

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

**UNTERSUCHUNGEN ZUM PROGNOTISCHEN EINFLUSS GENOMISCHER
VERÄNDERUNGEN DISSEMINIERTER TUMORZELLEN BEIM
ADENOKARZINOM DES ÖSOPHAGUS**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sarah Uphues (geb. Schumacher)

2021

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 H. Stoecklein

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

Für Eleni und Andreas.

In jedem Menschen ist Sonne.

Man muss sie nur zum Leuchten bringen.

Sokrates

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Schumacher S. *et al.* (2017), Disseminated tumour cells with highly aberrant genomes are linked to poor prognosis in operable oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2017 Jul 20. doi: 10.1038/bjc.2017.233.

Zusammenfassung

Adenokarzinome des Ösophagus gehören zu den aggressivsten Karzinomen des Gastrointestinaltraktes. Sie metastasieren häufig frühzeitig sowohl hämatogen als auch lymphogen. Als ursächlich für die Metastasierung werden früh disseminierte Tumorzellen angesehen, welche in der Routinediagnostik nicht erfasst werden können. Eine ausgeprägte chromosomale Instabilität gilt allgemein als ein Merkmal fortgeschrittener epithelialer Malignome und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Daher wurde in dieser Arbeit überprüft, ob eine ausgeprägte chromosomale Instabilität bei disseminierten Tumorzellen eine aggressive, klinisch okkulte, minimale Resterkrankung anzeigen kann und mit einem kürzeren Überleben der Patienten korreliert ist. Es wurden systematisch CK18+ disseminierte Tumorzellen aus Knochenmarkpräparaten und makroskopisch tumorfreien Lymphknoten von operablen Ösophaguskarzinompatienten isoliert. Nach der Amplifikation des gesamten Genoms wurden die disseminierten Tumorzellen auf Einzelzellebene unter Verwendung der Metaphasen-basierten vergleichenden chromosomalen Hybridisierung auf chromosomale Zugewinne und Verluste überprüft. Anschließend konnte der Prozentsatz der genomischen Veränderungen pro Genom für jede einzelne disseminierte Tumorzelle berechnet und ein kritischer Schwellenwert mit Hilfe einer STEPP-Analyse (Subpopulation Treatment Effect Pattern Plot) für Hochrisikopatienten identifiziert werden. Dieser Befund wurde in einem zweiten unabhängigen Patientenkollektiv mit Adenokarzinomen des Ösophagus validiert (Kohorte # 1, $n=44$; Kohorte # 2, $n=29$). Bei dem untersuchten Kollektiv wurden für das Ösophaguskarzinom typische chromosomale DNA-Zugewinne und Verluste nachgewiesen, wobei jedoch eine Variabilität des Prozentsatzes der genomischen Veränderungen pro Genom der disseminierten Tumorzellen innerhalb und zwischen verschiedenen Patienten zu beobachten war. So waren beispielsweise disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark im Vergleich zu jenen aus den Lymphknoten signifikant weniger stark aberrant. Die STEPP-Analyse ergab, dass ein steigender Prozentsatz der genomischen Veränderungen pro Genom mit einem erhöhten Risiko für ein verkürztes Gesamtüberleben in zwei unabhängigen ösophagealen Adenokarzinom-Kohorten, sowie in der entsprechenden kombinierten Analyse korrelierte. Über die Analyse der disseminierten Tumorzellen konnten operable Ösophaguskarzinompatienten mit einer schlechteren Prognose identifiziert werden. Dabei scheinen stark aberrante disseminierte Tumorzellen auf eine aggressivere minimale Resterkrankung hinzuweisen. Eine weitere Charakterisierung dieser disseminierten Tumorzellen könnte wichtige Hinweise für eine bessere Diagnostik zur Erkennung von Hochrisikopatienten sowie neue therapeutische Ansatzpunkte zur Vermeidung von Metastasen liefern.

Abstract

Adenocarcinomas of the esophagus are among the most aggressive carcinomas of the gastrointestinal tract. They often metastasize both hematogenously and lymphogenically at an early stage. Early disseminated tumor cells are considered to be the cause of the metastasis, which cannot be detected with routine diagnostics. Pronounced chromosomal instability is generally considered a feature of advanced epithelial malignancies and is associated with a poor prognosis. It was therefore examined in this work whether a pronounced chromosomal instability in disseminated tumor cells can indicate an aggressive, clinically occult, minimal residual disease and is correlated with a shorter patient survival. CK18⁺-disseminated tumor cells from bone marrow preparations and macroscopic tumor-free lymph nodes were systematically isolated from operable esophageal carcinoma patients. After whole genome amplification, the disseminated tumor cells were checked for chromosomal gains and losses using the metaphase-based comparative chromosomal hybridization at single cell level. The percentage of genomic changes per genome for each individual disseminated tumor cell could then be calculated and a critical threshold for high-risk patients was identified using a subpopulation treatment affect pattern plot analysis (STEPP). This finding was validated in a second independent patient population with esophageal adenocarcinoma (cohort #1, $n=44$; cohort #2, $n=29$). In the examined disseminated tumor cell collective, chromosomal DNA gains and losses typical for esophageal carcinomas were detected, although variability in the percentage of aberrant genome (PAG) of the disseminated tumor cells was observed within and between different patients. For example, bone marrow disseminated tumor cells were significantly less aberrant compared to lymph node disseminated tumor cells. The STEPP-analysis showed that an increasing PAG correlated with an increasing risk for shorter overall survival in two independent esophageal adenocarcinoma cohorts, as well as in the corresponding pooled analysis. The analysis of the disseminated tumor cells identified operable esophageal carcinoma patients with a poorer prognosis. Strongly aberrant disseminated tumor cells seem to indicate a more aggressive minimal residual disease. Further characterization of these disseminated tumor cells could provide important information for better detection of high-risk patients in routine diagnostics, as well as new therapeutic approaches to avoid metastasis formation.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aCGH	<i>Array</i> -basierte komparative genomische Hybridisierung
bp	Basenpaare
CK	<i>Cytokeratin</i> / Zytokeratin
CIN	Chromosomale Instabilität
CNA	<i>Copy number alteration</i> , Kopienzahlveränderung
CTC	Zirkulierende Tumorzelle
CtDNA	Frei zirkulierende Tumor DNA
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>Et al.</i>	et alii (und andere)
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
G	Grading
Gbp	Giga-Basenpaare
Kbp	Kilo-Basenpaare
M	Fernmetastasen
Mbp	Mega-Basenpaare
mCGH	<i>Metaphase-based comparative genomic hybridization</i> / Metaphasen-basierte komparative genomische Hybridisierung
N	Lymphknotenmetastasen
Ng / µg	Nano-/mikrogramm
NGS	<i>Next generation sequencing</i> / Sequenzierung der nächsten Generation
PAG	<i>Percentage of aberrant genome</i> / Prozentsatz des aberranten Genoms
R	Residualtumor
STEPP	<i>Subpopulation Treatment Effect Pattern Plot</i>
T	Tumorausdehnung

Inhalt

Zusammenfassung.....	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhalt	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Adenokarzinom des Ösophagus	1
1.1.1 Risikofaktoren.....	1
1.1.2 Epidemiologie	2
1.1.3 Klinik und Diagnostik	2
1.1.4 Klassifikation.....	3
1.1.5 Therapie und Prognose	4
1.2 Metastasierung und Metastasierungswege.....	5
1.3 Minimale Resterkrankung und Bedeutung von disseminierten Tumorzellen	7
1.4 Detektionsrate und prognostische Relevanz disseminierter Tumorzellen	9
1.5 Molekulare Analyse der disseminierten Tumorzellen	12
1.6 Chromosomale Instabilität.....	13
1.7 Ziele der Arbeit.....	15
2 Disseminated tumour cells with highly aberrant genomes are linked to poor prognosis in operable oesophageal adenocarcinoma, Schumacher S. et al., British Journal of Cancer, 117: 725-733, (2017).	17
3 Diskussion.....	18
3.1 Detektion disseminierter Tumorzellen bei Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus	18
3.2 mCGH-Analysen disseminierter Tumorzellen, korrespondierender Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen.....	19
3.3 Chromosomale Instabilität disseminierter Tumorzellen	20
3.4 Prognostischer Wert des PAG/der CIN	24
3.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	26
4 Literaturverzeichnis.....	29
5 Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Das Adenokarzinom des Ösophagus

Infolge einer lange andauernden gastroösophagealen Refluxerkrankung kann sich im unteren Ösophagus eine chronische Entzündung entwickeln, die zu einer Zerstörung des physiologischen Ösophagusepithels führen kann. Als Reaktion hierauf entwickelt sich unter Umständen die sogenannte Barrett-Schleimhaut, die das physiologische Plattenepithel im unteren Ösophagus durch ein Zylinderepithel, das auch Becherzellen enthält, ersetzt (Böcker *et al.* 2012; Spechler 2013; Runge *et al.* 2015). Diese Veränderung wird auch als *intestinale Metaplasie* bezeichnet (Böcker *et al.* 2012; Spechler 2013). Die Barrett-Schleimhaut stellt eine fakultative Präkanzerose dar, aus welcher sich sowohl eine, auf das Epithel begrenzte Neubildung (niedriggradige *intraepitheliale Neoplasie*, hochgradige *intraepitheliale Neoplasie*) als auch ein invasives Barrett-Karzinom (Adenokarzinom) des Ösophagus entwickeln kann (Spechler 2011; Böcker *et al.* 2012). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Pathogenese und Biologie ist die Unterscheidung zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen klinisch relevant. Es fällt häufig schwer eine klare Trennung zwischen den Karzinomen des Ösophagus und denen des gastroösophagealen Übergangs vorzunehmen. Ösophaguskarzinome können proximal die Kardia infiltrieren, ebenso können sich Kardiakarzinome in den distalen Ösophagus ausbreiten (DeMeester 2006). Das Metastasierungsverhalten und die Prognose von Adenokarzinomen des Ösophagus und des gastroösophagealen Übergangs lassen sich jedoch gut miteinander vergleichen, so dass diese auch in der vorliegenden Untersuchung zusammengefasst wurden (Dolan *et al.* 1999; Wijnhoven *et al.* 1999).

1.1.1 Risikofaktoren

Die gastroösophageale Refluxerkrankung stellt den wichtigsten Risikofaktor für die Entstehung einer Barrett-Schleimhaut dar, in Folge dessen sich dann ein Barrett-Karzinom des Ösophagus entwickeln kann (Lagergren *et al.* 1999; Gharakhani *et al.* 2015). In einer Studie aus den USA berichteten 70 % der Patienten mit Barrett-Mukosa sowie 61 % derer mit Barrett-Karzinomen über chronische Refluxsymptome über eine Dauer von mehr als 5 Jahren vor der Diagnosestellung (Chak *et al.* 2006).

Das jährliche Risiko aus einer Barrett-Schleimhaut ein Barrett-Adenokarzinom zu entwickeln beträgt etwa 0,12 % (Hvid-Jensen *et al.* 2011). Von den Patienten, die ein Adenokarzinom entwickeln, weisen jedoch circa 77 % eine Barrett-Mukosa auf (Patel *et al.* 2003), das

bedeutet, dass der Großteil der Ösophagealen Adeno- bzw. Barrett-Karzinome auf dem Boden einer Barrett-Schleimhaut entstehen.

1.1.2 Epidemiologie

Ösophaguskarzinome machen insgesamt nur einen geringen Anteil aller malignen Tumoren aus. Der prozentuale Anteil der Ösophaguskarzinome an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland machte 2016 bei Männern nur 2,1 % und bei Frauen nur 0,7 % aus. Das mittlere Erkrankungsalter für Ösophaguskarzinome liegt bei Männern bei 67 Jahren und bei Frauen bei 71 Jahren (Kaatsch *et al.* 2015; Bertram *et al.* 2017). In den vergangenen Jahrzehnten ist die Inzidenz an Adenokarzinomen des unteren Ösophagus in der westlichen Welt jedoch deutlich angestiegen (Hur *et al.* 2013; Arroyo-Martinez *et al.* 2016). Etwa 20-30 % der malignen Tumore der Speiseröhre sind Adenokarzinome. Trotz des geringen Anteils an Neuerkrankungen im Vergleich zu anderen malignen Tumoren, lagen die Krebssterbefälle in Deutschland 2016 bei Männern mit 3,6 % und bei Frauen mit 1,2 % prozentual deutlich höher. 2016 verstarben in Deutschland 4434 Männer und 1245 Frauen an Karzinomen des Ösophagus. Auf Grund dieser hohen Mortalität und einem 5-Jahres-Überleben von < 30 % zählt das Ösophaguskarzinom zu den Krebserkrankungen mit ungünstigen Überlebensaussichten (Rustgi and El-Serag 2014; Kaatsch *et al.* 2015; Bertram *et al.* 2017).

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Die klinischen Zeichen des Ösophaguskarzinoms sind häufig sehr unspezifisch. Das Leitsymptom der Patienten sind Schluckbeschwerden mit einer Häufigkeit von ca. 87 %. Es müssen jedoch ungefähr 50 % des Ösophagusumfanges befallen sein, bevor die Schluckbeschwerden überhaupt symptomatisch werden (Müller 2014). Daher erfolgt die Diagnose in der Regel erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Nur etwa ein Drittel der Ösophaguskarzinompatienten kann dann noch einer kurativen Therapie zugeführt werden (Shapiro *et al.* 2016). Die zielführende Diagnostik bei Ösophaguskarzinomen stellt die Speiseröhrenspiegelung mit Probenentnahme zur histologischen Sicherung dar (Siewert 2007). In der Praxis hat es sich bewährt, mindestens vier-Quadranten Biopsien alle 1-2 cm aus makroskopisch suspekten Arealen zu entnehmen (Davis-Yadley *et al.* 2016). Wurde histologisch ein Ösophaguskarzinom gesichert, erfolgt anschließend die Stadienbestimmung des Patienten. Diese dient der exakten Bestimmung der Tumorausdehnung und dem Nachweis von bereits vorliegenden Metastasen.

1.1.4 Klassifikation

Die Einteilung der Ösophaguskarzinome erfolgt postoperativ typischerweise mittels des TNM-Stadiums des UICC um in der Klinik prognostische Aussagen zu erleichtern. Es beschreibt die Tumorausdehnung („T“), das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen („N“) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen („M“) und wird mit dem Präfix „p“ gekennzeichnet. Zusätzlich zu diesen Kriterien werden Einbrüche in Venen und Lymphgefäße, der Malignitätsgrad anhand des Differenzierungsgrades sowie das restliche Tumorgewebe im Resektionsrand beurteilt. Einen Überblick gibt Tabelle 1 (Wittekind 2020).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für Karzinome des Ösophagus und des gastroösophagealen Übergangs.

T = Ausdehnung des Primärtumors

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltrierte Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submucosa
T1a	Tumor infiltrierte Lamina propria oder Muscularis mucosae
T1b	Tumor infiltrierte Submucosa
T2	Tumorinfiltration Muscularis propria
T3	Tumorinfiltration Adventitia
T4	Tumorinfiltration benachbarte Strukturen
T4a	Tumor infiltrierte Pleura, Perikard, Vena azygos, Zwerchfell oder Peritoneum
T4b	Tumor infiltrierte andere Nachbarstrukturen wie Aorta, Wirbelkörper oder Trachea

N = Regionäre Lymphknotenmetastasen

Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1	Metastasen in 1 bis 2 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 3 bis 6 regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M = Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
G = Grading	
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
R = Resektionsrand	
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Quelle: In Anlehnung an Wittekind, 2020, S.78-79

Die vom *American Joint Committee on cancer* etablierten UICC-Stadien fassen die TNM-Klassifikation übergeordnet, abhängig von der Tumorausdehnung sowie dem Fehlen oder Vorhandensein von Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen, zusammen und lassen die Prognose eines Patienten abschätzen (Wittekind 2020). Das Stadium IA z.B. steht für pT1a pN0 M0.

1.1.5 Therapie und Prognose

Die Prognose des Ösophaguskarzinoms ist trotz der, in der aktuellen S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus“ ausführlich dargestellten, endoskopischen, chirurgischen und multimodalen Therapieregime insgesamt sehr schlecht, was sich in der mittleren Überlebenszeit von 13,2-22 Monaten ausdrückt (Stoecklein *et al.* 2008; Tustumi *et al.* 2016). Auf die Schleimhaut begrenzte, nicht metastasierte Tumore (pT1a N0 M0) und hochgradige *intraepitheliale Neoplasien* können, in kurativem Ansatz, endoskopisch abgetragen werden (Pech *et al.* 2011). Einerseits breitet sich der Tumor bereits früh über die Lymphgefäße sowie die Blutgefäße aus (Takizawa *et al.* 2009) und andererseits wird auf Grund der fehlenden Frühsymptome die Diagnose erst in einem

fortgeschrittenen Stadium gestellt (Rice *et al.* 2016), so dass nur ein kleiner Anteil der betroffenen Patienten noch einer primären chirurgischen Therapie mit kurativem Ansatz zugeführt werden kann (Enzinger and Mayer 2003; Mariette *et al.* 2007). Das Ziel der kurativen Resektion ist dann die vollständige Entfernung des Tumors sowie der regionären Lymphknoten. Mittels einer *neoadjuvanten* Therapie kann eine präoperative Verbesserung des initialen Tumorstadiums erreicht werden und somit ein Teil der zunächst inoperablen Patienten doch noch einer kurativen Therapie zugeführt werden (Luketina and Emmanuel 2014; Samson *et al.* 2016). Es besteht insgesamt ein signifikanter Überlebensvorteil unter präoperativer Radiochemotherapie sowie perioperativer Chemotherapie gegenüber einer alleinigen Operation (Allum *et al.* 2011). Das 5-Jahresüberleben der Patienten korreliert insgesamt deutlich mit dem TNM-Stadium bzw. mit der lokalen Tumordinfiltrationstiefe und dem Grad der lymphatischen Streuung (Tabelle 2) (Enzinger and Mayer 2003; Blank *et al.* 2013; Bertram *et al.* 2017).

Tabelle 2: 5-Jahres-Überlebensraten von Ösophaguskarzinompatienten in Abhängigkeit vom TNM-Stadium.

<i>UICC-Stadien</i>	<i>5-Jahresüberleben</i>
0 (Tis)	>95 %
I	50-80 %
IIA	30-40 %
IIB	10-30 %
III	10-15 %
IVA	<5 %
IVB	<1 %

Quelle: In Anlehnung an Enzinger und Mayer, 2003, S.2247.

1.2 Metastasierung und Metastasierungswege

Die wichtigste krebsbedingte Todesursache ist bei Ösophaguskarzinompatienten die Metastasierung und nicht der Primärtumor (Kelsen *et al.* 2007; Tepper *et al.* 2008). Auch nach erfolgter R0-Resektion sterben annähernd 90 % der Patienten an den Folgen von Fernmetastasen und nicht in Folge von Lokalrezidiven (Vallböhmer *et al.* 2010). Ösophaguskarzinome metastasieren bereits frühzeitig im Verlauf der Krankheitsentwicklung. Etwa 50 % der Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Metastasen auf

(Enzinger and Mayer 2003; Allum *et al.* 2011; Anderegge *et al.* 2016). Die Streuung der Tumorzellen erfolgt in erster Linie lymphogen in regionale Lymphknoten. So können bereits auf die Schleimhaut begrenzte Tumore, auf Grund der vorhandenen Lymphgefäße in der *Lamina propria mucosae*, frühzeitig in die regionalen Lymphknoten streuen (Rice *et al.* 1998; Klein 2009; Dulak *et al.* 2012; Lee *et al.* 2013). Demzufolge zeigen bereits 30-60 % der Patienten mit lokal begrenzten Ösophaguskarzinomen (pT1/pT2) Lymphknotenmetastasen (Anderegge *et al.* 2016). Auch Stiles *et al.* wiesen bei einer Mehrzahl der Patienten mit Tumoren im Stadium cT2-T3 N0 M0 intraoperativ bereits Lymphknotenmetastasen nach (Stiles *et al.* 2011). Während Lymphknotenmetastasen der wichtigste prognostische Faktor bei potenziell heilbaren Patienten mit Ösophaguskarzinomen sind, verkürzt sich die Lebenserwartung drastisch, wenn Fernmetastasen auftreten (Sproll *et al.* 2018). Obwohl bei Ösophaguskarzinomen fast alle Organe von Metastasen befallen werden können, gibt es doch klare Zielorgane: So sind Lebermetastasen am häufigsten (33 %), gefolgt von Metastasen in nicht-regionäre Lymphknoten (27 %), in der Lunge (21 %) und den Knochen (16 %) (Wu *et al.* 2017). Interessanterweise neigen Adenokarzinome des Ösophagus dazu, häufiger in Leber und Knochen zu metastasieren, während Plattenepithelkarzinome eher zu Lungenmetastasen führen (Sproll *et al.* 2018).

Derzeit werden vor allem zwei Modelle der Tumorprogression diskutiert: Das lineare und das parallele Tumorprogressionsmodell. Bei dem linearen Modell wird von einer weitgehend vollständigen Entwicklung metastasierungsfähiger Zellen im Primärtumor und einer Streuung relativ spät im Krankheitsverlauf ausgegangen (Fearon and Vogelstein 1990; Klein 1998; Klein 2009). Wenn dieses Modell zutrifft, müssten gestreute Tumorzellen und die daraus entstehenden Metastasen weitgehend die meisten genetischen Veränderungen des Primärtumors übernehmen und erwerben nach Verlassen des Primärtumors gegebenenfalls noch zusätzliche Mutationen (Klein 2009). Jedoch zeigten mehrere Untersuchungen an früh gestreuten Tumorzellen (Schmidt-Kittler *et al.* 2003; Schardt *et al.* 2005; Stoecklein and Klein 2010) sowie neuere Vergleiche mit Hochdurchsatz-Sequenzierverfahren von Primärtumoren und ihren autologen Metastasen, dass die Zusammenhänge deutlich komplexer sind (Torres *et al.* 2007; Navin *et al.* 2011; Gerlinger *et al.* 2012; Bashashati *et al.* 2013; Castellarin *et al.* 2013; Gerlinger *et al.* 2014; Mattos-Arruda *et al.* 2014; Gundem *et al.* 2015, 2015; Yates *et al.* 2015). Anhand der Mutationsmuster wurde erkennbar, dass es offenbar häufig zu einer frühen Streuung in der Tumorentwicklung und Entwicklung metastasierungsfähiger Zellklone außerhalb des Primärtumors kommt (Torres *et al.* 2007; Klein 2009). Dabei läuft die

Entwicklung mit Akkumulation weiterer genetischer Aberrationen in den Metastaszellen unabhängig und parallel zum Primärtumor ab, weshalb man auch von einem parallelen Metastasierungsmodell spricht (Klein 2009). Die Formierung einer Metastase stellt allerdings einen sehr komplexen Prozess dar, bei dem nur ein kleiner Anteil aller gestreuten Tumorzellen überlebt und im weiteren Verlauf eine Metastase gründen kann (Hermanek 1999b). Ebenso können die Tumorzellen in eine Art Ruhephase eintreten und als sogenannte „schlafende Tumorzellen“ (*tumor cell dormancy*) bestehen bleiben. Zu einem späteren Zeitpunkt können sie dann erneut in eine Proliferationsphase eintreten oder auch zugrunde gehen (Bragado *et al.* 2012; Aguirre-Ghiso *et al.* 2013; Sosa 2016). Da derzeit immer nur punktuelle Ausschnitte bzw. auch nur Endpunkte in der Metastasenentwicklung betrachtet werden können, verbleibt der zeitliche Ablauf und die Entwicklung der Metastasierung im einzelnen Patienten weitgehend unbekannt. Über die vorgenannten Hochdurchsatz-Sequenzierungen von mehreren Metastasen und den zugehörigen Primärtumoren ist jedoch deutlich geworden, dass die Krebserkrankung innerhalb eines Patienten sehr heterogen sein kann und eigentlich immer einer sogenannten, verzweigten Evolution („branched evolution“) folgt. Dies konnte bereits bei verschiedenen soliden sowie hämatopoetischen Tumoren nachgewiesen werden (Campbell *et al.* 2010; Navin *et al.* 2010; Thirlwell *et al.* 2010; Yachida *et al.* 2010; Anderson *et al.* 2011; Navin *et al.* 2011; Gerlinger *et al.* 2012; Haffner *et al.* 2013; Gerlinger *et al.* 2014; Kim *et al.* 2015). Das aggressive Metastasierungsverhalten und die intrinsische therapeutische Resistenz von Adenokarzinomen des Ösophagus limitieren derzeit die erfolgreiche Behandlung betroffener Patienten. Insgesamt erleiden 48–80% der Patienten, bei denen eine vollständige Tumorresektion erreicht werden kann und die multimodale Behandlungen erhalten, innerhalb von fünf Jahren nach der Operation ein tödliches Rezidiv (Visser *et al.* 2016).

1.3 Minimale Resterkrankung und Bedeutung von disseminierten

Tumorzellen

Bei nicht metastasierten Patienten wird die Operation (Ösophagektomie) gegebenenfalls in Kombination mit einer Radio- und/oder Chemotherapie als kurativer Therapieansatz durchgeführt. Diese Patienten gelten postoperativ zunächst als tumorfrei. Dennoch versterben die meisten Patienten tumorbedingt durch die Entwicklung von Metastasen (Kelsen *et al.* 2007; Tepper *et al.* 2008). Der offensichtliche Ausgangspunkt dieser metastatischen Rückfälle sind einzelne Tumorzellen, auch disseminierte Tumorzellen

genannt, die bereits vor der Erstdiagnose in entfernte Organe gestreut haben und nach der operativen Resektion des Primärtumors weiterhin dort verblieben sind (Polzer and Klein 2013; Pantel and Alix-Panabières 2014). Es handelt sich meist um einzelne Tumorzellen, maximal jedoch um kleine Zellgruppen, bei denen es weder zu einer desmoplastischen Stromareaktion, noch zu einer extravaskulären Zellproliferation gekommen ist (Hermanek 1999a). Offensichtlich sind diese einzelnen gestreuten Tumorzellen resistent gegenüber Radio- und/oder Chemotherapien, denn auch bei neoadjuvant oder adjuvant therapierten Patienten sind disseminierte Tumorzellen nachweisbar bzw. treten später bei solchen therapierten Patienten Metastasen auf (Vallböhmer *et al.* 2010). Zwei mögliche Erklärungen für das langfristige Überleben der disseminierten Tumorzellen sind denkbar. Sie werden über das Blut verteilt und verstreuen sich in Organe, beginnen sich zu teilen und bilden Metastasen, oder werden z.B. durch Filterfunktionen im Knochenmark abgefangen und können dort nachweislich, teilweise jahrelang, in einem inaktiven Stadium überdauern. Es wird davon ausgegangen, dass die Tumorzellen während dieses Stadiums nicht proliferationsaktiv sind, das heißt, sie befinden sich in einer Ruhephase (G₀ - Phase) und teilen sich nicht weiter (Sosa *et al.* 2014). Daher sind sie einer systemischen Chemotherapie nicht zugänglich. Die zweite mögliche Erklärung ist, dass es sich auf Grund ihrer genetischen Ausstattung um Zellen mit ausgeprägter Resistenz gegenüber den eingesetzten Therapeutika handelt (Schneck *et al.* 2013). Diese, nach operativer Entfernung des Tumors, noch im Körper des Patienten befindlichen, gestreuten Tumorzellen bezeichnet man als minimale Resterkrankung (Klein *et al.* 2002). Der Nachweis ist mit konventionellen bildgebenden Verfahren bzw. aktuellen Routinemethoden nicht möglich (Klein *et al.* 2002; Sproll *et al.* 2018), jedoch kann diese klinisch nicht erkennbare Disseminierung mit hoch-sensitiven laborexperimentellen Nachweismethoden erfasst werden. Der immunzytochemische Nachweis isolierter Tumorzellen im Knochenmark und Lymphknoten ist dabei eine anerkannte und gut etablierte Methode, welche Zellen epithelialen Ursprungs in den mesenchymalen Indikatororganen Knochenmark und Lymphknoten nachweisen kann (Scheunemann *et al.* 2003). Da es keine tumorspezifischen Nachweisverfahren gibt, wird versucht diese Tumorzellen epithelialen Ursprungs über epitheliale Zielantigene, wie z.B. Zytokeratine (Scheunemann *et al.* 2001) oder das epitheliale Zell-Adhäsions-Molekül (EpCAM) (Lacroix and Doeberitz 2001) zu identifizieren, welche von mesenchymalen Zellen im Knochenmark und in Lymphknoten üblicherweise nicht exprimiert werden (Moll *et al.* 2008). Somit eignen sich diese Körperkompartimente als „Indikatororgane“ für die Detektion

von disseminierten Tumorzellen. In der Vergangenheit wurde bereits häufig der monoklonale Antikörper A45/BB3 verwendet, welcher mit den Epitopen der Zytokeratine 8 (CK8), 18 (CK18) und 19 (CK19) reagiert, die unter anderem von Adenokarzinomen des Ösophagus exprimiert werden. Bei den hier untersuchten Patienten und detektierten Tumorzellen handelt es sich um einen Teil eines größeren Kollektivs, bestehend aus 90 Patienten mit Adenokarzinomen oder Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und des gastroösophagealen Übergangs (Driemel *et al.* 2013) In dieser Untersuchung wurde, wie von Driemel *et al.* beschrieben, eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen die Antigene CK18 und EpCAM zur Detektion Marker-positiver disseminierter Tumorzellen bei 59 operablen Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus und des gastroösophagealen Übergangs durchgeführt (Driemel *et al.* 2013; Schumacher *et al.* 2017).

1.4 Detektionsrate und prognostische Relevanz disseminierter Tumorzellen

Je nach verwendeter Methode und Antigenen sowie abhängig vom Tumorstadium schwanken die Detektionsraten disseminierter Tumorzellen erheblich. So konnten bei verschiedenen soliden Tumoren (z.B. Lunge, Brust, Prostata, Kolon) mittels immunzytochemischen Methoden Detektionsraten zwischen 20 und 40 % erfasst werden (Pantel *et al.* 2003). Bei operablen Ösophaguskarzinomen konnten in Knochenmarkspräparaten in 11-88 % der Fälle disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden (Tabelle 3) (Sproll *et al.* 2018).

Tabelle 3: Detektionsraten disseminierter Tumorzellen (DTC) in Knochenmarkspräparaten.

Autor	Jahr	Patienten (Alle)	Patienten (DTC ⁺)	Prognostisch
Thorban	1996	90	41	Ja
O'Sullivan	1999	50	88	Nicht verfügbar
O'Sullivan	1999	27	15	Nicht verfügbar
Thorban	2000	75	39	Ja
Bonavina	2001	48	79	Nicht verfügbar
Bonavina	2001	18	11	Nicht verfügbar
Spence	2004	49	45	Nicht verfügbar

Ryan	2004	106	54	Nicht verfügbar
Kaifi	2005	135	44	Ja
Stoecklein	2008	107	41	Nicht signifikant
Bagheri	2011	43	30	Nicht verfügbar
Gray	2012	42	45	Nein
Vashist	2012	370	32	Ja
Driemel	2014	83	25	Nein
Ryan	2015	88	53	Ja

Quelle: In Anlehnung an Sproll *et al.*, 2018, S.69.

In histopathologisch tumorfreien Lymphknoten fanden sich in der Vergangenheit in 8-71 % der Fälle disseminierte Tumorzellen (Tabelle 4) (Sproll *et al.* 2018).

Tabelle 4: Detektionsraten disseminierter Tumorzellen (DTC) in Lymphknotenpräparaten.

Autor	Jahr	Patienten (Alle)	Patienten (DTC ⁺)	Lymphknoten	Prognostisch
Izbicki	1997	68	62	16,8	Ja
Natsugoe	1998	69	42	2,4	Ja
Glickman	1999	78	26	7	Nicht signifikant
Mueller	2000	145	33	4,9	Ja (Mikrometastase)
Matsumoto	2000	59	66	2,4	Ja
Komukai	2000	37	38	1	Ja
Sato	2001	50	40	1,6	Nicht signifikant
Qubain	2001	86	19	1	Nicht verfügbar
Hosch	2001	86	71	18	Ja
Komukai	2002	104	45	1,4	Ja
Doki	2002	41	44	2	Ja (Mikrometastase)

Vazquez-Sequeiros	2002	124	11	Nicht verfügbar	Nein
Waterman	2004	28	61	Nicht verfügbar	Nein
Heeren	2005	60	30	24	Ja
McGuill	2008	146	8	1,4	Ja
Buskens	2008	20	25	2,8	Ja
Zingg	2009	86	16	4,2	Ja (Plattenepithelkarzinom)
Koenig	2009	73	34		Ja (ratio)
Chao	2009	52	12	Nicht verfügbar	Nicht signifikant
Thompson	2010	119	25	Nicht verfügbar	Ja
Grotenhuis	2010	63	19	Nicht verfügbar	Nicht verfügbar
Prenzel	2012	48	15	1,3	Ja
Driemel	2013	28	50	Nicht verfügbar	Nicht verfügbar
Yanagi	2018	41	54	3	Ja (mit pN)

Quelle: In Anlehnung an Sproll *et al.*, 2018, S. 61-66.

Mehrere der zuvor aufgelisteten Untersuchungen konnten eine signifikante prognostische Relevanz für das alleinige Auftreten von disseminierten Tumorzellen beim Ösophaguskarzinom nachweisen. Einen Überblick dazu geben ebenfalls die Tabellen 3 und 4. Demgegenüber stellten einige Studien, unter anderem Driemel *et al.*, keine signifikante Korrelation mit dem Überleben der Patienten fest (Vazquez-Sequeiros *et al.* 2002; Waterman *et al.* 2004; Gray *et al.* 2012; Driemel *et al.* 2013). Obwohl die prognostische Bedeutung der disseminierten Tumorzellen somit beim Ösophaguskarzinom noch nicht abschließend geklärt ist, wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass es sich um potentielle metastatische Vorläuferzellen handelt (Klein 2013). Daher könnte ihre weitere molekulare Charakterisierung einen tieferen Einblick in das Voranschreiten der systemischen Erkrankung gewähren und zur Identifizierung neuer Biomarker führen, die möglicherweise die Therapie verbessern können.

1.5 Molekulare Analyse der disseminierten Tumorzellen

Die Charakterisierung des Primärtumors und der disseminierten Tumorzellen könnte klären, durch welche tumorbiologischen Faktoren eine hämatogene Streuung begünstigt werden könnte und welche Eigenschaften weitergegeben, verloren oder neu erworben werden. Ein erster Schritt in Richtung einer umfassenderen Charakterisierung ist die gesamt-genomische Analyse einzelner disseminierter Tumorzellen. Dies wurde erstmals mit der Etablierung einer stabilen gesamt-genomischen Amplifikationsmethode möglich. Die erste Beschreibung einer solchen Amplifikationsmethode für disseminierte Tumorzellen erfolgte mit der *MseI-Adapter-Linker-Polymerase-Kettenreaktion* durch Klein *et al.*, wobei nach der Vervielfältigung der DNA dieser Ansatz mit der Metaphasen-basierten komparativen genomischen Hybridisierung („*metaphase-based comparative genomic hybridization*“; mCGH) kombiniert wurde und somit das ganze Genom einer einzelnen Zelle erstmals bezüglich chromosomaler Zugewinne und Verluste untersucht werden konnte (Klein *et al.* 1999). Die mCGH ist eine zytogenetische Methode, die in den 1990er Jahren beschrieben wurde und mit der erstmals strukturelle chromosomale Aberrationen anhand von DNA untersucht werden konnten, die aus Tumormaterial extrahiert wurde (Kallioniemi *et al.* 1992). Für diese Methode waren jedoch große Mengen DNA (500ng-1µg) nötig, was durch die gesamt-genomische Amplifikationsmethode erreicht werden konnte. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass die mCGH auf die Detektion chromosomaler Zugewinne und Verluste mit einer Größe ab ca. 10 Megabasenpaaren limitiert ist (Kallioniemi *et al.* 1994).

Auch wenn die Information über chromosomale Zugewinne und Verluste nur einen Teil des möglichen Aberrationsspektrums abdeckt und die Auflösung der mCGH gering ist, können Hinweise auf amplifizierte Onkogene oder deletierte Tumorsuppressorgene (Yen *et al.* 2003; Dulak *et al.* 2013; Cancer Genome Atlas Research Network 2017), sowie Informationen zum Ausmaß der chromosomalen Instabilität des Tumors gewonnen werden. So untersuchten Hoffmann *et al.* z.B. die in dieser Arbeit und in einem weiteren Kollektiv von Ösophaguskarzinompatienten detektierten disseminierten Tumorzellen auf das Vorhandensein von Amplifikationen des Onkogens *ERBB2* und korrelierten diese anschließend mit dem Überleben der Patienten. Dabei konnte eine signifikante prognostische Relevanz nachgewiesen werden (Hoffmann *et al.* 2018). Darüber hinaus gibt es auch tumortypische Aberrationsprofile, die helfen können Tumore zu klassifizieren (Baudis 2007). So bietet beispielsweise die Datenbank Progenetix einen allgemeinen Überblick über die

chromosomalen Aberrationen bei den verschiedenen Tumorentitäten. In Abbildung 1 sind die häufigsten chromosomalen Verluste und Zugewinne bei Adenokarzinomen des Ösophagus in einem Penetranz-Diagramm dargestellt ($n=134$) (Abbildung 1) (Baudis M.; Baudis and Cleary 2001).

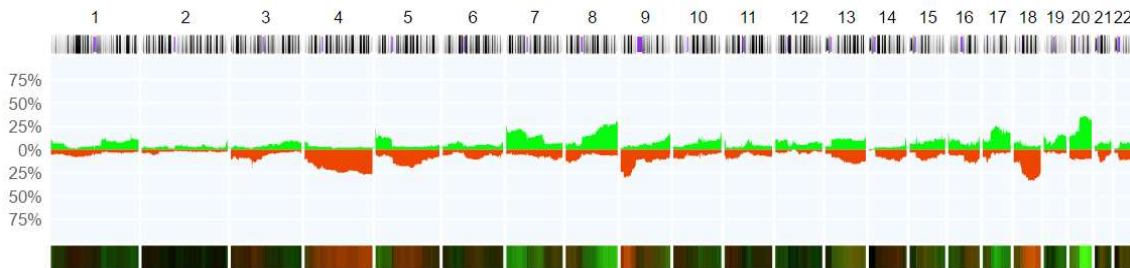


Abb.1: Penetranz-Diagramm der chromosomalen Verluste und Zugewinne bei Adenokarzinomen des Ösophagus ($n=134$, mCGH, aCGH) (cancer genome data @ progenetix.org; Baudis and Cleary 2001).

1.6 Chromosomale Instabilität

Die chromosomale Instabilität (CIN) ist ein Kennzeichen der meisten humanen malignen Tumorerkrankungen und eine wichtige Voraussetzung für genetische Heterogenität, Tumorprogression und Metastasierung (Nowak *et al.* 2002; Bakhoun and Swanton 2014). So wurde nachgewiesen, dass eine größere Anzahl von chromosomalen Veränderungen direkt mit der chromosomalen Instabilität (Thompson *et al.* 2010; Nicholson and Cimini 2015), der Krankheitsprogression (Chin *et al.* 2004; Li *et al.* 2014) und einer erhöhten genomischen Heterogenität (Jamal-Hanjani *et al.* 2017) korrelieren. Frühere gesamt-genomische-Analysen von Einzelzellen mittels der mCGH zur Detektion von Kopienzahlveränderungen (*copy number alterations*, CNAs) in disseminierten Tumorzellen, welche von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten isoliert wurden, verdeutlichten eine hohe Variabilität im Ausmaß der CNA. Dies spiegelt unterschiedliche Dimensionen der CIN wider (Klein *et al.* 1999; Klein *et al.* 2002; Schmidt-Kittler *et al.* 2003; Stoecklein *et al.* 2008; Weckermann *et al.* 2009b). Interessanterweise wurde bereits mehrfach festgestellt, dass disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark eine signifikant niedrigere CIN aufweisen als ihre entsprechenden Primärtumoren oder disseminierte Tumorzellen aus Lymphknoten (Schmidt-Kittler *et al.* 2003; Stoecklein *et al.* 2008; Weckermann *et al.* 2009b).

Bei der Entwicklung des ösophagealen Adenokarzinoms nimmt die Anzahl der CNA und damit das Ausmaß der CIN während der Tumorprogression über die verschiedenen prä-malignen Stadien der Barrett-Schleimhaut bis zum invasiven Karzinom und den Lymphknotenmetastasen kontinuierlich zu (Barrett *et al.* 1999; Maley *et al.* 2006; Pasello *et*

al. 2009; Paulson *et al.* 2009; Merlo *et al.* 2010; Davison *et al.* 2014; Li *et al.* 2014). Jüngste Daten deuten darauf hin, dass das Risiko für die Entwicklung von ösophagealen Adenokarzinomen durch den Erwerb einer frühen genetischen Instabilität in Barrett-Läsionen herbeigeführt wird (Martinez *et al.* 2016). Bei histopathologisch gesicherten primären Ösophaguskarzinomen berichteten Pasello *et al.* über eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl an CNA und dem Überleben der Patienten (Pasello *et al.* 2009). In ähnlicher Weise zeigte eine Studie von Davison *et al.*, dass die Variation des Aneuploidiegrades direkt mit einer schlechteren Prognose zusammenhängt (Davison *et al.* 2014).

Folglich erscheint die molekulargenetische Analyse von disseminierten Tumorzellen, im Vergleich mit den homologen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen, ein vielversprechender Ansatz zu sein um einerseits einen Überblick über das Ausmaß der CIN sowie die Prognose der Patienten zu erhalten und andererseits den Verlauf der Metastasen-Entstehung besser zu verstehen. Bislang wurden jedoch noch keine Studien beschrieben, in denen diesbezüglich systematische Untersuchungen beim Adenokarzinom des Ösophagus durchgeführt wurden. In dieser Arbeit werden nun einzelne disseminierte Tumorzellen aus histopathologisch tumorfreien Lymphknoten und Knochenmarkspräparaten isoliert und mittels mCGH analysiert. Zusätzlich werden mittels der Lasermikrodissektion einzelne Tumorzellen aus Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen isoliert und ebenfalls mittels mCGH analysiert. Die bei diesen Untersuchungen beobachteten genetischen Unterschiede, zwischen den disseminierten Tumorzellen und den Primärtumoren bzw. Lymphknotenmetastasen, können ein Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Therapie sein, um effektiver das Neuauftreten von Metastasen zu verhindern und auch bereits bestehende Metastasen zu behandeln. Das Vorhandensein von nicht- oder nur wenig-aberranten disseminierten Tumorzellen zeigt, dass diese Zellen offensichtlich bereits frühzeitig im Laufe der Tumorentwicklung in das Knochenmark disseminieren können (Braun *et al.* 2000; Hüsemann *et al.* 2008). Da jedoch nur wenige Zellen der disseminierten Tumorzell-Population zu manifesten Metastasen heranwachsen, ist es wichtig diese direkt zu analysieren und deren Biologie besser zu verstehen. Auf Grund der bekannten Heterogenität der disseminierten Tumorzellen, sowie angesichts der bekannten Treiberfunktion der CIN bei der Tumorprogression (Nowak *et al.* 2002; Bakhoun and Swanton 2014; Tanaka and Hirota 2016) und des Befundes, dass die CIN schon früh bei Ösophaguskarzinomen ausgeprägt zu sein scheint (Paulson *et al.* 2009; Nones *et al.* 2014) wurde in dieser Arbeit der Fokus auf diese Thematik gelegt. Es wurde die

Hypothese aufgestellt, dass disseminierte Tumorzellen mit höhergradig aberranten Genomen eine erhöhte CIN aufweisen und eine fortgeschrittene systemische Tumorerkrankung widerspiegeln. Damit wären sie eher in der Lage, manifeste Metastasen auszubilden. Demgegenüber repräsentieren disseminierte Tumorzellen ohne Veränderungen oder mit nur wenigen chromosomalen Aberrationen, einen Zustand der verzögerten systemischen Progression oder eine Sackgasse.

1.7 Ziele der Arbeit

Nach der Hypothese, die dieser Arbeit zu Grunde liegt, sind disseminierte Tumorzellen mit starken Aberrationen Anzeichen einer aktiven systemischen Tumorausbreitung, während disseminierte Tumorzellen mit wenig oder gar keinen Veränderungen in der mCGH Analyse auf einen inaktiven Prozess bzw. eine Sackgasse in der Tumorausbreitung hinweisen und nicht in der Lage sind, während der Lebensdauer eines Ösophaguskarzinom-Patienten zu Metastasen auszuwachsen. Des Weiteren sollten Ösophaguskarzinompatienten mit stark aberranten disseminierten Tumorzellen im Vergleich zu Patienten, die keine disseminierten Tumorzellen aufweisen oder bei denen nur wenige Veränderungen nachweisbar sind, ein signifikant kürzeres Überleben aufweisen. Um diese Hypothesen zu testen, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit die Verfahren zur Einzelzellisolation, zur Amplifikation des gesamten Genoms und zur mCGH im Wesentlichen wie in früheren Untersuchungen von disseminierten Tumorzellen beschrieben, durchgeführt (Klein *et al.* 2002; Schmidt-Kittler *et al.* 2003; Stoecklein *et al.* 2008; Weckermann *et al.* 2009b). Als Maß für die CIN wurde der prozentuale Anteil chromosomaler Zugewinne und Verluste pro Zellgenom (percentage of aberrant genome, PAG) berechnet. Um den PAG anhand von mCGH-Daten zu ermitteln musste die Gesamtgröße aller Aberrationen einer einzelnen Tumorzelle in Basenpaaren berechnet und der prozentuale Anteil bezogen auf die Gesamtgröße des Genoms (3,15 Gigabasenpaare) bestimmt werden. Für die Anwendung eines solchen PAG sollte mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse getestet werden, ob dieser repräsentativ für die Anzahl der Aberrationen ist und mit diesen korreliert.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden zwei unabhängige Kollektive analysiert. Dabei bestand das erste Testkollektiv aus Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen (Gesamtkollektiv). Für diese Arbeit wurde jedoch nur die Subgruppe der Adenokarzinome betrachtet (Teilkollektiv). Für das zweite unabhängige Kollektiv wurden zur Validierung der in

dieser Arbeit beschriebenen Befunde, die hier etablierten Auswertungen auf bereits gewonnene und publizierte Daten angewendet (unabhängiges Kollektiv).

Teilziele:

1. Detektion, Isolation und Analyse von disseminierten Tumorzellen aus den Indikatororganen Knochenmark und Lymphknoten mittels mCGH.
2. Isolation von Tumorzellen aus autologen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen und deren Analyse mittels mCGH.
3. Vergleichende Analyse der erfassten Veränderungen zwischen disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark und Lymphknoten mit den korrespondierenden Primärtumoren sowie Lymphknotenmetastasen.
4. Korrelation der Aberrationsanzahl für jede disseminierte Tumorzelle und Korrelation mit den Überlebensdaten, um den prognostischen Einfluss zu testen.
5. Korrelation der Aberrationsanzahl eines zuvor publizierten unabhängigen Kollektivs von Ösophaguskarzinompatienten (mCGH-Daten) zur Validierung der hier beschriebenen prospektiv gesammelten Daten.
6. Berechnung des PAG der isolierten disseminierten Tumorzellen und Korrelation mit dem Gesamtüberleben.

Die geplanten Untersuchungen werden nur an menschlichen Geweben (Tumorgewebe, Lymphknoten und Knochenmarksproben) durchgeführt, die während der klinisch erforderlichen Operation entnommen werden. Die Entnahme der Proben und deren Verwendung für wissenschaftliche Zwecke ist durch die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf positiv votiert worden (Antragsnummer: 2316 / 2655).

- 2 Disseminated tumour cells with highly aberrant genomes are linked to poor prognosis in operable oesophageal adenocarcinoma, Schumacher S. *et al.*, British Journal of Cancer, 117: 725-733, (2017).**

3 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine erhöhte chromosomale Instabilität von einzelnen disseminierten Tumorzellen, die aus dem Knochenmark und histopathologisch tumorfreien Lymphknoten von operablen Ösophaguskarzinompatienten isoliert wurden, mit einer schlechteren Prognose einhergeht und somit auf eine aggressivere minimale Resterkrankung hindeutet.

3.1 Detektion disseminierter Tumorzellen bei Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus

Es konnten mit der anti-CK18- / EpCAM-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung Marker-positive Zellen in 24 % der Knochenmarkaspirate und 41 % der Lymphknotenpräparate des hier untersuchten Kollektivs, mit Proben von 59 operablen Adenokarzinompatienten des Ösophagus, gefunden werden (Publikation Abbildung S1) (Schumacher *et al.* 2017). Auch in dem Gesamtkollektiv wurden zuvor, mittels derselben Immunfluoreszenz-Doppelfärbung, Marker-positive Zellen in Knochenmarksaspiraten (25 %) und Lymphknotenpräparaten (50 %) detektiert (Driemel *et al.* 2013). Um technische Artefakte auszuschließen bzw. nachzuweisen, wurden in einem zusätzlichen Screening-Experiment Knochenmark-Proben einer ähnlich großen Referenzpatientengruppe, welche Patienten mit benignen Tumoren und entzündlichen Veränderungen umfasste, auf das Vorkommen von Marker-positiven Zellen untersucht. Hierbei fand sich eine Detektionsrate von 6 % (Schumacher *et al.* 2017). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass unsere Kontroll-Kohorte nicht aus gesunden Kontrollen bestand, sondern aus Patienten mit gutartigen Tumoren und entzündlichen Erkrankungen. So ergaben Untersuchungen zu epithelialen Zellen im peripheren Blut, dass bei solchen Patienten-Kohorten eine erhöhte Detektionsrate von disseminierten epithelialen Zellen (7,5 % in > 200 Einzelpersonen) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Miller *et al.* 2010) nachzuweisen war. Die Detektion einer signifikant höheren Anzahl Marker-positiver Zellen in dem zuvor untersuchten Gesamtkollektiv und dem hier untersuchten Teilkollektiv deutet jedoch darauf hin, dass es sich bei der Mehrzahl dieser Zellen in erster Linie um epitheliale Zellen handelt, die mit den malignen Tumoren assoziiert sind bzw. von diesen stammen. Es muss bei der Interpretation der hier gewonnenen Daten jedoch berücksichtigt werden, dass die Detektion der disseminierten Tumorzellen in etwa 10 ml untersuchtem Knochenmark nicht repräsentativ für die Gesamtmenge an Knochenmark eines Erwachsenen (ca. 1,75 l) sein kann (Hassan and El-Sheemy 2004) und möglicherweise die minimale Resterkrankung somit

unterschätzt wird. Insgesamt zeigten frühere Untersuchungen bei Ösophaguskarzinompatienten abhängig von der Methode und den verwendeten Antigenen sehr unterschiedliche Detektionsraten, sowohl im untersuchten Knochenmark (11-88 %), als auch in den Lymphknotenpräparaten (8-71 %) (Sproll *et al.* 2018). Ein Erklärungsansatz für die hohe Spanne an disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark kann sein, dass die Studien, in denen prozentual sehr viele disseminierte Tumorzellen detektiert werden konnten, Knochenmark aus resezierten Rippen untersucht haben (O'sullivan *et al.* 1999; Bonavina *et al.* 2001; Ryan *et al.* 2004; Bagheri *et al.* 2011). Diese Knochenmarksproben sind möglicherweise von besserer Qualität als die Beckenkammaspirate und z.B. weniger durch Fettmark verunreinigt.

3.2 mCGH-Analysen disseminierter Tumorzellen, korrespondierender

Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen

In einem nächsten Schritt wurden die 43 detektierten disseminierten Tumorzellen von 18 Patienten (31 %) und 67 Tumorproben, isoliert aus korrespondierenden Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen von 17 Patienten mittels mCGH analysiert, um mögliche CNA-Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten Proben zu erkennen (Publikation Abbildung S1) (Schumacher *et al.* 2017).

Es konnten genomische Veränderungen der disseminierten Tumorzellen, Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen beobachtet werden, die den in der Literatur beschriebenen, für das Ösophaguskarzinom typischen chromosomalen Verlusten und Zugewinnen entsprachen (Moskaluk *et al.* 1998; Walch, Zitzelsberger and Bink *et al.* 2000; Walch, Zitzelsberger and Bruch *et al.* 2000; Baudis and Cleary 2001; Goh *et al.* 2011; Dulak *et al.* 2012; Frankel *et al.* 2014). So konnten unter anderem Zugewinne bei den Chromosomen 1q, 5p, 8q, 17q, 19 und 20, sowie Verluste bei den Chromosomen 5q, 8p, 9p, 16q und 18q identifiziert werden, die als typisch für das Adenokarzinom des Ösophagus gelten (Moskaluk *et al.* 1998; van Dekken *et al.* 1999) (Publikation Abbildung S3) (Schumacher *et al.* 2017). Solche typischen Veränderungen konnten bei allen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen, sowie bei 75 % der untersuchten disseminierten Tumorzellen aus Lymphknoten und 38 % der disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark nachgewiesen werden (Publikation Tabelle S3) (Schumacher *et al.* 2017). In einem nächsten Schritt wurde die Häufigkeit der Veränderungen für die vier Probentypen (disseminierte Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten, Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen) berechnet und auf

Gemeinsamkeiten hin untersucht. Die chromosomalen Veränderungen der einzelnen disseminierten Tumorzellen unterschieden sich von denen der korrespondierenden Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen, was als Zeichen der intratumoralen Heterogenität interpretiert werden kann (Maley *et al.* 2006; Stoecklein and Klein 2010; Dulak *et al.* 2013; Cao *et al.* 2015; Hao *et al.* 2016). Es konnten jedoch auch gemeinsame Aberrationen, beispielsweise bei den disseminierten Tumorzellen aus Lymphknoten und den Lymphknotenmetastasen beobachtet werden (Publikation Tabelle S4) (Schumacher *et al.* 2017), welche bei den Primärtumoren nicht nachweisbar waren, während andere Veränderungen exklusiv den disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark und den Primärtumoren gemeinsam waren (Publikation Tabelle S5) (Schumacher *et al.* 2017). Diese Befunde könnten auf charakteristische CNA hinweisen, die für die Ausbreitung in Lymphknoten bzw. Knochenmark relevant sind. Trotz der festgestellten Heterogenität, waren sich in einer anschließend durchgeführten hierarchischen Clusteranalyse die CNA der disseminierten Tumorzellen von Patienten, bei denen mehr als eine aberrante Zelle gefunden wurde, in der Mehrzahl der Patienten (53 %) sehr ähnlich (Publikation Abbildung S4) (Schumacher *et al.* 2017).

3.3 Chromosomale Instabilität disseminierter Tumorzellen

Ein wichtiger Befund dieser Arbeit war, dass disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark nur in 50 % aberrant waren und insgesamt eine signifikant geringere Aberrationsanzahl aufwiesen als die disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten (2,4 versus 8,78) (Schumacher *et al.* 2017). So waren in der niedrigauflösenden mCGH teilweise auch keine Veränderungen bei den immun-detektierten disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark zu beobachten, was eine sorgfältige Interpretation erfordert. In unserer Referenzpatientengruppe wurden 6 % Marker-positive Zellen gefunden, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass es sich bei einigen der nicht-aberranten disseminierten Tumorzellen möglicherweise um gutartige, unspezifisch Marker-positive Zellen handeln könnte (Schumacher *et al.* 2017). Ein denkbarer Erklärungsansatz wäre eine unspezifische Färbereaktion (z.B. durch nicht ausgewaschene Antikörper-Ansammlungen). Eine andere Interpretation dieser Zellen wäre, dass es sich um disseminierte Tumorzellen handelt, welche nur wenige oder gar keine Alterationen in der mCGH aufweisen da sie sich bereits in einem sehr frühen Erkrankungsstadium vom Tumorverband gelöst und in das Zielorgan disseminiert sind (Schmidt-Kittler *et al.* 2003; Schardt *et al.* 2005; Hüsemann *et al.* 2008; Schumacher *et*

al. 2017). Tatsächlich konnten bei genomischen Analysen in verschiedenen Tumorentitäten ähnliche Beobachtungen gemacht werden (Klein *et al.* 2002; Schmidt-Kittler *et al.* 2003; Weckermann *et al.* 2009a), was als Merkmal einer frühen Disseminierung interpretiert wurde. Spannenderweise konnten in transgenen Tumor-Mausmodellen in der Tat solche Zellen nachgewiesen werden (Hüsemann *et al.* 2008). Nach dieser Interpretation wären diese wenig/nicht aberranten Zellen Tumorzellen, die bereits während der ersten Schritte der malignen Transformation des Primärtumors gestreut sind, zu einem Zeitpunkt bei dem nur wenig oder keine größeren chromosomalen Veränderungen vorhanden sind. In diesem Zusammenhang ist es auch wichtig zu betonen, dass die Auflösung der mCGH sehr limitiert ist und Veränderungen nur in einer Größenordnung von >10 Megabasenpaaren erfasst werden können (Fuhrmann *et al.* 2008; Möhlendick *et al.* 2013). Das heißt, dass die hier beschriebenen „unveränderten“ disseminierten Tumorzellen durchaus chromosomal verändert sein könnten. Wenn die Veränderungen kleiner als 10 Megabasenpaare groß sind und keine fokalen Amplifikationen mit einer sehr hohen Kopienzahl besitzen, werden sie nicht erfasst (Kallioniemi *et al.* 1994). So konnten beispielsweise Schardt *et al.* mit Hilfe von höherauflösenden Analysen krebisrelevante subchromosomale DNA-Veränderungen in disseminierten Tumorzellen von Mammakarzinom-Patienten ohne mCGH-Veränderungen nachweisen (Schardt *et al.* 2005). Deshalb wäre es durchaus interessant, die in dieser Arbeit gewonnene Tumor-DNA mit mittlerweile verfügbaren, höherauflösenden Methoden zu analysieren. Eine denkbare Methode wäre die 1997 erstmals am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg entwickelte *array*-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (*arrayCGH*) (Solinas-Toldo *et al.* 1997). Sie dient ebenfalls dem Nachweis von Verlusten und Zugewinnen von genomischer DNA. Die vergleichende genomische Hybridisierung wird gegen ein Raster von immobilisierten DNA-Fragmenten durchgeführt, was in der Routine mittlerweile eine Auflösung von kleiner 200 kbp ermöglicht (Hanemaaijer *et al.* 2012). In unserer Arbeitsgruppe wurde die Methode auf Einzelzellebene etabliert und erlaubt es nun CNA von mindestens 56 kbp in Einzelzellen zu erfassen (Möhlendick *et al.* 2013). Eine weitere schnellere Methode stellt die Gesamt-genomische Sequenzierung nach dem Protokoll von Ferrarini *et al.* dar, welche eine Auflösung von 100 kbp erreicht (Ferrarini *et al.* 2018).

Ein möglicher Erklärungsansatz für die, sowohl in dieser, als auch in vorbeschriebenen Untersuchungen festgestellte geringe Anzahl an Alterationen in den früh disseminierten Tumorzellen, könnte die Wechselwirkung der Krebszellen mit Knochenmarks-Nischen sein

(Klein 2009). Demnach würden diese niedrig-aberranten Zellen, nachdem sie sich in hämatopoetischen Stammzellnischen des Knochenmarks abgesiedelt haben, am Auswachsen zu einer manifesten Metastase durch diese Mikroumgebung behindert, da bei ihnen, ähnlich wie bei den Stammzellen, eine Art Ruhezustand, die zelluläre Dormanz, induziert wird (Aguirre-Ghiso *et al.* 2013; Gužvić and Klein 2013; Pantel and Alix-Panabières 2014; Sosa *et al.* 2014). Die in den Knochenmarks-Nischen eingewanderten Tumorzellen, welche sich in einem dormanten Funktionszustand befinden, können sich nicht weiter teilen und somit keine weiteren Alterationen während der Zellteilung ansammeln (Sosa *et al.* 2011; Bragado *et al.* 2012). Darüber hinaus wird diskutiert, dass die bereits besetzten Stammzellnischen dann später disseminierten und ggf. stärker aberranten Tumorzellen nicht mehr zur Verfügung stehen (Shiozawa *et al.* 2011). Obwohl die Daten der hier vorliegenden Arbeit diese Hypothese weder beweisen noch widerlegen können, war der signifikant unterschiedliche PAG von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (0,44) gegenüber denen aus Lymphknoten (16,74) auffällig (Publikation Tabelle 2) und stützt die Hypothese einer frühzeitig und genetisch noch „unreifen“ Population disseminierter Tumorzellen, wohingegen es bei den lymphatisch disseminierten Tumorzellen eher zu einer vom Primärtumor unabhängigen Ansammlung von Alterationen gekommen sein könnte (Schumacher *et al.* 2017). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass mit weiteren Stichproben disseminierte Tumorzellen isoliert werden könnten, die den chromosomalen Aberrationen und der Aberrationsanzahl der Primärtumoren ähnlicher sind als den Lymphknotenmetastasen und eine spät disseminierte Population darstellen.

Vergleicht man nun den maximalen PAG des gesamten untersuchten Tumorzell-Kollektivs, konnte ein kontinuierlicher Anstieg der maximalen PAG-Werte von disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark über Primärtumoren, lymphatisch disseminierten Tumorzellen bis hin zu den Lymphknotenmetastasen festgestellt werden. Der mediane PAG war sowohl bei den Lymphknotenmetastasen, als auch bei den Primärtumoren deutlich niedriger als bei den lymphatisch disseminierten Tumorzellen (Publikation Abbildung 2) (Schumacher *et al.* 2017). Dass der PAG repräsentativ für die Aberrationsanzahl war, zeigte die Korrelation in einer linearen Regressionsanalyse (Publikation Abbildung S2) (Schumacher *et al.* 2017). Neben den biologischen Erklärungsansätzen für die unterschiedlichen Aberrationszahlen, dürfen auch technische Artefakte nicht außer Acht gelassen werden. So kann es bei der verwendeten Lasermikrodissektion zur Tumorzellisolierung zu einer Kontamination mit Zellen des peritumoralen Bindegewebes, umgebenden Lymphozyten oder

auch Retikulumzellen kommen (Moll *et al.* 1992). Da Lymphknotenmetastasen üblicherweise relativ klein sind (\varnothing 4.8 mm²) (Kajiyama *et al.* 2006), kann eine Kontamination mit gesunden Zellen der Umgebung nicht sicher ausgeschlossen werden und somit der mediane PAG fälschlicherweise zu niedrig liegen. Eine weitere Fehlerquelle für die genaue Bestimmung des PAG könnte auch in der Isolation und Analyse von genomischer DNA aus Zellverbänden liegen. Dabei kann eine Mischung genetisch heterogener Subklone im Primärtumor und den Lymphknotenmetastasen zu einer artifiziellen Verminderung des medianen PAG führen. Des Weiteren wurden für die Analyse nur kleine Tumorareale untersucht, sodass prinzipiell nicht alle Subklone erfasst werden können. Daher erscheint es wichtig Zellen bzw. Proben aus verschiedenen Arealen der Primärtumore oder der Lymphknotenmetastasen zu isolieren, einerseits um ggf. die verschiedenen Subklone abzubilden und andererseits eine Kontamination mit nicht-tumoralen Zellen, beispielsweise intratumoralen Entzündungszellen und Stromazellen, so gering wie möglich zu halten. Um das Risiko einer Kontamination mit Normalzellen bei der Isolierung der einzelnen disseminierten Tumorzellen aus Lymphknoten- und Knochenmarkpräparaten zu minimieren, wurden die Marker-positiven Zellen zunächst von den Haftobjektträgern isoliert und auf einen weiteren, gekammerten Objektträger transferiert, um von dort sicher die einzelne Tumorzelle aufzunehmen und in die weiteren Reaktionsansätze zu transferieren.

Insgesamt bestätigen jedoch die aktuellen Daten eine bereits publizierte mCGH-Analyse disseminierter Tumorzellen von Ösophaguskarzinomen, die an einem unabhängigen Kollektiv durchgeführt wurde (Stoecklein *et al.* 2008), in zwei wichtigen Punkten:

1. In den untersuchten Lymphknoten konnten insgesamt mehr disseminierte Tumorzellen als bei den Knochenmarkspiraten detektiert werden, welche unabhängig von den zur Detektion verwandten Markern, einen signifikant höheren PAG im Vergleich zu disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark aufwiesen (Publikation Tabelle 2, Abbildung S1) (Schumacher *et al.* 2017). Dabei ist hervorzuheben, dass im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, bei der früheren Untersuchung die Tumorzellen in den Kompartimenten Knochenmark und Lymphknoten über zwei unterschiedliche Marker (Zytokeratin und EpCAM) detektiert wurden. Daher war fraglich, ob der genomische Unterschied alleine mit dem unterschiedlichen Zielorgan oder auch mit den unterschiedlichen Detektionsmarkern zusammenhängt. Dies konnte mit den Daten dieser Arbeit geklärt werden, da die disseminierten Tumorzellen mit einer Doppelfärbung für EpCAM und Zytokeratin detektiert wurden. Geht man von einem systemischen Disseminierungsgeschehen in alle erreichbaren

Organe aus, scheint sich zu bestätigen, dass früh disseminierte Tumorzellen der Ösophaguskarzinome in Lymphknoten bessere Wachstumsbedingungen vorfinden und diese, im Vergleich zum Knochenmark, besser kolonisieren können. Eine andere Hypothese wäre, dass die lymphatische Disseminierung in tumornahe Lymphknoten zu einem späteren Zeitpunkt geschieht und diese Tumorzellen daher ähnlich viele Veränderungen wie Primärtumoren aufweisen. In jedem Fall ist, in Hinblick auf eine zielgerichtete patientenorientierte Tumorthherapie bei Ösophaguskarzinom-Patienten, die beobachtete genetische Heterogenität relevant, da diese den Therapieerfolg durchaus negativ beeinflussen kann (Murugaesu *et al.* 2015).

2. Wurden bei einem Patienten mehrere aberrante disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten gefunden, ergaben die Cluster-Analysen der mCGH Daten, dass diese sehr ähnliche chromosomale Veränderungen aufwiesen (Publikation Abbildung S4) (Schumacher *et al.* 2017). Möglicherweise handelt es sich bei diesen Zellen um expandierte Zellklone, welche sich in der Entwicklung zu einer manifesten Metastase befinden (Klein 2013).

3.4 Prognostischer Wert des PAG/der CIN

Da bekannt war, dass die CIN ein wichtiger Faktor für die Tumorprogression ist und disseminierte Tumorzellen eine hohe Variabilität der CIN aufweisen, wurde im Weiteren überprüft, welchen Einfluss die genomischen Veränderungen, bzw. der PAG als Maß für die CIN, auf das Überleben der Patienten haben. Die Einführung des PAG war wichtig, da die alleinige Angabe einer chromosomalen Aberrationsanzahl nicht aussagekräftig ist bzw. nichts über die Größe der Deletionen oder Amplifikationen und somit den Anteil des veränderten Genoms aussagt.

Motiviert durch die veröffentlichten CNA-Daten im Rahmen der Entwicklung ösophagealer Adenokarzinome wurde die Hypothese aufgestellt, dass nicht- oder niedrig-aberrante disseminierte Tumorzellen (CIN^{low}) eine Sackgasse oder zumindest eine verzögerte Progression der minimalen Resterkrankung darstellen, wohingegen stark aberrante disseminierte Tumorzellen (CIN^{high}) auf eine fortgeschrittenere / aggressivere minimale Resterkrankung hinweisen. Nach dieser Hypothese sollten Patienten mit disseminierten Tumorzellen, welche hohe CIN-Level zeigen kürzere Überlebensintervalle aufweisen als Patienten mit disseminierten Tumorzellen mit geringeren oder fehlenden Veränderungen in der mCGH.

Tatsächlich ergab die Analyse unserer Patientenkohorte und einer weiteren, unabhängigen Patientenkohorte mit 29 Adenokarzinompatienten des Ösophagus, dass Patienten, bei welchen disseminierte Tumorzellen mit deutlich aberranteren Genomen (Kohorte 1: PAG \geq 26 %; Kohorte 2: PAG \geq 19 %) nachgewiesen werden konnten, im Vergleich eine signifikant schlechtere Prognose als solche mit einem niedrigeren PAG besaßen (Publikation Abbildung S5) (Schumacher *et al.* 2017). Dabei stellen die 26 % bzw. 19 % einen Schwellenwert dar. Patienten mit aberranten disseminierten Tumorzellen, deren Genom zu weniger als 26 % bzw. 19 % aberrant war, überlebten signifikant länger als Patienten deren PAG diese Schwellenwerte überstiegen. Zuletzt wurden die beiden unabhängigen Datensätze zusammengefasst untersucht, um die Patientenzahl zu erhöhen. Auch in dieser Analyse war ein höherer PAG (\geq 15 %) signifikant mit einem kürzeren Überleben der Patienten verbunden. Da disseminierte Tumorzellen aus Lymphknoten signifikant stärker aberrant waren als die disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark, stellte sich die Frage, ob dieser Zusammenhang auf die disseminierten Tumorzellen aus den Lymphknoten zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang konnte in einer weiteren Analyse ein Trend zu einem erhöhten Risiko für ein kürzeres Überleben, bei der alleinigen Untersuchung von disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark, festgestellt werden. Die Anzahl der disseminierten Tumorzellen, die einen PAG von $>$ 15 % besaßen, war jedoch so gering, dass keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Es ist jedoch davon auszugehen, dass disseminierte Tumorzellen aus beiden Indikatororganen, Knochenmark und Lymphknoten, zu einem reduzierten Überleben der Patienten beitragen (Schumacher *et al.* 2017). So ergab sich die klinische Relevanz der CIN und CNA-Heterogenität bei Tumoren im Frühstadium eindeutig aus jüngsten umfangreichen *next generation*-Sequenzierungsstudien bei nicht-kleinzelligen Lungentumoren. Diese ergaben, dass die CIN nicht nur einen wesentlichen Treiber der parallelen Evolution darstellt, sondern auch mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Abbosh *et al.* 2017; Jamal-Hanjani *et al.* 2017). In der Literatur wurde bereits häufiger, sowohl bei Tumorvorstufen, als auch bei Ösophaguskarzinomen, eine Korrelation zwischen Aneuploidie / CIN und der Progression des Tumors sowie der prognostischen Bedeutung beschrieben (Barrett *et al.* 1999; Galipeau *et al.* 1999; Reid *et al.* 2000; Finley *et al.* 2006; Maley *et al.* 2006; Pasello *et al.* 2009; Merlo *et al.* 2010; Goh *et al.* 2011; Davison *et al.* 2014; Li *et al.* 2014).

In diesem Zusammenhang ist es auch interessant zu erörtern, dass der alleinige Nachweis von disseminierten Tumorzellen, unabhängig von einer weiteren genetischen Analyse, bei einigen

Tumorentitäten prognostisch ungünstig ist (Weitz *et al.* 1999; Vogel *et al.* 2002; Fehm *et al.* 2013; Stefanovic *et al.* 2016). Jedoch ist dies beim Ösophaguskarzinom nicht abschließend geklärt (Sproll *et al.* 2018), wobei einige Daten publiziert wurden, die auch hier eine prognostische Relevanz nachweisen (Vashist *et al.* 2012). In dem hier untersuchten Teilkollektiv ($n=59$), sowie auch dem vorher veröffentlichten Gesamtkollektiv ($n=90$), konnte keine signifikante Korrelation zwischen disseminierten Tumorzellen und dem Überleben der Patienten beobachtet werden (Driemel *et al.* 2013; Schumacher *et al.* 2017). Interessanterweise wurde, bei deutlich größeren Kohortenstudien an Ösophaguskarzinompatienten, ein signifikanter negativer prognostischer Einfluss von disseminierten Tumorzellen nachgewiesen (Vashist *et al.* 2012). Es ist daher möglich, dass die Anzahl (59 bzw. 90) an Ösophaguskarzinompatienten in der vorliegenden Arbeit nicht ausreichend war um einen Effekt des Nachweises von disseminierten Tumorzellen messen zu können. So umfasste die Kohorte von Vashist *et al.* 370 Patienten mit Adeno- und Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, wobei ein starker prognostischer Einfluss der disseminierten Tumorzellen auf das Überleben der Patienten beobachtet wurde (Gesamtüberleben: $p=0,001$) (Vashist *et al.* 2012). Möglich ist auch, dass die disseminierten Tumorzellen der Plattenepithelkarzinome für diesen starken Effekt verantwortlich sind, denn beide histologische Typen wurden, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, nicht differenziert betrachtet. Insgesamt geht aus den unterschiedlichen Daten hervor, dass nicht jede gefundene disseminierte Tumorzelle in der Lage ist, eine Metastase zu entwickeln und mit einem verkürzten Überleben einhergeht.

3.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Ösophaguskarzinome werden in der Regel, auf Grund fehlender Symptome, erst zu einem späten Zeitpunkt im Krankheitsverlauf diagnostiziert. Es erfolgt daraufhin eine zeitnahe operative bzw. multimodale Therapie der Primärtumore. Dennoch versterben im Verlauf viele der Patienten an Fernmetastasen. Ursächlich hierfür sind disseminierte Tumorzellen, die bereits zum Zeitpunkt der Operation in tumorferne Organe gestreut sind, aber von der Routinediagnostik nicht erfasst werden können. Verschiedene Arbeiten legten nahe, dass unter den gestreuten Tumorzellen verschiedene Gruppen, solche mit deutlichen tumortypischen genomischen Veränderungen und solche mit wenigen oder gar keinen genomischen Veränderungen (zumindest in der niedrig-auflösenden mCGH) existieren. Die

präsentierten und diskutierten Daten legen nahe, dass es sich bei den wenig aberranten disseminierten Tumorzellen um eine Sackgasse oder zumindest eine verzögerte Progression der minimalen Resterkrankung handelt. Nach den hier vorgestellten Daten gibt es aber offenbar disseminierte Tumorzellen mit genomischen Veränderungen, die nach Anzahl und Art den Primärtumoren oder Lymphknotenmetastasen ähneln und eine „aktive“ minimale residuale Erkrankung anzeigen. Diese disseminierten Tumorzellen, welche eine entscheidende Rolle im Verlauf der Tumorprogression spielen bzw. offensichtlich ab einem gewissen PAG für den Patienten prognostisch relevant sind, müssen demnach genauer untersucht werden.

Die Tumorbehandlung hat sich im Laufe der vergangenen 10 Jahre, durch zielgerichtete Therapiemöglichkeiten, deutlich verändert. Jedoch erwerben viele Tumoren durch Tumorheterogenität, klonale Evolution und Selektion Resistenzen gegenüber systemischen Therapien (Schneck *et al.* 2013). Auch wenn die Genotypisierung zurzeit die häufigste verwendete Methode darstellt um den Tumor für die weiteren klinischen Entscheidungen zu kategorisieren, spiegelt sie nur eine kleine Stichprobe des Tumorgewebes wieder. Primäre Tumorbiopsien können nicht alle relevanten genomischen Informationen einer einzelnen Krankheit bereitstellen. Es besteht jedoch die Hoffnung, dass die sogenannte flüssige Biopsie mehr Informationen liefert. In diesem Zusammenhang erscheint die direkte Analyse der minimalen Resterkrankung, mittels Charakterisierung der disseminierten Tumorzellen, daher als vielversprechender Ansatz, um Hochrisikopatienten zu identifizieren, die dann einer intensivierten Behandlung bzw. Therapie zugeführt werden können. Aus klinischer Sicht wäre es interessant zu testen, ob im peripheren Blut zirkulierende Tumorzellen (CTC) ähnliche molekulare Informationen zum Stand bzw. Status der minimalen Resterkrankung liefern könnten. Die Vorteile von solchen, im Blut zirkulierenden Biomarkern, sind, dass sie schnell, kosteneffektiv und wenig invasiv sowie zu verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf gemessen werden können. Zellfreie, im Blut frei zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) oder CTCs könnten als Ersatz für Tumorgewebe in bestimmten diagnostischen Situationen dienen. So können z.B. heute schon in der klinischen Routine, mit Hilfe von ctDNA Analysen, EGFR Mutationen in der Tumor-DNA bestimmt werden und somit bei Lungenkarzinompatienten die Therapie selektiert werden (Jenkins *et al.* 2017; Pisapia *et al.* 2019). Der Vorteil von CTC Analysen im Vergleich zur ctDNA Diagnostik ist, dass diese – ähnlich wie Biopsiegewebe - viel umfangreicher untersucht werden können (Proteinexpression, DNA, RNA etc.) (Alimirzaie *et al.* 2019). Da jedoch die CTC-Konzentration im Rahmen der minimalen Resterkrankung

extrem niedrig ist, könnte die diagnostische Leukapherese (Fischer *et al.* 2013; Stoecklein *et al.* 2016) einen praktikablen Ansatz darstellen um die CTCs anzureichern und somit eine informative flüssige Biopsie zu erhalten (Franken *et al.* 2019). Diese, in Kombination mit den modernen Sequenzierungsmethoden, bietet in Zukunft eine Vielzahl von klinischen Möglichkeiten, wie z.B. frühzeitige Diagnostik von Tumoren, Überwachung der minimalen Resterkrankung, Bewertung der Heterogenität des Tumors, Überwachung der Tumordynamik, Identifizierung therapeutischer Zielstrukturen, Einschätzung des Therapieerfolges, das Erkennen einer etwaigen Therapieresistenz in Echtzeit, die Identifizierung von Hochrisikopatienten mit erhöhtem Rezidivrisiko sowie eine Korrelation in Veränderungen der Tumorlast (Heitzer *et al.* 2015).

4 Literaturverzeichnis

- Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, Le Quesne J, Moore DA, Veeriah S, Rosenthal R, Marafioti T, Kirkizlar E, Watkins TBK, McGranahan N, Ward S, Martinson L, Riley J, Fraioli F, Al Bakir M, Grönroos E, Zambrana F, Endozo R, Bi WL, Fennessy FM, Sponer N, Johnson D, Laycock J, Shafi S, Czyzewska-Khan J, Rowan A, Chambers T, Matthews N, Turajlic S, Hiley C, Lee SM, Forster MD, Ahmad T, Falzon M, Borg E, Lawrence D, Hayward M, Kolvekar S, Panagiotopoulos N, Janes SM, Thakrar R, Ahmed A, Blackhall F, Summers Y, Hafez D, Naik A, Ganguly A, Kareht S, Shah R, Joseph L, Marie Quinn A, Crosbie PA, Naidu B, Middleton G, Langman G, Trotter S, Nicolson M, Remmen H, Kerr K, Chetty M, Gomersall L, Fennell DA, Nakas A, Rathinam S, Anand G, Khan S, Russell P, Ezhil V, Ismail B, Irvin-Sellers M, Prakash V, Lester JF, Kornaszewska M, Attanoos R, Adams H, Davies H, Oukrif D, Akarca AU, Hartley JA, Lowe HL, Lock S, Iles N, Bell H, Ngai Y, Elgar G, Szallasi Z, Schwarz RF, Herrero J, Stewart A, Quezada SA, Peggs KS, van Loo P, Dive C, Lin CJ, Rabinowitz M, Aerts HJWL, Hackshaw A, Shaw JA, Zimmermann BG, Swanton C (2017) Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature* **545**: 446–451, doi:10.1038/nature22364
- Aguirre-Ghiso JA, Bragado P, Sosa MS (2013) Metastasis Awakening: Targeting dormant cancer. *Nat Med* **19**: 276–277, doi:10.1038/nm.3120
- Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR (2019) Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clinical genetics* **95**: 643–660, doi:10.1111/cge.13514
- Allum WH, Blazeby JM, Griffin SM, Cunningham D, Jankowski JA, Wong R (2011) Guidelines for the management of oesophageal and gastric cancer. *Gut* **60**: 1449–1472, doi:10.1136/gut.2010.228254
- Andereg M, Lagarde SM, Jagadeshram VP, Gisbertz SS, Immanuel A, Meijer SL, Hulshof MCCM, Bergman JJGHM, van Laarhoven HWM, Griffin SM, van Berge Henegouwen MI (2016) Prognostic Significance of the Location of Lymph Node Metastases in Patients With Adenocarcinoma of the Distal Esophagus or Gastroesophageal Junction. *Annals of surgery* **264**: 847–853, doi:10.1097/SLA.0000000000001767
- Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempinski H, Moorman AV, Tittley I, Swansbury J, Kearney L, Enver T, Greaves M (2011) Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* **469**: 356–361, doi:10.1038/nature09650
- Arroyo-Martinez Q, Rodriguez-Tellez M, Garcia-Escudero A, Brugal-Medina J, Gonzalez-Campora R, Caunedo Alvarez A (2016) Epidemiology of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma in Spain. A unicentric study. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva* **108**: 609–617, doi:10.17235/reed.2016.4229/2016
- Bagheri R, Maddah G, Saedi HS, Sadeghian MH, Roodbari S (2011) Bone marrow involvement in esophageal cancer patients who underwent surgical resection. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **40**: 343–346, doi:10.1016/j.ejcts.2010.12.029

- Bakhoun SF and Swanton C (2014) Chromosomal instability, aneuploidy, and cancer. *Frontiers in oncology* **4**: 161, doi:10.3389/fonc.2014.00161
- Barrett MT, Sanchez CA, Prevo LJ, Wong DJ, Galipeau PC, Paulson TG, Rabinovitch PS, Reid BJ (1999) Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nature genetics* **22**: 106–109, doi:10.1038/8816
- Bashashati A, Ha G, Tone A, Ding J, Prentice LM, Roth A, Rosner J, Shumansky K, Kalloger S, Senz J, Yang W, McConechy M, Melnyk N, Anglesio M, Luk MTY, Tse K, Zeng T, Moore R, Zhao Y, Marra MA, Gilks B, Yip S, Huntsman DG, McAlpine JN, Shah SP (2013) Distinct evolutionary trajectories of primary high-grade serous ovarian cancers revealed through spatial mutational profiling. *The Journal of pathology* **231**: 21–34, doi:10.1002/path.4230
- Baudis M (2007) Genomic imbalances in 5918 malignant epithelial tumors: an explorative meta-analysis of chromosomal CGH data. *BMC Cancer* **7**: 226, doi:10.1186/1471-2407-7-226
- Baudis M and Cleary ML (2001) Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **17**: 1228–1229.
- Baudis M. *Progenetix*. Baudis M. Available at: www.progenetix.org
- Bertram H, Heidinger O, Kajüter H, Khil L, Krieg V, Kühling L, Mattauch V, Wellmann I (2017) *Jahresbericht 2017 Krebsgeschehen in Nordrhein-Westfalen 2015*. Bochum.
- Blank S, Stange A, Sisic L, Roth W, Grenacher L, Sterzing F, Burian M, Jäger D, Büchler M, Ott K (2013) Preoperative therapy of esophagogastric cancer: the problem of nonresponding patients. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie* **398**: 211–220, doi:10.1007/s00423-012-1034-5
- Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Höfler G, Kreipe H (2012) *Lehrbuch Pathologie*. Elsevier Health Sciences Germany.
- Bonavina L, Soligo D, Quirici N, Bossolasco P, Cesana B, Lemberghini Delilieri G, Peracchia A (2001) Bone marrow-disseminated tumor cells in patients with carcinoma of the esophagus or cardia. *Surgery* **129**: 15–22.
- Bragado P, Sosa MS, Keely P, Condeelis J, Aguirre-Ghiso JA (2012) Microenvironments dictating tumor cell dormancy. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* **195**: 25–39, doi:10.1007/978-3-642-28160-0_3
- Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, Waal J de, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K (2000) Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **18**: 80–86, doi:10.1200/JCO.2000.18.1.80
- Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, Morsberger LA, Latimer C, McLaren S, Lin M-L, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal SA, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Griffin CA, Burton J, Swerdlow H, Quail MA, Stratton MR, Iacobuzio-Donahue C, Futreal PA (2010) The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* **467**: 1109–1113, doi:10.1038/nature09460

- Cancer Genome Atlas Research Network (2017) Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature* **541**: 169–175, doi:10.1038/nature20805
- cancer genome data @ progenetix.org*. Available at:
<http://www.progenetix.net/subsets/?project=progenetix&genome=hg18&db=progenetix&subsetcode=C15&subsettype=ICDT##>, last assessed 11/03/2016.
- Cao W, Wu W, Yan M, Tian F, Ma C, Zhang Q, Li X, Han P, Liu Z, Gu J, Biddle FG (2015) Multiple region whole-exome sequencing reveals dramatically evolving intratumor genomic heterogeneity in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogenesis* **4**: e175, doi:10.1038/oncis.2015.34
- Castellarin M, Milne K, Zeng T, Tse K, Mayo M, Zhao Y, Webb JR, Watson PH, Nelson BH, Holt RA (2013) Clonal evolution of high-grade serous ovarian carcinoma from primary to recurrent disease. *The Journal of pathology* **229**: 515–524, doi:10.1002/path.4105
- Chak A, Faulx A, Eng C, Grady W, Kinnard M, Ochs-Balcom H, Falk G (2006) Gastroesophageal reflux symptoms in patients with adenocarcinoma of the esophagus or cardia. *Cancer* **107**: 2160–2166, doi:10.1002/cncr.22245
- Chin K, Solorzano CO de, Knowles D, Jones A, Chou W, Rodriguez EG, Kuo W-L, Ljung B-M, Chew K, Myambo K, Miranda M, Krig S, Garbe J, Stampfer M, Yaswen P, Gray JW, Lockett SJ (2004) In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* **36**: 984–988, doi:10.1038/ng1409
- Davison JM, Yee M, Krill-Burger JM, Lyons-Weiler MA, La Kelly, Sciulli CM, Nason KS, Luketich JD, Michalopoulos GK, LaFramboise WA (2014) The degree of segmental aneuploidy measured by total copy number abnormalities predicts survival and recurrence in superficial gastroesophageal adenocarcinoma. *PLoS ONE* **9**: e79079, doi:10.1371/journal.pone.0079079
- Davis-Yadley AH, Neill KG, Malafa MP, Pena LR (2016) Advances in the Endoscopic Diagnosis of Barrett Esophagus. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* **23**: 67–77.
- DeMeester SR (2006) Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment. *Annals of surgical oncology* **13**: 12–30, doi:10.1245/ASO.2005.12.025
- Dolan K, Sutton R, Walker SJ, Morris AI, Campbell F, Williams EMI (1999) New classification of oesophageal and gastric carcinomas derived from changing patterns in epidemiology. *British journal of cancer* **80**: 834–842, doi:10.1038/sj.bjc.6690429
- Driemel C, Kremling H, Schumacher S, Will D, Wolters J, Lindenlauf N, Mack B, Baldus SA, Hoya V, Pietsch JM, Panagiotidou P, Raba K, Vay C, Vallböhmer D, Harréus U, Knoefel WT, Stoecklein NH, Gires O (2013) Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2013.441
- Dulak AM, Schumacher SE, van Lieshout J, Imamura Y, Fox C, Shim B, Ramos AH, Saksena G, Baca SC, Baselga J, Taberero J, Barretina J, Enzinger PC, Corso G, Roviello F, Lin L, Bandla S, Luketich JD, Pennathur A, Meyerson M, Ogino S, Shivdasani RA, Beer DG, Godfrey TE, Beroukhim R, Bass AJ (2012) Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res.* **72**: 4383–4393, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3893

- Dulak AM, Stojanov P, Peng S, Lawrence MS, Fox C, Stewart C, Bandla S, Imamura Y, Schumacher SE, Shefler E, McKenna A, Carter SL, Cibulskis K, Sivachenko A, Saksena G, Voet D, Ramos AH, Auclair D, Thompson K, Sougnez C, Onofrio RC, Guiducci C, Beroukhi R, Zhou Z, Lin L, Lin J, Reddy R, Chang A, Landrenau R, Pennathur A, Ogino S, Luketich JD, Golub TR, Gabriel SB, Lander ES, Beer DG, Godfrey TE, Getz G, Bass AJ (2013) Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat. Genet.* **45**: 478–486, doi:10.1038/ng.2591
- Enzinger PC and Mayer RJ (2003) Esophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* **349**: 2241–2252, doi:10.1056/NEJMra035010
- Fearon ER and Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759–767.
- Fehm T, Banys M, Rack B, Janni W, Marth C, Blassl C, Hartkopf A, Trope C, Kimmig R, Krawczyk N, Wallwiener D, Wimberger P, Kasimir-Bauer S (2013) Pooled analysis of the prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* **23**: 839–845, doi:10.1097/IGC.0b013e3182907109
- Ferrarini A, Forcato C, Buson G, Tononi P, del Monaco V, Terracciano M, Bolognesi C, Fontana F, Medoro G, Neves R, Möhlendick B, Rihawi K, Ardizzoni A, Sumanasuriya S, Flohr P, Lambros M, Bono J de, Stoecklein NH, Manaresi N (2018) A streamlined workflow for single-cells genome-wide copy-number profiling by low-pass sequencing of LM-PCR whole-genome amplification products. *PLoS ONE* **13**, doi:10.1371/journal.pone.0193689
- Finley JC, Reid BJ, Odze RD, Sanchez CA, Galipeau P, Li X, Self SG, Gollahon KA, Blount PL, Rabinovitch PS (2006) Chromosomal instability in Barrett's esophagus is related to telomere shortening. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **15**: 1451–1457, doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0837
- Fischer JC, Niederacher D, Topp SA, Honisch E, Schumacher S, Schmitz N, Zacarias Föhrding L, Vay C, Hoffmann I, Kasprovicz NS, Hepp PG, Mohrmann S, Nitz U, Stresemann A, Krahn T, Henze T, Griebisch E, Raba K, Rox JM, Wenzel F, Sproll C, Janni W, Fehm T, Klein CA, Knoefel WT, Stoecklein NH (2013) Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**: 16580–16585, doi:10.1073/pnas.1313594110
- Frankel A, Armour N, Nancarrow D, Krause L, Hayward N, Lampe G, Smithers BM, Barbour A (2014) Genome-wide analysis of esophageal adenocarcinoma yields specific copy number aberrations that correlate with prognosis. *Genes Chromosomes Cancer* **53**: 324–338, doi:10.1002/gcc.22143
- Franken A, Driemel C, Behrens B, Meier-Stiegen F, Endris V, Stenzinger A, Niederacher D, Fischer JC, Stoecklein NH, Ruckhaeberle E, Fehm T, Neubauer H (2019) Label-Free Enrichment and Molecular Characterization of Viable Circulating Tumor Cells from Diagnostic Leukapheresis Products. *Clinical Chemistry* **65**: 549–558, doi:10.1373/clinchem.2018.296814

- Fuhrmann C, Schmidt-Kittler O, Stoecklein NH, Petat-Dutter K, Vay C, Bockler K, Reinhardt R, Ragg T, Klein CA (2008) High-resolution array comparative genomic hybridization of single micrometastatic tumor cells. *Nucleic Acids Research* **36**: e39, doi:10.1093/nar/gkn101
- Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Longton GM, Reid BJ (1999) Clonal expansion and loss of heterozygosity at chromosomes 9p and 17p in premalignant esophageal (Barrett's) tissue. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**: 2087–2095.
- Gerlinger M, Horswell S, Larkin J, Rowan AJ, Salm MP, Varela I, Fisher R, McGranahan N, Matthews N, Santos CR, Martinez P, Phillimore B, Begum S, Rabinowitz A, Spencer-Dene B, Gulati S, Bates PA, Stamp G, Pickering L, Gore M, Nicol DL, Hazell S, Futreal PA, Stewart A, Swanton C (2014) Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nature genetics* **46**: 225–233, doi:10.1038/ng.2891
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine* **366**: 883–892, doi:10.1056/NEJMoa1113205
- Gharahkhani P, Tung J, Hinds D, Mishra A, Vaughan TL, Whiteman DC, MacGregor S (2015) Chronic gastroesophageal reflux disease shares genetic background with esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Human molecular genetics*, doi:10.1093/hmg/ddv512
- Goh XY, Rees JRE, Paterson AL, Chin SF, Marioni JC, Save V, O'Donovan M, Eijk PP, Alderson D, Ylstra B, Caldas C, Fitzgerald RC (2011) Integrative analysis of array-comparative genomic hybridisation and matched gene expression profiling data reveals novel genes with prognostic significance in oesophageal adenocarcinoma. *Gut* **60**: 1317–1326, doi:10.1136/gut.2010.234179
- Gray RT, O'Donnell ME, Verghis RM, McCluggage WG, Maxwell P, McGuigan JA, Spence GM (2012) Bone marrow micrometastases in esophageal carcinoma: a 10-year follow-up study. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* **25**: 709–715, doi:10.1111/j.1442-2050.2011.01307.x
- Gundem G, van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JMC, Papaemmanuil E, Brewer DS, Kallio HML, Högnäs G, Annala M, Kivinummi K, Goody V, Latimer C, O'Meara S, Dawson KJ, Isaacs W, Emmert-Buck MR, Nykter M, Foster C, Kote-Jarai Z, Easton D, Whitaker HC, Neal DE, Cooper CS, Eeles RA, Visakorpi T, Campbell PJ, McDermott U, Wedge DC, Bova GS (2015) The Evolutionary History of Lethal Metastatic Prostate Cancer. *Nature* **520**: 353–357, doi:10.1038/nature14347
- Gužvić M and Klein CA (2013) Cancer dormancy: time to explore its clinical relevance. *Breast Cancer Res.* **15**: 321, doi:10.1186/bcr3590
- Haffner MC, Mosbrugger T, Esopi DM, Fedor H, Heaphy CM, Walker DA, Adejola N, Gurel M, Hicks J, Meeker AK, Halushka MK, Simons JW, Isaacs WB, Marzo AM de, Nelson WG, Yegnasubramanian S (2013) Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. *The Journal of clinical investigation* **123**: 4918–4922, doi:10.1172/JCI70354

- Hanemaaijer NM, Sikkema-Raddatz B, van der Vries G, Dijkhuizen T, Hordijk R, van Essen AJ, Veenstra-Knol HE, Kerstjens-Frederikse WS, Herkert JC, Gerkes EH, Leegte LK, Kok K, Sinke RJ, van Ravenswaaij-Arts CMA (2012) Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics. *European journal of human genetics : EJHG* **20**: 161–165, doi:10.1038/ejhg.2011.174
- Hao J-J, Lin D-C, Dinh HQ, Mayakonda A, Jiang Y-Y, Chang C, Jiang Y, Lu C-C, Shi Z-Z, Xu X, Zhang Y, Cai Y, Wang J-W, Zhan Q-M, Wei W-Q, Berman BP, Wang M-R, Koeffler HP (2016) Spatial intratumoral heterogeneity and temporal clonal evolution in esophageal squamous cell carcinoma. *Nat. Genet.* **48**: 1500–1507, doi:10.1038/ng.3683
- Hassan HT and El-Sheemy M (2004) Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine* **97**: 465–471, doi:10.1258/jrsm.97.10.465
- Heitzer E, Ulz P, Geigl JB (2015) Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clinical Chemistry* **61**: 112–123, doi:10.1373/clinchem.2014.222679
- Hermanek P (1999a) Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer research* **19**: 2771–2774.
- Hermanek P (1999b) Tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: histopathology, staging and prognosis. *Anticancer research* **19**: 2393–2396.
- Hoffmann M, Pasch S, Schamberger T, Maneck M, Möhlendick B, Schumacher S, Brockhoff G, Knoefel WT, Izbicki J, Polzer B, Stoecklein NH, Klein CA (2018) Diagnostic pathology of early systemic cancer: ERBB2 gene amplification in single disseminated cancer cells determines patient survival in operable esophageal cancer. *International Journal of Cancer* **142**: 833–843, doi:10.1002/ijc.31108
- Hur C, Miller M, Kong CY, Dowling EC, Nattinger KJ, Dunn M, Feuer EJ (2013) Trends in esophageal adenocarcinoma incidence and mortality. *Cancer* **119**: 1149–1158, doi:10.1002/cncr.27834
- Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA (2008) Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* **13**: 58–68, doi:10.1016/j.ccr.2007.12.003
- Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sorensen HT, Funch-Jensen P (2011) Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *The New England journal of medicine* **365**: 1375–1383, doi:10.1056/NEJMoa1103042
- Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, Birkbak NJ, Watkins TBK, Veeriah S, Shafi S, Johnson DH, Mitter R, Rosenthal R, Salm M, Horswell S, Escudero M, Matthews N, Rowan A, Chambers T, Moore DA, Turajlic S, Xu H, Lee S-M, Forster MD, Ahmad T, Hiley CT, Abbosh C, Falzon M, Borg E, Marafioti T, Lawrence D, Hayward M, Kolvekar S, Panagiotopoulos N, Janes SM, Thakrar R, Ahmed A, Blackhall F, Summers Y, Shah R, Joseph L, Quinn AM, Crosbie PA, Naidu B, Middleton G, Langman G, Trotter S, Nicolson M, Remmen H, Kerr K, Chetty M, Gomersall L, Fennell DA, Nakas A, Rathinam S, Anand G, Khan S, Russell P, Ezhil V, Ismail B, Irvin-Sellers M, Prakash V, Lester JF, Kornaszewska M, Attanoos R, Adams H, Davies H, Dentre S, Taniere P, O'Sullivan B, Lowe HL, Hartley JA, Iles N, Bell H, Ngai Y, Shaw JA, Herrero J, Szallasi Z, Schwarz RF, Stewart A, Quezada SA, Le

- Quesne J, van Loo P, Dive C, Hackshaw A, Swanton C (2017) Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**: 2109–2121, doi:10.1056/NEJMoa1616288
- Jenkins S, Yang JC-H, Ramalingam SS, Yu K, Patel S, Weston S, Hodge R, Cantarini M, Jänne PA, Mitsudomi T, Goss GD (2017) Plasma ctDNA Analysis for Detection of the EGFR T790M Mutation in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **12**: 1061–1070, doi:10.1016/j.jtho.2017.04.003
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Tremel K, Weg-Remers S, Wittenberg K, Baras N, Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A, Wolf U (2015) *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2011/2012*, 10th edn. Robert Koch-Institut: Berlin.
- Kajiyama Y, Iwanuma Y, Tomita N, Amano T, Isayama F, Matsumoto T, Tsurumaru M (2006) Size analysis of lymph node metastasis in esophageal cancer: diameter distribution and assessment of accuracy of preoperative diagnosis. *Esophagus* **3**: 189–195, doi:10.1007/s10388-006-0092-6
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**: 818–821.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **10**: 231–243.
- Kelsen DP, Winter KA, Gunderson LL, Mortimer J, Estes NC, Haller DG, Ajani JA, Kocha W, Minsky BD, Roth JA, Willett CG (2007) Long-term results of RTOG trial 8911 (USA Intergroup 113): a random assignment trial comparison of chemotherapy followed by surgery compared with surgery alone for esophageal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**: 3719–3725, doi:10.1200/JCO.2006.10.4760
- Kim T-M, Jung S-H, An CH, Lee SH, Baek I-P, Kim MS, Park S-W, Rhee J-K, Lee S-H, Chung Y-J (2015) Subclonal Genomic Architectures of Primary and Metastatic Colorectal Cancer Based on Intratumoral Genetic Heterogeneity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **21**: 4461–4472, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2413
- Klein CA (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* **9**: 302–312, doi:10.1038/nrc2627
- Klein CA (2013) Selection and adaptation during metastatic cancer progression. *Nature* **501**: 365–372, doi:10.1038/nature12628
- Klein CA, Blankenstein TJF, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmüller G (2002) Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* **360**: 683–689, doi:10.1016/S0140-6736(02)09838-0

- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Speicher MR, Riethmüller G (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 4494–4499.
- Klein G (1998) Foulds' dangerous idea revisited: the multistep development of tumors 40 years later. *Advances in cancer research* **72**: 1–23.
- Lacroix J and Doeberitz MK (2001) Technical aspects of minimal residual disease detection in carcinoma patients. *Seminars in surgical oncology* **20**: 252–264.
- Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O (1999) Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *The New England journal of medicine* **340**: 825–831, doi:10.1056/NEJM199903183401101
- Lee L, Ronellenfitch U, Hofstetter WL, Darling G, Gaiser T, Lippert C, Gilbert S, Seely AJ, Mulder DS, Ferri LE (2013) Predicting lymph node metastases in early esophageal adenocarcinoma using a simple scoring system. *Journal of the American College of Surgeons* **217**: 191–199, doi:10.1016/j.jamcollsurg.2013.03.015
- Li X, Galipeau PC, Paulson TG, Sanchez CA, Arnaudo J, Liu K, Sather CL, Kostadinov RL, Odze RD, Kuhner MK, Maley CC, Self SG, Vaughan TL, Blount PL, Reid BJ (2014) Temporal and spatial evolution of somatic chromosomal alterations: a case-cohort study of Barrett's esophagus. *Cancer Prev Res (Phila)* **7**: 114–127, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0289
- Luketina R-R and Emmanuel K (2014) Neoadjuvante Therapie beim operablen Ösophaguskarzinom. *Wien klin Mag*: 22–29, doi:10.1007/s00740-014-0002-9
- Maley CC, Galipeau PC, Finley JC, Wongsurawat VJ, Li X, Sanchez CA, Paulson TG, Blount PL, Risques R-A, Rabinovitch PS, Reid BJ (2006) Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nat. Genet.* **38**: 468–473, doi:10.1038/ng1768
- Mariette C, Piessen G, Triboulet J-P (2007) Therapeutic strategies in oesophageal carcinoma: Role of surgery and other modalities. *The Lancet Oncology* **8**: 545–553, doi:10.1016/S1470-2045(07)70172-9
- Martinez P, Timmer MR, Lau CT, Calpe S, Sancho-Serra MDC, Straub D, Baker A-M, Meijer SL, Kate FJWT, Mallant-Hent RC, Naber AHJ, van Oijen AHAM, Baak LC, Scholten P, Böhmer CJM, Fockens P, Bergman JJGHM, Maley CC, Graham TA, Krishnadath KK (2016) Dynamic clonal equilibrium and predetermined cancer risk in Barrett's oesophagus. *Nature communications* **7**: 12158, doi:10.1038/ncomms12158
- Mattos-Arruda L de, Bidard F-C, Won HH, Cortes J, Ng CKY, Peg V, Nuciforo P, Jungbluth AA, Weigelt B, Berger MF, Seoane J, Reis-Filho JS (2014) Establishing the origin of metastatic deposits in the setting of multiple primary malignancies: the role of massively parallel sequencing. *Molecular oncology* **8**: 150–158, doi:10.1016/j.molonc.2013.10.006
- Merlo LM, Shah NA, Li X, Blount PL, Vaughan TL, Reid BJ, Maley CC (2010) A comprehensive survey of clonal diversity measures in Barrett's esophagus as biomarkers of progression to esophageal adenocarcinoma. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* **3**: 1388–1397, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0108
- Miller MC, Doyle GV, Terstappen LWMM (2010) Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *Journal of oncology* **2010**: 617421, doi:10.1155/2010/617421

- Möhrendick B, Bartenhagen C, Behrens B, Honisch E, Raba K, Knoefel WT, Stoecklein NH (2013) A Robust Method to Analyze Copy Number Alterations of Less than 100 kb in Single Cells Using Oligonucleotide Array CGH. *PLOS ONE* **8**: e67031, doi:10.1371/journal.pone.0067031
- Moll R, Divo M, Langbein L (2008) The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology* **129**: 705–733, doi:10.1007/s00418-008-0435-6
- Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW (1992) Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.* **140**: 427–447.
- Moskaluk CA, Hu J, Perlman EJ (1998) Comparative genomic hybridization of esophageal and gastroesophageal adenocarcinomas shows consensus areas of DNA gain and loss. *Genes Chromosomes Cancer* **22**: 305–311.
- Müller M (2014) *Chirurgie für Studium und Praxis: Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen 2014/15*, 12th edn. Med. Verl.- und Informationsdienste: Breisach am Rhein.
- Murugaesu N, Wilson GA, Birkbak NJ, Watkins TB, McGranahan N, Kumar S, Abbassi-Ghadi N, Salm M, Mitter R, Horswell S, Rowan A, Phillimore B, Biggs J, Begum S, Matthews N, Hochhauser D, Hanna GB, Swanton C (2015) Tracking the genomic evolution of esophageal adenocarcinoma through neoadjuvant chemotherapy. *Cancer discovery* **5**: 821–831, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0412
- Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito D, Muthuswamy L, Krasnitz A, McCombie WR, Hicks J, Wigler M (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* **472**: 90–94, doi:10.1038/nature09807
- Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, Cook K, Meth J, Kendall J, Riggs M, Eberling Y, Troge J, Grubor V, Levy D, Lundin P, Maner S, Zetterberg A, Hicks J, Wigler M (2010) Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome research* **20**: 68–80, doi:10.1101/gr.099622.109
- Nicholson JM and Cimini D (2015) Link between aneuploidy and chromosome instability. *International review of cell and molecular biology* **315**: 299–317, doi:10.1016/bs.ircmb.2014.11.002
- Nones K, Waddell N, Wayte N, Patch A-M, Bailey P, Newell F, Holmes O, Fink JL, Quinn MCJ, Tang YH, Lampe G, Quek K, Loffler KA, Manning S, Idrisoglu S, Miller D, Xu Q, Waddell N, Wilson PJ, Bruxner TJC, Christ AN, Harliwong I, Nourse C, Nourbakhsh E, Anderson M, Kazakoff S, Leonard C, Wood S, Simpson PT, Reid LE, Krause L, Hussey DJ, Watson DI, Lord RV, Nancarrow D, Phillips WA, Gotley D, Smithers BM, Whiteman DC, Hayward NK, Campbell PJ, Pearson JV, Grimmond SM, Barbour AP (2014) Genomic catastrophes frequently arise in esophageal adenocarcinoma and drive tumorigenesis. *Nature communications* **5**: 5224, doi:10.1038/ncomms6224
- Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih I-M, Vogelstein B, Lengauer C (2002) The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 16226–16231, doi:10.1073/pnas.202617399

- O'sullivan GC, Sheehan D, Clarke A, Stuart R, Kelly J, Kiely MD, Walsh T, Collins JK, Shanahan F (1999) Micrometastases in esophagogastric cancer: high detection rate in resected rib segments. *Gastroenterology* **116**: 543–548, doi:10.1016/s0016-5085(99)70175-7
- Pantel K and Alix-Panabières C (2014) Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: A special source for liquid biopsy in cancer patients. *BoneKEy Rep* **3**: 584, doi:10.1038/bonekey.2014.79
- Pantel K, Müller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S (2003) Detection and Clinical Implications of Early Systemic Tumor Cell Dissemination in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **9**: 6326–6334.
- Pasello G, Agata S, Bonaldi L, Corradin A, Montagna M, Zamarchi R, Parenti A, Cagol M, Zaninotto G, Ruol A, Ancona E, Amadori A, Saggiaro D (2009) DNA copy number alterations correlate with survival of esophageal adenocarcinoma patients. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **22**: 58–65, doi:10.1038/modpathol.2008.150
- Patel AN, Preskitt JT, Kuhn JA, Hebel RF, Wood RE, Urschel HC (2003) Surgical management of esophageal carcinoma. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)* **16**: 280–284.
- Paulson TG, Maley CC, Li X, Li H, Sanchez CA, Chao DL, Odze RD, Vaughan TL, Blount PL, Reid BJ (2009) Chromosomal instability and copy number alterations in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **15**: 3305–3314, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2494
- Pech O, Bollschweiler E, Manner H, Leers J, Ell C, Hölscher AH (2011) Comparison between endoscopic and surgical resection of mucosal esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus at two high-volume centers. *Annals of surgery* **254**: 67–72, doi:10.1097/SLA.0b013e31821d4bf6
- Pisapia P, Malapelle U, Troncione G (2019) Liquid Biopsy and Lung Cancer. *Acta cytologica* **63**: 489–496, doi:10.1159/000492710
- Polzer B and Klein CA (2013) Metastasis Awakening: The challenges of targeting minimal residual cancer. *Nat Med* **19**: 274–275, doi:10.1038/nm.3121
- Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch PS (2000) Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets. *The American journal of gastroenterology* **95**: 1669–1676, doi:10.1111/j.1572-0241.2000.02196.x
- Rice TW, Apperson-Hansen C, DiPaola LM, Semple ME, Lerut TEMR, Orringer MB, Chen L-Q, Hofstetter WL, Smithers BM, Rusch VW, Wijnhoven BPL, Chen KN, Davies AR, D'Journo XB, Kesler KA, Luketich JD, Ferguson MK, Rasanen JV, van Hillegersberg R, Fang W, Durand L, Allum WH, Ceconello I, Cerfolio RJ, Pera M, Griffin SM, Burger R, Liu J-F, Allen MS, Law S, Watson TJ, Darling GE, Scott WJ, Duranceau A, Denlinger CE, Schipper PH, Ishwaran H, Blackstone EH (2016) Worldwide Esophageal Cancer Collaboration: clinical staging data. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* **29**: 707–714, doi:10.1111/dote.12493

- Rice TW, Zuccaro G, JR, Adelstein DJ, Rybicki LA, Blackstone EH, Goldblum JR (1998) Esophageal carcinoma: depth of tumor invasion is predictive of regional lymph node status. *The Annals of Thoracic Surgery* **65**: 787–792.
- Runge TM, Abrams JA, Shaheen NJ (2015) Epidemiology of Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Gastroenterology clinics of North America* **44**: 203–231, doi:10.1016/j.gtc.2015.02.001
- Rustgi AK and El-Serag HB (2014) Esophageal carcinoma. *The New England journal of medicine* **371**: 2499–2509, doi:10.1056/NEJMra1314530
- Ryan P, McCarthy S, Kelly J, Collins JK, Dunne C, Grogan L, Breathnach O, Shanahan F, Carey PD, Walsh TN, O'Sullivan GC (2004) Prevalence of bone marrow micrometastases in esophagogastric cancer patients with and without neoadjuvant chemoradiotherapy. *The Journal of surgical research* **117**: 121–126, doi:10.1016/j.jss.2003.12.008
- Samson P, Robinson C, Bradley J, Lockhart AC, Puri V, Broderick S, Kreisel D, Krupnick AS, Patterson GA, Meyers B, Crabtree T (2016) Neoadjuvant Chemotherapy versus Chemoradiation Prior to Esophagectomy: Impact on Rate of Complete Pathologic Response and Survival in Esophageal Cancer Patients. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, doi:10.1016/j.jtho.2016.07.031
- Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, Schubert F, Schmidt-Kittler O, Fuhrmann C, Polzer B, Petronio M, Eils R, Klein CA (2005) Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell* **8**: 227–239, doi:10.1016/j.ccr.2005.08.003
- Scheunemann P, Hosch SB, Izbicki JR (2001) Cytokeratins and other sensitive markers for esophageal cancer and metastases. *Dis. Esophagus* **14**: 85–90.
- Scheunemann P, Hosch SB, Izbicki JR (2003) Prognostic Value of Minimal Residual Disease in Esophageal Cancer. In: *Micrometastasis* (ed Pantel K.), pp. 127–138. Kluwer Academic Publishers: Boston.
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA (2003) From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 7737–7742, doi:10.1073/pnas.1331931100
- Schneck H, Blassl C, Meier-Stiegen F, Neves RP, Janni W, Fehm T, Neubauer H (2013) Analysing the mutational status of PIK3CA in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Molecular Oncology* **7**: 976–986, doi:10.1016/j.molonc.2013.07.007
- Schumacher S, Bartenhagen C, Hoffmann M, Will D, Fischer JC, Baldus SE, Vay C, Fluegen G, Dizdar L, Vallböhmer D, Klein CA, Knoefel WT, Stoecklein NH, Möhlendick B (2017) Disseminated tumour cells with highly aberrant genomes are linked to poor prognosis in operable oesophageal adenocarcinoma. *British journal of cancer* **117**: 725–733, doi:10.1038/bjc.2017.233

- Shapiro J, van Klaveren D, Lagarde SM, Toxopeus ELA, van der Gaast A, Hulshof MCCM, Wijnhoven BPL, van Berge Henegouwen MI, Steyerberg EW, van Lanschot JJB (2016) Prediction of survival in patients with oesophageal or junctional cancer receiving neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery. *The British journal of surgery* **103**: 1039–1047, doi:10.1002/bjs.10142
- Shiozawa Y, Pedersen EA, Am Havens, Jung Y, Mishra A, Joseph J, Kim JK, Patel LR, Ying C, Am Ziegler, Pienta MJ, Song J, Wang J, Loberg RD, Krebsbach PH, Pienta KJ, Taichman RS (2011) Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *The Journal of clinical investigation* **121**: 1298–1312, doi:10.1172/JCI43414
- Siewert JR (2007) Ösophaguskarzinom. *Onkologe* **13**: 949–960, doi:10.1007/s00761-007-1272-2
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, chromosomes & cancer* **20**: 399–407.
- Sosa MS (2016) Dormancy programs as emerging antimetastasis therapeutic alternatives. *Molecular & cellular oncology* **3**: e1029062, doi:10.1080/23723556.2015.1029062
- Sosa MS, Avivar-Valderas A, Bragado P, Wen HC, Aguirre-Ghiso JA (2011) ERK1/2 and p38alpha/beta signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**: 5850–5857, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2574
- Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA (2014) Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat. Rev. Cancer* **14**: 611–622, doi:10.1038/nrc3793
- Spechler SJ (2011) Barrett's esophagus: Clinical issues. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* **21**: 1–7, doi:10.1016/j.giec.2010.09.012
- Spechler SJ (2013) Barrett Esophagus and Risk of Esophageal Cancer: A Clinical Review. *JAMA* **310**: 627–636, doi:10.1001/jama.2013.226450
- Sproll C, Fluegen G, Stoecklein NH (2018) Minimal Residual Disease in Head and Neck Cancer and Esophageal Cancer. *Advances in experimental medicine and biology* **1100**: 55–82, doi:10.1007/978-3-319-97746-1_4
- Stefanovic S, Diel I, Sinn P, Englert S, Hennigs A, Mayer C, Schott S, Wallwiener M, Blumenstein M, Golatta M, Heil J, Rom J, Sohn C, Schneeweiss A, Schuetz F, Domschke C (2016) Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Patients with Operable Primary Breast Cancer: Prognostic Impact in Immunophenotypic Subgroups and Clinical Implication for Bisphosphonate Treatment. *Ann Surg Oncol* **23**: 757–766, doi:10.1245/s10434-015-4895-3
- Stiles BM, Mirza F, Coppolino A, Port JL, Lee PC, Paul S, Altorki NK (2011) Clinical T2-T3N0M0 esophageal cancer: the risk of node positive disease. *The Annals of Thoracic Surgery* **92**: 491-6; discussion 496-8, doi:10.1016/j.athoracsur.2011.04.004
- Stoecklein NH, Fischer JC, Niederacher D, Terstappen LWMM (2016) Challenges for CTC-based liquid biopsies: low CTC frequency and diagnostic leukapheresis as a potential solution. *Expert Rev Mol Diagn* **16**: 147–164, doi:10.1586/14737159.2016.1123095

- Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, Stern F, Hartmann CH, Vay C, Siegmund A, Scheunemann P, Schurr P, Knoefel WT, Verde PE, Reichelt U, Erbersdobler A, Grau R, Ullrich A, Izbicki JR, Klein CA (2008) Direct Genetic Analysis of Single Disseminated Cancer Cells for Prediction of Outcome and Therapy Selection in Esophageal Cancer. *Cancer Cell* **13**: 441–453, doi:10.1016/j.ccr.2008.04.005
- Stoecklein NH and Klein CA (2010) Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int. J. Cancer* **126**: 589–598, doi:10.1002/ijc.24916
- Takizawa K, Matsuda T, Kozu T, Eguchi T, Kato H, Nakanishi Y, Hijikata A, Saito D (2009) Lymph node staging in esophageal squamous cell carcinoma: a comparative study of endoscopic ultrasonography versus computed tomography. *Journal of gastroenterology and hepatology* **24**: 1687–1691, doi:10.1111/j.1440-1746.2009.05927.x
- Tanaka K and Hirota T (2016) Chromosomal instability: A common feature and a therapeutic target of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1866**: 64–75, doi:10.1016/j.bbcan.2016.06.002
- Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, Kiel K, Willett C, Sugarbaker D, Mayer R (2008) Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**: 1086–1092, doi:10.1200/JCO.2007.12.9593
- Thirlwell C, Will OCC, Domingo E, Graham TA, McDonald SAC, Oukrif D, Jeffrey R, Gorman M, Rodriguez-Justo M, Chin-Aleong J, Clark SK, Novelli MR, Jankowski JA, Wright NA, Tomlinson IPM, Leedham SJ (2010) Clonality assessment and clonal ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas. *Gastroenterology* **138**: 1441-54, 1454.e1-7, doi:10.1053/j.gastro.2010.01.033
- Thompson SL, Bakhoun SF, Compton DA (2010) Mechanisms of chromosomal instability. *Current biology : CB* **20**: R285-95, doi:10.1016/j.cub.2010.01.034
- Torres L, Ribeiro FR, Pandis N, Andersen JA, Heim S, Teixeira MR (2007) Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. *Breast cancer research and treatment* **102**: 143–155, doi:10.1007/s10549-006-9317-6
- Tustumi F, Takeda FR, Kimura CMS, Sallum RAA, Ribeiro UJ, Ceconello I (2016) ESOPHAGEAL CARCINOMA: IS SQUAMOUS CELL CARCINOMA DIFFERENT DISEASE COMPARED TO ADENOCARCINOMA? A transversal study in a quaternary high volume hospital in Brazil. *Arquivos de gastroenterologia* **53**: 44–48, doi:10.1590/S0004-28032016000100009
- Vallböhmer D, Hölscher AH, DeMeester S, DeMeester T, Salo J, Peters J, Lerut T, Swisher SG, Schröder W, Bollschweiler E, Hofstetter W (2010) A Multicenter Study of Survival After Neoadjuvant Radiotherapy/Chemotherapy and Esophagectomy for ypT0N0M0R0 Esophageal Cancer. *Annals of surgery* **252**: 744–749, doi:10.1097/SLA.0b013e3181fb8dde
- van Dekken H, Geelen E, Dinjens WN, Wijnhoven BP, Tilanus HW, Tanke HJ, Rosenberg C (1999) Comparative genomic hybridization of cancer of the gastroesophageal junction: deletion of 14Q31-32.1 discriminates between esophageal (Barrett's) and gastric cardia adenocarcinomas. *Cancer Res* **59**: 748–752.

- Vashist YK, Effenberger KE, Vettorazzi E, Riethdorf S, Yekebas EF, Izbicki JR, Pantel K (2012) Disseminated tumor cells in bone marrow and the natural course of resected esophageal cancer. *Ann Surg* **255**: 1105–1112, doi:10.1097/SLA.0b013e3182565b0b
- Vazquez-Sequeiros E, Wang L, Burgart L, Harmsen W, Zinsmeister A, Allen M, Jondal M, Wiersema M (2002) Occult lymph node metastases as a predictor of tumor relapse in patients with node-negative esophageal carcinoma. *Gastroenterology* **122**: 1815–1821, doi:10.1053/gast.2002.33665
- Visser E, Leeftink AG, van Rossum PSN, Siesling S, van Hillegersberg R, Ruurda JP (2016) Waiting Time from Diagnosis to Treatment has no Impact on Survival in Patients with Esophageal Cancer. *Ann Surg Oncol* **23**: 2679–2689, doi:10.1245/s10434-016-5191-6
- Vogel I, Kalthoff H, Henne-Bruns D, Kremer B (2002) Detection and prognostic impact of disseminated tumor cells in pancreatic carcinoma. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* **2**: 79–88, doi:10.1159/000055896
- Walch AK, Zitzelsberger HF, Bink K, Hutzler P, Bruch J, Braselmann H, Aubele MM, Mueller J, Stein H, Siewert JR, Höfler H, Werner M (2000) Molecular genetic changes in metastatic primary Barrett's adenocarcinoma and related lymph node metastases: comparison with nonmetastatic Barrett's adenocarcinoma. *Mod. Pathol.* **13**: 814–824, doi:10.1038/modpathol.3880143
- Walch AK, Zitzelsberger HF, Bruch J, Keller G, Angermeier D, Aubele MM, Mueller J, Stein H, Braselmann H, Siewert JR, Höfler H, Werner M (2000) Chromosomal imbalances in Barrett's adenocarcinoma and the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Am. J. Pathol.* **156**: 555–566, doi:10.1016/S0002-9440(10)64760-8
- Waterman TA, Hagen JA, Peters JH, DeMeester SR, Taylor CR, DeMeester TR (2004) The prognostic importance of immunohistochemically detected node metastases in resected esophageal adenocarcinoma. *The Annals of Thoracic Surgery* **78**: 1161-9; discussion 1161-9, doi:10.1016/j.athoracsur.2004.04.045
- Weckermann D, Polzer B, Ragg T, Blana A, Schlimok G, Arnholdt H, Bertz S, Harzmann R, Klein CA (2009a) Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 1549–1556, doi:10.1200/JCO.2008.17.0563
- Weckermann D, Polzer B, Ragg T, Blana A, Schlimok G, Arnholdt H, Bertz S, Harzmann R, Klein CA (2009b) Perioperative Activation of Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow of Patients With Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **27**: 1549–1556, doi:10.1200/JCO.2008.17.0563
- Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, Lehnert T, Herfarth C, Knebel Doeberitz M von (1999) Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin. Cancer Res.* **5**: 1830–1836.
- Wijnhoven BP, Siersema PD, Hop WC, van Dekken H, Tilanus HW (1999) Adenocarcinomas of the distal oesophagus and gastric cardia are one clinical entity. Rotterdam Oesophageal Tumour Study Group. *The British journal of surgery* **86**: 529–535, doi:10.1046/j.1365-2168.1999.01082.x

- Wittekind C (2020) *TNM-Klassifikation maligner Tumoren: Mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019*, 8th edn.
- Wu SG, Zhang WW, He ZY, Sun JY, Chen YX, Guo L (2017) Sites of metastasis and overall survival in esophageal cancer: a population-based study. *Cancer management and research* **9**, doi:10.2147/CMAR.S150350
- Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue CA (2010) Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**: 1114–1117, doi:10.1038/nature09515
- Yates LR, Gerstung M, Knappskog S, Desmedt C, Gundem G, van Loo P, Aas T, Alexandrov LB, Larsimont D, Davies H, Li Y, Ju YS, Ramakrishna M, Haugland HK, Lilleng PK, Nik-Zainal S, McLaren S, Butler A, Martin S, Glodzik D, Menzies A, Raine K, Hinton J, Jones D, Mudie LJ, Jiang B, Vincent D, Greene-Colozzi A, Adnet P-Y, Fatima A, Maetens M, Ignatiadis M, Stratton MR, Sotiriou C, Richardson AL, Lønning PE, Wedge DC, Campbell PJ (2015) Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat Med* **21**: 751–759, doi:10.1038/nm.3886
- Yen C-C, Chen Y-J, Lu K-H, Hsia J-Y, Chen J-T, Hu C-P, Chen P-M, Liu J-H, Chiou T-J, Wang W-S, Yang M-H, Chao T-C, Lin C-H (2003) Genotypic analysis of esophageal squamous cell carcinoma by molecular cytogenetics and real-time quantitative polymerase chain reaction. *International Journal of Oncology*, doi:10.3892/ijo.23.4.871

5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nikolas Hendrik Stoecklein für die Vermittlung des interessanten Promotionsthemas, für die unermüdliche Betreuung und die großartige Unterstützung in der Phase der finalen Fertigstellung sowie für die Erstellung des Erstgutachtens. Von ganzem Herzen möchte ich mich sowohl bei Frau Dr. rer. nat. Birte Möhlendick als auch bei meinem Mann Andreas, meiner Familie sowie meinen Freunden bedanken, die mich während der gesamten Promotionszeit unterstützten und immer für mich da waren.