

**Identifizierung und Charakterisierung
metastatischer Vorläuferzellen aus dem
Knochenmark beim Prostatakarzinom**



Bernhard Michael Polzer

München 2006

Aus dem
Institut für Immunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

**Identifizierung und Charakterisierung
metastatischer Vorläuferzellen aus dem
Knochenmark beim Prostatakarzinom**

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

vorgelegt von
Bernhard Michael Polzer
aus Rosenheim

München 2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Christoph Klein
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Jochem Kolb
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Helmut Bartels
Prof. Dr. med. Joachim Diebold
Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2006

Für Sybille
und
Hanna Louisa

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	Das Prostatakarzinom	9
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	9
1.1.2	Histopathologie	11
1.1.3	Diagnostik und Staging	12
1.1.4	Therapie	15
1.1.5	Nachsorge	17
1.2	Genomische Veränderungen beim Prostatakarzinom.....	18
1.2.1	Methoden der genomischen Untersuchung von Tumoren.....	18
1.2.2	Genomische Veränderungen beim Prostatakarzinom	19
1.3	Die minimal residuale Krebserkrankung (MRD)	21
1.3.1	Definition der MRD	21
1.3.2	Prognostische Bedeutung der MRD	21
1.3.3	Molekulare Untersuchungen an disseminierten Tumorzellen	22
1.4	Zielsetzung der Arbeit	24
2	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Kooperationspartner	25
2.2	Methoden	25
2.2.1	Aufarbeitung des Knochenmarks	25
2.2.2	Immunzytochemische Färbung	27
2.2.3	Isolierung einzelner Tumorzellen.....	28
2.2.4	Einzelzell-PCR.....	29
2.2.5	Kontroll-PCR	30
2.2.6	Agarose Gelelektrophorese	31
2.2.7	Hämatoxylin-Färbung von Gewebe und Mikrodissektion	31
2.2.8	Lymphozytenkulturen zur Gewinnung von Metaphasenchromosomen.....	32
2.2.9	Präparation von Metaphasechromosomen.....	32
2.2.10	Markierungs-PCR.....	32
2.2.11	Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH).....	33
2.2.12	Statistische Berechnungen.....	35
2.2.13	Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse.....	36

2.3	Verwendete Materialien	36
2.4	Verwendete Abkürzungen.....	39
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Immunzytochemischer Nachweis disseminierter Tumorzellen.....	41
3.1.1	Zytokeratin-Färbung disseminierter Tumorzellen.....	42
3.1.2	EpCAM-Färbung disseminierter Tumorzellen.....	47
3.1.3	Doppelfärbung gegen Zytokeratin und EpCAM	51
3.2	Isolation disseminierter Tumorzellen und Einzelzell-PCR	53
3.3	Genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen	56
3.3.1	Patientenkollektiv für die CGH-Untersuchungen.....	58
3.3.2	CGH-Aberrationen in den verschiedenen Krankheitsstadien.....	62
3.3.3	CGH-Aberrationen von CK- und EpCAM-Zellen	65
3.3.4	Klassifizierung disseminierter Tumorzellen.....	68
3.3.5	Heterogenität disseminierter Tumorzellen eines Patienten	73
3.4	Vergleich zwischen disseminierten Tumorzellen und Primärtumor	75
4	DISKUSSION.....	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	91
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	93
7	DANKSAGUNG.....	103
8	ANHANG.....	105
9	PUBLIKATIONEN UND STIPENDIEN.....	145
10	LEBENS LAUF	147

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Prostatakarzinom stellt derzeit den häufigsten malignen Tumor des Mannes dar (ohne Berücksichtigung von Basaliomen und Plattenepithelkarzinomen der Haut). Gegenwärtig geht man in Deutschland von über 40.000 Neuerkrankungen pro Jahr aus. Das entspricht zirka 20 % aller Krebserkrankungen bei Männern. Die Tumorentität nahm im Jahr 2000 mit 10,2 % den dritten Rang in der tumorbedingten Mortalität der Männer in Deutschland hinter Bronchialkarzinom und kolorektalem Karzinom ein (RKI 2004). Das mittlere Alter der Patienten bei Diagnosestellung liegt bei 71,4 Jahren und das mittlere Sterbealter bei 78 Jahren. Diese Daten legen eine in den meisten Fällen langsame Progredienz der Erkrankung nahe. Aus diesem Grund erlauben Überlebensraten nach 5 oder 10 Jahren keinen Schluss auf eine definitive Heilung. Prognostische Aussagen werden deswegen häufig über das rezidivfreie Überleben innerhalb von fünf oder zehn Jahren getroffen (Breul, Zimmermann et al. 2003). Interessanterweise wurde bei Autopsien bereits bei 29 % der Männer im Alter zwischen 20 und 40 Jahren und bei 64 % zwischen 60 und 70 Jahren ein gut differenziertes Adenokarzinom der Prostata als Zufallsbefund entdeckt. Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass bei einem Großteil der betroffenen Männer latente Tumoren klinisch nie manifest werden (Sakr, Grignon et al. 1994). Insgesamt deuten die publizierten Arbeiten auf ein langsames Wachstum eines häufig lange nicht erkannten Prostatakarzinoms von seiner Initiierung bis zu seiner klinischen Manifestation hin.

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist bis heute ungeklärt. Diätetische Faktoren wie ein hoher Fettanteil oder viel rotes Fleisch in der Nahrung wurden als ätiologisch relevant beschrieben (Giovannucci, Rimm et al. 1993; Gann, Hennekens et al. 1994), während Gemüse und frischem Obst protektive Wirkung zugeschrieben wird (Gann, Ma et al. 1999). Antioxidantien wie Vitamin E und Selen sollen ebenfalls vor der Entstehung von Neoplasien der Prostata schützen (Clark, Dalkin et al. 1998; Heinonen, Albanes et al. 1998). Höhere Inzidenzraten bei Asiaten, die früh in ihrem Leben in die USA immigrierten, untermauern den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Ätiologie (Shimizu, Ross et al. 1991).

Bei Auftreten einer Krebserkrankung in relativ jungem Alter und mehreren betroffenen Verwandten ersten Grades liegt der Schluss einer erblichen Komponente nahe (Carter, Bova et al. 1993). Es wurden mehrere Genloci gefunden, die mit dem familiären Prostatakarzinom in Verbindung gebracht werden und vermutlich nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden.

Beispiele hierfür sind Mutationen in den Genen HPC1 (hereditary prostate cancer 1) auf der Chromosomenregion 1q24-25 (Smith, Freije et al. 1996), HPCX auf Xq27-28 (Xu, Meyers et al. 1998) oder HPC20 auf 20q13 (Berry, Schroeder et al. 2000). In jüngster Zeit wurden auch genomische Veränderungen beschrieben, die mit deutlich niedriger Penetranz sporadisch zur Ausbildung eines Prostatakarzinoms führen. So variiert die Menge an CAG-Triplett-Repeats im Exon 1 des Gens für den Androgenrezeptor (AR) zwischen 8 und 31 Basentriplets. Kürzere Varianten des Rezeptors haben eine höhere Affinität für Androgene und die Prostatazellen reagieren auf diesen Stimulus mit einer erhöhten Proliferationsrate (Stanford, Just et al. 1997; Hsing, Gao et al. 2000). Tabelle 1 gibt einen Überblick von chromosomalen Regionen, die beim hereditären Prostatakarzinom eine Rolle spielen (modifiziert nach (Verhage und Kiemeney 2003).

Bezogen auf alle Fälle des Prostatakarzinoms im höheren Alter stellen diese vererbten Fälle allerdings nur einen geringen Anteil von etwa 10 % aller Malignome der Prostata dar (Carter, Beaty et al. 1992). Im Laufe des Lebens häufen sich somatische Mutationen in klassischen und prostataspezifischen Tumorsuppressorgenen an. Diese Mutationen und verschiedene epigenetische Veränderungen spielen in den meisten Fällen sicherlich eine größere Rolle in der klonalen Expansion einzelner Zellen (Deutsch, Maggiorella et al. 2004). Eine klassische Adenom-Karzinom-Sequenz wie beim Kolonkarzinom (Kinzler und Vogelstein 1996) konnte für das Prostatakarzinom allerdings bislang nicht gefunden werden. Auf einzelne Gene und ihre mögliche Rolle in der Proliferation und Disseminierung von Tumorzellen wird in der Diskussion näher eingegangen.

Tabelle 1 Veränderte Chromosomenregionen beim hereditären Prostatakarzinom

Kandidatengen	Chromosomaler Locus	Erstpublikation
HPC1	1q24-25	(Smith, Freije et al. 1996)
PCAP	1q42.2-43	(Berthon, Valeri et al. 1998)
SRD5A2	2p23	(Kantoff, Febbo et al. 1997)
MSR1	8p22-23	(Xu, Zheng et al. 2001)
VDR	12q12-14	(Ingles, Ross et al. 1997)
HPC2/ELAC2	17p11	(Tavtigian, Simard et al. 2001)
HPC20	20q13	(Berry, Schroeder et al. 2000)
AR	Xq11-12	(Stanford, Just et al. 1997)
HPCX	Xq27-28	(Xu, Meyers et al. 1998)

1.1.2 Histopathologie

Die Prostata ist ein retroperitoneal gelegenes Beckenorgan, das sich um Blasen Hals und Urethra legt, von einer Bindegewebskapsel umschlossen ist und im erwachsenen Mann etwa 20 Gramm wiegt (Cotran 1999). Histologisch stellt die Prostata einen Verbund tubulo-alveolärer Drüsen mit einem zweischichtigen Epithel aus Basalzellen und Sekret sezernierenden Deckzellen dar. Androgene gelten als wesentliche Wachstumsstimulatoren der Vorsteherdrüse, da eine Kastration zur Atrophie der Prostata führt (Huggins und Hodges 1941). Die ausdifferenzierte Prostata kann in vier Zonen gegliedert werden. Man teilt sie ein in periphere Zone, zentrale Zone, Transitionalzone und periurethrale Zone. Karzinome haben ihren Ursprung meist in der peripheren Zone, während die als Alterskrankheit des Mannes bekannte benigne Hyperplasie der Prostata vor allem in den anderen Bereichen entsteht (Cotran 1999).

Die World Health Organisation (WHO) klassifiziert eine Vielzahl maligner und potentiell maligner Tumoren der Prostata nach ihrer Morphologie (Mostofi 2002). Die häufigsten neoplastischen Läsionen der Prostata sind gut differenzierte Adenokarzinome mit wenigen Zelltypen und Mitosen, sowie einer fast vollständig erhaltenen und wenig hyperplastischen Drüsenstruktur. Weniger gut differenzierte Tumoren tendieren dazu, in Nestern oder Strängen zu proliferieren (Mostofi, Davis et al. 1992). Das sicherste Malignitätszeichen ist die Invasion in die Prostatakapsel, die von Lymph- und Blutgefäßen durchzogen wird. Fast immer enthält Prostatagewebe, das unter Malignitätsverdacht entnommen wird, auch zahlreiche präkanzeröse Läsionen mit intakter Basalmembran, die mit dem Begriff prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN) bezeichnet werden (Bostwick und Brawer 1987). In solchen Arealen können oft bereits viele molekulare Veränderungen gefunden werden, die auch in Karzinomen vorkommen (Bostwick 1996). Diese Befunde weisen darauf hin, dass eine PIN als Zwischenstufe zwischen normaler Prostata und eindeutig als Krebs erkennbarem Gewebe zu sehen ist (Bostwick, Pacelli et al. 1996).

Neben dem WHO-Schema (G1-G4), ist der so genannte Gleason Score das in Deutschland gebräuchlichste System zur Beurteilung der Malignität des Prostatakarzinoms (Grading). Dabei werden Tumoren in fünf verschiedene Differenzierungsstadien eingeteilt, wobei Grad 1 einem gut differenzierten Karzinom mit erhaltenen Drüsen und Grad 5 einer entdifferenzierten Prostata entspricht (vergleiche Abbildung 1). Da die meisten Tumore Areale mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden enthalten, werden die zwei dominantesten Muster bewertet. Diese beiden Werte gehen dann in das Grading mit ein und es ergeben sich endgültige Werte für den Gleason Score zwischen 2 und 10 (Gleason 1966). Tabelle 2 stellt die beiden gebräuchlichen Graduierungssystemen einander gegenüber.

Tabelle 2 Graduierungssysteme beim Prostatakarzinom

WHO-Tumorgrad	Gleason-Score	Beschreibung
G1	Gleason 2-4	Gut differenzierter Tumor
G2	Gleason 5-6	Mäßig differenzierter Tumor
G3-G4	Gleason 7-10	Schlecht differenzierter oder undifferenzierter Tumor

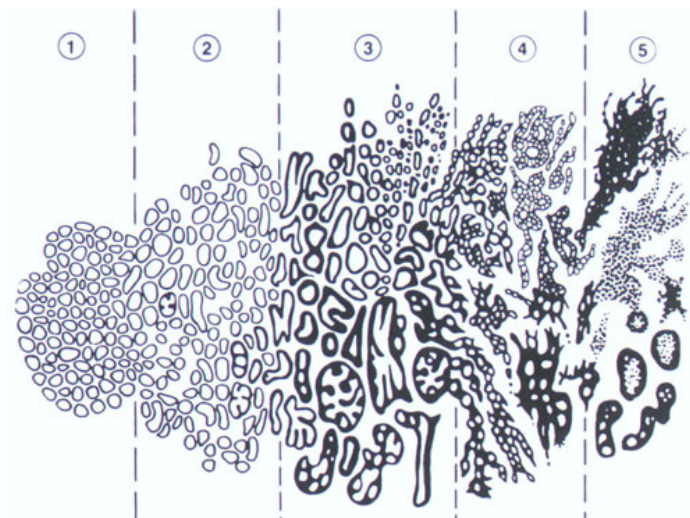


Abbildung 1 Pathohistologie der Stadien nach Gleason

Dargestellt ist ein Schema des pathohistologischen Bildes der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms beim Grading nach Gleason. Von links (Gleason 1) nach rechts (Gleason 5) nimmt der Grad der Entdifferenzierung zu (Gleason 1977).

1.1.3 Diagnostik und Staging

Die meisten Karzinome der Prostata machen zunächst keine klinischen Beschwerden und werden erst im fortgeschrittenen Stadium symptomatisch. Unspezifische Beschwerden wie verzögerte, schmerzhafte Blasenentleerung (Dysurie), Harnverhalt, Hämaturie oder Schmerzen durch die Ausbreitung des Tumors stehen dabei im Vordergrund (Braunwald, Fauci et al. 2001). Um frühe Stadien zu erkennen hat sich in Deutschland die Vorsorge bei Männern ab 50 Jahren etabliert. Als Standardverfahren haben sich hierbei die digitale rektale Untersuchung (DRU) und die Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Blut bewährt.

Mit der DRU können nur Tumoren palpirt werden, die sich peripher am posterioren Pol der Prostata befinden (80% der Karzinome) und einen ausreichend großen Durchmesser von 7 mm haben (Spigelman, McNeal et al. 1986). Bewertet werden hierbei Größe der Prostata,

Abgrenzbarkeit gegenüber dem umliegenden Gewebe, Konsistenz, eventuell vorhandene Indurationen und Verschieblichkeit zur Rektumschleimhaut (Breul, Zimmermann et al. 2003). Die Bestimmung des PSA ist mit etwa 95% sensitiver als die DRU (Sokoll, Bruzek et al. 2002). Das PSA ist eine kallikreinähnliche Serinprotease, die organspezifisch in Zellen der Prostata exprimiert und verstärkt bei Patienten mit Prostatakarzinom im Serum gefunden wird. Auf diese Weise können auch kleinere oder von der Lokalisation nicht mit der DRU erfassbare Tumoren erkannt werden (De Angelis, Brandt et al. 2000). Problematisch für die Diagnose eines Karzinoms ist allerdings, dass auch Patienten mit benigner Hyperplasie der Prostata oder Prostatitis leicht erhöhte PSA-Spiegel im Blut aufweisen können. Aus diesem Grund wird in Deutschland in den meisten Kliniken ein Wert von 4 ng/ml als Grenze für einen Verdacht auf Malignität und Indikation zur Biopsie festgelegt (Breul, Zimmermann et al. 2003). Bei Werten über 10 ng/ml wird bereits in zwei Dritteln der Fälle ein nicht mehr ausschließlich auf die Prostata beschränkter Tumor gefunden (Kleer und Oesterling 1993). Um die Spezifität der Laboruntersuchung zu erhöhen wurden mehrere Verfahren entwickelt, die sich noch nicht endgültig etabliert haben. Am häufigsten wird das Verhältnis von freiem PSA zu Chymotrypsin gebundenem PSA benutzt, wobei der Anteil des freien PSA bei Krebspatienten erhöht ist (Hofer, Sauerstein et al. 2000). Die DRU sollte im Rahmen der Früherkennung immer zusammen mit der PSA-Bestimmung durchgeführt werden, da hierdurch mit einer einfachen und schnellen Methode auch seltenere PSA-negative Tumoren erkannt werden können. Der transrektale Ultraschall (TRUS) wird aufgrund des hohen Zeitaufwands nur noch selten im Primär-Screening eingesetzt (Chodak 1989). Bei Malignitätsverdacht schließt sich zur Sicherung der pathologischen Diagnose eine ultraschallgesteuerte transrektale Sextantenbiopsie an (Hodge, McNeal et al. 1989; Stamey 1995), deren Nutzen umstritten ist, da die Detektionsrate von Karzinomen bei großen Vorsteherdrüsen deutlich abnimmt (Uzzo, Wei et al. 1995).

Die Einteilung des Tumorstadiums, das so genannte Staging, erfolgt mit Hilfe der TNM-Klassifikation der UICC (Union international contre cancer, siehe Tabelle 3). Zur Beurteilung des therapeutischen Vorgehens werden neben DRU, PSA, Ultraschall und Biopsie auch noch andere Verfahren eingesetzt. Dabei spielen die Computertomographie (in einzelnen Fällen auch Magnet-Resonanz-Tomographie) und die pelvine Lymphadenektomie eine wichtige Rolle bei der Beurteilung von lokaler Ausdehnung und Absiedlung in drainierenden Lymphknoten und anderen Organen (Breul, Zimmermann et al. 2003). Eine hämatogene Streuung des Prostatakarzinoms tritt vor allem in Form von osteoblastischen Knochenmetastasen in Erscheinung. Aus diesem Grund kommen der Knochenszintigraphie und der Bestimmung der alkalischen Phosphatase als Marker für die Osteoblastentätigkeit eine zentrale Bedeutung zu (Desoize, Amico et al. 1991). Viel seltener metastasiert das Prostatakarzinom in Lunge, Leber und Gehirn (Riede und Schäfer 1995). Tabelle 4 gibt abschließend einen Überblick der relevanten Prognosefaktoren beim Prostatakarzinom.

Tabelle 3 TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (UICC 2002)

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor nicht bestimmbar
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
T1	Klinisch inapparenter Tumor, nicht palpabel oder durch bildgebende Verfahren nachweisbar
T1a	Inzidenteller Tumor: histologisch in 5% oder weniger des Resektionsgewebes nachweisbar
T1b	Inzidenteller Tumor: histologisch in mehr als 5% des Resektionsgewebes nachweisbar
T1c	Tumor identifiziert durch Nadelbiopsie bei z.B. erhöhtem PSA-Wert
T2	Tumor beschränkt auf Prostata
T2a	Tumor erfasst einen Seitenlappen mit weniger als 50%
T2b	Tumor erfasst einen Seitenlappen mit mehr als 50%
T2c	Tumor erfasst beide Seitenlappen
T3	Tumor überschreitet die Prostatakapsel
T3a	Extrakapsulärer Tumor
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert benachbarte Strukturen
N - Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionärer Lymphknotenbefall
M – Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Extraregionärer Lymphknotenbefall
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Andere Manifestationen

Tabelle 4 Prognosefaktoren beim Prostatakarzinom (Bostwick, Grignon et al. 2000)

Kategorie 1*	postoperativer PSA-Anstieg, pathologisches Tumorstadium, Gleason Score, chirurgischer Schnitttrand
Kategorie 2**	Tumolvolumen, histologischer Tumorsubtyp, DNA Ploidie
Kategorie 3***	perineurale Invasion, Lymphknoten Mikrometastasen, Neuroendokrine Differenzierung, Angiogenese, Proliferationsmarker (z.B. Ki67), diverse Tumorsuppressor- und Onkogene

* bewiesene prognostische Relevanz, nützlich im klinischen Alltag

** klinisch und biologisch gut untersucht, prognostische Relevanz noch nicht endgültig bewiesen

*** biologische Zusammenhänge und prognostische Relevanz noch nicht ausreichend untersucht

1.1.4 Therapie

Lokal begrenztes Prostatakarzinom (N0 und M0)

Bei Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom und einer Lebenserwartung von mehr als zehn Jahren gilt die radikale Prostatektomie als Methode der Wahl. Der Zugang bei der radikalen perinealen Prostatektomie (RPP) bietet dabei den Vorteil besserer Rekonvaleszenz, während bei der radikalen retropubischen Prostatektomie (RRP) eine gleichzeitige pelvine Lymphadenektomie durchführbar ist (Frazier, Robertson et al. 1992). Da die Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasen bei einem postoperativen PSA-Wert unter 10 ng/ml und gut differenziertem Karzinom (kein einfacher Gleasonwert über 3) sehr niedrig ist, kann unter Umständen bei einigen Patienten sogar auf eine Lymphknotendisektion verzichtet werden (Parra, Isorna et al. 1996). Die Langzeitergebnisse von operierten Patienten mit kleinen lokal begrenzten Tumoren (T2) sind sehr gut und die Überlebenskurven entsprechen in etwa denen gesunder Männer (Gibbons, Correa et al. 1989). Auch bei fortgeschrittenen lokal begrenzten Tumoren stellt die Operation die klinische Standardtherapie dar, ihr Nutzen muss aber kritisch beurteilt werden. Zumindest bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen kann das Überleben durch eine Operation deutlich gesteigert werden (Wirth 2000). In letzter Zeit wird vermehrt die laparoskopische radikale Prostatektomie mit guten postoperativen Ergebnissen durchgeführt. Langzeitergebnisse aus retrospektiven Studien stehen zum heutigen Zeitpunkt aber noch aus (Hasan und Gill 2004).

Eine Alternative zur Operation stellen verschiedene Verfahren der Strahlentherapie, wie zum Beispiel perkutane Bestrahlung oder Brachytherapie, dar. Die Überlebensraten von Patienten mit kleinen Tumoren (pT1) sind vergleichbar mit denen eines operierten Patientenkollektivs (Middleton 1994). Allerdings sinken diese Werte deutlich bei schlecht differenzierten Tumoren, da hier in 50% der Fälle innerhalb der ersten zehn Jahren nach Therapie ein PSA-Anstieg mit Metastasierung zu beobachten ist (Breul, Zimmermann et al. 2003). Bei größeren lokal beschränkten Tumoren erzielt die perkutane Bestrahlung sogar bessere Ergebnisse als die Operation und kann alleine stehend oder adjuvant nach der Operation als Standardverfahren bezeichnet werden (Hanks, Diamond et al. 1987). Neuere Arbeiten zeigen aber nach einem längeren Zeitraum von 20 Jahren kontroverse Daten für die alleinige Strahlentherapie (Swanson, Riggs et al. 2004). Aufgrund des langsamen Wachstums kann bei älteren Patienten schließlich sogar eine abwartende Haltung („wait and watch“) in Erwägung gezogen werden. Einige Autoren schlagen bei gut differenzierten Tumoren und entsprechendem Alter des Patienten initial auch eine alleinige antihormonelle Therapie vor (Chodak, Keane et al. 2002).

Biochemisches Rezidiv (BR)

Trotz kurativ operativer Therapie kommt es bei einem großen Teil der Patienten innerhalb der ersten zehn Jahre nach Operation zu einem messbaren Anstieg des PSA-Wertes im Serum. Der erneute Anstieg des PSA nach der operativen Entfernung der Prostata zeigt eine Proliferation von Prostatazellen im Körper des Patienten an. Wenn neben dem PSA-Anstieg keine weiteren Anzeichen eines Krankheitsprogresses gefunden werden können, spricht man vom biochemischen Rezidiv (BR) (Pound, Partin et al. 1999). Auch wenn sich die 10-Jahres-Überlebensraten von Patienten mit oder ohne BR nicht wesentlich unterscheiden (Jhaveri, Zippe et al. 1999), muss bei diesen Patienten von einem langsamen Progress der Krebserkrankung ausgegangen werden, und 35% der Patienten zeigen 5 Jahre nach dem PSA-Anstieg ohne weitere Behandlung Knochenmetastasen.

Bei Patienten mit günstigen Prognosefaktoren, wie etwa einem niedrigen Gleason-Score ist der Anstieg des PSA häufiger auf ein Lokalrezidiv als auf Fernmetastasen zurückzuführen, und die Patienten sollten mit Radiotherapie behandelt werden. Trotz dieser Strahlentherapie wird in den meisten Fällen keine komplette biochemische Remission beobachtet (Pound, Partin et al. 1999). Patienten mit ungünstigen Prognosefaktoren profitieren dagegen nicht von der Bestrahlung. Heutiger Standard ist in diesen Fällen die systemische Unterdrückung der Androgenwirkung, die sobald wie möglich eingeleitet werden sollte. Daten aus kontrollierten Studien stehen derzeit jedoch noch aus (Breul, Zimmermann et al. 2003).

Metastasiertes Prostatakarzinom (N1 oder M1)

Seit langem stellt die Ausschaltung der wachstumsfördernden Androgenwirkung auf die Prostatazellen den Goldstandard für die Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms dar (Huggins und Hodges 1941). Diese kann entweder operativ durch Orchiektomie oder pharmakologisch erreicht werden. Mittel der Wahl ist eine Kombination aus zwei verschiedenen Wirkstoffen. Durch Gabe von starken Agonisten des Gonadotropin-Releasing Hormons aus dem Thalamus (GnRH) wird die Androgenausschüttung unterdrückt. Um eine zu Beginn der Hormontherapie häufig auftretende verstärkte Testosteron-Ausschüttung und damit Verschlechterung der Symptome (flare up) zu verhindern, muss zusätzlich die Umwandlung des gebildeten Testosteron in den aktiven Metaboliten Dihydroxytestosteron (DHT) durch Antiandrogene verhindert werden. Zu diesem Zweck stehen Hemmstoffe des relevanten Enzyms 5 α -Reduktase (z.B. Finasterid) oder Medikamente, die die Bindung von DHT an den Androgenrezeptor kompetitiv verhindern (z.B. Flutamid) zur Verfügung (Breul, Zimmermann et al. 2003). Durch den Androgenentzug kommt es allerdings zu erheblichen Einbußen der Lebensqualität mit Beschwerden wie Hitzewallungen, Schwäche, Impotenz und Osteoporose (Potosky, Knopf et al. 2001). Um diese negativen Effekte zu verringern wurde eine Therapie mit

dem Prinzip der intermittierenden Androgenblockade entwickelt (Bruchovsky, Klotz et al. 2000). Eine abschließende Bewertung dieser Methode steht allerdings noch aus.

Ein großes Problem ist, dass sich in fast allen Fällen innerhalb weniger Jahre aus einem primär Hormon-abhängigen in ein Hormon-unabhängiger Tumor entwickelt. Die Mechanismen dieser Umwandlung sind weitgehend nicht geklärt (Isaacs 1999). Die Progression der Erkrankung kann in einzelnen Fällen durch den Wechsel zu anderen Antiandrogenen um einige Zeit verzögert werden (Joyce, Fenton et al. 1998). Sollte die Krebserkrankung auch auf diese Maßnahmen nicht ansprechen, sind die weiteren therapeutischen Optionen sehr limitiert. Zytotoxischen Chemotherapien mit verschiedenen Präparaten stehen rein palliative Ansätze mit Bisphosphonaten oder die in Amerika übliche Prednisongabe gegenüber. Neue Therapiekonzepte mit monoklonalen Antikörpern oder Inhibitoren von Wachstumsrezeptoren sind derzeit in Erprobung (Breul, Zimmermann et al. 2003).

1.1.5 Nachsorge

Frühzeitiges Erkennen eines Rezidiv, sowie Erkennen und Behandlung von therapiebedingten Komplikationen sind Sinn und Ziel der Nachsorgeuntersuchungen. Neben einer spezifischen Anamnese, werden DRU und Sonographie durchgeführt und der PSA-Wert bestimmt. Bei Unklarheiten oder auffälligen Befunden kann dann eine weitergehende apparative Diagnostik eingeleitet werden (TRUS, CT, MRT). Im ersten Jahr wird der Patient alle drei Monate, im zweiten und dritten Jahr alle sechs Monate und danach einmal jährlich untersucht. Bei Patienten mit metastasierten Tumoren kommen individuell weitere Maßnahmen dazu. Beim Patientenkollektiv, das dieser Arbeit zugrunde liegt, wurden zusätzlich Knochenmark-Aspirationen durchgeführt. Der damit verbundene Nachweis disseminierter Tumorzellen hat noch keinen Eingang in die Routinediagnostik des Nachsorgekalenders gefunden (Breul, Zimmermann et al. 2003).

1.2 Genomische Veränderungen beim Prostatakarzinom

1.2.1 Methoden der genomischen Untersuchung von Tumoren

Zur Untersuchung des Genoms von Tumoren stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Untersuchung des Karyotyps auf Translokationen, Deletionen oder Inversionen spielt schon seit den 60er Jahren eine große Rolle in der Diagnostik von Krebserkrankungen (Patau 1960). Eine deutlich höhere Auflösung erreicht man durch die Hybridisierung auf Metaphase-Chromosomen oder Interphasen-Kerne der Tumoren, wobei bei geeigneter Wahl der Sonde gezielt spezifische Amplifikationen oder Translokationen nachgewiesen werden können (FISH, „fluoreszenz in situ hybridization“; (Pinkel, Straume et al. 1986). Der Nachweis größerer Amplifikationen oder Deletionen lässt sich auf diesem Weg allerdings nur sehr schwer durchführen. Durch eine Kombination von mindestens fünf Fluorochromen lassen sich alle Chromosomen des Menschen mit spezifischen Sonden markieren, so dass auf einer Metaphase alle Translokationen und Amplifikationen den einzelnen Chromosomen zugeordnet werden können (Speicher, Gwyn Ballard et al. 1996). Für all diese Methoden ist jedoch die Präparation von Metaphasen aus Tumorzellen Voraussetzung, was bei soliden Tumoren oft nicht möglich ist.

Eine Methode, die die globale Untersuchung des Genoms von Zellen auf strukturelle chromosomale Aberrationen erlaubt ist die komparative genomische Hybridisierung (CGH, siehe Abbildung 2). Die global amplifizierte Tumor-DNA wird dabei markiert und zusammen mit Referenz-DNA ohne Aberrationen, die mit einem anderen Basenanalogen markiert ist, auf Metaphasen eines gesunden Spenders hybridisiert (Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1992; du Manoir, Speicher et al. 1993). Die über Basenpaarung an die Metaphasen-DNA gebundenen, unterschiedlich markierten Proben können dann mit Hilfe zweier Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar gemacht werden und werden dann separat voneinander fotografiert. Mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung können die Intensitätsunterschiede der beiden Fluorochrome und damit der eingesetzten Proben berechnet und auf diese Weise Amplifikationen und Deletionen sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 2). Der große Vorteil der CGH ist, dass mit dieser Methode numerische Veränderungen bis zu einer Auflösung von 10 bis 20 Mb dargestellt werden können, ohne Metaphasen des Tumorgewebes gewinnen zu müssen. Um genomische Aberrationen signifikant festzustellen, müssen diese in der Regel in über 60% der Zellen vorliegen.

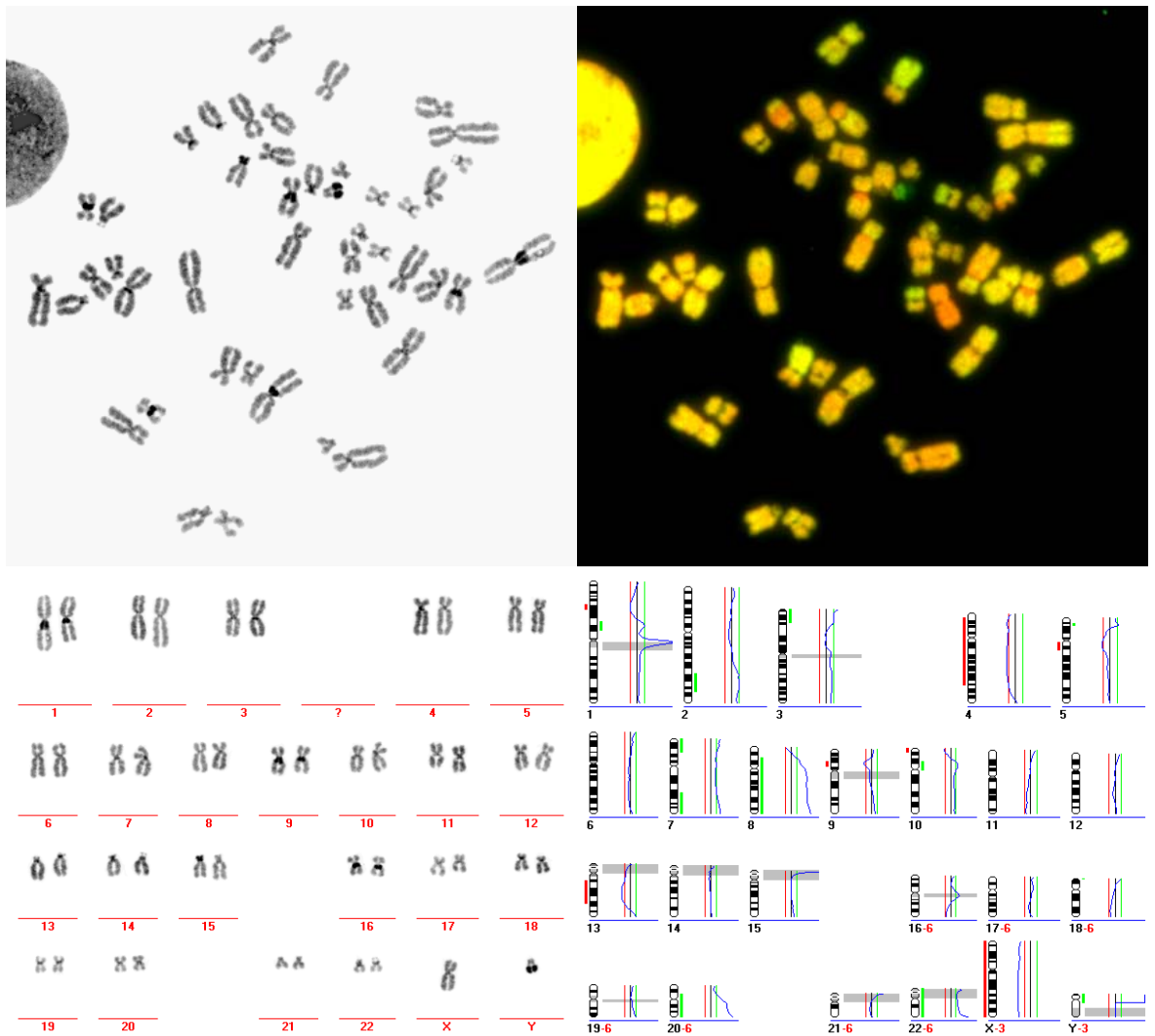


Abbildung 2 Das Prinzip der CGH (komparative genomische Hybridisierung)

Zwei unterschiedlich markierte DNA-Proben (Test-DNA aus einer disseminierten Tumorzelle und Referenz-DNA aus einem Lymphozytenpool aus dem peripheren Blut) werden auf humane Metaphasen gesunder Spender hybridisiert und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen. Die mit DAPI gegengefärbten Chromosomen können dann in ein Karyogramm-Schema eingeordnet werden. Das CGH-Profil zur Darstellung chromosomaler Veränderungen wird anschließend vom Computer berechnet.

1.2.2 Genomische Veränderungen beim Prostatakarzinom

Die molekularen Ursachen von Krebserkrankungen und ihre Rolle in der Krankheitsentstehung treten immer mehr in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Beim Kolonkarzinom wird die Akkumulation spezifischer Mutationen mit der Morphologie des Tumors korreliert. In diesem Modell spricht man von einer Adenom-Karzinom-Sequenz, bei der typische Genveränderungen zu bestimmten Zeitpunkten der Tumorentstehung und –progression auftreten (Kinzler und Vogelstein 1996). Auch bei der Entstehung des Prostatakarzinoms haben Veränderungen an den chromosomalen Abschnitten bestimmter Tumorsuppressor- und Onkogene eine große Bedeutung.

In der Literatur finden sich viele Hinweise auf bestimmte Chromosomenregionen, die bei Karzinomen der Prostata deletiert oder amplifiziert sind.

In den Primärtumoren von Patienten mit Prostatakarzinom wurde mit der CGH eine Vielzahl an chromosomalen Veränderungen detektiert. Die publizierten Daten zeigen ein sehr heterogenes Bild an CGH-Veränderungen (Visakorpi, Kallioniemi et al. 1995; Cher, Bova et al. 1996; Nupponen, Kakkola et al. 1998; Sattler, Rohde et al. 1999; Nupponen und Visakorpi 2000; Strohmeyer, Berger et al. 2004). Einige Aberrationen wurden allerdings immer wieder gehäuft gefunden. Tabelle 5 stellt die am häufigsten aufgetretenen chromosomalen Veränderungen aus 425 Primärtumoren dar, die in einer CGH-Datenbank zusammengetragen wurden (Baudis und Cleary 2001). Da in diese Zusammenstellung viele Tumoren ohne Aberrationen im Auflösungsbereich der CGH aufgenommen wurden, liegen die relativen Häufigkeiten einzelner Veränderungen deutlich unter denen anderer Veröffentlichungen. Der Grund hierfür ist, dass in den meisten Fällen keine Mikrodissektion der Tumoren vorgenommen wurde und deswegen viele Zellen aus Bindegewebe und benigner Prostata enthalten waren. Durchgeführte Analysen von Gewebe aus Vorstufen des Prostatakarzinoms (PIN, siehe 1.1.2) zeigten auch bereits in diesem sehr frühen Stadium der Entartung immer wieder Amplifikationen auf den Chromosomen 8q, 7 und 16p, sowie Verluste auf Chromosom 13q (Zitzelsberger, Engert et al. 2001). Diese Veränderungen finden sich auch häufig in bisher untersuchten Lymphknoten- und Fernmetastasen, was die große Rolle bestimmter Gene auf diesen Chromosomenlokalisationen andeutet (Cher, Bova et al. 1996; Zitzelsberger, Engert et al. 2001).

Tabelle 5 Die zehn häufigsten genomischen Gewinne und Verluste in 425 mit der CGH untersuchten Primärtumoren der Prostata (CGH-Datenbank auf www.progenetix.de; (Baudis und Cleary 2001)

Chromosomenarm	Gewinne (in %)	Chromosomenarm	Verluste (in %)
8q	19,1	8p	28,9
7q	9,4	13q	28,0
7p	8,2	16q	17,7
17q	7,8	6q	17,4
Xq	7,5	5q	12,7
Xp	6,4	18q	9,9
9q	6,1	2q	8,5
3q	5,4	17p	8,0
20q	4,2	10q	7,3
1q	3,8	1p	6,1

Die mithilfe der CGH gewonnenen Daten konnten bereits mit höher auflösenden Methoden, wie LOH (loss of heterozygosity) oder Array-CGH, bestätigt werden (Yano, Matsuyama et al. 2004). Sie deuten auf eine zentrale Rolle von verschiedenen Tumorsuppressorgenen, wie p53 auf Chromosom 17p, dem Retinoblastom-Gen auf Chromosom 13q oder PTEN auf 10q und Onkogenen, wie c-myc auf Chromosom 8q, während der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms (Karan, Lin et al. 2003; Deutsch, Maggiorella et al. 2004).

1.3 Die minimal residuale Krebserkrankung (MRD)

1.3.1 Definition der MRD

In den 80er Jahren wurden zum ersten Mal Zellen epithelialen Ursprungs im Knochenmark (KM) von Karzinompatienten nachgewiesen (Dearnaley, Sloane et al. 1981; Mansi, Berger et al. 1987; Schlimok, Funke et al. 1987). Diese Funde erlaubten eine Übertragung des bei Lymphomen und Leukämien gebräuchlichen Begriffs der „minimalen residualen Krebserkrankung“ (MRD) auf solide Tumoren und signalisierten den Verbleib von einzelnen Tumorzellen im Körper des Patienten. Über immunzytochemische Färbungen von epithelialen Markern können diese Zellen von den Zellen mesenchymalen Ursprungs aus Knochenmark, Lymphknoten oder Blut unterschieden werden, die diese Proteine nur in sehr seltenen Fällen exprimieren (Pantel, Felber et al. 1994). Die am häufigsten eingesetzten Nachweismethoden beruhen auf dem immunzytochemischen Nachweis mittels monoklonaler Antikörpern gegen Zytokeratine (CK) oder das epitheliale Adhäsionsmolekül EpCAM (Schlimok, Funke et al. 1987).

1.3.2 Prognostische Bedeutung der MRD

Bei vielen Typen solider Tumoren konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen nach operativer und adjuvanter Therapie in Knochenmark, Lymphknoten und Blut der Patienten persistieren (Gath und Brakenhoff 1999; Pantel, Cote et al. 1999; Tsavellas, Patel et al. 2001). Durch die verschiedenen molekularen Nachweismethoden in den einzelnen Studien stimmen die veröffentlichten Daten über den Zusammenhang zwischen MRD bei Karzinomen und rezidivfreiem bzw. Gesamt-Überleben der Patienten nicht immer überein. Für die Relevanz disseminierter Tumorzellen beim Prostatakarzinom seien zwei Studien mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen Zytokeratine genannt. Mit dem CK2-Antikörper, der spezifisch gegen Zytokeratin 18 gerichtet ist,

konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben von Patienten mit solchen Zellen im Knochenmark gesehen werden (Weckermann, Wawroschek et al. 1999). Dagegen zeigten die gleichen Autoren die prognostische Relevanz von Tumorzellen im Knochenmark, die mit dem Antikörper A45-B/B3 gefärbt wurden. Dieser murine Antikörper bindet an einem gemeinsamen Epitop der Zytokeratine 8, 18 und 19 und eine immunzytochemische Detektion positiver Zellen im Knochenmark stellt einen unabhängigen Prognosefaktor dar (Weckermann, Muller et al. 2001). Die Bedeutung von Zellen, die mit dem Panzytokeratin-Antikörper A45 entdeckt wurden, zeigte sich auch bei anderen Tumorentitäten. So war der Nachweis disseminierter Tumorzellen in einer Studie zum Mammakarzinom neben Tumorgröße und Östrogenrezeptorstatus der bedeutendste unabhängige prognostische Faktor (Braun, Pantel et al. 2000). Weitere Studien zur Relevanz disseminierter epithelialer Tumorzellen mit dem CK2-Antikörper zeigen ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse (Lindemann, Schlimok et al. 1992; Jauch, Heiss et al. 1996; Pantel, Izbicki et al. 1996; Heiss, Simon et al. 2002). Ein weiterer epithelialer Marker, der eine Bedeutung beim Nachweis disseminierter Tumorzellen hat und vor allem zu deren Nachweis in Lymphknoten eingesetzt wird, ist das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM. Das Vorkommen EpCAM-positiver Einzelzellen im Lymphknoten wurde als unabhängiger prognostischer Faktor auf das Gesamt-Überleben für die Gruppe der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome (Kubuschok, Passlick et al. 1999), das Pankreas-Karzinom (Hosch, Knoefel et al. 1997) und das Ösophagus-Karzinom (Izbicki, Hosch et al. 1997) beschrieben.

Aufgrund dieser zum Teil kontrovers diskutierten Daten und die Vielzahl an verwendeten Detektionssystemen bleibt die endgültige Antwort auf die Frage nach der klinischen Relevanz der disseminierten Tumorzellen für viele Karzinomentitäten weiterhin offen. Lediglich beim Mammakarzinom hat der Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark unter dem Kürzel $pM_{(i)}$ Eingang in die TNM-Klassifikation gefunden (Hermanek 1994).

1.3.3 Molekulare Untersuchungen an disseminierten Tumorzellen

Zum Beweis der Tumorigenität der disseminierten epithelialen Zellen aus dem Knochenmark wurden bereits umfassende molekulare Analysen durchgeführt. In einer Arbeit zu Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark von Patienten mit Prostata-Karzinom konnte gezeigt werden, dass diese Zellen genomische Veränderungen auf den Chromosomen 7, 8 und 1 aufwiesen (Mueller, Carroll et al. 1998). Durch eine immunzytochemische Doppelfärbung gegen PSA und Zytokeratin konnte gezeigt werden, dass die Zytokeratin-positiven Zellen bei Patienten mit Prostatakarzinom tatsächlich aus der Prostata stammen (Oberneder, Riesenberg et al. 1994). In mehreren Arbeiten konnte die Expression des Proto-Onkogens ErbB2 in den disseminierten Zellen

aus Patienten mit verschiedenen Tumoren durch immunzytochemische Färbungen nachgewiesen werden (Pantel, Schlimok et al. 1993; Putz, Witter et al. 1999; Braun, Schlimok et al. 2001). Das Vorkommen Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark, die zusätzlich erbB2 exprimieren, wurde bei Patientinnen mit Mammakarzinom als unabhängiger Faktor für eine schlechte Prognose definiert (Braun, Schlimok et al. 2001). Zwei anderen Arbeitsgruppen gelang der Nachweis von K-ras Mutationen in Zytokeratin-positiven Zellen von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren durch eine spezifische Einzelzell-PCR (Dietmaier, Hartmann et al. 1999; Tortola, Steinert et al. 2001). Zu disseminierten Tumorzellen bei Patienten mit Prostatakarzinom konnte des weiteren gezeigt werden, dass ihre Häufigkeit und Anzahl nach einer Therapie durch Androgenentzug deutlich abnimmt (Pantel, Schlimok et al. 1993). Aus dem Knochenmark von Patienten mit verschiedenen epithelialen Tumoren konnten auch Zelllinien der Zytokeratin-positiven Zellen generiert werden, die genomische Aberrationen aufweisen (Putz, Witter et al. 1999). Aus EpCAM-positiven Einzelzellen aus Lymphknoten von Patienten mit Ösophaguskarzinom wurden ebenfalls eine Zelllinie generiert, deren tumorigenes Potential und Fähigkeit zur Bildung von Metastasen durch die Implantation in immundefiziente SCID-Mäuse gezeigt werden konnte (Hosch, Kraus et al. 2000).

Die Etablierung der CGH zur globalen Untersuchung des Genoms von Einzelzellen ermöglichte eine Analyse numerischer Aberrationen von disseminierten Tumorzellen (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999) und auch den Vergleich mit kleinsten mikrodisszezierten Arealen aus Primärtumoren (Stoecklein, Erbersdobler et al. 2002). Für disseminierte Zytokeratin-positive Zellen aus dem Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden spezifische Aberrationen im Genom der Zellen definiert, die vor allem in Zellen aus Patientinnen mit Fernmetastasen auftreten (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003). Zytokeratin-positive Zellen aus Patienten ohne Fernmetastasen sind dagegen sehr heterogen in ihren genomischen Veränderungen (Klein, Blankenstein et al. 2002). Zelllinien, die wie oben bereits beschrieben aus disseminierten Einzelzellen erstellt wurden (Putz, Witter et al. 1999), konnten in jüngster Zeit mit neuen höher auflösenden Methoden, wie multiplex-FISH und Microarray-CGH, auf ihre genomischen Veränderungen hin untersucht werden (Kraus, Pantel et al. 2003). Seit kurzem stehen auch Methoden zur Verfügung, die eine nähere Untersuchung einzelner Zellen auf mRNA-Ebene möglich machen (Klein, Seidl et al. 2002). Da für diesen Zweck lebende Zellen isoliert werden müssen, können diese Zellen nicht über Antikörper gegen das intrazelluläre Zytokeratin nachgewiesen werden. Das Adhäsionsmolekül EpCAM für diese Arbeiten ein geeignetes Antigen für den immunzytochemischen Nachweis epithelialer disseminierter Tumorzellen dar.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war die genomische Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom. Der Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen stellt einen unabhängigen Prognosefaktor dar, dessen Wert allerdings hinter dem etablierter klinischer Faktoren zurück bleibt. Durch die immunzytochemische Färbung und weitergehende Analyse EpCAM-positiver Zellen im Knochenmark sollte ein zweites epitheliales Markermolekül untersucht werden, das den Nachweis von disseminierten Tumorzellen erlaubt.

Zu diesem Zweck sollten Knochenmarkpunktionen zum Zeitpunkt der Operation und von bereits operierten Patienten gewonnen und mit Immun-Färbungen gegen Zytokeratin und EpCAM nach disseminierten Zellen untersucht werden. Dadurch sollte die relative Häufigkeit disseminierter Tumorzellen bestimmt werden, die über Antikörper gegen die beiden epithelialen Markermoleküle detektiert werden. Die Zuordnung der Patienten in die drei definierten klinischen Stadien M0 (ohne Fernmetastasen), BR (PSA-Anstieg im Sinne eines biochemischen Rezidivs) und M1 (mit Fernmetastasen) sollte eine mögliche Assoziation der Marker-positiven Zellen auf die Progression der minimal residualen Krebserkrankung aufzeigen.

Zusätzlich sollte der neoplastische Ursprung der Marker-positiven Zellen über die einfache Korrelation mit klinischen Variablen hinaus direkt bewiesen werden. Hierzu sollten die gefärbten Zellen isoliert und die genomische DNA der einzelnen Zellen amplifiziert werden. Mit der komparativen genomischen Hybridisierung sollten die Marker-positiven Zellen schließlich auf chromosomale Veränderungen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Kooperationspartner

Die in dieser Dissertation untersuchten Knochenmarkaspirate und Primärtumoren, sowie die klinischen Daten zu den Patienten wurden durch die klinischen Kooperationspartner bereitgestellt. Mitarbeiter des pathologischen Instituts des Zentralklinikums Augsburg markierten auf angefertigten HE-gefärbten Gewebeschnitten der Operationspräparate die Lage von Tumorarealen für die Lasermikrodissektion.

Klinik

PD Dr. D. Weckermann Dr. D. Birnböck W. Werdecker	Zentralklinikum Augsburg Urologische Klinik 86156 Augsburg
Dr. A. Buchner Dr. R. Oberneder	Klinikum Großhadern Urologische Klinik 81377 München
Dr. J. Bischoff	Klinik Bad Trissl Fachklinik für Onkologie 83080 Oberaudorf

Pathologie

Prof. Dr. H. Arnholdt	Zentralklinikum Augsburg Institut für Pathologie 86156 Augsburg
-----------------------	---

2.2 Methoden

2.2.1 Aufarbeitung des Knochenmarks

Die disseminierten Tumorzellen wurden in dieser Dissertation durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugation der Knochenmark-Aspirate angereichert. Bei einigen Präparaten, aus denen Zellen isoliert werden konnten, wurde stattdessen eine Anreicherung EpCAM-positiver Zellen über paramagnetische Eisenpartikel (Beads) durchgeführt. Beide Methoden werden im Folgenden kurz dargelegt.

Percoll-Dichtegradientenzentrifugation

Das Knochenmark wird zunächst mit Hank's Salzlösung auf 50 ml aufgefüllt und in einem 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (10 min, 170 g), um grobe Verunreinigungen wie Fett und Thrombozyten zu entfernen. Nach Abnahme des Überstandes wird das Zellpellet mit 7 ml PBS resuspendiert. Daraufhin wird die Suspension vorsichtig mit 7 ml Percoll 50% überschichtet und zentrifugiert (10 min, 1000 g). Die mononukleären Zellen, die sich in der Interphase getrennt von den Erythrozyten ansammeln, werden in ein neues Falcon überführt werden. Dieses wird mit PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert (10 min, 500 g), um Percollreste zu entfernen. Das Zellpellet wird nach Abnehmen des Überstands in 2 ml PBS resuspendiert und die Anzahl der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend werden 1.000.000 Zellen für die Färbung mit dem monoklonalen Antikörper 3B10 gegen EpCAM aus der Suspension entfernt (siehe 2.2.2). Von den restlichen Zellen werden je 500.000 Zellen auf die beiden Auftragsfelder eines Adhäsions-Objektträgers gegeben. Nach einer Stunde sind die Zellen sedimentiert, das überständige PBS wird abgenommen und der Haft-Objektträger über Nacht getrocknet. Das Präparat wird bis zu seiner Verwendung in den immunzytochemischen Färbungen bei 4°C trocken gelagert.

Anreicherung mit 3B10-beschichteten Eisenpartikeln

Vor der Behandlung des Knochenmarks werden die kommerziell erworbenen Anti-Maus-Fc-beschichteten Eisenpartikeln (Beads) zunächst am Magneten isoliert, und nach einem Waschschrift in 50 µl PBS/0,1% BSA resuspendiert. Die gereinigten Beads müssen anschließend mit 1 µl murinem 3B10-Antikörper (1µg/µl) beschichtet werden. Dies geschieht über 30 min unter ständigem Rollen bei 4°C.

Während dieser Zeit wird das Knochenmark für 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Auf diesem Weg entsteht eine weiße Interphase aus mononukleären Zellen, aus der 1 ml entnommen wird. Zur Entfernung von Verunreinigungen im Knochenmark wird mit 14 ml Hank's Solution zentrifugiert (10 min, 170 g). Anschließend wird der Überstand bis auf 2 ml abgenommen und danach das Zellpellet resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer wird die Zellsuspension mit 200 µl AB-Serum blockiert und dann mit den 3B10-beschichteten Beads für 30 min inkubiert. Danach folgt ein dreimaliges Waschen am Magneten mit PBS/0,1% BSA, bevor die Lösung mit den an die Beads gebundenen Zellen in einem Ansatz von 200 µl aus PBS/0,1% BSA/0,8 mM MgSO₄ aufgenommen wird. Die Beads werden daraufhin mit 5 µl DNase (650 U/µl) versetzt und mehrmals mit der Pipette am Magneten resuspendiert. Auf diese Weise werden die angereicherten Zellen wieder von den Eisenpartikeln abgelöst. Der Überstand wird schließlich erneut in 200 µl PBS/0,1% BSA aufgenommen und die über EpCAM angereicherten Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben mit dem Cy3-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper gefärbt.

2.2.2 Immunzytochemische Färbung

EpCAM-Färbung lebender Zellen in Suspension

Wie in 2.1.1 beschrieben werden 1.000.000 Zellen aus der Aufarbeitung des Knochenmark mit dem 3B10-Antikörper gefärbt, der gegen ein extrazelluläres Epitop des epithelialen Zelladhäsionsmolekül EpCAM gerichtet ist. Die Zellsuspension wird dafür in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert (10 min, 500 g). Anschließend wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 1 µl des Primärantikörpers (monoklonaler muriner Antikörper 3B10, 7,85 µg/ml), 10 µl AB-Serum und 189 µl PBS/Pepton versetzt. Nach 10 min auf einem Schüttelgerät bei 4°C im Dunkeln wird die Suspension zentrifugiert. Das Zellpellet wird daraufhin in 500 µl PBS/Pepton gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet mit einer Lösung aus 4 µl Sekundärantikörper (Cy3-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper, 28 µg/ml), 10 µl AB-Serum und 186 µl PBS/Pepton im Dunkeln bei 4°C inkubiert (10 min). Nach dem folgenden Waschschrift mit 500 µl PBS wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 300 µl PBS für den Nachweis gegen EpCAM gefärbter Zellen aufgenommen.

Zytokeratin-APAAP-Färbung auf Adhäsions-Objektträgern

Nach der Rehydrierung der Haft-Objektträger in PBS werden unspezifische Bindungen zunächst über 20 min mit 10 % humanem AB-Serum blockiert. Anschließend werden die Zellen über 45 min mit dem Primärantikörper A45-B/B3 (2 µg/ml), der gegen ein gemeinsames Epitop der Zytokeratine 8,18 und 19 bindet, inkubiert. Danach wird der Primärantikörper über den Brückenantikörper Z259 (30 min, 125 µg/ml) mit dem APAAP-Komplex gekoppelt (30 min, 1,5 µg/ml). Der enzymatischen Entwicklung mit BCIP/NBT über 20 min folgt die Fixation mit 1 % PFA über 10 min. Zwischen den einzelnen Schritten wird immer dreimal in PBS gewaschen. Bei jeder Färbung wurde als Positivkontrolle ein Präparat der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 mitgefärbt. Als Negativkontrolle wurde ein Patientenpräparat mit MOPC 21 behandelt (45 min, 100 µg/ml) und anschließend mithilfe des APAAP-Komplex entwickelt. MOPC 21 ist vom gleichen Isotyp wie der Zytokeratin-Antikörper (IgG₁) und bindet kein menschliches Epitop.

Zytokeratin-F_{ab}-Färbung auf Adhäsions-Objektträgern

Die Färbung gegen Zytokeratin mit dem kommerziell erworbenen Epimet Kit erfolgt nach den Vorgaben des Herstellers. Das enthaltene A45-F_{ab}-Fragment ist bereits mit der alkalischen Phosphatase konjugiert. Da das enthaltene Färbesubstrat (Neufuchsin) die DNA schädigt, musste es durch BCIP/NBT ersetzt werden. Die Entwicklung des Präparates erfolgte unmittelbar nach der Behandlung mit dem Antikörper.

Zytokeratin-EpCAM-Doppelfärbung auf Haft-Objektträgern

Zu Beginn werden unspezifische Bindungen durch 10% humanes AB-Serum in PBS blockiert (20 min), bevor die Adhäsionsobjektträger für 30 min mit dem Panzytokeratin-Antikörper A45-B/B3 (2 µg/ml) inkubiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird ein mit dem Fluorochrom Cy3 verbundener Sekundärantikörper (4,4 µg/ml) gegen murines IgG an den Primärantikörper A45 gekoppelt. Zur Färbung des gleichen Präparats gegen EpCAM wird zunächst mit 5% Mausserum in PBS blockiert (20 min), bevor die Präparate mit einem murinen biotinylierten 3B10-Antikörper gegen humanes EpCAM inkubiert werden (30 min). Nach Waschen in TBS (3x1 min) folgt die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex für alkalische Phosphatase (30 min). Nach erneuten Waschschritten in TBS (3x1 min) werden die Präparate in ELF-Waschlösung gehalten (10 min). ELF ist ein leicht bläulicher Fluoreszenzfarbstoff, der nach dem Umsetzen mit alkalischer Phosphatase gelbgrün leuchtet. Der ELF-Substratentwicklung (1 min) folgt das Waschen in ELF-Stopplösung (10 min). Die Lösung wird dabei mehrmals gewechselt und die Objektträger in einer Küvette auf dem Schüttelgerät platziert. Bis zur weiteren Verwendung der Haft-Objektträger werden diese in PBS überführt. Als Positivkontrolle dient wie schon bei der vorigen Färbung die humane Mammakarzinom-Zelllinie MCF7, als Negativkontrolle werden Präparate desselben Patienten mit MOPC21 gefärbt.

2.2.3 Isolierung einzelner Tumorzellen

Isolierung von Adhäsions-Objektträgern: Die gefärbten Zellen werden mittels Mikromanipulation mit einer Glaskapillare von den Objektträgern isoliert. Dazu werden die Haft-Objektträger aus den verschiedenen Färbungen zunächst mit PBS + 0,5% Igepal überschichtet und in ein Invertmikroskop eingespannt. Die einzelnen Zellen werden mit einer Glaskapillare aufgesaugt, wobei sie zunächst vorsichtig von der Oberfläche des Haft-Objektträgers gekratzt werden müssen. Die auf diesem Weg isolierten Zellen werden dann in ein Feld eines 8-Feld-Objektträgers (Pickfeld) überführt, das mit PBS + 0,5 % Igepal überschichtet ist. Dort erfolgt die Aufnahme der einzelnen gefärbten Zellen unter Sicht in 1 µl PBS + 0,5% Igepal mit einer 2 µl Pipette.

Isolierung aus Suspension: Die gegen EpCAM gefärbte Zellsuspension wird direkt auf drei Felder eines 8-Feld-Objektträgers aufgebracht. Nach Sedimentieren der Zellen (15-30 min) werden die Felder nach fluoreszierenden Zellen durchsucht und positive Zellen direkt auf das mit PBS beladene Pickfeld überführt. Dort erfolgt die Aufnahme der einzelnen gefärbten Zelle unter Sicht mit einer 2 µl Pipette.

Die aufgenommene Zelle wird in ein 200 µl Reaktionsgefäß überführt, in das 2 µl Proteinase K Mix vorgelegt werden:

0,2 µl	OnePhorAll plus Puffer
0,13 µl	Igepal 10%
0,13 µl	Tween 10%
0,26 µl	Proteinase K
1,28 µl	H ₂ O

Anschließend werden die zellulären Proteine über 10 Stunden bei 42°C in der PCR-Maschine im Mix verdaut. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgt nach dem Verdau bei 80°C (10 min).

2.2.4 Einzelzell-PCR

Das Genom der Einzelzelle wird mit dem Restriktionsenzym Mse I (Schnittstelle T!TAA) fragmentiert und gleichzeitig an den 5'-Enden TA-Überhänge generiert. Der Verdau läuft bei 37°C über 3h in einer MJ-Research PCR-Maschine, indem der mit Proteinase K vorbehandelten Zelle folgende Reagenzien zugefügt werden:

0,2 µl	OnePhorAll plus Puffer
0,2 µl	Mse I (50 U/µl)
1,6 µl	H ₂ O

Nach der Reaktion wird das Mse I-Enzym bei 65°C inaktiviert (5 min). Ein Adapter aus den zwei Oligonukleotiden LIB1 und ddMse11 (HPLC gereinigt) wird an die durch den Verdau generierten Überhänge ligiert. Die Basenpaarung des Adapters wird dabei durch ein langsames Abkühlen in der PCR-Maschine nach einem programmierten Gradienten (65°C bis 15°C für je 1 min pro Temperaturschritt) vor der Ligation erzielt. Im Ansatz befinden sich:

0,5 µl	OnePhorAll plus Puffer
0,5 µl	LIB1 Primer (100mM)
0,5 µl	ddMse11 Primer (100mM)
1,5 µl	H ₂ O

Die Ligation selbst erfolgt über Nacht bei 15°C. Zu der mit Mse I fragmentierten Zelle wird der vorbehandelte Adapter, sowie 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U) und 1 µl ATP 10 mM gegeben. Das mit den an den Adapter ligierten Mse I-Fragmente gefüllte Reaktionsgefäß wird dann mit einem PCR-Mix aufgefüllt:

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

Um eine Auffüllreaktion der 3'-rezessiven Enden der Fragment-Adapter-Konstrukte zu erreichen wird das Reaktionsgemisch zunächst für 3 min bei 68°C inkubiert. Durch diesen Schritt entstehen komplementäre LIB1-Primerbindungsstellen.

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

Das entstandene primäre Amplifikat ist bei –20°C stabil und dient als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen am Genom der Einzelzellen.

2.2.5 Kontroll-PCR

Um die Qualität des primären PCR-Produktes zu bestimmen, werden spezifische genomische Mse I-Fragmente nachgewiesen. Bei zwei positiven spezifischen Kontroll-PCR auf repräsentative Mse I-Fragmente kann man von einem qualitativ guten primären PCR-Produkt ausgehen. Für die Auflösung der CGH sind erfahrungsgemäß aber auch Proben geeignet, bei denen nur ein spezifisches Fragment in der Kontroll-PCR nachgewiesen wurde. Der PCR-Ansatz zum Nachweis einer spezifischen Sequenz besteht aus:

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

Für die Einzelzellen aus dem Knochenmark wurden mindestens zwei der folgenden Primerpaare verwendet: p53 Exon 2/3 und/oder p53 Exon 8/9, sowie immer das Primerpaar CK 19 (Zytokeratin). Da die DNA bei der Gewinnung aus Paraffinschnitten zum Teil in kleineren Bruchstücken vorliegt, wurden für lasermikrodissektierte Areale die Mikrosatellitenmarker D5S500 und D16S485 verwendet. Das Programm im MJ-Research ist:

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

2.2.6 Agarose Gelelektrophorese

Die Produkte der PCR werden durch Gelelektrophorese mit einer Konzentration von 1,5% Agarose in TBE-Puffer aufgetrennt. Jede Probe wird mit 1 µl Sybr-Gold und 2 µl Orange G gemischt und in die einzelnen Geltaschen geladen. Durch ein Gelelektrophorese-System werden die Proben bei 160 V und 400 mA über 45 min aufgetrennt. Nach Visualisierung der aufgetragenen DNA-Fragmente auf einem UV-Schirm, werden die Gele mit einer Kamera fotografiert. Nach einer EDV-basierten Digitalisierung der Fotos erstellt ein Hitzedrucker Bilder.

2.2.7 Hämatoxylin-Färbung von Gewebe und Mikrodissektion

Mit Hilfe eines Mikrotoms bzw. Kryotoms werden 5 µm dicke Schnitte von in Paraffin eingebetteten bzw. kryokonservierten Prostatakarzinomproben angefertigt. Diese werden zur späteren Laserdissektion auf Objektträger gebracht, die zuvor mit Polyethylenmembranen (1,35 µm) bespannt wurden. Daneben werden Referenzschnitte auf herkömmliche Glasobjektträger aufgebracht. Die Paraffinschnitte werden darauf mit Xylol 100% deparaffinisiert (30 min). Nach einer absteigenden Alkoholreihe (EtOH 100%, 85%, 70%) erfolgt die Kernfärbung mit Hämatoxylinlösung 0,1% (3 min) und anschließender Bläuung in Leitungswasser (30 min). Die Referenzschnitte werden zusätzlich mit Eosin 0,1% gefärbt. Diese Gegenfärbung muss bei den Schnitten zur Mikrodissektion wegen negativer Einflüsse auf die Einzelzell-PCR vermieden werden. Abschließend werden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Während die Schnitte auf Polyethylenmembranen für die Laserdissektion über Nacht bei 42°C trocknen müssen, können die Referenzschnitte mit Eukitt eingedeckelt werden.

Die Tumoreale wurden auf den Referenzschnitten von Prof. Arnholdt (Pathologie) angezeichnet, und die entsprechenden Gebiete auf den Folienschnitten aufgesucht. Mittels eines PALM-Laser-Microbeam-Systems können nun Tumoreale mikrodissektiert werden, indem ausgeschnittene Areale durch einen Laserpuls in einen PCR-Öl Tropfen, der sich in einem PCR-Gefäßdeckel befindet katapultiert werden. Die Gesamtgröße der auf diese Weise gewonnenen Areale beträgt für Kryoschnitte etwa 150.000 µm², für Paraffinschnitte etwa 250.00 µm² je Tumorprobe. Durch Zentrifugation können die ausgeschnittenen Tumoreale auf den Boden des Reaktionsgefäßes überführt werden. Die Amplifikation der genomischen DNA erfolgt wie unter 2.2.4 beschrieben.

2.2.8 Lymphozytenkulturen zur Gewinnung von Metaphasenchromosomen

Als Ausgangsmaterial für die Metaphasen-Objektträger dienen 20 ml peripheres Blut von einem gesunden männlichen Spender. Nach Mischung mit Lymphozyten-Kulturmedium (250 ml RPMI Medium ohne L-Glutamin, 15% FCS, Penicillin 200 U/ml, Streptomycin 200 U/ml, L-Glutamin 2 mM, 3 mg Phytohemagglutinin) wird das Blut auf 10 ml Kulturfläschchen verteilt und über drei Nächte im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Um die Zellteilung der Lymphozyten in der Metaphase zu arretieren werden den Kulturfläschchen eine Stunde vor Ende der Inkubation je 100 µl Colcemidlösung (Stockkonzentration 10 µg/ml) zugegeben. Nach Überbringen der Kulturen in 15 ml Falcon-Röhrchen, werden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und für 8 min bei 37 °C mit 10 ml hypotoner Lösung (75 mM KCl) behandelt. Dadurch quellen die Lymphozyten auf und werden anschließend erneut abzentrifugiert und vorsichtig in eiskaltem Fixativ (7,5 ml Methanol, 2,5 ml Eisessig 100%) resuspendiert. Zweimaliges Zentrifugieren und Waschen in 10 ml Fixativ entfernt die Reste der lysierten Erythrozyten. Die auf diesem Wege gewonnenen Zellsuspensionen können in 3 ml Fixativ-Lösung bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.

2.2.9 Präparation von Metaphasechromosomen

Zur Herstellung der für die CGH notwendigen Metaphasen-Objektträger müssen Glasobjektträger über Nacht in einer Küvette mit 70%igem Ethanol entfettet und gereinigt werden. Vor dem Auftropfen wird der Alkohol abgegossen und die Objektträger in destilliertem Wasser auf 4°C abgekühlt. Die in Methanol-Eisessig fixierten Lymphozyten werden mittels Transferpipetten aus einem Abstand von zirka 50 cm auf die Objektträger aufgetropft. Inkubation der Glasobjektträger auf einer Heizplatte verdampft verbleibendes Fixativ. Gleichzeitig wird die Umgebungsluft durch Auflegen von feuchten Tüchern mit Wasserdampf angereichert, was die Qualität der Metaphasenpräparation verbessern soll. Die fertigen Metaphasen-Objektträger können dann über einige Wochen in 100% Ethanol bei 4°C aufbewahrt werden.

2.2.10 Markierungs-PCR

Die Produkte der Einzelzell-PCR werden in Anwesenheit von Deoxynukleotid-Derivaten reamplifiziert (Digoxigenin-11-dUTP zur Markierung der Einzelzelle und Biotin-16-dUTP zur Markierung der Referenz-DNA), die einen Teil der Thymidinbasen ersetzen. Durch diesen Schritt können die Reamplifikate über geeignete Fluoreszenz-Detektionssysteme nach der Hybridisierung auf humane Metaphasen nachgewiesen werden (CGH siehe 2.2.11).

Ein Reamplifikationsansatz besteht aus:

4 µl	Expand-Long-Template Puffer 1
8 µl	LIB1 10 µM
1,5 µl	7/8 dNTP-Mix (8,75 mM dTTP, je 10 mM dATP, dCTP und dGTP)
1,75 µl	1mM Biotin-dUTP (Referenz) oder 1mM Digoxigenin-dUTP (Tumor)
1 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
24,25 µl	H ₂ O

Zu dem Markierungs-PCR-Mix wird 1 µl primäres PCR-Produkt als Template zugegeben. Die MJ-Research PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

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

Nach der Reamplifikation wird der LIB1 Primer durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym Tru I abgetrennt (Schnittstelle T!TAA, Isozym von Mse I). Durch diesen Schritt sollen denkbare Interferenzen bei der CGH ausgeschlossen werden. Die Inkubation des Reamplifikats (41,5 µl) läuft über 3h bei 65°C unter Zugabe von 2 µl Puffer R⁺ und 1 µl Tru I (50 U/µl).

2.2.11 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Die markierten Reamplifikate von Test-DNA (primäre PCR-Produkte der Tumorzellen) und Referenz-DNA (Pool aus fünf bis zehn PCR-Produkten von normalen diploiden Zellen) werden über Nacht bei -20°C gefällt:

40 µl	PCR-Produkt der Tumor-DNA
40 µl	PCR-Produkt der Referenz-DNA
75 µl	C ₀ t-1 DNA 1 µg/µl
10 µl	Heringsperm-DNA 10 µg/µl
18 µl	NaAc 3M pH 5,2
400 µl	EtOH 100%

Die präzipitierte DNA wird am nächsten Tag in einer Tischzentrifuge bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert (45 min). Das DNA-Pellet wird danach einmal in 700 µl Ethanol 70% gewaschen, erneut für 10 min zentrifugiert und schließlich luftgetrocknet. Das Pellet wird in einem Wasserbad bei 37°C für eine Stunde mit 6 µl Formamid 100% und 6 µl Master-Mix (Dextran Sulfat 30% in 4x SSC, Mr > 500.000) gelöst. Die anschließende Denaturierung der DNA-Probe erfolgt für 6 min in einem Heizblock bei 78°C. Um eine unspezifische Bindung der Proben auf die Metaphasen zu

verhindern, gibt man der C₀t-1 DNA im Folgenden 30 min Zeit mit repetitiven Sequenzen der Test- bzw. Referenz-DNA zu hybridisieren.

Parallel zur Behandlung der DNA-Probe muss ein geeigneter Metaphase-Objektträger (siehe 2.2.9) von Zytoplasmaresten und RNA befreit und die darauf vorhandene DNA denaturiert werden. Dazu wird der Metaphase-Objektträger nach Equilibrierung in 2x SSC zunächst für 1 h bei 37°C mit 200 µl RNase A (100 µg/ml in 2x SSC) inkubiert. Die RNase A wird durch dreimaliges Waschen für je 5 min in 2x SSC entfernt. In einem Wasserbad bei 37°C werden 100 ml 10 mM HCl erwärmt, der bei Erreichen der Temperatur 50 µl Pepsin-Lösung (Stockkonzentration 100 mg/ml) zugegeben werden. Der Metaphase-Objektträger wird je nach dem Ausmaß vorhandener Zytoplasmareste für 3 bis 4 min in der entstandenen Pepsin-HCl Lösung bei 37°C inkubiert. Der Pepsin-Verdau der Metaphasen wird durch zweimaliges Waschen in PBS gestoppt. Um die Chromosomenstruktur für die folgende Denaturierung zu stabilisieren, muss das verbliebene Chromatingerüst mit 200 µl PFA-Lösung (50 mM MgCl₂ in PBS mit PFA 1%) fixiert werden. Eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, 85% und 100% bei 4°C) dehydriert den Objektträger. In einem Wasserbad werden parallel 100 ml Formamid-Lösung (70 ml Formamid 100%, 10 ml 20x SSC, 20 ml H₂O, eingestellt auf pH 7,5) auf 70°C erhitzt. Der Metaphase-Objektträger wird in dieser Lösung für 1 min 45 sec bis 2 min denaturiert, wobei die Zeit der Kondensation der Chromosomen und der Intensität des Pepsinverdaus anzupassen ist. Eine erneut durchgeführte aufsteigende Alkoholreihe bei 4°C trocknet die Objektträger bevor die zu hybridisierende, vorbehandelte DNA-Probe aufgetragen wird. Das Hybridisierungsfeld wird durch ein kleines Deckgläschen (18 x 18 mm) abgedeckt und großzügig mit Montagekleber (Fixogum) verschlossen. Die Hybridisierung der Probe läuft über 2 bis 3 Nächte bei 37°C in einem Wasserbad ab. Dabei darf das Fixogum nicht durch anfallendes Kondenswasser gelöst werden, da sonst die DNA-Probe weggeschwemmt werden könnte.

Nach der Hybridisierung wird das Deckgläschen mit dem Fixogum vorsichtig vom Hybridisierungsfeld gelöst und die zähflüssige Dextransulfat-haltige Lösung durch kräftiges Schwenken in 4x SSC entfernt. Anschließend wird der Objektträger je dreimal in Formamid-Lösung (150 ml Formamid 100%, 30 ml 20x SSC, 120 ml H₂O, eingestellt auf pH 7,5) und danach in 1x SSC bei 42°C gewaschen. Nach der Equilibrierung in PBS + Tween 0,2% werden die Proteinbindungsstellen auf dem Glas für 45 min mit 1 ml Superblock 3%-Lösung (PBS eingestellt auf pH 7,5, Tween 0,2%, BSA Fraktion V 3%, FCS 5%) bei 37°C abgesättigt. Überschüssige Block-Lösung wird mit PBS + Tween 0,2% weggespült bevor der Objektträger mit einem Gemisch aus 20 µl Anti-Digoxigenin-FITC, 2 µl Avidin-Cy 3.5 und 180 µl Superblock 1%-Lösung (PBS eingestellt auf pH 7,5, Tween 0,2%, BSA Fraktion V 1%, FCS 5%) für 45 min bei 37°C im Dunkeln, von einem Deckglas (24 x 55 mm) abgedeckt, inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit 4x SSC + Tween 0,2% bei 42°C werden nicht gebundene Fluorochrome wieder entfernt.

Anschließend wird die Chromosomenbänderung mit einer zweiminütigen DAPI Färbung (1 ml 4x SSC + Tween 0,2%, 10 µg DAPI) sichtbar gemacht. Der Objektträger wird kurz mit destilliertem Wasser gespült, um bei der Trocknung die Bildung von Salzkristallen zu verhindern, und schließlich unter Vectaschild H-1.000 eingedeckelt.

Die Auswertung der CGH erfolgt durch ein Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera und entsprechender Software (alle Komponenten von Leica). Mit dem Computerprogramm Leica-QFISH werden pro Hybridisierung 10 bis 15 geeignete Metaphasen mit den Fluoreszenzfiltern DAPI, FITC und Cy 3.5 fotografiert und in digitalisierten Bilderserien abgespeichert. Die Chromosomen dieser Bilderserien können mit Hilfe der Software Leica-QCGH in ein Chromosomenschema sortiert werden. Die Software vergleicht darauf nach Normalisierung die entlang jedes Chromosoms integrierte Fluoreszenzintensität der beiden relevanten Kanäle (FITC für Test-DNA und Cy 3.5 für Referenz-DNA). Das durchschnittliche Verhältnis aller ausgewerteten Metaphasen einer Hybridisierung wird grafisch in einem CGH-Profil für die getestete Probe dargestellt. Bei einem Fluoreszenzverhältnis von FITC zu Cy 3.5 über 1,25 liegt ein Gewinn, bei einem Verhältnis unter 0,75 ein Verlust des entsprechenden Chromosomenabschnitts vor.

2.2.12 Statistische Berechnungen

Mit dem Student's T-Test wird überprüft, ob sich die Mittelwerte aus zwei normalverteilten Kollektiven unterscheiden. Der Chi-Quadrat-Test wurde angewandt, wenn zwei Kollektive in Bezug auf eine Eigenschaft verglichen werden sollten. Für Kollektive mit geringen Stichprobengrößen wurde stattdessen auf den Fisher's Exact Test zurückgegriffen. Der McNemar-Test wurde beim Vergleich von zwei verbundenen Stichproben angewendet. Mit dem Wilcoxon Rangsummentest wurden zwei verbundene Stichproben und mit dem Kruskal-Wallis Rangsummentest drei unverbundenen Stichproben miteinander verglichen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Testverfahren wurden mit Programmen durchgeführt, die im Internet kostenfrei zur Verfügung gestellt werden (Internetlink: <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>).

Der Kontingenzkoeffizient zum Test der Unabhängigkeit zweier Ereignisse wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 12.0 für Windows durchgeführt.

2.2.13 Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse

Die hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der CGH-Datensätze erfolgte mit Hilfe der kostenfrei auf der Internetseite <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm> erhältlichen Cluster und TreeView Software (Eisen, Spellman et al. 1998). Die angelegten CGH-Daten werden dafür in eine Microsoft-Excel-Tabelle eingetragen, die dann als Textdatei gespeichert werden muss (*.txt Dateiextension). Gewinne und Verluste der einzelnen Chromosomenregionen werden dabei mit einem Zahlenwert ausgedrückt (+3 Gewinn, 0 keine Veränderung, -3 Verlust). Die auf diese Weise generierte Datei kann in das Cluster-Programm eingelesen werden und die Daten nach der Linkage-Clustering-Methode gruppiert werden. Das Ergebnis der hierarchischen Gliederung der Daten kann in TreeView sichtbar gemacht werden, wobei Gewinnen (+3) die Farbe grün und Verlusten (-3) die Farbe rot zugeordnet wird. Gleichzeitig wird zu den Daten ein Dendrogramm angelegt, wobei der Abstand zu den am nächsten stehenden Knotenpunkten die Ähnlichkeit zwischen zwei Proben angibt. Im Dendrogramm benachbarte Datensätze sind sich also besonders ähnlich, wobei diese Vereinfachung nicht an den Grenzen übergeordneter Bäumchen gilt.

In vielen Arbeiten mit der CGH werden die Chromosomen des untersuchten Organismus für biomathematische Analysen lediglich in die beiden Chromosomenarme geteilt. Um gerade auf den größeren Chromosomen keine wichtige Information zu verlieren, wurde in dieser Arbeit ein anderer Ansatz gewählt. Die einzelnen Chromosomen wurden in dieser Dissertation in möglichst kleine Abschnitte unterteilt. Auf diesem Weg konnten Fehler bei den Verwandtschaftsanalysen verhindert werden, da zum Beispiel eine Deletion am proximalen Ende eines Chromosomenarms nicht mit einer am distalen Ende gleichgesetzt wurde. Die Aufteilung der einzelnen Chromosomen in definierte Regionen ist in einer Tabelle im Anhang aufgeführt.

2.3 Verwendete Materialien

Enzyme und Antikörper

3B10.....	Micromet, München
A45-B/B3.....	Micromet, München
Anti-DIG-Flourescein.....	Roche, Mannheim
Anti-Mouse-Cy3.....	Dianova, Hamburg
APAAP.....	Dako, Hamburg
Avidin-Cy3.5.....	Rockland, Gilbertsville, USA
Biotin-16-dUTP.....	Roche, Mannheim
DNA-Polymerase I (<i>E. coli</i>).....	New England Biolabs, Frankfurt
DNase I.....	New England Biolabs, Frankfurt
Epimet-Kit.....	Micromet, München
ELF-97 Kit.....	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Expand Long Template.....	Roche, Mannheim

MOPC 21.....	Sigma, Deisenhofen
Mse I 50 U/µl.....	New England Biolabs, Frankfurt
Pepsin.....	Roche, Mannheim
Proteinase K.....	Roche, Mannheim
RNase A.....	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase.....	Roche, Mannheim
Panscript Taq-Polymerase.....	PAN Biotech, Aidenbach
Tru I.....	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Z259.....	Dako, Hamburg

Chemikalien

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

Natriumhydroxid-Plätzchen.....	Merck, Darmstadt
OPA Plus.....	Amersham Biosciences, Freiburg
Orange G.....	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd.....	Merck, Darmstadt
PCR-Öl.....	Sigma, Deisenhofen
Penicillin.....	Sigma, Deisenhofen
Pepton.....	Sigma, Deisenhofen
Percoll 50.....	Amersham Biosciences, Freiburg
Phytohämaglutinin M-From.....	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol/Chloroform.....	Roth, Karlsruhe
Repel-Silan.....	Amersham Biosciences, Freiburg
RPMI ohne L-Glutamin.....	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend).....	Merck, Darmstadt
SDS.....	Sigma, Deisenhofen
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
Xylencyanol.....	Sigma, Deisenhofen
Xylol.....	Roth, Karlsruhe

Oligonukleotide und Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma metabion in München synthetisiert

LIB1.....	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
ddMseI 1.....	TAA CTG ACA G-dideoxy C
p53 Exon 2/3 5'.....	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC
p53 Exon 2/3 3'.....	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA
p53 Exon 8/9 5'.....	GTG CAG TTA TGC CTC AGA TTC
p53 Exon 8/9 3'.....	GAA TCT GAG GCA TAA CTG CAC
Zytokeratin CK 19 5'.....	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C
Zytokeratin CK 19 3'.....	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG
D5S500 5'.....	CTT TTT ACA TTT TTG GTA CCT TG
D5S500 3'.....	GTA TCG GTG AAA TGC AAC TA
D16S485 5'.....	AGT AAT AAT GTA CCT GGT ACC
D16S485 3'.....	AGG CAA TTT GTT ACA GAG CC

Puffer

PBS (Phosphatbuffer-Saline):	Na ₂ HPO ₄	8,5 mM
	KH ₂ PO ₄	2 mM
	NaCl	150 mM
	pH	7,4
SSC (Saline-Sodiumcitrat):	NaCitrat	15 mM
	NaCl	150 mM
	pH	7,4
TBE (Tris-Borat-EDTA Puffer):	Tris	89 mM
	Borat	89 mM
	EDTA	2 mM
	pH	8,3
TBS (Tris-Buffer-Saline):	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	pH	7,6

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
Kryotom.....	Leica Jung Frigocut 2800 E
Lasermikroskop.....	P.A.L.M., Bernried
Mikromanipulator.....	Microinjector 5242, Eppendorf
Mikrotom.....	Leica RM 2025
MJR PCR-Maschine.....	Peltier Thermal Cycler PTC-200
Spannungsquelle (Agarose-Gel).....	EPS 200, Pharmacia Biotech
Thermoprinter.....	Sony
UV-Schirm.....	INTAS
Wasserbad.....	Lauda

Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen.....	Langenbrinck
Falcon.....	Sarsted
Glas-Küvetten.....	Roth
Haft-Objektträger.....	Micromet
Kulturflaschen (Cellstar).....	Greiner
Objektträger (Mattrand).....	Langenbrinck
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 Verwendete 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.

A.....	Adenin
APAAP.....	Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase
BCIP.....	5-Bromo-4-chloroindol-3-ol Dihydrogenphosphatester Mono-p-toluidiniumsalz
bp.....	Basenpaar
BR.....	biochemisches Rezidiv
C.....	Cytosin
CGH.....	comparative genomic hybridization
CK.....	Zytokeratin
CT.....	Computertomographie
DAPI.....	4',6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DHT.....	Dihydroxytestosteron
DNA.....	Desoxyribonucleinsäure
Dig.....	Digoxigenin
dNTP.....	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DRU.....	digitale reaktale Untersuchung

DTT.....	1,4-Dithiothreitol
ELF.....	enzyme-labeled fluorescence
EpCAM.....	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FCS.....	fötales Kälberserum
FITC.....	Fluorescein
G.....	Guanin
g.....	Beschleunigung
KM.....	Knochenmark
LOH.....	loss of heterozygosity
mAk.....	monoklonaler Antikörper
MOPC.....	Mouse Oocyte Plasmocytom
MRD.....	minimal residuale Krebserkrankung
mRNA.....	messenger Ribonucleinsäure
MRT.....	Magnet-Resonanz-Tomographie
NBT.....	p-Nitroblue-tetrazoliumchlorid
n.b.....	nicht bekannt
n.s.....	nicht signifikant
PBS.....	Phosphatbuffer-Saline
PCR.....	Polymerase Kettenreaktion
PFA.....	Paraformaldehyd
PHA.....	Phytohämagglutinin
PSA.....	Prostata-spezifisches Antigen
RNA.....	Ribonucleinsäure
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
SSC.....	Salins-Sodiumcitrat
TBE.....	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS.....	Tris-Buffer-Saline
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)
TRUS.....	transrektaler Ultraschall
T.....	Thymin
Upm.....	Umdrehungen pro Minute
WHO.....	World Health Organization

3 Ergebnisse

3.1 Immunzytochemischer Nachweis disseminierter Tumorzellen

In dieser Arbeit wurden verschiedene immunzytochemische Färbungen von Knochenmarkpunktaten gegen die beiden epithelialen Marker Zytokeratin (CK) und EpCAM durchgeführt. Um das Lesen des folgenden Ergebnisteils zu erleichtern, gibt Tabelle 6 die Anzahl der in die Auswertung eingehenden untersuchten Präparate für die verschiedenen Färbungen an. Die Präparate sind nach dem klinischen Stadium der Patienten zum Zeitpunkt der Punktion eingeteilt. Dadurch entstehen die drei Gruppen M0 (keine Fernmetastasen nachweisbar), BR (keine Fernmetastasen nachweisbar, biochemisches Rezidiv durch postoperativen PSA-Anstieg) und M1 (Fernmetastasen, meist im Skelettszintigramm nachweisbar). Die Verteilung der einzelnen Patienten auf die drei Gruppen ist für die Kollektive der immunzytochemischen Färbungen sehr ähnlich (Tabelle 6, Chi-Quadrat, $df=8$, $p>0,9$). Von einigen Patienten war das klinische Stadium leider nicht ermittelbar. Im Anschluss werden die Ergebnisse der verschiedenen Experimente einzeln dargestellt. Abbildung 3 zeigt in einem Schema die Weiterbehandlung und Aufteilung der Aspirate für die einzelnen Färbungen.

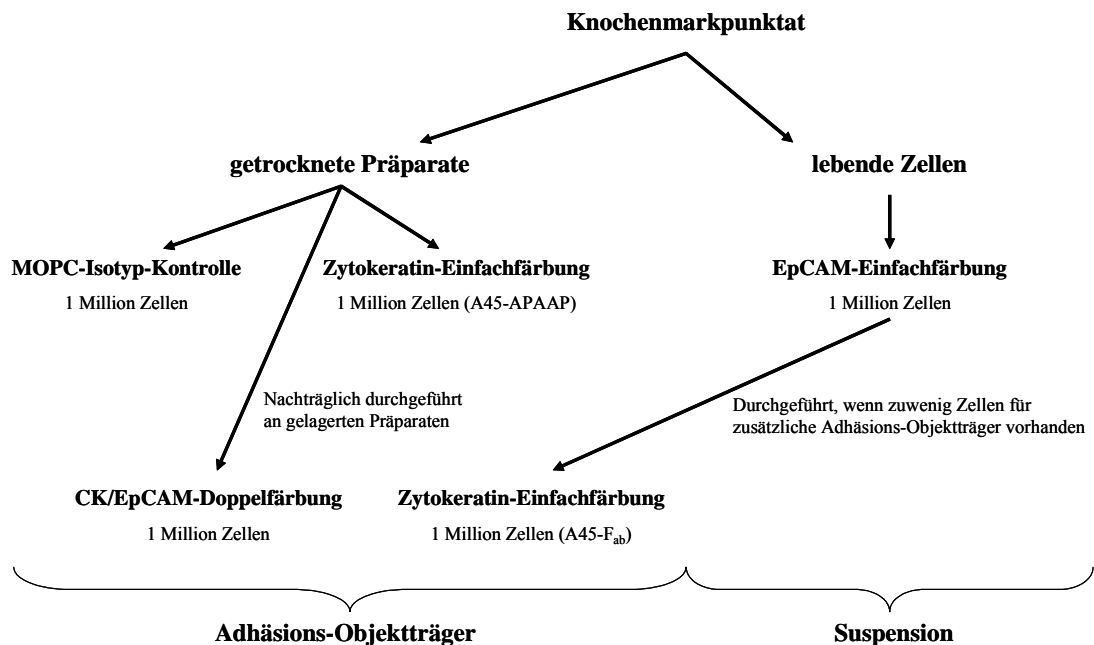


Abbildung 3 Aufteilung der gewonnenen Zellen auf die durchgeführten Färbungen

Die Abbildung gibt einen schematischen Überblick der Aufteilung der durch den Percoll-Gradienten gewonnenen Zellen auf die durchgeführten Färbungen. Wenn weniger als 2 Millionen Zellen zur Verfügung standen, mussten die Zellen der EpCAM-Färbung nachträglich auf Adhäsions-Objekträger gegeben und mit dem A45-F_{ab}-Fragment gefärbt werden.

Tabelle 6 Immunzytochemisch untersuchte Knochenmarkpunktate

	M0	BR	M1	n.b.*	
CK-Einfachfärbung	428 (64,8%)	160 (24,2%)	37 (5,6%)	35 (5,3%)	Unterschied zwischen den Färbungen n.s. (Chi-Quadrat)
EpCAM-Einfachfärbung	208 (63,4%)	74 (22,6%)	24 (7,3%)	22 (6,7%)	
Beide Einfachfärbungen	185 (62,1%)	69 (23,2%)	22 (7,4%)	22 (7,4%)	
CK/EpCAM Doppelfärbung	54 (70,1%)	18 (23,4%)	5 (6,5%)	---	
Gesamt	466 (65,4%)	171 (24,0%)	40 (5,6%)	36 (5,0%)	

* *klinisches Stadium nicht bekannt*

3.1.1 Zytokeratin-Färbung disseminierter Tumorzellen

Disseminierte Tumorzellen liegen im Knochenmark von Krebspatienten in einer sehr niedrigen Frequenz vor. Um den Nachweis der seltenen Zellen zu ermöglichen, wird das Knochenmarkspirat zunächst durch eine Percoll-dichtegradienten-Zentrifugation angereichert. Die mononukleären Zellen, zu denen auch die Tumorzellen zählen, werden dabei durch ein Medium mit einer Dichte von 1,065 g/ml von den Erythrozyten und Granulozyten getrennt (Klein 1997). Aus der so gewonnenen Fraktion wurden je 1 Million Zellen reversibel auf einem Adhäsions-Objektträger gebunden, um eine spätere Isolation der Zellen durch Mikromanipulation zu ermöglichen.

Der an ein gemeinsames Epitop der zytoplasmatischen Zytokeratine 8, 18 und 19 bindende murine monoklonale Antikörper A45-B/B3 wurde zur Detektion der disseminierten Tumorzellen verwendet. Bei dem Großteil der Präparate wurde ein Komplex aus Alkalischer Phosphatase und einem Antikörper gegen eben dieses Enzym über einen Brückenantikörper an den Zytokeratin-Antikörper gebunden. Dieser APAAP-Komplex (Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase) kann dann über eine Substrat-Farbstoff-Reaktion sichtbar gemacht werden. Bei der Entwicklung der Färbung wurde auf das BCIP/NBT-System zurückgegriffen, da mit anderen Substraten die DNA geschädigt wird. Abbildung 4 zeigt eine CK-positive Zelle neben ungefärbten Zellen mesenchymalen Ursprungs im Knochenmark.

Bei einem Teil der Patienten wurde neben der A45-B/B3-Färbung auch eine Färbung gegen EpCAM mit dem Maus-Antikörper 3B10 durchgeführt (siehe 3.1.2). Wenn möglich wurden für beide Antigene je eine Million mononukleäre Zellen gefärbt. Bei Punktaten, die nur eine sehr geringe Anzahl an Zellen aufwiesen, mussten die Zellen sowohl für die Färbung gegen EpCAM,

als auch für die Zytokeratin-Färbung verwendet werden. Bei diesen Knochenmarkaspiraten konnte nicht nach der APAAP-Methode verfahren werden, da der Brückenantikörper beide Primärantikörper aus der Maus erkannt hätte. In diesen Fällen wurde deswegen auf einen direkt mit Alkalischer Phosphatase konjugierten A45-Antikörper (A45-F_{ab}) zurückgegriffen.

Insgesamt wurden 713 Präparate von 390 Patienten mit dem Zytokeratin-Antikörper gefärbt. Dabei wurden von einigen Patienten mehrere Knochenmarkpunktate von bis zu fünf verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation untersucht. Parallel zur Färbung mit dem A45-Antikörper gegen Zytokeratin wurde bei jedem Patienten mit mehr als 1 Million Zellen im Knochenmarkaspirat eine Isotyp-Kontrolle mit MOPC21 durchgeführt. Insgesamt wiesen 53 von 586 getesteten Präparaten (9,0%) positive Zellen in der Isotyp-Kontrolle auf, so dass diese Präparate für die Ergebnisse ausgeschlossen wurden. Bei den 127 Präparaten, die mit dem F_{ab}-Fragment gefärbt wurden, war die Färbung gegen MOPC21 nicht möglich, da durch die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation weniger als eine Million Zellen aus dem Knochenmark isoliert werden konnten. In zwei Studien an 238 mit dem Direktkonjugat gefärbten Präparaten konnte in keinem Fall eine falsch positive Zelle detektiert werden (Leinung, Wurl et al. 2000; Schmidt-Kittler 2003), weshalb A45-F_{ab}-positive Proben auch ohne Negativkontrolle als spezifisch gefärbt gewertet wurden. Letztlich konnten 660 Punktate, die immunzytochemisch gegen Zytokeratin gefärbt wurden, ausgewertet werden.



Abbildung 4 Zytokeratin-positive Zelle im Knochenmark

Neben ungefärbten Normalzellen erkennt man in der Mitte des Bildes eine über das APAAP-System mit dem Antikörper A45-B/B3 angefarbte Zytokeratin-positive Zelle. Die Expression der Zytokeratine ist randständig, die Kernregion bleibt in der Färbung ausgespart.

Mehrere Punktionen eines Patienten können als unabhängige Ereignisse gewertet werden

Die 660 bewerteten Präparate stammen von 378 Patienten. Insgesamt gingen von einem Patienten 5 Punktate, von 20/378 Patienten jeweils 4 Punktate, von 59/378 Patienten jeweils 3 Punktate, von 103/378 Patienten jeweils 2 Punktate und von 195/378 nur 1 Knochenmarkpunktat in die Auswertung mit ein. Da ein Vergleich zwischen den Patienten deswegen nur schwer möglich war, sollte zunächst die Unabhängigkeit des Ergebnisses einer Punktion (1=positiv und 0=negativ) von den Ergebnissen der anderen Punktionen eines Patienten überprüft werden. Ein statistisches Testverfahren für diese Fragestellung stellt der Kontingenzkoeffizient dar, über den sich eine Wahrscheinlichkeit für die Korrelation zwischen zwei Ereignissen berechnen lässt. Für die 103 Patienten mit zwei untersuchten Punktionen ergibt das zum Beispiel die möglichen Kombinationen 0-0 (63 Patienten), 1-0 (14 Patienten), 0-1 (22 Patienten) und 1-1 (4 Patienten). Der errechnete Kontingenzkoeffizient r beträgt für dieses Kollektiv 0,032 und die Wahrscheinlichkeit für einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der beiden Punktionen bei $p=0,745$. Auch für drei und vier Punktionen eines Patienten ergab sich in der statistischen Berechnung des Kontingenzkoeffizienten kein Hinweis auf eine Abhängigkeit zwischen den einzelnen Ereignissen. Es wurde daher von einer Unabhängigkeit der Ergebnisse mehrerer Punktionen von einem Patienten ausgegangen und jede der 660 Punktionen als separates Ereignis definiert.

Frequenz Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark

Insgesamt fanden sich bei den 660 in die Auswertung eingehenden Proben in 142 Fällen (21,5%) Zytokeratin-positivem Zellen im Knochenmark der Krebspatienten. Teilt man die Punktate nach dem zum Zeitpunkt der Abnahme bestehenden Krankheitsstadium in die drei Gruppen M0, BR und M1 ein, so zeigen sich teilweise deutliche Unterschiede. Eine Zuordnung in die einzelnen Gruppen anhand der klinischen Verlaufsdaten war in 624 Fällen möglich. Die Verteilung der Punktate auf die drei klinischen Stadien, sowie relative und absolute Häufigkeit der Zytokeratin-positiven Zellen ist aus Tabelle 8 ersichtlich. Deutlich sichtbar ist hierbei, dass die Rate positiver Aspirate bei Patienten mit Fernmetastasen signifikant höher als in den beiden anderen Gruppen ist ($p<0,01$ bzw. $p<0,05$ im Chi-Quadrat-Test).

Tabelle 8 Anzahl der Zytokeratin-positiven (CK-positiven) Knochenmarkaspirate in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

	Gesamtzahl Aspirate	CK-positive Aspirate	
M0-Stadium	428	84 (19,6%)	M0 gegen BR: n.s. (p=0,66; Chi-Quadrat)
BR-Stadium	160	34 (21,3%)	M0 gegen M1: p < 0,01 (Chi-Quadrat)
M1-Stadium	37	14 (37,8%)	BR gegen M1: p < 0,05 (Chi-Quadrat)
Alle Punktate	660	142 (21,5%)	

Auch die Anzahl an CK-positiven Zellen je einer Million untersuchter Zellen aus dem Knochenmark war bei positiven Punktaten der Gruppe M1 höher als bei den beiden anderen Kollektiven, wenn auch nicht signifikant (Abbildung 6). So fanden sich in den 34 positiven Punktaten der Gruppe BR zwischen einer und acht Zytokeratin exprimierende Zellen, und auch in den 84 M0-Aspiraten gab es lediglich zwei Proben mit mehr als 6 positiven Zellen (18 und 40). Von den 14 positiven M1-Präparaten wiesen immerhin vier über 100 CK-positive Zellen auf. Bei diesen Aspiraten wurde die tatsächliche Anzahl nicht mehr ausgezählt, sondern mit den Werten 100 und dreimal 500 nur geschätzt. Tatsächlich waren jeweils deutlich mehr Zytokeratin-positive Zellen im Aspirat zu finden, so dass der Unterschied zwischen den Gruppen M0/BR und M1 nicht fälschlicherweise überschätzt wurde.

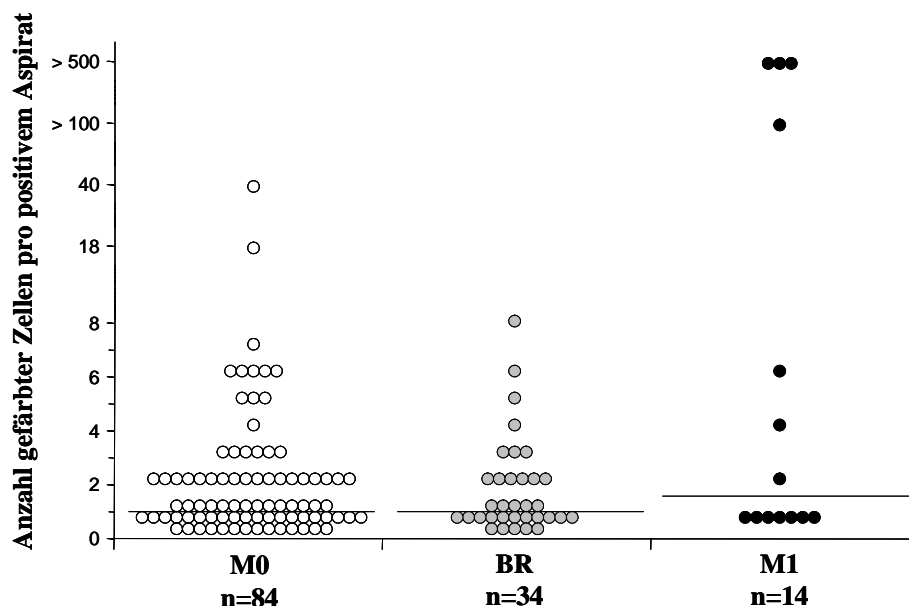


Abbildung 6 Anzahl der gegen Zytokeratin gefärbten Zellen pro positivem Knochenmarkaspirat in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Aufgetragen ist die Anzahl der gefärbten Zellen für die drei klinischen Stadien M0, BR und M1. Jeder Kreis symbolisiert ein Punktate mit Zytokeratin-positiven Zelle. Der Median der positiven Zellen war für die Stadien M0 und BR bei 1, für das Stadium M1 bei 1,5 (Querlinien). Im Kruskal-Wallis Rangsummentest für drei unverbundene Stichproben zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Ein kleiner Teil der untersuchten Knochenmarkaspirate wurde nicht im Rahmen der Nachsorge, sondern direkt zum Zeitpunkt der Operation abgenommen. Bei Präparaten von Patienten im Stadium M0 waren dies 29/428 und bei Patienten im Stadium M1 6/37. Da das Stadium BR durch einen postoperativen PSA-Anstieg definiert ist, gibt es keine Präparate aus diesem Stadium bei der Analyse, ob der Aspirationszeitpunkt einen Einfluss auf die Häufigkeit CK-positiver Zellen im Knochenmark hat. Es fand sich kein Unterschied in der Frequenz Zytokeratin-positiver Zellen für beide klinischen Stadien (Tabelle 9).

Tabelle 9 Anzahl der Zytokeratin-positiven (CK-positiven) Knochenmarkaspirate in Abhängigkeit von Krankheitsstadium und Punktionszeitpunkt

	Positive Punktionen zum Zeitpunkt der Operation	Positive Punktionen während der Nachsorge	
M0-Stadium	5/29 (17,2%)	79/399 (19,8%)	Unterschied n.s. (p=0,74; Chi-Quadrat)
M1-Stadium	2/6 (33,3%)	12/31 (38,7%)	Unterschied n.s. (p=0,59; Fisher Exact)
Alle Punktionen	7/35 (20,0%)	91/430 (21,2%)	

3.1.2 EpCAM-Färbung disseminierter Tumorzellen

Um eine Aussage zur Detektion disseminierter Tumorzellen mit anderen epithelialen Markerproteinen machen zu können, wurden 298 Knochenmarkpunktate zusätzlich zur Zytokeratin-Färbung mit einem Antikörper gegen das epitheliale Oberflächenmolekül EpCAM gefärbt (Antikörper 3B10). Eine EpCAM-positive Zelle wird hierbei mit der indirekten Immunfluoreszenz (Anti-Maus-Cy3) sichtbar gemacht (Abbildung 7). Die Tumorzellen wurden bereits am Tag der Punktion isoliert und verarbeitet. Die EpCAM-Färbung wurde an insgesamt 248 Patienten durchgeführt, von denen in 50 Fällen zwei Punktionen gefärbt wurden. Auch für diese Patienten wurde die Unabhängigkeit mehrerer Punktionen belegt (Kontingenzkoeffizient $r=0,141$; $p=0,315$)

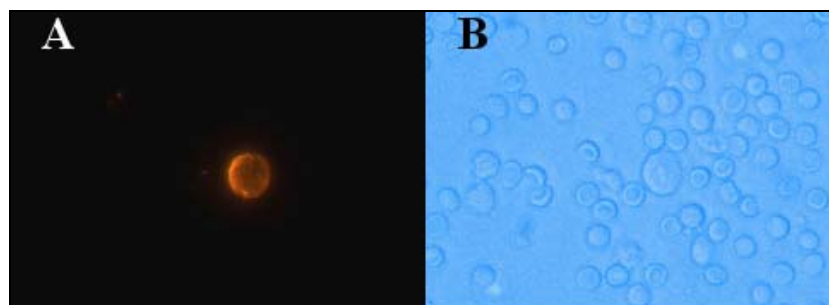


Abbildung 7 EpCAM-positive Zelle im Knochenmark

A Rötlich fluoreszierende Zelle im Knochenmark eines Patienten nach der Färbung mit dem Cy3-gekoppelten Antikörper 3B10 gegen EpCAM. B An der gleichen Position erkennt man die morphologisch etwas größere Zelle neben zahlreichen kleineren Knochenmarkszellen auch in der Durchlicht-Mikroskopie.

Frequenz EpCAM-positiver Zellen im Knochenmark

Insgesamt fanden sich in 58/298 (19,5%) Präparaten Zytokeratin-positive Zellen und in 34/298 (11,4%) EpCAM-positive Zellen. Die Häufigkeit positiver Aspire und die Verteilung der Präparate auf die klinischen Stadien für die beiden untersuchten Moleküle sind in Tabelle 10 wiedergegeben. Die im Stadium M0 mit 16,8% etwas niedrigere Frequenz Zytokeratin-positiver Zellen im Vergleich zum Gesamtkollektiv (21,5%), wird statistisch nicht signifikant ($p=0,40$; Chi-Quadrat). Im Stadium M0 werden signifikant häufiger Zytokeratin-positive Zellen als EpCAM-positive Zellen gefunden ($p<0,02$, Chi-Quadrat), während sich die Färbungen in den beiden anderen Stadien nicht unterscheiden. Die Frequenz EpCAM-positiver Zellen ist im Stadium M1 signifikant höher als in den beiden anderen klinischen Stadien (Tabelle 10).

Tabelle 10 Zytokeratin- und EpCAM-positive Knochenmarkaspirate in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

	CK-Färbung	EpCAM-Färbung	Unterschiede zwischen den Stadien für die EpCAM-Färbung
M0-Stadium	31/185 (16,8%)	15/185 (8,1%)	M0 gegen BR n.s. ($p=0,33$; Chi-Quadrat)
BR-Stadium	15/69 (21,7%)	9/69 (13,0%)	M0 gegen M1 $p<0,0005$ (Chi-Quadrat)
M1-Stadium	7/22 (31,8%)	8/22 (36,4%)	BR gegen M1 $p<0,05$ (Chi-Quadrat)
Alle Punktionen	58/298 (19,5%)	34/298 (11,4%)	

Unterschiede zwischen den Färbungen
 Stadium M0 $p<0,02$ (Chi-Quadrat)
 Stadium BR und M1 n.s. (Chi-Quadrat)

Betrachtet man die Anzahl an EpCAM-exprimierenden Zellen in den positiven Punktaten, so zeigt sich ein ähnliches Bild wie für die Zytokeratin-Färbung (Abbildung 8). EpCAM-positive Punktate von Patienten im klinischen Stadium M1 weisen auf 1 Million Knochenmarkzellen mehr EpCAM-exprimierende Zellen auf (Median 3), als die der beiden anderen Stadien (M0: Median 1; BR: Median 2). Aufgrund der geringen Anzahl der M1-Aspirate ist dieser Unterschied nicht signifikant.

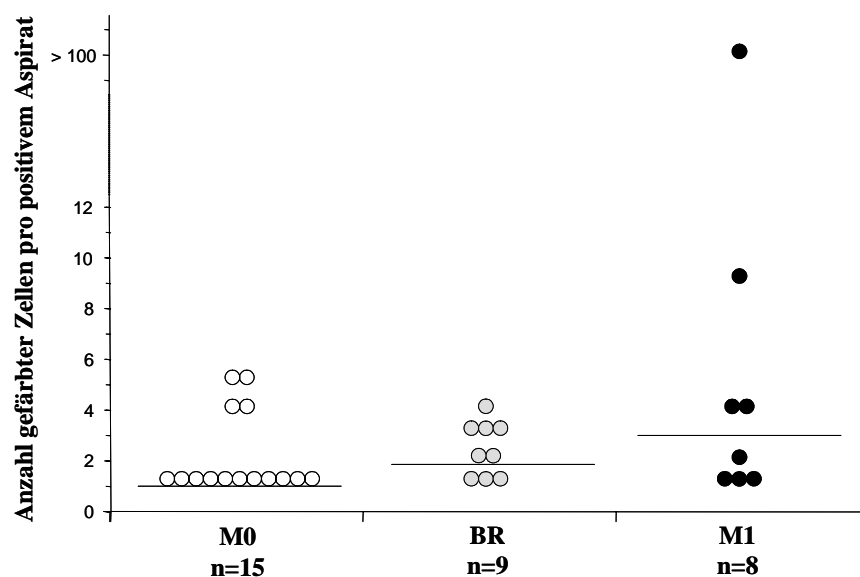


Abbildung 8 Anzahl der gegen EpCAM gefärbten Zellen pro positivem Knochenmarkaspirat in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Aufgetragen ist die Anzahl der gefärbten Zellen für die drei klinischen Stadien M0, BR und M1. Jeder Kreis symbolisiert ein Punktat mit EpCAM-positiven Zelle. Der Median der positiven Zellen war für das Stadium M0 bei 1, für BR bei 2 und für das Stadium M1 bei 3 (Querlinien). Im Kruskal-Wallis Rangsummentest für drei unverbundene Stichproben zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Auch von den gegen EpCAM gefärbten Präparaten wurden nicht alle im Rahmen der Nachsorge gewonnen. So wurden 23/208 Punktationen aus dem Stadium M0 und 6/24 Punktationen aus dem Stadium M1 zum Zeitpunkt der Operation abgenommen (Tabelle 11). Wie bei der Färbung gegen Zytokeratin zeigte sich für die einzelnen Stadien kein signifikanter Unterschied zwischen der Frequenz positiver Präparate, die zum Zeitpunkt der Operation und solchen, die im Rahmen der Nachsorge gewonnen wurden. Die Auswertung für das klinische Stadium M0 zeigte allerdings eine deutliche Tendenz zu einem häufigeren Auftreten EpCAM-positiver Zellen zum Zeitpunkt der Operation (Chi-Quadrat, $p=0,13$).

Tabelle 11 Anzahl der EpCAM-positiven Knochenmarkaspirate in Abhängigkeit von Krankheitsstadium und Punktionszeitpunkt

	Positive Punktationen zum Zeitpunkt der Operation	Positive Punktationen während der Nachsorge	
M0-Stadium	4/21 (19,0%)	11/164 (6,7%)	Unterschied n.s. ($p=0,13$; Chi-Quadrat)
M1-Stadium	3/6 (50,0%)	5/18 (27,8%)	Unterschied n.s. ($p=0,62$; Fisher Exact)
Alle Punktationen	8/29 (27,5%)	19/203 (9,4%)	

Vergleich zwischen Zytokeratin- und EpCAM-Einfachfärbung

Betrachtet man die Ergebnisse der Einfachfärbungen gegen Zytokeratin und EpCAM, so fällt auf, dass nur in 9/298 Aspiraten (3,0%) Zellen in beiden Färbungen einer individuellen KM-Probe detektiert werden konnten. Es weist demnach nur ein sehr geringer Prozentsatz der Aspire aus allen drei Krankheitsstadien in beiden Einfachfärbungen positive Zellen auf (Abbildung 9). Wenn man nur die Knochenmarkaspirate vergleicht, die in einer der beiden durchgeführten Färbungen positive Zellen zeigten, erkennt man einen mit dem Krankheitsprogress steigenden relativen Anteil der nur EpCAM-positiven Proben. Den gleichen Effekt sieht man bei den doppelt positiven Punktaten, während der relative Anteil der lediglich Zytokeratin-positiven Präparate stetig abnimmt (Abbildung 10).

Diese Ergebnisse deuten auf mindestens zwei unterschiedliche Populationen von disseminierten Tumorzellen hin: Zellen, die Zytokeratin exprimieren, aber negativ für EpCAM sind und Zellen, die EpCAM exprimieren ohne dabei Zytokeratin aufzuweisen. Denkbar sind außerdem Subpopulationen an Tumorzellen, bei der beide Proteine oder keiner der beiden epithelialen Marker nachgewiesen werden können.

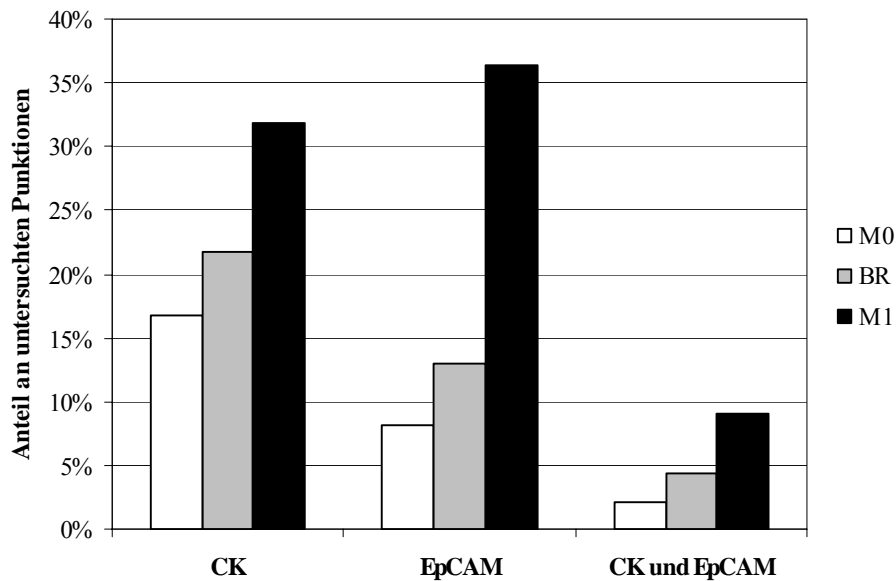


Abbildung 9 Relativer Anteil Zytokeratin- und EpCAM-positiver Knochenmarkpunktionen

Die Abbildung zeigt den relativen Anteil der positiven Punktationen für die beiden durchgeführten Einfachfärbungen gegen Zytokeratin und EpCAM, sowie die relative Häufigkeit von Präparaten, die in beiden Färbungen Zellen aufwiesen. Man sieht in allen drei Kategorien einen Anstieg der Nachweisrate mit fortschreitendem Krankheitsstadium.

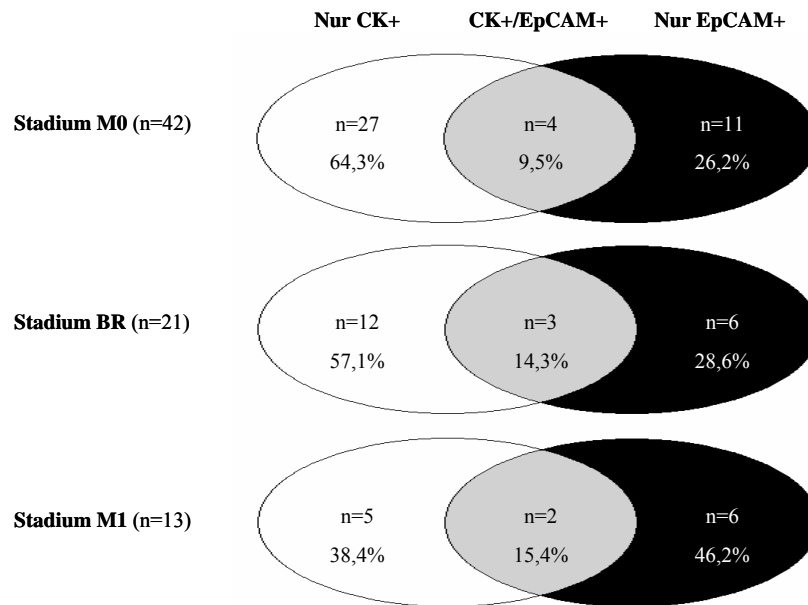


Abbildung 10 Relativer Anteil der Zytokeratin und EpCAM-gefärbten an allen positiven Präparaten

Die Grafik gibt den relativen Anteil von Punktationen an, in denen nur Zytokeratin- (weiß) bzw. nur EpCAM-positive (schwarz) oder beide Zelltypen (grau) gefunden wurden. Die Zahlen für die 3 Stadien M0, BR und M1 geben den prozentualen Anteil der Gruppen an allen positiven Präparaten wieder. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zeigten im Chi-Quadrat-Test keine Signifikanz (M0 gegen BR $p=0,81$, M0 gegen M1 $p=0,26$, BR gegen M1 $p=0,53$).

3.1.3 Doppelfärbung gegen Zytokeratin und EpCAM

Wie beschrieben zeigte sich in den immunzytochemischen Einfachfärbungen, dass zahlreiche Patienten nur in einer der beiden Färbungen gegen epitheliale Marker positive Zellen aufweisen. Nur wenige Aspirate waren in beiden Färbungen positiv. Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch die Färbungen unterschiedliche Subpopulationen an disseminierten Tumorzellen entdeckt werden. Um diese Hypothese zu bestätigen und die disseminierten Tumorzellen im Knochenmark weiter zu charakterisieren wurde eine Doppelfärbung gegen Zytokeratin und EpCAM verwendet. Dabei wurden die gleichen Primärantikörper wie bei den Einfachfärbungen eingesetzt (A45-B/B3 bzw. 3B10), die anschließend mit Fluorochromen sichtbar gemacht wurden. Bei der Doppelfärbung wurden der Panzytokeratin-Antikörper durch Cy3 und der EpCAM-Antikörper durch den ELF-Komplex visualisiert (Abbildung 11).

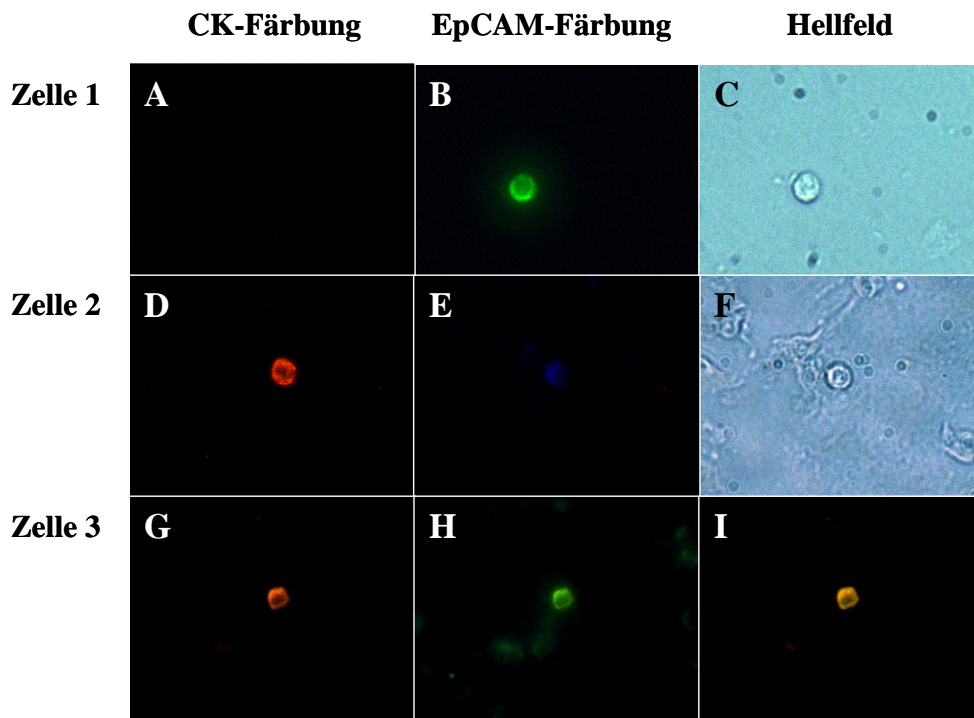


Abbildung 11 Zytokeratin/EpCAM-Doppelfärbung von Knochenmark

Jede Zeile stellt exemplarisch eine Zelle der drei Subpopulationen dar, die mit der EpCAM/Zytokeratin-Doppelfärbung detektiert werden können. **A bis C EpCAM+/Zytokeratin-**: Die gleiche Zelle ist im Hellfeld (C) und als gelbgrün fluoreszierende Zelle in der ELF-Fluoreszenzfärbung gegen EpCAM (B) zu sehen. Mit dem Fluoreszenz-Filter für Cy3 (Zytokeratin-Färbung) ist sie dagegen nicht zu erkennen. **D bis F EpCAM-/Zytokeratin+**: Die im Hellfeld (F) morphologisch beurteilbare Zelle leuchtet im Cy3-Filterorangerot durch die Fluoreszenzfärbung gegen Zytokeratin (D). Im Filter für ELF zeigt sich lediglich ein bläulicher Schatten, der die Eigenfluoreszenz des Reagens symbolisiert. **G bis H EpCAM+/Zytokeratin+**: Die gleiche Zelle ist positiv in der Färbung gegen Zytokeratin (G) und EpCAM (H). In Bild (I) wurden die beiden Fluoreszenzbilder digital überlagert.

Die verwendeten Patientenpräparate wurden zufällig aus den verschiedenen Tumorstadien (M0, BR, M1) ausgesucht und dann gefärbt. Wie Tabelle 6 am Anfang des Kapitels zeigte, ist die relative Häufigkeit der drei klinischen Stadien in etwa mit der bei den Einfachfärbungen vergleichbar. Insgesamt wurden Knochenmarkpräparate von 77 Patienten untersucht, von denen in 23/77 (29,9%) Zellen gegen mindestens einen der beiden epithelialen Marker gefärbt waren. Tabelle 12 zeigt wie häufig die einzelnen Zellsubpopulationen im Knochenmark gefunden werden konnten und stellt die Ergebnisse der Doppelfärbung den am größeren Kollektiv durchgeführten Einfachfärbungen gegenüber. Dabei zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Analysen.

Betrachtet man die einzelne gefärbte Zelle, so findet man tatsächlich alle drei durch die Doppelfärbung möglichen Subpopulationen: Zytokeratin-einfachpositive, EpCAM-einfachpositive und doppeltpositive disseminierte Tumorzellen. Sehr interessant dabei ist, dass zwei der M1-

Patienten Zellen aus verschiedenen Subpopulationen aufweisen. So wies ein Patient neben zahlreichen Zytokeratin-positiven Zellen auch zwei Zellen auf, die nur gegen EpCAM gefärbt waren. In einer Probe fand sich je eine Zelle bei der nur Zytokeratin, und eine andere bei der beide epithelialen Marker exprimiert wurden. Mögliche biologische Unterschiede dieser unterschiedlichen Zellpopulationen sollten durch die Analyse der genomischen Veränderungen geklärt werden.

Tabelle 12 Vergleich der Positivitätsrate für Zytokeratin (CK) und EpCAM zwischen Punktaten, die mit den Einzelfärbungen bzw. der Doppelfärbung untersucht wurden.

	Einzel-färbungen	Doppel-färbung	
untersuchte Punktate	298	77	
nur CK	49 (16,5%)	11 (14,3%)	Unterschiede nicht signifikant (Chi-Quadrat)
nur EpCAM	25 (8,4%)	6 (7,8%)	
beide Marker	9 (3,0%)	6 (7,8%)	
Summe positiver Punktate	83 (27,9%)	23 (29,9%)	

3.2 Isolation disseminierter Tumorzellen und Einzelzell-PCR

Vor der Amplifikation der DNA mussten die gefärbten Zellen zunächst isoliert werden. Diese Vereinzelung erfolgte mittels Mikromanipulation mit Glaskapillaren. Insgesamt habe ich versucht, 224 gefärbte Zellen von Adhäsions-Objektträgern zu lösen, wobei bei der Mikromanipulation 35 Zellen (15,6%) verloren gingen. Bei den meisten Aspiraten isolierte ich zusätzlich ungefärbte Einzelzellen als Kontrolle oder überführte einen ganzen Pool von ungefähr 1000 Zellen in ein Reaktionsgefäß. Bei der Vereinzelung der gegen EpCAM gefärbten Zellen aus der Suspension ist die Rate an fehlgeschlagenen Isolationsversuchen mit 11,6% (5 von 43 Zellen) etwas geringer. Einige der später mit der CGH untersuchten Zellen wurden vor Beginn dieses Dissertationsprojekts von Dr. Sonja Offner vereinzelt (n=38). Zu diesen Proben kann keine Aussage zur Erfolgsquote bei der Isolierung von Einzelzellen gemacht werden. Abbildung 12 gibt einen Überblick der durchgeführten Prozessierung der zellulären DNA.

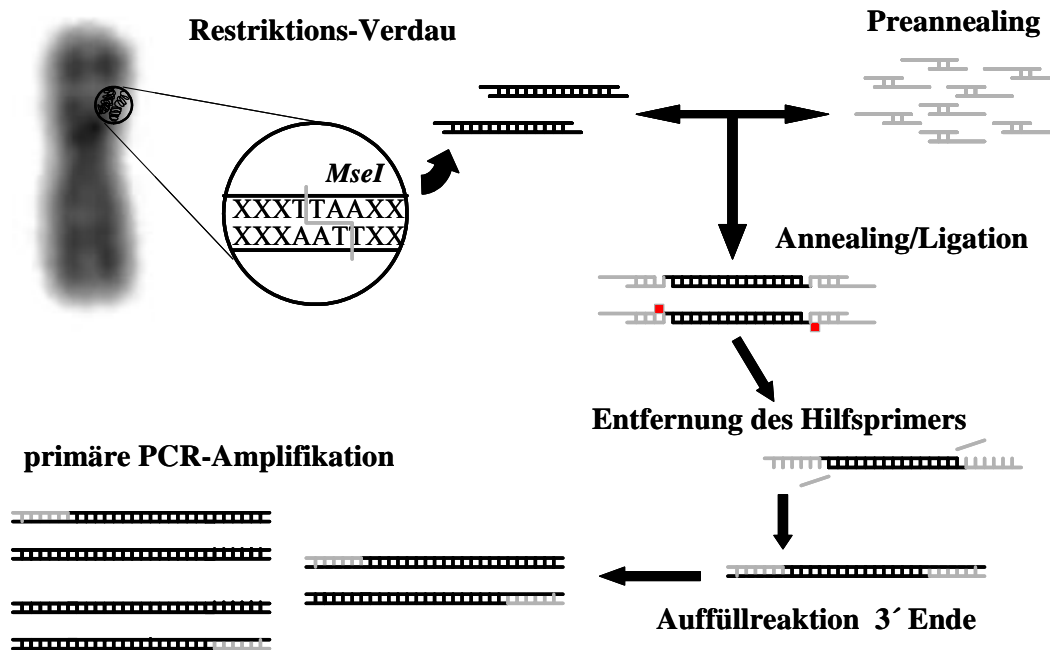


Abbildung 12 Isolation von Einzelzellen und Amplifikation der genomischen DNA

Die Abbildung gibt den Ablauf der Adapter-Linker-PCR wieder. Die genomische DNA wird mithilfe des Restriktionsenzym *Mse I* in Fragmente gespalten. Ein passendes Adapter-Konstrukt aus den beiden Oligonukleotiden *ddMseI1* und *Lib1* wird an die *MseI*-Schnittstellen ligiert. Nach Entfernung des Hilfsprimers *ddMseI1* bildet *Lib1* einen universalen Primer für die Amplifikation des gesamten Genoms einer Zelle.

Um genomische DNA aus wenig Ausgangsmaterial zu analysieren, muss zunächst eine globale Amplifikation durchgeführt werden. Da es für Versuche mit der CGH vor allem auch auf die quantitativ gleichmäßige Amplifikation der Probe ankommt, scheiden Methoden wie Alu-PCR oder DOP-PCR aus, die zu mehr oder weniger großen Verzerrungen führen würden. Für die Etablierung der CGH auf Einzellzebene wurde aus diesem Grund eine vorgeschaltete Adapter-Linker-PCR entwickelt (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999). Nach der Fragmentierung des gesamten Genoms mit dem Restriktionsenzym *Mse I* wird eine Adaptersequenz an die DNA-Bruchstücke ligiert. Auf diese Weise kann die gesamte DNA mit einem Primer amplifiziert werden. Um die Effizienz der *Mse*-Adapter-PCR zu beurteilen, wurde das PCR-Amplifikat jeder Zelle auf zwei spezifische *Mse*-Fragmente hin untersucht.

Die Amplifikation der genomischen DNA führte ich bei insgesamt 189 von Haft-Objektträgern abgelösten Zytokeratin-positiven Tumorzellen durch. In der Kontroll-PCR nach der primären Amplifikation waren dabei 113/189 Zellen (59,8%) für zwei und 37/189 Zellen (19,6%) für ein spezifisches *Mse*-Fragment positiv. Bei 39/189 Tumorzellen (20,6%) waren keine Banden in der Kontroll-PCR sichtbar. Neben den Tumorzellen behandelte ich auch 31 ungefärbte Einzelzellen nach dem gleichen Protokoll. Es zeigt sich dabei ein signifikanter Unterschied der Amplifikationsrate zwischen ungefärbten Zellen und Tumorzellen (Chi-Quadrat 6,71, df=2,

$p < 0,05$). Dieser könnte zum Beispiel mit deletierten Arealen in den entsprechenden Abschnitten des Genoms erklärt werden, da ein Primerpaar der Kontroll-PCR im Bereich des bekannten Tumorsuppressorgens p53 lag. Zur weiteren Überprüfung der Methode amplifizierte ich während meiner Dissertationsarbeit auch 35 Zellpools aus Patientenzellen (ungefähre 1000 Zellen), bei denen bis auf einen Fall immer beide Marker in der Kontroll-PCR sichtbar waren (Tabelle 13).

Bei EpCAM-positiven Zellen aus Suspension wurde neben der genomischen DNA für eine andere Arbeit zusätzlich mRNA gewonnen. Dabei wurde die mRNA über paramagnetische Beads aus dem Ansatz entfernt und die genomische DNA aus dem Überstand in 100% Ethanol gefällt. Nach mehreren Waschschritten in 70% Ethanol wird analog zu den von Haft-Objektträgern isolierten Zellen verfahren. Von insgesamt 76 aus Suspension amplifizierten Zellen konnten in 24/76 Zellen (31,6%) eines und in 24/76 Zellen (31,6%) zwei der untersuchten Mse-Fragmente nachgewiesen werden (Tabelle 13). Bei insgesamt 28/76 Zellen (36,8%) konnte allerdings keine der beiden untersuchten Sequenzen gefunden werden. EpCAM-positive Tumorzellen aus Suspension zeigen damit signifikant häufiger Verluste der untersuchten Mse-Fragmente (Chi-Quadrat, $p < 0,0005$) als CK-positive Tumorzellen von Adhäsions-Objektträgern. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese deutlich niedrigeren Detektionsraten von genomischen Sequenzen methodisch bedingt sind. Aus diesem Grund wurden achtzehn ungefärbte Einzelzellen aus Suspension isoliert und die genomische DNA entsprechend dem abgewandelten Protokoll zur gleichzeitigen mRNA-Gewinnung behandelt. In 16 Fällen (88,9%) konnten die beiden spezifischen Mse-Fragmente nachgewiesen werden, in einem Fall (5,6%) konnte nur ein Fragment in der Kontrolle detektiert werden und für eine weitere Zelle (5,6%) waren die spezifische PCR für beide Mse-Fragmente negativ. Der Unterschied zu den Ergebnissen der Adapter-Linker-PCR von normalen Knochenmarkzellen von Adhäsions-Objektträgern ist nicht signifikant (Chi-Quadrat, $p = 0,87$).

Tabelle 13 Effizienz der Mse-Adaptor-PCR zur Amplifikation genomischer DNA aus Tumorzellen.

	Tumorzellen Haft-OT	Tumorzellen Suspension	Kontrollzellen Haft-OT	Kontrollzellen Suspension	Kontrolle Zellpools
für beide Marker positiv	113 (59,8%)	24 (31,6%)	26 (83,8%)	16 (88,9%)	34 (97,1%)
für einen Marker positiv	37 (19,6%)	24 (31,6%)	2 (6,5%)	1 (5,6%)	0 (0,0%)
für beide Marker negativ	39 (20,6%)	28 (36,8%)	3 (9,7%)	1 (5,6%)	1 (2,9%)
Summe untersuchter Zellen	189	76	31	18	35
	$p < 0,0005$ (Chi-Quadrat)		Unterschied n.s. (Chi-Quadrat, $p = 0,87$)		

3.3 Genomische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen

Numerische Veränderungen der genomischen DNA von Einzelzellen können zuverlässig mit einem optimierten Protokoll der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) entdeckt werden (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999). Die über die Mse-Adapter-PCR amplifizierte DNA wird dabei mit Digoxigenin-dUTP markiert und zusammen mit Biotin-dUTP-markierter DNA aus Normalzellen auf humane Metaphasen von Lymphozyten gesunder Spender hybridisiert. Die markierten Fragmente binden dabei an die Chromosomen der Metaphasenpräparate und können über fluoreszierende Antikörper sichtbar gemacht werden. Die Metaphasen werden fotografiert, das Karyogramm erstellt und das Verhältnis der einzelnen Intensitäten durch den Computer berechnet. Damit werden Deletionen und Amplifikationen von Chromosomenmaterial durch eine relativ stärkere Intensität eines Fluorochroms sichtbar (Ratio). Abbildung 13 gibt einen schematischen Überblick der CGH.

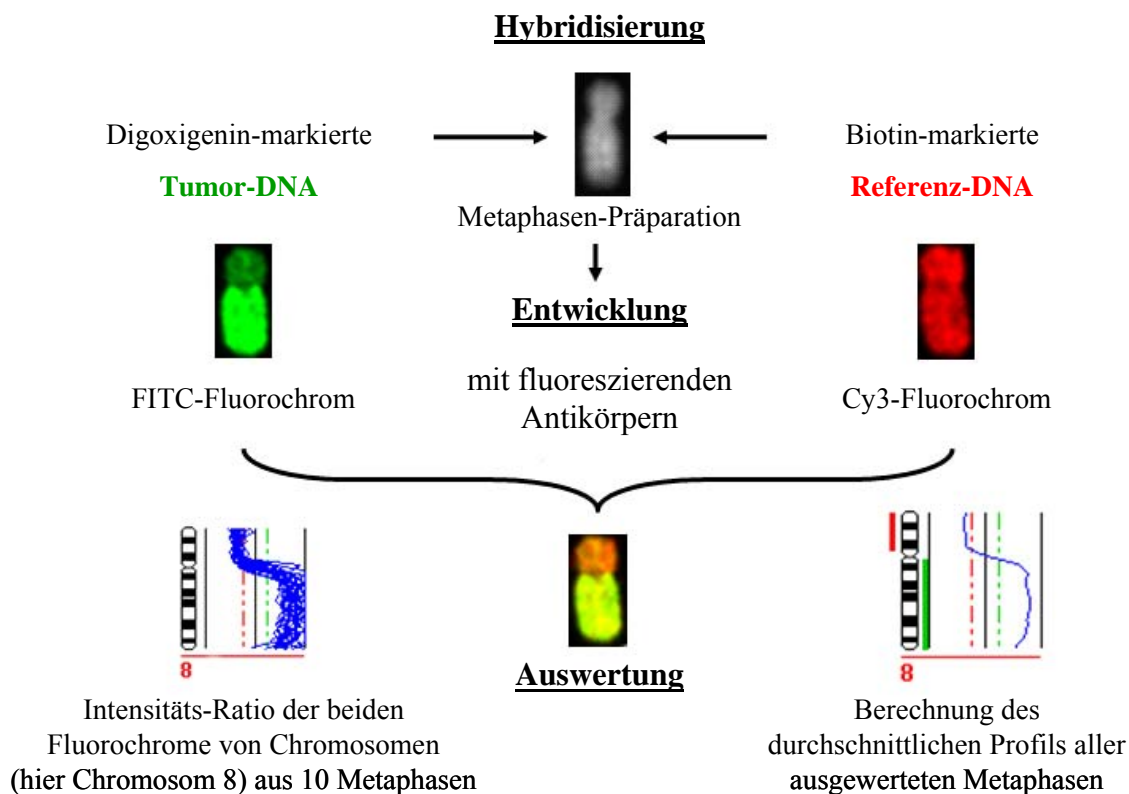


Abbildung 13 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Schematische Darstellung der CGH am Beispiel von Chromosom 8. Nach der Hybridisierung der markierten Proben aus Test- und Referenz-DNA auf Metaphasen folgt die Entwicklung mit für die beiden Sonden spezifischen Fluorochromen. Die Metaphasen werden mit einer CCD-Kamera fotografiert und durch EDV ausgewertet. Am Ende erhält man aus den Intensitätsmitteln der aufgenommenen Metaphasen ein Profil der detektierten genomischen Gewinne und Verluste

Zur Qualitätskontrolle der Einzelzell-CGH-Experimente wurden Stichproben von ungefärbten Einzelzellen und Zellpools aus dem Knochenmark von Patienten mit Prostata-Karzinom auf humane Metaphasen gesunder Spender hybridisiert. Diese Zellen sollten weder Gewinne noch Verluste von Chromosomenregionen zeigen. Insgesamt führte ich die CGH mit zwölf Einzelzellen und sechs Zellpools aus Normalzellen von Adhäsions-Objekträgern durch. Keine der Proben zeigte in der CGH sichtbare genomischen Veränderungen und alle wiesen somit ein balanciertes Profil auf (Abbildung 14). Zusätzlich wurde die CGH auch an 6 ungefärbten Einzelzellen durchgeführt, die aus Suspension isoliert wurden und nach dem für die Abtrennung von mRNA optimierten Protokoll weiterbehandelt wurden. Durch dieses Experiment sollen für die CGH relevante Fehler bei der Präparation EpCAM-positiver Zellen ausgeschlossen werden. Auch hier zeigten alle Kontrollzellen ein balanciertes Profil.

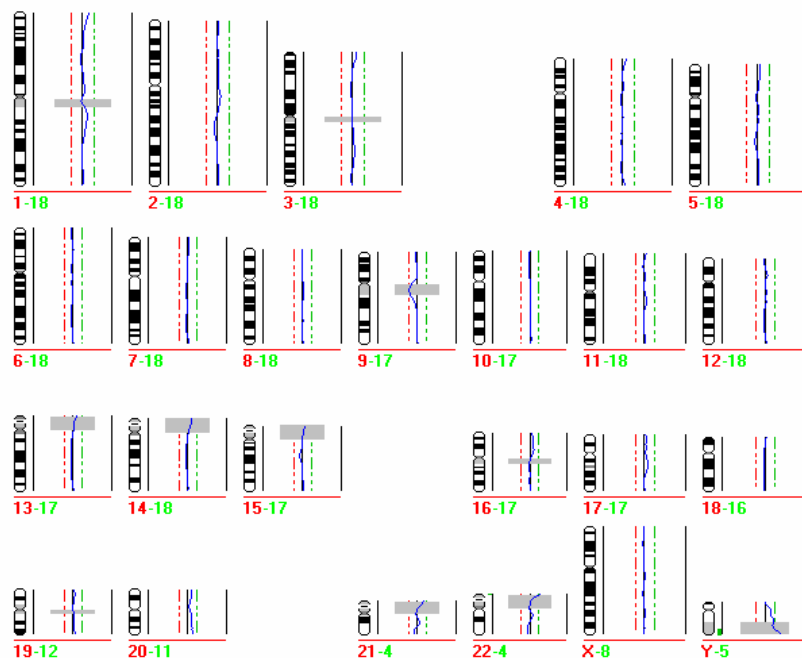


Abbildung 14 CGH einer ungefärbten Einzelzelle aus dem Knochenmark.

In dieser Abbildung ist das CGH-Profil einer ungefärbten Zelle dargestellt, die von einem Adhäsions-Objekträger isoliert wurde. Die grauen Balken geben Chromosomenregionen mit repetitiven Sequenzen an. Veränderungen in diesen Arealen werden nicht gewertet. Die erste Zahl benennt das jeweilige Chromosom an und die zweite Zahl gibt die in die Auswertung eingehenden Chromosomen an. Wie man erkennen kann, wurden in diesem Fall z.B. 18mal das Chromosom 1 zur Berechnung des Mittelwertes einbezogen. Das entspricht 9 untersuchten Metaphasen. Abweichende Zahlen zeigen, dass einzelne Metaphasen nicht komplett waren und dass nicht alle der kleineren Chromosomen in die Auswertung mit einbezogen werden können. Das gemittelte Profil aller Chromosomen der Knochenmarkzelle verläuft in der Mittellinie. Es sind weder Abweichungen nach rechts im Sinne einer Amplifikation noch nach links als Zeichen einer Deletion sichtbar.

3.3.1 Patientenkollektiv für die CGH-Untersuchungen

Der Vergleich der CGH-Aberrationen einzelner Tumorzellen soll im Folgenden zeigen, ob sich auch auf genomischer Ebene Unterschiede zwischen einzelnen Kollektiven zeigen. Insgesamt wurden 136 disseminierte Tumorzellen mit der Einzelzell-CGH analysiert, davon 50/136 von Patienten im Stadium M0, 28/136 aus dem Stadium BR und 58/136 aus dem Stadium M1 durch. Tabelle 14 gibt einen Überblick über das untersuchte Kollektiv und die analysierten Zellen. Wie in Abbildung 15 dargestellt, ergab sich für M1-Patienten ein Durchschnitt von 4,1 CGH-untersuchten Zellen je Aspirat, verglichen mit 1,5 bei den M0- und 1,3 bei den BR-Patienten. Dabei muss beachtet werden, dass von einem M0-Patienten zwei und von einem anderen drei positive Knochenmarkaspirate mit in die Auswertung eingehen. Auch im BR-Kollektiv gab es einen Patienten, von dem Zellen aus drei verschiedene Punktaten analysiert wurden. Besonders interessant ist auch, dass Zellen von drei Patienten mit in die CGH-Analysen eingehen, bei denen zwischen zwei Punktationen ein Krankheitsprogress zu beobachten war. So gibt es zwei Patienten, die vom M0-Kollektiv ins BR-Kollektiv wechseln und einen, bei dem in der Zeit zwischen zwei Punktationen Fernmetastasen detektiert wurden. In dieser Zeit stieg die Anzahl der im Knochenmark detektierbaren Zellen auch sprunghaft an. Während in diesem Fall bei der Punktation im Stadium BR nur eine CK-positive in 1 Million Knochenmarkzellen zu finden war, fanden sich ein Jahr später im Stadium M1 mehr als 500 Tumorzellen unter 1 Million Knochenmarkzellen, von denen insgesamt 19 mit der CGH analysiert wurden.

Tabelle 14 Übersicht über die mit der CGH analysierten disseminierten Tumorzellen bzw. Areale aus Primärtumoren von Patienten mit Prostatakarzinom

Immunzytochemische Färbung	CGH-analyalisierte disseminierte Tumorzellen bzw. Tumorareale	Patientenzahl
Einfachfärbung Zytokeratin	81	33
Einfachfärbung EpCAM	42	23
Doppelfärbung EpCAM/Zytokeratin	27	20
HE-Färbung von Primärtumoren	29	16

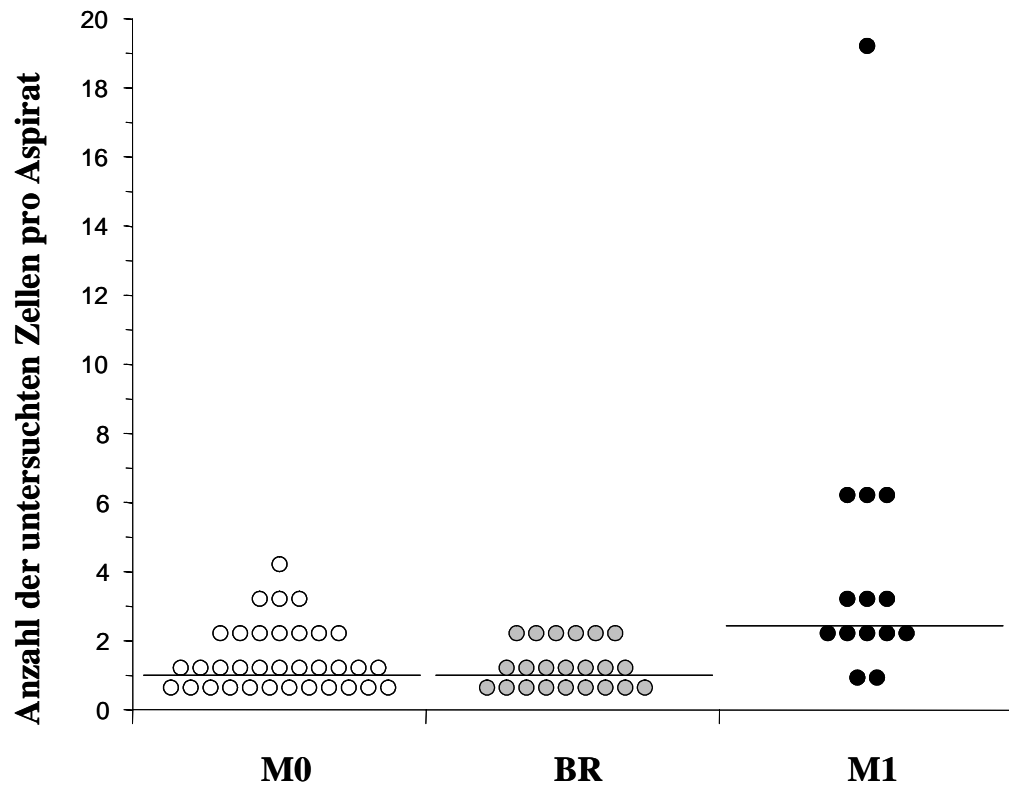


Abbildung 15 Anzahl der mit der CGH untersuchten Zellen der Patientengruppen

Jedes Knochenmarkaspirat wird durch einen Kreis symbolisiert. Die Linien markieren den Median der analysierten Zellen pro Aspirat für die drei Patientenkollektive M0, BR und M1.

Um die Zuordnung jeder analysierten Zelle zu ermöglichen, wurde ein kurzer aus vier Ziffern bestehender Code entwickelt, mit dem jede Zelle identifiziert werden kann. Die ersten beiden Ziffern geben dabei die Patienten-Nummer an, gefolgt von einem Buchstaben für die durchgeführte Färbung. Die nächsten beiden Ziffern nummerieren die Zellen eines Patienten. Die Zelle 12-E-02-C ist demnach die zweite isolierte Zelle aus Patient 12 und wurde in der EpCAM-Einfachfärbung eines KM-Aspirates detektiert, bei dessen Abnahme der Patient bereits Fernmetastasen aufwies. Im Anhang findet sich eine Tabelle in der für jede Zelle Code und die relevanten Informationen zu Färbungen und klinischen Daten zusammengefasst wurden. Bei den später erläuterten hierarchischen Clusteranalysen wurde der Code um einen weiteren Buchstaben für das klinische Stadium zum Zeitpunkt der Punktion erweitert, der ein ständiges Blättern zu dieser Tabelle verhindern soll. Tabelle 15 soll den Aufbau des entwickelten Code vermitteln.

Tabelle 15 Codierung der Zellen, die mit der CGH analysiert wurden

Position	Codierte Eigenschaft	Erläuterung der möglichen Werte
1 und 2	Patient	Laufende Nummerierung von 01 bis 68
3	Färbung	C – Zytokeratin-Einfachfärbung E – EpCAM-Einfachfärbung D – EpCAM/Zytokeratin-Doppelfärbung DC - EpCAM-/Zytokeratin+ DE - EpCAM+/Zytokeratin- DD - EpCAM+/Zytokeratin+ T – Färbung des Primärtumors
4 und 5	Zelle bzw. Tumorareal	Laufende Nummerierung von 01 bis maximal 20
6	klinisches Stadium zum Zeitpunkt der Punktion	U – klinisches Stadium nicht bekannt A – klinisches Stadium M0 B – klinisches Stadium BR C – klinisches Stadium M1

Von den untersuchten Zellen aus dem Knochenmark zeigten 49 keine sichtbaren Veränderungen bei der CGH. Verteilt auf die drei klinischen Stadien fällt auf, dass der Anteil von Zellen mit balanciertem CGH-Profil im Stadium M1 deutlich niedriger ist als in den beiden anderen Stadien. Nur 3/58 (5,2%) M1-Zellen ohne Aberrationen stehen 14/50 (28,5%) Zellen aus Patienten im Stadium M0 und 9/27 (33,3%) Zellen aus Patienten im Stadium BR gegenüber. Teilt man die untersuchten Zellen zusätzlich nach dem zum Nachweis verwendeten epithelialen Marker in zwei Gruppen ein, fällt ein weiterer Unterschied auf. Während in den beiden Stadien M0 und M1 für beide Marker in etwa gleich viele Zellen ohne Aberrationen auftraten, gibt es im Stadium BR deutlich mehr EpCAM-positive Zellen als CK-positive Zellen mit aberrantem CGH-Profil (Abbildung 16).

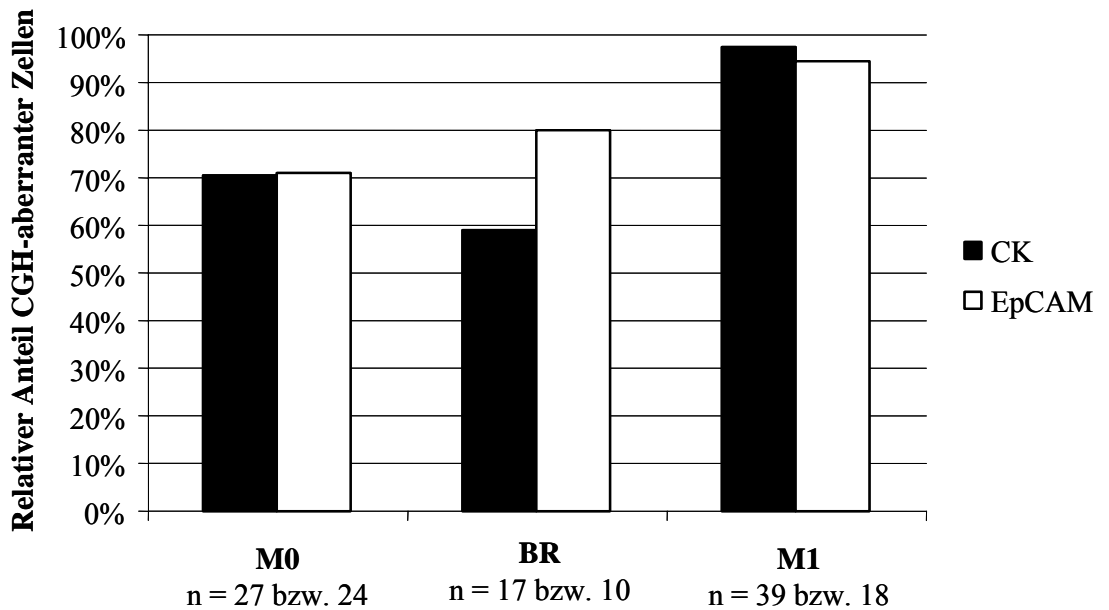


Abbildung 16 Anteil der CGH-aberranten Zellen nach Patientenstadium

Dargestellt wird getrennt nach den drei Patientenkollektiven der relative Anteil von Zellen, die Aberrationen in der CGH zeigten. Schwarze Säulen stehen dabei für Zellen mit nachgewiesener Zytokeratin-Expression, weiße Säulen für Zellen mit nachgewiesener EpCAM-Expression. Im Stadium M1 zeigen relativ deutlich mehr untersuchte Zellen Aberrationen in der CGH (M1 zu M0, $p < 0,0003$ bzw. M1 zu BR $p < 0,0005$, BR zu M0 nicht signifikant; Chi-Quadrat). Die Unterschiede zwischen Zellen, die über die verschiedenen Markermoleküle detektiert wurden, ist für keines der drei klinischen Stadien signifikant (Chi-Quadrat). Trotzdem fällt im Stadium BR auf, dass über EpCAM nachgewiesene Zellen häufiger chromosomale Veränderungen zeigen ($p = 0,48$).

Anreicherung von EpCAM-positiven Zellen über Eisenpartikel

In die CGH-Analysen wurden auch 7 EpCAM-gefärbte Zellen mit einbezogen, vor deren Isolation das Knochenmark auf andere Art aufbereitet wurde. Dabei wurden paramagnetische Eisenpartikel (Beads) mit dem 3B10-Antikörper beschichtet, um so eine Anreicherung von EpCAM exprimierenden Zellen zu erreichen. Tatsächlich waren die Detektionsraten deutlich höher: von 68 gefärbten Knochenmarkaspiraten fanden sich in 28 EpCAM-positive Zellen (41,2%). Gerade in der Gruppe der Patienten im Stadium BR zeigte sich ein sehr deutlicher Unterschied. Von 21 gefärbten Präparaten konnten in 11 Fällen (52,4%) gefärbte Zellen nachgewiesen werden, während bei 30 Punktionen aus dem Stadium M0 nur 9mal (30,0%) EpCAM-positive Zellen detektiert wurden. Aufgrund der noch niedrigen Fallzahlen war der durchgeführte Fisher Exact Test nicht signifikant, zeigte aber eine Tendenz ($p < 0,10$). Im klinischen Stadium M1 wurden nur fünf Punktionen untersucht, von denen nur in einem Fall positive Zellen detektiert werden konnten (20,0%). Da sich die Nachweisraten deutlich von denen der EpCAM-Färbung nach der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation unterscheiden, sind die mit paramagnetischen Beads angereicherten Präparate nicht in den Auswertungen zur EpCAM-Einfachfärbung enthalten. Diese vorläufigen

Daten haben aufgrund der kleinen Stichprobe noch keine große Aussagekraft, zusammen mit den Hinweisen eines möglichen Unterschieds bezüglich des häufigeren Nachweises EpCAM-positiver Zellen bei Patienten im Stadium BR sind sie aber dennoch interessant.

3.3.2 CGH-Aberrationen in den verschiedenen Krankheitsstadien

Durch den Vergleich aller CGH-veränderten Zellen der Stadien M0, BR und M1 werden genomische Veränderungen gesucht, die charakteristisch für das jeweilige Stadium sind. Aus 24 Patienten des Stadium M0 habe ich insgesamt 36 Zellen analysiert, die in der CGH Veränderungen aufwiesen. Im Stadium BR waren 18 Zellen von 12 Patienten und im Stadium M1 55 Zellen von 13 Patienten aberrant. Betrachtet man alleine die mittlere Anzahl an Veränderungen pro Zelle, so fällt eine Zunahme der absoluten Häufigkeit von genomischen Aberrationen mit dem Krankheitsprogress auf. Während im Stadium M0 durchschnittlich 3,7 Verluste und 3,6 Gewinne pro Zelle auftreten, zeigen die CGH-Ergebnisse der Zellen aus dem Stadium BR 4,5 Deletionen und 4,2 Amplifikationen und aus dem Stadium M1 sogar 5,6 bzw. 5,5. Während das Verhältnis aus Verlusten und Gewinnen in allen drei Stadien gleich bleibt (M0 1,05, BR 1,07, M1 1,03) steigt die absolute Anzahl an Veränderungen kontinuierlich an (Abbildung 17).

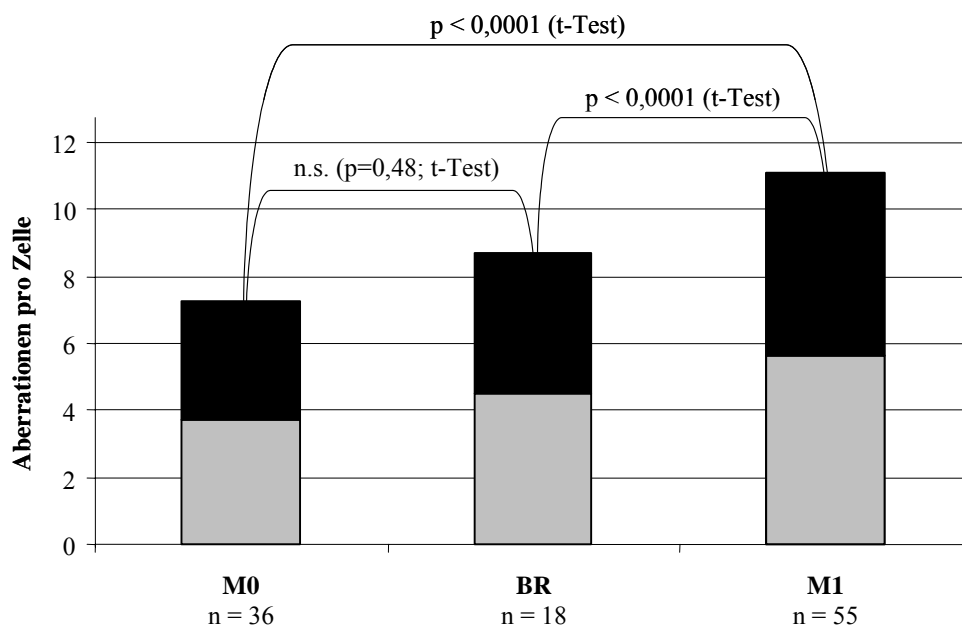


Abbildung 17 Mittlere Anzahl an CGH-Veränderungen pro Zelle

Das Säulendiagramm gibt die mittlere Anzahl an Veränderungen pro Zelle für die drei klinischen Stadien M0, BR und M1 an. Der graue Anteil zeigt dabei den Anteil der genomischen Verluste und der schwarze den der genomischen Gewinne an. Vergleicht man die drei klinischen Gruppen ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen aus dem Stadium M1 und den Zellen aus M0 bzw. BR (t-Test).

Die Abbildungen 18, 19 und 20 zeigen kumulative Histogramme der mit der CGH gefundenen Aberrationen in disseminierten Tumorzellen für die drei Kollektive M0, BR und M1. Tabelle 16 fasst die aufgetretenen Gewinne und Verluste für die drei klinischen Stadien zusammen und gibt ihre relative Häufigkeit an. Im Krankheitsstadium M0 zeigt sich ein sehr heterogenes Bild an Veränderungen. Die häufigsten Gewinne sind auf den Chromosomenarmen 4q, 11q, 12q und 17q lokalisiert. Verluste chromosomaler Regionen sind besonders oft auf 18p, 19p, 22q und 16q zu finden. Auch bei den Zellen von Patienten im Stadium BR herrscht ein sehr heterogenes Bild vor. Häufige Amplifikationen liegen auf Xq, 2p und 19, die am häufigsten auftretenden Deletionen sind auf 17p, 20q und 17q zu finden.

In den Histogrammen für das Stadium M1 sind pro Patient maximal drei Tumorzellen dargestellt, um eine Überrepräsentation spezifischer Veränderungen eines Patienten zu verhindern. Für Patienten mit mehr als drei veränderten Zellen wurden zufällig drei ausgewählt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal unabhängig wiederholt und Abbildung 20 stellt ein Beispiel aus diesen drei Zufallsexperimenten dar, die alle im Anhang nachgeschlagen werden können. Tabelle 16 gibt jeweils den Median aus den drei Verteilungen, sowie Maximum und Minimum für die jeweilige chromosomale Region an. Auf den ersten Blick fällt ein deutlich homogeneres Bild der M1-Veränderungen auf, was vor allem auf die hohe relative Häufigkeit einiger weniger Veränderungen zurückzuführen ist. So findet man wiederholt Amplifikationen auf 8q, 12q, 7 und Xq. Noch deutlicher ist die Ähnlichkeit der Zellen bei den chromosomalen Verlusten, die besonders häufig auf 8p, 18q, 5q, 10q, und 13q auftreten.

Tabelle 16 Häufige genomische Aberrationen der disseminierten Einzelzellen in der CGH.

	disseminierte Tumorzellen aus dem Stadium M0 (n = 36)
Gewinne	4q (22%), 11q (17%), 12q (17%), 17q (17%), 6 (14%), 11p (14%), 19 (14%)
Verluste	18p (25%), 19p (25%), 16q (22%), 22q (22%), 8p (19%), Xq (19%) 8q (17%), 18q (17%), Xp (17%), Y (17%), 1p (14%), 5p (14%), 17p (14%), 20q (14%)
	disseminierte Tumorzellen aus dem Stadium BR (n = 18)
Gewinne	Xq (39%), 2p (28%), 19q (28%), 9q (22%), 13q (22%), 19p (22%), Xp (22%), 4q (17%), 5 (17%), 6p (17%), 9p (17%), 12q (17%), 17 (17%)
Verluste	17p (39%), 20q (37%), 17q (28%), 22q (28%), 1p (22%), 12q (22%), 16q (22%), 20p (22%), Xp (22%), Y (22%), 6q (17%), 16p (17%), 19 (17%)
	disseminierte Tumorzellen aus dem Stadium M1 (n = 40) *
Gewinne	8q (65%, 61-65%), 12q (32%, 29-32%), 7q (29%, 26-29%), Xq (26%, 23-26%), 7p (23%, 23-26%), 2q (19%, 16-19%), 17q (19%, 13-23%), 18p (19%, 19-26%)
Verluste	8p (48%, 45-55%), 18q (39%, 35-39%), 5q (35%, 32-39%), 10q (32%, 32-32%) 13q (32%, 26-32%), 16q (32%, 29-35%), 22q (29%, 29-32%), 6q (26%, 23-29%)

* Für die Zellen aus dem Stadium M1 ist jeweils der Median, sowie dahinter Maximum und Minimum aus den drei durchgeführten Zufallverteilungen aufgeführt.

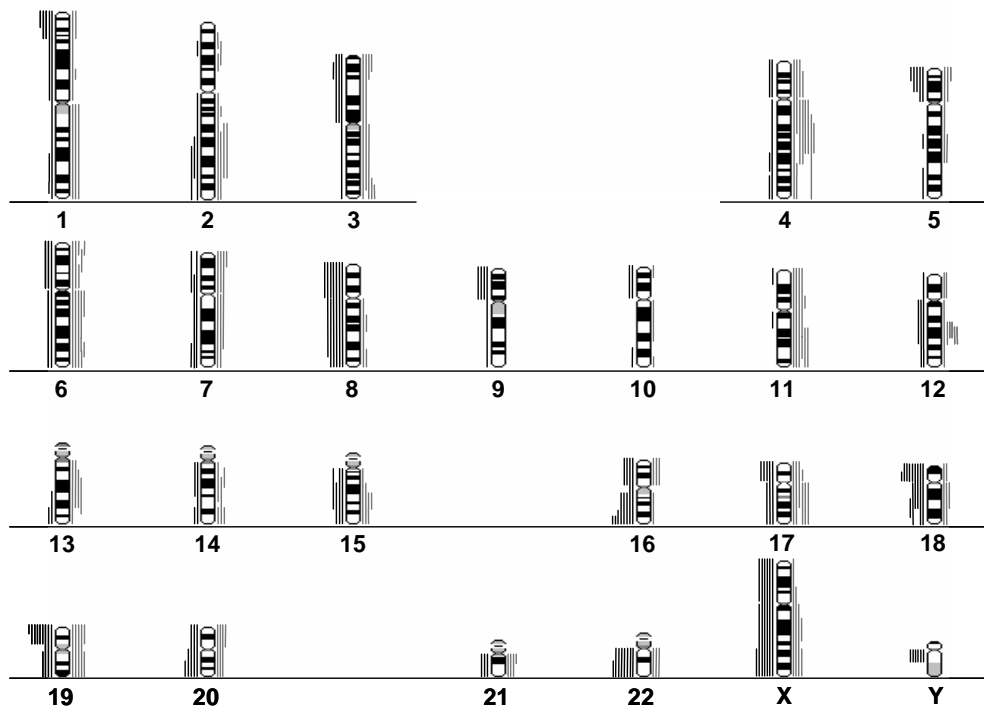


Abbildung 18 CGH-Ergebnisse der disseminierten Tumorzellen aus dem Stadium M0

Neben den Ideogrammen sind links die Deletionen jeder Zelle als schwarze Striche dargestellt, die Amplifikationen entsprechend rechts als graue Striche. Das Schema spiegelt die Veränderungen aller 36 untersuchten Zellen aus M0-Patienten dar, unabhängig vom Antikörper mit dem die Zelle detektiert wurde.

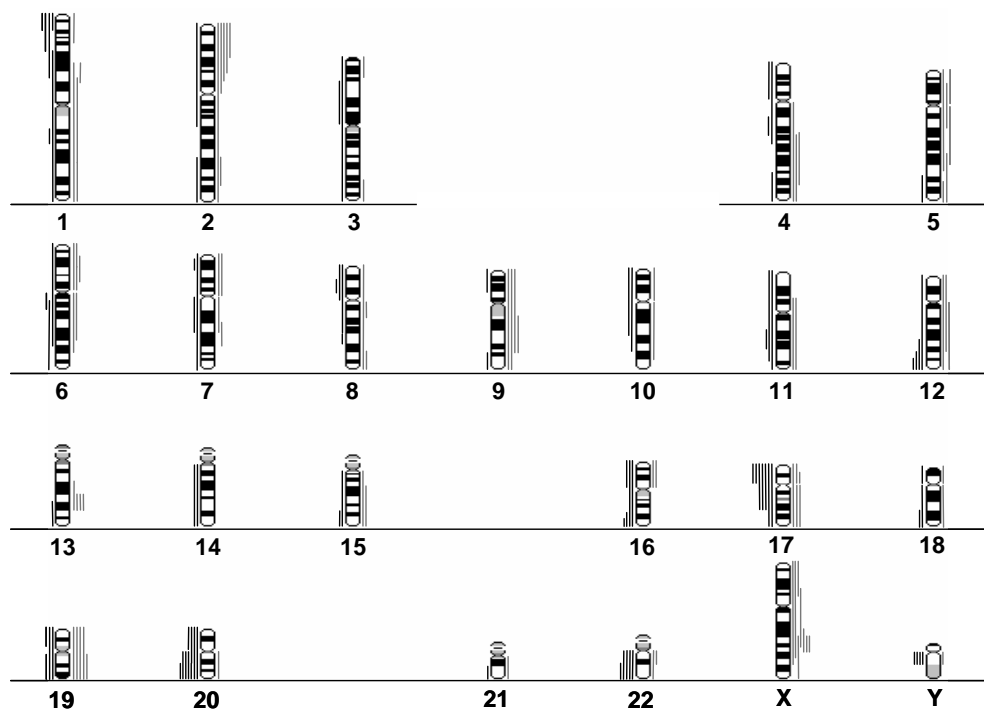


Abbildung 19 CGH-Ergebnisse der disseminierten Tumorzellen aus dem Stadium BR

Neben den Ideogrammen sind links die Deletionen jeder Zelle als schwarze Striche dargestellt, die Amplifikationen entsprechend rechts als graue Striche. Das Schema spiegelt die Veränderungen aller 18 untersuchten Zellen aus BR-Patienten dar, unabhängig vom Antikörper mit dem die Zelle detektiert wurde.

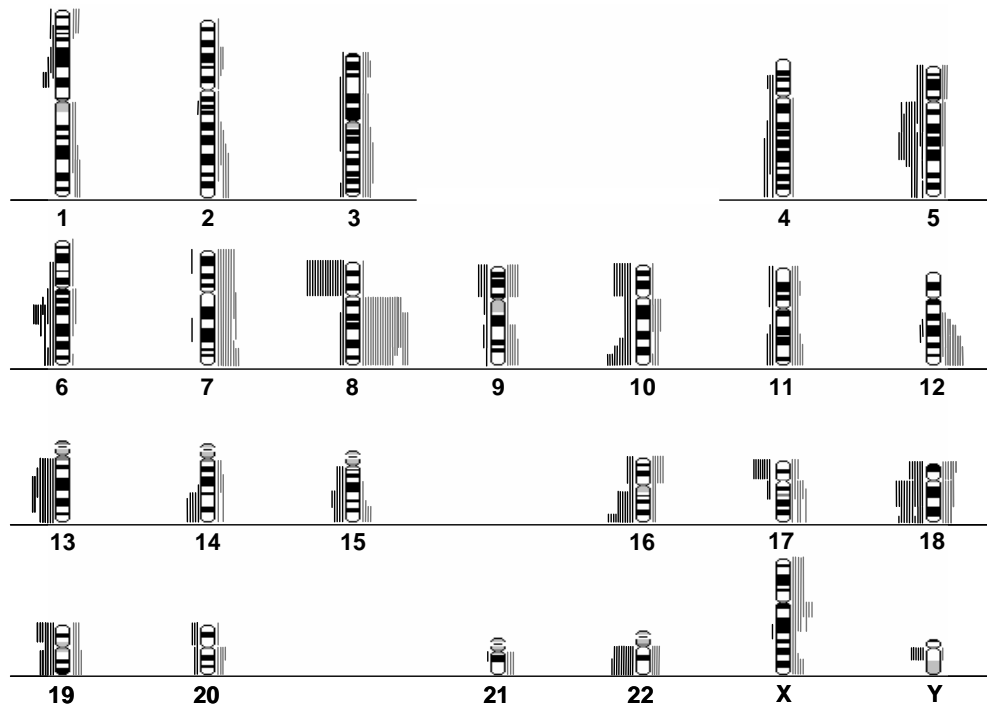


Abbildung 20 CGH-Ergebnisse der disseminierten Tumorzellen aus dem Stadium M1

Neben den Ideogrammen sind links die Deletionen jeder Zelle als schwarze Striche dargestellt, die Amplifikationen entsprechend rechts als graue Striche. Das Schema spiegelt die Veränderungen einer repräsentativen Stichprobe (siehe Text) von 40 Zellen aus M1-Patienten dar, unabhängig vom Antikörper mit dem die Zelle detektiert wurde.

3.3.3 CGH-Aberrationen von CK- und EpCAM-Zellen

Anschließend wurden mögliche Unterschiede zwischen Zytokeratin-positiven und EpCAM-positiven Zellen untersucht. Zunächst soll die mittlere Anzahl an CGH-Veränderungen pro Zelle betrachtet werden. Im Stadium M0 ist der Unterschied mit durchschnittlich insgesamt 7,1 genomischen Veränderungen pro Zelle für CK-positive Zellen und 7,8 für EpCAM-positive Zellen noch marginal, im Stadium BR ändern sich diese Mittelwerte allerdings auf 5,7 Veränderungen für CK-Zellen bzw. 12,5 für EpCAM-Zellen ($p < 0,03$, t-Test). Auch im Stadium M1 zeigen die EpCAM-positiven Zellen signifikant mehr Aberrationen ($p < 0,05$, t-Test; Abbildung 21). Ein Problem der Aussagekraft dieser Ergebnisse ist allerdings die geringe Fallzahl, insbesondere bei den Zellen aus dem Stadium BR.

Betrachtet man die sechs Gruppen, die durch die Einteilung nach klinischem Stadium und epithelalem Markermolekül entstehen, in Bezug auf ihre genomischen Veränderungen, so bestätigt sich die Beobachtung einer zunehmenden Homogenität der Aberrationsmuster mit dem klinischen Stadium M1 (Abbildung 22). Im Stadium M0 sind die untersuchten EpCAM- und CK-positiven Zellen sehr heterogen ($n=18$ bzw. 19). Auffällig ist allerdings, dass die Zytokeratin-positiven

Zellen relativ häufig einen Gewinn auf 3q (26,3%) und einen Verlust von 22q (31,6%), 17p (26,3%) und Y (26,3%) aufweisen, die bei den EpCAM-positiven Zellen nur sehr selten beobachtet werden. Dagegen zeigen die EpCAM-positiven Zellen häufiger chromosomale Gewinne auf den Regionen 12q (27,8%) und 17q (22,2%). Im Stadium BR (EpCAM n=8, CK n=10) wurde in den Zytokeratin-positiven Zellen erneut ein häufiger Verlust von 17p (50,0%) und Y (40,0%) festgestellt. Während 30,0% der CK-positiven Zellen einen Verlust von 19q aufweisen, ist dieser Chromosomenarm in 50,0% der EpCAM-positiven Zellen amplifiziert. Auffällig ist auch der in den EpCAM-positiven Zellen häufige chromosomale Gewinn einer Region auf 2p, in der auch das Gen für EpCAM selbst liegt.

Auch im Stadium M1 lassen sich deutliche Unterschiede zwischen den über die beiden epithelialen Marker detektierten Zellen finden (EpCAM n=14, CK n=24). Von jedem Patienten wurden erneut maximal drei zufällig bestimmte Zellen in die Analysen einbezogen und der Vorgang dreimal wiederholt. Die Histogramme in Abbildung 22 zeigen eine dieser Zufallsverteilungen. Man findet viele der in 3.3.2 als „M1-typisch“ beschriebenen Veränderungen gehäuft in beiden Gruppen. Beispiele hierfür sind die Gewinne auf 8q, 7p und 12q oder die Verluste auf 5q, 6q, 8p und 13q.

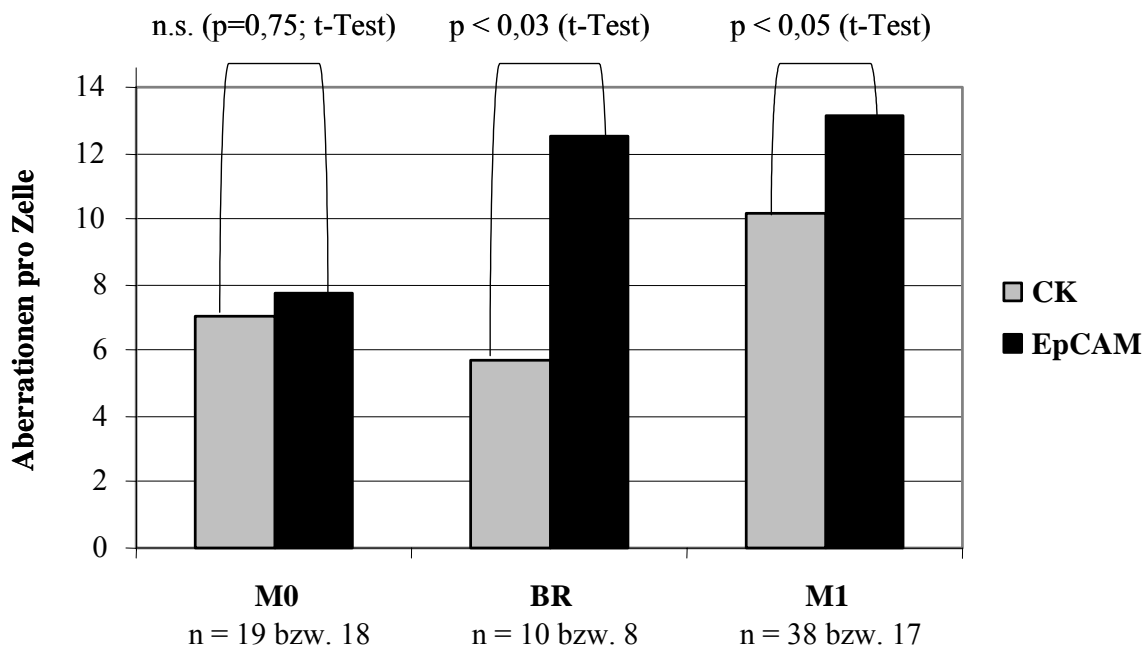


Abbildung 21 Mittlere Anzahl an CGH-Veränderungen pro Zelle

Das Säulendiagramm gibt die mittlere Anzahl an Veränderungen pro Zelle für die drei klinischen Stadien M0, BR und M1 an. In grau sind die Daten der Zellen dargestellt, die mit einer Färbung gegen Zytokeratin detektiert wurden und in schwarz die Zellen, die gegen EpCAM gefärbt waren. Für die beiden Stadien BR und M1 zeigen die über EpCAM detektierten Zellen im Mittel signifikant mehr Aberrationen als die über Zytokeratin detektierten Zellen (t-Test).

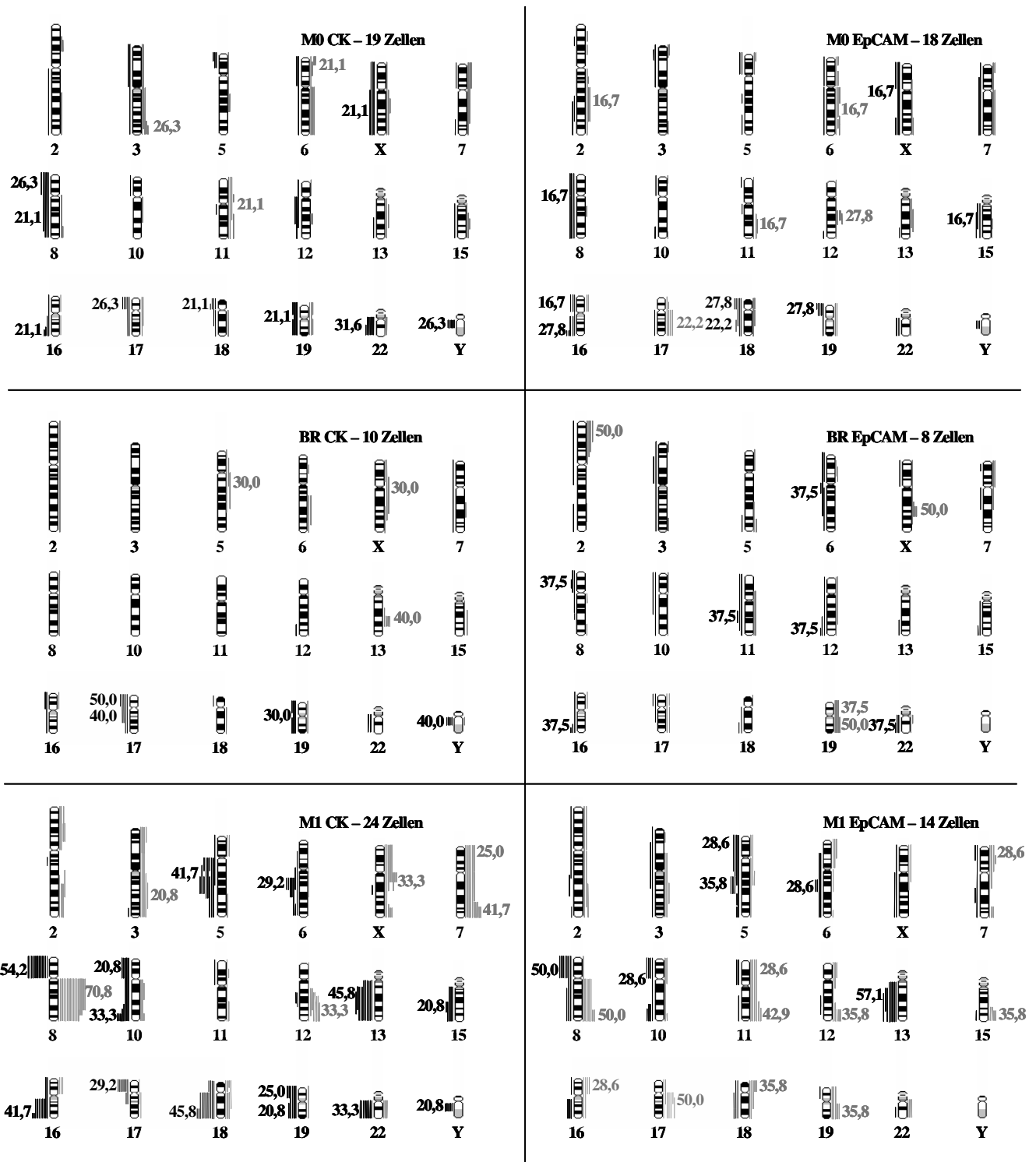


Abbildung 22 CGH-Ergebnisse EpCAM- und Zytokeratin-positiver Zellen

Die Abbildung zeigt Histogramme der CGH-untersuchten disseminierten Tumorzellen getrennt nach klinischem Stadium und immunzytochemischem Marker. Rechts von den Chromosomen sind genomische Gewinne (grau), links genomische Verluste (schwarz) dargestellt. Die häufigsten Veränderungen jeder Gruppe sind in der entsprechenden Farbe neben den Histogrammen zur Verdeutlichung als relativer Wert in Prozent dargestellt. Um eine Darstellung der Abbildung in ausreichender Größe zu ermöglichen, wurden selten veränderte Chromosomen (1, 4, 9, 14, 20 und 21) aus dem Schema entfernt. Bei diesen Chromosomen zeigte sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

Andere Veränderungen tauchen vornehmlich nur in einer der beiden Gruppen auf. Besonders interessant ist hierbei erneut Chromosom 17. Von den CK-positiven Zellen zeigen 29,2% einen Verlust von 17p, der in keiner der EpCAM-positiven Zellen beobachtet wurde. Dagegen wiesen 50,0% der EpCAM-positiven M1-Zellen eine Amplifikation von 17q auf, die in den Zytokeratin-positiven Zellen nur sehr selten gefunden wurde. Zytokeratin-positive Zellen zeigten außerdem Gewinne auf 7q (41,7%) und Xq (33,3%) und Verluste auf 18q (45,8%), 16q (41,7%), 22q (33,3%) und 19p (25,0%), die in EpCAM-positiven Zellen deutlich seltener waren. Im Gegensatz dazu fanden sich in EpCAM-positiven Zellen chromosomale Gewinne auf den Chromosomen 11q (42,9%), 15q (35,8%) und 19q (35,8%) auf, die in CK-positiven Zellen nur sehr selten vorkamen.

Bei der Beurteilung dieser Daten muss beachtet werden, dass die Fallzahl, insbesondere für die beiden Gruppen im klinischen Stadium M1 nur gering sind. Trotzdem deuten sich gerade auf den Chromosomen 17 und 19 und Y Unterschiede zwischen EpCAM- und Zytokeratin-positiven Zellen an.

3.3.4 Klassifizierung disseminierter Tumorzellen

Zur Bestimmung von Mustern genomischer Veränderungen wurden im Folgenden lediglich Zellen mit CGH-Aberrationen eingeschlossen. Von insgesamt 150 analysierten Zellen gehen demnach nur 114 in die im Folgenden dargestellten Analysen mit ein. Prinzipiell könnten hierbei alle untersuchten Zellen eines Patienten zu einem Profil zusammengefasst und somit als Einheit betrachtet werden. Da bei dieser Betrachtungsweise allerdings die Heterogenität der einzelnen disseminierten Tumorzellen unbeachtet bleiben würde, wurde in dieser Arbeit ein anderer Ansatz gewählt. In den durchgeführten Verwandtschaftsanalysen wird jede einzelne Zelle als separates Ereignis betrachtet. Aus einigen Aspiraten, insbesondere von Patienten im Stadium M1, wurden bis zu 19 Zellen mit der CGH untersucht. Um eine Überrepräsentation dieser Patienten zu verhindern, wurde die Zahl der in die Ähnlichkeitsanalysen eingehenden Zellen auf maximal 3 zufällig ausgewählte Tumorzellen pro Knochenmarkpunktat begrenzt. Wie schon bei der kumulativen Darstellung der CGH-Veränderung von M1-Zellen in Histogrammen (siehe Abbildung 20) wurde eine zufällige Auswahl von Zellen für jede hierarchische Ähnlichkeitsanalyse dreimal festgelegt. Die in diesem Kapitel gezeigten Abbildungen geben repräsentativ immer eine von diesen drei zufällig ausgewählten Zellverteilungen wieder. Die beiden übrigen können im Anhang nachgeschlagen werden.

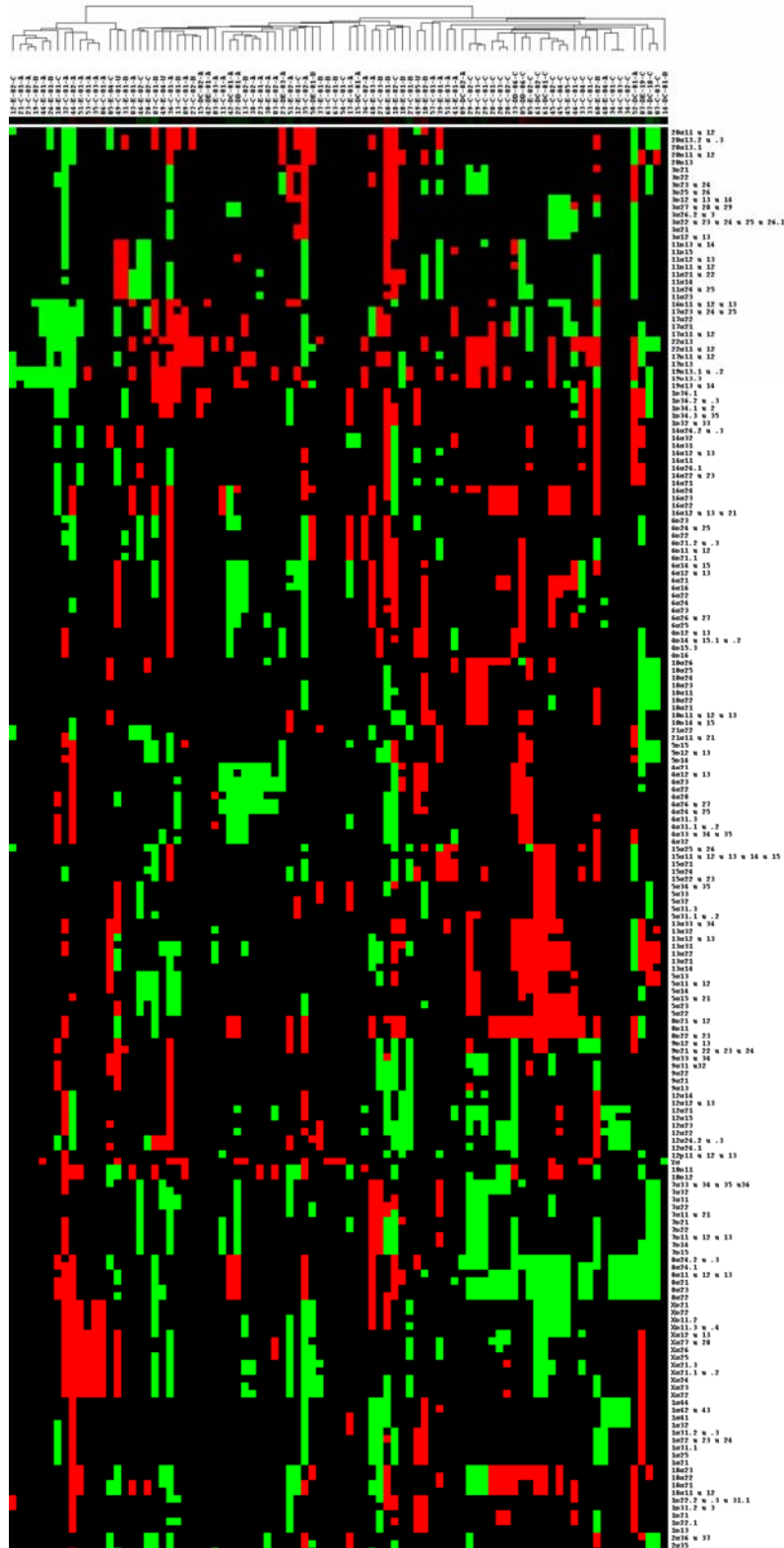


Abbildung 23 Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse aller CGH-veränderten Tumorzellen

Darstellung des Clusters aller 88 Zellen (average-linkage mode). In den Spalten sind die untersuchten Zellen aufgetragen und in den Zeilen die Chromosomenregionen. Ganz oben sieht man die Verwandtschaftsverhältnisse als Dendrogramm (Vergrößerung in Abbildung 18). Rote Kästchen stehen für Deletionen der Zelle an der entsprechenden Chromosomenregion, grüne für Amplifikationen.

In Abbildung 23 wurden die Einzelzellen mit Veränderungen aus allen untersuchten Patienten miteinander verglichen. Durch die Beschränkung der in die Analyse eingehenden Zellen pro Aspirat wurden insgesamt 88/110 Einzelzellen eingeschlossen. Der Verwandtschaftsgrad einzelner Zellen lässt sich leicht durch das Dendrogramm am oberen Ende der Abbildung ablesen, das in Abbildung 24 noch einmal vergrößert dargestellt ist. Je kürzer in dieser zweiten Abbildung die Astlänge zu einem Knoten zwischen zwei Zellen ist, desto ähnlicher sind sich die Zellen. Entgegengesetzt deuten die Aufzweigungen am rechten Bildrand auf nur sehr entfernt ähnliche Zellen hin. Da die Darstellung des gesamten Clusters nur in einer sehr stark verkleinerten Darstellung möglich ist, wurde im weiteren Verlauf dieses Kapitels darauf verzichtet. Stattdessen wurde jeweils nur das Dendrogramm dargestellt, aus dem sich die Verwandtschaft zwischen zwei Zellen ablesen lässt. Einzelne für die Aufstellung des Baumes wichtige Veränderungen werden zusätzlich im Text genannt oder als vergrößerter Ausschnitt aus dem Gesamtcluster dargestellt (wie zum Beispiel in Abbildung 25).

Die Ähnlichkeitsanalyse zeigt eine Anhäufung der durch einen schwarzen Balken symbolisierten M1-Zellen im unteren großen Ast des Dendrogramms. In der Darstellung des Gesamtclusters fällt hierbei auf, dass diese Gruppe ein deutlich homogeneres Aberrationsmuster zeigt. Ebenso sind hier die Zellen eines Patienten innerhalb dieses Baumes besonders nahe miteinander verwandt sind. Alle in die Analyse einbezogenen Zellen der Patienten 07, 20, 29, 34, 45 und 61 liegen nebeneinander in einem Endast und auch zwei Zellen der Patienten 05, 33 sind sich sehr ähnlich (Abbildung 24). Genomische Veränderungen, die in diesem Ast unter anderem gehäuft vorkommen sind zum Beispiel die Amplifikation von 8q und die Deletionen von 5q, 8p und 13q. Ein weiterer Aspekt ist, dass die EpCAM-positiven M1-Zellen in diesem unteren Ast entweder selbst auch Zytokeratin-positiv waren oder zumindest aus Patienten stammen, in deren Knochenmarkpunktaten auch Zytokeratin-positiv Zellen gefunden wurden. Im Gegensatz dazu sind über den restlichen Baum verteilte EpCAM-Zellen aus 6/8 M1-Patienten, bei denen keine Zytokeratin-positiven Zellen nachgewiesen werden konnten.

Die beiden oberen großen Äste des Dendrogramms (Abbildung 24) zeigen ein heterogenes Aberrationsprofil. Trotzdem gibt es auch hier immer wieder kleinere Gruppen von Zellen, die durch spezifische Veränderungen definiert werden. So weisen die Zellen 11-C-01-A bis 23-DE-03-A in ihrem Ast des Baumes als Gemeinsamkeit alle die Amplifikation von Regionen auf 4q auf. Neun dieser Zellen stammen aus Patienten des Stadiums M0, eine aus dem Stadium BR. Andere im Gesamtbild auffällige Cluster, wie die 19p-Amplifikation links oben bestehen aus Zellen aller Stadien und Marker.

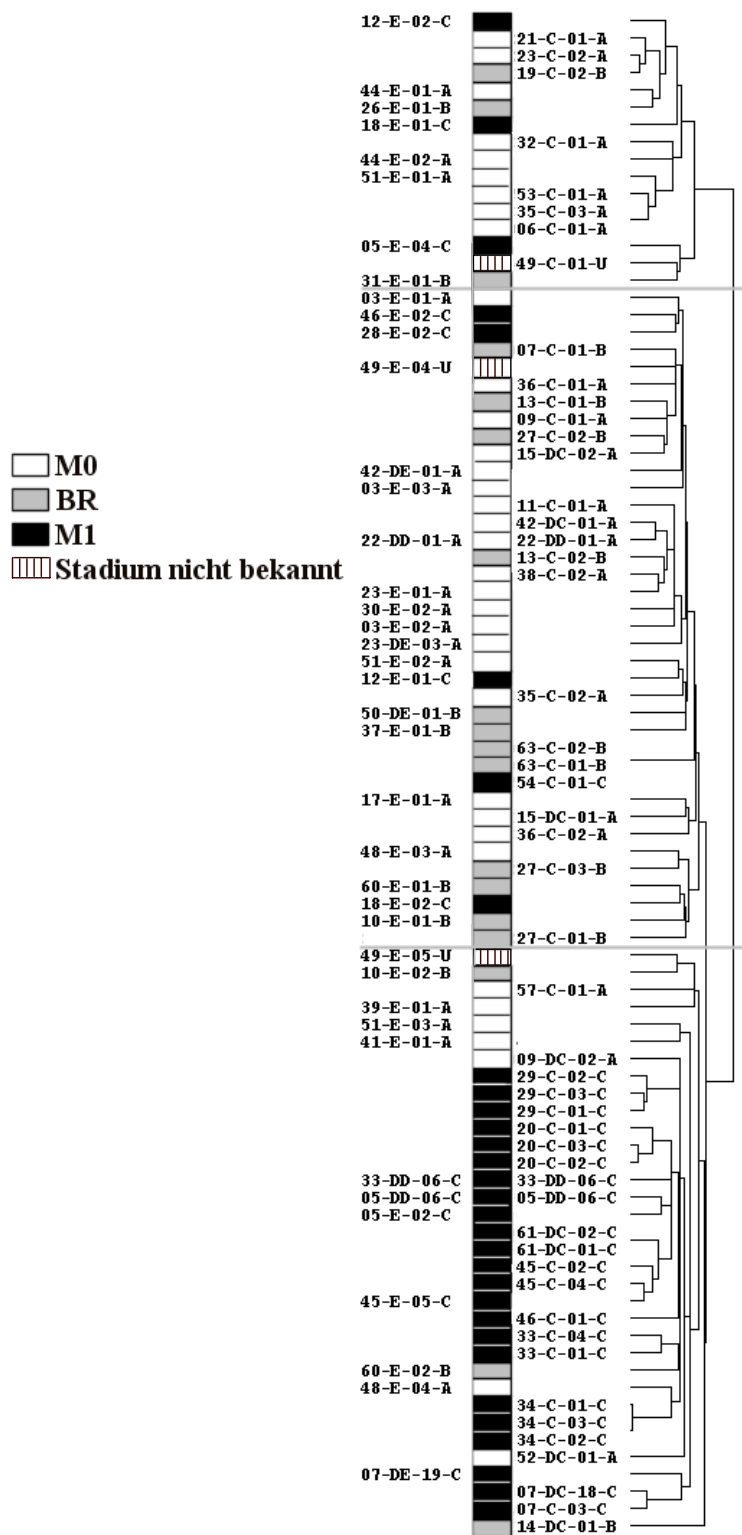


Abbildung 24 Dendrogramm der Ähnlichkeitsanalyse aller CGH-veränderten Zellen

Der Farbbalken in der Mitte gibt zusätzlich einen Überblick über das klinische Stadium: weiß steht für M0, grau für BR und schwarz für M1. Bei einem Patienten war das Stadium nicht bekannt (schraffiert). Alle CK-positiven Zellen sind rechts vom Farbbalken aufgetragen, alle EpCAM-positiven Zellen links. War eine Zelle in der Doppelfärbung für beide Marker positiv erscheint sie zu beiden Seiten des Balkens. Zwei Querlinien verdeutlichen die Trennung zwischen den beiden ersten Ästen der Analyse. Die verwendete Zellkennung wird in Tabelle 15 erläutert.

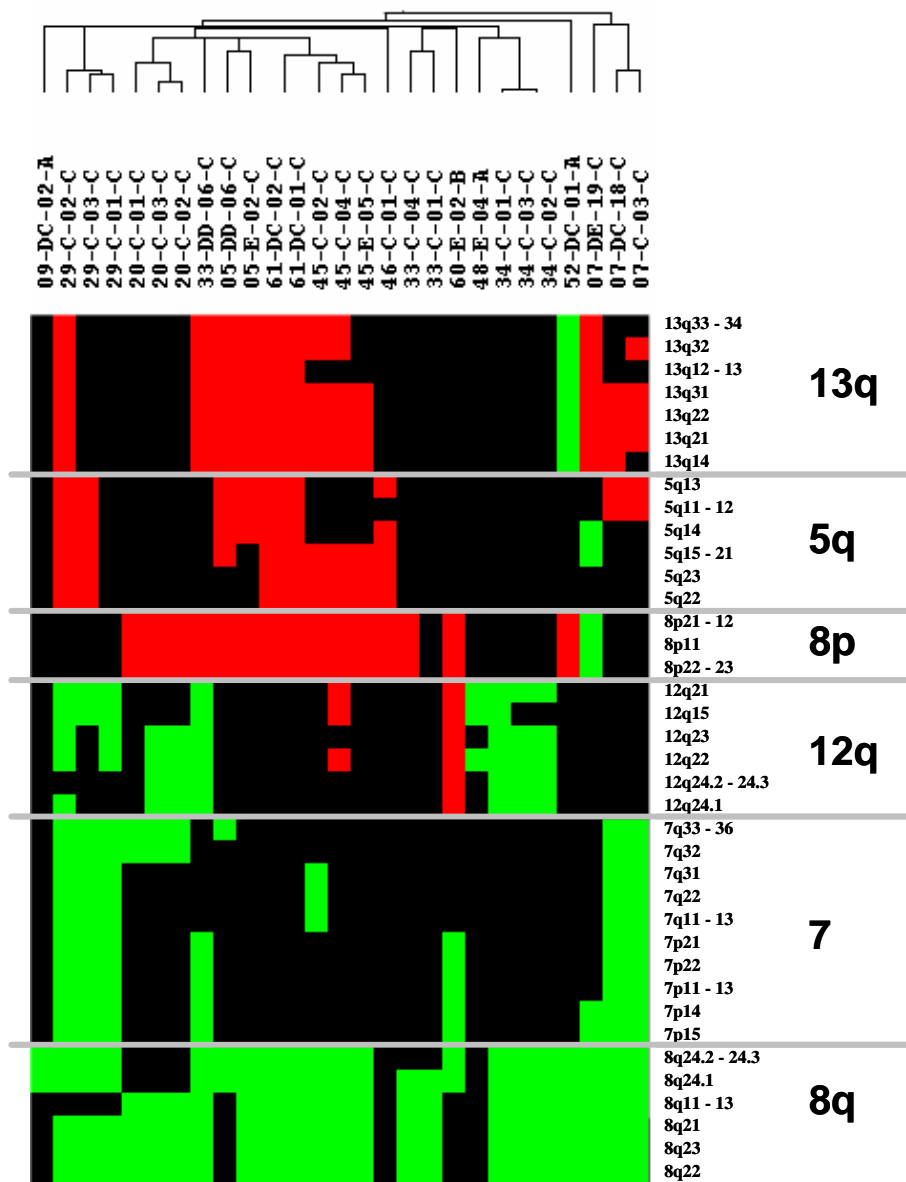


Abbildung 25 Klassifikation von M1-Zellen nach genomischen Aberrationen

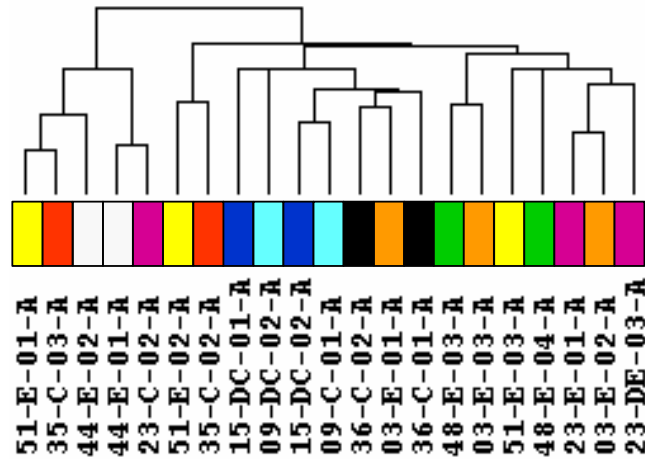
Der Ausschnitt der hierarchischen Clusteranalyse stellt den Endast mit den meisten Zellen aus M1-Patienten dar. Oben ist die Verwandtschaft der Zellen im Dendrogramm dargestellt und jede Zelle ist mit dem sie definierenden Code angegeben (C an letzter Stelle codiert das klinische Stadium M1). Rechts sind die genomischen Aberrationen aufgetragen, die die dargestellte Gruppe an disseminierten Tumorzellen definieren. Zur besseren Übersicht sind die einzelnen Chromosomen durch Querlinien voneinander getrennt. Chromosomale Gewinne sind dabei in grün, chromosomale Verluste in rot dargestellt. Besonders wichtig für die Gruppierung der M1-Zellen sind die Amplifikation auf Chromosom 8q, und die Deletionen auf 8p, 13q und 5q.

3.3.5 Heterogenität disseminierter Tumorzellen eines Patienten

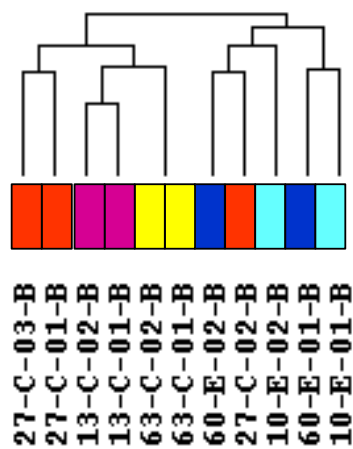
In der Klassifikation der disseminierten Tumorzellen (Abbildung 23) wird die genetische Heterogenität der Tumorzellen in den Stadien M0 und BR bereits deutlich. Um die Verwandtschaft von disseminierten Tumorzellen aus dem gleichen Patienten zu überprüfen, wurden in die folgende Clusteranalyse nur Patienten aufgenommen, in denen mehrere CGH-aberrante Zellen detektiert wurden. Um eine Überrepräsentation von ähnlichen M1-Zellen zu verhindern, wurden erneut maximal drei zufällig ausgewählte Zellen pro Patient aufgenommen. Diese zufällige Auswahl wurde erneut dreimal durchgeführt und kann im Anhang nachgeschlagen werden. Insgesamt gingen dadurch 21 Zellen von 9 M0-Patienten, 12 Zellen von 6 BR-Patienten und 29 Zellen von 11 M1-Patienten in die Analyse mit ein.

Abbildung 26 zeigt die Dendrogramme der zugehörigen Clusteranalysen getrennt für die Zellen der verschiedenen Stadien. Erneut wird deutlich, dass die M1-Zellen homogene Veränderungen aufweisen und insbesondere die Zellen eines Patienten in den meisten Fällen sehr ähnlich in ihren genomischen Veränderungen sind. Im Stadium M0 verteilen sich die Zellen eines Patienten dagegen meist auf verschiedene größere Äste des Dendrogramms und sind sehr verschieden in ihren genomischen Aberrationen. Die wenigen Patienten im Stadium BR nehmen bei der Betrachtung der Heterogenität mehrerer Zellen eines Patienten eine Art Mittelstellung ein. Zellen aus dem gleichen Patienten liegen meist direkt nebeneinander, durch die geringe Fallzahl ist eine Interpretation dieser Ergebnisse allerdings nur schwer möglich. Interessant ist zudem, dass die EpCAM-positiven Zellen im Stadium BR alle zusammen in den rechten Hauptast gruppiert werden, in dem sich sonst nur noch eine CK-positive Zelle befindet. Im Dendrogramm der M1-Patienten werden nur bei drei Patienten die gefundenen Zellen entfernt voneinander gruppiert.

M0



BR



M1

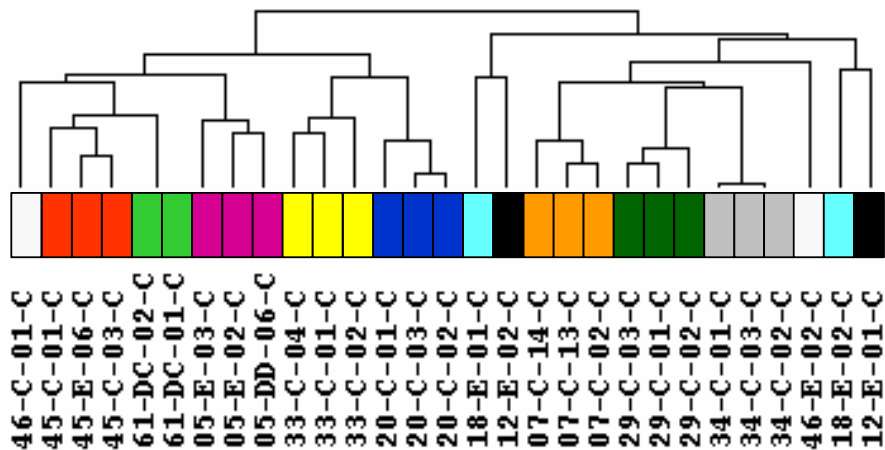


Abbildung 26 Heterogenität disseminierter Tumorzellen eines Patienten

Von allen Patienten mit mehreren CGH-aberranten Zellen wurde eine hierarchische Clusteranalyse für die einzelnen klinischen Stadien durchgeführt (M0 21 Zellen, BR 12 Zellen, M1 29 Zellen). Die Zellen eines Patienten werden für die einzelnen Stadien jeweils durch Kästchen der gleichen Farbe markiert. Man sieht deutlich, dass die Ähnlichkeit zwischen den Zellen eines Patienten mit der Progression der Erkrankung zunimmt. Während sich die Zellen eines Patienten im Stadium M0 meist über das gesamte Dendrogramm verteilen, liegen die Zellen aus den meisten Patienten im Stadium M1 direkt nebeneinander.

3.4 Vergleich zwischen disseminierten Tumorzellen und Primärtumor

Bei der genomischen Analyse der disseminierten Tumorzellen spielt der Vergleich mit dem zugehörigen Primärtumor eine wichtige Rolle. Durch die verwandtschaftliche Beziehung zum resezierten Prostatakarzinom könnten klonaler Ursprung der Zellen und ektoper Entwicklung der Zellen bis hin zur Metastase näher beleuchtet werden. Interessant dabei ist auch, ob sich die deutlichen Unterschiede der genomischen Veränderungen in M1-Zellen zu den M0- und BR-Zellen bereits im Primärtumor zeigen, oder ob sie eher auf eine unabhängige Entwicklung und Expansion dieser Zellen im Knochenmark zurückzuführen sind.

Ein weiterer Punkt bei diesen Analysen war auch der Vergleich verschiedener Areale eines Primärtumors. Um zu klären, ob Regionen aus verschiedenen Teilen des Tumors unterschiedliche genomische Aberrationen aufweisen, wurde Gewebe aus bis zu drei Arealen pro Schnitt gelasert. Von den insgesamt 16 untersuchten Primärtumoren konnten auf diesem Weg bei vier Patienten drei Tumorareale und bei 5 Patienten zwei Tumorareale untersucht werden.

Abbildung 27 zeigt die durch die CGH gefundenen Gewinne und Verluste in Histogrammen. Im Durchschnitt fanden sich 7,3 CGH-Veränderungen, davon 3,4 Deletionen und 3,9 Amplifikationen pro Tumorareal. Während die absolute Zahl an Veränderungen der von M0-Zellen entspricht, hat sich das Verhältnis von Verlusten und Gewinnen auf die Seite der Amplifikationen verschoben (0,88). Deutlich ist damit auch die höhere Zahl an Veränderungen in den disseminierten M1-Zellen im Vergleich zu den Primärtumoren. Die häufigsten Amplifikationen in Tumorarealen finden sich auf 16p (41,4%), 17p (41,4%), 19 (41,4%), 22q (41,4%), 20q (27,6%), 8q (24,1%), 17q (20,7%) und Xq (20,7%). Deletionen die bei relativ vielen Tumorarealen auftraten sind 13q (44,8%), 2q (24,1%), 8p (20,7%), 5q (17,2%), sowie 16q, 17,18q, 19q und 22q (jeweils 13,8%). Betrachtet man die Ideogramme zeigt sich ein eher homogenes Bild, ähnlich dem der M1-Zellen. So kommen die Veränderungen auf den Chromosomen 8 oder 5q auch bei den Primärtumoren vor, allerdings zu einem deutlich geringeren Prozentsatz. Die Amplifikationen auf 17q oder Xq kommen in etwa genauso häufig vor und die Veränderungen auf 13q, 16p und 19 deutlich häufiger. Auf Chromosom 2q häufen sich Deletionen während diese Region bei den M1-Zellen oft amplifiziert war und auf dem Chromosomenarm 17p treten deutlich mehr Amplifikationen als Deletionen auf.

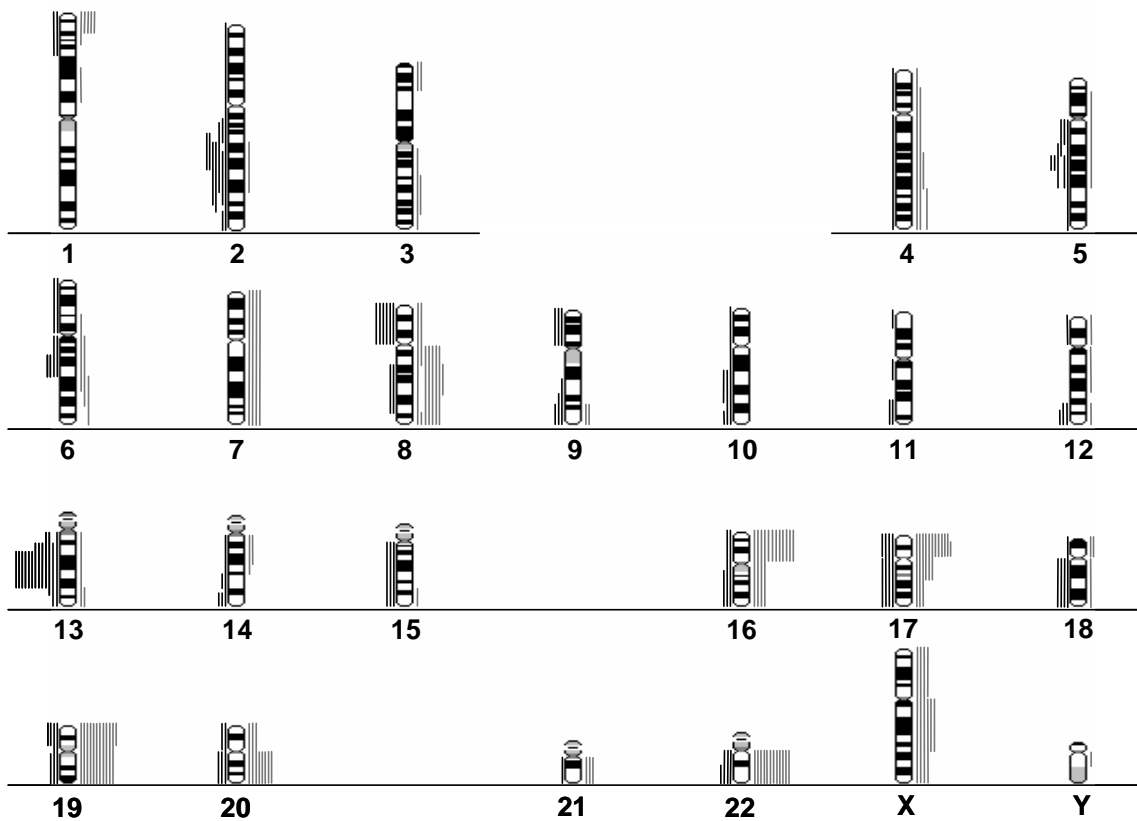


Abbildung 27 CGH-Ergebnisse der untersuchten Areale aus Primärtumoren

Neben den Ideogrammen sind links die Deletionen jedes Tumors als schwarze Striche dargestellt, die Amplifikationen entsprechend rechts als graue Striche. Das Schema spiegelt die Veränderungen aller untersuchten Tumorareale wieder.

Um die Verwandtschaftsverhältnisse der Tumorareale eines Patienten zu untersuchen, wurde eine hierarchische Clusteranalyse mit allen genomischen Veränderungen der Areale durchgeführt (Abbildung 28). Die am weitesten rechts gelegene Gruppe definiert sich vor allem durch Amplifikationen auf dem X-Chromosom bei insgesamt eher weniger Aberrationen, während das linke Cluster die Tumoren mit den meisten Aberrationen beinhaltet, wobei Deletionen auf 17 und 19 in fast allen bis auf jeweils einem Areal vorkommen. Im großen mittleren Cluster sind Amplifikationen auf 17, 19 und 22 besonders häufig. Die beiden relativ einzeln stehenden Areale in der Mitte links haben nur sehr wenige Aberrationen. Andere häufige Aberration in Primärtumoren, wie die Amplifikation von 8q oder die Deletion von 13q kommen in allen Gruppen vor. Auffällig ist, dass es bei Patienten mit mehreren analysierten Arealen sowohl Tumoren gibt, deren Areale eng verwandt, als auch 2 Fälle, von denen ein Areal sogar im jeweils entgegen gesetzten Ast des Dendrogramms liegt (Abbildung 28).

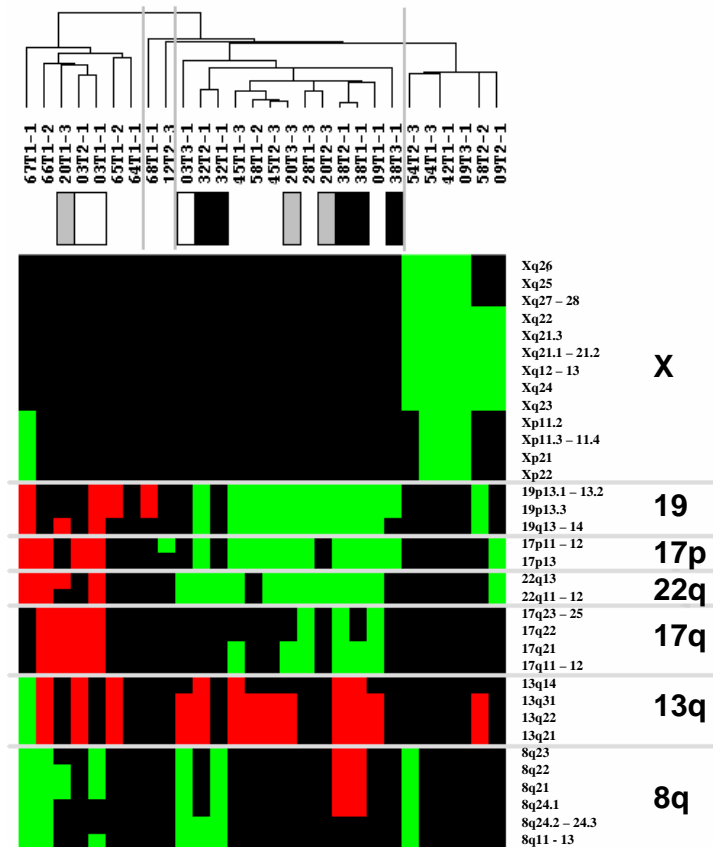


Abbildung 28 Ähnlichkeitsanalyse der Primärtumoreareale

Das Dendrogramm gibt die Verwandtschaftsverhältnisse aller CGH-veränderten Tumoreareale an. Der Zifferncode erlaubt eine Zuordnung zu den einzelnen Patienten. Die schwarzen Kästchen geben zwei Primärtumoren mit mehreren Arealen an, die alle eng miteinander verwandt sind. Die grauen und weißen Kästchen zeigen Primärtumoren, deren Arealen sogar auf zwei Hauptäste verteilt sind. Rechts sind die genomischen Aberrationen aufgetragen, die die dargestellten Gruppen an Tumorearealen definieren. Zum besseren Verständnis sind die einzelnen Chromosomen durch Querlinien voneinander getrennt. Chromosomale Gewinne sind dabei in grün, chromosomale Verluste in rot dargestellt. Besonders wichtig für die Gruppierung der Tumoreareale sind die Chromosomen X, 19, 17 und 22. Die häufige Amplifikation auf Chromosom 8q, und die Deletionen auf 13q kommen in allen Gruppen vor.

Anschließend wurden die Primärtumoren zusammen mit den zugehörigen disseminierten Tumorzellen eines Patienten auf ihre Verwandtschaft hin untersucht. Abbildung 29 zeigt das zugehörige Dendrogramm und für die Gruppierung wichtige chromosomale Veränderungen. Vertikale Linien sollen die größten Äste im Dendrogramm voneinander abgrenzen. Es fällt auf, dass die meisten Primärtumoren im zweiten großen Ast des Clusters liegen, während die meisten Einzelzellen im linken Ast zu finden sind. Zwischen verschiedenen Tumorearealen und Einzelzellen des gleichen Patienten zeigt sich erneut eine große Heterogenität in den genomischen Aberrationen. Abbildung 29 zeigt auch die genomischen Aberrationen, die hauptsächlich für die Trennung zwischen Primärtumoren und disseminierten Tumorzellen verantwortlich sind. Amplifikationen der Chromosomen 17, 19 und 22 und Deletionen von 13q treten vor allem im Ast mit dem Großteil der

Primärtumoren auf, während der Ast mit dem Großteil der Einzelzellen durch Deletionen der Chromosomen 16q, 17p, 19 und 22q definiert wird. Die in M1-Zellen häufigen Veränderungen auf Chromosom 8 finden sich in beiden Clustern.

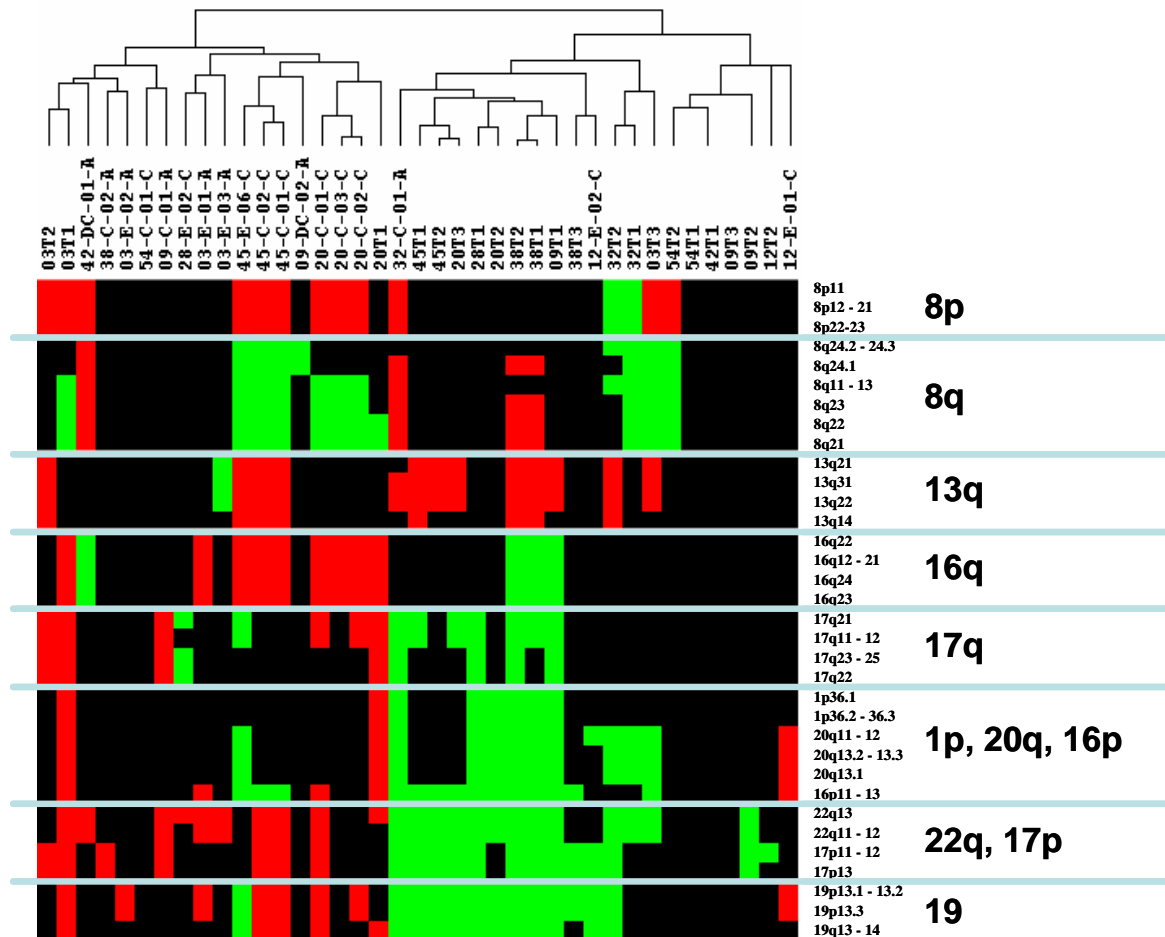


Abbildung 29 Ähnlichkeitsanalyse von Primärtumoren und Einzelzellen

Dargestellt ist das Verwandtschaftsverhältnis aller CGH-untersuchten Tumorareale und der zugehörigen Einzelzellen (Complete linkage Clustering). Die Codierung identifiziert die untersuchte Zelle bzw. das untersuchte Tumorareal. Vertikale Linien verdeutlichen die Hauptäste des Dendrogramms, horizontale Linien die für die Aufteilung wichtigsten Chromosomenregionen. Es zeigt sich eine deutliche Trennung zwischen dem Großteil der Tumorareale und dem Großteil der Einzelzellen. Die vier Präparate ganz links zeigten keine Aberrationen in der CGH.

4 Diskussion

Die Frequenz Zytokeratin-positiver Zellen steigt mit der Krankheitsprogression

Die prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom konnte durch immunzytochemische Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper A45-B/B3 gezeigt werden, der gegen ein gemeinsames Epitop der Zytokeratine 8, 18 und 19 bindet (Weckermann, Muller et al. 2001). Aus diesem Grund wurde dieser Antikörper auch in der vorliegenden Dissertation zum Nachweis Zytokeratin-positiver Zellen eingesetzt. Unspezifische Reaktionen individueller Proben wurden mit der Isotypkontrolle (MOPC 21) detektiert. Der Anteil der positiven Isotypkontrollen betrug 9,0%, was vergleichbar mit veröffentlichten Daten ist (Schlimok, Funke et al. 1987; Pantel, Felber et al. 1994; Braun, Pantel et al. 2000). Für die mit dem A45-Direktkonjugat gefärbten Präparate konnte aufgrund der geringen Zellzahl, die aus den Aspiraten isoliert wurde, keine Negativkontrolle durchgeführt werden. Die höhere Spezifität des Direktkonjugats wurde in zwei Studien an insgesamt 238 Präparaten gezeigt, bei denen in keinem Fall eine falsch positive Zelle detektiert wurde (Leinung, Wurl et al. 2000; Schmidt-Kittler 2003).

Die Fallzahl der gegen Zytokeratin gefärbten Präparate dieser Dissertation ist mit 660 Punktationen deutlich größer als die Kollektive früherer Arbeiten. Die Frequenz der Zytokeratin-positiven Zellen lag mit insgesamt 21,5% im Rahmen veröffentlichter Studien, in denen in 18-33% der Punktate Zytokeratin-positive Zellen gefunden werden konnten (Oberneder, Riesenbergl et al. 1994; Weckermann, Wawroschek et al. 1999; Vagunda, Landys et al. 2001; Lilleby, Nesland et al. 2003). Bei unbehandelten Patienten ohne Fernmetastasen beschreibt eine Arbeit eine mit 54,4% deutlich höhere Nachweisrate von CK-positiven Zellen im Knochenmark (Pantel, Aignherr et al. 1995). Allerdings wurden in dieser Studie pro Patient 2 Millionen Zellen gefärbt und die Prostatatumoren waren allesamt im fortgeschrittenen Tumorstadium T3 oder T4. Die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede in der Detektionsrate zwischen den drei klinischen Stadien M0 (19,6%), BR (21,4%) und M1 (37,8%) zeigen, dass die Frequenz Zytokeratin-positiver Zellen mit der Progression der Krebserkrankung ansteigt (siehe Tabelle 8).

In der vorliegenden Dissertation wurden zahlreiche KM-Aspirate im Rahmen der klinischen Nachsorge gewonnen. In einer Studie zum Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass eine Persistenz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark nach der Operation mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert ist (Janni, Rack et al. 2005). Da auch das Prostatakarzinom ein bevorzugt in den Knochen metastasierender Tumor ist, könnte einem wiederholten Nachweis epithelialer Tumorzellen eine ähnliche prognostische Bedeutung zukommen.

EpCAM-positive Zellen im Knochenmark sind Tumorzellen

In dieser Arbeit wurden außerdem insgesamt 328 Knochenmarkpunktate auf EpCAM-positive Zellen hin untersucht, von denen in 39 Fällen (11,9%) Zellen detektiert werden konnten. Wie auch bei der Färbung gegen Zytokeratin stieg der Anteil gefärbter Punktate mit dem Auftreten von Fernmetastasen deutlich an (33,3%). Außerdem deutete sich, wenn auch nicht signifikant, ein Unterschied in der relativen Häufigkeit EpCAM-positiver Tumorzellen zwischen den Stadien M0 (9,1%) und BR (13,5%) an. Die bisher einzigen veröffentlichten Daten zur Frequenz EpCAM-positiver Zellen im Knochenmark von Prostatakarzinompatienten berichten je nach Patientengruppe von 60-90% positiven Befunden (Ellis, Pfitzenmaier et al. 2003). Die Färbungen dieser Studie wurden allerdings nach Anreicherung epithelialer Zellen über paramagnetische Beads durchgeführt. Auch in Vorarbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden EpCAM-positive Zellen über Beads angereichert und schließlich in 41,2% der untersuchten Knochenmarkpunktate detektiert. Interessant ist, dass Patienten anderer Karzinomtypen deutlich seltener EpCAM-positive Zellen im Knochenmark aufwiesen (Ellis, Pfitzenmaier et al. 2003). Für Patientinnen mit Mamma-Karzinom konnte eine Korrelation zwischen dem Auftreten EpCAM-positiver Zellen im Knochenmark und dem Stadium der Patientinnen gefunden werden (Choemmel, Pierga et al. 2004).

Die prognostische Bedeutung Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom wurde für den A45-Antikörper zwar gezeigt, spielt aber gegenüber etablierten Prognosefaktoren nur eine untergeordnete Rolle (Weckermann, Muller et al. 2001). Ein Hauptziel dieser Arbeit war deswegen der Vergleich der Zytokeratin-Färbung mit der Detektion disseminierter Zellen über das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM. Die Frequenz EpCAM-positiver Zellen im Knochenmark war zumindest bei Patienten im Stadium M0 deutlich geringer als die Zytokeratin-positiver Zellen ($p < 0,02$, Chi-Quadrat). Die insgesamt geringe Rate EpCAM-positiver Punktate könnte auf die geringere Sensitivität der indirekten Immunfluoreszenz mit dem Anti-Maus-Cy3-Antikörper im Gegensatz zur üblichen Kopplung an einen Anti-Maus-PE-Antikörper zurückzuführen sein. Es wurde gezeigt, dass einige sehr seltene hämatopoetische Knochenmarkzellen EpCAM exprimieren (Lammers, Giesert et al. 2002; Choemmel, Anract et al. 2004). Diese schwach positiven Zellen wurden über den stärker fluoreszierenden PE-Antikörper ebenfalls detektiert, während der Cy3-gekoppelte Antikörper erst bei einer stärkeren Expression von EpCAM sichtbar wurde (Klein, Seidl et al. 2002).

Durch die Untersuchung der isolierten Zellen auf genomische Veränderungen mit der CGH konnten diese in der vorliegenden Arbeit erstmals als Tumorzellen identifiziert werden. Es zeigte sich, dass die isolierten EpCAM-positiven Zellen genauso häufig wie die isolierten Zytokeratin-positiven Zellen Aberrationen in der CGH zeigten (Abbildung 16). Außerdem kam es in EpCAM-positiven Tumorzellen häufiger zu einem Verlust spezifischer Mse-Fragmente als in Zytokeratin-

positiven Tumorzellen ($p < 0,0005$, Tabelle 13), was als Zeichen einer größeren genetischen Instabilität zu werten ist. Kontrollexperimente mit normalen Knochenmarkzellen zeigten hingegen eine gleichwertige Effizienz der Mse-Adapter-PCR für die Amplifikation genomischer DNA aus lebenden Zellen in Suspension (EpCAM-Färbung) und Zellen von Adhäsionsobjektträgern (CK-Zellen).

Zytokeratin und EpCAM identifizieren Subpopulationen disseminierter Tumorzellen

Immunzytochemische Färbungen gegen Zytokeratin nach Anreicherung EpCAM-positiver Zellen zeigten, dass nur ein geringer Prozentsatz der Zytokeratin-positiven Zellen eine Coexpression von EpCAM aufweist (Kasimir-Bauer, Otterbach et al. 2003). Bei Patientinnen mit Mammakarzinom wurde nach Anreicherung EpCAM-positiver Zellen durch eine Doppelfärbung gegen Zytokeratin und EpCAM gezeigt, dass nur 7,4% der Zytokeratin-positiven Zellen eine gleichzeitige Expression von EpCAM aufwiesen (Thurm, Ebel et al. 2003). In beiden Studien konnte demnach gezeigt werden, dass die beiden epithelialen Markermoleküle nur selten gemeinsam auf einer Zelle exprimiert werden. Vorherrschend war dabei die Interpretation, dass mit dem verwendeten EpCAM-Nachweis überwiegend Nicht-Tumorzellen detektiert wurden, wobei die Malignität der nachgewiesenen Zellen nicht näher untersucht wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass es sich sowohl bei EpCAM-, als auch bei CK-positiven Zellen im Knochenmark tatsächlich um Tumorzellen handelt. Die beiden unterschiedlichen Subpopulationen disseminierter Tumorzellen konnten direkt miteinander verglichen werden. Dies ist umso bedeutender, da Färbungen gegen Zytokeratin den Standard zum Nachweis disseminierter Tumorzellen darstellen und EpCAM als therapeutisches Zielmolekül für Patienten mit kolorektalem Karzinom im fortgeschrittenen Stadium bereits etabliert wurde (Riethmüller, Schneider-Gadicke et al. 1994; Riethmüller, Holz et al. 1998) und auch in Studien zur Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt wurde (Braun, Hepp et al. 1999).

Der in der vorliegenden Dissertation angestellte Vergleich der beiden Einfachfärbungen gegen Zytokeratin und EpCAM an 298 Präparaten zeigte, dass nur in 9/298 (3,0%) Aspiraten mit beiden Färbungen Zellen detektiert werden konnten. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei den mit den beiden Färbungen gefundenen Zellen um zwei Subpopulationen disseminierter Tumorzellen handelt. Weiterhin fand sich, dass die Fraktion der lediglich Zytokeratin-positiven Aspireate mit zunehmendem Krankheitsstadium abnimmt, wogegen die Rate EpCAM-positiver Aspireate steigt (Abbildung 10). Die Etablierung einer EpCAM/Zytokeratin-Doppelfärbung sollte die nach den Einfachfärbungen formulierte Hypothese zu verschiedenen Subpopulationen disseminierter Zellen überprüfen. Durch die Doppelfärbung an 77 Präparaten konnten über die Expression der beiden Moleküle drei verschiedene Zellgruppen definiert werden: Zellen, die nur gegen Zytokeratin (in 14,3% der Präparate) bzw. EpCAM (7,8%) gefärbt sind und Zellen, die beide Proteine exprimieren

(7,8%). Die relative Häufigkeit Zytokeratin-positiver Zellen, die ebenfalls EpCAM exprimieren ist in dieser Arbeit doppelt so hoch wie in Arbeiten zu disseminierten Zellen von Patientinnen mit Mammakarzinom (Kasimir-Bauer, Otterbach et al. 2003; Thurm, Ebel et al. 2003).

Einige Marker-positive disseminierte Tumorzellen haben keine CGH-Veränderungen

In Vergleichen der konventionellen Metaphasen-CGH mit deutlich höher auflösenden Verfahren wie LOH oder CGH-Microarray (Auflösung 40 kb) wurde gezeigt, dass mit diesen neueren Verfahren regelmäßig Veränderungen detektiert werden, die in der konventionellen CGH nicht sichtbar waren (Yano, Matsuyama et al. 2004). Durch die CGH-Analysen dieser Dissertation wurde gezeigt, dass abhängig vom Tumorstadium des Patienten ein Teil der isolierten Zellen keine Veränderungen in der Metaphasen-CGH aufwies (CK: M0 29,6%, BR 41,2% und M1 2,6%; EpCAM: M0 29,2%, BR 20,0% und M1 5,6%; vergleiche Abbildung 16). CGH-Analysen von CK-positiven Zellen aus dem Knochenmark von Patientinnen mit Mamma-Karzinom zeigten, dass 57% der Zellen von Patientinnen im Stadium M0 und 8,5% der gefärbten Zellen im Stadium M1 keine Aberrationen in der CGH aufweisen (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003). In diesen Fällen lässt sich mit der herkömmlichen CGH nicht beweisen, dass es sich hierbei tatsächlich um Tumorzellen handelt. Mit dem höher auflösendem LOH-Analysen (Loss of heterozygosity) konnten allerdings auch bei diesen Zellen Allelverluste für einzelne Markergene bewiesen werden (Schmidt-Kittler 2003). Da in der vorliegenden Arbeit keine LOH-Analysen durchgeführt wurden, lässt sich für die hier untersuchten Zellen ohne CGH-Veränderungen nicht zweifellos beweisen, dass es sich tatsächlich um Tumorzellen handelt.

Spezifische Aberrationen werden mit der Krankheitsprogression selektiert

Zunächst fand sich bei der genomischen Charakterisierung epithelialer Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom eine signifikant höhere Anzahl der CGH-Aberrationen zwischen disseminierten Tumorzellen der Patienten der Stadien M0 und BR einerseits und Patienten mit nachgewiesenen Fernmetastasen andererseits (siehe Abbildung 17). Außerdem fiel auf, dass bestimmte genomische Veränderungen deutlich häufiger in M1-Zellen auftraten. Im Einzelnen sind dabei hervorzuheben die Gewinne auf den Chromosomenregionen 8q, 12q und 7, sowie die Verluste auf 8p, 18q, 5q, 10q und 13q. Interessant dabei ist, dass diese Veränderungen mit Ausnahme der Aberrationen auf den Chromosomen 12 und 7 auch bei disseminierten Tumorzellen aus Patientinnen mit Mammakarzinom im Stadium M1 deutlich häufiger als im Stadium M0 auftreten (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003).

Der am häufigsten detektierte chromosomale Gewinn bei M1-Zellen ist auf dem langen Arm von Chromosom 8 lokalisiert. Diese Region wurde sowohl in fortgeschrittenen Stadien von Primärtumoren, als auch in Metastasen des Prostatakarzinoms immer wieder amplifiziert gefunden

(Cher, Bova et al. 1996; Nupponen, Kakkola et al. 1998). In einer Analyse von Metastasen aus Patienten mit Prostatakarzinom wurde eine Amplifikation des langen Arms von Chromosom 8 signifikant häufiger in Knochenmetastasen, als in hämatogenen Metastasen in anderen Organen beobachtet (Akers, Krijtenburg et al. 1997). Auf dieser Region liegt unter anderem das Gen *MYC*, dessen zugehöriges Protein als Transkriptionsfaktor induzierend auf Zellproliferation und -transformation wirkt (Thompson 1998) und dessen Amplifikation mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Sato, Qian et al. 1999). Eine Amplifikation dieser Chromosomenregion stellt offenkundig einen Selektionsvorteil für ein expandierendes Wachstum eines Zellklones dar. Die disseminierten Tumorzellen aus M0-Patienten weisen nur sehr selten Gewinne auf dieser Chromosomenregion auf. Bei diesen Zellen geht man davon aus, dass sie sich in einer Latenzphase befinden und erst nach langer Zeit zu proliferieren beginnen. Diese Latenzphase wurde als sogenannte „Tumour dormancy“ definiert (Willis 1952).

Tabelle 17 Häufig veränderte chromosomalen Veränderungen disseminierter Zellen und Kandidatengene mit einer möglichen Rolle beim Prostatakarzinom

Amplifikation	Kandidatengen	Publikation
2p21	EpCAM	(Poczatek, Myers et al. 1999)
7q31	MET	(Knudsen, Gmyrek et al. 2002)
8q24.1	MYC	(Jenkins, Qian et al. 1997)
11q	nicht bekannt	
12q14.3-15	MDM2	(Leite, Franco et al. 2001)
15q23-26	nicht bekannt	
17q21.1	Her2-neu	(Eder, Bektic et al. 2004)
19q13.4	PSA	(Cramer, Chang et al. 2003)
Xq11.2-12	AR	(Visakorpi, Hyytinen et al. 1995)
Deletion	Kandidatengen	Publikation
5q14-21	APC	(Brewster, Browne et al. 1994)
6q15-22	nicht bekannt	
8p21	NKX3.1	(He, Sciavolino et al. 1997)
10q23.3	PTEN	(Kwabi-Addo, Giri et al. 2001)
13q14.2	RB1	(Phillips, Barton et al. 1994)
16q22.1	E-Cadherin	(Umbas, Schalken et al. 1992)
17p13.1	TP53	(Navone, Troncoso et al. 1993)
18q21-23	DCC	(Brewster, Browne et al. 1994)
Y	SRY	(Perinchery, Sasaki et al. 2000)

Eine Amplifikation auf Chromosom 12q wurde im Zusammenhang mit Osteosarkomen und anderen nicht-epithelialen bereits häufiger beschrieben. Mögliche Gene, denen vor diesem Hintergrund gerade bei der Bildung von Knochenmetastasen eine zentrale Bedeutung zukommen könnte, sind *CDK4* oder *MDM2* (Khatib, Matsushime et al. 1993; Reifenberger, Reifenberger et al. 1994). Das Genprodukt von *MDM2* ist ein Inhibitor von p53, indem es dessen transkriptionelle Aktivität und Stabilität moduliert (Momand, Wu et al. 2000). Gegen *MDM2* wurden bereits therapeutische Antisense-Konstrukte entwickelt, die androgen-unabhängige Tumorzellen des

Prostatakarzinoms wieder anfällig für Apoptose machen sollen (Bianco, Caputo et al. 2004; Mu, Hachem et al. 2004; Mu, Hachem et al. 2004). Auch auf den anderen häufig veränderten Regionen wurden Gene identifiziert, deren Amplifikation oder Deletion im Prostatakarzinom als relevant beschrieben wurde oder in Zusammenhang mit der Entstehung von Knochenmetastasen zu bringen ist (Tabelle 17).

EpCAM und Zytokeratin-positive Zellen zeigen unterschiedliche genomische Veränderungen

Beim Vergleich Zytokeratin-positiver und EpCAM-positiver Zellen wurde deutlich, dass sich diese beiden Subpopulationen gerade im Stadium BR deutlich voneinander unterscheiden. In diesem Stadium zeigten EpCAM-positive Zellen häufiger chromosomale Veränderungen in der CGH und durchschnittlich auch deutlich mehr Aberrationen pro Zelle.

Die beiden Subpopulationen disseminierter Tumorzellen zeigten außerdem Unterschiede in den detektierten spezifischen Aberrationen. Besonders deutlich wurde dies an den Chromosomen 17, 19 und Y. In allen klinischen Stadien zeigte sich, dass Zytokeratin-positive Zellen häufig Verluste auf den Chromosomenregionen 17p, 19 und Y zeigten, die in EpCAM-positiven Zellen nur sehr selten gefunden wurden. Stattdessen wiesen EpCAM-positive Zellen häufiger Amplifikationen auf 17q und von Chromosom 19 auf. Im Stadium M1 zeigte sich, dass Zytokeratin-positive Zellen verschiedener Patienten untereinander homogenere Aberrationsmuster zeigten. M1-Zellen aus beiden Subpopulationen zeigten viele der im vorigen Absatz als „M1-typisch“ beschriebenen Veränderungen (Amplifikation auf 8q, Deletionen auf 5q, 6q, 8p und 13q). Andere Veränderungen, wie die Deletionen auf 16q, 17p und 18q, die in vielen Zytokeratin-positiven M1-Zellen zu finden waren, fehlten dagegen in den meisten EpCAM-positiven M1-Zellen. Dafür zeigten EpCAM-positive Zellen gehäuft Amplifikationen von 11q, 15q, 17q und 19q, die nur selten in Zytokeratin-positiven Zellen gefunden wurden. Gene auf diesen Regionen, die möglicherweise eine Rolle im Prozess der Disseminierung und Proliferation von Tumorzellen stehen könnten, sind in Tabelle 17 aufgelistet (siehe oben).

Genomische Instabilität und Heterogenität

Die genomische Charakterisierung der 16 untersuchten Primärtumoren sollte Aufschlüsse über Ursprung und Entwicklung der disseminierten Tumorzellen geben. Da aus einigen Tumoren mehrere Areale durch Lasermikrodissektion gewonnen wurden, konnte gleichzeitig in diesen Fällen die Heterogenität des Primärtumors selbst analysiert werden. Die CGH-Analysen zeigten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Primärtumoren, was bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurde (Beheshti, Vukovic et al. 2002). Die deutlichen Unterschiede der chromosomalen Veränderungen zwischen verschiedenen Tumorarealen desselben Patienten (siehe Abbildung 28) legen den Schluss nahe, dass einzelne Areale eines Tumors eine unterschiedliche

Tumorevolution durchlaufen. Die Zellen eines Areals häufen im Laufe der Zeit Aberrationen an, die ihnen einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Zellen bieten. Diese Hypothese ist gerade beim Prostatakarzinom plausibel, da die Tumoren häufig langsam über viele Jahre expandieren.

Die CGH-Analysen der disseminierten Tumorzellen zeigten, dass die durchschnittliche Anzahl an Aberrationen pro Tumorzelle mit der Krankheitsprogression ansteigt. Dabei wurden spezifische Aberrationen mit dem Stadium M1 selektiert. Dagegen waren die M0-Zellen sehr unterschiedlich in ihren Aberrationsprofilen und es zeigte sich ein sehr heterogenes Bild der genomischen Veränderungen, was auch an disseminierten Tumorzellen im Stadium M0 in einer Vielzahl epithelialer Tumoren gezeigt werden konnte (Klein, Blankenstein et al. 2002; Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003). Abbildung 30 gibt einen schematischen Überblick der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse. Dabei wird sowohl die Veränderung disseminierter Tumorzellen mit der Progression der systemischen Krebserkrankung deutlich, als auch Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Subpopulationen disseminierter Tumorzellen.

Die Entstehung von Metastasen abseits vom Primärtumor kann nicht ohne weiteres in das von Vogelstein entworfene Modell der linearen Tumorprogression integriert werden (Vogelstein, Fearon et al. 1988). Ein Unterschied zwischen den chromosomalen Veränderungen von Metastasen und dem Primärtumor eines Patienten wurde bereits in früheren Studien zu Mammakarzinom (Kuukasjarvi, Karhu et al. 1997; Pandis, Teixeira et al. 1998), Blasenkarzinom (Hovey, Chu et al. 1998), Nierenzellkarzinom (Bissig, Richter et al. 1999) und kolorektalem Karzinom (Al-Mulla, Keith et al. 1999) in mehreren Fällen gefunden.

Beim Vergleich der disseminierten Tumorzellen mit dem zugehörigen Primärtumor fand sich in keinem Fall eine vollständige Übereinstimmung der Aberrationsmuster. Ganz im Gegenteil: der Unterschied der genomischen Aberrationen eines Primärtumors zu den disseminierten Tumorzellen des gleichen Patienten war deutlicher als zu den Primärtumoren anderer Patienten. Dies legt eine frühe Disseminierung der im Knochenmark detektierten Zellen nahe. Nach einer zum Teil Jahre andauernden Latenzphase der Zellen, kommt es irgendwann zur erneuten Proliferation bestimmter Klone, die spezifische Aberrationen angehäuft haben und dann zur Metastase auswachsen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine frühe Disseminierung verschiedener Populationen von Tumorzellen ins Knochenmark hin, denen möglicherweise ein unterschiedlicher Stellenwert bei der metastatischen Progression der Krebserkrankung zukommen könnte.

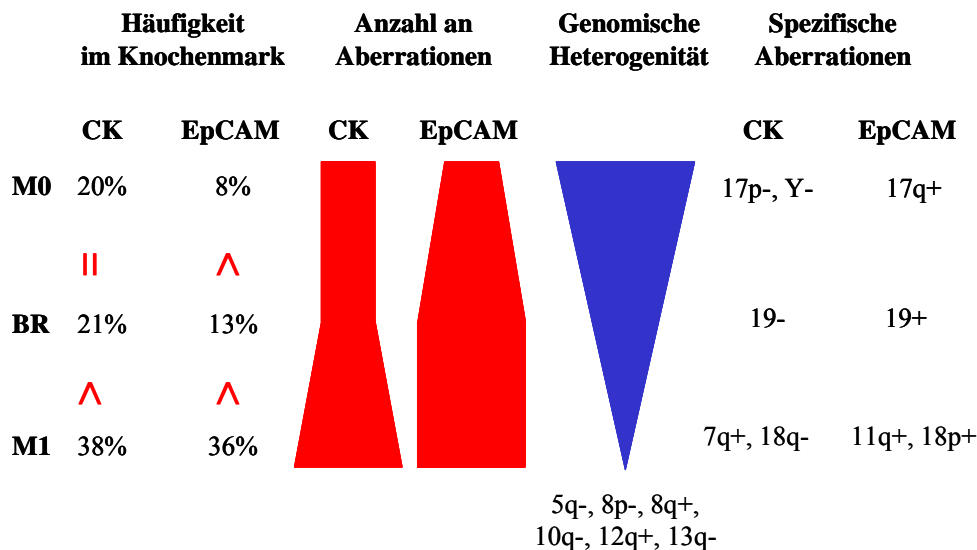


Abbildung 30 Unterschiede zwischen CK- und EpCAM-positiven Tumorzellen

Die Abbildung fasst die Unterschiede zwischen den Subpopulationen disseminierter Tumorzellen zusammen. Dabei wird deutlich, dass die Häufigkeit im Knochenmark und die Anzahl gefundener CGH-Aberrationen für EpCAM-positive Zellen mit der Progression der Krebserkrankung in allen drei klinischen Stadien ansteigen. Der Anhäufung von Aberrationen mit dem Stadium M1 steht eine Abnahme der genomischen Heterogenität und eine Selektion spezifischer Veränderungen gegenüber. In allen klinischen Stadien konnten Unterschiede in den chromosomalen Unterschieden zwischen den beiden Subpopulationen detektiert werden.

Krebsstammzellen bei der Entstehung epithelialer Tumoren

Stammzellen haben das Potential sich selbst zu erneuern, expansiv zu proliferieren und in eine Vielzahl spezialisierter Zelltypen zu differenzieren (Reya, Morrison et al. 2001). Der Begriff der Krebsstammzellen wurde für hämatopoetische Tumoren bereits vor einiger Zeit eingeführt (Park, Bergsagel et al. 1971). Für die akute myeloische Leukämie wurde propagiert, dass die Krebserkrankung durch die Akkumulation von Mutationen in hämatopoetischen Stammzellen entsteht (Lapidot, Sirard et al. 1994; Bonnet und Dick 1997; Miyamoto, Weissman et al. 2000). Die Übertragung der Stammzell-Hypothese auf solide Tumoren wurde bereits Ende der 1970er Jahren erstmals diskutiert (Hamburger und Salmon 1977). Eine Deregulierung zahlreicher Signalwege mit großer Bedeutung für die Selbsterneuerung von Stammzellen (z.B. Notch-, Wnt- oder Sonic hedgehog-Signalweg) wird immer wieder in Karzinomen beschrieben (Taipale und Beachy 2001). In jüngster Zeit wird die Stammzell-Hypothese im Zusammenhang mit epithelialen Tumoren verstärkt diskutiert, da gezeigt wurde, dass nur ein geringer Anteil der Tumorzellen aus Mammakarzinomen die Fähigkeit besitzt neue Tumoren zu gründen (Al-Hajj, Wicha et al. 2003; Dontu, Al-Hajj et al. 2003). Das Vorkommen einer relativ kleinen Population von Krebsstammzellen in epithelialen Tumoren, die den Tumor durch ihre ständige Selbsterneuerung unterhalten, hätte große Bedeutung für die Bewertung der durchgeführten Therapie epithelialer Tumoren und die Entwicklung neuer Therapiestrategien (Al-Hajj, Becker et al. 2004).

EpCAM ist ein Marker für nicht terminal differenzierte Prostatazellen

In der vorliegenden Arbeit wurden durch eine immunzytochemische Doppelfärbung gegen die epithelialen Marker Zytokeratin und EpCAM Subpopulationen disseminierter Tumorzellen definiert (vergleiche Abbildung 11). Für die Zytokeratine 8,18 und 19 wurde gezeigt, dass sie vor allem in terminal differenzierten Prostatazellen exprimiert werden (Robinson, Neal et al. 1998; Wang, Hayward et al. 2001). Unter diesen Gesichtspunkten könnte der Verlust von Markern der terminalen Differenzierung epithelialer Zellen gerade beim Prostatakarzinom eine große Rolle spielen. In einer immunzytochemischen Studie mit dem Zytokeratin-Antikörper AE1/3, der unter anderem auch gegen die Zytokeratine 8 und 19 gerichtet ist, wurde gezeigt, dass viele der Zellen in Knochenmetastasen keine Expression von Zytokeratin aufweisen (Cheville, Tindall et al. 2002).

EpCAM wurde dagegen in vielen epithelialen Geweben vor allem in noch nicht ganz ausdifferenzierten Zellen nachgewiesen (Tarmann, Dohr et al. 1990; Cirulli, Crisa et al. 1998; de Boer, van Krieken et al. 1999). Eine Überexpression bzw. neu initiierte Expression von EpCAM wurde für fast alle epithelialen Gewebe mit der Entstehung eines Karzinoms beschrieben (Winter, Nagtegaal et al. 2003). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass gerade die Regionen mit gesteigerter Proliferation verstärkt EpCAM exprimieren (Litvinov, van Driel et al. 1996), wofür auch die Induktion von c-myc durch EpCAM spricht, was Zellen zur Proliferation anregt (Munz, Kieu et al. 2004). EpCAM führt ebenfalls zu einer Neustrukturierung des Aktin-Zytoskeletts der Epithelzellen und zur Bildung von Stressfasern (Guillemot, Naspetti et al. 2001), und reguliert die starken Bindungen des epithelialen Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin (Litvinov, Balzar et al. 1997), was die Disseminierung von Epithelzellen erleichtern könnte.

Auch für Karzinome der Prostata wurde belegt, dass fast 100% der Tumoren EpCAM exprimieren (Winter, Nagtegaal et al. 2003). Dabei kommt es in hormonrefraktären Karzinomen sogar noch zu einer Steigerung der EpCAM-Expression gegenüber hormonsensitiven Prostatakarzinomen (Went, Lugli et al. 2004). Weiterhin interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in etwa 10% aller Prostatakarzinome größere Zellnester von neuroendokrinen Zellen identifiziert wurden (Cohen, Arber et al. 1994; Abrahamsson 1996; di Sant'Agnese und Cockett 1996), die aus pluripotenten Vorläuferzellen der Prostata entstehen (Bonkhoff, Stein et al. 1995). Neuroendokrine Zellen sind hormoninsensitiv (Bonkhoff, Stein et al. 1993) und ihr Vorkommen korreliert mit einer schlechteren Prognose (Weinstein, Partin et al. 1996) und dem deutlich häufigeren Auftreten von Knochenmetastasen (Tarle, Ahel et al. 2002). Ein Zusammenhang zwischen EpCAM und einer neuroendokrinen Umdifferenzierung von Prostatakarzinomen wurde bisher noch nicht untersucht. Es konnte aber gezeigt werden, dass EpCAM eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der endokrinen Inselzellen im Pankreas spielt (Cirulli, Crisa et al. 1998). Die Expressionsanalyse EpCAM-positiver disseminierter Tumorzellen könnte dabei einen möglichen Zusammenhang

zwischen EpCAM und einer neuroendokrinen Umdifferenzierung von Prostatazellen bei der Entstehung von Metastasen aufzeigen.

CK- und EpCAM-positive Tumorzellen und ihre Rolle bei der metastatischen Progression

Die Ergebnisse deuten auf verschiedene Rollen der untersuchten Subpopulationen disseminierter Tumorzellen im Rahmen der Progression des Prostatakarzinoms hin. Das häufigere Auffinden EpCAM-positiver Zellen im Stadium BR im Gegensatz zum Stadium M0 spricht für einen Zusammenhang dieser Zellen mit einer Progression der minimal residualen Krebserkrankung. Die höhere Anzahl an aberranten Zellen und der genomischen Veränderungen pro Zelle im Gegensatz zu Zytokeratin-positiven Zellen im Stadium BR spricht ebenfalls für eine wichtige Rolle dieser Zellen bei der Initiierung und Expansion von Knochenmetastasen. Der Zusammenhang von EpCAM- und CK-Expression mit dem Differenzierungsgrad epithelialer Zellen ist insbesondere im Hinblick auf das beschriebene Modell der Krebsstammzelle als Ursprung solider Tumoren interessant. Abbildung 31 beschreibt drei denkbare Varianten, wie sich die Subpopulationen disseminierter Tumorzellen im Knochenmark in das Modell der metastatischen Progression des Prostatakarzinoms integrieren lassen.

Im einfachsten Modell stellen CK- und EpCAM-positive Zellen zwei voneinander getrennte Zellpopulationen dar, die sich unabhängig voneinander im Knochenmark entwickeln und nach der Selektion M1-spezifischer Aberrationen zu Metastasen auswachsen können (Modell 1, Abbildung 31). Da eine epitheliale Zelle viele ihrer Differenzierungsmerkmale verlieren muss, um disseminieren zu können, wäre ein weiteres Modell denkbar, in dem eine bisher unbekanntes Vorläuferzelle ins Knochenmark disseminiert und sich erst dort in CK- und/oder EpCAM-positive Zellen differenziert. Beide Subpopulationen entwickeln sich getrennt voneinander und können die Fähigkeit zur Metastasenbildung erreichen (Modell 2, Abbildung 31).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Bedeutung der EpCAM-positiven Zellen im Stadium BR und damit bei der Progression der Erkrankung hin. Denkbar wäre demnach, dass neben differenzierten CK-positiven Zellen auch EpCAM-positive Vorläuferzellen mit Stammzeleigenschaften ins Knochenmark disseminieren. Nur diese haben die Fähigkeit zur Proliferation und häufen für die Entstehung von Metastasen notwendige Chromosomenveränderungen an (z.B. $8p^-$, $8q^+$). Die Tatsache, dass im Stadium M1 häufig sehr viele CK-positive Zellen gefunden werden (vergleiche Abbildung 6), lässt sich ebenfalls in das Modell integrieren. Der zusätzliche Verlust eines Chromosoms 17, 18 oder Y könnte mit einer Differenzierung EpCAM-positiver zu CK-positiven Tumorzellen assoziiert sein (vergleiche Abbildungen 22 und 30) und diese schließlich zur Bildung einer soliden Metastase im Epithelverbund befähigen (Modell 3, Abbildung 31).

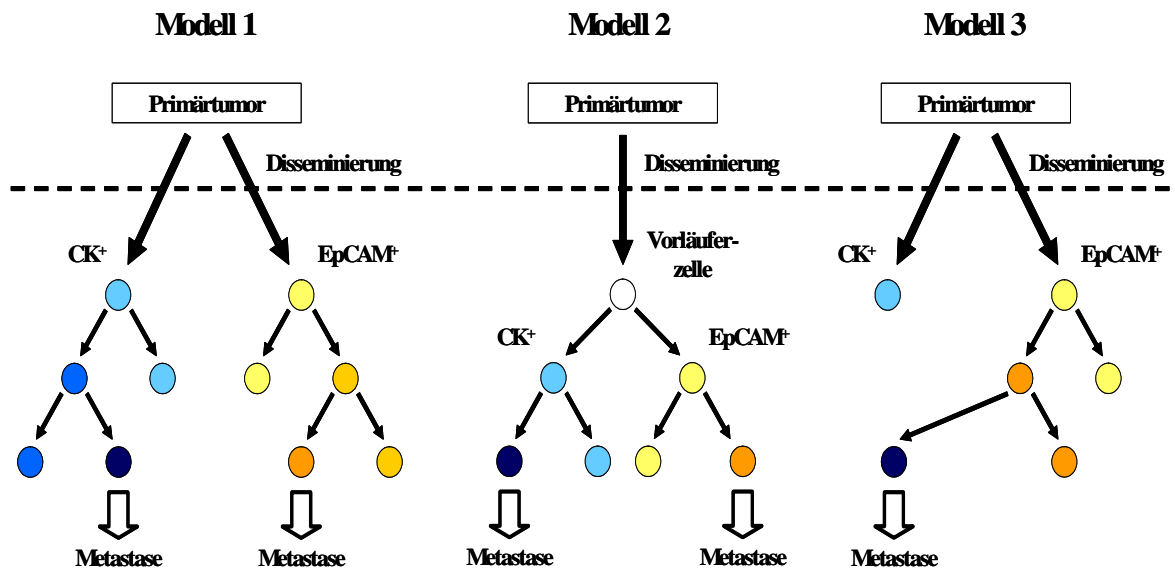


Abbildung 31 Subpopulationen disseminierter Tumorzellen im Modell der metastatischen Progression des Prostatakarzinoms

Die Abbildung gibt drei Modelle zur Bedeutung der Subpopulationen disseminierter Tumorzellen wieder. Die Kreise unter der gestrichelten Linie stehen für ins Knochenmark disseminierte Tumorzellen. Blaue Kreise symbolisieren CK-positive, gelb-orange Kreise EpCAM-positive Tumorzellen im Knochenmark. Die Intensität des Farbtönen gibt dabei die Anzahl der chromosomalen CGH-Veränderungen der disseminierten Zellen dar – je kräftiger die Farbe, desto mehr Aberrationen treten in der Zelle auf. Der weiße Kreis in Modell 2 steht für eine hypothetische disseminierte Vorläuferzelle, deren Eigenschaften nicht bekannt sind.

EpCAM-positive Tumorzellen im Knochenmark als Target in Diagnostik und Therapie

Ein weiterer Punkt, der für die Bedeutung und zusätzliche Erforschung EpCAM-positiver disseminierter Tumorzellen spricht ist die potentielle Therapiemöglichkeit. Klinische Studien zeigten bereits die Bedeutung einer Behandlung mit dem EpCAM-Antikörper Panorex (Edrecolomab) bei Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium Dukes C auf (Riethmuller, Schneider-Gadicke et al. 1994; Riethmuller, Holz et al. 1998). Auch in Arbeiten zur Reduzierung von Mikrometastasen und EpCAM-positiver Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom wurde ein Einsatz von Panorex vorgeschlagen (Braun, Hepp et al. 1999; Kirchner, Gerhards et al. 2002) In einem Mausmodell zum Mammakarzinom konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Häufigkeit von Lungenmetastasen und die Größe der Primärtumoren durch einen monoklonalen Antikörper gegen EpCAM deutlich verringert werden konnte (Ruan, Scott et al. 2003).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass EpCAM als Zielantigen auch für die Antikörpertherapie von Patienten mit Prostatakarzinom eine Rolle spielen könnte. Die diskutierte Rolle von EpCAM bei der metastatischen Progression des Prostatakarzinoms spricht für einen möglichen Einsatz einer Immuntherapie gegen EpCAM. Das klinische Follow-up EpCAM-

positiver Patienten lag zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht vor, wird aber zur Zeit erhoben. Sollte sich hier ein prognostischer Effekt EpCAM-positiver Tumorzellen im Knochenmark zeigen, könnten bessere Kenntnisse über die Bedeutung EpCAM-positiver Tumorzellen im Hinblick auf die Entdifferenzierung von Prostatazellen und die Entstehung von hormonrefraktären Knochenmetastasen in Zukunft zusätzliche therapeutische Optionen für Patienten mit Prostatakarzinom eröffnen.

5 Zusammenfassung

Trotz der kurativen Resektion von primären Prostatkarzinomen entwickeln sich oftmals nach mehreren Jahren Fernmetastasen. Dies zeigt, dass nach der Operation disseminierte Tumorzellen im Körper des Patienten verbleiben und die systemische Progression dieser Zellen letztlich zum Rezidiv der Krebserkrankung führt. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Prostatakarzinompatienten mit dem mAk A45/B-B3 korreliert mit einer schlechten Prognose. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, Einblicke in die Biologie der Tumorzeldisseminierung und Metastasenentstehung zu erarbeiten. In dieser Dissertation wurde zunächst die Häufigkeit disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom durch immunzytochemische Färbungen gegen die epithelialen Markermoleküle Zytokeratin und EpCAM bestimmt. Es deutete sich im Laufe dieser Arbeit an, dass beide Moleküle unterschiedliche Subpopulationen disseminierter epithelialer Zellen detektieren. Diese Hypothese wurde durch die Etablierung einer EpCAM/CK-Doppelfärbung bestätigt.

Durch die globale Amplifikation genomischer DNA einzelner Zellen, konnten die disseminierten Tumorzellen mit der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) auf chromosomale Gewinne und Verluste hin untersucht werden. Dabei zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Tumorzellen von Patienten mit metastasiertem Karzinom (M1) und Patienten, in denen keine Fernmetastasen nachgewiesen werden konnten (M0) oder in denen lediglich ein PSA-Anstieg im Sinne eines biochemischen Rezidivs (BR) zu beobachten war. Während etwa 30% der isolierten Zellen aus Patienten der Stadien M0 und BR keine Aberrationen in der CGH zeigten, wiesen fast alle disseminierten Tumorzellen des Stadium M1 chromosomale Veränderungen auf. Auch die durchschnittliche Anzahl der detektierten Aberrationen lag bei M1-Zellen deutlich über der in den anderen Stadien. Eine Ausnahme bildeten dabei EpCAM-positive Zellen, die aus Patienten im Stadium BR isoliert wurden. Hier fanden sich ähnlich viele Aberrationen pro Zelle wie in Zellen aus dem Stadium M1. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich in M1-Zellen im Laufe der Zeit charakteristische chromosomale Veränderungen anhäufen, während die Aberrationsmuster von Zellen in anderen Stadien deutlich heterogener waren. Die Untersuchung von Primärtumoren mit der CGH zeigte eine große Heterogenität der genomischen Gewinne und Verluste zwischen verschiedenen Arealen aus dem gleichen Tumor. Beim Vergleich der Einzelzellen mit Primärtumoren des gleichen Patienten konnte gezeigt werden, dass die disseminierten Tumorzellen und die untersuchten Tumorareale sich in ihren CGH-Veränderungen deutlich voneinander unterschieden. Die Primärtumoren verschiedener Patienten waren sich dabei in den meisten Fällen in ihren chromosomalen Aberrationen ähnlicher als Tumor und disseminierte Tumorzelle des gleichen Patienten.

Die gewonnenen Ergebnisse unterstützen das Modell einer frühen Disseminierung von Tumorzellen, die sich dann unabhängig vom Primärtumor entwickeln und zu Metastasen auswachsen. Mit der Progression zum Stadium M1 werden bestimmte genomische Veränderungen in den Zellen selektiert, die eine Expansion in manifeste Metastasen offensichtlich begünstigen. Erstmals wurde gezeigt, dass EpCAM-positive Zellen im Knochenmark eine eigene Tumorzellpopulation darstellen, die sich auch in ihren genomischen Veränderungen von der Subpopulation CK-positiver Zellen unterscheidet. Die signifikant größere Anzahl genomischer Aberrationen pro Zelle im Stadium BR könnte auf eine wichtige Rolle der Subpopulation EpCAM-positiver disseminierter Tumorzellen bei der frühen Entwicklung von Knochenmetastasen hindeuten. Die Ergebnisse dieser Dissertation sprechen für eine weitergehende Analyse EpCAM-positiver disseminierter Tumorzellen. Sollten sich die Ergebnisse im klinischen Follow-Up der Patienten mit EpCAM-positiven Zellen im Knochenmark bestätigen, stellt diese Subpopulation disseminierter Tumorzellen ein Target für eine Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper Edrecolomab (Panorex) dar.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamsson, P. A. (1996). "Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer." Prostate Suppl **6**: 3-8.
- Alers, J. C., P. J. Krijtenburg, et al. (1997). "Interphase cytogenetics of prostatic tumor progression: specific chromosomal abnormalities are involved in metastasis to the bone." Lab Invest **77**(5): 437-48.
- Al-Hajj, M., M. W. Becker, et al. (2004). "Therapeutic implications of cancer stem cells." Curr Opin Genet Dev **14**(1): 43-7.
- 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.
- Al-Mulla, F., W. N. Keith, et al. (1999). "Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases." Genes Chromosomes Cancer **24**(4): 306-14.
- Baudis, M. und M. L. Cleary (2001). "Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data." Bioinformatics **17**(12): 1228-9.
- Beheshti, B., B. Vukovic, et al. (2002). "Resolution of genotypic heterogeneity in prostate tumors using polymerase chain reaction and comparative genomic hybridization on microdissected carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia foci." Cancer Genet Cytogenet **137**(1): 15-22.
- Berry, R., J. J. Schroeder, et al. (2000). "Evidence for a prostate cancer-susceptibility locus on chromosome 20." Am J Hum Genet **67**(1): 82-91.
- Berthon, P., A. Valeri, et al. (1998). "Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43." Am J Hum Genet **62**(6): 1416-24.
- Bianco, R., R. Caputo, et al. (2004). "Combined targeting of epidermal growth factor receptor and MDM2 by gefitinib and antisense MDM2 cooperatively inhibit hormone-independent prostate cancer." Clin Cancer Res **10**(14): 4858-64.
- Bissig, H., J. Richter, et al. (1999). "Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization." Am J Pathol **155**(1): 267-74.
- Bonkhoff, H., U. Stein, et al. (1993). "Androgen receptor status in endocrine-paracrine cell types of the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **423**(4): 291-4.
- Bonkhoff, H., U. Stein, et al. (1995). "Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells." Hum Pathol **26**(2): 167-70.
- Bonnet, D. und J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-7.
- Bostwick, D. G. (1996). "Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to early invasive adenocarcinoma." Eur Urol **30**(2): 145-52.
- Bostwick, D. G. und M. K. Brawer (1987). "Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer." Cancer **59**(4): 788-94.
- Bostwick, D. G., D. J. Grignon, et al. (2000). "Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999." Arch Pathol Lab Med **124**(7): 995-1000.
- Bostwick, D. G., A. Pacelli, et al. (1996). "Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia." Prostate **29**(2): 117-34.
- Braun, S., F. Hepp, et al. (1999). "Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow." Clin Cancer Res **5**(12): 3999-4004.
- 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., G. Schlimok, et al. (2001). "ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients." Cancer Res **61**(5): 1890-5.
- Braunwald, E., A. Fauci, et al. (2001). Harrisons's Principles of Internal Medicine, The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Breul, J., F. Zimmermann, et al. (2003). Prostatakarzinom. Urogenitale Tumoren. B. Liedl. München, W.Zuckschwerdt Verlag.
- Brewster, S. F., S. Browne, et al. (1994). "Somatic allelic loss at the DCC, APC, nm23-H1 and p53 tumor suppressor gene loci in human prostatic carcinoma." J Urol **151**(4): 1073-7.
- Bruchovsky, N., L. H. Klotz, et al. (2000). "Intermittent androgen suppression for prostate cancer: Canadian Prospective Trial and related observations." Mol Urol **4**(3): 191-9;discussion 201.
- Carter, B. S., T. H. Beaty, et al. (1992). "Mendelian inheritance of familial prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3367-71.
- Carter, B. S., G. S. Bova, et al. (1993). "Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features." J Urol **150**(3): 797-802.
- Cher, M. L., G. S. Bova, et al. (1996). "Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping." Cancer Res **56**(13): 3091-102.
- Cheville, J. C., D. Tindall, et al. (2002). "Metastatic prostate carcinoma to bone: clinical and pathologic features associated with cancer-specific survival." Cancer **95**(5): 1028-36.
- Chodak, G. W. (1989). "Early detection and screening for prostatic cancer." Urology **34**(4 Suppl): 10-2; discussion 46-56.
- Chodak, G. W., T. Keane, et al. (2002). "Critical evaluation of hormonal therapy for carcinoma of the prostate." Urology **60**(2): 201-8.
- Choesmel, V., P. Anract, et al. (2004). "A relevant immunomagnetic assay to detect and characterize epithelial cell adhesion molecule-positive cells in bone marrow from patients with breast carcinoma: immunomagnetic purification of micrometastases." Cancer **101**(4): 693-703.
- Choesmel, V., J. Y. Pierga, et al. (2004). "Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance." Breast Cancer Res **6**(5): R556-70.
- Cirulli, V., L. Crisa, et al. (1998). "KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development." J Cell Biol **140**(6): 1519-34.
- Clark, L. C., B. Dalkin, et al. (1998). "Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial." Br J Urol **81**(5): 730-4.
- Cohen, M. K., D. A. Arber, et al. (1994). "Neuroendocrine differentiation in prostatic adenocarcinoma and its relationship to tumor progression." Cancer **74**(7): 1899-903.
- Cotran, R. K., V.; Collins, T. (1999). Male Genital Tract. Robbins Pathologic Basis of Diseases. R. K. Cotran, V.; Collins, T. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 1025-1034.
- Cramer, S. D., B. L. Chang, et al. (2003). "Association between genetic polymorphisms in the prostate-specific antigen gene promoter and serum prostate-specific antigen levels." J Natl Cancer Inst **95**(14): 1044-53.
- De Angelis, G., B. Brandt, et al. (2000). "[From antigen to tumor marker. Results of research regarding PSA and its clinical applications]." Urologe A **39**(4): 309-12.
- de Boer, C. J., J. H. van Krieken, et al. (1999). "Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver." J Pathol **188**(2): 201-6.
- 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.
- Desoize, B., S. Amico, et al. (1991). "Phosphatase isoenzymes as bone metastasis markers in prostatic carcinoma." Clin Biochem **24**(5): 443-6.
- Deutsch, E., L. Maggiorella, et al. (2004). "Environmental, genetic, and molecular features of prostate cancer." Lancet Oncol **5**(5): 303-13.

- di Sant'Agnes, P. A. und A. T. Cockett (1996). "Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy." Cancer **78**(2): 357-61.
- Dietmaier, W., A. Hartmann, et al. (1999). "Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification." Am J Pathol **154**(1): 83-95.
- Dontu, G., M. Al-Hajj, et al. (2003). "Stem cells in normal breast development and breast cancer." Cell Prolif **36 Suppl 1**: 59-72.
- 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.
- Eder, I. E., J. Bektic, et al. (2004). "Genes differentially expressed in prostate cancer." BJU Int **93**(8): 1151-5.
- 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.
- Ellis, W. J., J. Pfitzenmaier, et al. (2003). "Detection and isolation of prostate cancer cells from peripheral blood and bone marrow." Urology **61**(2): 277-81.
- Frazier, H. A., J. E. Robertson, et al. (1992). "Radical prostatectomy: the pros and cons of the perineal versus retropubic approach." J Urol **147**(3 Pt 2): 888-90.
- Gann, P. H., C. H. Hennekens, et al. (1994). "Prospective study of plasma fatty acids and risk of prostate cancer." J Natl Cancer Inst **86**(4): 281-6.
- Gann, P. H., J. Ma, et al. (1999). "Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis." Cancer Res **59**(6): 1225-30.
- Gath, H. J. und R. H. Brakenhoff (1999). "Minimal residual disease in head and neck cancer." Cancer Metastasis Rev **18**(1): 109-26.
- Gibbons, R. P., R. J. Correa, Jr., et al. (1989). "Total prostatectomy for clinically localized prostatic cancer: long-term results." J Urol **141**(3): 564-6.
- Giovannucci, E., E. B. Rimm, et al. (1993). "A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer." J Natl Cancer Inst **85**(19): 1571-9.
- Gleason, D. F. (1966). "Classification of prostatic carcinomas." Cancer Chemother Rep **50**(3): 125-8.
- Gleason, D. F. (1977). The Prostate. Urologic Pathology. M. Tannenbaum. Philadelphia, Lea and Febiger: 171-198.
- Guillemot, J. C., M. Naspetti, et al. (2001). "Ep-CAM transfection in thymic epithelial cell lines triggers the formation of dynamic actin-rich protrusions involved in the organization of epithelial cell layers." Histochem Cell Biol **116**(4): 371-8.
- Hamburger, A. W. und S. E. Salmon (1977). "Primary bioassay of human tumor stem cells." Science **197**(4302): 461-3.
- Hanks, G. E., J. J. Diamond, et al. (1987). "A ten year follow-up of 682 patients treated for prostate cancer with radiation therapy in the United States." Int J Radiat Oncol Biol Phys **13**(4): 499-505.
- Hasan, W. A. und I. S. Gill (2004). "Laparoscopic radical prostatectomy: current status." BJU Int **94**(1): 7-11.
- He, W. W., P. J. Sciavolino, et al. (1997). "A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer." Genomics **43**(1): 69-77.
- Heinonen, O. P., D. Albanes, et al. (1998). "Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial." J Natl Cancer Inst **90**(6): 440-6.
- 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.
- Hermanek, P. (1994). "What's new in TNM?" Pathol Res Pract **190**(1): 97-102.
- Hodge, K. K., J. E. McNeal, et al. (1989). "Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate." J Urol **142**(1): 71-4; discussion 74-5.

- Hofer, C., P. Sauerstein, et al. (2000). "Value of free prostate-specific antigen (Hybritech Tandem-R) in symptomatic patients consulting the urologist." Urol Int **64**(1): 18-23.
- 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.
- Hovey, R. M., L. Chu, et al. (1998). "Genetic alterations in primary bladder cancers and their metastases." Cancer Res **58**(16): 3555-60.
- Hsing, A. W., Y. T. Gao, et al. (2000). "Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China." Cancer Res **60**(18): 5111-6.
- Huggins, C. und C. V. Hodges (1941). "Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate." Cancer Res **1**(1): 293-297.
- Ingles, S. A., R. K. Ross, et al. (1997). "Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor." J Natl Cancer Inst **89**(2): 166-70.
- Isaacs, J. T. (1999). "The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop?" Urol Clin North Am **26**(2): 263-73.
- 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., B. Rack, et al. (2005). "The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence." Cancer **103**(5): 884-91.
- Jauch, K. W., M. M. Heiss, et al. (1996). "Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer." J Clin Oncol **14**(6): 1810-7.
- Jenkins, R. B., J. Qian, et al. (1997). "Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization." Cancer Res **57**(3): 524-31.
- Jhaveri, F. M., C. D. Zippe, et al. (1999). "Biochemical failure does not predict overall survival after radical prostatectomy for localized prostate cancer: 10-year results." Urology **54**(5): 884-90.
- Joyce, R., M. A. Fenton, et al. (1998). "High dose bicalutamide for androgen independent prostate cancer: effect of prior hormonal therapy." J Urol **159**(1): 149-53.
- Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, et al. (1992). "Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors." Science **258**(5083): 818-21.
- Kantoff, P. W., P. G. Febbo, et al. (1997). "A polymorphism of the 5 alpha-reductase gene and its association with prostate cancer: a case-control analysis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **6**(3): 189-92.
- Karan, D., M. F. Lin, et al. (2003). "Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas." Int J Cancer **103**(3): 285-93.
- Kasimir-Bauer, S., F. Otterbach, et al. (2003). "Rare expression of target antigens for immunotherapy on disseminated tumor cells in breast cancer patients without overt metastases." Int J Mol Med **12**(6): 969-75.
- Khatib, Z. A., H. Matsushime, et al. (1993). "Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas." Cancer Res **53**(22): 5535-41.
- Kinzler, K. W. und B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-70.
- Kirchner, E. M., R. Gerhards, et al. (2002). "Sequential immunochemotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumour cells." Ann Oncol **13**(7): 1044-8.
- Kleer, E. und J. E. Oesterling (1993). "PSA and staging of localized prostate cancer." Urol Clin North Am **20**(4): 695-704.

- Klein, C. A. (1997). Anreicherung und molekulare Charakterisierung einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Karzinompatienten. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Klein, C. A., T. J. Blankenstein, et al. (2002). "Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer." Lancet **360**(9334): 683-9.
- 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, C. A., S. Seidl, et al. (2002). "Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells." Nat Biotechnol **20**(4): 387-92.
- Knudsen, B. S., G. A. Gmyrek, et al. (2002). "High expression of the Met receptor in prostate cancer metastasis to bone." Urology **60**(6): 1113-7.
- Kraus, J., K. Pantel, et al. (2003). "High-resolution genomic profiling of occult micrometastatic tumor cells." Genes Chromosomes Cancer **36**(2): 159-66.
- 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.
- Kuukasjarvi, T., R. Karhu, et al. (1997). "Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer." Cancer Res **57**(8): 1597-604.
- Kwabi-Addo, B., D. Giri, et al. (2001). "Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11563-8.
- Lammers, R., C. Giesert, et al. (2002). "Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis." Exp Hematol **30**(6): 537-45.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-8.
- Leinung, S., P. Wurl, et al. (2000). "Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma." Langenbecks Arch Surg **385**(5): 337-43.
- Leite, K. R., M. F. Franco, et al. (2001). "Abnormal expression of MDM2 in prostate carcinoma." Mod Pathol **14**(5): 428-36.
- Lilleby, W., J. M. Nesland, et al. (2003). "The prognostic impact of cytokeratin-positive cells in bone marrow of patients with localized prostate cancer." Int J Cancer **103**(1): 91-6.
- Lindemann, F., G. Schlimok, et al. (1992). "Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients." Lancet **340**(8821): 685-9.
- Litvinov, S. V., M. Balzar, et al. (1997). "Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins." J Cell Biol **139**(5): 1337-48.
- Litvinov, S. V., W. van Driel, et al. (1996). "Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation." Am J Pathol **148**(3): 865-75.
- 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.
- Middleton, R. G. (1994). "Prostate cancer." J Urol **151**(3): 655.
- Miyamoto, T., I. L. Weissman, et al. (2000). "AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7521-6.
- Momand, J., H. H. Wu, et al. (2000). "MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein." Gene **242**(1-2): 15-29.
- Mostofi, F. K., C. J. Davis, Jr., et al. (1992). "Pathology of carcinoma of the prostate." Cancer **70**(1 Suppl): 235-53.
- Mostofi, F. K. S., I.A.; Davis, C.J.Jr (2002). Histological Typing of Prostate Tumours. International Histological Classification of Tumors. W. H. O. (WHO). Berlin, Springer.

- Mu, Z., P. Hachem, et al. (2004). "Antisense MDM2 oligonucleotides restore the apoptotic response of prostate cancer cells to androgen deprivation." *Prostate* **60**(3): 187-96.
- Mu, Z., P. Hachem, et al. (2004). "Antisense MDM2 sensitizes prostate cancer cells to androgen deprivation, radiation, and the combination." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**(2): 336-43.
- Mueller, P., P. Carroll, et al. (1998). "Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate carcinoma patients are cytogenetically aberrant." *Cancer* **83**(3): 538-46.
- Munz, M., C. Kieu, et al. (2004). "The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation." *Oncogene* **23**(34): 5748-58.
- Navone, N. M., P. Troncoso, et al. (1993). "p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma." *J Natl Cancer Inst* **85**(20): 1657-69.
- Nupponen, N. N., L. Kakkola, et al. (1998). "Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas." *Am J Pathol* **153**(1): 141-8.
- Nupponen, N. N. und T. Visakorpi (2000). "Molecular cytogenetics of prostate cancer." *Microsc Res Tech* **51**(5): 456-63.
- Oberneder, R., R. Riesenberger, et al. (1994). "Immunocytochemical detection and phenotypic characterization of micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with prostate cancer." *Urol Res* **22**(1): 3-8.
- Pandis, N., M. R. Teixeira, et al. (1998). "Cytogenetic comparison of primary tumors and lymph node metastases in breast cancer patients." *Genes Chromosomes Cancer* **22**(2): 122-9.
- Pantel, K., C. Aignherr, et al. (1995). "Immunocytochemical detection of isolated tumour cells in bone marrow of patients with untreated stage C prostatic cancer." *Eur J Cancer* **31A**(10): 1627-32.
- 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. (1994). "Detection and characterization of residual disease in breast cancer." *J Hematother* **3**(4): 315-22.
- Pantel, K., J. Izbicke, et al. (1996). "Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases." *Lancet* **347**(9002): 649-53.
- Pantel, K., G. Schlimok, et al. (1993). "Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells." *J Natl Cancer Inst* **85**(17): 1419-24.
- Park, C. H., D. E. Bergsagel, et al. (1971). "Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay." *J Natl Cancer Inst* **46**(2): 411-22.
- Parra, R. O., S. Isorna, et al. (1996). "Radical perineal prostatectomy without pelvic lymphadenectomy: selection criteria and early results." *J Urol* **155**(2): 612-5.
- Patau, K. (1960). "The identification of individual chromosomes, especially in man." *Am J Hum Genet* **12**: 250-76.
- Perinchery, G., M. Sasaki, et al. (2000). "Deletion of Y-chromosome specific genes in human prostate cancer." *J Urol* **163**(4): 1339-42.
- Phillips, S. M., C. M. Barton, et al. (1994). "Loss of the retinoblastoma susceptibility gene (RB1) is a frequent and early event in prostatic tumorigenesis." *Br J Cancer* **70**(6): 1252-7.
- Pinkel, D., T. Straume, et al. (1986). "Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(9): 2934-8.
- Poczatek, R. B., R. B. Myers, et al. (1999). "Ep-Cam levels in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia." *J Urol* **162**(4): 1462-6.
- Potosky, A. L., K. Knopf, et al. (2001). "Quality-of-life outcomes after primary androgen deprivation therapy: results from the Prostate Cancer Outcomes Study." *J Clin Oncol* **19**(17): 3750-7.
- Pound, C. R., A. W. Partin, et al. (1999). "Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy." *Jama* **281**(17): 1591-7.
- 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.

- Reifenberger, G., J. Reifenberger, et al. (1994). "Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2." Cancer Res **54**(16): 4299-303.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-11.
- Riede, U. und H. Schäfer (1995). Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme.
- Riethmuller, G., E. Holz, et al. (1998). "Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial." J Clin Oncol **16**(5): 1788-94.
- Riethmuller, G., E. Schneider-Gadicke, et al. (1994). "Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group." Lancet **343**(8907): 1177-83.
- RKI (2004). Krebs in Deutschland. Saarbrücken.
- Robinson, E. J., D. E. Neal, et al. (1998). "Basal cells are progenitors of luminal cells in primary cultures of differentiating human prostatic epithelium." Prostate **37**(3): 149-60.
- Ruan, H. H., K. R. Scott, et al. (2003). "ING-1(heMAB), a monoclonal antibody to epithelial cell adhesion molecule, inhibits tumor metastases in a murine cancer model." Neoplasia **5**(6): 489-94.
- Sakr, W. A., D. J. Grignon, et al. (1994). "High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases." In Vivo **8**(3): 439-43.
- Sato, K., J. Qian, et al. (1999). "Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma." J Natl Cancer Inst **91**(18): 1574-80.
- Sattler, H. P., V. Rohde, et al. (1999). "Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer." Prostate **39**(2): 79-86.
- 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. (2003). Von einzelnen disseminierten Tumorzellen zur Metastase: Genomische Analyse der minimalen Resterkrankung des Mammakarzinoms. Fakultät für Biologie. München, Ludwig-Maximilian-Universität.
- 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.
- Shimizu, H., R. K. Ross, et al. (1991). "Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County." Br J Cancer **63**(6): 963-6.
- Smith, J. R., D. Freije, et al. (1996). "Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search." Science **274**(5291): 1371-4.
- Sokoll, L. J., D. J. Bruzek, et al. (2002). "Short-term stability of the molecular forms of prostate-specific antigen and effect on percent complexed prostate-specific antigen and percent free prostate-specific antigen." Urology **60**(4 Suppl 1): 24-30.
- Speicher, M. R., S. Gwyn Ballard, et al. (1996). "Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH." Nat Genet **12**(4): 368-75.
- Spigelman, S. S., J. E. McNeal, et al. (1986). "Rectal examination in volume determination of carcinoma of the prostate: clinical and anatomical correlations." J Urol **136**(6): 1228-30.
- Stamey, T. A. (1995). "Making the most out of six systematic sextant biopsies." Urology **45**(1): 2-12.
- Stanford, J. L., J. J. Just, et al. (1997). "Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk." Cancer Res **57**(6): 1194-8.
- 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.

- Strohmeier, D. M., A. P. Berger, et al. (2004). "Genetic aberrations in prostate carcinoma detected by comparative genomic hybridization and microsatellite analysis: association with progression and angiogenesis." *Prostate* **59**(1): 43-58.
- Swanson, G. P., M. W. Riggs, et al. (2004). "Long-term follow-up of radiotherapy for prostate cancer." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**(2): 406-11.
- Taipale, J. und P. A. Beachy (2001). "The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer." *Nature* **411**(6835): 349-54.
- Tarle, M., M. Z. Ahel, et al. (2002). "Acquired neuroendocrine-positivity during maximal androgen blockade in prostate cancer patients." *Anticancer Res* **22**(4): 2525-9.
- Tarmann, T., G. Dohr, et al. (1990). "Immunohistochemical detection of an epithelial membrane protein in rat embryos at different stages of development." *Acta Anat (Basel)* **137**(2): 141-5.
- Tavtigian, S. V., J. Simard, et al. (2001). "A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p." *Nat Genet* **27**(2): 172-80.
- Thompson, E. B. (1998). "The many roles of c-Myc in apoptosis." *Annu Rev Physiol* **60**: 575-600.
- Thurm, H., S. Ebel, et al. (2003). "Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy." *Clin Cancer Res* **9**(7): 2598-604.
- Tortola, S., R. Steinert, et al. (2001). "Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer." *J Clin Oncol* **19**(11): 2837-43.
- Tsavellas, G., H. Patel, et al. (2001). "Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer." *Br J Surg* **88**(10): 1307-20.
- Umbas, R., J. A. Schalken, et al. (1992). "Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer." *Cancer Res* **52**(18): 5104-9.
- Uzzo, R. G., J. T. Wei, et al. (1995). "The influence of prostate size on cancer detection." *Urology* **46**(6): 831-6.
- Vagunda, V., K. Landys, et al. (2001). "Bone marrow micrometastases in patients with stage I-II localised prostate cancer." *Eur J Cancer* **37**(15): 1847-52.
- Verhage, B. A. und L. A. Kiemeny (2003). "Genetic susceptibility to prostate cancer: a review." *Fam Cancer* **2**(1): 57-67.
- Visakorpi, T., E. Hyytinen, et al. (1995). "In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer." *Nat Genet* **9**(4): 401-6.
- Visakorpi, T., A. H. Kallioniemi, et al. (1995). "Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization." *Cancer Res* **55**(2): 342-7.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* **319**(9): 525-32.
- Wang, Y., S. Hayward, et al. (2001). "Cell differentiation lineage in the prostate." *Differentiation* **68**(4-5): 270-9.
- Weckermann, D., P. Muller, et al. (2001). "Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value." *J Urol* **166**(2): 699-703.
- Weckermann, D., F. Wawroschek, et al. (1999). "Does the immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow (micrometastasis) influence the time to biochemical relapse after radical prostatectomy?" *Urol Res* **27**(5): 285-90.
- Weinstein, M. H., A. W. Partin, et al. (1996). "Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: enhanced prediction of progression after radical prostatectomy." *Hum Pathol* **27**(7): 683-7.
- Went, P. T., A. Lugli, et al. (2004). "Frequent EpCam protein expression in human carcinomas." *Hum Pathol* **35**(1): 122-8.
- Willis, R. A. (1952). *The Spread of Tumours in the Human Body*. London, Butterworth & Co. Ltd.
- Winter, M. J., I. D. Nagtegaal, et al. (2003). "The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology." *Am J Pathol* **163**(6): 2139-48.
- Wirth, M. (2000). Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms. *Uroonkologie*. H. Rübber. Berlin, Springer: 233-277.

- Xu, J., D. Meyers, et al. (1998). "Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome." Nat Genet **20**(2): 175-9.
- Xu, J., S. L. Zheng, et al. (2001). "Linkage and association studies of prostate cancer susceptibility: evidence for linkage at 8p22-23." Am J Hum Genet **69**(2): 341-50.
- Yano, S., H. Matsuyama, et al. (2004). "Accuracy of an array comparative genomic hybridization (CGH) technique in detecting DNA copy number aberrations: comparison with conventional CGH and loss of heterozygosity analysis in prostate cancer." Cancer Genet Cytogenet **150**(2): 122-7.
- Zitzelsberger, H., D. Engert, et al. (2001). "Chromosomal changes during development and progression of prostate adenocarcinomas." Br J Cancer **84**(2): 202-8.

7 Danksagung

PD Dr. Christoph Klein danke ich für die exzellente Betreuung dieser Dissertation. Er hat es immer wieder verstanden mich von neuem zu motivieren und mir Freiräume bei der Entwicklung und Gestaltung meiner Dissertation gelassen. Seine Kompetenz in fachlichen und praktischen Fragen war stets eine große Hilfe. Ich danke ihm außerdem für seinen Einsatz für die Finanzierung meiner Dissertation und meiner Stelle und nicht zuletzt für die persönliche freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Gert Riethmüller danke ich für die Aufnahme in den „Kreis der Münchner Immunologen“ und sein fortwährendes persönliches Interesse an meiner Arbeit.

Ich danke den Patienten, die mit ihrer Einwilligung zur Entnahme von Knochenmark diese Dissertation erst ermöglichten. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei den klinischen Kooperationspartnern für die stets schnelle und sorgfältige Bereitstellung der relevanten klinischen Daten zu den Patienten bedanken.

Oleg Schmidt-Kittler danke ich für die Vermittlung essentieller Kenntnisse für die Anwendung der CGH für einzelne Tumorzellen. Simone Pentz danke ich für die Unterstützung bei der Etablierung und Durchführung der Doppelfärbung gegen Zytokeratin und EpCAM und Elke Burghart für die Hilfe bei der Mikrodissektion von Primärtumoren. Besonderer Dank gilt Manfred Meyer, ohne den ich heute wahrscheinlich immer noch nicht wüsste, wie man eine Pipette richtig hält, und ohne den ich auf der Suche nach Human-Cot oder 8-Feld-Objektträgern weiterhin ziellos auf den Gängen des Instituts für Immunologie umherirren würde.

Yves Hüsemann, Oktay Kirak und Christian Vay danke ich für die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit. Die vielen kleinen Fehler, die sich trotz allem in der Dissertation finden, sind mit Sicherheit nicht auf ihre Unachtsamkeit zurückzuführen, sondern darauf, dass ich ihre Anmerkungen zum Teil überlesen habe.

Ich möchte allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klein am Institut für Immunologie danken, für die tolle Zeit und die viele Hilfe während meiner Dissertation.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung, ohne die meine Doktorarbeit sicherlich nicht so durchführbar gewesen wäre. Ich danke ihnen außerdem dafür, dass sie mich und meine Geschwister immer dazu ermutigt haben, dass zu machen, was uns interessiert.

Meiner Tochter Hanna Louisa danke ich dafür, dass sie mich seit dem 16.10.2003 jeden Tag mit einem Lächeln zuhause empfängt und mir immer vor Augen führt, dass meine Arbeit einen Sinn hat. Mein größter Dank gilt meiner Freundin Sybille Glöckl, die während meiner Dissertation nicht nur viele Stunden auf mich verzichten musste, sondern mich auch viele wunderschöne Stunden von der Arbeit losgerissen hat.

8 Anhang

Definierte Chromosomenregionen für die hierarchischen Clusteranalysen

Chromosom 1	1p	1p36.2 – 36.3 1p36.1 1p34.3 – 35 1p34.1 – 34.2 1p32 – 33	1p31.2 – 31.3 1p22.2 – 31.1 1p22.1 1p21 1p13	1q	1q21 1q22 – 24 1q25 1q31.1 1q31.2 – 31.3	1q32 1q41 1q42 – 43 1q44
Chromosom 2	2p	2p24 – 25 2p23 2p22 2p21 2p16 2p14 – 15	2p13 2p11 – 12	2q	2q11 – 12 2q13 2q14 2q21 2q22 2q23	2q24 2q31 2q32 2q33 – 34 2q35
Chromosom 3	3p	3p25 – 26 3p23 – 24 3p22	3p21 3p12 – 14	3q	3q12 – 13 3q21 3q22 – 26.1	3q26.2 – 26.3 3q27 – 29
Chromosom 4	4p	4p16 4p15.3 4p14 – 15.2 4p12 – 13		4q	4q12 – 13 4q21 4q22 4q23 4q24 – 25 4q26 – 27	4q28 4q31.1 – 31.2 4q31.3 4q32 4q33 – 35
Chromosom 5	5p	5p15 5p14 5p12 – 13		5q	5q11 – 12 5q13 5q14 5q15 – 21 5q22 5q23	5q31.1 – 31.2 5q31.3 5q32 5q33 5q34 – 35
Chromosom 6	6p	6p24 – 25 6p23 6p22 6p21.2 – 21.3 6p21.1	6p11 – 12	6q	6q12 – 13 6q14 – 15 6q16 6q21 6q22	6q23 6q24 6q25 6q26 – 27
Chromosom 7	7p	7p22 7p21 7p15	7p14 7p11 – 13	7q	7q11 – 21 7q22 7q31	7q32 7q33 – 36
Chromosom 8	8p	8p22 – 23 8p21 – 12 8p11		8q	8q11 – 13 8q21 8q22	8q23 8q24.1 8q24.2 – 24.3
Chromosom 9	9p	9p21 – 24 9p12 – 13		9q	9q13 9q21 9q22	9q31 – 32 9q33 – 34
Chromosom 10	10p	10p14 – 15 10p11 – 13		10q	10q11 10q21 10q22 10q23	10q24 10q25 10q26
Chromosom 11	11p	11p15 11p13 – 14 11p11 – 12		11q	11q12 – 13 11q14 11q21 – 22	11q23 11q24 – 25
Chromosom 12	12p	12p11 – 13		12q	12q12 – 13 12q14 12q15 12q21	12q22 12q23 12q24.1 12q24.2 – 24.3

Chromosom 13	13p	keine definierte Region	13q	13q12 – 13 13q14 13q21 13q22	13q31 13q32 13q33 – 34
Chromosom 14	14p	keine definierte Region	14q	14q11 14q12 13 14q21 14q22 – 23	14q24.1 14q24.2 – 24.3 14q31 14q32
Chromosom 15	15p	keine definierte Region	15q	15q11 – 15 15q21 15q22 – 23	15q24 15q25 – 25
Chromosom 16	16p	16p11 – 13	16q	16q12 – 21 16q22	16q23 16q24
Chromosom 17	17p	17p13 17p11 – 12	17q	17q11 – 12 17q21	17q22 17q23 – 25
Chromosom 18	18p	18p12 18p11	18q	18q11 – 12 18q21	18q22 18q23
Chromosom 19	19p	19p13.3 19p13.1 – 13.2	19q	19q13 – 14	
Chromosom 20	20p	20p13 20p11 – 12	20q	20q11 – 12 20q13.1	20q13.2 – 13.3
Chromosom 21	21p	keine definierte Region	21q	21q11 – 21	21q22
Chromosom 22	22p	keine definierte Region	22q	22q11 – 12	22q13
Chromosom X	Xp	Xp22 Xp21 Xp11.3 – 11.4 Xp11.2	Xq	Xq12 – 13 Xq21.1 – 21.2 Xq21.3 Xq22 Xq23	Xq24 Xq25 Xq26 Xq27 – 28
Chromosom Y	Yp	keine definierte Region	Yq	Yq	

CGH-analytierte Zellen und Tumorareale

Patient 01	KM-Punktion 01-C-01-A	Stadium M0 CGH-balanciert	postoperativ CK-Einfachfärbung
Patient 02	KM-Punktion 02-C-01-B	Stadium BR CGH-balanciert	54 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung
Patient 03	KM-Punktion 03-E-01-A 03-E-02-A 03-E-03-A Primärtumor 03T1 03T2 03T3	Stadium M0 CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant pT4N0M0 CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant	54 Monate postoperativ EpCAM-Einfachfärbung EpCAM-Einfachfärbung EpCAM-Einfachfärbung
Patient 04	KM-Punktion 04-C-01-C	Stadium M1 CGH-balanciert	91 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung
Patient 05	KM-Punktion 05-E-01-C 05-E-02-C 05-E-03-C 05-E-04-C 05-DD-05-C 05-DD-06-C	Stadium M1 CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant	Zeitpunkt der Operation EpCAM-Einfachfärbung EpCAM-Einfachfärbung EpCAM-Einfachfärbung EpCAM-Einfachfärbung Doppelfärbung (EpCAM+/CK+) Doppelfärbung (EpCAM+/CK+)
Patient 06	KM-Punktion 06-C-01-A KM-Punktion 06-DC-02-B	Stadium M0 CGH-aberrant Stadium BR CGH-balanciert	6 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung 18 Monate postoperativ Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)

Patient 07	KM-Punktion	Stadium BR	20 Monate postoperativ
	07-C-01-B	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	KM-Punktion	Stadium M1	33 Monate postoperativ
	07-C-02-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-03-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-04-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-05-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-06-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-07-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-08-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-09-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-10-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-11-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-12-C	CGH-balanciert	CK-Einfachfärbung
	07-C-13-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-14-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	07-C-15-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
07-DC-16-C	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)	
07-DC-17-C	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)	
07-DC-18-C	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)	
07-DE-19-C	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM+/CK-)	
07-DE-20-C	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM+/CK-)	
Patient 08	KM-Punktion	Stadium M0	Zeitpunkt der Operation
	08-E-01-A	CGH-balanciert	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 09	KM-Punktion	Stadium M0	41 Monate postoperativ
	09-C-01-A	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	09-DC-01-A	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)
	Primärtumor	pT2aN0M0	
	09T1	CGH-aberrant	
	09T2	CGH-aberrant	
	09T3	CGH-aberrant	
Patient 10	KM-Punktion	Stadium BR	18 Monate postoperativ
	10-E-01-B	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
	10-E-02-B	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 11	KM-Punktion	Stadium M0	Zeitpunkt der Operation
	11-C-01-A	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
Patient 12	KM-Punktion	Stadium M1	45 Monate postoperativ
	12-E-01-C	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
	12-E-02-C	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
	Primärtumor	pT2N0M0	
	12T1	CGH-balanciert	
	12T2	CGH-aberrant	
Patient 13	KM-Punktion	Stadium BR	6 Monate postoperativ
	13-C-01-B	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	13-C-02-B	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
Patient 14	KM-Punktion	Stadium BR	66 Monate postoperativ
	14-DC-01-B	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)
Patient 15	KM-Punktion	Stadium M0	19 Monate postoperativ
	15-DC-01-A	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)
	15-DC-02-A	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)
Patient 16	KM-Punktion	Stadium M0	43 Monate postoperativ
	16-DD-01-A	CGH-balanciert	Doppelfärbung (EpCAM+/CK+)
Patient 17	KM-Punktion	Stadium M0	Zeitpunkt der Operation
	17-E-01-A	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 18	KM-Punktion	Stadium M1	Zeitpunkt der Operation
	18-E-01-C	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
	18-E-02-C	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung

Patient 19	KM-Punktion 19-C-01-B 19-C-02-B	Stadium BR CGH-balanciert CGH-aberrant	18 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung CK-Einfachfärbung
Patient 20	KM-Punktion 20-C-01-C 20-C-02-C 20-C-03-C Primärtumor 20T1 20T2 20T3	Stadium M1 CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant	59 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung CK-Einfachfärbung CK-Einfachfärbung
Patient 21	KM-Punktion 21-C-01-A	Stadium M0 CGH-aberrant	6 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung
Patient 22	KM-Punktion 22-DD-01-A	Stadium M0 CGH-aberrant	31 Monate postoperativ Doppelfärbung (EpCAM+/CK+)
Patient 23	KM-Punktion 23-E-01-A KM-Punktion 23-C-02-A KM-Punktion 23-DE-03-A 23-DE-04-A	Stadium M0 CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-balanciert	69 Monate postoperativ EpCAM-Einfachfärbung 88 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung 100 Monate postoperativ Doppelfärbung (EpCAM+/CK-) Doppelfärbung (EpCAM+/CK-)
Patient 24	KM-Punktion 24-C-01-B	Stadium BR CGH-aberrant	18 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung
Patient 25	KM-Punktion 25-DC-01-A	Stadium M0 CGH-balanciert	95 Monate postoperativ Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)
Patient 26	KM-Punktion 26-E-01-B	Stadium BR CGH-aberrant	30 Monate postoperativ EpCAM-Einfachfärbung
Patient 27	KM-Punktion 27-C-01-B KM-Punktion 27-C-02-B 27-C-03-B KM-Punktion 27-DE-04-B	Stadium BR CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-balanciert	6 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung 18 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung CK-Einfachfärbung 42 Monate postoperativ Doppelfärbung (EpCAM+/CK-)
Patient 28	KM-Punktion 28-E-01-C 28-E-02-C Primärtumor 28T1	Stadium M1 CGH-balanciert CGH-aberrant CGH-aberrant	58 Monate postoperativ EpCAM-Einfachfärbung EpCAM-Einfachfärbung
Patient 29	KM-Punktion 29-C-01-C 29-C-02-C 29-C-03-C	Stadium M1 CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant	postoperativ CK-Einfachfärbung CK-Einfachfärbung CK-Einfachfärbung
Patient 30	KM-Punktion 30-E-01-A 30-E-02-A	Stadium M0 CGH-balanciert CGH-aberrant	Zeitpunkt der Operation EpCAM-Einfachfärbung EpCAM-Einfachfärbung
Patient 31	KM-Punktion 31-E-01-B	Stadium BR CGH-aberrant	68 Monate postoperativ EpCAM-Einfachfärbung
Patient 32	KM-Punktion 32-C-01-A Primärtumor 32T1 32T2	Stadium M0 CGH-aberrant CGH-aberrant CGH-aberrant	54 Monate postoperativ CK-Einfachfärbung

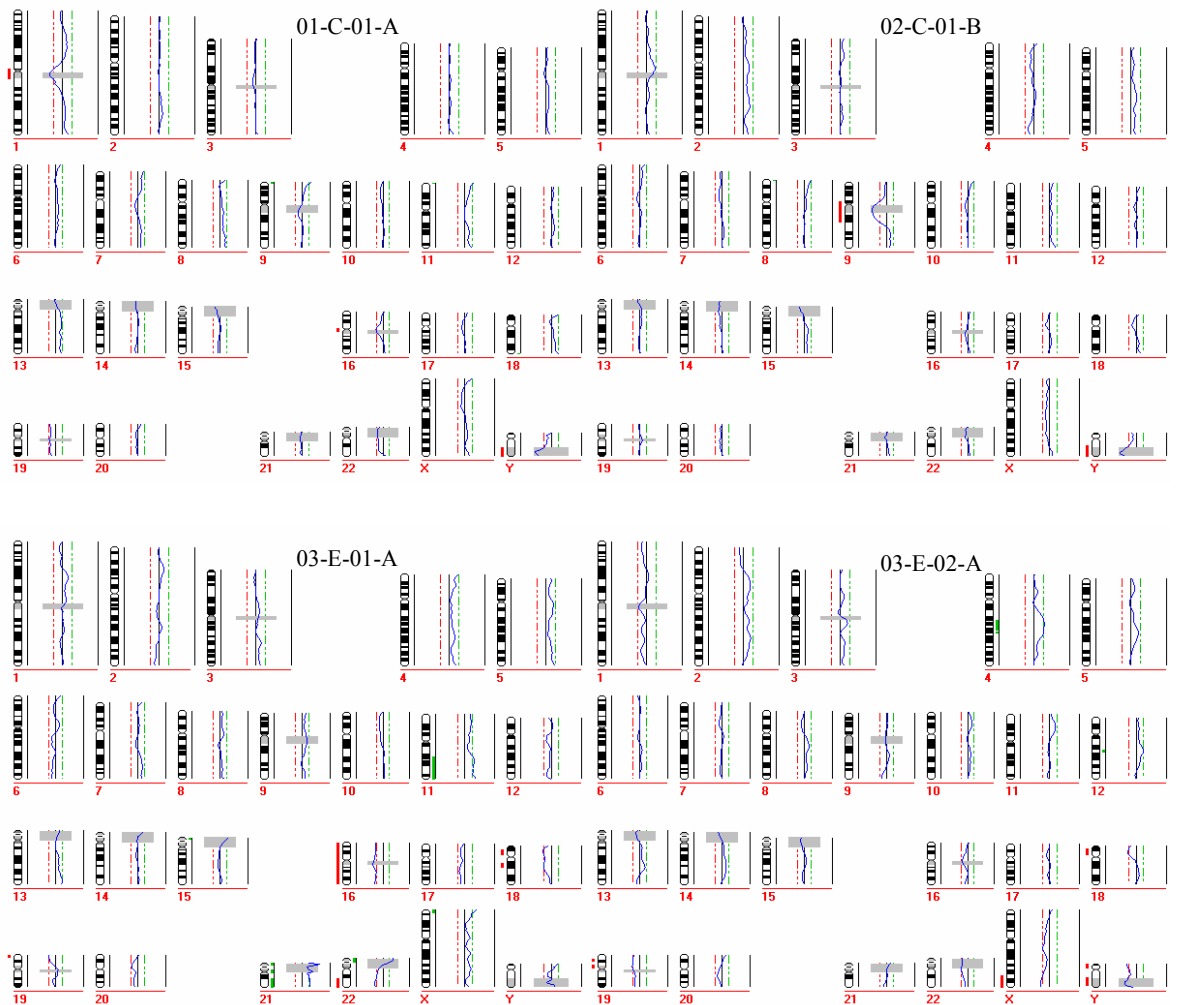
Patient 33	KM-Punktion	Stadium M1	113 Monate postoperativ
	33-C-01-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	33-C-02-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	33-C-03-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	33-C-04-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	33-C-05-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	33-DD-06-C	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM+/CK+)
Patient 34	KM-Punktion	Stadium M1	postoperativ
	34-C-01-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	34-C-02-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	34-C-03-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
Patient 35	KM-Punktion	Stadium M0	Zeitpunkt der Operation
	35-C-01-A	CGH-balanciert	CK-Einfachfärbung
	35-C-02-A	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	35-C-03-A	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
Patient 36	KM-Punktion	Stadium M0	7 Monate postoperativ
	36-C-01-A	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	36-C-02-A	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
Patient 37	KM-Punktion	Stadium BR	42 Monate postoperativ
	37-E-01-B	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 38	KM-Punktion	Stadium M0	7 Monate postoperativ
	38-C-01-A	CGH-balanciert	CK-Einfachfärbung
	38-C-02-A	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	Primärtumor	pT2bN0M0	
	38T1	CGH-aberrant	
	38T2	CGH-aberrant	
	38T3	CGH-aberrant	
Patient 39	KM-Punktion	Stadium M0	7 Monate postoperativ
	39-E-01-A	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
	KM-Punktion	Stadium BR	31 Monate postoperativ
39-C-02-B	CGH-balanciert	CK-Einfachfärbung	
Patient 40	KM-Punktion	Stadium M0	40 Monate postoperativ
	40-DE-01-A	CGH-balanciert	Doppelfärbung (EpCAM+/CK-)
Patient 41	KM-Punktion	Stadium M0	Zeitpunkt der Operation
	41-E-01-A	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 42	KM-Punktion	Stadium M0	54 Monate postoperativ
	42-DC-01-A	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)
	Primärtumor	pT2aN0M0	
42T1	CGH-aberrant		
Patient 43	KM-Punktion	Stadium M0	7 Monate postoperativ
	43-DD-01-A	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM+/CK+)
Patient 44	KM-Punktion	Stadium M0	Zeitpunkt der Operation
	44-E-01-A	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
	44-E-02-A	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 45	KM-Punktion	Stadium M1	40 Monate postoperativ
	45-C-01-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	45-C-02-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	45-C-03-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	45-C-04-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	45-E-05-C	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
	45-E-06-C	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
	Primärtumor	pT3bN0M0	
45T1	CGH-aberrant		
45T2	CGH-aberrant		
Patient 46	KM-Punktion	Stadium M0	89 Monate postoperativ
	46-C-01-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	46-E-02-C	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 47	KM-Punktion	Stadium BR	20 Monate postoperativ
	47-C-01-B	CGH-balanciert	CK-Einfachfärbung

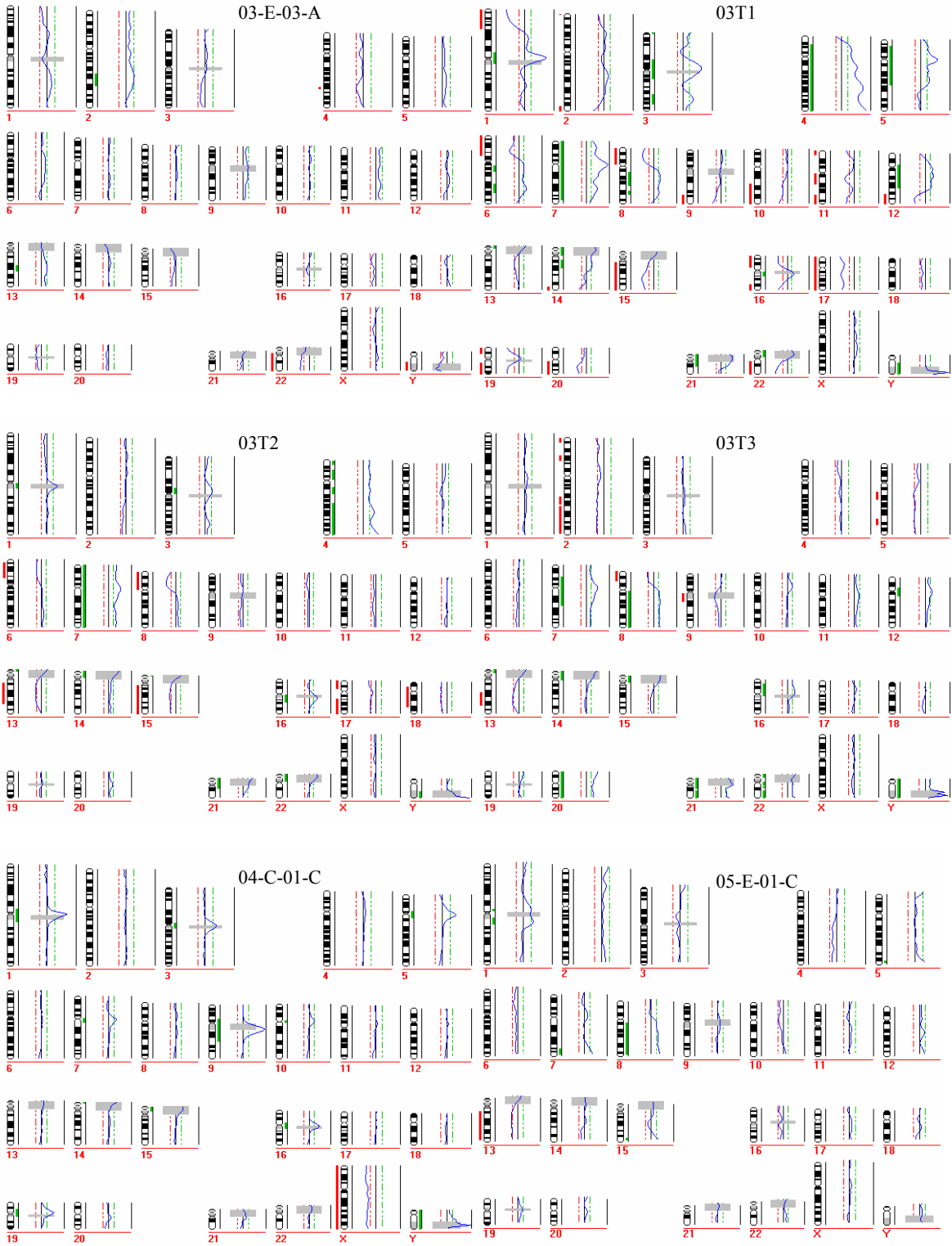
Patient 48	KM-Punktion	Stadium M0	Zeitpunkt der Operation
	48-E-01-A	CGH-balanciert	EpCAM-Einfachfärbung
	48-E-02-A	CGH-balanciert	EpCAM-Einfachfärbung
	48-E-03-A	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 49	KM-Punktion	Stadium unbekannt	Zeitpunkt der Operation
	49-C-01-U	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	49-C-02-U	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	49-C-03-U	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	49-E-04-U	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 50	KM-Punktion	Stadium BR	72 Monate postoperativ
	50-DE-01-B	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM+/CK-)
Patient 51	KM-Punktion	Stadium M0	59 Monate postoperativ
	51-C-01-A	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	51-E-02-A	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 52	KM-Punktion	Stadium M0	18 Monate postoperativ
	52-DC-01-A	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)
Patient 53	KM-Punktion	Stadium M0	7 Monate postoperativ
Patient 54	53-C-01-A	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	KM-Punktion	Stadium M1	42 Monate postoperativ
	54-C-01-C	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	Primärtumor	pT3bN0M0	
Patient 55	54T1	CGH-aberrant	
	54T2	CGH-aberrant	
Patient 55	KM-Punktion	Stadium M0	55 Monate postoperativ
	55-C-01-A	CGH-balanciert	CK-Einfachfärbung
Patient 56	KM-Punktion	Stadium M0	30 Monate postoperativ
	56-C-01-A	CGH-balanciert	CK-Einfachfärbung
	56-E-02-A	CGH-balanciert	EpCAM-Einfachfärbung
Patient 57	KM-Punktion	Stadium M0	Zeitpunkt der Operation
Patient 58	57-C-01-A	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	KM-Punktion	Stadium BR	42 Monate postoperativ
	58-E-01-B	CGH-balanciert	EpCAM-Einfachfärbung
	Primärtumor	pT2bN0M0	
Patient 59	58T1	CGH-aberrant	
	58T2	CGH-aberrant	
	KM-Punktion	Stadium unbekannt	Zeitpunkt der Operation
Patient 60	59-C-01-U	CGH-balanciert	CK-Einfachfärbung
	KM-Punktion	Stadium BR	69 Monate postoperativ
Patient 61	60-E-01-B	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
	60-E-02-B	CGH-aberrant	EpCAM-Einfachfärbung
	KM-Punktion	Stadium M1	Zeitpunkt der Operation
Patient 62	61-DC-01-C	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)
	61-DC-02-C	CGH-aberrant	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)
Patient 63	KM-Punktion	Stadium BR	31 Monate postoperativ
	62-DC-01-B	CGH-balanciert	Doppelfärbung (EpCAM-/CK+)
Patient 64	KM-Punktion	Stadium BR	19 Monate postoperativ
	63-C-01-B	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
	63-C-02-B	CGH-aberrant	CK-Einfachfärbung
Patient 65	Primärtumor	pT2aN1M0	
Patient 66	64T1	CGH-aberrant	
	Primärtumor	pT4N0M0	
Patient 67	65T1	CGH-aberrant	
	Primärtumor	pT3aN0M0	
Patient 68	66T1	CGH-aberrant	

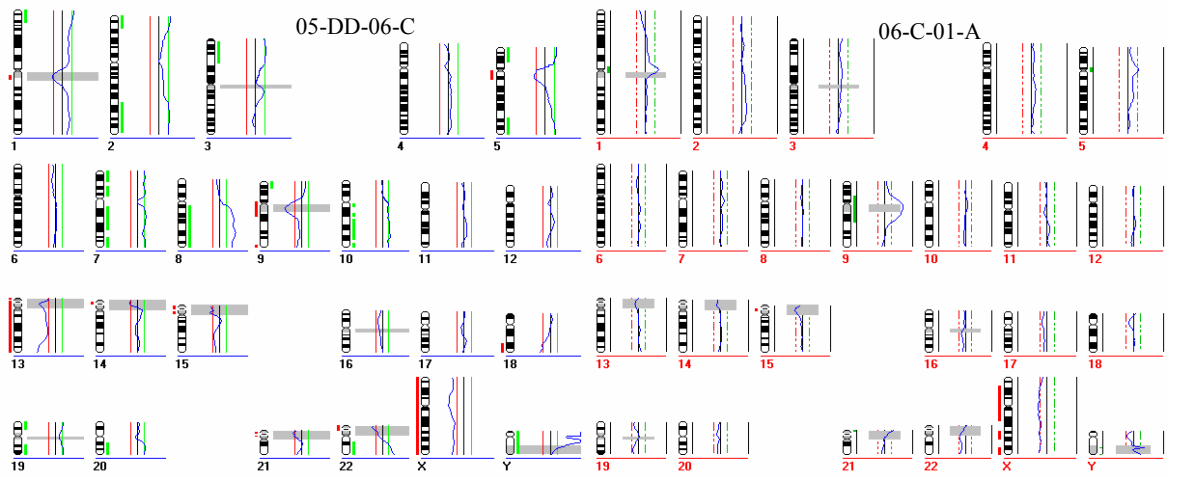
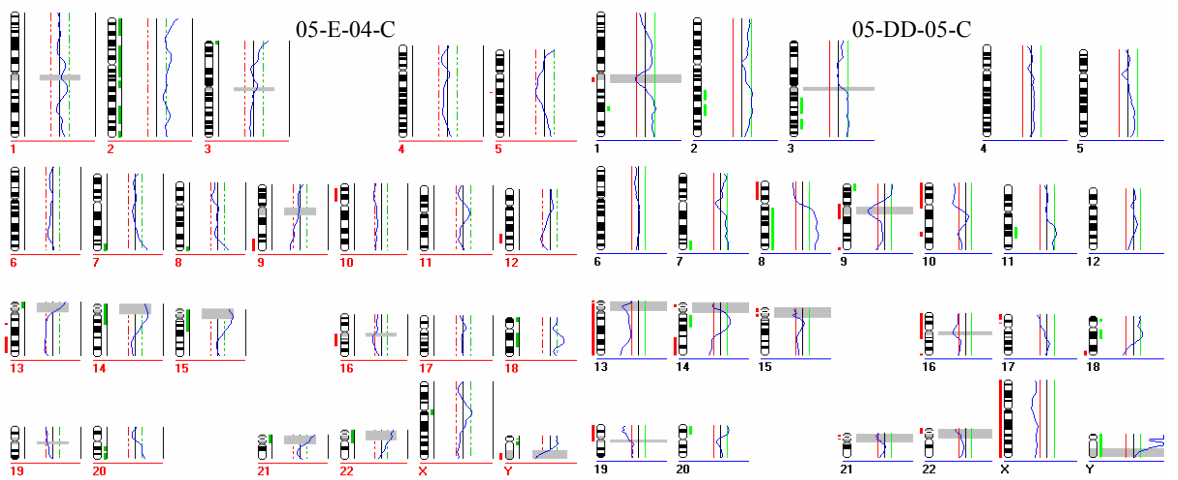
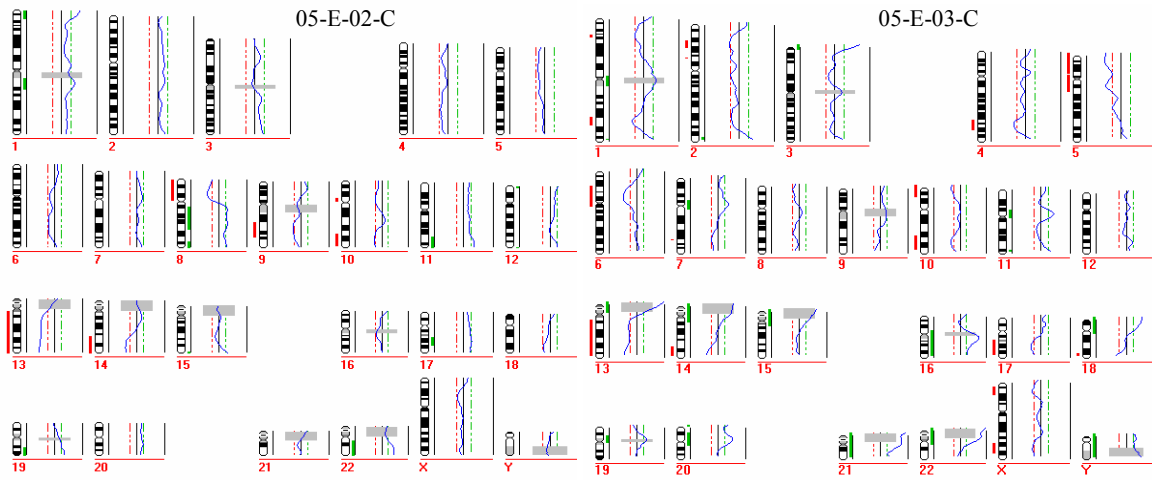
Patient 67	Primärtumor 67T1	pT4N0M0 CGH-aberrant
Patient 68	Primärtumor 68T1	pT2bN0M0 CGH-aberrant

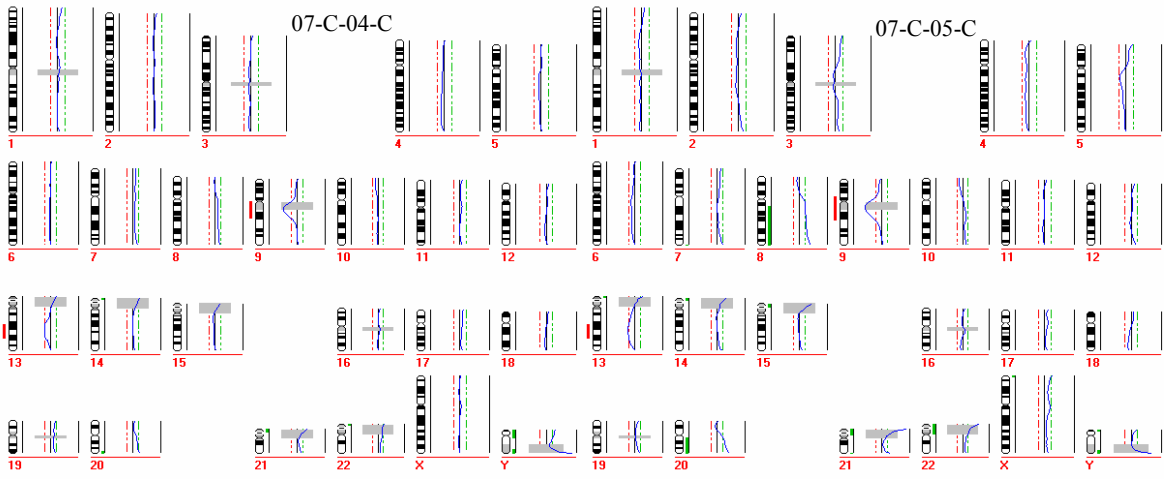
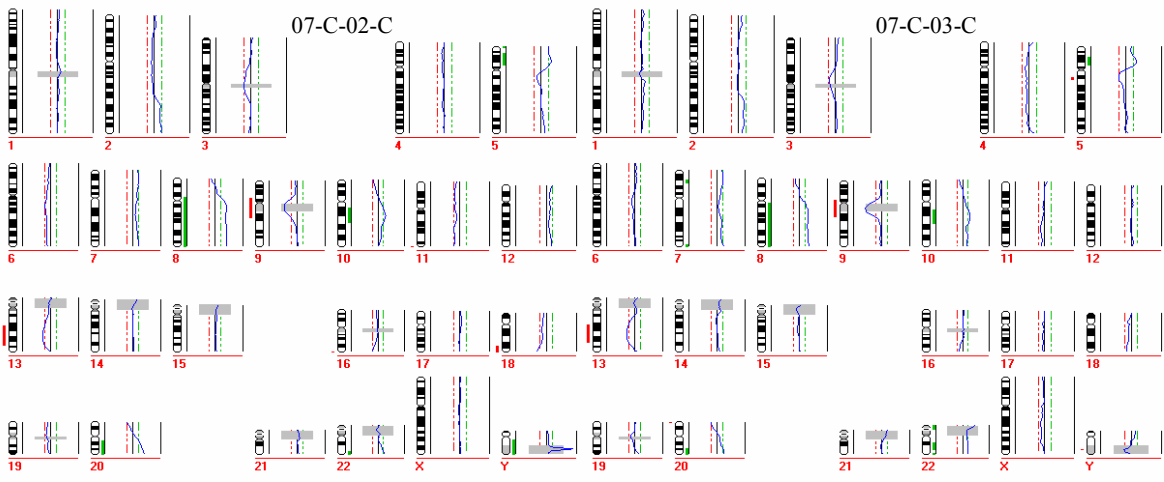
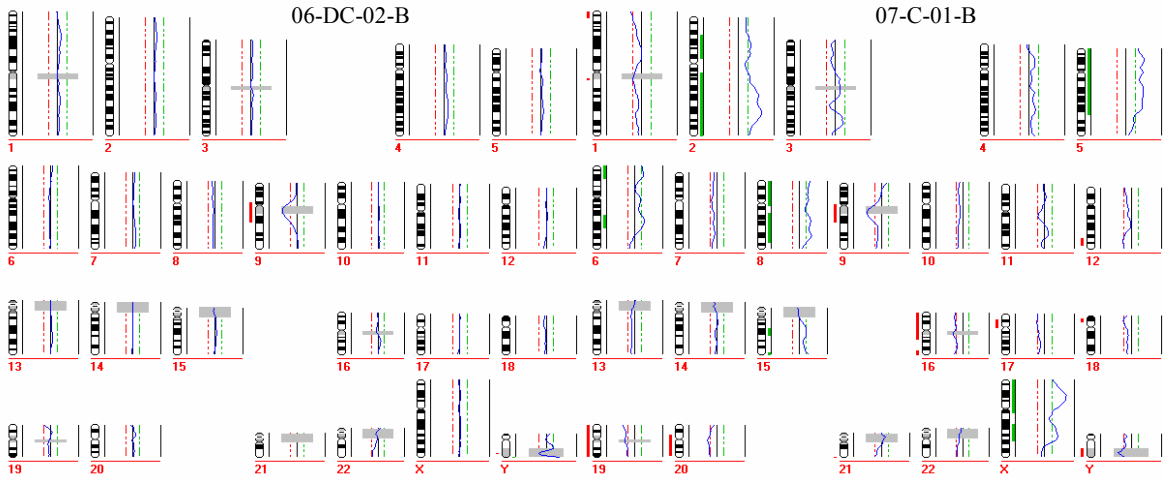
CGH-Profile aller disseminierten Zellen und Primärtumoren

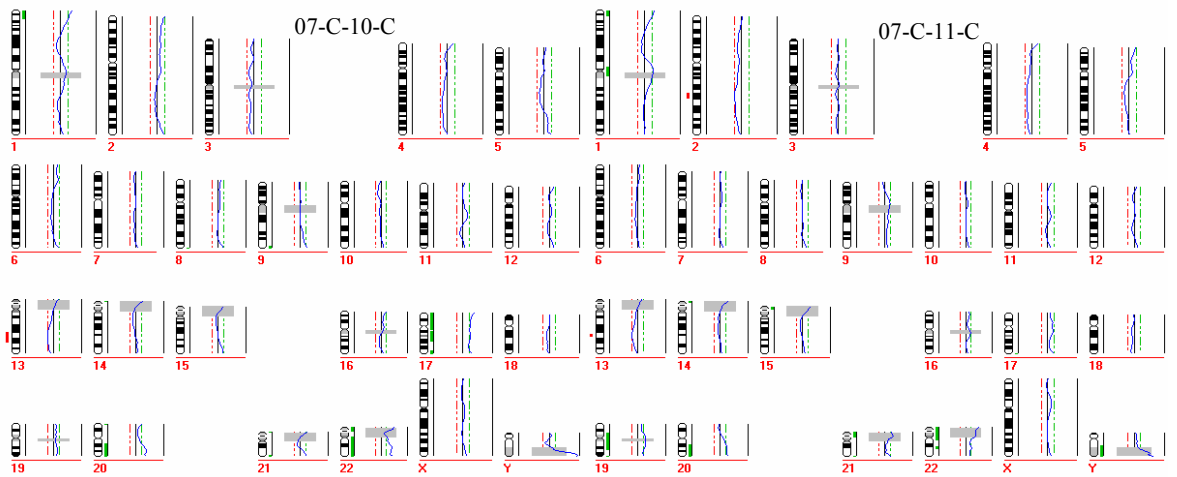
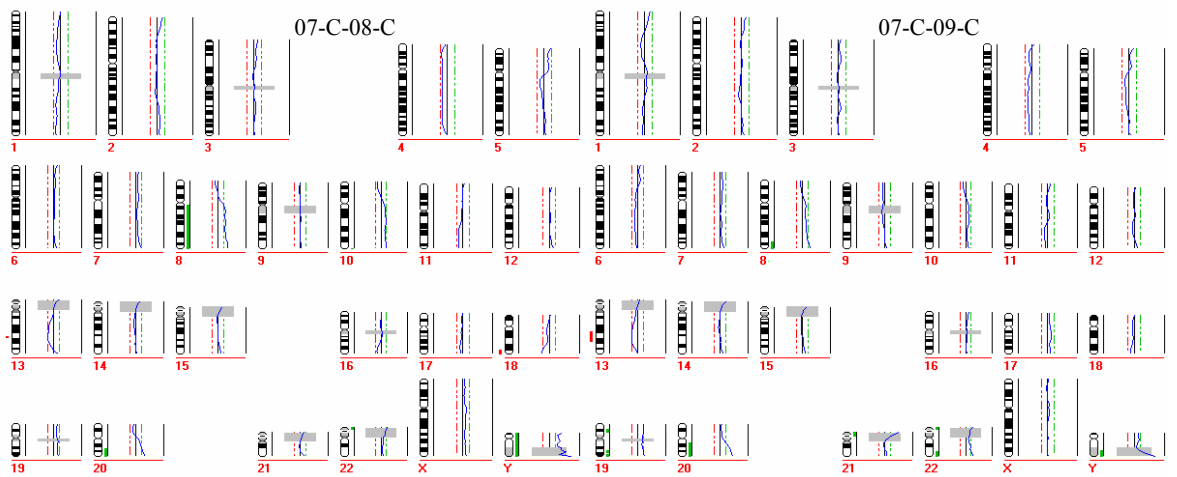
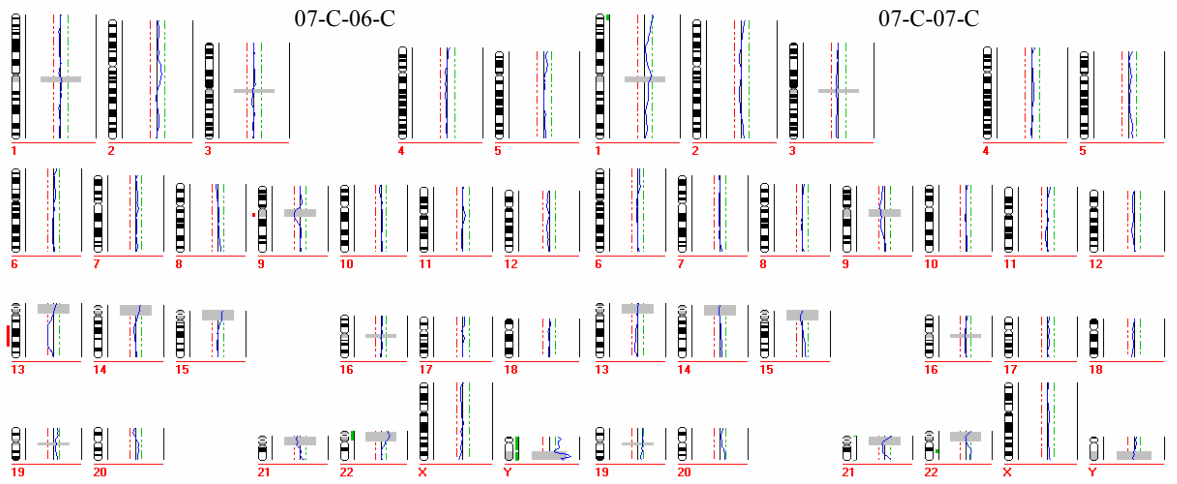
Die gemittelten CGH-Profile aller untersuchten Einzelzellen und Primärtumoreareale sind im Folgenden aufsteigend nach der Patientenzahl aufgeführt. Bei den Profilen 20-C-03-C, 45-C-03-C und 45-C-04-C wurden bei der Markierung der DNA für die CGH versehentlich die beiden Basenanaloga für Referenz und Probe vertauscht. In diesen Fällen entspricht rot einer Amplifikation und grün einer Deletion. Diese drei Profile sind durch den Zusatz „turn“ nach dem Code gekennzeichnet.

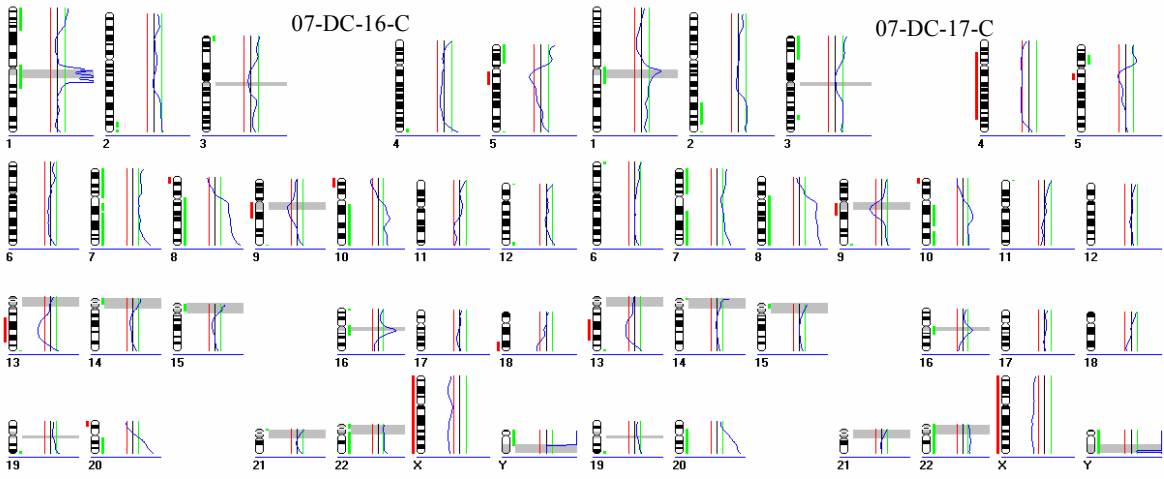
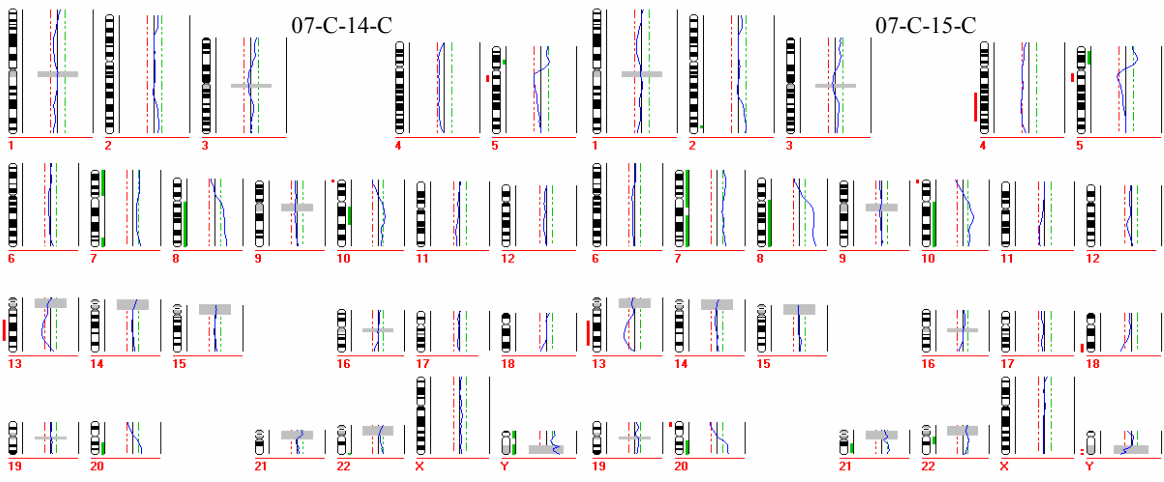
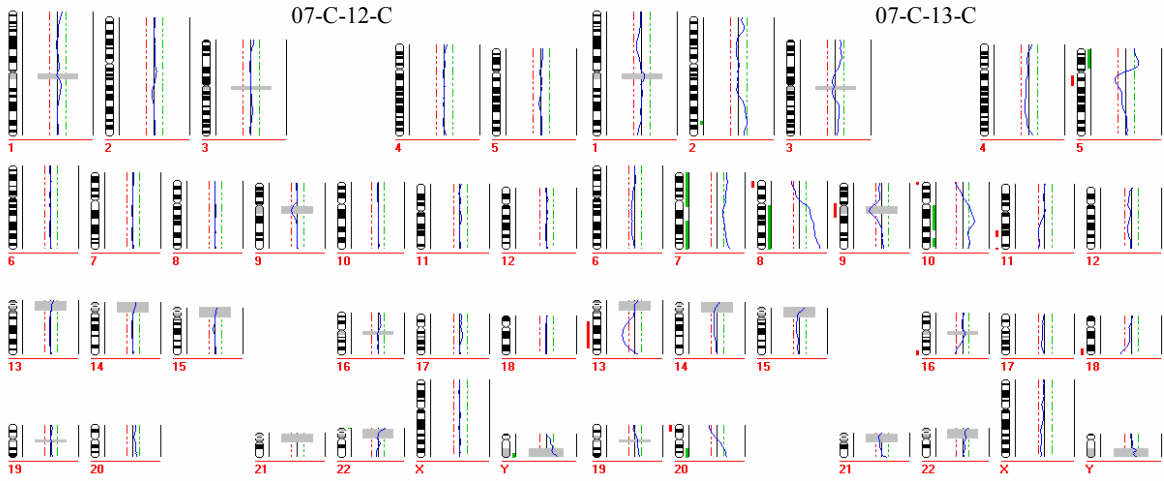


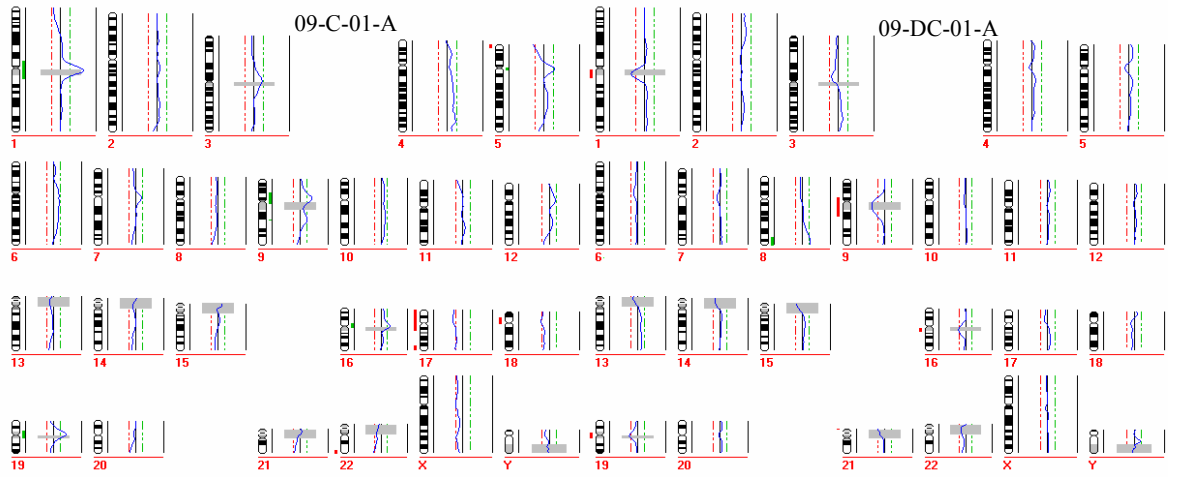
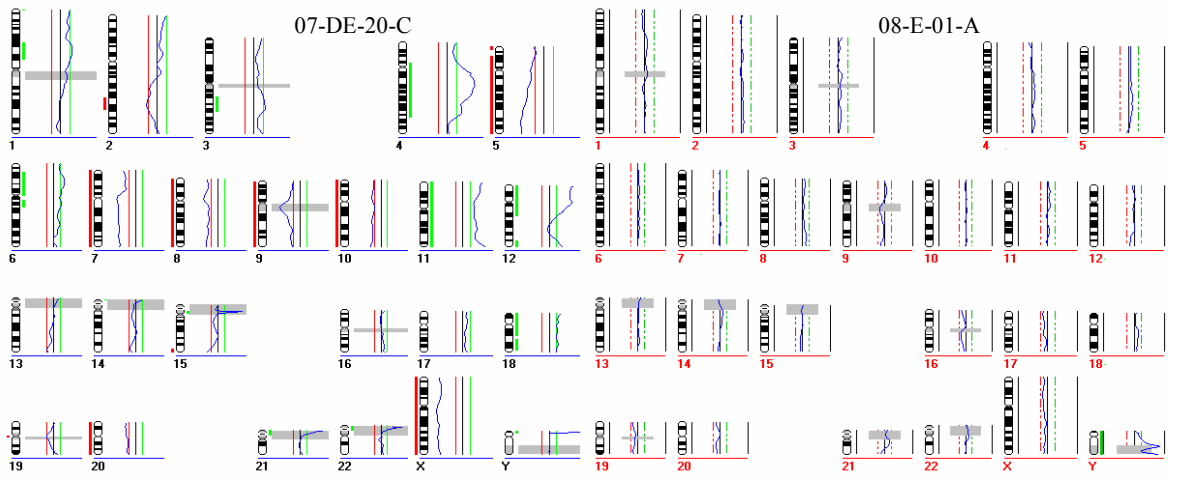
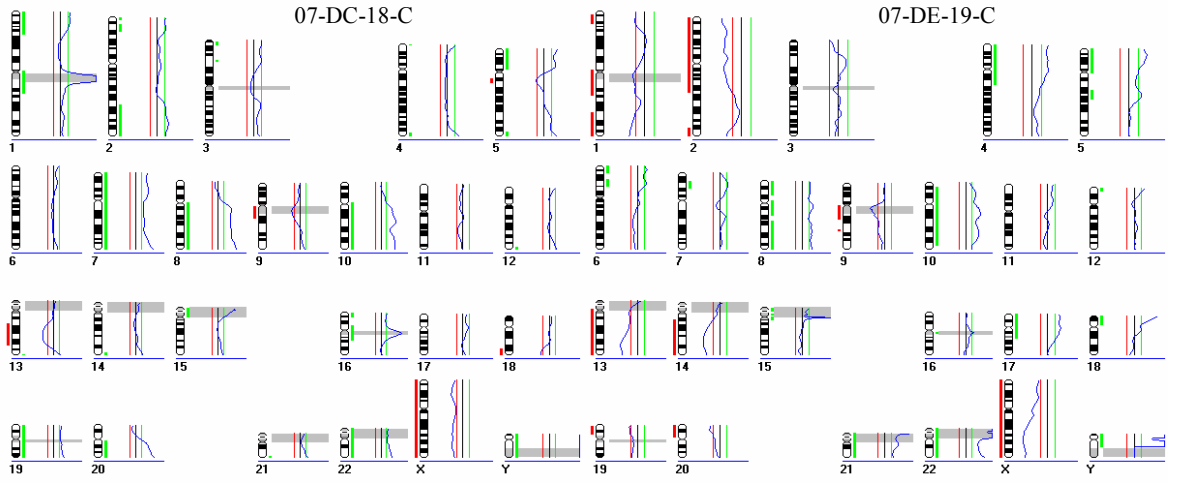


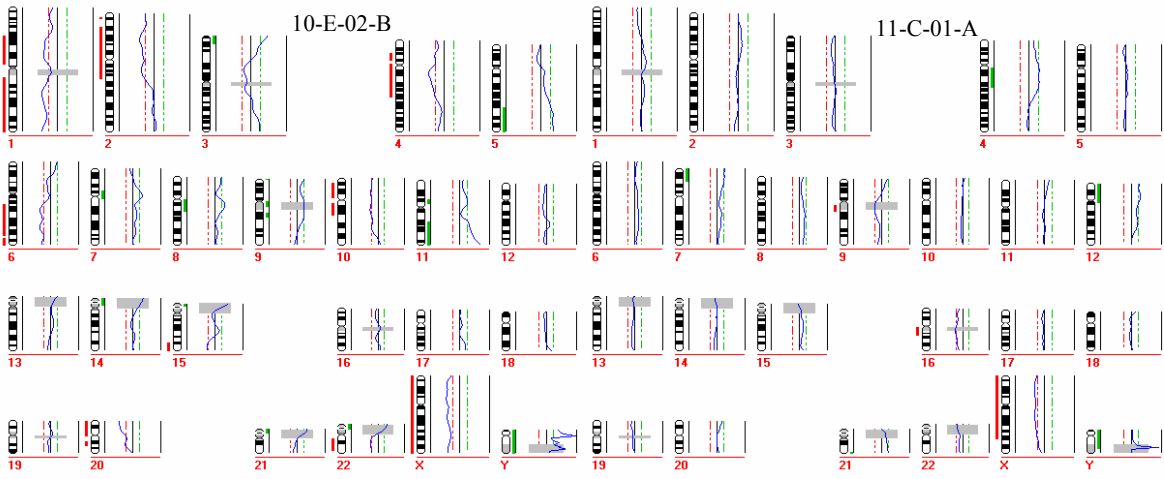
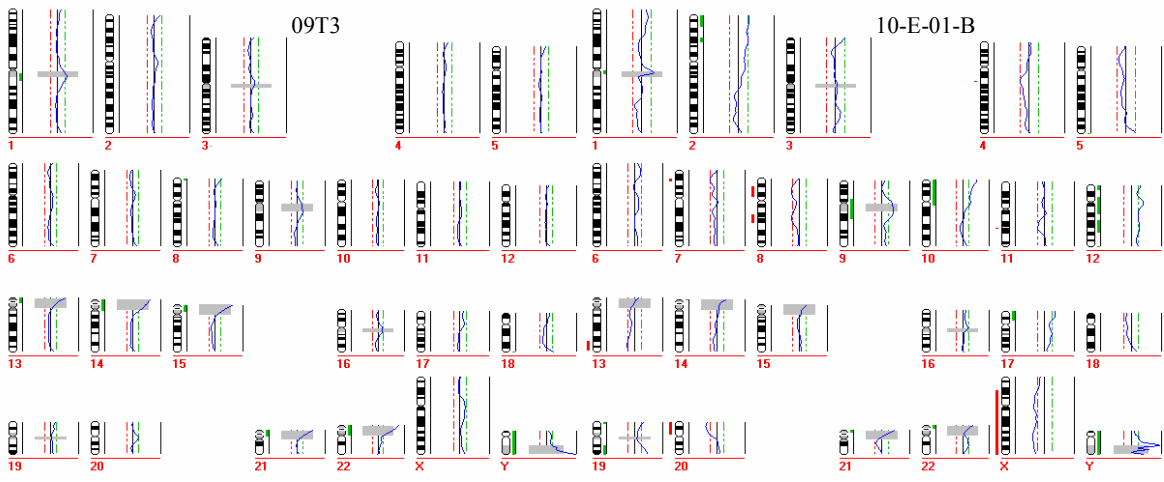
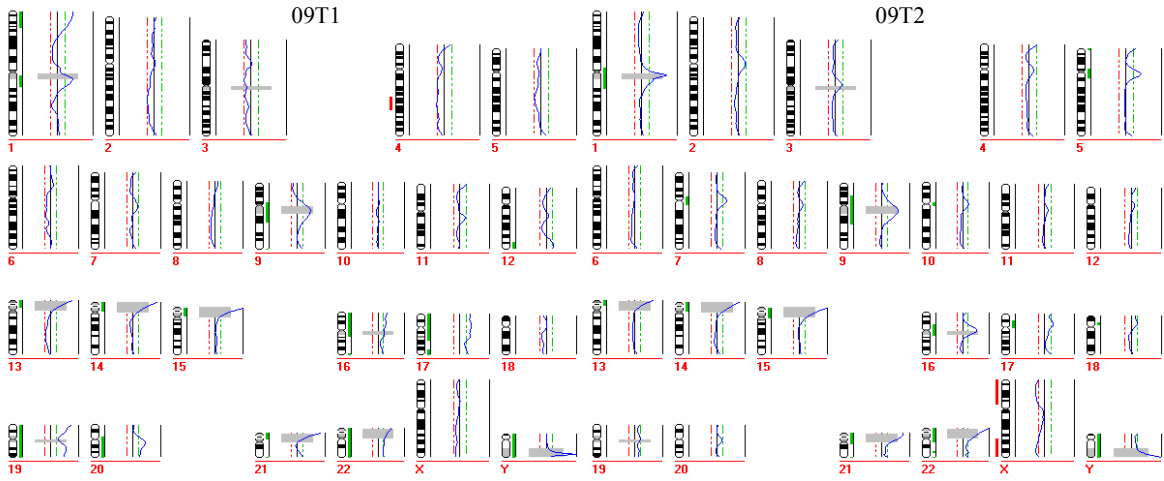


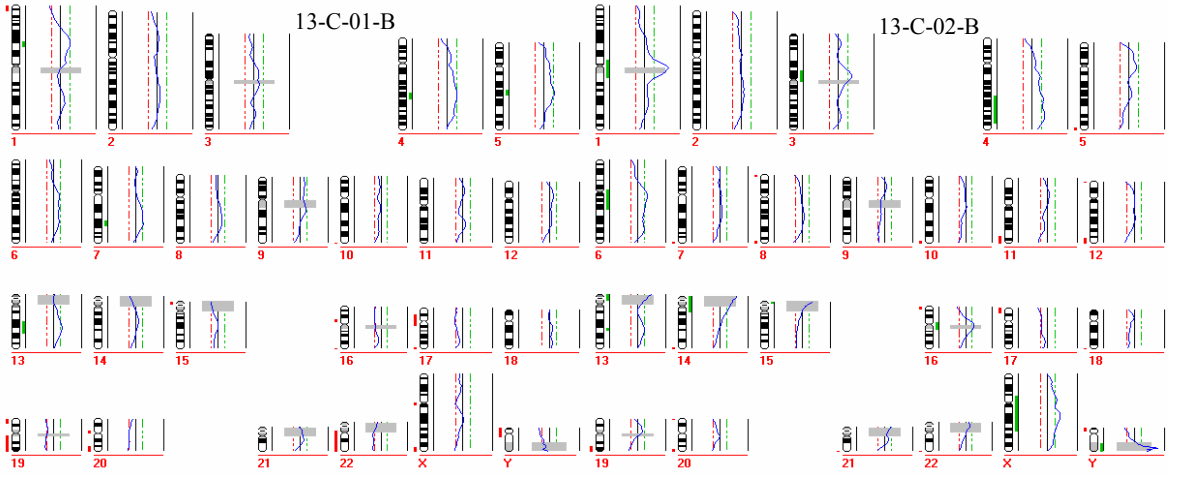
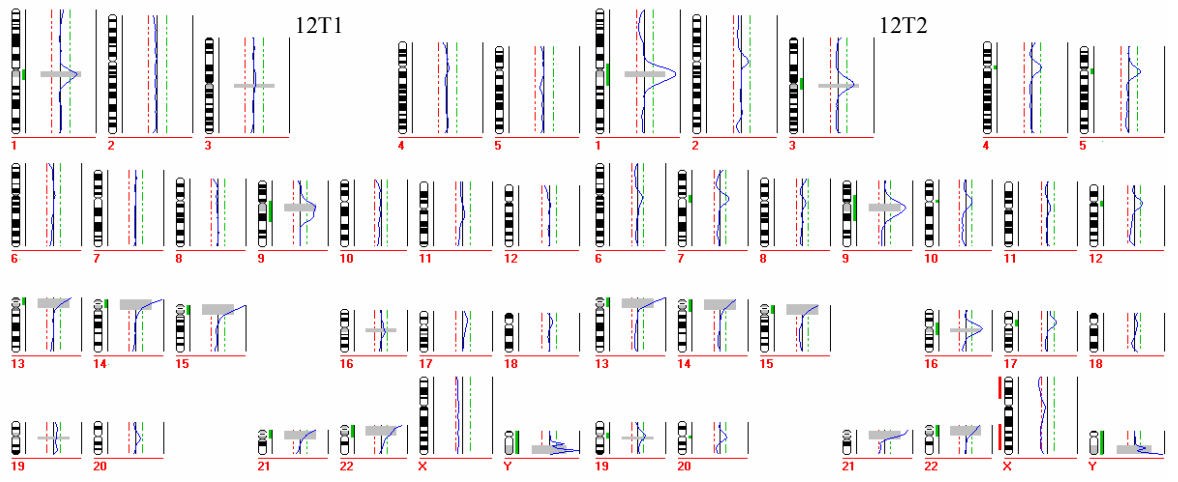
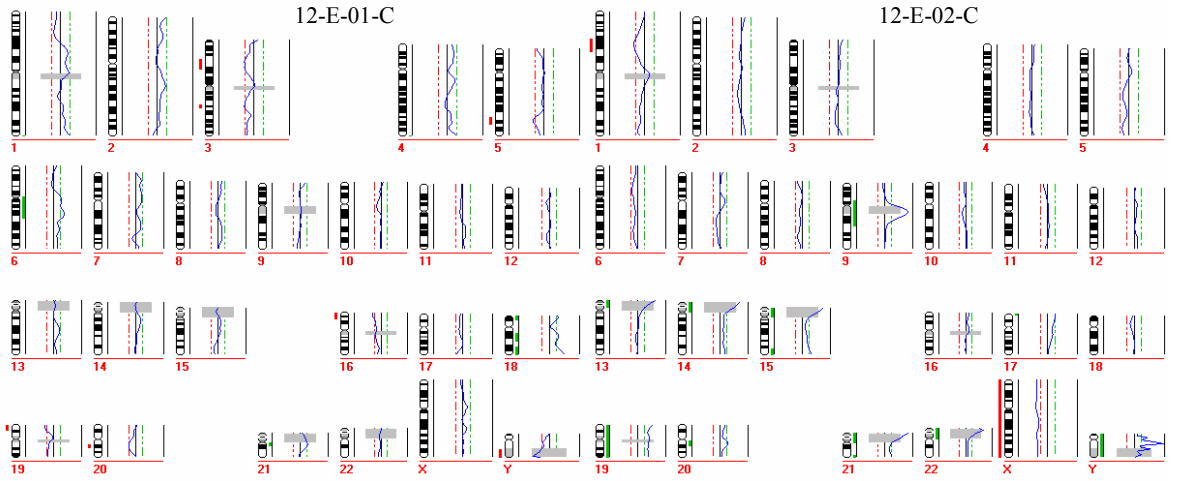


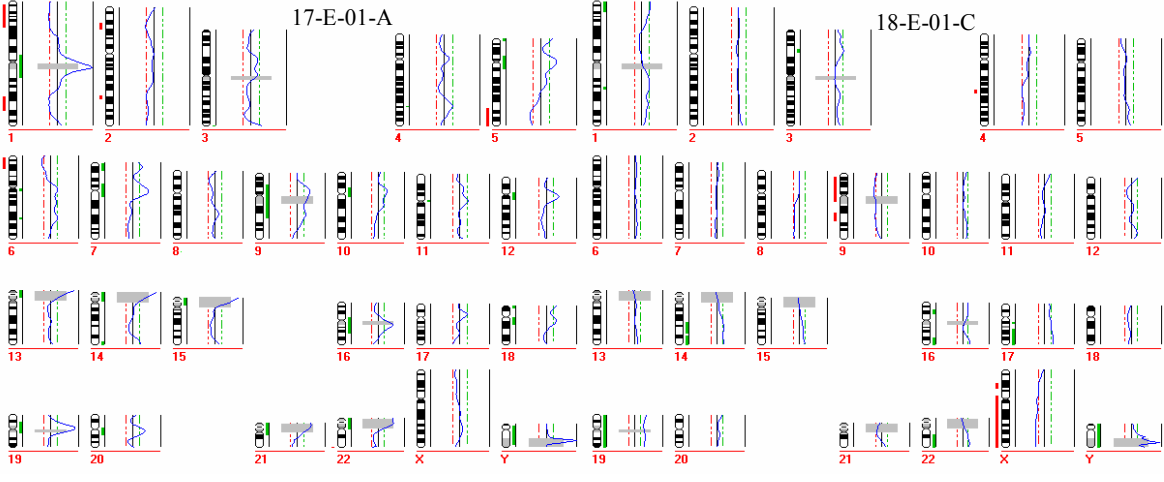
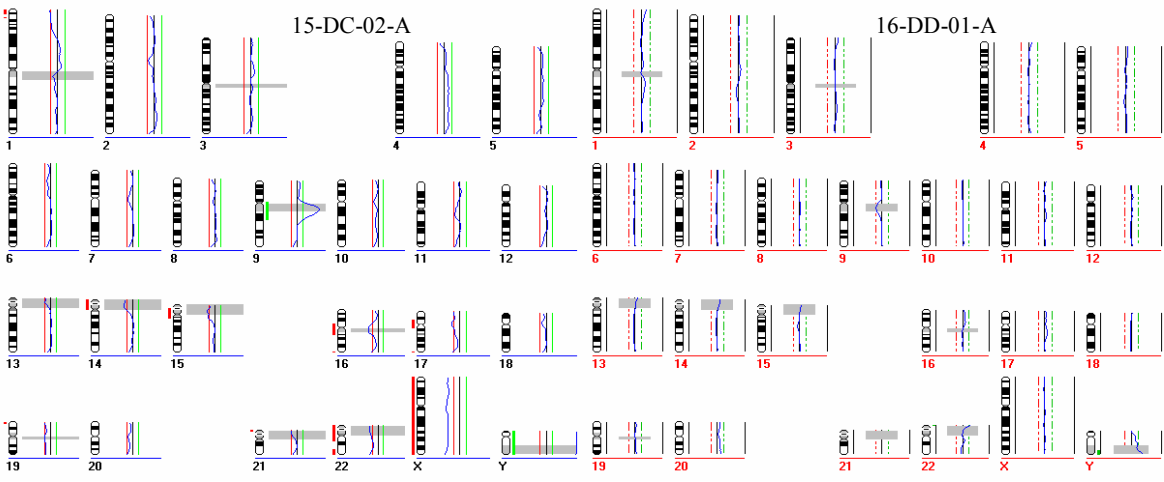
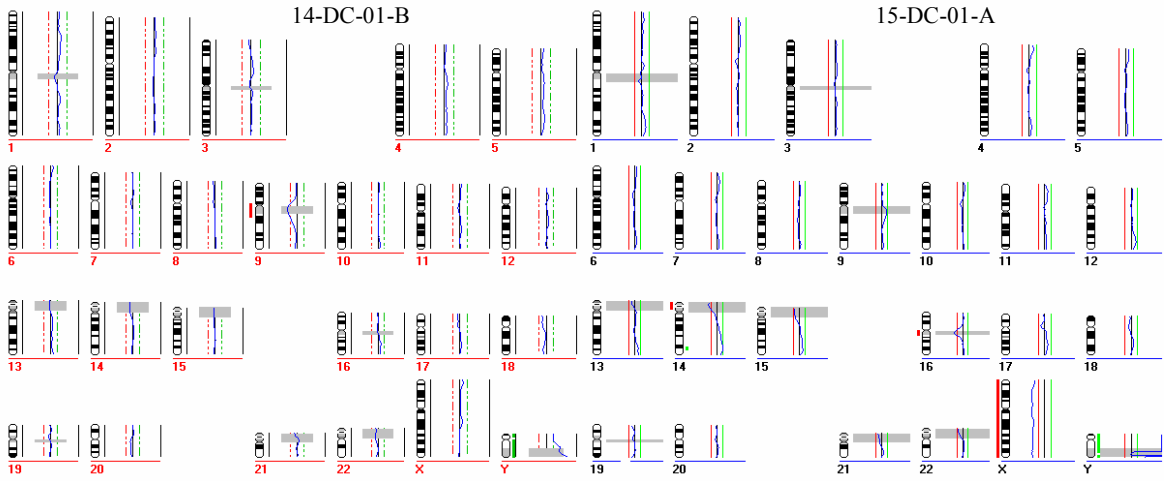


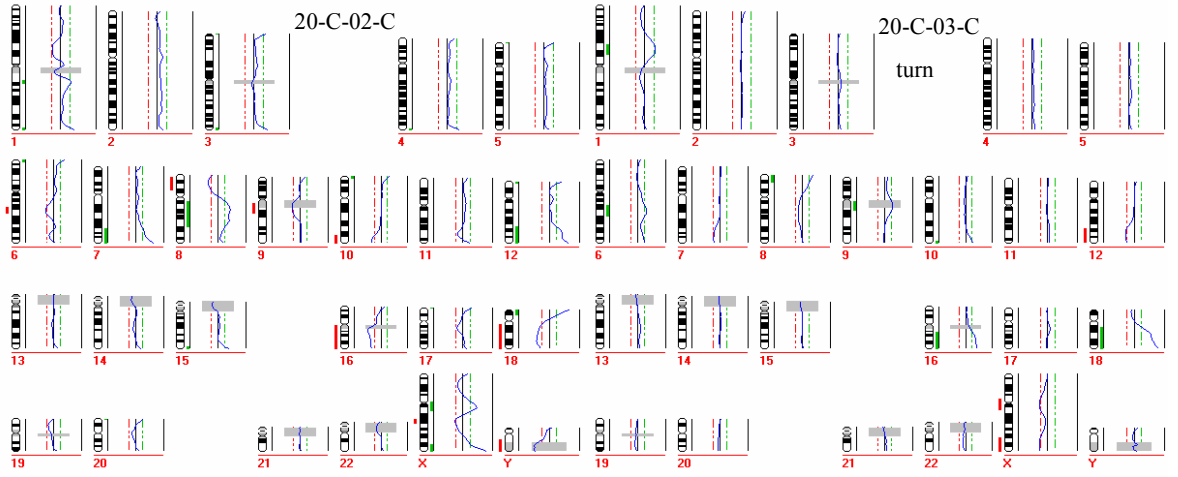
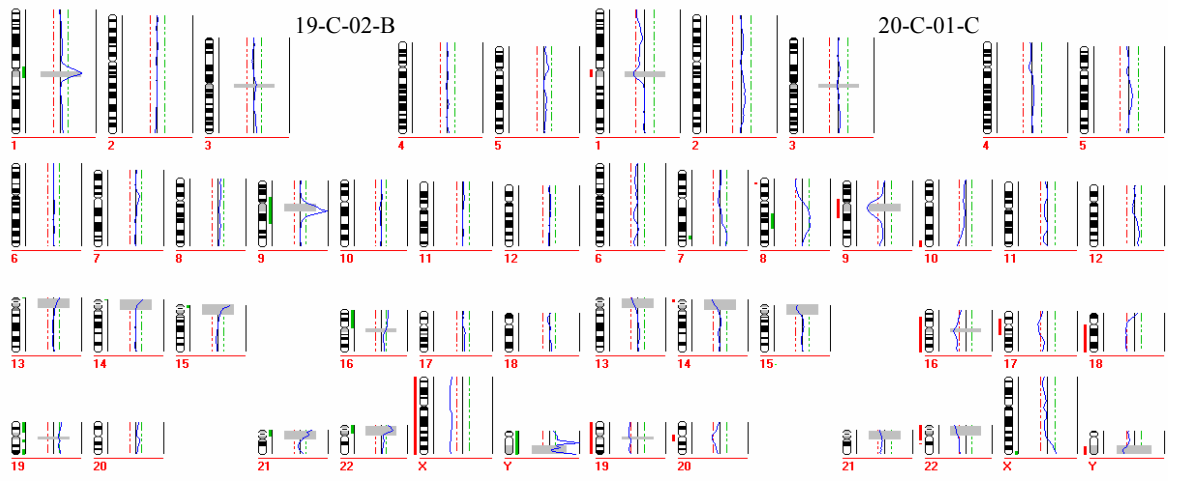
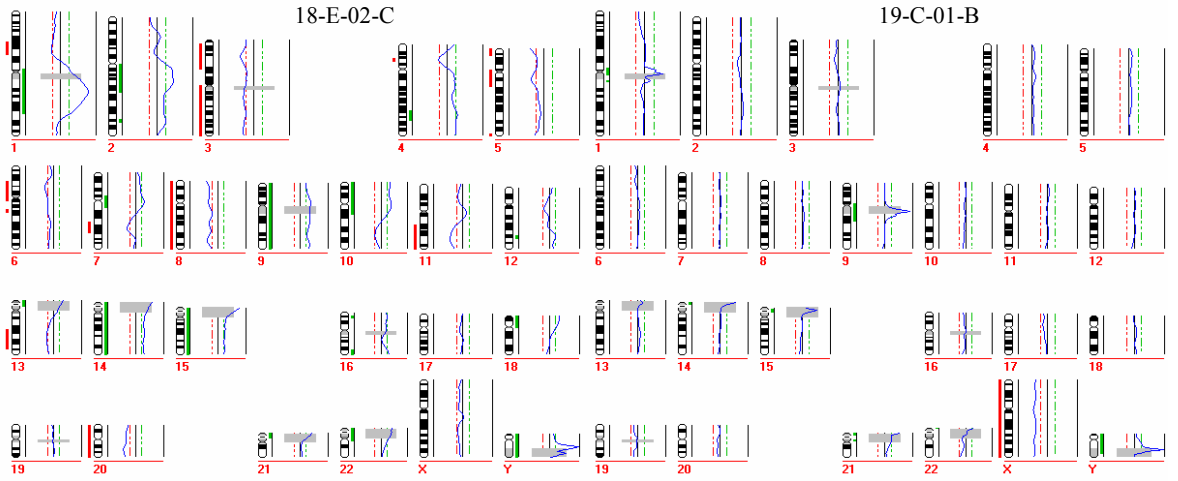


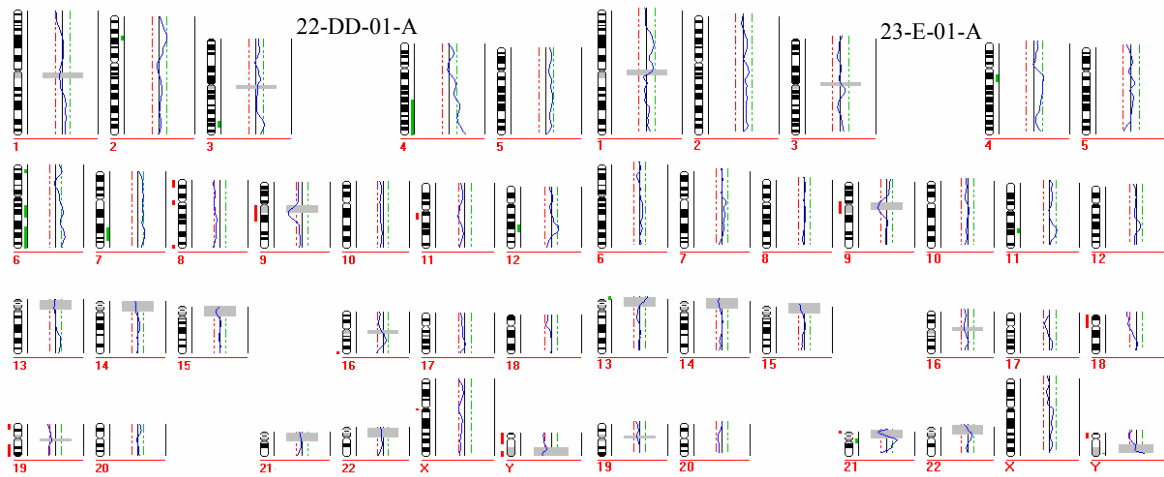
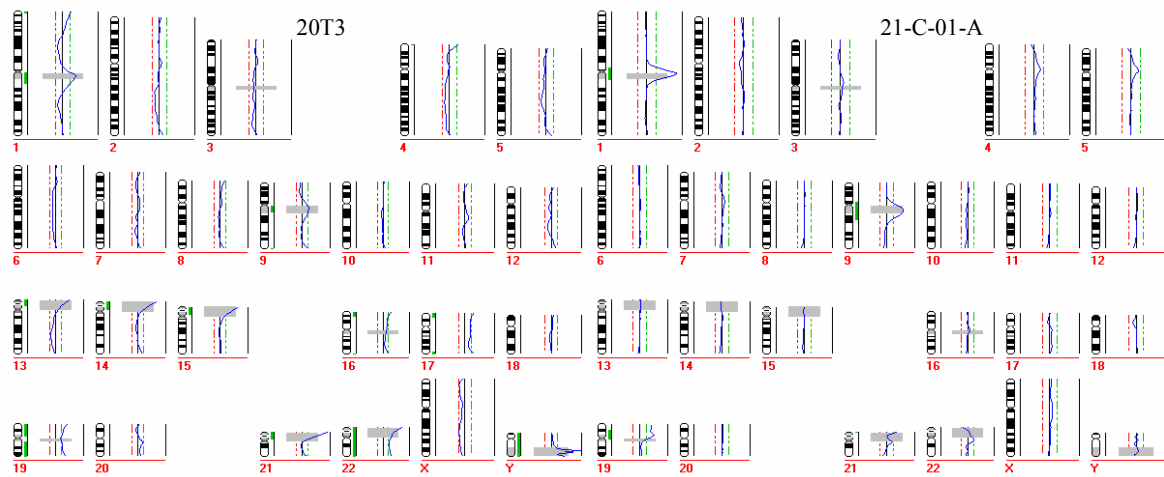
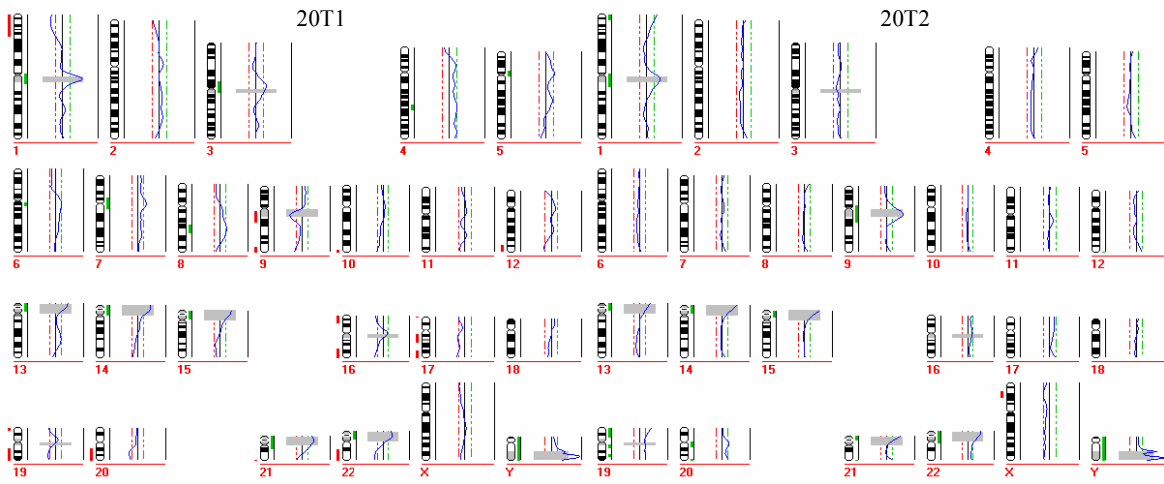


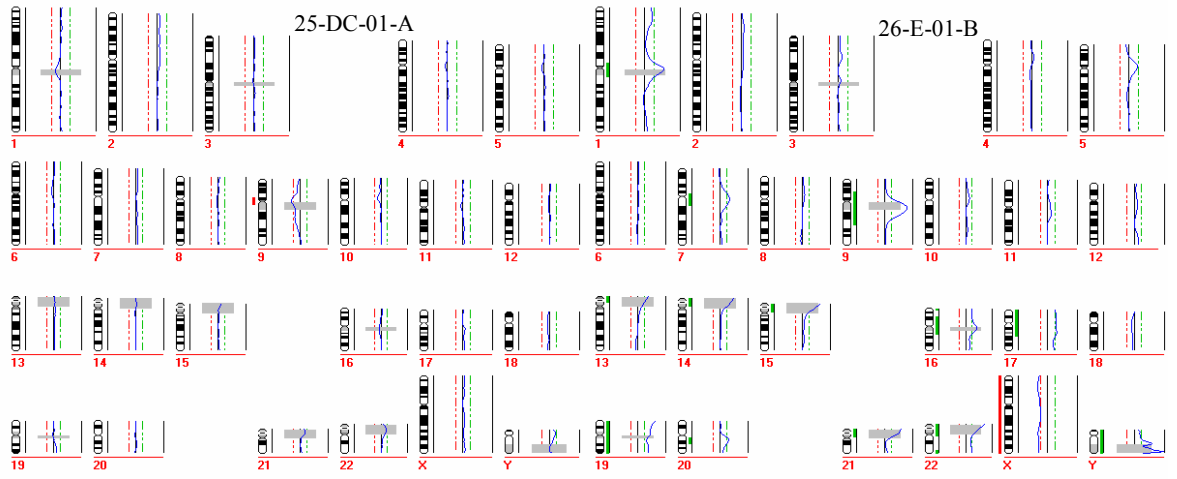
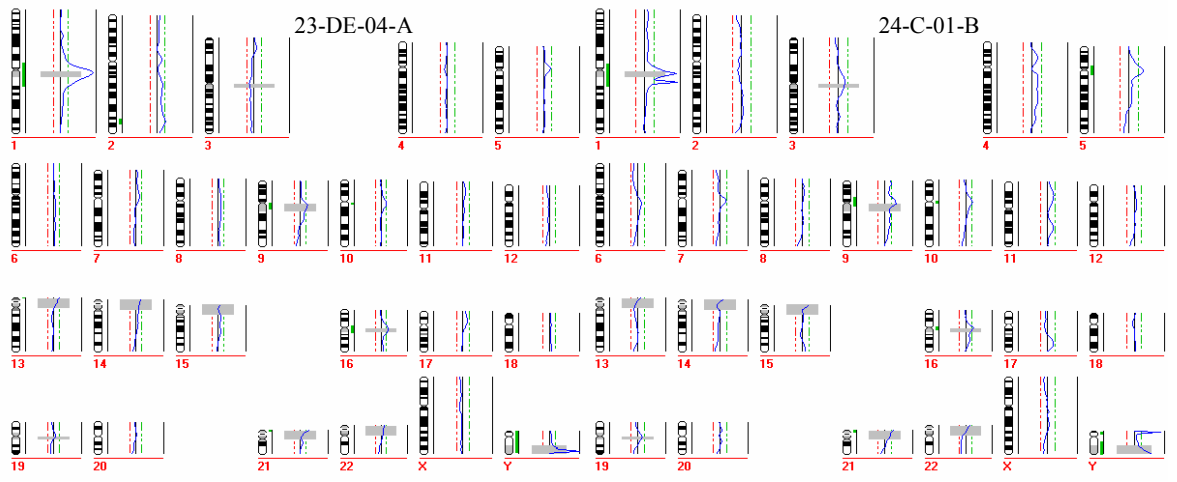
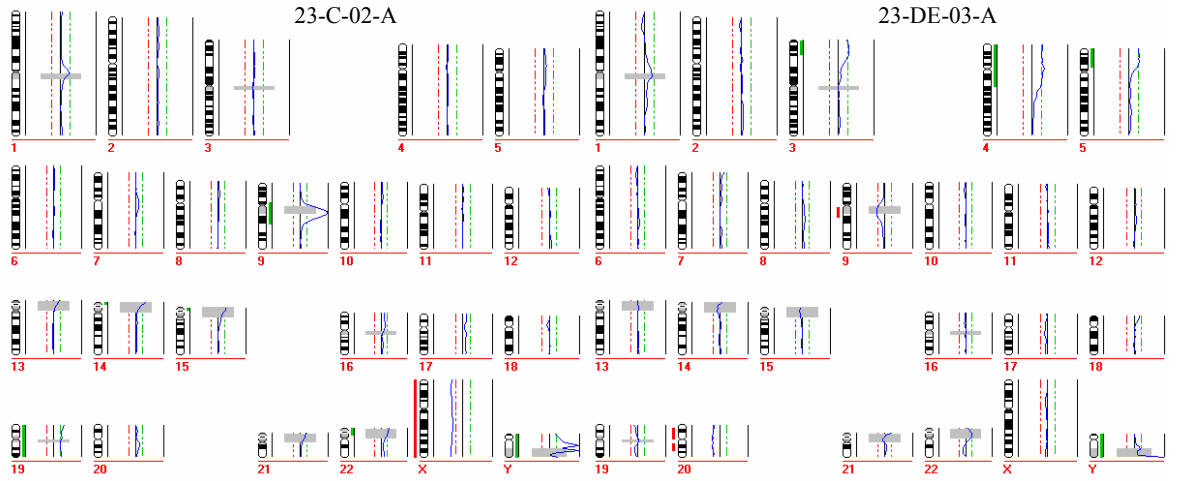


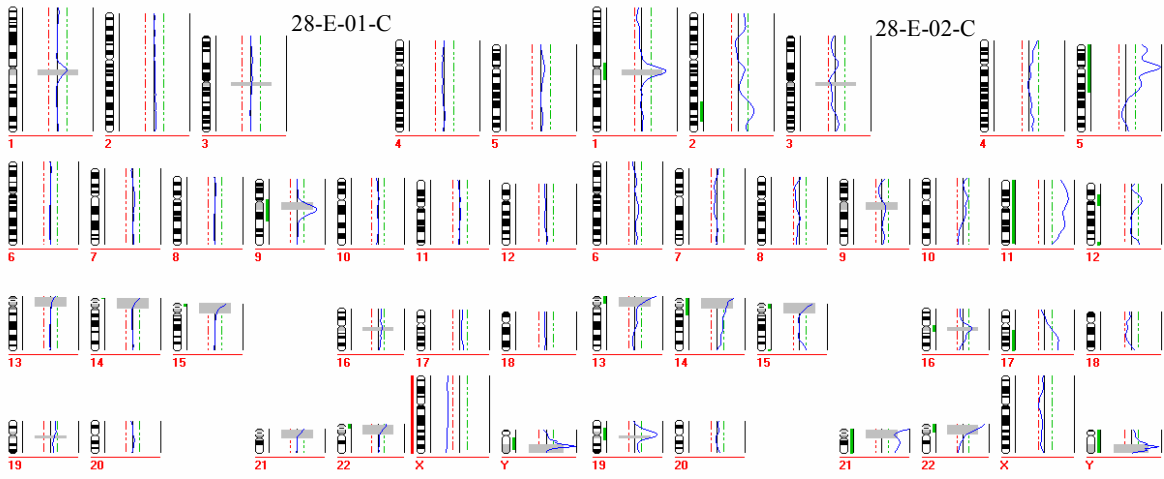
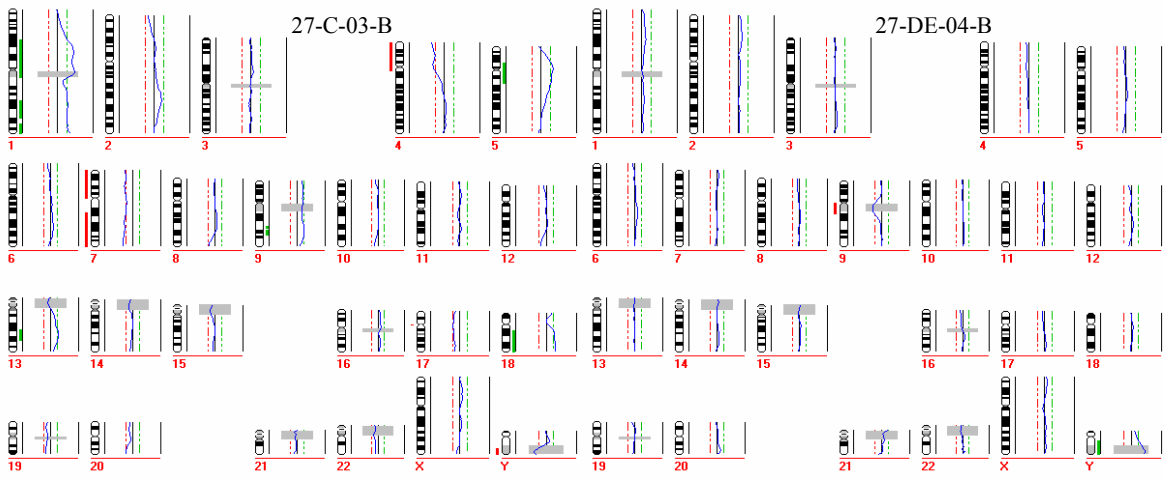
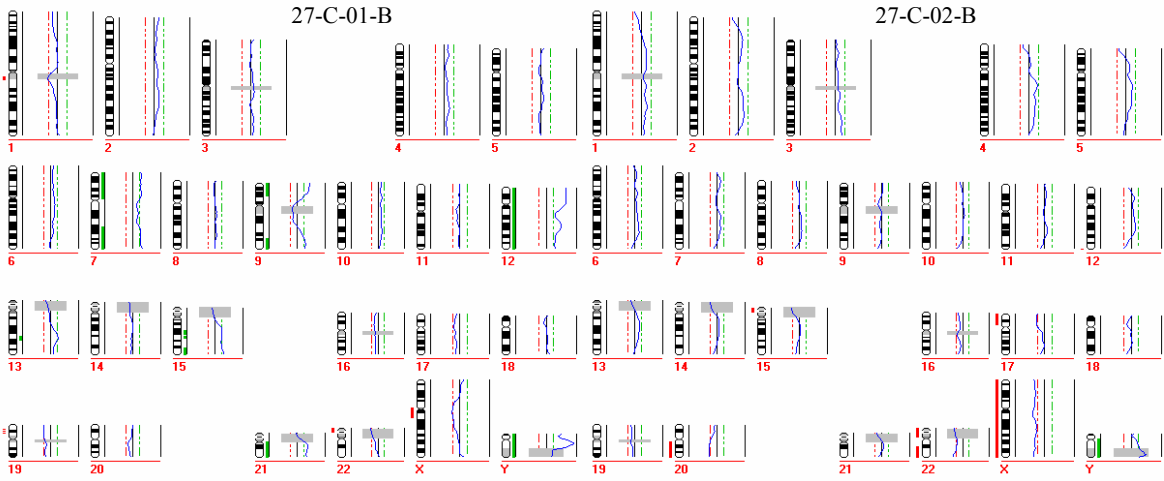


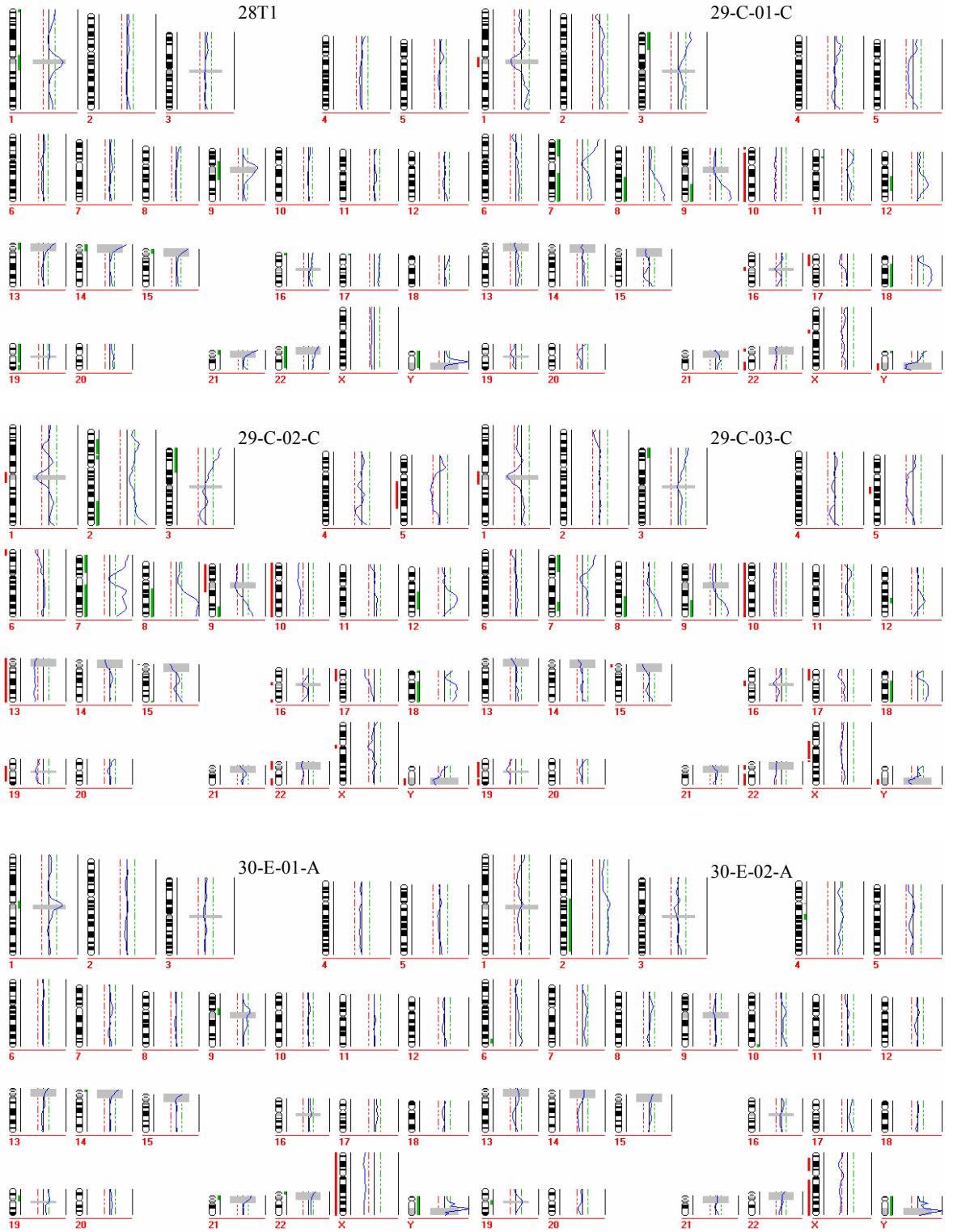


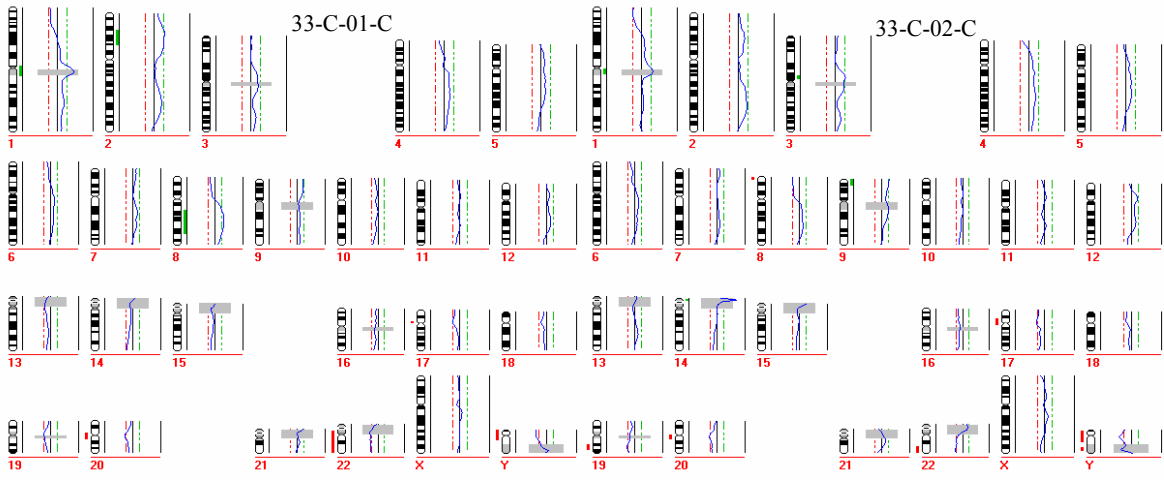
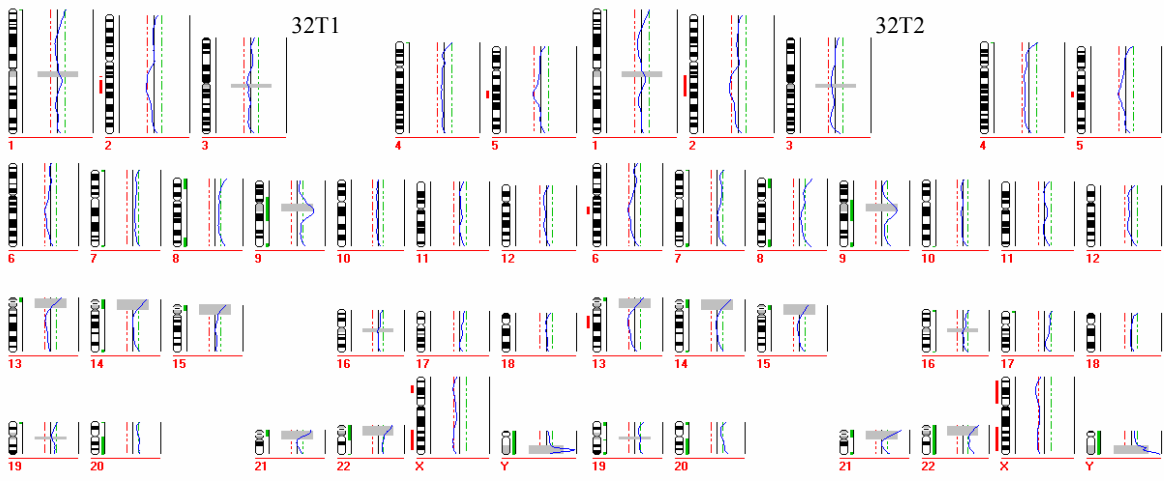
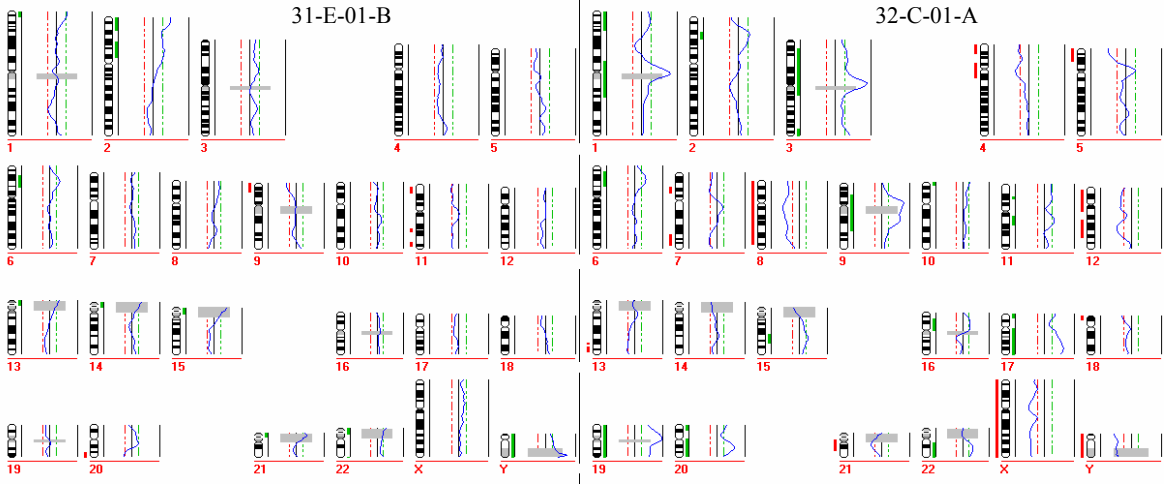


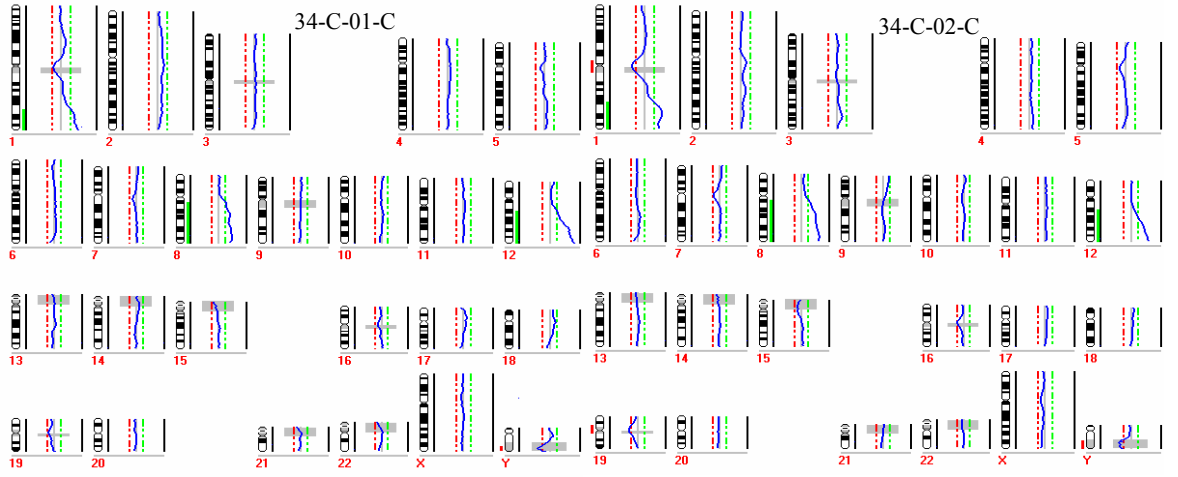
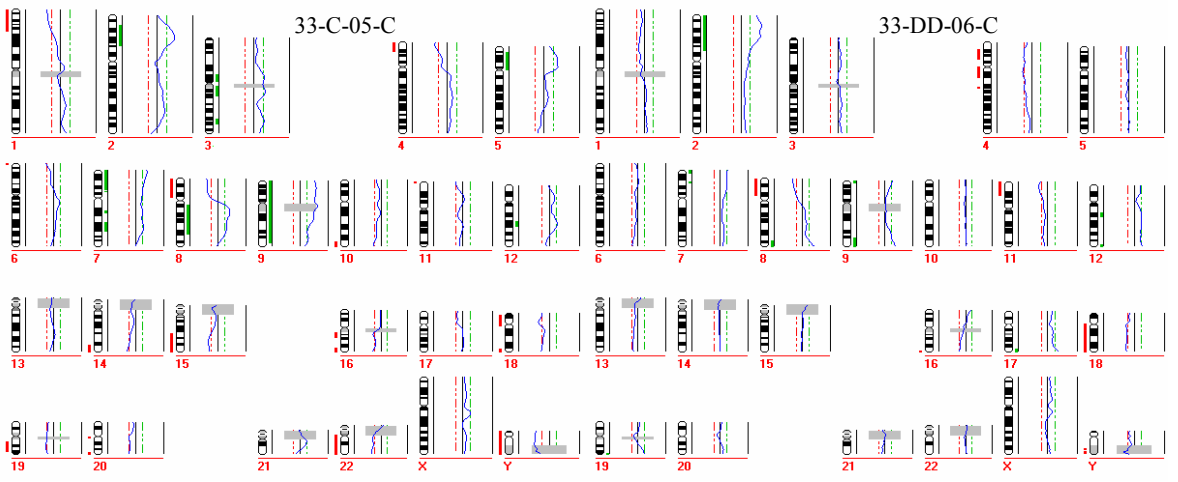
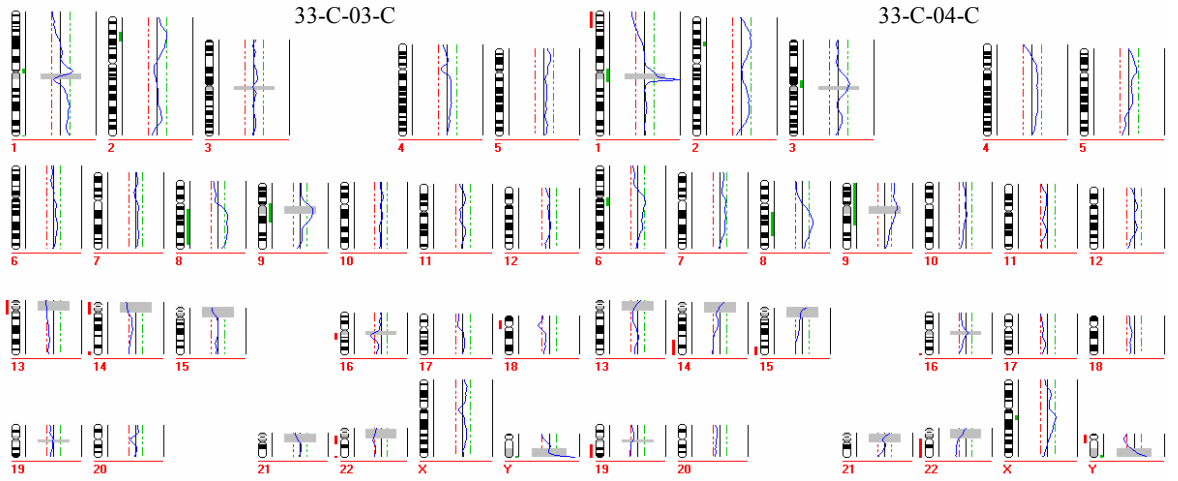


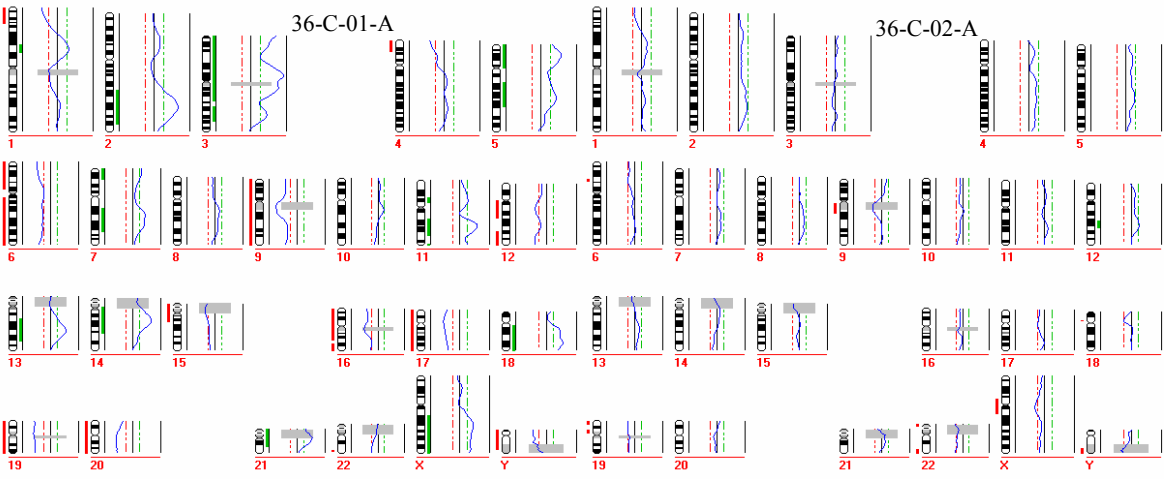
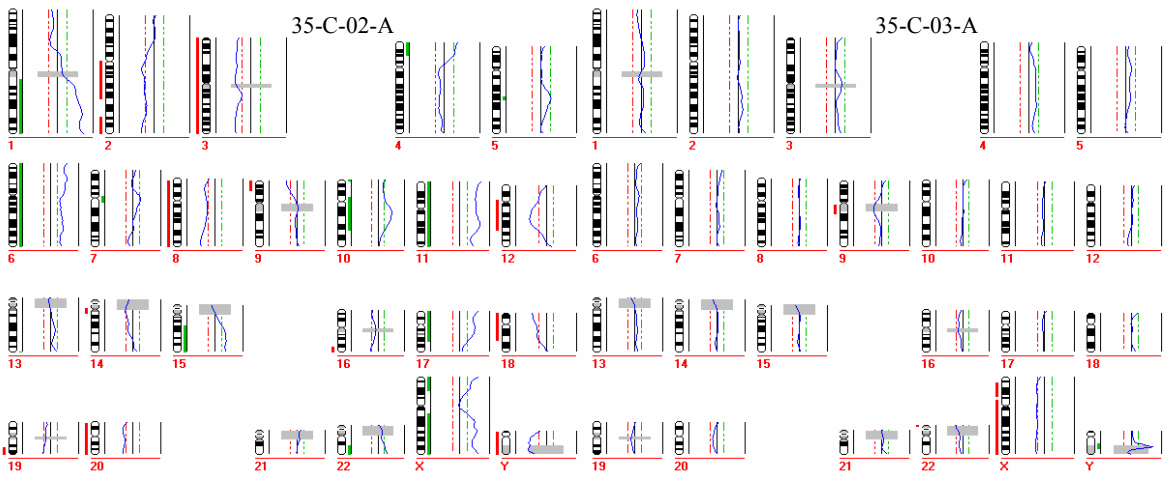
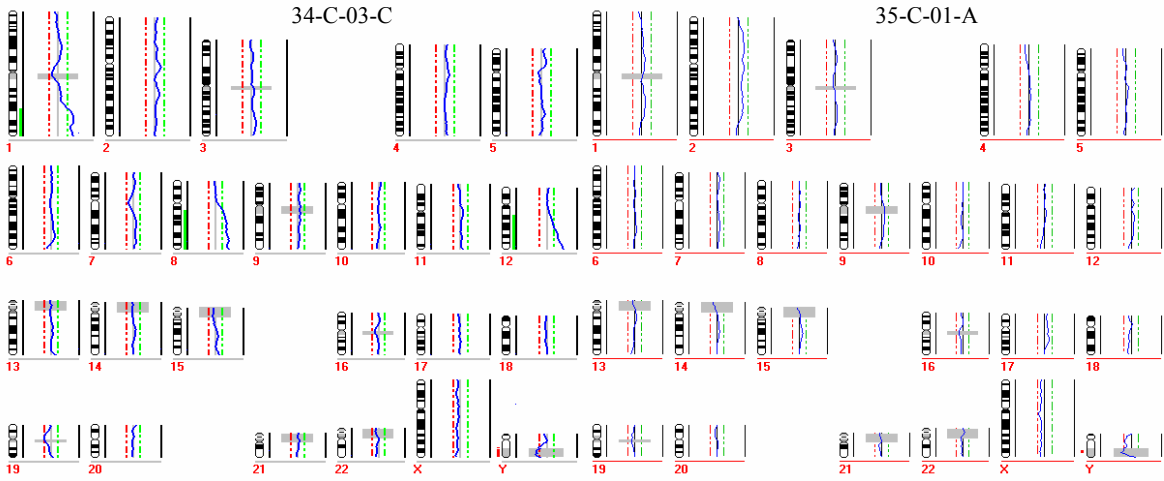


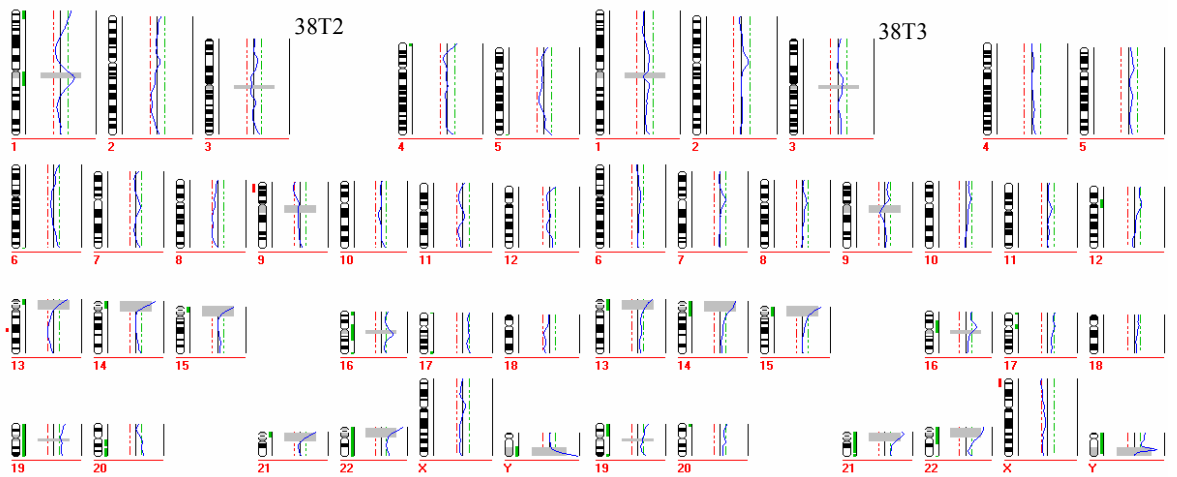
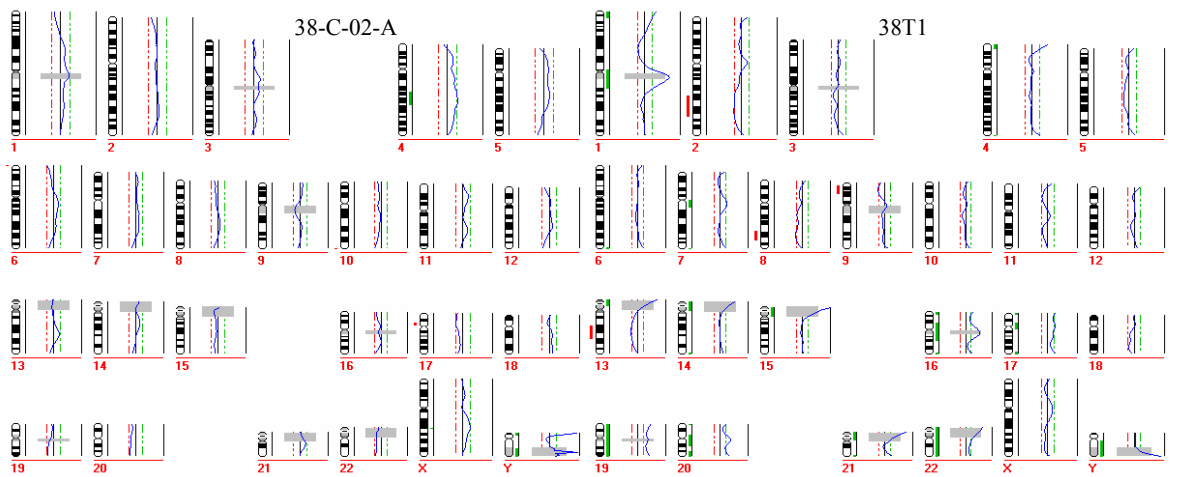
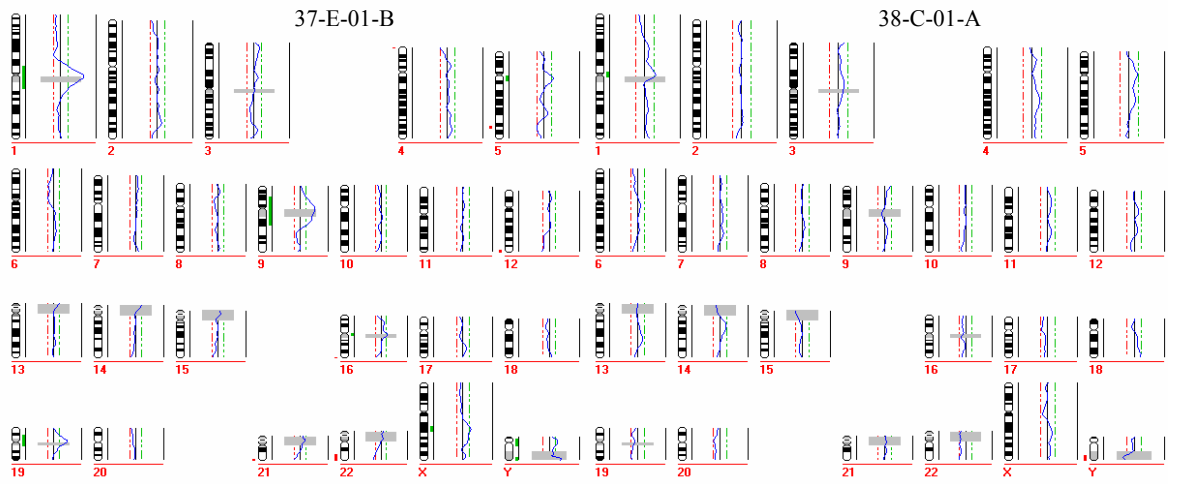


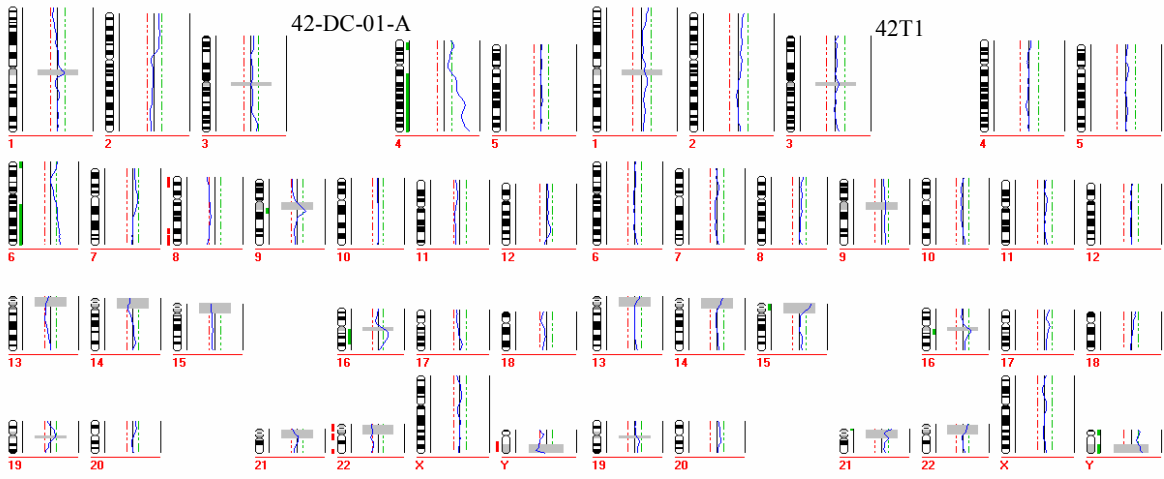
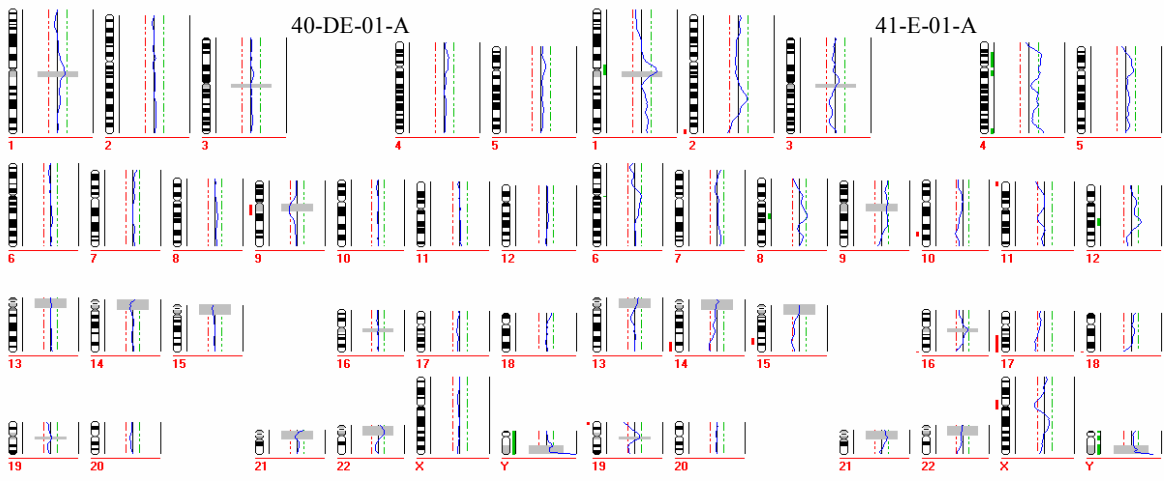
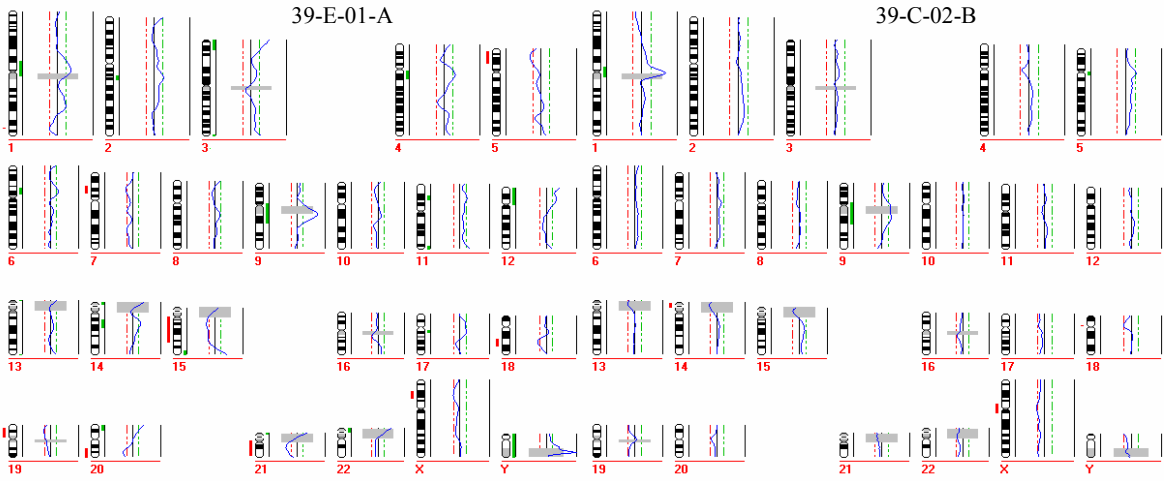


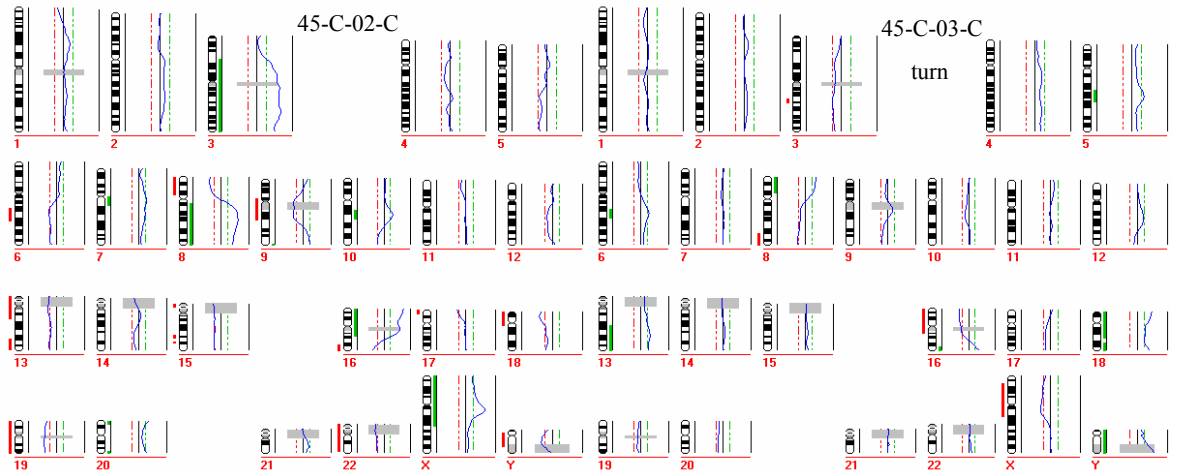
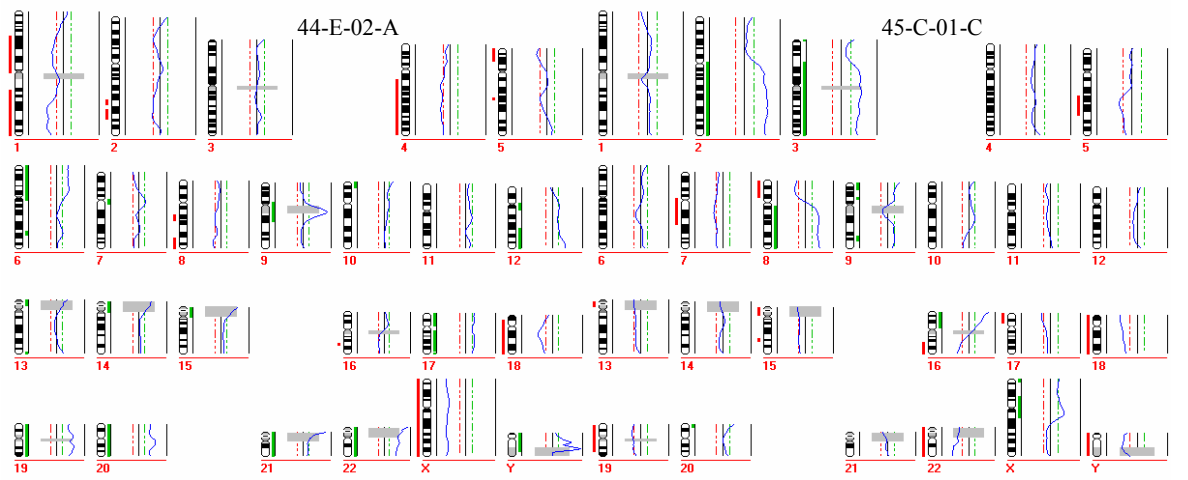
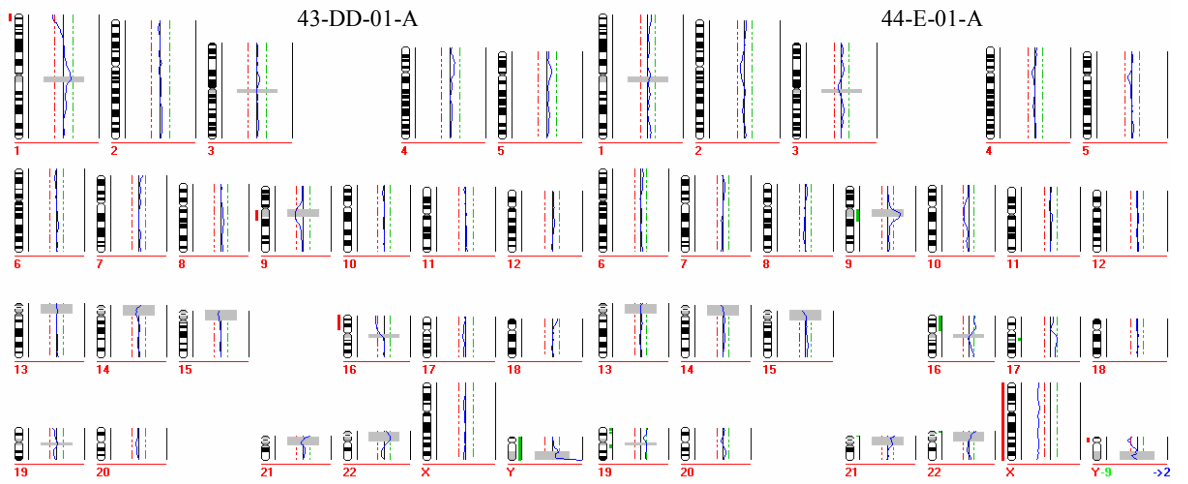


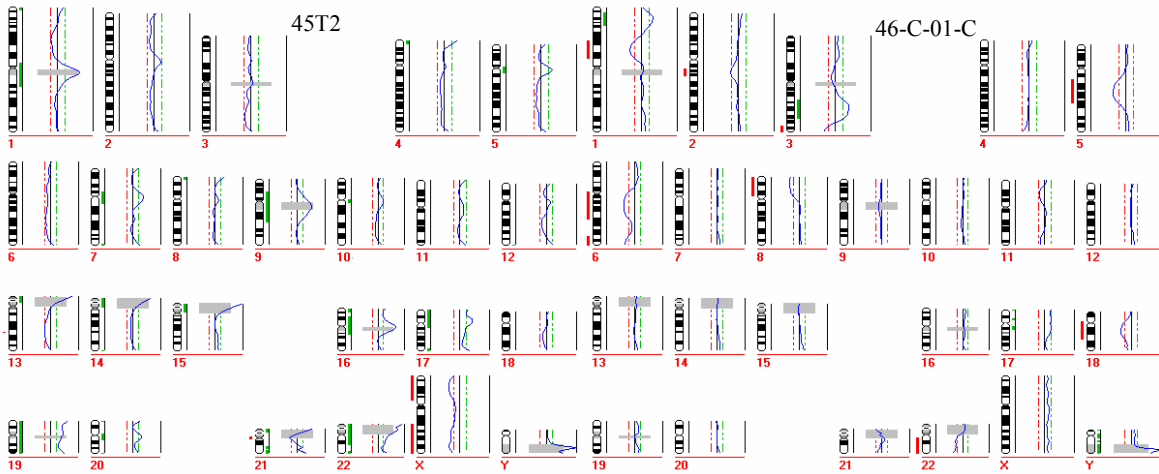
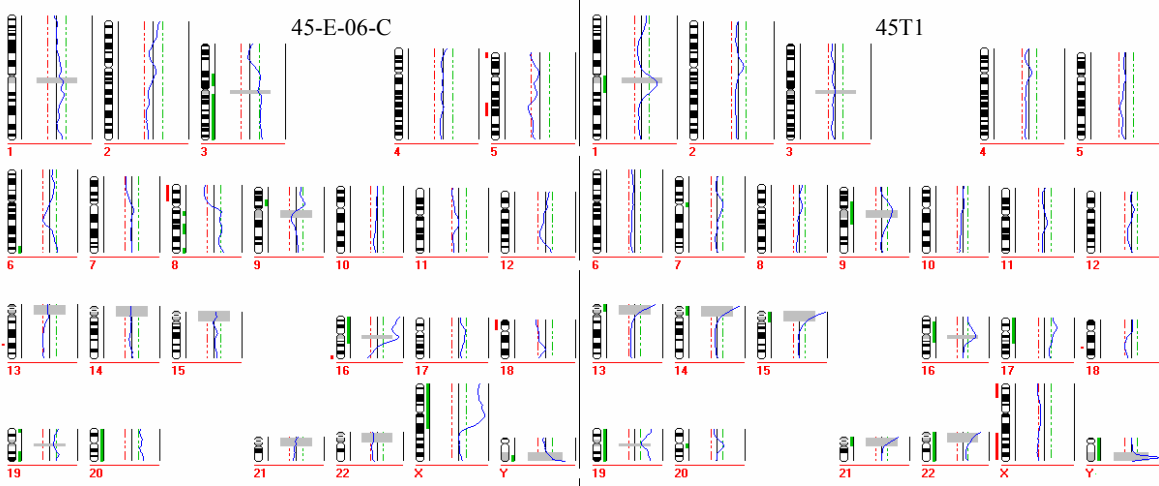
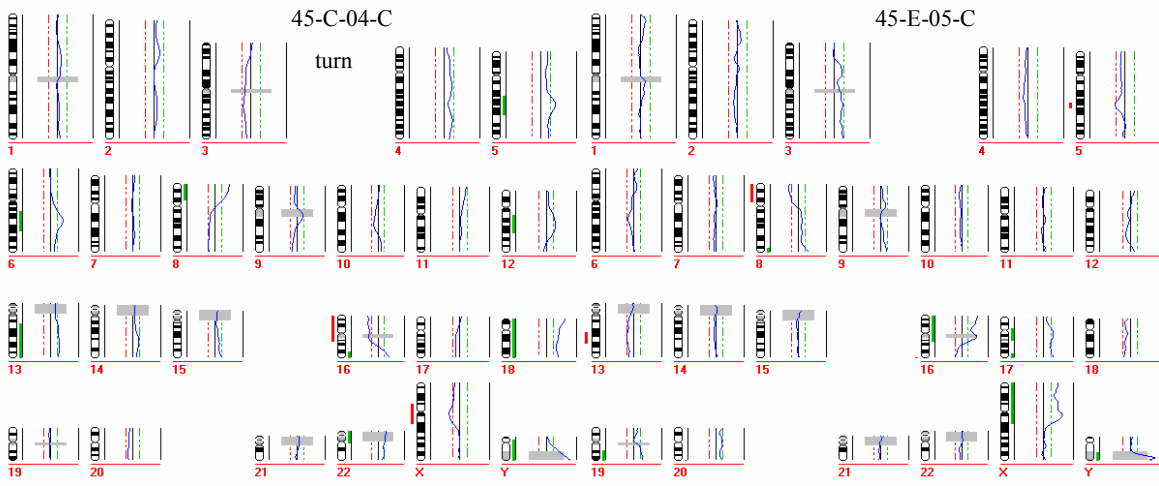


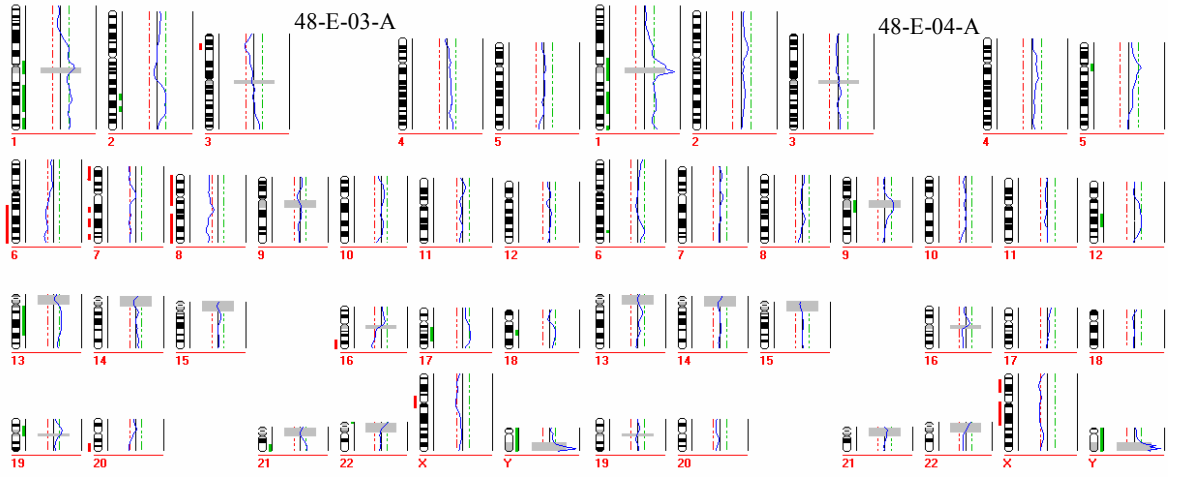
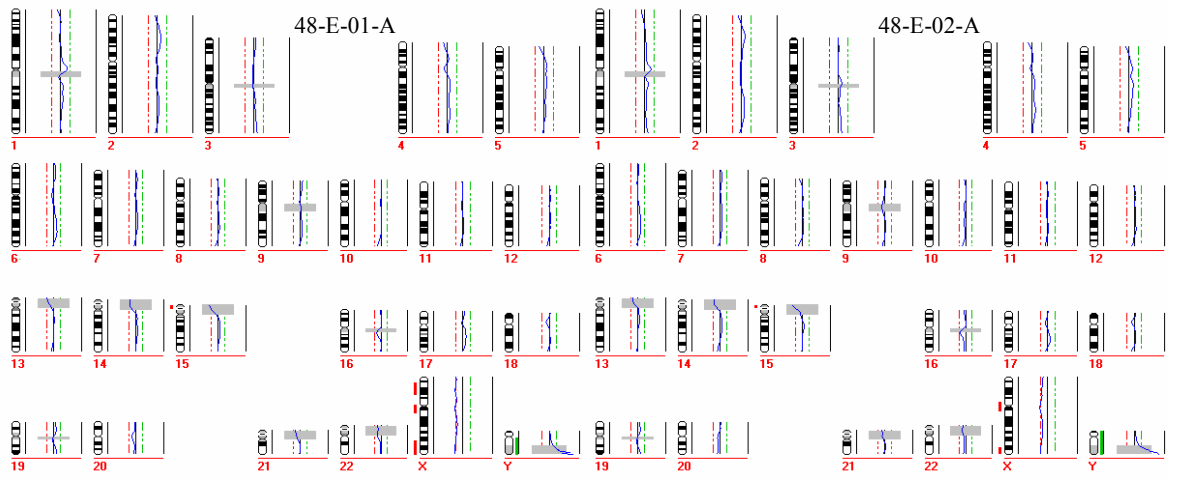
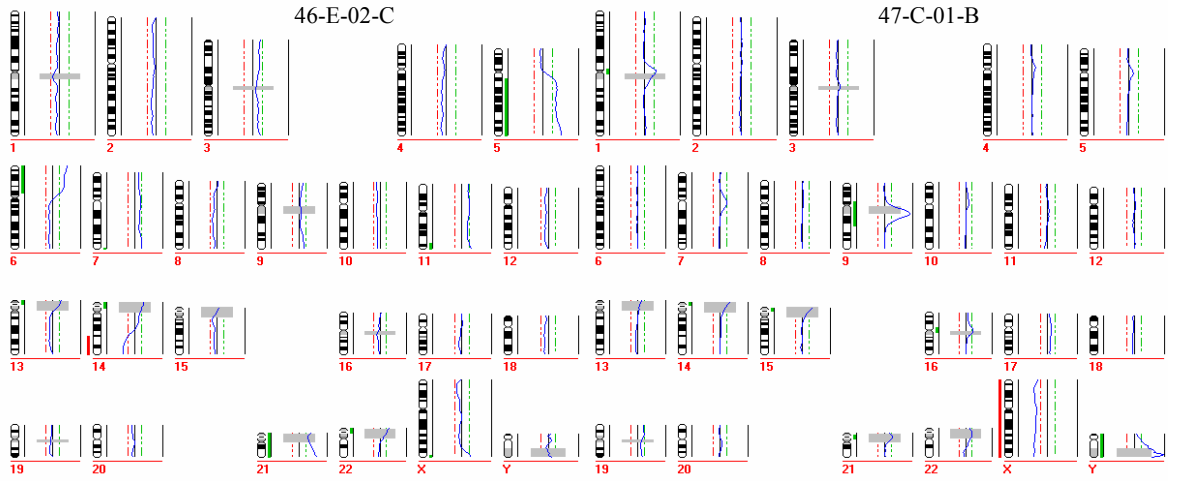


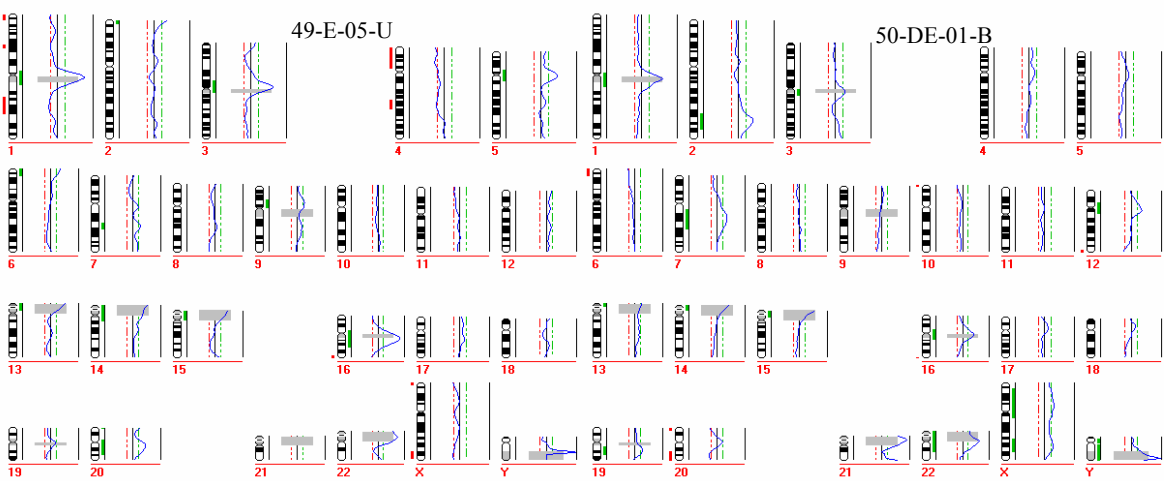
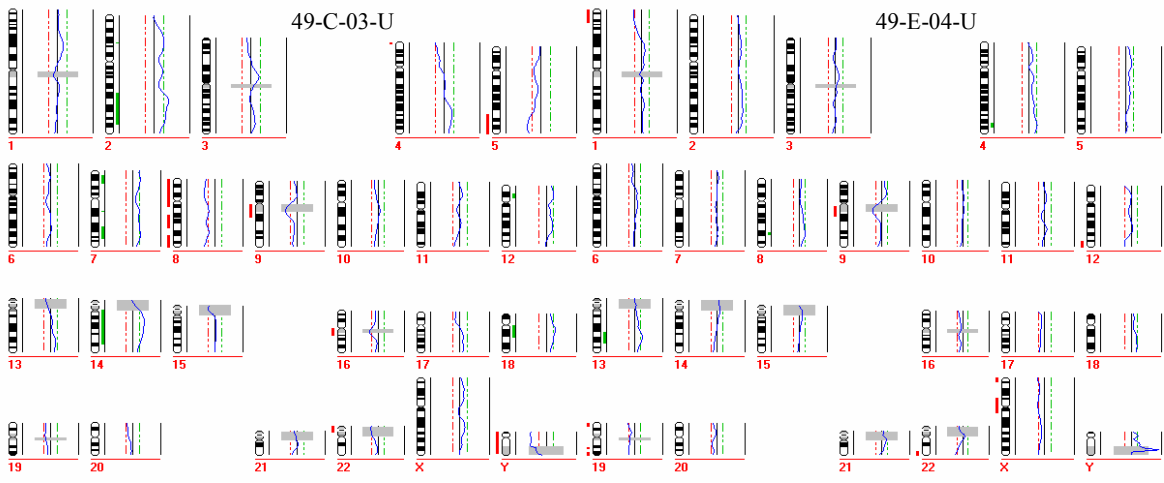
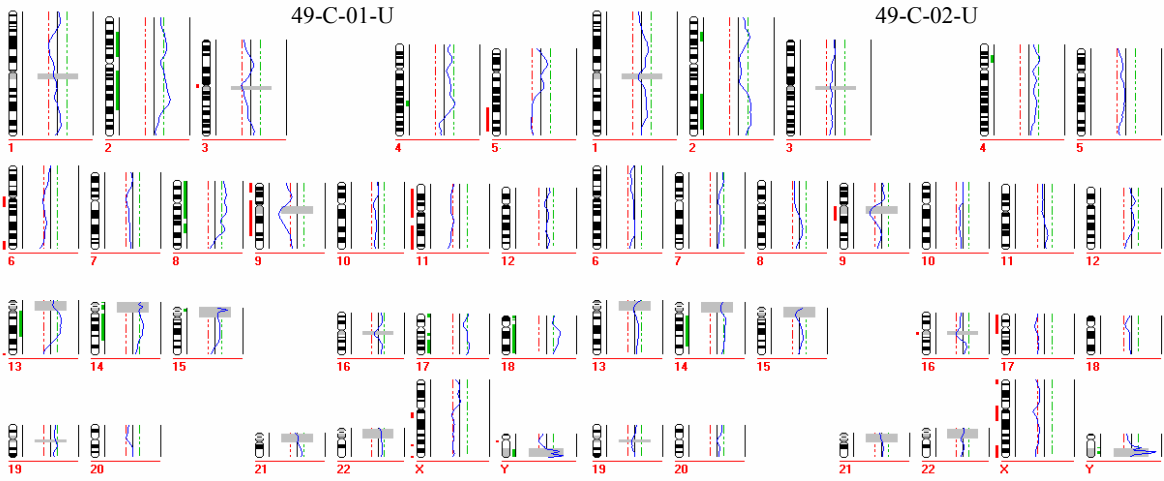


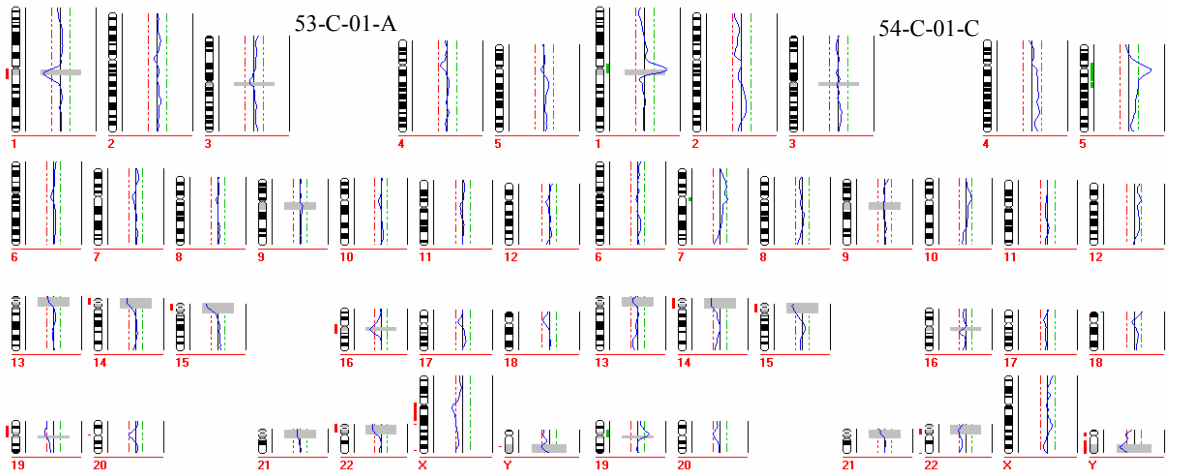
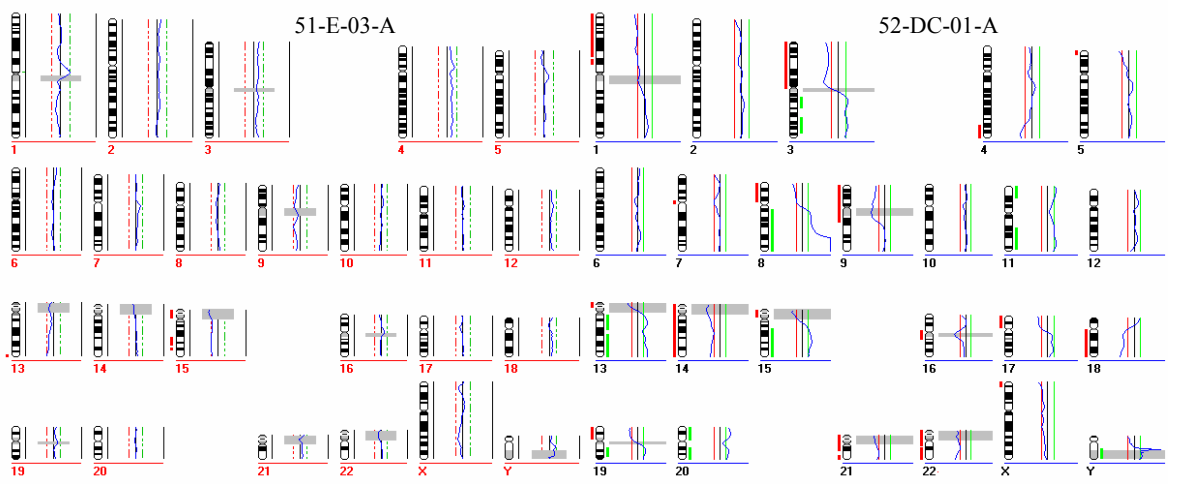
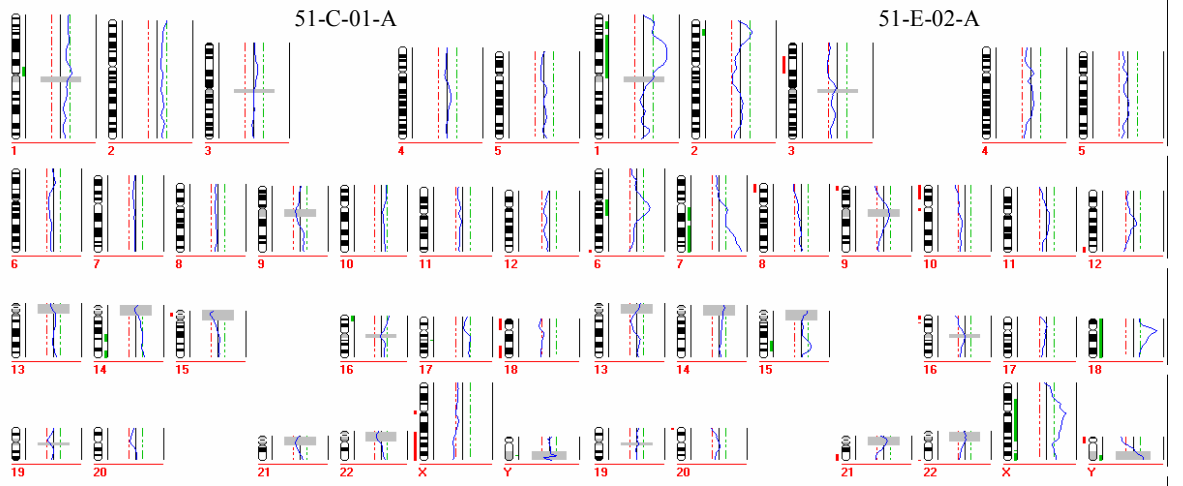


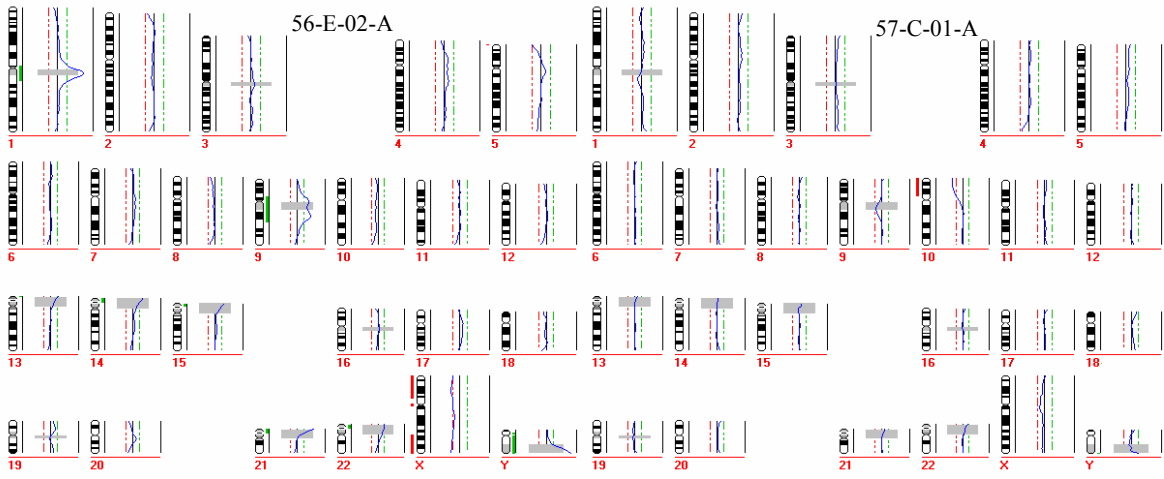
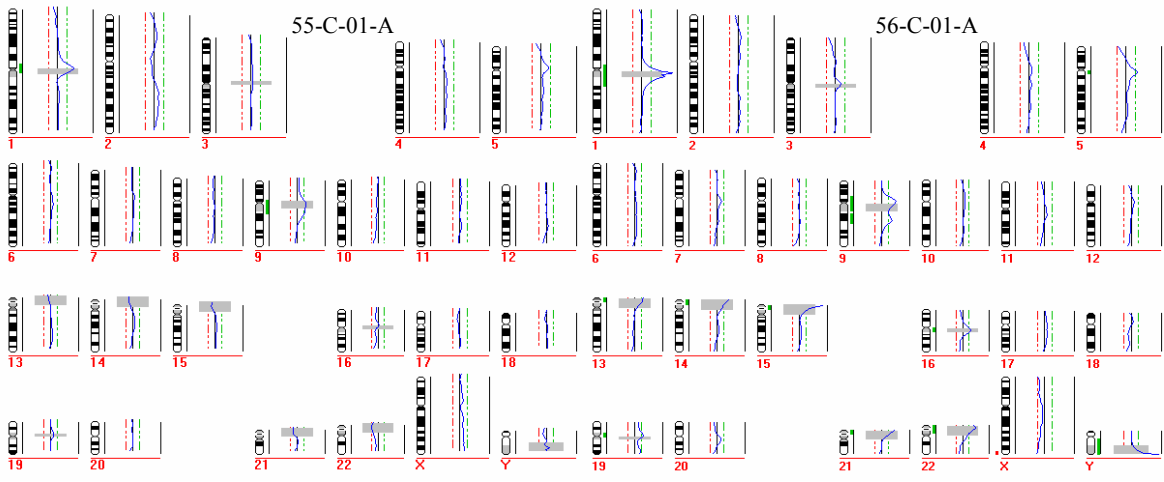
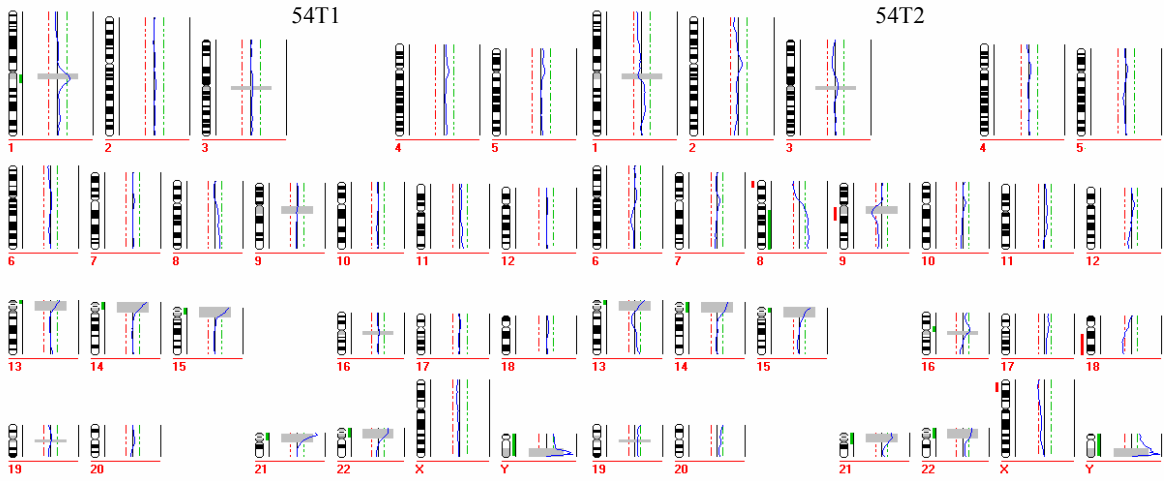


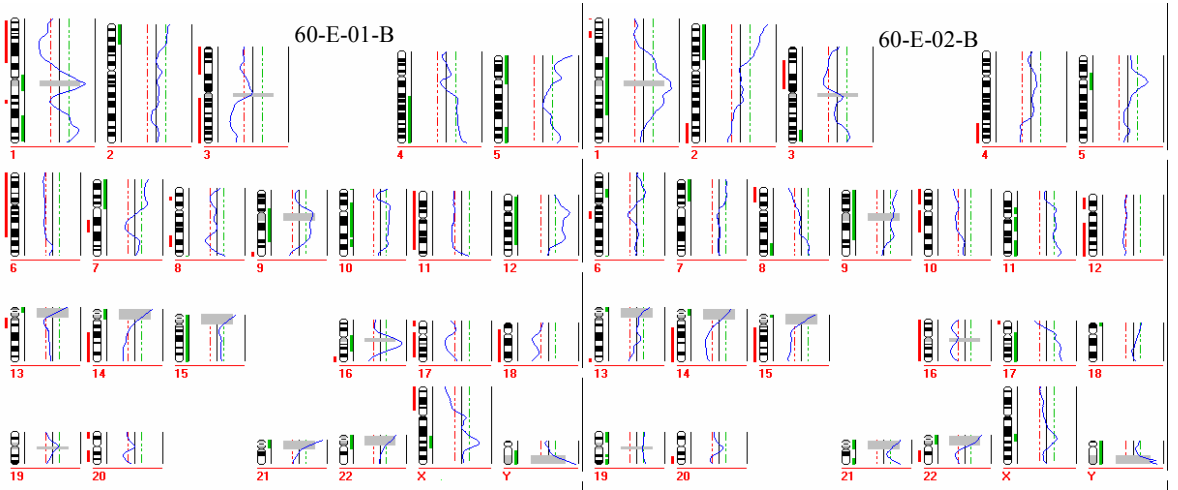
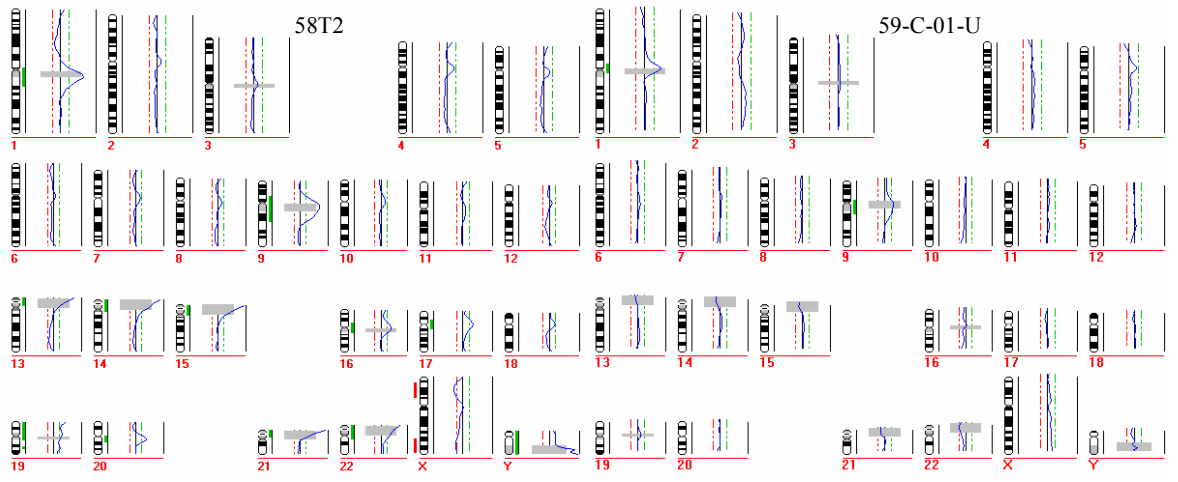
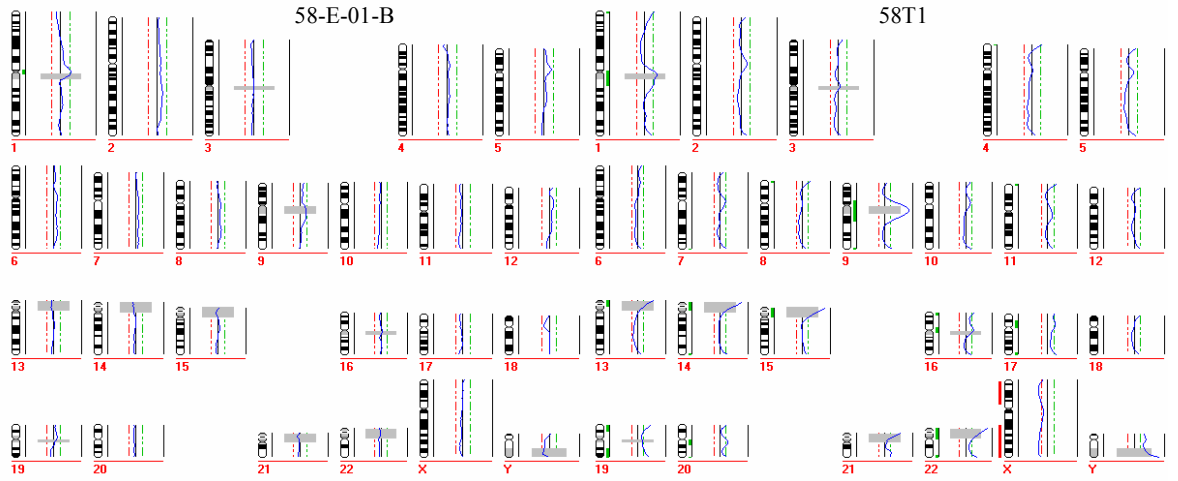


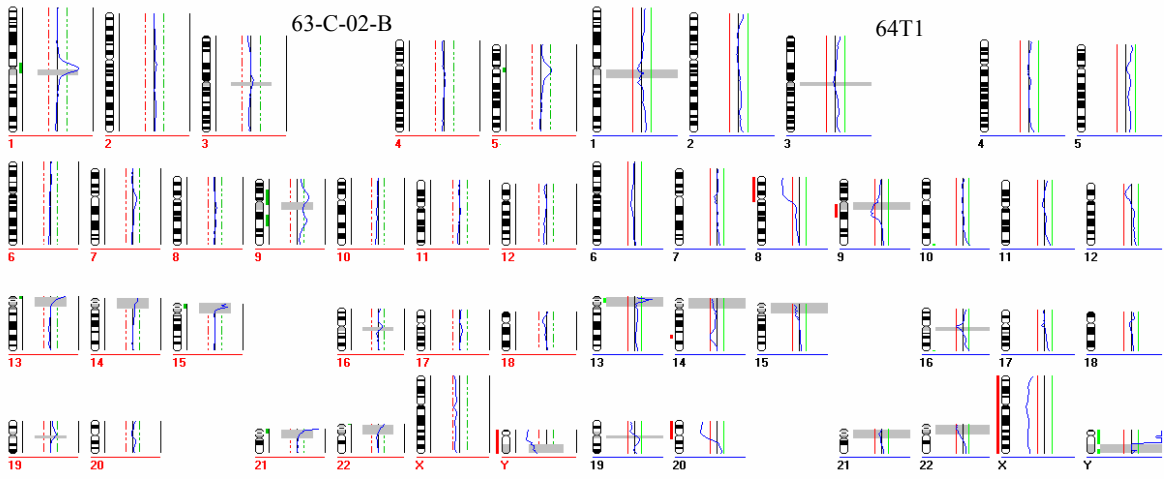
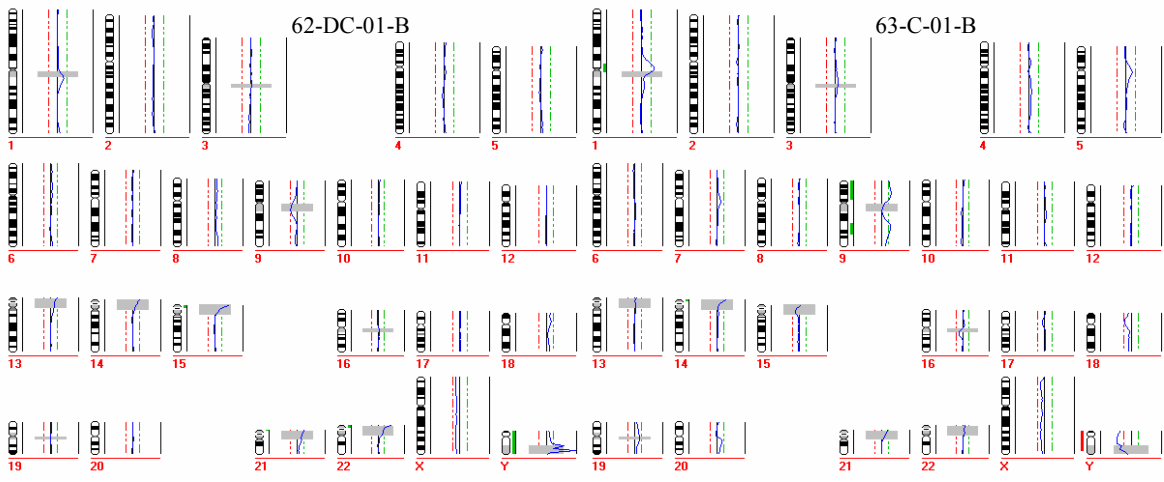
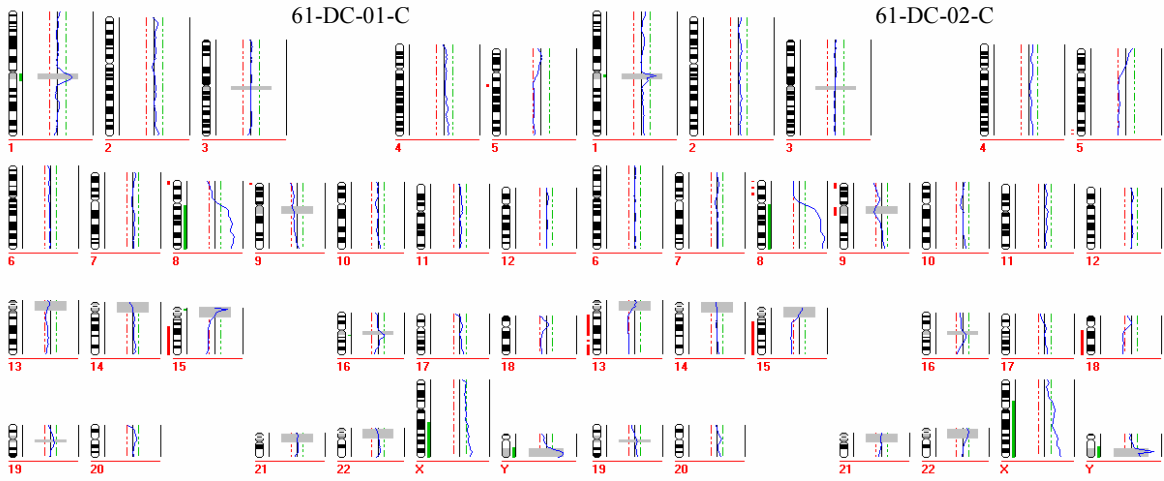


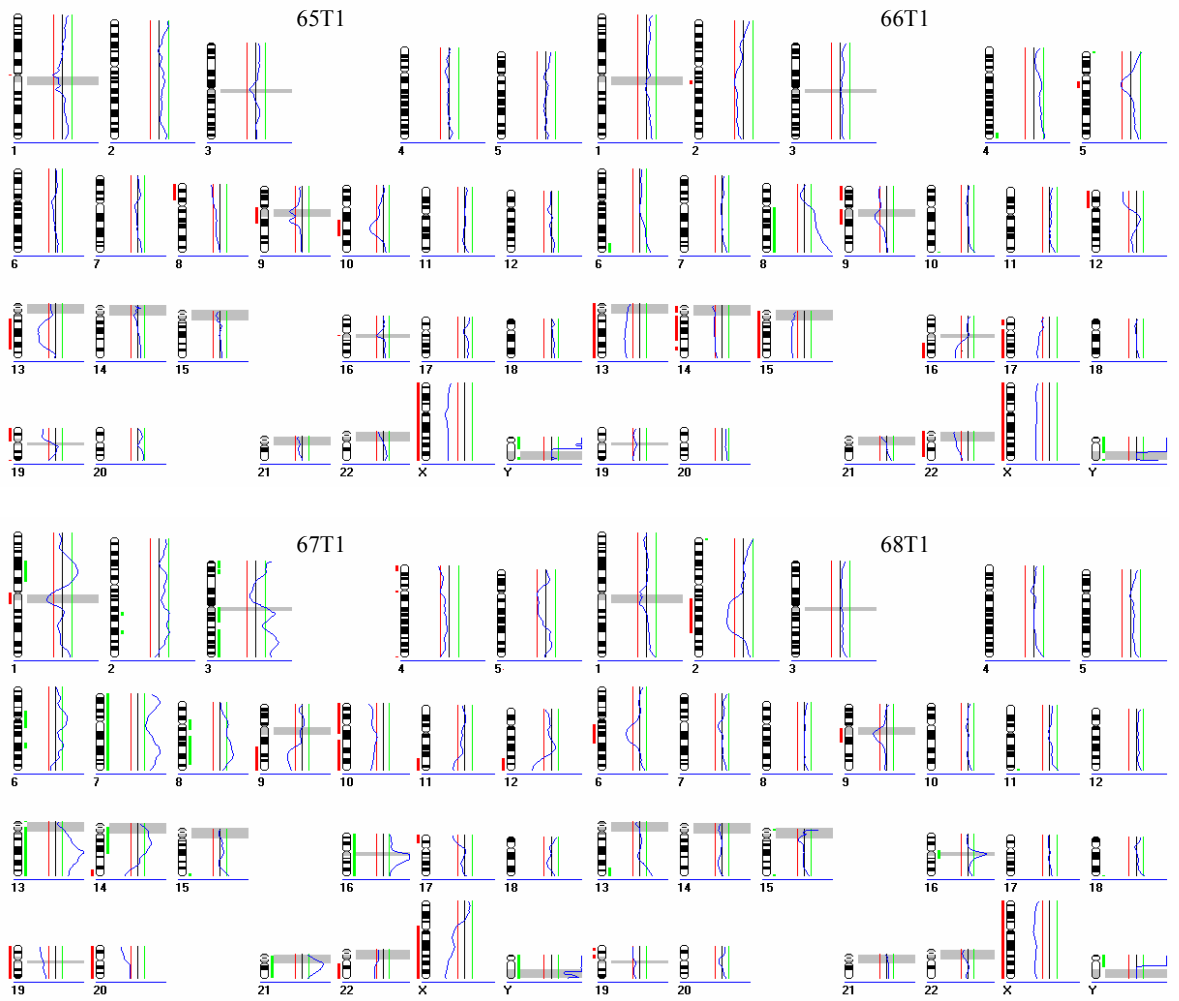




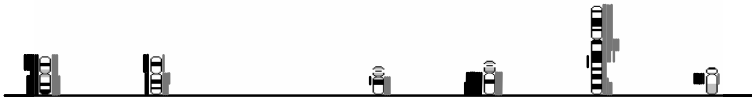
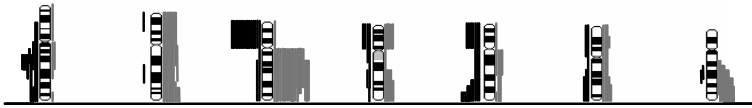








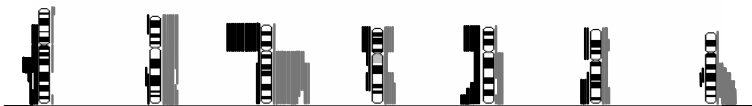
Histogramme der Zufallsverteilungen bei der Analyse aller M1-Zellen



Zufall 1



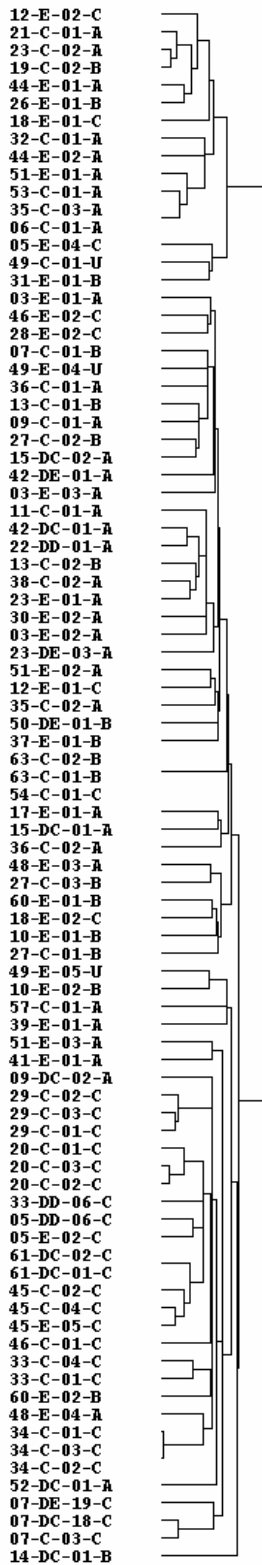
Zufall 2



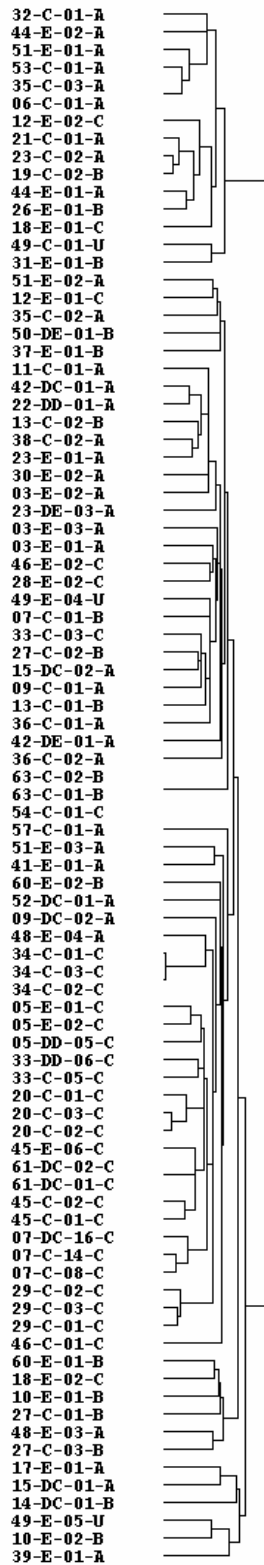
Zufall 3

Dendrogramme der Zufallsverteilungen aus den Clusteranalysen aller Einzelzellen

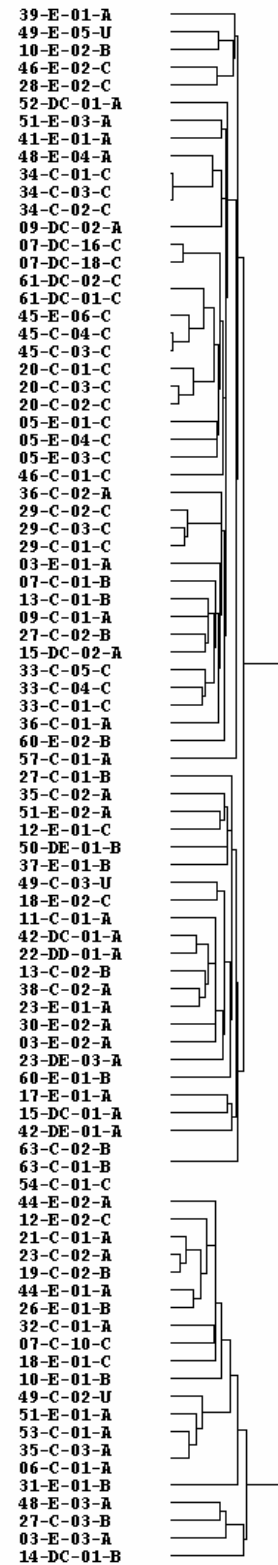
Zufall 1



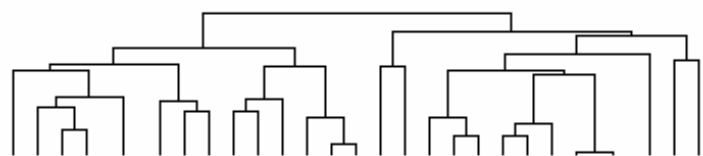
Zufall 2



Zufall 3

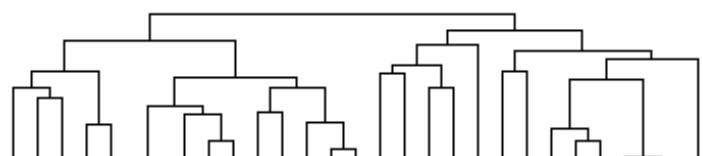


Dendrogramme der Zufallsverteilungen aus den Clusteranalysen zur Heterogenität disseminierter Zellen von einem Patienten



Zufall 1

46-C-01-C
45-C-01-C
45-E-06-C
45-C-03-C
61-DC-02-C
61-DC-01-C
05-E-03-C
05-E-02-C
05-DD-06-C
33-C-04-C
33-C-01-C
33-C-02-C
20-C-01-C
20-C-03-C
20-C-02-C
18-E-01-C
12-E-02-C
07-C-14-C
07-C-13-C
07-C-02-C
29-C-03-C
29-C-01-C
29-C-02-C
34-C-01-C
34-C-03-C
34-C-02-C
46-E-02-C
18-E-02-C
12-E-01-C



Zufall 2

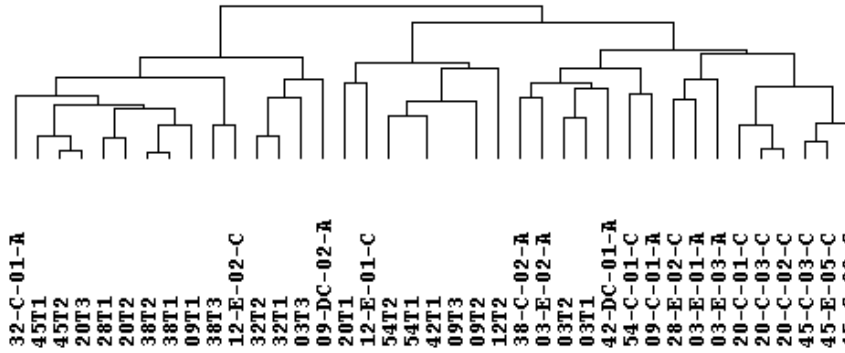
05-E-03-C
05-E-01-C
05-DD-05-C
07-C-09-C
07-C-04-C
61-DC-02-C
61-DC-01-C
45-C-01-C
45-E-05-C
45-C-04-C
33-DD-06-C
33-C-05-C
20-C-01-C
20-C-03-C
20-C-02-C
46-C-01-C
12-E-02-C
18-E-01-C
07-C-07-C
46-E-02-C
33-C-02-C
18-E-02-C
29-C-02-C
29-C-03-C
29-C-01-C
34-C-01-C
34-C-03-C
34-C-02-C
12-E-01-C



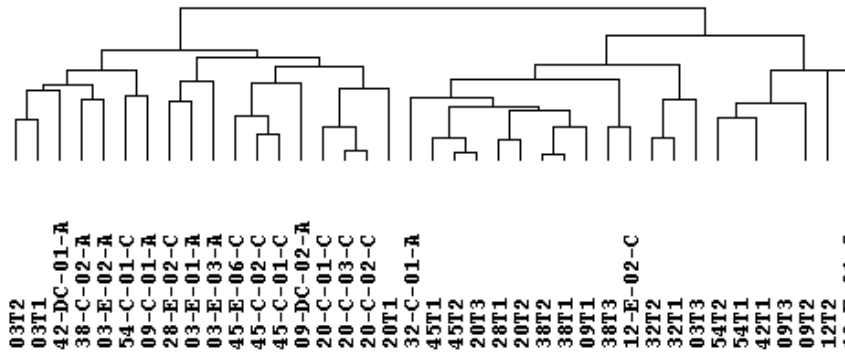
Zufall 3

46-C-01-C
18-E-02-C
18-E-01-C
12-E-02-C
07-C-11-C
12-E-01-C
33-C-04-C
33-C-03-C
29-C-02-C
29-C-03-C
29-C-01-C
34-C-01-C
34-C-03-C
34-C-02-C
46-E-02-C
05-E-03-C
45-C-02-C
45-C-04-C
45-C-03-C
61-DC-02-C
61-DC-01-C
20-C-03-C
20-C-02-C
20-C-01-C
05-E-02-C
05-E-01-C
33-DD-06-C
07-DC-16-C
07-C-08-C

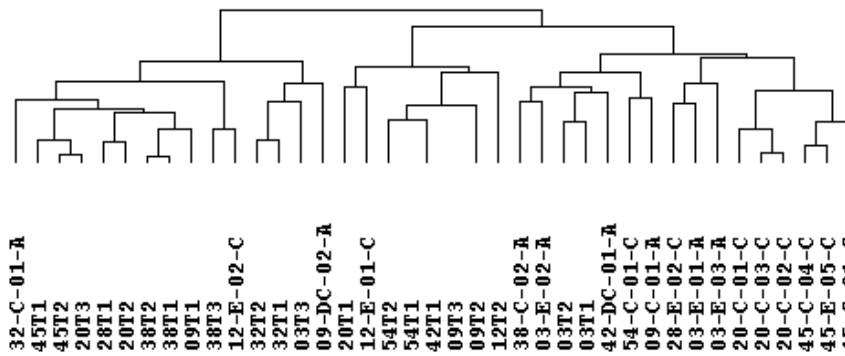
Dendrogramme der Zufallsverteilungen aus den Clusteranalysen der Einzelzellen mit ihrem zugehörigen Primärtumor



Zufall 1



Zufall 2



Zufall 3

9 Publikationen und Stipendien

Publikationen

Klein CA, Blankenstein TJ, Schmist-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmuller G. (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* **360**: 683-9.

Poster-Präsentationen

Polzer B, Weckermann D, Offner S, Oberneder R, Klein C. (2000). Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells in bone marrow of patients with prostatic carcinoma. *Großhadern Research Festival 2000. München.*

Polzer B, Weckermann D, Klein C. (2001). Genomische Analyse einzelner Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark von Patienten mit Prostata-Karzinom. *3rd International Symposium on Minimal Residual Cancer. Hamburg.*

Weckermann D, Polzer B, Mueller P, Wawroschek F, Schlimock G, Harzmann R, Klein C. (2002). Detection of disseminated tumor cells in bone marrow by Mab A45B/B3 but not by Mab CK2 correlates with biochemical relapse of prostate cancer patients. *Annual Meeting of the American Society of Oncology. Orlando.*

Weckermann D, Polzer B, Hamm M, Wawroschek F, Harzmann R, Klein C. (2002). Prognostic value of single micrometastatic cells detected in bone marrow of prostate cancer patients. *6th International Symposium on Biotechnology in Preventive Oncology. Paris.*

Polzer B, Weckermann D, Arnholdt H, Klein C. (2005). Identification of characteristic chromosomal changes in single disseminated cells during progression of human prostate cancer. *AACR Oncogenomics 2005. San Diego.*

Polzer B, Weckermann D, Arnholdt H, Klein C. (2005). Identification and characterization of single disseminated progenitor cells of bone metastasis in prostate cancer. *AACR 97th Annual Meeting 2006. Washington, DC.*

Stipendien

10.2001-09.2002 Stipendium zur Förderung medizinischer Doktoranden durch den Böhlinger-Ingelheim Fond

10 Lebenslauf

Name: Bernhard Michael Polzer

Geburtstag: 10.04.1977

Geburtsort: Rosenheim

Familienstand: ledig

Kinder: Hanna Louisa Glöckl, geboren am 16.10.2003

1983-1987 Besuch der Grundschule Haunwöhr

1987-1996 Besuch des Apian-Gymnasium Ingolstadt

06.1996 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife „sehr gut“ (1,1)

08.1996-09.1997 Zivildienst am Klinikum Ingolstadt, anästhesiologische Intensivstation

11.1997-04.2004 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

09.1999 Ärztliche Vorprüfung „gut“ (2,3)

09.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung „gut“ (2,0)

03.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung „gut“ (1,7)

04.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung „sehr gut“ (1,0)

05.2004-09.2004 AiP am Institut für Immunologie der LMU München

10.2004 Erlangung der Vollapprobation für Humanmedizin

seit 10.2004 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Immunologie