

Aus dem Institut für Tumorbiologie  
Direktor: Professor Dr. med. Klaus Pantel

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Etablierung einer Methode  
zur umfassenden zytogenetischen Charakterisierung  
disseminierter Tumorzellen  
mittels komparativer genomischer Hybridisierung**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin an der Universität Hamburg vorgelegt von

Holger Thurm  
aus Stuttgart

Hamburg, 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Koreferent:

# INHALT

Abkürzungsverzeichnis.....	III
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die häufigste Krebserkrankung der Frau: Das Mammakarzinom .....	1
1.2 Frühe hämatogene Metastasierung des Mammakarzinoms und adjuvante Therapie .....	2
1.3 Detektion und klinische Bedeutung hämatogen disseminierter Tumorzellen ...	3
1.4 Biologische Eigenschaften disseminierter Tumorzellen mit therapeutischen Implikationen .....	6
1.5 Zellkultur, Anreicherung und genetische Charakterisierung CK-positiver Kulturzellen mittels komparativer genomischer Hybridisierung .....	7
1.6 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit .....	13
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
2.1 Material.....	14
2.1.1 Geräte.....	14
2.1.2 Chemikalien und sonstige Materialien.....	14
2.1.3 Antikörper und Antikörperkonjugate.....	17
2.1.4 Pufferlösungen und Kulturmedien.....	18
2.1.5 Oligonukleotide.....	20
2.2 Methoden .....	20
2.2.1 Expansion CK-positiver Zellen durch Primärzellkultur .....	20
2.2.2 Cytospin-Präparationen.....	21
2.2.3 Immunzytochemie.....	21
2.2.4 Anreicherungsverfahren mit Dynal-Microbeads (Dynabeads).....	23
2.2.5 Anreicherungsverfahren mit MACS-Zytokeratin-Microbeads.....	24
2.2.6 Laser-Mikrostrahl-Mikrodissektion / Laser-Druck-Katapultation .....	25
2.2.7 Zellaufschluß für DOP-PCR .....	25
2.2.8 DOP-PCR.....	26
2.2.9 DNA-Gelelektrophorese .....	26
2.2.10 PCR-Markierung von Produkt aus der DOP-PCR (Label-DOP-PCR).....	27
2.2.11 DNA-Konzentrationsbestimmung .....	27
2.2.12 Markierung von Referenz-DNA durch Nick-Translation.....	27
2.2.13 MseI-Adapter-PCR .....	28
2.2.14 Komparative genomische Hybridisierung (CGH) .....	30

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	32
3.1	<b>Patientenkollektiv</b> .....	32
3.2	<b>Zellkultur</b> .....	32
3.3	<b>Versuch der präparativen Anreicherung CK-positiver Zellen aus Knochenmarkprimärkulturen mittels immunmagnetischer Verfahren</b> .....	37
3.3.1	Anreicherung mit Dynabeads .....	37
3.3.2	Anreicherung mit MACS Zytokeratin Microbeads .....	41
3.4	<b>Isolierung CK-positiver Zellen mittels Laserdissektion/katapultation und nachfolgende Genomamplifikation</b> .....	43
3.4.1	DOP-PCR von genomischer DNA und Zellsuspensionen.....	43
3.5	<b>Komparative genomische Hybridisierung (CGH)</b> .....	49
3.5.1	CGH mit DOP-PCR-Produkt.....	49
3.5.2	CGH mit MseI-Adapter-PCR-Produkt .....	52
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	56
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	66
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	67
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	79
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	80
	<b>ERKLÄRUNG</b> .....	81

## Abkürzungsverzeichnis

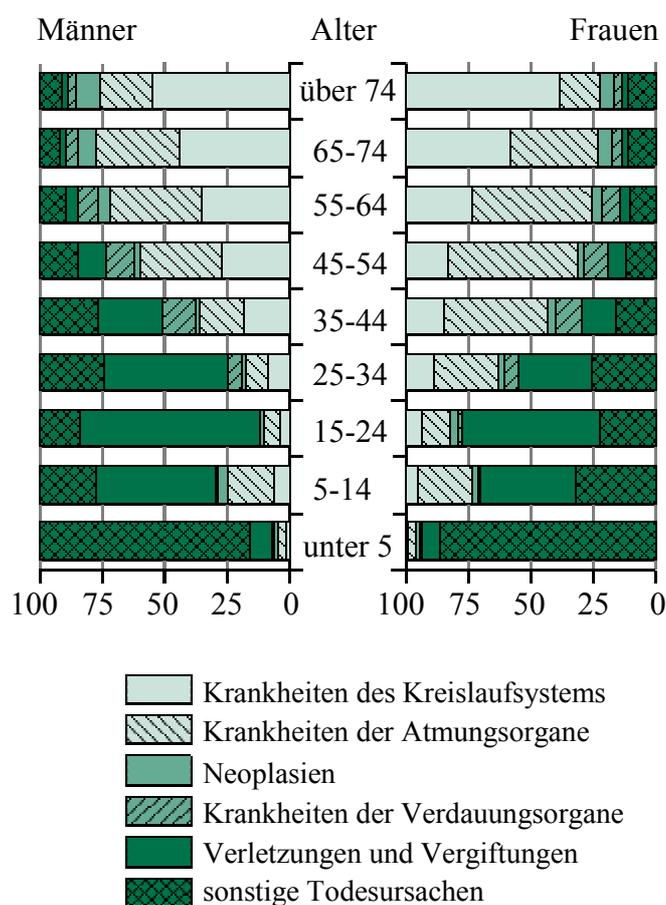
Ag	Antigen
APAAP	Alkalische Phosphatase Antialkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat
bp	Basen-Paar (in Nukleinsäuren)
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Karzinom
CCD	charge coupled device (Ladungsgekoppeltes Gerät)
CGH	Komparative Genomische Hybridisierung
CK	Zytokeratin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMF	N,N-Dimethylformamid
DOP-PCR	Degenerated oligonucleotide primed polymerase chain reaction
DTC	Disseminierte Tumorzellen
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
f.c.	final concentration – Endkonzentration
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
KM	Knochenmark
LMM	Laser Microbeam Microdissection (Laser-Mikrostrahl-Dissektion)
LPC	Laser Pressure Catapulting (Laser-Druck-Katapultation)
MAb	Monoklonaler Antikörper
MNC	Mononukleäre Zellen
MOPC	Mineralöl induziertes Plasmozytom
MPC	Magnetischer Partikel Konzentrador
NaOAc	Natriumacetat
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
OFA	One for all
OT	Objektträger

PAI-1	Plasminogenaktivator-1
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit)
uPA	Urokinaselike plasminogen activator
UV	Ultraviolett
w/o	without – ohne

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die häufigste Krebserkrankung der Frau: Das Mammakarzinom

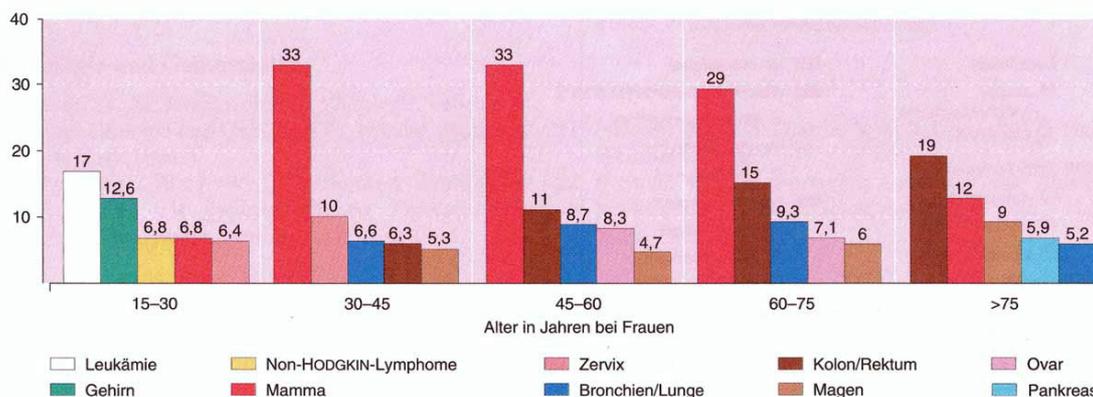
Mit Zunahme der Lebenserwartung im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich auch das Spektrum der Todesursachen verändert. Standen zu Beginn des Jahrhunderts noch infektiöse Ursachen im Vordergrund, so sind es heute vornehmlich bösartige Neubildungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Obwohl in der Europäischen Union für die meisten malignen Neoplasien seit Beginn der 90er Jahre ein Stillstand oder sogar ein Rückgang hinsichtlich der Mortalitätsrate zu verzeichnen ist (Levi et al. 1999), stellen Krebserkrankungen neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen noch immer die häufigste Todesursache der über 35jährigen Bevölkerung in Deutschland dar. Abbildung 1.1 illustriert in Abhängigkeit vom Alter die häufigsten Todesursachen.



**Abbildung 1.1 Altersspezifische Bedeutung ausgewählter Todesursachen 1995.** Die Sterbeziffern sind auf Europa-Standardbevölkerung standardisiert. Quelle: StBA, Todesursachenstatistik.

Bei Frauen in den westlichen Ländern stellt die Erkrankung an einem Mammakarzinom und deren Folgen nicht nur die häufigste Krebstodesursache dar, sondern sie bedeutet mit 21% aller neu diagnostizierten Krebsfälle auch die häufigste maligne Neoplasie für die Frau überhaupt (Pisani et al. 1999). In Deutschland liegt das Risiko einer Frau, im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken, bei etwa 1:9 (Gesundheitsbericht für Deutschland, Statistisches Bundesamt 1998). Bereits in der relativ jungen Altersgruppe der 30 bis 45jährigen Frauen ist es mit rund einem Drittel für den größten Anteil aller Krebstodesursachen verantwortlich und tritt erst in der Altersgruppe

der über 75jährigen Frauen hinter das kolorektale Karzinom zurück. Abbildung 1.2 soll diesen Zusammenhang exemplarisch für das Jahr 1993 in Deutschland demonstrieren. Für die Frau stellt also insbesondere das Mammakarzinom bereits ab dem dreißigsten Lebensjahr eine gesundheitliche Bedrohung dar. Vielleicht ist der wichtigste pathogenetische Teilaspekt dieser Erkrankung dabei in einer potentiellen frühzeitig hämatogenen Streuung von Tumorzellen zu sehen. Dieser Aspekt soll im nächsten Kapitel näher betrachtet werden.



**Abbildung 1.2 Krebstodesursachenstatistik 1993 für Frauen.** Dargestellt sind die nach dem Alter aufgeschlüsselten Krebstodesursachen. Berechnet nach StBA, Todesursachenstatistik 1993. Quelle: Bühling et al. 1995.

## 1.2 Frühe hämatogene Metastasierung des Mammakarzinoms und adjuvante Therapie

Noch vor rund hundert Jahren war es unter Medizinern der damaligen Zeit eine weit verbreitete Ansicht, die Lebensbedrohlichkeit des Mammakarzinoms läge an seinem lokal aggressivem Wachstum. So war auch Sir William Halsted, der Begründer der nach ihm benannten radikalen Operation des Mammakarzinoms um die Jahrhundertwende der festen Überzeugung, daß Brustkrebs in erster Linie eine lokale Erkrankung wäre und Tochtergeschwülste (beispielsweise des Hüftknochens) aufgrund eines per continuitatem zentrifugalen Wachstums des Tumors über teilweise anatomisch nicht genau bekannte Lymphwege entstünden (Halsted 1898, Halsted 1907). Gelänge die lokale Kontrolle ("in the broad sense") der Tumorerkrankung, so Halsted, könne man die Tumorerkrankung heilen. Er erkannte zwar, daß bei einigen Patientinnen, die später ihrer Erkrankung erlagen, zum Zeitpunkt der Operation an den Absetzungsrandern des Operationspräparats oder den lokalen Lymphknoten keine Tumorzellreste mehr nachgewiesen werden konnten, der Tumor also im Gesunden entfernt wurde. Dennoch schien dies paradoxerweise seine Überzeugung nur noch zu bestärken, nicht *radikal genug* operiert zu haben.

Erst viele Jahre später zeigte insbesondere Bernard Fisher in den von ihm initiierten Studien, daß weniger radikale Operationen für die betroffenen Frauen keinen Überlebensnachteil bedeuten müssen (Fisher et al. 1985). Ebenso wurde deutlich, daß ein brusterhaltendes Vorgehen mit zusätzlicher lokoregionärer, adjuvanter Radiotherapie das Lokalrezidivrisiko ebenso effektiv wie eine Mastektomie zu senken imstande ist (Veronesi et al. 1981). Die Entwicklung zu weniger radikalen Operationen hält mit dem Vorantreiben der Sentinel-Lymphknotenbiopsie-Technik bis heute an (Schrenk et al. 2000).

Das eigentliche Problem der Erkrankung bleibt aber in einer möglicherweise bereits vor der Operation eingetretenen, hämatogenen Aussaat der Tumorzellen bestehen. Es wurde geschätzt, daß eine Tumorzell disseminierung bereits ab einer Größe des Primärtumors von weniger als  $0,125 \text{ cm}^3$  einsetzen kann (Liotta et al. 1974). In etwa der Hälfte aller Fälle mit klinisch lokal begrenzter Erkrankung treten innerhalb von fünf Jahren Fernmetastasen auf. In der Untergruppe der nodalnegativen Patientinnen sind dies immerhin noch etwa ein Drittel der Fälle (DeVita et al. 1989, Veronesi et al. 1990). Entsprechend sind Mammakarzinome als eine systemische Erkrankung zu betrachten, bei denen die Prognose und Überlebenszeit der betroffenen Patientinnen in der Regel von dem Auftreten einer Fernmetastasierung bestimmt wird, auch wenn sich rein lokoregionär rezidivierende Wachstumsmuster gelegentlich als ein außerordentlich schwer zu behandelndes Krankheitsbild präsentieren können.

Um zusätzlich zur operativen Entfernung des Primärtumors einer bereits stattgefundenen, aber klinisch okkulten, hämatogenen Aussaat von Tumorzellen therapeutisch begegnen zu können, wurde eine Vielzahl adjuvanter Strategien entwickelt. Sie beinhalten neben endokrinen und immunologischen Schritten insbesondere auch die Anwendung von systemisch wirkenden Zytostatika. Zahlreiche Einzelstudien (Mansour et al. 1989, Ludwig Breast Cancer Group 1989, Fisher et al. 1989 a, Fisher et al. 1989 b) und mehrere Metaanalysen (European Breast Cancer Trialists' Corporation Group [EBCTCG] 1998) zeigten einen klaren statistischen Vorteil hinsichtlich der Überlebenszeit und rezidivfreien Überlebenszeit für derart adjuvant behandelte Patientinnen.

Da eine Chemotherapie mit zahlreichen, zum Teil schwerwiegenden, unerwünschten Nebenwirkungen einhergeht, besteht eine bis heute aktuelle Frage darin, wie sich für die individuelle Patientin ein ausreichend hohes Risiko für eine später auftretende Metastasierung definieren lassen könnte, um eine die Lebensqualität der Patientin mitunter hochgradig belastende adjuvante Chemotherapie zu rechtfertigen. Insbesondere in der Gruppe der Patientinnen mit tumorfreien, regionalen Lymphknoten zeigte sich bei Behandlung mit einer adjuvanten Chemotherapie im Vergleich zu den Frauen mit befallenen Lymphknoten eine deutlich geringere Senkung der 10-Jahres-Mortalität (EBCTG 1998). Um die gesamte Ausdehnung der Erkrankung sowie die Aggressivität und das Metastasierungspotenzial des Primärtumors besser abschätzen zu können, wurden neben der Beurteilung des lokoregionären Lymphknotenstatus weitere prognostische Marker etabliert, deren Gemeinsamkeit darin besteht, eine bestimmte Eigenschaft des Primärtumors statistisch mit dem Ergebnis des klinischen Verlaufs zu korrelieren. Neben ihrer prognostischen Bedeutung konnte einigen von Ihnen neuerdings auch eine prediktive beigemessen werden, wie das Beispiel des HER-2/neu oder des Proteasesystems uPA/PAI-1 zeigt (Baselga et al. 1996, Pegram et al. 1998, Look et al. 2002). Eine zusätzliche Möglichkeit, das Risiko für eine spätere Metastasierung besser abschätzen zu können, besteht in einem direkten, perioperativen Nachweis bereits hämatogen gestreuter Tumorzellen. Dieser Weg soll im folgenden Kapitel näher beleuchtet werden.

### **1.3 Detektion und klinische Bedeutung hämatogen disseminierter Tumorzellen**

Knochen und Knochenmark gelten beim Mammakarzinom neben Pleura, Lunge und der Leber als bevorzugtes Organ für eine mögliche Metastasierung. Die letztgenannten Organe sind allerdings weniger gut zugänglich als Knochenmark und bestehen zudem auch

aus epithelialen Komponenten, was einem immunhistochemischen Nachweis von epithelialen Karzinomzellen im Weg stehen könnte. Zudem besteht das Gefäßsystem des Knochenmarks aus einem einzigartigen sinuoidalen System, in dem es zu einem besonders intensiven Zellaustausch von zirkulierendem Blut und mesenchymalen Interstitium kommt. Man könnte sich daher dieses System als einen Filter vorstellen, der maligne Zellen aus der Blutbahn anreichert oder „gefangen“ hält. Daher lag es auf der Hand, dieses leicht zugängliche Kompartiment durch Knochenmarksaspiration zu biopsieren und es auf Vorhandensein von etwaigen Mikrometastasen hin zu untersuchen.

Zwar ließen sich auch schon mit Hilfe konventioneller histopathologischer Methoden mikrometastatische Tumorzellaggregate im Knochenmark von Patientinnen im Stadium M0 identifizieren, allerdings nur in etwa vier Prozent der untersuchten Fälle (Ridell und Landys 1979). Weitaus höhere Detektionsraten in dieser Patientengruppe ließen sich unter Anwendung immunhistochemischer Methoden und in jüngerer Zeit auch mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-PCR (RT-PCR) erzielen, die den Nachweis von Tumorzellen auf mRNA-Ebene erbringt (Burchill et al. 1995, Zippelius et al. 1997, Jung et al. 1998). Mit diesen Methoden war es sogar erstmals möglich, einzelne Tumorzellen nachzuweisen. Das Prinzip beruhte dabei auf dem Nachweis molekularer Marker, die möglichst spezifisch für epitheliale Tumorzellen sind und nicht von den hämatopoetischen Zellen mesenchymaler Herkunft des Knochenmarks exprimiert werden. So gelang es Dearnaley et al. als eine der ersten Wissenschaftler, mit einem polyklonalen Antiserum gegen das epitheliale Membranantigen (EMA) einzelne Tumorzellen im Knochenmark bei insgesamt 3/30 (10%) der untersuchten Patientinnen mit einem frühen Mammakarzinom zum Zeitpunkt der primären Operation zu identifizieren (Dearnaley et al. 1981), während Redding et al. bei einem größeren Kollektiv bei 28% der Patientinnen einen "Knochenmarkpositiven" Befund erhob (Redding et al. 1983).

Allerdings erfüllte der Marker EMA nur sehr bedingt das Kriterium der Spezifität (Taylor-Papadimitriou et al. 1985, Delsol et al. 1984). Ähnliches galt auch für andere tumorassoziierte Antigene - zumeist mucinähnliche Oberflächenproteine, die zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark eingesetzt wurden, wie beispielsweise TAG12 (Ahr et al. 1999) oder MUC-1 (Brugger et al. 1999). Eine höhere Spezifität für epitheliale Tumorzellen konnten dagegen Zytokeratine als integrale Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen erlangen (Poston und Sidhu 1986, Thomas und Battifora 1987, Thor et al. 1988, Pantel et al. 1994). Diese ausschließlich als Dimer auftretende Proteine mit mindestens zwanzig verschiedenen Familienmitgliedern werden von einer Vielzahl epithelialer Malignome reichlich und stabil exprimiert (Moll et al. 1982, Fuchs und Cleveland 1998). Ein ganzes Arsenal monoklonaler Antikörper mit hoher Spezifität gegen die verschiedensten Zytokeratinepitope stehen heute zur Verfügung (Stigbrand et al. 1998), aber nicht alle wurden im Rahmen klinischer Studien evaluiert. Obwohl auch bei Zytokeratinen eine ektopische Expression (Doglioni et al. 1990) oder eine illegitime mRNA-Expression in mesenchymalen Zellen nicht vollständig auszuschließen ist (Traweek et al. 1993, Krismann et al. 1995, Zippelius et al. 1997, Bostick et al. 1998, Jung et al. 1998), konnte in zahlreichen Studien mit einer großen Anzahl von Kontrollpatienten nur äußerst selten eine Zytokeratinexpression in hämatopoetischen Zellen festgestellt werden (Schlimok et al. 1987, Cote et al. 1988, Pantel et al. 1994, Pantel et al. 1996, Braun et al. 1998). Erschwerend bei allen Arten der immunzytochemischen Analyse ist die subjektive Auswertung zytologischer Präparate, weswegen objektive Kriterien zur Beurteilung immunzytochemisch gefärbter Einzelzellen erarbeitet wurden (Borgen et al. 1999).

Mit der beschriebenen immunzytochemischen Methode ließen sich in bisherigen Untersuchungen ein bis zwei epitheliale Zellen auf  $10^6$  umliegende, nicht-epitheliale Knochenmarkzellen detektieren. Dieser Sensitivität entspricht in etwa gerade die Häufigkeit, mit der Zytokeratin-positive Zellen in einer mittels einer Dichtegradienten-Zentrifugation aufgearbeiteten Knochenmarkprobe einer Patientin mit primärem Mammakarzinom vorkommen. In den meisten Untersuchungen waren dies im Median weniger als zehn solcher Zellen pro  $2 \times 10^6$  standardmäßig analysierten mononukleären Zellen (Pantel et al. 1994, Osborne et al. 1989). Bei Patientinnen mit einem primärem Mammakarzinom und negativem Nodalstatus fanden Gerber et al. bei 126 von 484 Patientinnen (26%) Zytokeratin-positive Zellen und Braun et al. bei 100 von 301 (33%) Patientinnen. Lag ein nodalpositiver Status vor, konnten Gerber et al. bei 26 von 70 Patientinnen (37%) und Braun et al. bei 251 von 552 Patientinnen (61%) solche Zellen detektieren (Gerber et al. 2001, Braun et al. 2000b).

Nachdem die technische Darstellbarkeit disseminierter Tumorzellen gegeben war, kam verständlicherweise die Frage nach der klinischen Bedeutung dieser Zellen auf. Um eine prognostische Aussage ableiten zu können, wurden zahlreiche klinische Follow-up Studien initiiert. Während einige Studien die prognostische Bedeutung dieser okkulten metastatischen Zellen hinsichtlich Gesamt- und rezidivfreiem Überleben beim primären Mammakarzinom bestätigen konnten (Harbeck et al. 1994, Diel et al. 1996, Landys et al. 1998, Mansi et al. 1999, Braun et al. 2000 b, Gebauer et al. 2001, Gerber et al. 2001), so konnten es andere, vor allem Studien älteren Datums, wiederum nicht (Porro et al. 1988, Salvadori et al. 1990, Mathieu et al. 1990, Courtemanche et al. 1991, Singletary et al. 1991, Molino et al. 1997, Untch et al. 1999). Auch eine Metaanalyse mit über zweitausend Patienten aus zwanzig Studien konnte einen positiven Knochenmarkbefund nicht als unabhängigen prognostischen Faktor hinsichtlich Überleben und Gesamtüberleben untermauern (Funke et al. 1998). Ein Haupteinwand gegen die Aussagekraft dieser Metaanalyse betrifft die Tatsache, daß den Ergebnissen der Einzelstudien weitgehend unterschiedliche, nicht vergleichbare Detektionsmethoden zugrunde lagen. Im Gegensatz zu den Studien älteren Datums und negativem Ergebnis zeichnen sich die neueren mit positivem Ergebnis durch größere Fallzahlen, längere Follow-up-Zeiten sowie validierte Detektionsmethoden mit definierten Probengrößen, standardisierter Probenaufarbeitung und Antikörpern aus. Hierzu zählte insbesondere eine von Braun und Pantel et al. groß angelegte Studie mit über 500 Patienten, vier Jahren Follow-up und validierter Detektionsmethodik. In ihr war der Nachweis okkult metastatischer Zellen im Knochenmark mit einem signifikant höheren Risiko für das Auftreten klinisch manifester distanter Metastasen sowie einem reduziertem Gesamtüberleben assoziiert. Dies konnte unabhängig vom Nodalstatus oder einer verabreichten, adjuvanten Chemotherapie gezeigt werden. Der Effekt durch das Vorhandensein okkult mikrometastatischer Zellen war ganz besonders deutlich bei nodalnegativen Patienten zu erkennen. Bei ihnen war nämlich ein ähnliches Gesamtüberleben wie bei nodalpositiven Patientinnen, bei denen keine disseminierten Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden konnten, zu beobachten (Braun und Pantel et al. 2000). Darüber hinaus war der Tumorzellnachweis mit einem signifikant höheren Risiko für das Auftreten einer Fernmetastasierung, insbesondere dem einer Knochenmetastasierung, nicht aber einem Lokalrezidiv assoziiert. Dies wurde von den Autoren als ein Hinweis für das tatsächliche Vorhandensein potentieller metastatischer Stammzellen unter dem im Knochenmark verstreuten Zytokeratin-positiven Zellen interpretiert. Obwohl somit inzwischen zahlreiche klinisch orientierte Studien zur Detektion und prognostischen Bedeutung disseminierter Tumorzellen vorliegen, bleiben

viele Fragen bezüglich der biologischen Eigenschaften hämatogen disseminierten Zellen offen.

#### **1.4 Biologische Eigenschaften disseminierter Tumorzellen mit therapeutischen Implikationen**

Entstammen diese Zellen alle einem einzigen, metastatischen Klon des Primärtumors oder entstammen sie verschiedenen Vorläuferzellen? Wie heterogen ist diese Zellpopulation und welchem genetisch-dynamischen Prozeß unterliegt sie? In welchem Zustand befinden sich die Zellen? Zumindest für das Blut wurde ein hoher apoptotischer Anteil dieser Zellen beschrieben (Mehes et al. 2001), der aller Wahrscheinlichkeit nach niemals klinisch manifeste Metastasen verursachen wird. Aber gilt dies auch für jene Zellen, die das Knochenmark erreicht haben?

Die Annahme, daß disseminierte Tumorzellen für lange Zeit nicht proliferationsaktiv sind und daher in einem Zustand der „Dormancy“ verharren (Uhr et al. 1997), wurde durch Doppelfärbungsstudien unterstützt, in denen die Fraktion der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, die den Proliferationsmarker Ki-67 oder p120 exprimieren, niedrig zu sein scheint (Pantel et al. 1993). Der Zustand der „Dormancy“ könnte auch eine der Ursachen für die relative Resistenz mikrometastatischer Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika sein (Braun et al. 2000a), was wiederum den Vorteil einer Therapieform unterstreichen würde, die unabhängig vom Proliferationsstatus dieser Zellen wirken würde. Zu welchem Zeitpunkt und durch welchen Trigger der Zustand der Dormancy im weiteren, postoperativen Verlauf aufgehoben werden kann, bleibt weiterhin unklar.

Wie hoch ist der Anteil der Zellen mit einem hohen, metastatischen Potenzial zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Primärtumors und durch welche (genetischen) Eigenschaften zeichnen sich diese, für das spätere Auftreten eines eventuellen Rezidivs verantwortlichen metastatischen Stammzellen aus? Wie ändert sich deren Verhalten im klinischen Verlauf nach erfolgter Operation und welcher Bedeutung kommt dabei einer eventuell verabreichten, adjuvanten Therapie zu? – Auch dies sind weitgehend ungeklärte Fragen.

Das Vorliegen von systemisch disseminierten Tumorzellen stellt sicherlich eine notwendige Voraussetzung, aber noch keine hinreichende Bedingung für das Zustandekommen einer späteren metastatischen Erkrankung dar. Ein indirekter Hinweis dahingehend war die Beobachtung, daß beim Vergleich von Karzinomen, die vorzugsweise Knochenmetastasen bilden (z.B. Mamma-, Bronchial-, Schilddrüsenkarzinome) mit solchen, bei denen dies eher selten der Fall ist (z.B. gastrointestinale Karzinome, Ovarialkarzinom) in frühen Erkrankungsstadien ein ähnlich hoher Prozentsatz von Patienten mit „knochenmarkspositivem“ Befund festzustellen war, was sich erst bei fortgeschrittener Erkrankung änderte. In dieser Situation ließ sich beim Mammakarzinom ein wesentlich höherer Patientenanteil mit Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark beobachten als beispielsweise beim Kolonkarzinom (Pantel et al. 1997). Daß dieser Unterschied erst im fortgeschrittenen Tumorstadium sichtbar wurde, könnte durch einen spezifisch für die disseminierten Mammakarzinomzellen im Knochenmark vorhandenen Wachstums-und/oder Überlebensvorteil erklärt werden. Dies würde ganz im Einklang mit der von Paget 1889 aufgestellten „seed and soil“ Hypothese (Paget 1889) stehen, wonach nur bestimmte, begünstigte Tumorzellen („seed“) eine spezifische Affinität für das

Wachstumsmilieu bestimmter, spezifischer Organe hätten („soil“), eine Vorstellung, die auch heute nichts an Aktualität eingebüßt hat (Fidler 1995).

Hinsichtlich des malignen Potenzials Zytokeratin-positiver Zellen wurden bereits eine Reihe tumorassoziierter Eigenschaften, vor allem mittels immunzytochemischer Doppelfärbungen, identifiziert. So war beispielsweise die Expression des uPA-Rezeptors auf disseminierten Tumorzellen von Patienten mit einem Magenkarzinom mit einer höheren Anzahl dieser Zellen im Knochenmark sowie einer schlechteren Prognose verbunden als bei Patienten, die zwar auch CK-positive Zellen aufwiesen, aber nicht den uPA-Rezeptor exprimierten (Heiss et al. 1995). Dieses Ergebnis weist nicht nur auf die Bedeutung des uPA/PAI-1-Systems als Prognosefaktor beim Primärtumor hin (Jänicke et al. 2001, Look et al. 2002), sondern auch bei disseminierten Tumorzellen des Knochenmarks.

Ein weiteres Selektionskriterium für ein erhöhtes Metastasierungspotenzial könnte mit einer Überexpression des HER-2/neu-Rezeptors einhergehen. Bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom exprimierten okkulte Zellen des Knochenmarks diesen Rezeptor mit 60%-70% der Zellen deutlich häufiger als der Primärtumor selbst, wo man nur in 20%-39% der Fälle eine Überexpression beschrieben wurde (Pantel et al. 1993). Beim fortgeschrittenen Mammakarzinom waren sogar bei allen Patientinnen HER-2/neu-CK doppelpositive Zellen im Knochenmark zu finden. Diese Beobachtung könnte den Erfolg des therapeutischen Einsatzes von Trastuzumab (Herceptin®) in diesem Patientengut miterklären (Baselga et al. 1996, Pegram et al. 1998).

Der klinische Verlauf vieler Patientinnen mit einem Mammakarzinom zeigt, daß mikrometastatische Zellen jahrelang vom Immunsystem nicht erkannt werden können. In diesem Zusammenhang könnte daher eine fehlende MHC I-Expression, die als restriktives Element bei der T-Lymphozyten vermittelten Tumorzellerkennung eine Rolle spielt, einen wichtigen Überlebensvorteil für okkulte mikrometastatische Zellen zur Folge haben (Pantel et al. 1991). Eine herabgesetzte Expression von MHC I dieser Zellen könnte leider auch die Erfolgsaussichten auf einen „Tumorzellimpfstoff“ enge Grenzen setzen. Antikörper mit MHC-unabhängigen, immunologischen Wirkmechanismen sollten deshalb eine bessere Wirkung erwarten lassen.

### **1.5 Zellkultur, Anreicherung und genetische Charakterisierung CK-positiver Kulturzellen mittels komparativer genomischer Hybridisierung**

Das größte Hindernis beim Versuch okkulte Tumorzellen auf biologische Eigenschaften hin zu untersuchen, besteht in ihrer äußerst niedrigen Frequenz, mit der sie in einer typischen Knochenmarkprobe von etwa zehn Millilitern vorkommen. Untersuchungen zur Anreicherung dieser Zellen sind deshalb Gegenstand aktueller Forschung. Um dies zu bewerkstelligen wurden bisher ganz unterschiedliche Wege eingeschlagen, die in Hinblick auf eine möglichst große Ausbeute auch in vielfältiger Weise miteinander kombiniert wurden. Aus praktischen Gründen geht jede Anreicherungsstufe allerdings zwangsläufig auch mit einem gewissen Verlust an Tumorzellen einher.

Ein erster Anreicherungs-schritt besteht zumeist in der Zentrifugation einer Knochenmarkprobe über einen Dichtegradienten mit Ficoll oder ähnlich dichten

Materialien. Hierbei kommt es größtenteils zu einem Abtrennen der Erythro-, Granulo- und Thrombozyten im Sediment. In der Interphase reichern sich dagegen mononukleäre Zellen an (Boyum 1968), unter denen sich einzelne, maligne epitheliale Zellen in einer Frequenz von etwa  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  immunzytochemisch detektieren lassen (Pantel et al. 1994; vgl. auch Kapitel 1.3). Tumorzellen können sich dabei aber auch zu einem geringeren Anteil auch noch in anderen Fraktionen eines solchen Gradienten befinden (Partridge et al. 1999).

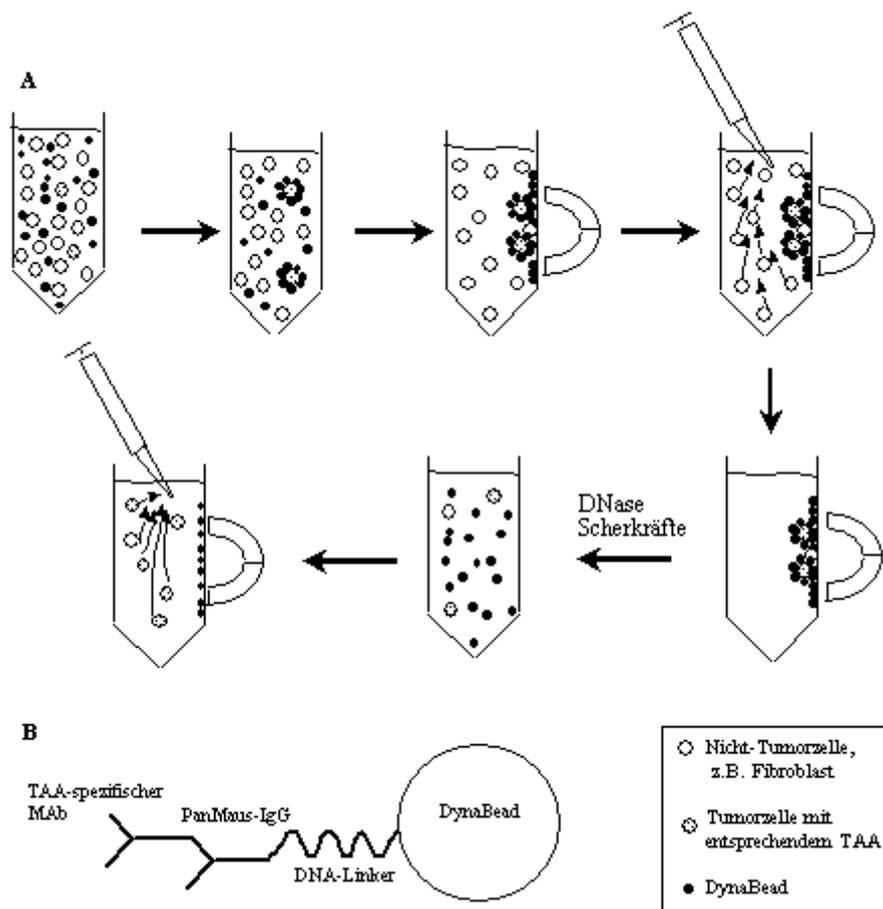
Die Zellkultur stellt eine weitere Möglichkeit der Anreicherung disseminierter, epithelialer Tumorzellen dar, wobei eine Reihe verschiedener Methoden beschrieben wurde (Ross et al. 1993, Pantel et al. 1995, Sharp et al. 1996, Rye et al. 1997, O'sullivan et al. 1999). Pantel et al. kultivierte die mononukleäre Zellfraktion eines Ficoll-Dichtegradienten der Knochenmarkproben von Patienten mit verschiedenen Tumor-entitäten unter besonderen Kulturbedingungen, die ein Anwachsen und die Proliferation epithelialer Zellen begünstigen, während der überwiegende Anteil der hämatopoetischen Zellen zugrunde geht bzw. durch regelmäßigen Wechsel des Kulturmediums entfernt wird. Ein enormer Vorteil der Zellkulturmethode gegenüber anderen Methoden der Anreicherung besteht in der Selektion von lebensfähigen, nicht-apoptotischen Zellen mit Proliferations-potenzial. Es ist allerdings bekannt, daß Zytokeratin-positive Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen nicht beliebig lange proliferieren können, sondern, vielleicht analog zur Situation *in vivo*, in einen Status der Dormancy mit einem Arrest in der  $G_0$ -Phase des Zellzyklus übergehen (Pantel et al. 1995).

Eine dritte Methode stellen immunmagnetische Anreicherungsverfahren dar. Dabei binden mit Antikörpern beladene magnetisierbare Mikropartikel an die entsprechenden Antigene auf Tumorzellen. Als tumorzellständige Antigene können dabei entweder oberflächenlokalisierte tumorassoziierte Antigene oder von Tumorzellen überexprimierte Oberflächenproteine dienen. Nach Inkubation dieser anti-körperbeladenen Partikel mit einer tumorzellhaltigen Suspension (z.B. unfraktioniertes Knochenmark, mononukleären Zellen eines Dichtegradienten oder Zellsuspension einer Knochenmarkprimärkultur) werden die von den Partikeln rosettierten Tumorzellen über einen Magneten (Naume et al. 1997, Racila et al. 1998, Otte et al. 2000, Krüger et al. 2000) oder aufgrund ihrer Größenzunahme durch ein Zellsieb (Rye et al. 1997) abgetrennt. Abbildung 1.3 soll das Trennprinzip schematisch verdeutlichen.

Unter Verwendung sehr kleiner superparamagnetischer Partikel (Durchmesser 50 nm) und zellpermeabilisierender Detergentien lassen sich prinzipiell auch Zytokeratine als intrazelluläres Target für eine Zellanreicherung nutzen (Griwatz et al. 1995, Martin et al. 1998). Wegen des geringen Durchmessers der Partikel und der daraus resultierenden geringen Magnetkräfte ist zur immunmagnetischen Auftrennung einer solchen Zellsuspension ein langsames Passieren der mit Microbeads markierten Zellen durch ein magnetisches Feld von hoher magnetischer Feldstärke notwendig. Ein kommerziell erhältliches Produkt bewerkstelligt dies durch mit Stahlwolle gefüllte Miniatursäulen, die in einen starken Magneten platziert werden können.

Als eine weitere Form der immunmagnetischen Anreicherung wurde auch der Weg über eine Depletion oder Negativ-Anreicherung von Tumorzellen beschrieben, indem hämatopoetische Zellen des Knochenmarks über antikörperbeladene, magnetisierbare Mikropartikel gegen ein gemeinsames Oberflächenantigen der hämatopoetischen Zellen

(z.B. CD 45) abgetrennt wurden und auf diese Weise eine mit epithelialen Zellen angereicherte Zellfraktion zurückblieb (Naume et al. 1998).



**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Anreicherung von Tumorzellen mit Hilfe von Dynabeads.** A) Suspension einer Knochenmarkprimärkultur. Die darin enthaltenen Tumorzellen exprimieren tumorassoziierte Antigene (TAA) und werden deshalb von mit anti-TAA-Antikörpern beladenen Dynabeads rosettenförmig umgeben. Während das Reaktionsgefäß einem Magnetfeld ausgesetzt wird läßt sich der Überstand mit den Nicht-Tumorzellen leicht abpipettieren. Allerdings werden bei diesem Trennschritt unerwünschterweise auch Nicht-Tumorzellen durch große Dynabead/Tumorzell-Aggregate mitgerissen (sog. trapping). Durch Behandlung mit DNase und unter Anwendung von Scherkräften separieren Tumorzellen und Dynabeads. Im wiederangelegten Magnetfeld werden die Tumorzellen im Überstand als angereicherte Fraktion abgetrennt. B) Dynabeads haben einen Durchmesser von 4,5 µm und sind über einen DNA-Linker an einen humanen monoklonalen Antikörper (IgG4) gebunden, der den F<sub>c</sub>-Anteil aller IgG Subklassen der Maus erkennt.

Schließlich lassen sich einzelne Tumorzellen auch rein physikalisch aus einer Mikroumgebung *in vitro* isolieren. Auch in diesem Fall müssen die epithelialen Tumorzellen zunächst immunzytochemisch oder durch Immunfluoreszenz markiert werden, um sie von umliegenden, hämatopoetischen Zellen sicher unterscheiden zu können. So wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators einzelne, gefärbte Zellen isoliert und näher charakterisiert (Klein et al. 1999). Eine weitere, rein physikalische Methode um einzelne, gefärbte Zellen zu isolieren, ist mit der Technologie der Lasermikrodissektion- und katapultation gegeben. Damit lassen sich einzelne Zellen über eine Wegstrecke von wenigen Millimetern ohne direkte Berührung und ohne wesentliche Veränderung der Zellmaterie in ein steriles Auffanggefäß katapultieren und auf diese Weise ohne

Verunreinigungen isolieren (Greulich und Leitz 1994, Schütze und Clement-Sengwald 1994, Schütze und Lahr 1998). Große Mengen an einzelnen Zellen (mehr als  $10^4$ ), wie sie z.B. für weitergehende, statistisch aussagekräftige Untersuchungen erforderlich wären, lassen sich mit dieser Methode jedoch aus Gründen der Praktikabilität nicht gewinnen. Allerdings ist es durch Anwendung verschiedener PCR-Methoden [z.B. PEP (Zhang et al. 1992), DOP (Telenius et al. 1992), MseI-Adapter (Klein et al. 1999)] möglich geworden, das Genom von wenigen oder sogar auch nur von einer einzigen Zelle in seiner Gesamtheit zu amplifizieren, um so über genügend Untersuchungsmaterial für weitergehende DNA- oder RNA-basierte Analysen verfügen zu können.

Angesichts der erschwerten Untersuchungsbedingungen okkulten Tumorzellen verwundert es nicht, daß über eventuelle chromosomale Veränderungen als Ausdruck ihrer Malignität nur wenig bekannt ist. Bänderungsanalysen von Tumormetaphasen waren in den vergangenen Jahrzehnten die Standarduntersuchungsmethode (Caspersson et al. 1970). Die mit Hilfe dieser Technik gefundenen typischen Translokationen bei Leukämien und Lymphomen konnten bei soliden Tumoren bislang nicht nachgewiesen werden, weshalb spezifische chromosomale Aberrationen bei den meisten soliden Tumoren unbekannt sind. Dies beruht vor allem auf einer Reihe von methodischen Problemen bei der Analyse von solidem Tumormaterial: Geringe Qualität der Metaphasechromosomen, Verunreinigungen durch umliegendes Stroma, zahlreiche zytogenetische Veränderungen von drastischer Komplexität, starke klonale Heterogenität (Mitelman et al. 1997), eine limitierte Kultivierbarkeit und eine schwer zu treffende Unterscheidung zwischen primären und sekundären evolutionären Veränderungen sind hier die wichtigsten zu nennenden Hindernisse. Diese technischen Hürden gelten natürlich noch einmal in ganz besonderem Maße für einzelne, metastatische, okkulte Zellen des Knochenmarks.

In den vergangenen Jahren wurden daher neue Techniken entwickelt, um die klassische Zytogenetik mit modernen molekularen Methoden der DNA-Hybridisierung und Fluoreszenzfarbstoffchemie zu verbinden. Mit Hilfe von Interphase-Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (FISH) gelang es Müller et al. als einer der ersten, chromosomale Aberrationen in individuellen mikrometastatischen Zellen des Knochenmarks bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom nachzuweisen (Müller et al. 1996). Die Aussagekraft dieser Analyse war jedoch durch die geringe Zahl der untersuchten Tumorzellen stark limitiert (es wurden überwiegend weniger als fünf Zellen pro Patient analysiert). Eine Weiterentwicklung der Interphase-FISH-Technik war die Multifarben-Interphase-FISH-Technik, die erfolgreich zum Nachweis numerischer Veränderungen der Chromosomen 7, 8, 11, 17 und 18 bei CK-positiven Zellen aus Knochenmarks-primärkulturen von Mammakarzinompatientinnen eingesetzt wurde (Solakoglu et al. 2002).

Die Methode der multiplex-FISH (M-FISH) dagegen wurde zur simultanen Darstellung aller Metaphasechromosomen in verschiedenen Farben mit Hilfe von fluorochromgekoppelten, zentromerspezifischen Sonden entwickelt (Speicher et al. 1996). Jedoch wurden hierzu ebenso Metaphasechromosomen benötigt wie bei der von Schröck et al. entwickelten Methode der spektralen Karyotypisierung (SKY), die sich von der multiplex-FISH nur durch die Art und Weise der Fluoreszenzsignaldetektion und Datenverarbeitung unterscheidet (Schröck et al. 1996).

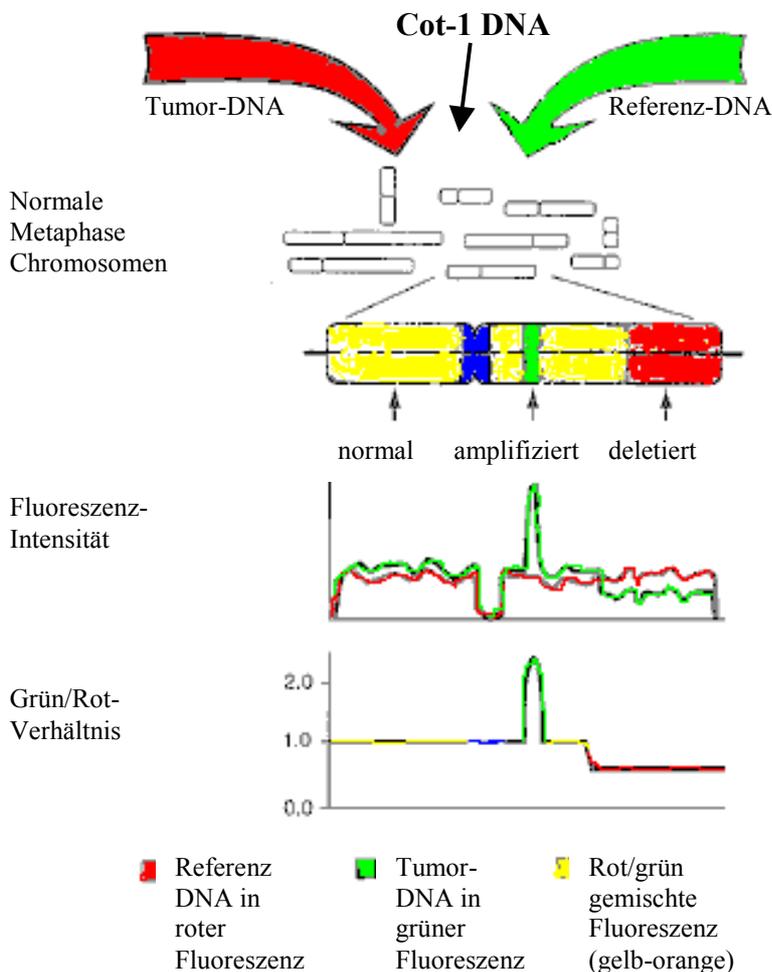
Eine weitere elegante molekularzytogenetische Methode, die es erlaubt, in einem einzigen Experiment einen Überblick über die genetischen Veränderungen von Tumorzellen auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene zu erlangen, ist die komparativen

genomischen Hybridisierung (CGH) (Kallioniemi et al. 1992, du Manoir et al. 1993). Diese Methode wurde seit ihrer Erstbeschreibung auf eine Vielzahl von malignen und benignen Neoplasien angewendet und hat dabei erfolgreich zur Aufdeckung verschiedener chromosomaler Aberrationen geführt, insbesondere auch beim Mammakarzinom und deren Vorstufen (zur Übersicht: Ried et al. 1997 und Knuutila et al. 1998). Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode besteht darin, daß als Ausgangsmaterial etwa 0,5 bis 1 µg DNA, entsprechend etwa  $5 \times 10^4$  bis  $10^5$  diploiden Zellen für die Analyse ausreichen, wobei auch DNA-Verunreinigungen enthalten sein dürfen, insofern ihr Anteil deutlich unterhalb von fünfzig Prozent liegt. Ein weiterer Vorteil ist, daß keine Metaphasechromosomen der zu untersuchenden Tumorzellen notwendig sind. In der CGH-Analyse werden die detektierbaren Veränderungen entweder als DNA-Gewinn oder Verlust klassifiziert. Die biologische Bedeutung eines DNA-Gewinns kann dabei in der Aktivierung eines Onkogens, der Verlust dagegen in der Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens liegen. Beide Genklassen können fundamental in die Entstehung und Progression metastatischer Klone eingebunden sein.

Das Prinzip einer CGH-Analyse ist zum besseren Verständnis in Abbildung 1.4 dargestellt. Ein Test- und ein Referenzgenom, d.h. Tumor- und Normal-DNA werden zunächst aus mindestens  $10^4$  Tumorzellen und Normalzellen gewonnen und dann durch Einbau von chemisch modifizierten Nukleotiden unterschiedlich markiert. Dies erfolgt bei einer Direktmarkierung beispielsweise durch den grünen Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FITC) und den roten Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin. Beide DNA-Präparationen werden dann zu gleichen Teilen gemischt und auf normale Metaphasechromosomen (auf einem einfachen Objektträger) hybridisiert, wo sie um homologe Bindungsstellen konkurrieren. Überwiegt in den Tumorzellen eine DNA-Sequenz, so bindet diese DNA häufiger an die entsprechende chromosomale DNA der Metaphasenpräparation. Bei der Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop überwiegt dann der Fluoreszenzfarbstoff der Tumorprobe, d.h. im Fall von FITC die grüne Fluoreszenz. Haben die Tumorzellen hingegen DNA verloren, bindet relativ mehr Normal-DNA, dessen Fluoreszenzsignal dann in dieser chromosomalen Region zu beobachten ist, d.h. im Falle von Rhodamin die rote Fluoreszenz. Besteht ein Gleichgewicht zwischen Test- und Referenzgenom, so ergibt sich bei der simultanen Betrachtung beider Fluorochrome eine gelbe Mischfarbe. Entscheidend ist, daß die Information, ob im Tumor ein DNA-Gewinn (Amplifikation) oder ein DNA-Verlust (Deletion) vorliegt, durch Fluoreszenzsignale repräsentiert wird.

Um eine quantitative Aussage zu ermöglichen, erfolgt die Auswertung nicht visuell, sondern über eine sog. CCD- („charged coupled device“) Kamera. Sie kodiert und quantifiziert das Fluoreszenzsignal als Graustufenbild. Weiterhin erfolgt die Aufnahme der Fluoreszenzbilder nicht simultan, sondern seriell für jedes Fluorochrom einzeln. Dabei verhindern selektive Filter, daß es zu einer Überlagerung der Fluoreszenzsignale zwischen den einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen kommt. Um eine Identifizierung der Chromosomen zu ermöglichen, werden die Metaphasenpräparate vor der Auswertung noch mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI behandelt, wodurch jedes Chromosom in einem typischen Bänderungsmuster angefärbt wird. Das DAPI-Bild dient daher der Identifizierung der Chromosomen, während FITC den Tumor- und Rhodamin die Normal-DNA repräsentiert. Die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten entlang der einzelnen Chromosomen erfolgt im Auswertergebnis nicht anhand der absoluten, sondern der relativen Werte zwischen grünem und rotem Signal, dem sog. RATIO-Bild. Da bei Messung von nur einer einzigen Metaphase Rauschsignale nicht ohne weiteres zu unterdrücken wären, wird nicht nur eine Metaphase, sondern immer mehrere Metaphasen

ausgewertet und das Ergebnis gemittelt. Im Endergebnis ergibt sich das sog. CGH-Summen-Karyogramm über alle 22 Chromosomen einschließlich des X- und Y-Chromosoms.



**Abbildung 1.4 Komparative genomische Hybridisierung.** Tumor-DNA (mit grünem Fluorochrom markiert) und normale Referenz-DNA (mit rotem Fluorochrom markiert) werden auf normale, humane Metaphasen hybridisiert in Anwesenheit von unmarkierter, humaner Cot-1 DNA, die künstlich für hochrepetitive Elemente angereichert wurde und so die Bindung der markierten DNA an diese Sequenzen, die keine Gene enthalten, unterdrückt. Regionen mit einem DNA-Überschuß werden auf den Zielchromosomen als grüne Fluoreszenz von hoher Intensität identifiziert; Regionen mit einem DNA-Verlust stellen sich dagegen mit einer erhöhten roten Fluoreszenz dar. Regionen auf den Chromosomen, die sowohl für grün als auch rot gleichmäßig angefärbt sind (gelb-orange Mischfarbe), zeigen eine gleich hohe Kopienzahl für Tumor- und Referenz-DNA an. Ein Verhältnis von 1,0 bedeutet keine Veränderung in der Kopienzahl eines Chromosomenabschnitts. Ein hohes grün/rot-Verhältnis (>1,0) bedeutet einen DNA-Zugewinn, ein niedriges grün/rot-Verhältnis (<1,0) dagegen eine DNA-Deletion.

## 1.6 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Über die biologischen Eigenschaften disseminierter, okkulten Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit einem Mammakarzinom ist nur wenig bekannt. Insbesondere bestehen über die zytogenetischen Veränderungen einer solchen Zellpopulation nur vage Vorstellungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher eine Methode etabliert werden, die es ermöglicht, mittels der Methode der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) einen Überblick über die genetischen Veränderungen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene zu erlangen. Dabei waren zwei Probleme zu bewältigen: Zum einen sollte die Methode den Fokus der Analyse auf diejenige Subpopulation disseminierter Tumorzellen setzen, die lebensfähig ist und eine hohe Proliferationskapazität aufweist. Zum anderen mußte ein bestimmter Anreicherungsgrad für diese Population erzielt werden, um die technischen Mindestanforderungen für eine CGH-Analyse zu erfüllen:  $10^4$  Tumorzellen oder eine dazu äquivalente DNA-Menge mit einer kritischen Reinheit von 50%.

Ausgehend von den perioperativ gewonnenen Knochenmarkaspiraten zwanzig verschiedener Patientinnen mit einem primärem Mammakarzinom sollte daher zunächst unter Anwendung eines Primärkulturmodells eine Selektion und Expansion lebensfähiger, nicht-apoptotischer, CK-positiver Zellen durchgeführt werden.

In einem zweiten Schritt sollten dann immunmagnetische Methoden auf ihre Eignung hin untersucht werden, eine weitergehende, präparative Anreicherung CK-positiver Zellen aus den Primärkulturen zu ermöglichen. Dies sollte zunächst über tumorzellspezifische, oberflächenständige Antigene der CK-exprimierenden Kulturzellen versucht und gegebenenfalls auf intrazelluläres Zytokeratin als antigene Struktur ausgeweitet werden.

Sollte mit immunmagnetischen Methoden keine Anreicherung in ausreichend hoher Menge und Reinheit für eine CGH-Analyse möglich sein, so sollten in diesem Fall mindestens fünfzig CK-positive Zellen einer Primärkultur mit Hilfe der Laserdruckkatapultation direkt isoliert werden. Nach Lyse der Zellen sollte sich hieran schließlich eine geeignete PCR-Methode zur möglichst gleichmäßigen Amplifikation der jeweils gepoolten fünfzig Genome anschließen, um so eine CGH-Analyse zu ermöglichen.

Mit der Etablierung einer solchen Methode ließen sich frühzeitig disseminierte, vitale Tumorzellen auf gemeinsame chromosomale Veränderungen hin analysieren. Diese Analyse könnte einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung metastatischer Stammzellen leisten mit möglichen Implikationen für eine adjuvante Krebstherapie.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Folgende Geräte wurden für die Arbeit verwendet:

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller/Vertrieb</u>
Gelelektrophorese-Anlagen	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel-Dokumentationssystem Intas <sup>®</sup>	Intas <sup>®</sup> GmbH, Göttingen
Digitale Bildverarbeitungsanlage Kappa <sup>®</sup>	KAPPA opto-electronics GmbH, Gleichen
Auflichtmikroskop Leica DMIL	Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar
Durchlichtmikroskop Leica DMLB mit Fluoreszenz-Kanal	Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Superior, Vertrieb Merck Eurolab, Darmstadt
Zellkultur-Inkubator B 5061, EK/CO <sub>2</sub>	Kendro Laboratory Products, Hanau
Zytozentrifuge	Hettich, Villingen-Schwenningen
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc., Watertown, Massachusetts, USA
Magnetischer Partikel-Konzentrator	Dynal, Oslo, Norwegen
Magnetischen Zellseparator MiniMACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
PALM <sup>®</sup> Robot-Microbeam	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
UV-Spectrometer Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

#### 2.1.2 Chemikalien und sonstige Materialien

Folgende Chemikalien und sonstige Materialien wurden für die Arbeit verwendet:

<u>Artikel</u>	<u>Bezugsquelle</u>
AB-Serum	Biotest AG, Dreieich
Accutase <sup>™</sup>	PAA Laboratories, Cölbe
Avidin-FITC	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim
Bio Blocking-Reagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Biotin-16dUTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

---

Biotin-Nick Translation Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BCIP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Borsäure	Merck Eurolab, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
CELLection™ Pan Mouse-IgG Dynabeads	Dynal, Oslo, Norwegen
Cy3.5 konjugiertes Avidin	BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg
dNTP-Mix (Desoxynukleotid Triphosphat-Set, PCR grade)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dextransulfat	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck Eurolab, Darmstadt
DIG-Nick Translation Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Digoxigenin-11dUTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dnase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco's PBS	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Eppendorf-Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Ethanol, zur Analyse	Merck Eurolab, Darmstadt
Falcon® Polypropylen-Röhrchen	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, Frankreich
Fast Blue BB Salz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fetales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin
Fettstift DAKO®-Pen	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Ficoll-Hypaque®	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Fixogum	Marabuwerte GmbH&Co., Tamm
Formamid, deionisiert	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Glutamin, Transferrin, Insulin, Natriumselenit-Mischung	
Glycergel	DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg
Glycerin	Merck Eurolab, Darmstadt
Haftobjektträger Histobond®	Superior, Vertrieb Merck Eurolab, Darmstadt
Hank's Salt-Lösung	Biochrom KG, Berlin
HEPES	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Humane Cot1-DNA	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Humane Genomische DNA, männlich und weiblich	Promega GmbH, Mannheim
Igepal CA630	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumhydrogenphosphat	Merck Eurolab, Darmstadt

---

Kaliumchlorid	Merck Eurolab, Darmstadt
Kalziumchlorid, hydratisiert	Merck Eurolab, Darmstadt
Levamisolhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
10x Ligase-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Liquemin <sup>®</sup>	Roche, Grenzach-Wyhlen
MACS Zytokeratin Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnesiumchlorid, hydratisiert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Maus-Serum	DAKO <sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg
Metaphase-Objektträger (Normal (46, XY) Metaphase CGH Target Slides)	Vysis GmbH, Bergisch Gladbach
MetaPhor <sup>®</sup> agarose	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
Molecular Weight Marker VIII	Roche Diagnostics, Mannheim
MseI-Restriktionsenzym (2x10 <sup>4</sup> U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
N,N-Dimethylformamid	Merck Eurolab, Darmstadt
Nitro-Blue-Tetrazolium	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Naphtol-AS-BI-Phosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Naphtol AS-MX Phosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Neufuchsin	Merck Eurolab, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim
One-Phor-All (OFA)-Buffer	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
PCR-Filter-Pipettenspitzen	Greiner Labordiagnostik, Kremsmünster, Östereich
PCR-Polymerase-Mix aus dem Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR-Puffer Nr. 3 aus dem Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR-Reaktionsgefäße, sterilisiert	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN Lysis Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
rekombinanter humaner EGF	Strathmann Biotech GmbH, Hamburg
rekombinanter b-FGF	Strathmann Biotech GmbH, Hamburg
RPMI-1640-Medium	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Salmon testis DNA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

SDS	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
SYBR <sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
T25-Zellkulturflaschen,	Novamed, Jerusalem, Israel, Vertrieb Deutschland
ECM beschichtet	über Paesel+Lorei, Hanau
Taq DNA Polymerase, rekombinant	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Tris	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck Eurolab, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Vectorshield Mounting Medium mit DAPI	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim

### 2.1.3 Antikörper und Antikörperkonjugate

Verwendete Primärantikörper:

<b>Antigen</b>	<b>Antikörper- Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Positiv- kontrolle</b>	<b>Hersteller</b>
CK8,18,19	A45-B/B3	IgG1	BT20	Micromet GmbH, München
17-1A	3B10	IgG1	HT29 (Colon- Ca)	Micromet GmbH, München
c-erbB2	7C1	IgG1	SKBr3 (Mamma-Ca)	Micromet GmbH, München
Lewis <sup>y</sup>	A70-C/C8	IgM	T47D (Mamma-Ca)	Hybridome von Dr. U. Karsten, MDC, Berlin
MUC-1	A76-A/C7	IgG1	T47D (Mamma-Ca)	Hybridome von Dr. U. Karsten, MDC, Berlin
EMA	E29	IgG2a	MCF7 (Mamma-Ca)	DAKO <sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg
Ber-EP4	E29	IgG1	MCF7 (Mamma-Ca)	DAKO <sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg
EGFR	EGFR1	IgG2b	HT29 (Colon- Ca)	Abcam Ltd, Cambridge, England

Alle Primärantikörper sind monoklonale Antikörper aus der Maus.

Folgende Sekundärantikörper und Antikörperkonjugate wurden verwendet:

APAAP, D651	DAKO <sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg
Kaninchen-anti-Maus-Antikörper, Z359	DAKO <sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg
MOPC-21 (Isotyp IgG1)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EnVision <sup>™</sup> Labelled Polymer, Alkaline Phosphatase	DAKO <sup>®</sup> Diagnostika GmbH, Hamburg
A45-B/B3-Cy3	Micromet GmbH, München
Anti-Digoxigenin-Fluorescein, Fab-Fragmente (Schaf)	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Digoxigenin-Rhodamin, Fab-Fragmente (Schaf)	Roche Diagnostics, Mannheim

#### 2.1.4 Pufferlösungen und Kulturmedien

Als Pufferlösungen und Kulturmedien dienten die folgenden Lösungen:

Bio-Blocking-Reagenz	0,5 g Blocking-Reagenz in 100 ml 1xTNT
BSB-Puffer	Basis: Dulbecco's PBS 0,1 % (w/v) BSA steril filtriert (Porengröße 0,22 – 0,45 µm)
BRB-Puffer	Basis: 0,9% (w/v) NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM HEPES pH 7,5 0,5% (w/v) BSA steril filtriert (Porengröße 0,22 – 0,45 µm)
Complete-Medium	Basis: RPMI-1640 10% (v/v) FCS Penicillin/Streptomycin (f.c. 200U/ml) Glutamin (f.c. 2mM) Transferrin (f.c. 5,5 mg/l) Insulin(f.c. 10mg/l) Natriumselenit (f.c. 6,7 µg/l) rekombinanter humaner EGF (f.c. 50 ng/ml) rekombinanter b-FGF (f.c. 10 ng/ml)

---

Dig-Blocking-Reagenz	0,5 g Blocking-Reagenz in 100 ml 4xSSC
Selbstangesezter DOP-PCR-Lysis-Puffer	PCR-Puffer Nr. 3 aus dem Expand Long Template PCR System, 1x konzentriert (2,25 mM MgCl <sub>2</sub> , Detergentien) 0,67% (v/v) Tween 20 0,67% (v/v) Igepal CA630 2 mg/ml Proteinase K (kurz vor Gebrauch zu den anderen Bestandteilen hinzugeben) Steriles, Nuklease-freies Wasser
Loading-Buffer	50% (w/v) Glycerin 0,2% (w/v) SDS 0,05% (w/v) Bromphenolblau in 1x TAE-Puffer
Mse-Lysis-Puffer	1 µl 0,5% (v/v) Igepal CA630 in Dulbecco's PBS 2 µl 10x One-Phor-All-Buffer (OFA-Buffer) 1,3 µl 10% (v/v) Tween 20 1,3 µl 10% (v/v) Igepal CA630 12,6 µl 10 mg/ml Proteinase K (kurz vor Gebrauch zu den anderen Bestandteilen hinzugeben) 12,8 µl Nuklease-freies Wasser
PBS-Puffer	150 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH: 7,4
20 x SSC-Puffer	3M NaCl 0,3M Na <sub>3</sub> Citrat•2H <sub>2</sub> O pH: 7,0
TAE-Puffer	40 mM Tris-acetat 2 mM EDTA pH: 8,5

TBE-Puffer	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH: 8,0
TBS-Puffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM Tris pH: 8,3

### 2.1.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden über die Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, bezogen.

Für die DOP-PCR wurde folgender degenerierter Primer eingesetzt (MW6):

5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'

Für die MseI-adapter-PCR wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

ddMse11: 5'-TAA CTG ACA GCdd-3'

LIB1: 5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT-3'

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Expansion CK-positiver Zellen durch Primärzellkultur

Im Zeitraum von Juni bis September 2000 wurden 41 Knochenmarksbiopsien von Patientinnen mit hochgradigem Verdacht auf oder einem bereits stanziobioptisch gesichertem Mammakarzinom intraoperativ gewonnen. Alle betroffenen Patientinnen gaben hierfür vor der Operation ihr informiertes und schriftliches Einverständnis. Nach Beendigung des operativen Eingriffs an der Brust und/oder der Axilla wurden bei noch in Narkose befindlicher Patientin per Nadelaspiration jeweils etwa 10 ml Knochenmarkgewebe in 5000 IE Liquemin<sup>®</sup> aus beiden vorderen, oberen Beckenknochenkämme aspiriert. Das gewonnene Knochenmarkgewebe wurde nach Überführung in ein konisches 50 ml Polypropylen-Röhrchen zunächst mit Hank's Salt-Lösung auf 30 ml aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Nach Zentrifugation mit 300g bei 4°C für 10 Minuten wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde behutsam in 20 ml Dulbecco's PBS-Lösung (w/o Ca, Mg, w/o Phenol Red) resuspendiert. Mit dieser Suspension wurden 20 ml einer Ficoll-Hypaque<sup>®</sup>-Lösung mit einer Dichte von 1,077g/mol, vorgelegt in einem konischen 50 ml Polypropylen-Röhrchen, langsam überschichtet. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 900g und 4°C ohne Bremsfunktion wurde die Interphase (nach Abheben und Verwerfen des Überstands) mit einer Pipette abgenommen und mit 40 ml Dulbecco's

PBS in einem 50 ml Falcon<sup>®</sup>-Polypropylen-Röhrchen durch erneutes Resuspendieren und Zentrifugieren mit 300g bei 4°C für 10 Minuten gewaschen und der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wurde schließlich in 5 ml Complete-Medium resuspendiert und die Zahl der mononukleären Zellen (MNC) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dann wurden zwischen  $1 \times 10^7$  und  $4 \times 10^7$  MNC in mit boviner, cornealer Extrazellulärmatrix beschichtete T25-Zellkulturflaschen überführt (Fläche 25 cm<sup>2</sup>) und auf 10 ml mit Complete-Medium angefüllt. Die Primärkulturen wurden bei 5% CO<sub>2</sub>- und vermindertem O<sub>2</sub>-Gehalt (10% O<sub>2</sub>) bis zum fast vollständigen, adhärenen Bewachsen der Zellkulturfläche (95% Konfluenz) unter zweimal wöchentlichem Mediumwechsel bebrütet. Falls kein adhärenes Zellwachstum beobachtet werden konnte, wurde die entsprechende Kultur verworfen. Bei Konfluenz wurde das Zellmedium entfernt, die Zellen kurz mit Dulbecco's PBS gewaschen und schließlich entweder mit 5 ml 10%iger Trypsin/EDTA-Lösung für 3 Minuten oder mit 5 ml Accutase<sup>™</sup>, einem proteolytischen und insbesondere collagenolytischen Enzymgemisch invertebralem Ursprungs, für 10 min bei 37°C inkubiert und dadurch abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Dulbecco's PBS wie oben beschrieben gewaschen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Von einem Teil der Suspension wurden Cytospinpräparate angefertigt (siehe unten), der restliche Teil wurde in einer neuen T25-Zellkulturflasche unter den gleichen Bedingungen wie oben rekultiviert (passagiert). Es erfolgten maximal 4 Passagen. Die Zellkulturbedingungen der Positivkontrollen (MCF-7, HT29, SKBr3 und T47D) entsprachen den Empfehlungen der American Tissue Culture Collection (ATCC).

### 2.2.2 Cytospin-Präparationen

Auf eine kreisrunde Fläche von 6 mm Durchmesser wurden jeweils  $3 \times 10^4$  Zellen auf unbeschichtete Haftobjektträger mit Hilfe einer Zytozentrifuge für 5 Minuten bei 900g und Raumtemperatur zentrifugiert, über Nacht luftgetrocknet und dann immunzytochemisch gefärbt.

### 2.2.3 Immunzytochemie

#### a) CK-Färbung nach der APAAP-Methode

Zunächst wurde der zu färbende Zellbereich mit einem Fettstift (DAKO-Pen) umrandet und unspezifische Bindungsstellen mit 10% AB-Serum für 20 Minuten bei RT in einer feuchten Kammer abgesättigt. Nach Entfernen der Lösung durch Abklopfen mit der Objektträgerkante auf einem sauberen Papiertuch wurden 200 µl des monoklonalen Maus-Antikörpers A45-B/B3 mit einer Konzentration von 2 µg/ml auf den Zellbereich aufgebracht und für 45 Minuten bei RT inkubiert. Dieser IgG1-Antikörper ist gegen ein gemeinsames Epitop verschiedener CK-Komponenten (CK8, CK18 und CK19, gerichtet (Braun et al. 2000b, Stigbrand et al. 1998, Conrad et al. 1988, Karsten et al. 1985). Nach Entfernen der Lösung durch Abklopfen mit der Objektträgerkante wurden die Objektträger jeweils für 3x3 Minuten in PBS gewaschen und anschließend, nach Abklopfen des überstehenden PBS, mit jeweils 200 µl eines polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-Antikörpers in einer 1:20-Verdünnung für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3x3 Minuten in PBS wurden die Präparate schließlich mit 200 µl eines präformierten Komplexes aus intestinaler Kälber-Alkalischer Phosphatase und monoklonaler Maus Anti-Alkalischer Phosphatase (APAAP, Cordell et al. 1984) für 30 Minuten bei RT inkubiert und danach für 3x3 Minuten in PBS gewaschen. Nach Abklopfen des Überstandes wurden die Objektträger mit 200 µl einer frisch zubereiteten

Farbstoffsubstrat-Lösung mit einer für das jeweilige Substrat typischen Entwicklungszeit bei RT entwickelt [siehe dieses Kapitel, Abschnitt e)]. Alle Färbelösungen enthielten zur Inhibierung endogener Alkalischer Phosphatase-Aktivität 0,62 M Levamisol. Nach der Entwicklung wurde die Farbreaktion durch Waschen mit 3x3 Minuten PBS abgebrochen und der Objektträger mit Glycergel eingedeckelt. Die Präparate wurden dann mit einem Durchlichtmikroskop und daran angeschlossener digitaler Bildverarbeitungsanlage (Kappa<sup>®</sup>) analysiert. Zur Bestimmung der CK-Positivitätsrate wurden vier unabhängige Bildausschnitte eines Cytospinpräparats quantitativ ausgezählt und auf das gesamte Präparat extrapoliert.

#### b) Isotypkontrolle

Parallel hierzu wurde ein zweiter Objektträger mit ebenfalls  $3 \times 10^4$  Zellen der Primärkultur in gleicher Weise behandelt, außer daß anstelle des spezifischen Antikörpers A45-B/B3 MOPC-21 als Primärantikörper verwendet wurde. MOPC-21 ist ein polyklonaler Antikörper mit unbekannter Spezifität vom Subtyp IgG1 eines mineralölinduziertem Plasmozytoms der Maus. Bei positiver Isotypkontrolle wurde das entsprechende mit A45-B/B3 gefärbte Präparat nicht ausgewertet.

#### c) Positivkontrolle für den CK-Nachweis

Bei jeder Färbung wurde ein Cytospinpräparat mit einem Gemisch aus 3T3-Mausfibroblasten, die aufgrund ihres mesenchymalen Ursprungs keine Zytokeratine exprimieren und CK-exprimierenden BT20-Zellen (Mammakarzinomzelllinie) in einem Verhältnis von etwa 1:500 von BT20 zu 3T3 mit A45-B/B3 mitgefärbt.

#### d) Färbung tumorassoziierter Antigene mit einem Primärantikörper-Mix

Zum Nachweis verschiedener tumorassoziierter- und epithelialer Antigene auf den Cytospinpräparaten der Knochenmarkprimärkulturen wurden unterschiedlich zusammengesetzte Mischungen monoklonaler Primärantikörper hergestellt. Die Arbeitskonzentration des einzelnen Antikörpers betrug dabei jeweils 10 µg/ml. Für eine Liste der verwendeten Antikörper siehe Kapitel 2.1.3. Als Sekundärsystem wurde Envision<sup>™</sup> gewählt, ein mit Alkalischer Phosphatase gekoppeltem Ziege-Antimäus-Konjugat, welches bei RT für eine halbe Stunde inkubiert wurde. Nach dem Waschen der Präparate mit 3x3 Minuten PBS wurde zur Verstärkung der Detektionssensitivität noch für 30 Minuten bei RT mit APAAP inkubiert.

#### e) Farbstoffsubstrat-Lösungen

##### 1) Neufuchsin

Zu 78,8 ml demineralisiertem Wasser wurden 4,2 ml eines 1M Tris-Puffers (pH 9,5) und 200 µl einer 0,62 M Levamisolhydrochlorid-Lösung gegeben (Lösung A). Dann wurden 415 µl einer 0,56 M Natriumnitrit-Lösung und 166 µl einer 5%igen wässrigen Neufuchsin in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 3 Minuten bei RT gemischt und anschließend zu Lösung A gegeben. In einem weiteren 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 42 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat in 0,5 ml DMF gelöst und zu den anderen Bestandteilen hinzugemixt. Das fertige Substrat wurde vor dem Aufbringen auf die

Objektträger über einen Papierfaltenfilter klarfiltriert und schließlich für 20 - 30 Minuten auf dem Objektträger entwickelt.

## II) Fast-Blue

In 49 ml einer 0,1 M Tris-gepufferten Lösung (pH 8,2) wurden 80 µl einer 0,62 M Levamisol-Lösung und 50 mg Fast Blue BB Salz gelöst. Hinzugefügt wurden 130 µl einer Naphtol AS-MX Phosphat-Lösung, die zuvor durch Lösen von 77,5 mg dieser Substanz in 1 ml DMF hergestellt wurde. Die gelbe Lösung wurde anschließend über einen Papierfilter klarfiltriert und für 10 - 20 Minuten auf dem OT entwickelt.

## III) NBT/BCIP

Zu 860 µl einer TBS-Pufferlösung (pH 8,3) wurden 100 µl einer 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 25 µl einer 24,5 mM NBT-Lösung (Basis 70% (v/v) DMF), 5 µl einer 115 mM BCIP-Lösung (DMF-Basis) sowie 10 µl einer 0,15 M Levamisol-Lösung gegeben. Die typische Entwicklungszeit betrug 5 – 10 Minuten.

### 2.2.4 Anreicherungsverfahren mit Dynal-Microbeads (Dynabeads)

#### a) Präparation der Beads

Zum Abtrennen der mit Anti-Maus-Antikörpern beladenen Dynabeads von überschüssigem, nichtgebundenem Anti-Maus-Antikörper wurden 100 µl einer CELLlection™ Pan Mouse IgG Dynabeads-Suspension (im folgenden kurz als „Dynabeads“ bezeichnet) in ein Eppendorf-Mikrogefäß pipettiert und in die Halterung eines Ständers geklemmt, an dessen Außenseite sich ein Magnet befand (sog. „Magnetischer Partikel Konzentrat“, abgekürzt MPC). Nachdem sich alle Partikel sichtbar an der dem Magneten zugewandten Seite angelagert hatten, wurde der klare Überstand abgenommen und verworfen. Dann wurden die Dynabeads in 500 µl BSB-Puffer resuspendiert und die oben beschriebene magnetische Abtrennprozedur zweimal wiederholt. Schließlich wurden die Dynabeads in 100 µl BSB-Puffer resuspendiert. Nach Hinzufügen von 1 µg eines Primärantikörper-Mixes gegen verschiedene tumorassoziierten Antigene wurde die Suspension für eine halbe Stunde bei RT auf dem Überkopfmischer rotiert. Zum Abtrennen von nichtgebundenem Primärantikörper wurde die Suspension dreimal mit dem doppeltem Volumen BSB-Puffer wie oben beschrieben gewaschen.

#### b) Zellseparation

Nach Ablösen der Zellen aus einer Knochenmarksprimärkultur (unterschiedliche Passagen) mittels Trypsin/EDTA oder Accutase™ wurde die Zellsuspension einmal mit PBS gewaschen und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dann wurden zwischen 1,4 und  $7 \times 10^5$  Zellen in 500 µl Dulbecco's PBS mit 25 µl mit in der oben beschriebenen Weise präparierten Dynabeads versetzt und eine Stunde bei 4°C auf dem Überkopfmischer rotiert. Darauf folgte eine Separation im MPC. Der Überstand wurde mit den Überständen der folgenden drei Waschschriffe gepoolt (jeweils 500 µl BSB-Puffer) und dann als Cytospin präpariert. Die nach dem letzten Waschschriff in 200 µl BRB-Puffer resuspendierten Dynabeads wurden dann mit 10 µl DNase I, entsprechend 500 U, versetzt und für eine halbe Stunde bei RT auf dem Überkopfmischer rotiert. Nach kräftigem

Schütteln auf einem Vortexer und ausgiebigem Scheren mit einer langen, dünnen 200 µl-Pipettenspitze wurde die Suspension für 2 Minuten in den MPC gestellt und der Überstand abgetrennt und gesammelt. Nach erneutem Scheren mit weiteren 200 µl BRB-Puffer wurde die Trennprozedur noch einmal wiederholt und der Überstand mit der ersten Fraktion vereinigt. Auch hiervon wurde ein Cytospinpräparat angefertigt. Zur Auswertung wurden die Cytospinpräparate schließlich immunzytochemisch mit den oben beschriebenen Färbemethoden behandelt.

### 2.2.5 Anreicherungsverfahren mit MACS-Zytokeratin-Microbeads

Die Durchführung des Verfahrens richtete sich streng am Protokoll des Carcinoma Cell Enrichment Kits der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, aus. Zur Gewinnung von humanen peripheren Blutleukozyten wurden in einem konischen 50 ml Falcon® Polypropylen-Röhrchen zunächst 35 ml Ficoll-Hypaque® mit 10 ml peripherem, venösem Blut eines klinisch gesunden, jungen Mannes überschichtet. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 900 g und 4°C ohne Bremsfunktion wurde die Interphase (nach Abheben und Verwerfen des Überstands) mit einer Pipette abgenommen und mit 40 ml 1x Dilution Buffer (Kit) in einem 50 ml Falcon® -Polypropylen-Röhrchen durch erneutes Resuspendieren und Zentrifugieren mit 300 g bei 4°C für 10 Minuten gewaschen. Die so gewonnene Leukozytenfraktion wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Zu  $4,7 \times 10^6$  Leukozyten wurden  $8 \times 10^5$  Zellen der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 gemischt. Diese Zellsuspension wurde in 2 ml 1x Dilution Buffer (Kit) resuspendiert und die Zellen durch Hinzufügen von 250 µl MACS CellPerm-Lösung (Saponinhaltig, Kit) für fünf Minuten bei RT lysiert. Darauf folgte eine Fixierung der Zellen durch Hinzufügen von 250 µl MACS CellFix-Lösung (Formaldehydhaltig, Kit) mit einer Inkubation von einer halben Stunde bei RT auf dem Rollenmischer. Nach Zentrifugation bei 300g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml 1x MACS CellStain-Lösung (Saponinhaltig, Kit) resuspendiert. Nach einem Waschschrift durch erneute Zentrifugation bei 300g für 10 Minuten, Verwerfen des Überstands und Resuspendieren des Zellpellets in 60 µl 1x CellStain-Lösung wurden alle F<sub>c</sub>R-Bindungsstellen durch Hinzufügen von 20 µl F<sub>c</sub>R-Blocking-Reagenz (Kit) abgesättigt. Nach Hinzufügen von 20 µl MACS Zytokeratin Microbeads (monoklonaler Antikörper gegen Zytokeratin 7 und 8, Klon CAM5.2, Isotyp IgG2a; Literatur unter Makin et al. 1984) wurde für 45 Minuten bei RT inkubiert. Überschüssige Microbeads wurden durch einmaliges Waschen mit 400 µl 1x MACS CellStain-Lösung entfernt und die Zellen in 1 ml 1x MACS CellStain-Lösung resuspendiert. Danach wurde erneut die Zellzahl bestimmt und von einem Teil der Zellen zwei Cytospinpräparate mit jeweils  $4 \times 10^5$  Zellen für Kontrollzwecke angefertigt. Das eine Präparat wurde mit mAb A45-B/B3-Cy3 zur Bestimmung der Anzahl CK-positiver Zellen gefärbt und das andere mit Anti-FITC-Cy3 als Negativkontrolle. Die verbleibenden  $1,95 \times 10^6$  Zellen wurden auf eine „MACS positive selection column MS“ (Kit) appliziert, die sich in einem magnetischen Zellseparator befand (Magnetic cell separator MiniMACS) und zuvor mit 500 µl entgastem 1x Dilution Buffer äquilibriert wurde. Die erste Fraktion („break through“) wurde aufgefangen, als Cytospinpräparation aufgearbeitet und mit mAb A45-B/B3-Cy3 gefärbt. Die Säule wurde dann mit 3x 500 µl entgastem 1x Dilution Buffer gewaschen. Die entsprechenden Waschfraktionen wurden aufgefangen, gepoolt und ebenfalls als Cytospinpräparation aufgearbeitet und mit mAb A45-B/B3-Cy3 gefärbt. Nach dem Separieren von Säule und Magnet wurden die Zellen schließlich mit 1 ml entgastem 1x Dilution Buffer eluiert, als Cytospinpräparation aufgearbeitet und mit mAb A45-B/B3-Cy3 gefärbt.

## 2.2.6 Laser-Mikrostrahl-Mikrodissektion (LMM)/ Laser-Druck-Katapultation (LPC)

### a) Vorbereitung der Proben

Zunächst wurden Histobond-Objektträger in 100% Ethanol mit einer 1,35 µm dicken Polyethylenaphtalat-Folie überzogen und luftgetrocknet. Nach Fixierung der Folie auf dem Objektträger mit Fixogum wurden maximal  $2 \times 10^5$  Zellen als Cytospinpräparation (siehe Kapitel 2.2.2) auf eine kreisrunde Fläche mit 18 mm Durchmesser aufgebracht und über Nacht luftgetrocknet. Am nächsten Tag wurden die Zellen dann immunzytochemisch mit Anti-Zytokeratin mAb A45-B/B3 nach der APAAP-Methode und Entwicklung mit NBT/BCIP [siehe Kapitel 2.2.3 e) III] gefärbt, luftgetrocknet und staubfrei bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

### b) Laserdissektion und -katapultation

Die Isolierung einzelner Zellen wurde an einem PALM<sup>®</sup> Robot-Microbeam-System vorgenommen. Die Anlage besteht aus einem Zeiss-Invertmikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen) mit Spezialobjektiv, aus einer digitalen Bildverarbeitungseinheit mit CCD-Camera, PC und zugehöriger Software sowie aus einer Haltebühne und einem Manipulator, die über Hochpräzisionselektromotoren per Mausbewegung gesteuert werden. Das Spezialobjektiv ermöglicht einerseits eine 40x Vergrößerung mit Reichweite eines bis zu acht Millimeter entfernten Objekts, andererseits der Einblendung eines Stickstoff-Laserstrahls (337 nm), der wiederum in Fokus und Intensität stufenlos regulierbar ist. Das System beinhaltet sowohl eine Schneide- als auch eine Katapultfunktion.

In einem ersten Arbeitsschritt wurden mit der Schneidefunktion des Lasers bis zu 70 einzelne Zellen „ausgeschnitten“, d.h. es wurde in ausreichendem Sicherheitsabstand (3 - 4 µm) die um eine Zelle liegende Folie mit einer am Objektivausgang befindlichen Energie von 10 µJ in einer bis zu maximal 1 µm breiten, ringförmigen Spur zerstört. In einem zweiten Arbeitsschritt wurde ein durchsichtiger (um ein Durchtreten des Auflichts zu gewährleisten), mit 5 µl selbstangesehtem DOP-Lysis-Puffer bzw. 3 µl Mse-Lysis-Puffer (siehe Kapitel 2.2.12) benetzter Deckel eines 200 µl PCR-Gefäßes in den Manipulator eingespannt, der sich im Abstand von etwa 1 mm über dem Objekt befand und zuvor im Strahlengang des Lasers zentriert wurde. In einem dritten Schritt wurde dann der Laser etwas unterhalb des Objekts fokussiert, die Energie am Objektivausgang auf 50 µJ hochreguliert und das Objekt mit einem einzigen, zielgerichteten Impuls in den knapp darüberliegenden, am Deckel hängenden Tropfen mit Lysis-Puffer katapultiert. Dieser Vorgang wurde für jeweils fünfzig einzelne Zellen wiederholt, ohne den Deckel zu wechseln. Schließlich wurde der Deckel vom Manipulator abgenommen, auf ein steriles 200 µl PCR-Gefäß gesetzt und der Inhalt durch kurzes Anzentrifugieren auf den Boden des Gefäßes zur weiteren Analyse befördert.

## 2.2.7 Zellaufschluß für DOP-PCR

Die in 5 µl selbstangesehtem DOP-Lysis-Puffer bzw. QIAGEN-Lysis-Puffer befindlichen Zellen wurden bei 60°C über Nacht in einem PCR-Heizblock aufgeschlossen. Die Proteinase K wurde anschließend für 10 Minuten bei 95°C hitzeinaktiviert und einem Genom-Amplifikationsverfahren (DOP-PCR oder MseI-Adapter-PCR) unterzogen.

### 2.2.8 DOP-PCR

#### a) Präamplifikation

Zu 5 µl verdautem Zell-Lysat bzw. zu 5 µl einer genomischen DNA-Lösung wurden 5 µl eines Präamplifikations-Master-Mixes gegeben, so daß sich nach Mischung mit dem Zell-Lysat zu Beginn der Reaktion folgende Konzentrationen einstellten:

- 1x konzentrierter PCR-Puffer Nr. 3 aus dem "Expand Long Template PCR System" (enthält 2,25 mM Magnesiumchlorid und Detergentien)
- 0,5 mM dNTP-Mix (Deoxynukleotid Triphosphat-Set, PCR Grade; dATP, dGTP, dCTP, dTTP jeweils 0,5 mM)
- 1 µM MW6-Primer
- 0,35 U/µl Polymerasen-Mix aus dem Expand Long Template PCR System
- Nuklease-freies Wasser

Nach initialer Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten wurden folgende 8 Zyklen gefahren:

- 94°C für 1 Minute (Aufschmelzen)
- 25°C für 1 Minute (Annealing mit geringer Stringenz)
- 25°C bis 68°C mit 0,2°C/Sekunde (Langsamer Anstieg der Hybridisierungsstringenz)
- 68°C für 3 Minuten (Primer-Extension)

Nach einem finalen Extensionsschritt bei 68°C für 7 Minuten wurde die Reaktion auf 4°C heruntergefahren.

#### b) Amplifikation

Ohne die PCR-Gefäße aus der PCR-Maschine zu nehmen wurden 40 µl eines Amplifikations-Mixes folgender Zusammensetzung addiert und die beiden Lösungen gut vermischt:

- 5 µl 10x konzentrierter PCR-Puffer Nr. 3 aus dem Expand Long Template PCR System
- 5 µl 5 mM dNTP-Mix
- 2 µl 100 µM MW6-Primer
- 1 µl entsprechend 3,5 U Polymerasen-Mix aus dem Expand Long Template PCR System
- 27 µl Nuklease-freies Wasser

Im folgenden wurden 35 Zyklen mit folgenden Temperatur-und Zeitschritten durchlaufen:

- 93°C für 30 Sekunden (Geringe Schmelztemperatur zur Vermeidung von Enzymaktivitätsverlust)
- 60°C für 1 Minute
- 68°C für 2 Minuten mit zusätzlichen 14 Sekunden pro Zyklus (Extension mit zunehmender Reaktionszeit zum Ausgleich von Enzymaktivitätsverlust).

Nach einem finalen Extensionsschritt von 68°C für 7 Minuten wurde die Reaktion auf 4°C heruntergefahren und damit beendet. Ein Aliquot des Produktes wurde gelelektrophoretisch analysiert.

### 2.2.9 DNA-Gelelektrophorese

Gelelektrophoresen wurden mit 2% MetaPhor<sup>®</sup> agarose mit 1 µl SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain pro 20 ml Gel in TBE-Puffer mit 8V/cm in Gelelektrophoresekammer-Systemen von Biorad durchgeführt. Als Größenstandard wurde der Molecular Weight

Marker VIII in einer Konzentration von 0,25 µg/µl eingesetzt. 1 µl des aufzutrennenden Produkts wurden mit 5 µl 1x Loading-Buffer auf das Gel aufgetragen. Eine Gel-Dokumentationssystem mit UV-Tisch, CCD-Kamera, PC und Thermodrucker-Einheit diente der Auswertung.

#### 2.2.10 PCR-Markierung von Produkt aus der DOP-PCR (Label-DOP-PCR)

5 µl aus der DOP-Amplifikationsreaktion wurden mit 45 µl eines Markierungs-Mixes versetzt, der sich wie folgt zusammensetzte:

- 5 µl 10x konzentrierter PCR-Puffer Nr. 3 aus dem Expand Long Template PCR System
- 5 µl low-dNTP-Mix
- 2,5 µl 1 mM Biotin-16dUTP oder 5 µl 1 mM Digoxigenin-11dUTP
- 4 µl 100 µM MW6-Primer
- 0,5 µl entsprechend 1,75 U Polymerasen-Mix aus dem Expand Long Template PCR System
- Nuklease-freies Wasser ad 45 µl

Das PCR-Programm bestand aus einem Denaturierungsschritt von 2 Minuten bei 94°C, gefolgt von 25 Zyklen mit einminütiger Denaturierung bei 94°C, einminütigem Annealing bei 60°C und zweiminütiger Extension bei 68°C mit einer Verlängerung von 14 Sekunden pro Zyklus. Vor Abkühlung und Beendigung der Reaktion auf 4°C wurde zuletzt ein siebenminütiger Extensionsschritt angeschlossen.

Vor dem Einsatz des erhaltenen Produkts für eine CGH wurde das Reaktionsgemisch zur Abtrennung überschüssiger Nukleotide über eine Miniatur-Ionenaustauschersäule (QIAquick PCR Purification Kit) entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt und danach die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt.

#### 2.2.11 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten DNA wurde photometrisch mit einem UV-Spektrometer (Ultrospec 2000) durchgeführt. Der Absorption von 1 OD (optische Dichte) bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml.

#### 2.2.12 Markierung von Referenz-DNA durch Nick-Translation

Nick-Translation wurde mit einem kommerziellen Kit (DIG-Nick bzw. Biotin-Nick Translation Mix) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Zu jeweils 1 µg Referenz-DNA in 16 µl Wasser wurden 4 µl des Kit-Mixes addiert. Im Falle männlicher humaner genomischer DNA führte eine Reaktionszeit bei 16°C von drei bis vier Stunden zum gewünschten Maximum der Längenverteilung in der Gelelektrophorese bei etwa 500 bp, im Falle der weiblichen DNA waren fünf bis sechs Stunden Reaktionszeit bis zu diesem Maximum dieser Längenverteilung notwendig.

### 2.2.13 MseI-Adapter-PCR

Als Ausgangsmaterial wurden hierfür in gleicher Weise wie für die DOP-PCR Zellen mit Hilfe von Laserdissektion- und katapultation [siehe Kapitel 2.2.6 b)] gewonnen. Als Auffang-Puffer dienten 3  $\mu\text{l}$  Mse-Lysis-Puffer. Der Zellaufschluß wurde jedoch hier im Vergleich zur DOP-PCR unter leicht abgeänderten Pufferbedingungen vorgenommen:

#### a) Zellaufschluß für MseI-Adapter-PCR

Die in 3  $\mu\text{l}$  Mse-Lysis-Puffer isolierten Zellen wurden bei 42°C für 10 Stunden in einem PCR-Heizblock verdaut. Die Proteinase K wurde anschließend für 10 Minuten bei 80°C hitzeinaktiviert.

#### b) MseI-Verdau

Zu 3  $\mu\text{l}$  lysierten Zellen wurde 0,2  $\mu\text{l}$  10x OFA-Buffer, 0,5  $\mu\text{l}$  (entsprechend 10 U) MseI Restriktionsenzym und 1,3  $\mu\text{l}$  Nuklease-freies Wasser gegeben. In einem Parallelansatz wurde 1  $\mu\text{l}$  (500 pg) Referenz-DNA (Human Genomic DNA, male oder female) mit 0,5  $\mu\text{l}$  MseI Restriktionsenzym, 3  $\mu\text{l}$  nukleasefreiem Wasser und 0,5  $\mu\text{l}$  10x OFA-Buffer versetzt. Beide Ansätze wurden für 3 Stunden bei 37°C in einem PCR-Heizblock inkubiert. Das Restriktionsenzym wurde anschließend bei 65°C für 5 Minuten inaktiviert.

#### c) Pre-Annealing und Ligation der Primer

Ein Pre-Annealing-Ansatz setzte sich zusammen aus 0,5  $\mu\text{l}$  OFA-Buffer, 0,5  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  LIB1-Oligonukleotidadapter, 0,5  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  ddMseI1-Oligonukleotidadapter und 1,5  $\mu\text{l}$  nukleasefreiem Wasser. Das Annealing wurde in einem PCR-Heizblock in absteigenden Temperaturen von 65°C bis 15°C in einminütigen Schritten durchgeführt.

#### d) Ligation

Zu den 3  $\mu\text{l}$  preannealten Adaptoren wurden 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase, 1  $\mu\text{l}$  10x Ligase-Puffer (enthält 10 mM ATP) und 5  $\mu\text{l}$  des MseI-verdauten Zell-Lysats bzw. 5  $\mu\text{l}$  der MseI-geschnittenen Referenz-DNA gegeben. Der Reaktionsansatz bei wurde bei 15°C in einem PCR-Block über Nacht ligiert.

#### e) Primäre PCR

Zu dem Ligations-Produkt wurden 40  $\mu\text{l}$  eines PCR-Mix addiert, welcher sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte: 3  $\mu\text{l}$  10x konzentrierter PCR-Puffer Nr. 1 aus dem Expand Long Template PCR System (enthält 2,25 mM Magnesiumchlorid und Detergentien), 2  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP-Mix, 1  $\mu\text{l}$  (3,5 U) Polymerasen-Mix aus dem Expand Long Template PCR System und 35  $\mu\text{l}$  nukleasefreiem Wasser.

Das PCR-Programm gestaltete sich folgendermaßen:

1x	14x	8x	22x	1x	∞
	94°C 40"	94°C 40"	94°C 40"		
68°C 3'	57°C 30"	57°C 30"	65°C 30"	68°C 3' 40"	4°C
	68°C 1' 30"	68°C 1' 45"	68°C 1' 53"		
	+1" / Zyklus	+1" / Zyklus	+1" / Zyklus		

Ein Aliquot des Produktes wurde gelelektrophoretisch analysiert.

f) PCR-Markierung von Produkt aus der MseI-Adapter-PCR

Zu einem Master-Mix von 40 µl wurden 0,5 µl des Produkts aus der Primär-PCR pipettiert. Der Master-Mix setzte sich folgendermaßen zusammen:

1x Ansatz	40 µl
BM Puffer 1	4
100 µM LIB1	6
7/8 Nukleotid-Mix	1,4
1mM Digoxigenin-dUTP	1,75
Taq Polymerase	0,5
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	26,35

7/8 Nukleotid-Mix: 50 µl setzen sich zusammen aus jeweils 5 µl 100 mM dATP, dCTP und dGTP sowie 4,4 µl dTTP und 30,6 µl nukleasefreiem Wasser.

BM Puffer 1: 10x konzentrierter PCR-Puffer Nr. 1 aus dem Expand Long Template PCR System.

Das PCR-Programm gestaltete sich wie folgt:

1x	10x
94°C 1'	94°C 30"
60°C 30"	60°C 30"
72°C 2'	72°C 2'
	+2" / Zyklus

Vor Einsatz in einer CGH wurde von einem Aliquot (1 µl) des PCR-Produkts eine Gelelektrophorese durchgeführt, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Falls das gewünschte Produkt vorhanden war, wurde der restliche Ansatz (etwa 1 µg) in der nachfolgenden CGH zur Hybridisierung eingebracht.

## 2.2.14 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

## a) Hybridisierung

Ein Fällungsansatz bestand schematisch aus folgender Zusammenstellung:

DNA	Volumen	Human Cot- 1 DNA	Salmon testis-DNA	Summe	3 M NaOAc (1/10 Vol.)	100% EtOH (x 2,5 Vol.)
Referenz-DNA	40 µl					
Tumor-DNA	40 µl	50 µl	2 µl	132 µl	13,2 µl	363 µl

Der Fällungsmix wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht aufbewahrt. Nach der Fällung wurde der Mix bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten mit  $1,5 \times 10^4$  g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pelett mit 70 % (v/v) Ethanol für 10 Minuten bei  $1,5 \times 10^4$  g mindestens zweimal gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 3-4 µl deionisiertem Formamid bei  $37^{\circ}\text{C}$  schüttelnd in einem Wasserbad für etwa 2 Stunden gelöst. Zu dem Formamid-Ansatz wurde dann das gleiche Volumen (3-4 µl) 30% (w/v) Dextransulfat hinzugefügt und die Reaktionsmischung bei  $75^{\circ}\text{C}$  für 7 Minuten denaturiert. Danach wurde der Mix für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  vorhybridisiert. In der Zwischenzeit wurden die Metaphasebereiche von kommerziellen, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Metaphase-Objektträgern durch Anhauchen mit einem Diamantstift markiert. Die Objektträger wurden dann für genau 5 Minuten in 70% (v/v) Formamid/2xSSC bei  $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Anschließend wurden die Objektträger durch jeweiliges einminütiges Eintauchen in 70% (v/v), 80% (v/v) und 100% Ethanol dehydriert. Der Hybridisierungsmix wurde dann auf das Chromosomenpräparat aufgetragen, mit einem 18 x 18 mm Deckglas versehen und mit Fixogum luftdicht verschlossen. Diese Chromosomen-DNA-Präparate wurden über drei Tage in einer feuchten Hybridisierungsbox bei  $37^{\circ}\text{C}$  hybridisiert. Nach Abziehen des Fixogums wurden die Präparate zunächst in  $42^{\circ}\text{C}$  warmen 4x SSC/0,2% Tween-20 bis zum spontanen Abfallen der Deckgläser geschwenkt. Danach folgte ein erster Waschschrift mit 3x5 Minuten bei  $42^{\circ}\text{C}$  in 4x SSC/0,2% Tween-20. In einem zweiten Waschschrift wurden die Objektträger mit einer Stringenz von 3x5 Minuten bei  $60^{\circ}\text{C}$  in 1x SSC gewaschen und anschließend kurz in 4x SSC/0,2% Tween-20 getaucht.

## b) Detektion der markierten, hybridisierten DNA

## I) Detektion von markiertem DOP-PCR-Produkt in der CGH

Nach Inkubation der Slides mit Bio-Blocking Reagenz für 25 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde zunächst mit Avidin-FITC (5 µg/ml in Bio-Blocking-Reagenz) für weitere 25 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 2 x 3 min mit 4xSSC/0,05% Tween 20 und 1 x 3 min mit TNT-Puffer waschen folgte eine dritte Inkubation mit Anti-Dig-Rhodamin (2 µg/ml in Dig-Blocking Reagenz) und Avidin-FITC (5 µg/ml) für 25 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Nach erneutem Waschen mit 2 x 3 min mit TNT-Puffer und 1 x 3 min mit PBS-Puffer wurden die Objektträger durch eine Alkoholreihe [70, 80 und 100% (v/v), jeweils kurz eintauchen] dehydriert und schließlich mit DAPI-haltigem Mounting Medium (Vectorshield) eingedeckelt.

## II) Detektion von markiertem MseI-Adapter-PCR-Produkt in der CGH

Zunächst wurde 1 ml 3% (w/v) BSA zur Reduktion von Hintergrundsignalen auf den Objektträger gegeben und für 30 Minuten bei 37°C in feuchter Kammer inkubiert. Nach kurzem Eintauchen in 4x SSC/0,2% Tween-20 wurden 150 µl eines Gemisches folgender Zusammensetzung auf die Metaphasen appliziert: Anti-Digoxigenin-Fluorescein in einer 1:200 Verdünnung und Cy3.5-konjugiertes Avidin in einer 1:300 Verdünnung in jeweils 4x SSC/0,2% Tween-20/1% (v/v) BSA. Damit wurde das Präparat für 45 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem Waschschrift von 3x5 Minuten bei 42°C in 4x SSC/0,2% Tween-20 wurden die Objektträger lichtgeschützt luftgetrocknet und anschließend mit 20 µl DAPI-haltigem Mounting Medium (Vectorshield) eingedeckelt.

### c) Digitale Bildanalyse der CGH-Metaphasen

Nach Aufsuchen einer geeigneten Metaphase mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert, Zeiss, Oberkochen) wurde diese mit drei unterschiedlichen Wellenlängenbereichen (fluorochromspezifische optische Filter für FITC, Rhodamin und DAPI) angeregt und die entsprechend emittierten Fluoreszenzsignale (Tumor-DNA: grün, Referenz-DNA: rot und Gegenfärbung mit DAPI blau) mit einer an das Mikroskop angeschlossenen, gekühlten CCD-Kamera (Photometrics, Tucson, USA) detektiert, digitalisiert und abgespeichert und schließlich mit Hilfe des quantitativen Bildverarbeitungssystems QUIPS (Vysis GmbH, Stuttgart, Germany) wie bei Piper et al. beschrieben verarbeitet (Piper et al. 1995). Um ein im Mittel 95%-Konfidenzintervall für jedes Rot/Grünverhältnis zu erhalten ( $\pm 1,96$  Standardabweichung vom Mittelwert), wurde für jede Hybridisierung die Daten von acht bis zwölf repräsentativen Beispielen eines Chromosoms zur Auswertung überlagert. Eine Überrepräsentation einer chromosomalen Region wurde definiert als Verhältnis von Tumor (grün) zu Referenz-DNA (rot) von mindestens 1,2. Eine Unterrepräsentation war definiert als ein Verhältnis von 0,8 oder darunter. Eine Hybridisierung von normaler männlicher gegen normale weibliche genomische DNA diente als Negativkontrolle und um die Linearität einer Hybridisierung zu überprüfen. Telomer, Zentromer und Regionen mit Heterochromatin waren von der Interpretation ausgeschlossen

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Patientenkollektiv

Die klinkopathologischen Daten der Patientinnen, bei denen erfolgreich eine Primärkultur aus angereicherten mononukleären Zellen (MNC) des Beckenkammknochenmarks erzeugt werden konnte, finden sich in Tabelle 3.1. Aus ihr wird ersichtlich, daß es sich bei dem Patientengut um überwiegend postmenopausale Patientinnen (medianes Alter 61 Jahre) mit einer Tumorgroße kleiner 5 cm handelt (jeweils 46% pT1 und pT2-Tumore). Bei der Hälfte der Patientinnen lag eine Beteiligung der axillären Lymphknoten vor, aber keine der Frauen wies bei Diagnosestellung eine Fernmetastasierung auf. Histologisch handelte es sich bei etwa der Hälfte der Malignome um duktale, in 25% der Fälle um lobuläre Karzinome. Der Rest wurde anderweitig histologisch klassifiziert. Hinsichtlich der biologischen Eigenschaften war die überwiegende Mehrheit der Fälle (80%) positiv für einen Nachweis des Östrogenrezeptors und bei 50% lagen die Werte der Proteasen uPA und PAI-1 unterhalb des cut-offs (Jänicke et al. 2001, et al. 2002). Im Rahmen des Primärscreenings, also der immunzytochemischen Bestimmung der Anzahl CK-positiver Zellen unter  $2 \times 10^6$  MNC des Knochenmarks nach der von Pantel et al. beschriebenen Methode (Pantel et al. 1994), konnten in knapp 21% der untersuchten Knochenmarks-biopsien epitheliale Zellen nachgewiesen werden. Die unterschiedlich hohen Ki67-Wachstumsfraktionen und HER-2/neu-Expressionstärken verteilten sich in etwa gleichmäßig über die einzelnen Fälle. Alle Patientinnen hatten zum Zeitpunkt der Probengewinnung weder eine Chemo- noch eine Strahlentherapie erhalten.

#### 3.2 Zellkultur

In einem Zeitraum von etwa vier Monaten wurden Primärkulturen von insgesamt 41 Patientinnen angelegt (sog. Knochenmarksexpandate). Dabei stammten 39 Proben von Patientinnen mit einem histologisch gesichertem Mammakarzinom (klinische und pathologische Daten siehe vorangehendes Kapitel). Zwei weitere Proben entstammten von klinisch gesunden Knochenmarkspendern. In 31 Fällen (75,6%) gelang das Kultivieren der Zellen über mehrere Passagen, so daß in diesen Fällen eine weitergehende Analyse der Zellen möglich war. Darin enthalten waren auch die Kulturen der klinisch gesunden Knochenmarksspender. Im Falle der übrigen Knochenmarkproben konnte kein Anwachsen und keine Expansion adhärenter Zellen erreicht werden, so daß diese Zellen keiner näheren Untersuchung zugänglich waren.

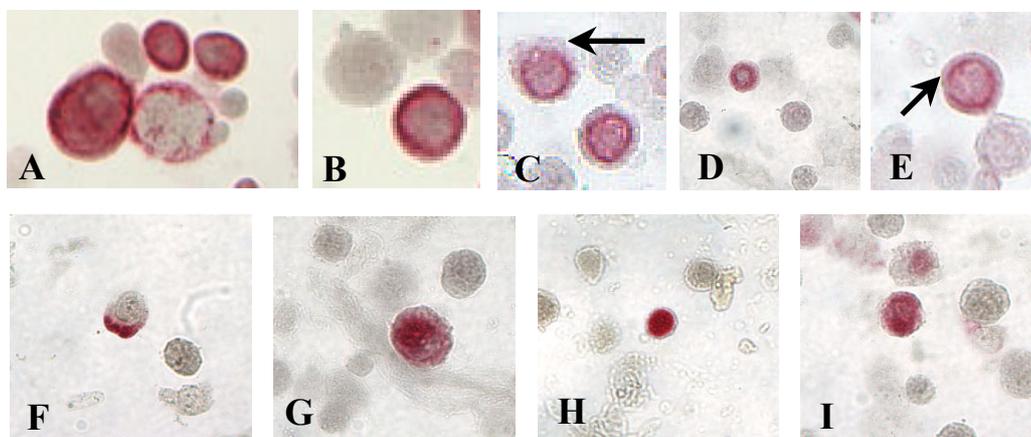
Unter den gewählten Kulturbedingungen traten erste Nester mit adhärenenten Zellen nach etwa zehn Tagen auf. Sobald diese Nester ein bis zwei Zentimeter Durchmesser erreicht hatten, wurde das Medium zum ersten Mal gewechselt, wodurch der größte Teil der nicht-adhärenenten, hämatopoetischen Zellen aus der Kultur mitentfernt wurde. Nach etwa vier bis fünf Wochen war der Boden der Kulturflasche entweder fast vollständig durch adhärenente Zellen bewachsen (95% Konfluenz) oder es kam aufgrund langsamen Wachstums nur zu einem unvollständigen Bewachsen des Kulturflaschenbodens. In beiden Fällen wurden die Zellen passagiert, was im Falle der unvollständig bewachsenen Kulturen häufig zu einer Reinduktion der Zellteilung führte. Dadurch war auch ein Fortführen dieser Kulturen möglich. Von den erfolgreich angelegten Zellkulturen wurde nur eine ein einziges mal passagiert, 51,7% wurden zweimal passagiert, 29% dreimal und die restlichen Kulturen (12,9%) wurden viermal passagiert.

Patienten ID	Alter	pT	pN	Grade	Histologie	ER	PR	uPA	PAI-1	Ki67	HER2/neu	Primärscreening
#117	58	2	1	2	duktal	+	+	erhöht	normal	mittel	3+	0
#226	54	2	0	3	NCS, unreif	+	+	n.b.	n.b.	niedrig	Negativ	0
#235	71	1	1	3	NCS, solid, lymph	-	-	n.b.	n.b.	hoch	Negativ	0
#305	77	1	1	1	papillär	+	-	n.b.	n.b.	mittel	Negativ	0
#321	51	1	0	1	duktal	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0
#371/72	75	2	1	2	lobulär	+	+	normal	normal	mittel	1+	1
#391	57	2	1	3	lobulär, lymphatisch	+	+	normal	erhöht	niedrig	2+	0
#539/40	37	DCIS	1	n.b.	duktal, nicht invasiv	+	-	normal	normal	hoch	3+	n.b.
#645	70	3	1	2	lobulär	+	+	n.b.	n.b.	mittel	Negativ	0
#630/51	50	2	0	3	duktal, angioinvasiv	+	+	normal	normal	hoch	3+	0
#652	54	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
#653/54	63	1	1	3	duktal	+	-	erhöht	normal	hoch	Negativ	0
#655/56	41	1	0	2	duktal, angioinvasiv	-	+	normal	normal	hoch	1+	1
#638/59	60	2	1	3	lobulär	+	-	normal	normal	hoch	3+	1
#660/61	63	2	0	2	duktal	+	+	normal	normal	mittel	1+	0
#662/63	65	1	1	2	lobulär	+	+	normal	normal	hoch	Negativ	0
#664/65	62	1	0	3	duktal	-	-	normal	normal	hoch	1+	0
#667/68	73	1	0	2	duktal	+	+	normal	normal	mittel	1+	2
#669/70	42	2	0	3	duktal	+	+	normal	normal	hoch	3+	2
#671	49	2	1	2	lobulär	+	+	normal	normal	hoch	1+	0
#672/73	41	2	1	2	mischdifferenziert	+	+	normal	normal	mittel	3+	0
#674/75	43	2	0	3	polymorph, angioinvasiv	+	-	normal	normal	n.b.	3+	0
#676	80	1	0	2	duktal	+	+	n.b.	n.b.	mittel	0	0
#681/82	75	2	0	2	Gallert-Carcinom	+	+	normal	normal	mittel	1+	0
#685/86	64	2	0	2	duktal	+	-	erhöht	erhöht	mittel	1+	0
#687/88	55	1	0	2	duktal	+	-	erhöht	normal	mittel	2+	0
#689/90	46	1	0	3	duktal	-	-	erhöht	normal	mittel	Negativ	0
#693/94	42	1	1	3	duktal	+	+	normal	normal	hoch	3+	0
#697/98	71	2	0	2	lobulär	+	+	normal	normal	mittel	Negativ	0

**Tabelle 3.1** Klinikopathologische Daten der Patientinnen, aus deren Knochenmarksaspiraten erfolgreich Primärkulturen erzeugt werden konnten. Das

Alter bezieht sich auf den Zeitpunkt der Diagnosestellung; "ER", "PR": Östrogenrezeptor/Progesteronrezeptor. Positiv (+) gewertet, falls immunzytochemischer Remmele-Score > 0; "uPA": urokinase-like plasminogen activator. Erhöht, falls uPA > 3,0 pg/mg Gesamtprotein; "PAI-1": plasminogen-aktivator inhibitor. Erhöht, falls PAI-1 > 14,0 pg/mg Gesamtprotein; Als "niedrig" eingestuft, falls Remmele-Score 1-2, "mittel" bei einem Score von 3-5, "hoch" bei Werten zwischen 6-12; Einteilung nach dem DAKO-Score; Primärscreening: Es wurde die Anzahl CK-positiver Zellen pro 2x10<sup>6</sup> MNC bestimmt; "n.b.": nicht bekannt.

Die nach jeder Passage von einem Aliquot der abgelösten Zellen angefertigten Cytopspinpräparate zeigten beim immunzytochemischen Nachweis von Zytokeratin sowohl hinsichtlich der Zellmorphologie als auch hinsichtlich des Färbeverhaltens ein heterogenes Bild. Es wurden daher Kriterien für das Einordnen der gefärbten Zellen in drei unterschiedliche Gruppen erstellt (Gruppe A, B und C). Typische Beispiele von Vertretern der jeweiligen Gruppe sind in Abbildung 3.1 dargestellt.



**Abbildung 3.1 Immunzytochemischer Nachweis von Zytokeratin (mAb A45-B/B3, APAAP, Neufuchsin) und Einteilung der gefärbten Zellen in drei Kategorien.** A) und B) Zellen der Gruppe A sind morphologisch rund und zeigen ein eindeutig zytoplasmatisches, ringförmiges Färbemuster. Ihre Zellkerne sind nicht angefärbt und gut abgrenzbar, ein ungefärbter Randsaum fehlt. C) - E) Gruppe B-Zellen zeigen bei ringförmiger Färbung einen ungefärbten Randsaum (angedeutet durch schwarze Pfeile), erfüllen aber sonst die Kriterien der Gruppe A. F) - I) Zellen mit nur teilweiser Anfärbung des Zellkörpers, eher flächigem Färbemuster oder von nicht-runder Morphologie gehören zur Gruppe C. Alle Abbildungen in jeweils 400x Vergrößerung.

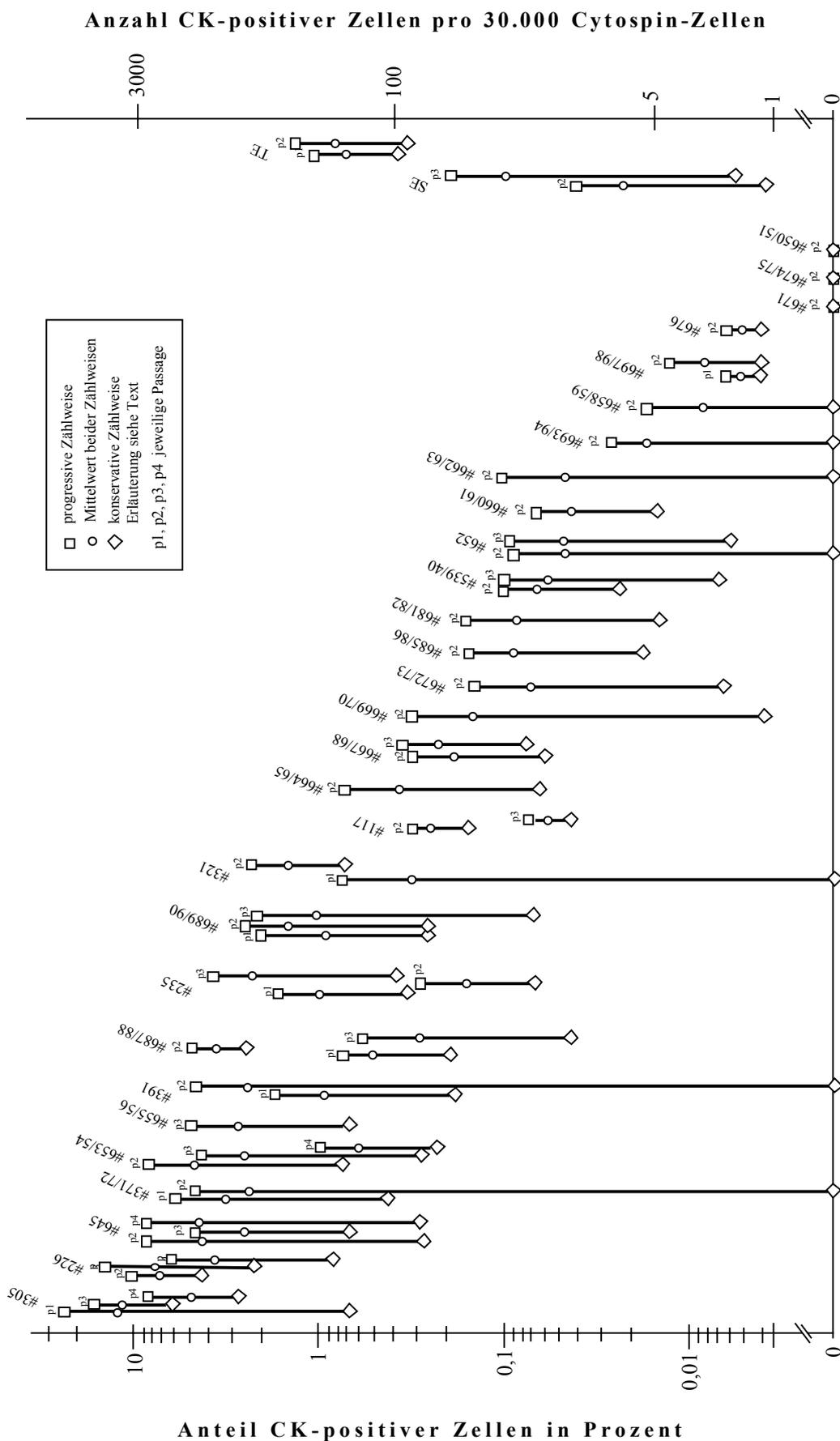
Morphologisch runde Zellen mit eindeutig zytoplasmatischem, ringförmigem Färbemuster ohne ungefärbten Randsaum wurden einer Gruppe A zugeordnet. Ihre Zellkerne waren nicht angefärbt und gut abgrenzbar. Die Zellen dieser Gruppe wurden als Zytokeratin-positiv erachtet. Zellen, die bei ringförmiger, zytoplasmatischer Färbung einen ungefärbten Randsaum aufwiesen, aber sonst den Kriterien der Gruppe A entsprachen, wurden einer Gruppe B zugeordnet und wurden als nicht sicher Zytokeratin-positiv ausgewertet. Zur Gruppe C gehörten Zellen mit nur teilweiser Anfärbung oder einem über die gesamte Zelle verteiltem, flächigem Färbemuster oder Zellen von nicht-runder Morphologie. Diese Zellen wurden als unspezifisch gefärbte Zellen gewertet. Die zu jeder Cytopspinpräparation angefertigte Isotypkontrolle (gleicher immunzytochemischer Färbeprozess, aber mit unspezifischem Antikörper vom gleichen Isotyp) war, unabhängig von der Herkunft der Knochenmarksbiopsie und unabhängig von der Passagezahl, in allen Fällen negativ.

Basierend auf dieser Einteilung wurden zur Bestimmung des relativen und absoluten Anteils CK-positiver Zellen zwei unterschiedliche Zählmethoden gewählt. Die erste, „konservative“ Zählmethode berücksichtigte nur Zellen der Gruppe A. In einer zweiten, weniger stringenten, „progressiven“ Zählung wurden sowohl Zellen der Gruppe A als auch Zellen der Gruppe B miteingeschlossen. Tabelle 3.2 zeigt eine Zusammenstellung der CK-Positivitätsraten der einzelnen Primärkulturen zu den verschiedenen Passagezeitpunkten, die in Abbildung 3.2 graphisch aufgearbeitet wurden. Man erkennt, daß der Anteil CK-

positiver Zellen zwischen den einzelnen Kulturen stark heterogen ausfiel und über drei Größenordnungen reichte. Die maximale Rate an CK-exprimierenden Zellen war bereits zum Zeitpunkt der zweiten Passage erreicht. Bei konservativer Auswertung, also einer ausschließlichen Berücksichtigung von Gruppe A-Zellen, enthielten pro Cytospin-Meßeinheit von  $3 \times 10^4$  Zellen 21/31 (67,7%) der Primärkulturen CK-positive Zellen bis spätestens zur zweiten Passage. Bei „progressiver“ Auswertung, also der Berücksichtigung von Gruppe A- und B-Zellen, enthielten sogar 28/31 (90,3%) aller Kulturen CK-positive Zellen bis zum Zeitpunkt der zweiten Passage. Die Rate CK-positiver Zellen des Kulturscreenings lag somit deutlich über der des Primärscreenings (21%).

Anzahl CK-positiver Zellen pro 30.000 expandierter Zellen (Prozent)								
Pat. ID	p1		p2		p3		p4	
	konservativ	progressiv	konservativ	progressiv	konservativ	progressiv	konservativ	progressiv
#117	n.a.	n.a.	44 (0,15%)	88 (0,3%)	11 (0,037%)	18 (0,061%)	*	*
#226	n.a.	n.a.	1380 (4,6%)	2970 (9,9%)	660 (2,2%)	3990 (13,3%)	270 (0,9%)	1800(6,0%)
#235	99 (0,33%)	510 (1,7%)	18 (0,06%)	70 (0,23%)	117 (0,39%)	1170 (3,9%)	*	*
#305	201 (0,67%)	6900 (23%)	n.a.	n.a.	2370 (7,9%)	4260 (14,2%)	600 (2,0%)	2610(8,7%)
#321	Null	240 (0,8%)	264 (0,88%)	615 (2,1%)	*	*	*	*
#371/72	126 (0,42%)	1770 (5,9%)	225 (0,75%)	2460 (8,2%)	*	*	*	*
#391	54 (0,18%)	450 (1,5%)	Null	1380 (4,6%)	*	*	*	*
#539/40	n.a.	n.a.	7 (0,025%)	30 (0,1%)	2 (0,007%)	30 (0,1%)	*	*
#625	n.a.	n.a.	90 (0,3%)	2520 (8,4%)	210 (0,7%)	1380 (4,6%)	900 (0,3%)	2460(8,2%)
#650/51	n.a.	n.a.	Null	Null	*	*	*	*
#652	n.a.	n.a.	Null	27 (0,09%)	1(0,006%)	27 (0,09%)	*	*
#653/54	n.a.	n.a.	231 (0,77%)	2250 (7,5%)	90 (0,3%)	1230 (4,1%)	720 (2,4%)	2880(9,6%)
#655/56	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	200 (0,67%)	1380 (4,6%)	n.a	n.a
#658/59	n.a.	n.a.	Null	5 (0,016%)	*	*	*	*
#660/61	n.a.	n.a.	5 (0,016%)	20 (0,067%)	*	*	*	*
#662/63	n.a.	n.a.	Null	30 (0,1%)	*	*	*	*
#664/65	n.a.	n.a.	20 (0,067%)	192 (0,64%)	Null	Null	*	*
#667/68	n.a.	n.a.	5 (0,016%)	900 (0,3%)	23 (0,078%)	105 (0,35%)	*	*
#669/70	n.a.	n.a.	1 (0,0042%)	87 (0,29%)	*	*	*	*
#671	n.a.	n.a.	Null	Null	*	*	*	*
#672/73	n.a.	n.a.	2 (0,006%)	39 (0,13%)	*	*	*	*
#674/75	n.a.	n.a.	Null	Null	*	*	*	*
#676	n.a.	n.a.	1 (0,0042%)	2 (0,006%)	*	*	*	*
#681/82	n.a.	n.a.	5 (0,016%)	45 (0,15%)	*	*	*	*
#685/86	Null	Null	6 (0,02%)	42 (0,14%)	*	*	*	*
#687/88	60 (0,2%)	231 (0,77%)	690 (2,3%)	1320 (4,4%)	13 (0,046%)	156 (0,52%)	*	*
#689/90	900 (0,3%)	2700 (1,2%)	75 (0,25%)	700 (2,3%)	21 (0,07%)	630 (2,1%)	*	*
#693/94	Null	7 (0,025%)	*	*	*	*	*	*
#697/98	1 (0,0042%)	2 (0,006%)	1 (0,0042%)	3 (0,011%)	*	*	*	*
SE	n.a.	n.a.	1 (0,0042%)	11 (0,038%)	2 (0,006%)	54 (0,18%)	*	*
TE	114 (0,38%)	285 (0,95%)	105 (0,35%)	369 (1,23%)	*	*	*	*

**Tabelle 3.2** Tabellarische Übersicht über die CK-Positivitätsraten der einzelnen Primärkulturen zu unterschiedlichen Passagezeitpunkten bei „konservativer“ und „progressiver“ Zählweise. p1 bis p4 bezeichnet die jeweilige Passage. „Konservativ“ meint, daß nur gefärbte Zellen der Gruppe A gezählt wurden, „progressiv“ dagegen, daß auch Zellen der Gruppe A und B bei der Zählung berücksichtigt wurden (Erläuterung siehe Text). „Patienten ID“ bezeichnet die interne Identifikationsnummer der einzelnen Knochenmarkexpandate. "SE" und "TE": Patienteninitialen von gesunden Knochenmarksspendern. "\*" symbolisiert, daß keine Passage angelegt wurde; „n.a.“ bedeutet, daß das entsprechende Färbeergebnis nicht zu verwerfen war.



**Abbildung 3.2 Übersicht über die Häufigkeit CK-positiver Zellen in Knochenmark-Primärkulturen.** Dargestellt sind die relative und absolute Anzahl Cytokeratin-positiver Zellen zu verschiedenen Passagezeitpunkten aller Patientinnen, bei denen das Anlegen einer Primärkultur erfolgreich war. Der zu jedem Passagezeitpunkt abgebildete Balken zeigt am oberen Ende (Quadrat) das Auszählergebnis bei Berücksichtigung von Gruppe A- und B Zellen, das untere Ende (Raute) bei Berücksichtigung von nur Gruppe A Zellen (Erläuterung siehe Text). Der Kreis symbolisiert den Mittelwert beider Auswertemethoden. SE und TE bezeichnen die Kulturen von klinisch gesunden Knochenmarksspendern.

Über  $10^3$  pro  $3 \times 10^4$  gescreenten Kulturzellen mit eindeutig CK-positiven Zellen (Gruppe A-Zellen) konnten bis zur zweiten Passage allerdings nur bei 12/31 Primärkulturen (38,7%) beobachtet werden. Die maximale absolute Anzahl von Gruppe A-Zellen betrug in einem Fall (auf mehrere Kulturflaschen verteilt)  $4,5 \times 10^4$  Zellen. Bei einer minimal anzunehmenden Ausgangsmenge von einer einzigen CK-positiven Zelle im Ausgangsmaterial und dem Auftreten von  $2 \times 10^6$  adhären Zellen nach sieben Wochen Wachstum (Zeitpunkt der zweiten Passage), entsprach diese Anzahl CK-positiver Zellen einer maximalen Proliferationsrate von zehn bis fünfzehn Zellteilungen, also einer Verdopplungszeit von 3,2 bis 4,9 Tagen.

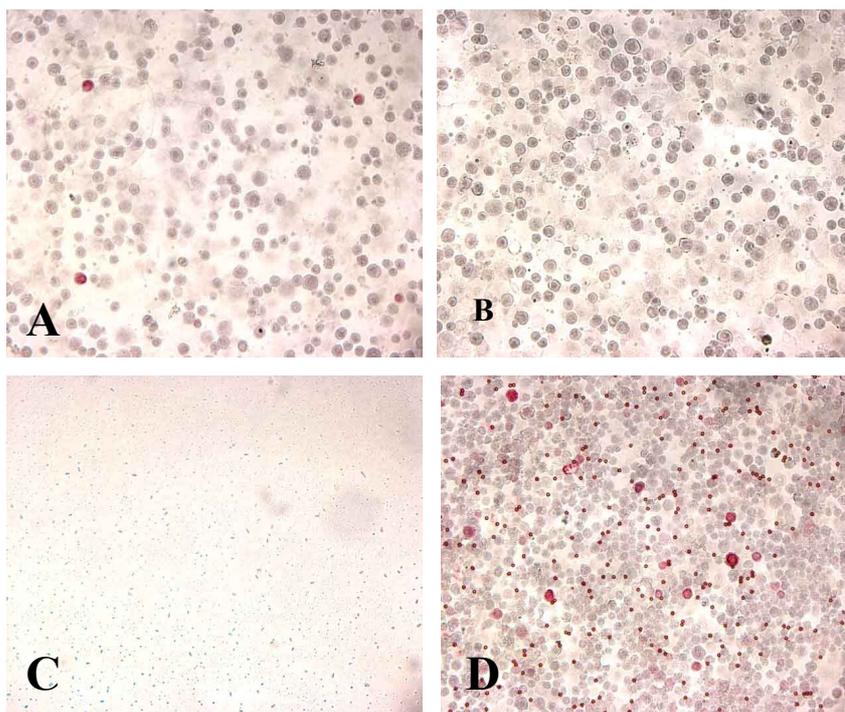
Eine bemerkenswerte Beobachtung war, daß die im Primärscreening (Tabelle 3.1) gefundene Anzahl epithelialer Zellen nicht mit der Expansionsrate CK-positiver Zellen in der Primärkultur korrelierte. Zehn der zwölf Proben, die zu einer signifikanten Expansion in Kultur führten ( $>10^3$  CK<sup>+</sup> Zellen pro  $3 \times 10^4$  analysierten Kulturzellen in sieben Wochen), waren im Primärscreening negativ. Umgekehrt gingen aus zwei Knochenmarksaspiraten, bei denen CK-positive Zellen im Primärscreening nachweisbar waren, Zellkulturen hervor, die bei „konservativer“ Auswertung keine CK-positiven Zellen aufwiesen. Außerdem ließen sich aus drei Knochenmarkaspiraten, die im Primärscreening epitheliale Zellen enthielten, keine Primärkulturen erzeugen.

Weiterhin fiel auf, daß die Kulturen beider gesunder KM-Spenderinnen ebenfalls CK-positive Zellen enthielten. Die Spenderin mit den Initialen SE wies in der zweiten Passage bei konservativem Kulturscreening eine, bei Einschluß von Kategorie B-Zellen elf CK-positive Zellen auf. In der darauffolgenden Passage stieg die Anzahl auf zwei bzw. 54 Zellen an. Im Falle der KM-Spenderin "TE" fanden sich eindrucksvoll bereits in der ersten Passage 114 Kategorie A-Zellen bzw. 285 Kategorie (A+B)-Zellen, was sich in der zweiten Passage mit 105 bzw. 369 CK-positive Zellen nicht wesentlich änderte.

### **3.3 Versuch der präparativen Anreicherung CK-positiver Zellen aus Knochenmarksprimärkulturen mittels immunmagnetischer Verfahren**

#### **3.3.1 Anreicherung mit Dynabeads**

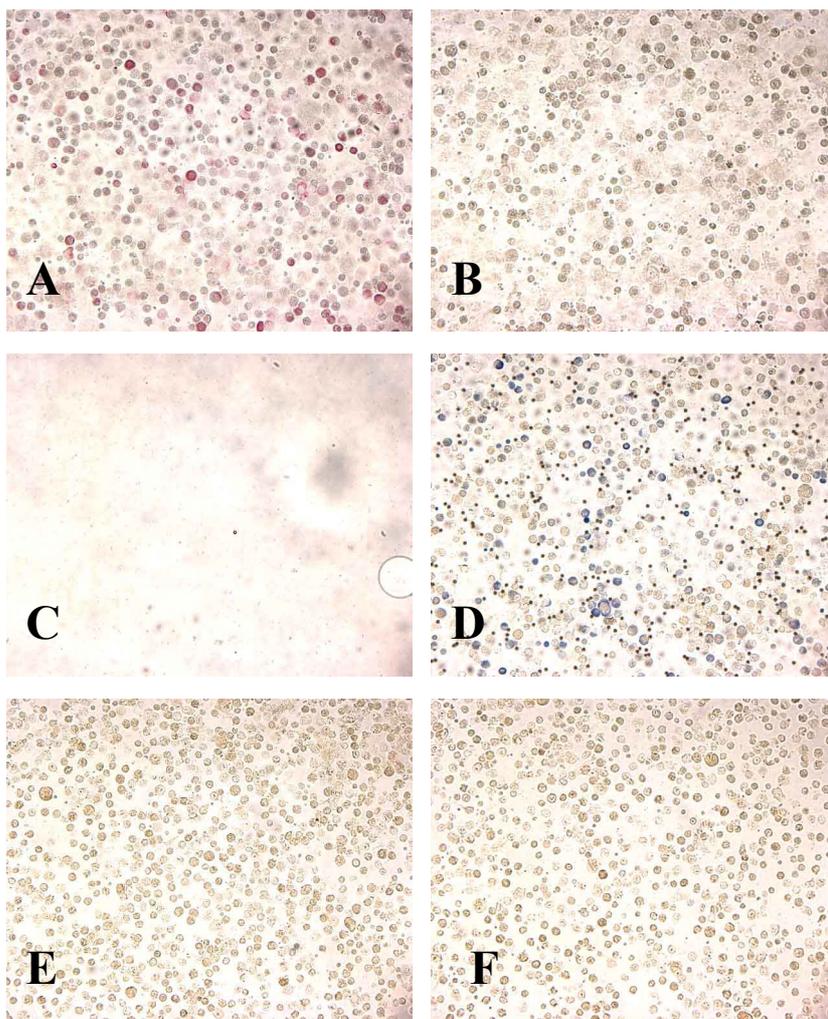
Die prinzipielle Anreicherbarkeit epithelialer Tumorzellen aus artifiziellen Zellsuspensionen wurde mehrfach experimentell belegt (Otte et al. 2000) und daher an dieser Stelle nicht wiederholt. In einem ersten Experiment wurde daher der direkte Versuch unternommen,  $7 \times 10^5$  trypsinierte Zellen der zweiten Passage der Patientin #645 mit Dynabeads der Spezifität c-erbB2 und 17-1A anzureichern. Die Wahl fiel auf diese Kultur, da sie mit 0,3% relativ viele CK-positive Zellen enthielt und so eine besonders hohe Ausbeute erhoffen ließ. Obwohl in der Load Control, also in einem Aliquot der anzureichernden Zellsuspension, 0,3% CK-positive Gruppe A-Zellen nachweisbar waren (bei negativer Isotypenkontrolle), fanden sich in der angereicherten Fraktion immunzytochemisch keine CK-positiven Zellen. In den gepoolten Überständen der Waschfraktionen konnten dagegen CK-positive Zellen mit einer zur Load control vergleichbaren Rate nachgewiesen werden, wie Abbildung 3.3 illustriert.



**Abbildung 3.3** Cytospinpräparationen von Knochenmarkprimärkulturen der Patientin #645 (zweite Passage). Verschiedene Arbeitsschritte eines immunmagnetischen Anreicherungsversuchs mit anti-17-1A und anti-ErbB2 beladenen Dynabeads mit konsekutiver immunzytochemischer Cytokeratin-Färbung (mAb A45-B/B3, APAAP/Neufuchsin) **A**) Load control: Die Zellsuspension der Primärkultur enthält bei quantitativer Auswertung 0,3% CK-positive Zellen. **B**) Die MOPC-21 Isotypenkontrolle ist erwartungsgemäß negativ. **C**) In der angereicherten Fraktion finden sich keine Zellen. **D**) In den gepoolten Überständen der Waschfraktionen finden sich hingegen CK-positive Zellen in einer im Vergleich zur Load control ähnlichen Rate. Man erkennt zwischen den Zellen liegende Dynabeads. Alle Abbildungen jeweils in 200x Vergrößerung.

In einem zweiten Anreicherungsversuch wurden  $1,4 \times 10^5$  trypsinierte Zellen der vierten Passage der Patientin #226 eingesetzt. Auch diese Kultur wies mit 0,9% einen hohen Anteil CK-positiver Zellen auf. Erneut wurden Dynabeads mit Antikörpern gegen c-erbB2 und 17-1A verwendet. Auch in diesem Versuch konnten keine Zellen in der angereicherten Fraktion nachgewiesen werden, während in der gepoolten Waschfraktion wiederum CK-positive Zellen in einer zur Load control ähnlichen Rate von 0,9% (Gruppe A-Zellen) bei negativer Isotypkontrolle gefunden wurden (Abbildung 3.4 A-D).

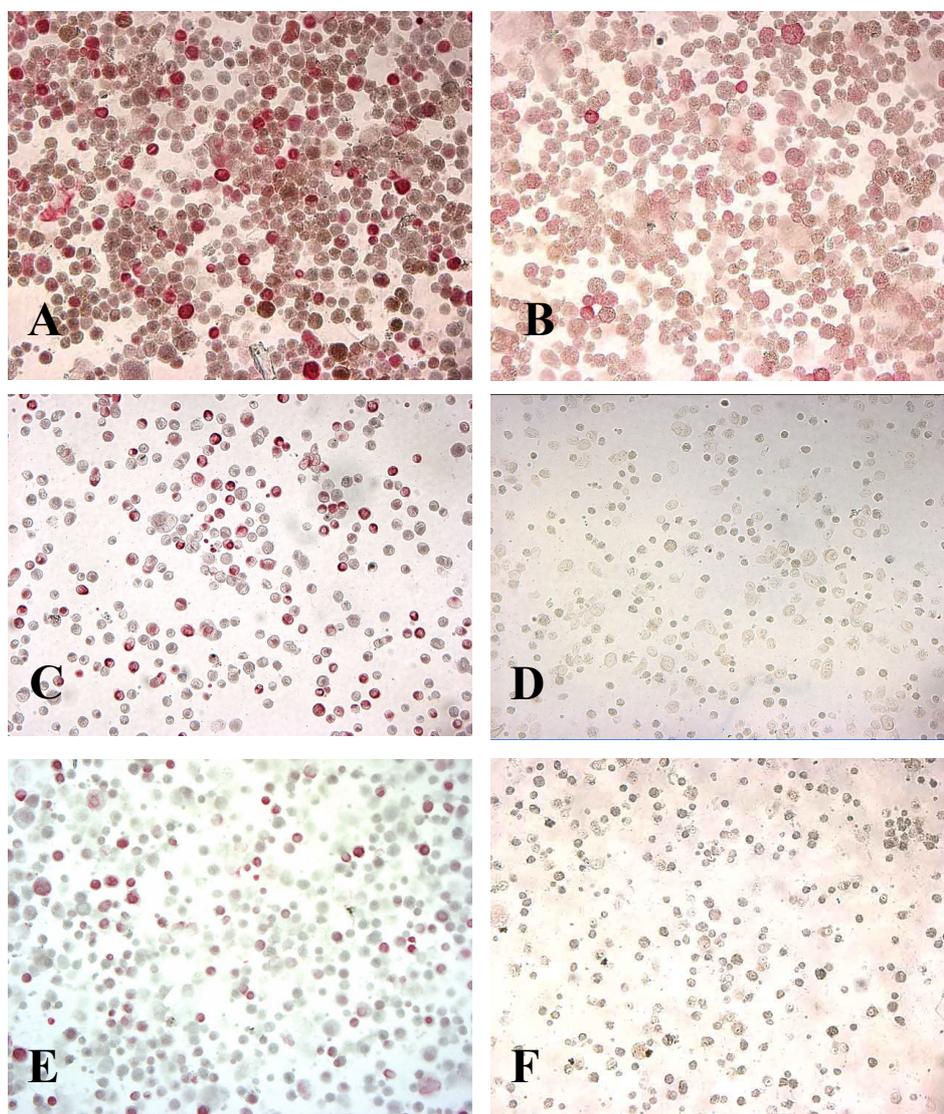
Beide Versuche legten die Vermutung nahe, daß vielleicht nur ein kleiner Teil der CK-positiven Zellen die Antigene c-erbB2 und 17-1A exprimiert. Daher wurde als nächstes der Versuch unternommen, diese beiden Antigene auf Cytospinpräparaten der gleichen Patientin und Zellkulturpassage (#226, vierte Passage) immunzytochemisch nachzuweisen. Um dabei die Sensitivität des Detektionssystems zu erhöhen, wurde zusätzlich zur sensitiven APAAP-Methode ein weiteres Verstärkungssystem (Envision) eingesetzt. Trotz dieser hochsensitiven Methode konnte keines der beiden Antigene dargestellt werden (Abbildung 3.4 E, F).



**Abbildung 3.4** Knochenmarkprimärkulturen der Patientin #226 (vierte Passage). Immunmagnetischer Anreicherungsversuch mit anti-17-1A und anti-ErbB2 beladenen DynaBeads mit konsekutiver immunzytochemischer Cytokeratin-Färbung. **A)** Load control: Die Zellsuspension enthält bei quantitativer Auswertung 0,9% CK-positive Zellen (mAb A45-B/B3, APAAP/Neufuchsin). **B)** Die MOPC-21 Isotypenkontrolle ist negativ. **C)** In der angereicherten Fraktion finden sich, wie in Abb. 3.4 c), wiederum keine Zellen. **D)** In den gepoolten Überständen der Waschfraktionen finden sich hingegen CK-positive Zellen in einer im Vergleich zur Load control ähnlichen Rate. Zwischen den Zellen sind Dynabeads zu erkennen. **E, F)** Negativer immunzytochemischer Nachweis von 17-1A (E) und ErbB2 (F). (C) bis (F): mAb A45-B/B3, APAAP+Envision/Fast Blue. Alle Abbildungen jeweils in 200x Vergrößerung.

Um das Spektrum an potentiell von CK-positiven Kulturzellen exprimierten, tumorassoziierten Antigenen zu erweitern, wurden zusätzlich zu c-ErbB-2 und 17-1A noch die tumorassoziierten Antigene MUC-1, EMA, EGFR und Lewis<sup>y</sup> berücksichtigt, wobei gegen EMA gleich zwei verschiedene monoklonale Antikörper eingesetzt wurden (Ber-EP4 und E29). Der Versuch eines immunzytochemischen Nachweises eines oder mehrerer dieser Antigene wurde dabei aus Praktikabilitätsgründen nicht einzeln, sondern mit einem Cocktail unternommen, der sich aus den einzelnen Primärantikörpern der oben genannten Spezifitäten zusammensetzte. Dies wurde zunächst exemplarisch für Kulturzellen der Patientin #321 der zweiten Passage durchgeführt. Dabei diente als empfindliches Sekundärsystem wiederum eine Kombination aus APAAP und Envision. Während 0,88 %

der Zellen CK-positiv (Gruppe A) waren, konnte nur bei einer sehr kleinen Fraktion der Zellen eine Anfärbung für eines oder mehrerer der oben genannten Antigene beobachtet werden, wie Abbildung 3.5 A und B zeigt.



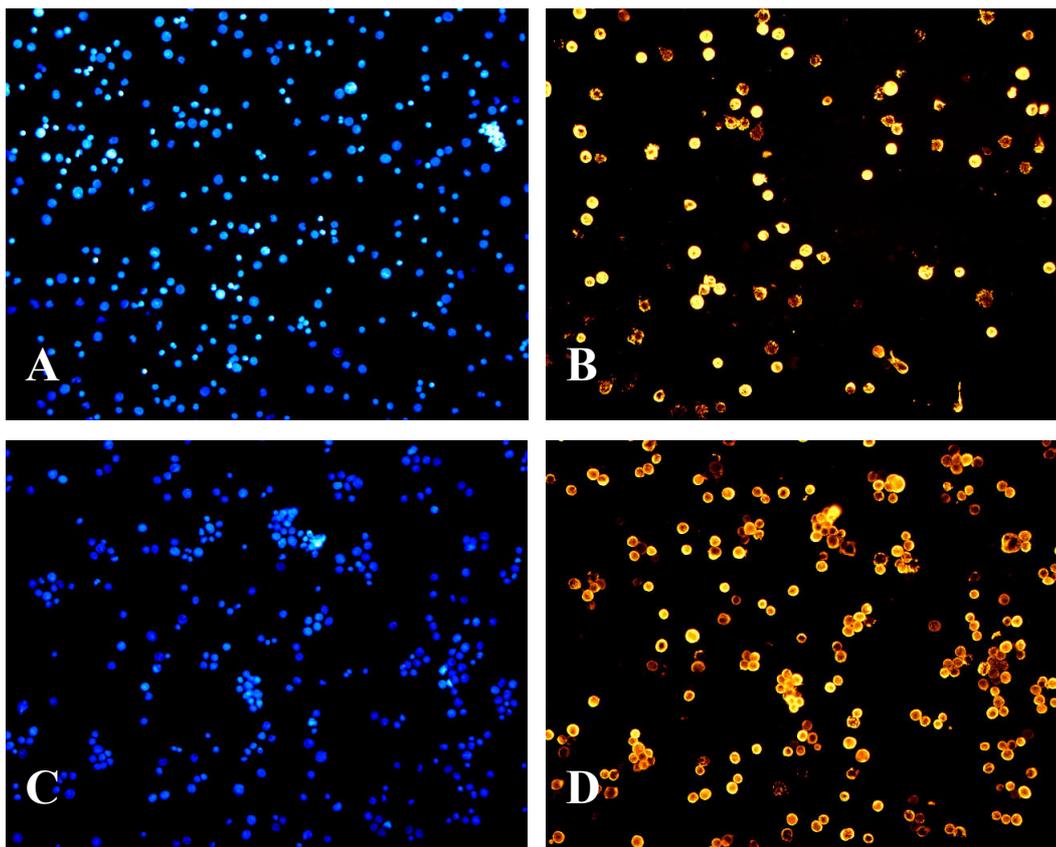
**Abbildung 3.5 Immunzytochemischer Nachweis von Cytokeratin und von tumorassoziierten Antigenen auf Cytopspinpräparationen von Knochenmarkprimärkulturen verschiedener Patientinnen. A)** Patientin #321 (zweite Passage). Im Cytokeratin-Nachweis (mAb A45-B/B3) sind 0,88 % der Zellen als Gruppe A-Zellen identifizierbar. APAAP/Neufuchsin-Färbung. **B)** Gleiche Patientin wie in A). Dagegen läßt sich beim Einsatz eines Cocktails aus Primärantikörpern gegen die Antigene 17-1A, ErbB2, MUC1, EMA, Ber-Ep4 und Lewis<sup>y</sup> nur ein vergleichsweise kleiner Anteil der Zellen anfärben. Färbung mit APAAP + Envision, Neufuchsin. **C)** Patientin #226 (zweite Passage). Hier sind 4,6% der Zellen CK-positiv in der APAAP/Neufuchsin-Färbung. **D)** Cytopspinpräparation wie in (C). Erneuter Versuch, verschiedene TAA's immunzytochemisch mit einem Antikörper-Mix darzustellenden, wobei hier zusätzlich zu den in A) verwendeten Antikörpern noch ein weiterer gegen den EGF-Rezeptor hinzugefügt wurde. Dennoch gelingt auch bei den Zellen dieser Kultur kein Nachweis der entsprechenden Antigene. APAAP/Neufuchsin-Färbung. **E)** Patientin #653/54 (zweite Passage). Bei dieser Cytopspinpräparation wurden die Zellen durch ein Verfahren aus der Kulturflasche abgelöst, welches Oberflächenproteine relativ unverseht läßt (Accutase). In der Cytokeratin-Färbung sind hier 0,77% der Zellen als Gruppe A-Zellen auswertbar. APAAP/Neufuchsin-Färbung. **F)** Cytopspinpräparation wie in (E), Antikörpermix wie in (C). Trotz des schonenden Ablöseverfahrens der Zellen und Verwendung eines Antikörper-Cocktails gegen verschiedene tumorassoziierte Antigene können diese nicht nachgewiesen werden. Envision, NBT/BCIP-Färbung. Alle Abbildungen jeweils in 200x Vergrößerung.

Die Kulturzellen der Patientin #226 der zweiten Passage mit 4,6% CK-positiven Zellen zeigte beim Versuch des Nachweises der tumorassoziierten Antigene aus dem vorhergehenden Versuch unter Hinzunahme eines noch weiteren monoklonalen Antikörpers, nämlich einem gegen den EGF-Rezeptor, keine Expression auch nur eines dieser Antigene (Abbildung 3.5 C und D).

Um zu überprüfen, ob nicht vielleicht das Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA aus den Primärkulturflaschen eine eventuelle proteolytische Zerstörung der entsprechenden Oberflächenmarker bewirkt hatte und aus diesem Grunde deren immunzytochemischer Nachweis nicht gelingen konnte, wurden in einem dritten exemplarischen Versuch die adhärennten Zellen der Kultur der Patientin #653/54 der zweiten Passage mit einem sehr schonend, kollagenaseartig wirkendem proteolytischen Gemisch invertebralen Ursprungs (Accutase™) abgelöst und immunzytochemisch wie im vorhergehenden Versuch gefärbt. Im Zytokeratin-Nachweis stellten sich hier 0,77% der Zellen als positiv dar. Dagegen konnte bei Einsatz des Antikörpercocktails, wie er im vorhergehenden Versuch verwendet wurde, erneut keines der oben genannten Antigene nachgewiesen werden (Abbildung 3.5 E und F). Da aufgrund dieser Ergebnisse eine immunmagnetische Anreicherung über zelloberflächenständige TAA's nicht ohne weiteres möglich erschien, wurde im Folgenden eine Anreicherung über intrazelluläres Zytokeratin versucht.

### 3.3.2 Anreicherung mit MACS Zytokeratin Microbeads

Bevor dieses Anreicherungsverfahren bei den Zellen der Primärkulturen zum Einsatz kommen sollte, wurde es zunächst an einer Modell-Zellsuspension erprobt. Zu  $4,7 \times 10^6$  humanen peripheren Blutleukozyten wurden  $8 \times 10^5$  Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 gemischt, entsprechend einem Anteil von 14,5%. Nach einem technisch notwendigen Fixier- und Permeabilisierungsschritt wurden zwei Aliquots der Suspension (jeweils  $4 \times 10^5$  Zellen) entnommen, um das quantitative Verhältnis der beiden Zellspezies zueinander nach jedem Arbeitsschritt zu monitoren. Das eine Präparat diente dem Auszählen aller kernhaltigen Zellen mittels DAPI-Färbung. Unter Umgehung der arbeits- und zeit-aufwendigen APAAP-Methode erfolgte der CK-Nachweis in diesem Experiment durch einen immunzytochemischen Direktnachweis mittels Cy3-gekoppeltem Anti-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3. Das zweite Cytospin diente der Negativkontrolle durch Färbung mit isotypidentischem Anti-FITC-Cy3. Unspezifisch gefärbte Zellen dabei traten nicht auf. Die Auszählung an drei repräsentativen Orten der Cytospinpräparation und Extrapolation auf die gesamte Zellsuspension ergab eine reduzierte Gesamtzellzahl von  $2,75 \times 10^6$  (Abbildung 3.6). Dieser hohe Verlust fiel für die beiden Zellspezies allerdings unterschiedlich stark aus. So wurden nach diesem Arbeitsschritt zwar insgesamt noch  $7 \times 10^5$  MCF-7 Zellen gezählt (Verlust 12,5%) aber nur noch  $2,05 \times 10^6$  Leukozyten (Verlust 43,6%). Durch den unverhältnismäßig höheren Verlust der Leukozyten nach dem Fixier- und Permeabilisierungsschritt ergab sich hierdurch ein MCF-7 Anteil von 25,5%, was einem relativen Anreicherungsfaktor von 1,76 entsprach ( $25,5\%/14,5\%$ ). Im folgenden Arbeitsschritt waren demnach von den verbleibenden  $1,95 \times 10^6$  auf die Säule aufgebraachten Zellen 25,5% ( $4,97 \times 10^5$ ) MCF-7 Zellen. Die zunächst gewonnene Break-Through-Fraktion wurde ebenso wie die gepoolten folgenden drei Wasch-Fraktionen auf das Vorhandensein CK-positiver Zellen untersucht. Da sich in keiner der Waschfraktionen MCF-7 Zellen nachweisen ließen, wurden sie offenbar während des Waschvorgangs quantitativ in der Säule zurückgehalten. Das Eluat wurde abermals als Cytospinpräparation aufgearbeitet und dessen quantitative Auswertung ergab schließlich eine totale Zellzahl von nur noch  $2,3 \times 10^5$



**Abbildung 3.6** Cytospinpräparate einer aus humanen peripheren Blutleukozyten und Zellen der Mammakarzinomlinie MCF-7 bestehenden Zellsuspension mit Nachweis von Cytokeratin in der Immunfluoreszenz. Die blaue Fluoreszenz stellt das Resultat einer Färbung mit dem Farbstoff DAPI dar, der unspezifisch die DNA aller kernhaltigen Zellen anfärbt. In orangefarbener Fluoreszenz erscheinen alle MCF-7 Zellen aufgrund ihrer Färbung mit dem monoklonalen anti-Cytokeratin Antikörper A45-B/B3, konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3. Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Zellsuspension fixiert, permeabilisiert und mit anti-Cytokeratin CAM5.2-beladenen MACS-Microbeads inkubiert. **A)** und **B)** Exemplarische Cytospinpräparat-Ausschnitte vor dem Säulenlauf. Die quantitative Auszählung ergibt einen Anteil von 25,5% MCF-7 Zellen. **C)** und **D)** Cytospinpräparat-Ausschnitte des Säuleneluats. Im Eluat beträgt der MCF-7 Anteil 39%.

Zellen ergab. Davon entfielen 39% auf MCF-7 Zellen, entsprechend einer absoluten Anzahl von  $9 \times 10^4$  Zellen dieser Spezies. Rechnerisch entsprach dies einem totalen Anreicherungsfaktor von 2,7 (39%/14,5%). Damit verbunden war, bedingt durch den Säulen-Arbeitsschritt, ein MCF-7 Zellverlust von 81,9%. Bei Berücksichtigung aller Arbeitsschritte ergab sich somit ein totaler MCF-7 Verlust von 88,8%. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Angesichts des mäßigen Anreicherungsfaktors von 2,7 und dem relativ hohen Verlust von 88,8% wurde die MACS-Microbeads-Anreicherungsmethode nicht auf die Primärkulturzellen ausgeweitet. Stattdessen wurde eine physikalische Methode zur selektiven Zellselektion mit anschließender Amplifikation des gesamten Genoms der isolierten Zellen gewählt, wie im folgenden beschrieben.

	Totale Zellzahl (x10 <sup>5</sup> )	Leukozyten (x10 <sup>5</sup> )	MCF-7			
			Total (x10 <sup>5</sup> )	Anteil (%)	R <sub>f</sub>	Verlust (%)
	55	47	8	14,5	-	-
<b>Fixierung Permeabilisierung</b>						
Summe	27,5	20,5	7	25,5	1,76	12,5
Aliquot <sup>a</sup>	8	n.b.	n.b.	25,5	1,76	12,5
auf Säule <sup>b</sup>	19,5	n.b.	4,97	25,5	1,76	12,5
<b>Säule fahren</b>						
Break- through	n.b.	n.b.	0	0	-	-
Wasch fraktion	n.b.	n.b.	0	0	-	-
Eluat	2,3	0,55	0,9	39,0	2,68	88,8

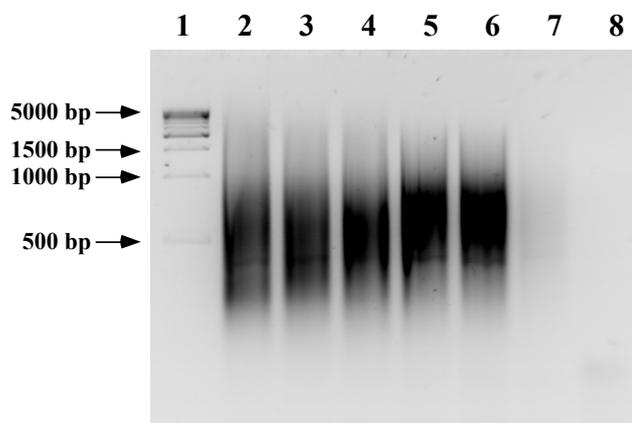
**Tabelle 3.3 Anreicherung von MCF-7-Zellen aus einer Modell-Zellsuspension mit humanen peripheren Blutleukozyten.** Zu  $47 \times 10^5$  Leukozyten wurden  $8 \times 10^5$  MCF-7 Zellen gemischt. Nach dem Fixieren und Permeabilisieren trat aufgrund eines überproportionalen Verlusts von Leukozyten durch diesen Arbeitsschritt ein relativer Anreicherungseffekt von MCF-7 Zellen ein. Nach dem Durchlaufen der Säule wurden keine Zellen im Durchlauf oder in den Waschfraktionen detektiert. Im Eluat fanden sich schließlich nur noch 11,2% der ursprünglich eingesetzten MCF-7 Zellen bei einem Anreicherungsfaktor von 2,68. R<sub>f</sub>: Anreicherungsfaktor; n.b.: nicht bestimmt; **a**) ein nicht auf die Säule aufgetragenes Aliquot diente Bestimmung des MCF-7-Anteils; **b**) es wurden  $19,5 \times 10^5$  Zellen auf die Säule appliziert.

### 3.4 Isolierung CK-positiver Zellen mittels Laserdissektion/katapultation und nachfolgende Genomamplifikation

#### 3.4.1 DOP-PCR von genomischer DNA und Zellsuspensionen

Vor Anwendung der Methode der DOP-PCR zur Genomamplifikation von PALM-Laser isolierten Zellen wurde sie zunächst an aufgereinigter, humaner genomischer DNA erprobt. Für den Präamplifikationschritt wurde statt der üblicherweise für eine PCR eingesetzte Taq-Polymerase eine DNA-Polymerase (Thermo-Sequenase) eingesetzt, die auch bei den für eine DOP-PCR typischen, tiefen Annealing-Temperaturen während der unspezifischen Präamplifikation des Genoms noch eine ausreichend hohe Aktivität aufzeigt. Für die sekundäre Amplifikation wurde dagegen zunächst Taq-Polymerase verwendet. Nach vier Zyklen Präamplifikation folgten dreißig Zyklen Sekundäramplifikation. Eine DNA-Verdünnungsreihe diente der Bestimmung der minimalen, durch diese Methode gerade noch zu amplifizierenden DNA-Ausgangsmenge. Wie Abbildung 3.7 zeigt, konnten noch 50 pg Ausgangsmaterial reproduzierbar amplifiziert werden. Das Maximum der Fragmentlängenverteilung lag für die

verschiedenen DNA-Ausgangsmengen einheitlich bei etwa 500 bp, einem für eine nachfolgende CGH technisch günstige Länge. Eine Reaktion, in der statt DNA nur steriles, nukleasefreies Wasser als Ausgangsmaterial verwendet wurde, diente als Negativkontrolle und führte im Experiment zu keinen Produkten (Laufspur 8 in Abbildung 3.7). Die Amplifikation fiel nicht ganz gleichmäßig über das gesamte Genom aus, da schwache, aber dennoch distinkte Banden innerhalb des DNA-Schmiers zu erkennen waren.



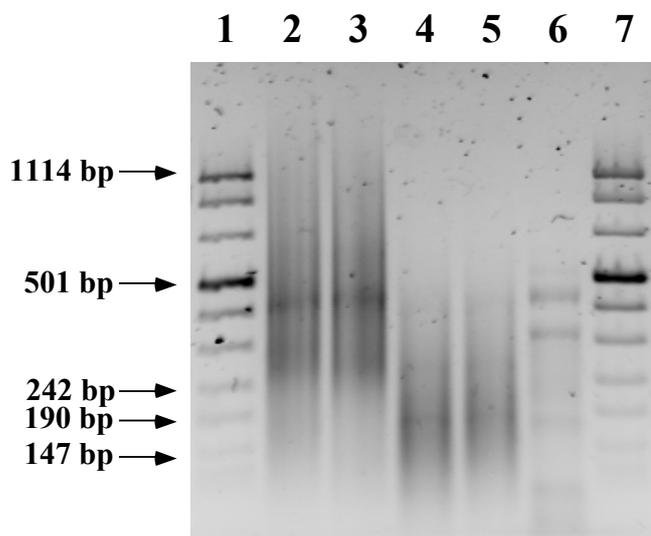
**Abbildung 3.7** Amplifikationsprodukte einer DOP-PCR mit aufgereinigter genomischer DNA als Ausgangsmaterial, aufgetrennt in einem mit SYBR-Gold gefärbtem 2% Agarose Gel. Laufspur 1: 500 bp Größenstandard; Laufspur 2: 1000 pg DNA als Ausgangsmenge; Laufspur 3: 500 pg; Laufspur 4: 250 pg; Laufspur 5: 100 pg; Laufspur 6: 50 pg; Laufspur 7: 10 pg; Laufspur 8: Wasser als Negativkontrolle.

In einem nächsten Schritt wurden einmal fünfzig und einmal hundert MCF-7-Zellen mit selbstangesehtem DOP-Lysis-Puffer behandelt und, anstatt aufgereinigter genomischer DNA, das entsprechende Zell-Lysat als zu amplifizierendes Ausgangsmaterial verwendet. Das verwendete PCR-Programm und die benutzten DNA-Polymerasen unterschieden sich dabei nicht vom vorausgegangenen Versuch. Abbildung 3.8 illustriert die Gelelektrophorese mit den entsprechenden Produkten.

Die als Positivkontrolle eingesetzte, kommerzielle genomische DNA wurde durch die Reaktion als ein Schmier mit einem Maximum der Fragmentlängenverteilung von 500 bp amplifiziert, ohne Unterschied zum vorangegangenen Versuch. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Verwendung von weiblicher oder männlicher genomischer DNA als Ausgangsmaterial. Auch das Zell-Lysat sowohl von hundert als auch von fünfzig MCF-7-Zellen wurde durch die DOP-PCR sichtbar amplifiziert. Allerdings fiel das Maximum der Fragmentlängenverteilung im Vergleich zur gereinigten genomischen DNA kleiner aus und lag bei etwa 190 bp. Die Negativkontrolle, mit Wasser als Ausgangsmaterial, zeigte in diesem Versuch ein Produkt mit einigen, distinkten Banden, was auf eine unspezifische Amplifikation von DNA-Verunreinigungen oder Primer-bedingte Produkte hindeutet.

Mit dem Ziel, das Maximum der Fragmentlängenverteilung der DOP-PCR-Amplifikate von lysiertem Zellmaterial auf das in der Literatur beschriebene Optimum von etwa 500 bp zu bringen (Huang et al. 2000, DeVries et al. 1995 und D. Pinkel, persönliche Kommunikation), wurde im folgenden der Versuch unternommen, dies durch den Einsatz

spezieller DNA-Polymerasen zu bewerkstelligen, die sich während der DNA-Synthese durch eine besonders niedrige Abbruchrate auszeichnen.

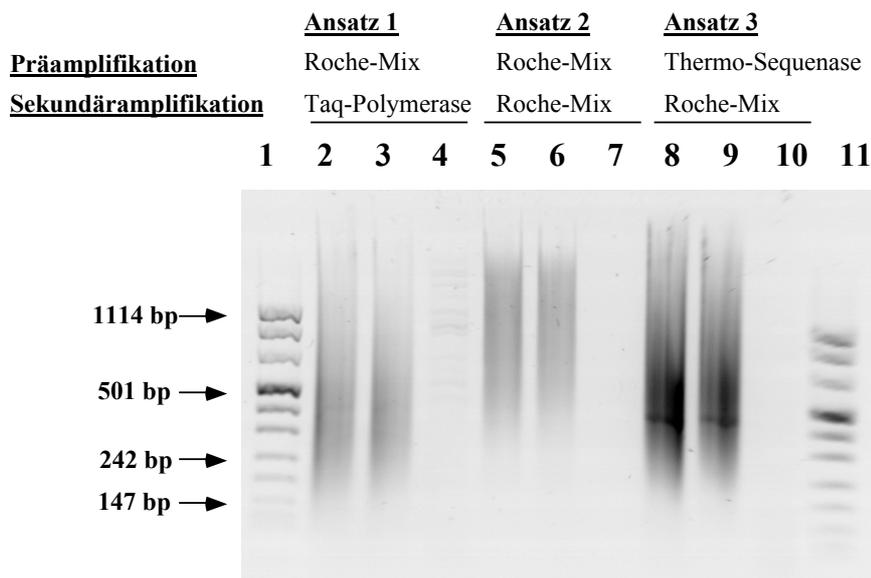


**Abbildung 3.8 SYBR-Gold gefärbtes 2% Agarose Gel mit Produkten einer DOP-PCR. Als Ausgangsmaterial diente gereinigte, genomische DNA sowie Zellysate von 100 bzw. 50 Zellen der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Laufspur 1: Größenstandard; Laufspur 2 und 3: Jeweils 1000 pg weiblicher bzw. männlicher genomischer DNA als Ausgangsmaterial. Das Maximum der Fragmentlängenverteilung liegt bei etwa 500 bp. Laufspur 4: Lysat von 100 MCF-7 Zellen. Laufspur 5: Lysate von 50 MCF-7 Zellen als Ausgangsmaterial. Das Maximum der Fragmentlängenverteilung liegt hier jeweils bei etwa 190 bp; Laufspur 6: Negativ-Kontrolle. Wasser als Ausgangsmaterial führt in dieser Reaktion zu unspezifischen, distinkten DNA-Banden; Laufspur 7: Nochmals Größenstandard.**

Dazu wurden für den Amplifikations- und Präamplifikationschritt verschiedene Kombinationen aus einem Polymerasen-Mix der Firma Roche („Roche-Mix“) und der Taq-Polymerase gewählt, wie in Abbildung 3.9 dargestellt. Als Ausgangsmaterial wurde zunächst wieder auf gereinigte, genomische DNA zurückgegriffen. Unter Verwendung des Roche-Mixes sowohl in der Prä- als auch in der Sekundäramplifikation war mit einem Maximum der Fragmentlängenverteilung von etwa 900 bp der höchste Bandenschmier zu erzielen (Abbildung 3.9). Offensichtlich war die Taq-Polymerase mit einer DNA-Kontamination behaftet, da nur bei ihr, nicht aber unter Verwendung der anderen Polymerasen die Negativkontrolle mit Wasser deutlich distinkte Banden als Zeichen einer unspezifischen Amplifikation zeigte.

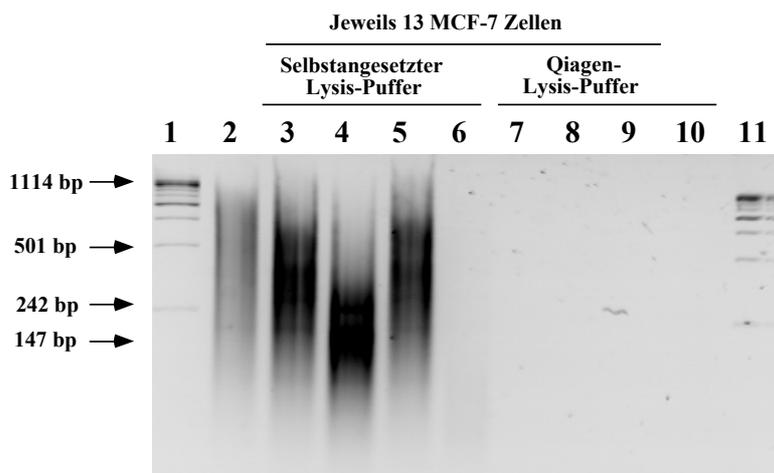
Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich unter Verwendung des Roche-Mixes in beiden Amplifikationsschritten nicht nur ein Banden-Shift für gereinigte, genomische DNA, sondern auch für lysiertes Zellmaterial erreichen lassen würde. Dabei sollte zusätzlich noch der Frage nachgegangen werden, ob vielleicht auch die Zusammensetzung des verwendeten Lysis-Puffers einen Einfluß auf die Höhe des DOP-PCR-Schmiers haben könnte. Zu diesem Zweck wurden MCF-7 Zellen verdünnt und mikroskopisch ausgezählt (im Vierfachansatz). Dann wurden jeweils 13 MCF-7 Zellen entweder mit einem selbstangewendeten Lysis-Puffer oder mit einem kommerziellen Lysis-Puffer der Firma

Qiagen behandelt und schließlich einer DOP-PCR unterworfen (jeweils als Dreifachansatz).

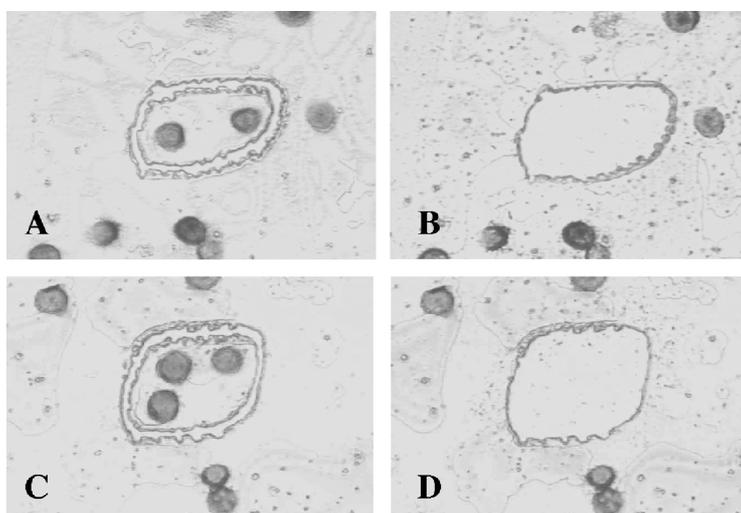


**Abbildung 3.9** Ergebnis einer DOP-PCR mit gereinigter humaner genomischer DNA als Ausgangsmaterial unter Verwendung verschiedener Kombinationen von DNA-Polymerasen (SYBR-Gold gefärbtes 2% Agarose Gel). Laufspur 1 und 11: Größenstandard; In Ansatz 1 wurde für die Präamplifikation Roche-Mix und für die Sekundäramplifikation Taq-Polymerase verwendet. Laufspur 2 zeigt männliche, Laufspur 3 weibliche genomische DNA als Ausgangsmaterial (jeweils 1 ng). Das Maximum der Fragmentlängenverteilung liegt im Ansatz 1 bei etwa 500 bp. Laufspur 4: Negativkontrolle mit Wasser als Ausgangsmaterial: Hier sind unspezifische, distinkte Banden zu erkennen. In Ansatz 2 wurde in beiden Amplifikationsschritten Roche-Mix eingesetzt; Laufspur 5: männliche, Laufspur 6: weibliche genomische DNA als Template (jeweils 1 ng). Das Intensitätsmaximum des Schmiere ist hier bei etwa 900 bp zu erkennen. Laufspur 7: Die Wasserprobe ist hier negativ. In Ansatz 3 wurde in der Präamplifikation Thermo-Sequenase, in der Folgeamplifikation Roche-Mix eingesetzt. In Laufspur 8 wurde männliche, in Laufspur 9 weibliche genomische DNA als Template eingesetzt, wiederum jeweils 1 ng. Das Maximum zeigt sich hier bei etwa 500 bp, wobei eine deutlich distinkte Bande bei etwa 400 bp auffällt. Laufspur 10 zeigt eine negative Wasserprobe.

Wie Abbildung 3.10 zu entnehmen ist, konnte nur mit dem selbst-angewendeten Lysis-Puffer eine nachweisbare Amplifikation erreicht werden. Unter Verwendung des Qiagen-Puffers zeigte sich kein Produkt. Das Maximum der Fragmentlängenverteilung war zwischen identisch durchgeführten Versuchen unterschiedlich groß und kleiner im Vergleich zu einer DOP-PCR mit gereinigter genomischer DNA (900 bp). Dennoch zeigte sich unter Verwendung des Roche-Polymerasen-Mixes für beide Amplifikationsschritte ein regelmäßig größeres Maximum der Fragmentlängenverteilung als unter der Verwendung der Kombination aus Thermo-Sequenase und Taq-Polymerase.



**Abbildung 3.10** Produkte einer DOP-PCR mit jeweils 13 MCF-7 Zellen als Ausgangsmaterial, die mit jeweils unterschiedlichen Lyse-Puffern aufgeschlossenen wurden (SYBR-Gold gefärbtes 2% Agarose Gel). Laufspur 1 und 11: Größenstandard; Laufspur 2: Amplifikation von 500 pg gereinigter genomischer DNA als Positiv-Kontrolle. Laufspur 3 bis 5 zeigt das Ergebnis identischer Ansätze mit jeweils 13 MCF-7 Zellen, die vor Durchführung der DOP-PCR mit selbsthergestelltem Lysis-Puffer aufgeschlossen wurden. Laufspur 6: Negativkontrolle mit selbsthergestelltem Lysis-Puffer, aber ohne Zellen als Ausgangsmaterial. Laufspur 7 bis 9: Mit Qiagen-Lysis Puffer lysierte Zellen führten in der DOP-PCR zu keinem sichtbaren Produkt. Laufspur 10: Negativkontrolle mit Qiagen-Lysis-Puffer, aber ohne Zellen als Ausgangsmaterial.

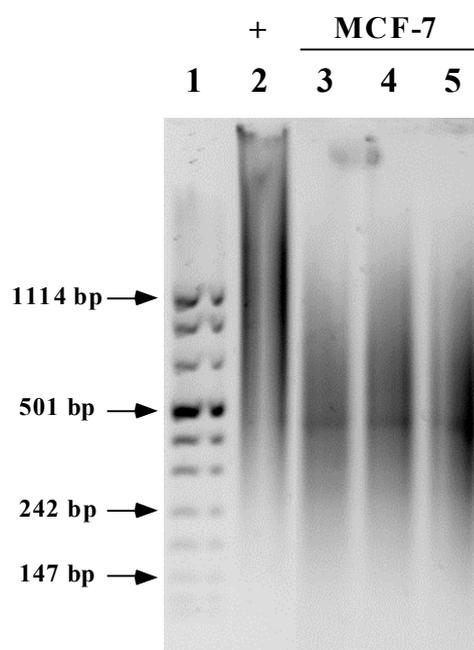


**Abbildung 3.11** Immunzytochemisch gefärbte Cytospinpräparate mit MCF-7 Zellen im Strahlengang eines PALM-Lasermikroskops vor und nach einer Laserkatapultation (Färbung mit Anti-Cytokeratin mAb A45-B/B3, APAAP, NBT/BCIP). Die Objektträger wurden vor der Cytospinpräparation mit einer 1,35  $\mu\text{m}$  dicken, UV-Laser-absorbierenden Polyethylenaphtalat-Folie überzogen. **A**) Zwei MCF-7 Zellen wurden vor der Katapultation zunächst mit niedriger Laserenergie in der Focusebene ausgeschnitten. **B**) Zurückbleibende Aussparung in der Folie nach der Katapultation. Nach Justierung des Laserstrahls knapp unterhalb der Fokusebene wurde das Folienstück zusammen mit den auf ihr befindlichen Zellen mit hoher Laserenergie in einen wenige Millimeter über dem Objektträger befindlichen, mit Lysis-Puffer benetzten Deckel eines Mikrogefäßes katapultiert. Die unmittelbare Umgebung der ausgeschnittenen Zellen blieb mikroskopisch unverändert. **C**) Drei ausgeschnittene MCF-7 Zellen, die sich an einem anderen Ort auf dem Objektträger auf einem ausgeschnittenen Stück Folie befinden. **D**) Zurückbleibender Defekt in der Folie mit mikroskopisch unversehrter Umgebung nach Katapultation (Alle Abbildungen x400).

### 3.4.2 DOP-PCR von mit dem PALM-Laser isolierten Zellen

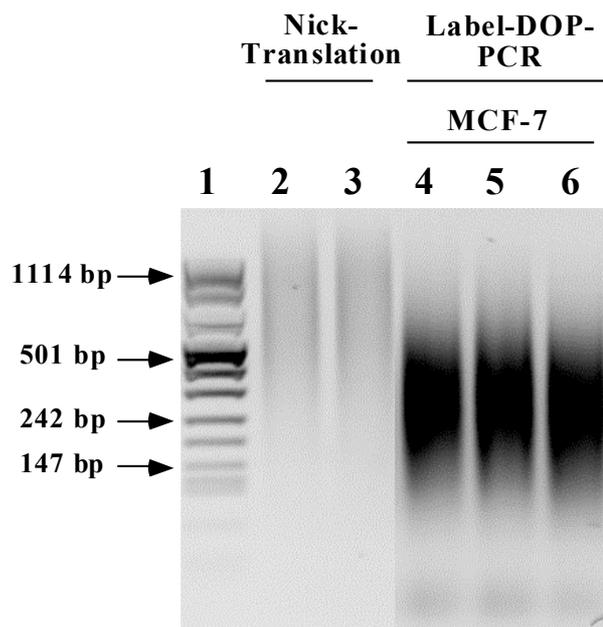
Die folgenden Experimente dienen der Frage, ob unter Verwendung der optimierten Methode der DOP-PCR (selbstangereicherter Lysis-Puffer, Roche-Polymerase-Mix in beiden Amplifikationsschritten) auch das Genom von Zellen, die mit Hilfe des PALM-Lasers isoliert wurden, zu einer akzeptablen Genomamplifikation führt. Dazu wurden zunächst Cytospinpräparate von MCF-7 Zellen als Modell angefertigt, ihr Zytokeratin immunzytochemisch dargestellt (A45-B/B3, APAAP, Entwicklung mit NBT/BCIP für 10 Minuten) und schließlich jeweils fünfzig Zellen mit dem PALM-Laser isoliert. Abbildung 3.11 illustriert den Monitoraspekt des PALM-Systems vor und nach einer Laserkatapultation.

Nach Lyse der Zellen mit anschließender DOP-PCR wurde im dreifach-Ansatz in allen Fällen ein in der Gelelektrophorese darstellbares Produkt erzeugt (Abbildung 3.12). Das Maximum der Fragmentlängenverteilung lag bei etwa 500 bp.



**Abbildung 3.12** Ergebnis einer DOP-PCR mit jeweils 50 lysierten MCF-7 Zellen als Ausgangsmaterial, die zuvor mit dem PALM-Laser isoliert wurden (SYBR-Gold gefärbtes 2% Agarose Gel). Laufspur 1: Größenstandard; Laufspur 2: DOP-PCR von 500 pg gereinigter genomischer DNA (Positivkontrolle); Laufspur 3 bis 5: jeweils 50 MCF-7 Zellen.

Bevor die Produkte der DOP-PCR schließlich für eine CGH-Analyse verwendet werden konnten, mußten beide DNA-Spezies zuvor noch markiert werden, um sie später detektieren zu können. Für die Referenz-DNA wurde dies mit Hilfe einer Nick-Translation bewerkstelligt. Die DOP-PCR-Produkte konnten nicht durch Nick-Translation markiert werden, da dies eine weitere Degradation der DNA-Fragmente zur Folge gehabt hätte. Daher wurden sie mit Hilfe einer weiteren PCR (Label-DOP-PCR), in der ein Teil des dTTP durch Biotin-16dUTP oder durch Digoxigenin-11dUTP ersetzt wurde, markiert. Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse der entsprechenden Reaktionen. Man sieht, daß durch die Label-DOP-PCR das Maximum der Fragmentlängenverteilung auf etwa 240 bp gesenkt wurde.

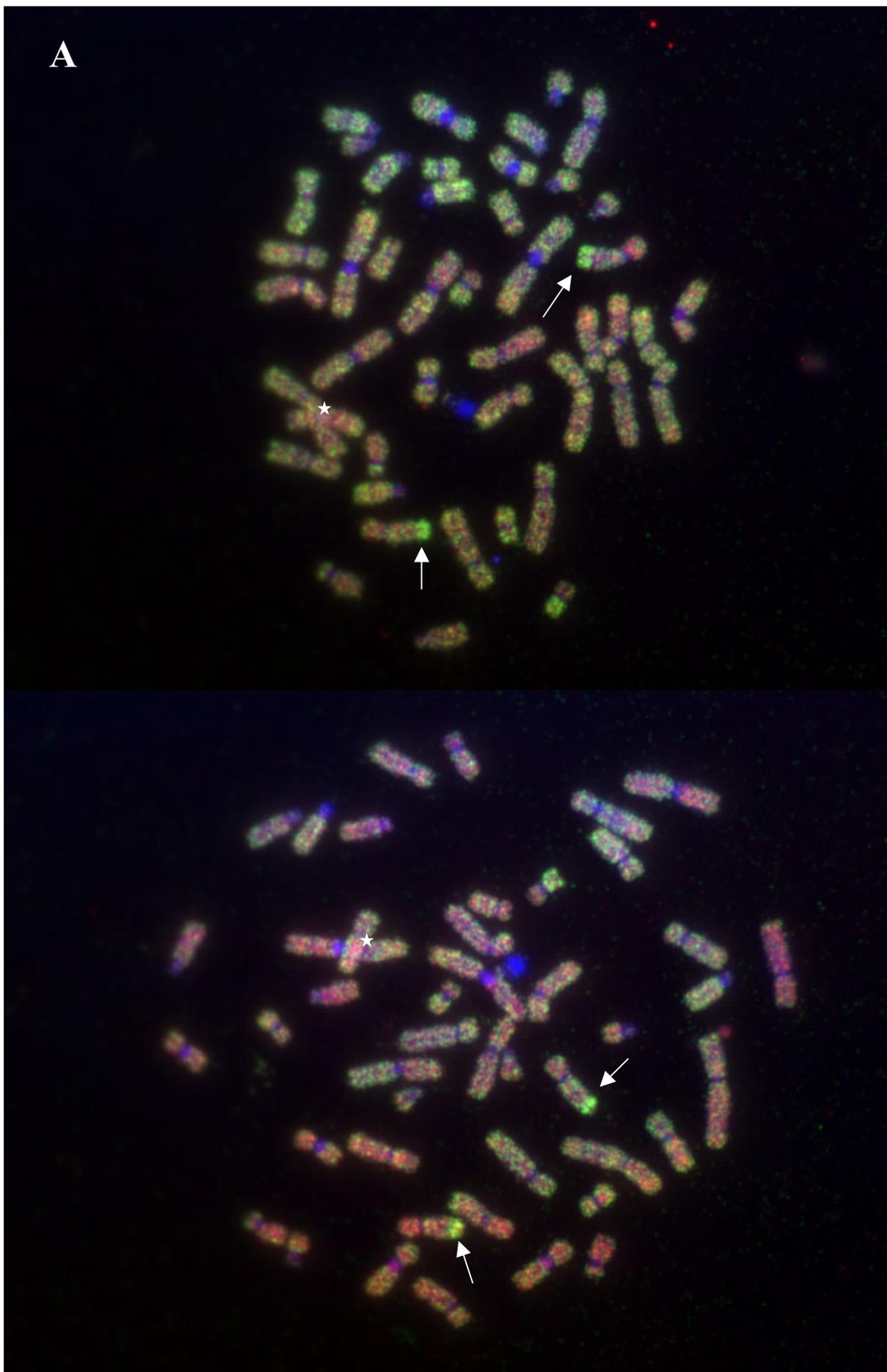


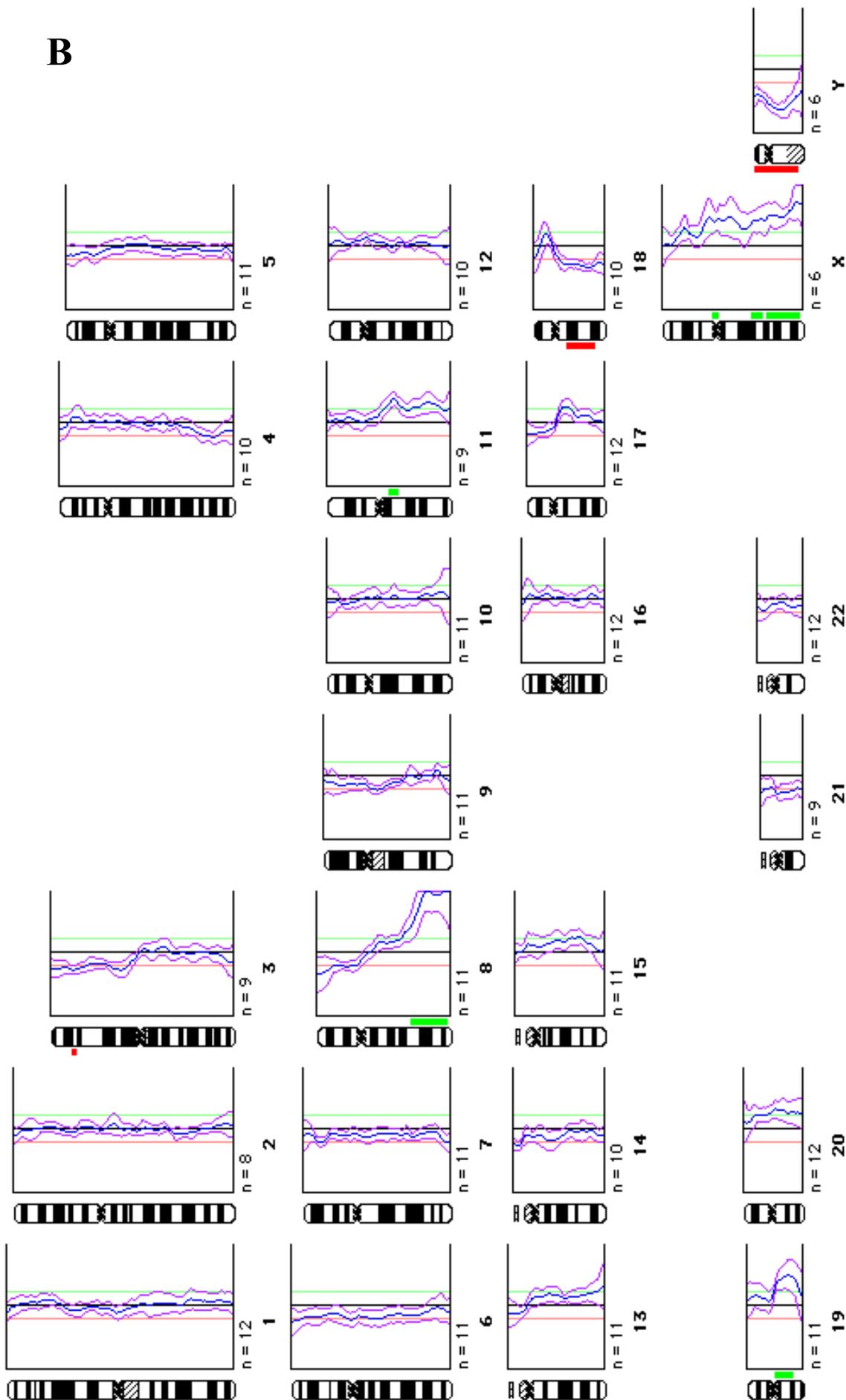
**Abbildung 3.13** Gelelektrophorese von Produkten einer Nick-Translation und von Amplifikaten aus verschiedenen Label-DOP-PCR-Reaktionen (SYBR-Gold gefärbtes 2% Agarose Gel). Laufspur 1: Größenstandard; Laufspur 2 und 3: Einbau von Digoxigenin-11dUTP in kommerzielle männliche genomische DNA mittels einer Nick-Translation. Laufspur 4 bis 6: Markierungs-PCR mit Einbau von Biotin-16dUTP in die jeweiligen Amplifikate. Als Ausgangsmaterial dienten die DOP-PCR-Produkte der MCF-7 Zellen (dreifacher Ansatz).

### 3.5 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

#### 3.5.1 CGH mit DOP-PCR-Produkt

In einem ersten CGH-Experiment wurde durch Nick-Translation markierte, männliche Referenz-DNA (rote Fluoreszenz) gegen DOP-PCR-Produkt von fünfzig, mit dem PALM-Laser isolierten MCF-7 Mammakarzinomzellen (grüne Fluoreszenz) auf Metaphasen eines männlichen Spenders hybridisiert. Zwei typische Metaphasen sind in Abbildung 3.14 A dargestellt. Man erkennt bereits mit bloßem Auge eine Amplifikation im Bereich des langen Armes von Chromosom 8. Das resultierende CGH-Summen-Karyogramm zeigt Abbildung 3.14 B. Darin sind DNA-Zugewinne bei 8q22-q24, 11q13 und 19q11-q13.1 zu erkennen. Verluste sind bei 3p23 und 18q12-qter angezeigt. Darüber hinaus erscheint das gesamte Y-Chromosom in einfacher Kopienzahl unterrepräsentiert zu sein. Tatsächlich reflektiert dies aber nur die Tatsache, daß männliche Referenz-DNA gegen die von einem weiblichen Individuum abstammende MCF-7 Zelllinie auf männliche Metaphasen hybridisiert wurde. Aus dem gleichen Grund wäre beim X-Chromosom ein einfaches Überwiegen der Kopienzahl zu erwarten gewesen. Tatsächlich waren aber nur bestimmte Abschnitte dieses Chromosoms amplifiziert (Xq21-Xter, der Gewinn im Zentromerbereich wird aufgrund des Heterochromatins in diesem Bereich nicht ausgewertet), was für einen relativen Verlust der komplementären Abschnitte in der MCF-7 Zelllinie spricht.





**Abbildung 3.14 (Vorhergehende Seiten) Beispiel einer CGH-Analyse von fünfzig mit dem PALM-Laser isolierten und durch eine DOP-PCR amplifizierte Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7. Hybridisiert wurde durch Nick-Translation markierte, männliche Referenz-DNA (Rhodamin, rote Fluoreszenz) gegen PCR-markiertes DOP-PCR-Amplifikat von fünfzig MCF-7 Zellen (FITC, grüne Fluoreszenz). Eine Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (blaue Fluoreszenz). A)** Dargestellt sind zwei exemplarische Metaphasen bei computergestützter Überlagerung aller drei Fluoreszenzkanäle (rot, grün, blau). Ein Überwiegen der grünen Fluoreszenz ist deutlich in einem Bereich der langen Arme des Chromosoms 8 (weiße Pfeile) zu erkennen. An die Zentromerregion der Chromosomen haben aufgrund der Absättigung dieser Bereiche durch humane Cot1-DNA keine markierte Referenz- oder Tumor-DNA gebunden, weshalb diese Region durch die DAPI-Gegenfärbung in blauer Fluoreszenz erscheint. Stellen, an denen einzelne Chromosomen übereinanderliegen (weiße Sterne), konnten nicht mit ausgewertet werden. Da die grüne Fluoreszenz der DOP-PCR-Fragmente auf den einzelnen Chromosomen etwas körnig erscheint, ist dieses CGH-Experiment von eingeschränkter Qualität. Die rote Fluoreszenz der durch Nick-Translation markierten Referenz-DNA erscheint dagegen eher gleichmäßig über alle Chromosomen verteilt zu sein (durch die Übereinanderlagerung der Fluoreszenzkanäle hier nicht gut zu erkennen). **B)** CGH-Summen-Karyogramm mit Darstellung des G-Banding-Musters (links) und der jeweiligen Fluoreszenzprofile (rechts) für jedes Chromosom bei Auswertung von acht bis zwölf Metaphasen (sechs X-Chromosomen). Das G-Banding-Muster ergibt sich aus der DAPI-Gegenfärbung und erlaubt die Identifikation der einzelnen Chromosomen. Die schwarze Mittellinie in der Auftragung der einzelnen Fluoreszenzprofile gibt ein 1:1-Verhältnis von rot zu grün-markierter DNA an. Übersteigt das Fluoreszenzsignal die rote Linie, so zeigt dies ein Verhältnis von Tumor- zu Referenz-DNA von 0,8 oder weniger an. Liegt das Signal jenseits der grünen Linie, bedeutet dies ein Überwiegen der Tumor-DNA von mindestens 1,2. Aufgetragen ist jeweils der Verlauf des Mittelwerts der Chromosomen aller berücksichtigten Metaphasen (blaue Linie) flankiert vom Verlauf der einfachen Standardabweichung. Das Y Chromosom erscheint in einfacher Kopienzahl unterrepräsentiert zu sein, da die von einem männlichen Individuum stammende Referenz-DNA gegen von einer Frau stammenden MCF-7 Zelllinie hybridisiert wurde und somit kein „weibliches Gegengewicht“ mit grüner Fluoreszenz existiert. Weitere numerische Aberrationen sind als Zugewinn bei 11q13 und 19q11-q13.1 zu erkennen, während Verluste bei 3p23 und 18q12-qter angezeigt sind.

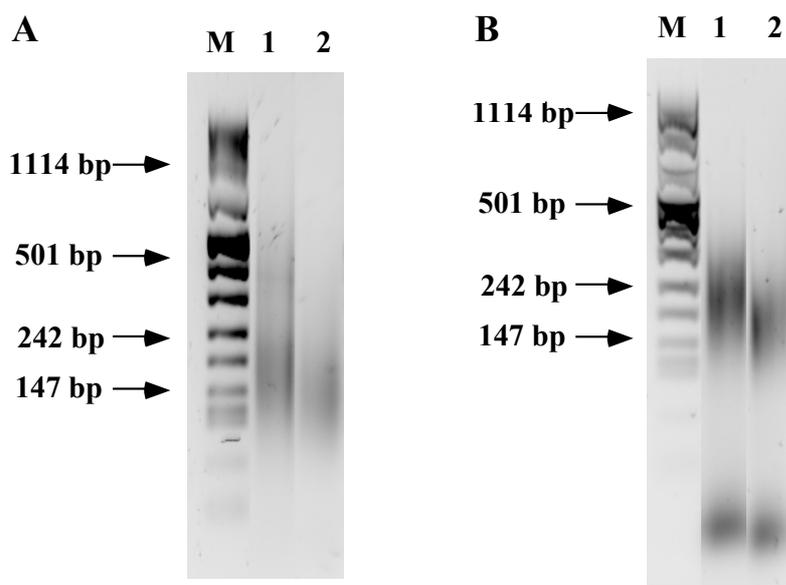
Insgesamt war festzuhalten, daß die Qualität der Hybridisierung der DOP-PCR-DNA (MCF-7 Zellen, grünes Signal, Abbildung 3.14 A) einen „körnigen“ Charakter aufwies und damit nicht der Qualität der nick-translatierten DNA entsprach, die sich durch eine über das gesamte Chromosom eher gleichmäßig verteilte Fluoreszenz auszeichnete. Deshalb wurde im weiteren Verlauf versucht, mit einer anderen Variante der globalen, genomischen DNA-Amplifikation, der MseI-Adapter-PCR, eine noch bessere CGH-Qualität zu erzielen.

### 3.5.2 CGH mit MseI-Adapter-PCR-Produkt

Als Ausgangsmaterial für diese Methode wurden wiederum fünfzig MCF-7 Zellen verwendet, die mit dem PALM-Laser isoliert wurden. Nach Lyse und Proteinverdau der Zellen wurde dann eine MseI-Adapter-PCR durchgeführt. Als Referenz-DNA diente kommerzielle, humane genomische DNA einer weiblichen Person, die ebenfalls durch eine MseI-Adapter-PCR amplifiziert wurde. Die durch die PCR erhaltenen Schmier-Produkte von etwa 180 Basenpaaren zeigt Abbildung 3.15 A. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einer sekundären PCR mit Digoxigenin- (MCF-7) bzw. Biotin-modifizierten Nukleotiden (Referenz-DNA) markiert. Abbildung 3.15 B zeigt die Gelelektrophorese mit den entsprechenden Produkten dieser Markierungs-PCR-Reaktion.

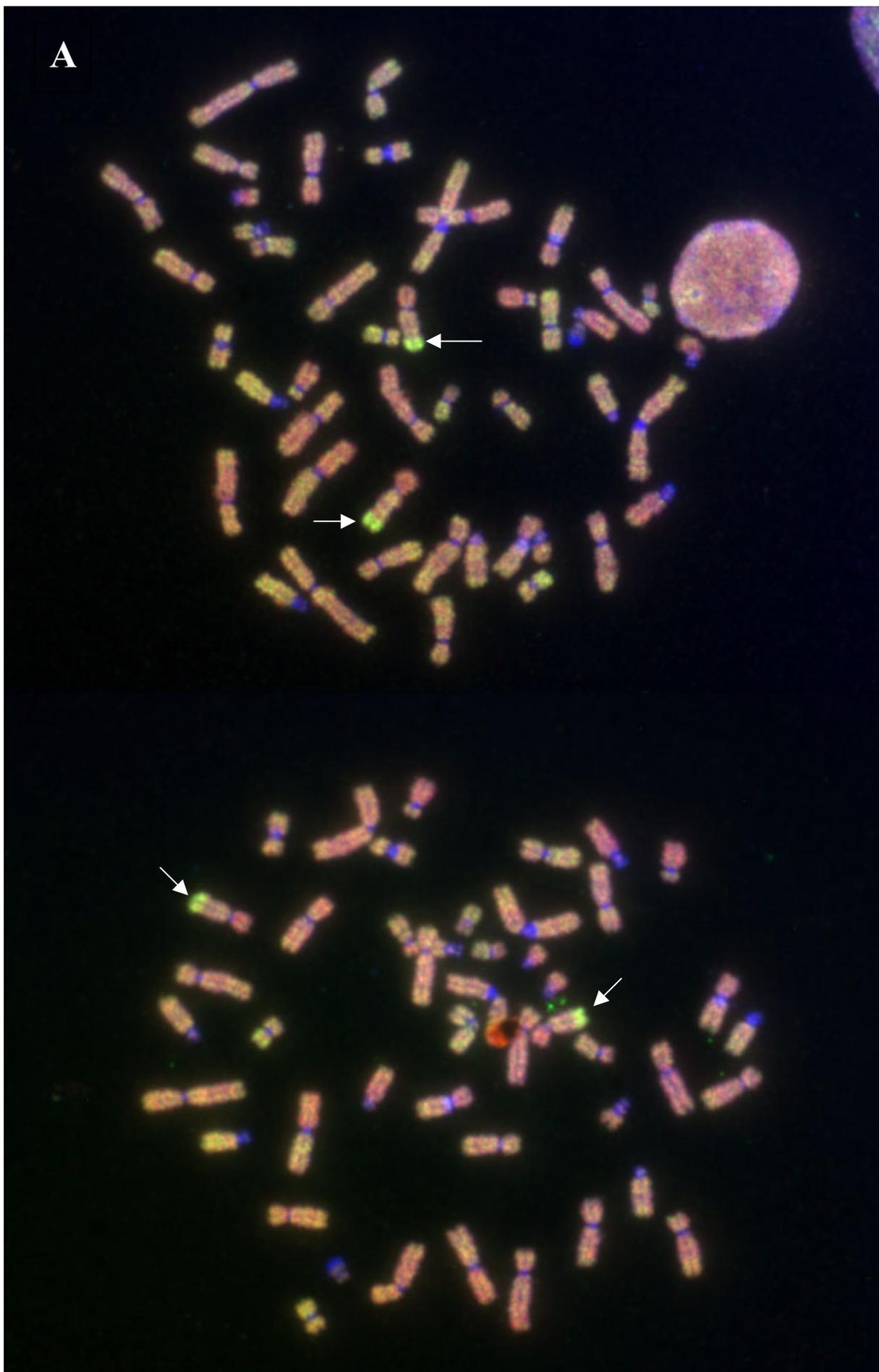
Nach der komparativen genomischen Hybridisierung dieser Produkte auf normale Metaphasen eines männlichen Spenders wurde die MCF-7-DNA in grüner Fluoreszenz und die Referenz-DNA in roter Fluoreszenz nachgewiesen. Zwei repräsentative Metaphasen zeigt Abbildung 3.16 A. Im Vergleich zur Hybridisierung mit DOP-PCR-Produkt wurde

hier ein über die einzelnen Chromosomen eher gleichmäßig verteiltes, weniger granuläres Fluoreszenzsignal erzielt und somit eine bessere Ausgangsbasis für eine Auswertung des CGH-Experiments mit hohem Informationsgehalt geschaffen. Bei Auswertung von acht bis sechzehn Metaphasen für jedes Chromosom ergab sich dabei das in Abbildung 3.16 B gezeigte CGH-Summen-Karyogramm. Es zeigt außer der (8q22-qter)-Amplifikation Zugewinne bei 5p15.2, 9q34-qter, 11p14-pter, 11p11.2-p13, 11q11-q13, 11q22-qter, 16q23, 17q11.2-q12, 17q24-qter, 19q11-q13.3 sowie fast des gesamten Chromosoms 20. Verluste ergeben sich für die Regionen 3pter, 3p12-p13, 8p, 18q11.2-q12, 18q21-q22 und 21p11.2-q11.2. Veränderungen des X-Chromosoms waren in diesem Experiment nicht zu erkennen. Das Y-Chromosom wurde von der Analyse ausgeschlossen, da sowohl Referenz- als auch Tumor-DNA weiblicher Abstammung waren.

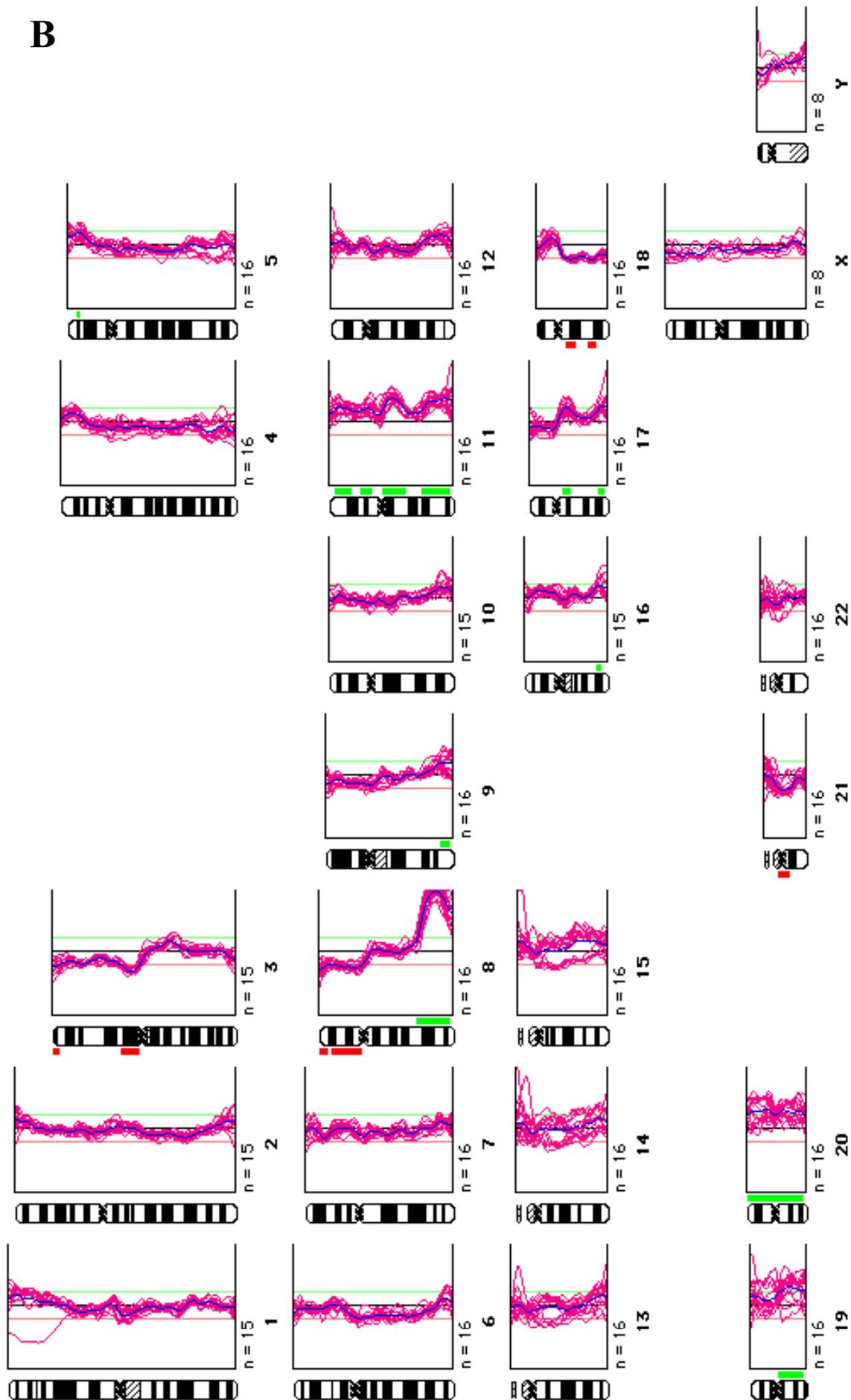


**Abbildung 3.15** Ergebnis einer *Mse*I-Adapter-PCR und konsekutiver Markierungs-PCR (SYBR-Gold gefärbtes 2% Agarose Gel). **A)** Resultat der *Mse*I-Adapter PCR. M: Größenstandard; Laufspur 1: Fünfzig lysierte MCF-7-Zellen als Ausgangsmaterial, die zuvor mit dem PALM-Laser isoliert wurden; Laufspur 2: 155 pg kommerzielle, gereinigte, genomische DNA weiblicher Herkunft als Referenz-DNA; **B)** M: Größenstandard; Laufspur 1: Produkt aus „A), Spur 1“ nach Einbau von Digoxigenin-11dUTP. Laufspur 2: Markierungs-PCR mit Einbau von Biotin-16dUTP in das Amplifikat aus A), Spur 2.

**Abbildung 3.16 (Folgende Seiten)** CGH-Experiment der Brustkrebszelllinie MCF-7. Hybridisiert wurde durch eine sekundäre PCR markierte DNA (FITC, grüne Fluoreszenz), die aus einer *Mse*I-Adapter-PCR von fünfzig, mit dem PALM-Laser isolierten MCF-7 Zellen stammte gegen ebenfalls durch die gleiche Methode amplifizierte und markierte, weibliche Referenz-DNA (Cy3.5, rote Fluoreszenz). **A)** Zwei exemplarische Metaphasen bei computergestützter Überlagerung aller drei Fluoreszenzkanäle (rot, grün, blau). Wie im CGH-Experiment mit DOP-PCR-Produkt, zeigt sich auch hier ein Überwiegen der grünen Fluoreszenz (Amplifikation) im Bereich der langen Arme des Chromosoms 8 (weiße Pfeile). Im Vergleich zur eingeschränkten Hybridisierungsqualität mit DOP-PCR-Produkt (aufgrund des „körnigen“ Charakters der Fluoreszenzintensität) konnte hier eine eher gleichmäßige Fluoreszenzintensität über die einzelnen Chromosomen und somit eine bessere Auswertbarkeit erzielt werden. **B)** CGH-Summen-Karyogramm mit Darstellung des schematischen G-Banding-Muster (links) und der durch die Auswertung von acht bis sechzehn Metaphasen gewonnenen Fluoreszenzprofile (rechts) für jedes einzelne Chromosom. Gewinne und Verluste sind durch die grünen und roten Balken an der rechten bzw. linken Seite der jeweiligen Chromosomen dargestellt. Die schwarze Mittellinie markiert ein 1:1-Verhältnis von Tumor- zu Referenz-DNA. Die rote und die grüne Grenzlinie zeigen ein Verhältnis von Tumor- zu Referenz-DNA von 0,8 bzw 1,2 oder weniger an. Für zahlreiche subchromosomale Regionen sind Aberrationen angezeigt; nähere Angaben hierzu finden sich im Text. Das Y Chromosom wurde nicht mit ausgewertet, da sowohl Tumors als auch Referenz-DNA weiblicher Abstammung waren (die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Dr. E. Breit zur Verfügung gestellt).



**B**



## 4 DISKUSSION

Die potentielle Lebensbedrohlichkeit einer Mammakarzinomerkrankung liegt in ihrer häufig frühen hämatogenen Metastasierung begründet. Vor dem Auftreten klinisch manifester Metastasen disseminieren epitheliale Tumorzellen hämatogen in Sekundärorgane wie beispielsweise dem Knochenmark. Dort sind sie bei Patientinnen mit einem frühen Mammakarzinom in etwa 30% der Fälle über einen immunzytochemischen Nachweis von Zytokeratinen in einer Frequenz von  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  pro mononukleärer Knochenmarkszelle detektierbar (Pantel et al. 1994).

Obwohl die klinische Bedeutung eines Tumorzellnachweises bei diesem Patientenkollektiv im Sinne einer ungünstigen Prognose in den letzten Jahren immer mehr erkannt wurde (Gebauer et al. 2001, Gerber et al. 2001, Braun et al. 2000, Mansi et al. 1999, Landys et al. 1998, Diel et al. 1996, Harbeck et al. 1994), blieb eine umfassende Beschreibung der Biologie dieser Zellpopulation bis zum heutigen Zeitpunkt aus. So konnten zwar mit Hilfe immunzytochemischer Doppelfärbeanalysen einige phänotypische Eigenschaften herausgearbeitet werden, über das Ausmaß und die Art ihrer potentiellen chromosomalen und subchromosomalen Veränderungen jedoch besteht bisher nur wenig Klarheit. Doch gerade die Kenntnis darüber könnte interessante Rückschlüsse über den malignen Charakter disseminierter Tumorzellen zulassen und würde so deren prognostische Bedeutung auch von einer biologischen Seite her unterstreichen. Ferner ließen sich hieraus mit hoher Wahrscheinlichkeit auch wichtige Hinweise zur Klonalität und zum Genotyp der potentiell metastatischen Stammzellen ableiten. Zwar gelang es bereits einigen Autoren mit Hilfe einer kombinierten Methode aus Immunzytochemie und Interphase-FISH bei okkulten Mammakarzinomzellen numerische Aberrationen für das Chromosom 17 (Müller et al. 1996) und eine Amplifikation der Onkogene *c-erbB-2* und *int2* aufzuzeigen (Müller et al. 1996, Forus et al. 1999). Eine das gesamte Genom miteinschließende Analyse jedoch, die eine chromosomale Positionierung potentieller Amplifikationen und Deletionen sämtlich vorhandener Chromosomen als Ursache einer möglichen Genfehlregulation miteinschließt, wurde in der Literatur zu disseminierten Tumorzellen des Knochenmarks von Patientinnen mit einem Mammakarzinom bisher noch nicht beschrieben.

Eine zytogenetische Methode, die diesem Anspruch einer genetischen Beschreibung vom Ansatz her gerecht werden könnte, stellt die Analysetechnik der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) dar. Seit ihrer Erstbeschreibung im Jahre 1992 durch Kallioniemi et al. wurde diese Methode auf eine Vielzahl maligner und benigner Neoplasien angewendet und hat dabei erfolgreich zur Aufdeckung verschiedener chromosomaler Aberrationen geführt (Ried et al. 1997, Knuutila et al. 1998). In einigen Fällen bedeutete dies auch einen ersten Schritt in Richtung zur Identifikation wichtiger, an der Tumorprogression beteiligter Gene (Anzick et al. 1997, Collins et al. 1998). Ebenso erbrachten vergleichende CGH-Analysen von Primärtumor und Metastase wertvolle Hinweise zu zusätzlich aufgetretenen genetischen Veränderungen in der Metastase (Nishizaki et al. 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein experimentelles Design zur Anwendung der Methode der komparativen genomischen Hybridisierung auf okkulte Tumorzellen des Knochenmarks entwickelt, um dadurch eine Übersicht über etwaige chromosomale und subchromosomale Aberrationen dieser Zellen zu ermöglichen.

Als Patientenkollektiv wurden dabei ganz bewußt Patientinnen mit einem frühen Mammakarzinom gewählt, da dieser Gruppe ein Nachweis von DTC im Knochenmark die größte prognostische Bedeutung zukommt. Das untersuchte Kollektiv entsprach hierbei in allen Eigenschaften (Nodalstatus, Alter, Rezeptorverteilung, HER-2/neu-Status, Proteasenwerte uPA/PAI-1, Größe des Primärtumors, etc.) einem Durchschnittskollektiv. Allerdings lag die im Primärscreening erfaßte Rate von 21% Patientinnen mit einem positivem Knochenmarkbefund eher im unteren Bereich der sonst zu dieser Gruppe publizierten Daten (s.o.), was sich aber ohne weiteres durch die geringe Fallzahl des untersuchten Kollektivs erklären läßt. Als Ausgangsmaterial diente intraoperativ gewonnenes Knochenmark aus beiden vorderen Beckenkämmen, was in den meisten Studien zur prognostischen Bedeutung von DTC den typischen Entnahmeort darstellte.

Beim Versuch, DTC des Knochenmarks einer näheren molekularen Analyse zu unterziehen, stellten sich dem Untersucher zwei große Hürden. Die erste Hürde betraf den funktionellen Status epithelialer Zellen in hämatopoetischen Systemen, der, seitdem diese Zellen beschrieben wurden, zugleich auch immer wieder in Frage gestellt wurde (Mansi et al. 1989, Funke und Schraut 1998, Mehes et al. 2001). Denn PCR-basierte Ansätze sind nicht in der Lage, zwischen intakten, nekrotischen oder apoptotischen Zellen oder Zellfragmenten, die möglicherweise in phagozytierende Zellen eingeschlossen wurden, zu unterscheiden. Immunzytochemische Methoden sind in dieser Hinsicht zwar etwas informativer, da sie auch die Zellmorphologie berücksichtigen, doch erlauben auch sie keine sichere Beschreibung des Funktionszustandes der entsprechenden Zellen. Außerdem existieren Hinweise auf eine vorübergehende, intraoperative Disseminierung von Tumorzellen in die Blutzirkulation (Eschwege et al. 1995, Hansen et al. 1995, Denis et al. 1996, Weitz et al. 1998). Es nicht bekannt, ob diese Zellen das Knochenmark erreichen oder gar "besiedeln" können, weshalb der Funktionszustand dieser eher passiv in die Blutbahn abgegebener Zellen völlig im Dunkeln liegt. Zellkulturtechniken und *in vivo*-Modelle stellen daher letztendlich die einzig denkbaren Versuchsanordnungen dar, mit denen eine Aussage über Lebensfähigkeit, Proliferationspotenzial und Klonogenität disseminierter Tumorzellen möglich ist.

Die zweite große Hürde im Umgang mit okkulten Tumorzellen besteht in ihrer niedrigen Frequenz, mit der sie in diesem Kompartiment vorkommen. Auch dieses Problem läßt sich mit Hilfe von KM-Primärkulturen zumindest teilweise lösen, da durch das Absterben nicht-adhärenter hämatopoetischer Zellen bei gleichzeitiger Proliferation der adhärenter Karzinomzellen ein Anreicherungseffekt erzielt wird, der allerdings durch ein unvermeidbares, gleichzeitiges Auswachsen mesenchymaler, adhärenter Stromazellen abgeschwächt wird.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde von den zu untersuchenden Knochenmarkproben zunächst jeweils eine Primärkultur angelegt, um im Folgenden die weitergehende Analyse auf vitale, nicht-apoptotische Tumorzellen zu fokussieren. Verschiedene Kulturmodelle standen dabei zur Auswahl: Rye et al. beschrieb ein Modell, in dem DTC vor der eigentlichen Kultivierung in einem Hydrokortison- und Östradiolhaltigem Medium in einem zweidimensionalen Separationsprozeß (immunmagnetische Anreicherung gefolgt von Zellsiebseparation) angereichert wurden (Rye et al. 1997). Nachteilhaft hierbei ist, daß nur diejenigen DTC in die Primärkultur gelangen, die zuvor durch die Spezifität des gewählten Antikörpers selektioniert werden konnten. Ross et al. entwickelte ein Primärkultursystem mit Softagar und einem EGF-, IGF-1- und GM-CSF-haltigem Medium; es diente allerdings nur zum Nachweis der

Vitalität von detektierten DTC, für präparative Zwecke wurde es nicht konzipiert (Ross et al. 1993).

Das in dieser Arbeit gewählte Zellkulturmodell folgte im Wesentlichen der 1995 von Pantel et al. beschriebenen Methode, in der die mononukleäre Zellfraktion eines Hypaque-Dichtegradienten unter Bedingungen kultiviert wurde, die ein Auswachsen epithelialer Zellen durch Verwendung ECM-beschichteter Kulturflaschen, epithelialer Wachstumsfaktoren und reduzierten Sauerstoffbedingungen begünstigen (Pantel et al. 1995).

Bemerkenswerterweise präsentierte das zu jedem Passagezeitpunkt (nach etwa drei bis vier Wochen) bei einem Aliquot nach der APAAP-Methode durchgeführte immunzytochemische Kulturscreening unabhängig vom Passagezeitpunkt und unabhängig von der Abstammung der Primärkultur ein sehr heterogenes Bild gefärbter Zellen. So konnten innerhalb einer einzigen Cytospinpräparation Zellen mit einem typisch ringförmigen Färbemuster neben Zellen beobachtet werden, die beispielsweise einen ungefärbten Randsaum aufwiesen. Derlei Beobachtungen konnten aus früheren Erfahrungen des Erstautors im Umgang mit solchen Primärkulturen nicht gemacht werden (Pantel, persönliche Kommunikation). Trotzdem machte dies, vielleicht in Analogie zur Etablierung objektiver Kriterien bei der Evaluation immungefärbter Zellen im Primärscreening von DTC im Knochenmark (Borgen et al. 1999), eine Einteilung der gefärbten Zellen in unterschiedliche Kategorien notwendig. Die Beobachtung eines sehr heterogen gefärbten Zellbildes warf darüber hinaus erneut die Frage nach der Spezifität der eingesetzten Untersuchungsmethode auf. Da die Isotypkontrollen durchweg negativ waren, konnte das Phänomen des heterogenen Zellbildes zumindest nicht auf eine unspezifische Reaktion zurückgeführt werden.

Abgesehen von der Schwankungsbreite hinsichtlich der jeweiligen CK-Positivitätsraten, die eine Einteilung immungefärbter Zellen in unterschiedliche Kategorien nach sich zog, deckten sich die meisten im Zusammenhang mit den Primärkulturen gemachten Beobachtungen mit den Angaben der Literatur (Pantel et al. 1995, Solakoglu et al. 2002): Eine Wachstumskinetik CK-positiver Zellen mit einer Verdoppelungszeit von etwa vier Tagen; ein Maximum der Rate CK-positiver Zellen bei den meisten Kulturen bereits nach der zweiten Passage; eine Schwankungsbreite der CK-Positivitätsrate einzelner Kulturen über mehrere Größenordnungen; eine für Primärkulturen typisch begrenzte Teilungskapazität (Offensichtlich verfügen die kultivierten Karzinomzellen noch nicht über eine vollständige Proliferationsautonomie, da bei manchen Kulturen ein Wachstumsstillstand bereits nach der dritten Passage eintrat); signifikante Zellzahlen ( $>10^3$  pro  $3 \times 10^4$  gescreenter Kulturzellen) bei etwa 40% der Kulturen nach vier bis acht Wochen; eine fehlende Korrelation von Kultur- und Primärscreening, wobei im Kulturscreening ein höherer Anteil von Patientinnen mit CK-positiven Zellen als im Vergleich zum Primärscreening beobachtet werden konnte. Letztere Beobachtung könnte bedeuten, daß das Ergebnis des Kulturscreenings nicht eine Folge von unterschiedlich hohen  $CK^+$ -Zellkonzentrationen in den Knochenmarkproben, die den Primärkulturen zugrunde liegen, darstellt, sondern eher das *in vitro* Proliferationspotenzial dieser Zellen reflektiert. Bemerkenswerterweise war die überwiegende Mehrheit (10/12) der Proben, die zu einer signifikanten Expansion in Kultur führten im Primärscreening negativ. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß zehnmal so viele KM-Zellen kultiviert wurden wie im Primärscreening untersucht (im Durchschnitt  $2 \times 10^6$  Zellen). Die Primärkulturen dürften daher unter fast limitierenden Verdünnungsbedingungen gewachsen sein mit einer

Startmenge von weniger als zehn Tumorzellen pro Kulturflasche. Dies weist auf ein beachtliches Wachstumspotenzial der mikrometastatischen Zellen hin.

Abweichend von dem Ergebnis eines negativen Kulturscreenings bei 17 Primärkulturen, die von Patienten mit Entzündung oder gutartigen Veränderungen stammten (Pantel et al. 1995), wurden in der vorliegenden Arbeit in den Primärkulturen zwei gesunder Spenderinnen CK<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen (bei negativer Isotypkontrolle), die sich hinsichtlich Morphologie und Färbemuster nicht von den CK-positiven Zellen der Primärkulturen von den Mammakarzinompatientinnen unterscheiden ließen. In einem Fall handelte es sich dabei um weniger als zehn Zellen, im anderen Fall waren es in aufeinanderfolgenden Kulturen über hundert Zellen. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß bei der Gewinnung der Knochenmarkproben der gesunden KM-Spenderinnen mit einer großen Kanüle und ohne vorherigen Hautschnitt Hautzellen als Kontaminate in Erscheinung traten. Außerdem ist bekannt, daß bei der Entnahme von Knochenmark für eine Stammzelltransplantation aufgrund des hohen Entnahmeverolumens ein mehrfaches Punktieren notwendig ist. Eine andere Ursache könnte in einer bei den Spenderinnen bisher noch nicht diagnostizierten malignen Erkrankung gesehen werden. Andererseits warf das Auftreten CK-positiver Zellen in Negativkontrollen erneut die Frage nach einer potentiellen, ektopen Expression von Zytokeratinen unter den gewählten Kulturbedingungen auf (Galmiche et al. 1993, Traweek et al. 1993, Krismann et al. 1995, Zippelius et al. 1997, Bostick et al. 1998, Jung et al. 1998). Doppelfärbungen mit Zytokeratinspezifischen Antikörpern und Antikörpern, die spezifisch für mesenchymale oder hämatopoetische Marker sind, hätten hier eventuell Aufschluß erbringen können. Mit monoklonalen Antikörpern gegen das mesenchymale Intermediärfilament Vimentin und/oder gegen das gemeinsame Leukozytenantigen CD45 konnte in den von Pantel et al. beschriebenen KM-Primärkulturen jedenfalls keine Expression dieser Marker nachgewiesen werden, was eine ektopen Expression von Zytokeratinen durch mesenchymale Stromazellen oder Zellen hämatopoetischer Herkunft zumindest sehr unwahrscheinlich erscheinen ließ (Pantel et al. 1995). Andererseits ist es bekannt, daß artifiziell immortalisierte Primärkulturen eine epithelial-mesenchymale Transition (Dandachi et al. 2001, Savagner 2001) durchlaufen und als Ausdruck dessen Vimentin-positiv werden können (Putz et al. 1999), so daß ein positiver Vimentin-Nachweis bei Primärkulturzellen nicht unbedingt deren hämato-poetische Herkunft, sondern, ganz im Gegenteil, sogar deren malignen Charakter unterstreichen kann. Eine CGH-Analyse der Kulturzellen sollte in jedem Falle Klarheit über deren neoplastische Natur verschaffen.

Einen direkten Hinweis auf einen veränderten Genotyp CK-positiver Kulturzellen lieferte bereits eine kürzlich erschienene Arbeit von Solakoglu et al.. In ihr konnten numerische Aberrationen der Chromosomen 7, 8, 11, 17 und 18 bei 19-61% der jeweils 100 untersuchten Kerne von Zellen aus sechs verschiedenen Primärkulturen mit Hilfe einer Vielfarben-Interphase-FISH-Technik nachgewiesen werden. Interessanterweise demonstrierte die gleiche Studie einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der *in-vitro* Expansion CK-positiver Zellen in Primärkultur und dem klinischen Verlauf, falls die Daten einer gemischten Kohorte von 122 Patienten mit Karzinomen der Brust, Lunge, Kolon, Prostata und Niere gepoolt wurden (Solakoglu et al. 2002). Dabei war das Ausmaß der *in vitro* Expansion ein besserer prognostischer Indikator als das Primärscreening selbst, was für die klinische Relevanz dieses Kulturmodells sprechen könnte.

Ein weiterer Hinweis, daß es sich bei den in Kultur gewachsenen Zellen tatsächlich um Zellen mit malignen Eigenschaften handelte, stammt von O'sullivan et al., der ein Primär-kulturmodell beschrieb, in dem Rippenknochenmark von Patienten mit magenahem Ösophaguskarzinom im Stadium M0 kultiviert wurden. Diese Kulturen erzeugten nach 8-16 Wochen und subkutaner Injektion in athymischen Nacktmäuse hochvaskularisierte, subkutane Tumorknötchen (O'sullivan et al. 1999).

Obwohl durch den Schritt der Primärkultur bereits eine Anreicherung CK-positiver Zellen zwischen zwei und fünf Zehnerpotenzen erzielt werden konnte, reichte deren absolute Anzahl und Reinheitsgrad noch nicht aus, um aus der DNA-Extraktion einer solchen Zellkultursuspension eine CGH-Analyse durchführen zu können, weshalb weitere Anreicherungsschritte erforderlich waren. Immun-magnetische Anreicherungsmethoden mittels tumorassoziierter Antigene oder über Antigene, die von Tumorzellen häufig überexprimiert werden, erweckten zu diesem Zweck zunächst einen vielversprechenden Eindruck, da sie bei einigen Autoren erfolgreich zu einer gesteigerten Detektionsrate CK-positiver Zellen im Knochenmark (und im Blut) von Mammakarzinompatientinnen geführt hatten (Naume et al. 1997, Otte et al. 2000, Krüger et al. 2000, Zhong et al. 2000, Kasimir-Bauer et al. 2001). Überraschenderweise zeigte eine entsprechende Anwendung dieser Methode auf einen Teil der Primärkulturzellen nicht den erhofften Erfolg, was experimentell auf eine nur schwache oder gar nicht vorhandene Expression der sechs untersuchten Antigene c-ErbB-2, 17-1A, MUC-1, Lewis<sup>y</sup>, EMA und EGFR bei den untersuchten Primärkulturen zurückgeführt wurde. Da die immun-zytochemische Charakterisierung nicht *in situ*, sondern erst nach proteolytischem Abbau der adhärennten Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA auf Cytospinpräparaten erfolgte, wurde überprüft, ob nicht vielleicht dieser Schritt mit einer möglichen negativen Beeinträchtigung der antigenen Struktur CK-positiver Zellen einhergegangen sein könnte. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, da auch der Einsatz eines schonenden Ablöseverfahren mit Accutase<sup>TM</sup> keinen positiven Nachweis der entsprechenden Antigene erbrachte. Eine mögliche Erklärung zumindest im Falle des c-ErbB-2 könnte sein, daß drei der untersuchten Kulturen von Patientinnen mit einem Primärtumor stammten, der kein HER-2/neu exprimiert hatte (bei der vierten analysierten Patientin war der HER-2/neu Status unbekannt). Obwohl Hinweise existieren, daß ein hoher Anteil Zytokeratin-positiver Zellen des Knochenmarks c-ErbB-2 überexprimiert (Pantel et al. 1993) und dies selbst bei Patientinnen der Fall ist, deren Primärtumor dieses Antigen nur schwach exprimiert (Braun et al. 2001), bleibt unbekannt, ob dies auch bei Patientinnen der Fall ist, deren Primarius negativ für HER-2/neu ist. Insgesamt scheint die Expression verschiedener tumorassoziierter oder von Mammakarzinomzellen überexprimierter Antigene recht heterogen zu sein, wie für verschiedene Lewis-Blutgruppenantigene (Sikut et al. 1996), das 17-1A Antigen (Göttlinger et al. 1986) und die Antigene 17-1A, c-ErbB-2, Lewis<sup>y</sup> und MUC-1 (Braun et al. 1999) gezeigt wurde. Ähnliches stellte Martin et al. für c-ErbB-2 und MUC-1 bei disseminierter Tumorzellen im Blut fest (Martin et al. 1998). Möglicherweise ist diese Heterogenität ein Ausdruck ihrer genetischen Instabilität, ließe es aber auch plausibel erscheinen, daß die unter den gewählten Kulturbedingungen *in vitro* gewachsenen CK-positiven Zellen die entsprechende Antigene herunterreguliert haben könnten. Diese Überlegung wird durch eine Arbeit von Putz et al. unterstützt, in der durch gezielte Transformation immortalisierte CK-positive Zellen aus KM-Primärkulturen von Mammakarzinompatientinnen erzeugte Zelllinien ebenfalls zum Teil negativ für c-ErbB-2 waren. Diese Zelllinien exprimierten allerdings mRNA zahlreicher Mitglieder der MAGE-Familie und waren auf Proteinebene beide positiv für die metastasenassoziierten Adhäsionsmoleküle E-Cadherin, die Integrin-Untereinheiten  $\alpha_5$  und  $\beta_1$ , sowie die Moleküle LFA-3

und CD44s (Putz et al. 1999). Es ist daher nicht auszuschließen, daß eine oder mehrere dieser Determinanten auch von den Primärkulturzellen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, exprimiert werden könnten und eine immunmagnetische Anreicherungsstrategie unter Verwendung von Antikörpern gegen eines oder mehrerer dieser Antigene eher zum Erfolg geführt hätte.

Da eine immunmagnetische Anreicherung prinzipiell auch über intrazellulär gelegenes Zytokeratin denkbar war, wurde diese Herangehensweise ebenfalls mit Hilfe von superparamagnetischen Partikeln untersucht, deren Oberfläche mit dem Anti-Zytokeratin 7/8 Antikörper (CAM5.2) beladen waren (hier MACS-Partikel genannt). In einer Modellsuspension wurden einzelne Zellen der Mammakarzinomlinie MCF-7 unter humane Leukozyten aus peripherem Blut zu einem Anteil von etwa 10% gemischt. Diese Rate wurde gewählt, da sie bei etwa einem Drittel der Primärkulturen der Rate der CK-positiven Zellen entsprach. Im Gegensatz zur Anreicherung über Oberflächenantigene war bei dieser Methode eine technisch aufwendige Fixierung und Permeabilisierung der entsprechenden Zellsuspension notwendig, um den antikörperbeladenen MACS-Partikeln Zugang zum intrazellulär gelegenen Antigen zu ermöglichen. Interessant war dabei die Beobachtung, daß es durch den Schritt der Fixierung und Permeabilisierung zu einem ungleichmäßigen Verlust beider Zellspezies kam (es gingen mehr Leukozyten als MCF-7-Zellen verloren) und dadurch ein relativer Anreicherungseffekt für MCF-7-Zellen eintrat. Dies ließe sich durch eine relativ größere Empfindlichkeit für physischen und chemischen Streß der frisch gewonnen humanen Leukozyten erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde für die untersuchte Modellsuspension insgesamt ein Anreicherungsfaktor von 3,9 bei einem Verlust von knapp 90% errechnet. Ein direkter Literaturvergleich der erhobenen Daten war allerdings aus zwei Gründen nicht ohne weiteres möglich. Zum einen basierten andere Untersuchungen zur Anreicherung epithelialer Zellen mit dem MACS-System auf viel geringeren Ausgangskonzentrationen epithelialer Zellen (Bereich  $10^{-6}$  bis  $10^{-7}$ ), was aus ihrer beabsichtigten Anwendung des Systems zur Anreicherung CK-positiver Zellen aus Knochenmark oder Blut resultierte. Unter diesen Umständen waren aber viel höhere Anreicherungsfaktoren (bei relativ konstanten Verlusten) zu erzielen (Griwatz et al. 1995). Zweitens wurden zum Monitoren der Konzentration CK-positiver Zellen zumeist eine FACS-Analytik verwendet, die mit geringeren Verlusten als ein immunzytochemischer Nachweis einherging, da mögliche Verluste durch Cytospinaufarbeitung und FärbeprozEDUREN wegfielen. So fanden sich in einer Arbeit von Martin et al. bei der Untersuchung ähnlicher Modellsuspensionen mit Ausgangskonzentration der Tumorzellen im Bereich  $10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  Anreicherungsfaktoren von  $206 \pm 57$  bei Verlusten von  $48,4 \pm 8,3$  % (Martin et al. 1998). In einer weiteren grundlegenden Arbeit zur Anreicherung CK-positiver Zellen mit dem MACS-System wurden Verlusten von etwa 70% bei einem Anreicherungsfaktor von etwa 80 und einer Ausgangskonzentration der Tumorzellen von  $10^{-4}$  beschrieben (Griwatz et al. 1995). Der in der vorliegenden Arbeit erzielte Anreicherungsfaktor von 3,9 ließ einer weitergehende Anwendung dieser Methode auf die Primärkulturzellen wenig sinnvoll erscheinen, insbesondere weil ein Verlust von knapp 90% eine Anreicherung von mindestens  $10^4$  Zellen, als das untere Limit für eine CGH-Analyse, nicht erwarten ließ.

Daher wurde schließlich unter Anwendung der PALM-Laser-Technologie auf eine rein physikalische Anreicherungsmethode zurückgegriffen. Mit dem PALM-Laser-Mikroskop wurden zwei verschiedene Funktionsweisen zur Probengewinnung ausgenutzt. In einem ersten Arbeitsschritt wurden einzelne, auf Kunststoff-Folie befindliche Zellen mit einem gewissen Sicherheitsabstand „umschnitten“. Das abladierte Material soll dabei aus

Produkten bestehen, die in der Größe von Atomen bis zu kleineren Fragmenten des Kunststoffpolymers reichen und mit Überschallgeschwindigkeit evaporiert werden (Srinivasan 1986). Obwohl bei diesem Prozeß Intensitäten von bis zu  $10^{13}$  W/cm<sup>2</sup> erreicht werden sollen, die zu elektrischen Feldstärken in der Größenordnung von  $10^7$  V/cm und Temperaturen von mehreren Millionen Grad führen können, so sollen sie doch hochgradig in Raum und Zeit begrenzt sein, weshalb sie auch keinen Schaden in der unmittelbaren Umgebung anrichten sollen (Greulich und Leitz 1994). Der Prozeß wurde daher auch als „kalte“ ablative Photodekompensation (Srinivasan 1986) bezeichnet. In einem zweiten Arbeitsschritt wurde der Laser etwas unterhalb des Objekts fokussiert und die Folie mit der darauf befindlichen Zelle in ein über der Probe befindliches Auffanggefäß katapultiert, das mit einem kleinen Tropfen Lysispuffer benetzt war. In einer Arbeit von Schütze und Lahr wurde als vermuteten Mechanismus für dieses Phänomen ein intensiver Photonendruck, der sich unterhalb der Probe ausbildet, angeführt und eine mögliche Distanzüberbrückung von bis zu 8 mm entlang der Vorderfront dieses starken Photonenstroms angegeben. Der Versuch, die aufgefangenen Zellen unter dem Mikroskop wiederzufinden, wurde von Schütze und Lahr als schwierig und mit einer Wiederfindungsrate von 63% beschrieben. Die angewandte Laserwellenlänge von 337 nm wurde dabei als ausreichend entfernt vom DNA-Absorptionsmaximum bei 260 nm angesehen, so daß mit Hilfe von Mutationsassays bisher keine DNA-Einzelstrang-Brüche beobachtet werden konnten (Schütze und Lahr 1998, de Witt und Greulich 1995). Es gelang im Gegenteil sogar bei einzelnen mit dieser Methode gewonnenen Zellen aus histologischen Kolonkarzinomschnitten oder aus CK-positiven Primärkulturzellen von Karzinompatienten, die einer RT-PCR unterworfen wurden, im entsprechenden Produkt zuverlässig die für diese Karzinome spezifische Mutation im *c-Ki-ras2*-Gen zu detektieren (Schütze und Lahr 1998, Solakoglu et al. 2002).

Da sich aus Gründen der Praktikabilität mit dieser Methode jeweils nur eine kleine Zellpopulation gewinnen ließ, war eine PCR-basierte Amplifikation des gepoolten Zellmaterials notwendig. Obwohl Wells et al. bei einem Vergleich verschiedener Genomamplifikationstechniken eine etwas bessere Abschneiden hinsichtlich der Abdeckung zehn verschiedener getesteter Loci für die Methode der PEP-PCR (Zhang et al. 1992) feststellte (Wells et al. 1999), wurde von den zahlreichen in der Literatur beschriebenen Varianten der Genomamplifikation zunächst die der DOP-PCR (Telenius et al. 1992) ausgewählt, da es mit ihrer Hilfe gelang, eine Vielzahl von CGH-Daten zu Proben mit wenig Ausgangsmaterial zu erheben (Speicher et al. 1993, Aubele et al. 1999, Aubele et al. 2000) und sie für diese Anwendung auch mehrmals optimiert wurde (Kuukasjärvi et al. 1997, Huang et al. 2000). Auch wenn die Methode der DOP-PCR aufgrund einer ungleichmäßigen, (scheinbar zufälligen) Amplifikation des Ausgangsmaterials nur eingeschränkt für eine Mikrosatellitenanalyse (LOH-Analyse) einsetzbar ist, zeigten Sequenzierungsanalysen ein verlässliches Abbilden des Ausgangsmaterials in Form von bis zu 500 bp-langen Fragmenten (Sanchez-Cespedes et al. 1998). Außerdem fand Harada et al. bei Untersuchungen zur Reliabilität einer Kombination aus DOP-PCR und CGH, daß damit ein im Vergleich zur Standard-CGH gleichwertiger, zytogenetischer Informationsgewinn möglich ist (Harada et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Beobachtung von Kuukasjärvi et al. Folge geleistet, mit Thermo-Sequenase statt der sonst üblichen Taq-Polymerase für die ersten Runden der Amplifikation (Präamplifikation) eine höhere Amplifikationseffizienz zu erzielen. Das Minimum von gerade noch amplifiziertem Ausgangsmaterial wurde in der vorliegenden Arbeit für gereinigte DNA bei 50 pg festgestellt, was in etwa dem DNA-Gehalt zweier MCF-7 Zellen entspricht und gut mit den Literaturdaten übereinstimmt

(Kuukasjärvi et al. 1997, Huang et al. 2000). Fünfzig gepoolte, unfraktionierte Zellen wurden genauso gut amplifiziert wie hundert (der Bandenintensität nach zu urteilen), weshalb im folgenden eine Population von jeweils fünfzig Zellen die Basis für weitere Untersuchungen darstellte. Das Auftreten distinkter Banden im "Bandenschmier" deutete auf eine ungleichmäßige Amplifikation des Ausgangsgenoms hin, die wahrscheinlich auf die spezifische Sequenz am 3'-Ende des Primers zurückzuführen war. Im Vergleich zu aufgereinigter DNA kam es bei den lysierten Zellen zu einem Abfall der Fragmentlängenverteilung des Amplifikationsprodukts auf etwa 190 bp, was nicht der optimalen Länge von 300 bp bis 3 kb für eine CGH-Analyse entsprach (Huang et al. 2000, DeVries et al. 1995 und D. Pinkel, persönliche Kommunikation). Durch Einsatz eines Polymerasemixes, der sich durch eine besonders niedrige Abbruchrate auszeichnet, konnte dieses Problem aber gelöst werden. Mit dieser optimierten Methode wurden auch erfolgreich mit dem PALM-Laser isolierte Zellen amplifiziert.

Für die eigentliche komparative genomische Hybridisierung wurden für Referenz- und Test-DNA unterschiedliche Markierungsverfahren gewählt: Die Methode der Nick-Translation stellt den Standard zur Markierung von DNA-Extraktionen aus makroskopischem Tumorgewebe dar, weil sie sehr gleichmäßig markierte Fragmente produziert und, im Gegensatz zu PCR-basierten Markierungsmethoden, keine potentiellen Abbildungsfehler verursacht, weshalb diese Markierungsmethode auf die Referenz-DNA angewendet wurde. Weil eine Nick-Translation aufgrund ihrer endonukleasehaltigen Zusammensetzung bei der Markierungsreaktion aber zu einem Abfall der Fragmentlänge führt, konnte sie nicht auf die Test-DNA angewendet werden, da hierdurch die ohnehin schon kritisch kurzen Fragmentlängen der DOP-PCR noch weiter degradiert worden wären. DNA aus der DOP-PCR wurde daher durch eine zweite PCR markiert. Hybridisiert wurde durch Nick-Translation markierte Referenz-DNA gegen PCR-markierte Test-DNA. In einer Arbeit von Huang et al. wurde die Gleichwertigkeit dieser Vorgehensweise zu einer Hybridisierung von auf identische Art und Weise markierten Proben beschrieben (Huang et al. 2000).

Um die Leistungsfähigkeit der Methode zu überprüfen, wurde zunächst nur die DNA einer Population von 50 MCF-7 Zellen einer CGH-Analyse unterzogen. Das resultierende CGH-Summen-Karyogramm zeigte erwartungsgemäß chromosomalen Regionen mit einer Zunahme der DNA-Kopienanzahl als auch solche mit einem Signalverlust. Beim Versuch, die erhobenen CGH-Daten der MCF-7 Zellen mit denen der Literatur zu vergleichen, fiel zunächst die Heterogenität der dort gemachten Angaben auf: Jones et al. fertigte CGH-Analysen drei verschiedener Mitglieder der "MCF-7-Familie" an (SOP, BUS und UCL) und fand beim Vergleich ihrer CGH-Karyogramme auffällige Unterschiede (Jones et al. 2000). Gleichzeitig warnte er daher vor einem unreflektierten Gebrauch der Zelllinie "MCF-7" als Positivkontrolle für CGH-Experimente. Von Kallioniemi et al. veröffentlichte CGH-Daten zu MCF-7 Zellen (ohne nähere Angabe zum Stamm) zeigten darüber hinaus weitere Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zu den von Jones gesammelten Daten (Kallioniemi et al. 1994 b). Zusammengenommen deuteten diese Befunde daraufhin, daß zwischen den im Umlauf befindlichen MCF-7 Kulturen eine deutliche genetische Heterogenität besteht. Daß sich diese Heterogenität aber nicht nur zwischen verschiedenen MCF-7 Zellpopulationen, sondern sogar auch zwischen den Zellen einer einzelnen Kultur zeigte, wurde durch eine CGH-Analyse einzelner, mit einem Mikromanipulator isolierter MCF-7 Zellen gezeigt (Klein et al. 1999). Um eine bessere Übersicht zu ermöglichen zeigt Tabelle 4.1 die im Rahmen der Dissertation erhobenen Befunde in Synopsis mit den Angaben der Literatur. Alle in der vorliegenden Arbeit gefundenen Veränderungen

spiegeln sich in den Beobachtungen der anderen Autoren wider. Allerdings umfassen die Literaturangaben noch einige weitere Amplifikationen und Deletionen, die bei der Auswertung der DOP-PCR gestützten CGH-Analyse nicht zu erkennen waren. Dies könnte entweder auf eine Kontamination des Ausgangsmaterials durch humanes Zellmaterial zurückzuführen gewesen sein oder auf eine verbesserungswürdige Sensitivität der Methode hindeuten. Außerdem waren die Metaphasen durch eine unerwünschte Granularität des grünen Fluoreszenzsignals (Test-DNA = DOP-DNA) gekennzeichnet.

Um die Methode in dieser Hinsicht noch weiter zu verfeinern, wurde statt einer DOP-PCR die vor einiger Zeit beschriebene Genomamplifikationstechnik der MseI-Adapter-PCR (Klein et al. 1999) auf mit Hilfe des PALM-Lasers isolierte MCF-7 Zellen angewendet. Bei dieser Technik wurde die zu testende DNA zunächst einem Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym MseI unterworfen und anschließend mit einem spezifischen, doppelsträngigen Primer ligiert. Obwohl diese Technik komplizierter als eine PCR mit einem semi-degenerierten Primer erscheint (wie bei der DOP-PCR) und die resultierende Fragmentlänge der durch eine zweite PCR markierten DNA mit etwa 190 bp deutlich unter der von DeVries und Pinkel empfohlenen minimalen Größe von 300 bp lag, war das Resultat der Hybridisierung doch sehr überzeugend. Es wurde damit nicht nur ein weitaus weniger granuläres Fluoreszenzsignal erzeugt, sondern es konnten mit dieser Methode auch fast alle bereits durch die DOP-PCR-CGH beschriebenen Veränderungen bestätigt und darüber hinaus noch weitere identifiziert werden. Die neu hinzugekommenen Veränderungen zeigten ebenfalls eine gute Übereinstimmung im Literaturvergleich (Vgl. Tabelle 4.1).

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, die hier beschriebene Methode der Isolierung einzelner Tumorzellen mit Hilfe des PALM-Lasermikroskops und nachfolgender Amplifikation mittels einer MseI-Adapter PCR in einem nächsten Schritt auf die CK-positiven Primärkulturzellen anzuwenden. So könnten auch diese Zellen einer CGH-Karyotypisierung unterzogen werden. Dies könnte zusammen mit weiteren, zur CGH-Analyse komplementären spezifischen molekulargenetischen Untersuchungsmethoden wie beispielsweise der FISH-Technik oder der LOH-Analyse, einen wertvollen Beitrag zur Identifikation und Kartierung bisher unbekannter Amplifikationen und Deletionen im Genom disseminierter Tumorzellen leisten und somit einen Weg in Richtung neuer, potentieller Metastasierungsgene aufzeigen.

**Tabelle 4.1 (Folgende Seite) Vergleich der im Rahmen der vorliegenden Dissertation erhobenen Originaldaten zu genomweiten Veränderungen in der DNA-Kopienzahl der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 gemäß CGH-Analyse mit entsprechenden Angaben in der Literatur.** Amplifikationen wurden in grüner, Deletionen in roter Schriftfarbe wiedergegeben. **a)** Die CGH-Analyse der Originaldaten beruhte auf der DNA von fünfzig einzelnen, laserisolierten MCF-7 Zellen mit nachfolgender Genomamplifikation der gepoolten DNA durch eine DOP- oder eine MseI-Adapter-PCR. Jones et al. untersuchte drei in Umlauf befindliche MCF-7-Substämme (SOP, BUS, UCL) und fand insbesondere abweichende Veränderungen beim Subtyp UCL. **b)** Nur die chromosomalen Regionen, bei denen Unterschiede zum Subtyp SOP beobachtet wurde, sind aufgeführt. **c)** Dieser Untersuchung lagen ebenso wie der von Kallioniemi et al. eine extrahierte DNA-Menge von  $10^6$  MCF-7 Zellen zugrunde, wobei die von Kallioniemi beschriebenen Amplifikationen bei 3p14 und 14q weder in den Originaldaten noch in den Angaben der anderen Autoren wiederzufinden sind. **d)** Klein et al. verglich das CGH-Muster vier einzelner MCF-7-Zellen, die mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert und nachfolgend mit einer MseI-Adapter-PCR amplifiziert wurden. Die Muster der Einzelzellen wurden auch mit dem CGH-Profil einer extrahierten DNA-Menge von  $10^6$  MCF-7 Zellen verglichen (Pool). Die dabei ersichtliche Heterogenität der genotypischen Veränderungen betrifft nicht nur Kulturen unterschiedlicher

Chr.	Originaldaten		Jones et al. 2000			Kallio- niemi et al. 1996 <sup>c</sup>	Klein et al. 1999 <sup>d</sup>				
	50 MCF-7 Zellen <sup>a</sup>		10 <sup>6</sup> MCF-7 Zellen				Pool	Einzelzellen			
	DOP	Msel	SOP	BUS <sup>b</sup>	UCL <sup>b</sup>			Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4
1		q25-pter	q25 p31-pter		p31-p32	q					
2					q21-q32 q35-qter		p				
3	p23	3pter, p12-p13	p25-pter, q27-q28			p14	q p	q p	q p	q p	q p
4					q12-q32 p16						p, q
5		p12.5	p13-pter			p			p	p	
6			p24-qter								gesamt gesamt
7			q21-qter	q21-qter							
8	q22-q24	q22-qter 8p	q21-qter 8p	q21-qter		q21-qter	q p	q p	q p	q p	q p
9		q34-qter	q31-q34								
10					q25-qter						
11	q13	p11-p13, p24-pter, q11-q13, q22-qter			q14-q22		p, q	p, q	p, q	p, q	p, q
12			q12-q21		q12, q25	q					p
13			q31					gesamt	gesamt	gesamt	
14						q	gesamt	gesamt	gesamt	gesamt	gesamt
15			q24-qter			q	gesamt	gesamt	gesamt	gesamt	gesamt
16		q23	q22-qter			q23-q24 q12-q21					
17		q11-q12, q24-qter	q21-q23			q22-q24	p, q24	p	p	p	p
18	q12-qter	q11.-q12, q21-q22	q12-qter				q	q	gesamt	q	q
19	q11- q13.1	q11- q13.3			gesamt		q	q	q	q	q
20		gesamt	q13			q13	q	q	q	gesamt	gesamt
21		p11-q11			q22					q	q
22			q12-qter				q	q	q	q	q
X	q21-qter		gesamt	p							

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Über den Genotyp hämatogen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit einem Mammakarzinom ist nur wenig bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde daher ein experimentelles Design zur lasergestützten Anreicherung und molekularzytogenetischen Charakterisierung dieser Zellen mittels der Methode der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) erarbeitet.

Ausgehend von perioperativ gewonnenen Knochenmarkaspiraten von Patientinnen mit einem frühen Mammakarzinom wurden zunächst durch ein Primärkulturmodell vitale, nicht-apoptotische, Zytokeratin-exprimierende (CK<sup>+</sup>) Tumorzellen erfolgreich selektiert und expandiert. Das immunzytochemische Screening der Kulturen auf CK<sup>+</sup>-Zellen ergab hinsichtlich Zellmorphologie und Färbeverhalten ein sehr heterogenes Bild und führte zur Definition objektiver Evaluationskriterien.

Da für eine informative CGH-Analyse mindestens zehntausend CK<sup>+</sup>-Zellen mit einem Reinheitsgrad von mindestens 50% erforderlich sind, wurden in einem zweiten Schritt Versuche einer immunmagnetischen Anreicherung dieser Zellen unternommen, welche die genannten Bedingungen allerdings nicht erfüllen konnten.

Daher wurden schließlich jeweils fünfzig CK<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe der Technologie der Laser-Mikrodissektion und -druckkatapultation rein physikalisch isoliert und gesammelt. Um ausreichende DNA-Mengen für eine CGH-Analyse bereitzustellen, wurde die DNA der gesammelten Zellen einem Genomamplifikationsverfahren unterworfen. Dies geschah mit der Methode der DOP-PCR, die vor Anwendung auf Laser-isolierte Kulturzellen zunächst in Pilotversuchen hinsichtlich Polymeraseauswahl und Lyse-Pufferbedingungen ausgetestet und optimiert wurde.

Mit einer CGH-Analyse von derart aufbereitetem Ausgangsmaterial gelang es am Beispiel von Zellen der Mammakarziomlinie MCF-7 zuverlässig, die für diese Zellen in der Literatur beschriebenen chromosomalen Veränderungen zu detektieren. Eine zunächst eingeschränkte Hybridisierungsqualität („körniger Hybridisierungscharakter“) konnte unter Anwendung der MseI-Adapter-PCR, einer neueren Variante der Genomamplifikation, überwunden und das Verfahren so noch weiter verbessert werden.

Mit der hier beschriebenen Methode sollte in einem nächsten Schritt auch die CGH-Analyse von CK-positiven Zellen der in dieser Arbeit etablierten Primärkulturen möglich sein. Dies könnte einen neuen Weg zur Aufdeckung der molekularen Determinanten potentiell metastatischer Stammzellen beim Mammakarzinom eröffnen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Ahr A, Scharl A, Muller M, von Minckwitz G, Gatje R, Pantel K, Kaufmann M. Cross-reactive staining of normal bone-marrow cells by monoclonal antibody 2E11. *Int J Cancer*. 1999 Oct 22;84(5):502-5.

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*. 1997 Aug 15;277(5328):965-8.

Aubele M, Mattis A, Zitzelsberger H, Walch A, Kremer M, Hutzler P, Hofler H, Werner M. Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999 Apr 15;110(2):94-102.

Aubele M, Mattis A, Zitzelsberger H, Walch A, Kremer M, Welzl G, Hofler H, Werner M. Extensive ductal carcinoma in situ with small foci of invasive ductal carcinoma: evidence of genetic resemblance by CGH. *Int J Cancer*. 2000 Jan 1;85(1):82-6.

Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996 Mar;14(3):737-44.

Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad O, Diel I, Solomayer EF, Theoharous P, Coombes RC, Smith BM, Wunder E, Marolleau JP, Garcia J, Pantel K. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. The European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection. *Cytotherapy* 1999;1(5):377-88.

Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, Hoon DS. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 1998 Aug;16(8):2632-40.

Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:7.

Braun S, Muller M, Hepp F, Schlimok G, Riethmuller G, Pantel K. Re: Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jul 15;90(14):1099-101.

Braun S, Hepp F, Sommer HL, Pantel K. Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease. *Int J Cancer*. 1999 Feb 19;84(1):1-5.

Braun S, Kantenich 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 Jan;18(1):80-6.

Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, et al. Zytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med.* 2000b Feb 24;342(8):525-33.

Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmuller G, Pantel K. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Mar 1;61(5):1890-5.

Brugger W, Buhring HJ, Grunebach F, Vogel W, Kaul S, Muller R, Brummendorf TH, Ziegler BL, Rappold I, Brossart P, Scheduling S, Kanz L. Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells. *J Clin Oncol.* 1999 May;17(5):1535-44.

Bühling KJ, Lepenies J, Witt K (Hrsg) (1995) Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer.* 1995 Feb;71(2):278-81.

Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res.* 1970 Jun;60(3):315-9.

Collins C, Rommens JM, Kowbel D, Godfrey T, Tanner M, Hwang SI, Polikoff D, Nonet G, Cochran J, Myambo K, JayKE, Froula J, Cloutier T, Kuo WL, Yaswen P, Dairkee S, Giovanola J, Hutchinson GB, Isola J, Kallioniemi OP, Palazzolo M, Martin C, Ericsson C, Pinkel D, Gray JW, et al. Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8703-8.

Conrad K, Karsten U, Frank KH, Pasternak G. Immunoblotting of monoclonal anti-cytoskeletal antibodies with cytoskeletal of HeLa and MCF-7 cells. *Biomed Biochim Acta.* 1988;47(7):697-703.

Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immunocomplexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem.* 1984 Feb;32(2):219-29.

Courtemanche DJ, Worth AJ, Coupland RW, Rowell JL, MacFarlane JK. Monoclonal antibody LICR-LON-M8 does not predict the outcome of operable breast cancer. *Can J Surg.* 1991 Feb;34(1):21-6.

Cote RJ, Rosen PP, Hakes TB, Sedira M, Bazinet M, Kinne DW, Old LJ, Osborne MP. Monoclonal antibodies detect occult breast carcinoma metastases in the bone marrow of patients with early stage disease. *Am J Surg Pathol.* 1988 May;12(5):333-40.

Dandachi N, Hauser-Kronberger C, More E, Wiesener B, Hacker GW, Dietze O, Wirl G. Co-expression of tenascin-C and vimentin in human breast cancer cells indicates phenotypic transdifferentiation during tumour progression: correlation with histopathological parameters, hormone receptors, and oncoproteins. *J Pathol.* 2001 Feb;193(2):181-9.

Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG, Steele K, Coombes RC, Clink HM, Powles TJ, Ford HT, Gazet JC, Neville AM. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer.* 1981 Jul;44(1):85-90.

Delsol G, Gatter KC, Stein H, Erber WN, Pulford KA, Zinne K, Mason DY. Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. Implications for diagnosis of human neoplasms. *Lancet.* 1984 Nov 17;2(8412):1124-9.

Denis MG, Tessier MH, Dreno B, Lustenberger P. Circulating micrometastases following oncological surgery. *Lancet.* 1996 Mar 30;347(9005):913.

DeVita Jr. Breast cancer therapy: exercising all our options. *N Engl J Med* 1989;320:527-9

DeVries S, Gray JW, Pinkel D, Waldmann FM, Sudar D. (1994) Comparative Genomic Hybridization. In: Dracopoli, NC (ed) *Current protocols in Human Genetics.* J. Wiley&Sons, Inc., New York, Vol.I, Suppl.6, 4.6.15

deWitt A, Greulich KO. Wavelength dependence of laser-induced DNA damage in lymphocytes observed by single-cell gel electrophoresis. *J Photochem Photobiol B.* 1995 Sep;30(1):71-6.

Dogliani C, Dell'Orto P, Zanetti G, Iuzzolino P, Coggi G, Viale G. Zytokeratin-immunoreactive cells of human lymph nodes and spleen in normal and pathological conditions. An immunocytochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1990;416(6):479-90.

du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet.* 1993 Feb;90(6):590-610.

EBCTCG: Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet.* 1998 Sep 19;352(9132):930-42.

EBCTCG: Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet.* 1998 Sep 19;351(9114):1451-67.

Eschwege P, Dumas F, Blanchet P, Le Maire V, Benoit G, Jardin A, Lacour B, Loric S. Haematogenous dissemination of prostatic epithelial cells during radical prostatectomy. *Lancet.* 1995 Dec 9;346(8989):1528-30.

Fidler IJ. Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Nov 1;87(21):1588-92.

Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Bauer M, Wolmark N, Wickerham DL, Deutsch M, Montague E, Margolese R, Foster R. Ten-year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. *N Engl J Med.* 1985 Mar 14;312(11):674-81

Fisher B, Redmond C, Dimitrov NV, Bowman D, Legault-Poisson S, Wickerham DL, Wolmark N, Fisher ER, Margolese R, Sutherland C, et al. A randomized clinical trial evaluating sequential methotrexate and fluorouracil in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-negative tumors. *N Engl J Med.* 1989a Feb 23;320(8):473-8.

Fisher B, Costantino J, Redmond C, Poisson R, Bowman D, Couture J, Dimitrov NV, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, et al. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med.* 1989b Feb 23;320(8):479-84.

Forus A, Hoifodt HK, Overli GE, Myklebost O, Fodstad O. Sensitive fluorescent in situ hybridisation method for the characterisation of breast cancer cells in bone marrow aspirates. *Mol Pathol.* 1999 Apr;52(2):68-74.

Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* 1998 Jan 23;279(5350):514-9.

Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol.* 1998 Feb;16(2):557-66.

Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol.*, 15: 3669-74, 2001.

Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol.*, 15: 960-71, 2001.

Göttlinger HG, Funke I, Johnson JP, Gokel JM, Riethmuller G. The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. *Int J Cancer.* 1986 Jul 15;38(1):47-53.

Greulich KO and Leitz G (1994) Light as microsensor and micromanipulator: laser microbeams and optical tweezers. *Exp. Technique Phys.* 40:1-14.

Griwatz C, Brandt B, Assmann G, Zanker KS. An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood. *J Immunol Methods.* 1995 Jun 28;183(2):251-65.

Halsted W S (1898). A Clinical and Histological Study of Certain Adenocarcinomas of the Breast: And a Brief Consideration of the Supraclavicular Operation and the Results of Operations for Cancer of the Breast from 1889 to 1898 at the Johns Hopkins Hospital. *Ann. Surg.* 28, 557-576.

Halsted W S (1907). The Results of Radical Operations for the Cure of Carcinoma of the Breast. *Ann. Surg.* 1907;46:1-19.

Hansen E, Wolff N, Knuechel R, Ruschoff J, Hofstaedter F, Taeger K. Tumor cells in blood shed from the surgical field. *Arch Surg.* 1995 Apr;130(4):387-93.

Harada T, Shiraishi K, Kusano N, Umayahara K, Kondoh S, Okita K, Sasaki K. Evaluation of the reliability of chromosomal imbalances detected by combined use of universal DNA amplification and comparative genomic hybridization. *Jpn J Cancer Res.* 2000 Nov;91(11):1119-25.

Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat Med.* 1995 Oct;1(10):1035-9.

Huang Q, Schantz SP, Rao PH, Mo J, McCormick SA, Chaganti RS. Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Aug;28(4):395-403.

Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Jun 20;93(12):913-20.

Jones C, Payne J, Wells D, Delhanty JD, Lakhani SR, Kortenkamp A. Comparative genomic hybridization reveals extensive variation among different MCF-7 cell stocks. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000 Mar;117(2):153-8.

Jung R, Krüger W, Hosch S, Holweg M, Kröger N, Gutensohn K, et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer* 1998;78:1194-1198.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992 Oct 30;258(5083):818-21.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 1994 a Aug;10(4):231-43.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994b Mar 15;91(6):2156-60.

Kasimir-Bauer S, Oberhoff C, Sliwinska K, Neumann R, Schindler AE, Seeber S. Evaluation of different methods for the detection of minimal residual disease in blood and bone marrow of patients with primary breast cancer: importance for clinical use? *Breast Cancer Res Treat.* 2001 Sep;69(2):123-32.

Karsten U, Papsdorf G, Roloff G, Stolley P, Abel H, Walther I, Weiss H. Monoclonal anti-Zytokeratin antibody from a hybridoma clone generated by electrofusion. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1985 Jun;21(6):733-40

Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmuller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 13;96(8):4494-9.

Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol.* 1998 May;152(5):1107-23. Review.

Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seeber S, Schutte J. Low specificity of Zytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol.* 1995 Nov;13(11):2769-75.

Kruger W, Datta C, Badbaran A, Togel F, Gutensohn K, Carrero I, Kroger N, Janicke F, Zander AR. Immunomagnetic tumor cell selection - implications for the detection of disseminated cancer cells. *Transfusion.* 2000 Dec;40(12):1489-93.

Kuukasjarvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola J. Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997 Feb;18(2):94-101.

Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Isola J. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res.* 1997 Apr 15;57(8):1597-604.

Landys K, Persson S, Kovarik J, Hultborn R, Holmberg E. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 1998 May;49(1):27-33.

Levi F, Lucchini F, La Vecchia C, Negri E. Trends in mortality from cancer in the European Union, 1955-94. *Lancet.* 1999 Aug 28;354(9180):742-3.

Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Ferno M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brunner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-Van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broet P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Janicke F, Schmitt M, Foekens JA. Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jan 16;94(2):116-28.

Liotta LA, Kleinerman J, Sidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* 1974 May;34(5):997-1004.

Ludwig Breast Cancer Study Group: Prolonged disease-free survival after one course of perioperative adjuvant chemotherapy for node-negative breast cancer. The Ludwig Breast Cancer Study Group. *N Engl J Med.* 1989 Feb 23;320(8):491-6.

Makin CA, Bobrow LG, Bodmer WF. Monoclonal antibody to Zytokeratin for use in routine histopathology. *J Clin Pathol.* 1984 Sep;37(9):975-83.

Mansour EG, Gray R, Shatila AH, Osborne CK, Tormey DC, Gilchrist KW, Cooper MR, Falkson G. Efficacy of adjuvant chemotherapy in high-risk node-negative breast cancer. An intergroup study. *N Engl J Med.* 1989 Feb 23;320(8):485-90.

Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S, Radbruch A, Miltenyi S, Schmitz J. Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol.* 1998 Mar;26(3):252-64.

Mathieu MC, Friedman S, Bosq J, Caillou B, Spielmann M, Travagli JP, Contesso G. Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies for detection of occult metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1990 Jan;15(1):21-6.

Mehes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol.* 2001 Jul;159(1):17-20.

Mitelman F, Johansson B, Mandahl N, Mertens F. Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997 May;95(1):1-8.

Molino A, Colombatti M, Bonetti F, Zardini M, Pasini F, Perini A, Pelosi G, Tridente G, Veneri D, Cetto GL. A comparative analysis of three different techniques for the detection of breast cancer cells in bone marrow. *Cancer.* 1991 Feb 15;67(4):1033-6.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human Zytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 1982 Nov;31(1):11-24.

Müller P, Weckermann D, Riethmüller G, Schlimok G. Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996 May;88(1):8-16.

Naume B, Borgen E, Beiske K, Herstad TK, Ravnas G, Renolen A, Trachsel S, Thrane-Steen K, Funderud S, Kvalheim G. Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood. *J Hematother.* 1997 Apr;6(2):103-14.

Naume B, Borgen E, Nesland JM, Beiske K, Gilen E, Renolen A, Ravnas G, Qvist H, Karesen R, Kvalheim G. Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone-marrow/peripheral-blood stem-cell products from breast-cancer patients by negative immunomagnetic separation. *Int J Cancer.* 1998 Nov 23;78(5):556-60.

Nishizaki T, DeVries S, Chew K, Goodson WH 3rd, Ljung BM, Thor A, Waldman FM. Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: direct comparison using modified comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997 Aug;19(4):267-72.

Osborne MP, Asina S, Wong GY, Old LJ, Cote RJ. Immunofluorescent monoclonal antibody detection of breast cancer in bone marrow: sensitivity in a model system. *Cancer Res.* 1989 May 1;49(9):2510-3.

O'sullivan GC, Sheehan D, Clarke A, Stuart R, Kelly J, Kiely MD, Walsh T, Collins JK, Shanahan F. Micrometastases in esophagogastric cancer: high detection rate in resected rib segments. *Gastroenterology.* 1999 Mar;116(3):543-8.

Otte M, Deppert K, Ebel S, Hosch SB, Jaenicke F, Izbicki JR, Pantel K. Immunomagnetic enrichment of disseminated tumor cells from bone marrow of carcinoma patients. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2000, 41:390.

Overgaard M, Hansen PS, Overgaard J, Rose C, Andersson M, Bach F, Kjaer M, Gadeberg CC, Mouridsen HT, Jensen MB, Zedeler K. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *N Engl J Med.* 1997 Oct 2;337(14):949-55.

Paget S. The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet* 1889;1:571-3.

Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, Backmann R, Funke I, Riethmuller G. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 1991 Sep 1;51(17):4712-5.

Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Sep 1;85(17):1419-24.

Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Weckermann D, Schmaus W, Gath H, Passlick B, Izbicki JR, Riethmuller G. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother.* 1994 Fall;3(3):165-73.

Pantel K, Dickmanns A, Zippelius A, Klein C, Shi J, Hoechtlen-Vollmar W, Schlimok G, Weckermann D, Oberneder R, Fanning E, et al. Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Aug 2;87(15):1162-8.

Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, Riethmuller G. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet.* 1996 Mar 9;347(9002):649-53.

Pantel K, von Knebel Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmuller G. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and strategies. *Chirurg.* 1997 Dec;68(12):1241-50.

Partridge M, Phillips E, Francis R, Li SR. Immunomagnetic separation for enrichment and sensitive detection of disseminated tumour cells in patients with head and neck SCC. *J Pathol.* 1999 Nov;189(3):368-77.

Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol*. 1998 Aug;16(8):2659-71.

Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*. 1995 Jan 1;19(1):10-26.

Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer*, 83, 18-29 (1999). *Int J Cancer*. 1999 Dec 10;83(6):870-873.

Porro G, Menard S, Tagliabue E, Orefice S, Salvadori B, Squicciarini P, Andreola S, Rilke F, Colnaghi MI. Monoclonal antibody detection of carcinoma cells in bone marrow biopsy specimens from breast cancer patients. *Cancer*. 1988 Jun 15;61(12):2407-11.

Poston RN, Sidhu YS. Diagnosing tumours on routine surgical sections by immunohistochemistry: use of Zytokeratin, common leucocyte, and other markers. *J Clin Pathol*. 1986 May;39(5):514-23.

Putz E, Witter K, Offner S, Stosiek P, Zippelius A, Johnson J, Zahn R, Riethmuller G, Pantel K. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res*. 1999 Jan 1;59(1):241-8.

Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW, Uhr JW. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4589-94.

Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ, et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet*. 1983 Dec 3;2(8362):1271-4.

Ridell B, Landys K. Incidence and histopathology of metastases of mammary carcinoma in biopsies from the posterior iliac crest. *Cancer*. 1979 Nov;44(5):1782-8.

Ried T, Liyanage M, du Manoir S, Heselmeyer K, Auer G, Macville M, Schrock E. Tumor cytogenetics revisited: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J Mol Med*. 1997 Nov-Dec;75(11-12):801-14.

Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, Tallman MS, Kennedy MJ, Davidson NE, Sweet D, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood*. 1993 Nov 1;82(9):2605-10.

Rye PD, Hoifodt HK, Overli GE, Fodstad O. Immunobead filtration: a novel approach for the isolation and propagation of tumor cells. *Am J Pathol*. 1997 Jan;150(1):99-106.

Salvadori B, Squicciarini P, Rovini D, Orefice S, Andreola S, Rilke F, Barletta L, Menard S, Colnaghi MI. Use of monoclonal antibody MBr1 to detect micrometastases in bone marrow specimens of breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 1990;26(8):865-7.

Sanchez-Céspedes M, Cairns P, Jen J, Sidransky D. Degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR): evaluation of its reliability for screening of genetic alterations in neoplasia. *Biotechniques*. 1998 Dec;25(6):1036-8.

Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*. 2001 Oct;23(10):912-23.

Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, et al. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-Zytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(23):8672-6.

Schrenk P, Rieger R, Shamiyeh A, Wayand W. Morbidity following sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection for patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2000 Feb 1;88(3):608-14.

Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*. 1996 Jul 26;273(5274):494-7.

Schütze K, Clement-Sengewald A. Catch and move--cut or fuse. *Nature*. 1994 Apr 14;368(6472):667-9.

Schütze K, Lahr G. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol*. 1998 Aug;16(8):737-42.

Sharp JG, Kessinger A, Mann S, Crouse DA, Armitage JO, Bierman P, Weisenburger DD. Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvest. *J Clin Oncol*. 1996 Jan;14(1):214-9.

Sikut R, Zhang K, Baeckstrom D, Hansson GC. Distinct sub-populations of carcinoma-associated MUC1 mucins as detected by the monoclonal antibody 9H8 and antibodies against the sialyl-Lewis a and sialyl-Lewis x epitopes in the circulation of breast-cancer patients. *Int J Cancer*. 1996 May 29;66(5):617-23.

Singletary SE, Larry L, Tucker SL, Spitzer G. Detection of micrometastatic tumor cells in bone marrow of breast carcinomapatients. *J Surg Oncol*. 1991 May;47(1):32-6.

Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, Breit E, Scheunemann P, Heumos I, Pichlmeier U, Schlimok G, Oberneder R, Kollermann MW, Kollermann J, Speicher MR, Pantel K. Heterogeneous proliferative Potenzial of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 19;99(4):2246-2251.

Speicher MR, du Manoir S, Schrock E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T. Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet*. 1993 Nov;2(11):1907-14.

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet.* 1996 Apr;12(4):368-75.

Srinivasan R. Ablation of polymers and biological tissue by ultraviolet lasers. *Science.* 1986 Oct 31;234(4776):559-65.

Stigbrand T, Andres C, Bellanger L, Bishr Omary M, Bodenmuller H, Bonfrer H, Brundell J, Einarsson R, Erlandsson A, Johansson A, Leca JF, Levi M, Meier T, Nap M, Nustad K, Seguin P, Sjodin A, Sundstrom B, van Dalen A, Wiebelhaus E, Wiklund B, Arlestig L, Hilgers J. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against Zytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumour Biol.* 1998;19(2):132-52.

Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Moss F, Beverley P. Monoclonal antibodies to epithelial membrane antigen and human milk fat globule mucin define epitopes expressed on other molecules. *Lancet.* 1985 Feb 23;1(8426):458.

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics.* 1992 Jul;13(3):718-25.

Thomas P, Battifora H. Keratins versus epithelial membrane antigen in tumor diagnosis: an immunohistochemical comparison of five monoclonal antibodies. *Hum Pathol.* 1987 Jul;18(7):728-34.

Thor A, Viglione MJ, Ohuchi N, Simpson J, Steis R, Cousar J, Lippman M, Kufe DW, Schlom J. Comparison of monoclonal antibodies for the detection of occult breast carcinoma metastases in bone marrow. *Breast Cancer Res Treat.* 1988 May;11(2):133-45.

Traweek ST, Liu J, Battifora H. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 1993 Apr;142(4):1111-8.

Uhr JW, Scheuermann RH, Street NE, Vitetta ES. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. *Nat Med.* 1997 May;3(5):505-9.

Untch M, Kahlert S, Funke I, Boettcher B, Konecny G, Nestle-Kraemling C, Bauerfeind I (1999) Detektion of Zytokeratin 18-positive cells in bone marrow of breast cancer patients: no prediction of bad outcome. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 18:639a.

Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, Banfi A, Clemente C, De Lena M, Gallus G, Greco M, Luini A, Marubini E, Muscolino G, Rilke F, Salvadori B, Zecchini A, Zucali R. Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. *N Engl J Med.* 1981 Jul 2;305(1):6-11.

Veronesi U, Volterrani F, Luini A, Saccozzi R, Del Vecchio M, Zucali R, Galimberti V, Rasponi A, Di Re E, Squicciarini P, et al. Quadrantectomy versus lumpectomy for small size breast cancer. *Eur J Cancer.* 1990;26(6):671-3.

Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 1998 Feb;4(2):343-8.

Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res.* 1999 Feb 15;27(4):1214-8.

Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jul 1;89(13):5847-51.

Zhong XY, Kaul S, Lin YS, Eichler A, Bastert G. Sensitive detection of micrometastases in bone marrow from patients with breast cancer using immunomagnetic isolation of tumor cells in combination with reverse transcriptase/polymerase chain reaction for Zytokeratin-19. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000 Apr;126(4):212-8.

Zippelius A, Kufer P, Honold G, Kollermann MW, 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 Jul;15(7):2701-8.

## Danksagung

Herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel mir die Möglichkeit gegeben zu haben, die vorliegende Dissertation im Labor für molekulare Onkologie anzufertigen, für sein stets großes Interesse am Fortgang der experimentellen Arbeit und für die wertvollen Diskussionen und fachlichen Anregungen. Weiterhin bedanke ich mich für die in jeder Beziehung großzügige Unterstützung der Arbeit .

Dr. Marcus Otte danke ich für die monatelange, geduldige Betreuung, seine stete Bereitschaft zur kritischen Diskussion sowie die vielen hilfreichen Ratschläge zur Bewältigung der praktischen Tätigkeit.

Ebenfalls danken möchte ich dem Direktor der Frauenklinik, Herrn Prof. Dr. Fritz Jänicke, für sein großes Interesse an der Mikrometastasenforschung und allen seinen Patientinnen für die Bereitstellung der Knochenmarksbiopsien zur wissenschaftlichen Auswertung.

Von Anfang an wurde die Arbeit mitgetragen von der Hilfe und der großen fachlichen Kompetenz der technischen Assistentinnen: Cornelia Coith, Kati Böge, Katrin Baak und Antje Andreas. Ihnen allen sei mein herzlichster Dank ausgesprochen. Weiterhin bin ich Ute Wölfle für ihre tatkräftige Unterstützung, ihre vielen Hinweise und Verbesserungsvorschläge ganz besonders dankbar, ebenso Dr. Elisabeth Breit für die freundliche Zurverfügungstellung der Abbildung 3.16 A und B.

Für die vielen interessanten Gespräche und die gute Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe danke ich insbesondere Alice Hensen, Katharina Braun, Anne-Marie Evers und Can Karakas.

Für ein selbstloses Überlassen der MUC-1- und anti-Lewis<sup>y</sup>-Antikörper sowie der Zelllinie T47D danke ich Herrn Dr. Uwe Karsten vom MDC in Berlin. Bei Rainer Gangnus vom Institut für Humangenetik und Anthropologie der TU München bedanke ich mich für das Protokoll zur MseI-Adapter PCR.

Für die Mitbenutzung des PALM-Lasermikroskops möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Erbersdobler vom Institut für Pathologie bedanken, für die Zurverfügungstellung des CGH-Fluoreszenzmikroskopie-Systems bei Frau Dr. Dierlamm, Medizinische Klinik.

Nicht zuletzt möchte ich ganz herzlich meinen Eltern für ihre persönliche Teilnahme, die Ermutigungen und Geduld, die über schwere Zeiten hinweghalfen, danken und für ihre außerordentlich großzügige finanzielle Unterstützung, ohne die ein Doppelstudium der Biochemie und Medizin nicht denkbar gewesen wäre.

## Lebenslauf

Geboren am 5. November 1969 in Stuttgart

1976 - 1980 Grundschulbesuch in Sindelfingen und Dettenhausen im Schönbuch

1980 - 1989 Besuch des Kepler-Gymnasiums in Tübingen mit Abitur

1989 - 1990 Zivildienst im Karolinen Frauenstift Tübingen

1990 Beginn des Biochemiestudiums an der Freien Universität Berlin

1993 Vordiplom in Biochemie und  
Beginn des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin

1994 Research Fellow im Bereich Molecular Biology,  
Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

1995 - 1996 Research Assistant im Bereich Oncovirology, The Scripps Research  
Institute, San Diego, USA (Diplomarbeit in Biochemie)

1996 Diplomprüfung in Biochemie und  
1. Staatsexamen in Medizin

1998 2. Staatsexamen in Medizin

1998 - 1999 Praktisches Jahr im Medizinstudium: Chirurgie: St. Joseph-Krankenhaus,  
Berlin. Innere Medizin, Charite, Berlin. Gynäkologie/ Geburtshilfe: Charité,  
Berlin

1999 3. Staatsexamen in Medizin

2000 - 2001 Arzt im Praktikum im Fach Gynäkologie und Geburtshilfe am Universitäts-  
Klinikum Eppendorf, Hamburg; Anfertigung der Dissertation

seit 2001 Wissenschaftlicher Angestellter an der Frauenklinik des UKE, Hamburg

## **Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.