

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W.T. Knoefel

**Untersuchungen zur beta-catenin-Expression und zu  
chromosomalen Veränderungen bei disseminierten  
Tumorzellen kolorektaler Karzinome**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Malte Nübel

2018

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

gez.:

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

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

## **Zusammenfassung**

Die Beteiligung von disseminierten Tumorzellen am Prozess der Metastasierung bei malignen Tumoren gilt als gesichert. So gibt es auch zahlreiche Hinweise für die Beteiligung dieser Tumorzellen an der Metastasierung beim kolorektalen Karzinom. Bei dieser Tumorentität scheint beta-catenin, als wichtiger Regulator des Wnt-Signalweges, eine bedeutende Rolle bei Tumorentstehung und -progression, sowie Metastasierung zu spielen. Nukleäres beta-catenin kann als Zeichen eines aktivierten Wnt-Signalweges gewertet werden und trägt vor allem am Invasionsrand von kolorektalen Karzinomen zur epithelialen-mesenchymalen Transition bei, welche den Tumorzellen überhaupt die Fähigkeit zur Disseminierung verleiht. Die Phänotypisierung und genomische Untersuchung solcher disseminierten Tumorzellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom war das Ziel dieser Arbeit. Mit Hilfe einer hierfür etablierten Doppelfärbung mit einem epithelialen Marker und mit einem Antikörper gegen beta-catenin konnten DTC identifiziert und gleichzeitig bezüglich der beta-catenin-Expression untersucht werden.

Es ließen sich insgesamt 28 CK-positive Tumorzellen in 18 Knochenmark-Proben von 66 CRC-Patienten (27%) und weitere 9 EpCAM-positive Tumorzellen in 5 Lymphknoten-Proben von 13 CRC-Patienten (39%) detektieren. Die vorliegende Untersuchung beschreibt das Expressionsverhalten von beta-catenin in disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sowie im Lymphknoten von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom. Es wurde beobachtet, dass 30% der DTC aus dem KM bzw. 14% der DTC aus den LK der Patienten nukleäres beta-catenin als Hinweis für einen aktivierten Wnt-Signalweg exprimierten. Weitergehend konnten die Einzelzellen aus dem KM durch die anschließende komparative genomische Hybridisierung direkt analysiert und auf chromosomale Gewinne und Verluste hin untersucht werden. Dabei wiesen Tumorzellen mit nukleärer Expression von beta-catenin eine signifikant höhere chromosomale Aberrationsrate auf, was als Merkmal einer erhöhten chromosomalen Instabilität interpretiert wurde.

Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob DTC mit nukleärer Expression von beta-catenin für die jeweiligen Patienten ein erhöhtes Risiko für ein metastatisches Rezidiv bedeuten.

## **Abstract**

Disseminated tumor cells (DTC) are an important prerequisite for metastasis of malignant tumors. There are several data indicating their importance also for colorectal cancer (CRC) metastasis. As main regulator of the Wnt-signalling-pathway, beta-catenin is considered as major driver for the development, progression and metastasis in CRC. Nuclear beta-catenin can serve as a sign for an activated Wnt-signal-pathway, which can trigger epithelial-mesenchymal transition especially at the invasive front of CRC, which facilitates and enables tumor cell dissemination. The aim of this study was to investigate the beta-catenin expression on CRC DTCs identified with epithelial markers (cytokeratins) and to investigate subsequently the genomes of these cells for chromosomal gains and losses.

Using a double-immunofluorescence staining, 28 cytokeratin-positive cells were detected in 18 bone marrow samples of 66 CRC-patients (27%), and nine EpCAM positive cells in five lymph nodes of 13 CRC-patients (39%). Overall, 30% of the bone marrow DTC and 14% of the lymphatic DTC displayed nuclear beta-catenin staining, respectively, indicating activated Wnt-signaling. Furthermore, bone marrow DTCs were isolated via micromanipulation, their DNA was globally amplified by an adapter-linker PCR method, and their genomes were subsequently screened for chromosomal gains and losses using comparative genomic hybridization. This analysis revealed that DTCs with nuclear beta-catenin staining displayed a significantly higher number of chromosomal aberrations, which was interpreted as a higher level of chromosomal instability.

Further research will need to clarify, whether these cells confer a higher risk for metastatic relapse.

## Verwendete Abkürzungen

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

A	Adenin
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CCD	charge-coupled device
CGH	comparative genomic hybridization
CK	Zytokeratin
CRC	kolorektales Karzinom
DAPI	4',6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dig	Digoxigenin
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTC	disseminierte Tumorzelle
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELF	enzyme-labeled fluorescence
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein
G	Guanin
g	Beschleunigung
HNPCC	hereditäre Non-Polyposis Colorectal Cancer
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
MOPC	Mouse Oocyte Plasmocytom
MRD	minimal residuale Krebserkrankung
n.b.	nicht bekannt
n.s.	nicht signifikant
OP	Operation

PBS	Phosphatbuffer-Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonucleinsäure
Rpm	revolution per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SSC	Saline-Sodiumcitrat
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
T	Thymin
UICC	Union for International Cancer Control

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Epidemiologie und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms	1
1.2 Metastasierung beim kolorektalen Karzinom	2
1.3 Die minimale residuale Krebserkrankung (MRD)	3
1.4 Der Wnt-Signalweg	5
1.5 Das Konzept der migratorischen Tumorstammzellen	8
1.6 Ziel der Arbeit	11
<b>2 Material und Methoden</b>	12
2.1 Aufbereitung des Knochenmarks	12
2.2 Aufbereitung der Lymphknoten	13
2.3 Zellkultur	13
2.3.1 Wundheilungsversuch	13
2.4 Immunzytochemie	14
2.4.1 Einfache Immunfluoreszenzfärbung	14
2.4.2 Doppelte Immunfluoreszenzfärbung	14
2.5 Immunhistochemie: ABC-Methode	15
2.6. Isolierung von Einzelzellen	16
2.6.1 Einzelzell-PCR	17
2.6.2 Kontroll-PCR	19
2.6.3. Agarose-Gelelektrophorese	19
2.6.4. Markierungs-PCR	20
2.6.5. Präparation von Metaphasechromosomen	21
2.6.6. Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)	24
2.6.7. CGH-Auswertung	24
2.7. Statistik	24
2.8. Patientenkollektiv	26
2.9. Verwendete Materialien	29
2.9.1 Enzyme und Antikörper	29
2.9.2 Chemikalien	29
2.9.3 Oligonukleotide und Primer	30
2.9.4 Puffer	31
2.9.5 Geräte	31

2.9.6	Verbrauchsmaterialien	31
2.9.7	Software	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1	Expression von beta-catenin in der kolorektalen Tumorzelllinie SW480	34
3.2	Membranär-zytoplasmatische und nukleäre Expression von beta-catenin im Wundheilungsversuch	36
3.3	Detektion disseminierter Tumorzellen in Knochenmark und Lymphknoten	38
3.4	Doppelfärbung disseminierter Tumorzellen	39
3.5	Inzidenz Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark	43
3.5.1	Anzahl disseminierter Tumorzellen pro Patient	43
3.5.2	Expression von beta-catenin in DTC aus dem Knochenmark	44
3.6	Inzidenz EpCAM-positiver disseminierter Tumorzellen im Lymphknoten	46
3.6.1	Anzahl der DTC pro Patient	47
3.6.2	Expression von beta-catenin in EPCAM-positiven DTC aus Lymphknoten	48
3.7	Genomische Untersuchung von DTC aus dem Knochenmark	49
3.8	Untersuchung der Primärtumoren und Metastasen	56
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>81</b>
7.1	Aberrationen aller gefundenen Zellen	81
7.2	Beispiel eines CGH-Profiles	82

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom ist mit mehr als 1,3 Mio. Neuerkrankungen pro Jahr die zweithäufigste Tumorerkrankung weltweit (Globocan 2012). Dabei kommt es jedes Jahr zu etwa 490.000 tumorbedingten Todesfällen (Weitz, Koch et al. 2005). In Deutschland ist das kolorektale Karzinom das zweithäufigste Karzinom (ca. 62.000 Neuerkrankungen pro Jahr) nach dem Prostatakarzinom beim Mann und dem Mammakarzinom bei der Frau (GEKID-Atlas 2012). Die geschätzte karzinombedingte Mortalität liegt bei etwa 27.600 bezogen auf 100.000 Erkrankungsfälle pro Jahr (Globocan 2012), wobei die Prognose entscheidend vom Stadium der Erkrankung bei Erstdiagnose abhängt. Patienten im UICC-Stadium I haben eine gute Prognose nach kurativer Resektion. Hier wird ein Langzeitüberleben von 86% beschrieben (Wichmann, Muller et al. 2002). Allerdings wird die Prognose der Erkrankung in erster Linie durch die systemische Metastasierung bestimmt (Tabelle 1). So liegt die durchschnittliche Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom (UICC-Stadium IV) nur noch unter 10%.

UICC-Stadium	DUKES	T	N	M	5- J.-Überleben (Jemal, Clegg et al. 2004)	5- J.-Überleben (Weitz, Koch et al. 2005)
I	A	T1,T2	N0	M0	90,5%	80-95%
IIA	B	T3	N0	M0	67,9%	72-75%
IIB	B	T4	N0	M0	67,9%	65-66%
IIIA	C	T1,T2	N1	M0	67,9%	55-60%
IIIB	C	T3,T4	N1	M0	67,9%	35-42%
IIIC	C	Jedes T	N2	M0	67,9%	25-27%
IV	D	Jedes T	Jedes N	M1	9,4%	0-7%

**Tabelle 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC und Dukes**

Zudem werden die 5-Jahres-Überlebensraten der verschiedenen Stadien dargestellt (Beispielhaft von Jemal, Clegg et al und von Weitz, Koch et al.)

Es werden grundsätzlich sporadische von hereditär auftretenden kolorektalen Karzinomen unterschieden. Die sporadische Form bildet mit etwa 90-95% der Fälle den Hauptanteil, wobei hier neben genetischen Faktoren auch Umwelteinflüsse eine

entscheidende Rolle spielen (Knopnadel, Altenhofen et al. 2003). Die Entstehung der sporadischen Form des kolorektalen Karzinoms läuft typischerweise über die Adenom-Karzinom Sequenz ab (Vogelstein, Fearon et al. 1988). Im Verlauf dieser zytomorphologischen Veränderung kommt es zu einer Akkumulation von genetischen Veränderungen bei Tumorsuppressor- und Onkogenen (Lynch and Hoops 2002). Diese Gene regulieren das Wachstum der Zelle und können bei unkontrollierter Aktivität bzw. Inaktivität zur Tumorentstehung führen. Wichtige Beispiele sind das APC-Gen, welches beim kolorektalen Karzinom eine Schlüsselrolle zu haben scheint, sowie TP53 und c-myc (Calvert and Frucht 2002). Die übrigen 5-10% der CRC bilden hereditäre Karzinome, bei denen erbliche Faktoren für die Tumorentstehung verantwortlich sind. Beispiele hierfür sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC). Im Gegensatz zu den erwähnten sporadischen Karzinomen sind hier prädisponierende Keimbahnmutationen für die Tumorentstehung verantwortlich.

Die genetische Instabilität einer Zelle deutet auf eine im Vergleich zu Normalzellen erhöhte Rate an genomischen Veränderungen hin, welche sich in Form von Amplifikationen, Deletionen, Aneuploidien oder strukturellen Abweichungen äußern können. Diese genetische Instabilität ist ein typisches Kennzeichen von Krebszellen und wird als Antreiber bei der frühen Krebsentstehung gesehen (Halazonetis 2008). Bei allen kolorektalen Karzinomen sind genetische Instabilitäten eine Grundvoraussetzung für die Entstehung und Progression. Hierbei werden zwei Typen der Instabilität unterschieden: die Mikrosatelliteninstabilität, die mit der HNPCC-Erkrankung assoziiert ist sowie die chromosomale Instabilität (CIN), die man bei der Mehrzahl der CRC findet (Imai and Yamamoto 2008).

## **1.2 Metastasierung beim kolorektalen Karzinom**

Die Metastasierung ist die Haupttodesursache von Patienten mit soliden Tumoren und damit auch beim CRC. Bei der Metastasierung kommt es zunächst zur Absiedlung von Tumorzellen aus dem Primärtumor, zur Streuung dieser Zellen über Blut- oder Lymphgefäße und schließlich zum Auswachsen eines Tumors in einem Sekundärorgan. Die primären Zielorgane für die Metastasierung beim CRC sind neben den lokoregionären Lymphknoten (LK) vor allem die Leber und die Lunge (Vatandoust,

Karapetis et al. 2015). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des kolorektalen Karzinoms zeigen sich bereits bei ca. 30% der Patienten Lebermetastasen (Nuzzo, Giuliante et al. 1997, Lehnert and Golling 2001). Im Verlauf der Erkrankung werden in 30-70% der Fälle metachrone Lebermetastasen (Piltz, Dienemann et al. 1996, Cady, Jenkins et al. 1998, Kemeny and Fata 1999, van Cutsem et al. 2009) sowie in etwa 10-15% Lungenmetastasen (Mitry et al. 2010) nachgewiesen. Innerhalb von fünf Jahren nach einer kompletten Tumorentfernung entwickeln sich Fernmetastasen bei bis zu 21% der Patienten mit CRC ohne regionale Lymphknotenmetastasierung (UICC Stadium I-II) und bei bis zu 48% der Patienten mit Lymphknotenmetastasen, entsprechend dem UICC Stadium III (Manfredi, Bouvier et al. 2006). Nach wie vor ist das metastasierte CRC sehr schwierig zu behandeln, da es neben einer Operation multimodale nebenwirkungsreiche Therapiekonzepte wie z.B. eine kombinierte Radiochemotherapie oder Antikörpertherapie beinhaltet. Die Prognose des CRC wird vor allem durch das Ausmaß der hämatogenen Metastasierung bestimmt, da diese einen der größten Risikofaktoren nach der Entfernung des Primärtumors darstellt. Die 5-Jahres-Überlebensrate im UICC-Stadium IV beträgt nur noch 0-7% (Weitz, Koch et al. 2005). Dabei könnte die minimale residuale Krebserkrankung für die Entstehung von Metastasen und damit für die Prognose beim CRC relevant sein (Bork, Weitz et al. 2014).

### **1.3 Die minimale residuale Krebserkrankung (MRD)**

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms basiert primär auf chirurgischen und chemotherapeutischen Behandlungsansätzen. Diese richten sich zunächst nach dem Primärtumorstadium und dem Ausmaß der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung. Allerdings zeigte sich in den letzten Jahren die zunehmende Bedeutung der minimalen residualen Krebserkrankung. Der ursprünglich bei Lymphomen und Leukämien verwendete Begriff wurde vor etwa 30 Jahren auch für solide Tumoren gebräuchlich (Mansi, Berger et al. 1987, Schlimok, Funke et al. 1987). Zu dieser Zeit wurde mit Hilfe von Immundetektionsverfahren begonnen, epitheliale Zellen im Knochenmark (KM) von Patienten mit soliden Tumoren nachzuweisen. Tumorzellen, die nach der chirurgischen Therapie im Körper des Patienten verbleiben und mit in der Klinik etablierten, konventionellen diagnostischen Mitteln nicht nachweisbar sind,

definieren die minimale residuale Krebserkrankung. Da die MRD für die Prognose des kolorektalen Karzinoms bedeutsam ist, wurden in den letzten Jahren Methoden zur Detektion dieser Zellen etabliert. Der immunzytochemische Nachweis disseminierter Tumorzellen durch gegen Zellen epithelialen Ursprungs gerichtete Antikörper, die in einer Umgebung von mesenchymalen Zellen in der Blutbahn, im Knochenmark und in Lymphknoten gefunden werden können, ist heute das am Häufigsten verwendete Verfahren. Insbesondere eignen sich Zytokeratine, welche integrale Bestandteile des Zytoskeletts sind als Zielmoleküle zum Nachweis von epithelialen Tumorzellen im KM (Schlimok, Funke et al. 1990, Pantel, Izbicki et al. 1993). Im LK hingegen erfolgt die Detektion von Tumorzellen üblicherweise über das epitheliale Zell-Adhäsionsmolekül EpCAM (Passlick, Izbicki et al. 1994). Dieses Zielmolekül hat sich für die Detektion von Tumorzellen im LK spezifischer als CK erwiesen (Lacza, Niedobitek et al. 1990). Zudem konnten CK-positive Zellen im LK (Passlick, Izbicki et al. 1994) und EpCAM-positive Zellen im KM (Klein, Seidl et al. 2002) von Kontrollpatienten gefunden werden, welche keine Hinweise für Malignität aufwiesen. Da die Zytokeratine und EpCAM üblicherweise nur in epithelialen Zellen, nicht aber in mesenchymalen Zellen vorkommen, gelten sie als besonders geeignete Marker. Festzuhalten ist jedoch, dass diese Markerproteine nicht tumorspezifisch sind.

Die prognostische Relevanz von DTC deutet sich für die Mehrzahl der malignen soliden Tumore in vielen Studien an, gilt jedoch vor allem beim Mammakarzinom (Kienle and Koch 2001, Feezor, Copeland et al. 2002, Braun, Vogl et al. 2005) als gesichert und ist in die klinische Diagnostik und Therapiefindung eingegangen. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass das Auffinden von disseminierten Tumorzellen im KM bzw. in LK bei Patienten mit kolorektalem Karzinom mit einer signifikant schlechteren Prognose verbunden ist (Leinung, Wurl et al. 2000, Bukholm, Bondi et al. 2003, Schurr, Behnke et al. 2007). Eine große Metaanalyse aus dem Jahr 2010, welche neben den DTC auch Studien mit zirkulierenden Tumorzellen (CTC) einschloss, zeigte eine Assoziation zwischen der Detektion von Tumorzellen mit einem schlechten rezidivfreien Überleben und einem schlechten Gesamtüberleben (Rahbari, Aigner et al.). Auch bei einigen anderen Tumorentitäten konnte der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im KM belegt und einer damit einhergehenden schlechteren Prognose verknüpft werden. Insbesondere beim Mammakarzinom zeigte sich, dass die im KM nachgewiesenen disseminierten Zellen mit einer signifikant kürzeren metastasenfren Zeit assoziiert sind (Braun, Pantel et al. 2000). Coello et al. fasste einige Arbeiten beim

nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zusammen und zeigte, dass in 22-60% der Fälle DTC gefunden werden konnten (Coello, Luketich et al. 2004). Hierbei schienen besonders die DTC im LK prognostisch relevant zu sein. Wolfrum et al. fasste Arbeiten beim Pankreaskarzinom zusammen: Hier gab es Detektionsraten zwischen 24-57%, wobei eine prognostische Relevanz der DTC nicht eindeutig identifiziert werden konnte (Wolfrum, Vogel et al. 2005). Beim Ovarialkarzinom konnten in 54% der Fälle DTC im KM gefunden werden (Wimberger, Heubner et al. 2007).

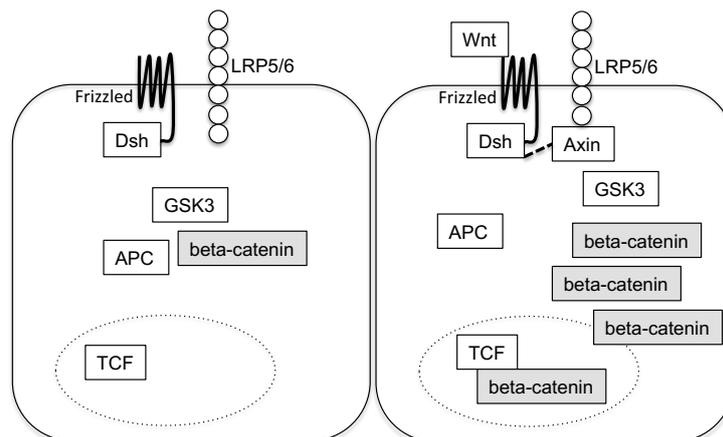
Die Detektion dieser disseminierten Tumorzellen ist beim kolorektalen Karzinom mit einem erhöhten Risiko für eine Metastasierung assoziiert (Lindemann, Schlimok et al. 1992). Die Tumorerkrankung wird durch die Disseminierung von Tumorzellen zur systemischen Erkrankung. Daher kann das KM als Indikatororgan für eine systemische Progression angesehen werden. Zwar ist das KM beim CRC nicht das Hauptziel der Metastasierung, doch ist es wegen der Möglichkeit einer einfachen Gewinnung von Proben für Untersuchungen gut geeignet. Die Zellen des Knochenmarks werden intraoperativ ohne großen zusätzlichen Aufwand aus dem vorderen Beckenkamm gewonnen.

Die Frage nach dem Zeitpunkt der Tumorzell-Disseminierung während der Progression der Erkrankung konnte bislang nicht beantwortet werden. Es gibt Hinweise darauf, dass sich die DTC viel früher vom Primärtumor lösen als bislang angenommen (Klein 2000). Eine Studie beim Mammakarzinom konnte zeigen, dass DTC geringere und andere Aberrationen als deren Primärtumore aufwiesen (Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003). Demnach wäre nicht davon auszugehen, dass sich die DTC aus dem am weitesten entwickelten Klon im Primärtumor bilden. Um das Potential der DTC besser verstehen zu können, sollen die Zellen in Zukunft besser in ihrer biologischen Funktion untersucht werden. Dafür müssen die Zellen im KM und LK detektiert, isoliert und letztlich molekulargenetisch und funktionell analysiert werden.

## **1.4 Der Wnt-Signalweg**

Der Wnt-Signalweg wurde ursprünglich als ein Prototyp einer Signalkaskade bei der Entwicklung von Wirbellosen und Wirbeltieren entdeckt (Cadigan, Nusse et al. 1997). Er setzt sich aus einer Reihe von Proteinen zusammen, deren Interaktion im Falle einer Aktivierung zu einem Signal vom Zelläußeren in den Zellkern führt. Der Signalweg

spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zell-Zell-Kontakten im Rahmen der Embryogenese (Arce, Yokoyama et al. 2006). Des Weiteren hat der Signalweg seine physiologische Funktion in der Gewebemöostase im Darmepithel (Pinto, Gregorieff et al. 2003). Schematisch ist der Wnt-Signalweg in Abb. 1 dargestellt.



**Abb. 1: Schema des kanonischen Wnt-Signalweges**

Hier ist der kanonische Wnt-Signalweg mit seinen beteiligten Proteinen schematisch dargestellt. Die linke Seite zeigt einen inaktiven Signalweg. Hier wird beta-catenin durch die Interaktion mit Axin, APC und GSK-3 $\beta$  abgebaut. Durch Bindung von Wnt-Proteinen an den Frizzled/LRP-Rezeptorenkomplex (rechte Seite) kommt es zur Aktivierung von Dsh, welches die Aktivität der GSK-3 inaktiviert. Schließlich wird die Degradierung von beta-catenin gehemmt, wodurch es zu einer Akkumulation im Zytoplasma und letztlich im Zellkern kommt. Hier interagiert beta-catenin mit den DNA-bindenden TCF/LEF-Faktoren, wodurch die beta-catenin-Zielgene aktiviert werden.

Die Aktivierung des Signalweges erfolgt über die Bindung von Wnt-Faktoren an membranständige Rezeptoren bzw. deren jeweilige Korezeptoren. Dabei handelt es sich vorwiegend um die Proteine der Frizzled-Familie und um LRP (Wang et al. 2016). In den letzten Jahren konnten diese Rezeptoren um eine Vielzahl weiterer ergänzt werden (Niehrs et al. 2012). Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor gelangt das Signal in das Zellinnere, wodurch es letztlich zur Akkumulation von beta-catenin im Zellkern kommt. In Abwesenheit von diesen Signalen bildet APC mit beta-catenin, Axin/Conductin und GSK3 $\beta$  einen Protein-Komplex, durch den beta-catenin zunächst durch eine Phosphorylierung markiert und anschließend durch Proteasomen abgebaut wird. Wird diese Kaskade jedoch durch einen Funktionsverlust eines der genannten

Proteine unterbrochen, kommt es ebenfalls zu einer nukleären Akkumulation von beta-catenin. Eine solche unkontrollierte, chronische Aktivierung des Signalweges, z.B. aufgrund von Mutationen einzelner Bestandteile, wird als ein grundlegender Schritt bei der Karzinogenese des sporadischen CRC angesehen (Reya, Clevers et al. 2005). Etwa 60-85% aller kolorektaler Karzinome weisen eine Mutation des APC-Gens und einen damit verbundenen Funktionsverlust dieses Tumorsuppressorgens auf (Miyoshi, Nagase et al. 1992, Kinzler and Vogelstein 1996, Rowan, Lamlum et al. 2000). Die APC-Genmutation gehört zu den frühesten und häufigsten Ereignissen bei der Entstehung des CRC, aber auch Mutationen im beta-catenin-kodierenden Gen CTNNB1 wurden beschrieben (Kitaeva, Grogan et al. 1997, Morin, Sparks et al. 1997, Lustig and Behrens 2003). Dem beta-catenin, als einer der wichtigsten Mediatoren des Signalweges, kommt eine herausragende Bedeutung zu. Durch die Aktivierung akkumuliert beta-catenin in der Zelle, gelangt durch eine Translokation in den Zellkern und kann dort an die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF-1 (T-cell-transcription-factor/lymphoid-enhancing-factor) binden. Dadurch werden Zielgene des Signalweges aktiviert, welche für Proliferation und das Überleben der Zelle notwendig sind. Wichtige Zielgene sind unter anderem Myc (He, Sparks et al. 1998, van de Wetering, Sancho et al. 2002) und Cyclin D1 (Tetsu and McCormick 1999, Hult, Wang et al. 2004), denen eine Schlüsselfunktion bei der Zellteilung zukommt.

Es gibt Hinweise darauf, dass der Wnt-Signalweg auch indirekte Einflüsse auf die chromosomale Instabilität (CIN) von Tumorzellen haben könnte (Hadjihannas, Bruckner et al. 2006, Aoki, Aoki et al. 2007, Rusan and Peifer 2008). Die CIN, als häufigste Form der genetischen Instabilität maligner Tumoren (Lengauer, Kinzler et al. 1998) findet sich bei den meisten Karzinomen, so auch beim CRC (Jallepalli and Lengauer 2001). Sie umfasst neben strukturellen chromosomalen Aberrationen auch numerische Aberrationen, die An- oder Polyploidie, d.h. das Fehlen oder zu viel Vorhandensein eines einzelnen Chromosoms. Es ist davon auszugehen, dass eine APC-Mutation mit der Entwicklung einer CIN assoziiert ist. Embryonale Stammzellen mit homozygoter Mutation des APC-Gens wiesen Aneuploidie auf und akkumulierten neu arrangierte Chromosomen (Kaplan, Burds et al. 2001). Dabei scheint der Verlust von APC die Entstehung einer Polyploidie durch einen Defekt in der Mitose und der Apoptose zu begünstigen (Dikovskaya, Schiffmann et al. 2007).

## 1.5 Das Konzept der migratorischen Tumorstammzellen

Als ein Modell für die molekularen Mechanismen bei der Progression des CRC hat sich vor einigen Jahren das Konzept der migratorischen Tumorstammzellen entwickelt (Brabletz, Jung et al. 2005). Dieses versucht am Beispiel des kolorektalen Karzinoms Konzepte der Tumorstammzellen mit der Invasion und Metastasierung zu verknüpfen. Für den Vorgang der Metastasierung müssen die abgesiedelten Zellen reversible Eigenschaften aufweisen, um den unterschiedlichen Ansprüchen der wechselnden Umgebung gerecht zu werden. Das Absiedeln aus dem Primärtumor, die Disseminierung durch das Blut- und Lymphsystem und die Entwicklung einer Metastase in einer anderen Umgebung erfordern ein hohes Potential dieser Zellen. Die Akkumulation von genetischen Veränderung bei der Entstehung von Tumorzellen allein, wie es bei dem Konzept der Adenom-Karzinom-Sequenz (Vogelstein, Fearon et al. 1988) beschrieben wird, kann diese komplexen und wechselnden Ansprüche an die disseminierenden Tumorzellen nur unzureichend erklären. Schließlich sind es eher dynamische Veränderungen der Zelladhäsion, beta-catenin-Expression und Differenzierung, die bei der Progression des CRC von Bedeutung zu sein scheinen (Barker and Clevers 2001). Nach dem Tumorstammzellkonzept könnten vielmehr Zellen mit Eigenschaften von Stammzellen für die Initiierung der Metastasierung verantwortlich sein. Typische Eigenschaften von Stammzellen sind Selbsterneuerungsfähigkeit und Differenzierungskapazität (Reya, Morrison et al. 2001). Diese Merkmale treffen im Wesentlichen auch auf maligne Tumorzellen zu. Nach dem Tumorstammzellkonzept ist davon auszugehen, dass Tumoren eine Stammzellpopulation aufweisen, welche den Ursprung des malignen Wachstums darstellt (Clarke, Dick et al. 2006). Als Erweiterung entstand das Modell der migratorischen Tumorstammzellen (Brabletz, Jung et al. 2005), die aus den sogenannten stationären Tumorstammzellen entstehen und zwei typische Fähigkeiten vereinen: Stammzeleigenschaften und epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). Jene Zellen, die ihre Stammzeleigenschaft erhalten und die EMT durchlaufen haben, gelten als migratorische Tumorstammzellen. Die Arbeitsgruppe um Brabletz et al. beschreibt ein biphasisches Expressionsmuster, welches zwei Gruppen von exprimierten Genen enthält. Hierzu gehören einerseits Gene, die für die Stammzeleigenschaft und die Proliferation unerlässlich sind. Sie werden früh und während allen Schritten der Progression exprimiert. Durch ihre Selbsterneuerungsfähigkeit und die damit

verbundene längere Lebensdauer verfügen diese Zellen über ausreichend Zeit Mutationen und chromosomale Aberrationen zu erleiden (Radtke and Clevers 2005). Die zweite Gruppe besteht aus Genen, die für die EMT und Disseminierung benötigt werden. Sie werden spät und auch nur vorübergehend exprimiert (Brabletz, Jung et al. 2005). Die EMT wird momentan als eine wesentliche Voraussetzung für die Metastasierung angesehen. Viele experimentelle Hinweise deuten darauf hin, dass eine erhöhte Wnt-Aktivität in Zellen an der Invasionsfront eine EMT induzieren kann (Mariadason, Bordonaro et al. 2001, Kim, Lu et al. 2002, Muller, Bain et al. 2002). So konnte gezeigt werden, dass nukleäres beta-catenin EMT-assoziierte Zielgene aktivieren kann (Conacci-Sorrell, Simcha et al. 2003). Zudem führt beta-catenin zu einer Stimulation von Survivin, wodurch die Zellen einen Stammzell-ähnlichen Phänotyp erhalten (Zhang, Otevrel et al. 2001, Kim, Plescia et al. 2003). Somit übernimmt der Wnt-Signalweg eine doppelte Funktion bei der Tumorprogression: Induktion von EMT und Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften. Die Voraussetzung für eine Zelle, eine EMT zu durchlaufen, erfordert zwei vorausgehende Schritte. Zunächst bedarf es einer chronischen Aktivierung (z. B. durch eine APC-Mutation) des Wnt-Signalweges in den somatischen Stammzellen. Die in den basalen Krypten des Dickdarmepithels befindlichen Zellen werden zu diesem Zeitpunkt als stationäre Tumorstammzellen bezeichnet. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Deregulierung des Wnt-Signalweges durch die Aufhebung von APC im adulten Darmgewebe zu einem Phänotyp führt, der an die Tumorgenese erinnern lässt (Sansom, Reed et al. 2004). Barker et al. konnten in einem Mausmodell nachweisen, dass die Deletion von APC in Stammzellen in den basalen Krypten des Dickdarmepithels zu einer Transformation dieser Zellen führt und es dadurch zur Ausbildung von (Makro-) Adenomen innerhalb weniger Wochen kommt (Barker, Ridgway et al. 2009). Bereits in kleinsten Adenomen lassen sich mit großer Häufigkeit APC-Mutationen nachweisen (Powell, Zilz et al. 1992). In einem zweiten Schritt verstärkt sich in den eben beschriebenen stationären Tumorstammzellen aufgrund weiterer Faktoren die Wnt-Aktivität, wodurch sich die EMT in den Zellen abspielen kann. Insbesondere beim kolorektalen Karzinom zeigt sich EMT durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges an der Invasionsfront, wobei nukleäres beta-catenin als Endpunkt des Signalweges als Nachweis einer Wnt-Aktivierung dienen kann. Dabei ist bemerkenswert, dass die Anzahl von Tumorzellen im Bereich der Invasionsfront welche nukleäres beta-catenin akkumulieren (nach diesem Konzept als MCS anzusehen) mit der Metastasierung und dem schlechten

Überleben korreliert (Ueno, Murphy et al. 2002, Ueno, Price et al. 2004). Erst durch die stattgefundene EMT ist es den epithelialen Zellen möglich, sich aus Zell-Zell-Kontakten zu lösen und aus dem Tumor zu disseminieren. Der Verlust von funktionellem E-Cadherin und der Erwerb von mesenchymalen Markerproteinen wie Fibronectin oder Vimentin können Indikatoren für einen Verlust des epithelialen Phänotyps und für einen Wechsel zu einem mesenchymalen Phänotyp sein (Korinek, Barker et al. 1997).

Bis zur Entstehung einer soliden Fernmetastase vergehen oftmals mehrere Monate bis Jahre. In dem beschriebenen Konzept der migratorischen Tumorstammzellen könnten die Zellen demnach einen Ruhezustand („*dormancy*“) durchlaufen, bevor sie letztlich den Prozess der mesenchymalen-epithelialen-Transition (MET) durchlaufen. Deren Initiierung wird letztlich am ehesten durch das Mikromilieu der Zelle getriggert (Barker and Clevers 2001). Durch den Prozess der MET, wodurch die Zellen ihren ursprünglichen Charakter einer epithelialen Zelle zurück erhalten, gewinnen sie erneut die Fähigkeit der Proliferation und Differenzierung. Erst dadurch kann es zur Entstehung eines lokalen Rezidives oder einer Metastase kommen.

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Das Ziel der Dissertation war die Detektion, Phänotypisierung und genomische Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen im KM und in LK von Patienten mit kolorektalen Karzinomen.

Mit Hilfe einer simultanen Färbung von epithelialen Tumormarkern und beta-catenin sollten eine Phänotypisierung der isolierten Zellen erreicht und durch die Lokalisierung des exprimierten beta-catenin Rückschlüsse auf die Wnt-Aktivität der Tumorzellen gezogen werden, womit letztlich disseminierte Tumorzellen mit aktiviertem Wnt-Signalweg identifiziert werden könnten.

Mithilfe der komparativen genomischen Hybridisierung der identifizierten Tumorzellen galt es, mögliche Zusammenhänge zwischen genotypischen und phänotypischen Merkmalen aufzuzeigen und auf diesem Wege eine für die Metastasierung kolorektaler Karzinome relevante Subpopulation von disseminierten Tumorzellen zu identifizieren.

## **2 Material und Methoden**

Die Aufbereitung der Proben, die Knochenmarkaspiration und LK-Disaggregation, sowie die Detektion von DTC wurde durchgeführt wie bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben (Hosch, Kraus et al. 2000, Hosch, Stoecklein et al. 2001).

Vor Beginn der Studie wurde die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf um ein Votum gebeten und es wurden gegen die hier durchgeführten Untersuchungen keine Bedenken geäußert. Alle untersuchten Patienten wurden entsprechend aufgeklärt und haben vor Entnahme des menschlichen Materials zu Studienzwecken schriftlich ihre Erlaubnis erteilt. Die Nummer des Ethikvotums lautet 2316 (2/2004).

### **2.1 Aufbereitung des Knochenmarks**

Die Aspiration von KM erfolgte unter sterilen Bedingungen im Rahmen der operativen Einleitungsphase, noch bevor die eigentlichen operativen Maßnahmen begonnen wurden. Dabei wurde den Patienten etwa 2-10 ml KM aus dem vorderen Beckenkamm in üblicher Technik entnommen. Das KM wurde anschließend auf zwei 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und mit Hank's Salzlösung aufgefüllt, so dass ein Verhältnis von 1:1 entstand. Anschließend wurde 10 min bei 170 g zentrifugiert, damit sichtbare Verunreinigungen entfernt werden konnten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in ca. 20 ml PBS-Puffer resuspendiert und in einem mit etwa 20 ml Ficoll gefüllten Falcon-Röhrchen überschichtet. Nach 30 min Zentrifugation bei 550 g wurde die Interphase vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 20 ml PBS-Puffer resuspendiert, nochmals bei 365 g für 10 min zentrifugiert und in ca. 2 ml PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zellkammer ermittelt. Gegebenenfalls notwendige Verdünnungen erfolgten mit PBS-Puffer. Jeweils 250.000 Zellen wurden pro Feld eines Haft-Objektträgers auftragen. Die Objektträger wurden 1h für die Zellsedimentation stehengelassen und nach Abzug des PBS-Puffers über Nacht getrocknet.

## **2.2 Aufbereitung der Lymphknoten**

Die vom Operateur während der systematischen Lymphadenektomie entfernten makroskopisch unauffälligen LK wurden zunächst mit einem Skalpell geteilt. Eine Hälfte gelang zur routinemäßigen pathologischen Untersuchung, die andere Hälfte wurde mit PBS gewaschen und zeitnah im Labor bearbeitet. Dazu wurden sie zunächst mit einem sterilen Skalpell von Fettgewebe befreit, zerkleinert und dann in der Medimachine zusammen mit 1000 µl 1x PBS für 45 s disaggregiert. Anschließend wurde die entstandene Suspension entnommen, mit ca. 8 ml 1xPBS aufgefüllt und bei 1500 rpm für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet noch mal mit 8 ml 1xPBS resuspendiert und bei 1500 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgenommen. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zellkammer ermittelt. Gegebenenfalls notwendige Verdünnungen erfolgten mit PBS-Puffer. Jeweils 250.000 Zellen wurden pro Feld eines Haft-Objektträgers auftragen. Die Objektträger wurden 1 h für die Zellsedimentation stehengelassen und nach Abzug des PBS-Puffers über Nacht getrocknet.

## **2.3 Zellkultur**

Zur Verwendung kam die Kolonkarzinomzelllinie SW480 (ATCC), die von einem Kolonkarzinom des Stadiums Duke B abstammt. Sie wurde in 200mL fassenden Kulturflaschen mit 50ml Wachstumsmedium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Das Medium setzte sich aus RPMI 1640 Medium und Glutamax zusammen. Der Wechsel des Mediums und das Splitten der Zellen mit Hilfe von Trypsin erfolgten nach üblicher Handhabung.

### **2.3.1 Wundheilungsversuch**

Hierbei wurde ein bereits etabliertes Protokoll übernommen und für die SW480-Zellen entsprechend angepasst (Liang, Park et al. 2007).

Die SW480-Zellen wurden zunächst in 6-Loch-Platten kultiviert, bis sie eine Konfluenz von ca. 90% erlangten. Am Tag 1 des Versuchs wurden die Zellen mit PBS gespült und

anschließend mit einem 0,1%-igen FCS-Medium über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde eine Linie mit einem farbigen Markierstift auf der Außenseite des Lochplattenbodens gezogen. Diese diente als Orientierung für spätere Aufnahmen. Anschließend wurde mit der Spitze einer 1000 $\mu$ l-Pipette auf der Innenseite des Bodens orthogonal zu diesen Orientierungslinien ein streifenförmiger Teil der Zellen abgekratzt. Die verbliebenen Zellen wurden anschließend noch mal mit PBS-Puffer gespült. Für das weitere Wachstum fügte man das Medium zu. Zwei der 6-Loch-Platten wurden sofort, die anderen im Abstand von jeweils 24 h mit 1% PFA fixiert. Es folgte eine einfache Immunfluoreszenzfärbung, wie sie unter 2.4.1 beschrieben wird.

## **2.4 Immunzytochemie**

### **2.4.1 Einfache Immunfluoreszenzfärbung**

Die Präparate wurden zunächst 40 min mit 10%igen humanen AB-Serum behandelt, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Der Primärantikörper gegen beta-catenin wurde in einer Endkonzentration von 4 $\mu$ g/ml eingesetzt. Als Negativkontrolle diente der IgG<sub>1</sub> Antikörper X0903. Die Präparate wurden 45 min mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden sie für 3x 5 min in PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper anti-Kaninchen-Cy3 wurde im Dunkeln für 30 min eingesetzt. Zuletzt wurde noch 3x 5 min mit 0,2%-igen Tween 20 gewaschen.

### **2.4.2 Doppelte Immunfluoreszenzfärbung**

Das Protokoll zur Färbung der Haftobjektträger von KM bzw. LK unterschied sich lediglich bei der Wahl des zweiten Primärantikörpers. In der Tabelle 2 wird das Protokoll schematisch dargestellt.

	<b>KM</b>	<b>LK</b>
1. Primär-AK	Anti-catenin-beta (Kaninchen)	Anti-catenin-beta (Kaninchen)
Negativkontrolle	X0903	X0903
1. Sekundär-AK	Anti-Kaninchen-Cy3	Anti-Kaninchen-Cy3
2. Primär-AK	A45-B/B3 (Maus)	Ber-Ep4 (Maus)
Negativkontrolle	MOPC 21	MOPC 21
2. Sekundär-AK	Alexa Fluor 488 (Anti-Maus)	Alexa Fluor 488 (Anti-Maus)

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Antikörper bei der doppelten Immunfluoreszenzfärbung von LK- und Knochenmarkpräparaten**

Die Präparate wurden zunächst 5 min mit 0,5%-igen TritonX-100/10%-igen humanen AB-Serum blockiert, 3x 3 min in PBS gewaschen und dann nochmals für 20 min in 0,1%-igen TritonX-100/10%-igen AB-Serum behandelt.

Der erste Primärantikörper Anti-catenin-beta wurde in einer Verdünnung von 4 µg/ml eingesetzt. Als Negativkontrolle diente der IgG<sub>1</sub> Antikörper X0903. Die Inkubation dauerte 45 min und fand bei RT statt. Anschließend wurden die Präparate 3x 3 min in PBS gewaschen. Der erste Sekundärantikörper anti-Kaninchen-Cy3 wurde im Dunkeln für 30 min inkubiert. Es folgte ein Waschschrift für 3x 3 min und anschließend noch eine weitere Behandlung mit 10%-igen AB-Serum für 20 min.

Der zweite Primärantikörper A45-B/B3 (Ber-Ep4 bei LK) sowie die Negativkontrolle mit MOPC-21 wurden 45 min inkubiert. Anschließend wurden die Präparate nochmals 3x 3 min in PBS gewaschen. Der zweite Sekundärantikörper ALEXA Fluor 488 wurde nun 30 min eingesetzt. Als letzter Schritt wurde das Präparat noch 3x 5 min gewaschen.

## **2.5 Immunhistochemie: ABC-Methode**

Die ABC-Methode wurde zur Färbung von Paraffinschnitten verwendet. Zu Beginn wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert. Dafür wurden sie 3x für je 10min mit Xylol behandelt. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe, um den Schnitten die entzogene Flüssigkeit wieder zu zuführen. Je 2x 5 min wurden sie mit 99,5%, 96%, 80% Ethanol und dann noch mal für 1x 5 min mit 70% Ethanol inkubiert. Zuletzt wurden sie noch 5 min in destilliertes Wasser gegeben. Es folgte die Demaskierung der Epitope in einer speziellen Lösung (*retrieval solution*) für 30 min bei 95°C. Nachdem diese Lösung 20

min bei Raumtemperatur (RT) abgekühlte, wurden die Schnitte noch mit 1x PBS für 5 min gewaschen. Nun wurde die endogene Peroxidase für 30 min mit einer 0,3-% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS-Lösung bei RT inhibiert.

Das genutzte Kit enthielt ein Serum, welches aus der gleichen Spezies gewonnen wurde, aus der der biotinylierte Sekundär-AK stammte. Dieses diente zum Blocken der Schnitte und wurde für 20 min angewandt. Anschließend wurden die Präparate mit dem Primärantikörper, der gegen beta-catenin gerichtet ist, inkubiert. Der erste Primärantikörper Anti-catenin-beta wurde dabei in einer Konzentration von 4µg/ml eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Isotypenkontrolle X0903. Die Schnitte wurden für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 3x 3 min in PBS gewaschen. Das Kit enthielt einen biotinylierten Sekundärantikörper, der für 30 min bei RT eingesetzt wurde. Es handelte sich um einen Anti-Kaninchen-AK. Es folgte das ABC-Reagenz für 30 min bei RT, welches an diesen biotinylierten Antikörper bindete. Um das entstandene Produkt darzustellen, wurden die Schnitte im Anschluss noch 10 min mit dem DAB-Substrat inkubiert. Dieser Schritt sollte im Dunkeln erfolgen. Daraufhin wurde 2x 5 min mit Leitungswasser gewaschen. Um die Färbung zu vollenden, wurden noch die Zellkerne mit einer Mayers-Hämalaun-Färbung dargestellt. Nach 15 s Inkubation wurden die Schnitte 15 min in Leitungswasser gewaschen. Zuletzt folgte eine aufsteigende Alkoholreihe, die je 1 min mit 70%, 80% und 99% Ethanol durchgeführt wurde. Dadurch wurde den Präparaten Wasser entzogen. Vor dem Eindeckeln mit Entellan (Lösung von Polymeren in Xylol) wurden die Schnitte noch 2 min mit reinem Xylol behandelt.

## **2.6 Isolierung von Einzelzellen**

Zur Isolierung der DTC wurde das von Klein et al. beschriebene Verfahren angewandt (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999), welches im Folgenden noch weiter modifiziert wurde (Stoecklein, Erbersdobler et al. 2002). Zum Auffinden CK-positiver Zellen wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop verwendet, an dem ein Mikromanipulator befestigt war. Die Haftobjektträger wurden dafür eingespannt, mit einem Pick-Puffer (PBS + 0,5% Igepal) beschichtet und das Präparat nach positiven Zellen durchsucht. Die positiven Zellen wurden mit Hilfe einer angespitzten feinen Glaskapillare von umliegenden Zellen isoliert, aufgesaugt und auf einen mit Pick-Puffer beschichteten

Objektträger transferiert. Dort wurde die Zelle mit einer Pipette aufgezogen und anschließend in ein vorbereitetes 200 µl Reaktionsgefäß gegeben. Das Reaktionsgefäß enthielt ein 2µl Proteinase K Mix:

0,2 µl	OnePhorAll plus Puffer
0,13 µl	Tween 10%
0,13 µl	Igepal 10%
0,26 µl	Proteinase K 10 mg/ml
1,28 µl	H <sub>2</sub> O

In diesem Proteinase K- Mix wurde das Protein der Zelle 10 h bei 42°C in einer PCR-Maschine verdaut. Es folgte die Inaktivierung der Proteinase K bei 80°C für 10 min.

### 2.6.1 Einzelzell-PCR

Verwendet wurde hier das von Klein et al. bereits 1999 etablierte Protokoll (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999). Hierbei wurde zunächst das Genom mit Hilfe des Restriktionsenzym Mse I (Schnittstelle: T`TAA) für 3 h bei 37°C in einer MJ-Research PCR-Maschine fragmentiert. Zu der Proteinase K verdauten Zelle wurde Folgendes hinzugegeben:

0,2 µl	OnePhorAll plus Puffer
0,2 µl	Mse I 50 U/µl
1,6 µl	H <sub>2</sub> O

Die Inaktivierung des Mse I-Enzyms geschah bei 65°C für 5 min. An die durch Mse I entstanden Überhänge (5`TA) wurde ein Adapter ligiert. Dieser Adapter musste vorher in einer weiteren Reaktion generiert werden, indem zwei Oligonukleotide (LIB1 und ddMSE11) unter langsamem Abkühlen eine Basenpaarung eingingen. Dafür benutzte man folgendes Reaktionsgemisch:

0,5 µl	LIB1 100 µM
0,5 µl	ddMse11 100 µM
0,5 µl	OPA
1,5 µl	H <sub>2</sub> O

Ein vorprogrammierter Gradient in der PCR Maschine wurde dafür benutzt:

65°C bis 15°C für je 1 min pro Temperaturschritt, wodurch eine Basenpaarung erreicht wird. Der entstandene Adapter zusammen mit 1 µl T4 DNA-Ligase und 1 µl ATP 10 mM wurden dem Reaktionsgefäß mit der Mse I fragmentierten Zellen hinzugegeben und über Nacht bei 15°C ligiert.

Anschließend wurde folgender PCR-Mix hinzugefügt:

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

Um ein Auffüllen der 3´rezessiven Enden zu erreichen, wurde zuerst eine Inkubation bei 68°C für 3 min durchgeführt, wodurch eine komplementäre LIB1-Primerbindungsstelle entstand.

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

Das Amplifikat war bei -20°C stabil und diente im weiteren Verlauf als Ausgangsmaterial für alle Untersuchungen der Einzelzellen.

## 2.6.2 Kontroll-PCR

Der Nachweis spezifischer genomischer Mse I-Fragmente diente der Bestimmung der Qualität des primären PCR-Produktes. Beim Erhalt von zwei positiven spezifischen Kontroll-PCR auf repräsentative Mse I-Fragmente, konnte von einer ausreichend guten Qualität ausgegangen werden. Der Ansatz für die Kontroll-PCR:

1 µl	PCR-Puffer (10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM Tris pH 8,5, 500 mM KCl, dNTP 1 mM)
0,5 µl	Primer 1 (3')
0,5 µl	Primer 2 (5')
0,25 µl	BSA 100%
0,1 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
7,75 µl	H <sub>2</sub> O

Für die Einzelzellamplifikate wurden die Primerpaare p53 (Exon 2/3) und CK 19 verwendet. Diese sind im Einzelnen unter 2.9.3 ersichtlich. Das Programm für die PCR im MJ-Research lautete:

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

## 2.6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die verwendete Gelkonzentration betrug 2% Agarose in TBE-Puffer. Die PCR-Proben wurden mit 1 µl SYBR-Gold und 3 µl *Loading-Dye* (0,3% Orange G, 25% Ficoll in TBE) gemischt und in die Geltaschen geladen. Das Elektrophorese-Netzgerät wurde auf 100 V (400 mA) eingestellt und die Proben 45 min mit einem Horizontal-Gelelektrophorese-System aufgetrennt. Die Aufnahme erfolgte mit einer entsprechenden Fluoreszenzkamera.

Beispielhaft wird das Ergebnis einer Gelelektrophorese einer Kontroll- PCR in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2: Kontroll-PCR nach genomischer Reamplifikation von DNA aus disseminierten Tumorzellen.**

Die Qualität des primären PCR-Produktes wird durch den Nachweis spezifischer MSE-I-Fragmente erbracht. Die Beschriftung in der Abbildung erklärt sich wie folgt: L: Leiter, Po: Positivkontrolle, T1: Tumorzelle 1 (mit Verwendung des *Primers* CK19 und p53), P1: peripherer Blutlymphozyt, T2: Tumorzelle 2 (CK19 und p53), P2: zwei periphere Blutlymphozyten, T3: Tumorzelle 3 (CK19, p53 ohne spezifische Bande), P3: peripherer Blutlymphozyt, N: Negativkontrolle.

Beim Erhalt von zwei positiven spezifischen Kontroll-PCR auf repräsentative MSE I-Fragmente, kann von einer ausreichend guten Qualität ausgegangen werden. Wie bei der Tumorzelle 3 ersichtlich erhielt man nur das Produkt des Primers CK 19.

#### 2.6.4 Markierungs-PCR

Die Reamplifikation der primären PCR-Produkte erfolgte unter Zugabe von Deoxynukleotid-Derivaten (Digoxigenin-11-dUTP zur Markierung der Einzelzelle und Biotin-16-dUTP zur Markierung der Referenz-DNA). Durch fluoreszierende Antikörper gegen Digoxigenin, bzw. Biotin konnten die Reamplifikate nach der Hybridisierung auf humane Metaphase-Chromosomen sichtbar gemacht werden. Der Ansatz bestand aus:

4 µl	Expand-Long-Template Puffer 1
6 µl	LIB1 10 µM
1,4 µl	7/8 dNTP-Mix (8,75 mM dTTP; je 10 mM dATP, dCTP und dGTP)
1,75 µl	1 mM Biotin-dUTP (Referenz) oder 1 mM Digoxigenin-dUTP (Tumor)
0,5 µl	Taq-Polymerase 5 U/µl
26,35 µl	H <sub>2</sub> O

Diesem Mix wurde 0,5 µl primäres PCR-Produkt als Vorlage zugegeben. Das Programm für das MJ-Research PCR-Gerät hatte folgenden Ablauf:

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

Nach der Reamplifikation wurde der LIB1-Primer durch einen Restriktionsverdau mit Tru I (Isozym von Mse I, Schnittstelle entsprechend T TAA) abgetrennt. Dadurch sollten mögliche Interferenzen bei der CGH ausgeschlossen werden. Dem Reamplifikat (40 µl) wurde 2 µl Puffer R und 2 µl Tru I (50 U/µl) zugegeben und bei 65°C für 23 h inkubiert.

### 2.6.5 Präparation von Metaphasechromosomen

Einem männlichen Spender wurden 20 mL venöses Blut in ein heparinisiertes Röhrchen abgenommen und einem vorbereiteten Medium hinzugefügt (250 mL RPMI Medium mit 2,5 ml Glutamin, 1% FCS und 5 ml PenStrep und 3 ml Phytohämagglutinin). Das Blut-Medium-Gemisch wurde anschließend auf 10 ml Kulturflaschen verteilt und für 72 h in einem CO<sub>2</sub>- Brutschrank bei 37°C inkubiert. In diesen 72 h wurden die Kulturflaschen täglich einmal leicht geschwenkt. 100 µl Colcemidlösung (10 µg/ml) wurden 1 h vor Ende der Inkubation zu jeder Lymphozytenkultur dazugegeben. Anschließend wurden die Lymphozytenkulturen auf 15 ml Falcons verteilt und 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 10 ml hypotoner 0,075 M KCL-Lösung aufgenommen und für 8 min bei 37°C lysiert. Die lysierten Zellen wurden

erneut abzentrifugiert und mit eiskaltem Fixativ (7,5 ml Methanol, 2,5 ml 100%igem Eisessig) vorsichtig resuspendiert. Der letzte Schritt musste ggf. bis zur völligen Klarheit der Lösung wiederholt werden.

Vor dem Auftropfen dieser Lymphozyten-Lösung auf den Objektträger mussten diese noch vorbehandelt werden, indem sie in einer Küvette 24h in 70%igen Ethanol entfettet und gereinigt wurden. Anschließend wurde der Alkohol abgegossen, durch destilliertes Wasser ersetzt und auf 4°C abgekühlt.

Das Auftropfen der Lymphozyten auf die Glasobjektträger erfolgte mit einer 100 µl Pipette aus ca. einem Meter Höhe. Dadurch war eine ausreichende Verteilung der einzelnen Chromosomen gewährleistet. Die Objektträger wurden gleich im Anschluss in einen 37°C warmen mit feuchten Tüchern ausgelegten Inkubator gegeben, so dass das restliche Fixativ verdampfen konnte. Auf diese Weise wurden erfahrungsgemäß die besten Ergebnisse erreicht.

## 2.6.6 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Die nach der Markierungs-PCR erhaltenen Reamplifikate von Test- und Referenz-DNA mussten über Nacht bei -20°C präzipitiert werden:

40 µl	PCR-Produkt der Tumor- DNA
40 µl	PCR-Produkt der Referenz- DNA
100 µl	1 µg/µl C <sub>0</sub> t-1 DNA
10 µl	10 µg/µl Heringssperma DNA
19 µl	3 M NaAc pH 5,2
400 µl	100% EtOH

Nach dieser Fällung wurde das Präzipitat 45 min bei 4°C und 15.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, das DNA-Pellet einmal mit 700 µl Ethanol 70% gewaschen, erneut 15 min zentrifugiert und luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 7 µl 100%-igem Formamid in einem *Thermocycler* bei 37°C mindestens 15 min gelöst und anschließend mit 7 µl Master-Mix (4x SSC, 30% Dextran Sulfat) gemischt. Die DNA-Probe wurde in einem Heizblock bei 78°C für 6 min denaturiert und für 1 h bei 37°C

inkubiert, so dass die cot-1 DNA mit den repetitiven Einheiten der DNA hybridisieren konnte. Dadurch sollte der negative Einfluss dieser repetitiven Einheiten auf die Auswertung der CGH vermindert werden. Ein geeigneter Metaphase-Objektträger wurde parallel zu der oben beschriebenen Herstellung der DNA-Probe aufbereitet. Die Objektträger wurden ggf. von Zytoplasmaresten, Proteinen und RNA befreit und die chromosomale DNA denaturiert werden. Hierfür wurden die Objektträger zunächst 5 min in 2x SSC-Puffer äquibriert, anschließend 2 min in einer 37°C warmen Pepsin-Lösung, bestehend aus 50 µl Pepsin-Lösung (100 mg/ml in H<sub>2</sub>O) in 100 ml HCl (10 mM), inkubiert. Dieser Verdau wurde mit zweimaligem Waschen in 1x PBS beendet. Die Fixierung mit 200 µl PFA-Lösung (180 µl 1x PBS + 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µl 10% PFA) diente der Stabilisierung der Chromosomenstruktur, da diese im weiteren Verlauf erhalten bleiben musste. Vor der Denaturierung wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 100% Ethanol; jeweils eisgekühlt) dehydriert. In 100 ml, 70°C warmer Formamid-Lösung (70 ml 100% Formamid, 10 ml 20x, 20 ml H<sub>2</sub>O, eingestellt auf pH 7,0) wurde die DNA auf den Objektträgern für 1 min 15 s denaturiert. Diese Zeit sollte durch Erfahrungswerte an die Metaphase-Chromosomen angeglichen werden. Eine aufsteigende Alkoholreihe diente wiederum der Dehydrierung, so dass nun die fluoreszenz-markierte DNA-Proben aufgetragen werden konnten. Diese Stellen wurden mit einem 24 x 18 mm großen Deckgläschen und Fixogum luftdicht abgeschlossen. Die Hybridisierung wurde mindestens über zwei Nächte in einem Wasserbad bei 37°C durchgeführt. War die Hybridisierung abgeschlossen, wurde das Deckgläschen entfernt und das über dem Hybridisierungsfeld befindliche Dextransulfat in 4x SSC abgewaschen. Anschließend wurde der Objektträger je dreimal in Formamid-Lösung (150 ml Formamid 100%, 30 ml 20x SSC, 120 ml H<sub>2</sub>O) und anschließend in 1x SSC bei 42 °C gewaschen. Es folgte eine kurze Äquibrierung mit 1x PBS + 0,2% Tween. Vor der Inkubation mit den Antikörpern, wurden Proteinbindungsstellen 45 min mit 1 ml 3% Superblock-Lösung (1x PBS pH 7,5, 0,2% Tween, 3% BSA Fraktion V, 5% FCS) gesättigt. Diese wurde anschließend mit 1x PBS + 0,2% Tween abgewaschen. Es wurde eine Mischung aus 20 µl Anti-Digoxigenin-FITC, 2 µl Avidin-Cy 3 und 185 µl 1% Superblock-Lösung (1x PBS pH 7,5, 0,2% Tween, 1% BSA Fraktion V, 5% FCS) hergestellt, mit der die Objektträger für 45 min bei 37°C im Ofen inkubiert wurden. Durch dreimaliges Waschen bei 42°C in 4x SSC + 0,2% Tween wurden die nicht gebundenen Fluorochrome entfernt und die Chromosomenbänderung anschließend mit einer

zweiminütigen DAPI Färbung (1ml 4x SSC + 0,2% Tween, 10 µg DAPI) dargestellt. Es folgte ein kurzes Abwaschen mit destilliertem Wasser. Die Objektträger mussten nun gänzlich trocknen und wurden abschließend mit der Zugabe von Vectashield H-1000 eingedeckelt.

### **2.6.7 CGH-Auswertung**

Die Aufnahme der CGH erfolgte durch ein Fluoreszenzmikroskop (Axioplan2), ausgestattet mit einer Kamera, welche einen CCD-Sensor enthielt. Die Auswertung wurde mit der entsprechenden Software MetaSystems Isis durchgeführt. Mit Hilfe dieser Software wurden mindestens zehn geeignete Metaphasen detektiert und jeweils anhand einer Bilderserie mit den Fluoreszenzfiltern DAPI, FITC und Cy3 abgelichtet. Es folgte die Sortierung der einzelnen Chromosomen in jedem der aufgenommenen Metaphasen. Anschließend analysierte die Software jedes einzelne Chromosom sowohl im FITC- (Test-DNA) als auch im Cy3-Kanal (Referenz-DNA) und verglich es auf Abweichungen in der Fluoreszenzintensität. Waren alle zehn Metaphasen sortiert und analysiert, konnte mit der Software ein CGH-Profil erstellt werden, welches die Veränderungen der aus dieser Zelle gewonnenen DNA wiedergab. War das Fluoreszenzintensitätsverhältnis FITC/Cy3 größer als 1,2 bzw. kleiner als 0,8 konnte von einem Gewinn oder Verlust von DNA im entsprechenden Chromosomenabschnitt ausgegangen werden. Um visualisierte kumulative CGH-Profile zu erhalten, wurden die genomischen Aberrationen der einzelnen CGH-Analysen nach den Anleitungen der ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, 1995) entsprechend der Anforderung für das webbasierte CGH-Analyseprogramm Progenetix (<http://www.progenetix.org>) in Tabellenform gebracht.

## **2.7 Statistik**

### **t-Test**

Mit dem Student's *t*-Test wurde überprüft, ob sich die durchschnittliche Anzahl der CGH- Aberrationen zwischen zwei Kollektiven signifikant unterscheidet. Verglichen

wurden die disseminierten Tumorzellen der M0- und M1-Patientenkollektive und die disseminierten Tumorzellen mit der unterschiedlichen beta-catenin-Expression.

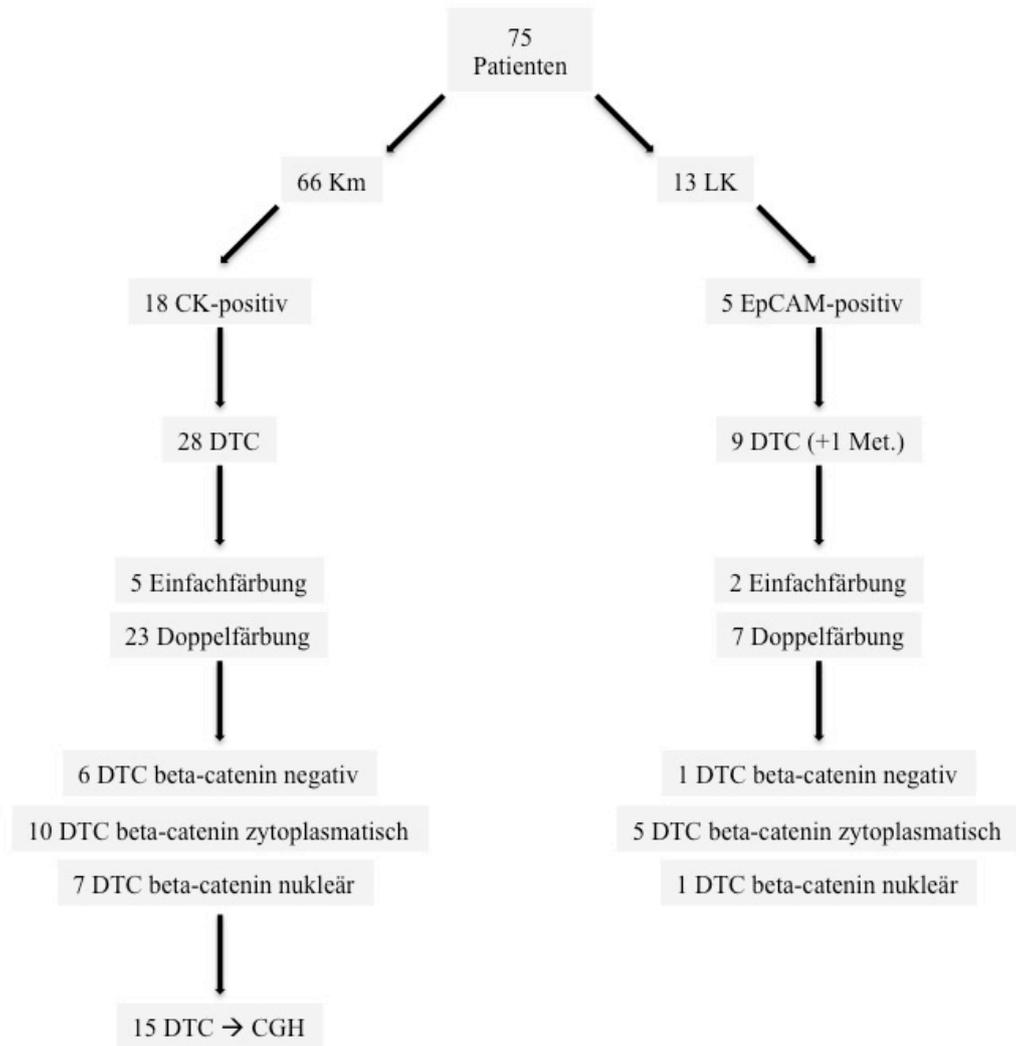
### **Fisher Exact Test**

Der Fisher Exact Test wurde angewendet, wenn die zu vergleichenden Gruppen zu klein für die Verwendung des  $\chi^2$ -Test waren, also weniger als fünf Mitglieder hatten. Dies war insbesondere bei dem Vergleich einzelner CGH-Aberrationen zwischen den disseminierten Tumorzellen und den Primärtumoren des M0-Kollektivs der Fall. Es wurde das Programm der Internetseite <http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact.html> verwendet.

## 2.8 Patientenkollektiv

#	Pat.-Nr.	KM	LK	Lokalisation	T	N	M	G	R	DTC	KM	DTC	LK
1	403	x		Zökum	4	2	0	2	2	4			-
2	405	x		Kolon	3	1	0	2	0	1			-
3	408	x		Rektum	3	2	0	2	0	1			-
4	409	x		Leber	3	0	1	2	0	-			-
5	458	x		Rektum	3	1	0	3	1	-			-
6	469	x		Mamma	4	2	1	3	x	-			-
7	511	x		Rektum	3	0	0	2	0	1			-
8	513	x		Kolon	3	1	0	2	1	-			-
9	526		x	Kolon	3	0	0	3	0	-			-
10	527	x		Leber	x	x	1	x	0	-			-
11	532	x		Kolon	3	2	0	2	0	1			-
12	546	x		Rektum	4	1	0	2	0	-			-
13	549		x	Rektum	3	1	0	2	1	-			-
14	557		x	Rektum	3	2	0	2	0	-			2
15	559	x		Rektum	2	0	0	2	0	-			-
16	560		x	Kolon	3	0	0	2	0	-			3
17	571	x		Rektum	4	1	0	2	1	2			-
18	594	x		Rektum	1	0	0	2	0	-			-
19	604		x	Kolon	2	0	0	2	0	-			-
20	618	x	x	Kolon	3	2	0	3	0	-			-
21	622	x	x	Kolon	4	0	0	2	0	-			2
22	629	x		Kolon	2	0	0	2	0	-			-
23	632	x		Kolon	4	1	0	3	0	-			-
24	660	x		Kolon	2	0	0	2	0	2			-
25	667	x		Kolon	3	0	0	2	0	1			-
26	672	x		LK	3	1	1	2	0	-			-
27	680	x		Leber	3	1	1	3	1	-			-
28	682	x		Rektum	3	2	0	2	0	-			-
29	688	x		Leber	x	x	1	x	x	-			-
30	709	x		Lunge	x	x	1	x	x	-			-
31	717	x		Rektum	3	2	0	2	0	-			-
32	736	x		Kolon	3	2	0	2	0	-			-
33	745	x		Leber	x	x	1	x	x	-			-
34	757	x		Rektum	3	0	0	3	0	-			-
35	780	x		Rektum	2	0	0	2	0	-			-
36	781	x		Lunge	3	1	1	2	x	-			-
37	801	x		Rektum	4	0	0	2	1	-			-
38	803	x		Leber	x	x	1	3	x	-			-
39	807		x	Kolon	2	x	x	x	x	-			-
40	821	x	x	Kolon	3	1	0	2	0	-			2
41	824	x		Leber	4	2	1	3	0	-			-
42	825	x		Leber	2	1	1	2	0	2			-
43	826		x	Leber	4	2	1	3	0	-			-
44	833	x		Leber	x	x	1	x	x	2			-
45	843i	x		Kolon	4	2	0	3	0	-			-
46	845	x		Lunge	4	1	1	2	x	1			-
47	864i	x		Rektum	1	0	0	2	0	-			-

48	865i	x		Rektum	2	0	0	2	0	-	-
49	867	x		Leber	3	2	1	2	0	-	-
50	875	x		Rektum	3	2	0	2	0	-	-
51	878	x		Lunge	4	2	1	x	x	-	-
52	885	x		Rektum	2	0	0	2	0	-	-
53	901	x		Zökum	3	2	0	3	0	-	-
54	916	x		Leber	x	x	1	x	x	2	-
55	918	x		Rektum	1	0	0	2	0	-	-
56	929	x		Peritoneum	3	2	1	3	x	1	-
57	935	x		Leber	3	2	1	3	x	-	-
58	967		x	Kolon	3	0	0	2	0	-	-
59	975		x	Kolon	3	2	0	3	0	-	Met.
60	982	x		Rektum	3	0	0	2	0	2	-
61	993	x		Leber/Knochen	3	2	1	3	1	1	-
62	1004	x	x	Kolon	3	0	0	2	0	1	-
63	1019	x		Rektum	3	0	0	2	0	-	-
64	1029	x		Leber	2	2	1	2	x	2	-
65	1032	x		Leber	x	x	1	x	x	-	-
66	1068	x		Rektum	3	0	0	2	0	-	-
67	1076	x		Lunge	2	0	1	2	0	-	-
68	1100	x		Rektum	4	2	0	2	0	-	-
69	1119	x		Kolon	3	0	0	2	0	-	-
70	1137	x		Rektum	2	0	0	2	0	-	-
71	1139	x		Rektum	3	2	0	2	1	-	-
72	1146	x		Rektum	2	0	0	2	0	-	-
73	1171	x		Kolon	1	0	0	2	3	1	-
74	1172	x		Leber	x	x	1	x	x	-	-
75	1175	x		Leber	x	x	1	x	x	-	-



**Abb. 3: Schematische Übersicht der Untersuchungsergebnisse aller untersuchten KM- und LK-Präparate**

## 2.9 Verwendete Materialien

### 2.9.11 Enzyme und Antikörper

A45-B/B3	Micromet, München
ABC-Kit	Vector lab, Burlingame, USA
ALEXA Fluor 488	Invitrogen, Darmstadt
Anti-beta-catenin RB-1491-P	Neo Markers, Fremont
Anti-DIG-Flourescein	Roche, Mannheim
Anti-Mouse-Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Rabbit-Cy3	Sigma, Hamburg
Avidin-Cy3.5	Rockland, Gilbertsville, USA
Ber-Ep4	Dako, Hamburg
DNA-Polymerase I ( <i>E. coli</i> )	New England Biolabs, Frankfurt
DNA-Pol-Mix	Boehringer, Ingelheim
DNase I	New England Biolabs, Frankfurt
ELF-97 Kit	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Expand Long Template PCR-System	Roche, Mannheim
MOPC 21	Sigma, Hamburg
Mse I hc	New England Biolabs, Frankfurt
Pepsin	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim
Trypsin 0,05%	Invitrogen, Darmstadt
Panscript Taq-Polymerase	PAN Biotech, Aidenbach
Tru I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Z0259	Dako, Hamburg
X0903	Dako, Hamburg

### 2.9.2 Chemikalien

AB-Serum	Biotest, Dreieich
Agarose	Sigma, Hamburg
ATP	Roche, Mannheim
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
BSA für PCR	Roche, Mannheim
Colcemid	Invitrogen, Darmstadt
DAB	Dako, Hamburg
DAPI	Roche, Mannheim

dATP, dCTP, dGTP, dTTP	GE healthcare, München
Dextran Sulfat	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Invitrogen, Darmstadt
Eisessig 100%	Merck, Darmstadt
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol unvergällt	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt	Merck, Darmstadt
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Fixogum	Marabu, Tamm
Formamid	Merck, Darmstadt
Glutamax	Invitrogen, Darmstadt
Hank's Salzlösung	Biochrom KG, Berlin
Hering Sperm DNA	Invitrogen, Darmstadt
Humane C0t-1 DNA	Invitrogen, Darmstadt
Igepal	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Invitrogen, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Nukleasefreies Wasser	Invitrogen, Darmstadt
OPA Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
RPMI mit L-Glutamin	Invitrogen, Darmstadt
SYBR Gold	Invitrogen, Darmstadt
Triton-X100	Sigma, Hamburg
Tween 20	Sigma, Hamburg
TRIS	Sigma, Hamburg
Vectashield	Linearis, Hamburg
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

### 2.9.3 Oligonukleotide und Primer

LIB1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
ddMse11	TAA CTG ACA G-dideoxy C
CK 19 for	GAA GAT CCG CGA CTG GTA C
CK 19 rev	TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG
p53 2/3 5'	GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC
p53 2/3 3'	CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA

## 2.9.4 Puffer

20x SSC (Saline-Sodiumcitrat)	NaCitrat 15 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4
4X SSC (Saline-Sodium Citrate)	aus 20X SSC verdünnt; pH = 7,4
2X SSC (Saline-Sodium Citrate)	aus 20X SSC verdünnt; pH = 7,4
7/8 dNTP-Mix:	dATP, dCTP und dGTP (je 10 mM); dTTP (8,75 mM)
<i>Loading-Dye</i>	0,3% Orange G, 25% Ficoll in TBE
OnePhorAll Puffer (OPA) (10X):	TRIS-Acetat (100 mM), MgAc2 (100 mM); KAc (500 mM); pH = 7.5
PBS (Phosphatbuffer-Saline):	Na2HPO4 8,5 mM, KH2PO4 2 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4
PCR-Puffer + dNTPs:	MgCl2 (10 mM); TRIS-HCl (100 mM); KCl (500 mM); dNTPs (1mM); pH = 8,5
TBE (Tris-Borat-EDTA Puffer):	Tris 89 mM, Borat 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3
Hybridisierungsmix für CGH	50% Formamid und 15% Dextransulfat (M > 500000 g/mol) in 2X SSC

## 2.9.5 Geräte

Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Bonn
UV-Transilluminator mit CD-Kamera	INTAS, Göttingen
CCD- Kamera (CGH)	Photometrix, Tucson, USA
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMXA-RF8
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
Horizontal Gelelektrophorese	Invitrogen, Darmstadt
Medimachine	Dako, Hamburg
Mikromanipulator	Microinjector 5242, Eppendorf
MJR PCR-Maschine Peltier Thermal Cycler PTC-200	Bio-Rad, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Schubert und Weiß, München
UV-Schirm	INTAS
Wasserbad	Lauda

## 2.9.6 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen

Falcon

Glas-Küvetten

Haft-Objektträger

Kulturflaschen (Cellstar

Objektträger (Matrand

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 0,2 ml

Transferpipetten

Langenbrinck

Sarsted

Roth

Micromet

Greiner

Langenbrinck

Eppendorf

Sarsted

## 2.9.7 Software

AxioVision 4.5

Isis - CGH Software

Progenetix

Zeiss, Göttingen

MetaSystems, Altlußheim

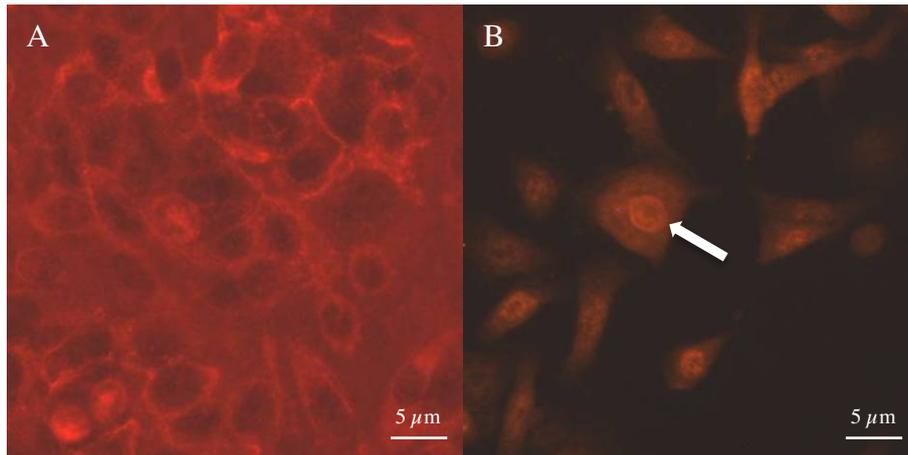
<http://www.progenetix.net>

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Expression von beta-catenin in der kolorektalen Tumorzelllinie SW480**

Die Untersuchung von nukleärem beta-catenin als Indikator eines aktivierten Wnt-Signalweges ist eines der Ziele dieser Arbeit. In Vorversuchen mit der kolorektalen Tumorzelllinie SW480 gelang es, ein Protokoll zur immunzytochemischen Anfärbung von beta-catenin zu etablieren. Des Weiteren dienten diese Versuche als Referenz für die späteren Einzelzell-Untersuchungen zur Expression von beta-catenin, da die verschiedenen Erscheinungsformen von beta-catenin an kultivierten SW480 Tumorzellen reproduzierbar dargestellt und mithilfe von speziellen Färbetechniken einem Zellkompartiment sicher zugeordnet werden konnten.

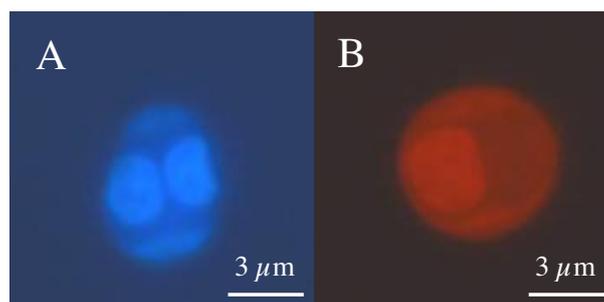
Die Zelllinie SW480 weist eine Mutation des APC-Gens auf, womit eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges einher geht. So kommt es zu einer gehäuften Translokation des exprimierten beta-catenin in den Zellkern. Im Rahmen der Vorversuche ließ sich bereits ein Erkenntnis bezüglich der Lokalisation von beta-catenin in Zellverbänden gewinnen: bildeten die SW480-Zellen einen epithelartigen Verband, färbte sich beta-catenin verstärkt membranständig oder zytoplasmatisch (Abb. 4). In Abschnitten, in denen die SW480-Zellen dagegen eher vereinzelt vorlagen, verließen sie diese epitheloide Zellgestalt und wiesen mit pseudopodienartigen Ausziehungen der Zellmembran eine Morphologie ähnlich derer von Fibroblasten auf. Die immunhistologischen Färbungen ergaben, dass diese Zellen häufiger nukleäres beta-catenin exprimierten.



**Abb. 4: Zellmorphologie von SW480-Zellen mit Distribution des beta-catenin (Cy3-markiert, Anti-catenin-beta) bei (A) konfluentem epitheloiden und (B) nicht-konfluentem fibroblastoidem Wachstum**

**A:** beta-catenin liegt bei den epitheloiden Zellen überwiegend zytoplasmatisch und membranständig vor. **B:** Die fibroblastoiden Zellen weisen eine nukleäre Expression (siehe Pfeil) von beta-catenin auf.

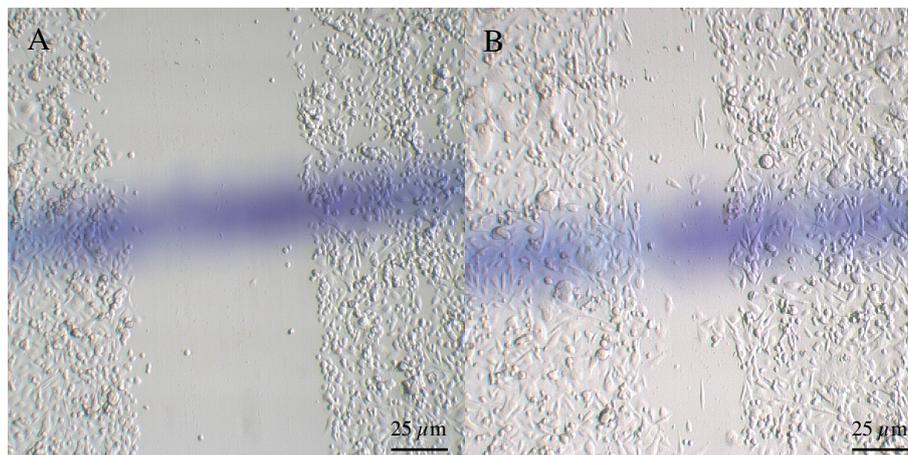
Um die Lokalisation von beta-catenin innerhalb einer Zelle beurteilen zu können, wurde eine Färbemethode zur simultanen Darstellung mehrere Proteine in einer Zelle entwickelt. Neben antikörpergebundenen Fluoreszenzmarkern wurde dabei auch der Kernfarbstoff DAPI verwendet, wodurch eine bessere Abgrenzung der einzelnen Zellkompartimente gewährleistet war (Abb. 5).



**Abb. 5: Doppelfärbung einer SW480 Tumorzelle mit dem Kernfarbstoff DAPI (A) und dem gegen beta-catenin gerichteten und Cy3-markierten Antikörper Anti-catenin-beta (B). Die Zelle befindet sich momentan in der Mitose, so dass sich bereits zwei Zellkerne der entstandenen Tochterzellen zeigen. Von diesen Tochterzellen exprimiert lediglich die linke nukleäres beta-catenin.**

### 3.2 Membranär-zytoplasmatische und nukleäre Expression von beta-catenin im Wundheilungsversuch

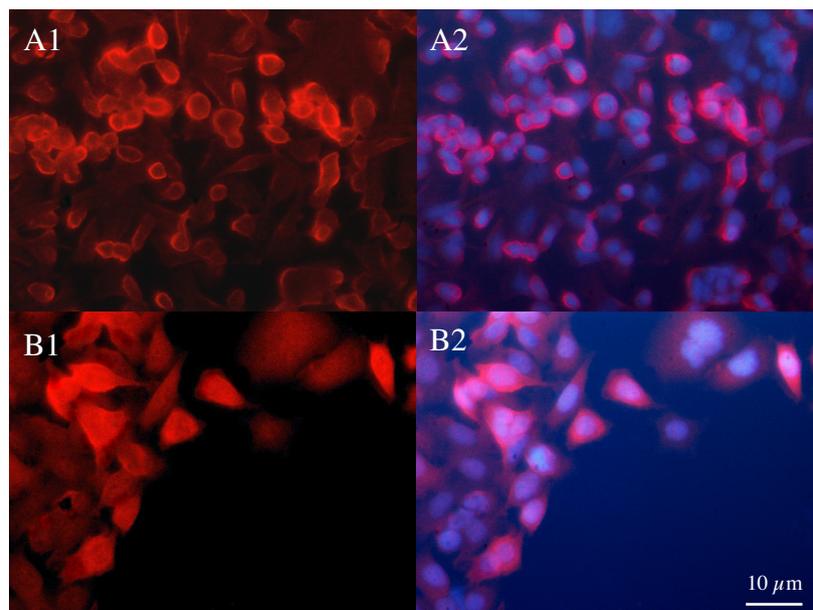
Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) gilt als eine wesentliche Voraussetzung für die Initiierung der Disseminierung von Tumorzellen (Bates and Mercurio 2005), welche insbesondere im Bereich des sogenannten Invasionsrandes stattfindet und neben einer Veränderung der zellulären Morphologie u.a. durch eine nukleäre Expression von beta-catenin charakterisiert ist. Eine Simulation des Invasionsrandes ist *in-vitro* annäherungsweise durch einen Wundheilungsversuch (engl. „*Scratch-Assay*“) möglich: In den nahezu konfluent zusammengewachsenen Tumorzellen der SW-480-Zelllinie wurde mechanisch eine künstliche Wachstumszone geschaffen und diese dann für 24 h beobachtet (Abb. 6). Im Randbereich – stellvertretend für den Invasionsrand – war eine Veränderung des zellulären Phänotyps sehr gut sichtbar, wobei sich die ursprünglich epitheloiden Zellen in der Wachstumszone mit länglichen dendritischen Ausläufern in einen fibroblastoiden Zelltyp wandelten.



**Abb. 6: SW480-Tumorzellen bei einem Wundheilungsversuch (nativ)**

**A:** Tag 1 des Wundheilungsversuches. Die Wunde wurde mit einer Pipettenspitze erzeugt. **B:** 24h später sind die Zellen in die vormals freie Fläche eingewachsen und wiesen eine veränderte, fibroblastoide Morphologie mit schmalen Zytoplasma und langen dendritischen Zellausläufern auf.

Um das Expressionsverhalten von beta-catenin während des Wundheilungsversuches beurteilen zu können, wurden die SW480-Zellen zu Beginn des Versuchs und 24 h später immunzytochemisch mit dem Cy3-markierten Antikörper Anti-beta-catenin gefärbt. Ergänzend wurde eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt, um die Lokalisation von beta-catenin innerhalb der Zelle besser abgrenzen zu können (Abb. 7). Dabei zeigte sich eine vermehrte nukleäre Anreicherung von beta-catenin von Zellen im Randbereich der Wunde.



**Abb. 7: Expression von Cy3-markiertem beta-catenin SW480-Tumorzellen im Wundheilungsversuch (*Scratch-Assay*)**

Die linke Spalte (A1 und B1) zeigt die alleinige Visualisierung von beta-catenin, die rechte Spalte (A2 und B2) umfasst die zusätzliche Kernfärbung mit DAPI. **A1/A2:** Nahezu konfluente SW480-Zellen weisen bei zytoplasmatischer und membranständiger Expression von beta-catenin eine epitheloide Morphologie auf.

**B1/B2:** 24h nach Beginn des Wundheilungsversuches wachsen fibroblastoid differenzierte Zellen in die freie Fläche hinein und exprimieren vermehrt nukleäres beta-catenin.

### **3.3 Detektion disseminierter Tumorzellen in Knochenmark und Lymphknoten**

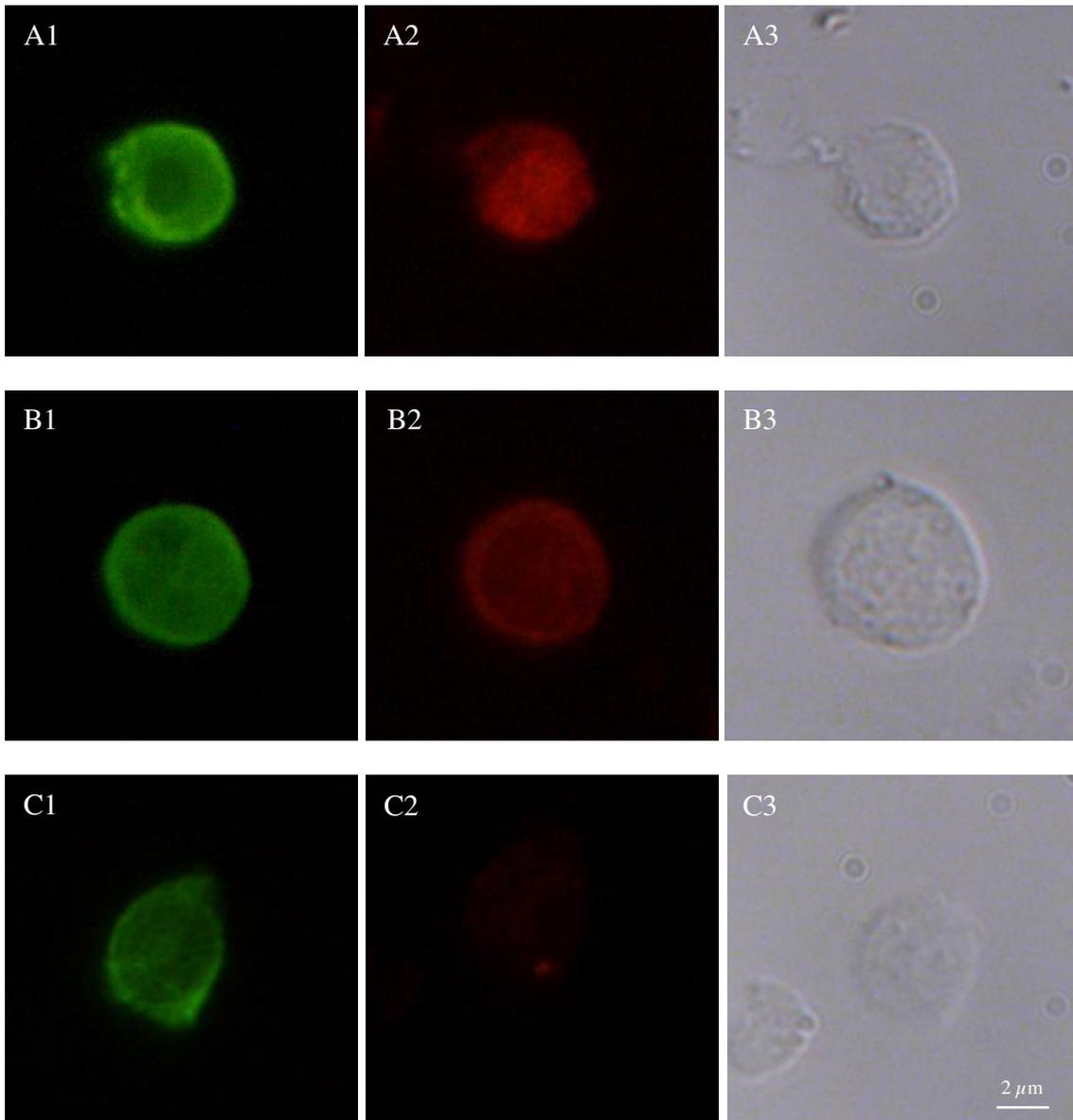
Nach Abschluss der Vorversuche und mit Etablierung des Protokolls zur immunzytochemischen Färbung von beta-catenin bei CK-positiven Zellen wurde die Immunfluoreszenzfärbung an Einzelzell-Suspensionen aus dem Knochenmark (KM) angewandt. Da disseminierte Tumoreinzellen im KM von Patienten mit kolorektalem

Karzinom selten vorkommen, wurde das während der Operation gewonnene KM zunächst mit Hilfe einer Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Dabei reichert sich epitheliale Zellen – unter denen sich die disseminierten Tumorzellen befinden – im Ficoll-Gradienten aufgrund ihrer Dichte gemeinsam mit mononukleären Zellen des KM an. Diese Zellschicht wurde nach entsprechender Separation auf Haftobjektträgern reversibel gebunden, sodass die immunzytochemisch markierten Einzelzellen nach Färbung mittels Mikromanipulation isoliert werden konnten.

### 3.4 Doppelfärbung disseminierter Tumorzellen

Um die simultane Expression von zwei Proteinen in einer Zelle darstellen zu können, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit zwei verschiedenen Primärantikörpern und den jeweils zugehörigen Sekundärantikörpern etabliert, wobei letztere mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (AlexaFluor 488/Cy3) konjugiert waren. Ergänzend zu dieser Doppelfärbung mit antikörpergebundenen Fluoreszenzmarkern wurde erneut der Kernfarbstoff DAPI eingesetzt, sodass die Abgrenzung zwischen Zytoplasma und Zellkern zur Unterscheidung zwischen nukleärem und nicht-nukleärem beta-catenin möglich war.

Die Detektion der Tumorzellen im ansonsten mesenchymal differenzierten Knochenmark erfolgte mit dem Primärantikörper A45-B/B3, der gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichtet ist. Zytokeratine sind, sobald sie einen Komplex aus zwei verschiedenen Zytokeratinen bilden, epithelspezifische Elemente des Zytoskeletts und werden als Tumorzellmarker für solide Tumoren epithelialen Ursprungs eingesetzt (Schlimok, Funke et al. 1990, Pantel, Izbicki et al. 1993). In den Lymphknotenpräparaten wurde der Primärantikörper Ber-EP4 zur Detektion epithelialer Zellen verwendet, der sich gegen das ebenfalls epithelspezifische Oberflächenprotein EpCAM richtet. Sowohl im KM als auch im LK wurde der gleiche Primärantikörper zur Markierung von beta-catenin verwendet. Mit Hilfe der mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Sekundärantikörper konnten somit die CK-positiven DTC des KM bzw. die EpCAM-positiven Zellen der LK auf ihre beta-catenin-Expression untersucht werden (Abb. 8).



**Abb. 8: CK-/ beta-catenin-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von drei unterschiedlichen DTC aus dem Knochenmark (KM) mit jeweils drei verschiedenen Lokalisationen des beta-catenin-Farbstoffes.**

Jede Zeile zeigt eine DTC mit ihrer CK- und beta-catenin-Expression (CK: Alexa Fluor 488/ grün; beta-catenin: Cy3/ rot) und im Durchlicht. **A1-A3:** DTC mit nukleärer Expression von beta-catenin. **B1-B3:** DTC mit zytoplasmatischer Expression von beta-catenin **C1-C3:** DTC ohne Expression von beta-catenin.

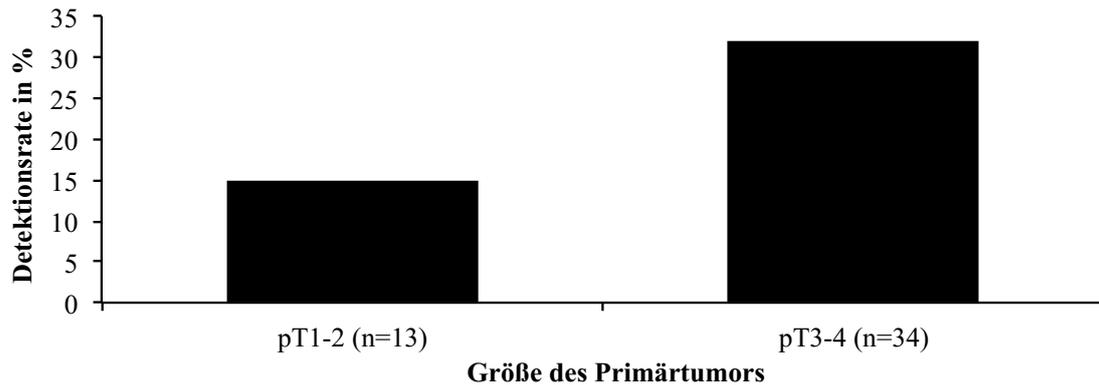
### 3.5 Inzidenz Zytokeratin-positiver Zellen im Knochenmark

Im Folgenden werden zwei Patientengruppen unterschieden: Patienten mit synchron zum Primärtumor operierten Fernmetastasen („M1<sub>syn</sub>“) und Patienten mit isolierten (metachronen) Fernmetastasen („M1<sub>meta</sub>“).

Die Anzahl der Patienten mit CK-positiven Zellen im KM sind in Tabelle 4 dargestellt, wobei es sich zunächst ausschließlich um Patienten im M0-Stadium oder M1-Stadium mit operablem Primärtumor (M1<sub>syn</sub>) handelt. Die Einteilung wurde nach Tumorgröße (T-Stadium) sowie lymphatischer (pN) und hepatischer Metastasierung (pM<sub>HEP</sub>) vorgenommen. Insgesamt ließen sich bei 13 von 47 Patienten (28%) CK-positive Zellen im Knochenmark nachweisen. Auffällig war, dass CK-positive Zellen bei Patienten mit größeren Tumoren (T3 und T4) tendenziell häufiger als bei Patienten mit kleineren Tumoren (T1 und T2) gefunden werden konnten ( $p=0,30$ ; *t-Test*; Abb. 9).

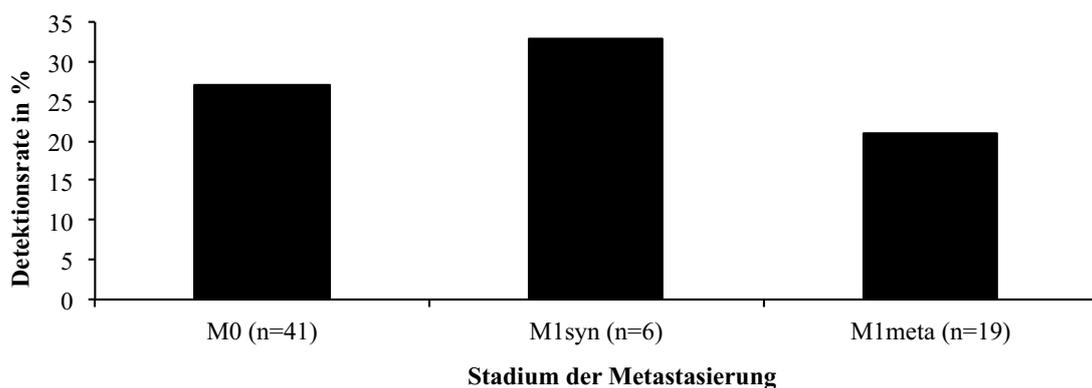
	Patienten (n=47)	Keine CK <sup>+</sup> Zellen im KM	CK <sup>+</sup> Zellen im KM
pT1	4	3 (75%)	1 (25%)
pT2	9	8 (89%)	1 (11%)
pT3	25	16 (64%)	9 (36%)
pT4	9	7 (78%)	2 (22%)
pN0	25	19 (76%)	6 (24%)
pN1	8	6 (75%)	2 (25%)
pN2	14	10 (71%)	4 (29%)
pM0	41	30 (73%)	11 (27%)
M1 <sub>syn</sub>	6	4 (67%)	2 (33%)

**Tabelle 3: Anzahl CK-positiver Knochenmarkspunktate in Abhängigkeit von Tumorgröße (pT), lymphatischer (pN) und hepatischer Metastasierung (pM) bei Patienten mit operablen Primärtumor**



**Abb. 9: Vergleich der Detektionsrate CK-positiver Zellen zwischen den Gruppen pT1-2 (15%) und pT3-4 (32%;  $p=0,30$ ; t-Test).**

Im Folgenden sollte überprüft werden wie sich die Detektionsrate von DTC in Abhängigkeit der klinischen Manifestation der Metastasierung verhielt. Hierfür wurden Patienten mit den Stadien M0, M1<sub>syn</sub> und M1<sub>meta</sub> verglichen. Es stellte sich heraus, dass Patienten mit synchroner Metastase (M1<sub>syn</sub>) mit 33% die höchste Nachweisrate zeigten, wohingegen Patienten ohne Fernmetastasierung (pM0) mit 27% bzw. oder mit metachronen Fernmetastasierung (M1<sub>meta</sub>) mit 21% eine niedrigere Detektionsrate aufwiesen (Abb. 10). Diese relativ geringen Unterschiede waren nicht signifikant.



**Abb. 10: Vergleich der Detektionsraten**

Die Detektionsrate von DTC war bei den synchron aufgetretenen Metastasen (M1<sub>syn</sub>) mit 33% am höchsten ohne sich signifikant von den anderen Stadien der Fernmetastasierung zu unterscheiden (M0 / M1<sub>meta</sub>)

Eine Subgruppenanalyse ergab, dass Patienten mit metachroner Fernmetastasierung ( $M1_{meta}$ ) und DTC im Knochenmark häufiger multiple Metastasen aufwiesen. Diese Patienten wiesen zudem eine höhere Detektionsrate (36%) von DTC im Knochenmark auf als jene Patienten mit nur einer isolierten Metastase, bei denen lediglich bei einem Patienten (13%) DTC im KM nachgewiesen wurden (Tabelle 5).

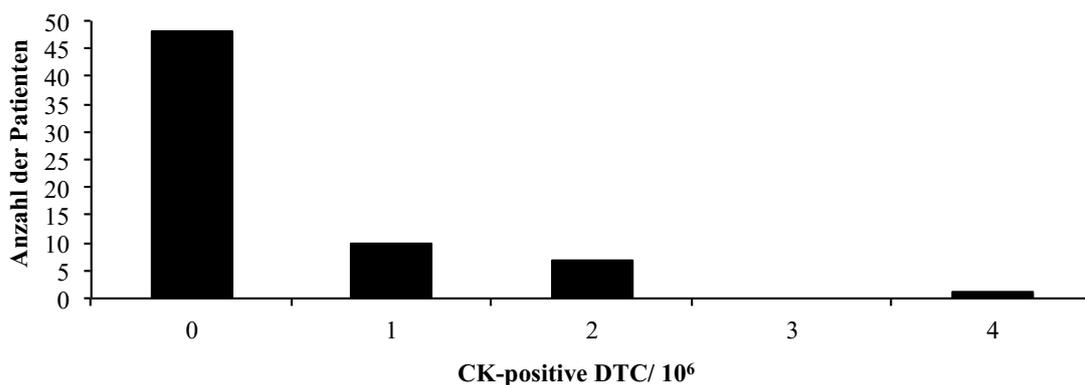
$M1_{meta}$	Patienten	Keine $CK^+$ Zellen im KM	$CK^+$ Zellen im KM
n=1	8	7 (87%)	1 (13%)
n>1	11	7 (64%)	4 (36%)

\* $p=0,338$  (fisher's exact test)

**Tabelle 4: Patienten mit metachronen Metastasen ( $M1_{meta}$ )**

### 3.5.1 Anzahl disseminierter Tumorzellen pro Patient

Bei den 66 Patienten, die in das Studienkollektiv eingegangen sind, fanden sich in insgesamt 18 Knochenmarksproben  $CK$ -positive Zellen. Pro Patient wurden ca.  $10^6$  Zellen eines Haftobjektträgers auf disseminierte Tumorzellen hin mikroskopisch untersucht, wobei zwischen einer und maximal vier DTC pro Patient gefunden wurden (Abb. 11).



**Abb. 11: Verteilung der Patienten hinsichtlich DTC-Detektion im Knochenmark**

Insgesamt wurden 28 DTC in 18 Knochenmark-Punktaten detektiert, so dass ein Patient im Durchschnitt 1,6  $CK$ -positive Zellen aufwies. Bei den Patienten mit isolierter metachroner Fernmetastase ( $M1_{meta}$ ) wurden in fünf positiven Aspiraten mit neun  $CK$ -

positiven DTC vergleichsweise mehr Tumorzellen pro positiven Knochenmarkaspirat (1,8 CK-positive DTC pro Patient) gefunden (Tabelle 6).

	Anzahl Patienten	CK <sup>+</sup> DTC im KM	Anzahl CK <sup>+</sup> DTC	CK <sup>+</sup> DTC / Patient
M0 + M1 <sub>syn</sub>	47	13 (28%)	19	1,6
M1 <sub>meta</sub>	19	5 (26%)	9	1,8

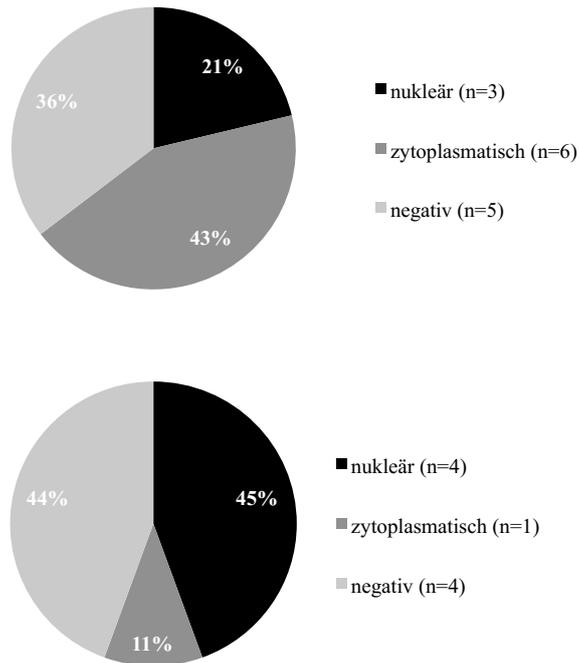
**Tabelle 5: Anzahl der gefundenen DTC pro positivem KM-Punktat bei Patienten mit operablem Primärtumor (M0+ M1<sub>syn</sub>) und bei Patienten mit metachroner Metastase (M1<sub>meta</sub>)**

### 3.5.2 Expression von beta-catenin in DTC aus dem Knochenmark

Nachdem im Zuge der Etablierung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zwei der insgesamt gewonnenen 66 Knochenmarksaspirate mit einer Einfachmarkierung zur Visualisierung von Zytokeratin untersucht worden waren, ließen sich mithilfe der etablierten Doppelfärbung zur simultanen Darstellung von Zytokeratin (CK) und beta-catenin aus den 64 verbliebenen Proben letztlich 23 CK-positive Zellen isolieren, die auf ihre beta-catenin Expression hin untersucht werden konnten. Weitere fünf Zellen wurden mit einer Einfachfärbung gegen Zytokeratin gefunden, sodass von diesen keine weitere Charakterisierung der Expression von beta-catenin vorgenommen werden konnte.

Von den 23 isolierten CK-positiven DTC wiesen sieben Zellen (30%) eine nukleäre Expression von beta-catenin auf. Zehn weitere Zellen (44%) exprimierten beta-catenin zytoplasmatisch, während sich bei sechs Zellen (26%) keine beta-catenin Expression abgrenzen ließ.

Eine Korrelation zwischen dem Expressionsmuster von beta-catenin und den histopathologischen Parametern (Tumorgröße und Lymphknotenstatus) des Primärtumors zeigte sich nicht. Dagegen wiesen die Tumorzellen der Patienten mit isoliert nachgewiesenen, metachronen Lebermetastasen ( $M1_{meta}$ ) häufiger nukleäres beta-catenin auf als CK-positive Zellen von Patienten mit synchroner Metastasierung und operablem Primärtumor ( $M1_{syn}$ ) oder gar fehlender Metastasierung (Abb. 12).



**Abb. 12: Lokalisation von beta-catenin in den DTC aus dem KM**

Es wird zwischen nukleärer, zytoplasmatischer und fehlender (negativer) beta-catenin-Expression unterschieden. Oben: Lokalisation von beta-catenin in den DTC bei Patienten mit pM0-Stadium und Patienten mit synchroner Fernmetastase (M1syn) sowie unten mit metachron aufgetretener Fernmetastase (M1meta). Der Anteil von nukleärem beta-catenin betrug hier 45% gegenüber 21% (oben).

### 3.6 Inzidenz EpCAM-positiver disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten

Ergänzend zu den Untersuchungen des Knochenmarks wurden auch Lymphknoten (LK) auf DTC untersucht. Anders als in den Knochenmarksaspiraten wurde hierzu ein Antikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM verwendet, nachdem sich dieser zur Detektion von DTC in LK etabliert hat (Latz, Niedobitek et al. 1990, Passlick, Izbicki et al. 1994).

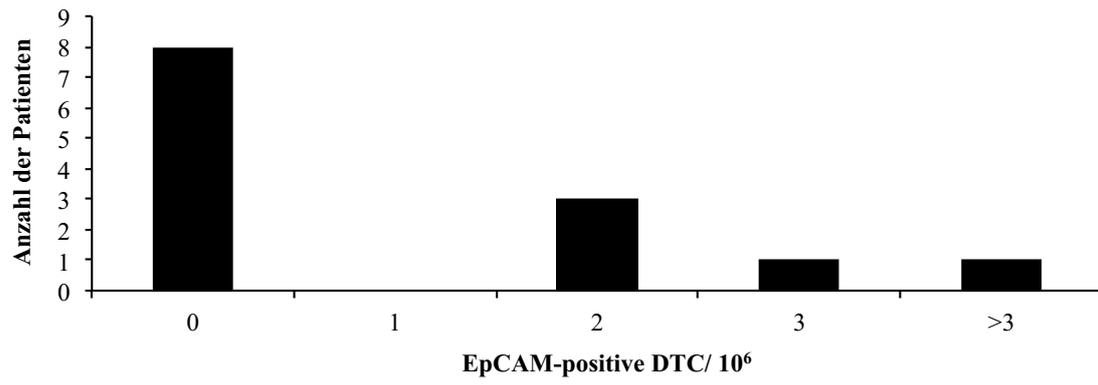
Bei fünf von 13 Patienten (39%), deren LK auf DTC untersucht wurden, fanden sich EpCAM-positive Zellen (Tabelle 7). Dabei zeigte sich, dass DTC allein in den LK von Patienten mit fortgeschrittenem Primärtumorstadium (pT3 und pT4) detektiert wurden ( $p < 0,0001$ ; *Chi<sup>2</sup>-Test*).

	Patienten (n=13)	LK ohne EpCAM <sup>+</sup> Zellen	LK mit EpCAM <sup>+</sup> Zellen
pT1	0	0	0
pT2	2	0	0
pT3	9	5 (56%)	4 (44%)
pT4	2	1 (50%)	1 (50%)
pN0	7	5 (71%)	2 (29%)
pN1	2	1 (50%)	1 (50%)
pN2	4	2 (50%)	2 (50%)
pM0	12	7 (58%)	5 (42%)
pM1	1	1 (100%)	0

**Tabelle 6: Anzahl EpCAM-positiver DTC in LK in Abhängigkeit von Tumorgröße, lymphatischer und hepatischer Metastasierung bei Patienten mit operablem Primärtumor**

#### 3.6.1 Anzahl der DTC pro Patient

Bei fünf der 13 Patienten (38%), deren LK auf DTC untersucht wurden, fanden sich EpCAM-positive Zellen (Abb. 13). Insgesamt wurden neun DTC in vier positiven LK-Präparaten detektiert. Ein weiterer Patient wies eine Makrometastase im untersuchten LK auf, so dass sich hier mehrere hundert EpCAM-positive Zellen nachweisen ließen.

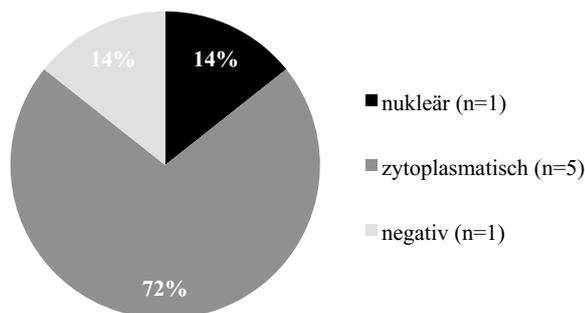


**Abb. 13: Verteilung der Patienten hinsichtlich DTC-Detektion im LK**

### 3.6.2 Expression von beta-catenin in EpCAM-positiven DTC aus Lymphknoten

Die Doppelfärbung für EpCAM und beta-catenin wurde für die Lymphknotenpräparate aller 13 untersuchten Fälle durchgeführt. Insgesamt konnten sieben EpCAM-positive Zellen auf ihre beta-catenin Expression hin untersucht werden. In der Lymphknoten-Metastase des oben beschriebenen Patienten wurden EpCAM-positive Zellen beobachtet, welche beta-catenin sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma aufwiesen (Abb. 14) Dabei ist bemerkenswert, dass nur eine von sieben EpCAM-positiven Zellen (14%) nukleäres beta-catenin exprimierte, während die fünf weiteren Zellen (72%) eine zytoplasmatische Expression von beta-catenin aufwiesen oder in einem Fall (14%) keine beta-catenin Expression zeigten.

Das Expressionsverhalten von beta-catenin in den aus LK isolierten DTC korrelierte analog zu den CK-positiven Tumorzellen aus dem Knochenmark nicht mit dem Primärtumorstadium und dem Lymphknotenstatus der Primärtumoren. In der bereits weiter oben beschriebenen LK-Makrometastase hingegen fanden sich alle Expressionsformen von beta-catenin, wobei jedoch auch hier die zytoplasmatische Expression die Mehrzahl ausmachte.

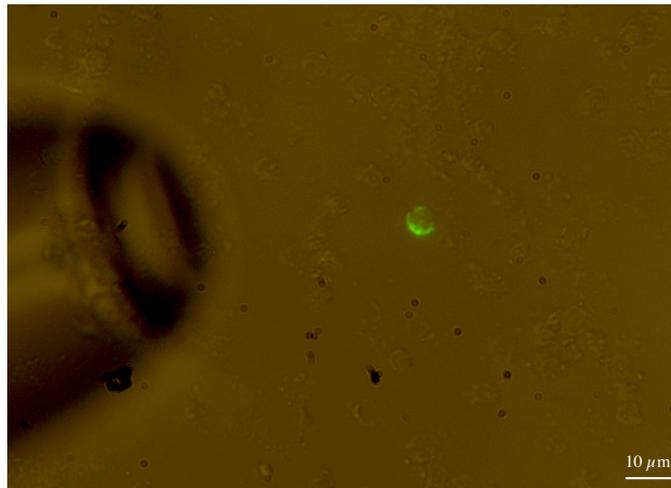


**Abb. 14: Lokalisation von beta-catenin in den DTC aus LK**

Es wird zwischen nukleärer, zytoplasmatischer und fehlender (negativer) beta-catenin-Expression unterschieden

### 3.7 Genomische Untersuchung von DTC aus dem Knochenmark

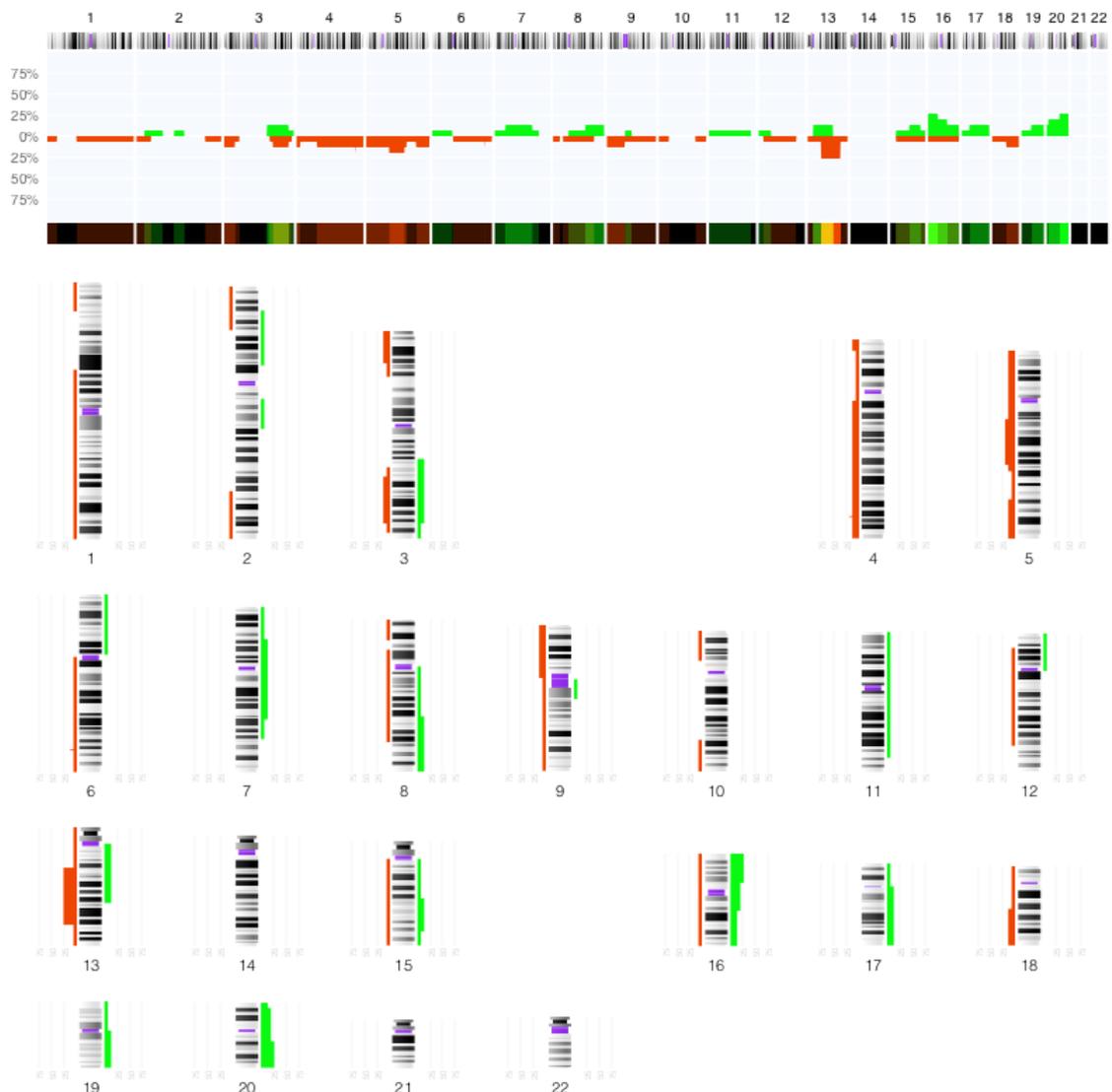
Die Isolation der CK-markierten Einzelzellen zur Untersuchung der genomischen DNA mittels Mikromanipulation gelang bei 17 DTC (Abb. 15). Aufgrund der geringen Anzahl von LK-Präparaten wurden lediglich DTC aus KM-Proben isoliert und für die DNA-Extraktion zur nachfolgenden CGH-Untersuchungen herangezogen.



**Abb. 15: Isolierung einer CK-positiven Tumorzelle aus einem Knochenmarksaspirat mittels Glaskapillare nach immunzytochemischer Markierung durch das AK-gekoppelte Fluorochrom AlexaFluor 488.** Zur selektiven Mikromanipulation war neben dem Fluoreszenzlicht zusätzlich Durchlicht mit niedriger Leuchtkraft angeschaltet.

Nach der Isolierung der DTC aus den aufbereiteten KM-Aspiraten folgte die globale Amplifikation der genomischen DNA durch eine MseI-Adapter-Linker-PCR (siehe Abschnitt Material und Methoden). Aus der Reaktion entstand ein repräsentatives MseI-PCR-Amplifikat, welches mit seinen DNA-Fragmenten das Genom einer Einzelzelle global und verhältnistreu abbildet. Anschließend wurden die amplifizierten Einzelzellgenome mithilfe der CGH auf genomische Zugewinne und Verluste untersucht. Dabei wurde die von Klein, Schmidt- Kittler et al. entwickelte Methode verwendet (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999). Von den 17 isolierten CK-positiven DTC gelang die globale Amplifikation der genomischen Einzelzell-DNA bei 15 Zellen (88%) aus den Knochenmarksaspiraten von 10 Patienten. Die gewonnenen CGH-Profile aller DTC wurden in Abb. 16 als Sammelhistogramm und Ideogramm zusammengefasst (erstellt über die Internetseite [www.progenetix.net](http://www.progenetix.net)). Die Darstellung gestattet eine

übersichtliche und anschauliche Präsentation häufiger genomischer Aberrationen (Amplifikationen und Deletionen) in den DTC.

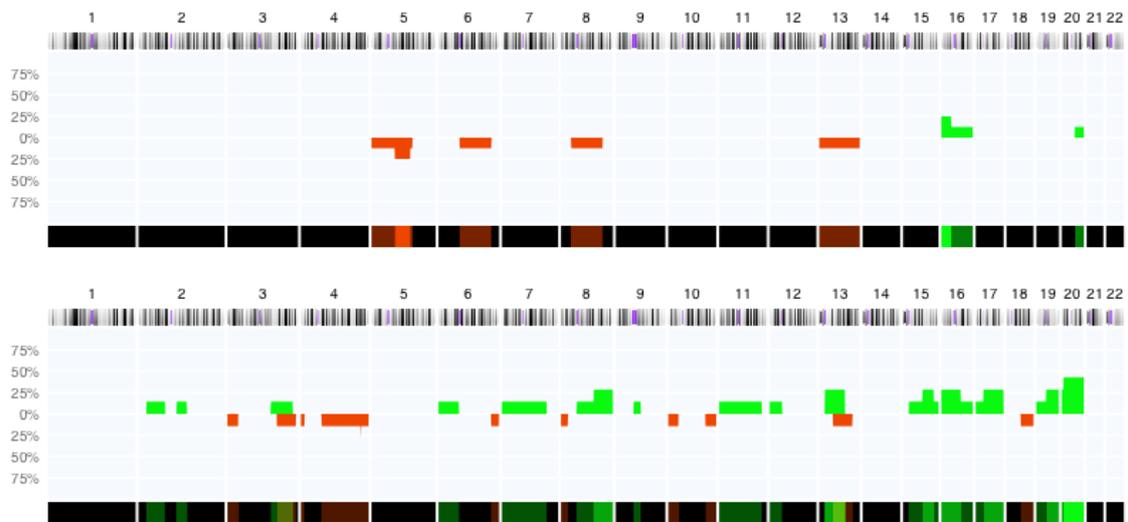


**Abb. 16: Sammelhistogramm (oben) und Ideogramm (unten) der 15 isolierten CK-positiven DTC aus Knochenmarkaspiraten.**

Im Sammelhistogramm zeigt sich die Häufigkeit (in Prozent aller untersuchten DTC) der chromosomalen Aberrationen im Genom (grüne Balken: Amplifikation; rote Balken: Deletion) entsprechend der Chromosomen. Das Ideogramm veranschaulicht die Aberrationen an den einzelnen Chromosomen.

Die häufigsten Veränderungen bei mehr als 25% aller untersuchten Einzelzellgenome waren Amplifikationen am kurzen Arm von Chromosom 16 und am langen Arm von Chromosom 20, während Deletionen besonders häufig am langen Arm von Chromosom 13 beobachtet wurden. Zudem fanden sich die für das kolorektale Karzinom typische genomische Veränderungen (Gewinne am Chromosom 7, 8, 13 und 20 sowie Verluste am Chromosom 4, 8 und 18).

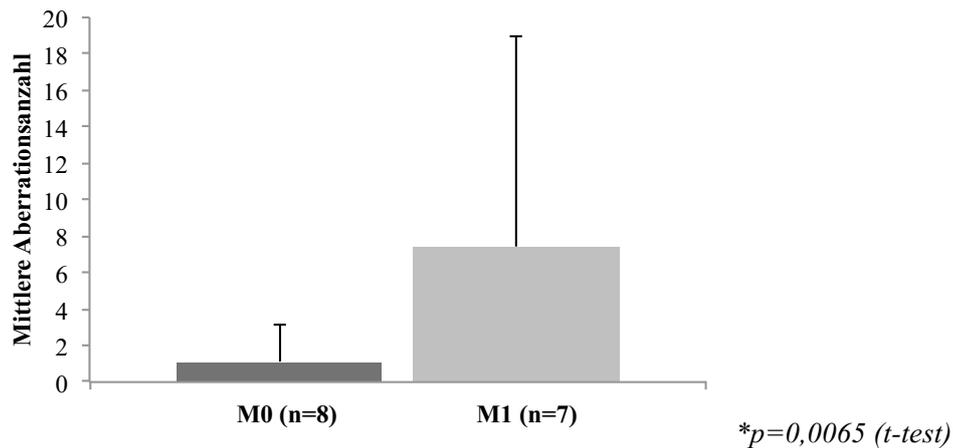
Um die Ergebnisse der CGH mit dem Grad der Metastasierung zu korrelieren, wurden zwei Patientengruppen gebildet (Abb. 17): Die erste Gruppe beinhaltete diejenigen Patienten, die ein M0-Stadium aufwiesen, während die zweite Gruppe Kollektiv aus den Patienten im M1-Stadium bestand.



**Abb. 17: Sammelhistogramme zur Subgruppenanalyse der untersuchten Einzelzellgenome in Abhängigkeit vom Metastasierungsstatus der Patienten (M0 vs. M1)**

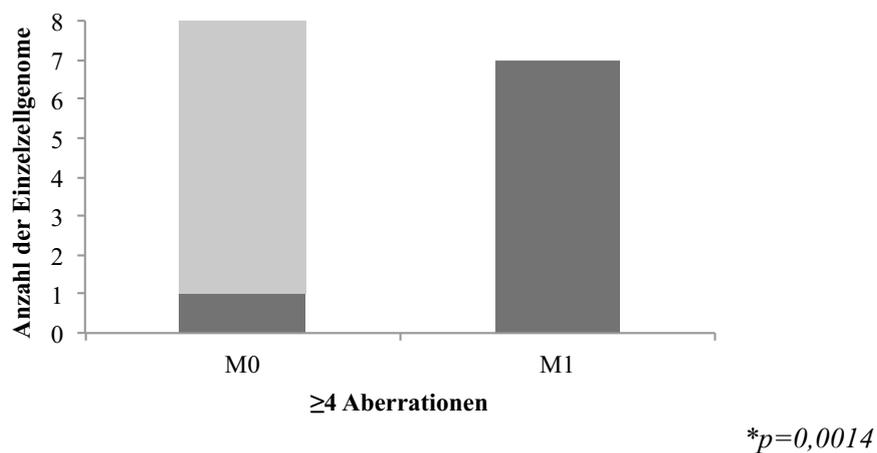
**Oben:** Einzelzellgenome von Patienten im Tumorstadium M0 (n=8). **Unten:** Einzelzellgenome von Patienten im Tumorstadium M1 (n=7).

Hierbei ist sowohl ein Unterschied bei der Lokalisation als auch in besondere Maße die Anzahl der Veränderungen auffällig. Dies wird in Abb. 18 veranschaulicht. Während die durchschnittliche chromosomale Aberrationsrate bei den Patienten im M0- Stadium bei 1,13 lag zeigten sich bei den Patienten im M1-Stadium durchschnittlich 7,43 Veränderungen pro Zelle ( $p=0,0065$ ; *t-test*).



**Abb. 18: Mittlere Anzahl von CGH-Veränderungen pro Einzelzellgenom in Abhängigkeit des Metastasierungsstatus (M0 vs. M1)**

Der Median aller in den untersuchten Einzelzellgenomen beobachteten Aberrationen belief sich auf vier pro DTC. Während bei den Patienten im M0-Stadium lediglich eine von acht Zellen vier oder mehr Aberrationen aufwies (1/8), fanden sich in allen Zellen (7/7) der Patienten im M1-Stadium vier oder mehr Aberrationen ( $p=0,0014$ ; Fisher's exact test; Abb. 19).

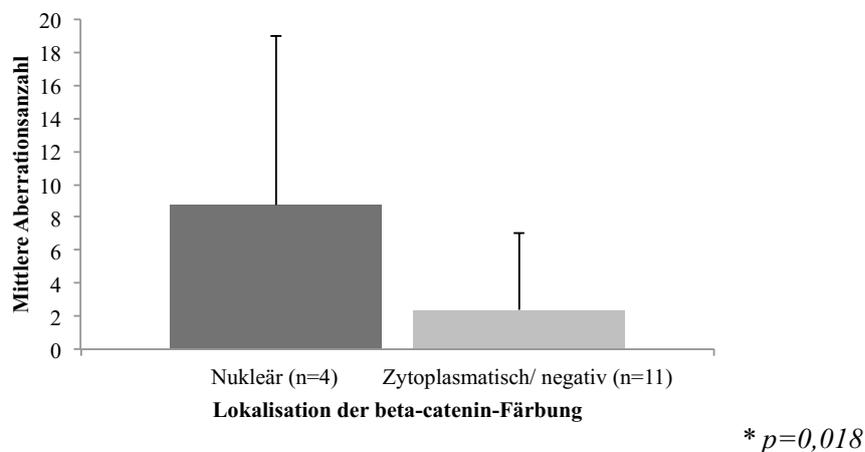


**Abb. 19: Anzahl der Einzelzellgenomen mit vier oder mehr Aberrationen pro DTC in Abhängigkeit vom Metastasierungsstatus (M0 vs. M1)**

In den folgenden Betrachtungen der CGH-Ergebnisse galt es, mögliche Zusammenhänge zwischen dem Expressionsverhalten von beta-catenin in den DTC und den genomischen Profilen der Einzelzellen zu identifizieren. Für die Analyse standen

die genomischen Veränderungen von 15 DTC aus dem Knochenmark zur Verfügung, bei welchen zuvor mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung die Expression von CK und beta-catenin untersucht worden war. Für die Korrelationen wurden die analysierten DTC in Abhängigkeit von ihrem Expressionsverhalten für beta-catenin zwei Gruppen zugeordnet: Vier Tumorzellen mit nukleärem beta-catenin bildeten die erste Subgruppe, während die zweite Subgruppe 11 DTC umfasste, die eine zytoplasmatische oder keine Expression von beta-catenin aufwiesen. Aus der ersten Gruppe waren vier Einzelzellgenome von vier Patienten auf CGH-Veränderungen untersucht worden, während elf Zellen aus der zweiten Gruppe von neun Patienten stammten.

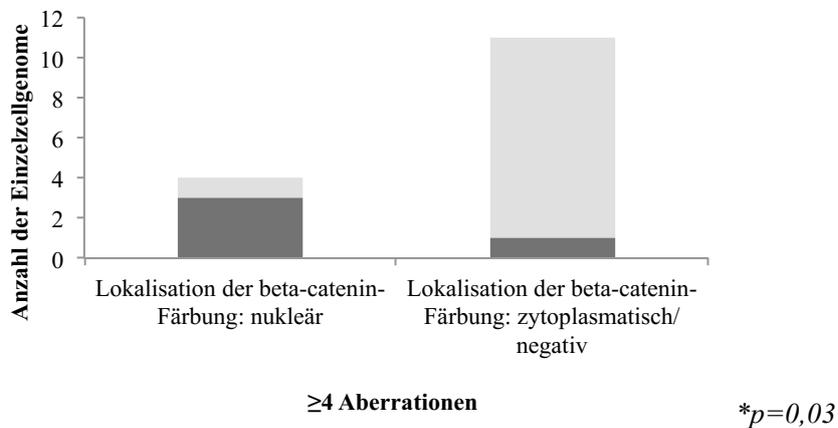
Bei der genomischen Untersuchung dieser beiden Gruppen fiel ein Unterschied in der Anzahl der Aberrationen auf (Abb. 20): Die durchschnittliche chromosomale Aberrationsrate der Einzelzellgenome von DTC mit nukleärem beta-catenin war mit 8,75 gegenüber 2,39 bei den DTC der zweiten Gruppe signifikant höher ( $p=0,018$ ; *t-test*).



**Abb. 20: Mittlere Anzahl an CGH-Veränderungen pro Zelle in Abhängigkeit von der beta-catenin-Expression**

In der CGH ließ sich allein bei drei der 15 untersuchten Zellen ein balanciertes CGH-Profil ohne DNA-Gewinne oder –Verluste detektieren, wobei keine dieser drei Zellen eine nukleäre Expression von beta-catenin in der vorangegangenen Immunfluoreszenz-Doppelfärbung aufgewiesen hatte. Abb. 21 veranschaulicht, in wie weit sich die Anzahl der chromosomalen Aberrationen zwischen den beiden Kollektiven unterschieden: Es wiesen drei der vier Zellen mit nukleärem beta-catenin mehr als vier Aberrationen auf,

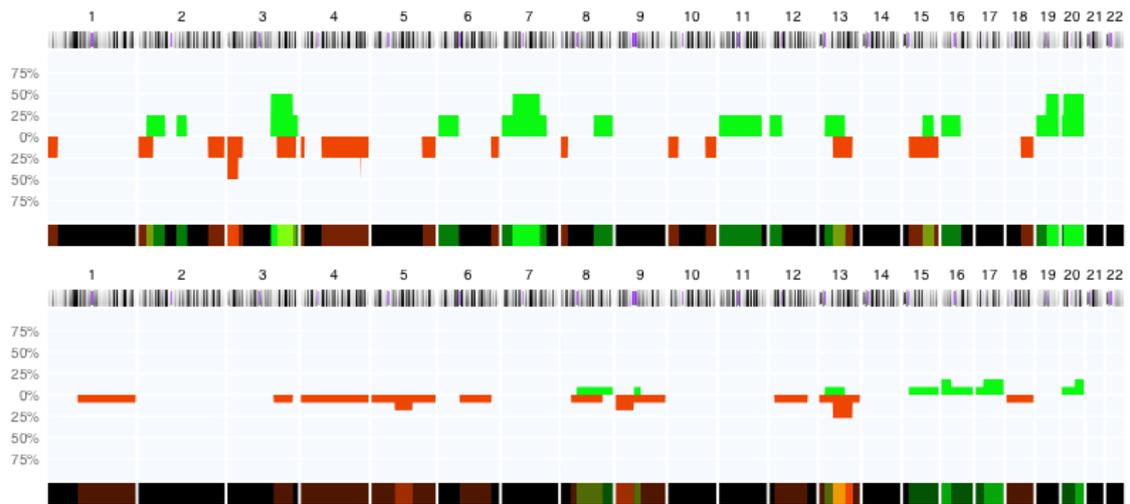
wobei vier Aberrationen den Median aller Zellen ausmachten. Demgegenüber fand sich bei nur einer der elf Zellen ohne nukleäre Expression von beta-catenin mehr als vier Aberrationen ( $p=0,03$ ; *Fisher's exact test*).



**Abb. 21: Anteil von DTC mit mehr als vier Aberrationen pro DTC in Abhängigkeit ihrer beta-catenin-Expression**

Um die Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurden die CGH-Profile der Einzelzellen ebenfalls zu Sammelhistogrammen vereint (Abb. 22). Die häufigsten Veränderungen, welche bei mehr als 25% der DTC gesehen wurden, waren bei den DTC mit nukleärem beta-catenin Gewinne an Chromosom 7 und Chromosom 20 sowie an den Chromosomenarmen 3q und 19q, während chromosomale Verluste besonders oft an den Chromosomenarmen 3p und 4q beobachtet wurden. Dagegen wiesen die Zellen ohne nukleäres beta-catenin häufiger chromosomale Zugewinne am Chromosomenarm 16p und Verluste insbesondere am Chromosomenarm 13q. Damit waren die chromosomalen Aberrationen in den beiden Kollektiven nicht nur ihrer Anzahl, sondern auch in ihrer Lokalisierung signifikant unterschiedlich.

Beim Vergleich der beiden Gruppen bezüglich ihrer Veränderungen zeigten sich auffällige Unterschiede bei der Amplifikation am Chromosom 7 ( $p=0,06$ ; *Fisher's exact test*) und am Chromosomenarm 19q ( $p=0,06$ ; *Fisher's exact test*) sowie bei der Deletion am Chromosom 3p ( $p=0,06$ ; *Fisher's exact test*).



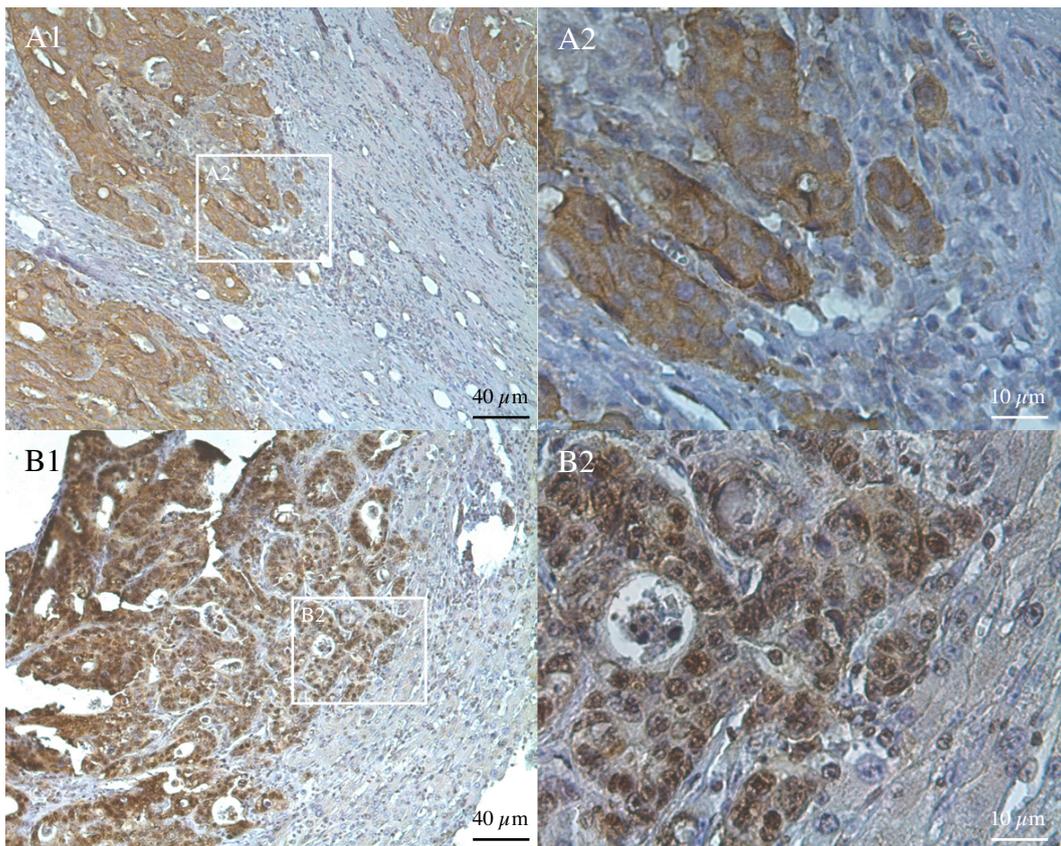
**Abb. 22: Sammelhistogramme der genomischen Aberrationen von DTC entsprechend ihres beta-catenin-Phänotyps.**

**Oben:** DTC mit nukleärem beta-catenin (n=4). **Unten:** DTC mit zytoplasmatischem bzw. fehlender Expression von beta-catenin (n=11).

### **3.8 Untersuchung der Primärtumoren und Metastasen**

Ergänzend zu den phänotypischen Untersuchungen an den DTC aus KM und LK erfolgten immunhistochemische Färbungen der zugehörigen Primärtumoren und Metastasen. Dabei wurde die ABC-Methode mit dem Antikörper Anti-catenin-beta zur Darstellung von beta-catenin verwendet, um die zentralen Anteile und Randbereiche der Präparate miteinander vergleichen zu können. Dabei galt es, Zellen mit den unterschiedlichen Expressionsmustern von beta-catenin wie schon bei den Untersuchungen der Einzelzellen zu unterscheiden. Die Abb. 23 zeigt beispielhaft einen Randbereich mit hohem Anteil von nukleärem beta-catenin sowie einen Randbereich mit Zellen ohne nukleäre beta-catenin-Expression.

Die Auswertung offenbarte eine ausgeprägte Heterogenität der Expression von beta-catenin innerhalb eines jeden Präparates. Große zusammenhängende Areale einer einheitlichen Expression zeigten sich nicht. Um dies für die Gesamtheit des Präparates zu berücksichtigen, wurden Mittelwerte bestimmt. Diese Mittelwerte entstanden, indem die angefärbten Tumorzellen pro Blickfeld bestimmt und in Prozentzahlen für ihre Positivität angegeben wurden.



**Abb. 23: Immunhistochemische Darstellung von beta-catenin an der Invasionsfront des Primärtumors bei kolorektalen Tumorpatienten**

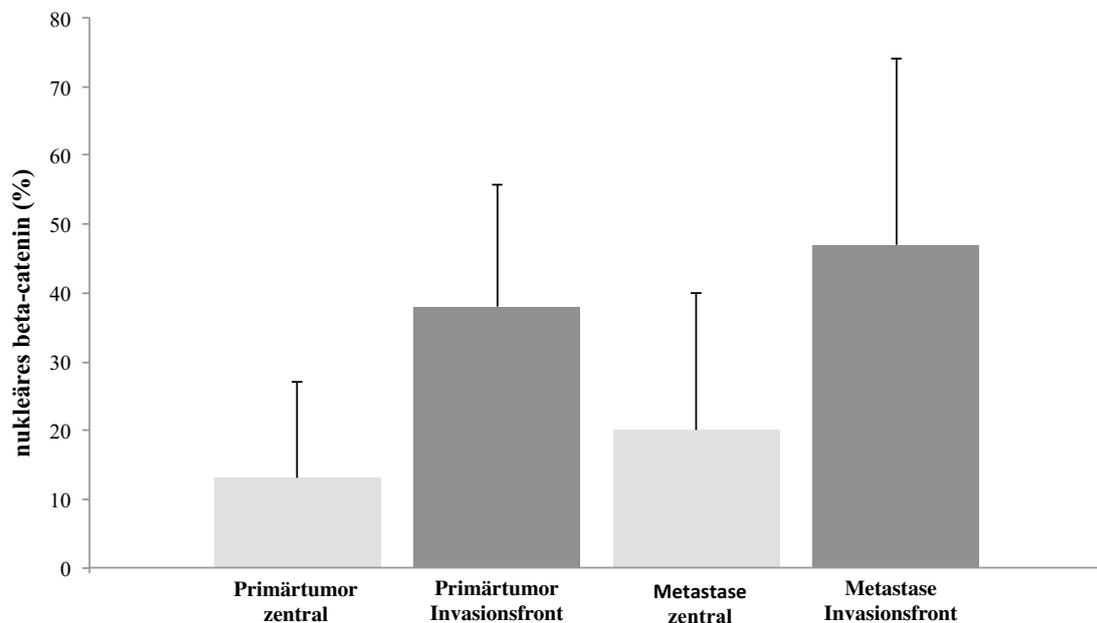
Die Bilder A2 und B2 entsprechen den weiß gerahmten Ausschnitten der Bilder A1 bzw. B1. **A1:** 100fache Vergrößerung, bzw. **A2:** 400fache Vergrößerung. Die Invasionsfront zeigt Zellen, die kein nukleäres beta-catenin aufweisen (0%).

**B1:** 100fache Vergrößerung, bzw. **B2:** 400fache Vergrößerung. Die Zellen dieser Invasionsfront exprimieren nahezu alle nukleäres beta-catenin (90%).

Es konnten 52 von 66 Präparaten (79%) auf ihre beta-catenin Expression überprüft werden. Dabei wiesen fünf Proben (14%) bei den Primärtumoren und drei (18%) bei den Metastasen kein beta-catenin im gesamten Präparat auf. Alle acht genannten Proben hatten keine DTC im KM. Die zentralen Anteile in den Primärtumoren wie auch in den Metastasen wiesen deutlich weniger Zellen mit nukleärem beta-catenin (13 bzw. 20%) als an den jeweiligen Randbereichen (38 bzw. 47%) auf (Abb. 24).

Betrachtet man lediglich jene Patientenproben, bei denen DTC im KM detektiert werden konnten ergaben sich vergleichbare Werte (10% zentral und 37% im Bereich der Invasionsfront).

Patienten, bei welchen DTC mit nukleärem beta-catenin im KM nachgewiesen worden waren, exprimierten durchschnittlich 14% nukleäres beta-catenin in den zentralen und 37% im Bereich der Invasionsfront.



**Abb. 24: Prozentuale Verteilung der Zellen mit nukleärem beta-catenin im zentralen Bereich und an der Invasionsfront der untersuchten Tumorgewebe**

Es ergab sich die Frage, ob der hohe Anteil an Zellen mit nukleärem beta-catenin im Bereich der Invasionsfront mit einem vermehrten Auftreten von DTC im KM verbunden war. Hierfür wurde der Anteil an nukleärem beta-catenin im Bereich der Invasionsfront bei Patienten ohne und Patienten mit DTC im KM getrennt berechnet. Es zeigte sich ein nahezu identischer Anteil (35% vs. 36%).

## 4 Diskussion

### Disseminierte Tumorzellen beim CRC

Die Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom wird weiterhin entscheidend durch das Auftreten von Fernmetastasen bestimmt (Holzel, Eckel et al. 2009). Bei der Metastasierung handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess (Hanahan et al. 2000), bei dem sich epitheliale Tumorzellen aus einem Zellverband lösen, in Blut- oder Lymphgefäße eintreten und diese andernorts wieder verlassen, um letztlich unter den dortigen, im Vergleich zum Ursprungsmilieu anders gearteten Gewebebedingungen eine Metastase bilden zu können (Zetter et al. 1990). Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass es sich bei den sogenannten disseminierten Tumorzellen (DTC), die in Knochenmark (KM) und Lymphknoten (LK) nachgewiesen werden können, um die Vorläuferzellen von Metastasen handelt (Stoecklein et al. 2010, Klein et al. 2013). Die erhebliche genetische Ungleichheit zwischen Primärtumoren, den DTC und Metastasen bei Karzinomen lässt auf eine frühe Absiedelung von Tumorzellen aus dem Primärtumor schließen (parallele Progression). Ein hypothetischer linearer Verlauf der Tumorprogression hingegen würde einen deckungsgleichen- bzw. ähnlichen Genotyp zwischen Primarius, DTC und Filiae vermuten lassen (lineare Progression). Ein weiteres Zeichen für die biologische Relevanz der DTC für die systemische Tumorerkrankung ist die signifikante Korrelation des Nachweises von DTC mit einer schlechteren Prognose, wie sie bei den meisten soliden Tumoren beschrieben worden ist (Gorges, Pantel et al. 2013). Während dieser Zusammenhang beim Mammakarzinom als gesichert gilt (Braun, Vogl et al. 2005, Vincent-Salomon, Bidard et al. 2008), bleibt die Studienlage beim kolorektalen Karzinom (CRC) trotz umfangreicher Untersuchungen bislang uneinheitlich. Rhabari et al. konnten in einer großen Metaanalyse insgesamt sechs Studien eingrenzen, die eine prognostische Relevanz der DTC beim CRC zeigten (Rahbari, Aigner et al.). Demgegenüber fanden sich aber auch Untersuchungen, in welchen der Nachweis von DTC im KM von Patienten mit einem CRC prognostisch irrelevant waren (Cohen, Garin-Chesa et al. 1998, Schott, Vogel et al. 1998, Schoppmeyer, Fruhauf et al. 2006). Diese widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der prognostischen Relevanz von DTC beim CRC können einerseits durch methodische Unterschiede im Studienaufbau (u.a. Patientenkollektive, Anreicherungsverfahren,

verwendete Antikörper, Nachbeobachtungszeitraum, usw.) erklärt werden. Andererseits lassen sich die kontroversen Studienergebnisse dahingehend deuten, dass die zugrundeliegende Biologie der DTC und ihre Bedeutung für die Tumorprogression bislang nur unzureichend verstanden sind. So zeigen sich beim CRC regelmäßig hohe Detektionsraten von DTC im KM (Riethdorf, Pantel et al. 2008), obgleich dieses kein primäres Zielorgan der Metastasierung des kolorektalen Karzinoms darstellt (Wan et al. 2009, Vatandoust et al. 2015). Demgegenüber weisen Patienten mit Mamma- oder Prostatakarzinomen eine deutlich niedrigere Inzidenz für DTC im KM auf, obwohl bei diesen Entitäten signifikant häufiger Knochenmetastasen entstehen (Guise et al. 2007). Demzufolge könnte die Präsenz von DTC im KM von CRC-Patienten einen transienten Ruhezustand („*dormancy*“) darstellen, aus welchem die Zellen mit einer zeitlichen Latenz reaktiviert und in die Blutbahn zurück gelangen, ohne jedoch in der Zwischenzeit eine ossäre Makrometastase entwickelt zu haben (WiKMan, Vessella et al. 2008).

Die Detektion von DTC im KM bei CRC-Patienten erfolgt üblicherweise mit Antikörpern, welche spezifisch die Zytokeratine der Zellen erkennen (Schlimok, Funke et al. 1990, Pantel, Izbicki et al. 1993). In den angeführten Studien wie auch in der vorliegenden Arbeit ist der Antikörper A45-B/B3 verwendet worden, welcher gegen die Heterodimere CK8, CK18 und CK19 gerichtet ist (Pantel, Schlimok et al. 1994). Mit dieser etablierten Methode wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt 28 CK-positive Tumorzellen in 18 KM-Proben von 66 CRC-Patienten (27%) detektiert. Die Detektionsrate unter Verwendung des Antikörpers A45-B/B3 variierte in den bisherigen Studien zwischen 10% und 55% (Buxhofer-Ausch, Ausch et al., Leinung, Wurl et al. 2000, Werther, Normark et al. 2002, Schoppmeyer, Fruhauf et al. 2006), so dass eine Nachweisrate von 27% in diesem Bereich liegt. Bemerkenswerterweise fiel die Detektionsrate bei Patienten mit kleineren Primärtumoren (pT1 und pT2) merklich geringer aus als bei Patienten mit größeren Primärtumoren (pT3 und pT4). Obgleich der Unterschied nicht signifikant war, ergab sich mit 15% bzw. 32% jedoch nominell ein deutlicher Unterschied. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Inzidenz von DTC im KM von CRC-Patienten unter anderem von der Infiltrationstiefe des Primärtumors abhängen könnte. Ob letztlich die Ausdehnung größerer Primärtumoren im Gewebe oder die damit vermutlich einher gehende längere Wachstumszeit für ein potentiell erhöhtes Risiko der Tumorzell dissemination ursächlich, ist letztlich ungeklärt. Die systemische Ausbreitung der Krebserkrankung ist mit dem Auftreten von

Fernmetastasen gewiss (Talmadge, Fidler et al. 2010). Betrachtet man die DTC als Vorläuferzellen von Metastasen, so wäre eine höhere Detektionsrate bei klinisch manifester Metastasierung naheliegend. In diesem Zusammenhang hatte sich unter Verwendung des Antikörpers A45-B/B3 bei der Untersuchung von Knochenmarkproben bei CRC-Patienten im M1-Stadium eine Detektionsrate von 55% gezeigt (Schoppmeyer, Fruhauf et al. 2006). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Subgruppenanalysen von Patienten im M0-Stadium (27%) und im M1-Stadium ohne (21%) bzw. mit (33%) operablem Primärtumor ergaben jedoch keinen signifikanten Unterschied der Detektionsraten zwischen den Gruppen. Dennoch fiel auf, dass jene Patienten mit klinisch fassbarer Metastasierung und DTC im KM häufiger multiple Metastasen ( $n > 1$ ) und zudem mit 36% auch eine höhere DTC-Detektionsrate aufwiesen als die übrigen Patienten mit lediglich 13%. Dies könnte Ausdruck des vermuteten Einflusses der DTC auf die Metastasierung sein, zumal mit fortschreitender Tumorprogression die Zunahme von für die Metastasierung relevanten DTC anzunehmen ist. Insgesamt jedoch waren die hier untersuchten Patientenzahlen zu gering, um einen möglichen Zusammenhang demonstrieren zu können. Der Vergleich mit ähnlichen Studien ist an dieser Stelle nicht möglich, da diese entweder keine Patienten im UICC-Stadium IV untersuchten (Lindemann, Schlimok et al. 1992) oder keine derartigen Ergebnisse beschrieben (Leinung, Wurl et al. 2000, Schott, Vogel et al. 1998).

Zur Detektion von DTC im LK wurde der monoklonale Antikörper Ber-Ep4 verwendet, welcher gegen das epitheliale Zell Adhäsionsmolekül (EpCAM) gerichtet ist. Die Detektionsrate EpCAM-positiver Zellen im LK betrug in der vorliegenden Arbeit 39%. Dieses Ergebnis lässt sich ebenfalls mit anderen Arbeiten vergleichen, bei denen die Rate gefundener Tumorzellen zwischen 27% und 50% lag (Rosenberg, Friederichs et al. 2004, Schurr, Behnke et al. 2007). Aufgrund der limitierten Fallzahl bei den Untersuchungen des Lymphknotens ist die Aussagekraft sicherlich eingeschränkt, allerdings zeigte sich bei den 13 untersuchten Patienten jedoch analog zu den aus dem KM isolierten DTC auch in diesem Fall, dass die größeren Tumoren (pT3 und pT4) eine höhere Detektionsrate als die kleineren Tumoren (pT1 und pT2) aufwiesen.

## **Stellen DTC mit aktiviertem Wnt-Signalweg relevante Subpopulation dar?**

Wie dargelegt konnte die prognostische Relevanz der DTC bei verschiedenen Tumorentitäten mehrfach belegt werden (Gorges, Pantel et al. 2013). Jedoch scheint nicht der Nachweis von DTC allein für eine schlechtere Prognose bedeutsam zu sein. So zeigten Überlebensanalysen beim Mammakarzinom, dass der Nachweis von DTC im KM ein verkürztes Überleben bedingt (Braun, Vogl et al. 2005). In der zitierten Untersuchung konnte bei Patientinnen mit Nachweis von DTC im KM ein signifikant verkürztes 5-Jahres-Überleben festgestellt werden. Allerdings zeigte sich bei der Analyse der 10-Jahres-Überlebensraten, dass dieses nicht allein durch den Nachweis von Fernmetastasen assoziiert ist. Hier schienen eher Tumorgröße und der LK-Status von Bedeutung zu sein. Die unbeständige prognostische Relevanz von DTC beim CRC wie sie in der Metaanalyse von Rhabari et al. insbesondere im Vergleich zu Brustkrebspatientinnen verdeutlicht wird, könnte durch ein variables metastatisches Potential dieser Tumorzellen zu erklären sein, wobei möglicherweise nicht alle detektierten DTC für die Metastasierung in gleichem Maße relevant sind. Vielmehr könnten Subpopulationen mit besonderem Potential für die Metastasierung verantwortlich zu sein.

Nach dem Konzept von Brabletz et al. (Brabletz, Jung et al. 2005) könnten migratorische Tumorstammzellen aus einer Subpopulation von für die Disseminierung und Metastasengründung relevanten DTC mit erhaltenen Stammzeleigenschaften hervorgehen. Die Identifikation dieser Tumorstammzellen beim CRC war in den letzten Jahren Gegenstand vieler Untersuchungen. Die folgenden Marker konnten bislang als potentielle Tumorstammzellmarker beim CRC identifiziert werden: CD24 und CD 29 (Vermeulen et al. 2008), CD44 (Chu et al. 2009, Dalerba, Dylla et al. 2007, Du et al. 2008), CD133 (O'Brien, Pollett et al. 2007, Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007), CD166 Dalerba, Dylla et al. 2007), Lgr-5 (Barker et al. 2009) und ALDH1A1 (Huang et al. 2009). Ein besonders zielführender Oberflächenmarker könnte dabei das CD133 sein, welches als ein Marker für Stammzeleigenschaften beim CRC identifiziert werden konnte (O'Brien, Pollett et al. 2007, Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007). Bei dem genannten CD133, auch Prominin genannt, handelt es sich um ein Transmembranprotein, welches erstmalig vor knapp 20 Jahren in humanen hämatopoetischen Stammzellen beschrieben wurde (Miraglia, Godfrey et al. 1997). Aus den zuvor benannten Publikationen geht hervor, dass eine Selektion von kolorektalen

Tumorzellen, die CD133 exprimieren, zu einer stark erhöhten Tumorigenität nach Inokulation in immundefizienten Mäusen führten. Dabei waren die implantierten Zellen fortan fähig, sich selbst zu erneuern und die ursprüngliche Morphologie des Primärtumors anzunehmen. Weitergehend konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Expression von nukleärem beta-catenin und CD133 im Primärtumorgewebe mit einem höheren Risiko der Tumorprogression assoziiert ist (Horst, Kriegl et al. 2009). Eine weitere vielversprechende Kombination zur Identifikation potentieller Tumorstammzellen beim CRC könnte die Oberflächenmoleküle EpCAM, CD44 und CD166 umfassen (Dalerba, Dylla et al. 2007). Die Arbeitsgruppe um Dalerba et al. zeigte, dass es einer Subpopulation aus EpCAM-/CD44-positiven epithelialen Zellen vorbehalten war, nach Implantation in immunsupprimierten Mäusen zu einem Tumorwachstum zu führen. Diese Tumoren exprimierten zusätzlich den mesenchymalen Stammzell-Oberflächenmarker CD166, sodass die Arbeitsgruppe das Stammzellmodell beim CRC hiermit weiter bestätigt sahen und in der Kombination aus diesen drei Markern ein für die Stammzellisolierung sinnvolles Profil an Oberflächenmarkern postulierten. Beta-catenin gilt als bedeutender Effektor des Wnt-Signalweges, wodurch es über die Aktivierung verschiedener Zielgene eine wichtige Funktion in den intestinalen Stammzellen übernimmt (Korinek, Barker et al. 1998). Entsprechend dem Konzept von Brabletz et al. gelten jene Zellen als migratorische Tumorstammzellen, die ihre Stammzeleigenschaft erhalten und die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen haben. Beim CRC lässt sich die EMT durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges an der Invasionsfront nachweisen (Brabletz, Jung et al. 1998, Kirchner and Brabletz 2000), wobei nukleäres beta-catenin als Endpunkt des Signalweges zum Nachweis der Wnt-Aktivierung dienen kann. Zudem konnte Lgr-5 als potentieller Marker für intestinale Stammzellen identifiziert werden (Barker, van Es et al. 2007). Es handelt sich hierbei um ein Zielgen des beta-catenin/TCF-4 Komplexes, welches aufgrund seiner restriktiven Expression in den basalen Krypten des Kolons von der Arbeitsgruppe ausgewählt wurde. TCF-4 ist ein Transkriptionsregulator, welcher im Falle einer Wnt-Aktivierung ein Komplex mit beta-catenin eingeht und demnach ebenfalls als wichtiger Mediator des Wnt-Signalweges gilt (Korinek, Barker et al. 1998). Lgr-5 ist ein sogenannter G-Proteingekoppelter Rezeptor welcher nach Ligandenbindung einen Proteinkomplex bildet und die Wnt-Signaltransduktion positiv reguliert. In der genannten Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine APC-Mutation in Lgr-5-positiven Stammzellen die Entstehung von

Adenomen fördert. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass eben dieser APC-Verlust ein sehr effizienter Weg zur Neoplasie darstellt (Barker et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis von nukleärem beta-catenin als indirekter Marker für die Aktivierung des Wnt-Signalweges in den detektierten DTC der CRC-Patienten heran gezogen. Die hierzu etablierte Doppelfärbung zur simultanen Darstellung von epithelialen Markern (Zytokeratin oder EpCAM) und beta-catenin wurde mithilfe der humanen kolorektalen Tumorzelllinie SW480 etabliert, da diese humane kolorektale Tumorzelllinie bekanntermaßen beide epitheliale Marker exprimiert und sich zudem für die Darstellung von beta-catenin eignet (Eleftheriou, Yoshida et al. 2001). In den beschriebenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich nukleäres beta-catenin insbesondere in den Bereichen mit niedriger Zelldichte, zytoplasmatisch lokalisiertes beta-catenin hingegen eher in Zellverbänden darstellen ließ. Dies ließ sich in den hier durchgeführten Zellkulturversuchen ebenfalls nachweisen, so dass die Doppelfärbung fortan für die weiteren Untersuchungen an den Einzelzellen verwendet werden konnte. Der für Etablierung der Doppelfärbung zusätzlich verwendete Kernfarbstoff DAPI wurde in den Untersuchungen der Einzelzellen nicht verwendet, da eine potentielle Beeinträchtigung (Darzynkiewicz et al. 2012) der folgenden genomischen Untersuchung vermieden werden sollte.

Die Phänotypisierung der DTC nach der Expression von beta-catenin gelang bei 23 Tumoreinzellen, die aus dem KM von CRC-Patienten isoliert worden waren. Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, dass 30% der untersuchten kolorektalen DTC nukleäres beta-catenin exprimierten und demzufolge ihrer anzunehmenden Wnt-Aktivierung als migratorische Tumorstammzelle gelten könnten (Brabletz, Jung et al. 2005). In wie weit sich die Wnt-Aktivität in den DTC während den verschiedenen Phasen der Disseminierung verändern, bleibt weiterhin ungeklärt. Es ist vorstellbar, dass die Wnt-aktivierten DTC ihre durch die EMT erworbenen Eigenschaften auch während der Disseminierung vorübergehend behalten. Möglicherweise sind zudem auto- und parakrine Faktoren des Mikromilieus relevant, welche die Aktivität des Wnt-Signalweges modulieren und damit die Migration und Invasion der Zellen begünstigen (Fodde and Brabletz 2007), für die Translokation von beta-catenin in den Zellkern verantwortlich. Bei den hier gezeigten Daten war auffällig, dass insbesondere jene Zellen, welche sich bei Patienten mit metachroner Metastase ( $M1_{meta}$ ) nachweisen ließen, besonders häufig nukleäres beta-catenin aufwiesen (45%). Im Gegensatz hierzu wiesen die Zellen der Patienten mit pM0- und  $M1_{syn}$ -Stadium lediglich in 21%

nukleäres beta-catenin auf. Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, dass nicht allein die Wnt-Aktivität und die konsekutive EMT am Rande des Primärtumors für die Wnt-Aktivität der DTC verantwortlich sind. Vielmehr scheinen die zellphysiologischen Eigenschaften, welche die DTC durch die EMT erlangt haben auch durch anhaltende Einflüsse wie das Mikromilieu im KM oder LK aufrechterhalten zu werden. Auch wenn die Fallzahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten LK von CRC-Patienten deutlich geringer war, wurde nukleäres beta-catenin lediglich in einer der sieben Zellen nachgewiesen (14%). Der Wnt-Signalweg schien in den aus dem LK isolierten DTC demnach nicht so häufig aktiviert zu sein wie bei den DTC des Knochenmarks mit 30%. Die Untersuchungen auf DTC im KM oder LK gilt beim kolorektalen Karzinom bislang nicht als Routinediagnostik. Grundsätzlich wäre hierfür ein einheitliches Konzept zur Detektion von DTC, wie sie die Arbeitsgruppe um Pantel et al. vorschlagen (Fehm, Pantel et al. 2006) sinnvoll. Zumal nur mit einer einheitlichen Methodik vergleichbare Ergebnisse aller Untersuchungen zu DTC im KM oder LK zu erwarten ist. Allerdings wäre die Etablierung einer immunzytochemischen Färbemethode zur simultanen Darstellung mehrerer Zielstrukturen ein ebenso anzustrebendes Ziel. Neben dem von der Arbeitsgruppe um Pantel et al. empfohlenen Zytokeratin-AK wäre es möglich, gleichzeitig mehrere zellspezifische Marker zu untersuchen und damit potentielle DTC-Populationen phänotypisch auf einfache Weise genauer zu klassifizieren. Eine Dreifachfärbung mit AK gegen beta-catenin, Zytokeratin und EpCAM wäre zu erwägen, zumal die Färbung gegen Zytokeratin als Standard zur Detektion disseminierter Tumorzellen gilt und EpCAM als therapeutisches Markermolekül beim fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom bereits etabliert wurde (Riethmuller, Schneider-Gadicke et al. 1994, Riethmuller, Holz et al. 1998). Als Beispiel für diese Kombination konnte beim Mammakarzinom gezeigt werden, dass bei immunzytochemischen Färbungen gegen Zytokeratin nach Anreicherung EpCAM-positiver Zellen nur ein geringer Prozentsatz der Zytokeratin-positiven Zellen eine Co-Expression von EpCAM aufweist (Kasimir-Bauer, Otterbach et al. 2003). Beide Marker scheinen bei dieser Studie nur selten gemeinsam auf einer Zelle gemeinsam exprimiert zu sein, sodass von unterschiedlichen DTC-Populationen mit potentiell unterschiedlicher Relevanz für die Metastasierung ausgegangen werden könnte.

## **Nukleäres beta-catenin in DTC korreliert mit erhöhter CIN**

Bei der Phänotypisierung von DTC aus dem KM konnten CK-positive Tumorzellen mit nukleärem beta-catenin identifiziert werden. Hadjihannas et al. hatten in diesem Zusammenhang zeigen können, dass nukleäres beta-catenin als Zeichen einer verstärkten Wnt-Aktivität in Kolonkarzinomzellen mit einer erhöhten chromosomalen Instabilität (CIN) einhergeht (Hadjihannas, Bruckner et al. 2006). Entsprechend dem genetischen Modell für die Tumorentstehung beim kolorektalen Karzinom spielt die CIN mit den damit einhergehenden Aktivierungen von Onkogenen und Verlust von Tumorsuppressorgenen eine entscheidende Rolle beim CRC (Fearon, Vogelstein et al. 1990). Fortgeschrittene Tumore beim CRC weisen CIN mit Aneuploidie als auch mit chromosomalen Aberrationen auf, wobei die CIN mit zunehmendem Tumorprogress zunimmt (Lengauer, Kinzler et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Aneuploidie als Zeichen einer CIN stark mit dem Nachweis von nukleärem beta-catenin im Bereich der Invasionsfront korrelierte (Martensson, Oberg et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden 15 DTC mit einem etablierten Protokoll zur Einzelzell-CGH (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999) genomisch mit dem Ziel untersucht, neben phänotypischen Merkmalen genomische Veränderungen zu identifizieren, welche ein besonderes Potential zur Metastasierung der Zellen nahelegen könnte. Dabei zeigte sich, dass die durchschnittliche Aberrationsrate von Zellen mit nukleärem beta-catenin signifikant höher war als bei DTC ohne nukleäres beta-catenin ( $p=0,018$ ). Diese signifikant erhöhte Aberrationsrate bei DTC mit nukleärem beta-catenin spricht für eine höhere chromosomale Instabilität, die durch Gewinne oder Verluste großer Teile ihrer der Chromosomen definiert ist (Rajagopalan, Nowak et al. 2003). Ungeklärt ist bislang, in wie weit diese chromosomalen Veränderungen in Zusammenhang mit der Expression von nukleärem beta-catenin stehen. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine erhöhte Wnt-Aktivität beim CRC Auswirkungen auf chromosomale Veränderungen hat: Hadjihannas et al. zeigten an der Tumorzelllinie HCT116, dass die durch nukleäre Translokation von beta-catenin erhöhte Transkriptionsaktivität über Conductin und polo-like-Kinase 1 letztlich zu einer erhöhten CIN führt (Hadjihannas, Bruckner et al. 2006). In der vorliegenden Untersuchung wiesen 3 von 4 untersuchten Zellen mit nukleärem beta-catenin (75%) mehr als 4 Aberrationen auf, was dem Median der Anzahl chromosomaler Aberrationen aller analysierten Zellen entsprach. Zu klären wird fortan sein, ob die DTC mit Wnt-Aktivität aufgrund ihrer erhöhten CIN ein erhöhtes Potential

zur Metastasierung aufweisen. Hinweis für einen solchen Zusammenhang könnte sein, dass in der vorliegenden Untersuchung die mittlere Anzahl chromosomaler Veränderungen pro DTC bei Patienten mit M1-Stadium signifikant höher war als bei Patienten mit M0-Stadium ( $p=0,0065$ ). Diese Beobachtung legt nahe, dass DTC mit einer erhöhten CIN prävalent für die Ausbildung von Metastasen sind. Untersuchungen zu einer prognostischen Relevanz von CIN beim CRC könnten diese Vermutung unterstützen, da mittels array-CGH eine Zunahme von genetischer Instabilität zwischen den UICC-Stadien I bis IV als auch zwischen Primärtumoren und Metastasen nachgewiesen werden konnte (Orsetti et al. 2014).

Betrachtet man die hier erstmalig identifizierten und isolierten DTC mit aktiviertem Wnt-Signalweg und erhöhter CIN entsprechend dem Modell von Brabletz et al. als potentielle migratorische Tumorstammzellen, könnte es sich bei den DTC mit nukleärem beta-catenin eine für die Metastasierung relevante und abgrenzbare Subpopulation handeln. Beim Vergleich der genomischen Profile zwischen DTC mit und ohne Wnt-Aktivität zeigten sich nicht allein Unterschiede in der Anzahl der chromosomalen Aberrationen sondern auch in der Qualität: Zwischen den beiden Subgruppen fanden sich umschriebene Unterschiede bei den Amplifikationen an Chromosom 7 und Chromosom 19q sowie bei den Deletionen an Chromosom 3p. Neben phänotypisch-funktionalen Unterschieden auf Proteinebene konnten in der vorliegenden Arbeit somit auch genotypische Unterschiede zwischen den beiden Subgruppen festgestellt werden. Bei Betrachtung der oben angeführten Aberrationen am Chromosom 7, Chromosom 19 und Chromosom 3 erkennt man, dass diese typischerweise im Zuge der frühen Tumorentstehung des kolorektalen Karzinoms auftreten (Ried, Knutzen et al. 1996, Meijer, Hermsen et al. 1998). Die zitierten Arbeiten konnten belegen, dass bereits „low grade“ und „high grade“ Adenome chromosomale Gewinne auf Chromosom 7 und 20 und folglich Karzinome Gewinne auf Chromosom 1, 7p, 8q, 13 und 20 und Verluste auf Chromosom 4, 8p und 18q aufwiesen. Die häufigsten chromosomalen Veränderungen beim CRC sind Gewinne am Chromosom 7, 8q, 13q und 20 sowie Verluste am Chromosom 4, 5q, 8p, 17p und 18 (Heim, Mitelman 2009).

Schon in sehr frühen Stadien der Kanzerogenese des CRC lassen sich in den Primärtumoren chromosomale Aberrationen nachweisen, die letztlich mit einer späteren Metastasierung der Tumoren assoziiert sind. Vertreter einiger Tumorprogressionsmodelle gehen davon aus, dass bereits die Primärtumoren

Subpopulationen von Tumorzellen aufweisen, die ein besonders hohes Malignitätspotential aufweisen (Schardt, Meyer et al. 2005, Knosel, Emde et al. 2006). Die Aktivierung des Wnt-Signalweges, wie dies durch die nukleäre Expression von beta-catenin zum Ausdruck kommt, könnte Merkmal und Identifikator einer solchen Zellfraktion sein.

### **Nukleäres beta-catenin an der Invasionsfront**

Nachdem es gelungen war nukleäres beta-catenin in DTC nachzuweisen, folgten ergänzende immunhistochemische Untersuchungen an den korrespondierenden Primärtumoren und Metastasen. Vergleichbare Untersuchungen zum Expressionsmuster von beta-catenin an der Invasionsfront beim kolorektalen Karzinom wurden vor allem von der Arbeitsgruppe um Brabletz et al. durchgeführt (Brabletz, Jung et al. 1998, Kirchner and Brabletz 2000, Kirchner, Brabletz et al. 2001). Hierbei konnten stetige Besonderheiten festgestellt werden: in den zentralen, gut differenzierten Tumorarealen (sowohl beim Primärtumor als auch bei den Metastasen) zeigte sich eine zytoplasmatische oder membranöse beta-catenin-Expression während sich in den Randbereichen, der sogenannten Invasionsfront, eine starke nukleäre Anreicherung von beta-catenin darstellen ließ.

Hiermit vergleichbar bot sich in der vorliegenden Arbeit eine vermehrte nukleäre  $\beta$ -catenin-Expression in den Randbereichen der Tumoren: Etwas mehr als ein Drittel der Zellen (38%) bei den Primärtumoren und knapp die Hälfte der Zellen bei den Metastasen (47%) wiesen im Bereich der Invasionsfront starke nukleäre Expression von beta-catenin auf. Die Korrelation der Ergebnisse zur Expression von beta-catenin am Invasionsrand der Primärtumoren bei Patienten mit oder ohne DTC im KM ergab keine Unterschiede – der Anteil an nukleärem beta-catenin war mit 35% bzw. 36% nahezu identisch. Analog zu den Studienergebnissen anderer Arbeitsgruppen erlaubt diese Beobachtung den Rückschluss, dass die nukleäre Expression von beta-catenin als Ausdruck eines aktivierten Wnt-Signalweges für die EMT am Invasionsrand eine mögliche Voraussetzung für die Tumorzell dissemination darstellt (Mariadason, Bordonaro et al. 2001, Kim, Lu et al. 2002, Muller, Bain et al. 2002, Hlubek, Brabletz et al 2007), dies jedoch beim CRC nicht mit der Inzidenz von DTC im KM korrespondiert und somit nicht zwischen einem metastasierenden oder nicht-metastasierenden

Tumorphänotyp unterscheiden kann. Dennoch liefert der Nachweis von DTC mit einer nukleären Expression von beta-catenin die Erkenntnis, dass sich unter den disseminierten Tumorzellen bei einem Teil der Patienten mit einem CRC eine Zellpopulation befindet, in welcher analog zu den Tumorzellen des Invasionsrandes der Wnt-Signalweg aktiviert ist und dies als Ausdruck der für die Metastasierung als notwendig angenommenen EMT gewertet werden kann. In den letzten Jahren wurden einige Studien zur Untersuchung durchgeführt, welche beta-catenin (als Marker einer EMT) als potentiellen prognostischen Faktor beim CRC identifizieren sollten (Mesker, Kuppen et al. 2009, Kevans, Mulcahy et al. 2011, Fan, Yang et al. 2012). Eine prognostische Bedeutung konnte jene Studien jedoch nicht nachweisen. Die beta-catenin-Expression variierte in den genannten Untersuchungen zwischen 40 und 50%, wobei eine klare Abgrenzung zwischen der Lokalisierung (nukleär oder membranös) nicht immer eindeutig dargestellt wurde. Neben der Berücksichtigung von DTC im KM sollten solche Marker für die Prognoseabschätzung weiter untersucht werden.

### **Perspektive**

In der Zukunft gilt es nun, DTC phänotypisch weiter zu charakterisieren. Wie erwähnt wäre hierfür eine Kombination mehrerer Antikörpern denkbar, wobei vor allem potentielle Tumor-Stammzellmarker eine bedeutende Rolle einnehmen dürften. Sich anschließende funktionelle Untersuchungen dieser Zellen sollten helfen, solche Subpopulationen von DTC zu identifizieren, die eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung beim CRC wie auch potenziell bei anderen soliden Tumoren spielen könnten. Hierfür stehen zwischenzeitlich Methoden mit einer höheren Auflösung wie die array-CGH oder das *whole-genome-sequencing* zur Verfügung.

Ziel bleibt es, nicht nur die Entstehung sondern vor allem auch die Progression der systemischen Krebserkrankung zu verstehen, um im Hinblick auf die Ausbildung der letalen Metastasen, die weiterhin wie bei anderen soliden Tumoren auch beim CRC die Haupttodesursache ausmachen, effektivere Behandlungsmethoden zu etablieren.

## 5 Literaturverzeichnis

Aoki, K., M. Aoki, M. Sugai, N. Harada, H. Miyoshi, T. Tsukamoto, T. Mizoshita, M. Tatematsu, H. Seno, T. Chiba, M. Oshima, C. L. Hsieh and M. M. Taketo (2007). "Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells." Oncogene **26**(24): 3511-3520.

Arce, L., N. N. Yokoyama and M. L. Waterman (2006). "Diversity of LEF/TCF action in development and disease." Oncogene **25**(57): 7492-7504.

Barker, N. and H. Clevers (2001). "Tumor environment: a potent driving force in colorectal cancer?" Trends Mol Med **7**(12): 535-537.

Barker, N., R. A. Ridgway, J. H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, A. R. Clarke, O. J. Sansom and H. Clevers (2009). "Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer." Nature **457**(7229): 608-611.

Barker, N., J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegbarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters and H. Clevers (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." Nature **449**(7165): 1003-1007.

Bates, R. C. and A. M. Mercurio (2005). "The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression." Cancer Biol Ther **4**(4): 365-370.

Bork U1, Grützmann R1, Rahbari NN1, Schölch S1, Distler M1, Reissfelder C1, Koch M1, Weitz J1 (2014). "Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer." World J Gastroenterol. **14**;20(30):10296-304. doi: 10.3748/wjg.v20.i30.10296.

Brabletz, T., A. Jung, K. Hermann, K. Gunther, W. Hohenberger and T. Kirchner (1998). "Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front." Pathol Res Pract **194**(10): 701-704.

Brabletz T1, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Aug 28;98(18):10356-61.

Brabletz, T., A. Jung, S. Spaderna, F. Hlubek and T. Kirchner (2005). "Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression." Nat Rev Cancer **5**(9): 744-749.

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

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

Bukholm, I. R., J. Bondi, P. Wiik, J. M. Nesland, S. N. Andersen, A. Bakka and G. Bukholm (2003). "Presence of isolated tumour cells in mesenteric lymph nodes predicts poor prognosis in patients with stage II colon cancer." Eur J Surg Oncol **29**(10): 862-866.

Buxhofer-Ausch, V., C. Ausch, E. Kitzweger, M. Mollik, A. Reiner-Concin, E. Ogris, M. Stampfl, G. Hamilton, R. Schiessel and W. Hinterberger "Spontaneous changes in tumour cell dissemination to bone marrow in colorectal cancer." Colorectal Dis **12**(8): 776-782.

Cadigan KM, Nusse R. (1997). "Wnt signaling: A common theme in animal development. " Genes Dev **11**: 3286– 3305.

Cady, B., R. L. Jenkins, G. D. Steele, Jr., W. D. Lewis, M. D. Stone, W. V. McDermott, J. M. Jessup, A. Bothe, P. Lalor, E. J. Lovett, P. Lavin and D. C. Linehan (1998). "Surgical margin in hepatic resection for colorectal metastasis: a critical and improvable determinant of outcome." Ann Surg **227**(4): 566-571.

Calvert, P. M. and H. Frucht (2002). "The genetics of colorectal cancer." Ann Intern Med **137**(7): 603-612.

Clarke, M. F., J. E. Dick, P. B. Dirks, C. J. Eaves, C. H. Jamieson, D. L. Jones, J. Visvader, I. L. Weissman and G. M. Wahl (2006). "Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells." Cancer Res **66**(19): 9339-9344.

Coello, M. C., J. D. Luketich, V. R. Litle and T. E. Godfrey (2004). "Prognostic significance of micrometastasis in non-small-cell lung cancer." Clin Lung Cancer **5**(4): 214-225.

Cohen, A. M., P. Garin-Chesa, M. Hanson, K. Weyhrauch, N. Kemeny, Y. Fong, P. Paty, S. Welt and L. Old (1998). "In vitro detection of occult bone marrow metastases in patients with colorectal cancer hepatic metastases." Dis Colon Rectum **41**(9): 1112-1115.

Conacci-Sorrell, M., I. Simcha, T. Ben-Yedidia, J. Blechman, P. Savagner and A. Ben-Ze'ev (2003). "Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK." J Cell Biol **163**(4): 847-857.

Dalerba, P., S. J. Dylla, I. K. Park, R. Liu, X. Wang, R. W. Cho, T. Hoey, A. Gurney, E. H. Huang, D. M. Simeone, A. A. Shelton, G. Parmiani, C. Castelli and M. F. Clarke (2007). "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10158-10163.

Darzynkiewicz Z. (2012). Critical Aspects in Analysis of Cellular DNA Content. Curr Protoc Cytom. Author manuscript; available in PMC 2012 April 1. Published in final edited form as: Curr Protoc Cytom. 2011 April; CHAPTER: Unit–7.2. doi: 10.1002/0471142956.cy0702s56

Dikovskaya, D., D. Schiffmann, I. P. Newton, A. Oakley, K. Kroboth, O. Sansom, T. J. Jamieson, V. Meniel, A. Clarke and I. S. Nathke (2007). "Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis." J Cell Biol **176**(2): 183-195.

Eira S Roth,<sup>1</sup> David T Fetzer,<sup>1</sup> Bruce J Barron,<sup>2</sup> Usha A Joseph,<sup>3</sup> Isis W Gayed,<sup>3</sup> and David Q Wan <sup>3</sup> (2009). Does colon cancer ever metastasize to bone first? a temporal analysis of colorectal cancer progression. BMC Cancer. 2009; 9: 274.

Eleftheriou, A., M. Yoshida and B. R. Henderson (2001). "Nuclear export of human beta-catenin can occur independent of CRM1 and the adenomatous polyposis coli tumor suppressor." J Biol Chem **276**(28): 25883-25888.

Fan XJ, Wan XB, Huang Y, Cai HM, Fu XH, Yang ZL, et al. (2012). "Epithelial- mesenchymal transition biomarkers and support vector machine guided model in preoperatively predicting regional lymph node metastasis for rectal cancer". Br J Cancer 2012;106:1735–41.

Fearon ER1, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.

Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, Schindlbeck C, Wallwiener D, Borgen E, Naume B, Pantel K, Solomayer E (2006): "A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation". *Cancer*; 107:885–892.

Feezor, R. J., E. M. Copeland, 3rd and S. N. Hochwald (2002). "Significance of micrometastases in colorectal cancer." Ann Surg Oncol 9(10): 944-953.

Fodde, R. and T. Brabletz (2007). "Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior." Curr Opin Cell Biol 19(2): 150-158.

Gorges TM(1), Pantel K (2013). Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. Cancer Immunol Immunother. 2013 May;62(5):931-9. doi: 10.1007/s00262-012-1387-Epub 2013 Jan 12.

Hadjihannas, M. V., M. Bruckner, B. Jerchow, W. Birchmeier, W. Dietmaier and J. Behrens (2006). "Aberrant Wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer." Proc Natl Acad Sci U S A 103(28): 10747-10752.

Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J (2006): An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. Science, 319:1352–1355.

Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. 100(1): p. 57-70.

He, T. C., A. B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. T. da Costa, P. J. Morin, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." Science 281(5382): 1509-1512.

Hlubek F1, Spaderna S, Schmalhofer O, Jung A, Kirchner T, Brabletz T (2007). "Wnt/FZD signaling and colorectal cancer morphogenesis." Front Biosci. Jan 1;12:458-70.

Heim S, Mitelman F (2009). "Cancer cytogenetics. 3rd ed. Hoboken", NJ: John Wiley & Sons; 2009. Google Scholar

Holzel, D., R. Eckel and J. Engel (2009). "[Colorectal cancer metastasis. Frequency, prognosis, and consequences]." Chirurg 80(4): 331-340.

Horst, D., L. Kriegl, J. Engel, A. Jung and T. Kirchner (2009). "CD133 and nuclear beta-catenin: the marker combination to detect high risk cases of low stage colorectal cancer." Eur J Cancer 45(11): 2034-2040.

Hosch, S., J. Kraus, P. Scheunemann, J. R. Izbicki, C. Schneider, U. Schumacher, K. Witter, M. R. Speicher and K. Pantel (2000). "Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer." Cancer Res 60(24): 6836-6840.

Hosch, S. B., N. H. Stoecklein, U. Pichlmeier, A. Rehders, P. Scheunemann, A. Niendorf, W. T. Knoefel and J. R. Izbicki (2001). "Esophageal cancer: the mode of lymphatic tumor cell spread and its prognostic significance." J Clin Oncol 19(7): 1970-1975.

Hulit, J., C. Wang, Z. Li, C. Albanese, M. Rao, D. Di Vizio, S. Shah, S. W. Byers, R. Mahmood, L. H. Augenlicht, R. Russell and R. G. Pestell (2004). "Cyclin D1 genetic heterozygosity regulates colonic epithelial cell differentiation and tumor number in ApcMin mice." Mol Cell Biol **24**(17): 7598-7611.

<https://www.progenetix.org>

letzter Zugriff am 08.03.2017

<http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact.html> letzter Zugriff am 13.04.2017

Imai, K. and H. Yamamoto (2008). "Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics." Carcinogenesis **29**(4): 673-680.

Jallepalli, P. V. and C. Lengauer (2001). "Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery." Nat Rev Cancer **1**(2): 109-117.

Jemal, A., L. X. Clegg, E. Ward, L. A. Ries, X. Wu, P. M. Jamison, P. A. Wingo, H. L. Howe, R. N. Anderson and B. K. Edwards (2004). "Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival." Cancer **101**(1): 3-27.

Kaplan, K. B., A. A. Burds, J. R. Swedlow, S. S. Bekir, P. K. Sorger and I. S. Nathke (2001). "A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation." Nat Cell Biol **3**(4): 429-432.

Kasimir-Bauer, S., F. Otterbach, C. Oberhoff, K. W. Schmid, R. Kimmig and S. Seeber (2003). "Rare expression of target antigens for immunotherapy on disseminated tumor cells in breast cancer patients without overt metastases." Int J Mol Med **12**(6): 969-975.

Kemeny, N. and F. Fata (1999). "Arterial, portal, or systemic chemotherapy for patients with hepatic metastasis of colorectal carcinoma." J Hepatobiliary Pancreat Surg **6**(1): 39-49.

Kemper, K., Versloot, M., Cameron, K., Colak, S., de Sousa e Melo, F., de Jong, J. H., ... Medema, J. P. (2012). Mutations in the Ras-Raf Axis underlie the prognostic value of CD133 in colorectal cancer. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 18(11), 3132-41.

Kevans D, Wang LM, Sheahan K, Hyland J, O'Donoghue D, Mulcahy H, et al. (2011). "Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status." Int J Surg Pathol 2011; 19:751-60.

Kienle, P. and M. Koch (2001). "Minimal residual disease in gastrointestinal cancer." Semin Surg Oncol **20**(4): 282-293.

Kim, K., Z. Lu and E. D. Hay (2002). "Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT." Cell Biol Int **26**(5): 463-476.

Kim, P. J., J. Plescia, H. Clevers, E. R. Fearon and D. C. Altieri (2003). "Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer." Lancet **362**(9379): 205-209.

Kingsley LA1, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis. Mol Cancer Ther. 2007 Oct;6(10):2609-17.

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.

Kirchner, T. and T. Brabletz (2000). "Patterning and nuclear beta-catenin expression in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Analogies with embryonic gastrulation." Am J Pathol **157**(4): 1113-1121.

Kिताeva, M. N., L. Grogan, J. P. Williams, E. Dimond, K. Nakahara, P. Hausner, J. W. DeNobile, P. W. Soballe and I. R. Kirsch (1997). "Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors." Cancer Res **57**(20): 4478-4481.

Klein, C. A. (2000). "The biology and analysis of single disseminated tumour cells." Trends Cell Biol **10**(11): 489-493.

Klein, C. A., T. J. Blankenstein, O. Schmidt-Kittler, M. Petronio, B. Polzer, N. H. Stoecklein and G. Riethmuller (2002). "Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer." Lancet **360**(9334): 683-689.

Klein, C. A., O. Schmidt-Kittler, J. A. Schardt, K. Pantel, M. R. Speicher and G. Riethmuller (1999). "Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4494-4499.

Klein, C. A., S. Seidl, K. Petat-Dutter, S. Offner, J. B. Geigl, O. Schmidt-Kittler, N. Wendler, B. Passlick, R. M. Huber, G. Schlimok, P. A. Baeuerle and G. Riethmuller (2002). "Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells." Nat Biotechnol **20**(4): 387-392.

Klein CA (2013). Selection and adaptation during metastatic cancer progression. Nature. 2013 Sep 19;501(7467):365-72. doi: 10.1038/nature12628.

Knopnadel, J., L. Altenhofen and G. Brenner (2003). "[Epidemiologic and health economic significance of colorectal cancers in Germany]." Internist (Berl) **44**(3): 268-274, 276-267.

Knosel, T., V. Emde, K. Schluns, P. M. Schlag, M. Dietel and I. Petersen (2006). "Cytokeratin profiles identify diagnostic signatures in colorectal cancer using multiplex analysis of tissue microarrays." Cell Oncol **28**(4): 167-175.

Korinek, V., N. Barker, P. Moerer, E. van Donselaar, G. Huls, P. J. Peters and H. Clevers (1998). "Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4." Nat Genet **19**(4): 379-383.

Korinek, V., N. Barker, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and H. Clevers (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma." Science **275**(5307): 1784-1787.

Latza, U., G. Niedobitek, R. Schwarting, H. Nekarada and H. Stein (1990). "Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial." J Clin Pathol **43**(3): 213-219.

Lehnert, T. and M. Golling (2001). "[Indications and outcome of liver metastases resection]." Radiologe **41**(1): 40-48.

Leinung, S., P. Wurl, C. L. Weiss, I. Roder and M. Schonfelder (2000). "Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma." Langenbecks Arch Surg **385**(5): 337-343.

Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "Genetic instabilities in human cancers." Nature **396**(6712): 643-649.

Liang, C. C., A. Y. Park and J. L. Guan (2007). "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." Nat Protoc **2**(2): 329-333.

- Lindemann, F., G. Schlimok, P. Dirschedl, J. Witte and G. Riethmuller (1992). "Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients." Lancet **340**(8821): 685-689.
- Lustig, B. and J. Behrens (2003). "The Wnt signaling pathway and its role in tumor development." J Cancer Res Clin Oncol **129**(4): 199-221.
- Lynch, J. P. and T. C. Hoops (2002). "The genetic pathogenesis of colorectal cancer." Hematol Oncol Clin North Am **16**(4): 775-810.
- Manfredi, S., A. M. Bouvier, C. Lepage, C. Hatem, V. Dancourt and J. Faivre (2006). "Incidence and patterns of recurrence after resection for cure of colonic cancer in a well defined population." Br J Surg **93**(9): 1115-1122.
- Mansi, J. L., U. Berger, D. Easton, T. McDonnell, W. H. Redding, J. C. Gazet, A. McKinna, T. J. Powles and R. C. Coombes (1987). "Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases." Br Med J (Clin Res Ed) **295**(6606): 1093-1096.
- Mariadason, J. M., M. Bordonaro, F. Aslam, L. Shi, M. Kuraguchi, A. Velcich and L. H. Augenlicht (2001). "Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation." Cancer Res **61**(8): 3465-3471.
- Martensson, A., A. Oberg, A. Jung, K. Cederquist, R. Stenling and R. Palmqvist (2007). "Beta-catenin expression in relation to genetic instability and prognosis in colorectal cancer." Oncol Rep **17**(2): 447-452.
- Meijer, G. A., M. A. Hermsen, J. P. Baak, P. J. van Diest, S. G. Meuwissen, J. A. Belien, J. M. Hoovers, H. Joenje, P. J. Snijders and J. M. Walboomers (1998). "Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation." J Clin Pathol **51**(12): 901-909.
- Mesker WE, Liefers GJ, Junggebur JMC, Van Pelt GW, Alberici P, Kuppen PJK, et al. (2009). "Presence of a high amount of stroma and down- regulation of SMAD4 predict for worse survival for stage I-II colon cancer patients." Cell Oncol; 31:169–78.
- Miraglia, S., W. Godfrey, et al. (1997). "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning." Blood. 1997 Dec 15;90(12):5013-21.
- Mitry E, Guiu B, Cosconea S, Jooste V, Faivre J, Bouvier AM (2010). "Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study". Gut; 59: 1383-1388 [PMID: 20732912 DOI: 10.1136/gut.2010.211557]
- Miyoshi, Y., H. Nagase, H. Ando, A. Horii, S. Ichii, S. Nakatsuru, T. Aoki, Y. Miki, T. Mori and Y. Nakamura (1992). "Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene." Hum Mol Genet **1**(4): 229-233.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." Science **275**(5307): 1787-1790.
- Muller, T., G. Bain, X. Wang and J. Papkoff (2002). "Regulation of epithelial cell migration and tumor formation by beta-catenin signaling." Exp Cell Res **280**(1): 119-133.
- Niehrs C (2012). "The complex world of WNT receptor signalling." Nat Rev Mol Cell Biol. 2012 Dec;13(12):767-79.

- Nuzzo, G., F. Giuliani, I. Giovannini, G. D. Tebala, G. Clemente and M. Vellone (1997). "Resection of hepatic metastases from colorectal cancer." Hepatogastroenterology **44**(15): 751-759.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, S. Gallinger and J. E. Dick (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-110.
- Pantel, K., J. R. Izbicki, M. Angstwurm, S. Braun, B. Passlick, O. Karg, O. Thetter and G. Riethmuller (1993). "Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer." Cancer Res **53**(5): 1027-1031.
- Pantel, K., G. Schlimok, M. Angstwurm, D. Weckermann, W. Schmaus, H. Gath, B. Passlick, J. R. Izbicki and G. Riethmuller (1994). "Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow." J Hematother **3**(3): 165-173.
- Passlick, B., J. R. Izbicki, B. Kubuschok, W. Nathrath, O. Thetter, U. Pichlmeier, L. Schweiberer, G. Riethmuller and K. Pantel (1994). "Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **12**(9): 1827-1832.
- Piltz, S., H. Dienemann, K. W. Jauch and F. W. Schildberg (1996). "[Results of operative therapy in sequential liver and lung metastasis]." Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd **113**: 225-228.
- Pinto, D., A. Gregorieff, H. Begthel and H. Clevers (2003). "Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium." Genes Dev **17**(14): 1709-1713.
- Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T. M. Bryan, S. R. Hamilton, S. N. Thibodeau, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." Nature **359**(6392): 235-237.
- Radtke, F. and H. Clevers (2005). "Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin." Science **307**(5717): 1904-1909.
- Rahbari, N. N., M. Aigner, K. Thorlund, N. Mollberg, E. Motschall, K. Jensen, M. K. Diener, M. W. Buchler, M. Koch and J. Weitz "Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer." Gastroenterology **138**(5): 1714-1726.
- Rajagopalan, H., M. A. Nowak, B. Vogelstein and C. Lengauer (2003). "The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer." Nat Rev Cancer **3**(9): 695-701.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Reya T, Clevers H. (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." Nature **434**: 843-850.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle and R. De Maria (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-115.
- Ried, T., R. Knutzen, R. Steinbeck, H. Blegen, E. Schrock, K. Heselmeyer, S. du Manoir and G. Auer (1996). "Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors." Genes Chromosomes Cancer **15**(4): 234-245.

Riethdorf S, WiKMan H, Pantel K (2008). Review: biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. Int J Cancer 2008; 123:1991–2006.

Riethmuller, G., E. Holz, G. Schlimok, W. Schmiegel, R. Raab, K. Hoffken, R. Gruber, I. Funke, H. Pichlmaier, H. Hirche, P. Buggisch, J. Witte and R. Pichlmayr (1998). "Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial." J Clin Oncol 16(5): 1788-1794.

Riethmuller, G., E. Schneider-Gadicke, G. Schlimok, W. Schmiegel, R. Raab, K. Hoffken, R. Gruber, H. Pichlmaier, H. Hirche, R. Pichlmayr and et al. (1994). "Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group." Lancet 343(8907): 1177-1183.

Rosenberg, R., J. Friederichs, R. Gertler, A. Hoos, J. Mueller, J. Nahrig, H. Nekarda and J. R. Siewert (2004). "Prognostic evaluation and review of immunohistochemically detected disseminated tumor cells in peritumoral lymph nodes of patients with pN0 colorectal cancer." Int J Colorectal Dis 19(5): 430-437.

Rowan, A. J., H. Lamlum, M. Ilyas, J. Wheeler, J. Straub, A. Papadopoulou, D. Bicknell, W. F. Bodmer and I. P. Tomlinson (2000). "APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits"." Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3352-3357.

Rusan, N. M. and M. Peifer (2008). "Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability." J Cell Biol 181(5): 719-726.

Sansom, O. J., K. R. Reed, A. J. Hayes, H. Ireland, H. BrinkMann, I. P. Newton, E. Batlle, P. Simon-Assmann, H. Clevers, I. S. Nathke, A. R. Clarke and D. J. Winton (2004). "Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration." Genes Dev 18(12): 1385-1390.

Schardt, J. A., M. Meyer, C. H. Hartmann, F. Schubert, O. Schmidt-Kittler, C. Fuhrmann, B. Polzer, M. Petronio, R. Eils and C. A. Klein (2005). "Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer." Cancer Cell 8(3): 227-239.

Schlimok, G., I. Funke, B. Bock, B. Schweiberer, J. Witte and G. Riethmuller (1990). "Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance." J Clin Oncol 8(5): 831-837.

Schlimok, G., I. Funke, B. Holzmann, G. Gottlinger, G. Schmidt, H. Hauser, S. Swierkot, H. H. Warnecke, B. Schneider, H. Koprowski and et al. (1987). "Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A 84(23): 8672-8676.

Schmidt-Kittler, O., T. Ragg, A. Daskalakis, M. Granzow, A. Ahr, T. J. Blankenstein, M. Kaufmann, J. Diebold, H. Arnholdt, P. Muller, J. Bischoff, D. Harich, G. Schlimok, G. Riethmuller, R. Eils and C. A. Klein (2003). "From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression." Proc Natl Acad Sci U S A 100(13): 7737-7742.

Schoppmeyer, K., N. Fruhauf, K. Oldhafer, S. Seeber and S. Kasimir-Bauer (2006). "Tumor cell dissemination in colon cancer does not predict extrahepatic recurrence in patients undergoing surgery for hepatic metastases." Oncol Rep 15(2): 449-454.

Schott, A., I. Vogel, U. Krueger, H. Kalthoff, H. W. Schreiber, W. Schmiegel, D. Henne-Bruns, B. Kremer and H. Juhl (1998). "Isolated tumor cells are frequently detectable in the peritoneal cavity of gastric and colorectal cancer patients and serve as a new prognostic marker." Ann Surg **227**(3): 372-379.

Schurr, P. G., S. Behnke, J. T. Kaifi, D. Bogoevski, B. Link, O. Mann, T. Strate, K. Pantel, J. R. Izbicki and E. Yekebas (2007). "Central mesenteric lymph node BER-Ep4+ cells in colorectal cancer: challenge to sentinel node concept?" Dig Surg **24**(1): 19-27.

Siegel R1, Naishadham D, Jemal A (2013). " Cancer statistics, 2013" CA Cancer J Clin. **63**(1):11-30. doi: 10.3322/caac.21166.

Steinert R1, Hantschick M, Vieth M, Gastinger I, Kühnel F, Lippert H, Reymond MA (2008). Influence of subclinical tumor spreading on survival after curative surgery for colorectal cancer. Arch Surg. 2008 Feb;143(2):122-8. doi: 10.1001/archsurg.2007.49.

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

Stoecklein NH1, Klein CA (2010). Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. Int J Cancer. 2010 Feb 1;126(3):589-98. doi: 10.1002/ijc.24916.

Talmadge J, Fidler I (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. Cancer Res. 2010 Jul 15; 70(14): 5649–5669.

Tetsu, O. and F. McCormick (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." Nature **398**(6726): 422-426.

Ueno, H., J. Murphy, J. R. Jass, H. Mochizuki and I. C. Talbot (2002). "Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer." Histopathology **40**(2): 127-132.

Ueno, H., A. B. Price, K. H. Wilkinson, J. R. Jass, H. Mochizuki and I. C. Talbot (2004). "A new prognostic staging system for rectal cancer." Ann Surg **240**(5): 832-839.

Van Cutsem E, Oliveira J. (2009). Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow- up. Ann Oncol; 20 Suppl 4: 61-63 [PMID: 19454465 DOI: 10.1093/annonc/mdp130]

van de Wetering, M., E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Battle, D. Coudreuse, A. P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema and H. Clevers (2002). "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells." Cell **111**(2): 241-250.

Vatandoust S, Price T, and Karapetis C (2015). "Colorectal cancer: Metastases to a single organ" World J Gastroenterol. Nov 7; 21(41): 11767–11776. Published online 2015 Nov 7. doi: 10.3748/wjg.v21.i41.11767. PMCID: PMC4631975

Vermeulen L, Todaro M, de Sousa MF, Sprick MR, Kemper K, Perez AM, et al. (2008). Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi- lineage differentiation capacity. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105: 13427–32.

Vincent-Salomon, A., F. C. Bidard and J. Y. Pierga (2008). "Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues." J Clin Pathol **61**(5): 570-576.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." N Engl J Med **319**(9): 525-532.

Wang Y, Chang H, Rattner A, Nathans J (2016). "Frizzled Receptors in Development and Disease." Curr Top Dev Biol. 2016;117:113-39.

Weitz, J., M. Koch, J. Debus, T. Hohler, P. R. Galle and M. W. Buchler (2005). "Colorectal cancer." Lancet **365**(9454): 153-165.

Werther, K., M. Normark, N. Brunner and H. J. Nielsen (2002). "Cytokeratin-positive cells in preoperative peripheral blood and bone marrow aspirates of patients with colorectal cancer." Scand J Clin Lab Invest **62**(1): 49-57.

Wichmann, M. W., C. Muller, H. M. Hornung, U. Lau-Werner and F. W. Schildberg (2002). "Results of long-term follow-up after curative resection of Dukes A colorectal cancer." World J Surg **26**(6): 732-736.

WiKMan, H., R. Vessella and K. Pantel (2008). "Cancer micrometastasis and tumour dormancy." Apmis **116**(7-8): 754-770.

Wimberger, P., M. Heubner, F. Otterbach, T. Fehm, R. Kimmig and S. Kasimir-Bauer (2007). "Influence of platinum-based chemotherapy on disseminated tumor cells in blood and bone marrow of patients with ovarian cancer." Gynecol Oncol **107**(2): 331-338.

Wolfrum, F., I. Vogel, F. Fandrich and H. Kalthoff (2005). "Detection and clinical implications of minimal residual disease in gastro-intestinal cancer." Langenbecks Arch Surg **390**(5): 430-441.

Wong, S. C., E. S. Lo, K. C. Lee, J. K. Chan and W. L. Hsiao (2004). "Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer." Clin Cancer Res **10**(4): 1401-1408.

Zetter, B.R. (1990), "The cellular basis of site-specific tumor metastasis." N Engl J Med. 322(9): p. 605-12.

Zhang, T., T. Otevrel, Z. Gao, Z. Gao, S. M. Ehrlich, J. Z. Fields and B. M. Boman (2001). "Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer." Cancer Res **61**(24): 8664-8667.

## 6 Anhang

### 6.1 Aberrationen aller gefundenen Zellen

#### a) Zellen mit nukleärem beta-catenin

DTC	Gewinne	Verluste
571T2	-	16
833T2	3q21ter, 7p14q22	1p36,2p22ter,2q33ter,3p22ter, 5q32ter, 15q11ter
916T2	6p12ter,16pterq12, 19,20	3q23q28,4q13q32, 13q14q31
1029T2	2p23p13,2q13q21,3q21q26,7q31pter, 8q22qter,11q23pter,12p,13q11q21,15q22q25, 19q,20p12qter	3p24pter,4p16, 4q33qter,6q25qter,8p22pter,10p12pter, 10q25qter,18q21qter

#### b) Zellen mit zytoplasmatischem/keinem beta-catenin

DTC	Gewinne	Verluste
403T2	16	5p15q21
403T3	-	5q13q22, 6q11q24
408	-	8p12q23, 13
571T3	-	-
667	16p13p12, 20q12ter	-
825T1	15q11ter,16,17q,20	4,9,12p12q23
825T2	9q11q13	9p, 13q14q31,18
916T1	17	3q22q26, 13q14q31
982T2	-	-
1029T1	8q11q12,8q12q24,13q11q21	1p22qter,5
1171T1	-	-

## 6.2 Beispiel eines CGH-Profils

