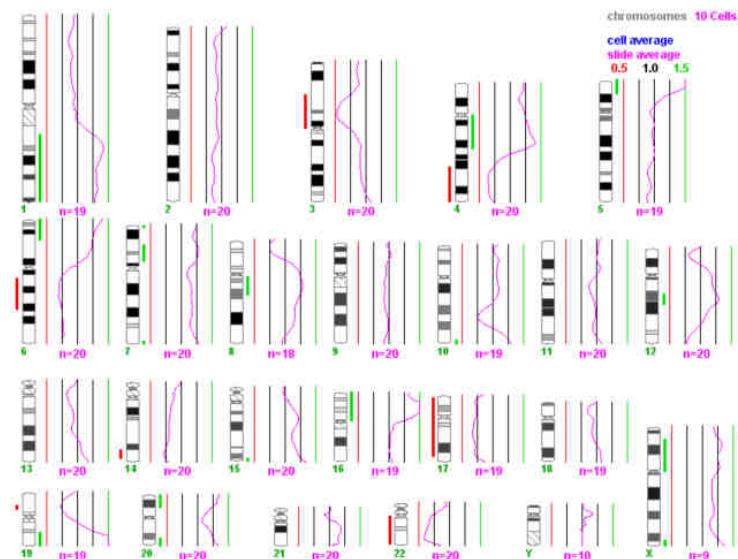


Abbildung 41: mCGH Profil einer EpCAM⁺ Zelle aus dem Lymphknoten einer M₀ Mammakarzinom-Patientin (MC-1131-4 LK)

4.6 Untersuchung der Genexpression der EpCAM⁺ Einzelzellen

Nachdem mit Hilfe der mCGH die aberranten Zellen eindeutig als DCC identifiziert worden waren, wurde die Genexpression dieser Zellen überprüft. Es sollte näher untersucht werden, ob sich die DCC mit und ohne CK-Transkript unterscheiden, bzw. ob ein Unterschied zwischen M₀ und M₁ DCC besteht. Insgesamt wurden die WTA-Produkte von 34 Zellen markiert. Sie stammten aus Knochenmarkproben, welche innerhalb von 24 h aufgearbeitet wurden. Fünf Zellen konnten nicht erfolgreich markiert oder hybridisiert werden, daher wurden insgesamt 21 M₀ DCC und acht M₁ DCC auf *Agilent whole human genome Arrays (4x44k)* hybridisiert und ausgewertet.

Zuerst wurde untersucht, ob sich CK-Transkript-positive DCC von CK-Transkript-negativen DCC unterscheiden. Dazu wurden jeweils beide Transkript-Gruppen innerhalb der M₀ und M₁ Patientinnen verglichen. Diese Analyse zeigte keine signifikant unterschiedlich exprimierten Gene und lässt den Schluss zu, dass sich EpCAM⁺ DCC, die zusätzlich CK-Transkripte exprimieren, in ihrem Transkriptom nicht von CK-Transkript-negativen Zellen unterscheiden (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde untersucht, ob ein Unterschied in der Genexpression zwischen DCC des primären und fortgeschrittenen Mammakarzinoms bestand. Dazu wurde die Genexpression von M₀ und M₁ DCC verglichen. Hierbei zeigte sich, dass M₀ und M₁ DCC zwei verschiedene Gruppen darstellen (Abbildung 42). In den M₀ DCC wurden 29 hochregulierte Gene im Vergleich zu den M₁ DCC detektiert, bei den M₁ Zellen waren 19 Gene im Vergleich zu den M₀ DCC höher exprimiert.

Um einen Einfluss der Aufarbeitungszeit auf die Genexpression auszuschließen, wurde die Auswertung unter Einbeziehung der Aufarbeitungszeit der jeweiligen Proben wiederholt. Der Vergleich von Proben, die innerhalb von 12 h aufgearbeitet wurden, und Proben, die zwischen 12 und 24 h aufgearbeitet und untersucht werden konnten, zeigte keine Unterschiede in den gefundenen untersuchten Genen.

Zur Validierung der gefundenen Ergebnisse wurden die Gene *S100A11* (hochreguliert in M₁) und *HBB* (Hämoglobin Beta, hochreguliert in M₀) ausgewählt und Primer definiert. Für den Vergleich der Ergebnisse der genspezifischen PCR mit den Genexpressionsergebnissen von *S100A11* und *HBB* wurde das WTA-Produkt der gleichen Zellen verwendet, die auf dem Array hybridisiert wurden (Abbildung 43). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson betrug für *S100A11* 0,61 und für *HBB* 0,82. Da sich auf dem Array insgesamt elf gleiche Sequenzen von *HBB* befanden, deren Ergebnisse übereinstimmten, wurde für *HBB* die mittlere Korrelation berechnet. Die Tatsache, dass mehrere Oligonukleotide auf dem Array sehr ähnliche Ergebnisse lieferten, deutet auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Hybridisierung von Einzelzellen hin.

Zusätzlich zu den Zellen, die sich auf dem Array befanden, wurden weitere zehn aberrante M₀ DCC und drei aberrante M₁ DCC mit den Primern für *S100A11* und *HBB* untersucht. Alle M₁ DCC waren positiv für *S100A11* und negativ für *HBB*. Von den M₀ Zellen waren 8/10 (80 %) positiv für *HBB* und ebenfalls 8/10 negativ für *S100A11*. Sowohl die Validierung als auch die zusätzliche Untersuchung von zehn weiteren Zellen, bestätigen die Genexpressionsergebnisse. Mit Hilfe von *S100A11* und *HBB* war eine Unterscheidung von M₀ und M₁ DCC mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich.

Ein weiteres Gen, das in M₁ Zellen hochreguliert war, ist *TNFSF11* (*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11*), auch bekannt als *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)*. Vor allem vier Zellen in der M₁-Gruppe wiesen eine sehr hohe *RANKL*-Expression auf (Abbildung 42). Diese vier Zellen stammen von der gleichen M₁ Patientin (MC-947), die Knochenmetastasen nach der Mammakarzinom-Diagnose entwickelte und sich in einem weit fortgeschrittenen Stadium der metastatischen Erkrankung befand.

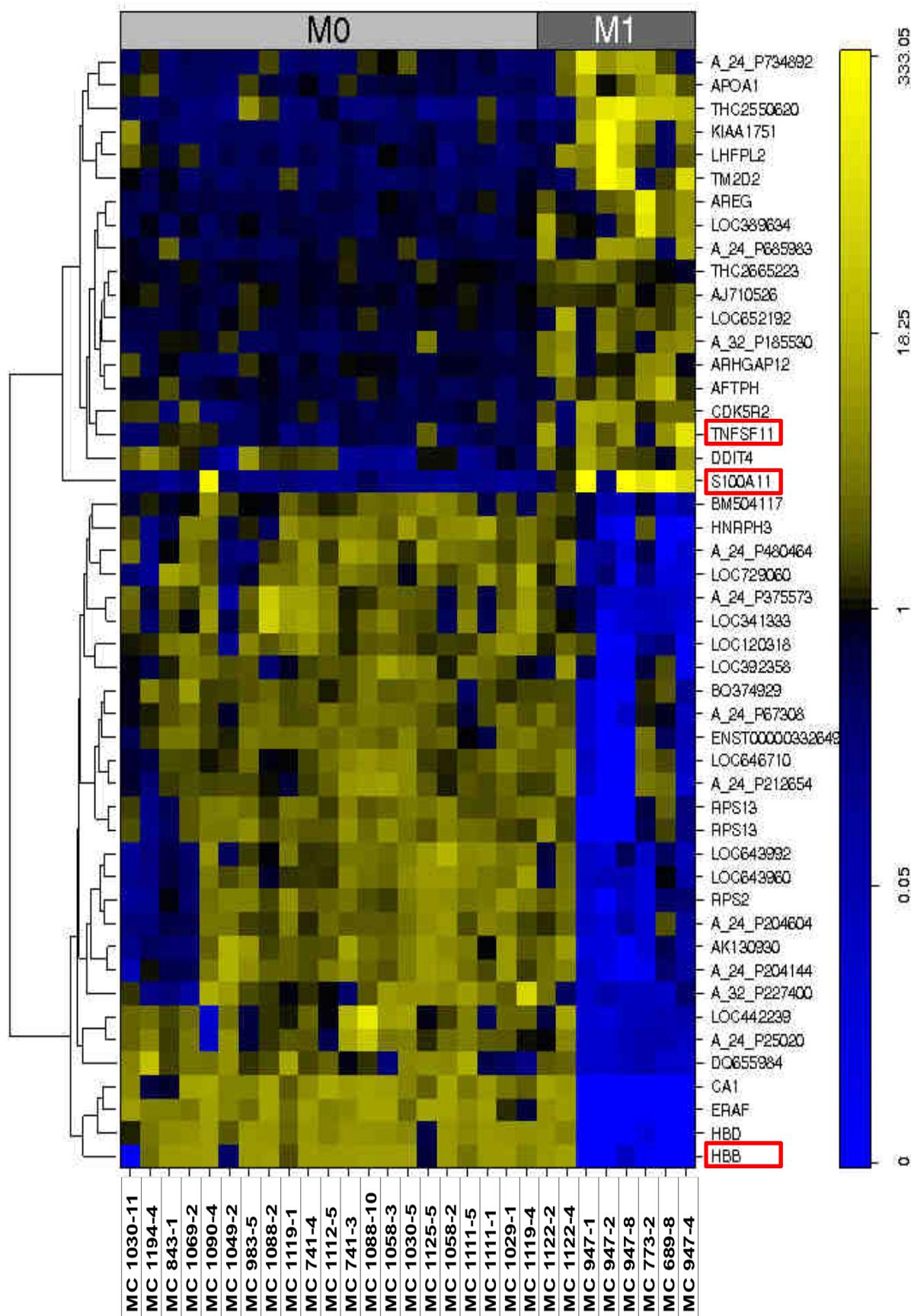


Abbildung 42: Heatmap der Genexpressionsergebnisse aus dem Vergleich von 21 aberranten M₀ und acht M₁ DCC; Horizontal sind die einzelnen DCC aufgetragen: M₀ DCC links und M₁ DCC rechts. Die Liste der differentiell exprimierten Gene ist vertikal aufgetragen. Differentiell hochregulierte Gene sind mit gelb gekennzeichnet, differentiell niederregulierte Gene mit blau. Die Skala rechts kodiert die Expressionsstärke.

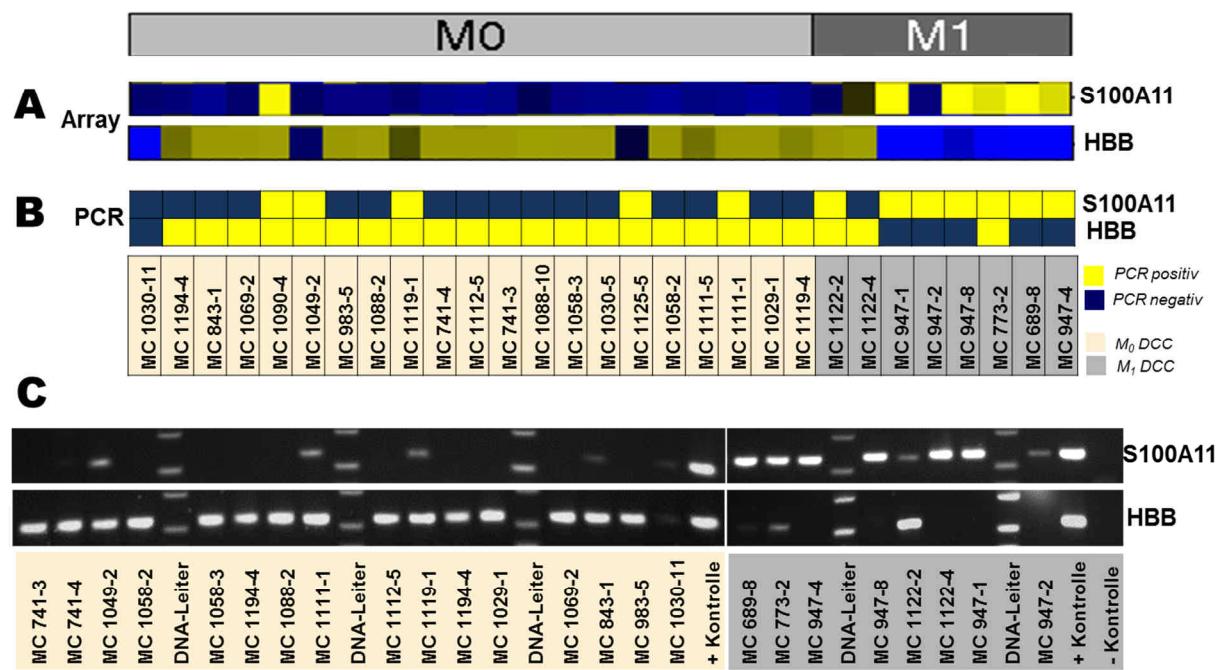


Abbildung 43: Validierung der Genexpressionsergebnisse mit der genspezifischen PCR: Mit Hilfe von Primern für *S100A11* und *HBB* wurde das WTA-Produkt der Zellen auf dem Array untersucht und die Ergebnisse der PCR mit dem Array verglichen. **A:** Ausschnitt aus der *Heatmap* der ausgewählten Gene (Abbildung 42); **B:** Die PCR-Ergebnisse für *S100A11* und *HBB* der gleichen Zellen auf dem Array. **C:** Gelbilder der PCR für einen Teil der Zellen des Arrays

Abschließend wurde untersucht, ob sich die Expressionsdaten der untersuchten EpCAM⁺ DCC aufgrund ihrer Ähnlichkeit separieren lassen. Das Ward-Clustering der Genexpressionsdaten aller 29 hybridisierten EpCAM⁺ DCC ermöglichte die Gruppierung in drei Cluster (Abbildung 44). Der vertikale Abstand jedes Clusters zum nächst höheren Knotenpunkt gibt die Verwandtschaft zwischen den Gruppen an. Je größer dieser Abstand ist, umso mehr unterscheiden sich die Gruppen. Demnach unterschied sich das Cluster A am meisten von den beiden anderen Clustern. M₁ Zellen gruppierten sich dabei mit Ausnahme zweier Zellen in das Cluster C (86 %). Bei den zwei M₁ Zellen handelte es sich erneut um die Zellen der Patientin MC-1122, die sich auch bei der hierarchischen Clusteranalyse der mCGH-Daten außerhalb des M₁-Clusters (Cluster I) befanden (Abbildung 40). Wurden mehrere Zellen von einer Patientin untersucht, fanden diese sich in 6/8 Fällen (75 %) im gleichen Cluster wieder.

Um die Clustereinteilung der Expressionsdaten mit der Clustereinteilung der mCGH-Daten zu vergleichen, wurde die Einteilung beider Analysen verglichen (Tabelle 57). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Zellen des zweiten mCGH-Clusters (Cluster II) sich auf die ersten beiden Arme im Dendrogramm der Genexpressionsdaten verteilten (Cluster A und B). Im Genexpressionscluster C wurden dagegen nur Zellen des mCGH-Cluster I gefunden – darunter 5/7 M₁ DCC (71,4 %). Insgesamt zeigte sich, dass die Zellen aus den verschie-

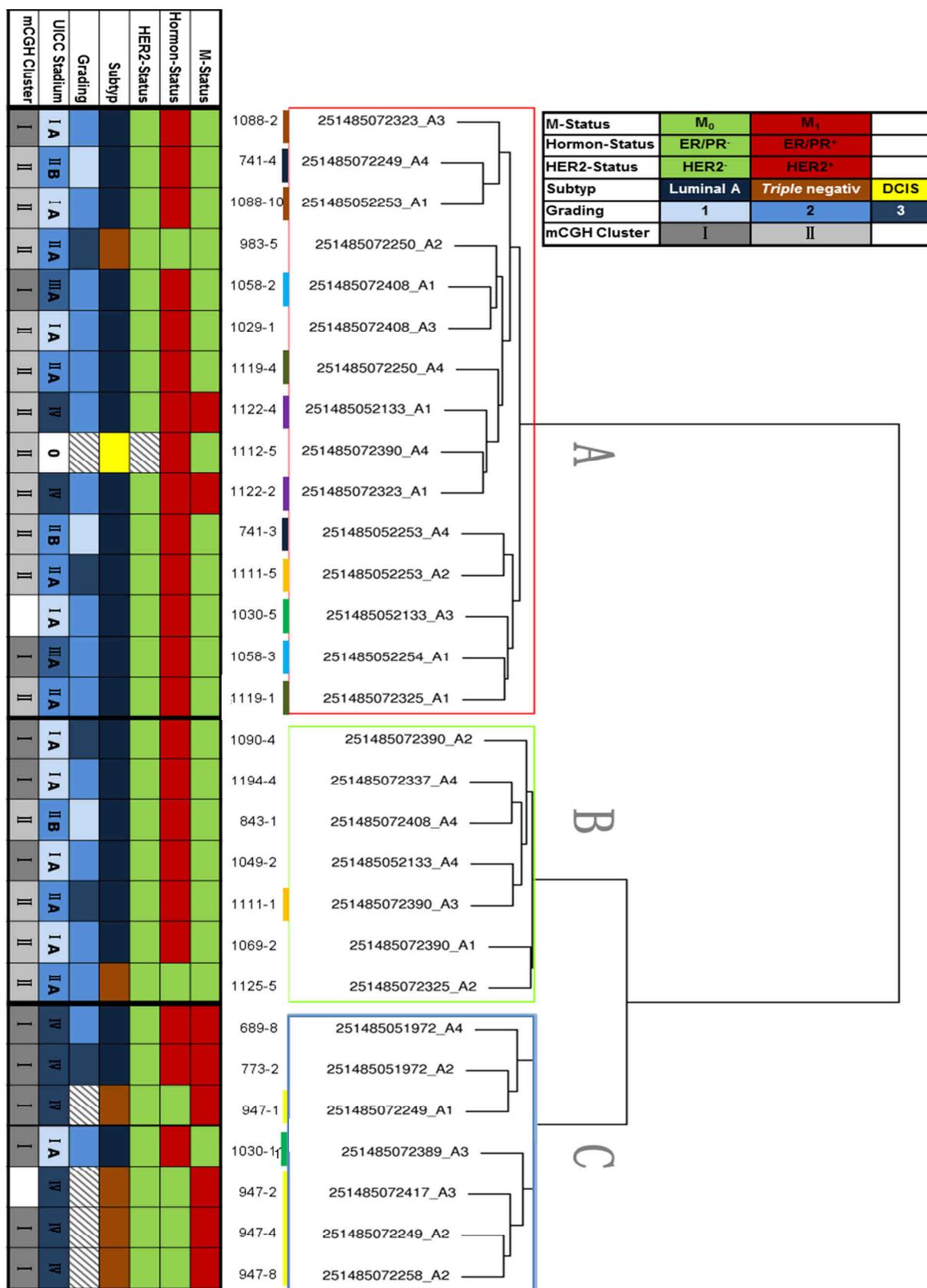
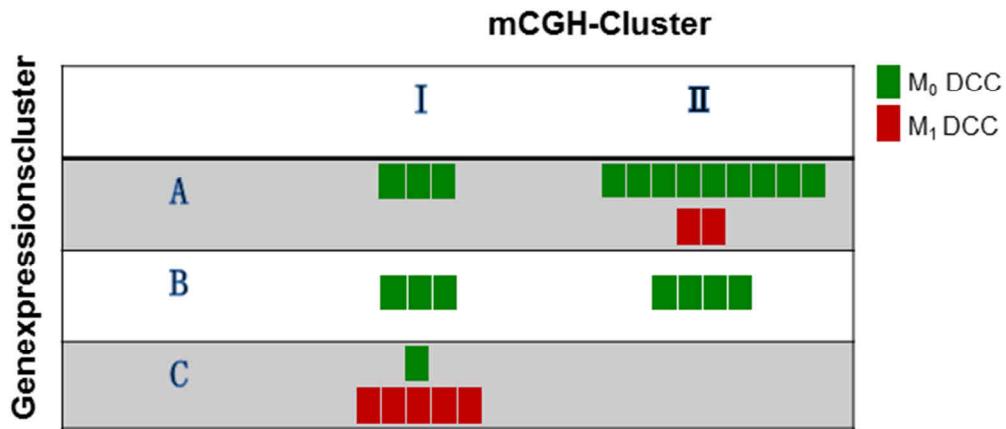


Abbildung 44: Ward-Clustering der Genexpressionsdaten von 29 aberranten EpCAM⁺ DCC. Die Zellen lassen sich mit Hilfe der 100 variabelsten Gene gruppieren. Durch Schneiden des hierarchischen Baums in der dritten Hierarchieebene ergeben sich drei Gruppen. Dabei gibt der Abstand der vertikalen Höhe der Gruppe zum nächst höheren Knotenpunkt die Verwandtschaft der Gruppen an. M_1 DCC gruppierten sich mit Ausnahme zweier Zellen der Patientin MC-1122 in das dritte Cluster. Die klinischen Daten zu den einzelnen Zellen sind in der Tabelle links ersichtlich. Im Falle nicht verfügbarer Patientendaten wurden die Felder grau gestreift. Mehrere Zellen einer Patientin wurden mit einem gleichfarbigen Balken gekennzeichnet.

denen Armen des Genexpressionsdendrogrammes nicht gleichmäßig auf die beiden mCGH-Cluster verteilt waren ($p=0,004$, *Fisher's exakt test*).

Tabelle 57: Verteilung der DCC im Genexpressionscluster und mCGH-Cluster: Aufgetragen sind 20 M₀ DCC und sieben M₁ DCC, die sowohl im Genexpressionscluster als auch im mCGH-Cluster analysiert wurden. Der Großteil der M₁ DCC (5/7) befand sich im ersten mCGH-Cluster (Cluster I) und im dritten Genexpressionscluster (Cluster C). Die zwei weiteren M₁ DCC clusterten in beiden Analysen getrennt von den übrigen M₁ DCC.



5. Diskussion

Obwohl die meisten Mammakarzinopatientinnen zum Zeitpunkt der Resektion noch frei von Makrometastasen sind, tritt bei ungefähr 20-50 % dieser M₀ Patientinnen im weiteren Verlauf ein Rezidiv auf (Lu et al., 2009). Das Auffinden von disseminierten Krebszellen (DCC) ist dabei mit einer höheren Metastasierungs-Wahrscheinlichkeit und einem schlechteren Überleben assoziiert (Riethdorf et al., 2008), was darauf hindeutet, dass sich die Vorläuferzellen der entstehenden Metastasen unter diesen Zellen befinden. In dieser Arbeit wurden diese DCC im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Spenderinnen detektiert und charakterisiert.

Es konnte zunächst mit einer Doppelfärbung gegen EpCAM und Zytokeratin (CK) gezeigt werden, dass CK⁺ Zellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen auch EpCAM⁺ sind. Somit konnte der Marker EpCAM zur Detektion von DCC verwendet werden. Allerdings wurden bei alleiniger Verwendung eines Antikörpers gegen EpCAM im Knochenmark von M₀ Patientinnen und gesunden Spenderinnen zu fast gleichen Prozentsätzen positive Zellen detektiert, Unterschiede bestanden in der Färbeintensität und der Anzahl gefundener Zellen. Nach der Isolierung, Aufarbeitung und Amplifikation von cDNA und gDNA wurden die detektierten Zellen eingehender charakterisiert. Die genspezifische PCR zeigte Unterschiede in M₀, M₁ und HD Zellen, jedoch war es nicht möglich EpCAM⁺ Zellen hämatopoetischen Ursprungs mit Hilfe eines Markers oder einer Markerkombination eindeutig zu identifizieren. Deshalb wurden Tumorzellen mit Hilfe von genomischen Aberrationen nachgewiesen und diese als DCC klassifiziert. Die anschließende Charakterisierung der M₀ und M₁ DCC veranschaulichte die Progression der Krankheit anhand einer erhöhten Anzahl an Aberrationen in DCC der M₁ Patientinnen. Auch mit Hilfe der Microarray-Analyse der DCC konnten differentiell exprimierte Gene in M₀ und M₁ DCC gefunden werden.

Nachweis von disseminierten Tumorzellen mit einem Antikörper gegen EpCAM

Zur Detektion von DCC werden häufig Antikörper gegen epitheliale Zytokeratine (CK) verwendet (Schlimok et al., 1987). Da aber in dieser Arbeit auch das Transkriptom der DCC untersucht werden sollte, wurde ein Antikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM, ein Oberflächenprotein, verwendet. Dadurch wird - im Gegensatz zu Antikörpern, die gegen intrazelluläre Proteine gerichtet sind, wie Zytokeratinen - die Detektion von intakten, lebenden, nichtpermeabilisierten Zellen ermöglicht. Dies ist eine Voraussetzung für die Isolation der mRNA und damit der Isolierung und Analyse von Genom und Transkriptom aus der gleichen Zelle. Außerdem wird die Relevanz von EpCAM bei der Detektion von DCC

auch dadurch bestätigt, dass EpCAM in einigen Studien als Marker für tumorinitierende Zellen (Tumorstammzellen) beschrieben wurde (*Visvader und Lindeman, 2008*).

In dieser Arbeit wurde zunächst in einer EpCAM/CK-Doppelfärbung gezeigt, dass in 43 % der untersuchten Mammakarzinom-Proben (n=37) EpCAM⁺/CK⁺ Zellen detektiert werden konnten, weitere 8 % waren EpCAM⁺/CK⁻. Da alle gefundenen CK⁺ Zellen ebenfalls EpCAM⁺ waren, ist davon auszugehen, dass bei der alleinigen Verwendung eines Antikörpers gegen das Antigen EpCAM die relevanten CK⁺ DCC erfasst werden. Die Koexpression von EpCAM und CK wurde bereits in anderen Studien beschrieben (*Braun und Pantel, 1999; Pierga et al., 2005*).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zur Detektion von EpCAM⁺ Zellen 113 Knochenmarkaspirate von M₀ und M₁ Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Spenderinnen untersucht. Bei 56 % der 87 M₀ Patientinnen und bei allen sieben M₁ Patientinnen wurden EpCAM⁺ Zellen detektiert. Dies ist vergleichbar mit den in anderen Arbeiten publizierten Detektionsraten für EpCAM⁺ Zellen. In der Doktorarbeit von Claudia Hartmann konnten bei 88 % aller untersuchten Patientinnen EpCAM⁺ Zellen detektieren werden, wobei nicht zwischen M₀ und M₁ Patientinnen unterschieden wurde (*Hartmann, 2006*). Die Gruppe von Pierga wies EpCAM⁺ Zellen bei 84 % der Patientinnen mit metastasierten Tumoren nach (*Pierga et al., 2005*). Die Beobachtung, dass in dieser Arbeit bei allen sieben untersuchten M₁ Patientinnen EpCAM⁺ Zellen gefunden wurden, beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass es sich dabei um sehr weit fortgeschrittene Karzinome handelt, bei denen meist schon mehrere Fernmetastasen und teilweise Knochenmetastasen aufgetreten sind.

Jedoch können EpCAM⁺ Zellen auch im Knochenmark von gesunden Spendern gefunden werden (*Buhring et al., 1996; Klein et al., 2002b; Lammers et al., 2002; Choesmel et al., 2004*). So konnten Choesmel et al. EpCAM⁺ Zellen mit einer Häufigkeit von $1,36 \times 10^{-6}$ im Knochenmark von gesunden Spendern detektieren. Die Autoren diskutierten, dass wahrscheinlich auch hämatopoetische Zellen des Knochenmarks EpCAM exprimieren können (*Choesmel et al., 2004*), was für immature erythroide Progenitorzellen bereits gezeigt werden konnte (*Lammers et al., 2002*). Wie publiziert, konnten auch in der vorliegenden Arbeit bei 53 % der Knochenmarkaspirate von gesunden Spenderinnen (n=19) EpCAM⁺ Zellen gefunden werden. Diese Detektionsrate unterschied sich nicht von der bei M₀ Patientinnen, jedoch war die Anzahl an EpCAM⁺ Zellen pro 1 Million untersuchter Zellen bei gesunden Spenderinnen signifikant niedriger ($p=0,0497$). Die HD Zellen schienen weniger stark gefärbt zu sein als EpCAM⁺ Zellen von M₀ und M₁ Patientinnen. Bis jetzt existiert keine Möglichkeit diese „falsch positiven“ Zellen allein aufgrund des Färbeergebnisses auszuschließen. Diese Tatsache erschwert die Suche nach EpCAM⁺ DCC und

konnte auch im Knochenmark von Prostatakarzinom Patienten beobachtet werden (Gužvić und Braun, unveröffentlicht). In der Literatur werden EpCAM⁺ oder CK⁺ Zellen allerdings meist ohne weitere molekularbiologische Analysen als DCC klassifiziert. Dies stellt ein Problem auf dem Forschungsgebiet dar, weil ohne weitere Analysen die Identität dieser Zellen unklar ist. In dieser Arbeit wurden daher nur EpCAM⁺ Zellen als DCC bezeichnet und für weitere Analysen verwendet, die eindeutig als Tumorzellen klassifiziert werden konnten. Dies geschah durch den Nachweis genomicscher Veränderungen mit Hilfe der mCGH.

Insgesamt wurden 423 Einzelzellen isoliert und bei 44 % der Einzelzellen war sowohl die Amplifikation des Transkriptoms als auch des Genoms erfolgreich, d.h. diese Zellen waren für die vergleichende Analyse von Transkriptom und Genom geeignet. Weitere 21 % konnten für die alleinige Analyse des Transkriptoms und 14 % für die Analyse des Genoms verwendet werden. Abhängig davon, ob es sich um eine Knochenmark- oder Lymphknotenprobe handelte, war bei 10 bzw. 45 % der isolierten Einzelzellen weder eine Amplifikation des Genoms, noch des Transkriptoms möglich. Die wahrscheinlichsten Gründe hierfür sind, dass die Einzelzelle beim Picken nicht eingesaugt wurde, in der Kapillare verblieb, am Rand des Plastikröhrchens festklebte oder es sich um eine tote Zelle handelte. Die Qualität der Einzelzellen wurde auch hinsichtlich der Aufarbeitungszeit der Knochenmarkproben untersucht. Es konnte ein nicht signifikanter Trend festgestellt werden, dass sich die Qualität des WTA-Produkts ab einer Aufarbeitungszeit von 24 h verschlechterte. Für die weiteren Transkriptomanalysen wurden diese Zellen daher ausgeschlossen, da nur die optimalsten Proben verwendet werden sollten.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde gezeigt, dass die Aufarbeitung und Analyse von Genom und Transkriptom erfolgreich durchgeführt werden konnte und verlässliche Ergebnisse erhalten wurden.

Charakterisierung der EpCAM⁺ Zellen mit Hilfe ausgewählter Transkripte

Im Hinblick auf die nahezu vergleichbaren Detektionsraten für EpCAM⁺ Zellen bei Mammakarzinom-Patientinnen und gesunden Spenderinnen, sollte eine molekulare Analyse der isolierten Zellen eine Abgrenzung zwischen DCC und hämatopoetischen Zellen ermöglichen. Da die EpCAM⁺ Einzelzellen nicht mit weiteren Immunfluoreszenz-Antikörpern untersucht werden konnten, wurde stattdessen die Expression ausgewählter Transkripte mit der genspezifischen PCR überprüft. Mit Hilfe von ausgewählten histogenetisch präferentiell exprimierten und tumor-assoziierten Transkripten sollten einerseits die EpCAM⁺ Zellen von M₀ und M₁ Patientinnen anhand der Expression dieser Gene charakterisiert und andererseits die EpCAM⁺ Zellen aus gesunden Spenderinnen von den EpCAM⁺ DCC aus dem Patientenknochenmark abgegrenzt werden.

Histogenetisch präferentiell exprimierte Transkripte

Zusätzlich zu EpCAM wurden die epithelialen Zytokeratine CK5, CK6a, CK8, CK14, CK18 und CK19 analysiert. CK8 und CK18 treten am häufigsten in einschichtigen epithelialen Zellen auf und werden meist koexprimiert, CK19 tritt häufig in duktalen Epithelien auf. CK5 und CK14 sind die Keratine der basalen Epithelzellen. CK6 wird von hyperproliferativen Epithelzellen exprimiert und wird in der humanen Brustdrüse in drei Isoformen (6a,b,c) exprimiert (Moll et al., 2008). CK8, CK18 und CK19 gelten als Marker für differenzierte Zellen, CK5, CK6a und CK14 sind Basalzellmarker. Im invasiven duktalen Mammakarzinom wurde eine charakteristische Expression von CK8/18, CK19 und CK5 im *basal-like* Subtyp gefunden (Moll et al., 2008; Shao et al., 2012). CK8, CK18 und CK19 werden vom Antikörper A45-B/B3 detektiert, der in der Literatur häufig zur Detektion CK⁺ DCC verwendet wird (Fehm et al., 2006).

Beim Vergleich des Auftretens des EpCAM-Transkriptes bei EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Einzelzellen wurde ein hoch signifikanter Unterschied ($p<0,001$) festgestellt, was die Spezifität des Antikörpers belegt. Der Anteil an EpCAM-Transkript-positiven Zellen stieg bei den 30 M₁ Zellen im Vergleich zu 151 M₀ Zellen leicht an (79 % vs. 87 %). Auch bei HD Zellen konnte das EpCAM-Transkript in 61 % nachgewiesen werden (n=18). Des Weiteren waren CK8, CK18 und CK19 bei den M₁ Zellen signifikant häufiger exprimiert als bei den M₀ Zellen ($p\leq 0,001$). Die im vorigen Absatz beschriebene Koexpression von CK8 und CK18 konnte auch auf Transkriptomebene in einzelnen Zellen beobachtet werden. Interessanterweise konnten neben EpCAM auch Transkripte epithelialer Zytokeratine in den analysierten 18 HD Zellen gefunden werden. Basale Zytokeratine (CK5, CK6a, CK14) wurden in Zellen von gesunden Spenderinnen nicht detektiert, traten aber in ca. 20 % der Patientenzellen auf. Ebenfalls waren HD Zellen signifikant häufiger negativ für EpCAM- und alle getesteten CK-Transkripte ($p=0,007$). Eine eindeutige Unterscheidung zwischen EpCAM⁺ Zellen von Patientinnen und gesunden Spenderinnen war weder mit den epithelialen Markern noch mit der Einteilung in Transkript-Phänotypen eindeutig möglich. Eine Erklärung hierfür könnte die Expression von Zytokeratin-Transkripten in Zellen des Knochenmarks sein, die auch in der vorliegenden Arbeit bei der Analyse von Zellpools und EpCAM⁻ Zellen festgestellt werden konnte. Dies wurde bereits für die Transkripte CK7, CK8, CK18, CK19 und CK20 im Knochenmark von gesunden Spendern gezeigt (Zippelius et al., 1997; Dimmler et al., 2001).

Da die Abgrenzung von hämatopoietischen Zellen von Tumorzellen nicht durch epitheliale Transkripte möglich war, wurde versucht, hämatopoietische Zellen mit Hilfe von CD45, einem Marker von hämatopoietischen Zellen (Leong, 2002), zu identifizieren. Das CD45 Transkript

wurde in 28 % der HD Zellen und in 12 % der M₀ Zellen detektiert, nicht aber in isolierten EpCAM⁺ Einzelzellen aus M₁ Patientinnen. Da nur ein geringer Teil der HD Zellen CD45 exprimierte, konnte auch dieses Transkript nicht zu einer eindeutigen Identifizierung von DCC beitragen.

Unter Einbeziehung der mCGH Ergebnisse wurde die Expression der analysierten Transkripte, getrennt nach aberranten und balancierten Zellen, betrachtet. Der Anteil an CK-Transkript-positiven Zellen war bei den balancierten Zellen sogar höher, wobei CK18 signifikant häufiger von balancierten Zellen exprimiert wurde ($p=0,003$). Außerdem konnte gezeigt werden, dass 12 % der CD45⁺ Zellen genomische Aberrationen zeigen und somit als Tumorzellen betrachtet werden müssen. Dieses überraschende Ergebnis wurde meinem Wissen nach bislang noch nicht für epitheliale DCC im Knochenmark beschrieben. Auch beim Prostatakarzinom konnten EpCAM⁺ DCC detektiert werden, die Transkripte für hämatopoetische Marker zeigen (Gužvić et al., unveröffentlicht). Dies lässt folgern, dass einzelne Marker nicht in der Lage sind die Identität einzelner Zellen eindeutig zu belegen. Durch die Vorgehensweise CD45⁺ Zellen in Blut oder Knochenmark von vorne herein als hämatopoetische Zellen zu werten, wie z.B. beim automatisierten Analysesystem CellSearch® (Veridex, 2013), könnte somit ein Teil der Tumorzellen unerkannt bleiben. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass morphologisch nicht eindeutig zuzuordnende „fragliche“ hämatopoetische Zellen im Knochenmark von frühen Mammakarzinom-Patientinnen mit einem schlechteren Überleben assoziiert sind (Synnestvedt et al., 2013).

Tumor-assoziierte Transkripte

Da eine eindeutige Identifizierung mit histogenetisch präferentiell exprimierten Transkripten von DCC nicht möglich war, wurde versucht, die eventuelle maligne Identität der EpCAM⁺ Zellen mit Hilfe von tumor-assoziierten Transkripten zu bestätigen. Hierfür wurde das Transkript PKM2 ausgewählt. Dabei handelt es sich um die embryonale Pyruvatkinase-Isoform M2, die in den meisten Tumoren reexprimiert wird (Christofk et al., 2008). Mangelnde Sauerstoffversorgung im Tumorgewebe führt unter anderem zur Bildung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor), der zahlreiche Gene aktiviert. Darunter auch Gene, die für an der Tumorprogression beteiligte Proteine kodieren, wie z.B. PKM2 (Luo et al., 2011). Für PKM2 wird eine Rolle bei der Tumorentwicklung diskutiert (David et al., 2010; Yang et al., 2012). Um zu sehen, welche PK-Variante in den EpCAM⁺ Zellen vorliegt, wurde die genspezifische PCR für PKM1 (adulte PK) und PKM2 durchgeführt. Die zugrundeliegende Annahme war, dass es sich bei PKM2 eventuell um einen Marker handeln könnte, der von aberranten Zellen exprimiert wird und der es ermöglicht, diese von hämatopoetischen Zellen zu unterscheiden. Allerdings wurde auch PKM2 nicht signifikant

häufiger von M₀ Zellen (32 %) exprimiert als von HD Zellen (22 %). Auch der Anteil von PKM2 bei M₀ und M₁ Zellen (47 %) war nicht signifikant verschieden. Eine mögliche Ursache für die Expression von PKM2 in HD Zellen könnte die äußerst niedrige Sauerstoffversorgung der Zellen im Knochenmark sein (*Jing et al., 2012*), wodurch auch hämatopoetische Zellen PKM2 reexprimieren könnten. Der mittlere Sauerstoff-Partialdruck liegt im Knochenmark von gesunden Spendern zwischen 48 und 55 mm Hg, die mittlere Sauerstoffsättigung beträgt 88 % (*Skouby, 1976; Harrison et al., 2002*). Im Vergleich dazu wurde in peripherem Blut eine Sauerstoffsättigung von 99 % gemessen (*Harrison et al., 2002*). Somit würde PKM2 gerade im Knochenmark aufgrund des niedrigen Sauerstoff-Partialdrucks keinen geeigneten Tumormarker darstellen.

Des Weiteren wurde die Expression von HER2wt und HER2Δ16 untersucht. Bei HER2Δ16 handelt es sich um eine Spleißvariante von HER2wt, deren Expression an der Zellinvasion und an der Resistenz gegenüber Trastuzumab beteiligt sein soll (*Castiglioni et al., 2006; Mitra et al., 2009; Cittelly et al., 2010*). Diese Spleißvariante konnte in 9 % der HER2-positiven Mammakarzinome (n=46) nachgewiesen werden (*Castiglioni et al., 2006*). Es stellte sich daher die Frage, ob auch auf den EpCAM⁺ Einzelzellen diese Spleißvariante detektiert werden kann und, ob ein Zusammenhang mit dem HER2-Status des Primärtumors besteht. In dieser Arbeit war der Anteil der HERΔ16 Isoform sowohl bei M₀ als auch bei M₁ Zellen geringfügig höher als der Anteil von HER2wt. Bei M₁ Zellen konnten HER2wt und HER2Δwt signifikant häufiger als bei M₀ Zellen detektiert werden ($p \leq 0,001$). Interessanterweise konnte in Zellen mit HER2wt Transkript in den meisten Fällen auch die Isoform HER2Δ16 gefunden werden, was auch in der Literatur beschrieben wurde (*Mitra et al., 2009*). In HD Zellen (n=18) konnte in keinem Fall eines der beiden Transkripte detektiert werden, was die Wahl dieses tumor-assoziierten Transkriptes bestätigt. Jedoch wurden in den Patientenzellen in höchstens 23 % Transkript-positive Zellen gefunden, was die eindeutige Klassifizierung nur für einen Teil der Zellen ermöglicht. Beim Vergleich der Ergebnisse beider Isoformen mit dem HER2-Status des Primärtumors wurde keine Korrelation festgestellt. Der HER2-Status des Primärtumors war bei allen Zellen (n=15), bei denen HER2wt oder HER2Δ16 detektiert werden konnte, negativ. Umgekehrt wurde bei HER2⁺ Primärtumoren keines der beiden Transkripte auf den EpCAM⁺ Zellen detektiert (n=11). Dieser Unterschied zwischen Primärtumor und DCC im Hinblick auf den HER2-Status konnte erst kürzlich bei einer Studie mit 151 Patientinnen mit disseminierten Krebszellen gezeigt werden (*Hartkopf et al., 2013*). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind daher ein weiterer Hinweis darauf, dass bei der Therapieentscheidung basierend auf den Eigenschaften des Primärtumors möglicherweise wichtige therapeutische Zielstrukturen übersehen werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe des spezifischen Transkriptnachweises keine Unterscheidung zwischen Tumorzellen und hämatopoetischen EpCAM⁺ Zellen möglich war. Das lag mitunter auch an der Heterogenität bezüglich der Transkriptexpression der untersuchten Einzelzellen.

Korrelation der EpCAM-Färbeergebnisse mit den Patientendaten

Die verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms waren in dem Patientenkollektiv dieser Studie ungefähr mit der beschriebenen Häufigkeit vertreten (Tabelle 3, Tabelle 43). Es ist daher anzunehmen, dass die für diese Arbeit verwendeten Patientenproben ein repräsentatives Kollektiv darstellen.

Nachweis von EpCAM⁺ Zellen bei DCIS Patientinnen

Die Einteilung der Patientinnen in die vier Mammakarzinom Subtypen (Tabelle 3) und die nicht-invasive Form DCIS zeigte, dass die Patientinnen mit DCIS und *Triple* negativen Tumoren am jüngsten waren. Diese Beobachtung konnten auch Kennecke et al. feststellen (Kennecke et al., 2010). Die EpCAM Positivität unterschied sich ebenfalls innerhalb der Subtypen des untersuchten Kollektivs. Erstaunlich war dabei, dass bei drei der vier DCIS Patientinnen EpCAM⁺ Zellen gefunden werden konnten, wobei bei zwei dieser Patientinnen durch die Analyse des Genoms jeweils eine Zelle als aberrante Krebszelle bestätigt werden konnte. Laut Definition handelt es sich bei DCIS um eine nicht invasive Form, bei der noch kein Durchbruch der Basalmembran stattgefunden hat. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Streuung von Tumorzellen ein sehr frühes Ereignis im Verlauf der Tumorprogression darstellt und diese bereits beim Stadium des DCIS stattgefunden hat (Husemann et al., 2008). In anderen Arbeiten wurden CK⁺ Zellen bei 13-21 % der Knochenmarkproben von DCIS-Patientinnen gefunden, abhängig von den verwendeten Antikörpern (Sanger et al., 2011; Banys et al., 2012). Die genannten Zahlen sind nicht direkt mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar, da Antikörper gegen Zytokeratine verwendet wurden. Es wird jedoch deutlich, dass EpCAM⁺ oder CK⁺ Zellen ebenfalls in DCIS-Patientinnen detektiert werden können. In einer weiteren Untersuchung konnten bei DCIS-Patientinnen, denen der Primärtumor bereits entfernt wurde, Metastasen festgestellt werden (Silverstein et al., 1998; Solin et al., 2001). Es liegt nahe, dass die Streuung in diesen Fällen bereits sehr früh in der Entwicklung des Tumors stattgefunden hat. Diese Ergebnisse unterstützen das Modell der parallelen Tumorprogression (Abbildung 1).

Nachweis von EpCAM⁺ Zellen im Verlauf der Erkrankung

In dieser Arbeit konnte außerdem festgestellt werden, dass die Anzahl an EpCAM⁺ und CK⁺ Zellen ein Jahr nach der Primäroperation mit Entfernung des Tumors bei allen acht Patientinnen entweder abgenommen hat oder gleichgeblieben ist. Wurden die Patientinnen jedoch neoadjuvant behandelt und die erste Knochenmarkpunktion vor und die zweite Knochenmarkpunktion nach der neoadjuvanten Therapie während der Entfernung des Primärtumors vorgenommen, stieg die Anzahl an gefundenen EpCAM⁺/CK⁺ Zellen bei sechs von neun Patientinnen. Der Abstand zwischen beiden Punktionen betrug ca. sechs Monate, der Primärtumor verblieb in dieser Zeit im Körper der Patientinnen. Eine mögliche Vermutung wäre, dass die aggressiveren *Triple* negativen Tumore, die nur in der zweiten Patientengruppe zu finden waren, mehr Zellen ins Knochenmark streuen. Dies ist jedoch nicht plausibel, da die Detektionsrate EpCAM⁺ Zellen im unbehandelten Knochenmark bei *Triple* negativen Tumoren (46 %) im Vergleich zu den anderen Subtypen am niedrigsten war. Deshalb besteht die Vermutung, dass während der neoadjuvanten Therapie weiterhin EpCAM⁺ und/oder CK⁺ Zellen vom Primärtumor gestreut werden. Möglicherweise findet durch die neoadjuvante Behandlung eine Selektion auf disseminierende Zellen statt. Die Zunahme von CK⁺ Zellen nach der Therapie konnte auch von anderen beobachtet werden. Mathiesen verglich den Prozentsatz an CK⁺ Zellen in 236 Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen Mammakarzinomen vor Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie, zum Zeitpunkt der Mastektomie und zwölf Monate nach Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie (Mathiesen et al., 2012). Der Prozentsatz an CK⁺ Zellen sank dabei von 21 % zu Beginn der Studie auf 16 % nach der neoadjuvanten Therapie. Nach zwölf Monaten war der Wert jedoch wieder auf 27 % gestiegen. Auch in dieser Studie war ein Unterschied zwischen Hormonrezeptor-positiven und –negativen Patientinnen festzustellen. So stieg der Anteil an CK⁺ Patientinnen mit Estrogenrezeptor-positiven (ER⁺) Primärtumoren von 24 % vor der neoadjuvanten Therapie auf 27 % zwölf Monate später. Bei ER⁻ Patientinnen stiegen die Detektionsraten bei gleichen Punktionszeitpunkten von 17 auf 28 % (Mathiesen et al., 2012). Es muss daher in Betracht gezogen werden, dass Unterschiede in den Subgruppen hinsichtlich des Therapieansprechens der gewählten neoadjuvanten Therapie bestehen. In der Studie von Mathiesen hatten Patientinnen, bei denen mindestens eine CK⁺ DCC zu einem der Zeitpunkte detektiert wurde, eine schlechtere Prognose. Wurden zum ersten Zeitpunkt CK⁺ Zellen detektiert, zum zweiten Zeitpunkt dagegen nicht, deutete dies auf eine gute Prognose für die Patientin hin, wohingegen eine alleinige Detektion zum Zeitpunkt nach der OP mit einem schlechten Überleben assoziiert war. Dies würde bedeuten, dass mit einer erneuten Punktion der Einfluss der erfolgten Therapie überwacht und möglicherweise therapieresistente DCC detektiert werden können (Janni et al., 2011). Durch die dadurch gewonnene Information könnte die Therapie angepasst oder während der Nachsorge eine

sekundäre Therapie verabreicht werden. Eine weitere Studie konnte feststellen, dass nach adjuvanter Therapie zwar bei 29 % der M₀ Mammakarzinom-Patientinnen CK⁺ Zellen detektiert werden können, diese aber nur selten EpCAM koexprimieren (*Thurm et al., 2003*). Die Knochenmarkproben in der Studie von Thurm et al. wurden drei Monate nach Abschluss der adjuvanten Chemotherapie entnommen und dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass die gewählte Chemotherapie die EpCAM⁺ Zellen eliminieren konnte. Es lässt sich folgern, dass zwar mehrere Studien eine Bedeutung der CK⁺ Zellen nach Abschluss der Therapie zeigen konnten, aber noch weitere prospektive Studien nötig sind, um diesen Zusammenhang und vor allem die Relevanz der DCC bei der Therapieüberwachung zu bestätigen.

Nachweis von EpCAM⁺ DCC im Lymphknoten

Neben den Knochenmarkproben standen insgesamt zehn Lymphknoten zur Verfügung. Durch die geringe Anzahl und einer EpCAM-Detektionsrate von 20 % war keine detaillierte Analyse dieser Zellen möglich. Zudem gibt es (laut aktuellem Wissensstand) keine vergleichbare Untersuchung mit EpCAM-Antikörpern in Lymphknoten. Die geringe Fallzahl der Lymphknoten war zum einen auf die genannten Fehler bei der Aufbewahrung der Lymphknoten zurückzuführen als auch auf die Änderung der Leitlinien. In der Aktualisierung der S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms von 2012 änderten sich die Empfehlungen zur Axilladissektion (*Leitlinienprogramm Onkologie, 2012*). Aus diesem Grund konnten keine weiteren Lymphknoten-Proben zur Verfügung gestellt werden, da der Sentinel-Lymphknoten vollständig für die Routinediagnostik verwendet wurde. Es wird daher auch für weitere Analysen schwierig sein, zusätzliche Proben zu bekommen. Trotzdem war es möglich ein mCGH Profil einer EpCAM⁺ DCC zu erstellen. Dieses zeigte die typischen Mammakarzinom-Veränderungen wie Amplifikationen auf 1q, 8q, 16p und 20 sowie eine Deletion auf 17p. Zusätzlich konnten Verluste auf 3p, 4q, 6q, 22q und Gewinne auf 4q und 19q detektiert werden. Auch wenn die Ergebnisse dieser einzelnen Zelle nicht aussagekräftig sind, zeigt sich doch anhand der zahlreichen Aberrationen der fortgeschrittene maligne Genotyp dieser Zelle.

Genomanalyse der EpCAM⁺ Zellen

In nächsten Schritt wurden die chromosomal Veränderungen zur Charakterisierung der EpCAM⁺ Zellen analysiert. Mit Hilfe der mCGH können Aberrationen des gesamten Genoms mit einer Auflösung von 10-20 Mb nachgewiesen werden (*Bentz et al., 1998; Jeuken et al., 2002*). Durch die begrenzte Auflösung der mCGH können Aberrationen unter dieser Grenze sowie Veränderungen, die keine Änderung der Chromosomenzahl mit sich führen, wie z.B. Translokationen, Inversionen oder Punktmutationen, mit diesem Verfahren nicht detektiert

werden. Dennoch wurden auch bei balancierten Zellen bereits Allelverluste und genomische Gewinne nachgewiesen (Schardt et al., 2005; Fuhrmann, 2007).

Identifizierung von EpCAM⁺ DCC

Insgesamt konnte von 58 EpCAM⁺ Zellen ein mCGH Profil erstellt werden und damit aberrante Zellen eindeutig als Tumorzellen klassifiziert werden. Alle sieben M₁ Zellen waren aberrant, bei den M₀ Zellen waren 43 % balanciert und 57 % aberrant. Diese Werte sind vergleichbar mit den Ergebnissen der CK⁺ Zellen, von denen 43 % der M₀ Zellen und 91 % der M₁ Zellen Aberrationen zeigten (Schmidt-Kittler et al., 2003). Bei den balancierten Zellen könnte es sich um seltene hämatopoetische Zellen handeln, die EpCAM exprimieren (Choesmel et al., 2004) und auch bei gesunden Spendern gefunden werden. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass es sich bei den mCGH balancierten Zellen um Tumorzellen handelt.

Für die Auswertung wurden 395 verschiedene Chromosomen-Loci mit dem *Fisher's exakt test* verglichen. Die *p*-Werte wurden auf multiples Testen korrigiert (Benjamini Y., 1995) und eine *false-discovery-rate* (FDR) <10 % verwendet. Das bedeutet, dass 10 % Falschpositive bei der Auswertung erwartet werden, was aber durch die zusätzliche manuelle Überprüfung der Aberrationen kontrolliert wurde.

Sowohl bei den EpCAM⁺ als auch bei den CK⁺ Zellen unterschied sich die Anzahl an Aberrationen zwischen den M₀ und den M₁ DCC signifikant. Tumorzellen von M₀ Patientinnen wiesen (teilweise) andere und wesentlich weniger Aberrationen auf, als Zellen von M₁ Patientinnen. Dies deutet auf eine Zunahme der genomischen und chromosomal Instabilität der Tumorzellen während der ektopen Tumorprogression hin. Die Identifizierung aberranter (v.a. deletierter) Regionen in M₀ Patientinnen ermöglicht die Suche nach potenziellen Kandidatengenen, die an der frühen Tumorprogression des Mammakarzinoms beteiligt sind.

Vergleich der Genomprofile von EpCAM⁺ und CK⁺ DCC

Mehrere Studien an insgesamt 546 Primärtumoren (Kallioniemi et al., 1994; Nishizaki et al., 1997; HermSEN et al., 1998; Tirkkonen et al., 1998; Buerger et al., 1999; Roylance et al., 1999; Buerger et al., 2001) konnten neun charakteristische Aberrationen beim invasiven Mammakarzinom detektieren (Tabelle 58). Auch bei den disseminierten EpCAM⁺ und CK⁺ Krebszellen konnten diese chromosomal Aberrationen sowohl bei den M₀ als auch bei den M₁ Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 58).

Tabelle 58: Vergleich der genomischen Aberrationen von Primärtumor und DCC: angegeben ist der Anteil [%] der Zellen, bei dem die jeweilige Aberration nachweisbar war; EpCAM M₀: n=25, EpCAM M₁: n=10, CK M₀: n=42, CK M₁: n=58

	Amplifikationen					Deletionen			
	1q	8q	16p	17q	20	8p	13q	16q	17p
Primärtumor	57-83	30-90	38-40	18-67	18-39	26-52	25-45	26-71	22-61
EpCAM⁺ DCC M₀	12	0	15	10	25	0	5	10	25
EpCAM⁺ DCC M₁	62	37	20	40	55	25	50	25	37
CK⁺ DCC M₀	37	5	10	20	5	15	12	15	15
CK⁺ DCC M₁	62	70	45	45	45	35	45	37	35

Bei den EpCAM⁺ M₀ DCC konnte bei 25 % der Verlust von 17p detektiert werden, welcher neben dem Verlust von 16q (10 %) eine frühe Aberration darstellt, die bereits in nicht invasiven Formen des Mammakarzinoms nachgewiesen werden kann (Gong *et al.*, 2001). Außerdem konnten drei Bereiche bei EpCAM⁺ M₁ DCC auf 1p (Deletion), 7p (Amplifikation) und 11q (Deletion) detektiert werden, die weder in der genannten Auflistung an bekannten häufigen Aberrationen auftreten, noch in den CK⁺ Zellen mit dieser Häufigkeit gefunden wurden. Die Bereiche auf den Chromosomen 1 und 11 unterschieden sich dabei signifikant von den CK⁺ M₁ Zellen (*adjp*=0,065). Die Bande 1p13 ist häufig an chromosomalen Umgruppierungen beim Mammakarzinom beteiligt (Mitchell und Santibanez-Koref, 1990). Eine Gruppe von Genen in diesem Bereich (GSTM1-5) könnte einen Einfluss auf die Prädisposition zum Mammakarzinom haben, wenn GSTM3 in dieser Gruppe fehlt (Yu *et al.*, 2010). Auch für 11q24q25 konnte gezeigt werden, dass in dieser Region häufig allelische Verluste beim frühen Mammakarzinom auftreten und dies mit einem schlechteren Überleben einhergeht (Gentile *et al.*, 1999; Gentile *et al.*, 2001). In dieser Region wurden bereits sechs Tumorsuppressor-Kandidatengene untersucht und es konnte für drei (LOH11CR2A, PIG8, CHEK1) eine Assoziation mit Mammakarzinomen sowie eine signifikante klinische als auch prognostische Aussagekraft beschrieben werden (Sinha *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit gelang es nicht, ein mCGH Profil von EpCAM⁺ Zellen aus gesunden Spenderinnen zu generieren. Einerseits lag das an der vergleichsweise geringen Zahl an EpCAM⁺ HD Knochenmarkproben von denen insgesamt 31 Zellen isoliert werden konnten, wovon jedoch nur 15 Zellen eine gute Qualität des WTA- sowie WGA-Produktes aufwiesen. Andererseits konnten diese Zellen nicht erfolgreich in der mCGH hybridisiert werden. Insgesamt war die mCGH bei 47 % der untersuchten Zellen nicht erfolgreich, da die Hybridisierung zu schwach war. Trotz Wiederholung konnte in vielen Fällen kein auswertbares Ergebnis generiert werden. Die Gründe hierfür sind unklar. Dennoch ist davon auszugehen, dass es sich bei einem Großteil der EpCAM⁺ HD Zellen wahrscheinlich um balancierte Zellen handelt. Da dies jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, wurden diese Zellen nicht für die Genexpressionsanalyse verwendet.

Analyse der Genexpression der EpCAM⁺ DCC

Für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien zur Prävention von Metastasen ist es von großer Bedeutung, differentiell exprimierte Gene und Signalwege in den Vorläuferzellen der Metastasen zu identifizieren. Aus diesem Grund wurde die Genexpression EpCAM⁺ DCC mit *Microarrays* untersucht. Die Ergebnisse der *Microarrays* wurden durch ausgewählte genspezifische PCR validiert. Der Vergleich von EpCAM⁺ DCC mit und ohne CK-Transkripte zeigte keine differentiell exprimierten Gene, was neben der durchgeföhrten Doppelfärbung ein weiterer Hinweis darauf sein könnte, dass Antikörper gegen EpCAM und CK beim Mammakarzinom im Grunde weitgehend überlappende Zellpopulationen identifizieren. Im Gegensatz dazu konnte eine Reihe signifikant unterschiedlich exprimierter Gene zwischen DCC von Patientinnen im Stadium M₀ und M₁ der Erkrankung gefunden werden (Abbildung 42).

Ein Beispiel für ein in den M₀ DCC hochreguliertes Gen ist Hämoglobin β (*HBB*), welches zusammen mit Hämoglobin α (*HBA*) für die Bildung der zwei Polypeptidketten des Hämoglobins A (HbA), der häufigsten Form des adulten Hämoglobins, verantwortlich ist. Hämoglobin spielt eine wichtige Rolle beim Sauerstofftransport von der Lunge zum peripheren Gewebe. Die Expression von Hämoglobin in der Mehrheit der Mammakarzinome konnte bereits nachgewiesen werden (Gorr *et al.*, 2011). Bei dem Vergleich von Mammakarzinom-Knochenmetastasen von Patientinnen mit und ohne zusätzliche viszerale Metastasen konnte Capulli eine Gensignatur generieren. Dabei war *HBB* in der Gruppe der Patientinnen mit Knochenmetastasen, die zusätzlich viszerale Metastasen haben, hochreguliert. Außerdem konnte eine hohe *HBB* Expression in Mammakarzinom-Primärtumoren festgestellt werden, jedoch nicht im normalen Mammagewebe. Eine hohe *HBB* Expression ging mit der Fähigkeit von Knochenmetastasen einher, weiter in andere Organe zu streuen (Capulli *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde zwar eine niedrige *HBB* Expression in M₁ DCC, jedoch eine hohe *HBB* Expression in M₀ DCC nachgewiesen. Dies widerspricht sich nicht zwingend, da in der Studie von Capulli RNA aus soliden Knochenmetastasen gewonnen wurde, wobei aber nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass auch andere Zellen untersucht wurden und *HBB* durch hämatopoetische Zellen in die Knochenmetastase gelangen konnte. Wogegen in dieser Arbeit einzelne DCC analysiert wurden und daher die sichere Aussage getroffen werden konnte, dass *HBB* in 26 von 29 M₀ DCC relativ zu M₁ DCC überexprimiert wurde. Es besteht daher die Möglichkeit, dass es sich bei *HBB* nicht nur um einen Biomarker mit Prognoseeffekt handelt, sondern dass auch ein funktioneller Zusammenhang zwischen der *HBB* Expression und der Tumorprogression vorliegt. In insgesamt sechs (30 %) der DCC, die *HBB* überexprimierten, konnte das PKM2 Transkript detektiert werden, wobei es sich nur um M₀ Zellen handelte. Interessanterweise wurde

festgestellt, dass *HBB* durch überexprimierte PKM2 reguliert werden kann (*Gao et al., 2012*).

In den M₁ DCC war *S100A11* (Calgizzarin) signifikant überexprimiert. Es gehört zur Gruppe der Calcium bindenden S-100-Proteine, welche an verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. dem Zellzyklus und der Differenzierung beteiligt sind. Auch bei der Progression des Mammakarzinoms spielen S-100-Proteine eine Rolle. So wurde gezeigt, dass die Expression von *S100A11* mit einer schlechteren Prognose bei Mammakarzinom-Patientinnen assoziiert ist (*McKiernan et al., 2011*). Für *S100A11* wurde bereits eine Funktion als prognostischer metastatischer Marker in verschiedenen Karzinomen nachgewiesen (*Yao et al., 2007; Meding et al., 2012; Xiao et al., 2012*). Auch soll dieses Protein eine wichtige Voraussetzung für die Migration und Invasion der Tumorzellen sein und möglicherweise eine Rolle bei der epithelialen-mesenchymalen-Transition (EMT) durch die Förderung der Aktindynamik der Pseudopodien spielen (*Shankar et al., 2010*). Durch einen Knockdown von S100A11 konnte gezeigt werden, dass sich Pseudopodien zurückbildeten, die Migration und Invasion der Zellen gehemmt wurde und es zu einer Umkehrung der EMT kam (*Shankar et al., 2010*).

Des Weiteren war *RANKL* (Receptor Activator of NF-κB Ligand) in M₁ Zellen signifikant höher exprimiert. Es gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) und spielt eine wichtige Rolle bei der Osteoklasten-Differenzierung und -Aktivierung im Knochen. Im gesunden Zustand befinden sich der Knochenaufbau durch Osteoblasten und der Knochenabbau durch Osteoklasten im Gleichgewicht. Parathormon (PTH) führt zur Ausschüttung von RANKL in Osteoblasten, welches wiederum an den RANK-Rezeptor von Osteoklasten-Vorstufen bindet und zur Bildung von aktivierte Osteoklasten führt. Durch eine vermehrte RANKL-Konzentration wird das Gleichgewicht zu den Osteoklasten und damit zu einem vermehrten Knochenabbau verschoben. Tumorzellen nutzen diesen Mechanismus und induzieren über PTHrP (*Parathormon-related protein*) eine Sezernierung von RANKL (*Chappard et al., 2011*). Diese RANKL-induzierte Knochenzerstörung wird als Voraussetzung von nahezu allen Arten von krebsinduzierter Knochenzerstörung, insbesondere osteolytischer Metastasen, gesehen (*Azim et al., 2012*).

Ein weiterer wichtiger Befund war die Tatsache, dass der Großteil der Zellen mit hoher Ähnlichkeit in den genomischen Veränderungen (d.h. die Zellen eines Astes im mCGH-Dendrogramm) auch bei der Clusteranalyse der Genexpression ein ähnliches Transkriptomprofil zeigt. Dies ist ein erster Hinweis, dass sich bestimmte Genomveränderungen einzelner DCC von Mammakarzinom-Patientinnen auch im zugehörigen Profil der Genexpression widerspiegeln können.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass sich die beiden untersuchten Zellen der M₁ Patientin MC-1122 sowohl in den *Microarray*- als auch in den mCGH-Analysen, außerhalb des definierten M₁-Clusters befanden. Daraus lässt sich schließen, dass sich sowohl Genom als auch Transkriptom dieser Zellen von den anderen M₁ Zellen unterschieden. Interessanterweise wurden bei dieser Patientin zum Zeitpunkt der Punktions (zehn Jahre nach der Erstdiagnose) lediglich Leber-, Lymphknoten-, Haut- und Weichteilmetastasen festgestellt, es lagen jedoch keine Knochenmetastasen vor. Im Gegensatz dazu, war bei allen übrigen untersuchten M₁ Patientinnen der Knochen bei der Metastasierung beteiligt und die Zellen dieser Patientinnen fanden sich bei *Microarray*- und Genomanalysen im M₁-Cluster wieder. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Erkrankung dieser Patientinnen bereits weiter fortgeschritten ist, während sich die anderen Zellen noch in einem früheren Stadium befinden. Ebenfalls wäre denkbar, dass es sich bei den M₀ DCC im M₁-Cluster um direkte Vorläuferzellen von Knochenmetastasen handelt, während die M₁ Zellen, die sich außerhalb des M₁-Clusters befinden, gegebenenfalls als Vorläuferzellen für Metastasen in anderen Organen dienen könnten. Diese Hypothese würde auch durch die Zellen der Patientin MC-1122 unterstützt, wobei eine abschließende Bewertung zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich ist.

Zusammenfassend zeigte sich, dass in den M₀ Zellen erythroide Marker (*HBB*, *HBD*: Hämoglobin delta, *ERAF/AHSP*: *alpha hemoglobin stabilizing protein*), während in M₁ Zellen Differenzierungsmarker und Proliferationsmarker (*S100A11*: Calgizzarin, *RANKL*, *AREG*: Amphiregulin) hochreguliert waren.

Tumorzellplastizität und Tumorzellheterogenität

Die durchgeführten Untersuchungen des Transkriptoms der EpCAM⁺ Zellen anhand spezifischer Transkripte ermöglichen keine eindeutige Identifizierung von Tumorzellen. Erst durch die Genomanalyse konnten EpCAM⁺ Einzelzellen sicher als DCC identifiziert werden. In den mCGH Analysen wurden viele charakteristische Aberrationen des Mammakarzinoms in einzelnen DCC gefunden (Tabelle 58), wodurch der epitheliale Ursprung dieser Zellen gezeigt werden konnte. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass einige dieser aberranten DCC epithelialer Herkunft aus dem Knochenmark, zusätzlich zu den zu erwartenden Transkripten (wie EpCAM oder Zytokeratine), das hämatopoetische Transkript CD45 exprimierten. Auch die *Microarray*-Analyse zeigte, dass *HBB* und weitere erythroide Marker von vielen M₀ Zellen exprimiert wurden. Die Tatsache, dass ein Genom abhängig von der Umgebung unterschiedliche Phänotypen hervorbringen kann, wird als phänotypische Plastizität bezeichnet (Tang, 2012; Marjanovic et al., 2013). Der in dieser Arbeit erfolgte Nachweis von erythroiden Markern in epithelialen Tumorzellen könnte eine unerwartete

Ausprägung von phänotypischer Plastizität darstellen. Folgt man dieser Hypothese, stellt sich die Frage, ob die gestreuten Tumorzellen durch die Expression hämatopoetischer Transkripte ihren Phänotyp adaptieren, um auf diesem Wege ein Überleben im Mikromilieu des Knochenmarks erst zu ermöglichen. Es wäre möglich, dass sich diese M₀ DCC im Knochenmark primär nicht durch den selektiven Druck onkogener Veränderungen weiterentwickeln und sich vielmehr in einer Art Ruhezustand (*tumor dormancy*) befinden, der mehrere Jahre fort dauern kann. Es wäre weiter denkbar, dass sich die Tumorzellen in dieser Zeit des Wartens den Bedingungen im Knochenmark anpassen und so auch erythroide Marker exprimieren, bevor sie zu einem späteren Zeitpunkt in einen Zustand der Proliferation wechseln. Die Detektion von Differenzierungsmarker und Proliferationsmarker in M₁ Zellen, lässt den Schluss zu, dass diese Zellen diesen Zustand bereits erreicht haben und wieder die Eigenschaften der ursprünglichen Mammakarzinomzellen besitzen.

Neben dieser phänotypischen Plastizität der DCC, konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch auch eine große Heterogenität der EpCAM⁺ Zellen untereinander gezeigt werden. Sowohl in Bezug auf die Expression ausgewählter Transkripte als auch den detektierten chromosomal Veränderungen unterschieden sich sogar verschiedene EpCAM⁺ DCC derselben Patientin. So besaßen aberrante Zellen mehrerer Patientinnen unterschiedliche mCGH-Veränderungen (z.B. MC-1119, MC-1088, MC-1058). Außerdem konnten bei acht Patientinnen sowohl aberrante als auch balancierte Zellen gefunden werden (zwei Patientinnen mit DCIS und sechs mit invasivem Karzinom). Die weitere Untersuchung der balancierten Zellen dieser Patientinnen mit hochauflösenden Methoden könnte eventuell einen Hinweis auf frühe Veränderungen der DCC liefern (*Schardt et al., 2005*).

Die Heterogenität in Genom und Transkriptom beschränkt auch die Aussagekraft zahlreicher Untersuchungen anderer Forschungsgruppen. So wurden bei einer Untersuchung von 14 cDNA Microarray-Datensets aus Primärtumor und Metastase des gleichen Patienten keine zwei Tumoren mit ähnlichen Gensignaturen gefunden (*Loberg et al., 2007*). Nicht nur die Tumoren verschiedener Individuen unterscheiden sich, es besteht auch eine Heterogenität der Tumorzellen innerhalb eines Tumors (*Gerlinger et al., 2012; Ogino et al., 2012*). Diese Heterogenität wird auch beim Vergleich verschiedener Genexpressions-Signaturen sichtbar, die die Klassifizierung des Mammakarzinoms verbessern und therapeutische und prognostische Rückschlüsse ermöglichen sollen (*Sotiriou und Pusztai, 2009*). So konnte in fünf aus dem gleichen Mammakarzinom generierten Zelllinien beobachtet werden, dass diese sich in ihren Expressionsprofilen, ihrer Tumorigenität und den organspezifischen metastatischen Eigenschaften unterschieden (*Mosoyan et al., 2013*). Die Studie zeigt, dass einzelne Zelllinien, wie sie oft in der Entwicklung für neue Arzneimittel verwendet werden, nicht den gesamten Tumor und dessen Heterogenität repräsentieren können. Dies wird

natürlich umso deutlicher, wenn einzelne Zellen statt Mittelwerte aus größeren Populationen untersucht werden.

Am Ende stellt sich die Frage, worauf die Heterogenität bei den DCC basiert. Einerseits wäre es möglich, dass sich DCC zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Tumorprogression vom Primärtumor lösen und damit ein Abbild des Primärtumors zum Zeitpunkt der Streuung bilden. Andererseits könnte es aber auch sein, dass die Tumorzellen, die disseminieren können, ursprünglich sehr homogen sind, die weitere Entwicklung dann allerdings abhängig vom Mikromilieu des Knochenmarks fortschreitet. Die weitere Analyse des molekularen Profils dieser einzelnen gestreuten Tumorzellen und den der Adaptation und Selektion zugrunde liegenden Mechanismen kann in Zukunft einen wichtigen Beitrag zum Verständnis und zur Therapie der generalisierten Brustkrebskrankung liefern.

6. Zusammenfassung

Trotz der Resektion des Primärtumors verbleiben disseminierte Tumorzellen (DCC) im Körper der Mammakarzinom-Patientinnen und es können sich auch noch nach mehreren Jahren Metastasen entwickeln, an denen der Großteil der Patientinnen verstirbt. Zum Zeitpunkt der Primäroperation müssen daher die DCC als Vorläuferzellen der Metastasen gelten und stellen somit die Zielzellen adjuvanter Therapien dar. Der Erfolg einer adjuvanten Therapie entscheidet sich also daran, inwieweit DCC eradiziert werden können oder resistent sind. Dennoch werden sowohl Therapieentscheidungen aufgrund von Primärtumor-Analysen getroffen wie auch die Entwicklung neuer Therapien und die Identifizierung von Zielstrukturen weitgehend auf Analysen der Primärtumoren oder daraus generierter Zelllinien beruht. Dieses Vorgehen steht in einer gewissen Spannung zu dem klaren Befund der prognostischen Relevanz der DCC, die in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden konnte.

Ziel dieser Arbeit war die sichere Identifizierung und molekulare Charakterisierung von DCC, um eine Voraussetzung für die Entwicklung zielgerichteter systemischer, insbesondere adjuvanter, Therapien zu schaffen. In einem ersten Schritt wurde durch eine Doppelfärbung gegen CK und EpCAM, den am häufigsten zur Detektion von DCC verwendeten Antigenen, eine Koexpression der beiden Proteine in der Mehrheit der Marker-positiven Patientinnen nachgewiesen. Dieser Befund ermöglichte unter der alleinigen Verwendung eines EpCAM-Antikörpers vitale EpCAM⁺ Zellen aus dem Knochenmark von M₀ und M₁ Patientinnen zu isolieren, die auch für Genexpressionsstudien verwendet werden konnten. In Kontrollexperimenten zeigte sich, dass EpCAM⁺ Zellen auch in gesunden Spenderinnen detektiert werden können. Die Anwesenheit von EpCAM⁺ Zellen im gesunden Knochenmark erschwert maßgeblich die Detektion von „echten Tumorzellen“. Es wurde zunächst versucht durch histogenetisch präferentiell exprimierte Marker (wie verschiedene Zytokeratin Transkripte und CD45) DCC von autochthonen Knochenmarkzellen zu unterscheiden. Ebenso wurden tumor-assoziierte Transkripte getestet, wobei HER2wt und eine Spleißvariante des HER2 Gens tumorspezifisch waren. Da diese Transkripte lediglich in bis zu 23 % der DCC gefunden wurden, blieb der einfache Klassifizierungsversuch mit Hilfe der Expression ausgewählter Transkripte bei vielen Zellen erfolglos.

Deshalb wurde versucht über den Nachweis von chromosomal Veränderungen mit Hilfe der mCGH die maligne Identität der Zellen zweifelsfrei festzustellen. Bei allen genomisch untersuchten EpCAM⁺ M₁ Zellen und der Mehrheit der EpCAM⁺ M₀ Zellen handelte es sich um disseminierte Tumorzellen mit aberrantem Genom. Dabei unterschied sich die Anzahl der Aberrationen von M₀ und M₁ Zellen signifikant und es konnten charakteristische chromosomale Alterationen in M₁ Zellen detektiert werden. Gegenwärtig bleibt unklar, ob sich auch

unter den EpCAM⁺ Zellen mit balanciertem Profil weitere Tumorzellen befinden, die genetische Veränderungen unterhalb der Auflösungsgrenze der mCGH besitzen.

Mit Hilfe einer umfassenden Genexpressionsanalyse konnte weiterhin gezeigt werden, dass EpCAM⁺ M₀ und M₁ DCC anhand ihrer Genexpression unterschieden werden konnten. Während Zellen von metastasierten Patientinnen Differenzierungs- und Proliferationsmarker überexprimierten (z.B. RANKL, S100A11), zeigten DCC aus nicht-metastasierten Patientinnen Zeichen einer Adaptation ans Knochenmark (Abbildung 45). Es konnte eine unerwartet deutliche phänotypische Plastizität der DCC im Knochenmark aufgedeckt werden. Die sichere Identifizierung von aberranten DCC und die Verfügbarkeit ihrer Genexpressionsprofile wird nun erlauben, differenzierende Gensignaturen für die hämatopoetischen EpCAM⁺ Zellen zu definieren.

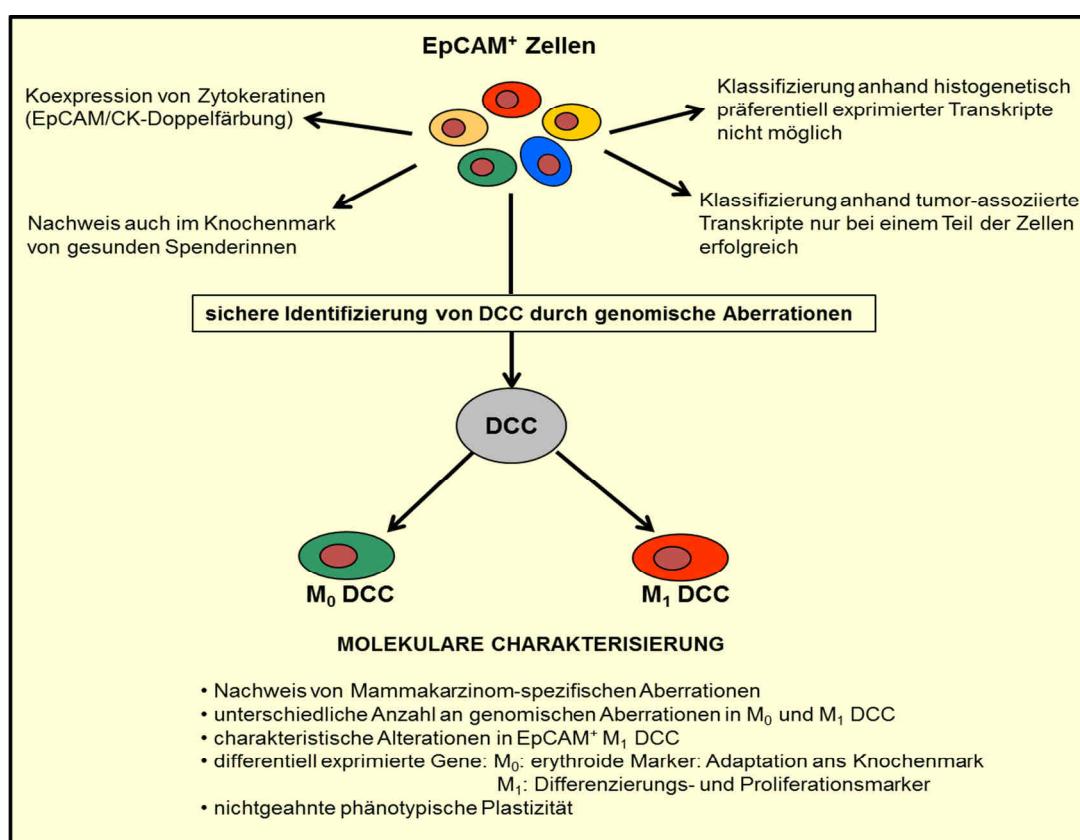


Abbildung 45: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die in dieser Arbeit begonnenen vergleichenden Analysen von Genom und Transkriptom einzelner DCC die Tür für ähnliche Studien zu metastatischen Vorläuferzellen öffnen. Dies könnte in der Zukunft zu einer Veränderung der Diagnostik der minimalen Resterkankung, der Suche nach therapeutischen Zielstrukturen und unserem Verständnis der generalisierten Krebserkrankung führen.

7. Literaturverzeichnis

ABCAM. **Fluoreszenzfarbstoffe: Übersicht.** Zugriff am 20.04.2013,
<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Fluorophore%20table.pdf>.

AJCC. **Cancer Staging Manual** Springer, New York, USA, 7. Auflage 2010.

Alanko A., Heinonen E., Scheinin T., Tolppanen E. M., Viiko R. **Significance of estrogen and progesterone receptors, disease-free interval, and site of first metastasis on survival of breast cancer patients.** *Cancer* 1985, 56(7): 1696-1700.

Azim H. A., Kamal N. S., Azim H. A., Jr. **Bone metastasis in breast cancer: the story of RANK-ligand.** *J Egypt Natl Canc Inst* 2012, 24(3): 107-114.

Banys M., Gruber I., Krawczyk N., Becker S., Kurth R., Wallwiener D., Jakubowska J., Hoffmann J., Rothmund R., Staebler A., Fehm T. **Hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination may be detected in patients diagnosed with ductal carcinoma in situ of the breast.** *Breast Cancer Res Treat* 2012, 131(3): 801-808.

Baudis M., Cleary M. L. **Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data.** *Bioinformatics* 2001, 17(12): 1228-1229.

Bendre M., Gaddy D., Nicholas R. W., Suva L. J. **Breast cancer metastasis to bone: it is not all about PTEN.** *Clin Orthop Relat Res* 2003, (415 Suppl): S39-45.

Benjamini Y., Hochberg Y. **Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing.** *J. R. Statist. Soc. B* 1995, 57: 289-300.

Bentz M., Plesch A., Stilgenbauer S., Dohner H., Lichter P. **Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization.** *Genes Chromosomes Cancer* 1998, 21(2): 172-175.

Berman A. T., Thukral A. D., Hwang W. T., Solin L. J., Vapiwala N. **Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment.** *Clin Breast Cancer* 2013, 13(2): 88-94.

Bertz J., Dahm S., Haberland J., Kraywinkel K., Kurth B., Wolf U. **Verbreitung von Krebskrankungen in Deutschland - Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010.** Robert Koch-Institut. 2010.

Blows F. M., Driver K. E., Schmidt M. K., Broeks A., van Leeuwen F. E., Wesseling J., Cheang M. C., Gelmon K., Nielsen T. O., Blomqvist C., Heikkila P., Heikkilä T., Nevanlinna H., Akslen L. A., Begin L. R., Foulkes W. D., Couch F. J., Wang X., Cafourek V., Olson J. E., Baglietto L., Giles G. G., Severi G., McLean C. A., Southey M. C., Rakha E., Green A. R., Ellis I. O., Sherman M. E., Lissowska J., Anderson W. F., Cox A., Cross S. S., Reed M. W., Provenzano E., Dawson S. J., Dunning A. M., Humphreys M., Easton D. F., Garcia-Closas M., Caldas C., Pharoah P. D., Huntsman D. **Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies.** *PLoS Med* 2010, 7(5): e1000279.

Bolstad B. M., Irizarry R. A., Astrand M., Speed T. P. **A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias.** *Bioinformatics* 2003, 19(2): 185-193.

Braun S., Kentenich C., Janni W., Hepp F., de Waal J., Willgeroth F., Sommer H., Pantel K. **Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients.** *J Clin Oncol* 2000a, 18(1): 80-86.

Braun S., Pantel K. **Biological characteristics of micrometastatic cancer cells in bone marrow.** *Cancer Metastasis Rev* 1999, 18(1): 75-90.

Braun S., Pantel K., Muller P., Janni W., Hepp F., Kentenich C. R., Gastroph S., Wischnik A., Dimpf T., Kindermann G., Riethmüller G., Schlimok G. **Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.** *N Engl J Med* 2000b, 342(8): 525-533.

Braun S., Vogl F. D., Naume B., Janni W., Osborne M. P., Coombes R. C., Schlimok G., Diel I. J., Gerber B., Gebauer G., Pierga J. Y., Marth C., Oruzio D., Wiedswang G., Solomayer E. F., Kundt G., Strobl B., Fehm T., Wong G. Y., Bliss J., Vincent-Salomon A., Pantel K. **A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer.** *N Engl J Med* 2005, 353(8): 793-802.

- Buerger H., Mommers E. C., Littmann R., Simon R., Diallo R., Poremba C., Dockhorn-Dworniczak B., van Diest P. J., Boecker W. **Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution.** *J Pathol* 2001, 194(2): 165-170.
- Buerger H., Otterbach F., Simon R., Schafer K. L., Poremba C., Diallo R., Brinkschmidt C., Dockhorn-Dworniczak B., Boecker W. **Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes.** *J Pathol* 1999, 189(4): 521-526.
- Buhring H. J., Muller T., Herbst R., Cole S., Rappold I., Schuller W., Zhu X., Fritzsch U., Faul C., Armeanu S., Ullrich A., Klein G., Schmidt H. **The adhesion molecule E-cadherin and a surface antigen recognized by the antibody 9C4 are selectively expressed on erythroid cells of defined maturational stages.** *Leukemia* 1996, 10(1): 106-116.
- Capulli M., Angelucci A., Driouch K., Garcia T., Clement-Lacroix P., Martella F., Ventura L., Bologna M., Flaminii S., Moreschini O., Lidereau R., Ricevuto E., Muraca M., Teti A., Rucci N. **Increased expression of a set of genes enriched in oxygen binding function discloses a predisposition of breast cancer bone metastases to generate metastasis spread in multiple organs.** *J Bone Miner Res* 2012, 27(11): 2387-2398.
- Cardoso F., Castiglione M. **Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up.** *Ann Oncol* 2009, 20 Suppl 4: 15-18.
- Castiglioni F., Tagliabue E., Campiglio M., Pupa S. M., Balsari A., Menard S. **Role of exon-16-deleted HER2 in breast carcinomas.** *Endocr Relat Cancer* 2006, 13(1): 221-232.
- Chappard D., Bouvard B., Basle M. F., Legrand E., Audran M. **Bone metastasis: histological changes and pathophysiological mechanisms in osteolytic or osteosclerotic localizations. A review.** *Morphologie* 2011, 95(309): 65-75.
- Chia Nicole. **ISCN 2009.** Zugriff am 01.11.2012, <http://www.atlasgeneticsoncology.org/ISCN09/ISCN09.html>.
- Chia S., Norris B., Speers C., Cheang M., Gilks B., Gown A. M., Huntsman D., Olivotto I. A., Nielsen T. O., Gelmon K. **Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers.** *J Clin Oncol* 2008, 26(35): 5697-5704.
- Choesmel V., Anract P., Hoifodt H., Thiery J. P., Blin N. **A relevant immunomagnetic assay to detect and characterize epithelial cell adhesion molecule-positive cells in bone marrow from patients with breast carcinoma: immunomagnetic purification of micrometastases.** *Cancer* 2004, 101(4): 693-703.
- Christofk H. R., Vander Heiden M. G., Harris M. H., Ramanathan A., Gerszten R. E., Wei R., Fleming M. D., Schreiber S. L., Cantley L. C. **The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth.** *Nature* 2008, 452(7184): 230-233.
- Cittelly D. M., Das P. M., Spoelstra N. S., Edgerton S. M., Richer J. K., Thor A. D., Jones F. E. **Downregulation of miR-342 is associated with tamoxifen resistant breast tumors.** *Mol Cancer* 2010, 9: 317.
- Cristofanilli M., Budd G. T., Ellis M. J., Stopeck A., Matera J., Miller M. C., Reuben J. M., Doyle G. V., Allard W. J., Terstappen L. W., Hayes D. F. **Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer.** *N Engl J Med* 2004, 351(8): 781-791.
- Cristofanilli M., Hayes D. F., Budd G. T., Ellis M. J., Stopeck A., Reuben J. M., Doyle G. V., Matera J., Allard W. J., Miller M. C., Fritzsche H. A., Hortobagyi G. N., Terstappen L. W. **Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 2005, 23(7): 1420-1430.
- Curigliano G., Locatelli M., Fumagalli L., Brolo J., Munzone E., Nole F., Criscitiello C., Goldhirsch A. **Targeting the subtypes of breast cancer: rethinking investigational drugs.** *Expert Opin Investig Drugs* 2012, 21(2): 191-204.
- David C. J., Chen M., Assanah M., Canoll P., Manley J. L. **HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer.** *Nature* 2010, 463(7279): 364-368.
- Denzel S., Maetzel D., Mack B., Eggert C., Barr G., Gires O. **Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact.** *BMC Cancer* 2009, 9: 402.
- Diaz N. M. **Laboratory testing for HER2/neu in breast carcinoma: an evolving strategy to predict response to targeted therapy.** *Cancer Control* 2001, 8(5): 415-418.
- Dimmler A., Gerhards R., Betz C., Gunther K., Reingruber B., Horbach T., Baumann I., Kirchner T., Hohenberger W., Papadopoulos T. **Transcription of cytokeratins 8, 18, and 19 in bone marrow and limited expression of cytokeratins 7 and 20 by carcinoma cells: inherent limitations for RT-PCR in the detection of isolated tumor cells.** *Lab Invest* 2001, 81(10): 1351-1361.

- Elston C. W.,Ellis I. O. **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* 1991, 19(5): 403-410.
- Engel J., Eckel R., Kerr J., Schmidt M., Furstenberger G., Richter R., Sauer H., Senn H. J.,Holzel D. **The process of metastasisation for breast cancer.** *Eur J Cancer* 2003, 39(12): 1794-1806.
- Eroles P., Bosch A., Perez-Fidalgo J. A.,Lluch A. **Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways.** *Cancer Treat Rev* 2012, 38(6): 698-707.
- Falck A. K., Bendahl P. O., Ingvar C., Isola J., Jonsson P. E., Lindblom P., Lovgren K., Rennstam K., Ferno M.,Ryden L. **Analysis of and prognostic information from disseminated tumour cells in bone marrow in primary breast cancer: a prospective observational study.** *BMC Cancer* 2012, 12: 403.
- Fearon E. R.,Vogelstein B. **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** *Cell* 1990, 61(5): 759-767.
- Fehm T., Braun S., Muller V., Janni W., Gebauer G., Marth C., Schindlbeck C., Wallwiener D., Borgen E., Naume B., Pantel K.,Solomayer E. **A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation.** *Cancer* 2006, 107(5): 885-892.
- Fidler I. J. **Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine.** *J Natl Cancer Inst* 1970, 45(4): 773-782.
- Fidler I. J. **The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.** *Nat Rev Cancer* 2003, 3(6): 453-458.
- Forouzanfar M. H., Foreman K. J., Delossantos A. M., Lozano R., Lopez A. D., Murray C. J.,Naghavi M. **Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis.** *Lancet* 2011, 378(9801): 1461-1484.
- Fuhrmann C. **Entwicklung der Array-CGH zur hochauflösenden, genomweiten Untersuchung von DNA-Veränderungen einzelner Tumorzellen.** Ludwig-Maximilians-Universität München, 2007.
- Gao X., Wang H., Yang J. J., Liu X.,Liu Z. R. **Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase.** *Mol Cell* 2012, 45(5): 598-609.
- Gentile M., Olsen K., Dufmats M.,Wingren S. **Frequent allelic losses at 11q24.1-q25 in young women with breast cancer: association with poor survival.** *Br J Cancer* 1999, 80(5-6): 843-849.
- Gentile M., Wiman A., Thorstenson S., Loman N., Borg A.,Wingren S. **Deletion mapping of chromosome segment 11q24-q25, exhibiting extensive allelic loss in early onset breast cancer.** *Int J Cancer* 2001, 92(2): 208-213.
- Gerlinger M., Rowan A. J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E., Martinez P., Matthews N., Stewart A., Tarpey P., Varela I., Phillimore B., Begum S., McDonald N. Q., Butler A., Jones D., Raine K., Latimer C., Santos C. R., Nohadani M., Eklund A. C., Spencer-Dene B., Clark G., Pickering L., Stamp G., Gore M., Szallasi Z., Downward J., Futreal P. A.,Swanton C. **Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing.** *N Engl J Med* 2012, 366(10): 883-892.
- Gires O., Klein C. A.,Baeuerle P. A. **On the abundance of EpCAM on cancer stem cells.** *Nat Rev Cancer* 2009, 9(2): 143; author reply 143.
- Goldhirsch A., Ingle J. N., Gelber R. D., Coates A. S., Thurlimann B.,Senn H. J. **Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009.** *Ann Oncol* 2009, 20(8): 1319-1329.
- Goldhirsch A., Wood W. C., Coates A. S., Gelber R. D., Thurlimann B., Senn H. J.,Panel members. **Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** *Ann Oncol* 2011, 22(8): 1736-1747.
- Gong G., DeVries S., Chew K. L., Cha I., Ljung B. M.,Waldman F. M. **Genetic changes in paired atypical and usual ductal hyperplasia of the breast by comparative genomic hybridization.** *Clin Cancer Res* 2001, 7(8): 2410-2414.
- Gorr T. A., Wichmann D., Pilarsky C., Theurillat J. P., Fabrizius A., Laufs T., Bauer T., Koslowski M., Horn S., Burmester T., Hankeln T.,Kristiansen G. **Old proteins - new locations: myoglobin, haemoglobin, neuroglobin and cytoglobin in solid tumours and cancer cells.** *Acta Physiol (Oxf)* 2011, 202(3): 563-581.
- Greaves M. **Cancer causation: the Darwinian downside of past success?** *Lancet Oncol* 2002, 3(4): 244-251.

- Gruver A. M., Portier B. P., Tubbs R. R. **Molecular pathology of breast cancer: the journey from traditional practice toward embracing the complexity of a molecular classification.** *Arch Pathol Lab Med* 2011, 135(5): 544-557.
- Gužvić M. **Identifikacija i molekulska karakterizacija prekursorskih ćelija metastaza raka prostate.** Universität Belgrad, 2011.
- Hanahan D., Weinberg R. A. **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, 100(1): 57-70.
- Harbeck N., Untch M., Pache L., Eiermann W. **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* 1994, 69(3): 566-571.
- Harrison J. S., Rameshwar P., Chang V., Bandari P. **Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers.** *Blood* 2002, 99(1): 394.
- Hartkopf A. D., Banys M., Meier-Stiegen F., Hahn M., Rohm C., Hoffmann J., Helms G., Taran F. A., Wallwiener M., Walter C., Neubauer H., Wallwiener D., Fehm T. **The HER2 status of disseminated tumor cells in the bone marrow of early breast cancer patients is independent from primary tumor and predicts higher risk of relapse.** *Breast Cancer Res Treat* 2013, 138(2): 509-517.
- Hartmann C. H. **Grundlagen für zielgerichtete adjuvante Therapien solider Tumore: Eine Methode zur Analyse der globalen Genexpression einzelner metastatischer Vorläuferzellen.** Ludwig-Maximilians-Universität München, 2006.
- Hartmann C. H., Klein C. A. **Gene expression profiling of single cells on large-scale oligonucleotide arrays.** *Nucleic Acids Res* 2006, 34(21): e143.
- Hayes D. F., Cristofanilli M., Budd G. T., Ellis M. J., Stopeck A., Miller M. C., Matera J., Allard W. J., Doyle G. V., Terstappen L. W. **Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival.** *Clin Cancer Res* 2006, 12(14 Pt 1): 4218-4224.
- Herlyn M., Steplewski Z., Herlyn D., Koprowski H. **Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, 76(3): 1438-1442.
- Hermsen M. A., Baak J. P., Meijer G. A., Weiss J. M., Walboomers J. W., Snijders P. J., van Diest P. J. **Genetic analysis of 53 lymph node-negative breast carcinomas by CGH and relation to clinical, pathological, morphometric, and DNA cytometric prognostic factors.** *J Pathol* 1998, 186(4): 356-362.
- Hildebrandt H., Dornblüth O., Pschyrembel W. **Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.** de Gruyter, Berlin, Deutschland, 258. Auflage 1997.
- Hiripi E., Gondos A., Emrich K., Holleczek B., Katalinic A., Luttmann S., Sirri E., Brenner H. **Survival from common and rare cancers in Germany in the early 21st century.** *Ann Oncol* 2012, 23(2): 472-479.
- Husemann Y., Geigl J. B., Schubert F., Musiani P., Meyer M., Burghart E., Forni G., Eils R., Fehm T., Riethmüller G., Klein C. A. **Systemic spread is an early step in breast cancer.** *Cancer Cell* 2008, 13(1): 58-68.
- Imle A., Polzer B., Alexander S., Klein C. A., Friedl P. **Genomic instability of micronucleated cells revealed by single-cell comparative genomic hybridization.** *Cytometry A* 2009, 75(7): 562-568.
- Izbicki J. R., Hosch S. B., Pichlmeier U., Rehders A., Busch C., Niendorf A., Passlick B., Broelsch C. E., Pantel K. **Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer.** *N Engl J Med* 1997, 337(17): 1188-1194.
- Janni W., Rack B., Lindemann K., Harbeck N. **Detection of micrometastatic disease in bone marrow: is it ready for prime time?** *Oncologist* 2005, 10(7): 480-492.
- Janni W., Vogl F. D., Wiedswang G., Synnestvedt M., Fehm T., Juckstock J., Borgen E., Rack B., Braun S., Sommer H., Solomayer E., Pantel K., Nesland J., Friese K., Naume B. **Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis.** *Clin Cancer Res* 2011, 17(9): 2967-2976.
- Jeuken J. W., Sprenger S. H., Wesseling P. **Comparative genomic hybridization: practical guidelines.** *Diagn Mol Pathol* 2002, 11(4): 193-203.
- Jing D., Wobus M., Poitz D. M., Bornhauser M., Ehninger G., Ordemann R. **Oxygen tension plays a critical role in the hematopoietic microenvironment in vitro.** *Haematologica* 2012, 97(3): 331-339.

- Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Piper J., Tanner M., Stokke T., Chen L., Smith H. S., Pinkel D., Gray J. W., Waldman F. M. **Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(6): 2156-2160.
- Kennecke H., Yerushalmi R., Woods R., Cheang M. C., Voduc D., Speers C. H., Nielsen T. O., Gelmon K. **Metastatic behavior of breast cancer subtypes.** *J Clin Oncol* 2010, 28(20): 3271-3277.
- Khasraw M., Bell R. **Primary systemic therapy in HER2-amplified breast cancer: a clinical review.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2012, 12(8): 1005-1013.
- Klein C. A. **Parallel progression of primary tumours and metastases.** *Nat Rev Cancer* 2009, 9(4): 302-312.
- Klein C. A., Blankenstein T. J., Schmidt-Kittler O., Petronio M., Polzer B., Stoecklein N. H., Riethmüller G. **Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer.** *Lancet* 2002a, 360(9334): 683-689.
- Klein C. A., Holzel D. **Systemic cancer progression and tumor dormancy: mathematical models meet single cell genomics.** *Cell Cycle* 2006, 5(16): 1788-1798.
- Klein C. A., Schmidt-Kittler O., Schardt J. A., Pantel K., Speicher M. R., Riethmüller G. **Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(8): 4494-4499.
- Klein C. A., Seidl S., Petat-Dutter K., Offner S., Geigl J. B., Schmidt-Kittler O., Wendler N., Passlick B., Huber R. M., Schlimok G., Baeuerle P. A., Riethmüller G. **Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells.** *Nat Biotechnol* 2002b, 20(4): 387-392.
- Klein C. A., Zohlnhofer D., Petat-Dutter K., Wendler N. **Gene expression analysis of a single or few cells.** *Curr Protoc Mol Biol* 2003, Chapter 25: Unit 25B 28.
- Krag DN, Kusminsky R., Manna E., Weaver D., Harlow S. P., Covelli M., Stanley M. A., McCahill L., Ittleman F., Leavitt B., Krag M., Amarante P. **Cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients and noncancer donors.** *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009, 17(5): 403-408.
- Kubuschok B., Passlick B., Izicki J. R., Thetter O., Pantel K. **Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol* 1999, 17(1): 19-24.
- Lakhani SR., Ellis IO., Schnitt SJ., Tan PH., Vijver MJ. van de. **WHO Classification of Tumours of the Breast.** WHO Press, Genf, Schweiz, 4. Auflage 2012.
- Lammers R., Giesert C., Grunebach F., Marxer A., Vogel W., Buhring H. J. **Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis.** *Exp Hematol* 2002, 30(6): 537-545.
- Leitlinienprogramm Onkologie. **Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.** Zuckschwerdt, München, Deutschland, 3. Auflage 2012.
- Leong A.; Cooper, K.; Leong, F.J. **Manual of Diagnostic Cytology.** Greenwich Medical Media, Ltd., Cambridge, England. 2., Auflage 2002.
- Loberg R. D., Bradley D. A., Tomlins S. A., Chinnaiyan A. M., Pienta K. J. **The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy.** *CA Cancer J Clin* 2007, 57(4): 225-241.
- Lu J., Steeg P. S., Price J. E., Krishnamurthy S., Mani S. A., Reuben J., Cristofanilli M., Dontu G., Bidaut L., Valero V., Hortobagyi G. N., Yu D. **Breast cancer metastasis: challenges and opportunities.** *Cancer Res* 2009, 69(12): 4951-4953.
- Luo W., Hu H., Chang J., Zhong J., Knabel M., O'Meally R., Cole R. N., Pandey A., Semenza G. L. **Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1.** *Cell* 2011, 145(5): 732-744.
- Luzzi K. J., MacDonald I. C., Schmidt E. E., Kerkvliet N., Morris V. L., Chambers A. F., Groom A. C. **Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases.** *Am J Pathol* 1998, 153(3): 865-873.
- Lynch H. T., Snyder C., Lynch J. **Heredity breast cancer: practical pursuit for clinical translation.** *Ann Surg Oncol* 2012, 19(6): 1723-1731.

- Maetzel D., Denzel S., Mack B., Canis M., Went P., Benk M., Kieu C., Papior P., Baeuerle P. A., Munz M., Gires O. **Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM.** *Nat Cell Biol* 2009, 11(2): 162-171.
- Malzahn K., Mitze M., Thoenes M., Moll R. **Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas.** *Virchows Archiv* 1998, 433(2): 119-129.
- Marjanovic N. D., Weinberg R. A., Chaffer C. L. **Cell plasticity and heterogeneity in cancer.** *Clin Chem* 2013, 59(1): 168-179.
- Mathiesen R. R., Borgen E., Renolen A., Lokkevik E., Nesland J. M., Anker G., Ostenstad B., Lundgren S., Risberg T., Mjaaland I., Kvælheim G., Lonning P. E., Naume B. **Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival.** *Breast Cancer Res* 2012, 14(4): R117.
- McKiernan E., McDermott E. W., Evoy D., Crown J., Duffy M. J. **The role of S100 genes in breast cancer progression.** *Tumour Biol* 2011, 32(3): 441-450.
- Meding S., Balluff B., Elsner M., Schone C., Rauser S., Nitsche U., Maak M., Schafer A., Hauck S. M., Ueffing M., Langer R., Hofler H., Friess H., Rosenberg R., Walch A. **Tissue-based proteomics reveals FXYD3, S100A11 and GSTM3 as novel markers for regional lymph node metastasis in colon cancer.** *J Pathol* 2012.
- Meng S., Tripathy D., Frenkel E. P., Shete S., Naftalis E. Z., Huth J. F., Beitsch P. D., Leitch M., Hoover S., Euhus D., Haley B., Morrison L., Fleming T. P., Herlyn D., Terstappen L. W., Fehm T., Tucker T. F., Lane N., Wang J., Uhr J. W. **Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy.** *Clin Cancer Res* 2004, 10(24): 8152-8162.
- Miltenyi. **MACS Technologie**, Zugriff am 29.07.2011,
http://www.miltenyibiotec.com/download/flyer_en/680/MACS_Technology_Flyer.pdf.
- Mitchell E. L., Santibanez-Koref M. F. **1p13 is the most frequently involved band in structural chromosomal rearrangements in human breast cancer.** *Genes Chromosomes Cancer* 1990, 2(4): 278-289.
- Mitra D., Brumlik M. J., Okamgba S. U., Zhu Y., Duplessis T. T., Parvani J. G., Lesko S. M., Brogi E., Jones F. E. **An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance.** *Mol Cancer Ther* 2009, 8(8): 2152-2162.
- Moll R., Divo M., Langbein L. **The human keratins: biology and pathology.** *Histochem Cell Biol* 2008, 129(6): 705-733.
- Morton N. E. **Parameters of the human genome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(17): 7474-7476.
- Mosoyan G., Nagi C., Marukian S., Teixeira A., Simonian A., Resnick-Silverman L., DiFeo A., Johnston D., Reynolds S. R., Roses D. F., Mosoyan A. **Multiple breast cancer cell-lines derived from a single tumor differ in their molecular characteristics and tumorigenic potential.** *PLoS One* 2013, 8(1): e55145.
- Mundy G. R. **Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities.** *Nat Rev Cancer* 2002, 2(8): 584-593.
- Munoz N. M., Leff A. R. **Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection.** *Nat Protoc* 2006, 1(6): 2613-2620.
- Munz M., Baeuerle P. A., Gires O. **The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling.** *Cancer Res* 2009, 69(14): 5627-5629.
- Munz M., Kieu C., Mack B., Schmitt B., Zeidler R., Gires O. **The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation.** *Oncogene* 2004, 23(34): 5748-5758.
- Naumov G. N., MacDonald I. C., Weinmeister P. M., Kerkvliet N., Nadkarni K. V., Wilson S. M., Morris V. L., Groom A. C., Chambers A. F. **Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy.** *Cancer Res* 2002, 62(7): 2162-2168.
- Nishizaki T., Chew K., Chu L., Isola J., Kallioniemi A., Weidner N., Waldman F. M. **Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization.** *Int J Cancer* 1997, 74(5): 513-517.
- O'Shaughnessy J., Romieu G., Diéras V., Byrtek M., Duenne A.-A., Miles D (2010). **Meta-analysis of patients with triple-negative breast cancer (TNBC) from three randomized trials of first-line bevacizumab (BV) and chemotherapy treatment for metastatic breast cancer (MBC).** 33. Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, TX, USA.
- Ogino S., Fuchs C. S., Giovannucci E. **How many molecular subtypes? Implications of the unique tumor principle in personalized medicine.** *Expert Rev Mol Diagn* 2012, 12(6): 621-628.

- Pantel K.,Brakenhoff R. H. **Dissecting the metastatic cascade.** *Nat Rev Cancer* 2004, 4(6): 448-456.
- 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., Botstein D. **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, 406(6797): 747-752.
- Pierga J. Y., Bonneton C., Magdelenat H., Vincent-Salomon A., Nos C., Boudou E., Pouillart P., Thiery J. P., de Cremoux P. **Real-time quantitative PCR determination of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression of isolated micrometastatic cells from bone marrow of breast cancer patients.** *Int J Cancer* 2005, 114(2): 291-298.
- Pierga J. Y., Bonneton C., Vincent-Salomon A., de Cremoux P., Nos C., Blin N., Pouillart P., Thiery J. P., Magdelenat H. **Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2004, 10(4): 1392-1400.
- Prat A., Parker J. S., Karginova O., Fan C., Livasy C., Herschkowitz J. I., He X., Perou C. M. **Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2010, 12(5): R68.
- Radbruch Andreas. **Flow Cytometry and Cell Sorting.** Springer, New York, USA, Auflage 2000.
- Remmeli W., Stegner H. E. **[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue].** *Pathologe* 1987, 8(3): 138-140.
- Riethdorf S., Fritsche H., Muller V., Rau T., Schindlbeck C., Rack B., Janni W., Coith C., Beck K., Janicke F., Jackson S., Gornet T., Cristofanilli M., Pantel K. **Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system.** *Clin Cancer Res* 2007, 13(3): 920-928.
- Riethdorf S., Pantel K. **Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization.** *Pathobiology* 2008, 75(2): 140-148.
- Riethdorf S., Wikman H., Pantel K. **Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients.** *Int J Cancer* 2008, 123(9): 1991-2006.
- Ritchie Matthew E., Silver Jeremy, Oshlack Alicia, Holmes Melissa, Diyagama Dileepa, Holloway Andrew, Smyth Gordon K. **A comparison of background correction methods for two-colour microarrays.** *Bioinformatics* 2007, 23(20): 2700-2707.
- Rosenberg R., Friederichs J., Gertler R., Hoos A., Mueller J., Nahrig J., Nekarda H., Siewert J. R. **Prognostic evaluation and review of immunohistochemically detected disseminated tumor cells in peritumoral lymph nodes of patients with pN0 colorectal cancer.** *Int J Colorectal Dis* 2004, 19(5): 430-437.
- Roy R., Chun J., Powell S. N. **BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection.** *Nat Rev Cancer* 2012, 12(1): 68-78.
- Roylance R., Gorman P., Harris W., Liebmann R., Barnes D., Hanby A., Sheer D. **Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer.** *Cancer Res* 1999, 59(7): 1433-1436.
- Saadatmand S., de Kruijf E. M., Sajet A., Dekker-Ensink N. G., van Nes J. G., Putter H., Smit V. T., van de Velde C. J., Liefers G. J., Kuppen P. J. **Expression of cell adhesion molecules and prognosis in breast cancer.** *Br J Surg* 2013, 100(2): 252-260.
- Sambrook J., Russell DW. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 3. Auflage 2000.
- Sanger N., Effenberger K. E., Riethdorf S., Van Haasteren V., Gauwerky J., Wiegratz I., Strebhardt K., Kaufmann M., Pantel K. **Disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ductal carcinoma in situ.** *Int J Cancer* 2011, 129(10): 2522-2526.
- Schardt J. A., Meyer M., Hartmann C. H., Schubert F., Schmidt-Kittler O., Fuhrmann C., Polzer B., Petronio M., Eils R., Klein C. A. **Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer.** *Cancer Cell* 2005, 8(3): 227-239.
- Schlomok G., Funke I., Holzmann B., Gottlinger G., Schmidt G., Hauser H., Swierkot S., Warnecke H. H., Schneider B., Koprowski H., et al. **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* 1987, 84(23): 8672-8676.

- Schmidt-Kittler O., Ragg T., Daskalakis A., Granzow M., Ahr A., Blankenstein T. J., Kaufmann M., Diebold J., Arnholdt H., Muller P., Bischoff J., Harich D., Schlimok G., Riethmuller G., Eils R., Klein C. A. **From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(13): 7737-7742.
- Schmidt M., Petry I. B., Bohm D., Lebrecht A., von Torne C., Gebhard S., Gerhold-Ay A., Cotarelo C., Battista M., Schormann W., Freis E., Selinski S., Ickstadt K., Rahnenfuhrer J., Sebastian M., Schuler M., Koelbl H., Gehrmann M., Hengstler J. G. **Ep-CAM RNA expression predicts metastasis-free survival in three cohorts of untreated node-negative breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2011, 125(3): 637-646.
- Schnitt S. J. **Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy.** *Mod Pathol* 2010, 23 Suppl 2: S60-64.
- SEER (*Surveillance Epidemiology and End Results*). **Fast Stats: An interactive tool for access to SEER cancer statistics.** Zugriff am 26.05.2013, <http://seer.cancer.gov/faststats>.
- Shankar J., Messenberg A., Chan J., Underhill T. M., Foster L. J., Nabi I. R. **Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells.** *Cancer Res* 2010, 70(9): 3780-3790.
- Shao M. M., Chan S. K., Yu A. M., Lam C. C., Tsang J. Y., Lui P. C., Law B. K., Tan P. H., Tse G. M. **Keratin expression in breast cancers.** *Virchows Arch* 2012, 461(3): 313-322.
- Silverstein M. J., Lagios M. D., Martino S., Lewinsky B. S., Craig P. H., Beron P. J., Gamagami P., Waisman J. R. **Outcome after invasive local recurrence in patients with ductal carcinoma in situ of the breast.** *J Clin Oncol* 1998, 16(4): 1367-1373.
- Sinha S., Singh R. K., Bhattacharya N., Mukherjee N., Ghosh S., Alam N., Roy A., Roychoudhury S., Panda C. K. **Frequent alterations of LOH11CR2A, PIG8 and CHEK1 genes at chromosomal 11q24.1-24.2 region in breast carcinoma: clinical and prognostic implications.** *Mol Oncol* 2011, 5(5): 454-464.
- Skouby A. R. **Haematologic adaptation in patients with chronic bronchitis and pulmonary insufficiency.** *Acta Med Scand* 1976, 199(3): 185-190.
- Smid M., Wang Y., Zhang Y., Sieuwerts A. M., Yu J., Klijn J. G., Foekens J. A., Martens J. W. **Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse.** *Cancer Res* 2008, 68(9): 3108-3114.
- Smyth G. K. **Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments.** *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004, 3: Article3.
- Solin L. J., Fourquet A., Vicini F. A., Haffty B., Taylor M., McCormick B., McNeese M., Pierce L. J., Landmann C., Olivotto I. A., Borger J., de La Rochedordiere A., Schultz D. J. **Salvage treatment for local recurrence after breast-conserving surgery and radiation as initial treatment for mammographically detected ductal carcinoma in situ of the breast.** *Cancer* 2001, 91(6): 1090-1097.
- 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., Matei J. C., Brown P. O., Botstein D., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L. **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(19): 10869-10874.
- Sotiriou C., Neo S. Y., McShane L. M., Korn E. L., Long P. M., Jazaeri A., Martiat P., Fox S. B., Harris A. L., Liu E. T. **Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(18): 10393-10398.
- Sotiriou C., Pusztai L. **Gene-expression signatures in breast cancer.** *N Engl J Med* 2009, 360(8): 790-800.
- Soysal S. D., Muenst S., Barbie T., Fleming T., Gao F., Spizzo G., Oertli D., Viehl C. T., Obermann E. C., Gillanders W. E. **EpCAM expression varies significantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2(+), basal-like, and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer.** *Br J Cancer* 2013, 108(7): 1480-1487.
- Sperduto P. W., Kased N., Roberge D., Chao S. T., Shanley R., Luo X., Snead P. K., Suh J., Weil R. J., Jensen A. W., Brown P. D., Shih H. A., Kirkpatrick J., Gaspar L. E., Fiveash J. B., Chiang V., Knisely J. P., Sperduto C. M., Lin N., Mehta M. **The effect of tumor subtype on the time from primary diagnosis to development of brain metastases and survival in patients with breast cancer.** *J Neurooncol* 2013, 112(3): 467-472.
- Spizzo G., Obrist P., Ensinger C., Theurl I., Dunser M., Ramoni A., Gunsilius E., Eibl G., Mikuz G., Gastl G. **Prognostic significance of Ep-CAM AND Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer.** *Int J Cancer* 2002, 98(6): 883-888.

Spizzo G., Went P., Dirnhofer S., Obrist P., Simon R., Spichtin H., Maurer R., Metzger U., von Castelberg B., Bart R., Stopatschinskaya S., Kochli O. R., Haas P., Mross F., Zuber M., Dietrich H., Bischoff S., Mirlacher M., Sauter G., Gastl G. **High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2004, 86(3): 207-213.

Statistisches Bundesamt. **Gesundheit in Deutschland.** Zugriff am 29.04.2013, <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Gesundheit.html>.

Stoecklein N. H., Erbersdobler A., Schmidt-Kittler O., Diebold J., Schardt J. A., Izbicki J. R., Klein C. A. **SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples.** *Am J Pathol* 2002, 161(1): 43-51.

Stoecklein N. H., Hosch S. B., Bezler M., Stern F., Hartmann C. H., Vay C., Siegmund A., Scheunemann P., Schurr P., Knoefel W. T., Verde P. E., Reichelt U., Erbersdobler A., Grau R., Ullrich A., Izbicki J. R., Klein C. A. **Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer.** *Cancer Cell* 2008, 13(5): 441-453.

Stoecklein N. H., Klein C. A. **Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis.** *Int J Cancer* 2010, 126(3): 589-598.

Strnad J., Hamilton A. E., Beavers L. S., Gamboa G. C., Apelgren L. D., Taber L. D., Sportsman J. R., Bumol T. F., Sharp J. D., Gadski R. A. **Molecular cloning and characterization of a human adenocarcinoma/epithelial cell surface antigen complementary DNA.** *Cancer Res* 1989, 49(2): 314-317.

Synnestvedt M., Borgen E., Schlichting E., Schirmer C. B., Renolen A., Giercksky K. E., Nesland J. M., Naume B. **Disseminated tumour cells in the bone marrow in early breast cancer: morphological categories of immunocytochemically positive cells have different impact on clinical outcome.** *Breast Cancer Res Treat* 2013, 138(2): 485-497.

Tang D. G. **Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity.** *Cell Res* 2012, 22(3): 457-472.

Thomssen C., Wand D. **Hereditärer Brustkrebs.** *Der Onkologe* 2012, 3(18): 216-223.

Thurm H., Ebel S., Kentenich C., Hemsen A., Riethdorf S., Coith C., Wallwiener D., Braun S., Oberhoff C., Janicke F., Pantel K. **Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy.** *Clin Cancer Res* 2003, 9(7): 2598-2604.

Tirkkonen M., Tanner M., Karhu R., Kallioniemi A., Isola J., Kallioniemi O. P. **Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH.** *Genes Chromosomes Cancer* 1998, 21(3): 177-184.

TRM Tumorregister München. **Basis-Statistiken C50: Mammakarzinom (Frauen)** Zugriff am 11.04.2013, http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/base_C50f_G.pdf.

TRM Tumorregister München. **Überleben C50: Mammakarzinom (Frauen).** Zugriff am 11.04.2013, http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv_C50f_G.pdf.

IUCC. **TNM Classification of Malignant Tumours.** John Wiley & Sons, Oxford, England, 7. Auflage 2009.

Untch M., Gelber R. D., Jackisch C., Procter M., Baselga J., Bell R., Cameron D., Bari M., Smith I., Leyland-Jones B., de Azambuja E., Wermuth P., Khasanov R., Feng-Yi F., Constantin C., Mayordomo J. I., Su C. H., Yu S. Y., Lluch A., Senkus-Konefka E., Price C., Haslbauer F., Suarez Sahui T., Srimuninnimit V., Colleoni M., Coates A. S., Piccart-Gebhart M. J., Goldhirsch A. **Estimating the magnitude of trastuzumab effects within patient subgroups in the HERA trial.** *Ann Oncol* 2008, 19(6): 1090-1096.

Valastyan S., Weinberg R. A. **Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.** *Cell* 2011, 147(2): 275-292.

Veridex. **The CellSearch® System.** Zugriff am 01.05.2013, <https://www.cellsearchctc.com/sites/default/files/docs/cellsearch-brochure.pdf>.

Veronesi U., Boyle P., Goldhirsch A., Orecchia R., Viale G. **Breast cancer.** *Lancet* 2005, 365(9472): 1727-1741.

Visvader J. E., Lindeman G. J. **Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions.** *Nat Rev Cancer* 2008, 8(10): 755-768.

Weinberg RA. **The biology of cancer.** Garland Science, New York, USA, Auflage 2007.

WHO World Health Organization. **Media centre: Fact sheets.** Zugriff am 11.04.2013, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.

- Wiedswang G., Borgen E., Karesen R., Kvalheim G., Nesland J. M., Qvist H., Schlichting E., Sauer T., Janbu J., Harbitz T., Naume B. **Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2003, 21(18): 3469-3478.
- Wiedswang G., Borgen E., Karesen R., Qvist H., Janbu J., Kvalheim G., Nesland J. M., Naume B. **Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome.** *Clin Cancer Res* 2004, 10(16): 5342-5348.
- Wiedswang G., Borgen E., Schirmer C., Karesen R., Kvalheim G., Nesland J. M., Naume B. **Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer.** *Int J Cancer* 2006, 118(8): 2013-2019.
- Winzer K. J. [Diagnosis and treatment of breast cancer]. *Chirurg* 2005, 76(8): 803-816; quiz 817-808.
- Woelfle U., Breit E., Zafrakas K., Otte M., Schubert F., Muller V., Izbicki J. R., Loning T., Pantel K. **Bi-specific immunomagnetic enrichment of micrometastatic tumour cell clusters from bone marrow of cancer patients.** *J Immunol Methods* 2005, 300(1-2): 136-145.
- Wolff A. C., Hammond M. E., Schwartz J. N., Hagerty K. L., Allred D. C., Cote R. J., Dowsett M., Fitzgibbons P. L., Hanna W. M., Langer A., McShane L. M., Paik S., Pogram M. D., Perez E. A., Press M. F., Rhodes A., Sturgeon C., Taube S. E., Tubbs R., Vance G. H., van de Vijver M., Wheeler T. M., Hayes D. F. **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2007, 25(1): 118-145.
- Xiao M. B., Jiang F., Ni W. K., Chen B. Y., Lu C. H., Li X. Y., Ni R. Z. **High expression of S100A11 in pancreatic adenocarcinoma is an unfavorable prognostic marker.** *Med Oncol* 2012, 29(3): 1886-1891.
- Yang W., Xia Y., Hawke D., Li X., Liang J., Xing D., Aldape K., Hunter T., Alfred Yung W. K., Lu Z. **PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis.** *Cell* 2012, 150(4): 685-696.
- Yao R., Davidson D. D., Lopez-Beltran A., MacLennan G. T., Montironi R., Cheng L. **The S100 proteins for screening and prognostic grading of bladder cancer.** *Histol Histopathol* 2007, 22(9): 1025-1032.
- Yu K. D., Fan L., Di G. H., Yuan W. T., Zheng Y., Huang W., Chen A. X., Yang C., Wu J., Shen Z. Z., Shao Z. M. **Genetic variants in GSTM3 gene within GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3 cluster influence breast cancer susceptibility depending on GSTM1.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, 121(2): 485-496.
- Zippelius A., Kufer P., Honold G., Kollermann M. W., Oberneder R., Schlimok G., Riethmuller G., Pantel K. **Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow.** *J Clin Oncol* 1997, 15(7): 2701-2708.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph Klein für die Überlassung des äußerst interessanten Themas und die hervorragende fachliche Betreuung, sowie für das entgegengebrachte Vertrauen. Bedanken möchte ich mich auch für die Teilnahme und Präsentation meiner Forschungsergebnisse auf zahlreichen Konferenzen und Meetings sowie die Teilnahme an „Tiers“.

Herrn Prof. Dr. Jens Schlossmann danke ich für die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung dieser Dissertation sowie für sein Interesse an dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren, die diese Arbeit unterstützt und den Laboralltag auf verschiedenste Weise erleichtert haben. Spezieller Dank geht an Sandra Grunewald, Isabell Blochberger sowie Manfred Meyer, die diese Arbeit nicht nur unterstützt haben, sondern auch immer ein offenes Ohr für mich hatten. Ganz herzlich danke ich meinen Kollegen Miodrag Gužvić, Bernhard Polzer, Nina Patwary, Sebastian Scheitler, Zbigniew Czyż und Barbara Alberter für die tolle Zusammenarbeit, zahlreiche fachliche Diskussionen und Ratschläge, die Sortierstunden, das Korrekturlesen und vieles mehr. Für die großartige Hilfe bei der statistischen Auswertung der Expressionsdaten danke ich Inka Appel.

Außerdem danke ich allen Patientinnen und gesunden Spenderinnen, die diese Arbeit ermöglicht haben. Zudem bedanke ich mich bei den klinischen Partnern, namentlich erwähnen möchte ich Gabriele Bölling, Claus Latrich und Carmen Sailer.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, die alle meine Pläne in jeglicher Hinsicht unterstützt und mich immer ermutigt haben. Insbesondere bedanke ich mich für die letzten Monate. Danke Rupert für Deinen Humor, Deine Hilfe und die 24 h „Notfallbereitschaft“!

Anton, ich danke Dir für Deine Liebe, Dein grenzenloses Verständnis und die Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben des Literaturzitats gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

10. Anhang

10.1 Klassifikation des Mammakarzinoms

Tabelle 59: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms (basierend auf UICC, 2009; AJCC, 2010)

T - Ausdehnung des Primärtumors

- T_x Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T₀ kein Anhalt für Primärtumor
- T_{is} Carcinoma in situ
- T₁ Tumor ≤ 2 cm
- T_{1mi} Mikroinvasion (≤ 0,1 cm)
- T₂ 2 cm < Tumor ≤ 5 cm
- T₃ Tumor > 5 cm
- T₄ Tumor jeglicher Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand und / oder Haut

N - Regionäre Lymphknotenmetastasen

- N_x regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N₀ keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N_{1mi} Mikrometastasen (> 2 mm und / oder 200 Zellen) *pathologisch*
- N₁ Metastasen in 1-3 axillären ipsilateralen Lymphknoten
- N₂ Metastasen in 4-9 axillären Lymphknoten
- N₃ Metastasen in ≥ 10 axillären Lymphknoten; Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten unterhalb des Brustbeins

M - Fernmetastasen

- M_x Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
- M₀ keine Fernmetastasen
- M₁ Fernmetastasen

Tabelle 60: Stadieneinteilung nach UICC (basierend auf UICC, 2009)

UICC-Stadium	T	N	M
Stadium 0	T _{is}	N ₀	M ₀
Stadium I A	T ₁	N ₀	M ₀
Stadium I B	T ₀ , T ₁	N _{1mi}	M ₀
Stadium II A	T ₀ , T ₁	N ₁	M ₀
	T ₂	N ₀	M ₀
Stadium II B	T ₂	N ₁	M ₀
	T ₃	N ₀	M ₀
Stadium IIIA	T ₀ , T ₁ , T ₂	N ₂	M ₀
	T ₃	N ₁ , N ₂	M ₀
Stadium IIIB	T ₄	N ₀ , N ₁ , N ₂	M ₀
Stadium IIIC	jedes T	N ₃	M ₀
Stadium IV	jedes T	jedes N	M ₁

Tabelle 61: Grading des Mammakarzinoms (basierend auf Elston and Ellis, 1991)

Summenscore	Malignitätsgrad	Grading	Bezeichnung
3, 4, 5	gering	G1	gut differenziert
6, 7	mäßig	G2	mäßig differenziert
8, 9	hoch	G3	schlecht differenziert

Tabelle 62: Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner (basierend auf Remmele und Stegner, 1987)

Färbeintensität (staining intensity = SI)	Score
keine Färbung nachweisbar	0
geringe Färbeintensität der Kerne	1
mäßige Färbeintensität der Kerne	2
starke Färbeintensität der Kerne	3

Anzahl positiver Zellen (PP)	Score
keine positiven Kerne nachweisbar	0
weniger als 10 % positive Zellen (Kernfärbung)	1
10-50 % positive Zellen (Kernfärbung)	2
51-80 % positive Zellen (Kernfärbung)	3
mehr als 80 % positive Zellen (Kernfärbung)	4

Immunreaktiver Score: IRS = SI * PP**Tabelle 63:** Score-Werte bei der HER2 Immunohistochemie (basierend auf Diaz, 2001)

Färbung	Score	Her2 Überexpression
Keine Färbung bzw. Membranfärbung <10 % der Tumorzellen	0	Negativ
Sehr schwache (teilweise) Membranfärbung >10 % der Tumorzellen	1+	Negativ
Schwache bis mittlere vollständige Membranfärbung >10 % der Tumorzellen	2+	Schwach positiv => FISH
Starke vollständige Membranfärbung >10 % der Tumorzellen	3+	Stark positiv

10.2 Gradienten-PCR von PKM1 und PKM2

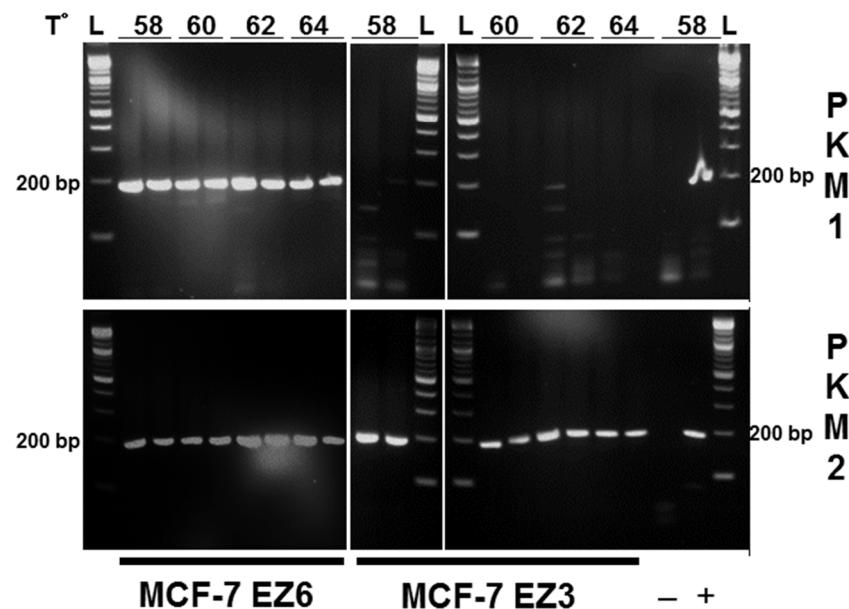


Abbildung 46: Gradienten-PCR von PKM1 und PKM2: Zwei MCF-7-Einzelzellen wurden mit PKM1 und PKM2 Primern getestet. MCF-7 EZ6 war zweifach positiv, MCF-7 EZ3 nur PKM2-positiv. Die erwartete Fragmentlänge betrug 190 bp für beide Transkripte. Die PCR wurde bei 58 °C, 60 °C, 62 °C und 64 °C durchgeführt. Bei 62 °C konnten die besten Ergebnisse beobachtet werden. EZ: Einzelzelle; L: DNA-Leiter; +: Positivkontrolle; -: Negativkontrolle; Größenstandard: 2-Log-DNA-ladder

10.3 Chromosomeneinteilung nach ISCN

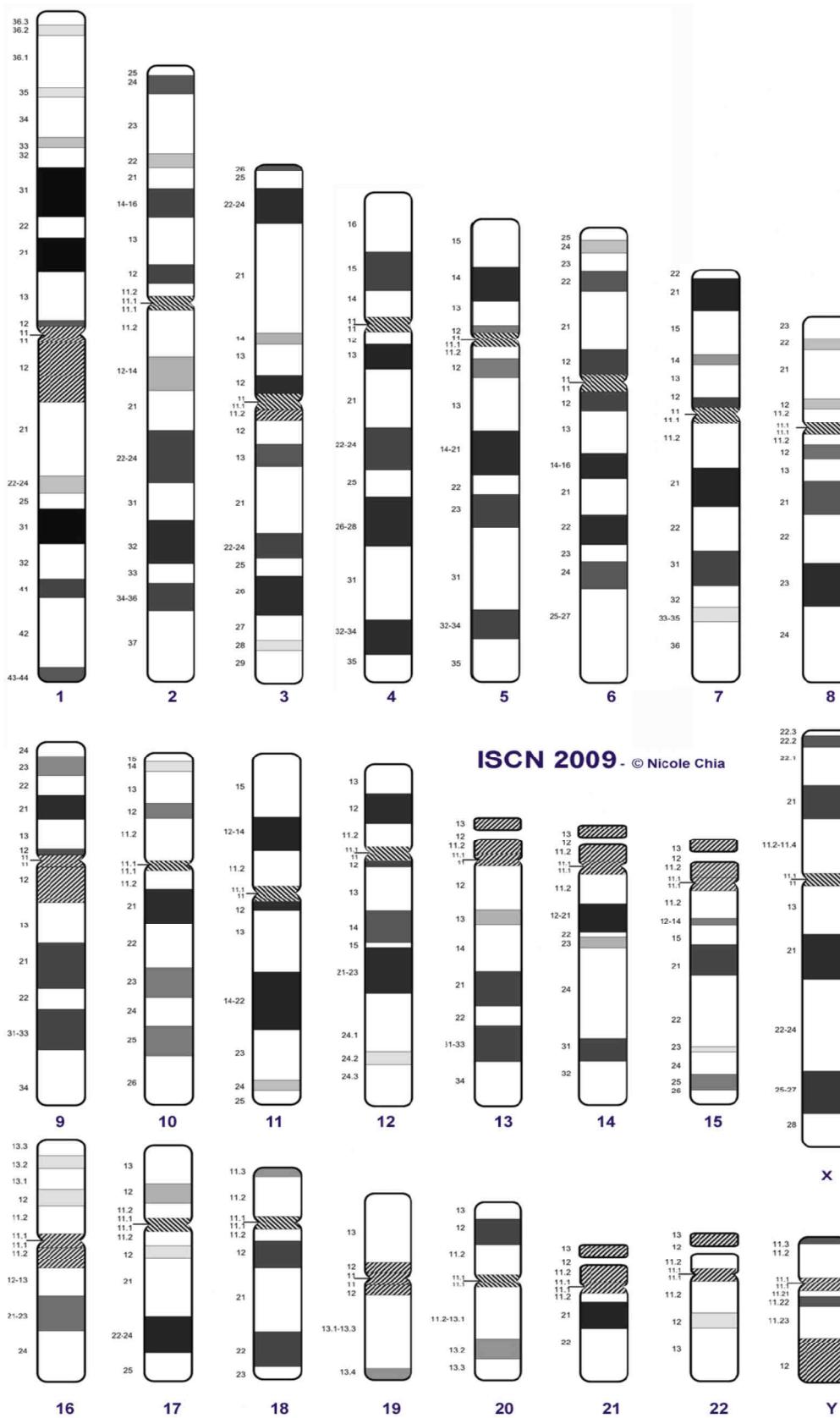


Abbildung 47: Chromosomeneinteilung nach ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)

10.4 Vergleich CK-Transkript positiver und negativer EpCAM⁺ Zellen

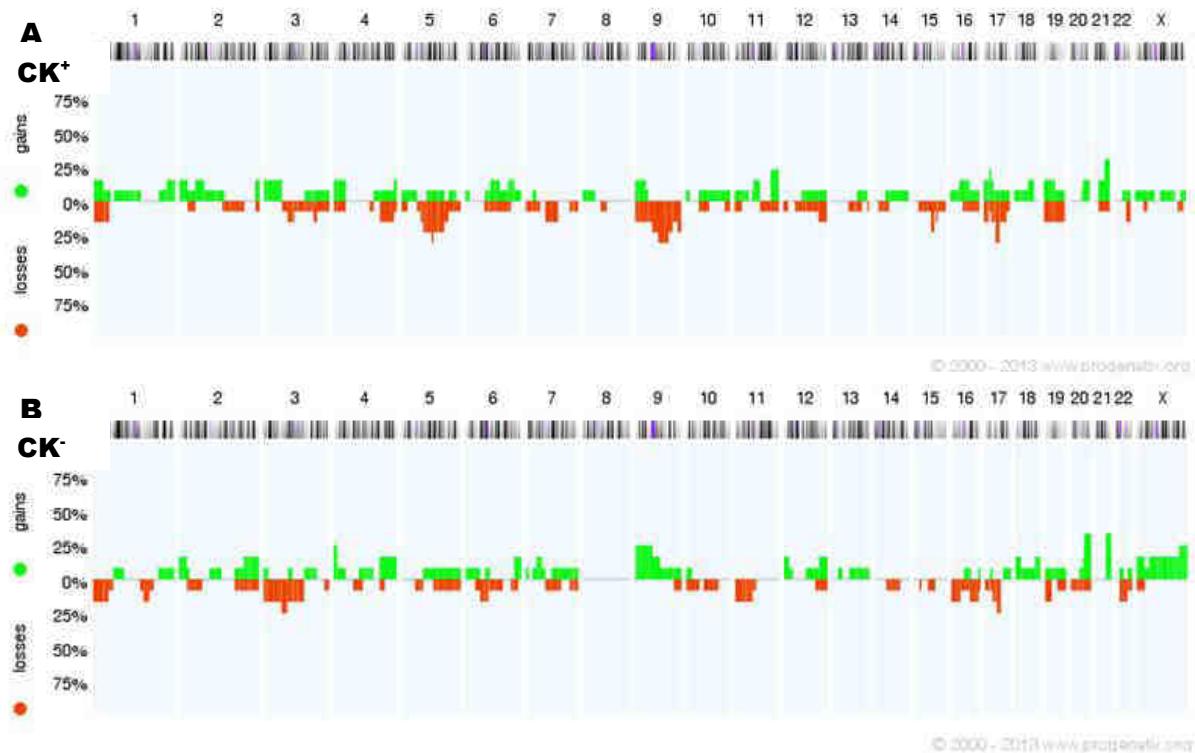
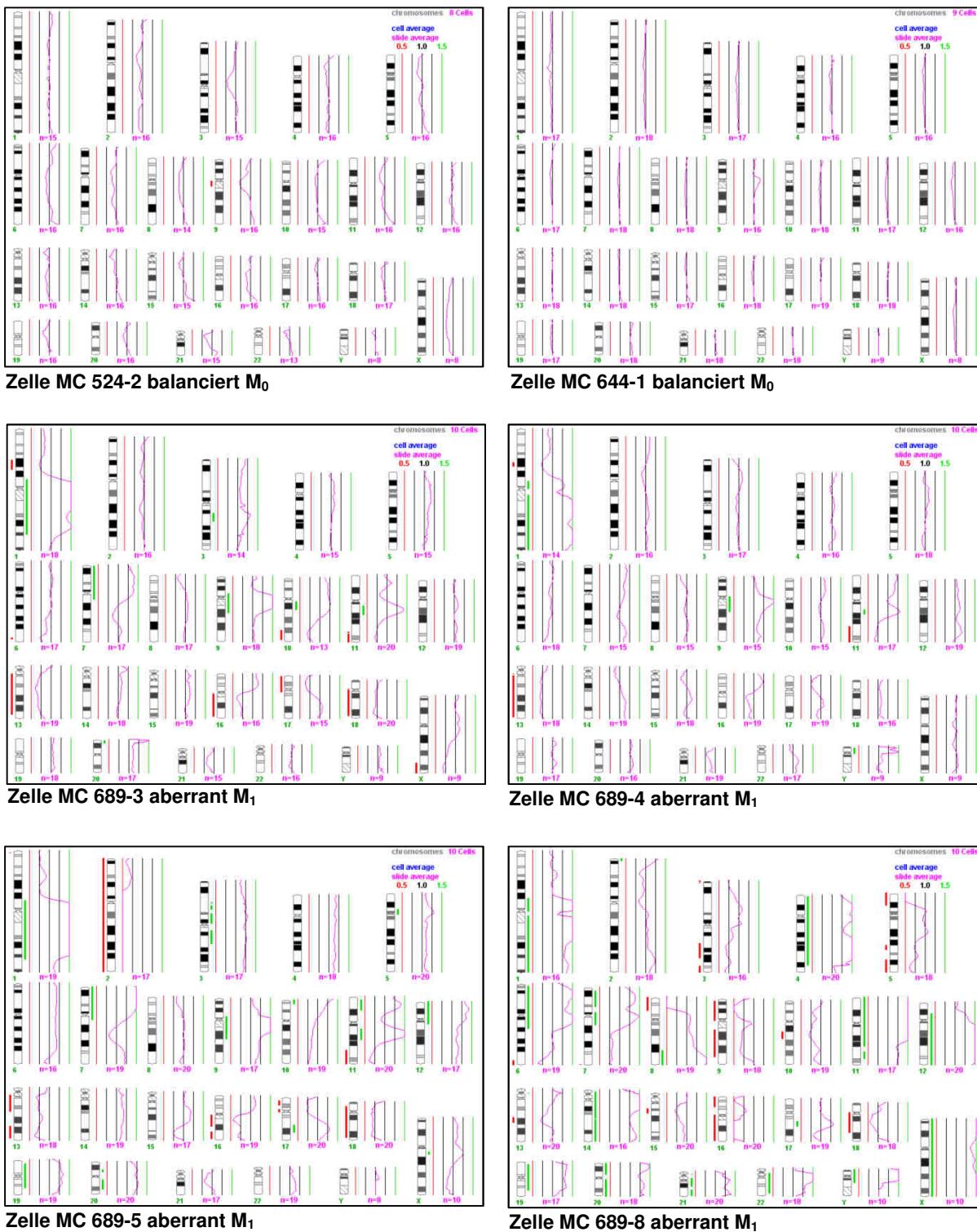
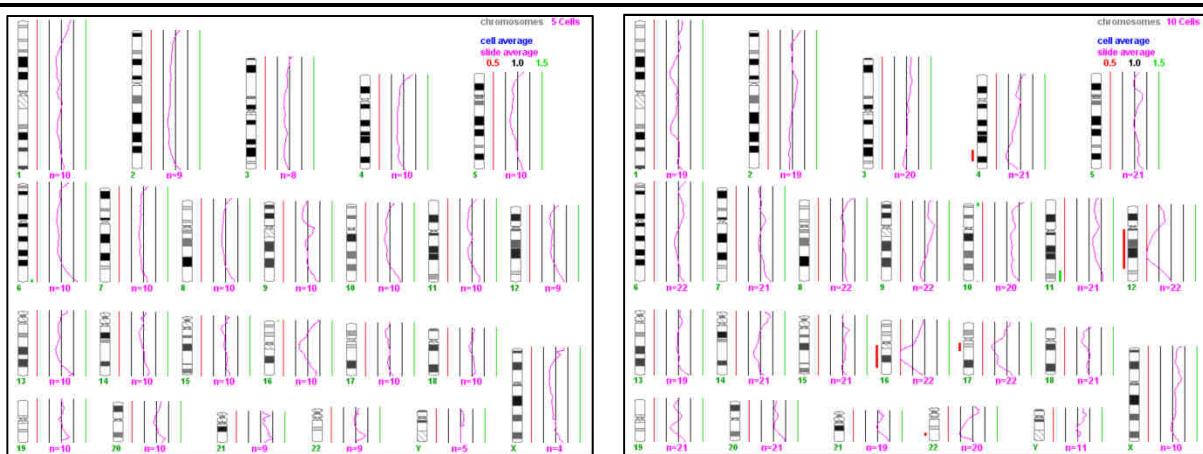
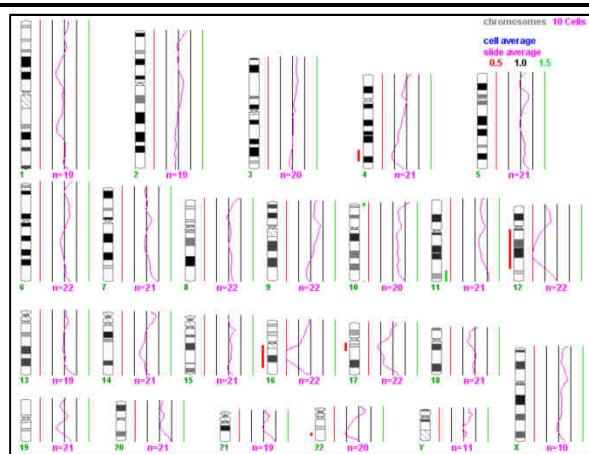
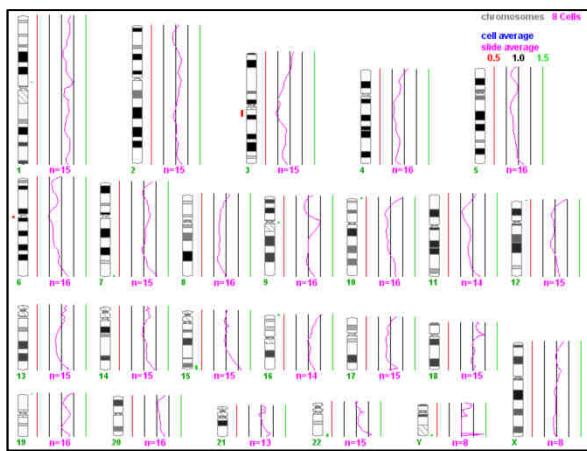
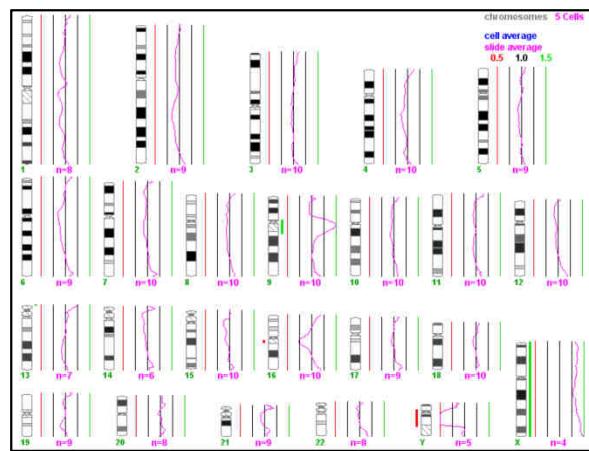
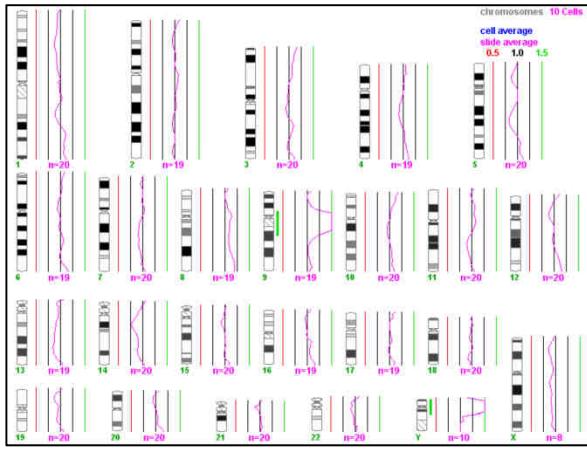
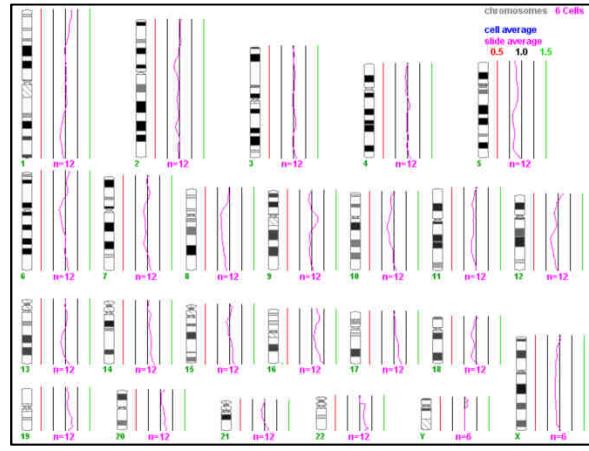
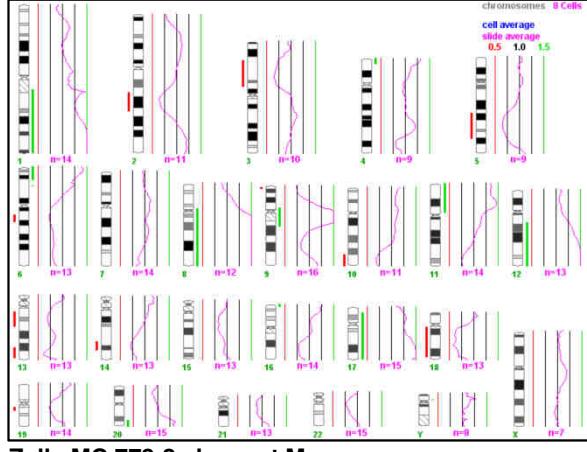
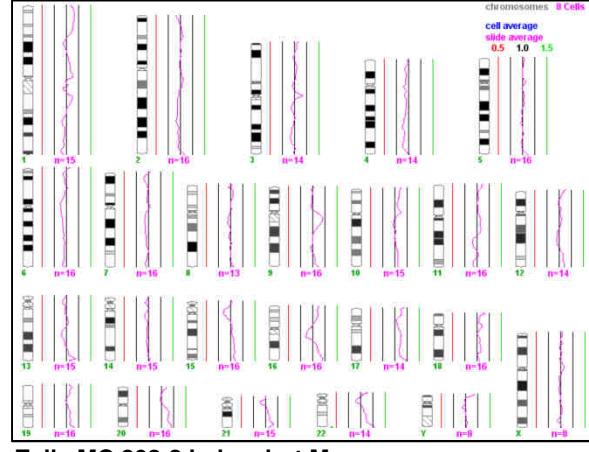
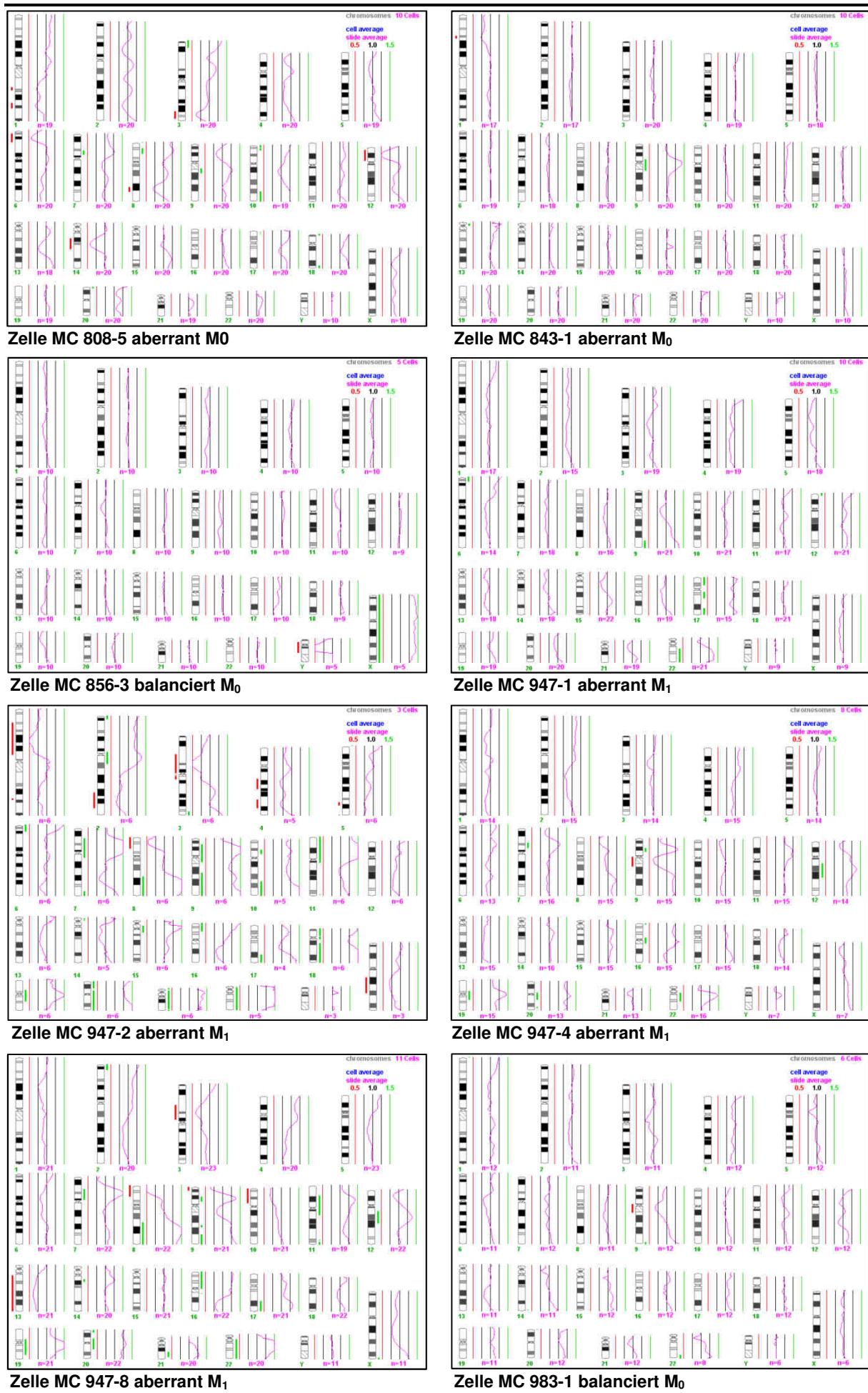


Abbildung 48: Histoplot der mCGH Aberrationen aller CK-Transkript-positiven bzw. -negativen M₀ DCC, dargestellt als Amplifikationen (grün) und Deletionen (rot) über den jeweiligen Chromosomen (horizontal) als prozentualer Anteil (vertikal) der jeweiligen Gruppe; A: 13 CK-Transkript-positive, EpCAM⁺ M₀ DCC; B: 13 CK-Transkript-negative, EpCAM⁺ M₀ DCC

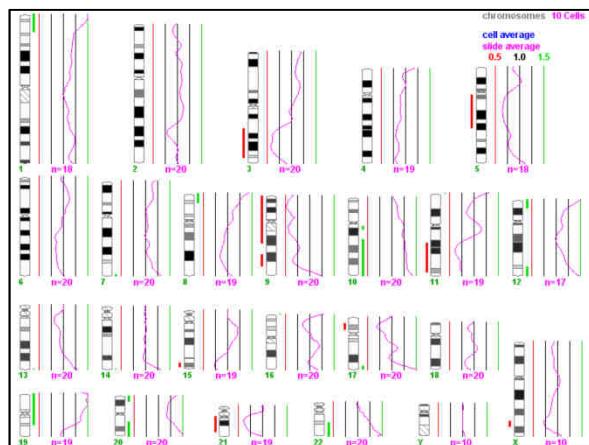
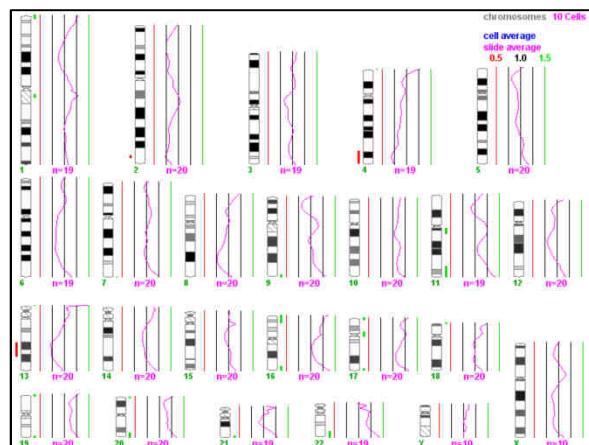
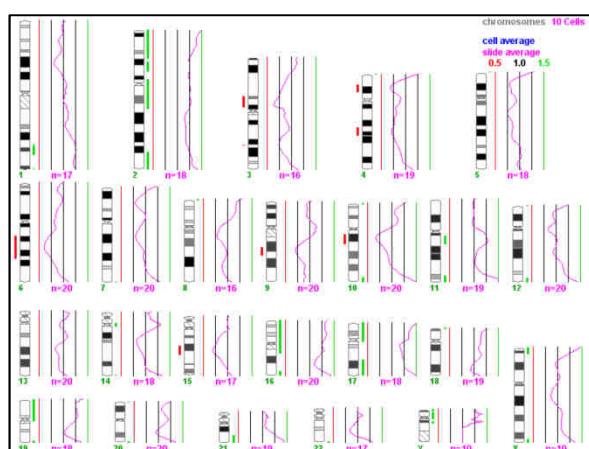
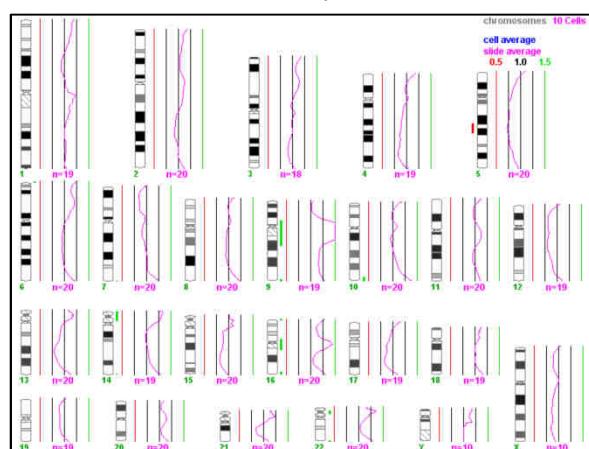
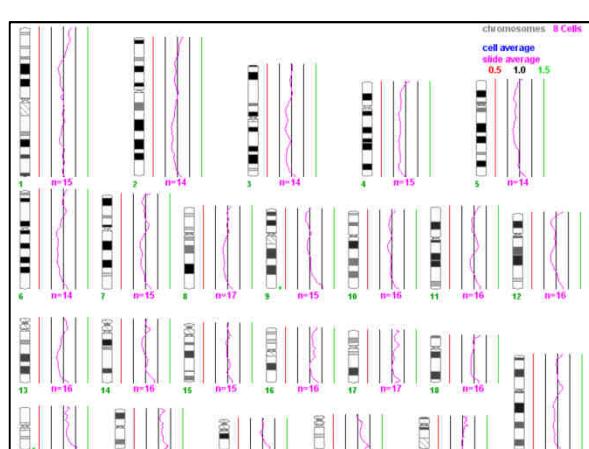
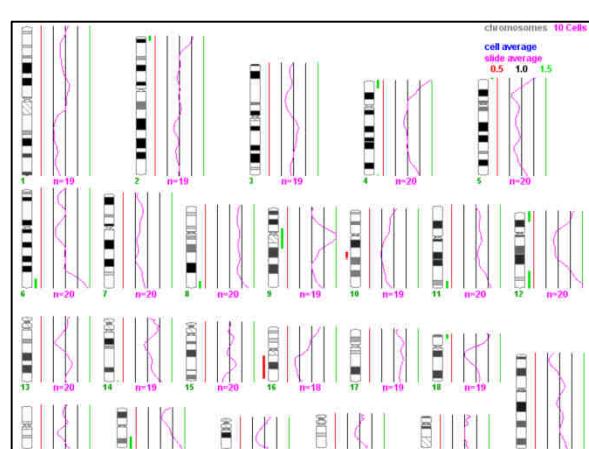
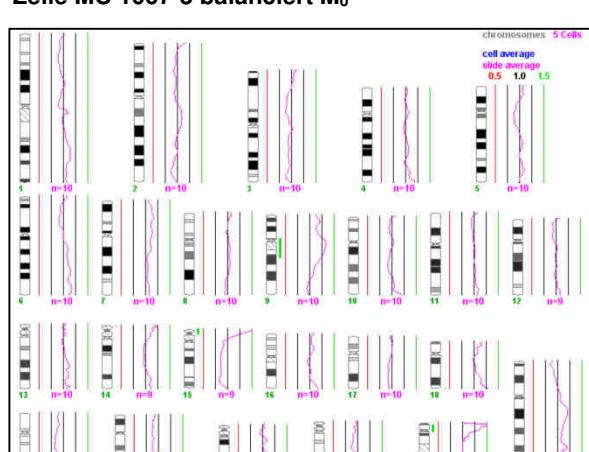
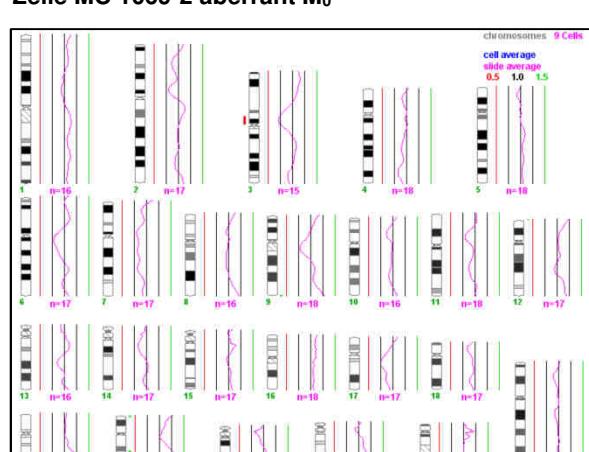
10.5 mCGH-Profile

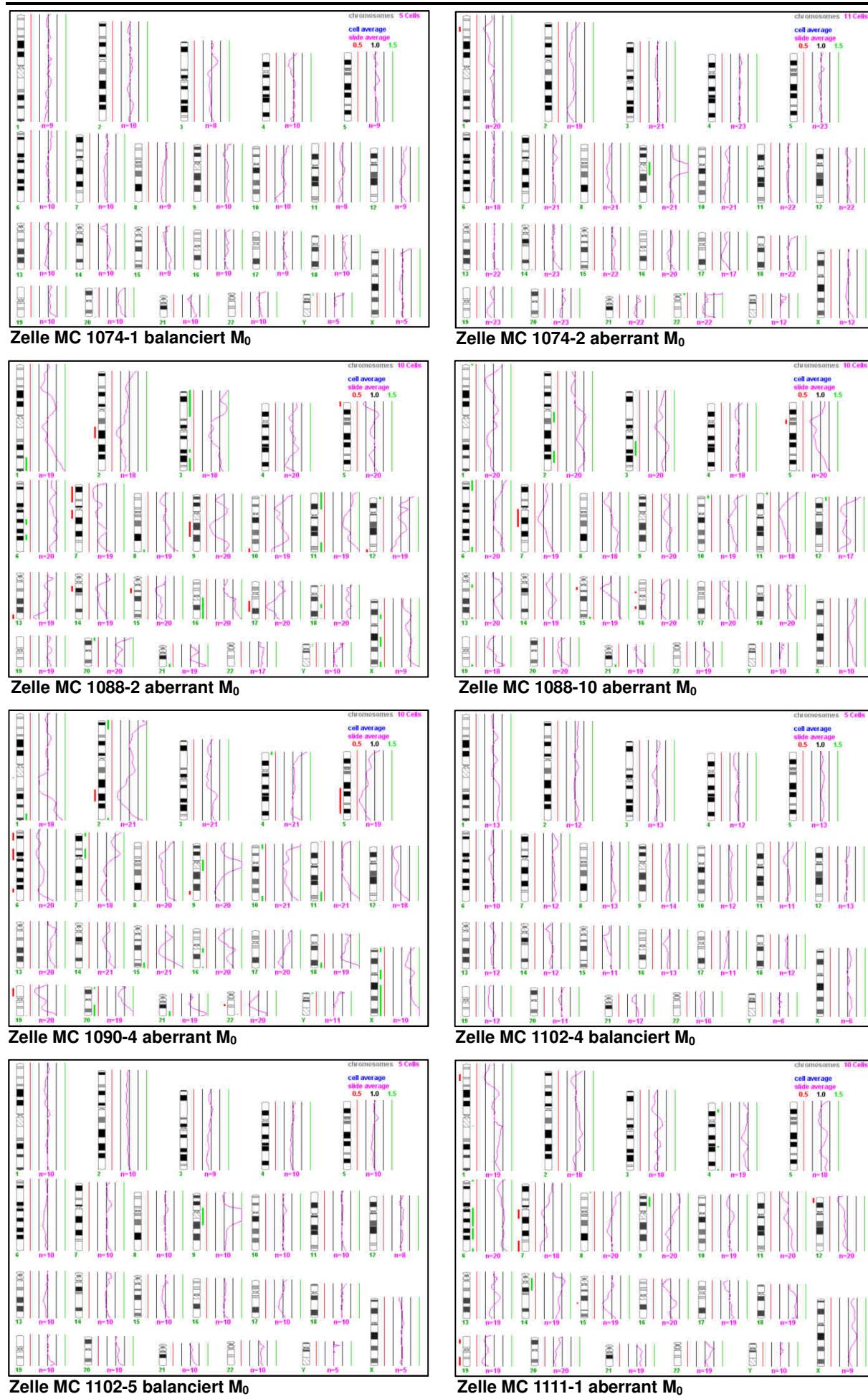


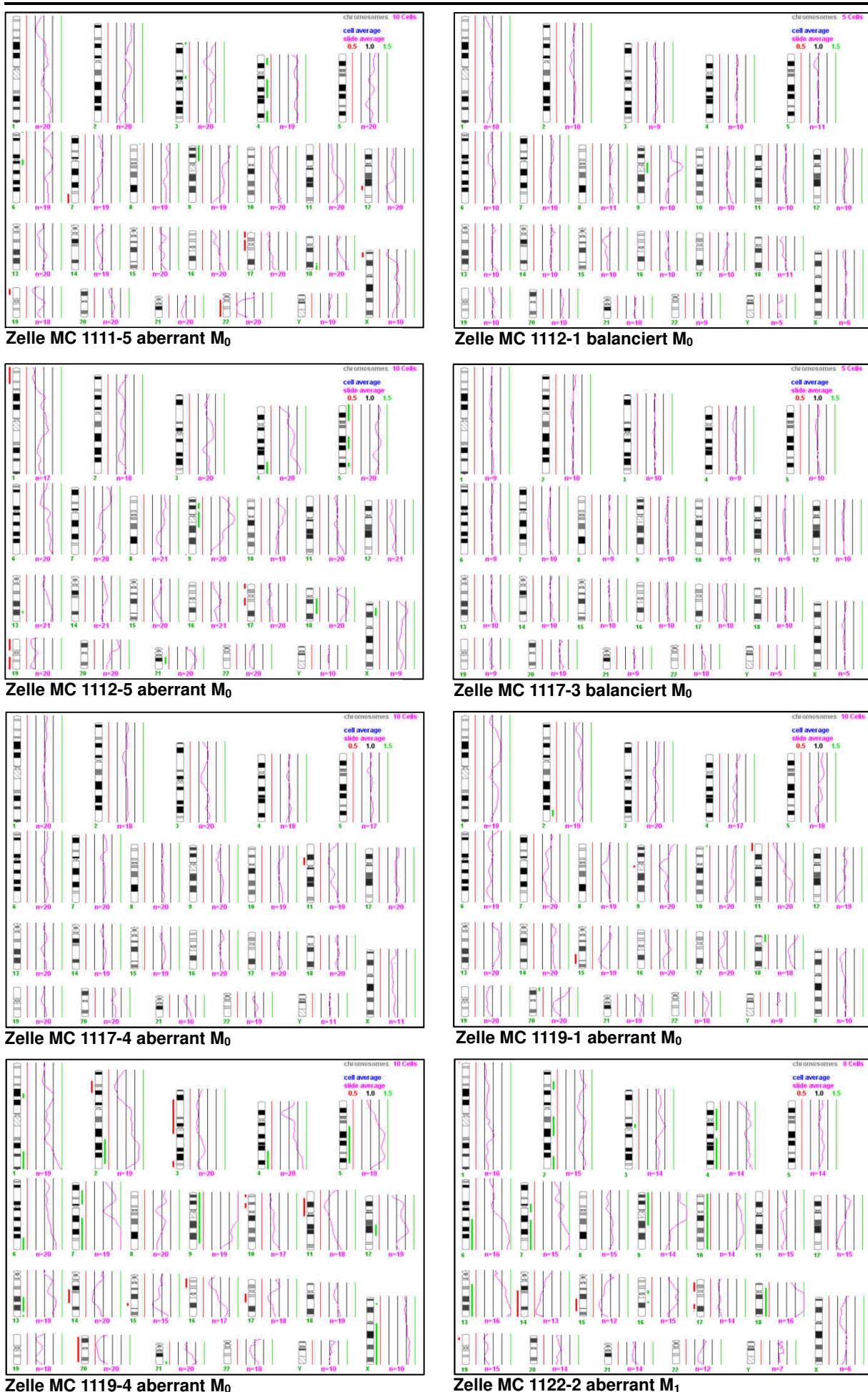
Zelle MC 741-1 balanciert M₀Zelle MC 741-3 aberrant M₀Zelle MC 741-4 aberrant M₀Zelle MC 741-9, EpCAM⁻, SM, balanciertZelle MC 746-4 balanciert M₀Zelle MC 746-5 balanciert M₀Zelle MC 773-2 aberrant M₁Zelle MC 802-2 balanciert M₀





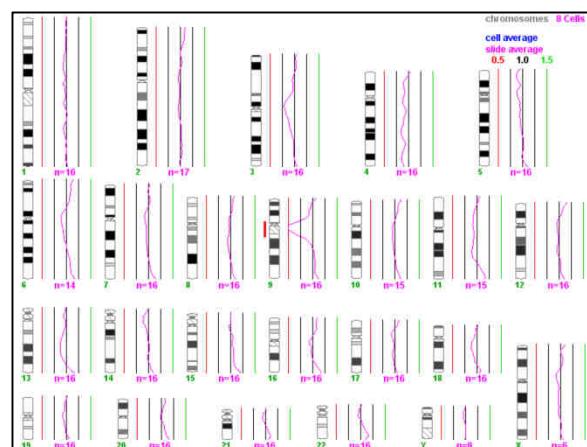
Zelle MC 1049-2 aberrant M₀Zelle MC 1058-2 aberrant M₀Zelle MC 1058-3 aberrant M₀Zelle MC 1059-2 aberrant M₀Zelle MC 1067-3 balanciert M₀Zelle MC 1069-2 aberrant M₀Zelle MC 1073-2 balanciert M₀Zelle MC 1073-3 aberrant M₀



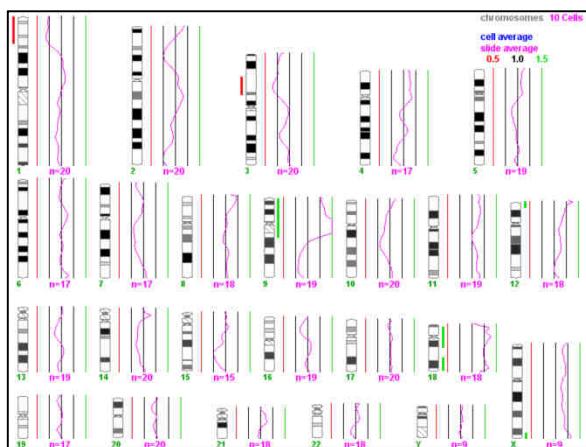




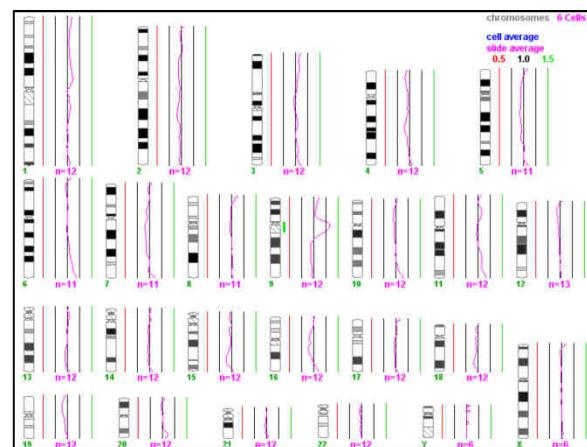
Zelle MC 1122-4 aberrant M₁



Zelle MC 1125-3 balanciert M₀



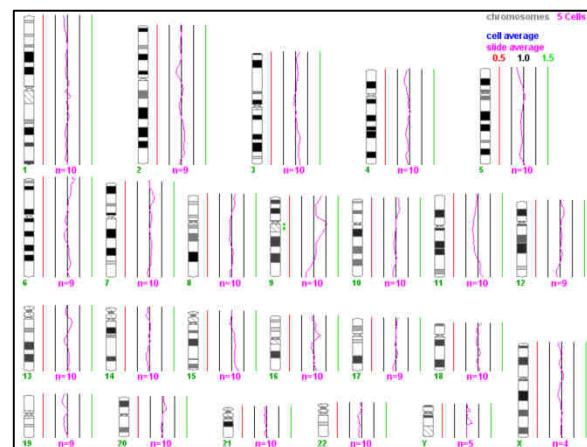
Zelle MC 1125-5 aberrant M₀



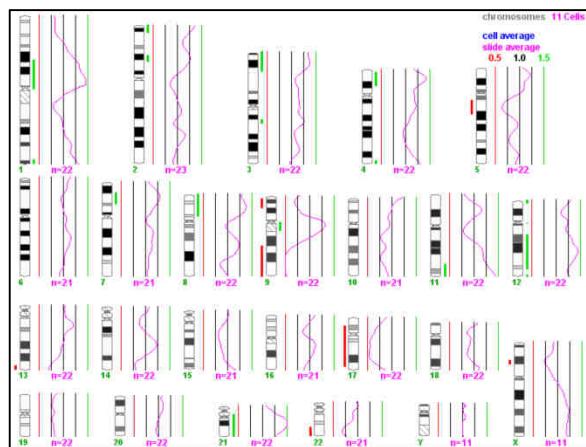
Zelle MC 1125-6 balanciert M₀



Zelle MC 1131-4 LK aberrant M₀



Zelle MC 1161-3 balanciert M₀



Zelle MC 1194-4 aberrant M₀