

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor der Klinik: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Norbert R. Kübler

**Detektion und molekulargenetische Charakterisierung einzelner
disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark
von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Benedikt Reising

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ulrich Meyer

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Arne Gerber

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.

Johann Wolfgang von Goethe

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Alexander, M., Reising, B., Schumacher, S., Sproll, C. and Stoecklein, N.H., (2013), Validation of markers for the screening and identification of disseminating tumor cells in lymph nodes and bone marrow. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* (51), S. 77-79.

Zusammenfassung

Die Prognose bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) ist neben fortgeschrittener Tumorstadien bei Erstdiagnose von den sich nach Jahren entwickelnden Rezidiven und Metastasen abhängig. Es ist bekannt, dass sich einzelne Tumorzellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt von ihrem Primärtumor absiedeln sowie in andere Organe disseminieren und sich unabhängig genetisch weiter entwickeln können. Diese okkulten disseminierten Tumorzellen (DTCs) können als Ausgangspunkt späterer Rezidive und Metastasen sowie als eine mögliche Ursache für die sog. minimale Resterkrankung (MRD) angesehen werden.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde zunächst die Detektionsrate von DTCs aus den beiden mesenchymalen Kompartimenten Knochenmark (KM) und Lymphknoten (LK) bei HNSCC-Patienten über eine Immunfluoreszenzfärbung gegen den epithelialen Marker Zytokeratin 18 (CK 18) und gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül CD326 (EpCAM) bestimmt. Dabei zeigte sich eine höhere Detektionsrate von LK-DTCs als von KM-DTCs. Des Weiteren wiesen die DTCs überwiegend eine CK18-Positivität und EpCAM-Negativität auf. Ein solcher Funktionsverlust von EpCAM könnte somit eine wichtige Voraussetzung für das Disseminierungs- und Metastasierungsverhalten von DTCs darstellen. In dieser Dissertationsarbeit konnten 38 DTCs mittels der Metaphasen-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (mCGH) gesamtgenomisch analysiert werden. Die beobachteten genetischen Veränderungen betrafen Chromosomenregionen mit bereits in der Literatur beschriebenen relevanten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Ferner zeigte sich im Rahmen der mCGH-Auswertung, dass die KM-DTCs hochsignifikant mehr chromosomale Aberrationen als die LK-DTCs aufwiesen. Bei der Analyse des prognostischen Einflusses der Anwesenheit von LK-DTCs auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten zeigte sich, dass Patienten mit nodalen DTCs länger überlebten als Patienten ohne LK-DTCs. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass es sich bei einem Teil der wenig aberranten LK-Einzelzellen nicht um DTCs, sondern um sog. Zytokeratin-positive interstitielle Retikulumzellen (CIRCs) handelte, deren Funktion bis heute nicht abschließend geklärt ist.

In dieser Dissertationsarbeit konnten die KM-DTCs als relevante Zellen identifiziert werden, die aufgrund ihrer genetischen Eigenschaften als potentielle Vorläuferzellen von Metastasen angesehen werden können. Eine weitere Charakterisierung mit hochauflösenden Methoden sowie eine Identifikation von Mechanismen, die diese Zellen zu einer Disseminierung in das Knochenmark, in die (lokoregionären) Lymphknoten u./o. in weitere Organe veranlassen, könnten zusätzliche wichtige Einblicke in den Disseminierungs- und Metastasierungsprozess beim HNSCC geben.

Abstract

The prognosis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is reliant on advanced tumor stages at initial diagnosis, but more importantly is determined by relapses and metastases of the disease. It is known that single disseminated tumor cells (DTCs) can egress from their primary tumor at an early stage into other organs and can develop genetic aberrations independently. This occult tumor cell dissemination can be seen as a starting point of subsequent relapses and metastasization and can be a reason for the so-called minimal residual disease (MRD).

In the present thesis, the detection rate of DTCs in the two mesenchymal compartments bone marrow (BM) and lymph node (LN) in HNSCC patients was determined by immunofluorescence staining against the epithelial marker Cytokeratin 18 (CK 18) and against the epithelial cell adhesion molecule CD326 (EpCAM). By this analysis, a higher detection rate of LN-DTCs than BM-DTCs could be observed. Furthermore, almost every detected DTC from BM and LN was positive for CK18 and negative for EpCAM. Such a loss of function of EpCAM could thus be an important prerequisite for the dissemination and metastasization behavior of DTCs. In this thesis, 38 DTCs could be analyzed by metaphase-based comparative genomic hybridization (mCGH). The observed genetic changes affected chromosomal regions with relevant oncogenes and tumor suppressor genes already described in the literature. Additionally, mCGH analyses revealed that the BM-DTCs had highly significant more chromosomal aberrations than the LN-DTCs. Analysis of the prognostic influence of the presence of LN-DTCs concerning overall survival of HNSCC patients showed that patients with nodal DTCs survived longer than patients without LN-DTCs. These results could indicate that some of the analyzed low-/non-aberrant single LN cells were not DTCs, but so-called Cytokeratin-positive interstitial reticulum cells (CIRCs); the function of which remains still unknown.

In this thesis, the BM-DTCs could be identified as relevant cells which can be regarded as potential precursor cells of metastases on the basis of their genetic properties. A further characterization with high-resolution techniques as well as the identification of the mechanisms that cause these cells to disseminate into the bone marrow, (locoregional) lymph nodes or other organs could provide additional important insights into the dissemination and metastasization process of HNSCC.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	g	Einheit der relativen Zentrifugalkraft
A	Adenin	G	Guanin
Abb.	Abbildung	h	<i>hour(s)</i> , Stunde(n)
abs.	absolut	hc	<i>high concentrated</i> , hochkonzentriert
AK	Antikörper	HCl	Salzsäure
ATP	Adenosintriphosphat	HIV	humanes Immundefizienz-Virus
bp	Basenpaare	HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , bovines Serumalbumin	HOT	Haft-Objekträger
C	Cytosin	HPV	humanes Papilloma-Virus
CCD	<i>charged coupled device</i>	ICD	<i>international classification of diseases</i> , Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
CD	<i>cluster of differentiation</i>	ISCN	<i>international system for human cytogenetic nomenclature</i> , Internationales System für humane zytogenetische Nomenklatur
CIRC	<i>Cytokeratin-positive interstitial reticulum cell</i> , Zytokeratin-positive interstitielle Retikulumzelle	KAc	Kaliumacetat
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>	kb	Kilobasen
CK	<i>Cytokeratin</i> , Zytokeratin	KCl	Kaliumchlorid
CT	Computertomographie	KM	Knochenmark
Cy3	Cyanin 3	l	Liter
Cy3.5	Cyanin 3.5	LK	Lymphknoten
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid	LOH	<i>loss of heterozygosity</i> , Verlust der Heterozygotie
dATP	Desoxyadenin-Triphosphat	Lsg.	Lösung
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat	M	Molar (mol/l); 1 mol= 6,022 x 10 ²³ Teilchen
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser	Mbp	Megabasenpaare
dGTP	Desoxyguanin-Triphosphat	mCGH	<i>metaphase based comparative genomic hybridisation</i> , Metaphasen-basierte komparative genomische Hybridisierung
DIG	Digoxigenin	MeOH	Methanol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (- <i>acid</i>)	MgAc ₂	Magnesiumacetat
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat		
DTC	<i>disseminated tumor cell</i> , disseminierte Tumorzelle		
DTT	Dithiothreitol		
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat		
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure		
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i> , epitheliales Zelladhäsionsmolekül		
EtOH	Ethanol		
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum		
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat		

MgCl ₂	Magnesiumchlorid	WGA	<i>whole genome amplification,</i>
min	Minute(n)		gesamtgenomische
ml	Milliliter		Amplifikation
mM	Millimolar		
MRD	<i>minimal residual disease,</i> minimale Resterkrankung	µg	Mikrogramm
		µl	Mikroliter
MRT	Magnetresonanztomographie	µM	Mikromolar
		µMol	Mikromol
NaAc	Natriumacetat		
ng	Nanogramm		
NNH	Nasennebenhöhlen		
OPA	<i>one phor all buffer,</i> Restriktionsenzym-puffer		
p-Arm	kurzer Chromosomenarm		
PBL	periphere Blutlymphozyten		
PBS	<i>phosphate buffered saline,</i> Phosphat-gepufferte Salzlösung		
PCR	<i>polymerase chain reaction,</i> Polymerase-Kettenreaktion		
PFA	Paraformaldehyd		
pg	Pikogramm		
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>		
q-Arm	langer Chromosomenarm		
SCC	<i>squamous cell carcinoma,</i> Plattenepithelkarzinom		
sec	<i>second(s),</i> Sekunde(n)		
SIN	squamöse intraepitheliale Neoplasie		
SSC	<i>saline sodium citrate,</i> Natriumcitrat-gepufferte Salzlösung		
T	Thymin		
Tab.	Tabelle		
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>		
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer		
TNM	<i>Tumor, Nodus, Metastasis-</i> Klassifikation		
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan		
U	<i>unit,</i> Einheit zur Angabe der Enzymaktivität		
UICC	<i>Union internationale contre</i> <i>le cancer</i>		
UV	ultraviolett		
V	Volt		
Vol.	Volumen		

Inhalt

Zusammenfassung.....	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhalt.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Malignome des Kopf-Hals-Bereiches	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	1
1.2 Histologie der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches	2
1.3 Anamnese und klinische Diagnostik	3
1.4 TNM (<i>Tumor, Nodus, Metastasis</i>)-Klassifikation und Stadieneinteilung.....	4
1.5 Prognose beim HNSCC	7
1.6 Zervikale Lymphknotenmetastasen und die minimale Resterkrankung beim HNSCC	8
1.7 Detektion disseminierter Tumorzellen (DTCs).....	9
1.8 Modelle zur Karzinogenese beim HNSCC.....	10
1.9 Gesamtgenomische Amplifikation von (Tumor-) Einzelzell-DNA	12
1.10 Metaphasen-basierte komparative genomische Hybridisierung (mCGH).....	12
2 Zielsetzung der Dissertationsarbeit	14
3 Material und Methoden.....	15
3.1 Kooperationspartner.....	15
3.2 Patientenkollektiv und -gewebeproben	15
3.3 Materialien.....	17
3.3.1 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....	17
3.3.2 Enzyme	17
3.3.3 Chemikalien.....	17
3.3.4 Geräte	19
3.3.5 <i>Software</i>	20
3.3.6 Puffer.....	21

3.3.7	Oligonukleotide.....	21
3.3.8	Verbrauchsmaterialien.....	22
3.4	Methoden.....	23
3.4.1	Aufarbeitung von Knochenmark.....	23
3.4.2	Aufarbeitung von Lymphknotengewebe	24
3.4.3	Herstellung von Zytospins.....	25
3.4.4	CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung.....	25
3.4.5	Isolierung von DTCs von Haft-Objektträgern und Amplifikation der (Tumor-) Einzelzell-DNA	27
3.4.6	(Tumor-) Einzelzell-PCR.....	28
3.4.7	Kontroll-PCR	30
3.4.8	Agarose-Gelelektrophorese	30
3.4.9	Markierungs-PCR.....	31
3.4.10	Lymphozytenkulturen zur Gewinnung von Metaphasechromosomen.....	32
3.4.11	Präparation von Metaphasechromosomen.....	32
3.4.12	Metaphasen-basierte komparative genomische Hybridisierung (mCGH).....	33
3.4.13	Auswertung der mCGH	36
3.4.14	Biostatistische Auswertung.....	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Klinische Daten des Patientenkollektivs	39
4.2	Immunzytochemische Detektion einzelner disseminierter Tumorzellen.....	40
4.3	Validierung der verwendeten Antikörper in Kontrollzelllinien.....	40
4.4	Verteilung der DTC-Subpopulationen	41
4.5	Isolierung von DTCs aus Lymphknoten und Knochenmark	43
4.6	Gesamtgenomische Amplifikation der (Tumor-) Einzelzell-DNA und Qualitätskontrolle der amplifizierten DNA	45
4.7	Genomische Charakterisierung von (Tumor-) Einzelzellen mittels Metaphasen-basierter komparativer genomischer Hybridisierung.....	47
4.8	Biostatistische Auswertung mittels des Analyseprogrammes Progenetix	52
4.9	Chromosomale Aberrationen bei DTCs in HNSCC-Patienten.....	57
4.10	Prognostische Bedeutung der klinisch-pathologischen Parameter sowie der Anwesenheit von DTCs für das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten.....	59

4.11	Hierarchische Ähnlichkeitsanalysen (<i>Cluster</i>) von DTCs aus Knochenmark und Lymphknoten anhand von chromosomalen Aberrationen	60
5	Diskussion.....	62
6	Literaturverzeichnis.....	72
7	Danksagung.....	78

1 Einleitung

1.1 Malignome des Kopf-Hals-Bereiches

1.1.1 Epidemiologie

Maligne Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich stellen aufgrund einer in den letzten Jahren zunehmenden Inzidenz ein weltweites Gesundheitsproblem dar. Malignome des Kopf-Hals-Bereiches in der Region der Mundhöhle und des Rachens standen in der Häufigkeit aller Krebserkrankungen in Deutschland 2012 an achter Stelle für Männer und an 17. Stelle für Frauen und machten 3,7 % aller malignen Neubildungen bei Männern und 1,6 % aller malignen Neubildungen bei Frauen aus. In Deutschland verstarben im Jahr 2012 4.090 Männer und 1.303 Frauen an einem Malignom im Bereich der Mundhöhle und des Rachens. Damit machten maligne Neubildungen im Kopf-Hals-Bereich 3,4 % aller Krebssterbefälle bei Männern und 1,3 % aller Krebssterbefälle bei Frauen aus (Robert-Koch-Institut, 2015).

Kopf-Hals-Tumore stellen eine heterogene Gruppe maligner Tumoren dar. Etwa 95 % aller bösartigen Tumorerkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches sind Tumore epithelialen Ursprungs und somit Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) (Gath *et al.*, 1999). Zu diesen zählen Karzinome des *Nasopharynx* (Nasenrachenkrebs), des *Oropharynx* (Mundrachenkrebs), des *Hypopharynx* (Schlundrachenkrebs), der Mundhöhle (Tumoren von Lippen, Zunge, Gaumen, Mundboden, Speicheldrüsen und des Zahnfleisches), des *Larynx* (Kehlkopfkrebs) sowie der Nase und Nasennebenhöhlen (NNH). Eine seltenere Entität stellen Adenokarzinome dar, die überwiegend als Tumore der inneren Nase und Nasennebenhöhlen auftreten.

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Tumorentstehung ist meist ein langwieriger über Zwischenstufen verlaufender Prozess. Die bedeutendsten Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen stellen nach wie vor der inhalative Nikotinabusus (Hunter *et al.*, 2005; Polesel *et al.*, 2008) sowie der regelmäßige Konsum von hochprozentigem Alkohol dar (Franceschi *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2004).

Für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen konnten darüber hinaus weitere Risikofaktoren identifiziert werden. Von besonderer Bedeutung ist z.B.:

- eine Infektion mit dem humanen Papilloma-Virus (HPV), insbesondere mit dem Subtyp 16. Diese Infektion spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung eines oropharyngealen Karzinoms (Gillison *et al.*, 2000; Boudewijn *et al.*, 2004).;
- für die Entstehung eines Mundhöhlenkarzinoms eine mangelhafte Mundhygiene sowie scharfe Zahnkanten;
- ein generell chronisch supprimiertes Immunsystem, z.B. durch eine Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV);
- eine erhöhte lokoregionäre radioaktive Strahlenbelastung;
- eine Exposition gegenüber kanzerogenen Chemikalien;
- eine (berufsbedingte) Inhalation von Eichen- oder Buchenholz-Stäuben, die u.a. zu Adenokarzinomen der inneren Nase und der Nasennebenhöhlen führen kann.

Bestimmte geographische Lebensstilformen u./o. Umweltfaktoren scheinen das Risiko, an verschiedenen Tumorentitäten zu erkranken, zu begünstigen (Parkin *et al.*, 2005). So beschrieben Muttagi *et al.* (2012), dass Betelnuss-kauende indische Frauen ohne gleichzeitigen Tabakkonsum ein erhöhtes Risiko für die spätere Entwicklung eines Tumors im Kopf-Hals-Bereich haben. Der Verzehr von Betelnüssen ist vor allem in ganz Asien traditionell verbreitet (Lee, 2007), allerdings beschränkt sich dieser nicht nur auf den asiatischen Raum, da 600-1200 Millionen Menschen der Weltbevölkerung Betelnüsse konsumieren (Petti, 2009). Somit stellt der Konsum von Betelnüssen einen weiteren signifikanten ätiologischen Risikofaktor für die HNSCC-Entstehung dar.

1.2 Histologie der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Plattenepithelien können ein- oder mehrschichtig sein. Histologisch kennzeichnend für Plattenepithelien sind eher flache Epithelzellen, deren Höhendurchmesser kleiner als ihr Breitendurchmesser ist. Der Zellverband eines einschichtigen Plattenepithels besteht lediglich aus nur einer Schicht dieser flachen Epithelzellen. Bei den mehrschichtigen Plattenepithelien unterscheidet man zwischen einem mehrschichtig unverhornten und einem mehrschichtig verhornten Plattenepithel. In der Mundhöhle kommt physiologischerweise ein mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel vor (Welsch, 2014).

Bei Einwirkung von Noxen wie z.B. Nikotin oder Alkohol kann sich initial eine benigne squamöse Zellhyperplasie durch vermehrte Zellteilung innerhalb des Zellverbandes des hier normalerweise vorkommenden mehrschichtig unverhornten Plattenepithels mit der Folge einer Gewebevergrößerung bilden. Bei einer dauerhaften und langjährigen Exposition gegenüber Kanzerogenen können sich dann squamöse intraepitheliale Neoplasien (SIN) ausbilden.

Über die Schritte von niedrig- (SIN I) und mittelgradigen (SIN II) Dysplasien kann es zu einer Entwicklung schwerer Dysplasien (SIN III) mit fließendem Übergang in ein Carcinoma *in situ* (CIS) kommen. Einhergehend mit einer weiteren Progression der fehlerhaften Gewebearchitektur sowie der abnormen Zell- und Kernmorphologie entwickelt sich schließlich ein die Basalmembran durchbrechendes invasives Karzinom (nach S2k-Leitlinie „Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde“, 2010).

1.3 Anamnese und klinische Diagnostik

Die Anamnese umfasst die Erfragung einer bestehenden B-Symptomatik sowie kennzeichnender Leitsymptome. Kennzeichnende Leitsymptome sind je nach betroffenem Bezirk eine eingeschränkte Zungenmotorik, Dysphagie sowie eine lokale u./o. ausstrahlende Schmerzsymptomatik. Aber auch Sensibilitätsstörungen, ein Fremdkörpergefühl, hämorrhagischer Auswurf oder lediglich eine binnen kürzester Zeit auftretende schmerzlose lokale Mundschleimhautschwellung können Hinweise auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung sein. Gemäß der S3-Leitlinie zur „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms“ von September 2012 gilt, dass jede Mundschleimhautveränderung, die trotz gezielter Behandlung länger als 14 Tage nach ihrer Feststellung besteht, einer weiterführenden Abklärung bedarf. Es schließt sich eine klinische Untersuchung des Kopf-Hals-Bereiches sowie eine repräsentative Probenentnahme zur histologischen Dignitätsklärung an. Bei Vorliegen eines malignen Tumors folgt eine gezielte Ausbreitungsdiagnostik im Sinne einer Metastasensuche. Vor allem die exakte Evaluation des Lymphknotenstatus im Rahmen des Tumorstaging nimmt einen ganz besonderen Stellenwert ein. Entsprechend den Empfehlungen der S3-Leitlinie zum Mundhöhlenkarzinom sollte „zur Feststellung der N-Kategorie [...] die gesamte Region von der Schädelbasis bis zur oberen Thoraxapertur mit der CT oder MRT

untersucht werden“. Das apparative Basis-*Staging* umfasst ferner eine Sonographie der im Abflussgebiet des Primarius liegenden Lymphknoten sowie der Halsweichteile. Eine weiterführende Bildgebung z.B. mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wird je nach spezifischer Fragestellung ergänzend eingesetzt. Aufgrund der anatomisch engen räumlichen Bedingungen des Kopf-Hals-Bereiches ist trotz modernster apparativer Diagnostik eine detaillierte Panendoskopie mit *Tumor-Mapping* unerlässlich.

1.4 TNM (*Tumor, Nodus, Metastasis*)-Klassifikation und Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung von Kopf-Hals-Tumoren erfolgt nach der jeweils gültigen TNM-Klassifikation der *Union internationale contre le cancer* [(UICC); (Wittekind *et al.*, 2010)] und ist für die jeweiligen anatomischen Bezirke des Kopf-Hals-Bereiches unterschiedlich. Da in dieser Dissertationsarbeit hauptsächlich Karzinome im Bereich der Mundhöhle untersucht wurden, wird die TNM-Klassifikation anhand des Mundhöhlenkarzinoms beschrieben.

Zur Mundhöhle gehören folgende anatomische Bezirke und Unterbezirke nach Kapitel II des ICD-Katalogs:

- 1) Mundschleimhaut
 - a) Schleimhaut der Ober- und Unterlippe (C00.3, 4)
 - b) Wangenschleimhaut (C06.0)
 - c) Retromolaregegend (C06.2)
 - d) *Sulcus buccomandibularis* und *-maxillaris* (C06.1)
- 2) Oberer *Alveolarfortsatz* und *Gingiva* (C03.0)
- 3) Unterer *Alveolarfortsatz* und *Gingiva* (C03.1)
- 4) Harter Gaumen (C05.0)
- 5) Zunge
 - a) Zungenrücken und Zungenrand vor den *Papillae vallatae* (vordere 2/3) (C02.0, 1)
 - b) Zungenunterseite (C02.2)

6) Mundboden (C04)

Die klinische und pathologische TNM-Klassifikationen der Mundhöhle sind wie folgt festgelegt:

- **Klinische TNM-Klassifikation der Mundhöhle**

T-Primärtumor:

- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor
- Tis Carcinoma *in situ*
- T1 Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- T2 Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
- T3 Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
- T4a Lippe: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen den *Nervus alveolaris inferior*, in Mundhöhlenboden oder in Haut (Kinn oder Nase)
- T4a Mundhöhle: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge (*M. genioglossus*, *M. hyoglossus*, *M. palatoglossus* und *M. styloglossus*), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
- T4b Lippe und Mundhöhle: Tumor infiltriert *Spatium masticatorium*, *Processus pterygoideus* oder Schädelbasis oder umschließt die *Arteria carotis interna*

Anmerkung: Eine nur oberflächliche Erosion des Knochens oder eines Zahnfaches durch einen Primärtumor der *Gingiva* berechtigt nicht zur Einordnung eines Tumors als T4.

N-Regionäre Lymphknoten:

- NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- N2 Metastase(n) wie nachfolgend beschrieben:

- N2a Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
- N2b Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
- N2c Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
- N3 Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung

Anmerkung: In der Mittellinie gelegene Lymphknoten gelten als ipsilateral.

M-Fernmetastasen:

- M0 Keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen

- **Pathologische TNM-Klassifikation der Mundhöhle**

Die pT- und pN-Kategorien entsprechen den cT- und cN-Kategorien.

Die Kategorie pM1 beschreibt die mikroskopische Bestätigung von Fernmetastasen.

Anhand der TNM-Klassifikation der UICC erfolgt die Einordnung in das klinische Stadium und wird hier exemplarisch für Tumore der Lippen und Mundhöhle aufgeführt (Wittekind *et al.*, 2010):

Stadium 0	Tis N0 M0
Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0
Stadium III	T1, T2 N1 M0 T3 N0, N1 M0
Stadium IVA	T1, T2, T3 N2 M0 T4a N0, N1, N2 M0
Stadium IVB	jedes T N3 M0 T4b jedes N M0

Stadium IVC jedes T jedes N M1

Weitere Punkte, die bei der Charakterisierung eines Tumors eine Rolle spielen sind der histopathologische Differenzierungsgrad (*Grading*-Kategorie), sowie das Fehlen oder Vorhandensein von Resttumorreste (Residualtumor-Klassifikation):

- **Histopathologische Grading (G)-Kategorien**

GX Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden

G1 Gut differenziert

G2 Mäßig differenziert

G3 Schlecht differenziert

G4 Undifferenziert

- **Residualtumor (R)-Klassifikation**

RX Das Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden

R0 Kein Residualtumor

R1 Mikroskopischer Residualtumor

R2 Makroskopischer Residualtumor

1.5 Prognose beim HNSCC

Insgesamt ist die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem Malignom im Kopf-Hals-Bereich schlecht und Patienten mit der Diagnose eines HNSCC haben prognostisch gesehen eine unter 50 % liegende Überlebenschance, was auf bereits sehr fortgeschrittene Tumorstadien bei Erstdiagnose schließen lässt (Chin *et al.*, 2006). Obwohl es außerordentliche Fortschritte im Bereich der Tumorbehandlung gegeben hat, verbesserte sich die Überlebenschance der HNSCC-Patienten in den letzten 20 Jahren nur geringfügig (Patmore *et al.*, 2004). Treten Rezidive u./o. Fernmetastasen auf, verschlechtert sich die Prognose dramatisch, so dass einer präzisen klinischen und bildmorphologischen Ausbreitungsdiagnostik ein hoher Stellenwert zukommt. Insbesondere nimmt hierbei der Lymphknotenstatus einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose der Überlebenswahrscheinlichkeit von HNSCC-Patienten (Wittekind *et al.*, 2001). Patienten

mit zervikalen Lymphknotenmetastasen haben eine schlechtere Prognose als Patienten ohne einen nodalen Befall. Bei Detektion von nodalen Metastasen wird eine Reduktion der durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate um ca. 50 % beobachtet (Pantel *et al.*, 2004). Bei Anwesenheit einer einzigen ipsilateralen Lymphknotenmetastase sinkt die Überlebensrate bereits um mindestens 50 %; bei einem kontra- oder bilateralen Lymphknotenbefall sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit um weitere 50 % (Enepekides *et al.*, 1999). Ein weiterer prognostischer Faktor ist das Vorliegen eines kapselüberschreitenden Wachstums. Patienten, bei denen ein extrakapsuläres Wachstum zervikaler *Filiae* vorliegt, haben eine halbierte 3-Jahres-Überlebensrate im Vergleich zu Patienten mit einem ausschließlich intranodalen Befall (Woolgar *et al.*, 2003). Ferner steigt bei einem nodalen Befall das Risiko einer Fernmetastasierung an. Dieses steigt um fast 50 % bei mindestens drei histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen. Bei Fehlen von Lymphknotenmetastasen beträgt das oben genannte Risiko lediglich 7 % (Leemans *et al.*, 1993; Pantel *et al.*, 2004). Zervikale Lymphknotenmetastasen stellen somit den wichtigsten Prognosefaktor dar (Leemans *et al.*, 1993; Pantel *et al.*, 2004).

1.6 Zervikale Lymphknotenmetastasen und die minimale Resterkrankung beim HNSCC

Die Ergebnisse des Tumorstagings haben unmittelbaren Einfluss auf die individuelle Therapiestrategie für jeden Patienten und bilden die Grundlage für die Planung eines multimodalen Therapieregimes. Bei einem klinisch unauffälligen Lymphknotenstatus (cN0) sollte eine elektive *Neck-dissection* oder bei bereits eingetretener Metastasierung (cN+) eine (modifizierte) radikale Ausräumung aller Lymphknoten des Halses erfolgen. Die gewonnenen Lymphknoten werden durch eine routinemäßige histopathologische Begutachtung auf Metastasen hin untersucht. Bemerkenswert ist jedoch, dass in bis zu 50 % der als tumorfrei beurteilten Lymphknoten bereits Mikrometastasen vorhanden sind (Rinaldo *et al.*, 2004). Anhand dieser Daten wird deutlich, dass okkulte Tumoreinzellen durch die standardisierte histopathologische Aufarbeitung nur unzureichend detektierbar sind.

Diese hohe Zahl an falsch-negativen befundeten zervikalen Lymphknoten bildet den Ausgangspunkt für die kontroverse Diskussion bezüglich des Vorgehens bei einem klinisch unauffälligen Lymphknotenstatus im UICC-Stadium I oder II. Grundsätzlich sind in diesen

Stadien drei Vorgehensweisen möglich: die elektive *Neck-dissection*, die elektive *Radiatio* oder eine *wait-and-see*-Strategie. In der S3-Leitlinie zum Mundhöhlenkarzinom von September 2012 soll jedoch „bei Patienten mit klinisch unauffälligem Lymphknotenstatus (cN0) [...] unabhängig von der T-Kategorie eine elektive *Neck-dissection* durchgeführt werden“, da es in ca. 20-40 % der Fälle zu einer okkulten Metastasierung in die zervikalen Lymphknoten kommt trotz klinisch und bildmorphologisch unauffälligem Befund (cN0). Auch scheinen bereits bei Erstdiagnose vorhandene Mikrometastasen in Organen wie z.B. der Leber aufgrund ihrer zu geringen Größe trotz modernster hochauflösender Bildgebung nicht detektierbar zu sein (Riethdorf *et al.*, 2008). Genau diese im Körper eines HNSCC-Patienten verbleibenden okkulten disseminierten Tumorzellen sind möglicherweise Ursache für die sog. minimale Resterkrankung [*minimal residual disease* (MRD)]. Bei Anwesenheit disseminierter Tumorzellen ist das rezidivfreie Intervall kürzer und solide Metastasen können sich bevorzugt in Leber, Lunge oder dem Skelettsystem entwickeln.

1.7 Detektion disseminierter Tumorzellen (DTCs)

DTCs gehören zu den seltensten Zellen mit einer nachgewiesenen Frequenz von 1 pro 10^5 bis 10^6 normaler Knochenmarkszellen bei ca. 20-50 % der betroffenen Patienten (Riethdorf *et al.*, 2008; Stoecklein *et al.*, 2010). In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Methoden zur Detektion von DTCs entwickelt. Präferiert werden heute hierzu immunzytochemische Färbungen, die sich Antikörper bedienen, die im Falle von Tumoren epithelialen Ursprungs gegen verschiedene Epithel-spezifische Antigene wie z.B. Intermediärfilamente des Zytoskeletts gerichtet sind und von den umgebenden Zellen des jeweils zu untersuchenden Körperkompartiments wie z.B. dem mesenchymalen Gewebe des Knochenmarks oder des Lymphknotens physiologischerweise nicht exprimiert werden. Bemerkenswerterweise bewahren Karzinome und ihre autologen Metastasen weitestgehend ihr spezifisches Keratinprofil (Oshima, 2007; Moll *et al.*, 2008), so dass hierdurch die Voraussetzung für eine erfolgreiche und vor allem frühe Detektion von DTCs anhand spezifischer biologischer Oberflächenmarker gegeben ist. Deswegen werden bis heute verschiedene Antikörper, die gegen spezifische Zytokeratine gerichtet sind, als Differenzierungsmarker in immunzytochemischen und -histologischen Analysen von Tumoren und Metastasen genutzt (Moll *et al.*, 2008). Zur Detektion von DTCs, deren

Primärtumor aus Plattenepithelien aufgebaut ist, eignen sich ferner Antikörper, die gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül CD326 (EpCAM) gerichtet sind. Das transmembranäre Glykoprotein EpCAM ist grundsätzlich auf Epithelverbänden von gesunden Menschen exprimiert, mit Ausnahme von Plattenepithelien, epidermalen Keratinozyten, gastralen Parietalzellen, myoepithelialen Zellen, kortikal lokalisierten Epithelzellen im Thymus und Hepatozyten (Schmelzer *et al.*, 2008; Spizzo *et al.*, 2011). Karzinome überexprimieren stark EpCAM, wobei die normalerweise EpCAM-negativen Plattenepithelien EpCAM in einem solchen Maß *de novo* zu exprimieren scheinen, das dem Grad der malignen Transformation und Entdifferenzierung entspricht (Litvinov *et al.*, 1996; Münz *et al.*, 2004). Ob EpCAM selbst als Molekül Motor der Karzinogenese ist, ist abschließend unklar. Allerdings bewirkt die intrazelluläre EpCAM-Domäne eine Induktion des Protoonkogens *MYC* sowie der Zellzyklus-regulierenden Gene *CCNA* und *CCNE* (Münz *et al.*, 2004).

1.8 Modelle zur Karzinogenese beim HNSCC

Im Rahmen von Untersuchungen zur Karzinogenese stellten Vogelstein *et al.* (2000) die besondere Bedeutung von drei Genklassen heraus, nämlich Onkogene, Tumorsuppressorgene und Reparaturgene. Normalerweise stehen alle drei Genklassen in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander. Dabei kodieren Onkogene Proteine, deren Genprodukte eine zentrale Rolle für die Zellteilung und das -wachstum einnehmen. Die direkten Gegenspieler im Zellzyklus stellen die Tumorsuppressorgene dar, deren Genprodukte eine unkontrollierte Zellteilung verhindern. Durch die Akkumulation von genetischen Veränderungen können sich jedoch Protoonkogene zu Onkogenen transformieren und zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Reparaturgenen führen. Infolge dessen kommt es zur abnormen Zellproliferation im Sinne einer Karzinogenese.

Der Prozess der Tumorprogression von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches wird als eine Akkumulation von genetischen Veränderungen verstanden (Das *et al.*, 2002). Das von Califano *et al.* im Jahr 1996 entwickelte Modell zur Karzinogenese beim HNSCC beschreibt mit Hilfe von sog. *loss of heterozygosity* (LOH)-Analysen eine lineare Tumorprogression durch eine Akkumulation von genetischen Veränderungen. Argiris *et al.* entwickelten dieses Modell im Jahr 2008 weiter und zeigten exemplarisch die

histologische Tumorprogression anhand akkumulierter genetischer Veränderungen (Abb. 1). Eine detaillierte Übersicht der zahlreichen identifizierten chromosomalen Amplifikationen und Deletionen beim HNSCC gaben Patmore *et al.* in ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2005 anhand von durchgeführten komparativen genomischen Hybridisierungs-Untersuchungen (CGH).

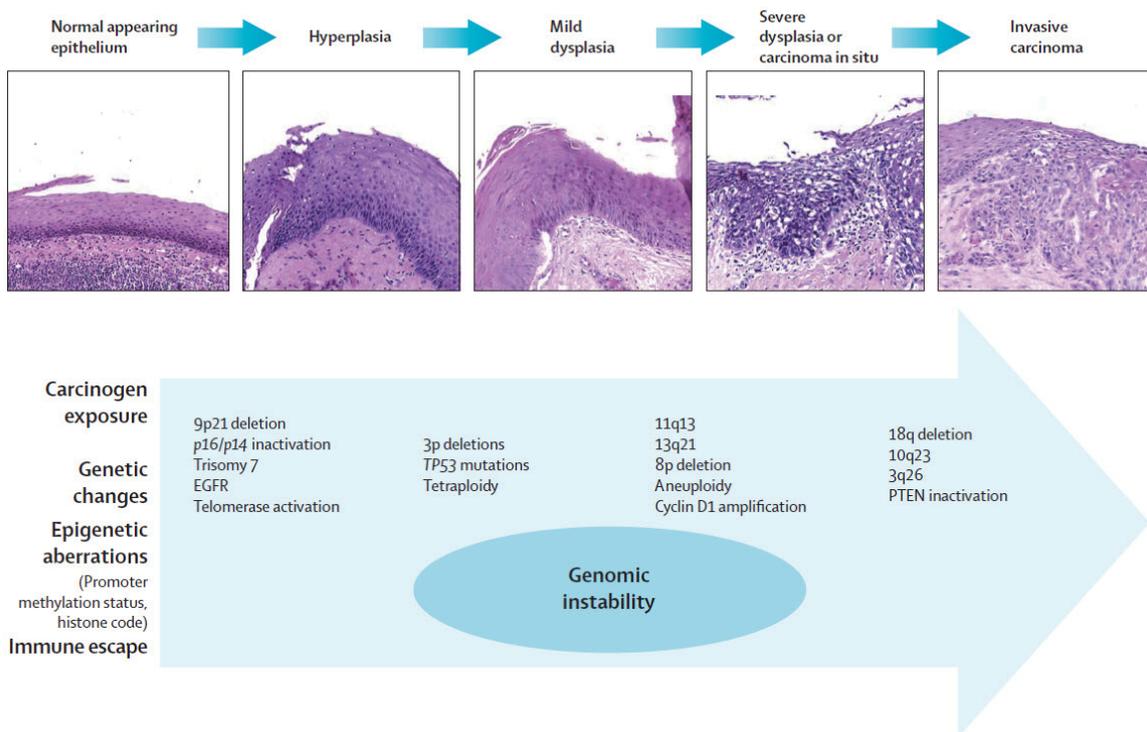


Abb. 1: HNSCC-Karzinogenese. Histologische Tumorprogression anhand akkumulierter genetischer Veränderungen im Rahmen der HNSCC-Karzinogenese (Argiris *et al.*, 2008).

In sog. linearen Tumorprogressionsmodellen zur Karzinogenese wird die Metastasierung als letzter Schritt im Prozess der Tumorprogression verstanden. Diese Ansicht impliziert die Annahme einer starken genetischen Verwandtschaft zwischen Primärtumor und Metastase(n). Mittels moderner hochauflösender molekulargenetischer Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass Primärtumor und autologe(n) Metastase(n) eine starke genetische Divergenz aufweisen können. Diese Erkenntnis führte zur Formulierung eines sog. parallelen Tumorprogressionsmodells.

In diesem Modell können sich zu jedem Zeitpunkt einzelne Tumorzellen aus dem Primärtumor lösen und in Lymphknotengewebe, Knochenmark und andere Organe

disseminieren. Je nach Zeitpunkt der Absiedlung können aufgrund der unabhängigen Weiterentwicklung verschieden starke genetische Unterschiede bestehen (Stoecklein und Klein, 2010).

1.9 Gesamtgenomische Amplifikation von (Tumor-) Einzelzell-DNA

Für eine direkte genetische Analyse des Genoms einer einzelnen Zelle benötigt man eine DNA-Menge zwischen 0,5 und 1 µg. Der diploide Chromosomensatz des Genoms einer Einzelzelle setzt sich jedoch nur aus einer DNA-Gesamtmenge von ca. 6 pg zusammen (Morton, 1991). Um eine umfangreiche und differenzierte genomische Analyse von (Tumor-) Einzelzellen durchführen zu können, bedarf es PCR-basierter *whole genome amplification* (WGA)-Methoden. Eine etablierte und hierzu von uns angewandte Methode zur Amplifikation genomischer DNA ist die *MseI*-Adapter-*Linker*-PCR. Diese erreicht eine nahezu repräsentative Amplifikation des gesamten Genoms durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *MseI*. Dadurch wird das gesamte Genom in spezifische *MseI*-DNA-Fragmente gespalten, an die dann ein passendes Adapter-Konstrukt mittels T4-DNA-Ligase ligiert werden kann. An dieses Adapter-Konstrukt können nun komplementäre spezifische Oligonukleotid-*Primer* binden und die spezifischen DNA-Fragmente mittels einer DNA-Polymerase amplifiziert werden. Auf diese Weise kann das gesamte Genom einer Zelle homogen und fast vollständig repräsentativ amplifiziert werden (Klein *et al.*, 1999).

1.10 Metaphasen-basierte komparative genomische Hybridisierung (mCGH)

Nach Amplifikation des gesamten Genoms einer (Tumor-) Einzelzelle kann zur globalen Untersuchung der genomischen DNA auf chromosomale Aberrationen hin eine Metaphasen-basierte komparative genomische Hybridisierung (mCGH) durchgeführt werden. Die mCGH wurde erstmalig von Kallioniemi *et al.* im Jahr 1992 beschrieben. Die mCGH stellt eine Methode dar, mit der das gesamte Genom einer (Tumor-) Einzelzelle auf chromosomale Aberrationen hin untersucht werden kann. Die durch die *MseI*-Adapter-*Linker*-PCR global amplifizierte Test- (Tumor) und Referenz- (periphere Blutlymphozyten) DNA werden jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und miteinander gemischt. Im Anschluss erfolgt eine Kohybridisierung auf

Metaphasechromosomen eines gesunden männlichen Spenders, wobei die unterschiedlich markierte Test- und Referenz-DNA um komplementäre Bindungsstellen auf den Metaphasechromosomen konkurrieren. Mit Hilfe einer speziellen *Software* kann anhand des Verhältnisses der beiden eingesetzten Fluorochrome das Verhältnis der Test- und Referenz-DNA zueinander bestimmt werden. Auf diese Weise können Zugewinne und Verluste von Genomabschnitten ab einer Größe von 10 Megabasenpaaren (Mbp) identifiziert werden (Petersen *et al.*, 1996).

2 Zielsetzung der Dissertationsarbeit

Die Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit bestand darin, einen Kenntnisgewinn über die genetische Konstitution von disseminierten Tumorzellen (DTCs) bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) zu erlangen. Hierzu erfolgte die Detektion und molekulargenetische Charakterisierung einzelner disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark bei HNSCC-Patienten.

Die genetische Analyse von DTCs sollte zur Klärung folgender Fragen beitragen:

- 1) Ist die Detektionsrate von DTCs bei HNSCC-Patienten durch die Marker Zytokeratin 18 und EpCAM unterschiedlich?
- 2) Ist es möglich eine genetische Analyse von DTCs aus Lymphknoten und Knochenmark von HNSCC-Patienten durchzuführen, um ein genetisches Profil zu erstellen?
- 3) Weisen DTCs aus Lymphknoten und Knochenmark eine vergleichbare Anzahl chromosomaler Aberrationen auf?
- 4) Was sind die häufigsten chromosomalen Aberrationen, die mittels einer Metaphasen-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (mCGH) festgestellt werden können?
- 5) Liegen im Bereich der betroffenen chromosomalen Regionen bekannte Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene, die potentiell eine Rolle im Prozess der Karzinogenese spielen können?
- 6) Ist das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten durch die Anwesenheit von DTCs verkürzt im Vergleich zu HNSCC-Patienten ohne DTCs?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte zu einem besseren Verständnis des frühen okkulten lymphogenen und hämatogenen Disseminierungs- und Metastasierungsprozesses bei HNSCC-Patienten beitragen.

3 Material und Methoden

3.1 Kooperationspartner

Es erfolgte eine Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel und Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein).

3.2 Patientenkollektiv und -gewebeproben

In dieser Dissertationsarbeit wurde ein Kollektiv von 50 Patienten (30 Männer und 20 Frauen) mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches untersucht. Das Durchschnittsalter lag bei den Männern bei 64 Jahren und bei den Frauen bei 73 Jahren. Bei 35 Patienten lagen sowohl Knochenmarkaspirate als auch Lymphknotengewebe-proben vor. Bei zehn Patienten wurden keine Lymphknoten intraoperativ entnommen und bei fünf Patienten fand keine präoperative Knochenmarkentnahme statt. Gründe für die Ablehnung der Gewebeprobengewinnung seitens der Patienten waren u.a. Angst vor einer Schmerzsymptomatik, postoperativen Lymphödemem, Infektionen, Wundheilungsstörungen u./o. eine mit der Gewebeprobengewinnung potentiell einhergehenden erhöhten Mortalität sowie die Ablehnung der Probenverwendung für wissenschaftliche Zwecke. Von der Studie ausgeschlossen wurden u.a. nicht einwilligungsfähige Patienten, Patienten mit akuten u./o. instabilen Grunderkrankungen u./o. Patienten mit einem bekannten Zweitmalignom.

Die Verwendung der personenerhobenen Daten und der Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke erfolgte nach ausführlicher Aufklärung sowie schriftlicher Einwilligung der Patienten als auch mit der Genehmigung der hiesigen Ethikkommission (Studiennummer: 3090).

Die für diese Dissertationsarbeit verwendeten Knochenmarkaspirate und Lymphknotengewebe-proben wurden von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf gewonnen und asserviert. Dabei wurden präoperativ aus dem vorderen Beckenkamm beidseitig ca. 18 ml Knochenmark aspiriert. Intraoperativ wurde zur Vermeidung einer Tumorzellverschleppung mit der Gewinnung der im Abflussgebiet des Primarius lokalisierten Lymphknoten begonnen. Die exstirpierten

lokoregionären Lymphknoten, die makroskopisch keine pathologischen Veränderungen aufwiesen, wurden unverzüglich nach Entnahme jeweils halbiert. Eine Hälfte des Lymphknotens wurde durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf aufgearbeitet und histopathologisch begutachtet. Die andere Hälfte des Lymphknotens wurde erneut halbiert: die eine Hälfte wurde in ein steriles Tumormedium eingebracht und die andere Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die entnommenen Lymphknoten wurden gemäß der gängigen Klassifikation von Robbins *et al.* (2002) dem jeweiligen Lymphknotenlevel zugeordnet und durchnummeriert.

3.3 Materialien

3.3.1 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

<i>Anti-Digoxigenin-FITC, Fab-fragments</i>	Roche, Mannheim
<i>Anti-mouse-Alexa 488</i>	Invitrogen, Darmstadt
<i>Anti-rabbit-Cy3</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Avidin-Cy3.5 conjugated</i>	Rockland, Gilbertsville, USA
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
CK18-AK (Kaninchen polyklonal)	Abcam, UK
Digoxigenin-dUTP stabil	Roche, Mannheim
EpCAM-AK (Klon: BerEp4; Maus monoklonal)	Dako, Hamburg
MOPC21, Isotyp-Kontrolle	Sigma-Aldrich, Steinheim
X0903, <i>negative-control-rabbit</i>	Dako, Hamburg

3.3.2 Enzyme

<i>Expand-Long-Template PCR-System</i>	Roche, Mannheim
<i>MseI hc</i>	New England Biolabs, Frankfurt
Pepsin (Lyophilisat)	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> -Polymerase	Roche, Mannheim
<i>Tru1</i> + Puffer R	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase <i>hc</i>	Roche, Mannheim

3.3.3 Chemikalien

AB-Serum	Biotest, Dreieich
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
ATP 40 μ mol	Roche, Mannheim
Bovines Serumalbumin	Roche, Mannheim
Colcemid	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

dATP, dCTP, dGTP, dTTP	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
DAPI	Roche, Mannheim
Destilliertes Wasser	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Dextran-Sulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA <i>Gel Loading Dye</i> (6x)	Thermo Scientific, Braunschweig
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol abs.	Merck, Darmstadt
Ficoll-Paque	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Fötale Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
<i>GelRed</i>	Biotium, Fremont, USA
Hanks- <i>Salt-Solution</i>	Biochrom AG, Berlin
<i>Hering Sperm</i> DNA	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Human C₀t-1</i> DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid-Lsg.	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Montagekleber (Fixogum)	Marabu, Tamm
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
OPA <i>buffer plus</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
<i>PB-Max Karyotyping Medium</i>	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
PBS-Puffer	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt

Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vectashield	Vector Laboratories, USA

3.3.4 Geräte

Brutschrank	Memmert, Schwabach
CCD-Kamera	Photometrics, Tucson, USA
<i>Cell-Tram-Air</i>	Eppendorf, Hamburg
DMZ Universal <i>Puller</i>	Zeitz-Instruments, Martinsried
Eismaschine AF80	Scotsman Ice-Syst., Mailand, Italien
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop DMIL	Leica, Jena
Gefrierschrank <i>Premium no-frost</i>	Liebherr, Ochsenhausen
Heizblock	neoLab, Heidelberg
Horizontal-Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München
Kühlschrank <i>Comfort</i>	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank <i>Premium BioFresh</i>	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Medimaschine	Dako, Hamburg
Mikromanipulator <i>Microinjector</i>	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Kammer	Brand, München
PCR-Maschine <i>Dyad Disciple</i>	Bio-Rad, München
PCR-Maschine PTC 200	Biozym, Hessisch Oldendorf
pH-Meter <i>Microprocessor</i>	HANNA Instrum., Vöhringen
<i>Pipettboy</i>	Brand, München

Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	IKA Labortechnik, Staufen
Spannungsquelle <i>Power-PAC 300</i>	Bio-Rad, München
Sterilbank <i>Hera-safe</i>	Thermo Scientific, Braunschweig
Thermometer <i>Precision</i>	Roth, Karlsruhe
Thermomixer <i>Comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>TransferMan NK2</i>	Eppendorf, Hamburg
UV-Transluminator mit CD-Kamera	Bio-Rad, München
Vortexer- <i>Mixer</i>	neoLab, Heidelberg
Waage 440-43N	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge <i>Fresco 17</i>	Thermo Scientific, Braunschweig

3.3.5 Software

Eisen <i>Lab Software</i>	Eisen Lab, Berkeley, USA
<i>GraphPad-Prism Software</i>	GraphPad Software Inc., Californien, USA
ISIS-CGH <i>Software</i>	MetaSystems, Altlußheim
Leica <i>Application Suite</i>	Leica, Jena
Progenetix	http://www.progenetix.net
<i>Quantity One</i>	Bio-Rad, München
SPSS	SPSS Inc., Chicago, USA

3.3.6 Puffer

7/8 dNTP-Mix	dTTP (4,375 µl), dATP (5 µl), dCTP (5 µl), dGTP (5 µl), dest. H ₂ O (30,7 µl)
<i>Expand-Long-Template buffer 1</i>	MgCl ₂ (17,5 mM), HCl (20 mM), KCl (100 mM), DTT (1 mM), EDTA (0,1 mM), Nonidet P40 (0,5 %), Tween-20 (0,5 %), Glycerol (50 %), pH 7,5
<i>OPA buffer plus (10x)</i>	Tris-Acetat (100 mM), MgAc ₂ (100 mM), KAc (500 mM), pH 7,5
PCR-Puffer MgCl ₂ + dNTPs	Ansatz 480 µl: 10 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,5, + je 5 µl dNTPs
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	Tris (11 %), Borsäure (6 %), dest. H ₂ O (82,3 %), EDTA (0,7 %), pH 8,3

3.3.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins/MWG in Ebersberg synthetisiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
LIB1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
ddMse11	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
Zytokeratin CK 19 5'	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C
Zytokeratin CK 19 3'	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG

3.3.8 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (versch. Größen)	Menzel, Braunschweig
Deckgläschen (versch. Größen)	VWR, Darmstadt
Glas-Küvetten mit Deckel	neoLab, Heidelberg
Glas-Objektträger mit Mattrand	Engelbrecht, Edermünde
Haft-Objektträger	Menzel, Braunschweig
<i>Liquid-Blocker Pen</i>	Dako, Glostrup, Dänemark
Medicons (50 µl)	BD Biosciences, USA
Mikrohaematokritkapillaren	Brand, Wertheim
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (versch. Größen)	Starlab, Ahrensburg
Probenröhrchen (versch. Größen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (versch. Größen)	Eppendorf, Hamburg
Stripetten (versch. Größen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Stripetten (versch. Größen)	Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsieb (70 µM)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.4 Methoden

3.4.1 Aufarbeitung von Knochenmark

Präoperativ erfolgt die Entnahme von ca. 18 ml Knochenmark aus dem vorderen Beckenkamm beidseitig. In ein 50 ml Probenröhrchen wird 10 ml Knochenmark gegeben und im gleichen Verhältnis mit Hanks-Salt-Solution gemischt. Im Anschluss erfolgt eine zehninütige Zentrifugation ($170 \times g$). Der Lipid und Thrombozyten enthaltende Überstand wird mit einer Pipette bis zum *Pellet* abgenommen, verworfen und das *Pellet* wird daraufhin in 20 ml 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Bedingt durch die niedrige Konzentration von DTCs im Knochenmark ($1 \text{ pro } 10^5 \text{ bis } 10^6 \text{ normaler Knochenmarkzellen}$) besteht die Notwendigkeit einer Separierung von mononukleären peripheren Blutlymphozyten (PBL), zu denen auch die DTCs zählen, von Erythrozyten und Granulozyten. Dieser Anreicherungsprozess wird z.B. mittels einer Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation erzielt, basierend auf dem jeweiligen spezifischen Dichteverhalten der einzelnen Zellfraktionen. Im nächsten Schritt wird ca. 15-20 ml Ficoll-Paque in ein weiteres 50 ml Probenröhrchen gegeben und mit der Zellsuspension vorsichtig überschichtet, so dass zwei Phasen erkennbar sind (Abb. 2A).

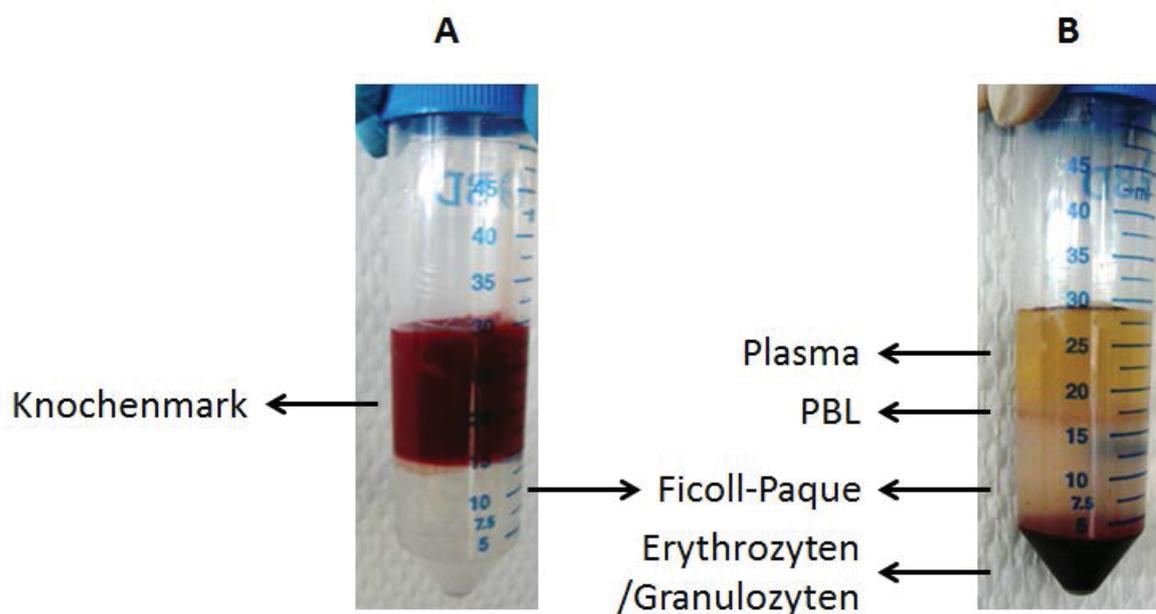


Abb. 2: Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mittels Ficoll-Paque-Technik. A) Es lässt sich vor der Zentrifugation eine untere Phase aus Ficoll-Paque und eine obere Phase aus Knochenmark erkennen. **B)** Zwischen der Plasma- und der Ficoll-Paque-Schicht lässt sich nach der Zentrifugation eine mit peripheren Blutlymphozyten angereicherte schmale Interphase erkennen.

Durch eine 30-minütige Zentrifugation (550 x g) entsteht eine aus mononukleären Zellen des Knochenmarks bestehende Interphase (Abb. 2B). Mit Hilfe einer Pipette wird diese mit peripheren Blutlymphozyten angereicherte Interphase vorsichtig in ein neues 50 ml Probenröhrchen gegeben und in 20 ml 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Es schließt sich eine erneute Zentrifugation bei 365 x g für 10 Minuten an. Dieser Waschschrift wird nach Resuspendierung des *Pellets* in 20 ml 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) nochmals wiederholt. Der Überstand wird erneut verworfen und das *Zellpellet* wird in ca. 2 ml 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) gegeben.

Es schließt sich die Zellzählung in einer Neubauer-Kammer an. Dazu werden jeweils ca. 10 µl der Zellsuspension und Trypanblau zusammen pipettiert und in der Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Zellkonzentration wird auf 500.000 Zellen/ml in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) eingestellt. Je 500 µl dieser Suspension, also 250.000 Zellen, werden auf ein Feld eines Haft-Objektträgers (HOT) gegeben, so dass eine Million Zellen auf zwei HOT zur Verfügung stehen. Nach einer 30-minütigen Sedimentierung der Zellsuspension auf den HOT wird der Überstand abgekippt und der HOT bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag werden die getrockneten HOT bis zur Immunfluoreszenzfärbung im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

3.4.2 Aufarbeitung von Lymphknotengewebe

Das intraoperativ gewonnene Lymphknotengewebe wird zunächst in eine Petrischale gelegt und mit Hilfe eines Skalpells von umliegenden Geweberesten befreit und zerkleinert. Anschließend werden die Lymphknotengewebefragmente zusammen mit 1 ml 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) in ein Medicon (50 µl) gegeben und in die Medimaschine eingesetzt. In Abhängigkeit von der Größe des Lymphknotengewebes wird nach mehreren einminütigen Zerschreddervorgängen die Zellsuspension mit einer 1 ml Einwegspritze aus dem Medicon herausgezogen und in ein 15 ml Probenröhrchen überführt. Daraufhin wird erneut 1 ml 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) in das Medicon gegeben und noch einmal für eine Minute geschreddert. Diese Zellsuspension wird in ein weiteres 15 ml Probenröhrchen gegeben. Es werden ca. 10 ml 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) zum Waschen hinzugegeben. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 200 x g wird der Überstand bis zum *Zellpellet* abgenommen und in ca. 5 ml 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Bei ggf. sehr trüber Zellsuspension wird diese durch ein 70 µm Zellsieb

filtriert und anschließend die Zellzahl in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Analog dem Vorgehen bei der Knochenmarkaufarbeitung werden die Zellen gezählt und auf die HOT gegeben und anschließend am Folgetag bei -20°C gelagert.

3.4.3 Herstellung von Zytospins

Die Zellkonzentration der Kontrollzelllinie wird auf 500.000 Zellen/ml in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) eingestellt. Anschließend werden die Glas-Objektträger in die Spannkammern eingelegt, die Zytokammer darauf installiert und mit einem Spannring gesichert. Es wird 1 ml der Kontrollzellsuspension in jede Zytokammer pipettiert und für drei Minuten bei 250 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zytokammer entfernt. Die gesamte Zellzahl pro Objektträger beträgt somit eine Million Zellen. Die Objektträger trocknen bei Raumtemperatur über Nacht und werden am Folgetag bei -20°C gelagert.

3.4.4 CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung

DTCs aus Knochenmark und Lymphknotengewebe können durch den Einsatz einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung detektiert werden. Dafür werden Antikörper gegen das epitheliale Antigen Zytokeratin 18 (CK18) und das epitheliale Zelladhäsionsmolekül CD326 (EpCAM) benutzt. Zu Beginn der Doppelimmunfluoreszenzfärbung werden die HOT zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Die einzelnen Felder des HOTs werden mit dem *Liquid-Blocker Pen* umrandet, um ein späteres Überlaufen der Flüssigkeiten über den Feldrand hinaus zu vermeiden. Im ersten Schritt erfolgt eine fünfminütige Permeabilisierung mit 0,5 % Triton X-100/1 x PBS (pH 7,4). Nach dreimaligem Waschen in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) für jeweils drei Minuten werden unspezifische Bindungen durch 20 % humanes AB-Serum in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) für 20 Minuten blockiert. Die HOT mit den Knochenmark- bzw. Lymphknotengewebeproben werden mit dem ersten Primärantikörper BerEp4, einem murinen monoklonalen anti-EpCAM-Antikörper, für 45 Minuten inkubiert. Die HOT werden dreimal in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) für jeweils drei Minuten gewaschen. Danach erfolgt eine 30-minütige Inkubationsphase mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper *anti-mouse-Alexa 488*. Die HOT müssen ab jetzt in einer Metallbox abgedunkelt werden, um eine optimale Fluoreszenzintensität zu erhalten. Nun erfolgt erneut ein dreimaliger, je dreiminütiger Waschschrift sowie eine Blockung mit 20 % humanem AB-Serum in 1 x PBS-Puffer (pH

7,4) für 20 Minuten. Anschließend werden die HOT mit den Knochenmark- bzw. Lymphknotengewebebeobungen mit dem zweiten Primärantikörper CK18, einem polyklonalen anti-CK18-Antikörper, für 45 Minuten inkubiert. Der Inkubation folgt erneut ein Waschschrift (3 x 3 min) in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) bevor der zweite fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper *anti-rabbit-Cy3* für eine lichtgeschützte 30-minütige Inkubation auf alle HOT aufgebracht wird. Es schließt sich ein letzter dreimaliger je dreiminütiger Waschschrift in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) an, wobei beim zweiten Waschschrift dem 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) noch 0,2 % Tween-20 zugegeben wird, um unspezifische Signale im Hintergrund zu minimieren. Zum Schluss erfolgt eine fünfminütige Fixierung mit 1 % Paraformaldehyd (PFA) und ein einmaliges kurzes Waschen in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4), um überschüssiges PFA zu entfernen. Nach dem Fixieren werden die HOT in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) bis zur weiteren Verwendung über Nacht im Kühlschrank abgedunkelt gelagert. Parallel erfolgt zur Isotypen-Kontrolle die Versetzung der HOT mit dem MOPC21-Antikörper statt mit dem BerEp4-Antikörper und mit dem X0903-Antikörper statt mit dem CK18-Antikörper. Dieser Vorgang dient einer Negativkontrolle, da nur Knochenmark- und Lymphknotengewebebeobungen, auf deren Zellen in der Isotypen-Kontrolle kein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann, zur Identifikation von DTCs geeignet sind. Ferner wird bei jeder Doppelimmunfluoreszenzfärbung eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrollen werden folgende humane Zelllinien verwendet:

- Zelllinie: SCC-4
 - Zelltyp: humanes Plattenepithelkarzinom
 - Ursprung: Plattenepithelkarzinom der Zunge eines 55-jährigen Mannes bei Zustand nach Radiochemotherapie im Jahr 1980 (Rheinwald *et al.*, 1981)
- Zelllinie: LN1590
 - Zelltyp: humanes Lymphknotengewebe
 - Ursprung: histologisch metastasenfrees Lymphknotengewebe eines therapienaiven Ösophaguskarzinom-Patienten, genauer Zeitpunkt unbekannt, Zeitspanne der Primäroperation April 1992 - Februar 1999 (Hosch *et al.*, 2000)

3.4.5 Isolierung von DTCs von Haft-Objektträgern und Amplifikation der (Tumor-) Einzelzell-DNA

Eine durch die CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung detektierte (Tumor-) Einzelzelle wird unter mikroskopischer Sicht mit Hilfe eines Mikromanipulators von dem mit 300 µl „Pickpuffer“ [1 x PBS-Puffer (pH 7,4) + 0,5 % Igepal] überschichteten HOT vorsichtig isoliert. Hierzu wird eine im Mikromanipulator eingespannte Mikrohaematokritkapillare um die entsprechende (Tumor-) Einzelzelle gezielt herum bewegt, damit die zu „pickende“ (Tumor-) Einzelzelle möglichst frei von jeglicher Art von Hintergrundmaterial in die Mikrohaematokritkapillare „eingesaugt“ werden kann. Dieser Säuberungsvorgang soll verhindern, dass beim Aufsaugen der (Tumor-) Einzelzelle unspezifisches Material oder auch Normalzellen mit in die Mikrohaematokritkapillare aufgesaugt werden, wodurch eine Verunreinigung der Test-DNA entstehen könnte. Nach dem Freilegen der (Tumor-) Einzelzelle wird diese mit der Mikrohaematokritkapillare aufgenommen und in ein sog. „Pickfeld“ eines 8-Feld-Objektträgers überführt, das mit 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) mit 0,5 % Tween-20 überschichtet ist. Dann erfolgt eine vorsichtige Positionierung der (Tumor-) Einzelzelle in einem solchen „Pickfeld“. Die „gepickte“ (Tumor-) Einzelzelle wird dann unter mikroskopischer Sicht zusammen mit 1 µl 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) mit Hilfe einer Pipette aufgenommen und in ein Proteinase-K-Verdau enthaltendes 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Pro 0,2 ml Reaktionsgefäß werden 2 µl des Proteinase-K-Gemisches auf Eis vorgelegt:

0,2 µl OPA *buffer plus*

0,13 µl Igepal 10 %

0,13 µl Tween-20 10 %

0,26 µl Proteinase K

1,28 µl dest. H₂O

Die so isolierten (Tumor-) Einzelzellen werden für zehn Stunden bei 42°C in einer PCR-Maschine im Proteinase-K-Mix verdaut. Am Ende des Proteinase-K-Verdau findet ein zehnminütiger Inaktivierungsschritt des Enzyms bei 80°C statt.

3.4.6 (Tumor-) Einzelzell-PCR

Zu Beginn der (Tumor-) Einzelzell-PCR findet ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *MseI* statt. Das Enzym mit der Schnittstelle T^ATAA fragmentiert das Genom der zuvor „gepickten“ (Tumor-) Einzelzelle.

Es wird dem jeweiligen 0,2 ml Reaktionsgefäß mit der Proteinase-K verdauten (Tumor-) Einzelzelle 2 µl des folgenden *MseI*-Gemisches zugefügt:

0,2 µl OPA *buffer plus*

0,2 µl *MseI hc*

1,6 µl dest. H₂O

Der *MseI*-Verdau läuft dann bei 37°C für drei Stunden in einer PCR-Maschine ab. Am Ende der Reaktion wird das *MseI*-Enzym für die Dauer von fünf Minuten bei 65°C inaktiviert.

Vor der Ligation (*annealing*) erfolgt ein *preannealing*, währenddessen an die durch den *MseI*-Verdau entstandenen TA-Überhänge an den 5'-Enden (*sticky ends*) ein Adapter angelagert wird. Der Adapter besteht aus den zwei Oligonukleotiden LIB1 und ddMse11. Die Anlagerung der Oligonukleotide an die durch den Verdau generierten Überhänge geschieht per Basenpaarung. Dies wird durch schrittweises Abkühlen um 1°C pro Minute von 65°C auf 15°C in einer PCR-Maschine erreicht.

Es wird dem jeweiligen 0,2 ml Reaktionsgefäß mit der *MseI*-fragmentierten (Tumor-) Einzelzelle 3 µl des folgenden Adapter-Mixes zugefügt:

0,5 µl OPA *buffer plus*

0,5 µl LIB1 Oligonukleotid-*Primer* (100 µM)

0,5 µl ddMse11 Oligonukleotid-*Primer* (100 µM)

1,5 µl dest. H₂O

Zur Durchführung des *annealings* werden zu den *preannealten* Adaptern jeweils 1 µl T4-DNA-Ligase (*hc*) und 1 µl 10 mM ATP hinzugegeben. Über Nacht findet die Ligation bei einer Temperatur von 15°C in einer PCR-Maschine statt.

Am nächsten Tag werden 41 µl des folgenden PCR-Mixes hinzugegeben und nachfolgendes Programm in einer PCR-Maschine durchgeführt:

3 µl *Expand-Long-Template buffer 1*

2 µl 10 µM dNTPs

1 µl *Expand-Long-Template PolMix*

35 µl dest. H₂O

Temperatur	1 Zyklus	15 Zyklen	8 Zyklen	22 Zyklen	1 Zyklus
94°C		40 sec	40 sec	40 sec	
57°C bis 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 so entstandene primäre PCR-Produkt dient als Ausgangspool für alle weiteren genomischen Untersuchungen und wird bei einer Temperatur von -20°C gelagert (Abb. 3).

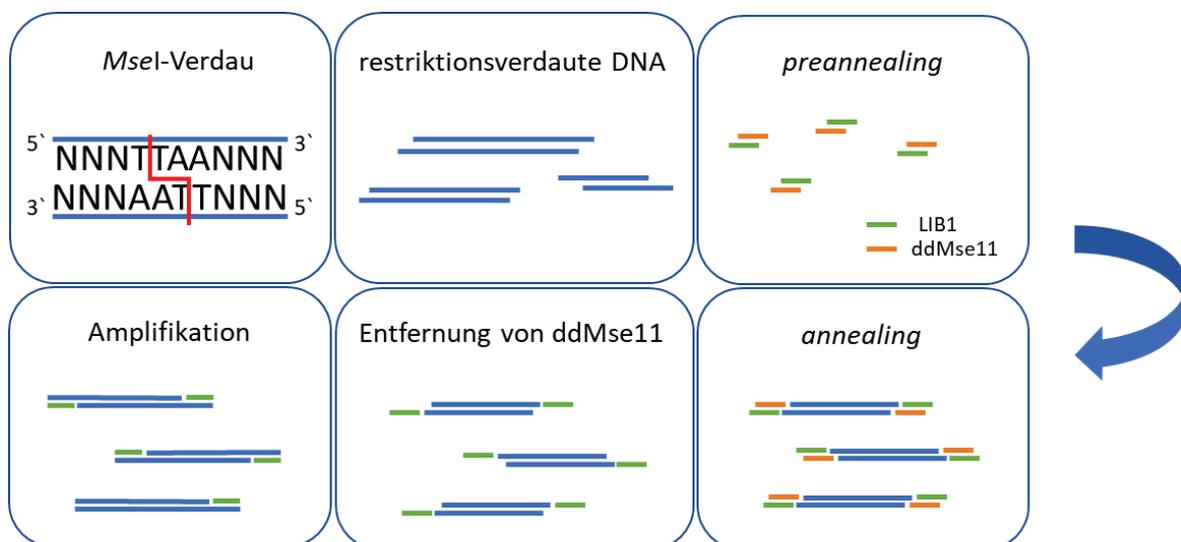


Abb. 3: Adapter-Linker-PCR. Der Ablauf der Adapter-Linker-PCR wird schematisch in der Abbildung gezeigt. Mit Hilfe des Restriktionsenzym *MseI* erfolgt eine Spaltung der genomischen DNA in Fragmente. Vor der Ligation (*annealing*) erfolgt ein *preannealing*, währenddessen an die durch den *MseI*-Verdau generierten TA-Überhänge an den 5'-Enden ein komplementärer Adapter angelagert wird. Der Adapter besteht aus den zwei Oligonukleotiden LIB1 und ddMse11. Aufgrund der Komplementarität der Adapter zur *MseI*-Schnittstelle kann im Anschluss durch die Zugabe der T4-DNA-Ligase der *annealing*-Prozess ablaufen. Nach erfolgter Ligation kann der Hilfsprimer ddMse11 entfernt werden und das Oligonukleotid LIB1 dient als Ausgangsprimer für die gesamte Amplifikation der genomischen DNA einer Zelle.

3.4.7 Kontroll-PCR

Zur Verifizierung der Qualität des primären PCR-Produktes wird eine Kontroll-PCR durchgeführt, die spezifische *MseI*-Fragmente nachweist. Dazu werden die beiden Oligonukleotidpaare p53 Exon 2/3 und Zytokeratin 19 eingesetzt. Man kann von einem qualitativ guten primären (Tumor-) Einzelzellamplifikat ausgehen, wenn beide PCR-Produkte erfolgreich amplifiziert worden sind. Erfahrungsgemäß sind auch solche Proben für mCGH-Untersuchungen geeignet, bei denen eine Amplifikation nur eines spezifischen PCR-Produktes in der Kontroll-PCR stattgefunden hat.

Pro 0,2 ml Reaktionsgefäß wird folgender PCR-Ansatz hergestellt:

- 1 µl PCR-Puffer MgCl₂ + dNTPs
- 0,5 µl Oligonukleotid-*Primer 3'*, 8 µM
- 0,5 µl Oligonukleotid-*Primer 5'*, 8 µM
- 0,25 µl BSA 100 %
- 0,1 µl *Taq* Polymerase
- 7,75 µl dest. H₂O

Dem PCR-*Mix* wird zum Schluss noch 0,5 µl des primären PCR-Produktes hinzugefügt.

Das PCR-Programm für die Kontroll-PCR lautet:

Temperatur	1 Zyklus	14 Zyklen	24 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

3.4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese wird zunächst ein 2 % (w/v) Agarose-Gel in eine Horizontal-Kammer gegossen. Es werden hierzu 150 ml TBE-Puffer mit 3 g Agarose versetzt. Anschließend gibt man 15 µl *GelRed* hinzu (5 µl *GelRed*/50 ml Volumen) und lässt das Gel auskühlen. Das nun abgekühlte Gel wird in eine Horizontal-Kammer mit 1 x TBE-Puffer (pH 8,3) gelegt.

Zur Auftrennung der Kontroll-PCR-Produkte wird jede Probe mit 3 µl DNA *Gel Loading Dye* (6x) versetzt und anschließend in die einzelnen Geltaschen eingebracht. Ferner wird in die erste Geltasche 7 µl einer 50 bp-Leiter aufgetragen.

In einer Horizontal-Gelelektrophorese-Kammer werden die Kontroll-PCR-Proben bei 135 V über 45 Minuten aufgetrennt. Im Anschluss wird das Gel auf einen UV-Schirm aufgelegt und mit einer CCD-Kamera fotografiert.

3.4.9 Markierungs-PCR

In der Markierungs-PCR erfolgt eine unterschiedliche Markierung von Test- und Referenz-DNA. Für die Markierung sowohl der in der Einzelzell-PCR amplifizierten Test-DNA (*MseI*-Amplifikat einer DTC) als auch der Referenz-DNA (100 PBL) werden Desoxynukleotide eingesetzt. Digoxigenin-11-dUTP dient der Markierung der Test-DNA und Biotin-16-dUTP wird zur Markierung der Referenz-DNA verwendet.

Ein Reamplifikationsansatz für die Markierungs-PCR setzt sich zusammen aus:

4 µl *Expand-Long-Template buffer* 1

6 µl LIB 1/*MseLig11* 10 µM

1,4 µl 7/8 *dNTP-Mix* (4,375 µl dTTP; 5 µl dATP; 5 µl dCTP; 5 µl dGTP; 30,7 µl dest. H₂O)

1,75 µl Dig-11-dUTP (Test-DNA) oder Biotin-16-dUTP (Referenz-DNA)

0,5 µl *Taq* Polymerase

26,35 µl dest. H₂O

Abschließend wird zu dem Reamplifikationsansatz 0,5 µl des primären PCR-Produktes zugegeben. Das PCR-Programm lautet:

Temperatur	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 müssen die LIB1-*Primer* noch entfernt werden. Dieser Schritt erfolgt durch den Einsatz des Restriktionsenzym *TruI*. Dieses Enzym ist ein Isoenzym von *MseI* und weist somit dieselbe Schnittstelle T^ATAA auf.

Das Reamplifikat wird dazu mit 1 µl *Trul* und 2 µl Puffer R bei einer Temperatur von 65°C für drei Stunden in einer PCR-Maschine inkubiert.

3.4.10 Lymphozytenkulturen zur Gewinnung von Metaphasechromosomen

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Metaphasechromosomen dienen ca. 10-20 ml peripheres Blut von einem gesunden männlichen Spender. Es werden jeweils 300 µl Blut in eine Zellkulturflasche (25 cm²) pipettiert, die bereits mit 5 ml *PB-Max Karyotyping Medium* befüllt worden ist. Das Gemisch aus Blut und Lymphozyten-Kulturmedium wird anschließend über 72 Stunden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C inkubiert, wobei alle 24 Stunden die Zellkulturflaschen geschwenkt werden müssen. Nach 72 Stunden wird zu jeder Zellkulturflasche 50 µl des Mitose-Hemmstoffes Colcemid hinzugegeben, um anschließend für weitere 30-60 Minuten bei 37°C inkubiert zu werden. Colcemid ist ein synthetisches Analogon von Colchizin und verhindert die Ausbildung des Spindelfaserapparates, so dass eine Arretierung der Lymphozyten in der Metaphase stattfindet. Im Anschluss werden jeweils zwei Kulturansätze in einem 15 ml Reaktionsgefäß vereinigt und bei Raumtemperatur für acht Minuten bei 200 x g durch Zentrifugation *pelletiert*. Nach Verwerfen des Überstandes und vorsichtiger Resuspendierung des *Pellets* werden 10 ml einer auf 37°C aufgewärmten hypotonen Kaliumchlorid-Lösung (KCl; 75 mM) für eine 20-minütige Inkubationszeit bei 37°C dazugegeben. Durch den Einsatz der hypotonen KCl-Lösung quellen die Lymphozyten osmotisch bedingt auf. Zur Fixierung erfolgt die Zugabe von 1 ml eines -20°C kalten Methanol-Eisessig-Gemisches (75 ml/25 ml). Die Lymphozyten werden dann für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur (8 min, 200 x g) und Verwerfen des Überstandes wird mit 5 ml des eiskalten Fixativs (MeOH-Eisessig-Gemisch) gewaschen. Durch weiteres zweimaliges Zentrifugieren und Waschen werden die Reste der lysierten Erythrozyten entfernt. Die durch dieses Procedere hergestellten Zellsuspensionen können eingebettet in 5 ml Fixativ-Lösung im Gefrierschrank bei -20°C gelagert werden.

3.4.11 Präparation von Metaphasechromosomen

Bei der Herstellung der Metaphasen-Objektträger für die mCGH werden zunächst Glas-Objektträger zur Säuberung in 100-%igem unvergällten Ethanol über Nacht in Glas-

Küvetten im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wird der Ethanol abgegossen und die Glas-Objektträger in destilliertem Wasser in einem -20°C kalten Gefrierschrank für zehn Minuten vorgekühlt und zusammen mit den Chromosomensuspensionen auf Eis kaltgestellt. Die in Methanol-Eisessig eingebetteten Lymphozyten können mit Hilfe einer Pipette aus einem Höhenabstand von ca. 50 cm auf die Glas-Objektträger aufgetropft werden. Zur Trocknung werden diese auf befeuchtete Papiertücher in einen Brutschrank bei 37°C gelegt, um im Sinne eines sog. Spreitungs-Prozesses eine bessere Verteilung der Chromosomen zu erreichen. Vor Gebrauch der Metaphasen-Objektträger für die mCGH werden diese in 70-%igem unvergällten Ethanol im Kühlschrank bei 4°C für mindestens eine Woche gelagert.

3.4.12 Metaphasen-basierte komparative genomische Hybridisierung (mCGH)

Vorbereitend zur Durchführung der mCGH erfolgt ein DNA-Fällungsprozess der markierten Reamplifikate der Test- und Referenz-DNA bei -20°C über Nacht:

40 µl markiertes PCR-Produkt der Test-DNA (Dig-dUTP)

40 µl markiertes PCR-Produkt der Referenz-DNA (Biotin-dUTP)

100 µl humane C₀t-1 DNA

10 µl Heringssperma-DNA

19 µl NaAc 3 M (pH 5,2)

400 µl 100-%iger EtOH (-20°C)

Am darauf folgenden Tag wird die präzipitierte DNA in einer Kühlzentrifuge bei 25.000 x g und 4°C für eine Zeitdauer von 45 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wird das DNA-*Pellet* in 700 µl 70-%igem Ethanol gewaschen und dann erneut bei 4°C für 20 Minuten bei 25.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird erneut mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach erfolgter Trocknung des *Pellets* im Heizblock bei 37°C wird diesem 7 µl 100-%iges Formamid zugefügt. Daraufhin erfolgt eine zehnminütige Denaturierung der DNA-Probe im Heizblock bei 37°C. Nach diesem Lösevorgang werden 7 µl *Master-Mix* (20 % Dextran-Sulfat in 4 x SSC) dazu pipettiert. Nach Hinzugabe von 7 µl *Master-Mix* können nun die DNA-Stränge für sechs Minuten in einem Heizblock bei 78°C erneut denaturiert werden. Anschließend wird die Probe für 60

Minuten bei einer Temperatur von 37°C im Heizblock inkubiert. Innerhalb dieser Phase kann sich die humane C₀t-1 DNA an die hochrepetitiven Sequenzen der Test- und Referenz-DNA anlagern, um unspezifische Bindungen der DNA an die Metaphasechromosomen zu minimieren. Dadurch soll eine unterschiedliche Hybridisierungskinetik im Vergleich zu einmalig vorkommenden Sequenzen verhindert werden.

Parallel zur Herstellung des DNA-Hybridisierungsansatzes werden mehrere Glas-Objektträger mikroskopisch auf geeignete Metaphasen für die spätere Hybridisierung *gescreent*. Als geeignete Hybridisierungsstellen bezeichnet man in ausreichendem Maße gespreitete und nicht überlappende Metaphasechromosomen, so dass eine spätere Sortierung in ein Karyogramm möglich ist. Anschließend wird eine solche Stelle mit einem schwarzen wasserfesten Stift auf der Rückseite des Glas-Objektträgers markiert.

Ein geeigneter Glas-Objektträger wird für fünf Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC gewaschen. Es werden 100 ml 10 mM Salzsäure (HCl) auf 37°C in einem Wasserbad erwärmt, der dann bei Erreichen der Zieltemperatur 50 µl Pepsin-Lösung zugefügt werden. In dieser HCl-Pepsin-Lösung werden die Metaphasen-Objektträger bei genau 37°C für zwei Minuten inkubiert. Ziel des Pepsin-Verdaues ist die Eliminierung unspezifischer Proteine, die an den Metaphasechromosomen angelagert sind und somit eine effektive Hybridisierung stören könnten. Der Pepsin-Verdau wird durch zweimaliges dreiminütiges Waschen in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) beendet. Daraufhin werden die Glas-Objektträger kurz in 50 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Anschließend werden die Chromosomen für fünf Minuten mit 200 µl 1 % PFA-MgCl₂-Lösung fixiert. Im nächsten Schritt werden die Glas-Objektträger zweimal für jeweils fünf Minuten in 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen, um überschüssige PFA-Lösung zu entfernen. Es wird ein Dehydrierungsschritt durch eine aufsteigende Ethanolreihe bei 4°C für jeweils zwei Minuten angeschlossen (70-%iger, 80-%iger und 100-%iger Ethanol) und die Glas-Objektträger danach bei Raumtemperatur getrocknet. Gleichzeitig werden 100 ml einer Denaturierungslösung aus 70 ml Formamid, 10 ml 20 x SSC und 20 ml dest. H₂O hergestellt, diese auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und auf 70°C in einem Wasserbad erhitzt. Bei Erreichen der Zieltemperatur werden die Chromosomen auf den Glas-Objektträgern für eine Minute und 15 Sekunden in der Formamidlösung denaturiert.

Eine erneut durchgeführte aufsteigende Ethanolreihe bei 4°C für jeweils zwei Minuten dehydriert die Metaphasen-Objektträger. Jetzt kann die zu hybridisierende, vorbehandelte DNA-Probe (14 µl) auf das markierte Feld mit den Metaphasen aufgetropft und mit einem Deckgläschen (18 x 18 mm) bedeckt werden, das mit Fixogum-Montagekleber verschlossen wird. Die Hybridisierung läuft in einer feuchten Kammer bei einer Temperatur von 37°C in einem Brutschrank über mindestens zwei Tage ab.

Nach der Hybridisierung wird das Deckgläschen zusammen mit dem Fixogum-Montagekleber mit Hilfe einer Pinzette vom Hybridisierungsfeld entfernt und der Glas-Objektträger wird zweimal für jeweils fünf Minuten in 4 x SSC und 0,2 % Tween-20 kräftig in einem maschinellen Schüttler gewaschen. Ziel dieses Waschvorganges ist die Entfernung des Dextran-Sulfates als Hauptbestandteil des *Master-Mixes*. Daraufhin wird der Glas-Objektträger dreimal für jeweils fünf Minuten in einer auf 42°C vorgewärmten Formamidlösung (150 ml Formamid, 30 ml 20 x SSC und 120 ml dest. H₂O, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,0) eingebracht, um dann dreimal für jeweils fünf Minuten bei 42°C in 1 x SSC gewaschen zu werden. Nach diesem Schritt wird der Glas-Objektträger kurz in 4 x SSC und 0,2 % Tween-20 eingetaucht. Der Glas-Objektträger wird nun mit 1 ml 3-%iger *Superblock*-Lösung (1 x PBS-Puffer, Tween-20 0,2 %, BSA 3 %, FCS 5 %, pH-Wert 8,5) bedeckt und in einer Feuchtkammer bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Ziel dieses Schrittes ist die Sättigung von unbesetzten Proteinbindungsstellen. Überschüssige Blockierungs-Lösung wird durch einen kurzen Waschvorgang in 4 x SSC und 0,2 % Tween-20 entfernt. Im Anschluss wird auf den Glas-Objektträger 200 µl eines Antikörpergemisches aufgetragen. Dieses besteht aus 185 µl 1-%iger *Superblock*-Lösung (1 x PBS-Puffer, Tween-20 0,2 %, BSA 1 %, FCS 5 %, pH-Wert 8,5), 20 µl anti-Digoxigenin-FITC und 2 µl Avidin-Cy3.5. Der Glas-Objektträger wird mit einem 24 x 55 mm großen Deckglas bedeckt. Es folgt eine Inkubation für 45 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluorochrome erfolgen alle weiteren Schritte im Dunkeln. Ungebundene Fluorochrome werden durch dreimaliges fünfminütiges Waschen in 4 x SSC und 0,2 % Tween-20 bei 37°C entfernt. Eine sich daran anschließende zweiminütige DAPI (4',6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid)-Färbung (0,125 µg/ml in 4 x SSC + 0,2 % Tween-20 in 1:20 Verdünnung) dient der Darstellung der Chromosomenbänderung. Überschüssige DAPI-Lösung wird mit destilliertem Wasser entfernt. Nach Trocknung des Glas-Objektträgers wird ein Tropfen Vectashield zur

Verhinderung der Bildung von Salzkristallen auf diesen gegeben und mit einem 24 x 55 mm großen Deckglas bedeckt.

3.4.13 Auswertung der mCGH

Die Auswertung der mCGH erfolgt zum einen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops, das an eine CCD-Kamera angeschlossen ist. Zum anderen wird eine entsprechende Auswertungssoftware (ISIS-CGH Software) benötigt. Ziel ist es ca. zehn geeignete Metaphasen pro Hybridisierung zu detektieren und zu analysieren. Ausschlusskriterien bei der Auswahl geeigneter Metaphasen sind:

- schwache, inhomogene Hybridisierungssignale/-intensitäten
- starke Größenunterschiede der einzelnen Chromosomen
- sich überlappende Chromosomen
- granuläre Chromosomen
- unvollständiger Chromosomensatz

Trifft eines oder mehrere der oben genannten Kriterien zu, sind die jeweiligen Chromosomen bzw. die ganze Metaphase von der Auswertung auszuschließen. Von geeigneten Metaphasen wird dann jeweils ein digitales Foto mit den Fluoreszenzfiltern für DAPI, FITC und Cy3.5 aufgenommen und gespeichert.

Unterstützt durch die ISIS-CGH Software schließt sich eine Weiterverarbeitung der Chromosomen der digitalisierten Bilderserien an. Das Programm gleicht die Fluoreszenzintensitäten der Antikörper FITC und Cy3.5 automatisch an. Anschließend erfolgt eine manuelle Chromosomensortierung in ein Karyogramm. Des Weiteren wird die Zentromerposition manuell gesetzt. Im Anschluss an die Chromosomenzuordnung kann mit Hilfe der o.g. Software ein graphisches mCGH-Profil für die untersuchte DNA-Probe erstellt werden. Die Software vergleicht für jedes Chromosom das Verhältnis der Fluoreszenzintensität von FITC (Test-DNA) und Cy3.5 (Referenz-DNA). Bei einem Verhältnis von FITC zu Cy3.5 größer als 1,25 (+25%) liegt ein Gewinn, bei einem Verhältnis kleiner 0,75 (-25%) liegt ein Verlust des entsprechenden Chromosomenabschnittes vor. Graphisch werden Gewinne u./o. Verluste als Abweichung von der Mittelgraden dargestellt, wobei eine Abweichung nach rechts einen Gewinn und eine Abweichung nach

links einen Verlust des korrespondierenden Chromosomenabschnittes darstellt. Gewinne bzw. Verluste werden zusätzlich farblich kodiert: Die Farbe Grün steht für die Amplifikation und die Farbe Rot für die Deletion von Chromosomenabschnitten.

3.4.14 Biostatistische Auswertung

Eisen-Cluster

Die von Eisen *et al.* im Jahr 1998 entwickelte *Software* zur Herstellung eines hierarchischen *Clusters* kann zur Analyse und graphischen Darstellung von Ähnlichkeiten in mCGH-Datensätzen verwendet werden (<http://www.eisenlab.org>). In dieser Dissertationsarbeit wurde die Version 3.0 benutzt.

Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test dient der Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen und ist das nichtparametrische Äquivalent des t-Tests. Die graphische Darstellung wurde mittels der *GraphPad-Prism Software* erstellt. In dieser Dissertationsarbeit wurde die Version 7.0 benutzt.

Progenetix

Die genomischen Aberrationen der einzelnen mCGH-Auswertungen werden gemäß der Nomenklatur des ISCN (*international system for human cytogenetic nomenclature*, Stand 2013) tabellarisch zusammengefasst. Der ISCN legt eine grundlegende Schreibweise für den humanen Chromosomensatz und dessen Bandenmuster fest. Die so erstellte Tabelle wird dann in das Analyseprogramm Progenetix (<http://www.progenetix.net>) hochgeladen. Daraufhin wird das Format "*ISCN annotation table*" sowie "*chromosomal CGH*" gewählt. Nach dieser Prozessierung erhält man ein graphisches kumulatives mCGH-Profil.

SPSS

Die *Software* SPSS wird zur graphischen Darstellung von Kaplan-Meier-Stufenkurven verwendet. Bei dieser univariaten Analyse wird der Einfluss von verschiedenen Risikofaktoren auf das Gesamtüberleben der Patienten berechnet. Um die

Überlebenskurven von zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wird der Log-rang-Test eingesetzt. In dieser Dissertationsarbeit wurde die Version 21.0 benutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Daten des Patientenkollektivs

Es lag ein repräsentatives Kollektiv von insgesamt 50 Patienten mit einem HNSCC vor. Die präoperativ entnommenen Knochenmarkaspirate und das intraoperativ gewonnene Lymphknotengewebe wurden mittels einer immunzytochemischen Doppelfärbung auf einzelne disseminierte Tumorzellen (DTCs) hin untersucht. Die folgende Tabelle fasst die wichtigsten klinischen Daten des Patientenkollektivs sowie die Anzahl der detektierten DTCs in dem jeweiligen Kompartiment (KM oder LK) zusammen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Klinische Daten des Patientenkollektivs. n=Anzahl; KM=Knochenmark; LK=Lymphknoten; DTC=disseminierte Tumorzelle; SCC=Plattenepithelkarzinom; Ø=Durchschnittsalter.

Patienten	n=50	DTC ⁺ KM	DTC ⁻ KM	DTC ⁺ LK	DTC ⁻ LK
Frauen (Ø 73 Jahre)	20	4	11	7	9
Männer (Ø 64 Jahre)	30	4	26	11	13
Primärtumorgröße					
pTX	1	0	1	0	1
pT1-2	31	4	24	14	14
pT3-4	18	4	12	4	7
Lymphknotenmetastasen					
pNX	2	0	2	-	-
pN0	24	4	19	12	8
pN1-2	24	4	16	6	14
Fernmetastasen					
M0	45	7	35	15	20
M1	5	1	2	3	2
Histopathologisches Grading					
G1	1	0	1	0	1
G2	39	6	31	16	23
G3	10	2	5	2	8
Residualtumor					
R0	32	4	24	12	13
R1	16	3	12	6	7
R2	2	1	1	0	2
Histologie					
SCC, verhornend	10	2	5	2	0
SCC, nicht verhornend	37	6	30	15	21
SCC, nicht klassifizierbar	3	0	2	1	1

4.2 Immunzytochemische Detektion einzelner disseminierter Tumorzellen

Die Gesamtzahl der Patienten mit vorliegenden Lymphknotengewebeproben betrug 40 (siehe 3.2). Insgesamt wurden 47 Lymphknotengewebeproben mittels der im Material- und Methodenteil beschriebenen CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf einzelne DTCs hin untersucht (siehe 3.4.4). Bei 45 % (18/40) aller Patienten konnten auf diese Weise DTCs in makroskopisch-tumorfreiem Lymphknotengewebe gefunden werden. Ferner wurden insgesamt 48 Knochenmarkaspirate von 45 Patienten auf DTCs hin gescreent. Im Vergleich wiesen jedoch nur 17,8 % (8/45) der Patienten DTCs im Knochenmark auf (Abb. 4).

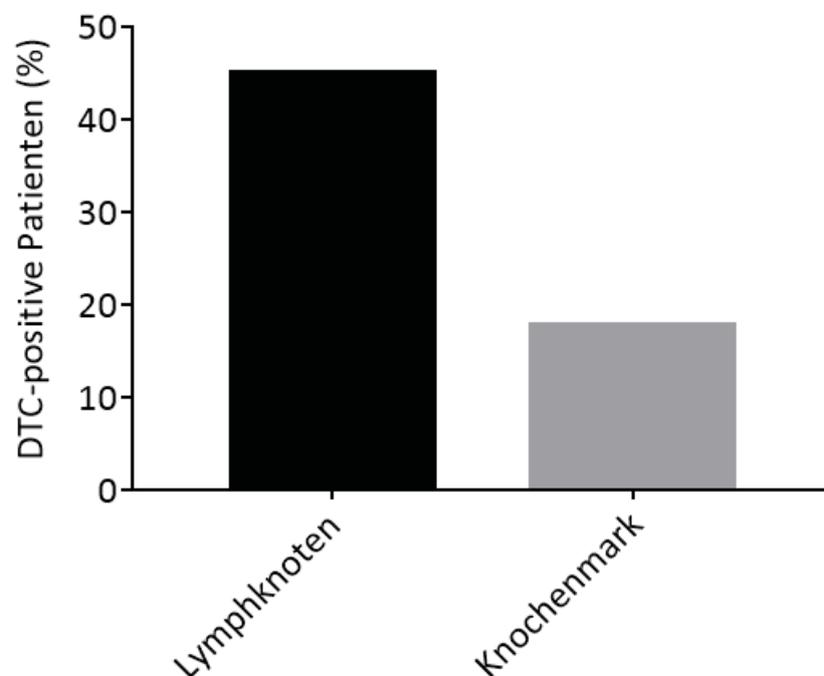


Abb. 4: Häufigkeit der DTC-positiven Patienten (Ordinate, in %) nach Untersuchung von Knochenmark- und Lymphknotengewebeproben (Abszisse) mittels einer CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung.

4.3 Validierung der verwendeten Antikörper in Kontrollzelllinien

Zur Qualitätssicherung wurde bei jeder Durchführung einer CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung jeweils eine Kontrollzelllinie eingesetzt, die laut Angaben der Bezugsquellen (siehe 3.4.4) positiv für beide v.g. epithelialen Marker ist. Die verwendeten LN1590- und SCC-Zelllinien konnten sowohl für CK18 als auch für EpCAM homogen gefärbt werden.

Die Spezifität des im Rahmen der durchgeführten Doppelimmunfluoreszenzfärbung eingesetzten anti-EpCAM-Primärantikörpers BerEp4 wurde durch den Einsatz des Isotyp-Kontroll-Antikörpers MOPC21 verifiziert; die Verifizierung der Spezifität des anti-CK18-Antikörpers erfolgte durch den Einsatz des Isotyp-Kontroll-Antikörpers X0903. Hierbei konnten in beiden Kontrollzelllinien keine gefärbten Zellen detektiert werden, es lagen also keine unspezifischen Bindungen der Antikörper an die untersuchten Zellen vor. Ebenso konnte keine Autofluoreszenz der Zellen detektiert werden. Durch die Verwendung der fluorophorgekoppelten Sekundärantikörper *anti-mouse*-Alexa 488 bzw. von *anti-rabbit*-Cy3 konnte eine Visualisierung der Doppelimmunfluoreszenzfärbung der Kontrollzelllinie erreicht werden. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch Immunfluoreszenz-gefärbte LN1590-Zellen, auf denen beide epitheliale Antigene (CK18 und EpCAM) kodetektiert werden konnten (Abb. 5).

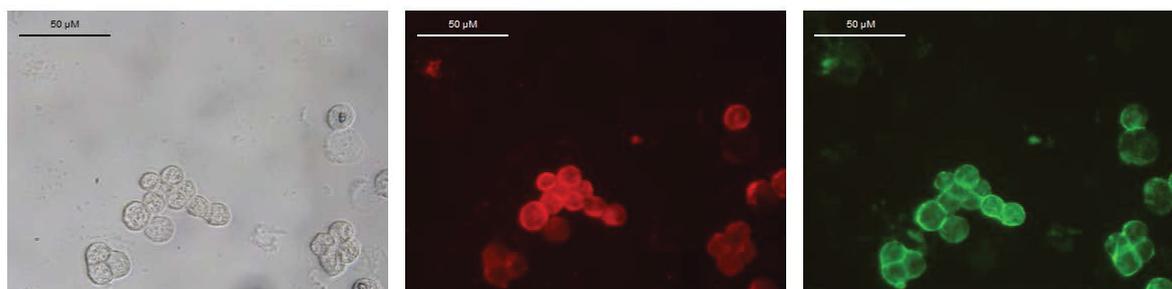


Abb. 5: CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung einer Kontrollzelllinie bei 40-facher Vergrößerung, Größenmaßstab 50 µM. Von links nach rechts: Hellfeld, Zytokeratin 18 (Cy3) und EpCAM (Alexa 488). In der Kontrollzelllinie LN1590 konnten beide epithelialen Antigene kodetektiert werden. Durch Einsatz des Fluorochroms Cy3 wird Zytokeratin 18 visuell als rotes Fluoreszenzsignal auf den Zellen nachgewiesen. Durch Einsatz des Fluorochroms Alexa 488 wird EpCAM visuell als grünes Fluoreszenzsignal auf den Zellen nachgewiesen.

4.4 Verteilung der DTC-Subpopulationen

Grundsätzlich können durch die CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung maximal drei Markerkombinationen entstehen, die man für die Einteilung der DTCs in Subgruppen heranziehen kann:

1. Gruppe: CK18⁺/EpCAM⁻-DTCs
2. Gruppe: CK18⁺/EpCAM⁺-DTCs
3. Gruppe: CK18⁻/EpCAM⁺-DTCs

Die immunzytochemisch detektierten DTCs innerhalb dieses Patientenkollektivs konnten in alle drei Subgruppen eingeordnet werden (Abb. 6).

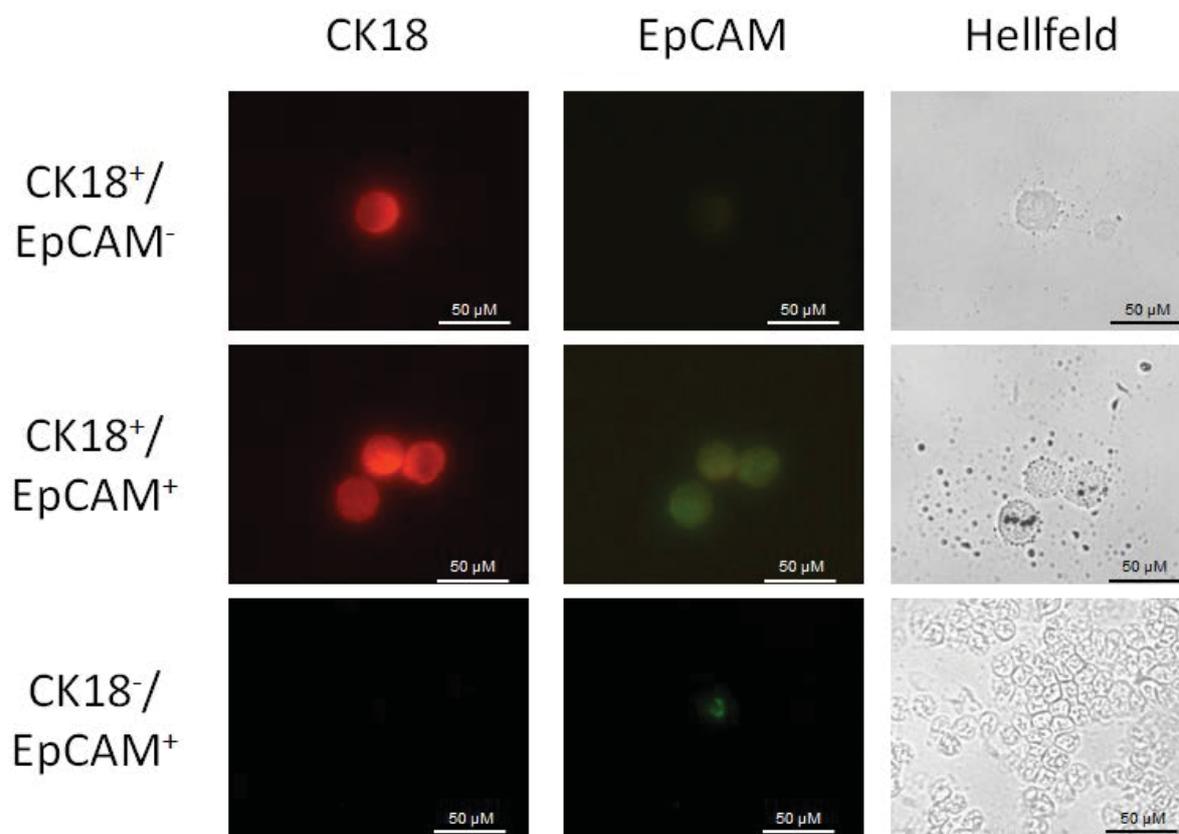


Abb. 6: Einteilung der DTCs in Subgruppen anhand der CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung bei 40-facher Vergrößerung, Größenmaßstab 50 μ M.

38,3 % (18/47) der Lymphknotengewebeproben und 16,7 % (8/48) der Knochenmarkaspirate wiesen DTCs auf, die CK18⁺ und EpCAM⁻ waren (Subgruppe 1). Die der Subgruppe 2 zuzuordnenden doppelpositiven DTCs wurden in 2,1 % (1/48) der Knochenmarkaspirate und in 6,4 % (3/47) der Lymphknotengewebeproben gefunden. Es konnte des Weiteren nur bei einem Patienten eine CK18⁻/EpCAM⁺-DTC im Lymphknotengewebe (2,1 %; 1/47) detektiert werden, welche jedoch nicht isoliert werden konnte (Subgruppe 3).

Die folgende Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung der drei DTC-Subpopulationen anhand der drei möglichen Markerkombinationen (Abb. 7).

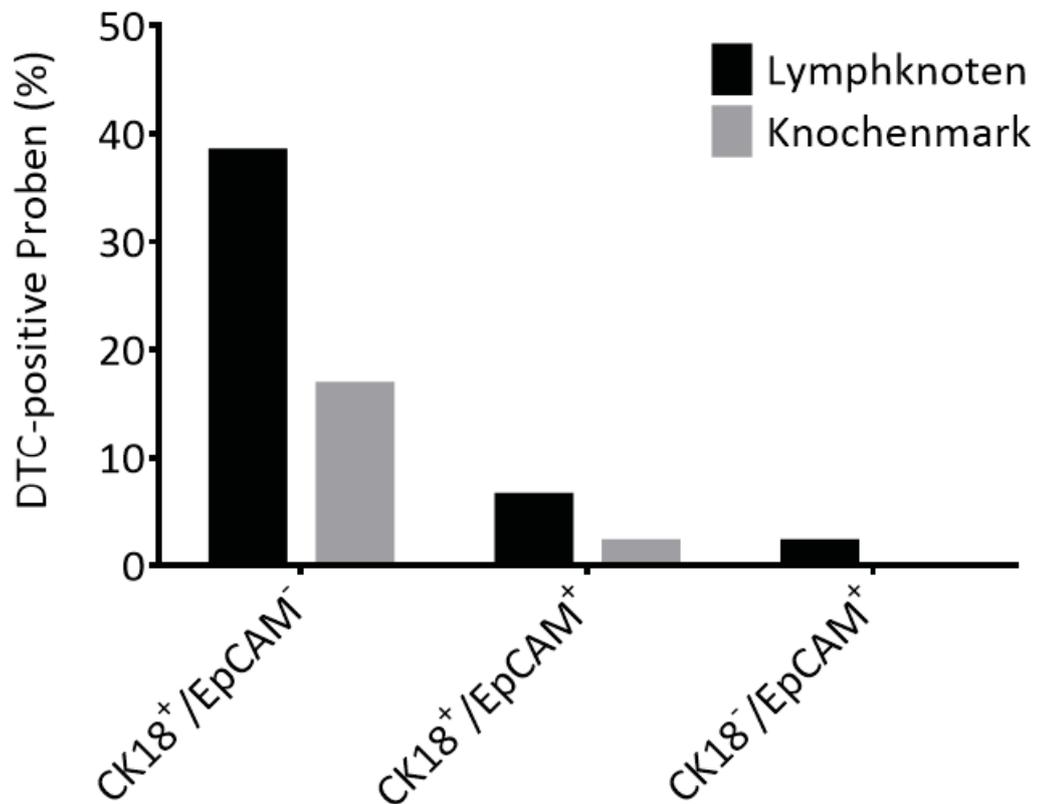


Abb. 7: Prozentuale Verteilung der DTC-positiven Proben (Ordinate) innerhalb der drei DTC-Subpopulationen (Abszisse) nach Untersuchung von Knochenmark- und Lymphknotengewebeproben.

4.5 Isolierung von DTCs aus Lymphknoten und Knochenmark

Eine mittels der CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung detektierte und mit Hilfe eines Mikromanipulators isolierte DTC wurde in ein sog. „Pickfeld“ eines 8-Feld-Objektträgers transferiert, welches mit einem Tropfen „Pickpuffer“ [1 x PBS (pH 7,4) + 0,5 % Igepal] benetzt war. Hier erfolgte dann unter mikroskopischer Sichtkontrolle die Aufnahme der immunzytochemisch gefärbten DTC mit Hilfe einer 1 µl Pipette (Abb. 8).

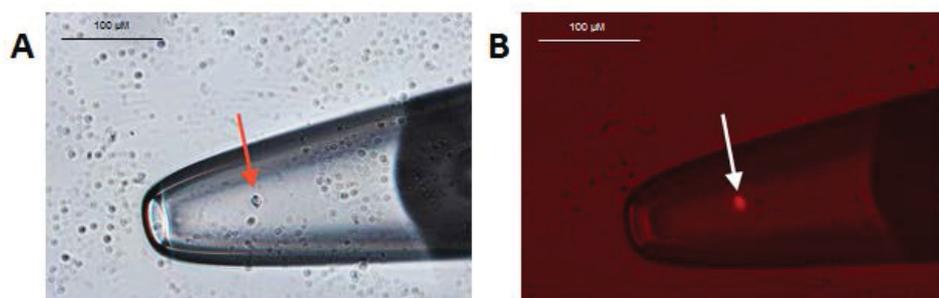


Abb. 8: Darstellung einer DTC in einer Mikrohaematokritkapillare bei 20-facher Vergrößerung, Größenmaßstab 100 µM. A) Unter mikroskopischer Sicht wird mit Hilfe eines Mikromanipulators eine DTC

von einem Haft-Objektträger gelöst und isoliert. **B)** Im Hintergrund einer Zytokeratin 18 (Cy3)-positiven DTC befinden sich zahlreiche ungefärbte Normalzellen.

Im Median (LK + KM) konnten drei immunzytochemisch gefärbte DTCs (Spannweite 1-30) auf den HOT vorgefunden werden. Beim Versuch 79 (LK: 52 + KM: 27) immunzytochemisch gefärbte DTCs mit Hilfe eines Mikromanipulators von den HOT zu lösen gingen 20 Zellen (LK: 14 + KM: 6) verloren (insgesamt 25,3 %). Somit konnten insgesamt 59 (LK: 38 + KM: 21) gegen CK18 u./o. EpCAM immunzytochemisch gefärbte DTCs erfolgreich von den HOT isoliert werden (Abb. 9).

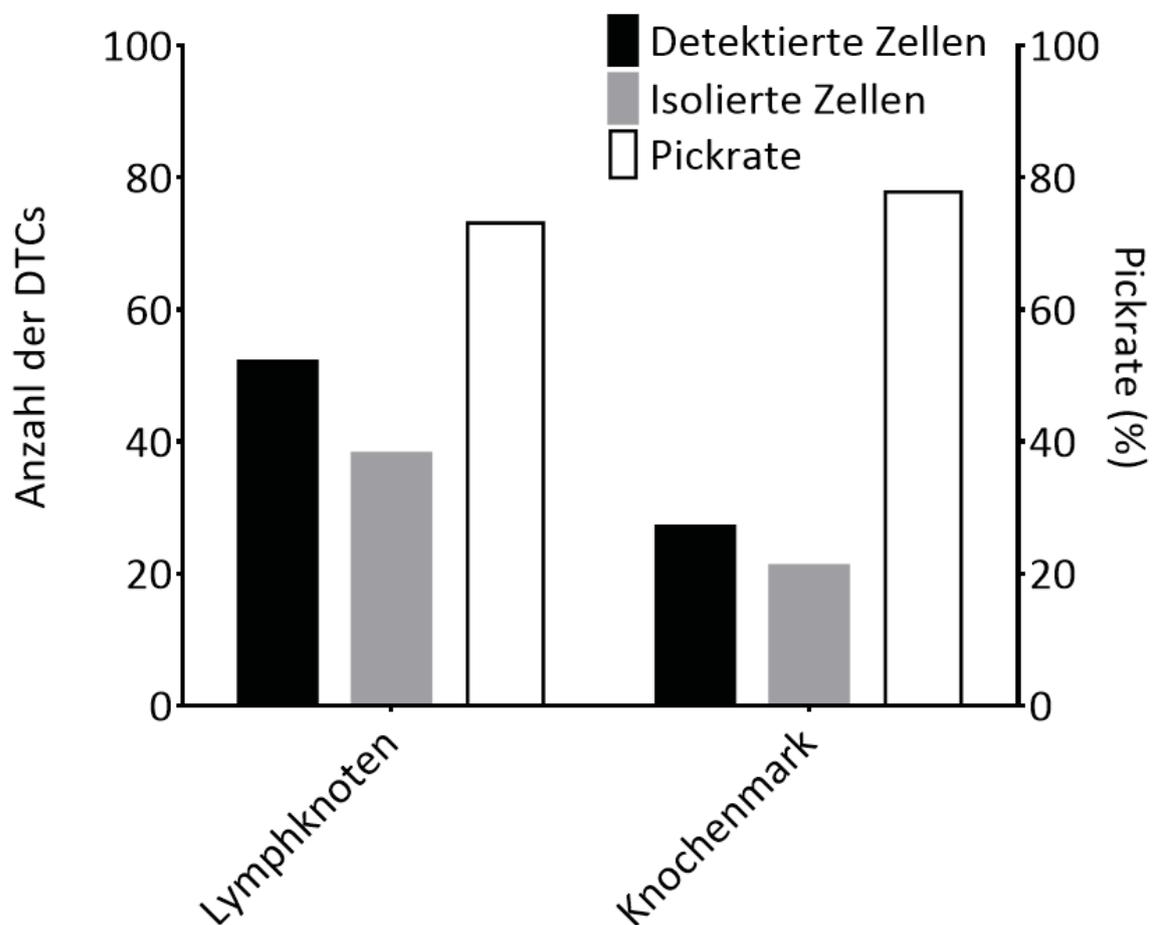


Abb. 9: In der linksbündigen Ordinate ist die Detektions- und Isolierungszahl von disseminierten Tumorzellen (DTCs) in Knochenmark- und Lymphknotengewebeproben (Abszisse) dargestellt. In der rechtsbündigen Ordinate ist die Rate (%) der mit Hilfe eines Mikromanipulators gepickten DTCs in Knochenmark- und Lymphknotengewebeproben (Abszisse) dargestellt.

4.6 Gesamtgenomische Amplifikation der (Tumor-) Einzelzell-DNA und Qualitätskontrolle der amplifizierten DNA

Nach erfolgreicher Isolierung einer (Tumor-) Einzelzelle erfolgte eine Amplifikation der gesamtgenomischen DNA mit Hilfe einer *MseI*-Adapter-*Linker*-PCR. Zur Beurteilung der Qualität der primären PCR-Produkte wurde jede (Tumor-) Einzelzelle auf zwei spezifische genomische *MseI*-Fragmente hin untersucht. Die dafür eingesetzten Oligonukleotid-*Primer* waren Zytokeratin 19 (750 bp) und p53 Exon 2/3 (375 bp). Zusätzlich wurden bei jedem Patienten, bei dem mindestens eine (Tumor-) Einzelzelle gefunden wurde, periphere Blutlymphozyten von dem jeweiligen HOT als Referenz-DNA entnommen sowie „Pickpuffer“ zum Ausschluss einer DNA-Kontaminierung in den jeweiligen PCR-*Master-Mix*-Ansätzen als Negativkontrolle mitgeführt. Nach der primären Amplifikation waren in der Kontroll-PCR 13,6 % (8/59) für ein und 54,2 % (32/59) der isolierten (Tumor-) Einzelzellen für zwei spezifische *MseI*-Fragmente positiv. Prämisse zur weiteren Untersuchung einer isolierten (Tumor-) Einzelzelle war die erfolgreiche Amplifikation mindestens eines Kontroll-PCR-Produktes. Nachfolgend wird exemplarisch das Ergebnis einer Agarose-Gelelektrophorese zur Qualitätsbeurteilung von *MseI*-Adapter-*Linker*-PCR-Amplifikaten gezeigt (Abb. 10).

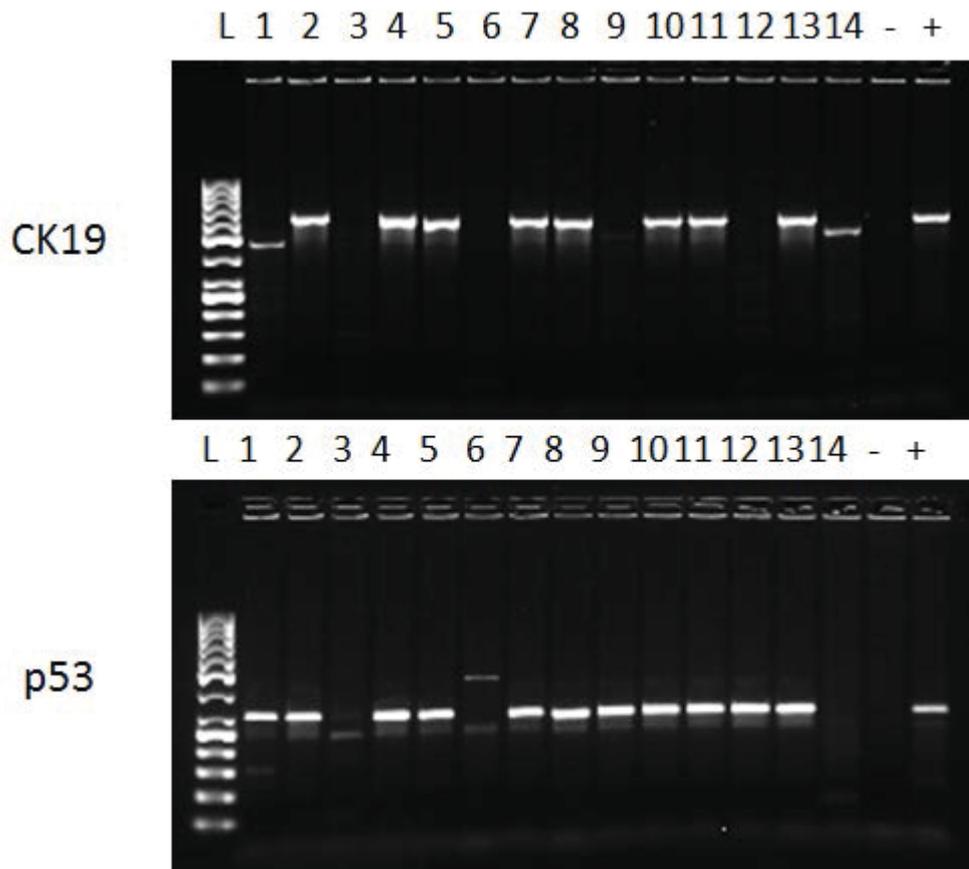


Abb. 10: Agarose-Gelelektrophorese einer Kontroll-PCR zur Qualitätsbeurteilung von *MseI*-Adapter-*Linker*-PCR-Amplifikaten von (Tumor-) Einzelzellen. Die Kontroll-PCR diente der Qualitätskontrolle der *MseI*-Adapter-*Linker*-PCR-Amplifikate durch den Nachweis von zwei spezifischen *MseI*-Fragmenten. Der Nachweis mindestens eines der Fragmente in der Kontroll-PCR wies auf die Verwendbarkeit der zu untersuchenden DNA-Probe in einer mCGH hin. Als Oligonukleotid-*Primer* wurden Zytokeratin 19 (CK19; 750 bp) und p53 Exon 2/3 (375 bp) verwendet. L=50bp-Leiter; Spur 1=25 KM T1 (CK19 negativ); Spur 2=25 KM T2; Spur 3=25 KM T3 (Probe nicht verwendbar); Spur 4=25 KM T4; Spur 5=25 KM PBL; Spur 6=25 K; Spur 7=25 LK4 T1; Spur 8=25 LK4 T2; Spur 9=25 LK4 T3 (CK19 negativ); Spur 10=25 LK4 T4; Spur 11=25 LK4 T5; Spur 12=25 LK4 T6 (CK19 negativ); Spur 13=25 LK4 PBL; Spur 14=25 LK4 K; Spur -=Negativkontrolle (dest. H₂O); Spur +=Positivkontrolle; die erste Zahl der Probennummer entspricht der Patientnummer; KM=Knochenmark; LK=Lymphknoten mit dazugehöriger Nummerierung; T=Tumorzelle mit dazugehöriger Nummerierung; PBL=periphere Blutlymphozyten; K=„Pickpuffer“ als mitgeführte Negativkontrolle.

Als Ergebnis konnte die gesamtgenomisch amplifizierte DNA von insgesamt 40 isolierten DTCs, entsprechend einer Positivquote von 67,8 %, bei -20°C gelagert sowie archiviert werden und diente als Ausgangsmaterial für die im nächsten Schritt erfolgende Metaphasen-basierte komparative genomische Hybridisierung (mCGH).

4.7 Genomische Charakterisierung von (Tumor-) Einzelzellen mittels Metaphasen-basierter komparativer genomischer Hybridisierung

Insgesamt stand die DNA von 40 disseminierten Tumorzellen (DTCs) zur Durchführung einer Metaphasen-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (mCGH) zur Verfügung. Dabei stammten 15 (Tumor-) Einzelzellen aus Knochenmarkproben und 25 (Tumor-) Einzelzellen aus Lymphknotengewebeproben. Die mCGH der (Tumor-) Einzelzellen erfolgte gemäß Protokoll (siehe 3.4.12). Im Fluoreszenzmikroskop wurden mehrere geeignete Metaphasen aufgesucht und mittels CCD-Kamera fotografisch dokumentiert. Von jeder Metaphase wurden drei Aufnahmen gemacht: eine Aufnahme erfolgte von der DAPI-Färbung (Metaphasen-DNA, schwarz invertiert, Abb. 11A) sowie von der Cy3.5- (Referenz-DNA, rot, Abb. 11B) und der FITC- (Test-DNA, grün, Abb. 11C) Fluoreszenzfärbung. Im Anschluss erfolgte ein Überlagerungsbild der Cy3.5- und FITC-Fluoreszenzintensitäten (Abb. 11D).

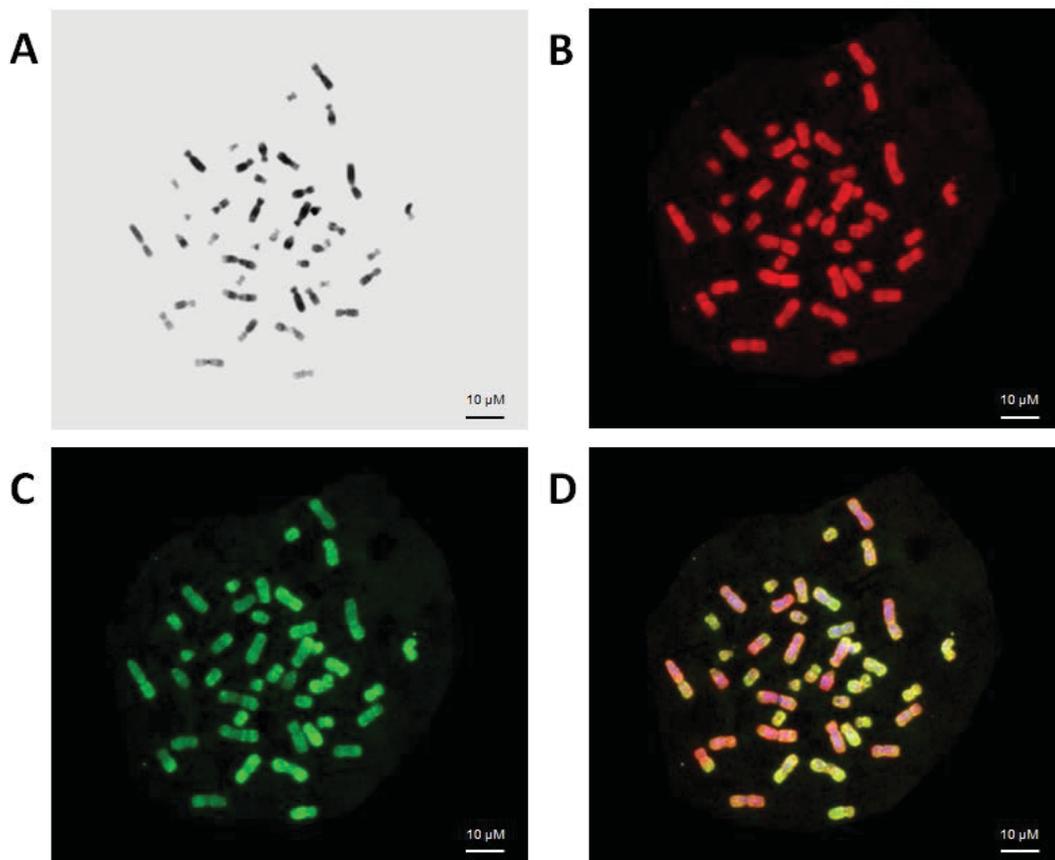


Abb. 11: mCGH: Hybridisierung einer Test-DNA und Referenz-DNA auf eine Metaphase eines gesunden männlichen Spenders bei 63-facher Vergrößerung, Größenmaßstab 10 µM. A) Die DAPI-Färbung dient der Chromosomensortierung. B) Rot (Cy3.5)=Referenz-DNA. C) Grün (FITC)=Test-DNA. D) Beim Cy3.5- und FITC-

Überlagerungsbild werden Amplifikationen und Deletionen innerhalb eines Tumor-Genoms ab einer Größe von 10 Megabasenpaaren (Mbp) sichtbar.

Nach Erstellung der Karyogramme von einzelnen Metaphasen wurden diese in ein zusammengesetztes Karyogramm aller Metaphasen eingebracht. Die ISIS-CGH *Software* maß das Verhältnis der Cy3.5- und FITC-Fluoreszenzintensitäten an jedem Punkt der Chromosomenachse zueinander. Dadurch wurden Amplifikationen (grün) und Deletionen (rot) ab einer Größe von 10 Mbp sichtbar gemacht. Die mCGH gab somit einen globalen Überblick über die numerischen Veränderungen des Genoms einer isolierten DTC anhand des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten zueinander. Konnten mittels mCGH genomische Aberrationen in den Einzelzellen festgestellt werden, so war davon auszugehen, dass es sich hierbei tatsächlich um eine disseminierte Tumorzelle handelte. Das so erstellte mCGH-Profil einer DTC gibt die folgende Abbildung exemplarisch wieder (Abb. 12).

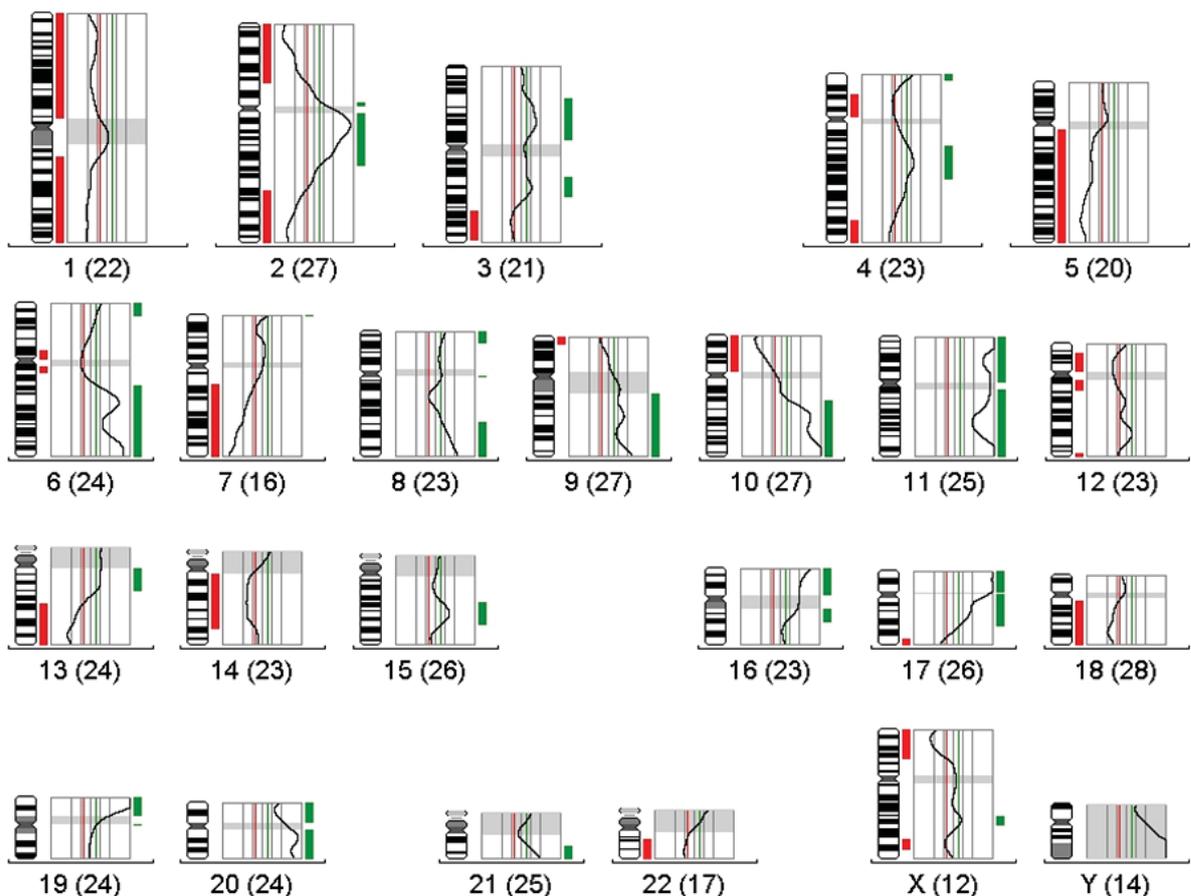


Abb. 12: mCGH-Profil einer disseminierten Tumorzelle. Die Abbildung zeigt ein mCGH-Profil einer einzelnen disseminierten Tumorzelle, die aus dem Knochenmark eines Patienten mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert werden konnte. Die erste Zahl steht für das jeweilige Chromosom und die Zahl in den Klammern dahinter gibt die Anzahl der Chromosomen an, die aus den verschiedenen Metaphasen in

die Auswertung einbezogen wurden. Der Grund für die Abweichung der Anzahl der zusortierten Chromosomen innerhalb dieses mCGH-Profiles lag darin, dass nicht alle Chromosomen einer fotografierten Metaphase für eine Auswertung geeignet waren. Chromosomenregionen mit repetitiven Sequenzen werden durch graue Balken markiert und werden von der Auswertung ausgeschlossen. Chromosomale Deletionen sind als eine Überschreitung der roten Linie und chromosomale Amplifikationen als eine Überschreitung der grünen Linie definiert.

Es waren 95 % (38/40) der isolierten disseminierten Tumorzellen mittels mCGH auswertbar. Zwei DTCs (5,3 %; 2/38) wiesen keine genomischen Veränderungen in ihren mCGH-Profilen auf, so dass in insgesamt 36 mCGH-Profilen numerische Veränderungen der genomischen DNA von Einzelzellen in Form von Amplifikationen u./o. Deletionen beobachtet werden konnten. Die folgende Tabelle fasst die Anzahl der Amplifikationen und Deletionen der jeweiligen mittels mCGH analysierten LK- und KM-DTCs zusammen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Anzahl der Amplifikationen und Deletionen der jeweiligen mittels mCGH analysierten LK- und KM-DTCs. Die erste Zahl der Probennummer entspricht der Patientenummer; LK=Lymphknoten mit dazugehöriger Durchnummerierung; KM=Knochenmark; T=Tumorzelle mit dazugehöriger Durchnummerierung.

Probennummer	Anzahl Amplifikationen	Anzahl Deletionen	Summe
19 LK8 T2	11	0	11
22 LK2 T3	1	0	1
22 LK2 T5	18	0	18
25 LK4 T1	1	0	1
25 LK4 T2	1	0	1
25 LK4 T3	3	1	4
25 LK4 T4	0	2	2
25 LK4 T5	5	1	6
25 LK4 T6	7	0	7
28 LK9 T1	2	0	2
28 LK9 T3	3	0	3
28 LK9 T4	8	0	8
30 LK4 T1	2	0	2
32 LK5 T2	0	0	0
32 LK5 T3	6	0	6
40 LK13 T1	0	0	0
41 LK9 T1	4	1	5
41 LK9 T2	1	0	1
44 LK4 T1	2	0	2
48 LK4 T1	6	0	6
49 LK3 T1	11	0	11
50 LK7 T2	6	4	10
50 LK7 T3	13	6	19

Probennummer	Anzahl Amplifikationen	Anzahl Deletionen	Summe
22 KM T1	13	1	14
22 KM T2	3	0	3
22 KM T3	16	0	16
22 KM T4	22	3	25
25 KM T1	23	16	39
25 KM T2	4	0	4
25 KM T4	2	0	2
48 KM T1	7	0	7
49 KM T1	15	6	21
49 KM T2	18	5	23
50 KM T1	8	4	12
50 KM T3	13	9	22
50 KM T4	11	8	19
50 KM T5	9	3	12
50 KM T6	15	3	18

Zur Qualitätskontrolle der mCGH wurden ferner mCGH-Untersuchungen von CK18⁻/EpCAM⁻-Einzelzellen aus Knochenmark- und Lymphknotengewebeproben durchgeführt. Die mCGH-Profile dieser ungefärbten Einzelzellen wiesen jeweils ein balanciertes Profil auf, d.h. es waren weder Gewinne noch Verluste von Chromosomenregionen nachweisbar (Abb. 13).

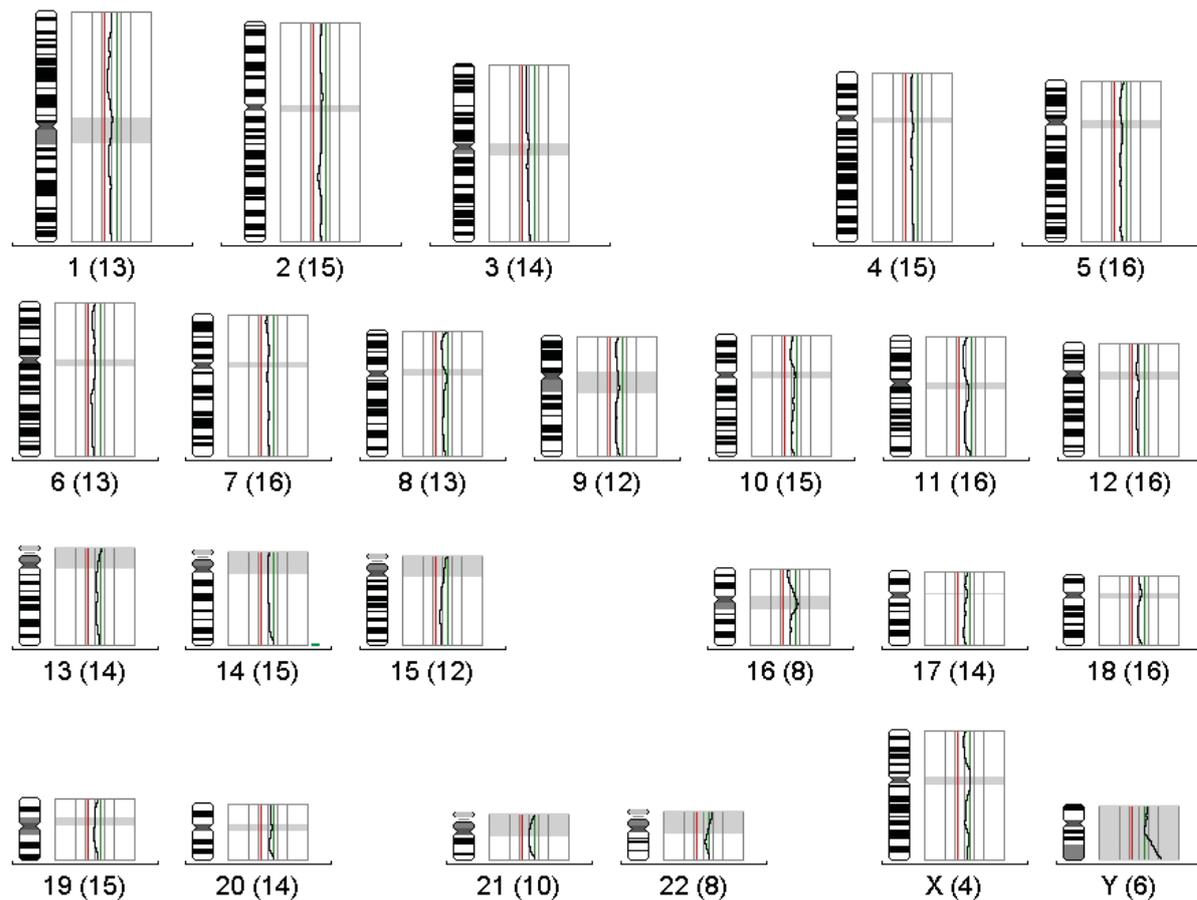


Abb. 13: mCGH-Profil einer CK18⁻/EpCAM⁻ Einzelzelle. Die Abbildung zeigt ein mCGH-Profil einer aus einem Lymphknoten isolierten ungefärbten Einzelzelle. Die erste Zahl steht für das jeweilige Chromosom und die Zahl in den Klammern dahinter gibt die Anzahl der Chromosomen an, die aus den verschiedenen Metaphasen in die Auswertung einbezogen wurden. Der Grund für die Abweichung der Anzahl der zusortierten Chromosomen innerhalb dieses mCGH-Profiles lag darin, dass nicht alle Chromosomen einer fotografierten Metaphase für eine Auswertung geeignet waren. Chromosomenregionen mit repetitiven Sequenzen werden durch die grauen Balken markiert und werden von der Auswertung ausgeschlossen. Chromosomale Deletionen sind als eine Überschreitung der roten Linie und chromosomale Amplifikationen als eine Überschreitung der grünen Linie definiert. Im vorliegenden Fall handelte es sich um ein balanciertes mCGH-Profil, da weder Deletionen noch Amplifikationen nachweisbar waren.

4.8 Biostatistische Auswertung mittels des Analyseprogrammes

Progenetix

Mittels des Analyseprogrammes Progenetix wird ein prozentualer Überblick von häufig vorkommenden genetischen Aberrationen anhand eines kumulativen mCGH-Plots wiedergegeben. In einem solchen mCGH-Plot wird auf der horizontalen Achse die Nummer des jeweiligen Chromosoms in aufsteigender Reihenfolge und auf der vertikalen Achse der prozentuale Anteil der genomischen Aberrationen dargestellt. Hierbei zeigt die Farbe Grün Amplifikationen und die Farbe Rot Deletionen auf den betroffenen Chromosomenabschnitten an.

Die mCGH-Profile von insgesamt 38 DTCs wurden zunächst aus den Kompartimenten Knochenmark und Lymphknoten zusammengefasst dargestellt (Abb. 14).

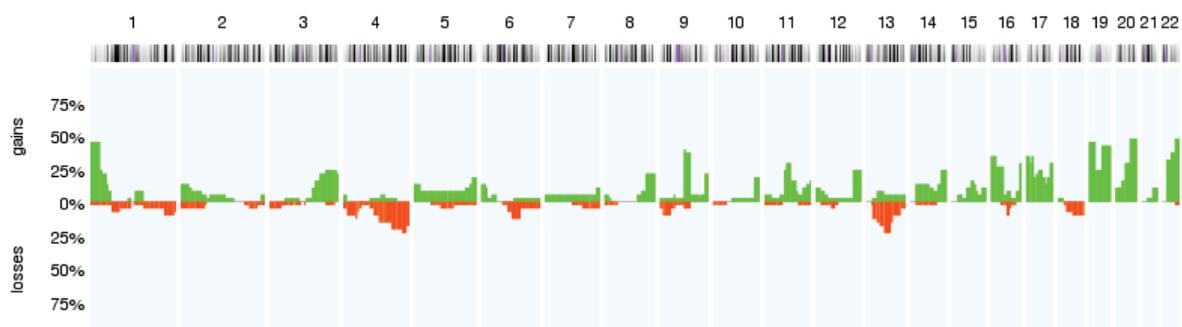


Abb. 14: Kumulativer mCGH-Plot aller analysierten DTCs aus Knochenmark- und Lymphknotengewebeprobe. Der mCGH-Plot repräsentiert die Gesamtheit aller genomischen Aberrationen von 38 DTCs. Horizontale Achse=Chromosomennummer; vertikale Achse=prozentualer Anteil der genomischen Aberrationen; grün=Amplifikation; rot=Deletion.

Im obigen kumulativen mCGH-Plot zeigten sich vor allem Amplifikationen auf Abschnitten der Chromosomen 1p, 2p, 3q, 5, 8q, 9q, 10q, 11q, 12q, 14, 15, 16, 17, 19, 20 und 22. Deletionen befanden sich vorrangig auf Regionen der Chromosomen 4q, 6q, 9p, 13 und 18.

Im nächsten Schritt wurden alle isolierten DTCs aus dem Knochenmark mit denen aus Lymphknotengewebeprobe verglichen (Abb. 15).

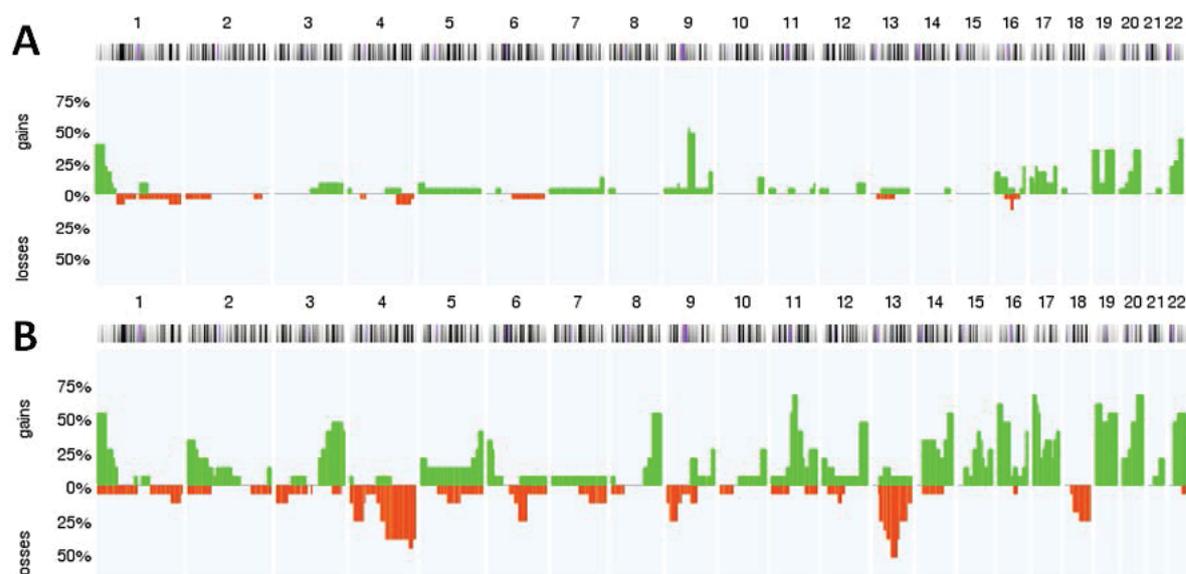


Abb. 15: Kumulative mCGH-Plots von **A)** 23 DTCs aus Lymphknotengewebe (LK) und **B)** 15 DTCs aus dem Knochenmark (KM). Horizontale Achse=Chromosomennummer; vertikale Achse=prozentualer Anteil der genomischen Aberrationen; grün=Amplifikation; rot=Deletion.

Im obigen kumulativen mCGH-Plot der LK-DTCs (Abb. 15A) stellten sich Amplifikationen mit einem prozentualen Anteil von über 25 % auf den Chromosomen 1p, 9q, 19, 20 und 22 dar und gehörten somit zu den häufigeren genomischen Veränderungen. Deletionen traten bei den LK-DTCs nur in geringem prozentualen Maße auf den Chromosomen 1q, 2p, 4q, 6q, 13 und 16q auf.

Bei den analysierten KM-DTCs (Abb. 15B) waren Amplifikationen von über 25% vor allem auf den Chromosomen 1p, 2p, 3q, 5, 8q, 11q, 12q, 14, 15, 16, 17 sowie 19, 20 und 22 zu beobachten. Zu den häufigeren Deletionen mit einem prozentualen Anteil von über 25 % zählten bei den KM-DTCs vor allem DNA-Verluste auf den Chromosomen 4, 6q, 9p, 13 und 18.

Beim Vergleich dieser beiden Kompartiment-bezogenen kumulativen mCGH-Plots wurde deutlich, dass die KM-DTCs mehr genomische Aberrationen als die LK-DTCs aufwiesen.

Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl genomischer Aberrationen bei DTCs aus Lymphknotengewebe und dem Knochenmark stellte sich die Frage, ob diese durch das Kompartiment (LK vs. KM) der DTC-Detektion oder durch den eingesetzten epithelialen Marker (CK vs. EpCAM) erklärt werden konnte. Daher wurden in folgender Abbildung

CK18⁺/EpCAM⁻-DTCs aus den Kompartimenten Lymphknoten und Knochenmark gegenübergestellt (Abb. 16).



Abb. 16: Kumulative mCGH-Plots von **A)** 22 CK⁺/EpCAM⁻-DTCs aus Lymphknotengewebeproben (LK) und **B)** 11 CK⁺/EpCAM⁻-DTCs aus dem Knochenmark (KM). Horizontale Achse=Chromosomennummer; vertikale Achse=prozentualer Anteil der genomischen Aberrationen; grün=Amplifikation; rot=Deletion.

Es fiel auf, dass sich die jeweiligen kumulativen mCGH-Plots aller DTCs aus Lymphknotengewebe (Abb. 15A) und dem Knochenmark (Abb. 15B) fast deckungsgleich mit denen der kumulativen mCGH-Plots der CK⁺/EpCAM⁻-DTCs aus den jeweiligen Kompartimenten (Abb. 16) darstellten. Dies war der Tatsache geschuldet, dass 86,8 % (33/38 DTCs) aller zur Durchführung einer mCGH zur Verfügung gestandenen DTCs CK⁺ und EpCAM⁻ waren.

In der hier vorliegenden Dissertationsarbeit konnte ein Vergleich zwischen CK⁻/EpCAM⁺-DTCs aus den Kompartimenten Knochenmark und Lymphknoten nicht durchgeführt werden. Ursächlich hierfür war, dass CK⁻/EpCAM⁺-DTCs nicht im Knochenmark detektiert werden konnten. Darüber hinaus misslang der Versuch eine CK⁻/EpCAM⁺-DTC aus einer Lymphknotengewebeprobe mit Hilfe eines Mikromanipulators zu isolieren.

Nach Bestimmung der Mittelwerte der Anzahl genomischer Aberrationen bei DTCs aus Knochenmark- und Lymphknotengewebeproben zeigte sich, dass die KM-DTCs mit einer durchschnittlichen Aberrationsanzahl von 15,8 wesentlich mehr genomische Aberrationen als die LK-DTCs (5,4) aufwiesen; dieser Unterschied war hochsignifikant (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0.0002$; Abb. 17).

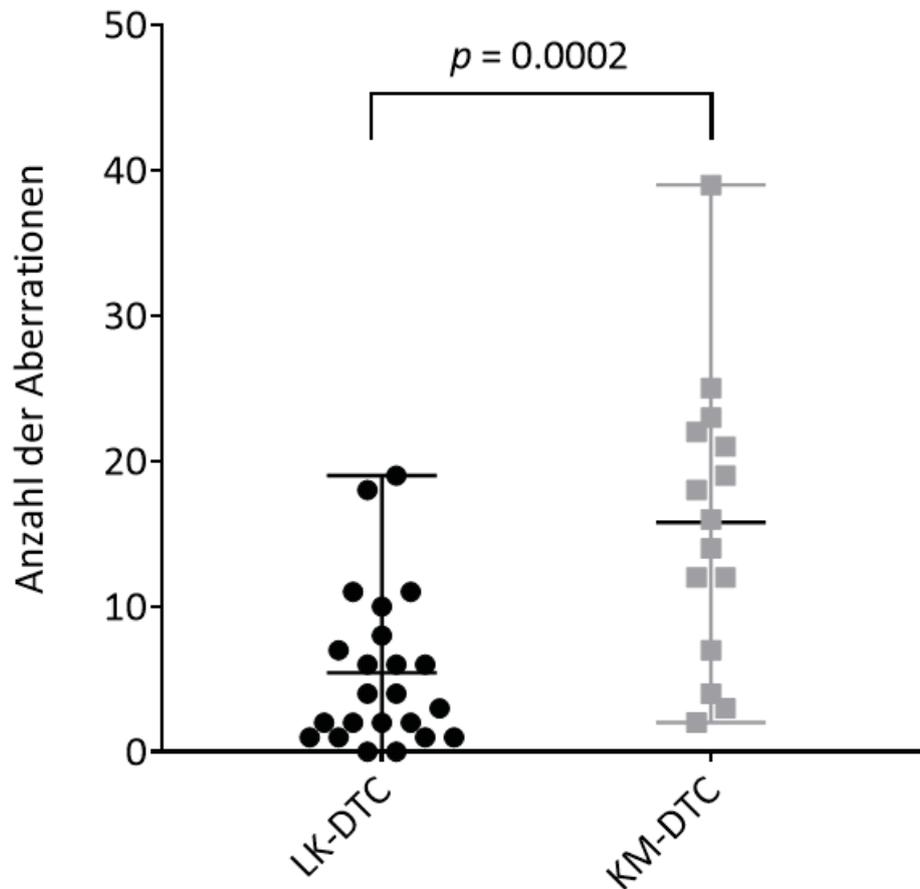


Abb. 17: Anzahl der Aberrationen (Ordinate) bei LK- und KM-DTCs (Abszisse) in einem *Dotplot*- (Streu) Diagramm. KM-DTCs wiesen hochsignifikant (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0.0002$) mehr genomische Aberrationen als LK-DTCs auf. Ein schwarzer Punkt steht für eine LK-DTC und ein graues Quadrat für eine KM-DTC. Die Streubreite wird durch den unteren sowie oberen Querbalken, der Mittelwert durch den mittleren Querbalken angegeben.

Vor diesem Hintergrund ergab sich die Fragestellung, ob sich diese Divergenz der Aberrationsanzahl auch bei Patienten mit mCGH-zugänglichen DTCs sowohl im Lymphknotengewebe als auch im Knochenmark beobachten ließ. Dies wäre somit ein weiterer Indikator für die genetische intratumorale Heterogenität von DTCs. Bei fünf Patienten konnten DTCs im Knochenmark und Lymphknotengewebe detektiert, isoliert und deren DNA erfolgreich amplifiziert werden. Für eine mCGH-Analyse standen zwölf DTCs aus Lymphknotengewebeproben und 15 DTCs aus dem Knochenmark zur Verfügung. Bei den KM-DTCs wurden CK⁺/EpCAM⁻- und CK⁺/EpCAM⁺-DTCs aufgrund der geringen Fallzahl zusammengefasst dargestellt. Die folgende Abbildung gibt die beiden so erstellten kumulativen mCGH-Plots wieder (Abb. 18).

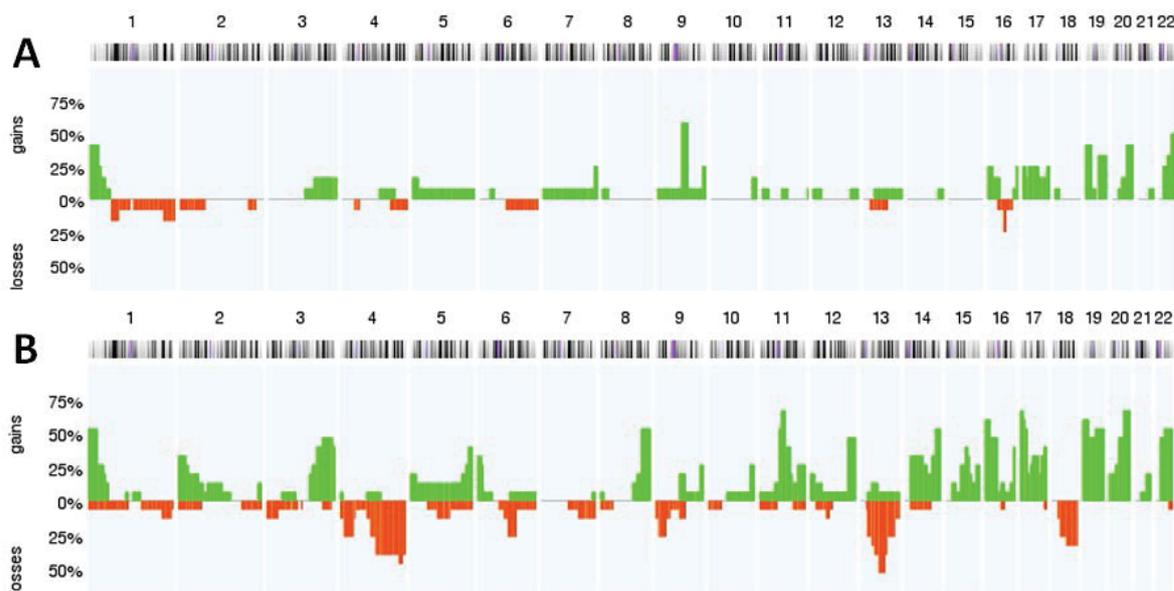


Abb. 18: Kumulative mCGH-Plots der DTCs von fünf Patienten mit sowohl LK- als auch KM-DTCs.

A) 12 CK⁺/EpCAM⁻-DTCs aus Lymphknotengewebe und **B)** 15 CK⁺/EpCAM⁻- und CK⁺/EpCAM⁺-DTCs aus dem Knochenmark. Horizontale Achse=Chromosomnummer; vertikale Achse=prozentualer Anteil der genomischen Aberrationen; grün=Amplifikation; rot=Deletion.

Ein repräsentativer Vergleich war aufgrund der geringen Fallzahl nur eingeschränkt möglich, jedoch ließ sich anhand der obigen kumulativen mCGH-Plots feststellen, dass auch innerhalb eines Patienten DTCs aus dem Knochenmark signifikant (Mann-Whitney-*U*-Test: $p = 0.0105$) mehr genomische Aberrationen im Vergleich zu DTCs aus dem Lymphknotengewebe aufwiesen (Abb. 19).

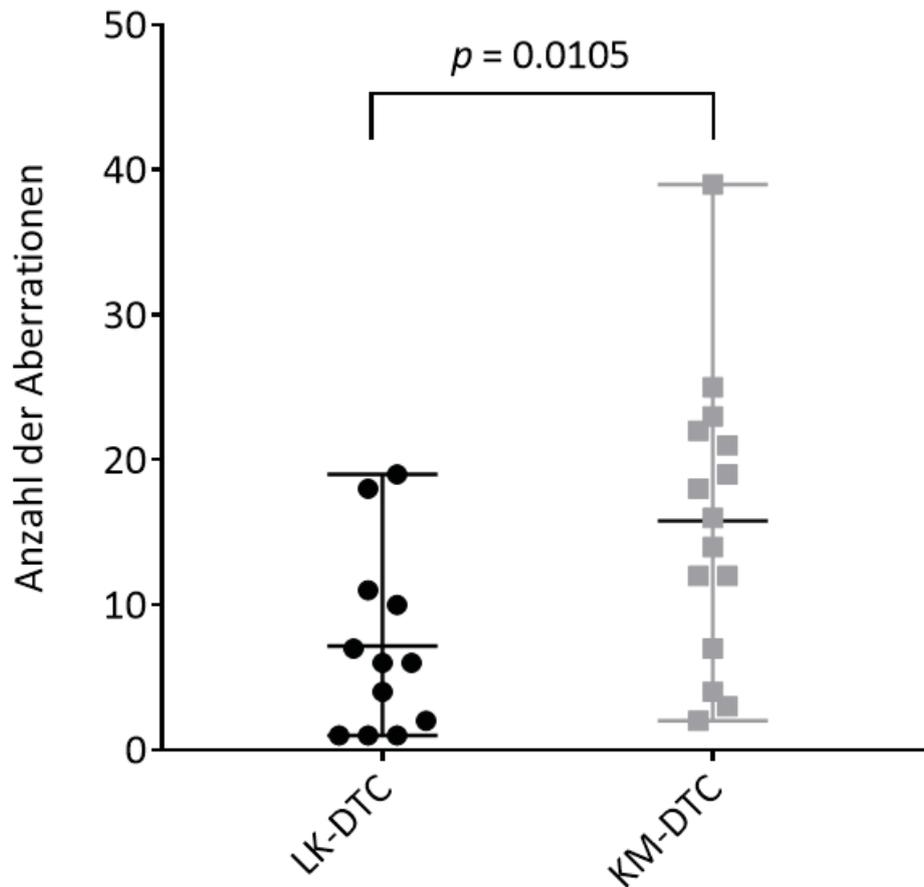


Abb. 19: Anzahl der Aberrationen (Ordinate) bei DTCs von fünf Patienten mit sowohl LK- als auch KM-DTCs (Abszisse) in einem *Dotplot*- (Streu) Diagramm. KM-DTCs wiesen signifikant (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0.0105$) mehr genomische Aberrationen als LK-DTCs auf. Ein schwarzer Punkt steht für eine LK-DTC und ein graues Quadrat für eine KM-DTC. Die Streubreite wird durch den unteren sowie oberen Querbalken, der Mittelwert durch den mittleren Querbalken angegeben.

4.9 Chromosomale Aberrationen bei DTCs in HNSCC-Patienten

Die folgende Tabelle zeigt die mittels mCGH ermittelten „häufig“ Amplifikationen und Deletionen bei 36 disseminierten Tumorzellen aus Lymphknotengewebeproben und dem Knochenmark (Tabelle 4). Das Merkmal „häufig“ wurde hier als eine Aberrationsfrequenz von $\geq 20\%$ definiert. Bei den DTCs aus Lymphknotengewebeproben wurden keine DNA-Verluste mit einer Aberrationsfrequenz von $\geq 20\%$ beobachtet.

Tabelle 4: mCGH-Aberrationen mit einer Frequenz von ≥ 20 % bei DTCs. Darstellung von „häufigen“ (≥ 20 %) chromosomalen Aberrationen, die durch die mCGH bei 36 disseminierten Tumorzellen (DTCs) aus Lymphknotengewebe (LK) und dem Knochenmark (KM) festgestellt wurden.

mCGH-Aberrationen mit einer Frequenz von ≥ 20 %			
Amplifikationen DTCs KM	Amplifikationen DTCs LK	Deletionen DTCs KM	Deletionen DTCs LK
1pterp33	1pterp35	4p15p14	-
2pterp16	9q13q21	4q22qter	
3q21qter	16q24	6q15q21	
5p15	17p11	9p23p21	
5q33qter	17q25	13q12q32	
6p25p23	19p13	18q12qter	
8q23q24	19q13		
9q34	20q13		
10q26	22q		
11q13			
12p13			
12q24			
14			
15q21q24			
15q26			
16p13p11			
16q24			
17			
19			
20			
22q			

4.10 Prognostische Bedeutung der klinisch-pathologischen Parameter sowie der Anwesenheit von DTCs für das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten

Anhand von Kaplan-Meier-Stufenkurven wurde der Einfluss der Primärtumorgröße (T-Kategorie), des Lymphknotenstatus (N-Kategorie) sowie der Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen (DTCs) auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten dargestellt.

Zunächst wurden in einer Überlebensanalyse Patienten mit einem histopathologisch gesicherten Primärtumor der T0-, T1- oder T2-Kategorie Patienten mit einem histopathologisch gesicherten Primärtumor der T3- oder T4-Kategorie gegenübergestellt (Abb. 20A). Hierbei zeigte sich, dass Patienten mit Primärtumoren der Kategorie T3 oder T4 eine hochsignifikant kürzere Überlebensdauer aufwiesen (Log-rang-Test: $p = 0.004$).

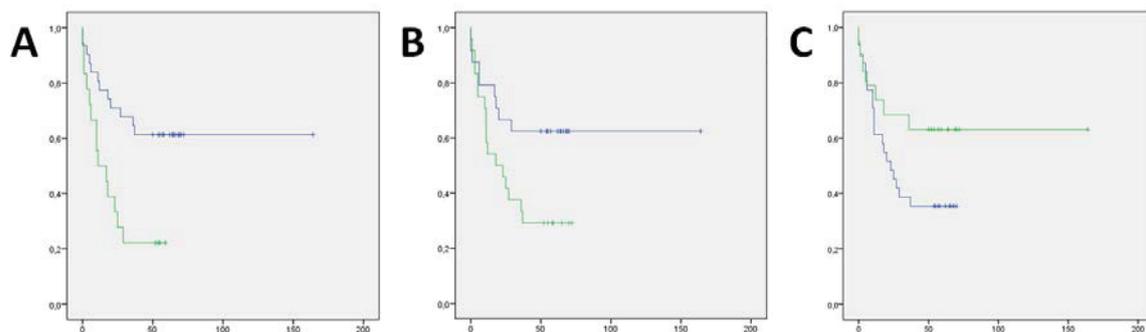


Abb. 20: Einfluss der T- und N-Kategorie sowie der Anwesenheit von DTCs auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten. A) Einfluss der T-Kategorie. In die Überlebensanalyse wurden 49 Patienten einbezogen: 31 Patienten der Subgruppe T0, T1 und T2 (blaue Linie) und 18 Patienten der Subgruppe T3 und T4 (grüne Linie). Ein Patient wurde von der Auswertung ausgeschlossen, da aufgrund eines stark fragmentierten Gewebes histopathologisch keine eindeutige Zuordnung in eine T-Kategorie erfolgen konnte (pTX). Patienten mit Primärtumoren der Kategorie T3 und T4 wiesen eine hochsignifikant kürzere Überlebensdauer auf (Log-rang-Test: $p = 0.004$). **B)** Einfluss der N-Kategorie. In die Überlebensanalyse wurden 48 Patienten einbezogen: 24 Patienten der Subgruppe N0 (blaue Linie) und 24 Patienten der Subgruppe N1, N2 und N3 (grüne Linie). Zwei Patienten wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da diese eine diagnostische/therapeutische Lymphknotenexstirpation ablehnten (cNX). Patienten mit histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen wiesen eine signifikant kürzere Überlebensdauer auf (Log-rang-Test: $p = 0.035$). **C)** Einfluss der Anwesenheit von DTCs im Knochenmark u./o. Lymphknotengewebe. In die Überlebensanalyse wurden 50 Patienten einbezogen: 30 Patienten ohne DTCs im Knochenmark u./o. Lymphknotengewebe (blaue Linie) und 20 Patienten mit DTCs im Knochenmark u./o. Lymphknotengewebe (grüne Linie). Bei Patienten mit DTCs zeigte sich der Trend für ein längeres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten ohne DTCs (Log-rang-Test: $p = 0.092$). Abszisse=Überlebensdauer in Monaten; Ordinate=kumulatives Gesamtüberleben.

Im nächsten Schritt wurden Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0-Kategorie) Patienten mit Lymphknotenmetastasen (N1-, N2- oder N3-Kategorie) gegenübergestellt (Abb. 20B). Es zeigte sich, dass Patienten mit histopathologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen ein signifikant (Log-rang-Test: $p = 0.035$) kürzeres Gesamtüberleben aufwiesen als Patienten ohne nodale Metastasen.

Anschließend wurde der Einfluss der Anwesenheit von DTCs auf das Gesamtüberleben der Patienten analysiert. Es wurden DTC⁺-Patienten mit mindestens einer CK⁺- u./o. EpCAM⁺-DTC im Knochenmark u./o. Lymphknotengewebe als gemeinsame Gruppe definiert und den DTC⁻-Patienten gegenübergestellt (Abb. 20C). Bei dem Vergleich dieser beiden Patientengruppen zeigte sich der Trend, dass DTC⁺-Patienten länger überlebten als DTC⁻-Patienten; der Unterschied im Gesamtüberleben war jedoch nicht signifikant (Log-rang-Test: $p = 0.092$).

Abschließend wurde untersucht, ob dieses Ergebnis auf das Gesamtüberleben der Patienten auch bei einer getrennten Analyse der Kompartimente (LK vs. KM) beobachtet werden konnte. Hierzu wurde das Gesamtüberleben der Patienten mit DTCs im Knochenmark mit dem Gesamtüberleben der Patienten ohne DTCs im Knochenmark verglichen. Patienten mit DTCs im Knochenmark starben früher als Patienten ohne KM-DTCs. Es konnte jedoch kein signifikanter (Log-rang-Test: $p = 0.865$) Unterschied im Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Ferner wurde das Gesamtüberleben der Patienten mit DTCs in Lymphknotengewebe mit dem Gesamtüberleben der Patienten ohne DTCs in Lymphknotengewebe verglichen. Es zeigte sich hier der Trend, dass Patienten mit DTCs im Lymphknotengewebe länger überlebten als Patienten ohne LK-DTCs. Auch dieser Unterschied im Gesamtüberleben war nicht signifikant (Log-rang-Test: $p = 0.161$).

4.11 Hierarchische Ähnlichkeitsanalysen (*Cluster*) von DTCs aus

Knochenmark und Lymphknoten anhand von chromosomalen

Aberrationen

In dieser Dissertationsarbeit wurden hierarchische Ähnlichkeitsanalysen mit Hilfe des Programmes Progenetix und der Eisen-*Software* durchgeführt, die die klonale Verwandtschaft von disseminierten Tumorzellen (DTCs) aus den beiden Kompartimenten

Knochenmark und Lymphknoten untersuchten. Die Ähnlichkeiten genomischer Veränderungen wurden dabei durch ihre unmittelbare Nähe im Dendrogramm dargestellt.

Die folgende Abbildung zeigt die Dendrogramme der durchgeführten Ähnlichkeitsanalysen (*Cluster*; Abb. 21).

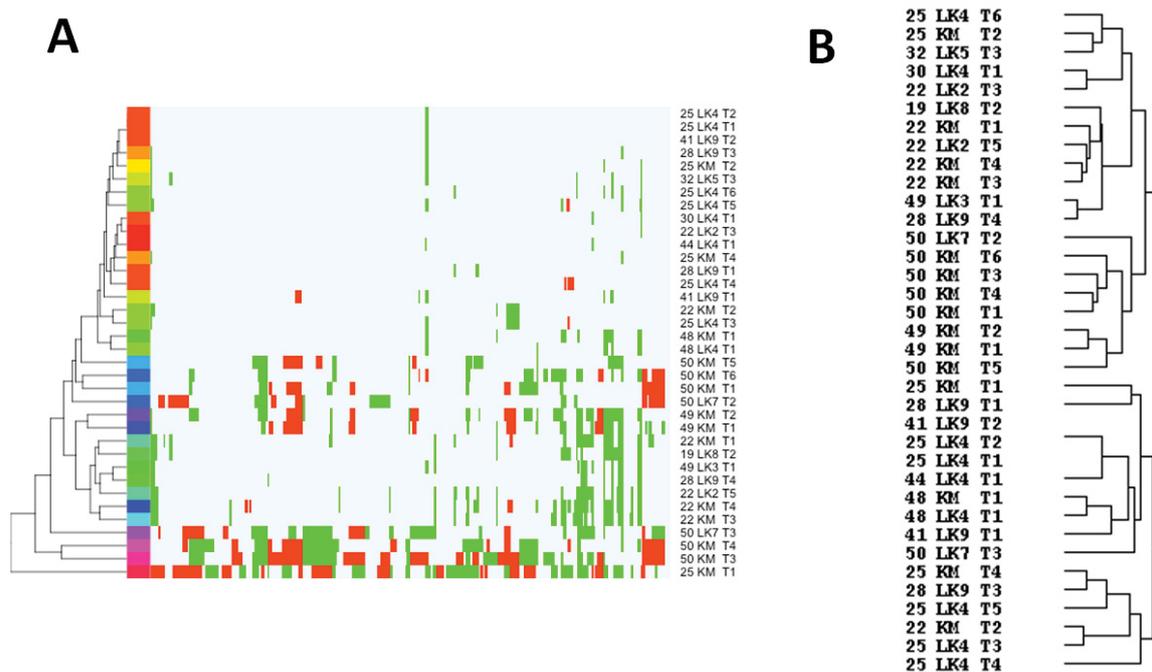


Abb. 21: Dendrogramme der Ähnlichkeitsanalysen aller disseminierten Tumorzellen (DTCs) aus Knochenmark und Lymphknoten mit Hilfe des Programmes Progenetix und der Eisen-Software. A) Bei dem mit Hilfe des Programmes Progenetix erstellten Dendrogramm befinden sich auf der horizontalen Achse in aufsteigender Reihenfolge die Chromosomen (keine visuelle Durchnummerierung). Auf der rechten vertikalen Achse ist die jeweilige DTC dargestellt. Auf der linken vertikalen Achse befindet sich das Dendrogramm. Grüne Kästchen markieren farblich Amplifikationen und rote Kästchen Deletionen. **B)** Bei dem mit Hilfe der Eisen-Software erstellten Dendrogramm wurden ähnliche genomische Veränderungen durch ihre unmittelbare Nähe zueinander im Dendrogramm visualisiert.

Die erste Zahl der Probennummer entspricht der Patientennummer; LK=Lymphknoten mit dazugehöriger Durchnummerierung; KM=Knochenmark; T=Tumorzelle mit dazugehöriger Durchnummerierung.

Zusammenfassend fiel bei der Betrachtung der Dendrogramme der Ähnlichkeitsanalysen von DTCs aus dem Knochenmark und Lymphknotengewebe auf, dass DTCs aus demselben Kompartiment eines Patienten tendenziell gemeinsam gruppiert werden konnten. Auch DTCs aus dem Knochenmark und Lymphknotengewebe desselben Patienten ließen eine klonale Verwandtschaft erkennen (intratumorale Homogenität) und wiesen tendenziell eine stärkere genetische Verwandtschaft auf als zu DTCs eines anderen Patienten (intertumorale Heterogenität).

5 Diskussion

Die schlechte Prognose bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) ist meist dem Vorliegen fortgeschrittener Tumorstadien bei Erstdiagnose und den sich nach Jahren entwickelnden Rezidiven und Metastasen geschuldet. Das von Califano *et al.* im Jahr 1996 entwickelte Modell zur Karzinogenese beim HNSCC beschreibt mit Hilfe von sog. *loss of heterozygosity* (LOH)-Analysen eine lineare Tumorprogression durch die Akkumulation von genetischen Veränderungen. Califano und Kollegen gehen in ihrem Modell davon aus, dass der Prozess der Tumorentstehung als mehrschrittige Abfolge von initialer Zellhyperplasie zur Zelldysplasie bis hin zum Carcinoma *in situ* und letztlich zum manifesten invasiven Karzinom auf der Basis von multiplen genetischen Aberrationen verstanden werden muss. Dieses lineare genetische Tumorprogressionsmodell für das HNSCC wird heute noch als Grundlage zur Erklärung der Karzinogenese beim HNSCC herangezogen und weiterentwickelt (u.a. Argiris *et al.*, 2008). In diesem Modell wird der Prozess der Metastasierung als letzter Schritt des Tumorprogresses aufgefasst. Dieses Modell impliziert somit zwangsläufig, dass Primärtumor, DTCs und Metastase(n) sehr ähnliche genetische Veränderungen aufweisen müssen. Mit der Entwicklung der modernen hochauflösenden genetischen Einzelzell-Analyse ergab sich eine kritische Auseinandersetzung mit dem linearen Tumorprogressionsmodell. Hierbei zeigte sich, da DTCs den Primärtumor bereits sehr früh verlassen können, dass sich DTCs, Metastase(n) und der Primärtumor genetisch stark unterscheiden können (intratumorale Heterogenität). Es sollte daher eher von einem parallelen Tumorprogressionsmodell ausgegangen werden. Auch neuere Studienergebnisse stützen die Beobachtung einer frühen und häufigen okkulten Tumorzell-disseminierung beim HNSCC (Sproll *et al.*, 2017). In dem jeweiligen metastatischen Zielorgan können sich diese disseminierten Tumorzellen unabhängig vom Primärtumor genetisch weiter entwickeln und damit eine genetische Heterogenität zum Primärtumor ausbilden (Stoecklein und Klein, 2010).

Dadurch erhält die direkte genetische Analyse von DTCs einen besonderen Stellenwert, um ein tieferes Verständnis über die molekularen Mechanismen der Tumorzell-disseminierung und Metastasierung beim HNSCC zu erlangen. Beispielsweise können bestimmte genetische Aberrationen Genabschnitte für Zellwachstum und -differenzierung betreffen, andere genetische Aberrationen betreffen wiederum

disseminierungsrelevante Genloci. Dies erklärt, warum das genetische *profiling* zunehmend in das wissenschaftliche Interesse gerückt ist. Denn unter Berücksichtigung der jeweiligen Tumorbiologie könnte so eine zielgerichtete molekulare *anti-target*-Therapie im Rahmen eines interdisziplinären Therapieregimes eingesetzt werden, um so zu einer Verbesserung der Überlebensprognose von HNSCC-Patienten zu führen.

Zellen, die in den mesenchymalen Indikatororganen Knochenmark und Lymphknoten epitheliale Proteine an ihrer Zelloberfläche exprimieren, stellen wahrscheinlich einzelne disseminierte Tumorzellen dar, die als ein Ausgangspunkt für die sog. minimale Resterkrankung (MRD) angesehen werden können und somit für die schlechte Überlebensprognose von HNSCC-Patienten mitverantwortlich sind.

In dieser Dissertationsarbeit wurde zur Detektion von DTCs im Knochenmark und Lymphknotengewebe eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen den epithelialen Marker Zytokeratin 18 (CK18) und gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül CD326 (EpCAM) durchgeführt. Es wurden hierdurch bei 45 % der hier untersuchten HNSCC-Patienten DTCs in Lymphknotengewebeproben detektiert. Es konnten jedoch nur bei 17,8 % der HNSCC-Patienten DTCs im Knochenmark gefunden werden. Die detektierten DTCs aus Knochenmark- und Lymphknotengewebeproben wiesen überwiegend eine CK18-Positivität und EpCAM-Negativität auf.

In der Publikation von Alexander *et al.* (2013) wurden meine Ergebnisse bzgl. des Zytokeratin 18- und EpCAM-Expressionsverhaltens von DTCs im Knochenmark und Lymphknotengewebe mit der Detektionsrate von DTCs durch den Einsatz anderer Marker verglichen. Hierzu nutzten Alexander und Kollegen die Marker CK5/14 und CD44v6. Als Ergebnis zeigte sich, dass durch den Einsatz der letztgenannten Marker die Detektionsrate von DTC⁺-Patienten fast doppelt so hoch war wie die der Patienten, bei denen eine CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung durchgeführt worden war. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die Detektionsrate von DTCs abhängig von den eingesetzten Markern ist.

Im Rahmen des Vergleichs der Detektionsraten von DTCs mittels der CK18-EpCAM-Doppelimmunfluoreszenzfärbung fiel auf, dass lediglich bei vier von 40 Patienten EpCAM⁺-DTCs im Lymphknotengewebe und nur bei einem von 45 Patienten EpCAM⁺-DTCs im Knochenmark detektiert worden waren. Grundsätzlich lässt sich EpCAM als

transmembranäres Glykoprotein auf der Zelloberfläche fast aller stark proliferierenden Epithelien nachweisen. Normalerweise sind Plattenepithelien EpCAM negativ. In Plattenepithelkarzinomen besitzen jedoch die normalerweise EpCAM-negativen Plattenepithelzellen die Fähigkeit, eine *de novo* EpCAM-Expression zu leisten (Litvinov *et al.*, 1996; Fix 2005). Da EpCAM auf der Zelloberfläche aller Karzinome exprimiert wird, prägten Roovers *et al.* (1998) den Ausdruck eines sog. pan-Karzinom-Antigens. Ausgehend von der Beschreibung in der Literatur EpCAMs als ein pan-Karzinom-Antigen könnte man ebenso eine hohe EpCAM-Positivität bei DTCs von HNSCC-Patienten vermuten. In diesem Zusammenhang stellte sich bei der Auswertung meiner Ergebnisse die Frage, warum EpCAM auf den hier detektierten DTCs, deren Ursprung ein epithelialer Primärtumor war, nur gering exprimiert wurde. 2001 untersuchte die Arbeitsgruppe von Takes *et al.* bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor die Expression von verschiedenen genetischen Markern in nodalen Metastasen verglichen mit dem Primärtumor. In dieser Studie konnte eine verminderte Expression von EpCAM in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Primärtumorgewebe gefunden werden. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass EpCAM eine relevante Funktion im Schritt der lymphogenen Metastasierung einnimmt. EpCAM vermittelt als Zelladhäsionsmolekül u.a. Zell-zu-Zell-Kontakte und ein Verlust dieser Funktion kann einen Übergang vom epithelialen in den mesenchymalen Zustand auslösen. Dieser Vorgang wird auch als epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet (Nguyen *et al.*, 2013). Ein solcher Funktionsverlust EpCAMs kann somit eine Disseminierung von einzelnen Tumorzellen aus dem Primärtumor begünstigen (Wang *et al.*, 2017). Darüber hinaus konnten Rao *et al.* (2005) zeigen, dass die Expression von EpCAM auf der Zelloberfläche zirkulierender Tumorzellen im Blut bedeutend schwächer ist im Vergleich zu Zellen aus dem Primärtumorgewebe. Die oben genannten Beobachtungen könnten somit einen Erklärungsansatz darstellen, warum bei meinen detektierten DTCs nur in geringem prozentualen Maße eine Positivität für den Marker EpCAM gefunden wurde.

Nach Detektion und erfolgreicher Isolierung einer okkult gestreuten Tumoreinzelzelle epithelialen Ursprungs aus den mesenchymalen Kompartimenten Knochenmark und Lymphknoten bedarf es einer verlässlichen Amplifikationsmethode des gesamten Genoms einer DTC, da die DNA-Gesamtmenge eines einzelnen Genoms nur ca. 6 pg beträgt (Morton, 1991). Die hier eingesetzte *MseI*-Adapter-*Linker*-PCR ermöglicht eine

homogene und globale Amplifikation des Genoms einer einzelnen Zelle (Klein *et al.*, 1999). Der somit für jede DTC hergestellte DNA-Pool dient als Ausgangsmaterial zur Durchführung einer Metaphasen-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (mCGH). Diese seit 1992 (Kallioniemi *et al.*) verfügbare Methode ermöglicht eine molekularzytogenetische Untersuchung des gesamten Genoms auf chromosomale Aberrationen hin. Durch die direkte genetische Analyse von DTCs in den metastasenrelevanten *homing organs* (Bleijerveld *et al.*, 2011) Knochenmark und Lymphknoten besteht die Möglichkeit disseminierungs- und metastasierungsrelevante chromosomale Aberrationen zu identifizieren. Insgesamt wiesen 36 DTCs aus Lymphknotengewebeproben und dem Knochenmark im Rahmen einer mCGH genetische Aberrationen auf. Die DTCs aus dem Knochenmark wiesen hochsignifikant (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0.0002$) mehr genomische Aberrationen (Mittelwert: 15,8) als DTCs aus dem Lymphknotengewebe (Mittelwert: 5,4) auf.

Die Tabelle 4 (siehe Abschnitt 4.9) zeigt die mittels mCGH ermittelten „häufigen“ (hier definiert als eine Aberrationsfrequenz $\geq 20\%$) Amplifikationen und Deletionen bei meinen DTCs aus Lymphknotengewebe und dem Knochenmark. Patmore *et al.* (2005) fassten in ihrer Übersichtsarbeit die zahlreichen identifizierten chromosomalen Aberrationen anderer internationaler Studiengruppen zusammen, die bei HNSCC-Patienten mit Hilfe von CGH-Untersuchungen festgestellt worden waren. In der Literatur werden oft chromosomale Überrepräsentierungen, die mit einem primären HNSCC assoziiert sein können, auf den Chromosomenabschnitten 5q, 7q, 8q, 11q und 20 beschrieben (u.a. Jin *et al.*, 2005). So wiesen 28,9 % aller in dieser Dissertationsarbeit mittels mCGH analysierten KM- und LK-DTCs eine Amplifikation auf dem Chromosomenabschnitt 11q13 auf. In dieser Region befindet sich das *CCND1*-Gen, dessen Genprodukt das Protein Cyclin D1 ist und in 30-60 % der HNSCC-Fälle amplifiziert ist. Die Amplifikation dieses chromosomalen Abschnittes ist mit einem aggressiveren Tumorverhalten und somit mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden (Berenson *et al.*, 1989; Volling *et al.*, 1993; Kyomoto *et al.*, 1993; Callender *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995; Michalaidis *et al.*, 1997). Neben dem am häufigsten betroffenen Onkogen *CCND1* liegen auf Chromosom 11q13 zwei Gene, die die Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) 3 und 4 kodieren und im Falle einer Amplifikation dieser chromosomalen Region ebenso vermehrt exprimiert werden können. Die genaue Rolle von FGF im Rahmen der HNSCC-

Tumorprogression ist bis heute nicht abschließend geklärt. FGF sind an Prozessen der Zellproliferation, -migration und -differenzierung beteiligt.

Die Disseminierung von einzelnen Tumorzellen aus einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches in mesenchymale Kompartimente wie Lymphknoten oder das Knochenmark verlangt einen komplexen Wechsel von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp dieser DTCs (EMT). An diesen Prozessen sind Wachstumsfaktoren beteiligt, zu denen auch Fibroblastenwachstumsfaktoren gehören, die nach erfolgter Rezeptorbindung multiple zelluläre Signalwege beeinflussen.

In dieser Dissertationsarbeit konnte bei 53,3 % der detektierten KM-DTCs mittels mCGH eine Amplifikation des Chromosomenabschnittes 8q24 gefunden werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen in der Literatur (Patmore *et al.*, 2005). In dieser chromosomalen Region liegt das Gen *MYC*, welches für den Transkriptionsfaktor C-myc kodiert (zelluläres myc, humane Variante). In seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor reguliert C-myc ca. 15 % der menschlichen Gene und induziert die Transkription proliferationsfördernder Gene. Eine amplifizierte Version von *MYC* führt somit zu einer unregulierten und permanenten Expression von vielen Genen, die eine Rolle bei Zellproliferationsprozessen spielen. In seiner Funktion als Zellzyklus-Kontrollgen kann *MYC* durch diese verstärkte Expression als ein Protoonkogen fungieren und gibt den Zellen einen Wachstumsvorteil (Nilsson *et al.*, 2003).

In vielen Studien sind des Weiteren häufig genetische Veränderungen des Chromosoms 3 beschrieben. Diese Beobachtung deckt sich mit meinem Ergebnis. So gehörten die auf diesem Chromosom festgestellten Amplifikationen mit 46,7 % zu den „häufigen“ DNA-Überrepräsentierungen bei den KM-DTCs. LK-DTCs zeigten hier eine Amplifikation in nur 8,7 % der Fälle. Patmore *et al.* (2005) verwiesen in ihrer Übersichtsarbeit u.a. auf die Ergebnisse von Speicher *et al.* (1995), welche in 77 % der Fälle eine DNA-Überrepräsentierung im Bereich von Chromosom 3q mit betont vorrangiger Amplifikation des Abschnittes 3q26qter bei HNSCC-Primärtumoren beobachtet hatten. Auf dem Chromosomenabschnitt 3q26 befindet sich ein Gen, dessen Produkte eine wichtige Rolle im PI3K-AKT-Signalweg spielen. Dabei sind diese Genprodukte an wichtigen Prozessen von Zellwachstum, -proliferation, -motilität sowie an Apoptose-Vorgängen beteiligt. Auch Kozaki *et al.* (2006) beschrieben in ihrer Arbeit Amplifikationen des für die

Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase mit der katalytischen *subunit alpha* kodierenden Gens (*PIK3CA*) bei HNSCC-Patienten.

Ferner zählten bei meinen KM-DTCs Amplifikationen auf dem Chromosomenabschnitt 17q22 mit 33,3 % der Fälle zu den „häufigen“ genomischen Aberrationen im Vergleich zu den LK-DTCs mit nur 8,7 % der Fälle. Auf diesem Chromosomenabschnitt ist das Gen *RAD51C* lokalisiert, welches eine entscheidende Rolle bei Doppelstrangreparaturmechanismen der DNA spielt (Chen *et al.*, 1999). Im Jahr 2010 wurde das *RAD51C*-Gen als ein weiteres Hochrisikogen identifiziert, das neben den bekannten Hochrisikogenen *BRCA1* und *BRCA2* (*BReast CAncer*-Gene) verantwortlich für die Entstehung eines Mamma- oder Ovarialkarzinoms ist (Meindl *et al.*, 2010). Neuen Studienergebnissen zufolge scheinen auch Amplifikationen des *RAD51C*-Gens ein genetisches Risikoprofil, an einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches zu erkranken, darzustellen (Scheckenbach *et al.*, 2014).

Eine Verschlechterung der Prognose in frühen HNSCC-Stadien wurde auch bei Auftreten von DNA-Verlusten im Chromosomenbereich 3p14 aufgrund einer damit einhergehenden Lymphknotenmetastasierung beobachtet (Joo *et al.*, 2013). Auf diesem Chromosomenabschnitt können Chromosomenbrüche durch eine chronische Karzinogenexposition verursacht werden (Glover *et al.*, 1988). In Kopf-Hals-Karzinomen wurden häufig genetische Veränderungen auf diesem „empfindlichen“ Genomabschnitt liegenden *Fragile Histidine Triad*-Tumorsuppressorgens (*FHIT*) beschrieben (Virgilio *et al.*, 1996). Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit konnten Deletionen in dieser Chromosomenregion nicht als „häufiges“ Ereignis bei den DTCs identifiziert werden, da zum einen keine Deletionen auf dem Chromosomenabschnitt 3p14 bei den DTCs aus Lymphknotengewebe beobachtet werden konnten und zum anderen nur eine disseminierte Tumorzelle aus dem Knochenmark in dieser chromosomalen Region einen DNA-Verlust zeigte.

Zu den „häufigen“ Deletionen bei den KM-DTCs zählten 9p21-Deletionen. So zeigten 26,7 % der KM-DTCs Deletionen auf diesem Chromosomenabschnitt. Im Unterschied dazu waren solche Deletionen nur bei 4,3 % der hier untersuchten LK-DTCs zu beobachten. In der Literatur werden Deletionen in dieser chromosomalen Region ebenfalls als eine weitere häufig gefundene chromosomale Aberration beim HNSCC beschrieben (van der

Riet *et al.*, 1994; Chang und Califano, 2008). Auf diesem Chromosomenabschnitt befindet sich das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* (p16/INK4A). p16 selbst wird von dem Tumorsuppressorgen *CDKN2A* kodiert und wird auch als INK4 (Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 4) bezeichnet. p16 inhibiert die Cyclin-abhängigen Kinasen wie z.B. CDK4 und CDK6 (*cyclin-dependent kinase 4* bzw. 6), die wiederum von Cyclin D1 aktiviert werden. Diese Kinasen phosphorylieren das Retinoblastom-Protein (pRb), welches in ruhenden Zellen in einem nicht-phosphorylierten Zustand vorliegt. Die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins bedeutet einen unkontrollierten Wechsel des Zellzyklus von der G1- (*gap*=Lücke; Phase, in der die Zelle sich auf die DNA-Synthese vorbereitet) zur S-Phase (DNA-Synthese-Phase). In diesem Zusammenhang wird das komplexe Zusammenspiel des Cyclin D1-CDK4/6-p16-pRb-Signalweges im Rahmen der Karzinogenese deutlich. So führen eine Amplifikation des Chromosomenabschnittes 11q13 mit einer Aktivierung von Cyclin D1 sowie eine Deletion des Chromosomenabschnittes 9p21 mit einer Inaktivierung von p16 zu einem unkontrollierten Stimulus für Zellwachstum und -proliferation mit der Folge eines stetigen Tumorprogresses.

Darüber hinaus konnte ich Deletionen auf dem Chromosomenarm 13q bei den KM-DTCs als „häufiges“ Ereignis beobachten. Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit der Literatur, in der häufig 13q-Deletionen bei Kopf-Hals-Karzinomen beschrieben wurden. Insbesondere wurden Verluste auf dem Chromosomenabschnitt 13q14 beobachtet (Yoo *et al.*, 1994; Maestro *et al.*, 1996). So zeigten 26,7 % der KM-DTCs in den Regionen 13q12q14, 13q21q22 und 13q31q32 DNA-Verluste. Die LK-DTCs wiesen hingegen nur in 4,3 % der Fälle Deletionen in den v.g. Chromosomenregionen auf. 13q-Verluste werden als ein wichtiges genetisches Ereignis in der Progression von der Dysplasie zum Carcinoma *in situ* angesehen. Verschiedene Arbeitsgruppen (u.a. Stembalska *et al.*, 2006) vermuten hier ein weiteres relevantes Tumorsuppressorgen.

In den durchgeführten Ähnlichkeitsanalysen (*Cluster*) von allen disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark und Lymphknotengewebe konnten DTCs aus demselben Kompartiment eines Patienten tendenziell gemeinsam gruppiert werden. Auch DTCs aus dem Knochenmark und Lymphknotengewebe desselben Patienten ließen untereinander eine klonale Verwandtschaft erkennen. Insgesamt fiel bei der Betrachtung

der Dendrogramme der Ähnlichkeitsanalysen auf, dass DTCs eines Patienten tendenziell eine stärkere genetische Verwandtschaft aufwiesen (intratumorale Homogenität) als zu DTCs eines anderen Patienten (intertumorale Heterogenität).

Die Analyse des Einflusses der klinisch-pathologischen Parameter auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten mittels Kaplan-Meier-Stufenkurven ergab, dass Patienten mit einem histopathologisch gesicherten Primärtumor der T3- oder T4-Kategorie hochsignifikant (Log-rang-Test: $p = 0.004$) früher starben als HNSCC-Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der T0-, T1- oder T2-Kategorie. Auch starben HNSCC-Patienten mit einer lokoregionären nodalen Metastasierung signifikant (Log-rang-Test: $p = 0.035$) früher als Patienten ohne nodale Metastasen. Diese Beobachtung deckt sich mit der zu erwartenden Prognose im Hinblick auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der betroffenen HNSCC-Patienten. Auch die Auswirkung der Anwesenheit von DTCs im Knochenmark u./o. Lymphknotengewebe auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten wurde anhand von Kaplan-Meier-Stufenkurven untersucht. Es zeigte sich der Trend, dass DTC-positive HNSCC-Patienten sogar länger überlebten als DTC-negative Patienten. Es konnte hierbei jedoch kein signifikanter (Log-rang-Test: $p = 0.092$) Unterschied im Gesamtüberleben festgestellt werden. Zur Klärung, ob diese bemerkenswerte Beobachtung für jedes Kompartiment auch im Einzelnen zutrifft, erfolgte im nächsten Schritt die Analyse des Einflusses der Anwesenheit von DTCs im jeweiligen Kompartiment auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten. Bei der differenzierten Analyse zeigte sich anhand von Kaplan-Meier-Stufenkurven, dass HNSCC-Patienten mit DTCs im Knochenmark früher starben als Patienten ohne KM-DTCs. Ein signifikanter (Log-rang-Test: $p = 0.865$) Unterschied im Gesamtüberleben konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Bei der Analyse des Gesamtüberlebens der HNSCC-Patienten mit DTCs im Lymphknoten zeigte sich jedoch der Trend, dass Patienten mit LK-DTCs länger überlebten als Patienten ohne LK-DTCs. Es ließ sich auch hier kein statistisch signifikanter (Log-rang-Test: $p = 0.161$) Unterschied im Gesamtüberleben feststellen. Ein möglicher Erklärungsversuch für diese Beobachtung könnte sein, dass es sich bei einem Teil der wenig aberranten DTCs in den Lymphknotengewebeproben um fibroblastische Retikulumzellen handelte (Franke *et al.*, 1987), die mittels des eingesetzten Markers Zytokeratin 18 im Rahmen der Doppelimmunfluoreszenzfärbung detektiert wurden. Seltene mesenchymale Zellen, wie fibroblastische Retikulumzellen, können die

Zytokeratine 8 und 18 exprimieren, die normalerweise in einfachem einschichtigem Epithel vorkommen (Moll *et al.*, 2008). Aufgrund der Fähigkeit Zytokeratine zu exprimieren werden diese fibroblastischen Retikulumzellen auch Zytokeratin-positive interstitielle Retikulumzellen (CIRCs) genannt. Gould *et al.* (1995) verglichen die Anzahl von CIRCs in 291 vergrößerten Lymphknoten, die in reaktiv-inflammatorische u./o. neoplastische Prozesse involviert waren, mit histologisch unauffällig befundenen Lymphknoten. Diese wiesen in 89 % der Fälle (258/291) eine deutlich erhöhte Anzahl von CIRCs parakortikal subkapsulär auf, die häufig Netzwerke um Follikel, Sinusoide und Gefäße formatierten. Gelegentlich waren diese auch im Bereich der Markregion nachweisbar. Gould und Kollegen (1995) fanden eine beträchtliche Menge von CIRCs in tumorfreien Lymphknoten, die jedoch im Lymphabflussgebiet eines malignen Tumors lokalisiert waren. Ihre Funktion ist bis heute nicht abschließend geklärt (Gould *et al.*, 1995; Jacob *et al.*, 2016). Diese Studienergebnisse könnten somit als ein Erklärungsansatz für meine Beobachtung herangezogen werden, dass Patienten mit nachweisbaren DTCs im Lymphknotengewebe tendenziell länger überlebten als Patienten ohne nodale DTCs. Ferner könnten diese Ergebnisse erklären, dass bei den analysierten KM-DTCs hochsignifikant (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0.0002$) mehr genomische Aberrationen als bei den LK-DTCs gefunden wurden. Des Weiteren muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die mCGH-zugänglichen DTCs aus dem Knochenmark eine partiell besonders genetisch stabile, aggressive DTC-Subpopulation darstellten, da diese DTCs aufgrund unklarer genetischer Aberrationen einen Selektionsvorteil gegenüber anderen DTCs hatten. Das Kompartiment Knochenmark selbst als Ausgangspunkt einer hämatogenen Disseminierung von einzelnen Tumorzellen in Organe wie z.B. der Leber könnte aber auch im Sinne eines *homing organs* fungieren, in welchem bis heute noch nicht abschließend geklärte Stimulationsfaktoren eine genetische Weiterentwicklung und Disseminierung begünstigen (Bleijerveld *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit konnten die KM-DTCs als relevante Zellen identifiziert werden, die aufgrund ihrer genetischen Eigenschaften als potentielle Vorläuferzellen von Metastasen angesehen werden können. Eine weitere Charakterisierung mit hochauflösenden Methoden sowie eine Identifikation von Mechanismen, die diese Zellen zu einer Disseminierung in das Knochenmark, in die (lokoregionären) Lymphknoten u./o. in

weitere Organe veranlassen, könnten zusätzliche wichtige Einblicke in den Disseminierungs- und Metastasierungsprozess beim HNSCC geben.

6 Literaturverzeichnis

S2k-Leitlinie, (2010), Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, *AWMF-Register-Nummer (007/092)*, S. 3.

S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom, (2012), Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, *AWMF-Register-Nummer (007-1000L)*, S. 19-36.

Alexander, M., Reising, B., Schumacher, S., Sproll, C., Stoecklein, N.H., (2013), Validation of markers for the screening and identification of disseminating tumor cells in lymph nodes and bone marrow. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 51, S. 77-79.

Al-Othman, M.O.F., Morris, C.G., Hinerman, R.W., Amdur, R.J., Mendenhall, W.M., (2003), Distant metastases after definitive radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & neck* 25 (8), S. 629-633.

Alvi, A., Johnson, J.T., (1997), Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head & neck* 19 (6), S. 500-505.

Argiris, A., Karamouzis, M.V., Raben, D., Ferris, R.L., (2008), Head and neck cancer. *Lancet (London, England)* 371 (9625), S. 1695-1709.

Berenson, J.R., Yang, J., Mickel, R.A., (1989), Frequent amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 4 (9), S. 1111-1116.

Bleijerveld, O.B., Brakenhoff, R.H., Schaaij-Visser, T.B.M., Damen, J.M.A., Altelaar, A.F.M., Heck, A.J.R., Leemans, C.R., Slijper, M., (2011), Protein signatures associated with tumor cell dissemination in head and neck cancer. *Journal of proteomics* 74 (4), S. 558-566.

Braakhuis, B.J.M., Senft, A., Bree, R. de, Vries, J. de, Ylstra, B., Cloos, J., Kuik, D.J., Leemans, C.R., Brakenhoff, R.H., (2006), Expression profiling and prediction of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of clinical pathology* 59 (12), S. 1254-1260.

Braakhuis, B.J.M., Snijders, P.J.F., Keune, W.J., Meijer, C.J., Ruijter-Schippers, H.J., Leemans, C.R., Brakenhoff, R.H., (2004), Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *Journal of the National Cancer Institute* 96 (13), S. 998-1006.

Braun, S., Pantel, K., Muller, P., Janni, W., Hepp, F., Kntenich, C.R., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmuller, G., Schlimok, G., (2000), Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *The New England journal of medicine* 342 (8), S. 525-533.

Bree, R. de, Deurloo, E.E., Snow, G.B., Leemans, C.R., (2000), Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *The Laryngoscope* 110 (3 Pt 1), S. 397-401.

Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., Sidransky, D., (1996), Genetic progression model for head and neck cancer, implications for field cancerization. *Cancer research* 56 (11), S. 2488-2492.

Callender, T., el-Naggar, A.K., Lee, M.S., Frankenthaler, R., Luna, M.A., Batsakis, J.G., (1994), PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 74 (1), S. 152-158.

Chang, S.S., Califano, J., (2008), Current status of biomarkers in head and neck cancer. *Journal of surgical oncology* 97 (8), S. 640-643.

Chen, J.J., Silver, D., Cantor, S., Livingston, D.M., Scully, R., (1999), BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer research* 59 (7 Suppl), S. 1752s-1756s.

Chin, D., Boyle, G.M., Porceddu, S., Theille, D.R., Parsons, P.G., Coman, W.B., (2006), Head and neck cancer, past, present and future. *Expert review of anticancer therapy* 6 (7), S. 1111-1118.

Das, B.R., Nagpal, J.K., (2002), Understanding the biology of oral cancer. *Medical science monitor, international medical journal of experimental and clinical research* 8 (11), S. 258-267.

- Eisen, M.B.**, Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., (1998), Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (25), S. 14863-14868.
- Enepekides, D.J.**, Sultanem, K., Nguyen, C., Shenouda, G., Black, M.J., Rochon, L., (1999), Occult cervical metastases, immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. *Otolaryngology--head and neck surgery, official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 120 (5), S. 713-717.
- Fiegler, H.**, Carr, P., Douglas, E.J., Burford, D.C., Hunt, S., Scott, C.E., Smith, J., Vetrie, D., Gorman, P., Tomlinson, I.P.M., Carter, N.P., (2003), DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes, chromosomes & cancer* 36 (4), S. 361-374.
- Fix, P.**, (2005), Untersuchung zur Regulation des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM. Dissertation. LMU München.
- Franceschi, S.**, Levi, F., La Vecchia, C., Conti, E., Dal Maso, L., Barzan, L., Talamini, R., (1999), Comparison of the effect of smoking and alcohol drinking between oral and pharyngeal cancer. *International journal of cancer* 83 (1), S. 1-4.
- Franke, W.W.**, Moll, R., (1987), Cytoskeletal components of lymphoid organs. I. Synthesis of cytokeratins 8 and 18 and desmin in subpopulations of extrafollicular reticulum cells of human lymph nodes, tonsils, and spleen. *Differentiation, research in biological diversity* 36 (2), S. 145-163.
- Gath, H.J.**, Brakenhoff, R.H., (1999), Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer metastasis reviews* 18 (1), S. 109-126.
- Gillison, M.L.**, Koch, W.M., Capone, R.B., Spafford, M., Westra, W.H., Wu, L., Zahurak, M.L., Daniel, R.W., Viglione, M., Symer, D.E., Shah, K.V., Sidransky, D., (2000), Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 92 (9), S. 709-720.
- Glover, T.W.**, Coyle-Morris, J.F., Li, F.P., Brown, R.S., Berger, C.S., Gemmill, R.M., Hecht, F., (1988), Translocation t(3,8)(p14.2,q24.1) in renal cell carcinoma affects expression of the common fragile site at 3p14(FRA3B) in lymphocytes. *Cancer genetics and cytogenetics* 31 (1), S. 69-73.
- Gould, V.E.**, Bloom, K.J., Franke, W.W., Warren, W.H., Moll, R., (1995), Increased numbers of cytokeratin-positive interstitial reticulum cells (CIRC) in reactive, inflammatory and neoplastic lymphadenopathies, hyperplasia or induced expression?. *Virchows Archiv, an international journal of pathology* 425 (6), S. 617-629.
- Gourin, C.G.**, Johnson, J.T., (2001), Surgical treatment of squamous cell carcinoma of the base of tongue. *Head & neck* 23 (8), S. 653-660.
- Hashibe, M.**, Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M.P., Dal Maso, L., Daudt, A.W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R.B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A.F., Rudnai, P., Schwartz, S.M., Smith, E., Sturgis, E.M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D.M., Zaridze, D., Zatonski, W., Zhang, Z.-F., Berthiller, J., Boffetta, P., (2007), Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer, pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute* 99 (10), S. 777-789.
- Hosch, S.**, Kraus, J., Scheunemann, P., Izbicki, J.R., Schneider, C., Schumacher, U., Witter, K., Speicher, M.R., Pantel, K., (2000), Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. *Cancer Research* 60 (24), S. 6836-6840.
- Hunter, K.D.**, Parkinson, E.K., Harrison, P.R., (2005), Profiling early head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer* 5 (2), S. 127-135.
- Izbicki, J.R.**, Hosch, S.B., Pichlmeier, U., Rehders, A., Busch, C., Niendorf, A., Passlick, B., Broelsch, C.E., Pantel, K., (1997), Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *The New England journal of medicine* 337 (17), S. 1188-1194.

- Jacob, P.M.**, Nair, R.A., Nair, S.P., Jayasudha, A.V., (2016), Cytokeratin-positive interstitial reticulum cells in the lymph node: A potential pitfall. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 59, S. 128-129.
- Jin, Y.**, Jin, C., Lv, M., Tsao, S.-W., Zhu, J., Wennerberg, J., Mertens, F., Kwong, Y.-L., (2005), Karyotypic evolution and tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer genetics and cytogenetics* 156 (1), S. 1-7.
- Joo, Y.H.**, Park, S.-W., Jung, S.-H., Lee, Y.-S., Nam, I.-C., Cho, K.-J., Park, J.-O., Chung, Y.-J., Kim, M.-S., (2013), Recurrent loss of the FHIT gene and its impact on lymphatic metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Acta oto-laryngologica* 133 (9), S. 992-999.
- Kallioniemi, A.**, Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D., (1992), Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science (New York, N.Y.)* 258 (5083), S. 818-821.
- Khafif, R.A.**, Gelbfish, G.A., Tepper, P., Attie, J.N., (1991), Elective radical neck dissection in epidermoid cancer of the head and neck. A retrospective analysis of 853 cases of mouth, pharynx, and larynx cancer. *Cancer* 67 (1), S. 67-71.
- Klein, C.A.**, Schmidt-Kittler, O., Scharadt, J.A., Pantel, K., Speicher, M.R., Riethmuller, G., (1999), Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (8), S. 4494-4499.
- Klein, C.A.**, (2003), The systemic progression of human cancer, a focus on the individual disseminated cancer cell--the unit of selection. *Advances in cancer research* 89, S. 35-67.
- Klein, C.A.**, Blankenstein, T.J.F., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N.H., Riethmuller, G., (2002), Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet (London, England)* 360 (9334), S. 683-689.
- Kostrzewa, M.**, Muller, U., (1998), Genomic structure and complete sequence of the human FGFR4 gene. *Mammalian genome, official journal of the International Mammalian Genome Society* 9 (2), S. 131-135.
- Kozaki, K.I.**, Imoto, I., Pimkhaokham, A., Hasegawa, S., Tsuda, H., Omura, K., Inazawa, J., (2006), PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. *Cancer science* 97 (12), S. 1351-1358.
- Kyomoto, R.**, Kumazawa, H., Toda, Y., Sakaida, N., Okamura, A., Iwanaga, M., Shintaku, M., Yamashita, T., Hiai, H., Fukumoto, M., (1997), Cyclin-D1-gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over-expression in human head-and-neck squamous-cell carcinoma. *International journal of cancer* 74 (6), S. 576-581.
- Lee, J.M.**, (2007), The synergistic effect of cigarette taxes on the consumption of cigarettes, alcohol and betel nuts. *BMC public health* 7, S. 121.
- Leemans, C.R.**, Tiwari, R., Nauta, J.J., van der Waal, I., Snow, G.B., (1993), Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer* 71 (2), S. 452-456.
- Litvinov, S.V.**, van Driel, W., van Rhijn, C.M., Bakker, H.A., van Krieken, H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., (1996), Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *The American journal of pathology* 148 (3), S. 865-875.
- Maestro, R.**, Piccinin, S., Doglioni, C., Gasparotto, D., Vukosavljevic, T., Sulfaro, S., Barzan, L., Boiocchi, M., (1996), Chromosome 13q deletion mapping in head and neck squamous cell carcinomas, identification of two distinct regions of preferential loss. *Cancer research* 56 (5), S. 1146-1150.
- Marusyk, A.**, Polyak, K., (2010), Tumor heterogeneity, causes and consequences. *Biochimica et biophysica acta* 1805 (1), S. 105-117.
- Meindl, A.**, Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., Freund, M., Lichtner, P., Hartmann, L., Schaal, H., Ramser, J., Honisch, E., Kubisch, C., Wichmann, H.E., Kast, K., Deissler, H., Engel, C., Muller-Myhsok, B., Neveling, K., Kiechle, M., Mathew, C.G., Schindler, D., Schmutzler, R.K., Hanenberg,

- H., (2010), Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature genetics* 42 (5), S. 410-414.
- Merino, O.R.**, Lindberg, R.D., Fletcher, G.H., (1977), An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 40 (1), S. 145-151.
- Michalides, R.J.**, van Veelen, N.M., Kristel, P.M., Hart, A.A., Loftus, B.M., Hilgers, F.J., Balm, A.J., (1997), Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 123 (5), S. 497-502.
- Moll, R.**, Divo, M., Langbein, L., (2008), The human keratins, biology and pathology. *Histochemistry and cell biology* 129 (6), S. 705-733.
- Morton, N.E.**, (1991), Parameters of the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (17), S. 7474-7476.
- Muller, D.**, Millon, R., Lidereau, R., Engelmann, A., Bronner, G., Flesch, H., Eber, M., Methlin, G., Abecassis, J., (1994), Frequent amplification of 11q13 DNA markers is associated with lymph node involvement in human head and neck squamous cell carcinomas. *European journal of cancer. Part B, Oral oncology* 30B (2), S. 113-120.
- Munz, M.**, Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., Gires, O., (2004), The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 23 (34), S. 5748-5758.
- Muttagi, S.S.**, Chaturvedi, P., Gaikwad, R., Singh, B., Pawar, P., (2012), Head and neck squamous cell carcinoma in chronic areca nut chewing Indian women, Case series and review of literature. *Indian journal of medical and paediatric oncology, official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology* 33 (1), S. 32-35.
- Nguyen, P.T.**, Tsunematsu, T., Yanagisawa, S., Kudo, Y., Miyauchi, M., Kamata, N., Takata, T., (2013), The FGFR1 inhibitor PD173074 induces mesenchymal-epithelial transition through the transcription factor AP-1. *British journal of cancer* 109 (8), S. 2248-2258.
- Nilsson, J.A.**, Cleveland, J.L., (2003), Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22 (56), S. 9007-9021.
- Oshima, R.G.**, (2007), Intermediate filaments, a historical perspective. *Experimental cell research* 313 (10), S. 1981-1994.
- Pantel, K.**, Brakenhoff, R.H., (2004), Dissecting the metastatic cascade. *Nature reviews. Cancer* 4 (6), S. 448-456.
- Parkin, D.M.**, Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., (2005), Global cancer statistics, 2002. *CA, a cancer journal for clinicians* 55 (2), S. 74-108.
- Patmore, H.S.**, Ashman, J.N.E., Cawkwell, L., MacDonald, A., Stafford, N.D., Greenman, J., (2004), Can a genetic signature for metastatic head and neck squamous cell carcinoma be characterised by comparative genomic hybridisation?. *British journal of cancer* 90 (10), S. 1976-1982.
- Patmore, H.S.**, Cawkwell, L., Stafford, N.D., Greenman, J., (2005), Unraveling the chromosomal aberrations of head and neck squamous cell carcinoma, a review. *Annals of surgical oncology* 12 (10), S. 831-842.
- Petersen, I.**, Schwendel, A., Bockmühl, U., Dietel, M., (1996), Die komparative genomische Hybridisierung. *Der Pathologe* 17 (5), S. 333-341.
- Petti, S.**, (2009), Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral oncology* 45 (4-5), S. 340-350.
- Pignon, J.P.**, Le Maitre, A., Maillard, E., Bourhis, J., (2009), Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC), an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and oncology, journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 92 (1), S. 4-14.
- Polesel, J.**, Talamini, R., La Vecchia, C., Levi, F., Barzan, L., Serraino, D., Franceschi, S., Dal Maso, L., (2008), Tobacco smoking and the risk of upper aero-digestive tract cancers, A reanalysis of case-control studies using spline models. *International journal of cancer* 122 (10), S. 2398-2402.

- Rao, C.G.**, Chianese, D., Doyle, G.V., Miller, M.C., Russell, T., Sanders, R.A. Jr, Terstappen, L.W.M.M., (2005), Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *International journal of oncology* 27 (1), S. 49-57.
- Rheinwald, J.G.**, Beckett, M.A., (1981), Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. *Cancer research* 41 (5), S. 1657-1663.
- Riethdorf, S.**, Wikman, H., Pantel, K., (2008), Review, Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *International journal of cancer* 123 (9), S. 1991-2006.
- Rinaldo, A.**, Devaney, K.O., Ferlito, A., (2004), Immunohistochemical studies in the identification of lymph node micrometastases in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *ORL, journal for otorhino-laryngology and its related specialties* 66 (1), S. 38-41.
- Robbins, K.T.**, Clayman, G., Levine, P.A., Medina, J., Sessions, R., Shaha, A., Som, P., Wolf, G.T., (2002), Neck dissection classification update, revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 128 (7), S. 751-758.
- Robert-Koch-Institut**, (2015), Krebs in Deutschland 2011/2012. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015.
- Rodriguez, T.**, Altieri, A., Chatenoud, L., Gallus, S., Bosetti, C., Negri, E., Franceschi, S., Levi, F., Talamini, R., La Vecchia, C., (2004), Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral oncology* 40 (2), S. 207-213.
- Roovers, R.C.**, Henderikx, P., Helfrich, W., van der Linden, E., Reurs, A., Bruine, A.P. de, Arends, J.W., Leij, L. de, Hoogenboom, H.R., (1998), High-affinity recombinant phage antibodies to the pan-carcinoma marker epithelial glycoprotein-2 for tumour targeting. *British journal of cancer* 78 (11), S. 1407-1416.
- Scheckenbach, K.**, Baldus, S.E., Balz, V., Freund, M., Pakropa, P., Sproll, C., Schafer, K.-L., Wagenmann, M., Schipper, J., Hanenberg, H., (2014), RAD51C--a new human cancer susceptibility gene for sporadic squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *Oral oncology* 50 (3), S. 196-199.
- Schmelzer, E.**, Reid, L.M., (2008), EpCAM expression in normal, non-pathological tissues. *Frontiers in bioscience, a journal and virtual library* 13, S. 3096-3100.
- Schmidt, M.**, Scheulen, M.E., Dittrich, C., Obrist, P., Marschner, N., Dirix, L., Ruttinger, D., Schuler, M., Reinhardt, C., Awada, A., (2010), An open-label, randomized phase II study of adecatumumab, a fully human anti-EpCAM antibody, as monotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Annals of oncology, official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21 (2), S. 275-282.
- Speicher, M.R.**, Howe, C., Crotty, P., Du Manoir, S., Costa, J., Ward, D.C., (1995), Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer research* 55 (5), S. 1010-1013.
- Spizzo, G.**, Fong, D., Wurm, M., Ensinger, C., Obrist, P., Hofer, C., Mazzoleni, G., Gastl, G., Went, P., (2011), EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases, an immunohistochemical analysis. *Journal of clinical pathology* 64 (5), S. 415-420.
- Sproll, C.**, Freund, A.K., Hassel, A., Holbling, M., Aust, V., Storb, S.H., Handschel, J., Teichmann, C., Depprich, R., Behrens, B., Neves, R.P.L., Kubler, N.R., Kaiser, P., Baldus, S.E., Toth, C., Kaisers, W. and Stoecklein, N.H., (2017), Immunohistochemical detection of lymph node-DTCs in patients with node-negative HNSCC. *International journal of cancer* (140), S. 2112-2124.
- Stembalska, A.**, Blin, N., Ramsey, D., Sasiadek, M.M., (2006), Three distinct regions of deletion on 13q in squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncology reports* 16 (2), S. 417-421.
- Stoecklein, N.H.**, Hosch, S.B., Bezler, M., Stern, F., Hartmann, C.H., Vay, C., Siegmund, A., Scheunemann, P., Schurr, P., Knoefel, W.T., Verde, P.E., Reichelt, U., Erbersdobler, A., Grau, R., Ullrich, A., Izbicki, J.R., Klein, C.A., (2008), Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer cell* 13 (5), S. 441-453.
- Stoecklein, N.H.**, Klein, C.A., (2010), Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *International journal of cancer* 126 (3), S. 589-598.

- Takes, R.P.**, Baatenburg de Jong, R.J., Wijffels, K., Schuurin, E., Litvinov, S.V., Hermans, J., van Krieken, J.H., (2001), Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *The Journal of pathology* 194 (3), S. 298-302.
- Telenius, H.**, Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjold, M., Ponder, B.A., Tunnacliffe, A., (1992), Degenerate oligonucleotide-primed PCR, general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13 (3), S. 718-725.
- Van der Riet, P.**, Nawroz, H., Hruban, R.H., Corio, R., Tokino, K., Koch, W., Sidransky, D., (1994), Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer research* 54 (5), S. 1156-1158.
- Vandenbrouck, C.**, Eschwege, F., La Rochefordiere, A. de, Sicot, H., Mamelle, G., Le Ridant, A.M., Bosq, J., Domenge, C., (1987), Squamous cell carcinoma of the pyriform sinus, retrospective study of 351 cases treated at the Institut Gustave-Roussy. *Head & neck surgery* 10 (1), S. 4-13.
- Virgilio, L.**, Shuster, M., Gollin, S.M., Veronese, M.L., Ohta, M., Huebner, K., Croce, C.M., (1996), FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18), S. 9770-9775.
- Vogelstein, B.**, Lane, D., Levine, A.J., (2000), Surfing the p53 network. *Nature* 408 (6810), S. 307-310.
- Volling, P.**, Jungehulsing, M., Jucker, M., Stutzer, H., Diehl, V., Tesch, H., (1993), Coamplification of the hst and bcl-1 oncogenes in advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *European journal of cancer (Oxford, England, 1990)* 29A (3), S. 383-389.
- Wang, X.**, Pavelic, Z.P., Li, Y.Q., Wang, L., Gleich, L., Radack, K., Gluckman, J.L., Stambrook, P.J., (1995), Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical molecular pathology* 48 (5), S. 256-259.
- Wang, H.**, Stoecklein, N.H., Lin, P.P. and Gires, O., (2017), Circulating and disseminated tumor cells: diagnostic tools and therapeutic targets in motion. *Oncotarget* (8), S. 1884-1912.
- Weiss, M.H.**, Harrison, L.B., Isaacs, R.S., (1994), Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 120 (7), S. 699-702.
- Welsch, U.**, Deller, T., Kummer, W., (2014), Lehrbuch Histologie. 4. Aufl. München, Elsevier, Urban et Fischer.
- Winter, M.J.**, Nagtegaal, I.D., van Krieken, J.H.J.M., Litvinov, S.V., (2003), The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *The American journal of pathology* 163 (6), S. 2139-2148.
- Wittekind, C.**, Weber, A., Weidenbach, H., (2001), Pathologie und Prognosefaktoren von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Der Onkologe* 7 (5), S. 498-504.
- Wittekind, C.**, (2010), TNM. Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl. Somerset, Wiley-Blackwell.
- Woolgar, J.A.**, Rogers, S.N., Lowe, D., Brown, J.S., Vaughan, E.D., (2003), Cervical lymph node metastasis in oral cancer, the importance of even microscopic extracapsular spread. *Oral oncology* 39 (2), S. 130-137.
- Yoo, G.H.**, Xu, H.J., Brennan, J.A., Westra, W., Hruban, R.H., Koch, W., Benedict, W.F., Sidransky, D., (1994), Infrequent inactivation of the retinoblastoma gene despite frequent loss of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research* 54 (17), S. 4603-4606.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. U. Meyer für die Bereitstellung und Überlassung des interessanten Themas, für die kontinuierliche Betreuung meiner Dissertationsarbeit sowie für die Erstellung des Erstgutachtens. Vielen Dank für die großartige Unterstützung in der Phase der finalen Fertigstellung sowie für die Geduld und Bereitschaft für auftretende Fragen und Probleme eine Lösung zu finden.

Ein großes Dankeschön gilt auch dem Korreferenten für die Unterstützung meiner Dissertationsarbeit und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Von ganzem Herzen möchte ich mich schließlich bei meinen Eltern und meinen Freunden bedanken, die mich während der gesamten Promotionszeit unterstützten und immer für mich da waren.