

**Genomische Charakterisierung von disseminierten
Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten
sowie Primärtumoren bei Patienten mit
Pankreaskarzinom**

**Ein Vergleich von hämatogener und lymphogener
Disseminierung**



Marco Petronio

Aus dem
Institut für Immunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

**Genomische Charakterisierung von disseminierten
Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten
sowie Primärtumoren bei Patienten mit
Pankreaskarzinom**

**Ein Vergleich von hämatogener und lymphogener
Disseminierung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marco Petronio
aus Singapur
München 2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Klein
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joachim-Ulrich Walther
Mitberichterstatter: PD. Dr. med. Michaela Feuring-Buske
Prof. Dr. med. Christiane J. Bruns

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11. März 2010

Meiner Mutter
und
meiner Schwester

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	Das Pankreaskarzinom	9
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	9
1.1.2	Anatomie und Pathologie	10
1.1.3	Diagnostik und Staging	11
1.1.4	Therapie	13
1.1.5	Nachsorge	14
1.2	Molekulare Biologie des Pankreaskarzinoms	15
1.2.1	Progressionsmodell des duktales Adenokarzinoms	15
1.2.2	Häufig mutierte Gene	16
1.2.3	Chromosomale Instabilität und Heterogenität	16
1.3	Komparative genomische Hybridisierung	18
1.4	Disseminierung und minimale residuale Krebserkrankung	18
1.4.1	Definition	18
1.4.2	Prognostische Bedeutung der minimalen residualen Krebserkrankung	19
1.5	Zielsetzung der Arbeit	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Kooperationspartner	22
2.2	Methoden	22
2.2.1	Aufbereitung von Knochenmark und Lymphknoten mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.	22
2.2.2	Immunzytochemische Färbung und Isolation einzelner Tumorzellen	23
2.2.3	Hämatoxylinfärbung von Tumorgewebe und Laser-Mikrodissektion	24
2.2.4	Proteinase K-Verdau	25
2.2.5	Adapter-Linker-PCR	26
2.2.6	Markierungs-PCR	28
2.2.7	Kontroll-PCR und Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.8	Lymphozytenkultur zur Gewinnung von Metaphasenchromosomen	30
2.2.9	Präparation von Metaphasenchromosomen-Objektträgern	31
2.2.10	Vergleichende genomische Hybridisierung	31
2.2.11	Kumulative Histogramme der CGH-Profile	34
2.2.12	Statistische Berechnungen	35

2.2.13	Biomathematische Analysen.....	35
2.3	Materialien	36
2.4	Abkürzungen.....	38
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	Patienten.....	41
3.2	Immunzytochemischer Nachweis disseminierter Tumorzellen	41
3.2.1	Patientenkollektiv für die immunzytochemischen Untersuchungen	43
3.2.2	Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase Färbung	44
3.3	Isolation disseminierter Tumorzellen und Qualitätsprüfung der Adapter-Linker-PCR.....	47
3.4	Genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen.....	50
3.4.1	Patientenkollektiv für die CGH-Untersuchungen.....	52
3.4.2	Tumorzellen mit aberrantem oder balanciertem CGH-Profil.....	53
3.4.3	Anzahl der DNA-Gewinne und -Verluste von Primärtumoren und Tumorzellen	55
3.4.4	Numerische Aberrationen von Primärtumoren und Tumorzellen beim Adenokarzinom des Pankreas	57
3.4.5	Numerische Aberrationen der Tumorzellen bei intraduktaler papillär-muzinöser Neoplasie und neuroendokrinem Pankreastumor.....	70
4	DISKUSSION	71
4.1	Immunzytochemische Färbung	71
4.2	Genomische Charakterisierung.....	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	87
6	LITERATURVERZEICHNIS	89
7	DANKSAGUNG	94
8	ANHANG	95
9	LEBENS LAUF	141
10	PUBLIKATIONEN	142

1 EINLEITUNG

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Adenokarzinom des Pankreas stellt eine der aggressivsten Tumorerkrankungen des Menschen überhaupt dar. Im Jahr 2002 erkrankten in Deutschland 6600 Frauen und 6050 Männer an einem Pankreaskarzinom, wobei Inzidenz (Frauen: 8,8. Männer: 12,5) und Mortalität (Frauen: 8,8. Männer: 12,6) nahezu identisch sind. Bezogen auf die Krebstodesfälle steht damit das Pankreaskarzinom bei Frauen an der vierten, bei Männern an der fünften Stelle. Unbehandelt haben Patienten mit Pankreaskarzinom eine mittlere Überlebenszeit von nur drei Monaten, durch eine radikale Operation lässt sich diese auf zehn bis 20 Monate erhöhen. Insgesamt muss man von einer 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich drei bis vier Prozent ausgehen (RKI 2006). Entscheidend für die Prognose der Pankreaskarzinome sind die Ausdehnung des Primärtumors sowie der Lymphknotenstatus. Sie verschlechtert sich zum Beispiel bei mehr als drei befallenen Lymphknoten erheblich (Yeo, Hruban et al. 2002). Eine wesentlich bessere Prognose haben die Karzinome, die in der Region der Papilla Vateri wachsen. Dies hat seine Ursache zum einen in der früher auftretenden Symptomatik und somit schneller eingeleiteten Therapie, zum anderen mögen anatomische Gegebenheiten eine Rolle spielen, die eine spätere lymphogene und retroperitoneale Ausbreitung zur Folge haben. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt hier zwischen 30 und 80 Prozent.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 76 und für Männer bei 68 Jahren. Zigarettenrauchen gilt als sicherer Risikofaktor (relatives Risiko: 1,5-2,5), letztlich ungeklärt dagegen ist ein Zusammenhang mit chronischer Pankreatitis oder Diabetes mellitus. Eine fett- oder fleischreiche Ernährungsweise sowie Adipositas scheinen mit einem erhöhten Risiko einherzugehen. Andererseits sollen körperliche Aktivität, frisches Obst und Gemüse vorbeugend wirken. Weitere Faktoren bei der Entstehung eines Pankreaskarzinoms sind Strahlenexposition, der Zustand nach Magenteilresektion und die berufsbedingte Exposition gegen Chemikalien, wie chlorhaltige Lösungsmittel (RKI 2006). In einigen Fällen scheinen genetische Faktoren an der Entstehung eines Pankreaskarzinoms beteiligt zu sein. Fall-Kontroll-Studien belegen, dass Verwandte von Patienten mit sporadischem Pankreaskarzinom ein höheres Erkrankungsrisiko haben (Ghadirian, Liu et al. 2002). Auch familiäre Syndrome wie das Peutz-Jeghers Syndrom können mit gehäuftem Auftreten von Pankreaskarzinomen einhergehen (siehe Tabelle 1).

Intraduktale papillär-muzinöse und muzinös zystische Neoplasien sind sehr seltene Präkanzerosen, die in ein invasives Karzinom übergehen können. Wesentlich häufiger dagegen ist die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN). Man geht heute davon aus, dass sie die Vorstufe der meisten duktaalen Adenokarzinome darstellt (siehe 1.2.1).

Tabelle 1 Familiäre Syndrome und Keimbahnmutationen, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für ein Pankreaskarzinom einhergehen (Modifiziert nach (Yeo, Hruban et al. 2002))

Syndrom	Gen (Locus)	Erkrankungsrisiko
Peutz-Jeghers Syndrom	<i>STK11</i> (19p13)	130fach
Hereditäre Pankreatitis	<i>PRSS1</i> (7q35)	50fach
Naevusdysplasie Syndrom	<i>CDKN2A</i> (9p21)	12-20fach
Brust- und Ovarialkrebs Syndrom	<i>BRCA2</i> (13q12q13)	3,5-10fach

1.1.2 Anatomie und Pathologie

Das Pankreas ist ein retroperitoneal, im Oberbauch gelegenes Organ mit enger Nachbarschaftsbeziehung zu Leber, Niere, Duodenum, Mesenterialgefäßen und Milz. Funktionell werden zwei verschiedene Teile unterschieden, welche sich auch im histologischen Aufbau des Pankreas wiederfinden. Der endokrine Pankreasanteil, auch als Inselorgan bezeichnet, setzt sich aus 0,5 bis 2×10^6 sogenannten Langerhansschen Inseln zusammen. Es handelt sich dabei um verschiedene Drüsenzellen, die Glukagon, Insulin, Somatostatin und weitere gastrointestinale Hormone produzieren, welche unter anderem den Blutzuckerspiegel regulieren. Beim exokrinen Pankreasanteil handelt es sich um eine rein seröse Drüse, die dem Duodenum täglich etwa zwei Liter Flüssigkeit mit hochwirksamen Verdauungsenzymen zuleitet. Sie setzt sich aus den azinösen Endstücken, dem Produktionsort des Verdauungssekrets und dem Ductus pancreaticus zusammen, welcher das gesamte Organ durchzieht. Verbunden werden diese durch kurze, senkrecht in den Ductus pancreaticus einmündende Drüsengänge (Frick, Leonhardt et al. 1992).

Pankreastumore werden entsprechend ihrem Ursprungsgewebe in epitheliale, welche vom exokrinen Pankreasgewebe ausgehen, und in neuroendokrine Tumore unterteilt. Letztere, die vom endokrinen Pankreasgewebe ausgehen, nehmen mit 1-3% Häufigkeit nur eine untergeordnete Rolle ein. Die World Health Organisation (WHO) klassifiziert eine Vielzahl maligner und potentiell maligner Tumoren des Pankreas nach ihrer Morphologie. Unter den malignen Tumoren des exokrinen Pankreas ist das duktaale Adenokarzinom (80-85%) das weitaus häufigste (WHO 2002). Auf Vorschlag der WHO hin wird die Malignität des Pankreaskarzinoms nach einem dreistufigen System beurteilt (Grading), in das Differenzierung, Zahl der Mitosen und Kernmorphologie des zu beurteilenden

Gewebes eingehen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 Differenzierungsgrade des exokrinen Pankreasadenokarzinoms

Grad 1	Glanduläre Differenzierung, geringe Kernpolymorphie (≤ 5 Mitosen)
Grad 2	Mittelgradig differenzierte Strukturen, mittelgradige Kernpolymorphie (6-10 Mitosen)
Grad 3	Gering differenzierte Strukturen, hochgradige Kernpolymorphie (≥ 10 Mitosen)

Das Pankreaskarzinom befindet sich zu 70% im Pankreaskopf-, zu 20% im Korpus- und zu 10% im Schwanzbereich. Karzinome, die im Bereich der Pankreaspapille wachsen, werden als Karzinome der Papilla Vateri (CPV) zusammengefasst. Diese Karzinome haben ihren Ursprung im distalen Bereich des Ductus choledochus (Ampullo-biliäres Segment), des Ductus pancreaticus (Ampullo-pankreatisches Segment) oder im gemeinsamen Ausführungsgang beider. Des Weiteren werden Karzinome dazugezählt, die vom intestinalen Epithel des Duodenums der Ampulle ausgehen (Ampullo-duodenales Segment). Je nach Ursprung wird zwischen einem intestinalen und pankreatobiliären Typ unterschieden (Fischer and Zhou 2004). Sind die Tumoren dieser Region weit fortgeschritten, so kann es Schwierigkeiten bereiten, sie ihrem spezifischen Ursprungsorgan zuzuordnen.

Die Karzinome des Pankreas überschreiten frühzeitig die Organgrenze und infiltrieren das peripankreatische Gewebe. Prognostisch besonders ungünstig sind Lymphgefäß- oder Veneneinbrüche und eine perineurale Infiltration. Abhängig von der Tumorgroße sind bereits zum Zeitpunkt der Operation in über 50% der Fälle die regionalen Lymphknoten befallen. Metastasen befinden sich in zwei Drittel aller Fälle in der Leber, gefolgt von organfernen Lymphknotenmetastasen (20%) und Lungenmetastasen (Yeo, Hruban et al. 2002).

1.1.3 Diagnostik und Staging

Die meisten Pankreaskarzinome verursachen erst in fortgeschrittenen Stadien klinische Symptome. Häufige Anzeichen sind Schmerzen, Gewichtsabnahme, Ikterus und eine Glukoseintoleranz. Das Courvoisier-Zeichen (eine tastbar vergrößerte Gallenblase) wird vor allem bei Patienten mit einem Pankreaskopfkarzinom gefunden. Ein schmerzloser Ikterus kann als Frühsymptom auftreten, wenn Tumoren in dieser Region in unmittelbarer Nähe zum intrapankreatischen Abschnitt des Ductus choledochus wachsen und diesen obstruieren. Gelegentlich manifestiert sich ein Pankreaskarzinom durch den Verschluss des Ductus pancreaticus als akute Pankreatitis. Weitere Symptome wie rezidivierende Thrombosen, Aszites, Inappetenz oder Malabsorption können im Verlauf der Erkrankung auftreten. Die Papillenkarcinome haben dagegen eine typische Frühsymptomatik, die

durch die Abflussbehinderung des Gallen- und Pankreassekrets schon bei kleinen Tumoren verursacht wird. Diese setzt sich zusammen aus akuter Pankreatitis, Ikterus und kolikartigen Schmerzen und ermöglicht eine vergleichsweise frühe Diagnose.

Bei Lokalisation exokriner Pankreaskarzinome im Pankreaskörper oder -schwanz sind die Standardlaborparameter gewöhnlicher Weise im Normalbereich. Bei Pankreaskopf- und bei Papillenkarzinomen, insbesondere wenn der Patient sich mit einem Ikterus vorstellt, sind Leberwerte (AST, ALT, Bilirubin) und Cholestaseparameter (γ -GT, AP) oft erhöht. Zur Verlaufskontrolle ist der Tumormarker CA19-9 am besten geeignet (Ritts and Pitt 1998). Weitere Tumormarker sind CEA, CA50, CA195 und CA242.

Für die apparativen Untersuchungen stehen eine Reihe bildgebender Verfahren wie Sonographie, Röntgen, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Positronenemissionstomographie (PET) oder endoskopische retrograde Cholangiographie (ERCP) zur Verfügung. Die Methode der Wahl für Diagnose und Staging (siehe Tabelle 3) des Pankreaskarzinoms ist die hochauflösende Mehrzeilen-Computertomographie (Horton 2002). Die Untersuchung mit der MRT ist der CT zur Darstellung von kleinen Tumoren (kleiner 1 cm) und beteiligter umliegender Strukturen überlegen, aber kostenintensiver. Die PET wird aus demselben Grund und wegen ihrer eingeschränkten Verfügbarkeit nur selten eingesetzt, liefert aber zum Beispiel bei der Erkennung von Metastasen oder zur Einschätzung der Malignität des Tumors ergänzende, für die Diagnostik relevante Informationen (Alazraki 2002) (Saisho and Yamaguchi 2004). Alternativ dazu kann bei unklarem Befund die Endoskopie oder eine Laparoskopie eingesetzt werden, welche zusätzlich die Möglichkeit einer Gewebeentnahme bieten. Eine Biopsie kann auch mittels Feinnadelpunktion unter sonographischer oder CT-Kontrolle erfolgen, allerdings ist eine zytologische oder histologische Untersuchung des Tumorgewebes bei operablen Karzinomen nicht erforderlich. Bei fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen dagegen sollte die Diagnose vor Therapiebeginn durch eine Punktion des Tumorgewebes abgesichert werden. Von einer rein diagnostischen ERCP wird mit Ausnahme der Abklärung von Papillenprozessen abgesehen. Therapeutisch dagegen kann sie präoperativ oder palliativ zur Einlage von Stents bei einer Abflussbehinderung von Galle- oder Pankreassekret eingesetzt werden (Pisters, Hudec et al. 2001) (Bruns, Diebold et al. 2006).

Tabelle 3 TNM-Klassifikation exokriner Pankreasadenokarzinome (nach UICC 2002)

T Primärtumor	
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor begrenzt auf Pankreas, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor breitet sich jenseits des Pankreas aus, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden

N Regionäre Lymphknoten	
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

M Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

1.1.4 Therapie

Patienten mit einem Pankreaskarzinom werden für eine angemessene Therapieplanung nach der Ausdehnung ihrer Erkrankung eingeteilt. Es wird zwischen operablem, lokal begrenztem und nicht operablem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreaskarzinom unterschieden.

Operation

Lediglich 10-30% der Adenokarzinome des Pankreas sind resektabel. Im Gegensatz dazu liegt die Resektionsrate für Papillenkarcinome bei über 90%. Das operative Vorgehen ist abhängig von Lokalisation und Größe des Tumors. Das klassische Verfahren bei Pankreaskopf- und größeren Papillenkarcinomen ist die partielle Duodenopankreatektomie (nach Kausch-Whipple). Alternativ dazu wird bei kleineren Tumoren pylorus-erhaltend operiert (nach Traverso-Longmire). Bei Karzinomen im Pankreaskörper und -schwanz ist die distale Pankreatektomie mit Splenektomie das Operationsverfahren der Wahl. Palliative Operationsverfahren sind bei Obstruktion des Ductus choledochus, des Duodenums, bei tumorassoziierten Schmerzen und zur Verbesserung der Lebensqualität indiziert. Sie kommen zur Anwendung, wenn nichtoperative Verfahren versagen oder wenn sich im Rahmen einer potentiell kurativen Laparotomie herausstellt, dass der Tumor nicht resektabel ist (Alexakis, Halloran et al. 2004).

Radiochemotherapie

Mit dem präoperativen Einsatz der Chemo- oder Radiochemotherapie (neoadjuvante Therapie) wird eine Verkleinerung der Tumormasse erreicht und die Operabilität verbessert. Dadurch wird es möglich, einen Teil der Patienten mit lokal fortgeschrittenem Karzinom operativ zu therapieren und ihr Überleben zu verlängern (Rau, Wichmann et al. 2002). Radiochemotherapie wie auch alleinige Chemotherapie kommen postoperativ (adjuvante Therapie), bei nicht operablen Tumoren oder als rein palliative Maßnahme zum Einsatz. Als Standardtherapie gilt die alleinige Chemotherapie mit 5-Fluorouracil oder eine Kombination mit Bestrahlung (je nach Tumorstadium und Allgemeinzustand des Patienten) (Bruns, Diebold et al. 2006). Trotz zahlreicher Studien mit unterschiedlichen Substanzen und deren Kombinationen konnten über einen langen Zeitraum keine entscheidenden Fortschritte erzielt werden. Eine Alternative stellt heute die Therapie mit Gemcitabin dar. Im Vergleich zur Therapie mit 5-Fluorouracil wird eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit bei metastasiertem (Rothenberg, Moore et al. 1996) (Burris, Moore et al. 1997) oder lokal fortgeschrittenem, inoperablem Pankreaskarzinom erreicht (Li, Chao et al. 2003). Gemcitabin wirkt zudem strahlensensibilisierend und die Kombination mit Cisplatin und Bestrahlung erscheint vielversprechend (Wilkowski, Thoma et al. 2004). Derzeit wird in einer Reihe klinischer Studien untersucht, ob durch Kombination und/oder alleinigen Einsatz verschiedener Chemotherapeutika (z.B. Docetaxel, Cisplatin, Irinotecan, Mitomycin C, Oxaliplatin) und Strahlentherapie eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden kann. Einige Ansätze zeigen geringfügige Verbesserungen, doch bleibt die Therapie des Pankreaskarzinoms bis heute eine große Herausforderung (Stieler and Oettle 2005) (Bruns, Diebold et al. 2006).

1.1.5 Nachsorge

Trotz aller Bemühungen sind Therapieerfolge beim Pankreaskarzinom gering. Es bestehen keine kurativ-therapeutischen Ansätze für Rezidive und das Auftreten von lokalen oder Fernmetastasen stellt keine Indikation für ein operatives Vorgehen dar. Die Nachsorge beschränkt sich aus diesem Grund auf frühzeitige Erkennung und Behandlung sekundärer Folgen wie Tumorkachexie, Schmerzbehandlung oder Pankreasinsuffizienz. In der Regel finden Nachsorgeuntersuchungen im Abstand von ein bis mehreren Monaten statt. Häufigkeit, Art und Umfang der Nachsorge sollten auf die jeweilige Situation und den Krankheitsverlauf abgestimmt werden und besteht aus Anamnese, klinischer Untersuchung, Gewichtskontrolle und Labor. Bei entsprechenden Beschwerden wird mit Abdomensonographie, CT und Röntgen-Thorax nach einem Lokalrezidiv oder Metastasen gesucht. Bei positivem Befund stehen palliative Maßnahmen im Vordergrund.

1.2 Molekulare Biologie des Pankreaskarzinoms

1.2.1 Progressionsmodell des duktales Adenokarzinoms

Es ist allgemein anerkannt, dass epitheliale Zellen des Pankreasgangs den Ursprung duktales Adenokarzinome darstellen. Bei Patienten mit Adenokarzinomen finden sich neben den malignen Veränderungen abnormale duktales Strukturen (Cubilla and Fitzgerald 1976), die heute als pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN Grad-1 bis -3) bezeichnet werden (Hruban, Adsay et al. 2001). Eine Reihe von Studien und Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass es sich hierbei um Vorstufen handelt, die zunehmend entarten und in ein Karzinom übergehen können. Bei einigen Patienten konnte im Krankheitsverlauf zuerst eine PanIN und anschließend ein Pankreaskarzinom beobachtet werden (Brat, Lillemoe et al. 1998). Mit zunehmendem Grad der Neoplasie erhöht sich die Proliferationsrate (Klein, Hruban et al. 2002) und PanINs zeigen Mutationsprofile, die ebenso in duktales Adenokarzinomen anzutreffen sind. Häufig involviert sind zum Beispiel die Gene *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* und *SMAD4*. Ebenso erhöht sich die Anzahl der betroffenen Gene mit zunehmender Progression und es lassen sich typische Veränderungen den Stadien PanIN-1 bis -3 zuordnen (Moskaluk, Hruban et al. 1997) (Yamano, Fujii et al. 2000) (Wilentz, Iacobuzio-Donahue et al. 2000) (Luttges, Galehdari et al. 2001). Die Ergebnisse dieser und weitere Arbeiten an PanINs und Adenokarzinomen sind folgend im genetischen Progressionsmodell für das duktales Pankreaskarzinom zusammengefasst (siehe Abbildung 1).

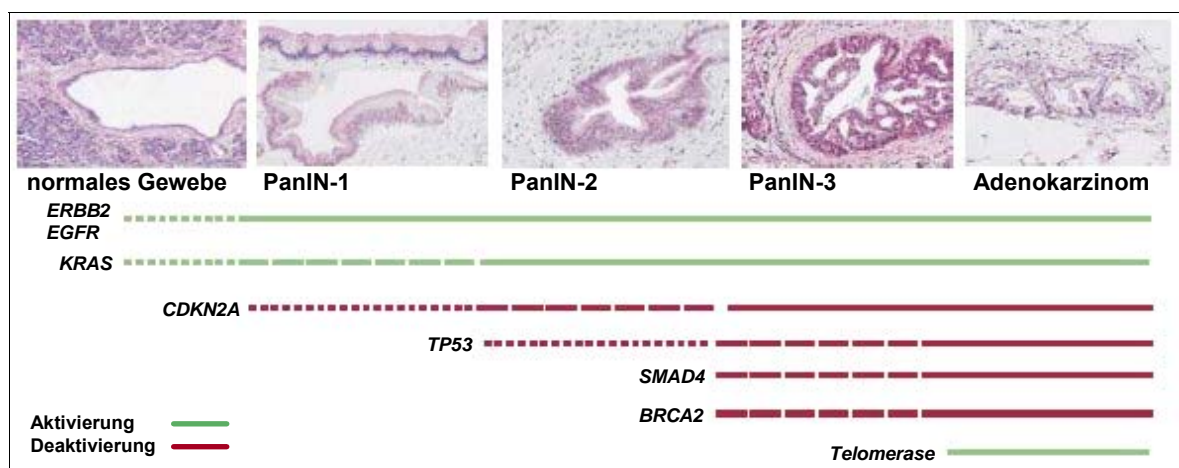


Abbildung 1 Genetisches Progressionsmodell des duktales Adenokarzinoms (modifiziert nach Bardeesy, 2002)

Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) scheinen Vorstufen des duktales Adenokarzinoms zu repräsentieren. Genetische Veränderungen, die typisch für Karzinome des Pankreas sind, können den verschiedenen Graden der PanINs zugeordnet werden.

1.2.2 Häufig mutierte Gene

Das Pankreaskarzinom ist eine Erkrankung, welche aus einer Akkumulation erworbener Mutationen resultiert. Die beteiligten Gene lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Onko- und Tumorsuppressorgene. Der Übersicht halber sind die am häufigsten beteiligten Gene mit ihrer Lokalisation und Häufigkeit in Tabelle 4 aufgelistet (Li, Xie et al. 2004). Eine sehr oft anzutreffende Mutation in Pankreaskarzinomen ist die aktivierende Punktmutation des Codons 12 im *KRAS* Onkogen, die ein frühes Ereignis in der Progression duktaler Adenokarzinome darstellt (Almoguera, Shibata et al. 1988). Mutationen in anderen Abschnitten des Gens sind dagegen sehr selten (Hruban, van Mansfeld et al. 1993). Es wird diskutiert, ob der Nachweis dieser Punktmutation zum Beispiel in DNA-Analysen des Pankreassafts neue Ansätze zur Früherkennung des Pankreaskarzinoms bietet (Boadas, Mora et al. 2001).

Tabelle 4 Häufig veränderte Gene beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas (modifiziert nach Li, 2004)

Onkogene	Lokalisation	relative Häufigkeit
<i>KRAS</i>	12p	75-100%
<i>ERBB2</i>	17q	65-70%
<i>AKT2</i>	19q	10-20%
<i>MYB</i>	6q	10%
Tumorsuppressorgene	Lokalisation	relative Häufigkeit
<i>FHIT</i>	3p	66-70%
<i>SMAD4</i>	18q	50-55%
<i>TP53</i>	17p	40-75%
<i>CDKN2A</i>	9p	27-98%
<i>IL23A</i>	9p	27-82%
<i>CDKN2B</i>	9p	27-48%
<i>BRCA2</i>	13q	7-10%
<i>RBI</i>	13q	0-10%

1.2.3 Chromosomale Instabilität und Heterogenität

Viele humane Karzinome, wie auch das Pankreaskarzinom, werden im Rahmen ihrer Progression chromosomal instabil (Mitelman, Johansson et al. 1994). Diese Instabilität führt zu Veränderungen des Karyotyps, welche von Verlusten oder Gewinnen einzelner Chromosomen oder chromosomaler Regionen gekennzeichnet sind. Diese numerischen Aberrationen werden zum Beispiel mit der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH, siehe 1.3) detektiert. In der Literatur finden sich einige Studien, die Primärtumoren von Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom oder Pankreaskarzinom-Zelllinien mit der CGH auf numerische Aberrationen hin untersuchten, doch ist dieser Tumor bei Weitem nicht so gut erforscht wie zum Beispiel Mamma- oder Kolonkarzinome. Die publizierten

Daten zählen eine Vielzahl numerischer Aberrationen auf. Einige werden wiederholt beschrieben, wie zum Beispiel DNA-Gewinne auf 7, 8q und 20q oder DNA-Verluste auf 8p, 17p und 18q. Dennoch lässt sich feststellen, dass Pankreaskarzinome in ihren Veränderungen sehr heterogen sind. Diese Heterogenität wird nicht nur zwischen Tumoren von verschiedenen Patienten aufgedeckt, sie besteht auch innerhalb eines Tumors beziehungsweise zwischen gleichzeitig untersuchten Karzinomen und Vorstufen desselben Patienten (Mahlamaki, Hoglund et al. 1997) (Schleger, Arens et al. 2000) (Chang, Chang et al. 2005) (Harada, Okita et al. 2002a) (Harada, Okita et al. 2002b) (Kitoh, Ryozaawa et al. 2005). In Tabelle 5 am Ende dieses Kapitels sind die häufigsten numerischen Aberrationen beim Adenokarzinom des Pankreas aufgelistet, die aus der Literatur in einer Online-CGH-Datenbank zusammengetragen wurden (Baudis and Cleary 2001) (Die Tabelle entspricht dem Stand der Datenbank im Frühjahr 2007).

Untersuchungen mit weiteren Methoden machen die Heterogenität von Pankreaskarzinomen und ihren Vorstufen ebenfalls sichtbar. Beispielsweise wurden durch Karyotypisierung mittels G-Bänderung 54 verschiedene Zellklone (Gorunova, Johansson et al. 1995) oder durch LOH-Analysen der Gene *CDKN2A*, *TP53* oder *SMAD4* multiple genetische Alterationen innerhalb des Primärtumors eines Patienten (Heinmoller, Dietmaier et al. 2000) identifiziert. LOH-Analysen zeigten genetische Heterogenität auch in PanINs (Yamano, Fujii et al. 2000). Es ist leicht vorstellbar, dass sich Adenokarzinome aus der klonalen Selektion einer besonders aggressiven Variante innerhalb der Vorstufen entwickeln. Auch kann der mangelnde Erfolg einer Radiochemotherapie in der Heterogenität des Pankreaskarzinoms und dem Überleben therapieresistenter Klone begründet sein.

Tabelle 5 Die relative Häufigkeit numerischer Aberrationen von Primärtumoren beim Adenokarzinom des Pankreas (Online-CGH-Datenbank, Stand Frühjahr 2007, 97 Fälle, Webadresse: <http://www.progenetix.de>)

Chromosom	DNA-Gewinn	Chromosom	DNA-Verlust
20q	27%	18q	36%
8q	22%	17p	21%
7p	20%	9p	20%
3q	18%	8p	18%
12p	18%	13q	18%
17q	18%	21q	18%
7q	17%	6q	16%
11q	14%	3p	14%
14q	14%	10q	14%
5p	13%	4q	12%

1.3 Komparative genomische Hybridisierung

Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) ist eine Methode, mit der numerische Aberrationen nachgewiesen werden. Sie ermöglicht die komplette Analyse des Genoms von Tumorgewebe oder einzelner Tumorzellen und detektiert zuverlässig DNA-Gewinne oder -Verluste mit einer Auflösung von 10-20 Mb. Es handelt sich um ein Anfang der 90er Jahre etabliertes Verfahren, in dem unterschiedlich markierte DNA solider Tumoren oder von Tumorzelllinien einerseits und normale Referenz-DNA andererseits zusammen auf humane Metaphasen eines gesunden Spenders hybridisieren (Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1992) (du Manoir, Speicher et al. 1993) (Speicher, du Manoir et al. 1993). Nach der Basenpaarung werden die Tumor- und Referenz-DNA mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen und mit Hilfe entsprechender Fluoreszenzfilter fotografiert. Spezielle Softwareprogramme vergleichen diese digitalen Aufnahmen miteinander, berechnen Intensitätsunterschiede zwischen Tumor- und Referenz-Probe und stellen diese graphisch dar. Auf diese Weise werden DNA-Gewinne oder -Verluste des Tumors sichtbar gemacht.

Durch die Entwicklung neuer PCR-Techniken ist es möglich, sowohl das Genom einzelner disseminierter Tumorzellen (DTZ) auf numerische Aberrationen hin zu untersuchen (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999) als auch sehr geringe DNA-Mengen von soliden Tumoren als Ausgangsmaterial der CGH-Untersuchungen zu verwenden (Stoecklein, Erbersdobler et al. 2002).

1.4 Disseminierung und minimale residuale Krebserkrankung

1.4.1 Definition

Unter Disseminierung versteht man die Streuung einzelner Tumorzellen im Verlauf einer Krebserkrankung. Der Begriff der „minimalen residualen Krebserkrankung“ (MRD) bezeichnet den Verbleib disseminierter Tumorzellen (DTZ) im Körper eines Krebspatienten nach einer Primärtherapie ohne Nachweis manifester Metastasen. Dieser Begriff, der zuerst bei malignen hämatologischen Neoplasien zur Anwendung kam, wurde im Laufe der 80er Jahre auf solide Tumoren übertragen. Damals wurden zum ersten Mal disseminierte Zellen epithelialen Ursprungs im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom nachgewiesen (Dearnaley, Sloane et al. 1981) (Mansi, Berger et al. 1987). Der Nachweis solcher Zellen gelingt mittels immunzytochemischer Färbung von

epithelialen Markern, welche die Zellen der untersuchten mesenchymalen Indikatororgane für Disseminierung (Knochenmark, Blut oder Lymphknoten) nicht oder nur sehr selten exprimieren. In den Färbungen werden häufig monoklonale Antikörper gegen epitheliale Zytoskelettbestandteile oder das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM verwendet (Schlimok, Funke et al. 1987) (Pantel, Schlimok et al. 1994b).

1.4.2 Prognostische Bedeutung der minimalen residualen Krebserkrankung

Inzwischen wurde für verschiedene solide Tumoren gezeigt, dass DTZ nach Operation und adjuvanter Therapie im Körper vorliegen können und dass sich damit das Gesamtüberleben betroffener Patienten verschlechtert (Pantel, Cote et al. 1999). Zum Beispiel wurde in immunzytochemischen Studien eine prognostische Relevanz DTZ im Knochenmark beziehungsweise Lymphknoten beim Mamma- (Mansi, Berger et al. 1987) (Pantel, Felber et al. 1994a) (Braun, Pantel et al. 2000), Bronchial- (Kubuschok, Passlick et al. 1999), Magen- (Heiss, Simon et al. 2002), Kolon- (Liefers, Cleton-Jansen et al. 1998), Ösophagus- (Izbicki, Hosch et al. 1997) und Zervixkarzinom (Janni, Hepp et al. 2003) nachgewiesen. Eine Metaanalyse der Überlebensdaten von 4703 Patienten mit Mammakarzinom unterstreicht die prognostische Bedeutung der MRD. Es wurde evaluiert, dass die Prognose von Patienten mit DTZ im Knochenmark zum Zeitpunkt der Diagnose signifikant schlechter war im Vergleich zu Patienten ohne (Braun, Vogl et al. 2005).

Auch für das Pankreaskarzinom gibt es Daten, welche diesen Zusammenhang belegen. Es wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von DTZ in der Peritonealhöhle mit einem schlechteren Gesamtüberleben korreliert (Vogel, Kruger et al. 1999). In der gleichen Studie wurde bei Patienten, deren Knochenmark positiv auf DTZ gescreent wurde, ein starker Trend zur schlechteren Prognose festgestellt. Bei der Verwendung von fünf verschiedenen monoklonalen Antikörpern wurde für Ra96-positive Zellen eine signifikante prognostische Relevanz festgestellt. Die Ergebnisse von Studien, welche mittels immunzytochemischer Färbung die prognostische Bedeutung DTZ untersuchen, sind demnach auch von der Art der zur Detektion eingesetzten Antikörper abhängig. Beim Pankreaskarzinom konnte eine prognostische Relevanz für Zytokeratin-positive Zellen, welche im Knochenmark mit dem monoklonalen Antikörper A45-B/B3 detektiert wurden, mehrfach bestätigt werden (Thorban, Roder et al. 1999) (Roder, Thorban et al. 1999) (Yekebas, Bogoevski et al. 2006). Der monoklonale Antikörper Ber-EP4 gegen das epitheliale Adhäsionsmolekül EpCAM wird für die immunzytochemische Detektion DTZ in Lymphknoten verwendet, da sich die Zytokeratinfärbung als zu unspezifisch erwies (Latza, Niedobitek et al. 1990) (Passlick, Izbicki et al. 1994). Auch für das

Pankreasadenokarzinom gibt es Daten, welche das Vorkommen EpCAM-positiver Zellen im Lymphknoten als unabhängigen prognostischen Faktor beschreiben (Hosch, Knoefel et al. 1997) (Bogoevski, Yekebas et al. 2004) (Yekebas, Bogoevski et al. 2006).

Mit verschiedenen Ansätzen wurde versucht, DTZ weitergehend zu analysieren. Ein Problem ist ihr seltenes Vorkommen im Knochenmark oder in Lymphknoten. Untersuchungen von Zellkulturen aus DTZ bieten eine Möglichkeit, dieser Schwierigkeit zu begegnen. Beispielsweise wurden in Zellkulturen Zytokeratin-positiver Zellen aus Knochenmarkproben von Patienten mit epithelialen Tumoren die Expression epithelialer und tumorassoziierter Gene aufgezeigt (Putz, Witter et al. 1999). Mutations- und FISH-Analysen wiesen Tumoreigenschaften in Kulturen EpCAM-positiver Zellen aus Lymphknoten von Patienten mit Ösophaguskarzinom nach. Die Zellen dieser Kultur hatten die Fähigkeit, in immundefizienten SCID-Mäusen Metastasen zu bilden (Hosch, Kraus et al. 2000). Eine weitere Möglichkeit, den neoplastischen Ursprung von DTZ zu belegen, bietet die direkte Analyse der detektierten Zellen. Zum Beispiel wurde mit der CGH bei Primärtumoren des Mammakarzinoms bekannte chromosomale Instabilität auch in entsprechenden Zytokeratin-positiven Zellen aus Knochenmarkproben nachgewiesen (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003). Ein ähnlicher Ansatz wurde bei der vorliegenden Doktorarbeit verfolgt, um DTZ von Patienten mit Pankreaskarzinom zu charakterisieren.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Gegenstand dieser Doktorarbeit war die genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen (DTZ) und der Vergleich von hämatogener mit lymphogener Disseminierung bei Patienten mit Pankreaskarzinom. Zuerst sollten DTZ anhand epithelialer Marker in Knochenmark-, Blut- und Lymphknotenproben identifiziert und ihre relative Häufigkeit bestimmt werden. Um einen weiteren Nachweis ihres neoplastischen Ursprungs zu erhalten, wurde die DNA solcher Zellen auf numerische Aberrationen hin untersucht, welche Ausdruck der häufig beim Pankreaskarzinom vorkommenden genomischen Instabilität sind. Von besonderem Interesse waren Anzahl und Art der Aberrationen von DTZ. Der zusätzliche Vergleich mit den chromosomalen Veränderungen des Primärtumorkollektivs sollte neue Einblicke erlauben, ob sich DTZ und Primärtumoren ähnlich sind, ob klonale Verwandtschaft besteht und charakteristische Veränderungen für hämatogen (H-DTZ) und lymphogen disseminierte Tumorzellen (L-DTZ) existieren.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in einer immunzytochemischen Färbung epithelialer Marker identifiziert, anschließend isoliert und ihre DNA amplifiziert. Die DNA Marker-positiver Zellen wie auch die der Primärtumoren wurde mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) auf numerische chromosomale Veränderungen hin untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Kooperationspartner

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Knochenmark-, Blut- und Lymphknotenproben wurden ebenso wie die pathohistologischen Daten von klinischen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Mitarbeiter der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) in Hamburg arbeiteten die Proben nach ihrer Gewinnung im Forschungslabor auf. Blut- und Knochenmarkproben wurden unmittelbar, Lymphknotenproben nach mechanischer Desintegration durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und somit die disseminierten Tumorzellen (DTZ) angereichert. Die entstandenen Einzelzellsuspensionen sedimentierten auf Adhäsionsobjektträger, die nach Trocknung zur weiteren Untersuchung in das Labor von Christoph A. Klein am Institut für Immunologie der LMU München gesandt wurden.

Die zytogenetischen Untersuchungen der Primärtumorproben führte Andreas M. Lübke im chirurgischen Forschungslabor am UKE in Hamburg durch und stellte mir die Ergebnisse der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) für die nachfolgenden Auswertungen zur Verfügung.

Tabelle 6 Kooperationspartner

Andreas M. Lübke Dr. med. Peter Scheunemann PD Dr. med. Emre F. Yekebas Prof. Dr. med. Stefan B. Hosch Prof. Dr. med. Jakob R. Izbicki	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie Martinistrasse 52 20246 Hamburg
--	---

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung von Knochenmark und Lymphknoten mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die präoperativ gewonnenen Knochenmarkaspirate (10 ml) und venösen Blutproben (5 ml) wurden mit Hank's Salzlösung im Verhältnis 1:1 in einem 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen aufgefüllt. Das Lymphknotengewebe aus dem Operationspräparat wurde in einer Petrischale präpariert und mit Nährmedium (RPMI1640) in der DAKO Medimaschine mechanisch zerkleinert und zur Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet. Die

Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und ebenfalls mit Hank's Salzlösung auf 30 ml aufgefüllt.

Die Falcon-Röhrchen wurden für 10 min bei 850 Upm zentrifugiert. Der Überstand der gewaschenen Proben wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 20 ml 1x PBS resuspendiert. In einem neuen 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen wurden 15-20 ml Ficoll vorgelegt, mit der Zellsuspension vorsichtig überschichtet, so dass zwei Phasen erkennbar waren und anschließend zentrifugiert (30 min bei 2050 Upm). Die Interphase, in der sich mit den mononukleären Zellen auch die DTZ anreicherten, wurde vorsichtig in ein neues Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt, dort mit 1x PBS auf 20 ml aufgefüllt und für 10 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 2 ml 1x PBS resuspendiert, bevor die Anzahl der gewonnenen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden konnte. Die Zellkonzentration wurde dann mit 1x PBS auf 1000 Zellen pro μl eingestellt. Anschließend wurden jeweils 500 μl mit $0,5 \times 10^6$ Zellen auf die beiden Auftragsstellen der Adhäsionsobjektträger gegeben. Die Zellen sedimentierten für eine Stunde, danach konnte das überständige PBS abgeschüttet werden und die Adhäsionsobjektträger trockneten über Nacht. Diese Objektträger, die den Ausgangspunkt der von mir durchgeführten Untersuchungen bildeten, wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert.

2.2.2 Immunzytochemische Färbung und Isolation einzelner Tumorzellen

Die DTZ sind epithelialen Ursprungs. Bei den Organen (Knochenmark, Blut oder Lymphknoten), in welchen nach ihnen gesucht wird, handelt es sich um mesenchymales Gewebe. Dieser Unterschied wurde bei der Detektion von DTZ durch den Einsatz monoklonaler Antikörper für solche Epitope genutzt, die exklusiv von epithelialen Zellen exprimiert werden. Zur Färbung der Knochenmark- und Blutproben wurde der Antikörper A45-B/B3 gegen ein gemeinsames Epitop der Zytokeratine 8, 18, 19 verwendet, zur Färbung der Lymphknotenproben wurde der Antikörper Ber-Ep4 gegen das Oberflächenmolekül EpCAM eingesetzt (beide monoklonale Antikörper stammen aus der Maus). Anschließend wurde über Antigen-Antikörperreaktionen ein Enzym-Immunkomplex aufgebaut, der die alkalische Phosphatase als Katalysator enthält. Mit Hilfe ihres Substratumsatzes färbten sich markierte epitheliale Zellen bläulich-violett.

APAAP-Färbung auf Adhäsionsobjektträgern

Vor Beginn der Färbung wurden die Adhäsionsobjektträger eine halbe Stunde bei Raumtemperatur liegen gelassen. Bei jeder Färbung kam als Positivkontrolle ein

Objektträger mit Zellen der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zum Einsatz. Als Negativkontrolle diente ein patienteneigenes Präparat und in der Färbung wurde anstelle der Primärantikörper A45-B/B3 oder Ber-Ep4 der Antikörper MOPC21 verwendet. Er ist vom gleichen Isotyp wie der Zytokeratin- beziehungsweise der EpCAM-Antikörper, bindet jedoch kein menschliches Epitop (IgG₁-Isotypkontrolle).

Nach Rehydrierung der Adhäsionsobjektträger in 1x PBS wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation mit 10% humanen AB-Serum für 20 min abgesättigt. Anschließend wurden die Objektträger für 45 min mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert (A45-B/B3: 2 µg/ml, Verdünnung 1:100 in 10% AB-Serum. Ber-Ep4: 5 µg/ml, Verdünnung 1:25. MOPC21: 2 µg/ml, Verdünnung 1:100). Mit Hilfe der spezifischen Bindung des Brücken- oder Sekundärantikörper Z259 (Inkubation für 30 min, 125 µg/ml, Verdünnung 1:20 in 10% AB-Serum) und des Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase-Komplexes (APAAP-Komplex) als Tertiärantikörper (Inkubation für 30 min, 1,5 µg/ml, Verdünnung 1:100 in 10% AB-Serum) wurde der Enzym-Immunkomplex aufgebaut. Nach jedem einzelnen Inkubationsschritt mit den verschiedenen Antikörpern wurde dreimal für 3 min mit 1x PBS gewaschen. Die enzymatische Entwicklung und Blaufärbung durch den Substratumsatz der alkalischen Phosphatase erfolgte während der Inkubation mit der Substratlösung BCIP/NBT für 20 min. Nach der Färbung wurden die Zellen für 10 min mit 1% PFA fixiert.

Isolation Marker-positiver Zellen

Die Objektträger mit den auf epithelialen Markern positiv gefärbten Zellen wurden vor der Isolation unter einem Invertmikroskop eingespannt und mit 0,5% Igepal-PBS überschichtet. Die Glaskapillare des Mikromanipulatorsystems wurde mit FCS benetzt und anschließend mit PBS gespült. Dadurch wurde ein Festkleben der Zelle an der Glaswand verhindert, nachdem die Zelle mit Hilfe der Glaskapillare von der Objektträgeroberfläche gelöst und aufgesaugt wurde. In der Kapillare wurde die isolierte Zelle in ein Feld eines 8-Feld-Objektträgers transferiert, das vorher aus dem gleichen Grund mit BSA benetzt und mit 0,5% Igepal-PBS überschichtet worden war. Aus diesem konnte die Zelle unter Sicht in 40facher Vergrößerung mit einer 2 µl Pipette aufgenommen und in ein 200 µl Reaktionsgefäß für die weiteren Schritte überführt werden.

2.2.3 Hämatoxylinfärbung von Tumorgewebe und Laser-Mikrodissektion

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchung der Primärtumoren diente in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden Schnitte mit der Stärke

von 5 µm angefertigt. Ein Teil der Schnitte wurde direkt auf herkömmliche Glasobjektträger aufgebracht. Vor dem Aufbringen des anderen Teils der Schnitte wurden Objektträger mit einer Polyethylenmembran (1,35 µm) beschichtet. Im Wechsel wurden aufeinanderfolgende Schnittebenen auf die unbeschichteten und beschichteten Objektträger geladen. Erstere dienten nach Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung als Orientierungshilfe zur Auswahl von Tumorarealen, die dann von den beschichteten Objektträgern mit Hilfe eines PALM-Laser-Microbeam-Systems mikrodisektiert wurden.

Die Objektträger mit Gewebeschnitten (beschichtete wie unbeschichtete) wurden zuerst mit 100% Xylol für 30 min deparaffinisiert. Nach einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol: 100%, 90%, 70% für jeweils 1 min) wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin (0,1%-Lösung für zwei Minuten) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Schnitte durch ein 5-minütiges Bad in Leitungswasser gebläut. Nur die unbeschichteten Objektträger färbte man mit Eosin (0,1%-Lösung) gegen. Dieser Schritt wurde bei den beschichteten Objektträgern ausgespart, da Eosin die Adapter-Linker-PCR in ihrer Ausbeute und Qualität negativ beeinflusst. Anschließend wurden die Objektträger mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Ethanol: 70%, 90%, 100% für jeweils 1 min). Die unbeschichteten, HE-gefärbten Objektträger wurden sofort nach Lufttrocknung mit Eukitt eingedeckelt, wohingegen die mit der Polyethylenmembran beschichteten Objektträger über Nacht bei 42°C trockneten.

Unter mikroskopischer Sicht wurden auf den beschichteten Objektträgern Areale markiert, die sich zuvor auf den HE-Objektträgern eindeutig als Tumorgewebe identifizieren ließen. Mit Hilfe des rechnergesteuerten Lasers wurde das Tumorgewebe ausgeschnitten (ca. 250000 µm²) und mittels eines Laserimpulses in einen PCR-Gefäßdeckel katapultiert. In den Deckel wurde ein Tropfen PCR-Öl vorgelegt, um die nachfolgende Zentrifugation (14000 Upm für 2 min) der Gewebeprobe auf den Grund eines 200 µl Reaktionsgefäßes zu erleichtern.

2.2.4 Proteinase K-Verdau

Durch einen Verdau zellulärer Proteine der Membranen, des Zytoplasmas und der Chromatinstruktur mit dem Enzym Proteinase K wurde die DNA der DTZ oder der Primärtumoren für die anschließenden molekulargenetischen Verfahren freigelegt und zugänglich gemacht. Der Proteinase K-Mix (siehe Tabelle 7) wurde in einem 200 µl Reaktionsgefäß vorgelegt, anschließend die Zelle oder das Tumorgewebe hinzugegeben. Der Verdau erfolgte in einer MJ-Research PCR-Maschine für die Tumorzelle 10 beziehungsweise für das Primärtumorgewebe 15 Stunden bei 42°C. Durch Erhitzen des

Ansatzes für 10 min auf 80°C wurde die Proteinase inaktiviert.

Tabelle 7 Reaktionsansatz: Proteinase K-Verdau

Ansatz Tumorzelle (2 µl)	
OnePhorAll plus Puffer	0,20 µl
Tween 10%	0,13 µl
Igepal 10%	0,13 µl
Proteinase K (10 mg/ml)	0,26 µl
H ₂ O	1,27 µl
Ansatz Primärtumor (4,5 µl)	
OnePhorAll plus Puffer	0,50 µl
Tween 10%	0,13 µl
Igepal 10%	0,13 µl
Proteinase K (10 mg/ml)	0,26 µl
H ₂ O	3,48 µl

2.2.5 Adapter-Linker-PCR

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des PCR-Verfahrens vorgestellt, welches die globale, quantitativ repräsentative Amplifikation der DNA einer einzelnen Zelle ermöglichte.

Restriktionsenzymverdau

Die zu amplifizierende DNA wurde zunächst einem Restriktionsenzymverdau mit *MseI* unterzogen, welches das Palindrom TTAA erkennt und DNA zwischen den beiden Thymidinbasen schneidet. So entstehen DNA-Fragmente mit einem TA-Überhang am 5'-Ende. Der Restriktionsenzymverdau wurde für 3 Stunden mit dem in Tabelle 8 aufgeführten Reaktionsansatz bei 37°C in der MJ-Research PCR-Maschine durchgeführt. Danach wurde das Enzym *MseI* für 5 min bei 65°C inaktiviert.

Tabelle 8 Reaktionsansatz: Restriktionsenzymverdau

Ansatz Tumorzelle (2 µl)	
OnePhorAll plus Puffer	0,20 µl
<i>MseI</i> (50000 U/µl)	0,20 µl
H ₂ O	1,60 µl
Ansatz Primärtumor (0,5 µl)	
<i>MseI</i> (50000 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O	0,25 µl

Preannealing

In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden aus den zwei Oligonukleotiden LIB1 und ddMse11 die sogenannten Adapter hergestellt (siehe Tabelle 9). Die Basenpaarung des Adapters wurde durch langsames Abkühlen in der PCR-Maschine nach einem programmierten Gradienten (von 65°C auf 15°C für jeweils 1 min pro Grad) erzielt. Der Adapter selbst hat einen Überhang von zwei Basen am 5'-Ende des ddMse11-Oligonukleotids, welcher komplementär zu dem der DNA-Fragmente ist. Durch die Basenpaarung der Überhänge werden LIB1-Primer und *MseI*-Fragmente zur Ligation aneinander gebracht.

Tabelle 9 Reaktionsansatz: Preannealing

OnePhorAll plus Puffer	0,50 µl
LIB1 Primer (100 µl)	0,50 µl
ddMse11 Primer (100 µl)	0,50 µl
H ₂ O	1,50 µl

Ligation

Im nächsten Schritt wurden 3 µl Adapter und die fragmentierte DNA aus dem *MseI*-Verdau zur Ligation des Primers zusammengebracht. Zusätzlich benötigte man jeweils 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U) und ATP (10 mM). Die Ligation des LIB1-Primers an die zu amplifizierende DNA erfolgte bei 15°C über Nacht in der MJ-Research PCR-Maschine. Aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am 3'-Ende des ddMse11-Primers wurde dieses Oligonukleotid nicht ligiert.

PCR-Amplifikation

Für das anschließende PCR-Verfahren wurden folgender Reaktionsansatz und das angegebene Programm in der MJ-Research PCR-Maschine verwendet (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11). Vor Beginn der eigentlichen PCR-Reaktion wurde das Reaktionsgemisch für 3 min auf 68°C erhitzt. Das ermöglichte zum einen die Dissoziation des Oligonukleotids ddMse11 des Adapters und zum anderen die Auffüllreaktion der komplementären Primerbindungsstelle am 3'-Ende der Primer-Fragmentstränge. Das Amplifikat der DNA einer einzelnen Zelle oder der Primärtumoren (primäres PCR-Produkt) wurden bei -20°C stabil gelagert und für weitergehende Analysen verwendet.

Tabelle 10 Reaktionsansatz: Adapter-Linker-PCR

Expand-Long-Template Puffer 1	3 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Expand-Long-Template PolMix (3,5 U/µl)	1 µl
H ₂ O	35 µl

Tabelle 11 Reaktionsschritte der Adapter-Linker-PCR (MJ-Research PCR-Maschine)

	Temperatur	Zeit
Füllreaktion	68°C	3 min
1. PCR-Zyklus: 15x	94°C	40 sec
	57°C	30 sec
	68°C	1 min 30 sec + 1 sec/Zyklus
	94°C	40 sec
2. PCR-Zyklus: 9x	57°C + 1°C/Zyklus	30 sec
	68°C	1 min 45 sec + 1 sec/Zyklus
	94°C	40 sec
	65°C	30 sec
3. PCR-Zyklus: 23x	68°C	1 min 53 sec + 1 sec/Zyklus
	68°C	3 min 40 sec
	4°C	∞
	Endreaktion	

2.2.6 Markierungs-PCR

In diesem Reamplifikationsverfahren wurden PCR-Produkte der Adapter-Linker-PCR in Anwesenheit von Desoxynukleotid-Derivaten unterschiedlich markiert. Für die Tumor-DNA wurde Digoxigenin-11-dUTP und für die Referenz-DNA (5 bis 10 normale diploide Zellen) Biotin-16-dUTP verwendet, die einen Teil der Thymidinbasen ersetzen (siehe Tabelle 12 und Tabelle 13). Dieser Schritt ermöglichte es, die Reamplifikate über geeignete Fluoreszenz-Detektionssysteme nach der Hybridisierung auf humanen Metaphasen nachzuweisen (siehe CGH 2.2.10).

Nach der Markierungs-PCR wurden die Primer (LIB1) durch einen Restriktionsenzymverdau mit einem Isoenzym von *MseI*, *TruI* (50 U/µl) entfernt. Dazu wurden 1 µl des Enzyms und 2 µl des Puffers R⁺ zum Reaktionsansatz hinzugefügt und dieser im Anschluss in einer MJ-Research PCR-Maschine für 3 Stunden bei 65°C inkubiert. Die Entfernung des Primers verhindert, dass DNA-Fragmente in der CGH aufgrund einer Paarung komplementärer Primerbindungssequenzen nicht mit den Metaphasenchromosomen hybridisierten.

Tabelle 12 Reaktionsansatz: Markierungs-PCR

Expand-Long-Template Puffer 1	4 μ l
LIB1 (10 μ M)	8 μ l
7/8 dNTP-Mix (dATP, dCTP und dGTP: 10 mM. dTTP: 8,75 mM)	1,50 μ l
Digoxigenin-dUTP bzw. Biotin-dUTP (1 mM)	1,75 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	24,25 μ l

+ 1 μ l des jeweiligen DNA-Amplifikats

Tabelle 13 Reaktionsschritte der Markierungs-PCR (MJ-Research PCR-Maschine)

	Temperatur	Zeit
1. PCR-Zyklus: 1x	94°C	1 min
	60°C	30 sec
	72°C	2 min
2. PCR-Zyklus: 11x	94°C	30 sec
	60°C	30 sec
	72°C	2 min + 20 sec/Zyklus
Endreaktion	4°C	∞

2.2.7 Kontroll-PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität der primären PCR-Produkte bzw. der markierten Reamplifikate wurde durch die Amplifikation einzelner DNA-Abschnitte (*Mse*I-Fragmente) mit Hilfe von spezifischen Primern überprüft. Es zeigte sich, dass der spezifische Nachweis eines der unten genannten DNA-Fragmente genügte, um eine erfolgreiche Hybridisierung in der CGH zu gewährleisten (siehe Tabelle 14 und Tabelle 15). Die erfolgreiche Amplifikation eines Fragments zeigte sich durch eine spezifische Bande in der Auftrennung des Kontroll-PCR-Produkts mittels einer Gelelektrophorese (1,5% Agarose, 45 min in 1x TBE-Puffer bei 160 V und 400 mA). Die zu testende Probe wurde zusammen mit 2 μ l Orange G und 1 μ l Sybr-Gold gemischt und in die Geltasche gegeben. Bei jeder Elektrophorese wurden zusätzlich eine Negativ- und eine Positivkontrolle sowie als Marker eine 1kb-Leiter (9 μ l mit 2 μ l Sybr) mit aufgetragen. Auf einem UV-Schirm wurden die Banden sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Rechner-gestützten Kamera aufgenommen. Die digitalen Abbildungen wurden als Bilddatei elektronisch gespeichert und/oder mittels eines Hitzedruckers ausgedruckt (siehe Abbildung 5).

Tabelle 14 Reaktionsansatz: Kontroll-PCR

PCR-Puffer: 10 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris (pH 8,5), 500 mM KCl, 1 mM dNTPs)	1 µl
3'-Primer	0,50 µl
5'-Primer	0,50 µl
BSA	0,25 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,10 µl
H ₂ O	7,75 µl
+ 0,5 µl des zu untersuchenden PCR-Pools	

Tabelle 15 Reaktionsschritte der Kontroll-PCR (MJ-Research PCR-Maschine)

	Temperatur	Zeit
1. PCR-Zyklus: 1x	94°C	2 min
	58°C	30 sec
	72°C	2 min
2. PCR-Zyklus: 15x	94°C	15 sec
	58°C	30 sec
	72°C	20 sec
3. PCR-Zyklus: 25x	94°C	15 sec
	58°C	30 sec
	72°C	30 sec
Endreaktion	72°C	2 min
	4°C	∞

PCR-Primer: Ex2/3 (TP53) und CK19 (Zytokeratin 19)

2.2.8 Lymphozytenkultur zur Gewinnung von Metaphasenchromosomen

Als Hybridisierungsplattform der markierten DNA-Amplifikate in der CGH dienen Präparationen aus humanen Metaphasenchromosomen. Diese wurden aus Lymphozytenkulturen gesunder männlicher Probanden gewonnen und auf Glasobjektträger aufgetropft.

Zur Vorbereitung der Kulturen wurde ein Nährmedium (250 ml RPMI-Medium 1640) mit 15% FCS (37,5 ml), 5 ml einer Lösung aus Penicillin und Streptomycin (200 U/ml), 3 ml Phytohämagglutinin (PHA) und 2,5 ml L-Glutamin vermischt. Vor der Verteilung auf 25 cm² Zellkulturflaschen wurde dem Ansatz 20 ml heparinisertes Blut des Probanden hinzugefügt. Anschließend wurden die Lymphozytenkulturen für 72 Stunden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert und währenddessen zwei- bis dreimal am Tag vorsichtig bewegt. Vier Tage nach Beginn der Inkubation wurden die Lymphozytenkulturen weiterverarbeitet. Vorbereitend dafür wurde eine hypotone KCl-Lösung (75 mM) hergestellt, auf 37°C erwärmt und eine sogenannte Fixativ-Lösung (Methanol-Eisessig-Gemisch im Verhältnis 3:1) auf -20°C gekühlt. Durch Zugabe von 100 µl einer Colcemidlösung (10 µg/ml, Endkonzentration im Kulturfläschchen: 0,1 µg/ml)

für 30 bis 60 min bei 37°C wurde ein Teil der Lymphozyten in der Metaphase arretiert. Anschließend wurden die Lymphozytenkulturen in 15 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen transferiert und für 10 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit Hilfe eines Vortexers mit 10 ml der hypotonen KCl-Lösung resuspendiert, wodurch die Zellen dem Konzentrationsgradienten entsprechend Flüssigkeit aufnahmen. Nach einer Einwirkzeit von 8 bis 10 min platzten die Erythrozyten, während die Lymphozyten derart aufquollen, dass diese beim nachfolgenden Auftropfen auf Glasobjektträger leicht zerplatzten. Die Zellen wurden im Anschluss für 10 min bei 1500 Upm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Es folgte zwei- bis dreimaliges Waschen in Fixativ-Lösung (10 ml pro Ansatz) und Zentrifugation, bis schließlich sämtliche Erythrozytenreste entfernt waren und man eine klare Flüssigkeit mit weißem Lymphozytenpellet erhielt. Derart behandelte Lymphozyten wurden in 3 ml Fixativ-Lösung bis zu drei Monate bei -20°C gelagert und bei Bedarf für die Herstellung von Metaphasenchromosomen-Objektträgern herangezogen.

2.2.9 Präparation von Metaphasenchromosomen-Objektträgern

Die verwendeten Glasobjektträger wurden vor Gebrauch über Nacht durch Lagerung in 100% unvergälltem Ethanol bei 4°C gereinigt und entfettet. Zehn Minuten vor dem Auftropfen wurde Ethanol durch destilliertes Wasser ersetzt und die Objektträger auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Lymphozytenlösung aus circa 50 cm Höhe auf den Objektträger getropft, wodurch die Lymphozyten samt Kernmembran platzten und Metaphase-Chromosomen freigesetzt wurden. Die Objektträger mit den ausgespreiteten Metaphasechromosomen wurden auf einer mit befeuchteten Zellstofftüchern ausgelegten Heizplatte für 1 bis 2 Stunden bei 40°C getrocknet und danach mindestens für eine Woche in 70% Ethanol gelagert. In 70% Ethanol waren sie bis zu drei Monaten haltbar.

2.2.10 Vergleichende genomische Hybridisierung

In der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) hybridisierten die Testprobe (Digoxigenin-dUTP markierte DNA von Tumorzellen beziehungsweise Primärtumoren) und die Referenzprobe (Biotin-dUTP markierte DNA normaler diploider Zellen) auf die komplementären Regionen der Metaphasenchromosomen. Enthielt die DNA der Tumorprobe numerische Aberrationen, zum Beispiel einen DNA-Gewinn, so hybridisierte entsprechend mehr DNA im Verhältnis zur Referenzprobe auf dem entsprechenden Chromosomenabschnitt. In der nachfolgenden Antikörperfärbung mit spezifischen Fluorochromen wurde die unterschiedlich markierte DNA sichtbar gemacht und es ließen

sich chromosomale Regionen identifizieren, die von numerischen Aberrationen betroffen waren.

Alkoholfällung

Im ersten Schritt wurden die markierten Reamplifikate der Test-DNA (primäre PCR-Produkte der Tumorzellen oder Primärtumoren) und der Referenz-DNA (Pool aus 5 bis 10 normalen diploiden Zellen) über Nacht in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei -20°C gefällt (siehe Tabelle 16). Die präzipitierte DNA wurde am folgenden Tag in einer Tischzentrifuge für 45 min bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Tabelle 16 Reaktionsansatz: Fällung der markierten DNA-Proben

Digoxygenin-markiertes PCR-Produkt (Tumor-DNA)	30-40 µl
Biotin-markiertes PCR-Produkt (Referenz-DNA)	30-40 µl
Humane C ₀ t-1 DNA (1 µg/µl)	75 µl
Heringssperm-DNA (10 µg/µl)	6 µl
Natrium Acetat (3 M; pH 5,2)	1/10 Volumen
100% EtOH (unvergällt, -20°C)	2x Volumen

Herstellung des DNA-Hybridisierungsansatzes

Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 700 µl 70% EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert (10 min bei 4°C und 14000 Upm), der Überstand verworfen und im geöffneten Reaktionsgefäß luftgetrocknet. Die getrocknete DNA wurde nach Zugabe von 6 µl 100% Formamid und 6 µl Master-Mix (30% Dextransulfat in 4× SSC, Mr > 500000) in einem Heizblock für 60 min bei 37°C unter leichtem Schütteln gelöst. Daraufhin wurde die DNA-Probe durch Erhitzen in einem Heizblock bei 78°C für 6 min denaturiert. In der folgenden Inkubation für 45 min bei 37°C hybridisierte die C₀t-1 DNA an repetitive Sequenzen in der Test- und Referenz-DNA, um deren störenden Einfluss auf die CGH zu unterbinden.

Vorbehandlung der Metaphasen-Objektträger

Parallel zur Herstellung der DNA-Probe wurde ein geeigneter Metaphasen-Objektträger von RNA- und Proteinresten befreit und die chromosomale DNA denaturiert. Nach kurzer Rehydrierung in 2x SSC wurde er mit 200 µl RNase A (100 µg/ml in 2x SSC) für 60 min bei 37°C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 min in 2x SSC wurde die

RNase entfernt. In einem Wasserbad wurden 100 ml einer 10 mM HCl-Lösung auf 37°C erwärmt, der pH-Wert auf 2 eingestellt und dann 50 µl Pepsinlösung (100 mg/ml in ddH₂O) zugegeben. Der Metaphasen-Objektträger wurde je nach Ausmaß der Zytoplasmareste für 3 bis 4 min in der Pepsin-HCL-Lösung inkubiert. Der Verdau wurde durch dreimaliges Waschen in 1x PBS beendet, der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol: 70%, 85%, 100%; jeweils für 3 min bei 4°C) dehydriert und anschließend luftgetrocknet. Um die Chromosomenstruktur für die folgende Denaturierung zu stabilisieren, wurde das Chromatingerüst mit 200 µl PFA-Lösung (50 mM MgCl₂ in 1x PBS mit PFA 1%) fixiert. In einem Wasserbad wurden 100 ml Formamid-Lösung (70 ml 100% Formamid, 10 ml 20x SSC, 20 ml ddH₂O, eingestellt auf pH 7) auf 70°C erhitzt. Der Metaphasen-Objektträger wurde bei Erreichen der Temperatur für 1 min 30 sec bis 2 min denaturiert. Die optimale Einwirkungszeit wurde in einer Testreihe ermittelt und der Kondensation der Chromosomen und Intensität des Pepsinverdaus angepasst. Es folgte eine erneute Dehydrierung des Objektträgers in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Nach der anschließenden Lufttrocknung wurde die zu hybridisierende DNA-Probe im nächsten Schritt aufgetragen.

Hybridisierung

Das Hybridisierungsfeld wurde mit einem Deckgläschen (18x18 mm) bedeckt und mit Montagekleber (Fixogum) verschlossen. Die Hybridisierungsreaktion fand für 48 bis 72 Stunden im Wasserbad bei 37°C statt.

Waschen und Antikörperfärbung

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläschen vorsichtig abgenommen und Reste des Hybridisierungsansatzes auf dem Objektträger durch kräftiges Schwenken in 4x SSC + 0,2% Tween entfernt. Anschließend wurde der Objektträger je dreimal für 5 min in Formamid-Lösung (150 ml Formamid 100%, 30 ml 20x SSC, 120 ml H₂O, eingestellt auf pH 7,5) und danach in 1x SSC bei 42°C gewaschen. Nach der Equilibrierung in 1x PBS + 0,2% Tween wurden Proteinbindungsstellen auf dem Glasobjektträger für 45 min mit 1 ml 3% Block-Lösung (0,2% Tween, 3% BSA Fraktion V und 5% FCS in 1x PBS, eingestellt auf pH 7,4) bei 37°C abgesättigt. Die überschüssige Block-Lösung wurde mit 1x PBS + 0,2% Tween weggespült und der Objektträger zum Nachweis der hybridisierten DNA-Proben mit einem Gemisch aus 20 µl Anti-Digoxigenin-FITC, 2 µl Avidin-Cy3.5 und 180 µl 1% Block-Lösung (0,2% Tween, 1% BSA Fraktion V, 5% FCS in 1x PBS, eingestellt auf pH 7,4) für 45 min bei 37°C im Dunkeln unter einem Deckglas (24 x 55 mm) inkubiert.

Ungebundene Fluorochrome wurden durch dreimaliges Waschen in 4x SSC + 0,2% Tween bei 42°C entfernt und die Chromosomenbänderung anschließend durch eine 2-minütige DAPI-Färbung (10 µg DAPI in 1 ml 4x SSC + 0,2% Tween pro Objektträger) zur späteren Identifikation der Chromosomen bei der Auswertung sichtbar gemacht. Der Objektträger wurde kurz mit ddH₂O gespült, um bei der Trocknung die Bildung von Salzkristallen zu verhindern, und abschließend unter Vectashield H-1000 eingedeckelt.

Digitale Bildverarbeitung und Auswertung

Die Dokumentation der CGH erfolgte als digitale Bildserien, die mit Hilfe einer CCD-Kamera, eines Fluoreszenzmikroskops und den Fluoreszenzfiltern DAPI, FITC und Cy3.5 erstellt wurden. Die Auswertung wurde mit den Computerprogrammen QFISH und QCGH durchgeführt (alle Hard- und Softwarekomponenten von Leica). Pro Hybridisierung wurden 12 bis 15 geeignete Metaphasen aufgenommen und in ein Chromosomenschema sortiert. Die Software verglich nach Normalisierung die entlang eines jeden Chromosoms integrierte Fluoreszenzintensität der Kanäle FITC (Test-DNA) und Cy3.5 (Referenz-DNA) miteinander. Das durchschnittliche Verhältnis aller in die Auswertung eingehender Chromosomen wurde graphisch als sogenanntes CGH-Profil dargestellt. War das Fluoreszenzverhältnis FITC/Cy3.5 größer als 1,25, lag ein Gewinn an DNA in der Testprobe vor. Bei einem Wert kleiner 0,75 wurde ein Verlust an DNA im entsprechenden Chromosomenabschnitt angegeben.

2.2.11 Kumulative Histogramme der CGH-Profile

Für die Überlagerung und graphische Darstellung der einzelnen CGH-Profile eines Kollektivs wurde das im Internet frei zugängliche ISCN-Matrix-Konvertierungsprogramm herangezogen (Baudis and Cleary 2001) (Webadresse: <http://www.progenetix.de>). Dieses Programm wandelte die CGH-Datensätze numerischer Aberrationen in eine schematische bandenspezifische Matrix um, aus der Häufigkeit und Lokalisation der Aberrationen herausgelesen wurden. Die Beschreibung der Chromosomenaberrationen für diese Analysen wurde nach dem Internationalen System für Humane Zytogenetische Nomenklatur (ISCN 1995) durchgeführt, in einer Microsoft-Excel-Tabelle aufgelistet und als Textdatei (Dateiextension .txt) gespeichert, die von dem Konvertierungsprogramm eingelesen und verarbeitet wurde.

2.2.12 Statistische Berechnungen

Für die statistischen Auswertungen wurden Programme verwendet, die im Internet auf der Seite „VassarStats“ (Webadresse: <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>) kostenfrei angeboten werden.

Mit dem Chi-Quadrat Test wurde überprüft, ob sich zwei Kollektive in Bezug auf eine bestimmte Eigenschaft signifikant unterscheiden. Waren die zu vergleichenden Gruppen zu klein für den Chi-Quadrat Test, kam der Fisher-Exakt Test zur Verwendung. Beide wurden bei der Auswertung der Färbeergergebnisse, der PCR-Ergebnisse und dem Vergleich von DTZ mit balanciertem oder aberrantem Profil herangezogen. Mit dem Student t-Test wurde überprüft, ob sich die Mittelwerte der Anzahl von CGH-Aberrationen zwischen zwei Kollektiven signifikant unterscheiden. Es wurden die Mittelwerte der CGH-Aberrationen von hämatogen, lymphogen disseminierten Tumorzellen und Primärtumoren miteinander verglichen.

2.2.13 Biomathematische Analysen

Die hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der CGH-Daten erfolgte mit Hilfe der kostenfreien Programme „Cluster“ und „TreeView“ (Webadresse: <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) (Eisen, Spellman et al. 1998). Die CGH-Daten wurden dazu in eine Microsoft-Excel-Tabelle überführt und als Textdatei (Dateiextension .txt) gespeichert. Gewinne und Verluste der einzelnen Chromosomenregionen wurden mit einem Zahlenwert ausgedrückt (+1=Gewinn, -1=Verlust, 0=keine Veränderung) und in dieser Form konnten die CGH-Daten in das Cluster-Programm eingelesen und nach der Complete-Linkage-Clustering Methode gruppiert werden. Das Ergebnis der Gruppierung wurde durch das TreeView-Programm graphisch dargestellt, wobei Gewinne grün und Verluste rot gekennzeichnet wurden. Gleichzeitig zu dem Cluster wurde ein Dendrogramm generiert, aus dem die Ähnlichkeit zwischen zwei Datensätzen herausgelesen werden konnte. Der Abstand zu den am nächsten stehenden Knotenpunkten entsprach der Ähnlichkeit zwischen zwei Proben. Im Dendrogramm benachbarte Proben waren einander also besonders ähnlich, wobei diese Vereinfachung nicht über die Grenzen übergeordneter Bäumchen gilt. Wie bei vielen Arbeiten mit der CGH üblich, wurden die Chromosomen bei der Angabe der Regionen, die von numerischen Aberrationen betroffen waren, in Chromosomenarme unterteilt.

2.3 Materialien

Antikörper und Enzyme

A45-B/B3	Micromet, München
Anti-Dig-Flourescein	Roche, Mannheim
APAAP-Komplex	Dako, Hamburg
Avidin-Cy3.5	Rockland, Gilbertsville, USA
Ber-Ep4	Dako, Hamburg
Expand Long Template PolMix	Roche, Mannheim
MOPC 21	Sigma, Deisenhofen
MseI 50 U/µl	New England Biolabs, Frankfurt
Pepsin	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim
Panscript Taq-Polymerase	PAN Biotech, Aidenbach
Tru1	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Z259	Dako, Hamburg

Chemikalien

AB-Serum	Biotest, Dreieich
Agarose GTG Seakem	Biozym, Hess. Oldendorf
ATP	Roche, Mannheim
BCIP/NBT (AP Color Reagent)	BioRad, München
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
BSA für PCR	Roche, Mannheim
BSA Fraktion V	Paesel + Lorei, Hanau
Colcemid	Sigma, Deisenhofen
DAPI	Roche, Mannheim
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Biosciences, Freiburg
Dextransulfat	Sigma, Deisenhofen
Digoxygenin-11-dUTP stabil	Roche, Mannheim
DNA-Größenmarker (1kb Leiter)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Eisessig 100%	Merck, Darmstadt
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol unvergällt	JT Baker, Griesheim
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg
Expand-Long-Template Puffer 1	Roche, Mannheim
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Ficoll	Amersham Biosciences, Freiburg
Fixogum (Montagekleber)	Marabu, Tamm
Formamid	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Hämatoxylinlösung (Mayer's)	Sigma, Deisenhofen

Heparin-Natrium (5000 I.E./ml)	B.Braun, Melsungen
Hering Sperm DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Human C ₀ t-1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Igepal	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
OPA Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
Orange G	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCR-Öl	Sigma, Deisenhofen
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
Phytohämagglutinin M-Form	Invitrogen, Karlsruhe
Puffer R	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend)	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
SYBR Gold	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Vectashield	Linearis, Hamburg
Wasser (LiChrosolv für Chromatographie)	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe

Puffer

PCR-Puffer:	Tris (100 mM), MgCl ₂ (10mM), KCl (500 mM), dNTPs (1 mM); pH 8,5
PBS:	Na ₂ HPO ₄ (8,5 mM), KH ₂ PO ₄ (2 mM), NaCl (150 mM); pH 7,4
SSC:	NaCitrat (15 mM), NaCl (150 mM); pH 7,4
TBE:	Tris (89 mM), Borat (89 mM), EDTA (2 mM); pH 8,3

Oligonukleotide und Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion in München synthetisiert.

ddMse11	TAA CTG ACA G-dideoxy-C
LIB1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
TP53 Exon2/3 3'	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA
TP53 Exon2/3 5'	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC
Zytokeratin CK19 3'	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG
Zytokeratin CK19 5'	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C

Geräte

Brutschrank	Heraeus 6000
-------------	--------------

Videokamera (Agarose-Gel)	INTAS
CCD-Kamera (CGH)	Photometrix
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMXA-RF8
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
Heizplatte	Bachofer
Horizontal Gelelektrophorese	Invitrogen
Invertmikroskop	Leica DM IRB
Lasermikroskop	P.A.L.M., Bernried
Medimaschine	DAKO, Hamburg
Mikromanipulator	Microinjector 5242, Eppendorf, Hamburg
Mikrotom	Leica RM 2025
MJR PCR-Maschine	Peltier Thermal Cycler PTC-200
Spannungsquelle (Agarose-Gel)	EPS 200, Pharmacia Biotech
Thermoprinter	Sony
UV-Schirm	INTAS
Wasserbad	Lauda

Verbrauchsmaterialien

Adhäsionsobjektträger	Micromet
Deckgläschen	Langenbrinck
Glas-Küvetten	Roth
Kulturflaschen (Cellstar)	Greiner
Objektträger (Mattrand)	Langenbrinck
Petrischale	Greiner
Pipetten	Gilson
Polyethylenmembranen	P.A.L.M. Microlaser Technologies
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Thermo-Fast 96, Abgene
Transferpipetten	Sarsted

2.4 Abkürzungen

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

A45-B/B3	Antikörper gegen CK
A	Adenin
AB	Albumin
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
AST	Aspartat-Aminotransferase

BCIP/NBT	5-Bromo-4-chloroindol-3-ol Dihydrogenphosphatester Mono-p-toluidiniumsalz Substratlösung
Ber-Ep4	Antikörper gegen EpCAM
Bio	Biotin-16-dUTP
BL	Blutproben
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
CCD	Charge-coupled Device (Kamera)
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
CK	Zytokeratin
CPV	Papillenkarcinom des Pankreas
CT	Computertomographie
CTP	Cytidintriphosphat
Cy3.5	Cyanin Dye 3.5
DAPI	4',6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
ddH ₂ O	Aqua dest
Dig	Digoxygenin-11-dUTP
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTZ	Disseminierte Tumorzelle(n)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiographie
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase
g	Beschleunigung
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
H-DTZ	Hämatogen disseminierte Tumorzelle(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG ₁	Isotypkontrolle
IPMN	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
ISCN	Internationales System für humane Zytogenetische Nomenklatur
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KM	Knochenmark
L-DTZ	Lymphogen disseminierte Tumorzelle(n)
LK	Lymphknoten
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
Mb	Megabasen
MCF-7	Humane Mammakarzinom-Zelllinie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOPC21	Mouse Oocyte Plasmocytom, IgG ₁ -Isotyp-AK gegen CK

Mr	Molekulargewicht
MRD	minimal residuale Krebserkrankung
MRT	Magnetresonanztomographie
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
n.b.	nicht bekannt
NPCA	Neuroendokriner Pankreastumor
n.s.	nicht signifikant
OP	Operation
OPA Plus	One Phor All Plus
OT	Objektträger
PACA	Adenokarzinom des Pankreas
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCA	nicht an der Papille lokalisiertes Pankreaskarzinom
PBS	Phosphatbuffer Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
RE	Restriktionsenzym
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonucleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
SSC	Salins-Sodiumcitrat
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
Tris	Trishydroxymethyl
TTP	Tymidintriphosphat
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
Z259	Brückenantikörper

3 ERGEBNISSE

3.1 Patienten

Für die Dokumentation der analysierten Proben wurde ein Code verwendet, der sich aus vier Ziffern, einem Buchstabenkürzel, sowie der Probennummer zusammensetzt (zum Beispiel: 2337LKT1). Die ersten vier Ziffern identifizieren den Patienten. Die folgende Abkürzung gibt an, ob es sich um eine Primärtumorprobe (PT) oder um eine disseminierte Tumorzelle aus Knochenmark (KMT), Lymphknoten (LKT) bzw. peripher-venösem Blut (BLT) handelt. Insgesamt wurden Proben von 106 Patienten mit Pankreastumoren und 14 Patienten mit chronischer Pankreatitis bearbeitet. Nachfolgend sind einige Daten zu diesem Kollektiv aufgelistet, die genauen Angaben zu jedem einzelnen Patienten befinden sich in einer Tabelle im Anhang (von der Gesamtzahl abweichende Zahlen in Tabelle 17 erklären sich aus fehlenden Angaben).

Tabelle 17 Charakteristika des untersuchten Patientenkollektivs mit Pankreastumoren

		n
Geschlecht	männlich	65
	weiblich	41
Durchschnittsalter bei Diagnose	männlich	62
	weiblich	61
Lymphknotenstatus	N0M0	36
	N1M0	60
Metastase	M0	86
	M1	20
Grading	G1	5
	G2	60
	G3	36
Lokalisation	Papille	15
	Kopf	49
	Korpus	4
	Schwanz	4
	gemischt	28
Diagnose	Adenokarzinom	94
	IPMN	6
	NPCA	6
	Chronische Pankreatitis	14

3.2 Immunzytochemischer Nachweis disseminierter Tumorzellen

Da disseminierte Tumorzellen (DTZ) in den verschiedenen Geweben nur in sehr geringer Zahl vorkommen, ist ein Anreicherungsverfahren zur Erleichterung ihres Nachweises in der immunzytochemischen Färbung unerlässlich. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation erreicht, nachdem die Knochenmark-

und Blutproben gewaschen sowie die Lymphknotenproben zur Einzelzellsuspension aufgearbeitet wurden. In der Zentrifugation, die Zellen nach Größe und Dichte trennt, wurde die Fraktion der mononukleären Zellen, in der auch die Tumorzellen enthalten sind, isoliert. Jeweils eine Million dieser Zellen wurden auf einen Adhäsions-Objektträger sedimentiert. Die gegensätzliche Ladung von Zellmembran (negativ) und Objektträgeroberfläche (positiv) unterstützte die reversible Bindung der Zellen auf den Adhäsions-Objektträgern. Diese Methode ermöglichte nach der immunzytochemischen Färbung eine spätere Isolation der Tumorzellen mittels Mikromanipulation. Die Adhäsionsobjektträger stellte die kooperierende Klinik her (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Der Nachweis von DTZ (siehe Abbildung 2) basiert auf dem Einsatz von Antikörpern gegen epitheliale Marker, die von den Zellen des Organs, in dem sie detektiert wurden, physiologischerweise nicht exprimiert werden. Für die Knochenmark- und Blutproben wurde der Antikörper A45-B/B3 gegen ein gemeinsames Epitop der Zytokeratine 8, 18, 19 und für die Lymphknotenproben der Antikörper Ber-Ep4 gegen das Oberflächenmolekül EpCAM eingesetzt. Bei beiden handelte es sich um monoklonale Antikörper aus der Maus. Die Blaufärbung der CK- beziehungsweise EpCAM-positiven Zellen erfolgte durch einen enzymatischen Substratumsatz der alkalischen Phosphatase, die über weitere Antikörper an den Primärantikörper A45-B/B3 oder Ber-Ep4 gekoppelt wurde (siehe auch 2.2.2). Bei der Entwicklung wurde das BCIP/NBT-System als Substratlösung benutzt, da andere Substanzen wie zum Beispiel Neufuchsin die DNA in zu hohem Maße schädigten und die anschließende PCR nicht mehr durchführbar war.

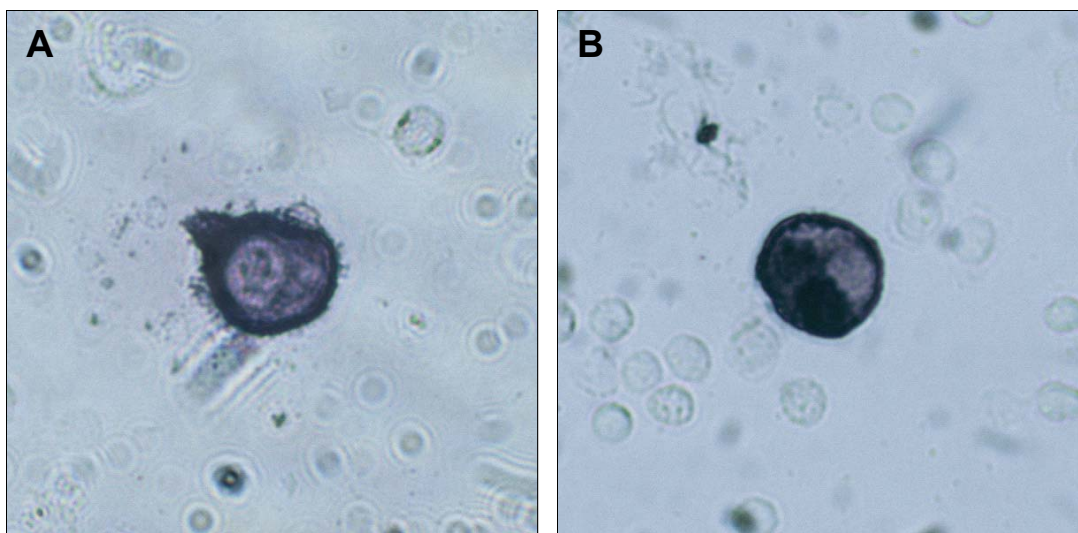


Abbildung 2 Marker-positive Tumorzellen

Mit Antikörpern gegen epitheliale Antigene (A: A45-B/B3 gegen Zytokeratin für Knochenmark- und Blutproben. B: Ber-Ep4 gegen EpCAM für Lymphknotenproben) werden DTZ detektiert und über das APAAP- und BCIP/NBT-System gefärbt. Über der Kernregion erscheint die Färbung schwächer als im Bereich der Zellmembran. Auch morphologisch sind Tumorzellen oft aufgrund ihrer Größe von ungefärbten Normalzellen in ihrer Umgebung zu unterscheiden.

3.2.1 Patientenkollektiv für die immunzytochemischen Untersuchungen

Das Kollektiv setzte sich in erster Linie aus Patienten mit Adenokarzinomen (PACA) des Pankreas zusammen, die von der Papille über den Pankreaskopf bis in den Pankreasschwanz hin lokalisiert waren. Nach der Lokalisation des Primärtumors konnte das Kollektiv in eine Gruppe mit Karzinomen der Papille (CPV) und in eine zweite, deren Karzinom im restlichen Pankreas wuchs (PCA), unterteilt werden. Aus der Gruppe der Papillenkazinome wurden alle Patienten aussortiert, deren Karzinom biliären, intestinalen oder unklaren Ursprungs war. Zusätzlich wurden auch einige Fälle mit intraduktaler papillär-muzinöser Neoplasie (IPMN) oder neuroendokrinem Tumor (NPCA) bearbeitet. Die Patienten befanden sich hauptsächlich im klinischen Stadium M0. Obwohl das metastasierte Pankreaskarzinom (klinisches Stadium M1) in der Regel nicht mehr operiert wird, konnte auch Material von Patienten mit Metastasen bearbeitet werden. Es wurde in kurativer Absicht operiert, intraoperativ stellte sich jedoch heraus, dass der Primärtumor metastasiert hatte und der Patient inoperabel war (siehe Tabelle 18). Neben Proben von Pankreastumoren konnten auch Proben von 14 Patienten mit der Diagnose einer chronischen Pankreatitis gewonnen und bearbeitet werden. Allerdings gelang in keinem dieser Fälle der Nachweis von CK- oder EpCAM-positiven Zellen.

Tabelle 18 Patientenkollektiv, aufgeteilt nach Diagnose, klinischem Stadium (M0: keine Metastasen, M1: Tumor mit Metastase) und Proben, in denen nach DTZ gesucht wurde

	Stadium M0				Stadium M1			
	Patienten	KM ⁶	LK ⁷	BL ⁸	Patienten	KM ⁶	LK ⁷	BL ⁸
PACA ¹	74	63	23	21	19	17	1	3
PCA ²	61	55	15	17	18	16	1	3
CPV ³	13	8	8	4	1	1	0	0
IPMN ⁴	6	4	3	2	0	0	0	0
NPCA ⁵	5	5	2	1	1	1	0	1

¹Adenokarzinom des Pankreas

²Nicht an der Papille lokalisiertes Adenokarzinom

³Adenokarzinom mit Lokalisation an der Papille

⁴Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie

⁵Neuroendokriner Pankreastumor

⁶Knochenmarkaspirate

⁷Lymphknotenproben

⁸Blutproben

Die Probenanzahl von Patienten mit IPMN und NPCA, die für die immunzytochemischen Färbungen zur Verfügung standen, waren zu gering, um Vergleiche dieser Ergebnisse durchzuführen. Dennoch wurden aus diesen Kollektiven Tumorzellen isoliert, auf die im späteren Verlauf bei der Auswertung der CGH-Ergebnisse wieder eingegangen wird. Die folgenden Kapitel (3.2.2 und 3.3) dagegen beschränken sich auf die Versuche mit Probenmaterial von Adenokarzinomen des Pankreas.

3.2.2 Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase Färbung

Mit dem Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 wurden insgesamt 90 Färbeexperimente mit Knochenmark- und 32 mit Blutprobenmaterial von insgesamt 84 Patienten mit Pankreasadenokarzinom durchgeführt. Die Negativkontrolle (IgG₁-Isotypkontrolle mit MOPC21) war bei Knochenmarkzellen in fünf Versuchen (5,5%) und bei Blutzellen in einem Versuch (3,1%) positiv. Solche Fälle wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Aus dem Kollektiv der Knochenmarkaspirate wurden letzten Endes zwei Patienten aussortiert, bei den vier übrigen Fällen konnten die Experimente mit zusätzlichem Material erfolgreich wiederholt werden. Der EpCAM-Antikörper Ber-Ep4 wurde bei 36 Färbungen von Adhäsionsobjektträgern mit Lymphknotenproben von 24 Patienten mit Pankreasadenokarzinom verwendet. Die Negativkontrolle mit dem Antikörper MOPC21 war in drei Fällen positiv (8,3%). In einem Fall konnte das Experiment mit zusätzlichem Material erfolgreich wiederholt werden, so dass zwei Patienten aussortiert wurden.

Um zu untersuchen, ob die Anwendung der APAAP-Färbung auf Material unterschiedlicher Organe wie Knochenmark oder Lymphknoten einen Einfluss auf die Anzahl falsch-positiver Versuche hatte, wurden die Färbeergebnisse von Knochenmark- und Lymphknotenproben mit dem Fisher-Exakt Test verglichen. Die Berechnungen waren mit einem p-Wert von 0,69 nicht signifikant, also unterscheiden sich die Zellen dieser beiden Organe bezüglich ihrer unspezifischen Bindung der Antikörper nicht voneinander.

Frequenz hämatogen und lymphogen disseminierter Tumorzellen

Es ist bekannt, dass Pankreaskarzinome zum Zeitpunkt der Diagnose häufiger lymphogen als hämatogen metastasiert haben. Ob sich diese Situation auch in einer stärkeren Disseminierung über die Lymphbahnen widerspiegelt, wurde durch den Vergleich von Knochenmark- und Blutproben mit den Lymphknotenproben ergründet. Der Vergleich der Frequenz von DTZ in Knochenmarkaspiraten und Blutproben zeigt, ob DTZ eher im Blutkreislauf zirkulieren oder häufiger im Knochenmark anzutreffen sind. Des Weiteren ist es interessant, durch den Vergleich der Knochenmarkaspirate von Patienten ohne und mit Fernmetastasen zu analysieren, ob es bei fortschreitender Progression des Primärtumors auch zu einer Zunahme der Disseminierung kommt.

Zusammengefasst gelang der Nachweis von DTZ in allen drei verschiedenen Kompartimenten. Beim Adenokarzinom des Pankreas im klinischen Stadium M0 fanden sich DTZ am häufigsten in Proben regionärer Lymphknoten (38,1%). Am zweithäufigsten waren sie in Knochenmarkaspiraten (23,0%) und am seltensten im Blutkreislauf zu

detektieren (14,3%). Diese Unterschiede waren nicht signifikant, dennoch ließ sich eine Tendenz zur lymphogenen Disseminierung feststellen (siehe Abbildung 3).

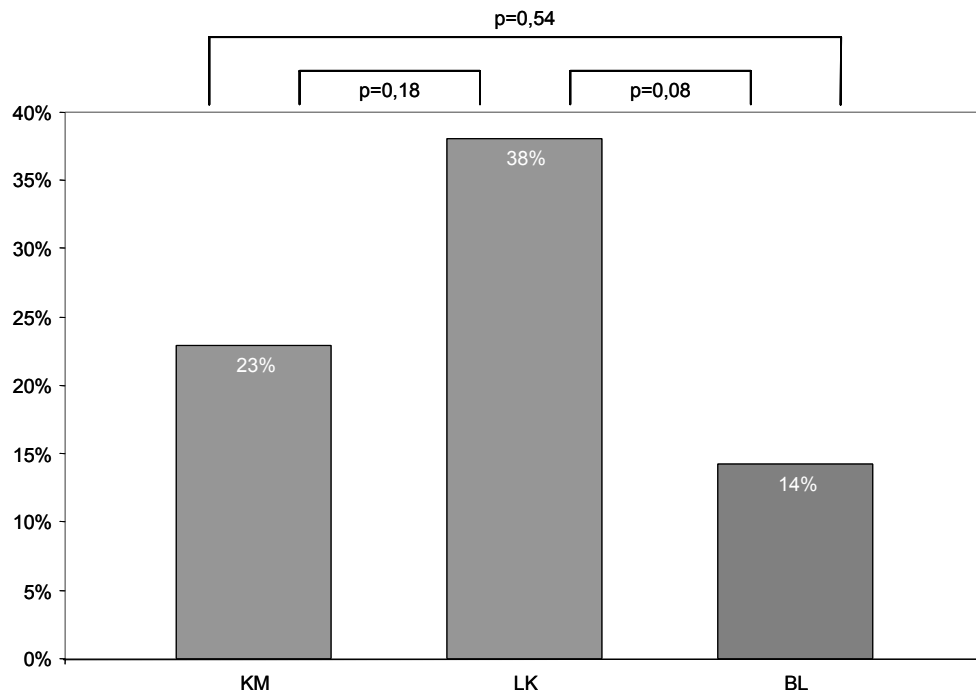


Abbildung 3 Anteil Marker-positiver Knochenmarkaspirate, Lymphknoten- und Blutproben bei nicht metastasiertem Pankreaskarzinom (Stadium M0)

Das Diagramm zeigt die relative Häufigkeit positiver Knochenmarkaspirate (KM=14/61), Lymphknoten- (LK=8/21) und Blutproben (BL=3/21) in der APAAP-Färbung. Deutlich zu erkennen ist die Tendenz zur lymphogenen Disseminierung des Pankreaskarzinoms.

Das untersuchte Kollektiv umfasste sowohl Patienten ohne wie auch mit regionären Lymphknotenmetastasen (klinisches Stadium N0M0 und N1M0). In diesem Zusammenhang ist es denkbar, dass die Tendenz zur lymphogenen Disseminierung durch ein Überwiegen von Patienten mit regionären Lymphknotenmetastasen bedingt wurde. Um dem Rechnung zu tragen, wurde das untersuchte Patientenkollektiv nach dem Lymphknotenstatus getrennt und dieselbe Analyse durchgeführt. Bei Patienten im klinischen Stadium N0M0 waren 33,3% (4/12) aller Lymphknotenproben positiv auf DTZ. Dem standen 25% positive Knochenmarkaspirate (6/24) und Blutproben (2/8) gegenüber. Die statistischen Berechnungen waren nicht signifikant (Fisher-Exakt: $p=0,70$ für KM gegen LK, $p=1$ für LK gegen BL und KM gegen BL). In der zweiten Patientengruppe (klinisches Stadium N1M0) waren 44,4% (4/9) der Lymphknotenproben, 21,6% (8/37) der Knochenmarkaspirate und 7,7% (1/13) der Blutproben positiv auf DTZ. Auch hier ergab die statistische Überprüfung der Ergebnisse keine signifikanten Werte (Fisher-Exakt: $p=0,21$ für KM gegen LK, $p=0,12$ für LK gegen BL und $p=0,41$ für KM gegen BL). Ebenso waren die Unterschiede in der Frequenz von DTZ in Knochenmark, Lymphknoten- oder Blutproben zwischen Patienten im klinischen Stadium N0M0 und N1M0 nicht signifikant

(Chi-Quadrat: $p=0,50$ für KM(N0) gegen KM(N1), Fisher-Exakt: $p=0,67$ für LK(N0) gegen LK(N1) und $p=0,53$ für BL(N0) gegen BL(N1)). Dennoch ließ sich in beiden Patientengruppen die Tendenz zur lymphogenen Disseminierung bestätigen. Die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im Blutkreislauf dagegen scheint ein seltenes Ereignis zu sein.

Bei Patienten im klinischen Stadium M1 wurden in Blutproben ($n=3$) keine und im Knochenmark in nur einem Fall ($n=16$) Zytokeratin exprimierende Zellen gefunden (6,3%). Der einzige zur Verfügung stehende Lymphknoten eines Patienten im klinischen Stadium M1 wurde positiv auf EpCAM exprimierende Zellen untersucht (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19 Anzahl Marker-positiver Knochenmarkaspirate und Blutproben von Patienten mit einem metastasiertem Adenokarzinom (PACA) des Pankreas

Stadium M1	Gesamtzahl Proben	Marker-positive Proben
KM	16	1 (6,3%)
LK	1	1 (100%)
BL	3	0 (0%)

M0 gegen M1 (KM), Fisher-Exakt: n.s. ($p=0,17$)

Ein zusätzlicher Aspekt bei der Auswertung der Färbeergebnisse ist die Häufigkeit Marker-positiver Zellen bezogen auf eine Million untersuchter Zellen bei Patienten mit DTZ. Pro Patient wurden jeweils ein bis fünf Adhäsionsobjektträger untersucht (entsprechend eine bis fünf Millionen Zellen). Dies geschah, um möglichst viele DTZ für die CGH-Analysen zu isolieren. Um die Experimente mit unterschiedlicher Objektträgeranzahl untereinander vergleichen zu können, wurde der Quotient von Marker-positiven zur Anzahl der untersuchten Objektträger berechnet. In CK-positiven Knochenmarkaspiraten der Patienten im klinischen Stadium M0 ($n=14$) befanden sich bis zu siebeneinhalb disseminierte Zellen, peripher-venös dagegen maximal eine ($n=3$). Im Knochenmark des Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom war eine CK-positive Zelle zu finden. In sechs der acht EpCAM-positiven Proben wurden bis zu drei disseminierte Zellen detektiert. In zwei positiven Lymphknotenproben wurden 1000 beziehungsweise 2000 EpCAM-positive Zellen gezählt. Diese stammten von Patienten, die sich im klinischen Stadium N1 befanden.

Disseminierte Tumorzellen beim Papillenkarzinom und Pankreaskarzinom anderer Lokalisation

Aufgrund ihrer Klinik werden Papillenkarzinome im Gegensatz zu Pankreaskarzinomen anderer Lokalisation in früheren Tumorstadien diagnostiziert. Der Vergleich der Frequenz

von DTZ dieser zwei Gruppen untereinander deckt eventuell Unterschiede in der Disseminierung zwischen weniger und weiter fortgeschrittenen Adenokarzinomen auf.

Die unter 3.2.2 erwähnten 61 Knochenmarkaspirate und 21 Lymphknotenproben der Patienten ohne Metastasen wurden nach der Lokalisation ihres Primärtumors in zwei Gruppen aufgeteilt (CPV: Adenokarzinom der Papille und PCA: Karzinome anderer Lokalisation). Die drei positiven Blutproben stammten ausschließlich von Patienten, deren Primärtumor nicht an der Papille lokalisiert war, so dass sie aufgrund fehlender Vergleichsmöglichkeiten bei dieser Auswertung nicht weiter berücksichtigt wurden. Auf eine Unterteilung des M1-Kollektivs wurde ebenfalls aufgrund der geringen Fallzahlen verzichtet (siehe Tabelle 18).

Der Trend zur lymphogenen Disseminierung, der im Gesamtkollektiv unter 3.2.2 festzustellen war, zeigte sich innerhalb des Kollektivs der Papillenkarzinome noch verstärkt (siehe Tabelle 20). Die Rate positiver Knochenmarkaspirate war bei Patienten mit PCA doppelt so hoch wie bei Patienten mit CPV (24,5% zu 12,5%, $p=0,67$). Dagegen waren EpCAM-positive Zellen häufiger in Lymphknoten von Papillenkarzinomen zu finden (33,3% zu 50%, $p=0,63$).

Tabelle 20 Anzahl Marker-positiver Knochenmarkaspirate und Lymphknotenproben bei Unterteilung der Adenokarzinome nach ihrer Lokalisation

CPV	Gesamtzahl Proben	Marker-positive Proben
KM	8	1 (12,5%)
LK	6	3 (50,0%)
KM gegen LK, Fisher-Exakt: n.s. ($p=0,24$)		
PCA	Gesamtzahl Proben	Marker-positive Proben
KM	53	13 (24,5%)
LK	15	5 (33,3%)
KM gegen LK, Fisher-Exakt: n.s. ($p=0,52$)		
CPV gegen PCA (KM), Fisher-Exakt: n.s. ($p=0,67$)		
CPV gegen PCA (LK), Fisher-Exakt: n.s. ($p=0,63$)		

3.3 Isolation disseminierter Tumorzellen und Qualitätsprüfung der Adapter-Linker-PCR

Die gefärbten Tumorzellen wurden unter mikroskopischer Kontrolle mit Hilfe einer Glaskapillare vorsichtig von der Oberfläche gelöst, aufgesaugt und in ein 200 µl Reaktionsgefäß überführt (siehe Abbildung 4). Zusätzlich wurde versucht, bei jeder positiven Patientenprobe zum einen eine einzelne ungefärbte Normalzelle und zum anderen mehrere ungefärbte Normalzellen gemeinsam (zwei bis fünf Zellen) als

Positivkontrollen zu isolieren.

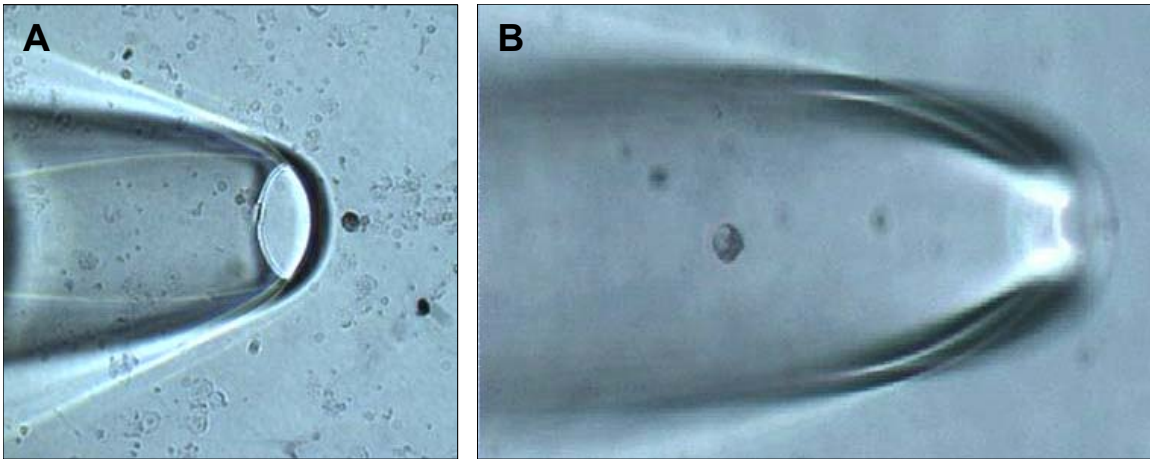


Abbildung 4 Zellisolation durch Mikromanipulation

A: Marker-positive Zelle auf einem Adhäsionsobjektträger, bevor sie mit der Glaskapillare mobilisiert wird. Nach der Mobilisierung wird die Zelle aufgesaugt (B), um in ein Reaktionsgefäß zur weiteren Bearbeitung überführt zu werden.

Um ausreichend DNA für die komparative genomische Hybridisierung (CGH) zu haben, ist es unumgänglich, das Genom der zu untersuchenden Zelle vorher zu amplifizieren. Die CGH basiert auf einem quantitativen Vergleich von Tumor- und Referenz-DNA. Deshalb ist es wichtig, dass die zu untersuchende DNA gleichmäßig amplifiziert wird und das Amplifikat die numerischen Veränderungen der DNA vor der PCR repräsentiert. Aus diesem Grunde wurde die sogenannte Adapter-Linker-PCR etabliert, die eine CGH auf Einzelzellebene überhaupt erst ermöglicht (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999). Im ersten Schritt dieses Verfahrens wird die DNA der zu untersuchenden Zelle mit dem Restriktionsenzym *MseI* verdaut. Die anschließende Ligation einer Adaptersequenz an alle DNA-Fragmente ermöglicht dann die globale Amplifikation des gesamten Genoms der Zelle mit nur einem Primer (siehe 2.2.5). Wie unter 2.2.7 beschrieben dient im Anschluss der Nachweis zweier *MseI*-Fragmente als Qualitätskontrolle der Adapter-Linker-PCR. Ein Primerpaar liegt im Bereich des Exons 2/3 des Tumorsuppressorgens *TP53*, das zweite im Bereich des Gens für das Zytokeratin 19 (siehe Abbildung 5). Im Laufe der Arbeit hat es sich gezeigt, dass eine Positivität für mindestens eines dieser beiden Genfragmente als Kriterium für eine gute DNA-Qualität ausreichte, um mit einer erfolgreichen CGH rechnen zu können.

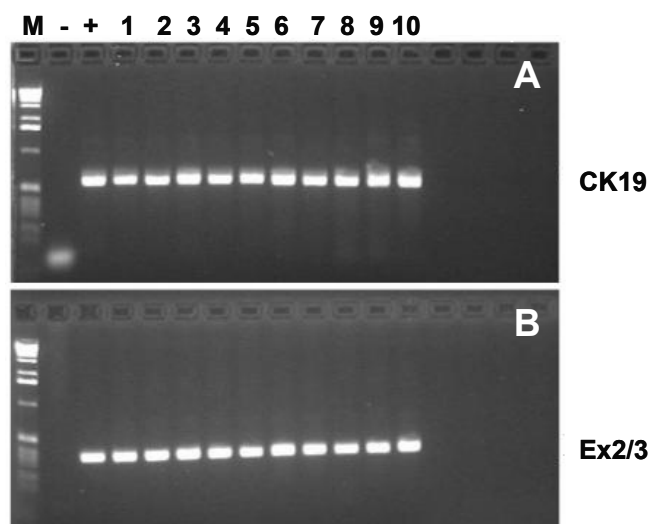


Abbildung 5 Qualitätskontrolle der Adapter-Linker-PCR

Neben dem Marker (1kb-Leiter) sind von links nach rechts Negativ- und Positivkontrolle sowie zehn PCR-Amplifikate von Tumorzellen aufgetragen. Mit Hilfe spezifischer Primer wurden DNA-Fragmente der Gene Zytokeratin 19 (A: CK19) und TP53 (B: Ex2/3) nachgewiesen.

In Tabelle 21 sind zuerst alle Isolationsversuche Marker-positiver Tumorzellen und ungefärbter Normalzellen und dann die Ergebnisse der Kontrolle der DNA erfolgreich isolierter Zellen durch die spezifische PCR angegeben. So konnten von 112 positiven Tumorzellen in der APAAP-Färbung 91 für die CGH-Untersuchungen geeignete Adapter-Linker-PCR Amplifikate (81,25%) hergestellt werden. Die Ausbeute bei einzelnen ungefärbten Normalzellen war mit 76,2% etwas geringer, die bei mehreren ungefärbten Normalzellen mit 90,5% erwartungsgemäß am besten. Die Amplifikation der DNA mehrerer Zellen als Ausgangsmaterial ist weniger anfällig für artifizielle Verluste, da der diploide Chromosomensatz je nach Zellzahl mehrfach vorhanden ist.

Tabelle 21 Anzahl erfolgreich bearbeiteter Marker-positiver Tumorzellen und ungefärbter Normalzellen, deren Genom mit der Adapter-Linker-PCR amplifiziert wurde

Mikromanipulation	Marker-positive Zellen	einzelne Normalzellen	2-5 Normalzellen
Isolationsversuche	112	21	21
Verluste	7 (6,3%)	2 (9,5%)	0 (0,0%)
Kontroll-PCR	105	19	21
Positiv auf CK19 und Ex2/3 (beide)	66 (62,9%)	14 (73,7%)	19 (90,5%)
Positiv auf CK19 oder Ex2/3 (eines von beiden)	25 (23,8%)	2 (10,5%)	0 (0,0%)
Negativ (Verluste)	14 (13,3%)	3 (15,8%)	2 (9,5%)
Adapter-Linker-PCR Amplifikate für die CGH	91 (81,3%)	16 (76,2%)	19 (90,5%)

Um zu überprüfen, ob die Färbung der Zellen einen Einfluss auf die Ausbeute in der Adapter-Linker-PCR hatte, wurden die Ergebnisse der Kontroll-PCR, welche mit DTZ und einzelnen ungefärbten Normalzellen durchgeführt wurden, miteinander verglichen. Jede spezifische-PCR wurde als unabhängiges Ereignis gewertet. Da pro Zelle zwei verschiedene *MseI*-Fragmente getestet wurden, kommt man auf die Gesamtzahl von 210 Kontroll-PCRs gefärbter und 38 Kontroll-PCRs ungefärbter Normalzellen. Mit einem p-Wert von 0,68 errechnete sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen und es kann davon ausgegangen werden, dass die Färbung einer Zelle mit dem APAAP-System keinen Einfluss auf die Ausbeute der Adapter-Linker-PCR hatte (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22 Statistische Überprüfung der Adapter-Linker-PCR

	Positive Kontroll-PCR	Negative Kontroll-PCR
Marker-positive Tumorzellen	157	53
Normale Einzelzellen	30	8

Marker-positiv gegen normal, Chi-Quadrat: n.s. (p=0,68)

3.4 Genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen

Die durch die Adapter-Linker-PCR amplifizierte DNA von Tumorzellen kann mit der komparativen genomischen Hybridisierung (siehe 2.2.10) auf numerische Veränderungen hin analysiert werden. Diese Methode ermöglicht es, zuverlässig und reproduzierbar über das ganze Genom dieser Zellen hinweg Chromosomenregionen mit DNA-Verlusten und -Gewinnen zu detektieren. Die Auflösung der Methode liegt zwischen 10 und 20 Mb (Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1992). Als Hybridisierungsmatrix dienen humane Metaphasenchromosomen gesunder männlicher Spender. Die DNA der disseminierten Tumorzellen (DTZ) wird mit Digoxigenin-dUTP und die DNA aus Normalzellen, die als Referenz zur veränderten Tumor-DNA dient, mit Biotin-dUTP markiert. Die unterschiedlich markierten DNA-Fragmente hybridisieren an die komplementären Regionen der Metaphasenchromosomen. Anschließend werden sie mit Hilfe zwei verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe nachgewiesen, wobei Regionen mit einem Verlust oder Gewinn an DNA durch die relativ stärkere oder schwächere Intensität des entsprechenden Fluorochroms (Verhältnis von FITC=Tumor-DNA zu Cy3.5=Referenz-DNA) erkennbar werden. Die Metaphasen werden fotografiert, ein Karyogramm erstellt, die Intensitäten vom Computer berechnet und als CGH-Profil dargestellt (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7B).

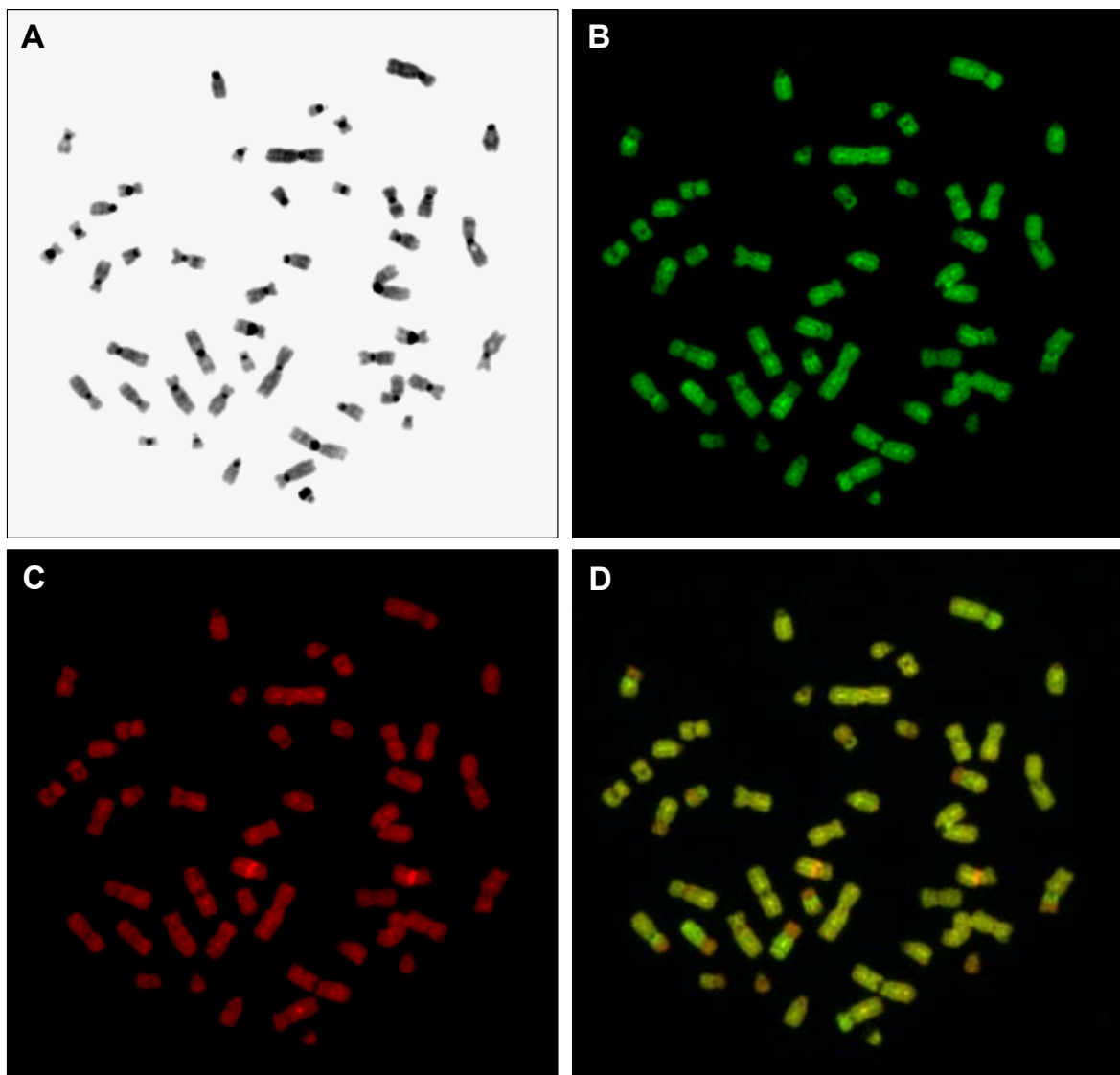


Abbildung 6 CGH-Bilder einer Tumorzelle

Die Aufnahmen A bis D dokumentieren einen erfolgreichen CGH-Versuch. A zeigt die Metaphasen-Chromosomen und ihre G-Bänderung (DAPI-Filter). Diese Aufnahme ermöglicht Identifikation und Sortieren der Chromosomen. Mit Hilfe der entsprechenden Filter erkennt man in grün die Tumor-DNA (B: FITC-Filter) und in rot die Referenz-DNA (C: Cy3.5-Filter). D zeigt ein vom Computer erstelltes Überlagerungsbild von B und C, das mit Hilfe der Software weiter bearbeitet wird.

Um die Qualität der CGH zu kontrollieren, wurde in regelmäßigen Abständen die DNA einer oder mehrerer ungefärbter Normalzellen anstelle der Marker-positiven Zellen eingesetzt und mit Digoxigenin-dUTP markiert. Bei diesen Experimenten wurde ein balanciertes Profil als Ergebnis erwartet, das heißt, diese Zellen dürfen keine Aberrationen im CGH-Profil aufweisen. Alle zwölf durchgeführten Stichproben zeigten keine signifikanten Aberrationen in der Kontroll-CGH (siehe Abbildung 7A).

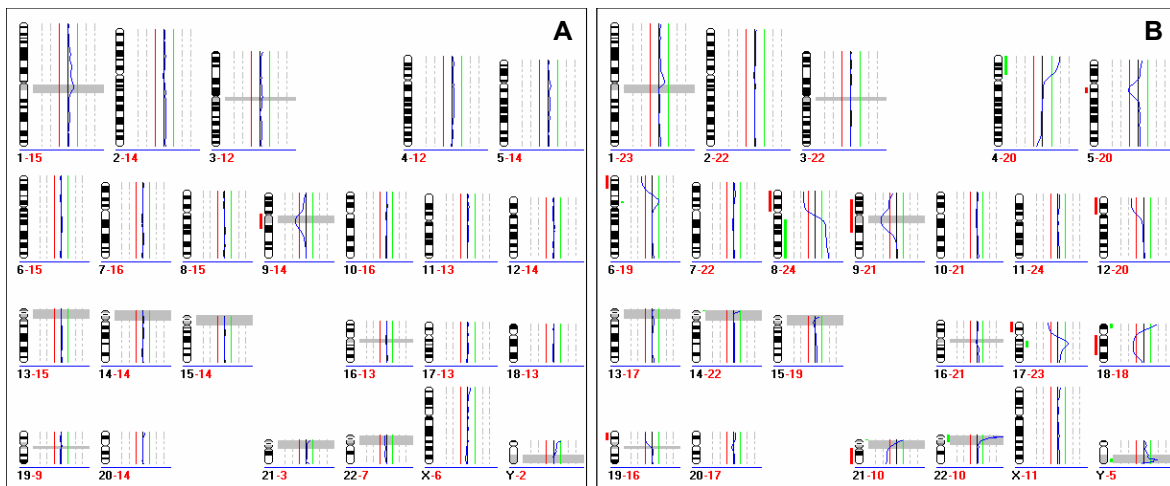


Abbildung 7 CGH-Profil einer ungefärbten, normalen Zelle (A) und einer CK-positiven Tumorzelle (B)

A: *Balanciertes CGH-Profil einer ungefärbten Zelle. Graue Balken geben Regionen mit hochrepetitiven Sequenzen an, die bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden. Die schwarze Zahl benennt das Chromosom, die rote Zahl gibt an, wie viele Chromosomen ausgewertet wurden.*
 B: *CGH-Profil einer Tumorzelle: Überschreitet die blaue Linie, die das Verhältnis von Tumor- zu Referenz-DNA angibt, die Signifikanzgrenze, dann wird ein DNA-Verlust mit einem roten (z.B. 8p) und ein DNA-Gewinn mit einem grünen Balken (z.B. 8q) am Chromosom angezeigt.*

3.4.1 Patientenkollektiv für die CGH-Untersuchungen

Insgesamt wurde die DNA von 76 Marker-positiven Tumorzellen für CGH-Experimente verwendet. Zusätzlich wurden von Andreas Lübke CGH-Profile von 29 Primärtumoren, die er im Rahmen seiner Dissertation am UKE Hamburg erstellt hatte, für die vergleichenden Analysen zur Verfügung gestellt. Einen genauen Überblick über die Verteilung auf die verschiedenen Kollektive gibt Tabelle 23. Hämatogen disseminierte Tumorzellen aus Knochenmark und Blutproben wurden zu einer Gruppe (KM) zusammengefasst.

Die folgenden Angaben über die Anzahl der untersuchten Tumorzellen eines Patienten beschränken sich wiederum auf das Kollektiv der Adenokarzinome des Pankreas im klinischen Stadium M0, da die Fallzahlen der anderen Kollektive sehr klein sind. Es wurden pro Patient eine bis acht CK-positive Zellen (Mittelwert: 2,7. Median: 1) und eine bis sieben EpCAM-positive Zellen (Mittelwert: 3,3. Median: 3) für die CGH-Analysen verwendet.

Tabelle 23 Anzahl der CGH-Profile (n=105) von Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas (PACA), intraduktaler papillär-muzinöser Neoplasie (IPMN) und neuroendokrinem Tumor (NPCA)

PACA	Stadium M0			Stadium M1		
	PT	KM	LK	PT	KM	LK
CGH-Profile	29	32	23	-	5	3
Patienten	29	11	7	-	2	1
IPMN	PT	KM	LK			
CGH-Profile	-	-	3			
Patienten	-	-	2			
NPCA	PT	KM	LK			
CGH-Profile	-	3	7			
Patienten	-	2	1			

3.4.2 Tumorzellen mit aberrantem oder balanciertem CGH-Profil

In den CGH-Experimenten gab es neben Zellen mit numerischen Aberrationen (aberrante, CGH-positive Zellen) auch solche, die trotz positiver Färbung auf epitheliale Marker keine signifikanten Veränderungen hatten (balancierte, CGH-negative Zellen). Primärtumoren dagegen waren alle CGH-positiv. Es wurde folgend untersucht, ob es einen Unterschied zwischen hämatogen (H-DTZ) und lymphogen disseminierten Tumorzellen (L-DTZ) bezüglich Marker-positiver Zellen mit balanciertem oder aberrantem CGH-Profil gibt.

Insgesamt waren bei Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas lymphogen disseminierte Tumorzellen (L-DTZ) häufiger CGH-positiv (siehe Abbildung 8). Bei der Unterteilung der Adenokarzinome nach der Lokalisation des Primärtumors, verdeutlichte sich dieser Trend im Kollektiv von Patienten mit nicht an der Papille lokalisiertem Primärtumor (PCA). Alle untersuchten L-DTZ hatten numerische Aberrationen und der Unterschied zu den hämatogen disseminierten Zellen (H-DTZ) wurde mit einem p-Wert von 0,019 signifikant. Bei Patienten mit an der Papille lokalisiertem Primärtumor (CPV) konnte nur eine H-DTZ, die CGH-positiv war, untersucht werden, so dass weitergehende Vergleiche mit dieser Zelle nicht sinnvoll waren. Es stellte sich aber heraus, dass 44,4% der L-DTZ aberrant waren und der Unterschied zur Situation bei Patienten mit PCA (100% aberrant) mit einem p-Wert von 0,004 hochsignifikant war (siehe Abbildung 9).

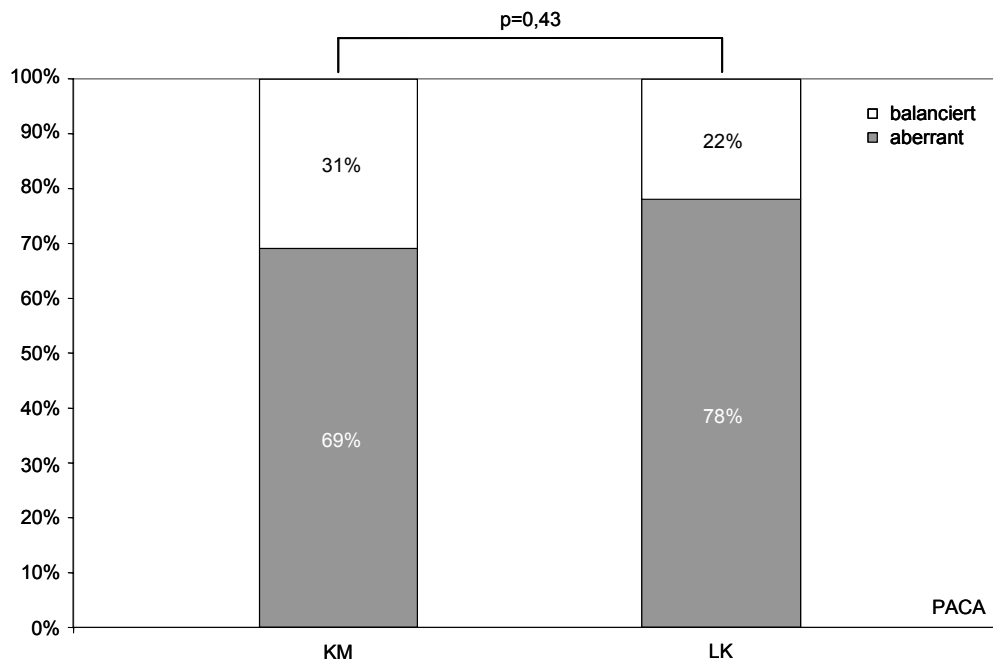


Abbildung 8 Anteil CGH-positiver Zellen beim Adenokarzinom (PACA) des Pankreas im klinischen Stadium M0

In Grau dargestellt ist der relative Anteil von Zellen mit Aberrationen. Auf der linken Seite befinden sich H-DTZ (KM: 22/32) und rechts L-DTZ (LK: 18/23). Mit einem p-Wert von 0,43 im Chi-Quadrat Test ist der Unterschied nicht signifikant.

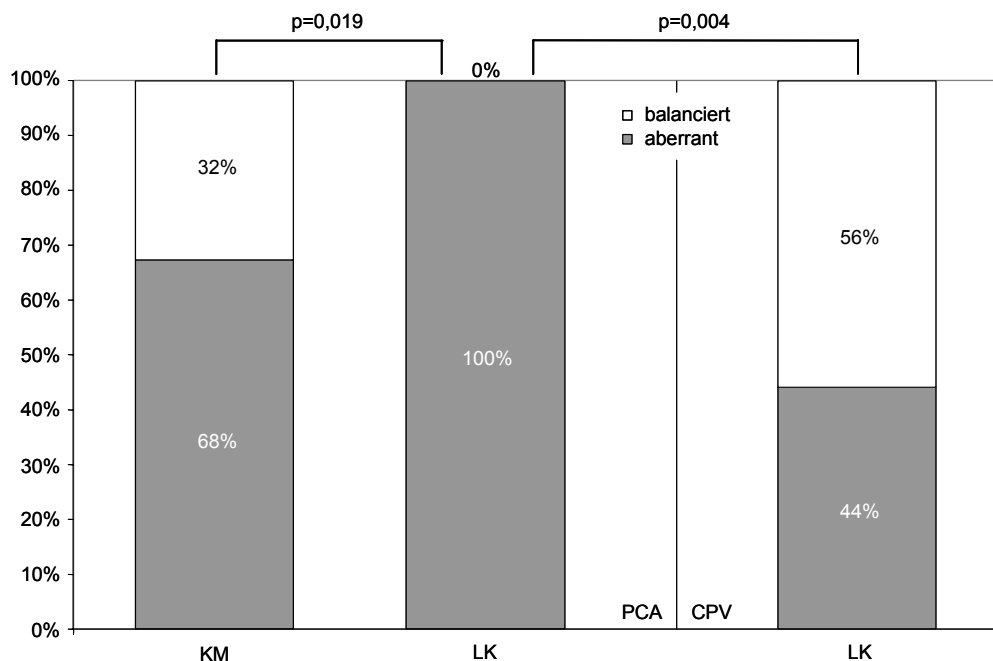


Abbildung 9 Anteil CGH-positiver Zellen beim Adenokarzinom des Pankreas im klinischen Stadium M0 unter Berücksichtigung der Lokalisation des Primärtumors

Die zwei linken Säulen stellen H-DTZ und L-DTZ von nicht an der Papille lokalisierten Primärtumoren gegenüber (PCA: KM:21/31; LK: 14/14). Alle L-DTZ haben numerische Aberrationen und der Vergleich mit H-DTZ ist signifikant ($p=0,019$, Fisher-Exakt). Bei Papillenkarzinomen (rechter Balken, CPV) sind 4 von 9 L-DTZ aberrant und der Vergleich mit PCA hochsignifikant ($p=0,004$, Fisher-Exakt). Auf die Darstellung der einen hämatogen disseminierten, CGH-positiven Zelle bei CPV wurde verzichtet.

Anders als bei Patienten mit CPV waren bei metastasierten Adenokarzinomen, bei intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien und bei neuroendokrinen Pankreastumoren L-DTZ häufiger CGH-positiv als -negativ. Sofern der Vergleich von L-DTZ mit H-DTZ innerhalb dieser Kollektive möglich war (metastasierte Adenokarzinome und neuroendokrine Pankreastumoren), waren wie oben beschrieben L-DTZ häufiger CGH-positiv als H-DTZ. Die jeweiligen Kollektive waren sehr klein, so dass diese Ergebnisse auch rein zufälliger Natur sein können (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24 Anzahl CGH-positiver und -negativer Zellen bei Adenokarzinom des Pankreas im klinischen Stadium M1 (PACA), intraduktaler papillär-muzinöser Neoplasie (IPMN) und neuroendokrinen Tumoren (NPCA)

PACA (M1)	Gesamtzahl	CGH-Profil aberrant	CGH-Profil balanciert
KM	5	2 (40,0%)	3 (60,0%)
LK	3	3 (100,0%)	0 (0,0%)
KM gegen LK, Fisher Exakt: n.s. (p=0,19)			
IPMN	Gesamtzahl	CGH-Profil aberrant	CGH-Profil balanciert
LK	3	2 (66,7%)	1 (33,3%)
NPCA	Gesamtzahl	CGH-Profil aberrant	CGH-Profil balanciert
KM	3	1 (33,3%)	2 (66,7%)
LK	7	4 (57,1%)	3 (42,9%)
KM gegen LK, Fisher Exakt: n.s. (p=0,99)			

Abschließend wurden alle untersuchten Zellen der verschiedenen Tumorentitäten zusammengefasst und die Analyse wiederholt. 62,5% (25/40) aller H-DTZ und 75% (27/36) aller L-DTZ waren CGH-positiv. Tumorzellen aus Lymphknoten waren öfters CGH-positiv, doch war die statistische Überprüfung dieses Unterschieds nicht signifikant (Chi-Quadrat: p=0,24).

3.4.3 Anzahl der DNA-Gewinne und -Verluste von Primärtumoren und Tumorzellen

Es ist bekannt, dass Primärtumoren mit fortschreitender Progression numerische Aberrationen akkumulieren. Um herauszufinden, in welchem Ausmaß die detektierten Tumorzellen chromosomale Instabilität aufwiesen, wurde die Anzahl numerischer Veränderungen CGH-positiver Zellen ausgezählt. Diese wurden in DNA-Gewinne und -Verluste unterteilt und mit den Daten der Primärtumoren verglichen. Zusätzlich wurde untersucht, welche DTZ mehr Ähnlichkeit mit den Primärtumoren hatten. Da diese Auswertung nur mit größeren Kollektiven sinnvoll ist, beschränkt sich das Kapitel auf das Kollektiv der Adenokarzinome im klinischen Stadium M0.

Primärtumoren, H-DTZ und L-DTZ unterschieden sich in der Gesamtzahl ihrer

numerischen Aberrationen deutlich voneinander (siehe Abbildung 10 und Tabelle 25). Die chromosomale Instabilität war im Primärtumorkollektiv am weitesten fortgeschritten. L-DTZ standen an zweiter Stelle gefolgt von H-DTZ mit der geringsten mittleren Zahl numerischer Veränderungen. Unterteilte man diese nach DNA-Gewinn und -Verlust, so stellte sich heraus, dass dieser Unterschied auf dem Verlust von Erbmaterial beruhte. Die größte Differenz war zwischen Primärtumoren und H-DTZ festzustellen ($p < 0,0001$). Primärtumoren enthielten im Mittel 7,2 DNA-Verluste pro Zelle und H-DTZ dagegen eine. H-DTZ waren auch die einzige Gruppe, innerhalb der die Anzahl der DNA-Gewinne den größeren Anteil an der Gesamtzahl ausmachte ($p = 0,004$). Diese Verteilung trennte H-DTZ auch deutlich von den beiden anderen Kollektiven: L-DTZ hatten gleichviel DNA-Gewinne und -Verluste, in Primärtumoren überwogen DNA-Verluste ($p = 0,049$). Sowohl die Untersuchung der Gesamtzahl wie auch die Verteilung der DNA-Gewinne und -Verluste zeigten eine größere Ähnlichkeit zwischen Primärtumoren und L-DTZ.

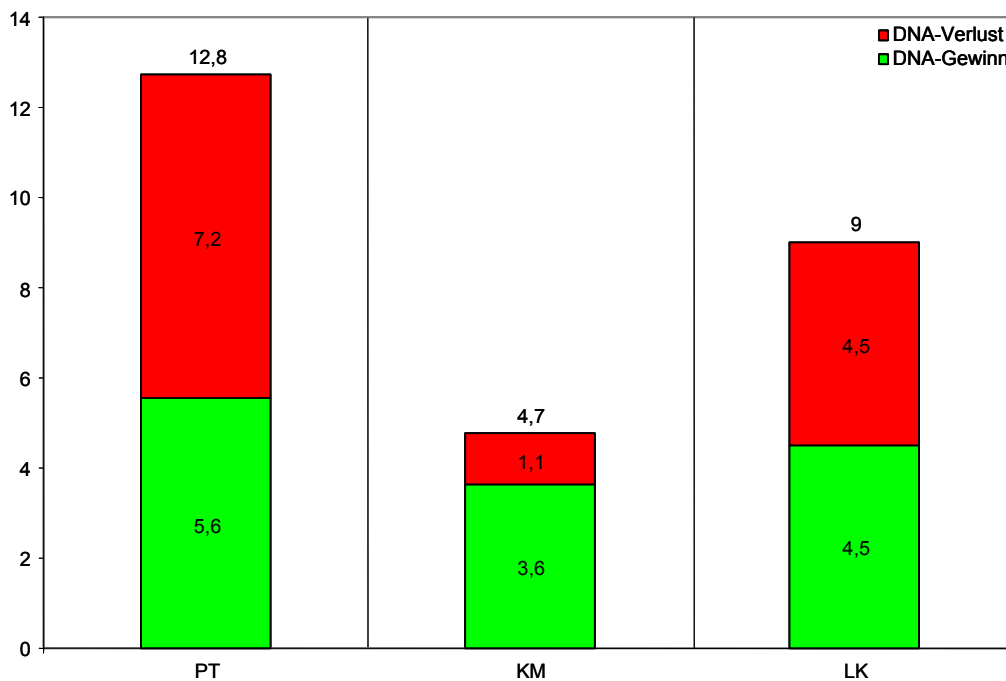


Abbildung 10 Durchschnittliche Anzahl der DNA-Gewinne und -Verluste

Das Säulendiagramm stellt die mittlere Gesamtzahl aller numerischen DNA-Veränderungen in Primärtumoren ($n=29$) denen in H-DTZ (KM: $n=22$) und L-DTZ (LK: $n=18$) gegenüber. Getrennt dargestellt sind DNA-Gewinne in grün und -Verluste in rot. Der deutliche Unterschied basiert auf der Verteilung von DNA-Verlusten (siehe auch Tabelle 25).

Tabelle 25 **Statistische Auswertung der mittleren Anzahl an Aberrationen mit dem Student t-Test**

DNA-Gewinne gegen -Verluste	PT KM LK	p=0,049 p=0,004 p=1
Gesamtzahl Aberrationen	PT gegen KM PT gegen LK KM gegen LK	p<0,0001 p=0,009 p=0,002
DNA-Gewinne	PT gegen KM PT gegen LK KM gegen LK	p=0,07 p=0,357 p=0,457
DNA-Verluste	PT gegen KM PT gegen LK KM gegen LK	p<0,0001 p=0,001 p=0,0002

3.4.4 Numerische Aberrationen von Primärtumoren und Tumorzellen beim Adenokarzinom des Pankreas

Im vorangehenden Kapitel wurde festgestellt, dass Primärtumoren und L-DTZ untereinander bezüglich ihrer Anzahl und Art der Aberrationen größere Ähnlichkeit aufweisen als H-DTZ zu Primärtumoren oder zu L-DTZ. Um diese Beobachtung weitergehend zu untersuchen, wurden die Chromosomenregionen mit DNA-Gewinnen und -Verlusten auf ihre Häufigkeit hin analysiert und typische Aberrationen der drei verschiedenen Kollektive miteinander verglichen. Dazu wurden kumulative Histogramme aller CGH-Profile eines Kollektivs erstellt, aus denen sich die relative Häufigkeit spezifischer Aberrationen ablesen lässt (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12). Sind die Zellen oder Proben eines Kollektivs in ihren Veränderungen sehr heterogen, so lassen sich keine Chromosomenregionen identifizieren, die häufiger betroffen sind. Gemeinsamkeiten im Muster numerischer Aberrationen dagegen deuten auf eine Selektion spezifischer Aberrationen hin.

Durch die CGH mehrerer DTZ eines Patienten wurden in einigen Fällen Zellen identifiziert, welche untereinander sehr große Ähnlichkeiten in ihrem Aberrationsmuster aufwiesen. Wenn mehrere solcher Zellen eines Patienten in die folgenden Analysen eingehen, wird den beobachteten Veränderungen fälschlicherweise eine zu hohe Bedeutung beigemessen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden solche Zellen zu Gruppen zusammengefasst und das Profil nur einer Zelle für die weiteren Analysen ausgewählt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Zellen eines Patienten, die aufgrund eines komplett abweichenden Aberrationsprofils nicht solchen Gruppen zugeordnet werden konnten, gingen alle in die Auswertung ein. Aus der Gruppe von Zellen mit ähnlichen Veränderungen eines Patienten wurde diejenige Zelle ausgewählt,

welche die geringste Ähnlichkeit mit den anderen bei der Auswertung berücksichtigten Zellen dieses Patienten aufwies. Insgesamt waren ein Patient mit H-DTZ und zwei Patienten mit L-DTZ betroffen (siehe Tabelle 26 und Anhang). Durch die Auswahl blieben 19 H-DTZ und zwölf L-DTZ von Patienten mit Adenokarzinom im klinischen Stadium M0 für die folgenden Auswertungen übrig.

Tabelle 26 Zusammenfassung ähnlich veränderter Zellen zu Gruppen. Gezeigt wird nur ein Teil der Chromosomenveränderungen, um die Einteilung in Gruppen und das Vorgehen bei der Auswahl zu verdeutlichen. Die ausgewählten Zellen sind fett hervorgehoben (DNA-Gewinn: grün. DNA-Verlust: rot).

Patient 2349

Gruppe	Zelle	1q	2q	5p	5q	7p	7q	8q	10q	13q	15q	20	22q
1	KMT1												
	KMT2												
	KMT9												
2	KMT3												
	KMT10												

Patient 3295

Gruppe	Zelle	4q	6q	7q	11p	12p	14q	17p	18p	18q	19p	19q	21q
1	LKT1												
	LKT2												
2	LKT3												
	LKT4												

Patient 3449

Gruppe	Zelle	3	4p	5q	8p	8q	9	17p	17q	18q	19p	21q	X
1	LKT1												
	LKT2												
	LKT4												
	LKT6												
	LKT7												
	LKT3												
	LKT5												

Aberrationen von Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen

Folgend wird untersucht, ob im Kollektiv der Primärtumoren oder im Gesamtkollektiv aller hämatogen und lymphogen DTZ häufig vorkommende, charakteristische Veränderungen auftreten. Innerhalb beider Kollektive wurde nach Chromosomenregionen gesucht, welche häufig von numerischen Aberrationen betroffen waren, um diese anschließend miteinander zu vergleichen. Zum Beispiel könnten charakteristische Veränderungen, welche vor allem in den gestreuten Zellen vorkommen, diese Zellen erst zur Disseminierung befähigen.

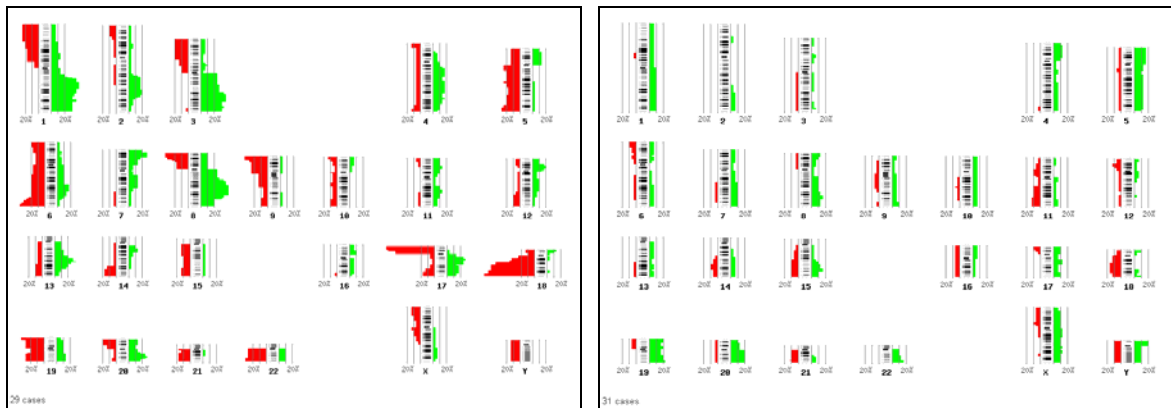


Abbildung 11 CGH-Ergebnisse der Primärtumoren (links) und aller disseminierter Tumorzellen (rechts)

Die kumulativen Histogramme von Primärtumoren (links) und aller DTZ (rechts) geben Lokalisation und relative Häufigkeit numerischer Aberrationen an. Große Balken sind Ausdruck einer Selektion spezifischer Aberrationen, wie sie im Primärtumorkollektiv zu finden ist (zum Beispiel DNA-Verluste auf Chromosom 17 und 18). In DTZ lassen sich dagegen keine häufigen Veränderungen finden.

Im Primärtumorkollektiv wurde eine Reihe charakteristischer numerische Aberrationen identifiziert, welche häufig anzutreffen waren. Insgesamt ließen sich 19 Regionen identifizieren, die in mehr als 30% aller untersuchten Primärtumoren von numerischen Veränderungen betroffen waren (neun mit einem DNA-Gewinn, zehn mit einem -Verlust). Zum Beispiel hatten 59% aller untersuchten Tumoren einen DNA-Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17. Ab der Bande 17p12 telomerwärts hatten sogar 72% der Tumoren DNA verloren. Ähnlich war die Situation auf dem q-Arm von Chromosom 18: 55% aller Proben wiesen einen DNA-Verlust auf, ab Bande 18q21 waren es 76%. Die Region, die mit 45% am häufigsten DNA hinzugewonnen hatte, war der Bereich von 8q21.3 bis 8q23.3. Im Gesamtkollektiv der DTZ wurden Regionen, die in über 30% der Fälle Veränderungen aufwiesen, nicht identifiziert. Nur Chromosom 19 war in mehr als 20% der Fälle von einem DNA-Gewinn betroffen. Der häufigste DNA-Verlust von DTZ war mit 16% der q-Arm des Chromosoms 18. Dies war Ausdruck der Heterogenität numerischer Aberrationen in diesem Kollektiv. Aus diesem Grund ließen sich im Gesamtkollektiv aller DTZ auch keine Aberrationen identifizieren, welche häufig mit dem Primärtumorkollektiv geteilt wurden. Andererseits war innerhalb der Primärtumoren die Selektion einer Reihe typischer Veränderungen festzustellen (siehe Abbildung 11 und Tabelle 27).

Tabelle 27 Häufigkeit und Lokalisation numerischer Veränderungen von Primärtumoren und Tumorzellen beim Adenokarzinom des Pankreas im klinischen Stadium M0

Primärtumoren (n=29)		
DNA-Gewinn	≥ 30%	9 Regionen: 1q (41%), 3q22q24 (35%), 3q25qter (41%), 7p15pter (31%), 8q11q13 (35%), 8q21q22 (41%), 8q23qter (45%), 17q11q21 (31%), 20q (33%)
	≥ 20%	6 Regionen: 2q32qter (21%), 3q11q21 (28%), 4q23q27 (21%), 12p (20%), 13q21qter (28%), 17q22qter (21%)
	≥ 10%	26 Regionen: 1p11p33 (10%), 2q22q31 (17%), 3p11p14 (10%), 4q11q22 (17%), 4q28qter (17%), 5p (14%), 6p11p21 (10%), 6q11q16 (10%), 6q21q22 (17%), 6q23qter (14%), 7p11p14 (14%), 7q11q31 (10%), 8p21pter (10%), 8p11p12 (14%), 11p14pter (14%), 11p11p13 (10%), 11q14q22 (14%), 11q23qter (10%), 12q11q22 (10%), 13q11q14 (14%), 14q11q23 (14%), 16p12pter (10%), 19p (10%), 19q (14%), 20p (17%), 22q (10%)
DNA-Verlust	≥ 30%	10 Regionen: 5q31qter (35%), 6q23qter (38%), 8p21pter (35%), 9p21pter (35%), 17p12pter (72%), 17p11 (59%), 18q11q12 (55%), 18q21qter (76%), 19p (38%), 22q (35%)
	≥ 20%	13 Regionen: 1p31pter (24%), 1p11p22 (21%), 3p21pter (21%), 5q11q14 (24%), 5q15q23 (21%), 6p22pter (21%), 6q11q22 (21%), 8p11p12 (14%), 9p11p13 (24%), 17q24qter (21%), 19q (24%), 20p (21%), 21q (21%)
	≥ 10%	18 Regionen: 2p22pter (10%), 3p11p14 (17%), 4p15pter (14%), 4q28qter (14%), 5p (14%), 6p11p21 (14%), 9q11q21 (14%), 9q31qter (10%), 10p13pter (14%), 10q (10%), 12q23qter (17,2%), 13q22qter (10%), 14q24q32 (17%), 15q (14%), 18p (14%), Xp (14%), Xq11q22 (10%), Y (14%)
Hämatogen und lymphogen disseminierte Tumorzellen (n=31)		
DNA-Gewinn	≥ 30%	-
	≥ 20%	2 Regionen: 19p (23%), 19q (23%)
	≥ 10%	15 Regionen: 4p (13%), 5p (16%), 5q11q14 (16%), 5q15qter (13%), 8p (13%), 8q23qter (16%), 15q22qter (16%), 17q11q21 (13%), 18q21qter (13%), 20p (16%), 20q11q13 (19%), 22q (16%), Xp (13%), Xq (13%), Y (19%)
DNA-Verlust	≥ 30%	-
	≥ 20%	-
	≥ 10%	4 Regionen: 11q23qter (13%), 12p11pter(13%), 18q (16%), 21q (13%)

Aberrationen von hämatogen und lymphogen disseminierten Tumorzellen

Um der Frage nachzugehen, ob die oben festgestellte Heterogenität sowohl bei H-DTZ wie auch L-DTZ anzutreffen ist, wurde das Gesamtkollektiv aller Tumorzellen wieder aufgeteilt. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass innerhalb einer dieser beiden Gruppen charakteristische Aberrationen selektiert werden.

Bei H-DTZ waren deutlich weniger DNA-Verluste und eine geringere Anzahl selektierter Veränderungen festzustellen als bei L-DTZ. Erstere wiesen fünf Regionen auf, deren DNA-Gewinn von mehr als 20% der Tumorzellen geteilt wurde. Bezüglich der DNA-Verluste konnten nur drei Regionen identifiziert werden, die in mehr als 10% der Zellen vorkamen. Im Gegensatz dazu zeigten L-DTZ eine deutlichere Selektion numerischer Aberrationen. Insgesamt wurden zehn Regionen identifiziert, die in über 20% der Zellen Veränderungen hatten. Weitere drei Regionen waren in mehr als 30% der Fälle betroffen. Die Aberrationen verteilten sich gleichmäßig auf DNA-Gewinne (sechs) und -Verluste (sieben). Nur der Gewinn von 19q13.4qter war bei beiden Gruppen ähnlich häufig repräsentiert (siehe Abbildung 12 und Tabelle 28).

Tabelle 28 Häufigkeit und Lokalisation numerischer Veränderungen von hämatogen und lymphogen disseminierten Tumorzellen beim Adenokarzinom des Pankreas im klinischen Stadium M0

Hämatogen disseminierte Tumorzellen (n=19)		
DNA-Gewinn	≥ 30%	-
	≥ 20%	5 Regionen: 5p (21%), 15q22qter (21%), 19q (21%), 20q (21%), Y (26%)
	≥ 10%	18 Regionen: 1q (11%), 2q32qter (11%), 5q11q14 (16%), 5q15qter (11%), 8p21pter (11%), 8q23qter (11%), 10p (11%), 10q (11%), 12p (11%), 12q11q14 (11%), 17q11q21 (11%), 18q21qter (11%), 19p (16%), 20p (16%), 21q (11%), 22q (16%), Xp (11%), Xq (11%)
DNA-Verlust	≥ 30%	-
	≥ 20%	-
	≥ 10%	3 Regionen: 11p11p13 (11%), 14q24qter (11%), Y(16%)
Lymphogen disseminierte Tumorzellen (n=12)		
DNA-Gewinn	≥ 30%	2 Regionen: 4p (33%), 19p (33%)
	≥ 20%	4 Regionen: 8q23qter (25%), 9q31q34 (25%), 18p (25%), 19q (25%)
	≥ 10%	19 Regionen: 3p21 (17%), 3q25qter (17%), 5q (17%), 6p11p21 (17%), 7q (17%), 8p21pter (17%), 8q11q22 (17%), 9p21pter (17%), 9q11q22 (17%), 13q22qter (17%), 16p (17%), 17p (17%), 17q11q21 (17%), 17q24qter (17%), 18q21q23 (17%), 20p (17%), 20q (17%), 22q (17%), Xq (17%)
DNA-Verlust	≥ 30%	1 Region: 18q (33%)
	≥ 20%	6 Regionen: 6p22pter (25%), 11q23qter (25%), 12p11pter (25%), 15q22qter (25%), 17p12pter (25%), 21q (25%)
	≥ 10%	6 Regionen: 6p11p21 (17%), 9q11q22 (17%), 11q14q22 (17%), 15q11q21 (17%), 18p11 (17%), Xp (17%)

Vergleich der Aberrationen zwischen Primärtumoren, hämatogen und lymphogen disseminierten Tumorzellen

Aus den vorangegangenen Analysen ergibt sich die Frage, welches der beiden Tumorzellkollektive mehr Ähnlichkeiten mit dem Primärtumorkollektiv aufweist.

Den kumulativen Histogrammen (siehe Abbildung 12) ließen sich einige interessante Tendenzen entnehmen: Bei H-DTZ wurde die geringste Anzahl von charakteristischen Aberrationen identifiziert und sie waren untereinander in ihrem Aberrationsmuster sehr heterogen. Dem gegenüber wiesen die Primärtumoren eine Selektion typischer Veränderungen auf, die weniger stark ausgeprägt auch in Tumorzellen aus Lymphknoten anzutreffen war. Dies erklärte sich vor allem aus der Zahl und Verteilung der DNA-Verluste, welche in L-DTZ und Primärtumoren zunehmend häufiger vorkamen und zum Teil auch ähnlich verteilt waren (siehe Tabelle 27 und Tabelle 28).

Im Detail betrachtet, war fast jede Veränderung des Primärtumorkollektivs auch in DTZ aufzufinden. Insbesondere die häufigeren Veränderungen der Chromosomenregionen 6p, 15q, 17p, 18q, 21q und Xp waren Primärtumoren und L-DTZ gemeinsam. Eine Ausnahme bildeten die Chromosomen 1, 3 und 22, deren DNA-Verluste und -Gewinne der Primärtumoren in den DTZ gar nicht oder nur in Einzelfällen anzutreffen waren. Die DNA-Gewinne von 5p, 15q und Y der H-DTZ sowie die DNA-Gewinne von 4p und 19 beziehungsweise die DNA-Verluste von 11q und 12p der L-DTZ waren in ihrer Häufigkeit (relativer Anteil $\geq 20\%$) charakteristisch für das jeweilige Tumorzellkollektiv (siehe Abbildung 12). Für die drei Kollektive wurde keine gemeinsame Aberration mit einem relativen Anteil über 20% gefunden.

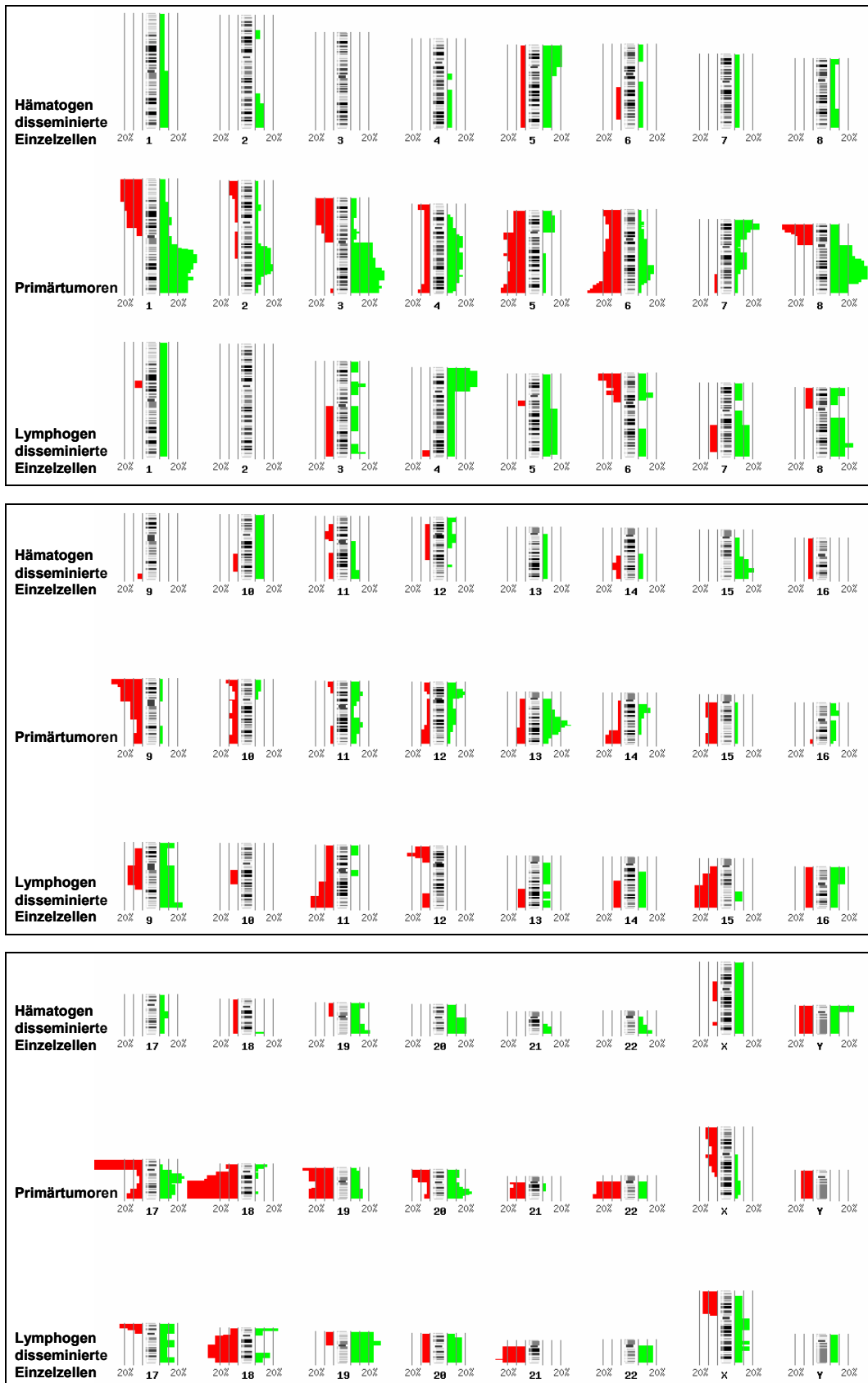


Abbildung 12 Direkter Vergleich der kumulativen Histogramme von Primärtumoren, hämatogen und lymphogen disseminierten Tumorzellen

Die numerischen Aberrationen veranschaulichen die Ähnlichkeit zwischen Primärtumoren und L-DTZ (siehe Chromosomregion 6p, 15q, 17p, 18q, 21q und Xp). Die DNA-Gewinne von 5p, 15q und Y der H-DTZ sowie die DNA-Gewinne von 4p und 19 bzw. die DNA-Verluste von 11q und 12p der L-DTZ sind in ihrer Häufigkeit typisch für das jeweilige Kollektiv.

Des Weiteren wurde eine hierarchische Ähnlichkeitsanalyse mit den oben vorgestellten CGH-Ergebnissen aller PT und DTZ durchgeführt (siehe Abbildung 13). Die Ähnlichkeit einzelner Proben lässt sich aus dem Dendrogramm rechts neben der Abbildung ablesen. Je kürzer die Astlänge zu einem Knoten zwischen zwei getesteten Proben ist, desto ähnlicher sind sie sich. Die verschiedenen Primärtumor- und Tumorzellproben werden nach ihren Gemeinsamkeiten im Dendrogramm von links nach rechts schrittweise zu größeren Gruppen zusammengefasst. Für die Beschreibung der Chromosomenregionen, die von numerischen Aberrationen betroffen waren, wurde die bei Clusteranalysen von CGH-Ergebnissen allgemein übliche Aufteilung nach Chromosomenarmen gewählt (siehe 2.2.13).

Die Ähnlichkeitsanalyse teilte die Primärtumoren und DTZ in zwei große Gruppen (A und B) auf. Gruppe A enthielt ausschließlich DTZ, die wenige Aberrationen und fast nur DNA-Gewinne hatten (9/19 H-DTZ und 4/12 L-DTZ). In Gruppe B wurden alle Primärtumoren zusammen mit den übrigen DTZ einsortiert. Diese unterschieden sich durch ihre Anzahl an Aberrationen und dem vermehrten Vorkommen von DNA-Verlusten von Gruppe A. Ihnen gemeinsam waren vor allem Verluste auf den Chromosomenarmen 5q, 6p, 15q, 17p, 18q und 21q. Die Gruppe B wurde in zwei Untergruppen (B1 und B2) aufgeteilt, die sich in ihrer Gesamtzahl an Aberrationen und insbesondere in ihren Veränderungen auf 3p, 6q, 9p, 17q, 19 und 22q unterschieden. B1 zeichnete sich durch DNA-Verluste dieser Regionen aus und enthielt die Proben, welche eine hohe Anzahl an Aberrationen aufwiesen. Es handelte sich dabei fast ausschließlich um Primärtumorproben. Die Ausnahme bildete eine H-DTZ, welche mit in diese Gruppe sortiert wurde und als einzige Veränderung einen DNA-Verlust von 19p hatte (B1: 20/29 Primärtumoren und 1/19 H-DTZ). In der Gruppe B2, die häufiger DNA-Gewinne in den oben erwähnten Regionen und insgesamt weniger Veränderungen als B1 hatte, wurden die übrigen Primärtumoren (9/29), H-DTZ (9/19) und L-DTZ (8/12) zusammengefasst (siehe Abbildung 13).

Die Clusteranalyse deckte vor allem die große Ähnlichkeit innerhalb des Primärtumorkollektivs auf (siehe B1). In der gleichmäßigen Verteilung von H-DTZ über A (47,4%) und B (52,6%) kam ihre Heterogenität zum Ausdruck. In den vorangegangenen Analysen wurde herausgearbeitet, dass L-DTZ in ihrem Aberrationsmuster Gemeinsamkeiten mit den Primärtumoren hatten. Die Clusteranalyse teilte zwei Drittel der L-DTZ in dieselbe Gruppe (B) mit den Primärtumoren ein und bietet ein weiteres Argument für diese Hypothese.

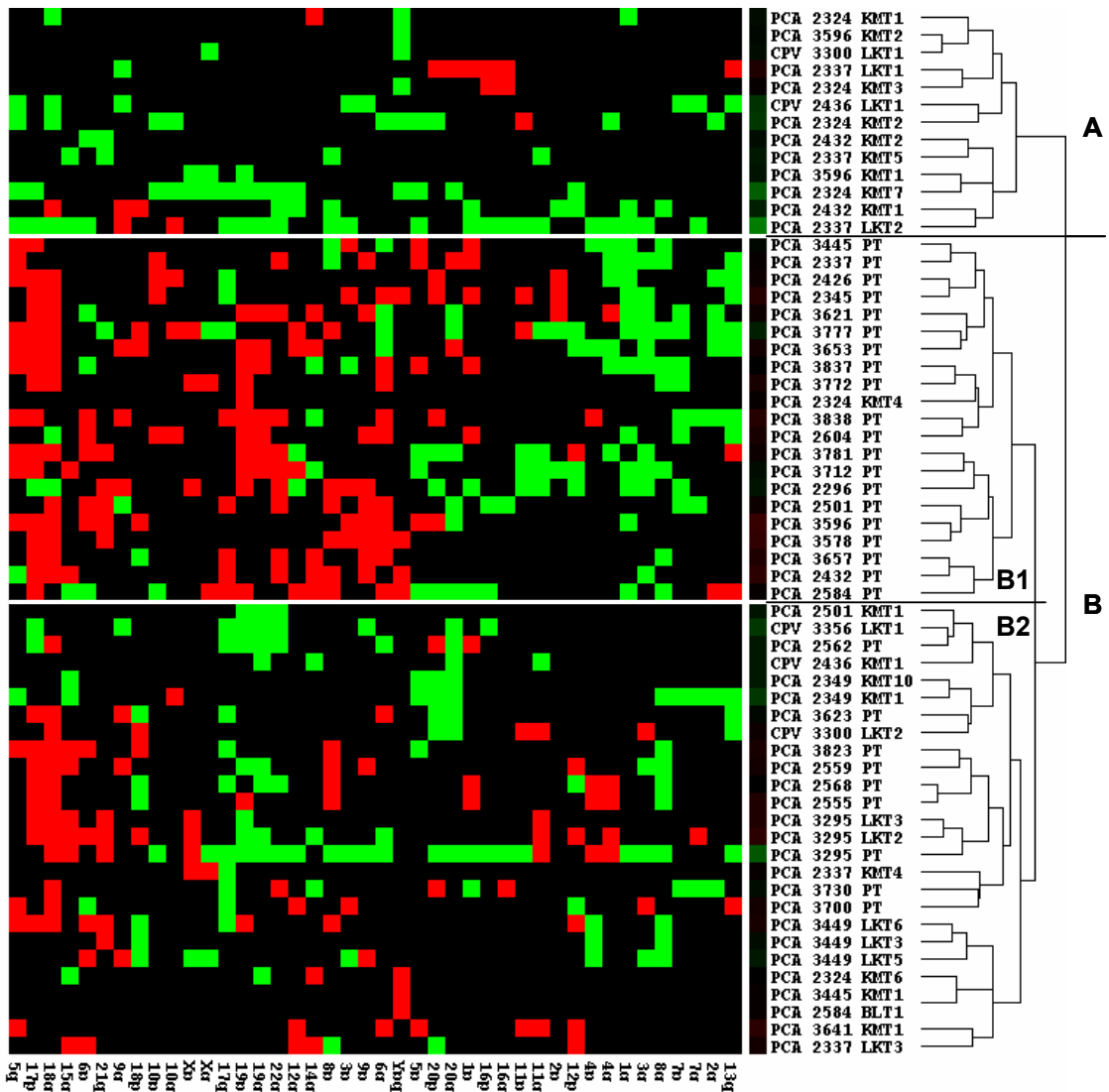


Abbildung 13 Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse von Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen

Cluster (Complete-linkage mode) und Dendrogramm der CGH-Daten von 29 Primärtumoren und 31 DTZ. Grüne Kästchen stehen für DNA-Gewinne und rote für -Verluste. Spalten zeigen die Chromosomenregionen, Zeilen die Primärtumoren und DTZ an.

Vergleich zwischen Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen desselben Patienten

Bei sieben Patienten mit nicht an der Papille lokalisiertem Pankreasadenokarzinom (PCA) war es möglich, die genomische DNA sowohl vom Primärtumor als auch von DTZ desselben Patienten zu analysieren (siehe Tabelle 29). Es ist denkbar, dass sich im direkten Vergleich gepaarter Proben Aberrationen finden lassen, die DTZ und Primärtumoren gemeinsam sind. Diese könnten bei wiederholtem Auftreten in Tumoren und Zellen verschiedener Patienten auf Chromosomenregionen hinweisen, deren Veränderung mit einer Disseminierung assoziiert ist.

Tabelle 29 Patienten, bei denen ein direkter Vergleich von Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen möglich war („+“: Probe erfolgreich bearbeitet, „-“: keine Probe vorhanden)

Patient	PT	KM	LK
2337	+	+	+
2432	+	+	-
2501	+	+	-
2584	+	+	-
3295	+	-	+
3445	+	+	-
3596	+	+	-

Patient 2337 war der einzige Fall, bei dem neben Primärtumordaten gleichzeitig CGH-Profile von H-DTZ (n=2) und L-DTZ (n=3) zur Verfügung standen. Bis auf eine der beiden Zellen aus dem Knochenmark hatten DTZ numerische Aberrationen mit dem Primärtumor gemeinsam. In Abbildung 14 ist die Verteilung der Anzahl gemeinsamer und ungeteilter Aberrationen angegeben. Nur der DNA-Gewinn von 8p23pter war in allen drei Gruppen vertreten (siehe Abbildung 15).

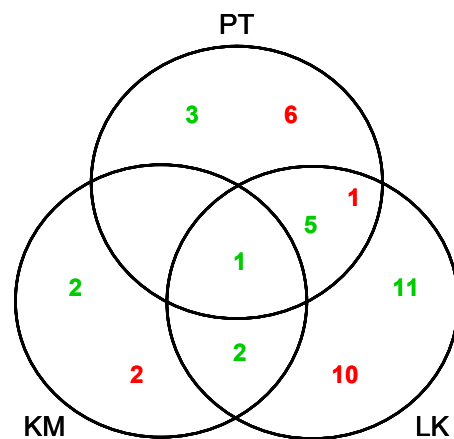


Abbildung 14 Venn-Diagramm der Verteilung numerischer Aberrationen von Primärtumor (PT), hämatogen (KM) und lymphogen disseminierten Tumorzellen (LK) des Patienten 2337

Die verschiedenen Schnittmengen zeigen die Anzahl der DNA-Gewinne (grün) und -Verluste (rot) von Primärtumor und DTZ. Nur ein DNA-Gewinn ist allen gemeinsam. Die Mehrzahl geteilter Aberrationen findet sich zwischen Primärtumor und Zellen aus Lymphknoten.

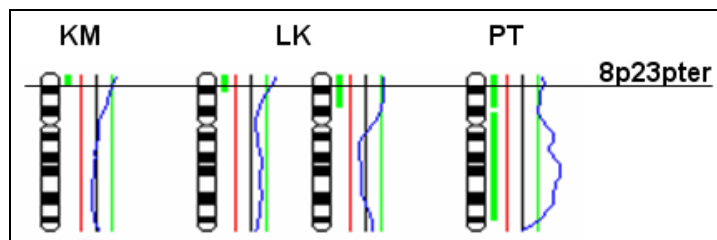


Abbildung 15 Identifikation des gemeinsamen DNA-Gewinns auf Chromosom 8 von Primärtumor (PT), hämatogen (KM) und lymphogen disseminierten Tumorzellen (LK) des Patienten 2337

Der Primärtumor teilt den DNA-Gewinn 8p23pter mit einer der beiden H-DTZ und zwei der drei L-DTZ, welche aus Knochenmark- bzw. Lymphknotenproben desselben Patienten isoliert wurden.

Bei drei der sechs Paare von Primärtumor und H-DTZ war jeweils eine gemeinsame Aberration zu finden. Primärtumor und L-DTZ dagegen hatten in den beiden untersuchten Fällen mehrere gemeinsame Veränderungen (Patient 2337: sieben, Patient 3295: vier). Beide Beobachtungen sprechen auch hier für eine größere Ähnlichkeit zwischen Primärtumor und L-DTZ. Die gemeinsamen Aberrationen gepaarter Proben waren allerdings von Patient zu Patient zu unterschiedlich, um einen möglichen Zusammenhang zwischen ihrem Auftreten und einer Disseminierung herstellen zu können. Nur der DNA-Gewinn auf 8p und der DNA-Verlust auf 18q waren mehrmals anzutreffen (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30 Gemeinsame Aberrationen von Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen desselben Patienten (Fett hervorgehoben sind Aberrationen, die mehrmals anzutreffen waren)

Patient	PT & KM		PT & LK		PT, KM & LK	
	Verluste	Gewinne	Verluste	Gewinne	Verluste	Gewinne
2337	0	8p23pter	20q13.3qter	1q21q41 3qcenq23 3q28qter 4qcenq22.1 4q24q28 8p12pter	0	8p23pter
2432	18q21qter	0	-	-	-	-
2501	0	0	-	-	-	-
2584	Y	0	-	-	-	-
3295	-	-	18q12.3qter 21q22qter Xp11.4pter	19pcenp13	-	-
3445	0	0	-	-	-	-
3596	0	0	-	-	-	-

Aberrationen von disseminierten Tumorzellen beim Papillenkarcinom

In den bisherigen Analysen DTZ von Papillenkarcinomen wurde festgestellt, dass im Vergleich zu Pankreaskarcinomen anderer Lokalisation die Tendenz zur lymphogenen Disseminierung stärker ausgeprägt (siehe 3.2.2) und der Anteil CGH-positiver Zellen im Lymphknoten kleiner war (siehe 3.4.2). Mit der CGH dieser Zellen (eine H-DTZ eines Patienten, vier L-DTZ von drei weiteren Patienten) wurde überprüft, ob sich trotz der geringen Fallzahlen auch Unterschiede im Muster numerischen Aberrationen von DTZ beim Papillenkarcinom (CPV) im Vergleich zum Pankreaskarcinom anderer Lokalisation (PCA) finden.

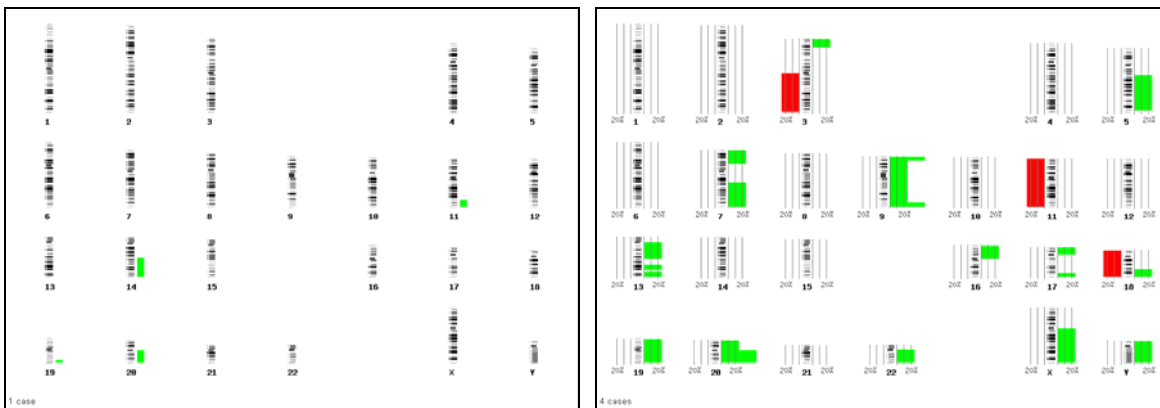


Abbildung 16 CGH-Ergebnisse von hämatogen (links) und lymphogen disseminierten Tumorzellen (rechts) beim Papillenkarcinom

Links ist das CGH-Profil der H-DTZ. Rechts befindet sich das Überlagerungsprofil der vier L-DTZ. Beide zeigen aufgrund ihrer Heterogenität und der überwiegenden Anzahl an DNA-Gewinnen Charakteristika, wie sie für H-DTZ beim Pankreasadenokarcinom typisch sind.

Die H-DTZ hatte vier DNA-Gewinne. Dieses Ergebnis deckte sich mit den vorangegangenen Beobachtungen bezüglich H-DTZ. Nur eine der vier L-DTZ hatte DNA-Verluste (insgesamt drei). Mit Chromosom 18 war auch in diesem Fall eine der am häufigsten von DNA-Verlusten betroffenen Regionen beteiligt. Alle vier hatten DNA-Gewinne, wobei nur auf Chromosom 9 und 20 Regionen zu identifizieren waren, deren Veränderung bei zwei Zellen vorkam. Die vier L-DTZ waren untereinander heterogen und im Mittel wurden vier DNA-Gewinne und 0,75 DNA-Verluste pro Zelle gezählt (siehe Abbildung 16). Damit zeigten sie Charakteristika, wie sie oben für H-DTZ beschrieben wurden.

Aberrationen von disseminierten Tumorzellen beim metastasierten Adenokarzinom

Bei metastasiertem Adenokarzinom wurden zwei CGH-positive H-DTZ und drei CGH-positive L-DTZ von jeweils einem Patienten auf ihre numerischen Aberrationen hin untersucht. Die beiden Zellen aus dem Knochenmark teilten keine einzige Aberration und enthielten durchschnittlich drei DNA-Gewinne und einen -Verlust. Die drei Zellen aus dem Lymphknoten dagegen waren sich sehr ähnlich. Mit im Mittel acht DNA-Gewinnen und 6,3 -Verlusten pro Tumorzelle hatten sie mehr Aberrationen als H-DTZ (siehe Tabelle 31, entsprechende CGH-Profile im Anhang).

Tabelle 31 Numerische Veränderungen disseminierter Tumorzellen bei metastasiertem Pankreaskarzinom. Angegeben sind ausschließlich Chromosomarme, auf denen sich Aberrationen befinden (DNA-Gewinn: grün. DNA-Verlust: rot)

Zelle	1p	1q	5p	5q	6q	7*	8q	10p	10q	12p	12q	13q
3425KMT2												
3425KMT3												
3311LKT1		grün	grün		rot	grün	grün			rot		rot
3311LKT2		grün	grün	rot	rot	grün	grün	rot	grün	rot	grün	rot
3311LKT3	rot	grün	grün	rot	rot	grün	grün	rot		rot		rot

Zelle	15q	16*	17p	17q	18*	19p	19q	20p	21q	22q	X*	Y
3425KMT2												rot
3425KMT3	grün	grün	grün	grün		grün	grün	grün		grün	rot	
3311LKT1							grün	grün			rot	
3311LKT2			grün		rot		grün	grün	rot		rot	
3311LKT3			grün	grün			grün	grün	rot			

* War das ganze Chromosom betroffen, wurde auf eine Unterteilung in p- und q-Arm verzichtet

3.4.5 Numerische Aberrationen der Tumorzellen bei intraduktaler papillär-muzinöser Neoplasie und neuroendokrinem Pankreastumor

Abschließend werden die CGH-Ergebnisse der DTZ von Patienten mit intraduktaler papillär-muzinöser Neoplasie und neuroendokrinem Pankreastumor tabellarisch aufgeführt (siehe Tabelle 32, entsprechende CGH-Profile im Anhang). Eine weitergehende Analyse erscheint bei der sehr geringen Anzahl bearbeiteter Proben nicht sinnvoll.

Die beiden L-DTZ von Patienten mit IPMN teilten zwei DNA-Verluste auf den Chromosomen 20 und 22. Diesen Veränderungen kam den L-DTZ innerhalb des unter 3.4.4 beschriebenen Kollektivs keine besondere Bedeutung zu. Alle untersuchten Tumorzellen von Patienten mit NPCA hatten mehr DNA-Gewinne als -Verluste. Die H-DTZ war mit insgesamt 26 numerischen Aberrationen die Zelle mit den meisten Veränderungen überhaupt. Die vier L-DTZ, welche alle von einem Patienten stammten, waren untereinander heterogen und nur eine dieser Zellen enthielt einen DNA-Verlust auf Chromosom 21.

Tabelle 32 Anzahl und Lokalisation numerischer Aberrationen bei intraduktaler papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) und neuroendokrinem Pankreastumor (NPCA)

		DNA-Gewinn		DNA-Verlust	
IPMN	Anzahl	Lokalisation	Anzahl	Lokalisation	
3271LKT1	0	-	3	19, 20pcenp11.2, 20q, 22q13qter	
3273LKT2	2	5pcenp15.2, 19pcenp13.2	2	20q13.2qter, 22q13qter	
		NPCA			
NPCA	Anzahl	Lokalisation	Anzahl	Lokalisation	
3456KMT1	21	1pcenp31.1, 1q32.3qter, 2q37qter, 3, 4, 5, 6, 7p, 8qcenq12, 8q21.2qter, 10pcenp13, 10q, 12p, 12qcenq23, 13q31qter, 15q21q26.1, 16, 17p, 18, 19q, 22q, X, Y	5	2pcenp21, 7q31.3qter, 8p12p21, 11p15pter, 11q23.3qter	
2506LKT2	7	7p12pter, 7q21qter, 9, 10p, 10qcenq21, 10q23.3qter, 13q, 20p11.2pter	0	-	
2506LKT4	1	20	0	-	
2506LKT5	1	14q32qter	0	-	
2506LKT6	5	5qcenq15, 5q22q34, 12q13.3q22, 16qcenq22, 19q13.4qter	1	21q22.2qter	

4 DISKUSSION

Das Hauptaugenmerk dieser Studie galt Adenokarzinomen des Pankreas. Die Anzahl der Proben von Patienten mit neuroendokrinem Pankreastumor oder intraduktaler papillär-muzinöser Neoplasie war sehr gering und es konnten keine Primärtumoren analysiert werden. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse dieser beiden Tumorentitäten nicht ausführlicher diskutiert, sondern lediglich denen der Adenokarzinome gegenübergestellt.

4.1 Immunzytochemische Färbung

Die prognostische Relevanz disseminierter Tumorzellen (DTZ) von Patienten mit Pankreaskarzinom, die durch immunzytochemische Färbungen mit den monoklonalen Antikörpern A45-B/B3 gegen Zytokeratine im Knochenmark oder BerEP4 gegen das Zelladhäsionsmolekül EpCAM im Lymphknoten detektiert wurden, ist in zahlreichen Studien belegt (Roder, Thorban et al. 1999) (Thorban, Roder et al. 1999) (Hosch, Knoefel et al. 1997) (Bogoevski, Yekebas et al. 2004) (Yekebas, Bogoevski et al. 2006). Aus diesem Grund wurden die beiden Antikörper A45-B/B3 und BerEP4 auch in dieser Arbeit zur Detektion von DTZ verwendet, welche dann molekulargenetisch charakterisiert wurden.

Die IgG₁-Isotypkontrolle unspezifischer Bindungen in der Färbung wurde mit dem Antikörper MOPC21 durchgeführt. Der Anteil von Proben mit positiver Isotypkontrolle betrug bei Knochenmarkszellen 5,5% und bei Lymphknotenzellen 8,3%. Beides steht im Einklang mit früheren Studien (Schlimok, Funke et al. 1987) (Pantel, Schlimok et al. 1994b) (Vogel 2001). Der Unterschied zwischen Knochenmark- und Lymphknotenproben war nicht signifikant ($p=0,69$). Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich die Zellen dieser beiden Organe in ihrer unspezifischen Bindung von IgG₁-Antikörpern aus der Maus nicht unterscheiden.

Frequenz Zytokeratin- und EpCAM-positiver Zellen

Bei Patienten mit nicht metastasiertem Pankreasadenokarzinom lag die Frequenz Zytokeratin-positiver (CK-positiver) Zellen im Knochenmark bei 23,0%, also im Rahmen veröffentlichter Daten, welche die Frequenz A45-B/B3-positiver Zellen im Knochenmark von Patienten mit Pankreaskarzinom untersuchten (18,6%-23,7%). In der Literatur werden

zum Teil auch wesentlich höhere Detektionsraten für DTZ beschrieben, doch erklärt sich dieser Unterschied aus der Kombination mehrerer Antikörper zum Nachweis von DTZ. So wurden mit der Kombination von fünf verschiedenen Antikörpern (C1P83 gegen CEA, CA19-9 gegen einen Bestandteil des Lewis-a-Blutgruppenantigens, 17-1-A gegen EpCAM, Ra96 gegen tumorassoziiertes Muzin und KL-1 gegen Zytokeratine) in 38% der Patientenproben DTZ nachgewiesen (Vogel, Kruger et al. 1999). Die Detektionsraten der einzelnen Antikörper, soweit erwähnt, erbrachten zum Teil ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit (CA19-9: 23%, C1P83: 13% und KL1: 12%). Bei der gleichzeitigen Anwendung von drei verschiedenen Antikörpern gegen Zytokeratine (CK2, KL-1 und A45-B/B3) wurden CK-positive Zellen in 58,3% (Thorban, Roder et al. 1996) beziehungsweise 52,0% (Roder, Thorban et al. 1999) (Thorban, Roder et al. 1999) der Knochenmarkproben gefunden. Die Detektionsrate für A45-B/B3 alleine wurde mit 19,0% beziehungsweise 18,6% angegeben. In einer weiteren Studie zum Pankreaskarzinom wurden DTZ im Knochenmark allein mit dem Antikörper A45-B/B3 gefärbt (Yekebas, Bogoevski et al. 2006). In diesem Fall war die Frequenz positiver Zellen mit 23,7% nahezu identisch mit dem Ergebnis der eigenen Untersuchung. Die Anzahl der untersuchten Knochenmarkproben in der vorliegenden Arbeit (n=61) lag in einem ähnlichen Bereich wie bei den oben erwähnten Studien (n=42-80), so dass das Ergebnis der eigenen Untersuchung durchaus vergleichbar und repräsentativ erscheint.

In der vorliegenden Studie wurde auch im Knochenmark von Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom (n=16) nach CK-positiven Zellen gesucht. Überraschenderweise war nur eine Probe positiv (6,3%). In der Literatur wurden keine Angaben zur Disseminierung A45-B/B3-positiver Zellen bei metastasiertem Pankreaskarzinom gefunden, doch wurde eine nicht signifikante Zunahme von DTZ im Knochenmark bei Patienten mit fortgeschrittenem, nicht operablem im Vergleich zu operablem Pankreaskarzinom beschrieben (58,8% zu 48,4%) (Roder, Thorban et al. 1999). Allerdings ist der Veröffentlichung nicht zu entnehmen, ob es sich nur um lokal fortgeschrittene oder auch metastasierte Karzinome handelte. Eine weitere Arbeit, welche DTZ auch im Knochenmark mittels einer quantitativen RT-PCR für Zytokeratin 20 (CK20) nachwies, zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Detektionsrate und UICC-Klassifizierung der Erkrankung. Mit zunehmender Tumorgroße, bei Metastasierung wie auch bei positivem Lymphknotenstatus wurde eine Zunahme von CK20-positiven Knochenmarkspiraten beobachtet (Soeth, Grigoleit et al. 2005). Allerdings wurden die Proben, welche auf RNA von CK20 hin untersucht wurden, unmittelbar präoperativ entnommen. Aus diesem Grund ist es durchaus denkbar, dass die RT-PCR zirkulierende RNA aus nekrotisierten Zellen des Primärtumors nachwies und nicht die von DTZ im Knochenmark. Vor diesem Hintergrund bleiben die eigenen Ergebnisse unklar und

müssen in weiteren Untersuchungen mit einem größeren Patientenkollektiv abgeklärt werden.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde bei 21 Patienten mit Pankreasadenokarzinom im klinischen Stadium M0 nach EpCAM-positiven Zellen im Lymphknoten gesucht (von Patienten mit Metastasen stand nur eine Lymphknotenprobe für die Färbung zur Verfügung, welche positiv getestet wurde). In 38,1% der Patienten gelang der Nachweis EpCAM-positiver Zellen. Die ermittelte Detektionsrate war geringer als in vergleichbaren Studien. Das mag in erster Linie daran liegen, dass bei diesen Studien in wesentlich mehr Lymphknoten eines Patienten nach EpCAM-positiven Zellen gesucht wurde als in der vorliegenden Arbeit. So wurden in 72,2% (Hosch, Knoefel et al. 1997), 58,3% (Bogoevski, Yekebas et al. 2004) beziehungsweise 68,9% (Yekebas, Bogoevski et al. 2006) der Patienten EpCAM-positiv Zellen gefunden. In der Untersuchung von Hosch, Knoefel et al. 1997 wurden diese Zellen häufiger bei Patienten im Stadium N0 als bei Patienten im Stadium N1 gefunden (N0: 75,0%, N1:66,6%). Allerdings war das untersuchte Patientenkollektiv (n=18) ähnlich klein wie in der vorliegenden Arbeit. Dagegen wurde eine Zunahme EpCAM-positiver Patientenproben im Stadium N1, wie sie auch in der eigenen Studie anzutreffen war (N0: 33,3%, N1: 44,4%), in einer Untersuchung von 106 Patienten bestätigt (Yekebas, Bogoevski et al. 2006).

Pankreaskarzinome zeigen eine Tendenz zur lymphogenen Disseminierung

Im Vergleich der Frequenz CK-positiver Zellen im Knochenmark mit EpCAM-positiven Zellen im Lymphknoten zeigte sich eine Tendenz zur lymphogenen Disseminierung ($p=0,18$). Die einzige vergleichbare Studie über Pankreaskarzinome bestätigte diesen Trend mit einem signifikantem Ergebnis ($p<0,0001$) und zeigte keine signifikante Assoziation zwischen der Detektion CK-positiver Zellen im Knochenmark und EpCAM-positiver Zellen im Lymphknoten (Yekebas, Bogoevski et al. 2006).

Für den Vergleich von hämatogener und lymphogener Disseminierung wurde das Kollektiv der Adenokarzinome nach der Lokalisation des Primärtumors in Papillenkarzinome und Pankreaskarzinome anderer Lokalisation aufgeteilt. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden Papillenkarzinome nach ihrer Histologie in einen intestinalen und pankreatobiliären Typ aufgeteilt (Fischer and Zhou 2004) und Patienten mit Karzinomen intestinalen, rein biliären oder unklaren Ursprungs ausgeschlossen. Papillenkarzinome sind aufgrund ihrer Frühsymptomatik bei der Operation weniger weit fortgeschritten als Pankreaskarzinome anderer Lokalisation (siehe 1.1.3). Diese Auftrennung nach der Lokalisation des Primärtumors bietet möglicherweise

einen Einblick in die Vorgänge der Disseminierung früher Tumorstadien des Pankreaskarzinoms. Nach bestem Kenntnisstand gibt es keine Daten über Färbeexperimente mit einem ähnlichen Ansatz, welche die Disseminierung von Papillenkarcinomen pankreatischen Ursprungs beschreiben. In der vorliegenden Studie wurde beim Papillenkarcinom pankreatischen Ursprungs (CPV) festgestellt, dass die Tendenz zur lymphogenen Disseminierung stärker ausgeprägt war als bei Pankreaskarcinomen anderer Lokalisation (siehe Tabelle 20). Patienten mit Papillenkarcinom des pankreatobiliären Typs haben ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben und eine höhere Inzidenz für Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu Patienten mit Papillenkarcinom intestinalen Ursprungs (Kimura, Futakawa et al. 2004). Pankreaskarcinome haben zum Zeitpunkt der Operation in Abhängigkeit von der Tumorgröße in über 50% der Fälle regionäre Lymphknotenmetastasen. Bei Fernmetastasierung sind organferne Lymphknotenmetastasen am zweithäufigsten anzutreffen. Auch werden hämatogen gestreute Metastasen im Vergleich zu lymphogen gestreuten Metastasen erst in fortgeschritteneren Krankheitsstadien gefunden (Yeo, Hruban et al. 2002). Der festgestellte Trend zur lymphogenen Disseminierung beim Papillen- und Pankreaskarcinom könnte diesen Beobachtungen zugrunde liegen und das Ergebnis der Färbeexperimente kann dahingehend interpretiert werden, dass beim Papillen- und Pankreaskarcinom die lymphogene Disseminierung im Vergleich zur hämatogenen Disseminierung schon in sehr frühen Stadien eine bedeutendere Rolle spielt. Die Ergebnisse zum Papillenkarcinom basieren allerdings auf der Untersuchung von Knochenmarkproben von acht und Lymphknotenproben von sechs Patienten und müssen mit größeren Fallzahlen überprüft werden.

Die Detektionsrate CK-positiver Zellen in Blutproben war erwartungsgemäß sehr gering. Auch ist ihre prognostische Relevanz umstritten und nicht hinreichend geklärt. Zur Bearbeitung von Blutproben werden andere Methoden für Anreicherung und Detektion von DTZ benötigt, als die bei dieser Studie verwendeten (Pantel, Cote et al. 1999). So wurden zum Beispiel bei der Untersuchung von Blutproben mittels quantitativer RT-PCR für CK20, dessen Nachweis als Indiz für zirkulierende Tumorzellen gewertet werden kann, wesentlich höhere Detektionsraten erzielt (Soeth, Grigoleit et al. 2005). In der vorliegenden Studie wurden in drei von 21 (14,3%) der untersuchten Blutproben CK-positive Zellen nachgewiesen. Von den drei detektierten Zellen ging eine bei der Bearbeitung verloren. Die beiden anderen wurden für die folgenden Analysen den hämatogen disseminierten Zellen zugeordnet. In der CGH wurden nur bei einer der beiden Zellen numerische Aberrationen nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Dissertation diente die immunzytochemische Färbung in erster Linie dazu, Zellen epithelialen Ursprungs zu identifizieren. Anschließend wurden sie isoliert und

ihre DNA amplifiziert, um sie mit der CGH auf genomische Veränderungen zu analysieren.

4.2 Genomische Charakterisierung

Bei der Etablierung der Adapter-Linker-PCR und CGH für DNA-Proben einzelner Zellen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Christoph A. Klein wurde in verschiedenen Kontrollexperimenten die Zuverlässigkeit der Methoden überprüft und bestätigt. Zum Beispiel wurde die homogene Amplifikation der DNA an normalen diploiden Zellen getestet, welche wie gefordert keine CGH-Aberrationen zeigten. Um zu beweisen, dass bekannte numerische Aberrationen mit der CGH identifiziert werden, wurden Experimente mit der DNA einer einzelnen Zelle von einem Patienten mit Down-Syndrom durchgeführt. Das CGH-Profil wies ausschließlich die erwartete Trisomie von Chromosom 21 nach (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999). Als Kontrolle der eigenen Versuche dienten Experimente mit patienteneigenen, ungefärbten Zellen, welche in regelmäßigen Abständen durchgeführt wurden (n=12). Mit diesen normalen diploiden Zellen wurde identisch wie mit Marker-positiven Zellen verfahren. Die CGH-Profile aller zwölf durchgeführten Kontrollversuche (siehe Anhang) hatten keine signifikanten Aberrationen und somit wurde die Qualität von Adapter-Linker-PCR und Einzelzell-CGH bestätigt.

Marker-positive Zellen sind Tumorzellen

Mit dem Nachweis numerischer Aberrationen in der CGH wurde gezeigt, dass es sich um DTZ mit chromosomaler Instabilität handelt. Marker-positive Zellen mit numerischen Aberrationen, die mit der CGH detektierbar waren, werden folgend als CGH-positiv bezeichnet. Marker-positive Zellen ohne Veränderungen werden entsprechend als CGH-negativ bezeichnet. Der Nachweis numerischer Aberrationen ist neben der Expression epithelialer Marker ein weiteres Charakteristikum, welches DTZ als Tumorzellen identifiziert. In der Analyse aller isolierten Marker-positiven Zellen wiesen lymphogen disseminierte Tumorzellen häufiger numerische Aberrationen auf als hämatogen disseminierte (75,0% zu 62,5%, $p=0,24$). Bei Patienten mit Pankreasadenokarzinom im Stadium M0 waren 78,0% der lymphogen disseminierten Tumorzellen (L-DTZ) und 69,0% der hämatogen disseminierten Tumorzellen (H-DTZ) CGH-positiv ($p=0,43$). Deutlich war dieser Unterschied bei Berücksichtigung der Lokalisation des Primärtumors zu erkennen. Bei nicht an der Papille lokalisierten Pankreaskarzinomen (PCA) waren im Gegensatz zu 68,0% der H-DTZ alle L-DTZ CGH-positiv ($p=0,019$). L-DTZ bei Papillenkarzinomen

(CPV) waren dagegen nur zu 44,0% CGH-positiv und es ließ sich ebenfalls ein klarer Unterschied im Anteil CGH-positiver L-DTZ zwischen PCA und CPV feststellen (siehe Abbildung 9, $p=0,004$). Auch bei metastasierten Pankreaskarzinomen und neuroendokrinen Pankreastumoren waren L-DTZ häufiger CGH-positiv als H-DTZ.

CGH-negative Zellen könnten unspezifisch gefärbte Zellen mit normalem Karyotyp sein. Der Anteil CGH-negativer Zellen an allen isolierten Marker-positiven Zellen lag bei H-DTZ (37,5%) und bei L-DTZ (25,0%) jedoch erheblich über der Rate falsch-positiver Zellen in der Isotypenkontrolle. Auch spricht der festgestellte Unterschied im Anteil CGH-negativer Zellen zwischen H-DTZ und L-DTZ sowie zwischen L-DTZ bei Papillenkarzinomen und Pankreaskarzinomen anderer Lokalisation im klinischen Stadium M0 gegen die Annahme eines unspezifischen Effekts. Unter Umständen handelt es sich bei CGH-negativen Zellen um eine Population von DTZ, welche numerische Aberrationen unterhalb des Auflösungsvermögens der Metaphasen-CGH (10-20 Mb) haben. Es stellt sich die Frage, ob sich CGH-negative Zellen in früheren Stadien genetischer Instabilität befinden, bevor Aberrationen mit dieser Methode detektierbar sind. Es gibt weitere Methoden, wie zum Beispiel LOH-Analysen, welche mit höherer Auflösung auch bei CGH-negativen Zellen numerische Aberrationen nachweisen (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003) (Schardt, Meyer et al. 2005). Für das Pankreaskarzinom wurde gezeigt, dass mit der Array-CGH wesentlich mehr Aberrationen detektiert werden als mit der Metaphasen-CGH (Holzmann, Kohlhammer et al. 2004). Mit den CGH-negativen Zellen dieser Studie wurden solche Untersuchungen nicht durchgeführt, so dass ihre Abstammung vom Primärtumor nicht endgültig bewiesen ist. Handelt es sich bei CGH-negativen Zellen um DTZ ohne chromosomale Instabilität und also um Zellen im Frühstadium der genetischen Progression, so könnten die Unterschiede im Prozentsatz CGH-positiver Zellen zwischen H-DTZ und L-DTZ beim Pankreaskarzinom darauf hindeuten, dass L-DTZ weiter fortgeschritten sind als H-DTZ. Ebenso wären L-DTZ von extrapapillär lokalisierten Pankreaskarzinomen im Vergleich zu L-DTZ beim Papillenkarzinom weiter fortgeschritten.

Disseminierte Tumorzellen haben weniger Aberrationen als Primärtumoren

Für die meisten soliden Tumoren ist das häufige Vorkommen einer chromosomalen Instabilität und die daraus resultierende Aneuploidie beschrieben (Mitelman, Johansson et al. 1994). Insbesondere die Mutation von Genen, welche der Mitose zugeordnet werden, kann in eine chromosomale Instabilität münden. Veränderte Gene steuern beispielsweise Chromosomenkondensation, Paarung von Schwesterchromatiden, Ausbildung und Funktion von Kinetochor, Zentromer sowie Mikrotubuli. Einige Autoren sprechen von bis zu hunderten verschiedenen Genen, deren Veränderung eine Rolle bei der Entwicklung

chromosomaler Instabilität spielen könnte (Rajagopalan and Lengauer 2004). Sie ist ein frühes Ereignis in der Tumorprogression, treibt sie zunehmend an und es wird davon ausgegangen, dass sie die Grundlage der genomischen Heterogenität vieler Primärtumoren ist (Lengauer, Kinzler et al. 1998) (Duesberg, Rasnick et al. 1999) (Rajagopalan and Lengauer 2004) (Kops, Weaver et al. 2005) (Gorgoulis, Vassiliou et al. 2005). Chromosomale Instabilität wurde beim Pankreaskarzinom bereits in Vorstufen des duktales Adenokarzinoms, sogenannten PanINs, beschrieben (Yamano, Fujii et al. 2000) (Luttges, Galehdari et al. 2001). Mit zunehmender Progression und fortschreitender chromosomaler Instabilität wurden vermehrt numerische Aberrationen im Primärtumor nachgewiesen (Ried, Heselmeyer-Haddad et al. 1999) (Harada, Okita et al. 2002a) (Luttges, Galehdari et al. 2001) (Baumgart, Heinmoller et al. 2005). Ähnliches wurde bei DTZ des Mammakarzinoms festgestellt: Tumorzellen von Patienten ohne Metastasen hatten weniger Aberrationen als solche von Patienten mit Metastasen (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003). Über DTZ von Pankreaskarzinomen wurden bisher keine CGH-Daten veröffentlicht. In der vorliegenden Dissertation wurde erstmals ein Vergleich zwischen den numerischen Veränderungen von Primärtumoren und DTZ unternommen.

Die CGH-Ergebnisse von Patienten mit Pankreasadenokarzinom im Stadium M0 deckten einen signifikanten Unterschied in der durchschnittlichen Anzahl an Aberrationen zwischen H-DTZ, L-DTZ und Primärtumoren auf (siehe Abbildung 10 und Tabelle 25). Die meisten numerischen Aberrationen hatten Primärtumoren (12,8). L-DTZ hatten am zweithäufigsten Aberrationen (9) und die wenigsten Veränderungen konnten bei H-DTZ festgestellt werden (4,7). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass sich disseminierte Tumorzellen, insbesondere H-DTZ, in früheren Stadien chromosomaler Instabilität befinden als Primärtumoren. Die Differenz in der Anzahl der Aberrationen zwischen H-DTZ, L-DTZ und Primärtumoren beruhte in erster Linie auf der signifikant unterschiedlichen Verteilung von DNA-Verlusten. Die Anzahl der DNA-Gewinne dagegen war bei H-DTZ, L-DTZ und Primärtumoren ähnlich. Bei H-DTZ waren mehr DNA-Gewinne als -Verluste festzustellen ($p=0,004$). Das Verhältnis von DNA-Gewinnen zu -Verlusten war in L-DTZ ausgewogen und in Primärtumoren dominierten dagegen DNA-Verluste ($p=0,049$). Ein Überwiegen von DNA-Verlusten im Primärtumor wurde auch in den CGH-Studien von Harada, Okita et al. 2002a und Schleger, Arens et al. 2000 beobachtet. Eine weitere Studie beschreibt zwar ein Überwiegen von DNA-Gewinnen, doch betonen die Autoren, dass sich die untersuchten Primärtumoren hauptsächlich in frühen TNM-Stadien befanden (T1 und T2) (Schleger, Arens et al. 2000). Dies kann zusammen mit dem Überwiegen von DNA-Gewinnen in H-DTZ, welche sich von den drei untersuchten Kollektiven im frühesten Stadium chromosomaler Instabilität befanden, als Indiz für die Hypothese gewertet werden, dass DNA-Gewinne in frühen Stadien der Tumorprogression

des Pankreaskarzinoms häufiger anzutreffen sind als DNA-Verluste. In der Steigerung der Anzahl von DNA-Verlusten von H-DTZ über L-DTZ zu Primärtumoren könnte ihre zunehmende Bedeutung bei der weiteren Tumorprogression zum Ausdruck kommen.

Analyse und Vergleich der Verteilung von DNA-Gewinnen und -Verlusten dieser drei Gruppen erbrachten einen ersten Hinweis für Ähnlichkeiten zwischen Primärtumoren und L-DTZ. Um dem weiter nachzugehen, wurde nach spezifischen Aberrationen für H-DTZ, L-DTZ und Primärtumoren gesucht und diese miteinander verglichen.

In Primärtumoren und lymphogen disseminierten Tumorzellen werden spezifische Aberrationen selektiert

Für Primärtumoren von Pankreaskarzinomen wurden charakteristische numerische Aberrationen bereits in zahlreichen CGH-Studien beschrieben (siehe 1.2.3). Einige der veröffentlichten Daten beruhen auf Studien an Zelllinien von Pankreaskarzinomen. Im Vergleich der DNA humaner Proben mit Zellkulturen wurde gezeigt, dass schon wenige Passagen zu einer Anhäufung zusätzlicher numerischer Aberrationen in Zelllinien führten, welche unterschiedlich zu den Veränderungen von Pankreastumoren waren. Zum Beispiel wurde der DNA-Verlust von 18q dreimal und der DNA-Gewinn von 20q sechsmal häufiger in Zellkulturen als in humanen Tumorproben nachgewiesen (Mahlamaki, Hoglund et al. 1997). Dagegen beschreibt eine andere Arbeit, welche ebenfalls numerische Aberrationen von humanen Pankreaskarzinomen mit Zellkulturen verglich, eine bemerkenswert hohe Übereinstimmung zwischen den Veränderungen von Primärtumoren und Zellkulturen von Patienten mit Pankreaskarzinomen (Fukushige, Waldman et al. 1997). Eine weitere CGH-Studie über Zelllinien von Pankreaskarzinomen beschrieb insbesondere einen DNA-Gewinn auf Chromosom 19 als besonders interessante Veränderung und Sitz potentieller Kandidatengene für die Progression des Pankreaskarzinoms (Curtis, Li et al. 1998). Doch CGH-Ergebnisse von Zellkulturen müssen kritisch betrachtet werden, da Zelllinien einem anderen Selektionsdruck ausgesetzt sind als Tumoren im menschlichen Körper. Aus diesem Grund und wegen der oben dargestellten widersprüchlichen Datenlage wurden numerische Veränderungen von Pankreaskarzinomzelllinien für die Gegenüberstellung mit den eigenen Ergebnissen nicht weiter berücksichtigt.

Die numerischen Aberrationen des hier vorgestellten Primärtumorkollektivs waren im Einklang mit den veröffentlichten CGH-Daten über humane Pankreaskarzinome. Im Abgleich mit den CGH-Ergebnissen älterer Studien wurde allerdings festgestellt, dass diese eine geringere Anzahl numerischer Aberrationen beschrieben und ein Teil der untersuchten Primärtumoren keine mit der CGH detektierbaren Veränderungen hatten

(Solinas-Toldo, Wallrapp et al. 1996) (Mahlamaki, Hoglund et al. 1997) (Schleger, Arens et al. 2000). Der Grund für diese Differenzen zu den eigenen Ergebnissen ist im methodischen Ansatz zu finden. In älteren Studien wurde DNA direkt aus Tumorgewebe extrahiert und für die CGH verwendet. Die Kontamination durch unveränderte Stromazellen führte dabei zu einer Abschwächung des CGH-Signals und der Signifikanz numerischer Aberrationen im CGH-Profil (Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1994). Diese Problematik wurde mit dem Einsatz neuer Methoden zur DNA-Gewinnung und -Bearbeitung wie Mikrodissektion, DOP-PCR oder Adapter-Linker-PCR vermieden. Mit der Zunahme der CGH-Daten über das Pankreaskarzinom wurden die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigt und typische Veränderungen für das Pankreaskarzinom beschrieben (Harada, Okita et al. 2002a) (Harada, Okita et al. 2002b) (Kitoh, Ryozaawa et al. 2005) (Chang, Chang et al. 2005). Unterschiede im relativen Anteil typischer Aberrationen zwischen den zitierten Studien und im Vergleich zur eigenen Untersuchung erklären sich aus in ihren Tumorstadien abweichend zusammengesetzten Patientenkollektiven, aus unterschiedlichen methodischen Ansätzen und der Heterogenität des Pankreaskarzinoms (Gorunova, Johansson et al. 1995) (Gorunova, Hoglund et al. 1998) (Harada, Okita et al. 2002b). Charakteristische Veränderungen für das Pankreaskarzinom sind zum Beispiel DNA-Gewinne von 8q und 20q sowie DNA-Verluste von 17p und 18q, welche auch in den hier vorgestellten Primärtumoren mit die am häufigsten anzutreffenden Aberrationen waren. Diese Veränderungen können - insbesondere im Zusammenhang mit der allgemein anerkannten Hypothese, dass DNA-Gewinne mit einer verstärkten Expression von Onkogenen der betroffenen Region und der Verlust von Tumorsuppressorgenen mit ihrer Inaktivierung einhergehen können - als ein Hinweis auf bevorzugte Mechanismen bei der Tumorentstehung und -progression gewertet werden.

Die wiederholt beschriebene Heterogenität des Pankreaskarzinoms wurde in der vorliegenden Dissertation sowohl in H-DTZ und L-DTZ als auch Primärtumoren bestätigt. Es wurde eine Vielzahl von Chromosomenregionen identifiziert, die numerische Aberrationen aufwiesen und aufgrund der ausgeprägten Heterogenität wurde nahezu jede Veränderung der Primärtumoren auch in DTZ angetroffen. Deshalb konzentrierte sich die Suche nach spezifischen und gemeinsamen Aberrationen auf Veränderungen, welche bei H-DTZ, L-DTZ und Primärtumoren einen relativen Anteil von über 20% hatten. Die Abbildung 17 am Ende dieses Abschnitts gibt einen Überblick der spezifischen und gemeinsamen Aberrationen dieser drei Gruppen.

Für H-DTZ wurden wenige charakteristische Veränderungen identifiziert und wiederholt anzutreffende Veränderungen waren ausschließlich DNA-Gewinne. Relativ typisch für H-DTZ war die Beteiligung von 5p, 15q22qter und Y, da sie in L-DTZ und Primärtumoren

nicht in derselben relativen Häufigkeit vorkamen. Unter insgesamt 13 häufigen Aberrationen wurden DNA-Gewinne auf 4p und 19 sowie DNA-Verluste auf 11q und 12p als spezifisch für L-DTZ erkannt. Für Primärtumoren dagegen waren die DNA-Gewinne von 1q, 3q, 7p und 13q sowie DNA-Verluste von 1p, 3p, 6q, 8p, 9p, 19 und 22q als charakteristische Aberrationen zu verzeichnen (siehe Abbildung 17). Abschließend lässt sich feststellen, dass L-DTZ im Vergleich zu H-DTZ eine verstärkte Selektion spezifischer Aberrationen aufwies, welche in erheblich größerem Ausmaß auch im Primärtumorkollektiv anzutreffen war.

Auf der Suche nach gemeinsamen Aberrationen zwischen H-DTZ, L-DTZ und Primärtumoren wurden keine Veränderungen mit einem relativen Anteil größer 20% gefunden, welche von allen drei Gruppen oder von H-DTZ und L-DTZ geteilt wurden. Für H-DTZ und Primärtumoren wurde nur ein Abschnitt auf 20q identifiziert, auf dem bei beiden ein DNA-Gewinn vorlag. Bei L-DTZ und Primärtumoren dagegen ließen sich insgesamt fünf Veränderungen herausarbeiten, welche beiden Gruppen gemeinsam waren (ein DNA-Gewinn auf 8q sowie vier DNA-Verluste auf 6p, 17p, 18q und 21q). Die Gegenüberstellung selektierter Aberrationen von H-DTZ, L-DTZ und Primärtumoren erbrachte demnach neben der vorangegangenen Betrachtung der Gesamtzahl sowie Verteilung von DNA-Gewinnen und -Verlusten einen zusätzlichen Hinweis auf eine größere Ähnlichkeit zwischen L-DTZ und Primärtumoren im Vergleich zu H-DTZ.

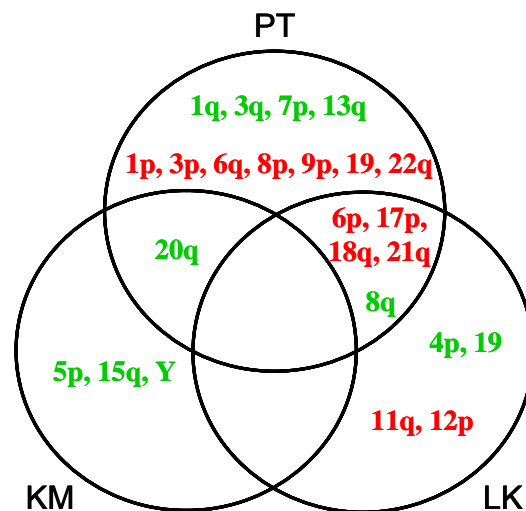


Abbildung 17 Venn-Diagramm der Verteilung spezifischer und gemeinsamer numerischer Aberrationen beim Adenokarzinom des Pankreas

Die verschiedenen Schnittmengen zeigen spezifische DNA-Gewinne (grün) und -Verluste (rot) von Primärtumoren und DTZ. Angegeben sind Chromosomenarme, auf denen Aberrationen mit einer relativen Häufigkeit größer 20% lagen.

In der hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse werden vor allem Primärtumorproben zu einer Gruppe zusammengefasst

Aus den bisherigen Analysen der genomischen Veränderungen geht hervor, dass die Selektion spezifischer Aberrationen in Primärtumoren am weitesten fortgeschritten ist. Ähnliches war, wenn auch in geringerem Ausmaß, bei L-DTZ festzustellen. Weitere Belege für eine größere Ähnlichkeit zwischen Primärtumoren und L-DTZ als zwischen Primärtumoren und H-DTZ ergaben sich aus der Gegenüberstellung der Gesamtzahl und Verteilung von DNA-Verlusten sowie der Anzahl an gemeinsamen Aberrationen dieser Gruppen. Diese Beobachtungen wurden in der hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse, bei der im Gegensatz zu den vorherigen Betrachtungen sämtliche numerische Veränderungen einer Probe in die Analyse eingehen und die verschiedenen Proben nach Gemeinsamkeiten zu Gruppen zusammengefasst werden, eindrucksvoll bestätigt (siehe Abbildung 13).

Zwei Drittel der L-DTZ und die Hälfte der H-DTZ mit einer höheren Gesamtzahl an Aberrationen und DNA-Verlusten als die übrigen DTZ wurden in dieselbe Gruppe eingeteilt wie alle Primärtumoren (B). Innerhalb dieser Gruppe trennte sich ein Großteil der Primärtumorproben (70%) durch ihre Zusammenfassung zu einer Subgruppe (B1) deutlich von den übrigen Primärtumoren und DTZ (B2). Den Primärtumoren der Gruppe B1 waren insbesondere DNA-Verluste der Chromosomenregionen 3p, 6q, 9p, 17q, 19 und 22q gemeinsam. Die restlichen DTZ wurden zu einer Gruppe zusammengefasst (A), in der Proben mit wenigen Aberrationen und überwiegend DNA-Gewinnen enthalten waren (siehe Abbildung 13). Ein interessanter Aspekt für weitergehende Analysen wäre die Gegenüberstellung der Überlebensdaten von Patienten, deren Proben in die Gruppen A, B1 und B2 eingeteilt wurden. Möglicherweise verschlechtert sich die Prognose mit zunehmender Anzahl an Aberrationen, insbesondere DNA-Verlusten. Zum Zeitpunkt der Dissertation konnte jedoch noch nicht auf diese Daten zurückgegriffen werden.

Primärtumor und lymphogen disseminierte Tumorzellen desselben Patienten sind sich ähnlicher als Primärtumor und hämatogen disseminierte Tumorzellen

Bis zu diesem Punkt der Analysen basieren die Ergebnisse auf der Betrachtung und dem Vergleich aller Proben von Primärtumoren, H-DTZ und L-DTZ, welche von verschiedenen Patienten gewonnen wurden. Bei einigen Patienten bestand zusätzlich die Möglichkeit, gleichzeitig Primärtumor und DTZ zu charakterisieren (n=7). Trotz der geringen Anzahl gepaarter Proben desselben Patienten, wurden diese Fälle ebenfalls daraufhin untersucht, ob sich gemeinsame Aberrationen zwischen Primärtumor und DTZ finden

lassen und ob sich L-DTZ und Primärtumor ähnlicher sind als H-DTZ und Primärtumor.

Nur bei der Hälfte der Paare von Primärtumoren und H-DTZ eines Patienten (n=6) war jeweils eine gemeinsame Aberrationen festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigten L-DTZ in allen Fällen (n=2) mehrere gemeinsame Aberrationen mit dem Primärtumor (sieben bzw. vier) und bestätigten damit übereinstimmend mit den vorangegangenen Analysen aller Primärtumoren, H-DTZ und L-DTZ die Hypothese einer größeren Ähnlichkeit zwischen L-DTZ und Primärtumoren (siehe Tabelle 30). In einem der oben vorgestellten Fälle gepaarter Proben wurden sowohl Primärtumor als auch CGH-positive H-DTZ und L-DTZ charakterisiert (Daraus erklärt sich auch die abweichende Summe der Paare von Primärtumor und H-DTZ plus Primärtumor und L-DTZ zur Gesamtzahl untersuchter Fälle gepaarter Proben). An gemeinsamen Aberrationen dieser drei Gruppen konnte nur der DNA-Gewinn eines Abschnitts auf 8p herausgearbeitet werden (siehe Abbildung 15). Der Vergleich der gemeinsamen Aberrationen von H-DTZ, L-DTZ und Primärtumoren gepaarter Proben von Patient zu Patient ergab, dass wenige Übereinstimmungen zu finden waren. Die einzigen wiederholt anzutreffenden Veränderungen waren der DNA-Verlust auf 18q und der DNA-Gewinn auf 8p. Diese Beobachtung spricht eher gegen eine Selektion typischer Aberrationen bei der hämatogenen oder lymphogenen Disseminierung, da im Falle einer Selektion mehr Übereinstimmungen zu erwarten wären.

Disseminierungsmodell beim Pankreaskarzinom

Aus den Analysen der Primärtumoren und DTZ von Patienten mit Pankreaskarzinom ergaben sich folgende Punkte, welche zu dem unten vorgestellten Disseminierungsmodell des Pankreaskarzinoms führen:

- 1.) Beim Pankreaskarzinom im klinischen Stadium M0, insbesondere beim Papillenkarzinom pankreatischen Ursprungs wurde im Vergleich der Färbeergebnisse von Knochenmarkaspiraten mit Lymphknotenproben eine Tendenz zur lymphogenen Disseminierung festgestellt. Diese Beobachtung kann dahingehend interpretiert werden, dass die lymphogene Disseminierung schon in frühen Tumorstadien die hämatogene Streuung von DTZ übersteigt.
- 2.) Der Anteil CGH-positiver Zellen war bei H-DTZ im Vergleich zu L-DTZ geringer (n CGH-positiv: H-DTZ < L-DTZ). Numerische Aberrationen waren bei H-DTZ seltener als bei L-DTZ anzutreffen und Primärtumoren wiesen die meisten Veränderungen auf (n Aberrationen: H-DTZ < L-DTZ < PT). Beide Beobachtungen können als Beleg für die Annahme gewertet werden, dass sich H-DTZ in früheren Stadien chromosomaler Instabilität als L-DTZ und

insbesondere als PT befinden.

- 3.) Bei H-DTZ waren hauptsächlich DNA-Gewinne nachzuweisen und sie scheinen in frühen Stadien chromosomaler Instabilität zu verharren, da sie im Verhältnis zu L-DTZ und Primärtumoren wenige Aberrationen hatten. DNA-Verluste nahmen in der Reihenfolge H-DTZ, L-DTZ, Primärtumoren zu. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass in frühen Stadien chromosomaler Instabilität DNA-Gewinne und die Aktivierung von Onkogenen eine bedeutende Rolle spielen. Der weitere Verlauf der Tumorprogression wird durch zunehmende DNA-Verluste und die damit einhergehende Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen geprägt.
- 4.) Primärtumoren und L-DTZ sind sich in ihren genetischen Veränderungen ähnlicher als Primärtumoren und H-DTZ. Dies kommt insbesondere durch die größere Anzahl an DNA-Verlusten bei Primärtumoren und L-DTZ als bei H-DTZ, welche teilweise mit ähnlicher relativer Häufigkeit anzutreffen waren, zum Ausdruck.
- 5.) DTZ und Primärtumoren unterschiedlicher Patienten sind in ihren genetischen Veränderungen sehr heterogen. Mit fortschreitender Tumorprogression werden zunehmend spezifische Aberrationen selektiert, was in erster Linie bei Primärtumoren beobachtet wurde.
- 6.) Die Frage nach einer Selektion spezifischer Aberrationen, welche im Zusammenhang mit einer hämatogenen oder lymphogenen Disseminierung selektiert wurden, kann im Rahmen dieser Studie nicht ausreichend beantwortet werden. Mit der Metaphasen-CGH wurden nur wenige gemeinsame Veränderungen bei H-DTZ, L-DTZ und Primärtumoren nachgewiesen, die zudem bei gepaarten Proben von Primärtumor und DTZ desselben Patienten untereinander heterogen waren. Wenn überhaupt, so kann dies nur als ein schwacher Hinweis für eine Selektion bestimmter Veränderungen auf chromosomaler Ebene gewertet werden, welche Zellen des Primärtumors zu einer hämatogenen oder lymphogenen Disseminierung befähigen. Glaubhafter erscheint die Annahme, dass der Streuung von Tumorzellen Bedingungen zu Grunde liegen, welche sich auf subchromosomaler Ebene oder in anderen Mechanismen, zum Beispiel epigenetischer Natur, finden lassen.

Am wahrscheinlichsten erscheint die Hypothese, dass L-DTZ fortgeschrittenere und H-DTZ frühere Stadien der Tumorprogression widerspiegeln und mit zunehmender Tumorprogression ähnliche DNA-Verluste selektiert werden, wie es bei L-DTZ im

Vergleich zu Primärtumoren festzustellen war. Dafür sind zwei verschiedene Mechanismen vorstellbar:

Einerseits kann den oben aufgezählten Ergebnissen eine Selektion ähnlicher Veränderungen im Rahmen der Tumorprogression sowohl im Primärtumor als auch in DTZ zugrunde liegen, welche nach der Disseminierung stattfindet. So ließe sich die Ähnlichkeit zwischen L-DTZ und Primärtumoren erklären. Allerdings bleibt die Frage offen, warum bei H-DTZ keine weitere Progression zu erkennen ist. Eine mögliche Antwort ist die Arretierung von hämatogen gestreuten Tumorzellen im Knochenmark in frühen Stadien chromosomaler Instabilität.

Auf der anderen Seite ist auch vorstellbar, dass sich im Lymphknoten DTZ befinden, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten disseminiert sind und somit unterschiedliche Stadien der Tumorprogression des Primärtumors repräsentieren. Die Ähnlichkeiten zwischen Primärtumoren und L-DTZ erklären sich dann aus dem Überwiegen von DTZ aus späteren Tumorstadien. Bei dieser Annahme stellt sich allerdings die Frage nach der fehlenden Streuung von DTZ fortgeschrittener Tumorstadien ins Knochenmark. Beim Pankreaskarzinom wäre dann eine selektive Streuung von DTZ späterer Tumorstadien über das lymphatische System zu diskutieren.

In beiden Fällen sollten sich bei frühen Stadien des Primärtumors DTZ im Lymphknoten identifizieren lassen, welche Charakteristika von H-DTZ aufweisen. Dies gelang bei der Untersuchung von L-DTZ bei Papillenkarzinomen pankreatischen Ursprungs. Sie hatten überwiegend DNA-Gewinne, weniger numerische Aberrationen und waren seltener CGH-positiv als L-DTZ von fortgeschritteneren Pankreaskarzinomen anderer Lokalisation (siehe Abbildung 9 und Abbildung 16). Sie erfüllten die geforderten Charakteristika von H-DTZ, welche damit frühen Stadien der Tumorprogression zugeschrieben werden können. Im Disseminierungsmodell zum Pankreaskarzinom ist die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie abschließend zusammengefasst (siehe Abbildung 18).

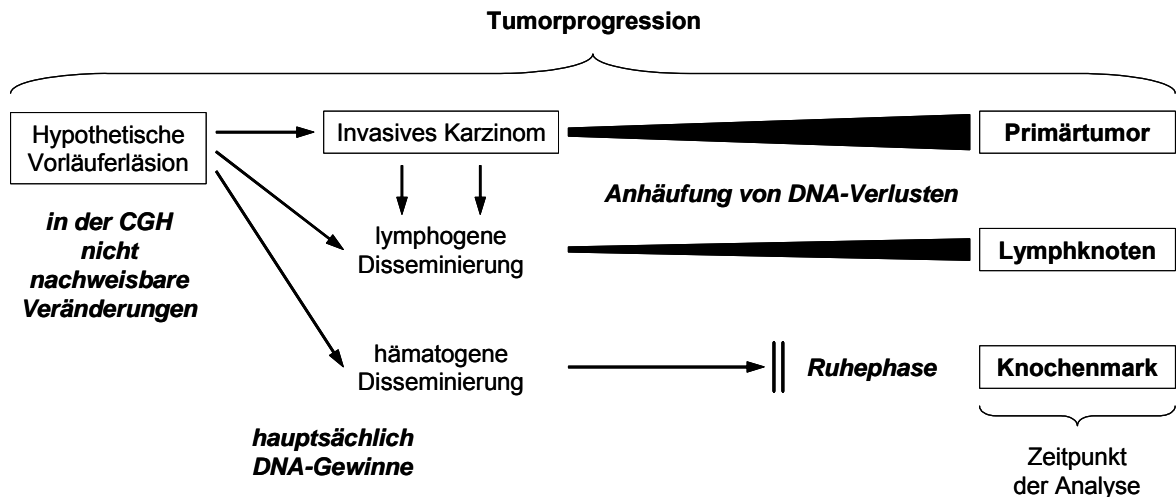


Abbildung 18 Disseminierungsmodell des Pankreasadenokarzinoms

Zum Zeitpunkt der Analyse ist chromosomale Instabilität in H-DTZ am wenigsten weit fortgeschritten. Im Gegensatz dazu zeigen L-DTZ und Primärtumoren im Lauf der Tumorprogression eine signifikante Anhäufung von DNA-Verlusten, welche die Progression zunehmend antreibt und in Primärtumoren am weitesten entwickelt war. DNA-Gewinne waren bei allen drei Kollektiven in ähnlicher Anzahl anzutreffen und sind möglicherweise frühen Tumorstadien zuzuordnen.

Ausblick

Das hier vorgestellte Disseminierungsmodell wie auch die Frage nach einer Selektion numerischer Aberrationen bei der hämatogenen wie lymphogenen Disseminierung sollte in weitergehenden Experimenten überprüft werden.

Eine Beschränkung der Metaphasen-CGH ist das geringe Auflösungsvermögen dieser Methode (10-20 Mb). Aus diesem Grund bleiben einige Aspekte der vorliegenden Dissertation unbeantwortet. So wurden bei einem Teil der DTZ mit der Metaphasen-CGH keine Aberrationen nachgewiesen und es ist unklar, ob es sich um Zellen neoplastischen Ursprungs handelt, welche sich in frühen Stadien genetischer Instabilität befinden. Trotz fehlenden Hinweises in der vorliegenden Studie, besteht dennoch die Möglichkeit einer Selektion numerischer Aberrationen unterhalb des Auflösungsvermögens der Metaphasen-CGH im Rahmen der hämatogenen und lymphogenen Streuung von Tumorzellen. Für weitergehende Analysen empfiehlt es sich, das hier vorgestellte Kollektiv mit höher auflösenden Methoden auf numerische Aberrationen hin zu untersuchen. Vielversprechend erscheinen Untersuchungen mit der Array-CGH, welche in den letzten Jahren für Studien an Primärtumoren und Zelllinien des Pankreaskarzinoms zur Anwendung kam. Mit dieser Methode werden bekannte numerische Aberrationen weiter eingegrenzt und bisher unbekannte Veränderungen detektiert. Die Array-CGH stellt somit einen weiteren Schritt bei der Identifikation von Regionen mit bisher unbekanntem Onko- und Tumorsuppressorgenen dar, welche eine Rolle bei der Progression des

Pankreaskarzinoms spielen (Holzmann, Kohlhammer et al. 2004) (Nowak, Gaile et al. 2005) (Harada, Baril et al. 2007).

Mit dem experimentellen Ansatz der vorliegenden Studie kann die Annahme, ob CK-positive Zellen im Knochenmark und EpCAM-positive Zellen im Lymphknoten zwei grundsätzlich unterschiedliche Populationen von DTZ repräsentieren, ebenfalls nicht beantwortet werden. Gefordert wird der Nachweis, dass die hier untersuchten DTZ sowohl Zytokeratin als auch EpCAM exprimieren. Diesen Nachweis erbringt zum Beispiel eine Doppelfärbung von Knochenmark- und Lymphknotenproben gegen beide epitheliale Marker. Bei diesem Färbeexperiment könnten drei verschiedene Populationen von DTZ im Knochenmark und Lymphknoten auftreten: CK-, EpCAM- sowie CK- und EpCAM-positive Zellen. Mit der genomischen Charakterisierung aller drei Populationen muss das hier vorgestellte Disseminierungsmodell beim Pankreaskarzinom nachgeprüft werden. Eine besondere Bedeutung kommt dabei EpCAM-positiven Zellen zu. Die Expression von EpCAM wurde für Zellen mit Stammzellcharakter aus Primärtumoren von Mamma- (Al-Hajj, Wicha et al. 2003) und Kolonkarzinomen (Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007) (O'Brien, Pollett et al. 2007) nachgewiesen. Ebenso wurden Eigenschaften von Stammzellen, wie Selbsterhaltung und Erzeugung von differenzierten Tochterzellen, für EpCAM-positive Zellen beim Pankreaskarzinom beschrieben (Li, Heidt et al. 2007). Insbesondere in der Charakterisierung EpCAM-positiver DTZ könnte im Hinblick auf neue Erkenntnisse über das Pankreaskarzinom ein vielversprechender Ansatz liegen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die einzige Möglichkeit, Patienten mit Pankreaskarzinom zu heilen, besteht in einer möglichst frühzeitigen Diagnose und Operation. Nach einer kurativen Resektion versterben dennoch über 95% aller Patienten innerhalb der folgenden fünf Jahre an einem Rezidiv, was belegt, dass nach der Operation disseminierte Tumorzellen (DTZ) im Körper des Patienten verbleiben und deren Progression zu einem Rezidiv der Krebserkrankung führt. Beim Pankreaskarzinom wurde gezeigt, dass der Nachweis von DTZ mit dem Antikörper A45-B/B3 gegen Zytokeratin im Knochenmark und mit dem Antikörper Ber-EP4 gegen EpCAM im Lymphknoten mit einer schlechteren Prognose korreliert.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, Einblicke in die Biologie von hämatogener und lymphogener Disseminierung beim Pankreaskarzinom zu erarbeiten. Zunächst wurde die Prävalenz von DTZ durch immunzytochemische Färbungen gegen die oben genannten epithelialen Marker bestimmt. Anschließend wurden die Zellen isoliert, ihre DNA amplifiziert und mit der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) auf numerische Aberrationen hin untersucht, welche mit den chromosomalen Veränderungen des Primärtumorkollektivs verglichen wurden. Diese Gegenüberstellung sollte ergründen, ob Ähnlichkeiten zwischen hämatogen disseminierten (H-DTZ), lymphogen disseminierten Tumorzellen (L-DTZ) sowie Primärtumoren (PT) bestehen und ob charakteristische Veränderungen für H-DTZ und L-DTZ existieren, welche möglicherweise im Rahmen der Disseminierung selektiert wurden.

Die Prävalenz von DTZ bei Patienten mit nicht metastasiertem Pankreaskarzinom lag im Knochenmark bei 23,0% und im Lymphknoten bei 38,1%. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Die genomische Analyse von DTZ und PT deckte auf, dass Primärtumore die höchste Anzahl an numerischen Aberrationen aufwiesen (Mittelwert: 12,8), gefolgt von den L-DTZ (Mittelwert: 9) und den H-DTZ (Mittelwert: 4,7). Zum anderen zeigten EpCAM-positive Zellen aus den Lymphknoten häufiger abnorme Karyotypen (78,3%) als Zytokeratin-positive Zellen aus dem Knochenmark (68,8%), während alle PT numerische Aberrationen aufwiesen. Die Häufigkeit von chromosomalen Gewinnen und Verlusten war unterschiedlich in den verschiedenen Gruppen und betrug bei H-DTZ 3,6 DNA-Gewinne und 1,1 DNA-Verluste, bei L-DTZ 4,5 DNA-Gewinne und 4,5 DNA-Verluste und bei PT 5,6 DNA-Gewinne und 7,2 DNA-Verluste pro analysierter Probe. Die Ähnlichkeitsanalyse numerischer Aberrationen der drei Kollektive zeigte, dass PT und insbesondere DTZ untereinander sehr heterogen sind. Charakteristische Veränderungen, die möglicherweise selektiert worden waren, wurden in erster Linie in PT gefunden, in geringerem Ausmaß

auch in Tumorzellen aus Lymphknoten. Es handelte sich dabei in erster Linie um DNA-Verluste, wie zum Beispiel auf Chromosom 17 und 18, welche PT und L-DTZ gemeinsam waren und eine größere Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Gruppen im Vergleich zu PT und H-DTZ nahelegen. Andererseits konnten auch Aberrationen identifiziert werden, die charakteristisch für die jeweilige Gruppe waren. Insbesondere handelte es sich dabei bei H-DTZ um DNA-Gewinne von 5p und 15q und bei L-DTZ um DNA-Gewinne von 4p oder 19 beziehungsweise DNA-Verluste von 11q oder 12p. Häufige DNA-Gewinne und -Verluste auf den Chromosomen 1, 3 oder 22 waren kennzeichnend für die Gruppe der Primärtumore. In der Analyse gepaarter Proben desselben Patienten waren gemeinsame Aberrationen zwischen PT und H-DTZ nur in der Hälfte (3/6), zwischen PT und L-DTZ dagegen in allen der untersuchten Fälle (2/2) anzutreffen. Auch die Anzahl dieser gemeinsamen Veränderungen war bei letzteren größer (Anteil gemeinsamer Veränderungen zwischen a) PT und H-DTZ: 5,9%, 5,9%, 4,8% und b) PT und L-DTZ: 16,3%, 8,9%). Der Vergleich solcher Aberrationen zwischen den verschiedenen Patienten mit gepaarten Proben dagegen führte nicht zur eindeutigen Identifikation typischer Veränderungen, welche im Zusammenhang mit einer hämatogenen oder lymphogenen Disseminierung gesehen werden können.

Eine Zunahme numerischer Aberrationen mit fortschreitender Tumorprogression im Primärtumor wurde für die meisten soliden Tumoren nachgewiesen. Auch bei der Progression der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie zum Pankreaskarzinom ist die Akkumulation von genetischen Veränderungen zu beobachten. Vor diesem Hintergrund deuten die vorliegenden Ergebnisse daraufhin, dass die Disseminierung ein frühes Ereignis im Rahmen der Progression des Pankreaskarzinoms ist. In sehr frühen Tumorstadien, welche möglicherweise von den Genomprofilen der DTZ im Knochenmark repräsentiert werden, sind in erster Linie DNA-Gewinne anzutreffen. Interessanterweise scheinen diese DTZ im Milieu des Knochenmarks keine Deletionen zu akkumulieren. Mit fortschreitender Tumorprogression kommt dagegen DNA-Verlusten eine zunehmend bedeutende Rolle zu, was in DTZ aus Lymphknoten sowie im Primärtumor zu beobachten ist. Diese Beobachtungen bilden die Grundlage für eine Vielzahl weiterführender Fragestellungen, wie zum Beispiel die Identifikation der genetischen Veränderungen, die am Anfang der genetischen Progression stehen. Gerade diese Veränderungen könnten von allen Tumorzellen geteilt werden und somit ideale Zielstrukturen für neue Therapieansätze darstellen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-8.
- Alazraki, N. (2002). "Imaging of pancreatic cancer using fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography." J Gastrointest Surg **6**(2): 136-8.
- Alexakis, N., C. Halloran, et al. (2004). "Current standards of surgery for pancreatic cancer." Br J Surg **91**(11): 1410-27.
- Almoguera, C., D. Shibata, et al. (1988). "Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes." Cell **53**(4): 549-54.
- Baudis, M. and M. L. Cleary (2001). "Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data." Bioinformatics **17**(12): 1228-9.
- Baumgart, M., E. Heinmoller, et al. (2005). "The genetic basis of sporadic pancreatic cancer." Cell Oncol **27**(1): 3-13.
- Boadas, J., J. Mora, et al. (2001). "Clinical usefulness of K-ras gene mutation detection and cytology in pancreatic juice in the diagnosis and screening of pancreatic cancer." Eur J Gastroenterol Hepatol **13**(10): 1153-9.
- Bogoevski, D., E. F. Yekebas, et al. (2004). "Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma: prognostic significance of nodal microinvolvement." Ann Surg **240**(6): 993-1000; discussion 1000-1.
- Brat, D. J., K. D. Lillemoe, et al. (1998). "Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas." Am J Surg Pathol **22**(2): 163-9.
- Braun, S., K. Pantel, et al. (2000). "Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer." N Engl J Med **342**(8): 525-33.
- Braun, S., F. D. Vogl, et al. (2005). "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer." N Engl J Med **353**(8): 793-802.
- Bruns, H., J. Diebold, et al. (2006). Karzinome des exokrinen Pankreas und der periampullären Region. München, W. Zuckschwerdt Verlag.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, et al. (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." J Clin Oncol **15**(6): 2403-13.
- Chang, M. C., Y. T. Chang, et al. (2005). "Distinct chromosomal aberrations of ampulla of Vater and pancreatic head cancers detected by laser capture microdissection and comparative genomic hybridization." Oncol Rep **14**(4): 867-72.
- Cubilla, A. L. and P. J. Fitzgerald (1976). "Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer." Cancer Res **36**(7 PT 2): 2690-8.
- Curtis, L. J., Y. Li, et al. (1998). "Amplification of DNA sequences from chromosome 19q13.1 in human pancreatic cell lines." Genomics **53**(1): 42-55.
- Dearnaley, D. P., J. P. Sloane, et al. (1981). "Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen." Br J Cancer **44**(1): 85-90.
- du Manoir, S., M. R. Speicher, et al. (1993). "Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization." Hum Genet **90**(6): 590-610.
- Duesberg, P., D. Rasnick, et al. (1999). "How aneuploidy may cause cancer and genetic instability." Anticancer Res **19**(6A): 4887-906.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, et al. (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14863-8.

- Fischer, H. P. and H. Zhou (2004). "Pathogenesis of carcinoma of the papilla of Vater." J Hepatobiliary Pancreat Surg **11**(5): 301-9.
- Frick, H., H. Leonhardt, et al. (1992). Spezielle Anatomie II.
- Fukushige, S., F. M. Waldman, et al. (1997). "Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 20 in human pancreatic adenocarcinoma." Genes Chromosomes Cancer **19**(3): 161-9.
- Ghadirian, P., G. Liu, et al. (2002). "Risk of pancreatic cancer among individuals with a family history of cancer of the pancreas." Int J Cancer **97**(6): 807-10.
- Gorgoulis, V. G., L. V. Vassiliou, et al. (2005). "Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions." Nature **434**(7035): 907-13.
- Gorunova, L., M. Hoglund, et al. (1998). "Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations." Genes Chromosomes Cancer **23**(2): 81-99.
- Gorunova, L., B. Johansson, et al. (1995). "Massive cytogenetic heterogeneity in a pancreatic carcinoma: fifty-four karyotypically unrelated clones." Genes Chromosomes Cancer **14**(4): 259-66.
- Harada, T., P. Baril, et al. (2007). "Identification of genetic alterations in pancreatic cancer by the combined use of tissue microdissection and array-based comparative genomic hybridisation." Br J Cancer **96**(2): 373-82.
- Harada, T., K. Okita, et al. (2002a). "Detection of genetic alterations in pancreatic cancers by comparative genomic hybridization coupled with tissue microdissection and degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction." Oncology **62**(3): 251-8.
- Harada, T., K. Okita, et al. (2002b). "Interglandular cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization in pancreatic cancer." Cancer Res **62**(3): 835-9.
- Heinmoller, E., W. Dietmaier, et al. (2000). "Molecular analysis of microdissected tumors and preneoplastic intraductal lesions in pancreatic carcinoma." Am J Pathol **157**(1): 83-92.
- Heiss, M. M., E. H. Simon, et al. (2002). "Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow." J Clin Oncol **20**(8): 2005-16.
- Holzmann, K., H. Kohlhammer, et al. (2004). "Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes." Cancer Res **64**(13): 4428-33.
- Horton, K. M. (2002). "Multidetector CT and three-dimensional imaging of the pancreas: state of the art." J Gastrointest Surg **6**(2): 126-8.
- Hosch, S., J. Kraus, et al. (2000). "Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer." Cancer Res **60**(24): 6836-40.
- Hosch, S. B., W. T. Knoefel, et al. (1997). "Early lymphatic tumor cell dissemination in pancreatic cancer: frequency and prognostic significance." Pancreas **15**(2): 154-9.
- Hruban, R. H., N. V. Adsay, et al. (2001). "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions." Am J Surg Pathol **25**(5): 579-86.
- Hruban, R. H., A. D. van Mansfeld, et al. (1993). "K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization." Am J Pathol **143**(2): 545-54.
- ISCN (1995). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel,

Karger.

- Izbicki, J. R., S. B. Hosch, et al. (1997). "Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer." N Engl J Med **337**(17): 1188-94.
- Janni, W., F. Hepp, et al. (2003). "Patterns of disease recurrence influenced by hematogenous tumor cell dissemination in patients with cervical carcinoma of the uterus." Cancer **97**(2): 405-11.
- Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, et al. (1992). "Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors." Science **258**(5083): 818-21.
- Kallioniemi, O. P., A. Kallioniemi, et al. (1994). "Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors." Genes Chromosomes Cancer **10**(4): 231-43.
- Kimura, W., N. Futakawa, et al. (2004). "Neoplastic diseases of the papilla of Vater." J Hepatobiliary Pancreat Surg **11**(4): 223-31.
- Kitoh, H., S. Ryozaawa, et al. (2005). "Comparative genomic hybridization analysis for pancreatic cancer specimens obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration." J Gastroenterol **40**(5): 511-7.
- Klein, C. A., O. Schmidt-Kittler, et al. (1999). "Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4494-9.
- Klein, W. M., R. H. Hruban, et al. (2002). "Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression." Mod Pathol **15**(4): 441-7.
- Kops, G. J., B. A. Weaver, et al. (2005). "On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint." Nat Rev Cancer **5**(10): 773-85.
- Kubuschok, B., B. Passlick, et al. (1999). "Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **17**(1): 19-24.
- Latza, U., G. Niedobitek, et al. (1990). "Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial." J Clin Pathol **43**(3): 213-9.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." Nature **396**(6712): 643-9.
- Li, C., D. G. Heidt, et al. (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." Cancer Res **67**(3): 1030-7.
- Li, C. P., Y. Chao, et al. (2003). "Concurrent chemoradiotherapy treatment of locally advanced pancreatic cancer: gemcitabine versus 5-fluorouracil, a randomized controlled study." Int J Radiat Oncol Biol Phys **57**(1): 98-104.
- Li, D., K. Xie, et al. (2004). "Pancreatic cancer." Lancet **363**(9414): 1049-57.
- Liefers, G. J., A. M. Cleton-Jansen, et al. (1998). "Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer." N Engl J Med **339**(4): 223-8.
- Luttges, J., H. Galehdari, et al. (2001). "Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis." Am J Pathol **158**(5): 1677-83.
- Mahlamaki, E. H., M. Hoglund, et al. (1997). "Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer." Genes Chromosomes Cancer **20**(4): 383-91.
- Mansi, J. L., U. Berger, et al. (1987). "Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases." Br Med J (Clin Res Ed) **295**(6606): 1093-6.
- Mitelman, F., B. Johansson, et al. (1994). "Catalog of chromosome aberrations in human cancer." Wiley Liss **2**.

- Moskaluk, C. A., R. H. Hruban, et al. (1997). "p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma." Cancer Res **57**(11): 2140-3.
- Nowak, N. J., D. Gaile, et al. (2005). "Genome-wide aberrations in pancreatic adenocarcinoma." Cancer Genet Cytogenet **161**(1): 36-50.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-10.
- Pantel, K., R. J. Cote, et al. (1999). "Detection and clinical importance of micrometastatic disease." J Natl Cancer Inst **91**(13): 1113-24.
- Pantel, K., E. Felber, et al. (1994a). "Detection and characterization of residual disease in breast cancer." J Hematother **3**(4): 315-22.
- Pantel, K., G. Schlimok, et al. (1994b). "Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow." J Hematother **3**(3): 165-73.
- Passlick, B., J. R. Izbicki, et al. (1994). "Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **12**(9): 1827-32.
- Pisters, P. W., W. A. Hudec, et al. (2001). "Effect of preoperative biliary decompression on pancreaticoduodenectomy-associated morbidity in 300 consecutive patients." Ann Surg **234**(1): 47-55.
- Putz, E., K. Witter, et al. (1999). "Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases." Cancer Res **59**(1): 241-8.
- Rajagopalan, H. and C. Lengauer (2004). "Aneuploidy and cancer." Nature **432**(7015): 338-41.
- Rau, H. G., M. W. Wichmann, et al. (2002). "[Surgical therapy of locally advanced and primary inoperable pancreatic carcinoma after neoadjuvant preoperative radiochemotherapy]." Chirurg **73**(2): 132-7.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-5.
- Ried, T., K. Heselmeyer-Haddad, et al. (1999). "Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation." Genes Chromosomes Cancer **25**(3): 195-204.
- Ritts, R. E. and H. A. Pitt (1998). "CA 19-9 in pancreatic cancer." Surg Oncol Clin N Am **7**(1): 93-101.
- RKI (2006). Krebs in Deutschland. Saarbrücken, Robert Koch Institut.
- Roder, J. D., S. Thorban, et al. (1999). "Micrometastases in bone marrow: prognostic indicators for pancreatic cancer." World J Surg **23**(9): 888-91.
- Rothenberg, M. L., M. J. Moore, et al. (1996). "A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer." Ann Oncol **7**(4): 347-53.
- Saisho, H. and T. Yamaguchi (2004). "Diagnostic imaging for pancreatic cancer: computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography." Pancreas **28**(3): 273-8.
- Schardt, J. A., M. Meyer, et al. (2005). "Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer." Cancer Cell **8**(3): 227-39.
- Schleger, C., N. Arens, et al. (2000). "Identification of frequent chromosomal aberrations in ductal adenocarcinoma of the pancreas by comparative genomic hybridization (CGH)." J Pathol **191**(1): 27-32.
- Schlimok, G., I. Funke, et al. (1987). "Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro

- detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(23): 8672-6.
- Schmidt-Kittler, O., T. Ragg, et al. (2003). "From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7737-42.
- Soeth, E., U. Grigoleit, et al. (2005). "Detection of tumor cell dissemination in pancreatic ductal carcinoma patients by CK 20 RT-PCR indicates poor survival." J Cancer Res Clin Oncol **131**(10): 669-76.
- Solinas-Toldo, S., C. Wallrapp, et al. (1996). "Mapping of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma by comparative genomic hybridization." Cancer Res **56**(16): 3803-7.
- Speicher, M. R., S. du Manoir, et al. (1993). "Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification." Hum Mol Genet **2**(11): 1907-14.
- Stieler, J. M. and H. Oettle (2005). "[Up-to-date diagnosis and treatment of advanced pancreatic cancer]." Dtsch Med Wochenschr **130**(38): 2146-8.
- Stoecklein, N. H., A. Erbersdobler, et al. (2002). "SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples." Am J Pathol **161**(1): 43-51.
- Thorban, S., J. D. Roder, et al. (1996). "Immunocytochemical detection of isolated epithelial tumor cells in bone marrow of patients with pancreatic carcinoma." Am J Surg **172**(3): 297-8.
- Thorban, S., J. D. Roder, et al. (1999). "Detection of micrometastasis in bone marrow of pancreatic cancer patients." Ann Oncol **10 Suppl 4**: 111-3.
- Vogel, I., Kalthoff, A. (2001). "Disseminated tumor cells: Their detection and significance for prognosis of gastrointestinal and pancreatic carcinomas." Virchows Arch **439**: 109-177.
- Vogel, I., U. Kruger, et al. (1999). "Disseminated tumor cells in pancreatic cancer patients detected by immunocytology: a new prognostic factor." Clin Cancer Res **5**(3): 593-9.
- WHO (2002). Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon, IARC Press.
- Wilentz, R. E., C. A. Iacobuzio-Donahue, et al. (2000). "Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression." Cancer Res **60**(7): 2002-6.
- Wilkowski, R., M. Thoma, et al. (2004). "Concurrent chemoradiotherapy with gemcitabine and cisplatin after incomplete (R1) resection of locally advanced pancreatic carcinoma." Int J Radiat Oncol Biol Phys **58**(3): 768-72.
- Yamano, M., H. Fujii, et al. (2000). "Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma." Am J Pathol **156**(6): 2123-33.
- Yekebas, E. F., D. Bogoevski, et al. (2006). "Strong prognostic value of nodal and bone marrow micro-involvement in patients with pancreatic ductal carcinoma receiving no adjuvant chemotherapy." World J Gastroenterol **12**(40): 6515-21.
- Yeo, T. P., R. H. Hruban, et al. (2002). "Pancreatic cancer." Curr Probl Cancer **26**(4): 176-275.

7 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Christoph Klein für die hervorragende und sehr kompetente Betreuung dieser Dissertation danken. Insbesondere durch seinen persönlichen Einsatz, seine Begeisterung und Begeisterungsfähigkeit für die Forschung, durch die mir gewährten Freiräume in der Planung und Gestaltung meiner Dissertation und die exzellente Unterstützung bei der Bewältigung von Problemen hat er es immer wieder verstanden, mich aufs Neue zu motivieren. Ich danke ihm außerdem für seinen großen Einsatz bei der Finanzierung meiner Arbeit und meiner Stelle sowie die persönliche und freundschaftliche Zusammenarbeit. Es war mir eine große Freude, diesen Weg zusammen mit ihm gehen zu können.

Herrn Prof. Dr. Gert Riethmüller danke ich für das Vertrauen, das er mir bei der Einstellung am Institut der Immunologie entgegengebracht hat und für die Vermittlung des Kontakts zu der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Christoph Klein.

Mein besonderer Dank gilt den Patienten, die mit ihrer Einwilligung zu wissenschaftlichen Untersuchungen ihrer Knochenmark-, Lymphknoten- und Primärtumorproben diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben. An dieser Stelle möchte mich auch bei den klinischen Kooperationspartnern bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Peter Scheunemann für die Aufbereitung der Patientenproben und Bereitstellung der klinischen Daten und bei Herrn Dr. Andreas Lübke für die Überlassung der CGH-Daten der Primärtumoren für die vergleichenden Analysen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe gilt mein Dank für das angenehme und kreative Arbeitsklima während unserer gemeinsamen Zeit. Einige von ihnen wurden mir zu sehr wertvollen Menschen. Bei der Durchführung der Experimente, der Diskussion und Auswertung der Ergebnisse sowie Ausarbeitung dieser Dissertation haben mir besonders geholfen: Elke Burghart, Manfred Meyer, Simone Pentz, Dr. Bernhard Polzer, Dr. Julian Schardt, Dr. Christian Vay und Barbara Wittek.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Familie, mein Patenkind Lea und all meine Freunde für ihre große Unterstützung. Durch sie habe ich viel Kraft geschöpft, um meinen Interessen nachgehen und meine Ziele verwirklichen zu können, ohne dabei den Blick für das Wesentliche im Leben aus den Augen zu verlieren.

8 ANHANG

Diagnose und pathohistologische Daten aller untersuchten Patienten mit Pankreastumoren (n=106, PCA: extrapapilläres Adenokarzinom, CPV: an der Papille lokalisiertes Adenokarzinom, IPMN: intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie, NPCA: neuroendokriner Pankreastumor, NA: Angabe fehlt. Auf eine Listung der 14 Patienten mit chronischer Pankreatitis wurde verzichtet)

Patient	Sex	Alter	Diagnose	Lokalisation	pT	pN	M	Grading
2296	m	75	PCA	Schwanz	4	1	0	3
2307	m	51	PCA	Kopf	4	0	0	3
2316	m	51	PCA	Kopf	4	1	1	3
2319	m	59	IPMN	Kopf, Korpus	0	0	0	0
2324	w	77	PCA	Kopf	4	0	0	2
2337	w	74	PCA	Kopf	3	1	0	3
2344	w	63	PCA	NA	4	1	1	2
2345	m	64	PCA	Kopf	3	1	0	2
2347	m	46	PCA	Kopf	2	1	0	2
2349	w	78	PCA	Kopf	4	1	0	2
2362	m	68	PCA	Kopf	4	0	0	2
2363	w	78	CPV	Papille	2	1	0	2
2418	w	50	PCA	Kopf	3	1	1	2
2426	m	72	PCA	Kopf	3	1	0	3
2432	w	49	PCA	Kopf	3	1	0	2
2436	m	63	CPV	Papille	2	0	0	2
2495	m	70	PCA	Kopf	3	1	0	3
2501	w	47	PCA	Kopf, Korpus, Schwanz	4	1	0	3
2506	m	50	NPCA	Kopf, Korpus	1	0	0	1
2537	m	56	IPMN	Papille	0	0	0	2
2539	m	63	CPV	Papille	1	0	0	2
2545	w	76	PCA	Kopf, Papille	2	0	0	3
2555	m	56	PCA	Prozessus uncinatus	3	1	0	3
2559	w	43	PCA	Korpus	3	1	0	3
2562	m	61	PCA	Kopf	3	0	0	2
2568	w	58	PCA	Kopf	2	0	0	2
2579	m	73	PCA	Kopf	3	1	0	2
2584	m	69	PCA	Kopf, Korpus	3	0	0	2
2596	w	42	PCA	Kopf, Korpus, Schwanz	3	1	0	3
2604	m	73	PCA	Kopf	3	0	0	2
2646	m	67	PCA	Kopf	3	1	0	1
2674	m	35	NPCA	NA	4	1	1	2
2680	w	57	PCA	NA	4	1	1	2
2682	m	68	CPV	Papille	2	0	0	2
2835	m	65	PCA	Kopf	NA	NA	1	2
2846	m	67	CPV	Papille	2	0	0	2
3102	w	73	CPV	Papille	3	0	0	2
3181	m	64	PCA	Kopf	NA	NA	1	3
3191	w	75	PCA	Kopf, Papille	3	1	0	2
3195	w	47	PCA	Kopf, Papille	1	0	0	2
3214	m	59	CPV	Papille	3	0	0	2
3225	m	57	PCA	Kopf, Papille	3	1	0	2
3237	w	51	CPV	Papille	3	0	0	3
3271	m	61	IPMN	Kopf	1	0	0	2
3273	m	76	IPMN	Kopf, Korpus	0	0	0	0
3277	m	61	CPV	Papille	3	1	0	2
3281	m	75	PCA	Kopf, Korpus	3	1	0	2
3293	m	61	PCA	Kopf	3	0	0	2
3295	w	71	PCA	Kopf	2	1	0	3
3300	w	44	CPV	Papille	2	0	0	2

Patient	Sex	Alter	Diagnose	Lokalisation	pT	pN	M	Grading
3311	w	73	PCA	Kopf	3	1	1	3
3318	m	75	IPMN	Kopf, Korpus	3	1	0	2
3319	m	69	PCA	NA	NA	NA	1	NA
3333	m	67	PCA	Kopf	3	0	0	2
3336	m	42	PCA	Kopf	1	1	0	2
3356	w	54	CPV	Papille	2	0	0	2
3390	m	60	PCA	Kopf	3	1	0	2
3396	w	62	PCA	Kopf	3	1	0	3
3409	w	75	PCA	Kopf, Korpus	4	1	0	2
3411	w	74	PCA	NA	3	1	1	3
3425	m	70	CPV	Papille	3	1	1	3
3430	m	32	NPCA	Kopf, Korpus	3	1	0	2
3445	w	65	PCA	Kopf, Papille	3	0	0	2
3449	m	59	PCA	Kopf	3	1	0	2
3456	m	57	NPCA	Kopf	3	0	0	2
3466	m	63	PCA	Kopf	3	1	0	2
3468	w	79	IPMN	Kopf, Korpus	3	1	0	2
3505	m	75	PCA	Kopf	3	1	0	3
3511	m	51	PCA	Kopf, Korpus, Schwanz	3	1	0	3
3524	w	60	CPV	Papille	3	0	0	1
3539	m	69	PCA	Kopf	3	1	0	2
3553	m	60	NPCA	Kopf, Papille	4	1	0	1
3558	m	67	PCA	Korpus	4	1	1	2
3562	m	73	PCA	Kopf	3	1	0	2
3578	m	60	PCA	Kopf, Prozessus uncinatus	3	1	0	3
3592	w	36	PCA	Kopf	4	1	1	3
3596	w	63	PCA	Kopf	3	1	0	3
3603	w	65	PCA	Korpus	NA	NA	1	3
3621	w	58	PCA	Kopf	3	0	0	2
3623	w	50	PCA	Kopf	3	1	0	2
3626	m	61	PCA	Kopf, Korpus	3	NA	1	3
3641	w	47	PCA	Kopf	3	1	0	3
3644	m	52	PCA	Kopf	4	NA	1	2
3650	m	34	PCA	Kopf	3	1	0	3
3653	m	49	PCA	Kopf	3	1	0	3
3657	w	56	PCA	Korpus, Schwanz	3	0	0	2
3659	w	74	PCA	Kopf	3	0	0	3
3672	m	71	PCA	Kopf, Korpus	2	1	0	2
3698	m	72	PCA	Schwanz	NA	NA	1	NA
3700	w	62	PCA	Kopf	3	1	0	2
3712	w	84	PCA	Kopf, Papille	3	1	0	2
3723	m	69	PCA	Kopf	4	1	0	3
3730	m	68	PCA	Kopf, periampullär	3	0	0	3
3771	m	66	PCA	Kopf, Papille	2	0	0	2
3772	m	64	PCA	Kopf	3	1	0	3
3777	m	76	PCA	Kopf	3	1	0	3
3780	m	57	CPV	Papille	3	1	0	2
3781	m	68	PCA	Korpus	3	1	0	2
3813	m	51	PCA	Kopf, Korpus	4	1	0	2
3822	m	66	PCA	NA	NA	NA	1	NA
3823	m	78	PCA	Schwanz	3	0	0	3
3834	w	59	PCA	Kopf	4	NA	1	3
3837	m	64	PCA	Kopf	2	0	0	2
3838	w	59	PCA	Korpus, Schwanz	3	1	0	3
3848	w	52	NPCA	Schwanz	3	0	0	1
3853	w	52	PCA	Kopf	4	NA	1	2

CGH-analyse Primärtumoren (PT, n=29) und disseminierte Zellen (KM: Knochenmark, LK: Lymphknoten, BL: peripher-venöses Blut, n=76)

Patient	Diagnose	Probe	CGH-Ergebnis
2296	PCA	PT	aberrant
2316	metastasiertes PCA	KMT1 KMT2	balanciert balanciert
2324	PCA	KMT1 KMT2 KMT3 KMT4 KMT5 KMT6 KMT7	aberrant aberrant aberrant aberrant balanciert aberrant aberrant
2337	PCA	PT BLT1 KMT1 KMT2 KMT3 KMT4 KMT5 KMT6 KMT7 KMT8 LKT1 LKT2 LKT3	aberrant balanciert balanciert balanciert balanciert aberrant aberrant balanciert balanciert balanciert aberrant aberrant aberrant
2345	PCA	PT	aberrant
2347	PCA	KMT1	balanciert
2349	PCA	KMT1 KMT2 KMT3 KMT9 KMT10	aberrant aberrant aberrant aberrant aberrant
2426	PCA	PT	aberrant
2432	PCA	PT KMT1 KMT2	aberrant aberrant aberrant
2436	CPV	KMT1 LKT1 LKT2	aberrant aberrant balanciert
2501	PCA	PT KMT1	aberrant aberrant
2506	NPCA	KMT1 KMT2 LKT1 LKT2 LKT3 LKT4 LKT5 LKT6 LKT8	balanciert balanciert balanciert aberrant balanciert aberrant aberrant aberrant aberrant balanciert
2555	PCA	PT	aberrant
2559	PCA	PT	aberrant
2562	PCA	PT	aberrant
2568	PCA	PT	aberrant
2584	PCA	PT BLT1 KMT1	aberrant aberrant balanciert
2604	PCA	PT	aberrant

Patient	Diagnose	Probe	CGH-Ergebnis
3214	CPV	LKT1 LKT2 LKT3 LKT4	balanciert balanciert balanciert balanciert
3271	IPMN	LKT1	aberrant
3273	IPMN	LKT1 LKT2	aberrant balanciert
3295	PCA	PT LKT1 LKT2 LKT3 LKT4	aberrant aberrant aberrant aberrant aberrant
3300	CPV	LKT1 LKT2	aberrant aberrant
3311	metastasiertes PCA	LKT1 LKT2 LKT3	aberrant aberrant aberrant
3356	CPV	LKT1	aberrant
3425	metastasiertes CPV	KMT1 KMT2 KMT3	balanciert aberrant aberrant
3445	PCA	PT KMT1	aberrant aberrant
3449	PCA	LKT1 LKT2 LKT3 LKT4 LKT5 LKT6 LKT7	aberrant aberrant aberrant aberrant aberrant aberrant aberrant
3456	NPCA	KMT1	aberrant
3578	PCA	PT	aberrant
3596	PCA	PT KMT1 KMT2	aberrant aberrant aberrant
3621	PCA	PT	aberrant
3623	PCA	PT	aberrant
3641	PCA	KMT1	aberrant
3653	PCA	PT	aberrant
3657	PCA	PT	aberrant
3700	PCA	PT	aberrant
3712	PCA	PT	aberrant
3730	PCA	PT	aberrant
3772	PCA	PT	aberrant
3777	PCA	PT	aberrant
3781	PCA	PT	aberrant
3823	PCA	PT	aberrant
3837	PCA	PT	aberrant
3838	PCA	PT	aberrant

Auswahl einzelner Zellen aus Gruppen ähnlich veränderter Zellen eines Patienten bei der Analyse spezifischer Aberrationen:

Zellen eines Patienten, die aufgrund eines komplett abweichenden Aberrationsprofils nicht zu einer Gruppe zusammengefasst wurden, gingen alle in die Analyse ein. Aus einer Gruppe von Zellen mit ähnlichen Veränderungen wurde diejenige Zelle für die Analyse ausgewählt, welche die geringste Ähnlichkeit mit den anderen bei der Auswertung berücksichtigten Zellen aufwies. Die ausgewählten Zellen sind fett hervorgehoben (Chromosomenregionen ohne Veränderungen sind nicht dargestellt, DNA-Gewinn: grün. DNA-Verlust: rot).

Patient 2349

Gruppe	Zelle	1q	2q	3q	5p	5q	7p	7q	8q	10q	11p	11q	13q	15q
1	KMT1		■		■	■	■	■	■	■			■	■
	KMT2	■	■	■		■		■	■	■	■	■	■	
	KMT9		■		■			■	■	■			■	
2	KMT3				■									■
	KMT10				■								■	■

Gruppe	Zelle	16q	18q	19p	19q	20p	20q	21q	22q	Xp	Xq
1	KMT1					■	■				
	KMT2	■	■			■	■		■		
	KMT9			■	■	■	■	■	■		
2	KMT3					■				■	■
	KMT10					■	■				

Patient 3295

Gruppe	Zelle	4q	5q	6p	6q	7q	8p	11p	11q	12p	14q	15q	17p	18p
1	LKT1	■	■		■	■	■	■	■				■	
	LKT2	■		■	■	■			■	■	■	■	■	■
2	LKT3								■			■	■	
	LKT4							■						

Gruppe	Zelle	18q	19p	19q	20q	21q	22q	Xp
1	LKT1	■	■	■	■	■	■	■
	LKT2	■	■	■		■		■
2	LKT3	■	■			■		■
	LKT4	■	■			■		■

Patient 3449

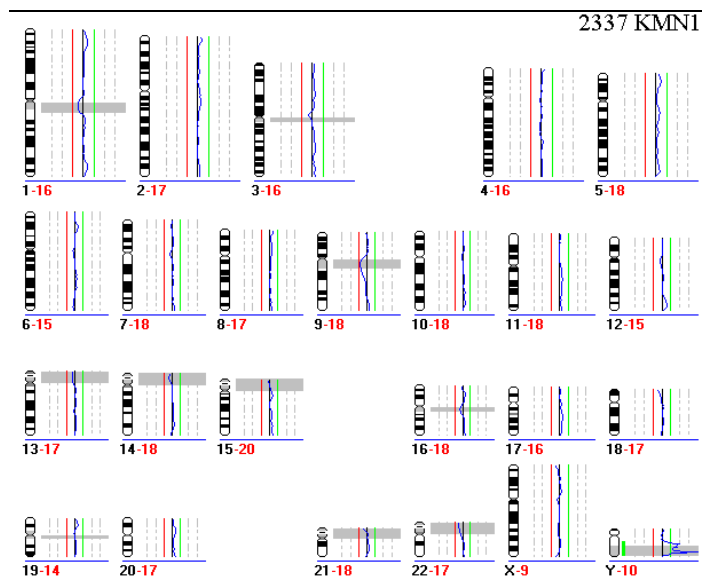
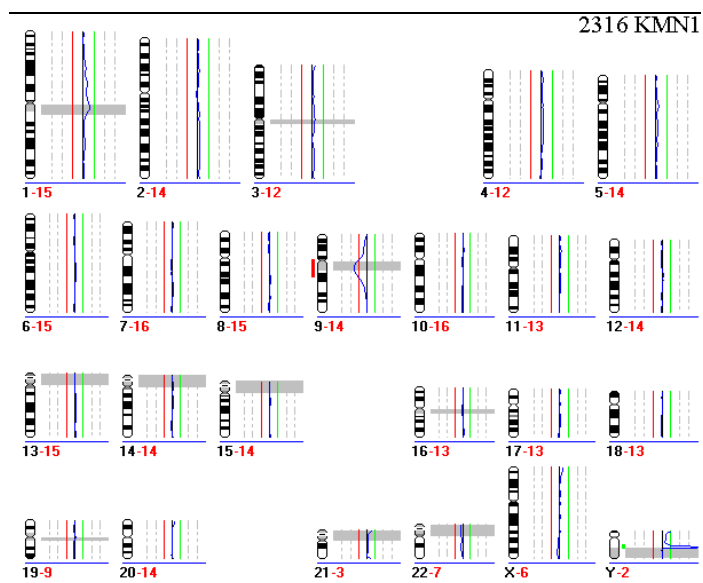
Gruppe	Zelle	3p	3q	4p	5q	6p	8p	8q	9p	9q	12p	17p	17q	18p
1	LKT1			■	■	■	■	■			■	■	■	
	LKT2			■		■	■	■			■	■		■
	LKT4			■	■	■	■	■	■		■	■	■	■
	LKT6			■		■	■	■			■	■	■	■
	LKT7			■		■	■	■			■	■	■	
LKT3			■		■		■						■	
LKT5	■	■	■		■		■	■	■				■	

Gruppe	Zelle	18q	19p	21q	Xp	Xq
1	LKT1	■		■		
	LKT2	■		■		
	LKT4	■	■	■		
	LKT6	■	■	■		
	LKT7	■	■	■		
LKT3			■			
LKT5				■	■	

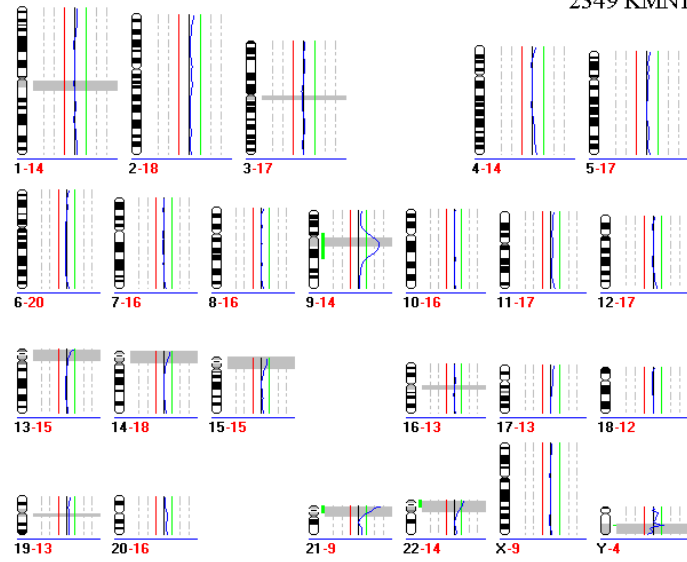
CGH-Profile aller ungefärbten Normalzellen, Marker-positiven Zellen und Primärtumoren

Die CGH-Profile aller untersuchten Proben sind im Folgenden nach ihrer Codenummer aufsteigend aufgeführt für:

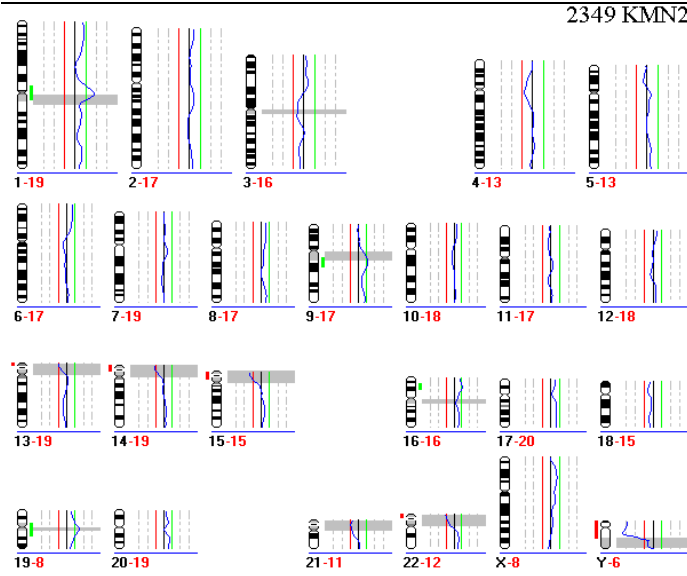
1.) Normalzellen (n=12)



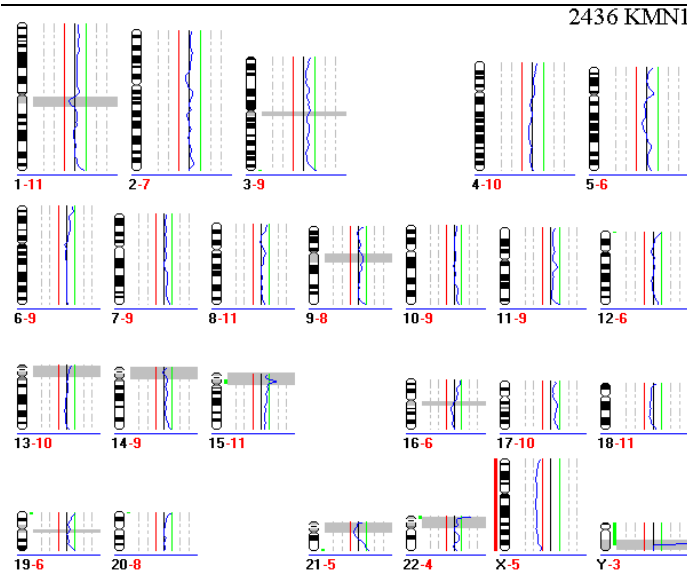
2349 KMN1



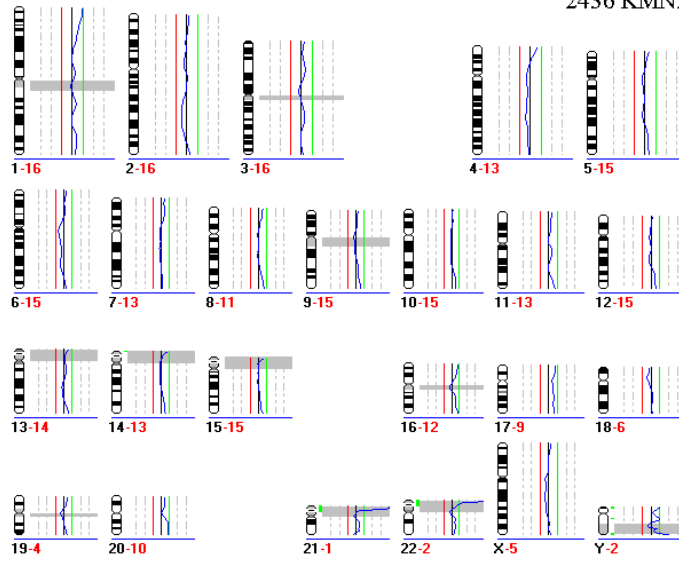
2349 KMN2



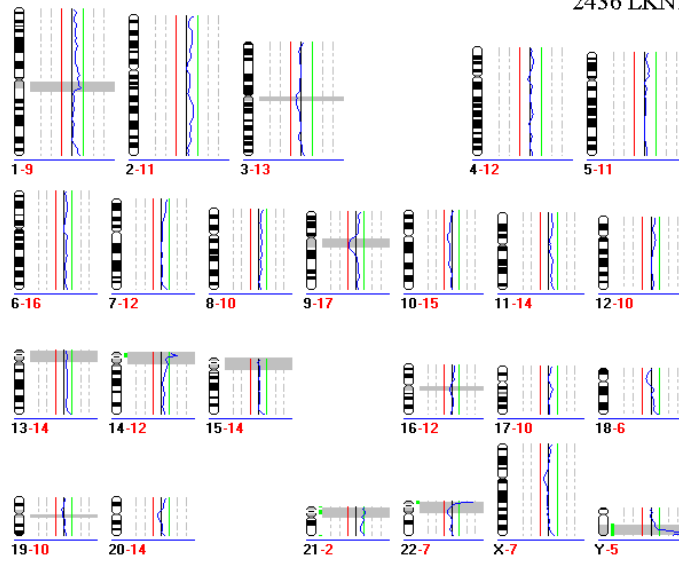
2436 KMN1



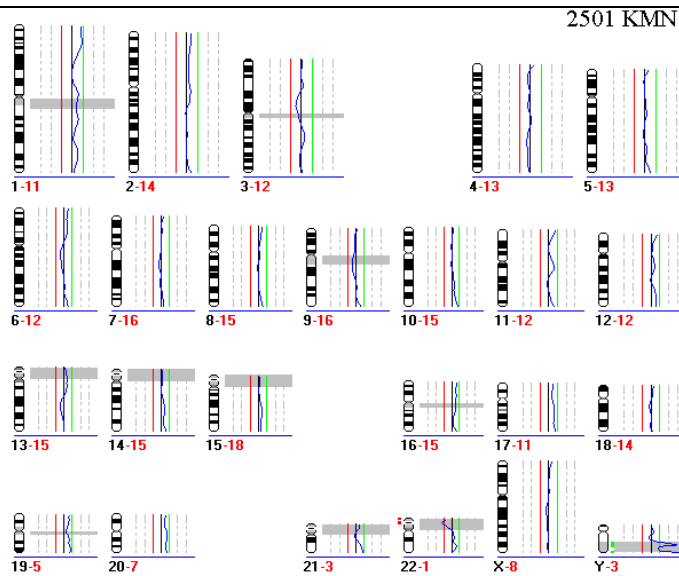
2436 KMN2



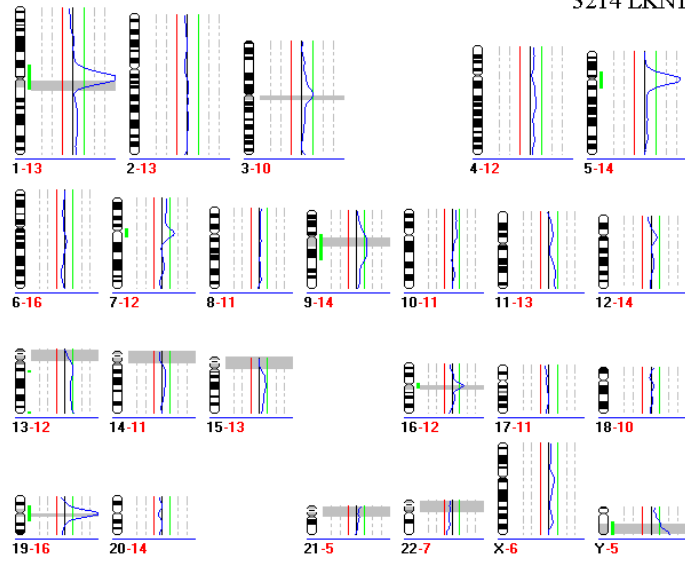
2436 LKN1



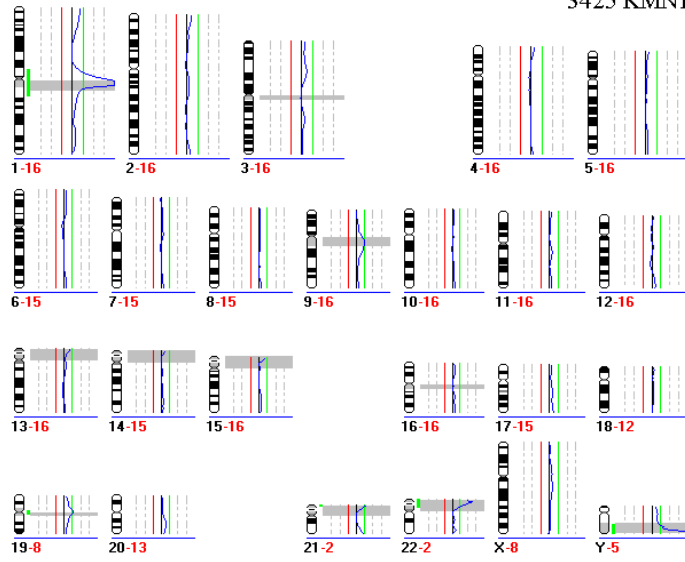
2501 KMN1



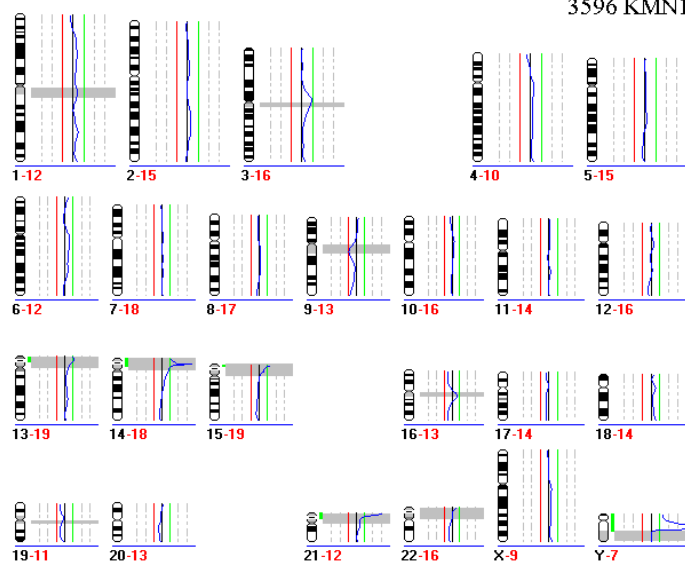
3214 LKN1

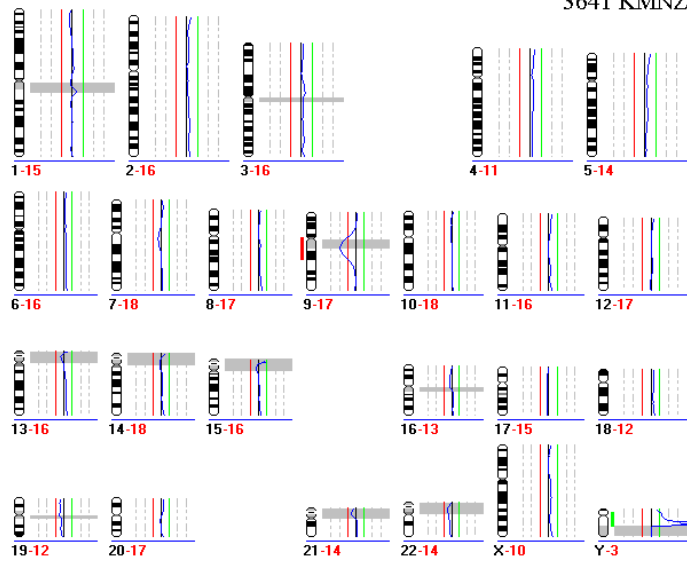


3425 KMNI

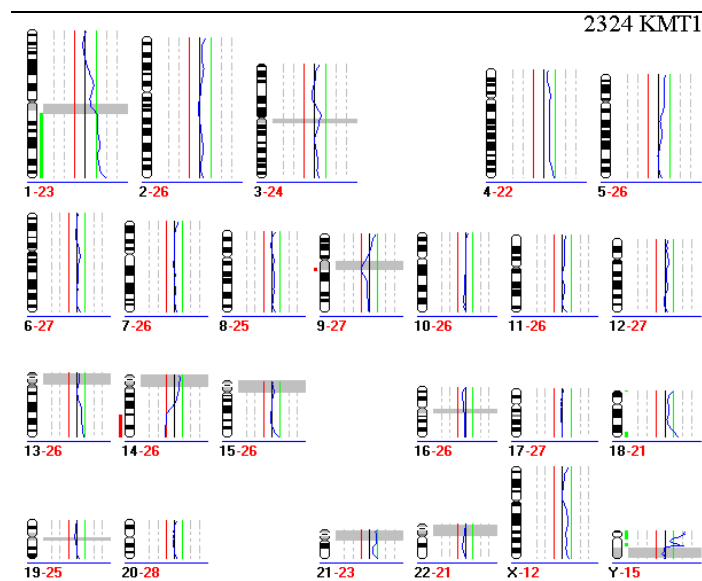
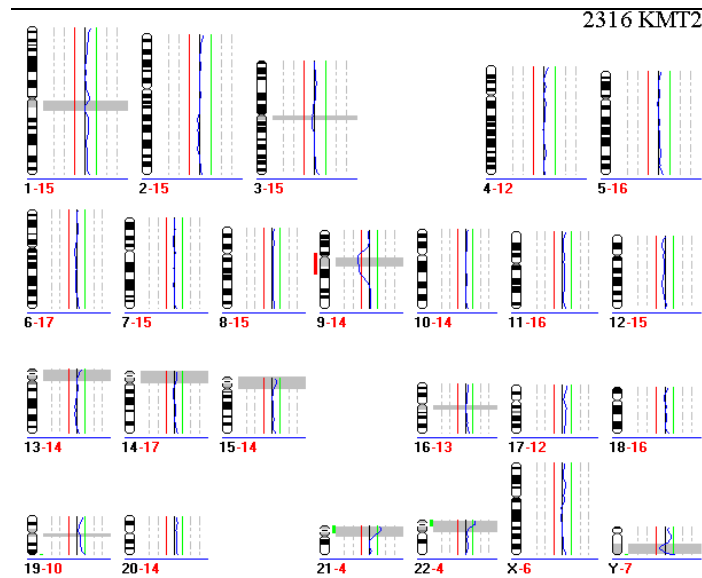
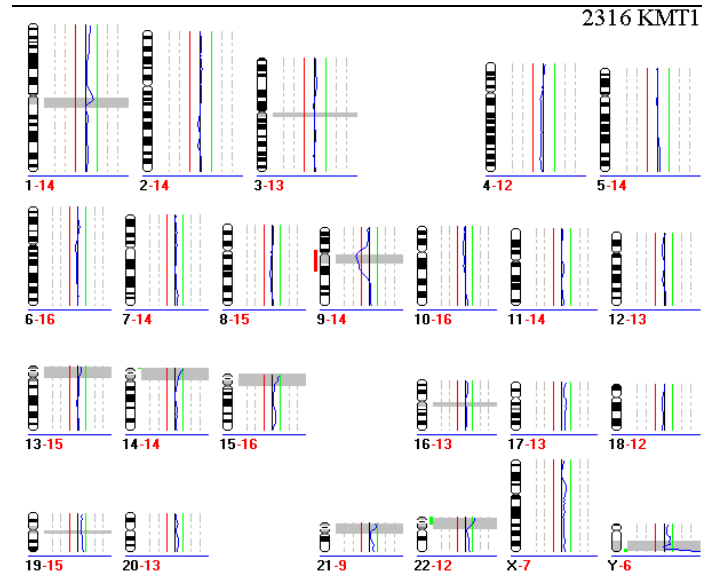


3596 KMNI

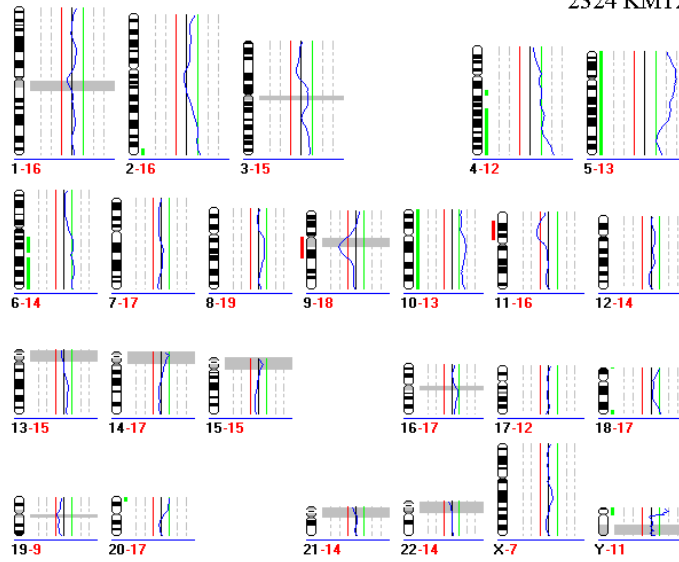




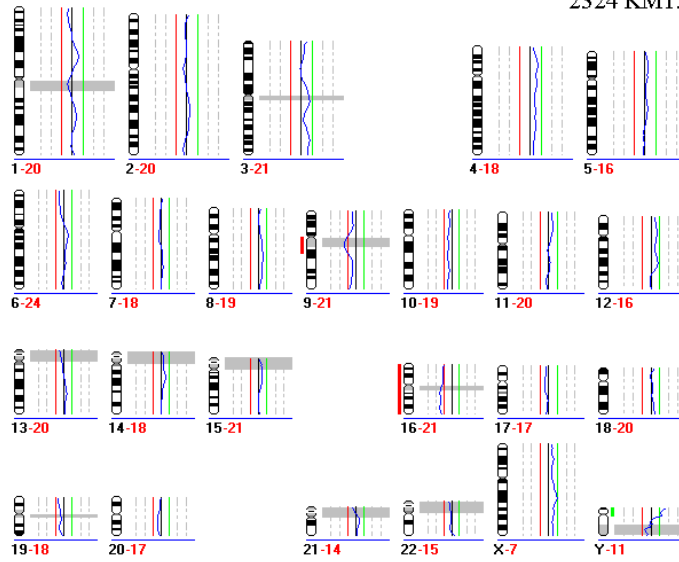
2.) Marker-positiven Zellen (n=76)



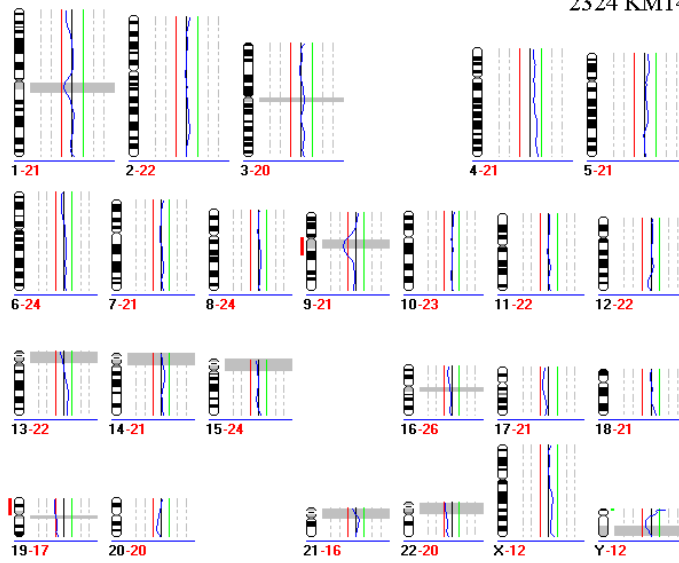
2324 KMT2



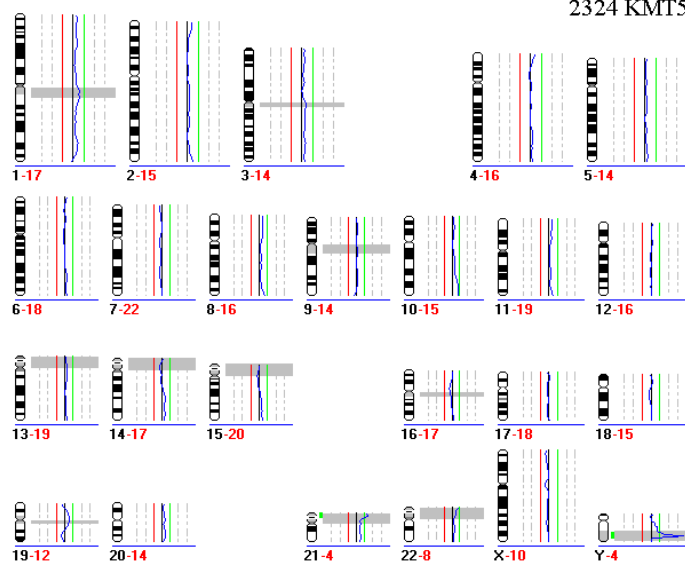
2324 KMT3



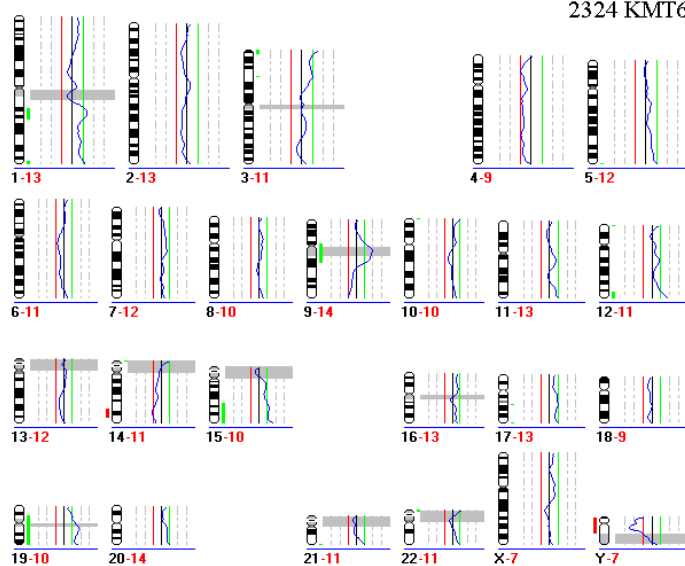
2324 KMT4



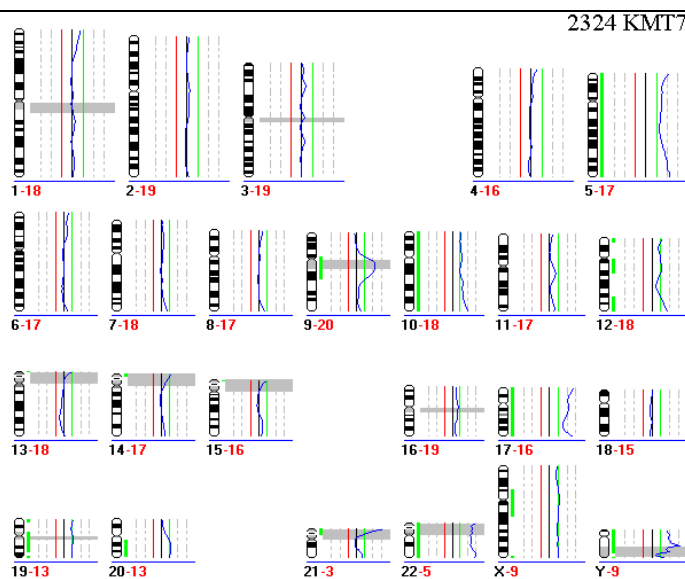
2324 KMT5



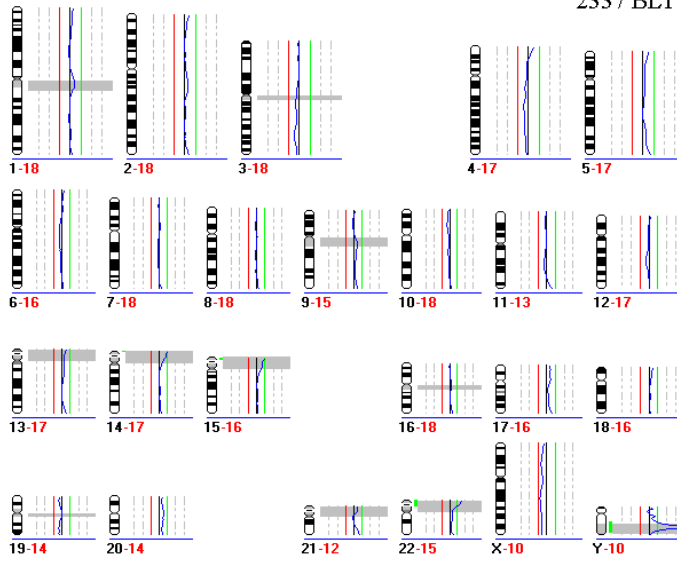
2324 KMT6



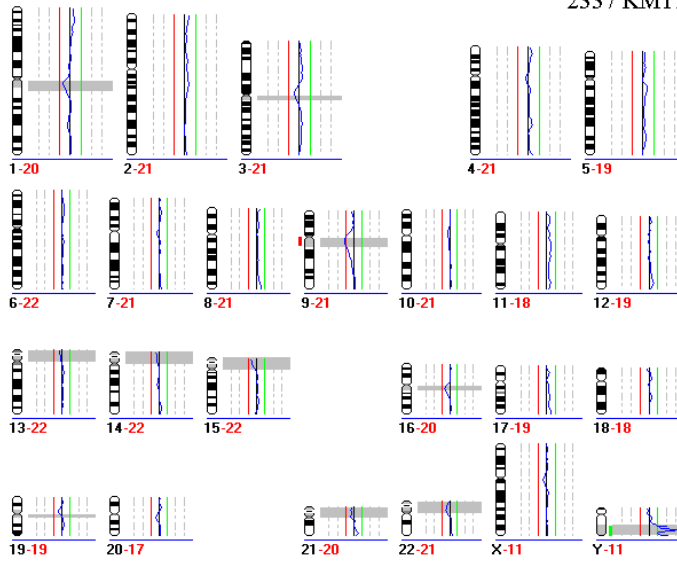
2324 KMT7



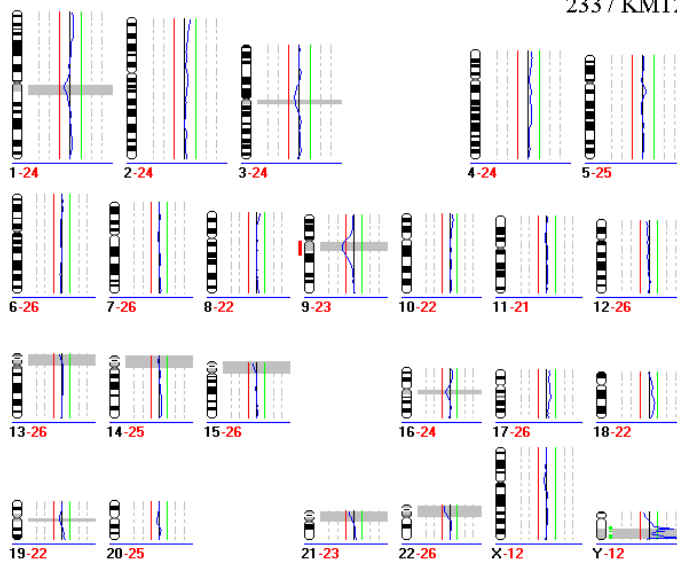
2337 BLT1



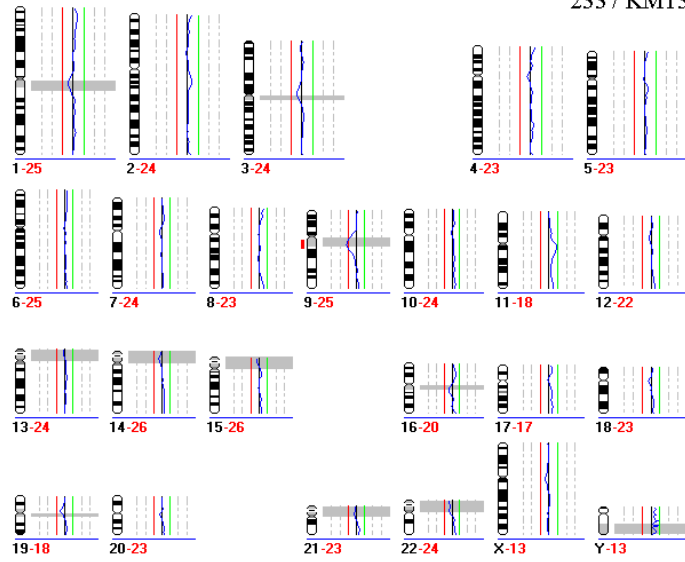
2337 KMT1



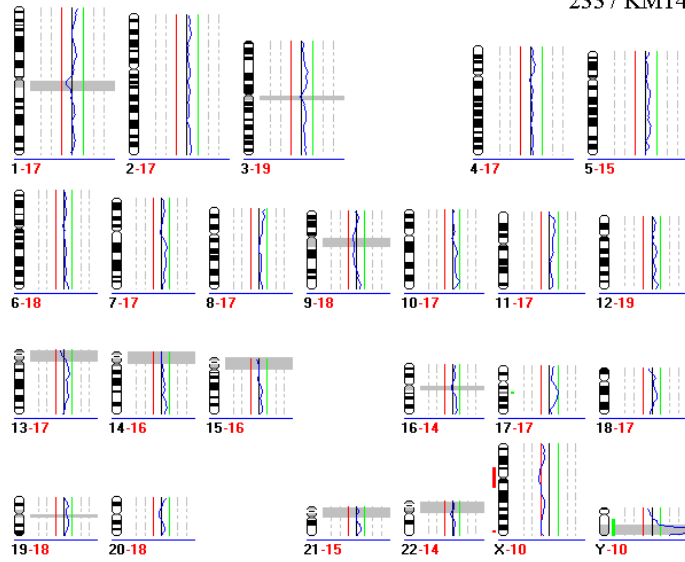
2337 KMT2



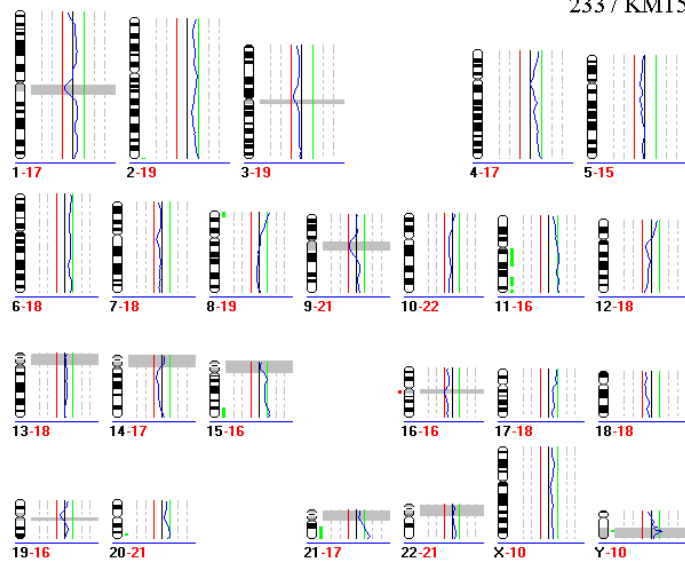
2337 KMT3



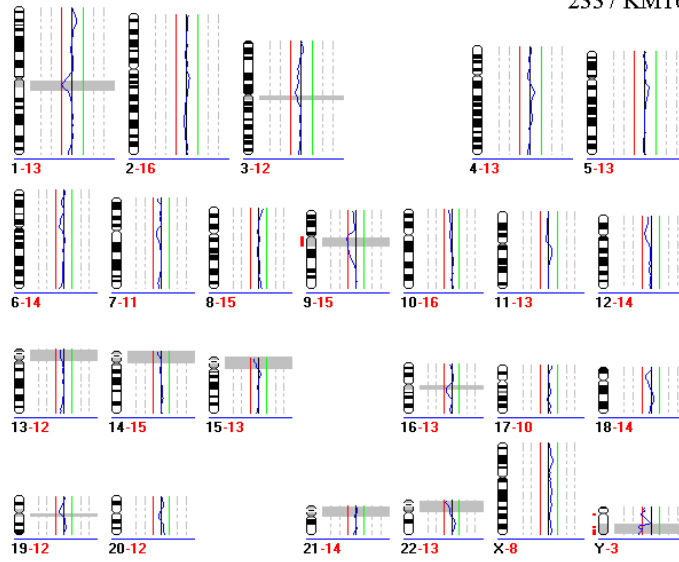
2337 KMT4



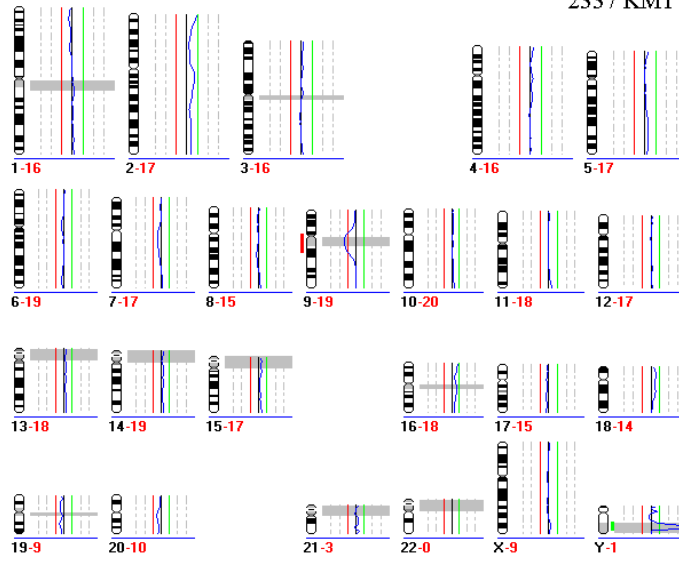
2337 KMT5



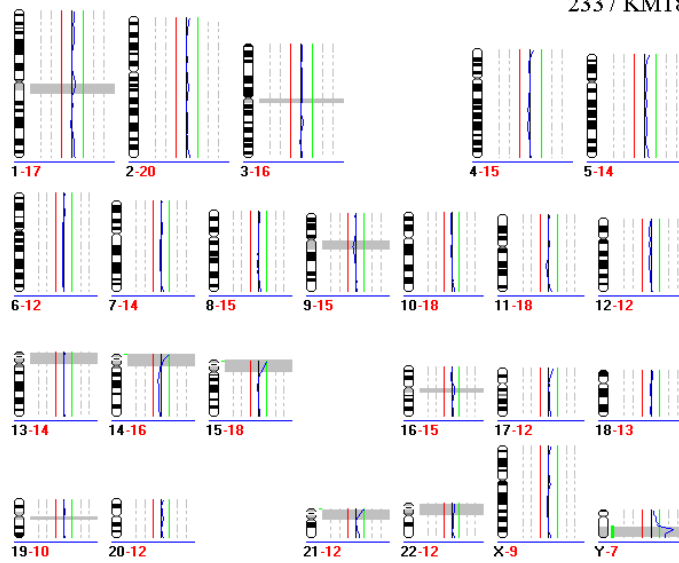
2337 KMT6



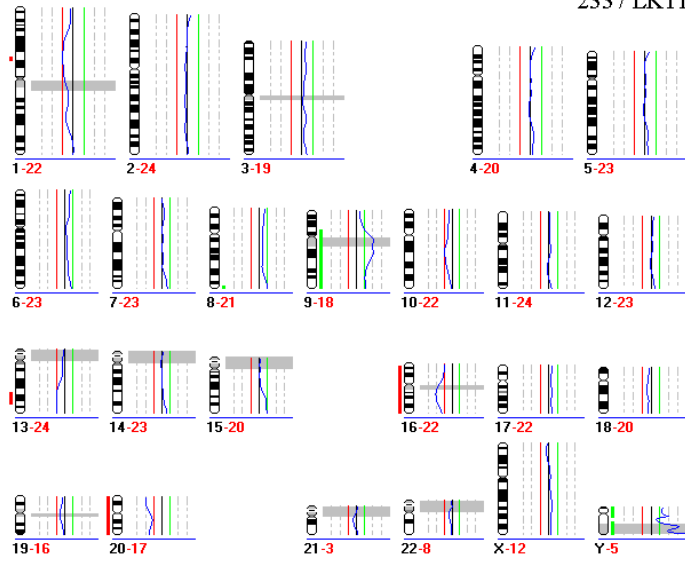
2337 KMT7



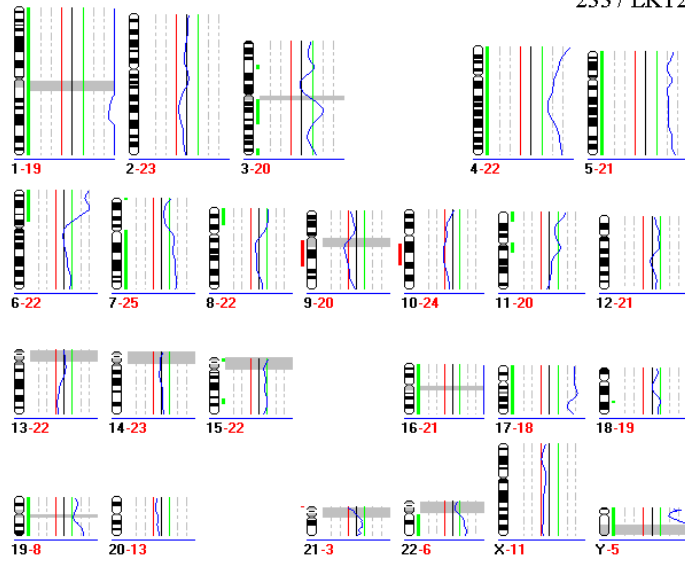
2337 KMT8



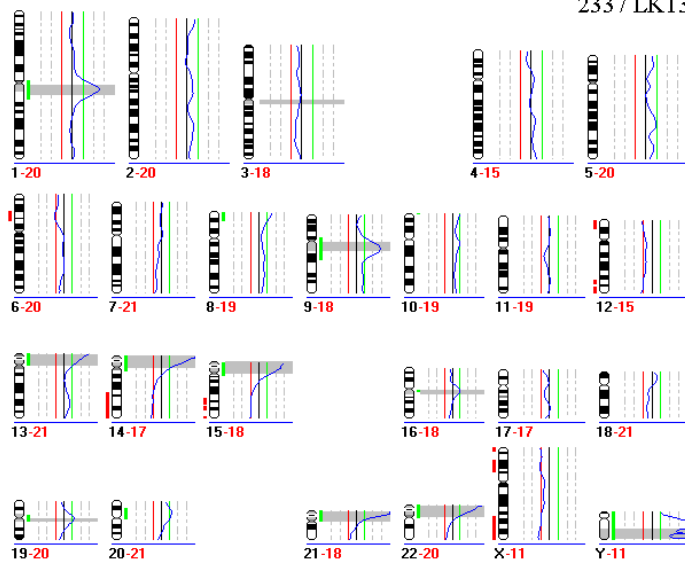
2337 LKT1

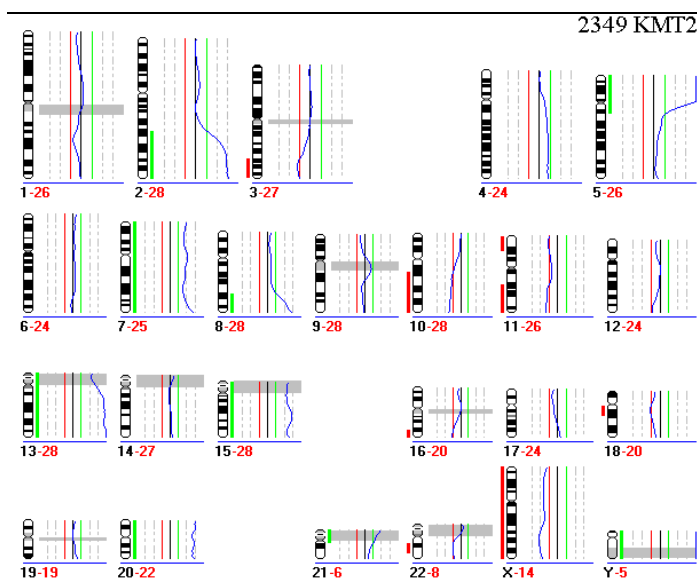
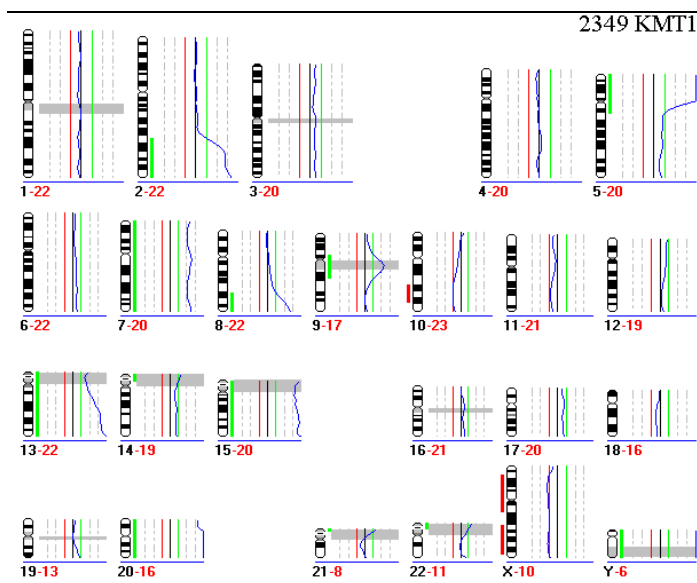
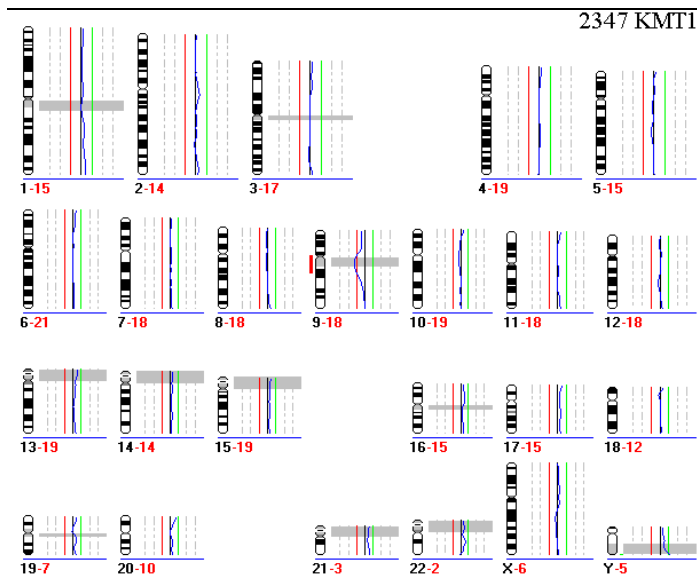


2337 LKT2

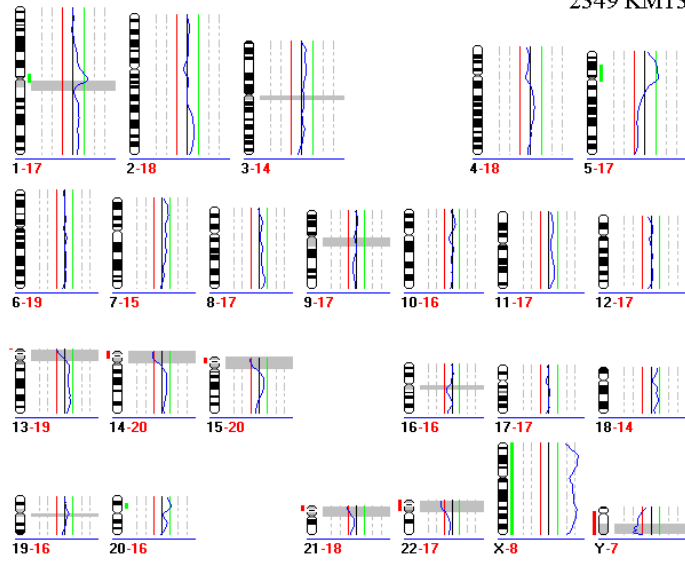


2337 LKT3

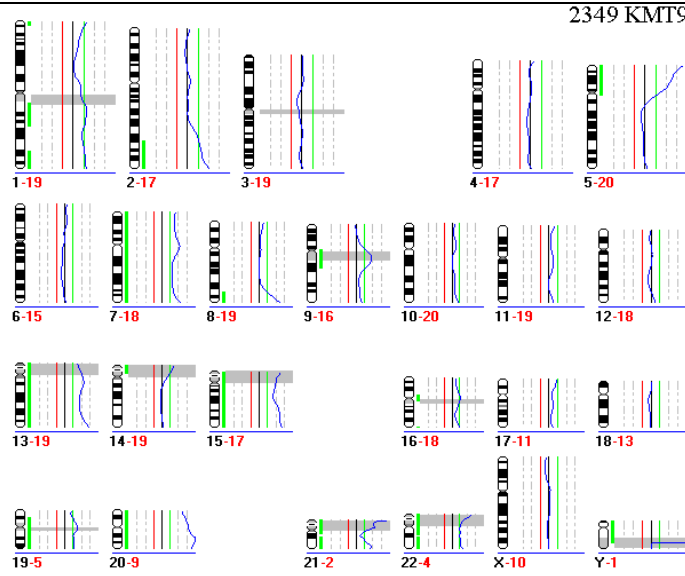




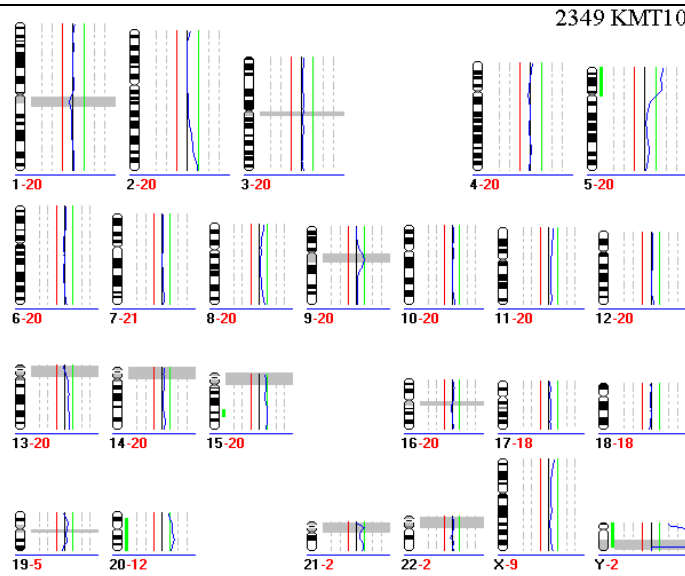
2349 KMT3



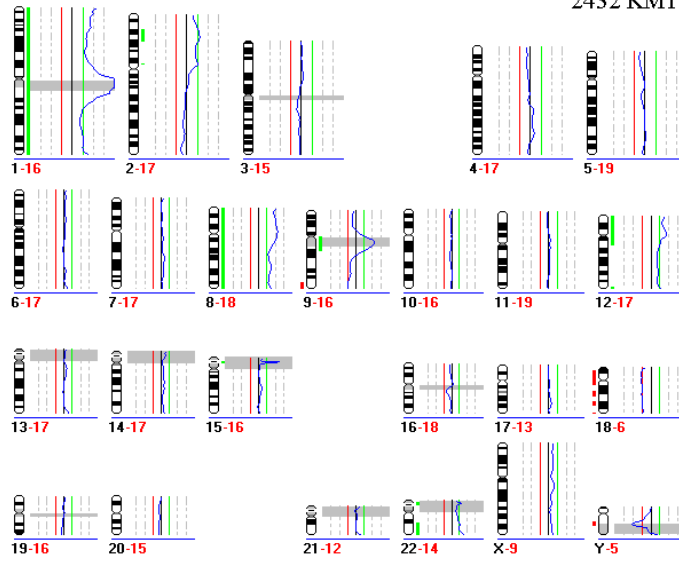
2349 KMT9



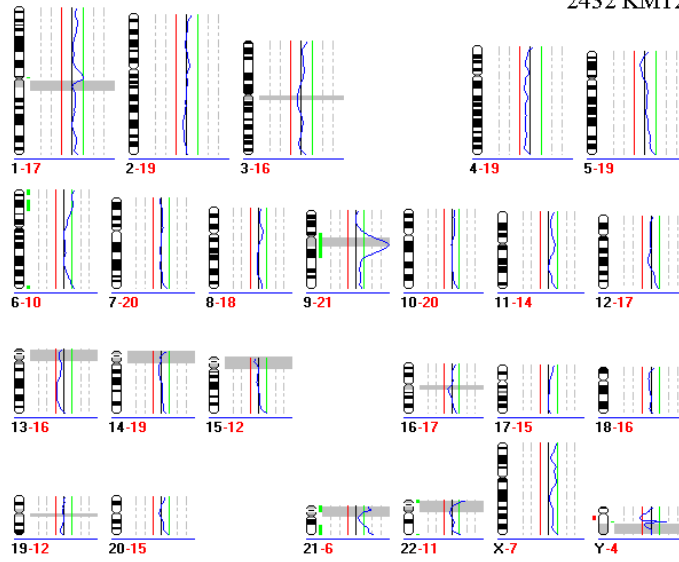
2349 KMT10



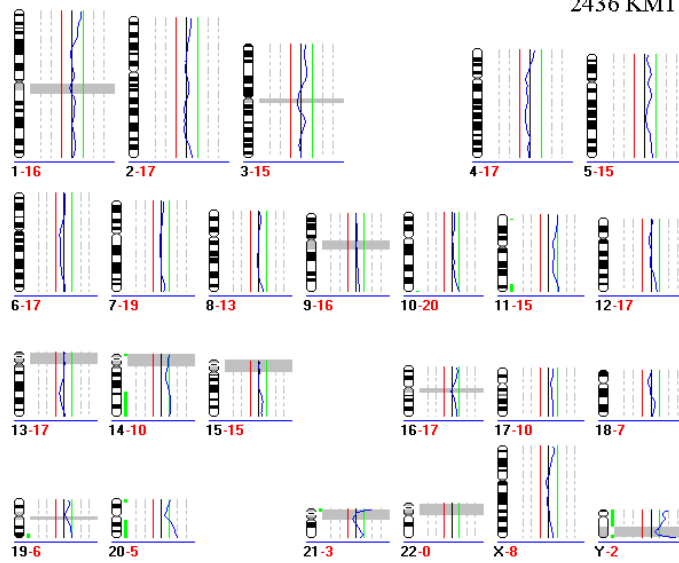
2432 KMT1



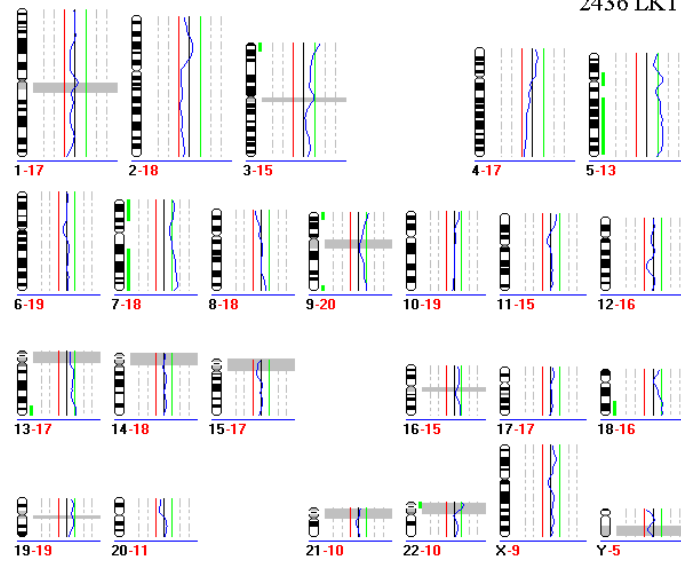
2432 KMT2



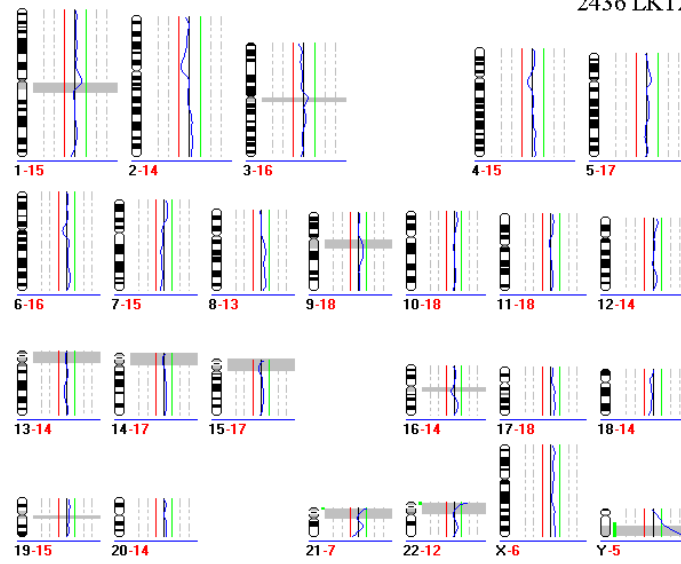
2436 KMT1



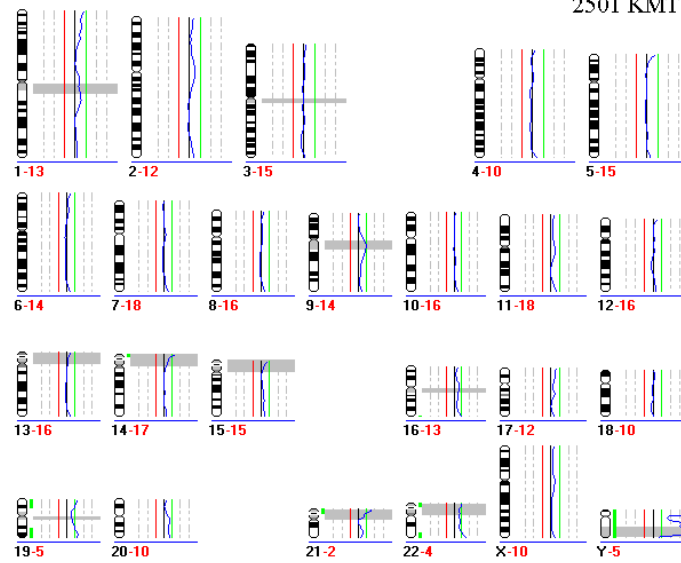
2436 LKT1

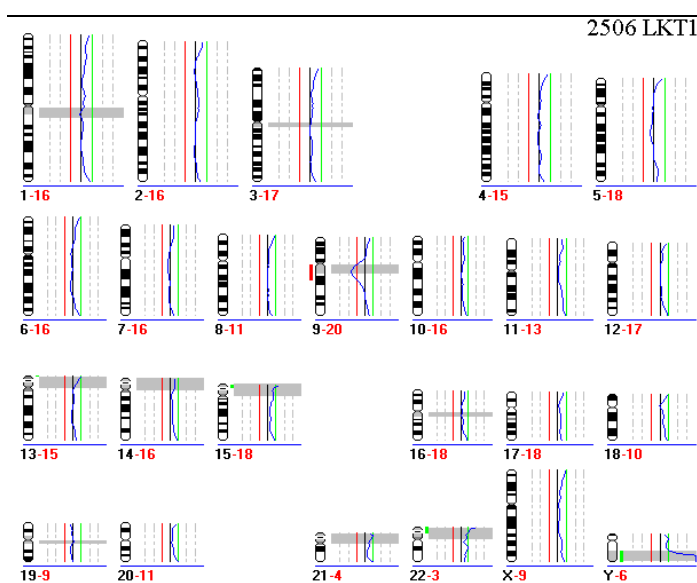
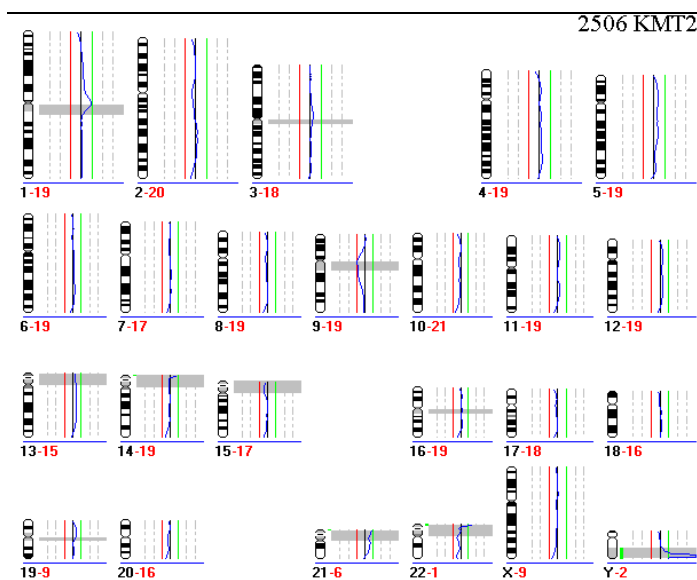
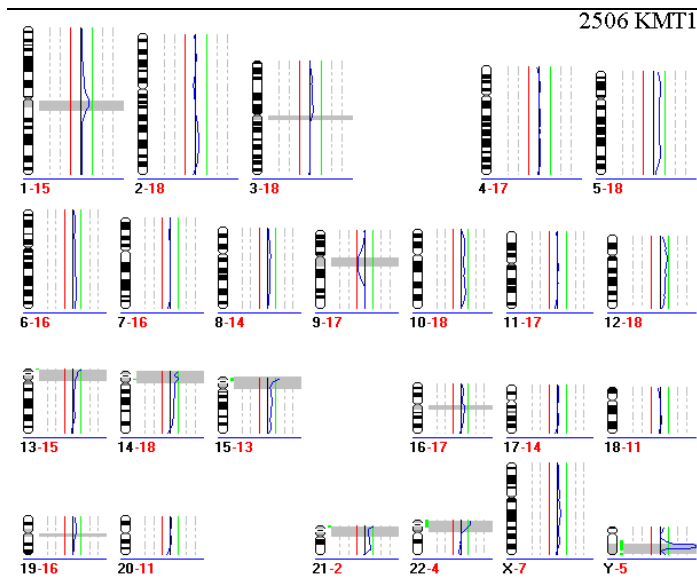


2436 LKT2

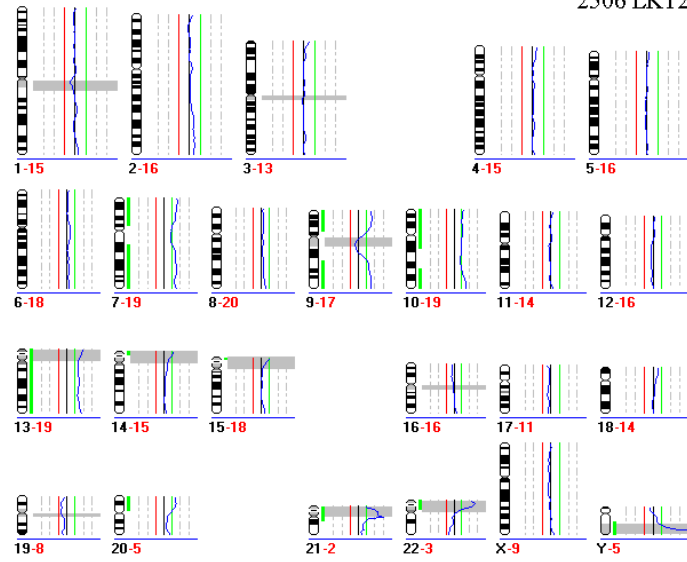


2501 KMT1

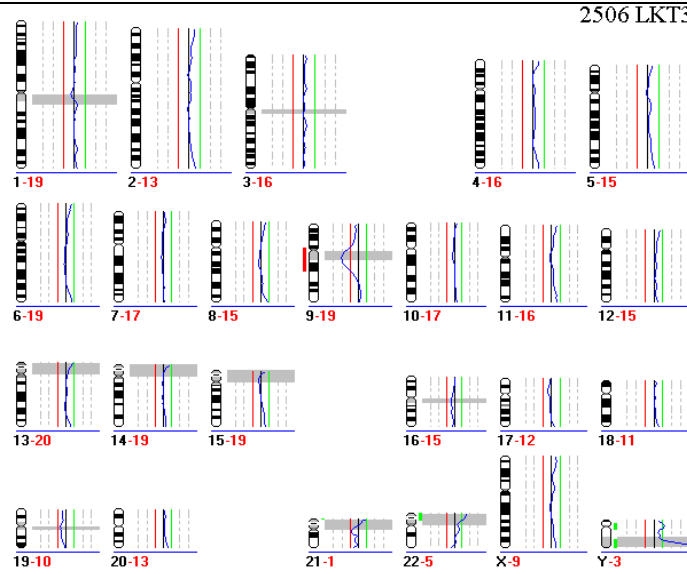




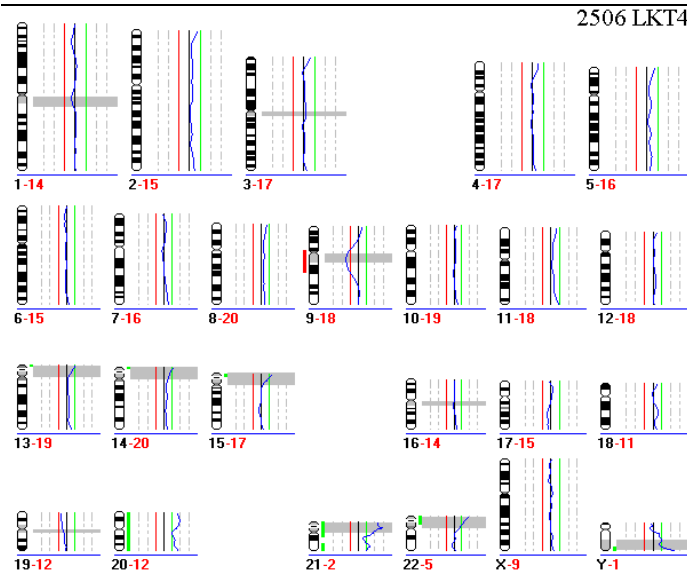
2506 LKT2



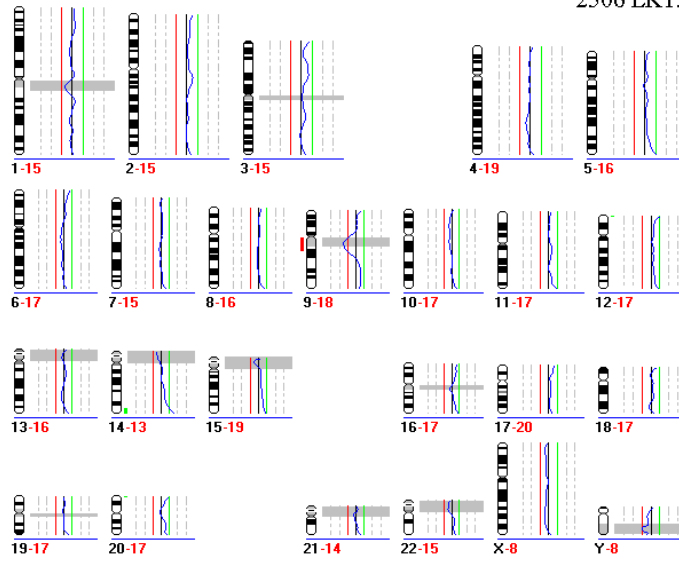
2506 LKT3



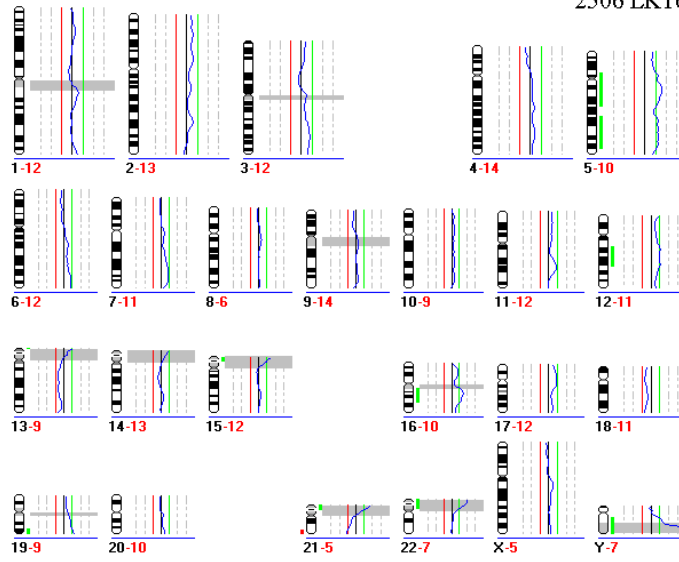
2506 LKT4



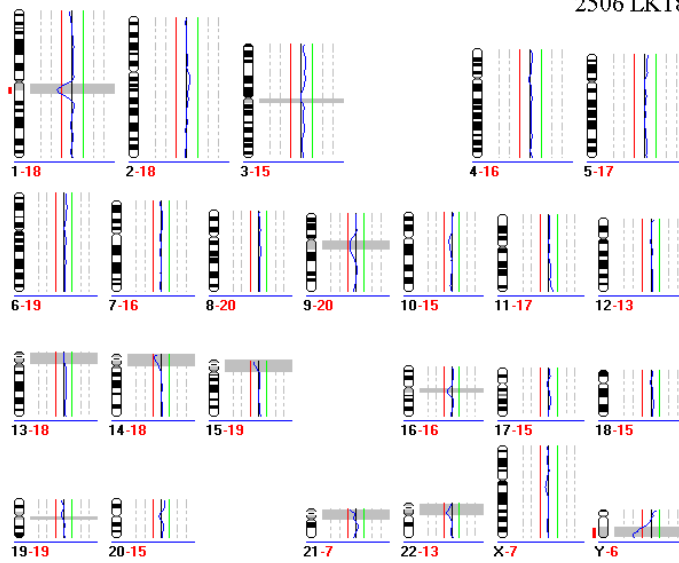
2506 LKT5



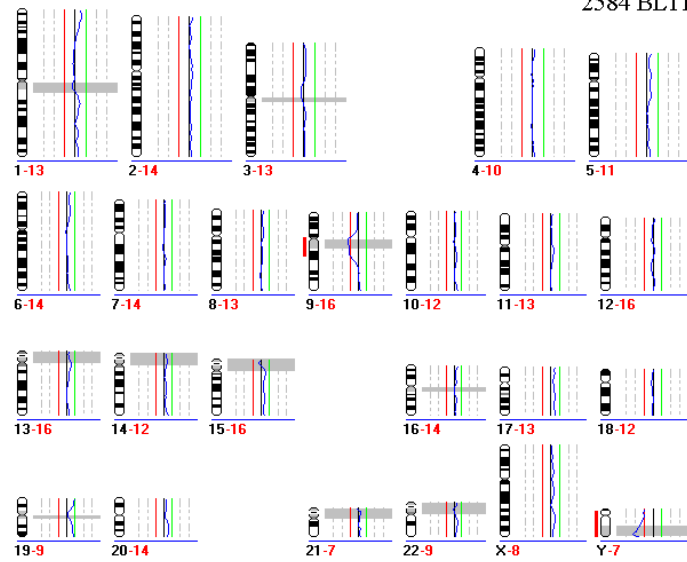
2506 LKT6



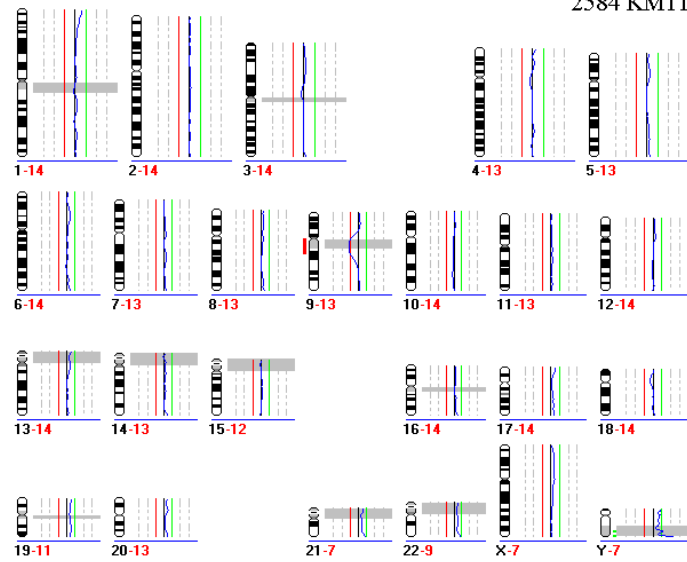
2506 LKT8



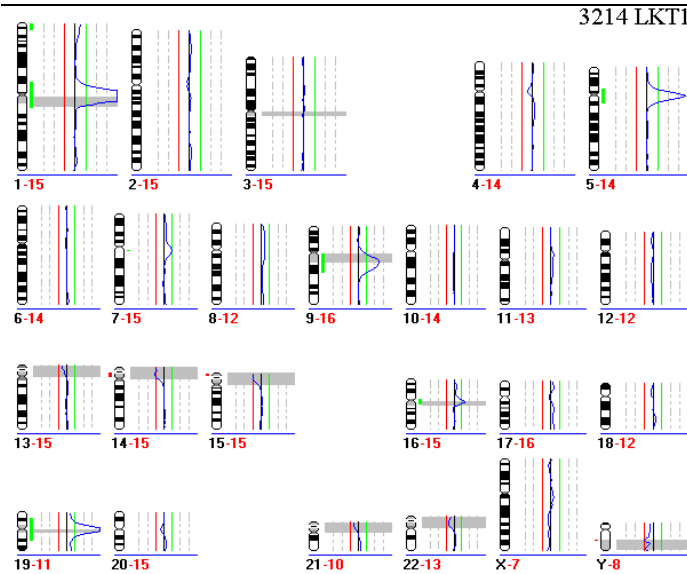
2584 BLT1



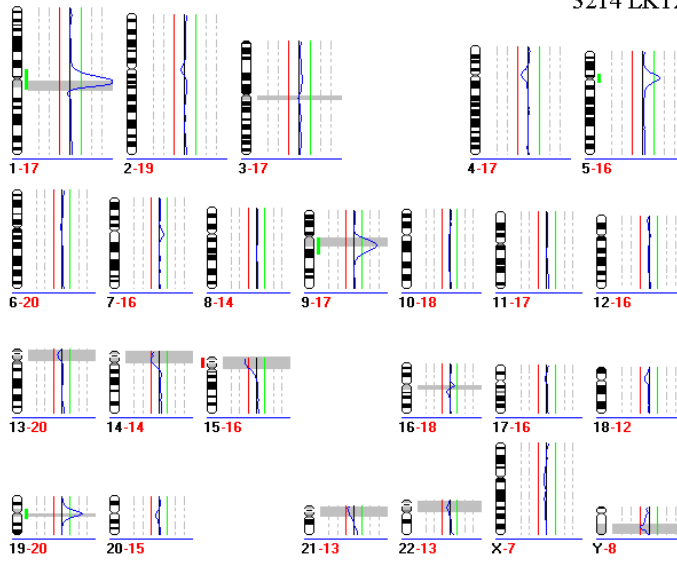
2584 KMT1



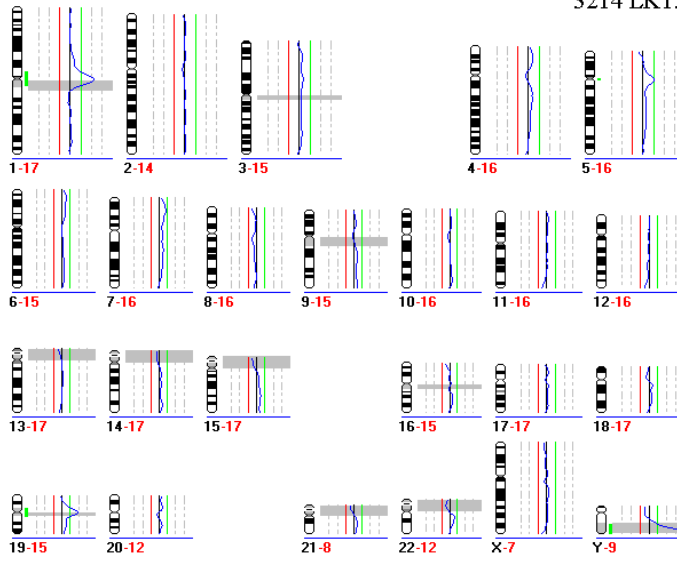
3214 LKT1



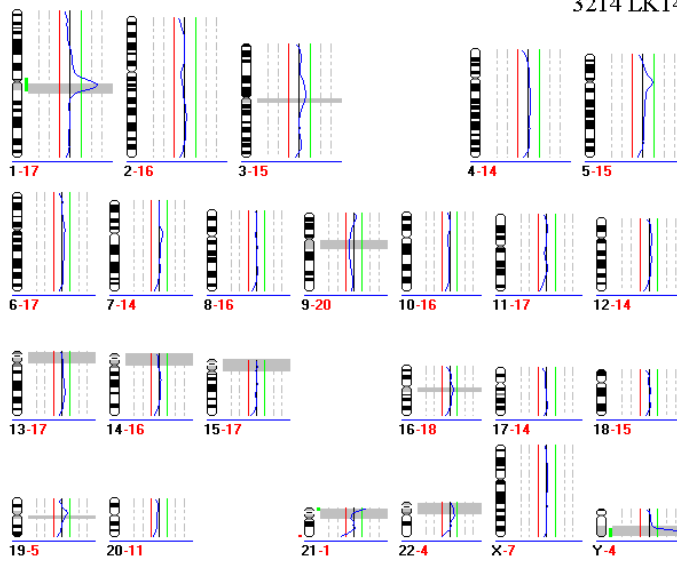
3214 LKT2



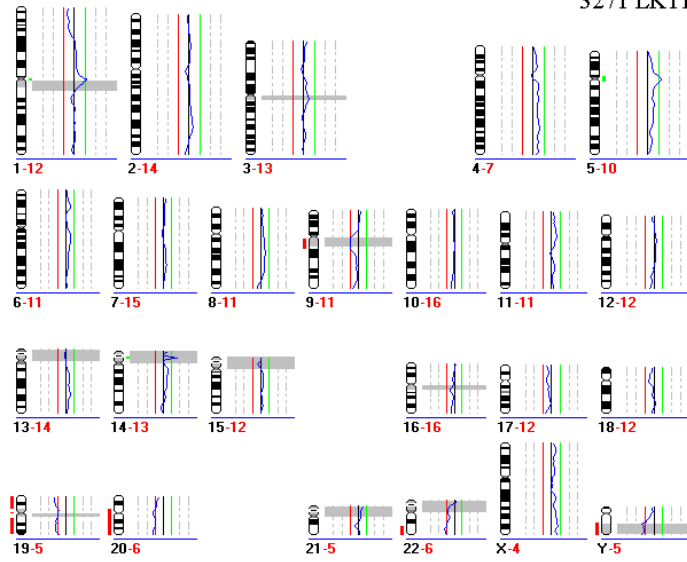
3214 LKT3



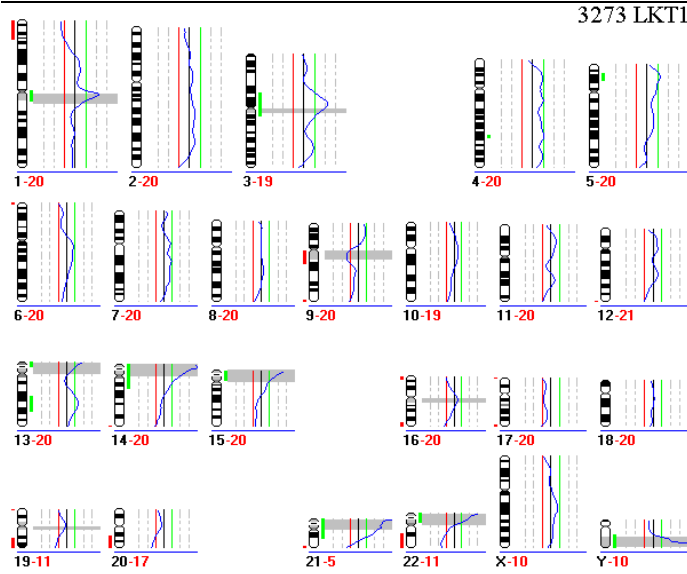
3214 LKT4



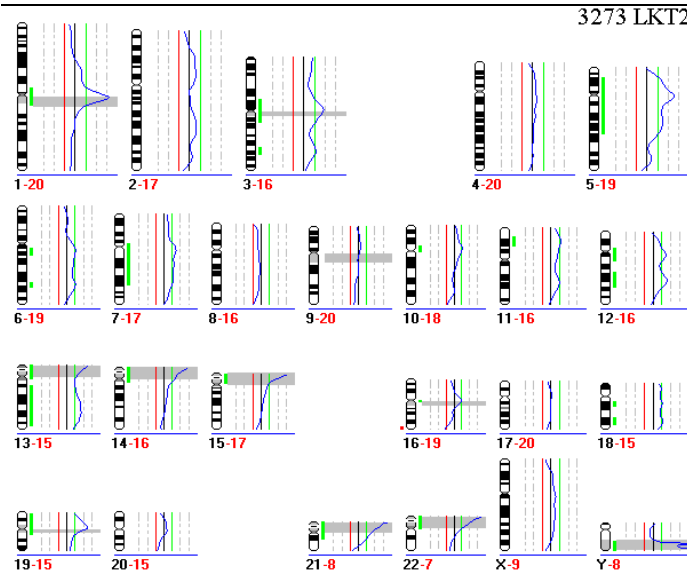
3271 LKT1



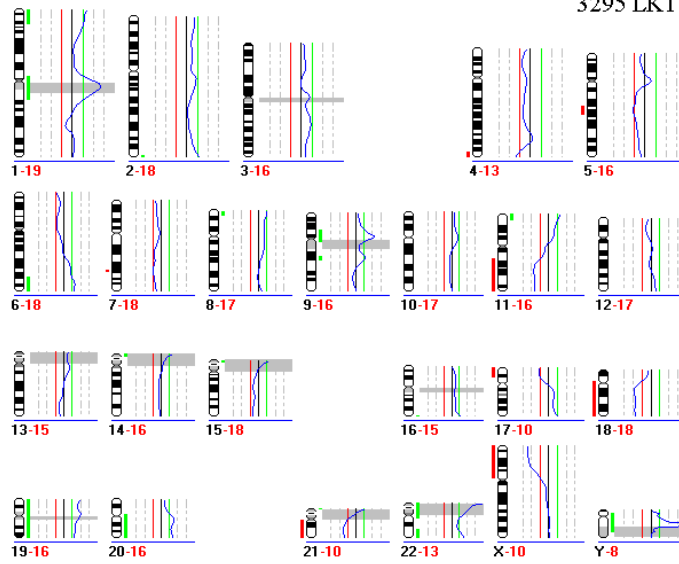
3273 LKT1



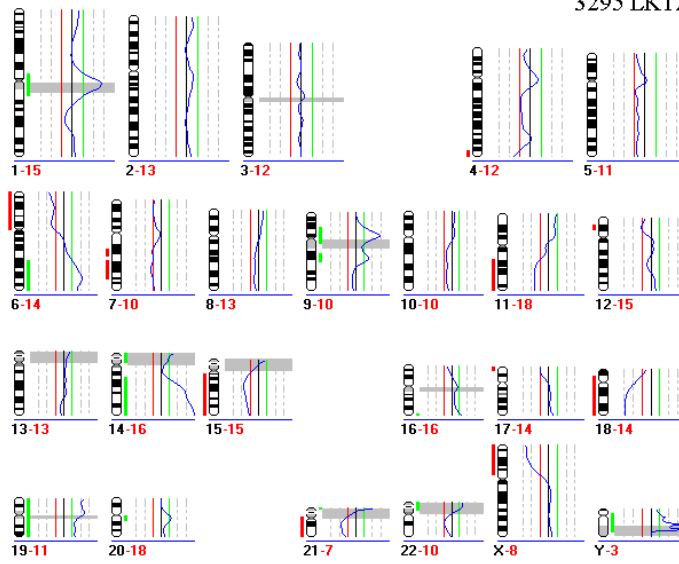
3273 LKT2



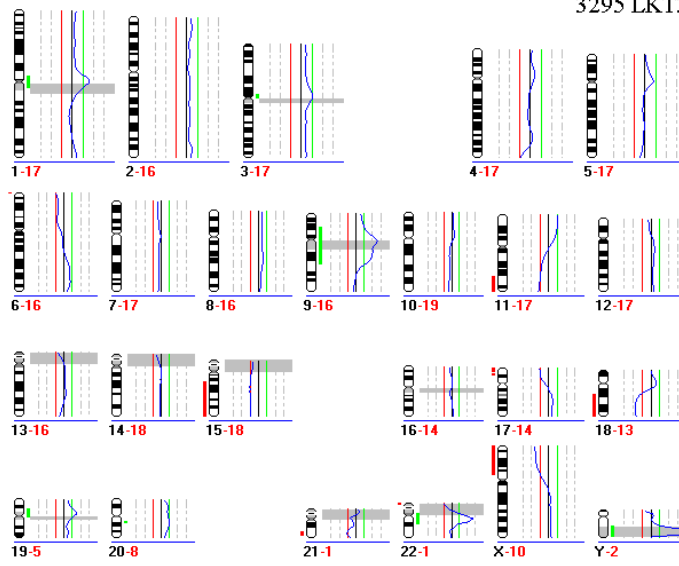
3295 LKT1



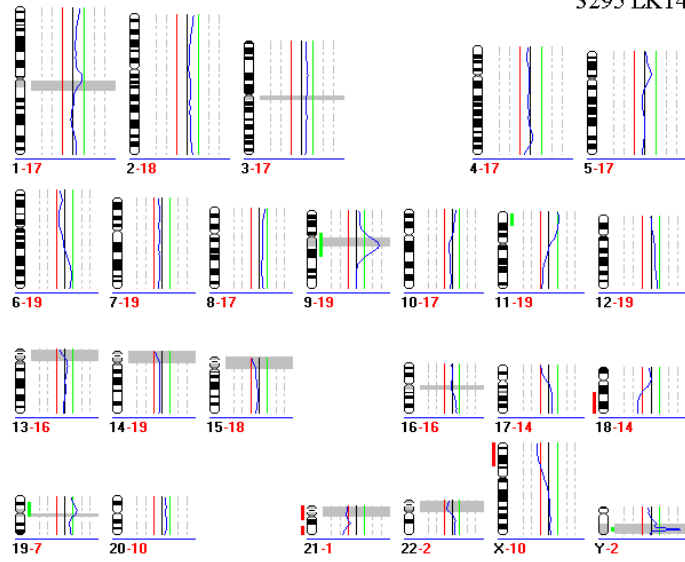
3295 LKT2



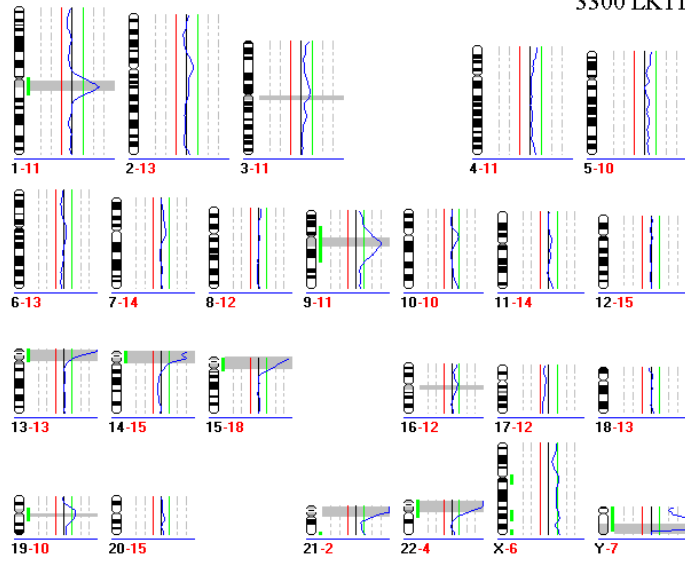
3295 LKT3



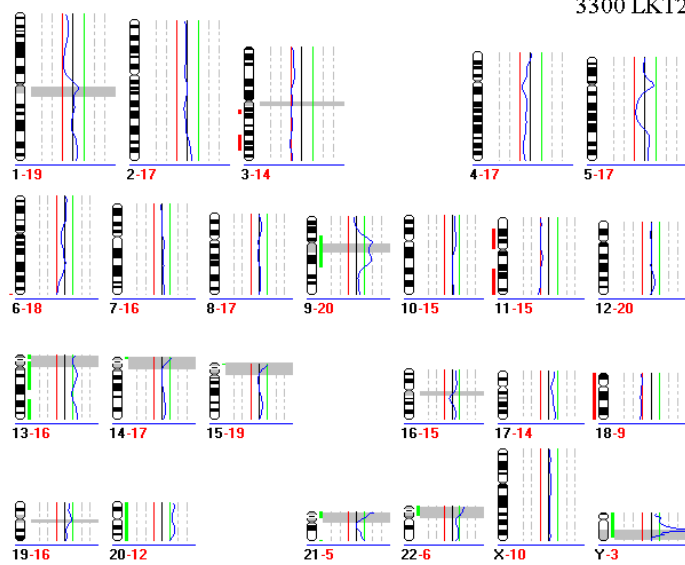
3295 LKT4



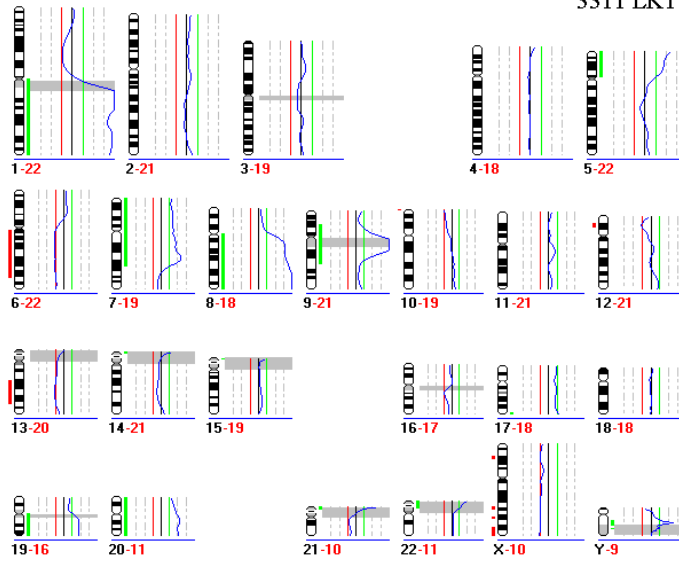
3300 LKT1



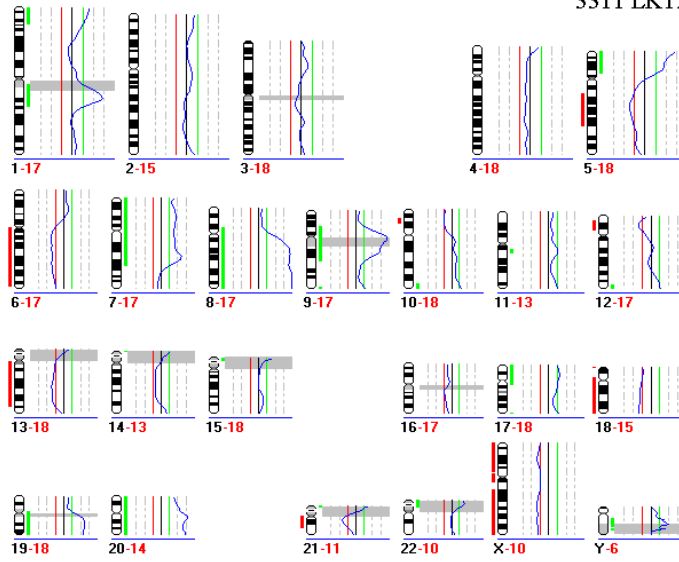
3300 LKT2



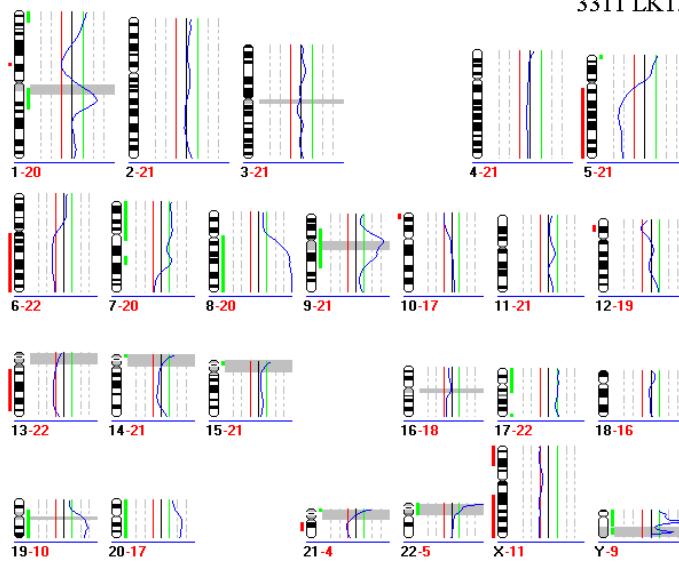
3311 LKT1



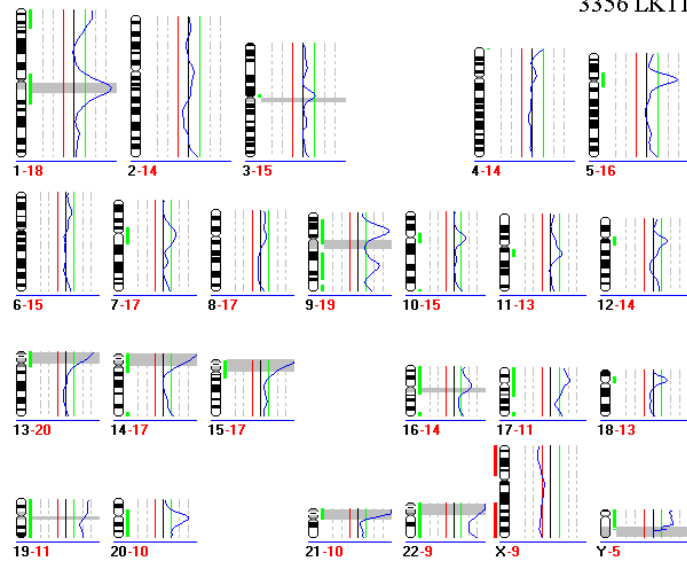
3311 LKT2



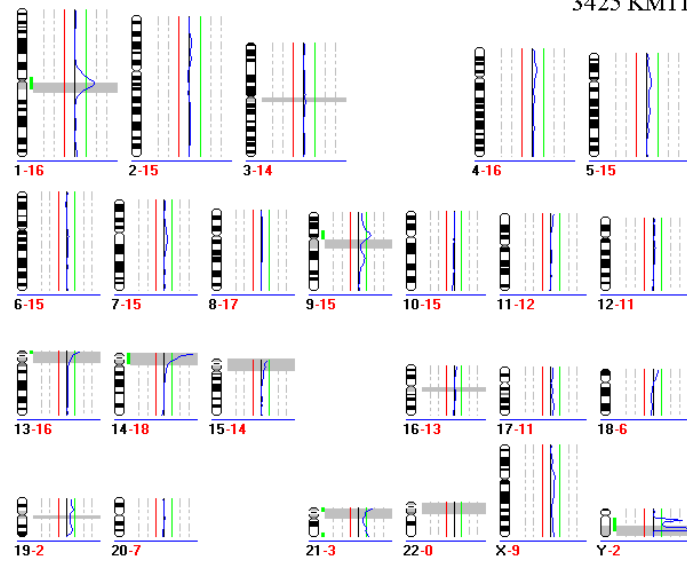
3311 LKT3



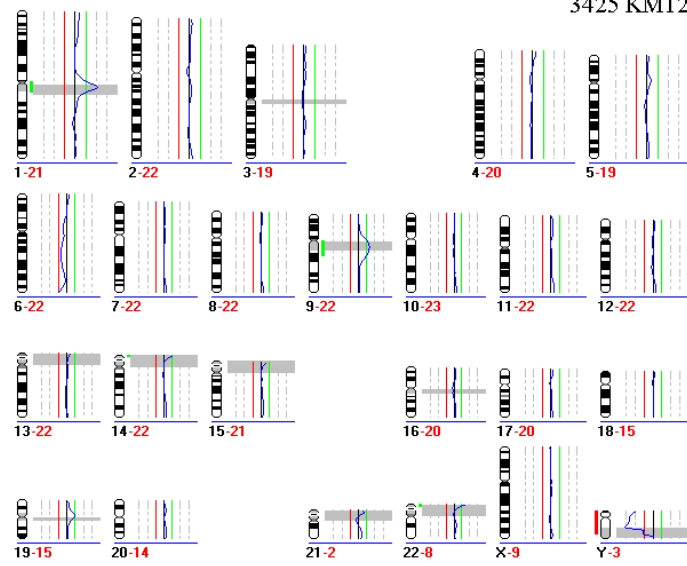
3356 LKT1



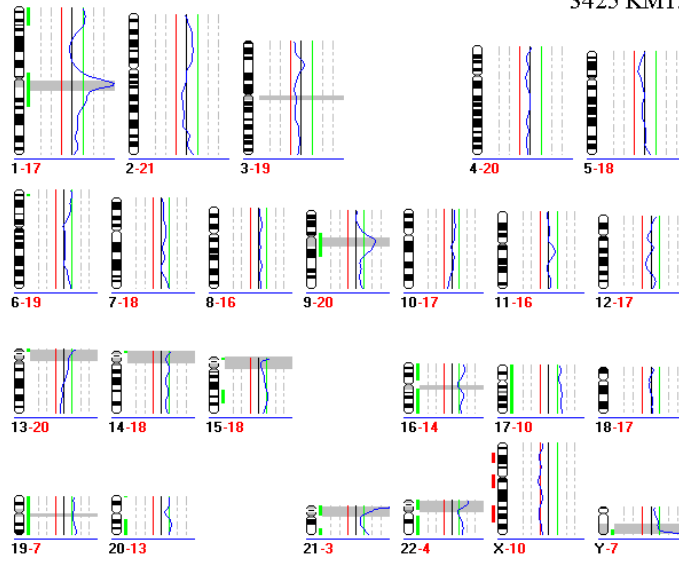
3425 KMT1



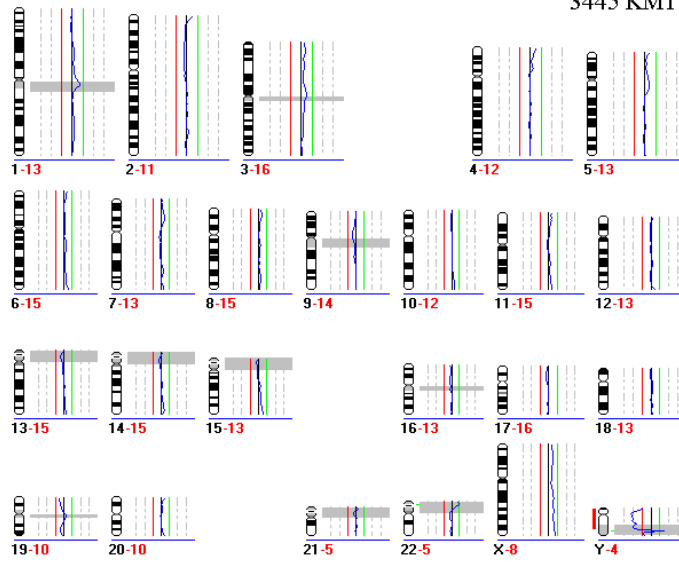
3425 KMT2



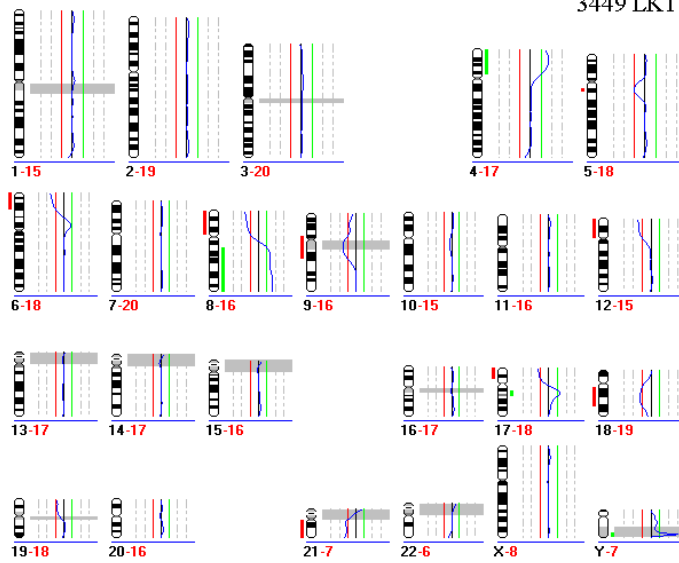
3425 KMT3



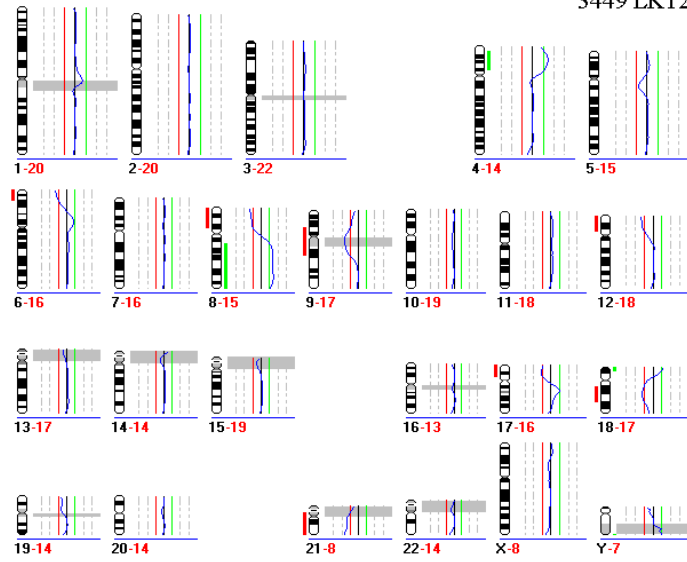
3445 KMT1



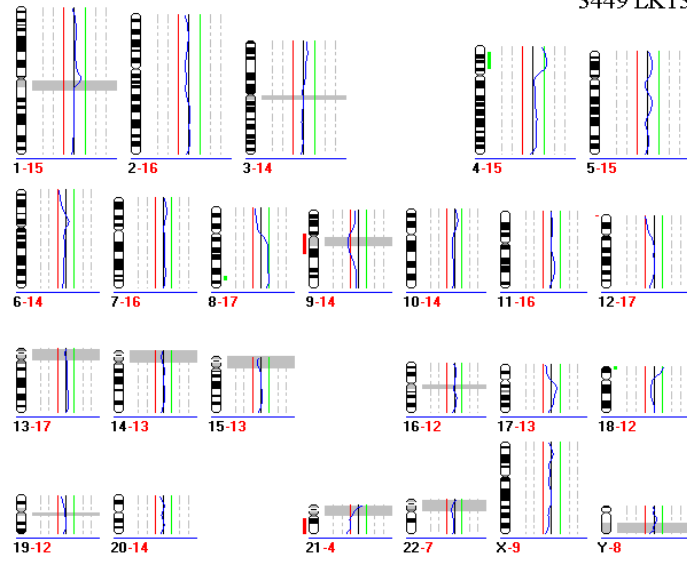
3449 LKT1



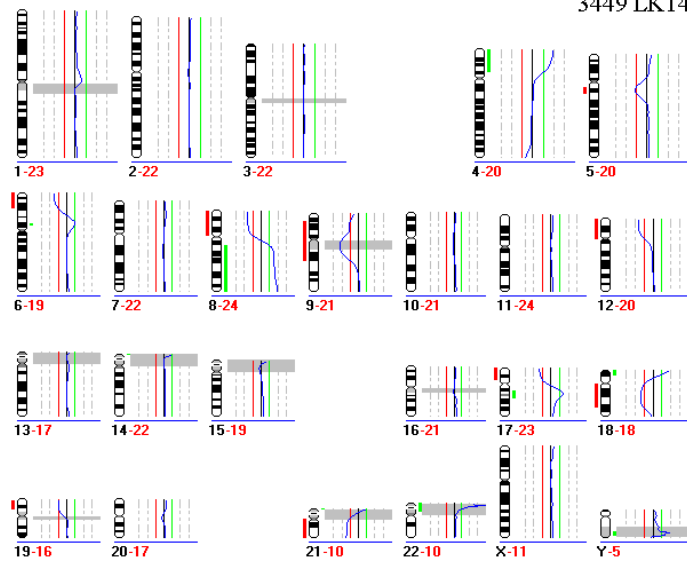
3449 LKT2



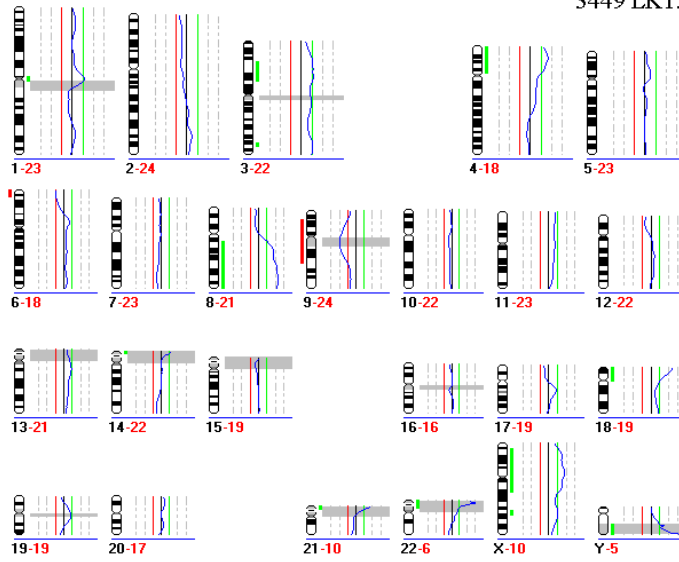
3449 LKT3



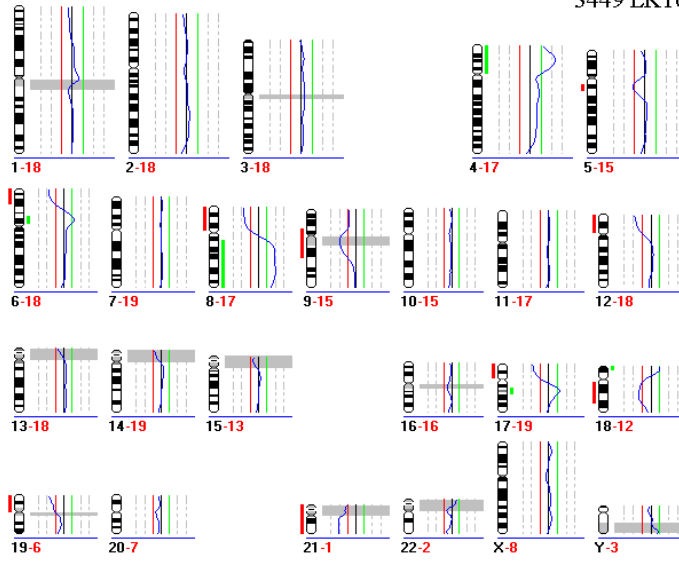
3449 LKT4



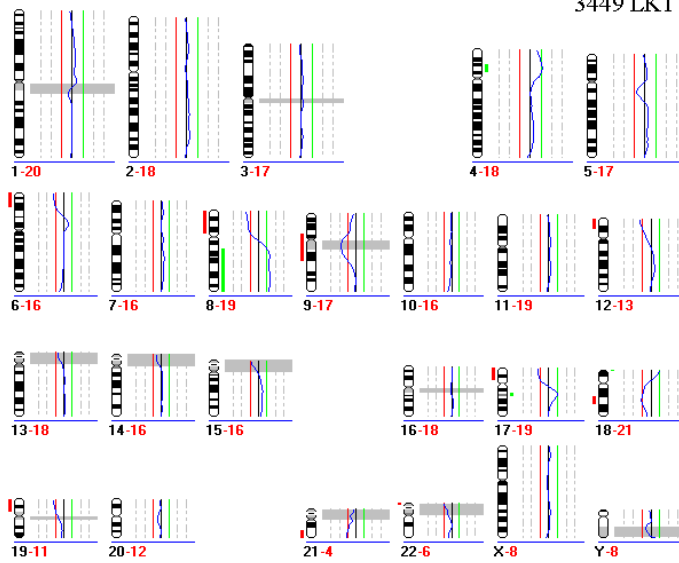
3449 LKT5



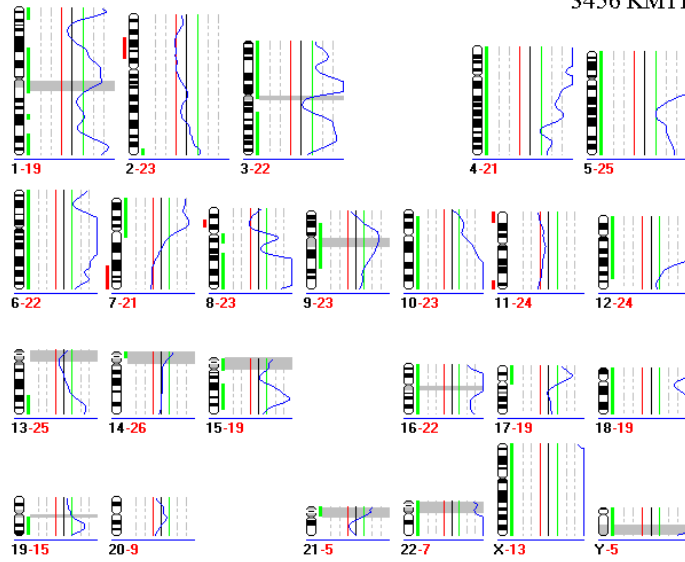
3449 LKT6



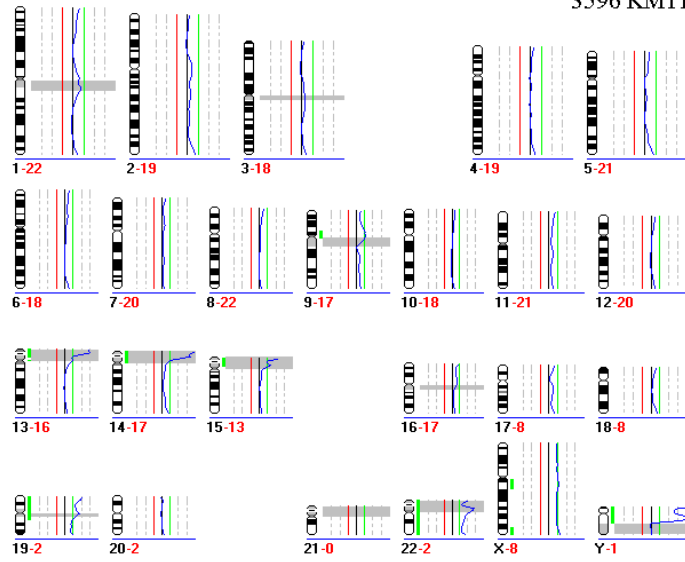
3449 LKT7



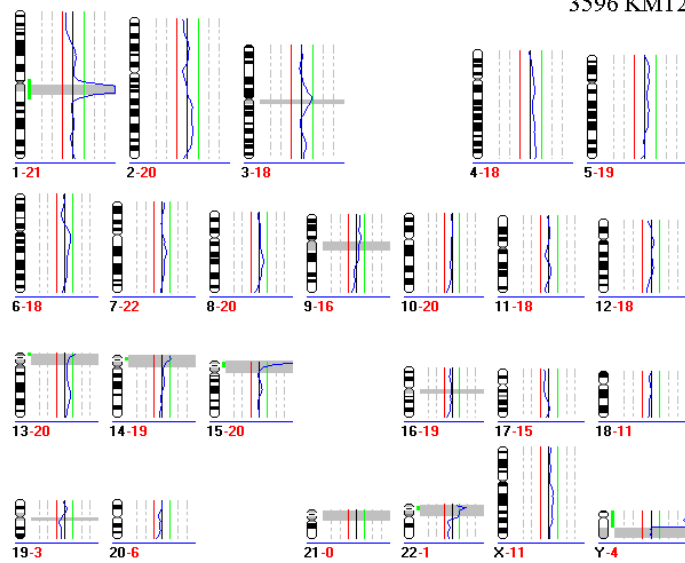
3456 KMT1

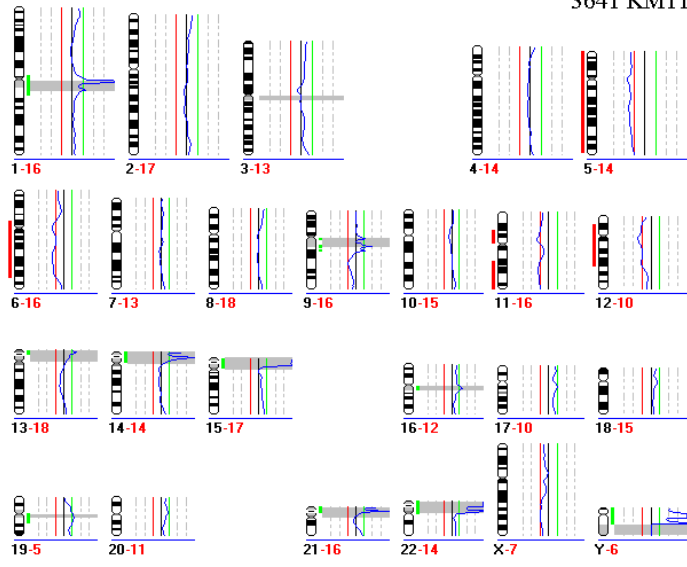


3596 KMT1

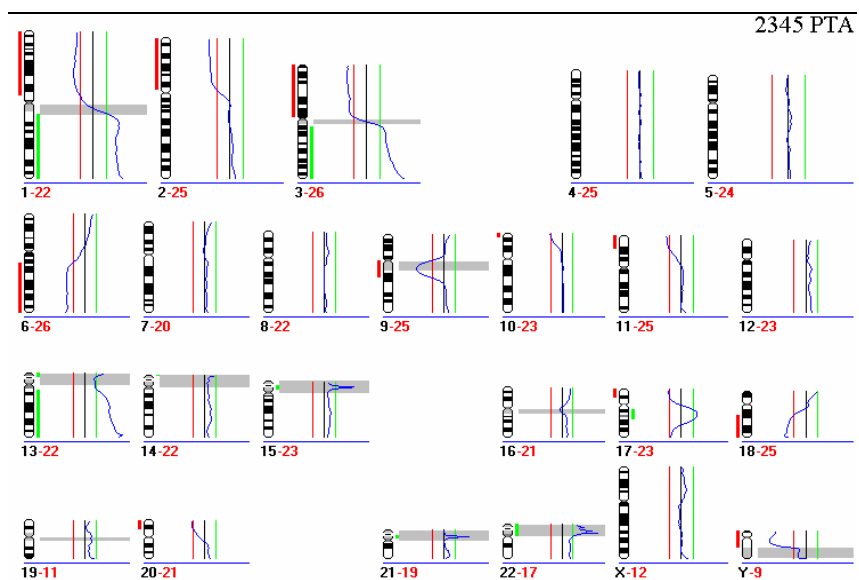
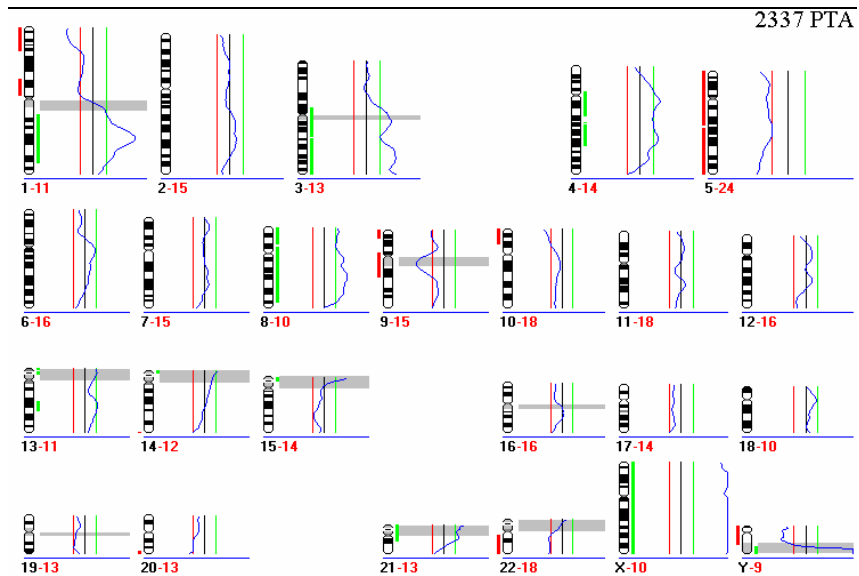
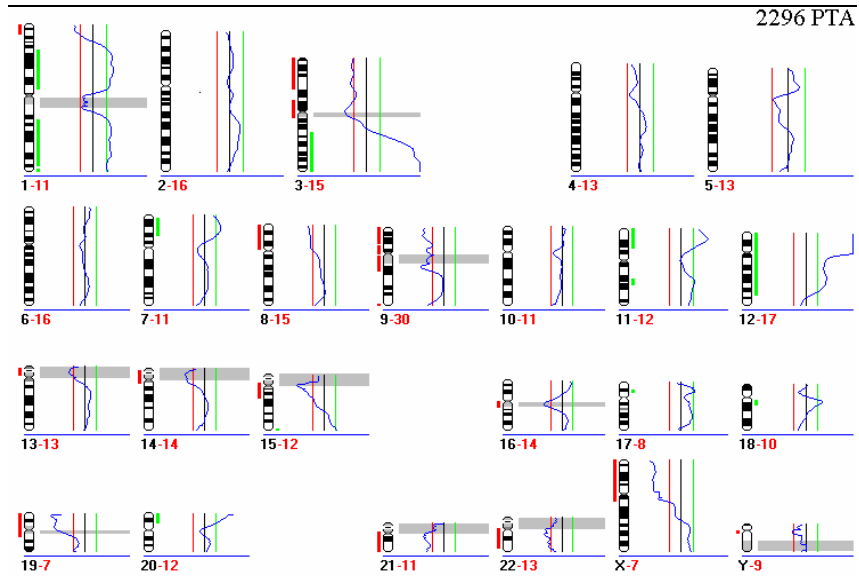


3596 KMT2

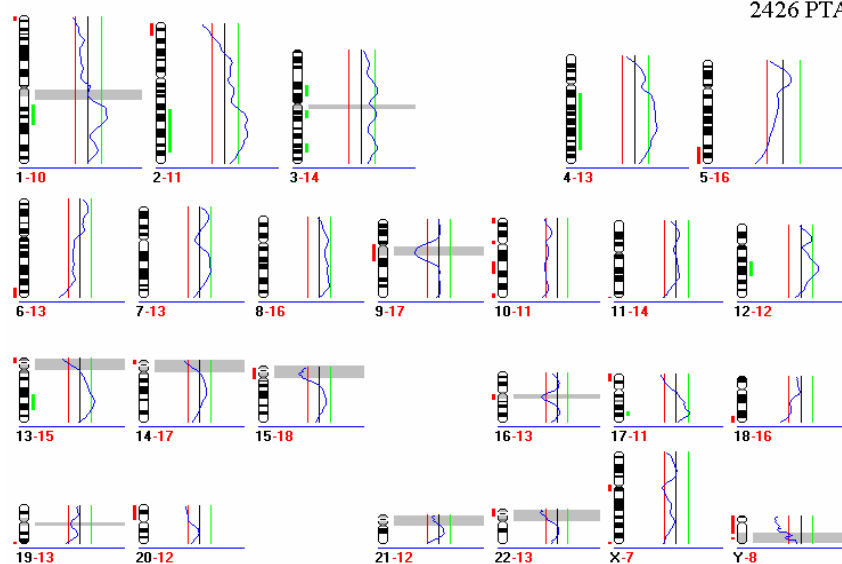




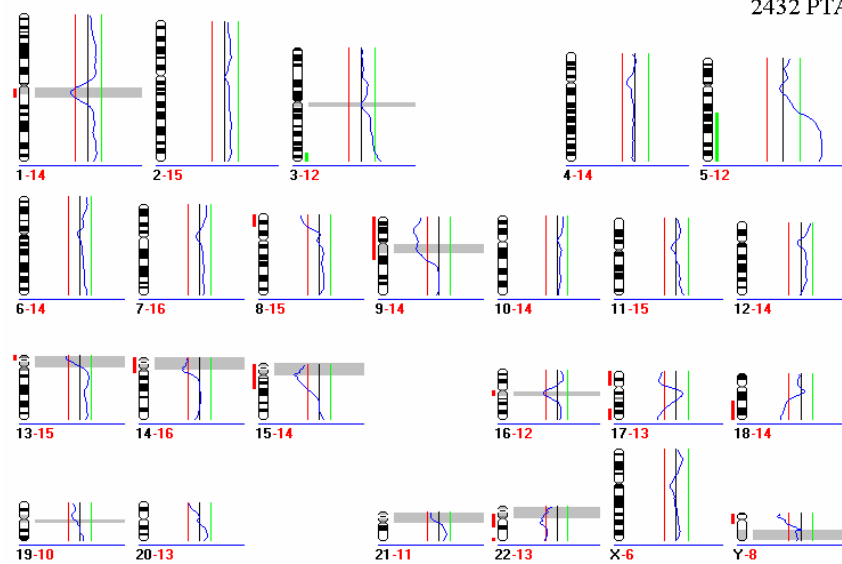
3.) Primärtumoren (n=29)



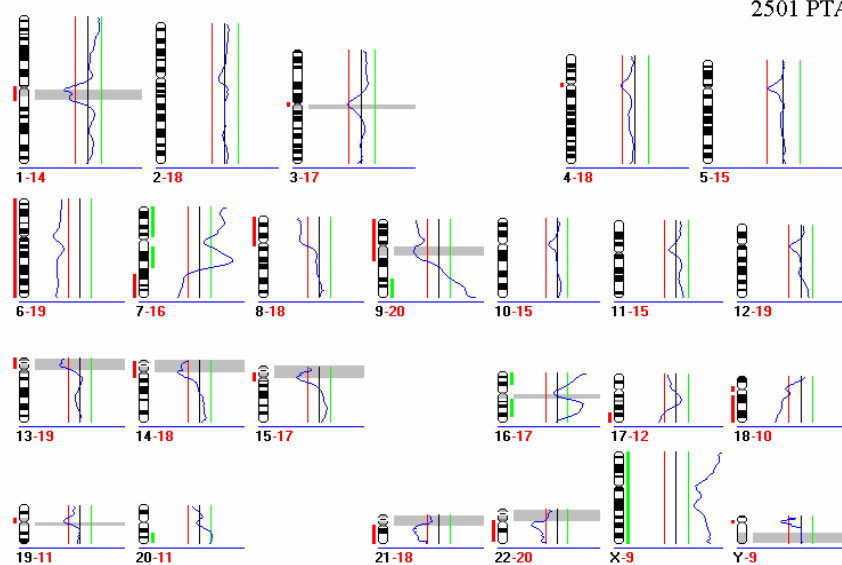
2426 PTA



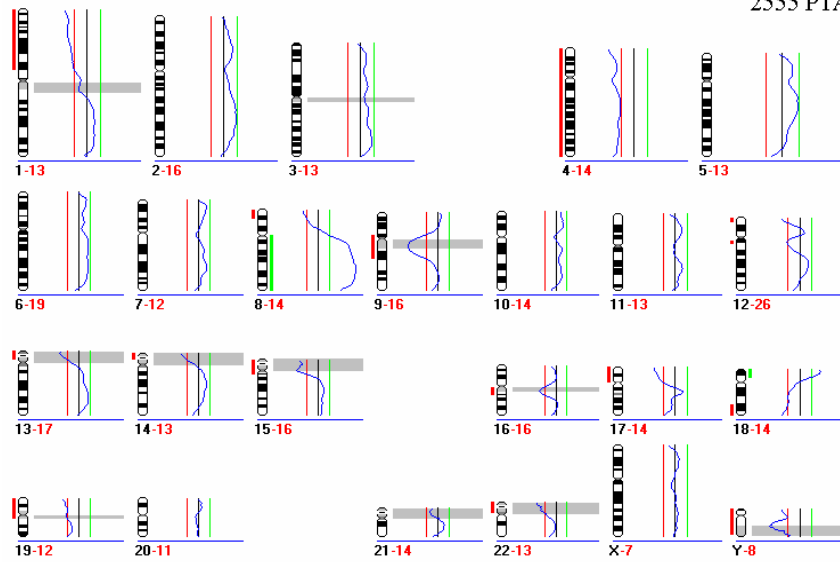
2432 PTA



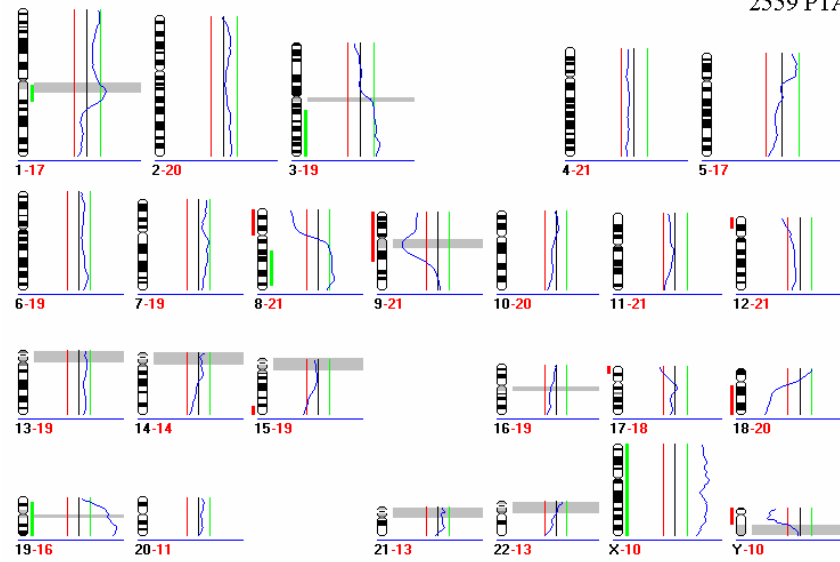
2501 PTA



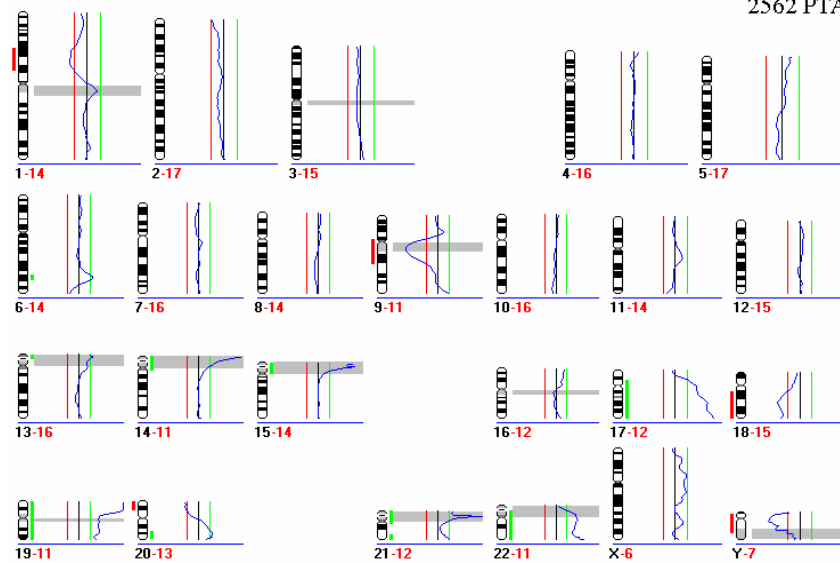
2555 PTA



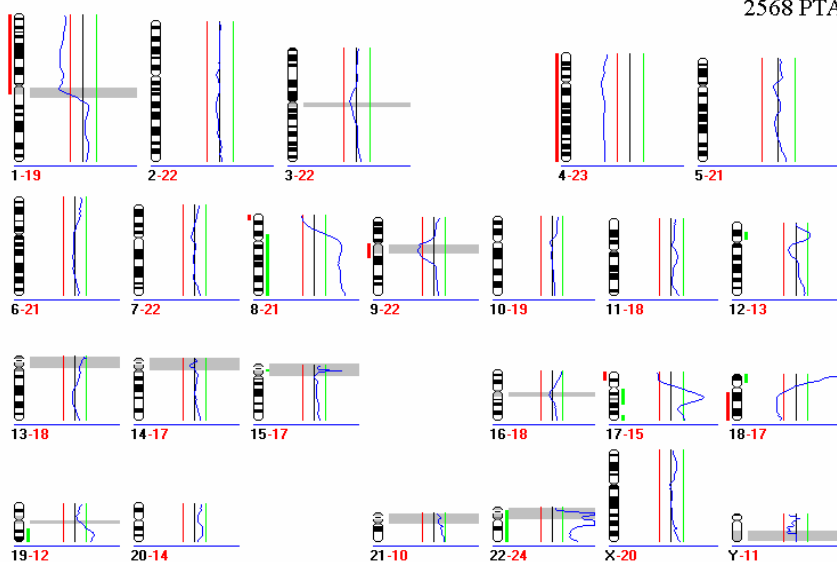
2559 PTA



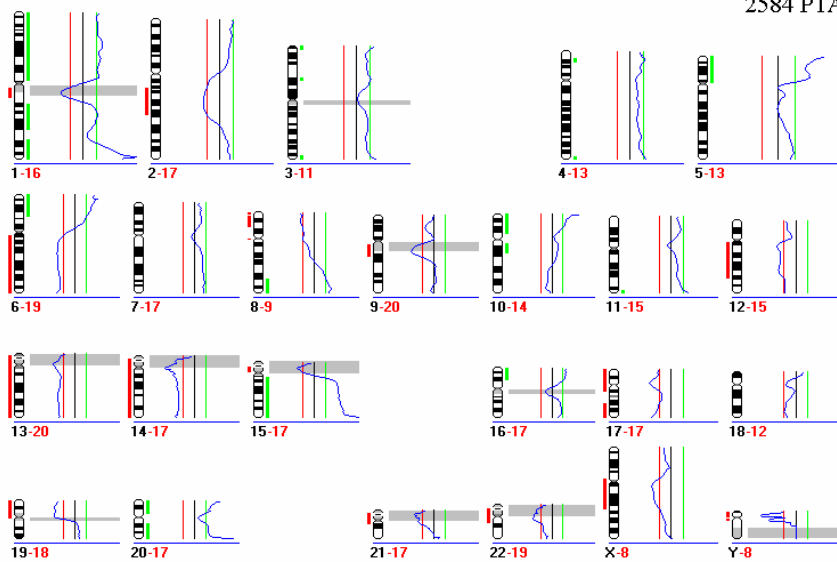
2562 PTA



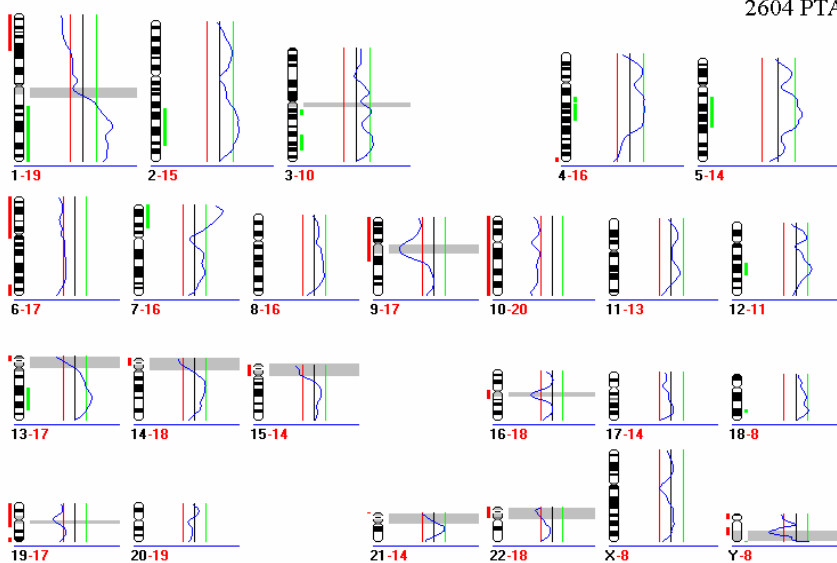
2568 PTA



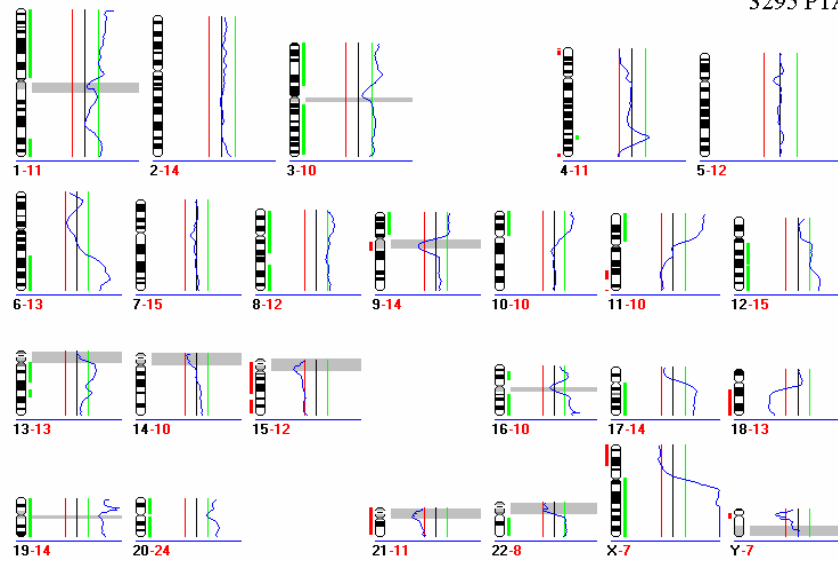
2584 PTA



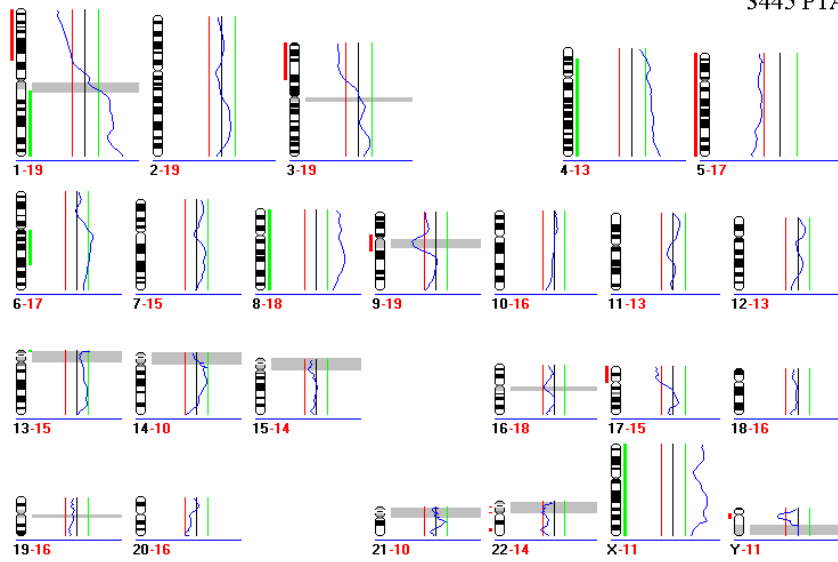
2604 PTA



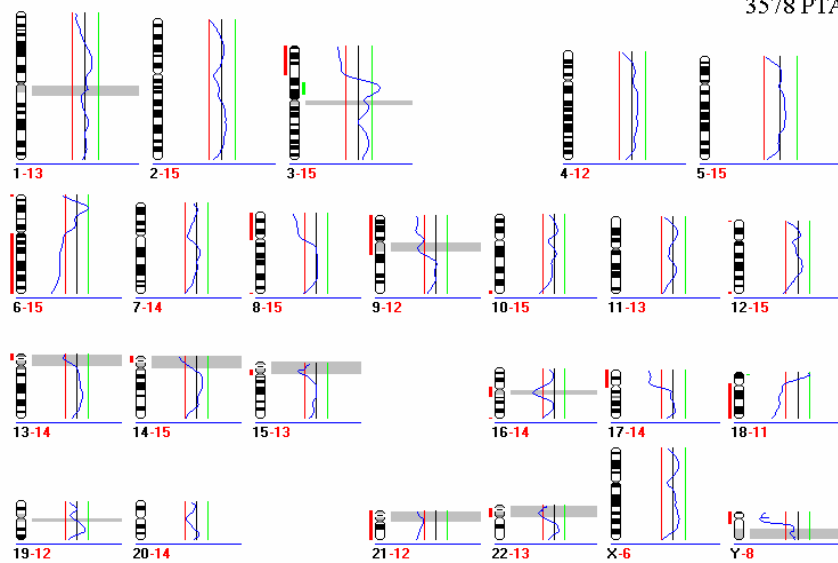
3295 PTA



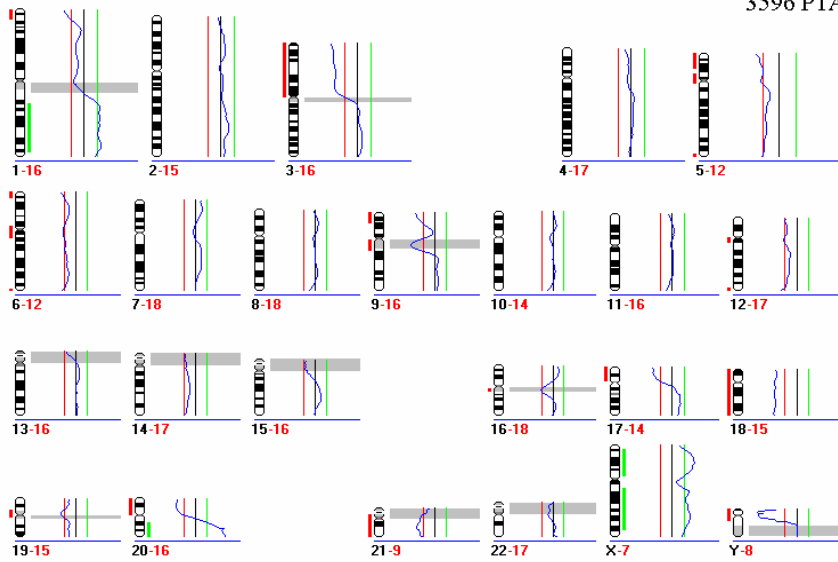
3445 PTA



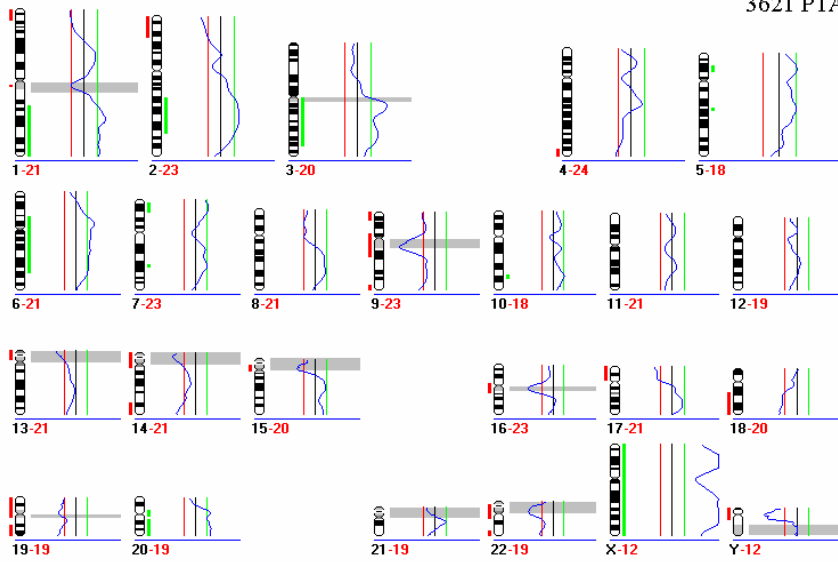
3578 PTA



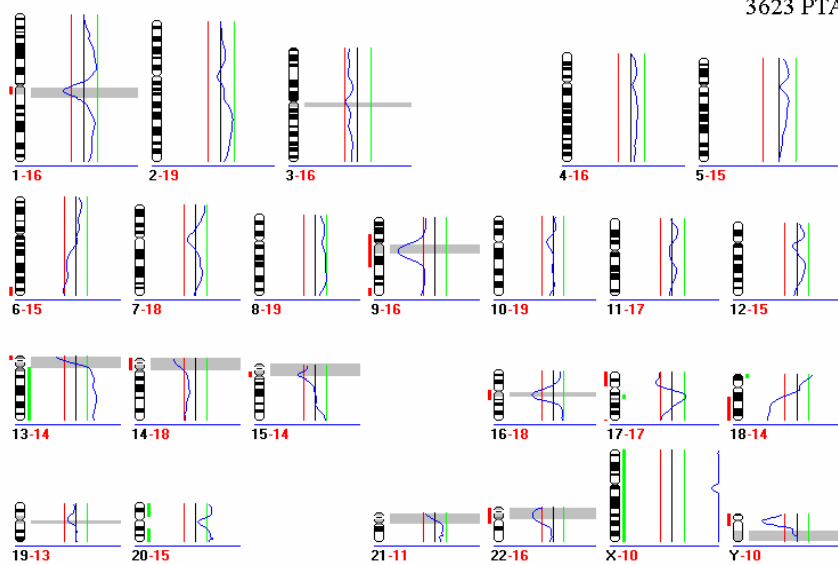
3596 PTA



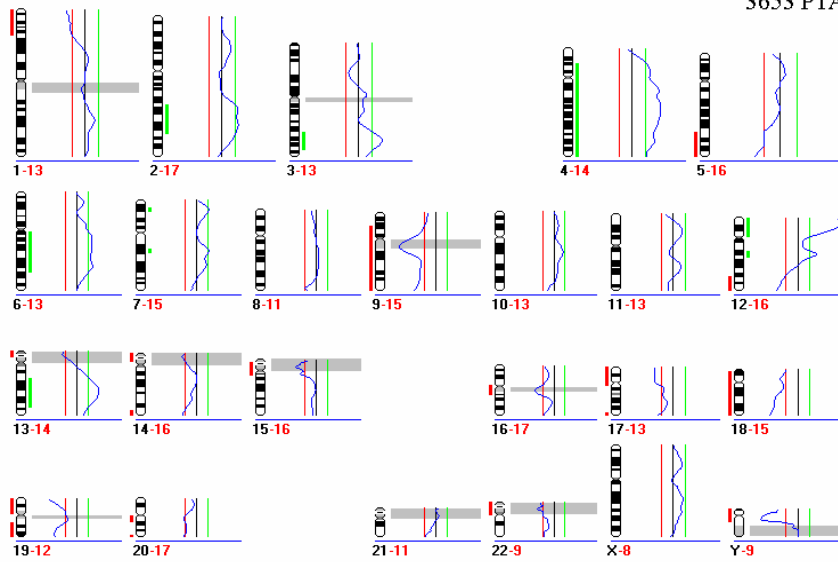
3621 PTA



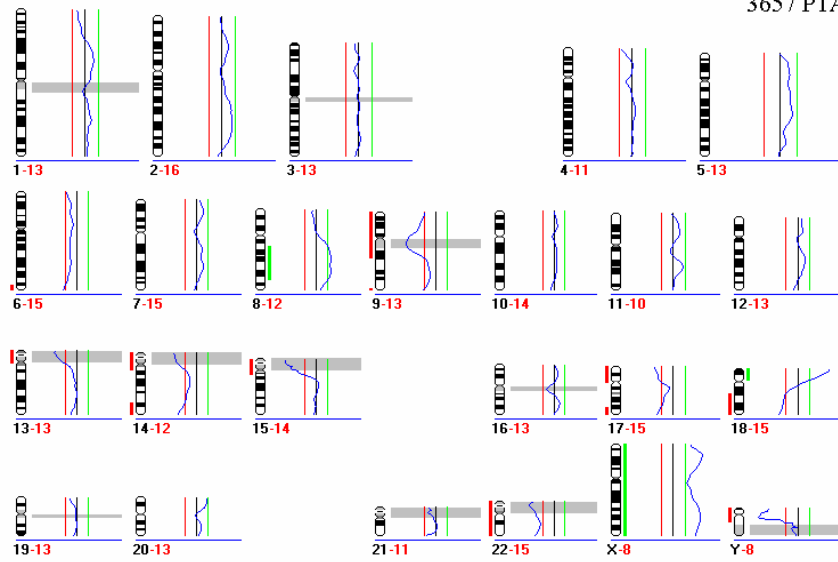
3623 PTA



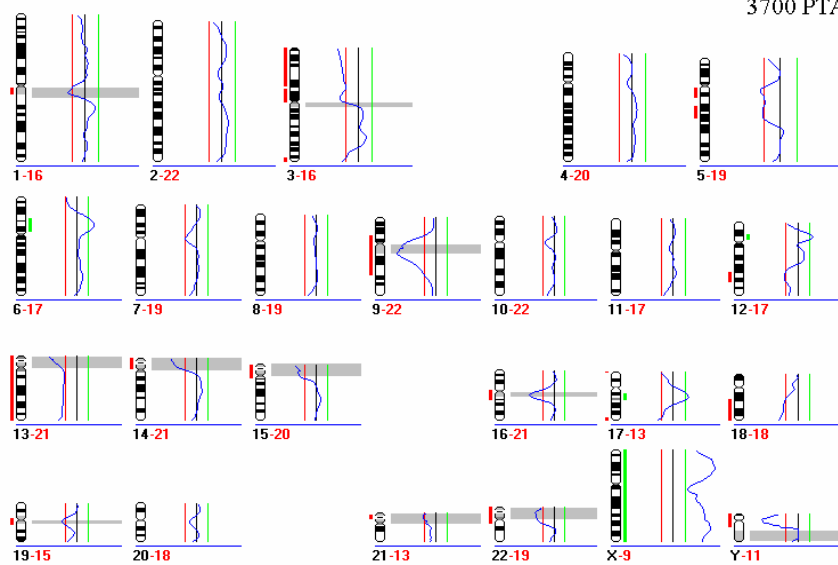
3653 PTA



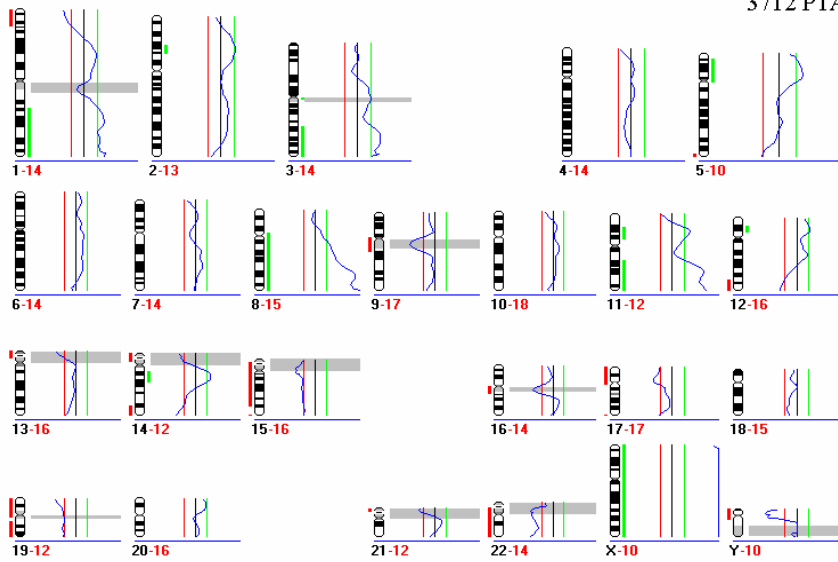
3657 PTA



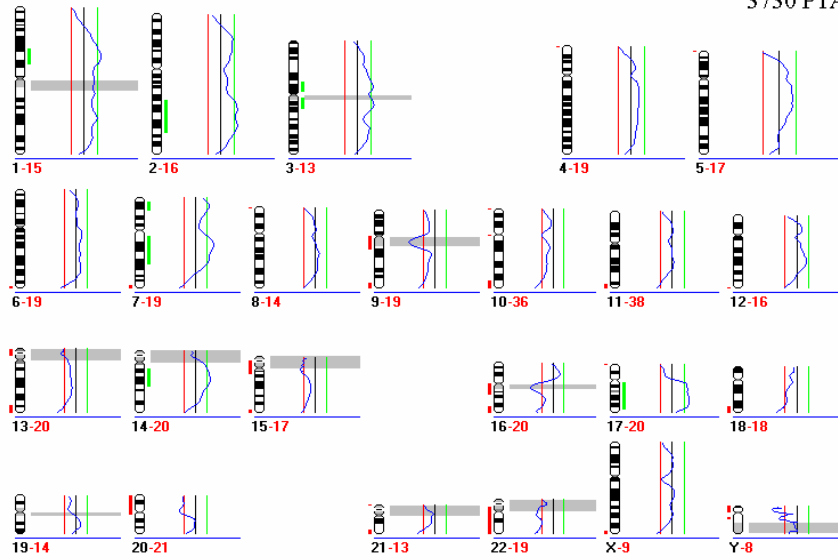
3700 PTA



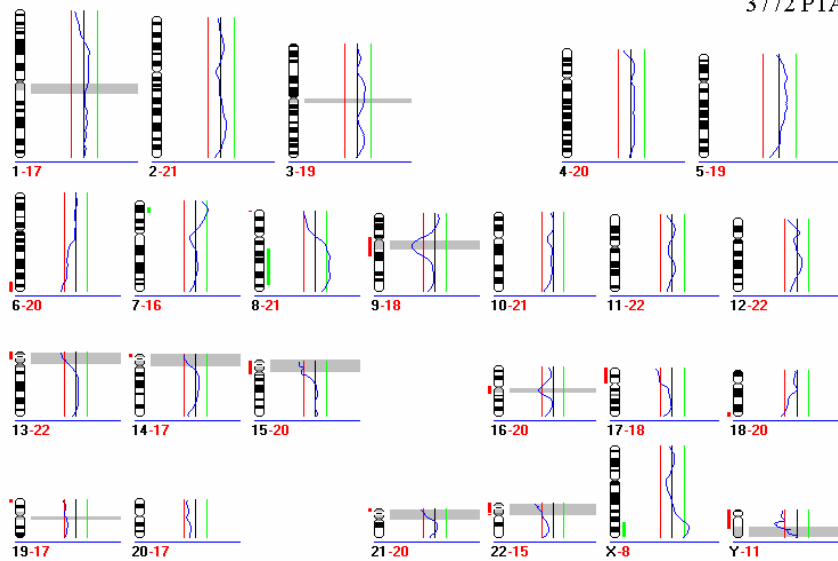
3712 PTA



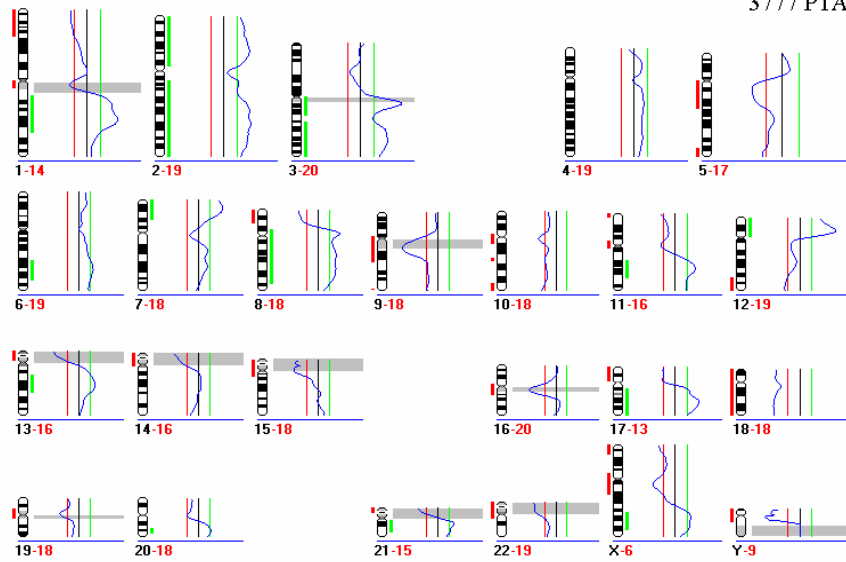
3730 PTA



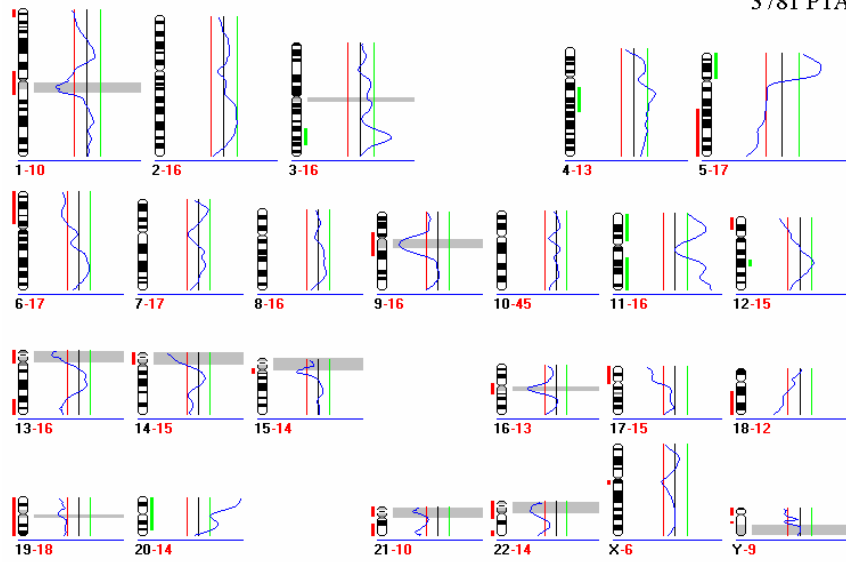
3772 PTA



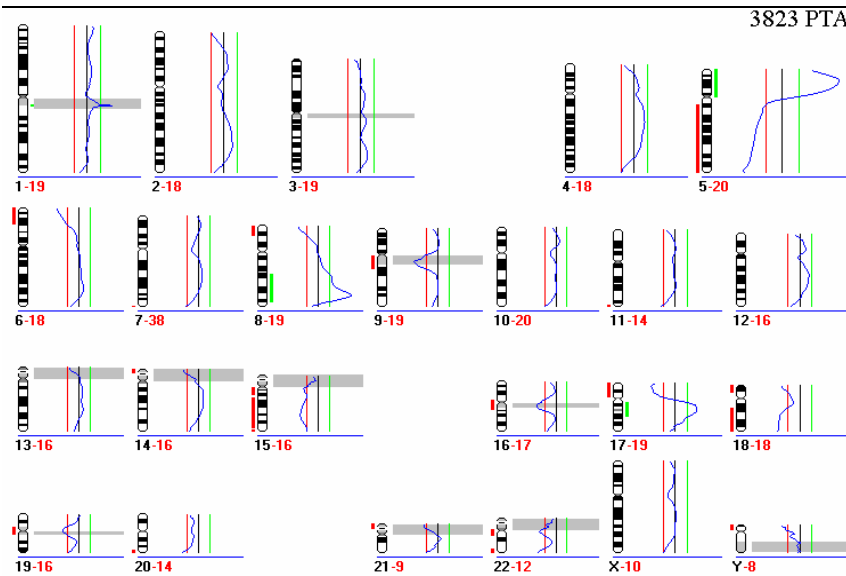
3777 PTA



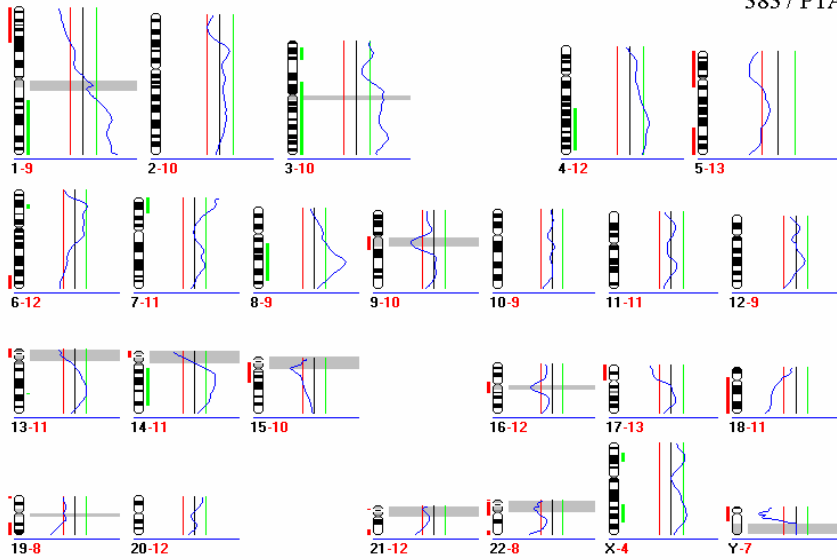
3781 PTA



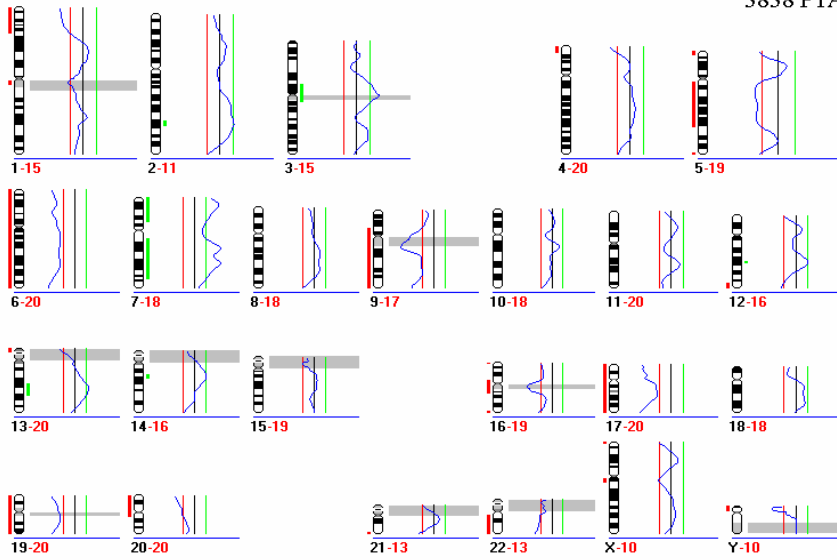
3823 PTA



3837 PTA



3838 PTA



9 LEBENS LAUF

Name:	Marco Petronio
Geburtstag:	13. Mai 1973
Geburtsort:	Singapur
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch, italienisch
1980-1981	Schweizer Schule Singapur
1981-1984	Grundschule Kirchheim bei München
1984-1993	Gymnasium Kirchheim bei München
07/1993	Allgemeinen Hochschulreife (Abiturnote: 1,3)
08/1993-10/1994	Zivildienst: Rettungssanitäter beim Malteser-Hilfsdienst München
10/1994-09/2005	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
03/1997	Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,0)
09/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
10/2000-03/2003	Wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
03/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
05/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
06/2005-10/2006	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
11/2006-05/2007	Wissenschaftlicher Angestellter am Klinikum der Universität Regensburg, Abteilung für Onkogenomik
Seit 06/2007	Assistenzarzt am Klinikum der Universität Regensburg, Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie

10 PUBLIKATIONEN

Publikationen:

Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, **Petronio M**, Polzer B, Stöcklein NH, Riethmüller G

Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer.

Lancet, 2002 Aug 31; 360(9334): 683-9

Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C, Polzer B, **Petronio M**, Eils R, Klein CA

Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer.

Cancer Cell, 2005 Sep; 8(3): 227-39

Posterpräsentationen:

Petronio M, Izbicki JR, Heiss MM, Klein CA

Comparative genomische Hybridisierung einzelner disseminierter Tumorzellen von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren: Vergleich von hämatogener und lymphogener Disseminierung.

Research Festival 2000, Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Auszeichnung mit einem Posterpreis)

Petronio M, Scheunemann P, Hosch SB, Izbicki JR, Heiss MM, Riethmüller G, Klein CA

Genomic analysis of single micrometastatic tumour cells from patients with gastrointestinal carcinomas: A comparison of haematogenous to lymphatic dissemination.

3rd International Symposium on Minimal Residual Cancer, February 2001, Hamburg

Stoecklein NH, **Petronio M**, Blankenstein TJ, Hosch SB, Erbersdobler A, Izbicki, JR
Riethmüller G, Klein CA

Genomic alterations of micrometastatic tumor cells in patients with operable esophageal carcinoma.

102nd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, May 2001,
Atlanta, USA

Petronio M, Lübke AM, Scheunemann P, Yekebas EF, Hosch SB, Izbicki JR, Klein CA

Genomic analysis of single disseminated pancreatic tumor cells reveals genetic divergence between haematogenous and lymphatic dissemination.

97th Meeting of the AACR, April 2006, Washington, USA

(Auszeichnung mit einem Reisestipendium der Pezcoller-Foundation)