

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

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

**Identifikation und Charakterisierung disseminierter
Tumorzellen beim Cholangiokarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von

Alexander Ökmen

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Meiner Frau und meiner Familie

Posterpräsentation:

2017 **Smyczek A**, Bongers E, Seidschner S, Knoefel WT, Stoecklein NH, Möhlendick B: Identifikation und Charakterisierung disseminierter Tumorzellen beim cholangiozellulären Karzinom. *Symposium der Medical Research School Düsseldorf*

I Zusammenfassung

Die genetische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen (DTCs), die als Vorläuferzellen möglicher Metastasen angesehen werden, könnte Hinweise auf Mechanismen der Tumorzeldissimierung und Metastasierung liefern. Diese Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit im Knochenmark (KM) und Lymphknoten (LK) der Patienten, die an einem Cholangiokarzinom (CCA) erkrankt sind, identifiziert, isoliert und genetisch charakterisiert.

Von den 88 CCA-Patienten konnten 88 KM-Proben untersucht werden. Darüber hinaus standen neben dem KM-Proben zusätzlich 7 LK-Proben zur Verfügung. Aus diesen Proben wurden mononukleäre Zellen, in deren Zellfraktionen sich neben Lymphozyten auch DTCs befinden können, über eine Dichtegradientenzentrifugation selektiert. Die DTCs wurden mit Hilfe einer Doppel-Immunofluoreszenzfärbung (IF) mit Antikörpern gegen Cytokeratine (CK) 7, 8, 18 und 19 detektiert und mittels Mikromanipulation als Einzelzelle isoliert. Daraufhin erfolgte eine gesamtgenomische Amplifikation (WGA) der DTC-DNA. Die Analyse des gesamten Genoms auf chromosomale Kopienzahlveränderungen (CNA) erfolgte mittels einer *array*-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (aCGH).

Insgesamt konnten in 23 von 88 KM- und in 4 von 7 LK-Proben DTCs gefunden werden. Davon hatte ein Patient sowohl im Knochenmark als auch im Lymphknoten positive DTC. Das bedeutet, dass bei 29,5 % (26/88) der CCA-Patienten DTCs mittels IF detektiert werden konnten. Nach Überprüfung der Qualität der gesamtgenomisch amplifizierten Einzellzell-DNA konnte die Analyse des Genoms auf chromosomale Kopienzahlveränderung mittels aCGH an 14 KM-DTCs und 8 LK-DTCs erfolgen. Die aCGH-Analyse der DTCs deckte im Vergleich zu Profilen von CCA-Primärtumoren aus der Progenetix-Datenbank CCA-typische CNAs, wie zum Beispiel, Zugewinne der Chromosomen 7 und 8, sowie Verluste der Chromosomen 3p, 4 und 6q, auf. Beim Vergleich von KM- und LK-DTCs zeigte sich zusätzlich zu den Unterschieden in der Qualität der CNAs ein signifikanter Unterschied im prozentual aberranten Genom zwischen DTCs. So konnte bei den LK-DTCs ein signifikant aberrantes Genom festgestellt werden ($p < 0,01$).

In dieser Kohorte von 88 CCA-Patienten gelang der Nachweis von DTCs aus KM- und LK-Proben. Ebenso konnten CCA-typische Kopienzahlveränderungen bei den DTCs aus KM und LK gezeigt werden. Ein signifikanter Einfluss von DTCs auf ein kürzeres Gesamtüberleben der CCA-Patienten konnte nicht nachvollzogen werden. Lediglich klinische Parameter, wie die Größe des Primärtumors ($p < 0,01$), Alter der Patienten ($p = 0,01$), der Differenzierungsgrad des Primärtumors ($p = 0,03$) und die R0-Operation ($p = 0,01$) korrelierten signifikant mit einem kürzeren Überleben.

Weitere Analysen sollen klären, ob die distinkten genetischen Veränderungen der DTCs einen Einfluss auf die Progression und die Metastasierung beim CCA darstellen.

II Summary

The genetic characterization of disseminated tumor cells (DTCs) which are regarded as precursor cells of possible metastases could provide clues to mechanisms of tumor cell dissemination and metastasis. As part of this work, these cells were identified, isolated and genetically characterized in patients' bone marrow (KM) and lymph nodes (LK) suffering from cholangiocarcinoma (CCA).

88 KM samples from the 88 CCA patients could be examined. In addition to the KM samples, 7 LK samples were also available. Mononuclear cells whose cell fractions may contain lymphocytes as well as DTCs were selected from these samples, using a density gradient centrifugation. The DTCs were detected using double immunofluorescence staining (IF) with antibodies against cytokeratins 7, 8, 18 and 19 and isolated as single cells by means of micromanipulation. This was followed by a total genomic amplification (WGA) of the DTC DNA. The analysis of the entire genome for chromosomal copy number changes (CNA) was carried out by means of an array-based comparative genomic hybridization (aCGH).

Overall, DTCs could be detected by IF in 23/88 KM and 4/7 LK samples. Of these, one patient had positive DTCs in both bone marrow and lymph nodes. This means that DTCs could be detected by IF in 29,5 % (26/88) of the CCA patients. After checking the quality of the whole genomic amplified single cell DNA, the genome could be analyzed for chromosomal copy number changes, using aCGH on 14 KM-DTCs and 8 LK-DTCs. The aCGH analysis of the DTCs revealed, in comparison to profiles of CCC, primary tumors from the Progenetix database, CCA-typical CNAs, such as gains of chromosomes 7 and 8 and losses of chromosomes 3p, 4 and 6q. When comparing KM- and LK-DTCs, in addition to the differences in the quality of the CNAs, a significant difference in the percentage of aberrant genome between DTCs was found. A significantly aberrant genome was detected in the LK-DTCs ($p < 0,01$).

In this cohort of 88 CCA patients, DTCs were detected from contrast medium and LK samples. Likewise, changes in the copy number typical of CCA could be shown in the DTCs from KM and LK. A significant influence of DTCs on a shorter overall survival of CCA patients could not be established. Only clinical parameters such as the size of the primary tumor ($p < 0,01$), age of the patient ($p = 0,01$), the degree of differentiation of the primary tumor ($p = 0,03$) and the R0 operation ($p = 0,01$) correlated significantly with a shorter survival.

Further analyzes should clarify whether the distinct genetic changes of the DTCs have an influence on the progression and metastasis in CCA.

III Abkürzungsverzeichnis

aCGH	<i>array</i> -basierte komparative genomische Hybridisierung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pairs</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Celsius
CA 19-9	Tumormarker CA 19-9
CCA	Cholangiokarzinom
CK 7	Zytokeratin 7
cm	Centimeter
CNA	chromosomale Kopienzahlveränderungen
CTC	zirkulierende Tumorzelle
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
dCCA	distales Cholangiokarzinom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynucleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbeccos's phosphate buffered saline</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTC	disseminierte Tumorzelle
eCCA	extrahepatisches Cholangiokarzinom
ETDA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
e.V.	eingetragener Verein

FCS	Fötale Kälberserum
G	Erdbeschleunigung
iCCA	intrahepatisches Cholangiokarzinom
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems – 10. Revision</i>
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
kU	kilo <i>Units</i>
L	Liter
LK/LN	Lymphknoten
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
min	Minute
mL	Milliliter
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
nm	Nanometer
OR	<i>odds ratio</i> , Chancenverhältnis
pCCA	perihiläres Cholangiokarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis

R0	komplette Resektion eines Tumors
R1	verbleibende mikroskopisch sichtbare Reste eines Tumors nach Resektion
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
sec	Sekunde
TNM	<i>Tumor-Nodes-Metastasis</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
WGA	gesamtgenomische Amplifikation
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

IV INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das Cholangiokarzinom	1
1.1.1 Anatomische Einteilung und Häufigkeit	1
1.1.2 Epidemiologie Deutschland	2
1.1.3 Risikofaktoren	3
1.1.4 Früherkennung und prophylaktische Maßnahmen	4
1.1.5 Therapie	5
1.1.6 TNM-Klassifikation, UICC-Stadien, ICD-10	5
1.2 Pathogenese des Cholangiokarzinoms	6
1.2.1 Epitheliale-mesenchymale Transition	7
1.2.2 Heterogenität	8
1.2.2.1 Lineare Progression	9
1.2.2.2 Parallele Progression	9
1.3 Analyse von disseminierten Tumorzellen	9
1.3.1 Charakteristika von disseminierten Tumorzellen	9
1.3.2 Anforderung der immunhistochemischen Färbung	10
1.3.3 Prinzip der Einzelzell-CGH	10
1.3.4 Prinzip der <i>Microarray</i> -CGH	13
1.4 Ziele der Arbeit	14

2	Material und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Reagenzien und Chemikalien	15
2.1.2	Geräte und Materialien	18
2.1.3	Zellkultur	20
2.1.4	Software	20
2.2	Patienten und Gewebeproben	21
2.3	Aktenzeichen des Ethikvotums	22
2.4	Patientenproben	22
2.4.1	Lymphknotenaufbereitung	22
2.4.2	Knochenmarksaufbereitung	23
2.5	Doppel-Immunfluoreszenzfärbung CK 7 / A45 BB3 / Hoechst	24
2.6	Picken von Einzelzellen	28
2.7	MSE PCR	30
2.7.1	Proteinase K Verdau	30
2.7.2	MseI Verdau	31
2.7.3	<i>Preannealing</i>	31
2.7.4	Ligation	32
2.7.5	Primäre PCR	32
2.7.6	Multiplex PCR	33
2.7.7	Agarose Gelelektrophorese	34
2.8	<i>Microarray</i> -CGH	35
2.8.1	Einzelzell-DNA Aufreinigung	35
2.8.2	<i>Labeling</i>	36
2.8.3	Probenvorbereitung für Hybridisation	38

2.8.4	<i>Microarray</i> Hybridisation	38
2.8.5	Das Waschen der <i>Microarrays</i>	40
2.8.6	Scannen der <i>Microarrays</i>	41
2.8.7	Extraktion der Daten und Auswertung	41
2.8.8	Statistische Analyse	44
3	Ergebnisse	
3.1	Auswertung klinischer Daten	45
3.2	Auswertung der Färbeergebnisse	46
3.3	Überlebenszeitanalysen der CCA-Kohorte	47
3.3.1	Auswertung der TNM-Daten	47
3.3.2	Auswertung der DTC und der CK-Expression	48
3.4	Gesamt-aCGH-Analyse	50
3.4.1	Profile von DTC aus den Lymphknotenproben	50
3.4.2	Profile DTC aus den Knochenmarksproben	52
3.4.3	Vergleichende Analyse der aberranten Genome von KM-DTC und LK-DTC	53
3.5	Vergleichende kumulative Darstellung aller DTC-Proben	53
4	Diskussion	55
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	59

1 Einleitung

1.1 Das Cholangiokarzinom

1.1.1 Anatomische Einteilung und Häufigkeit

Das Cholangiokarzinom ist eine heterogene Gruppe von Tumoren, die aus verschiedenen Bereichen des Gallengangsystems entstehen können. Es unterteilt sich in ein intrahepatisches Cholangiokarzinom (iCCA), welches die kleinen Gallengänge innerhalb der Leber betrifft und in ein perihiläres Cholangiokarzinom/Klatskintumor (pCCA), das den Bereich der Hepatikusgabel definiert. Außerdem unterteilt es sich in ein distales Cholangiokarzinom (dCCA), womit der Gallengang kaudal der Ductus cysticus Einmündung klassifiziert ist [1]. Das dCCA und das pCCA werden auch unter der Gruppe der extrahepatischen Cholangiokarzinome (eCCA) zusammengefasst [2]. Zuletzt gibt es noch spezifische Entstehungsorte an der Gallenblase und an der Ampulla vateri (Abb. 1). Von der Verteilung tritt das pCCA mit 50 % am häufigsten auf, gefolgt vom dCCA mit 42 % und am seltensten ist das iCCA mit 8 % [3].

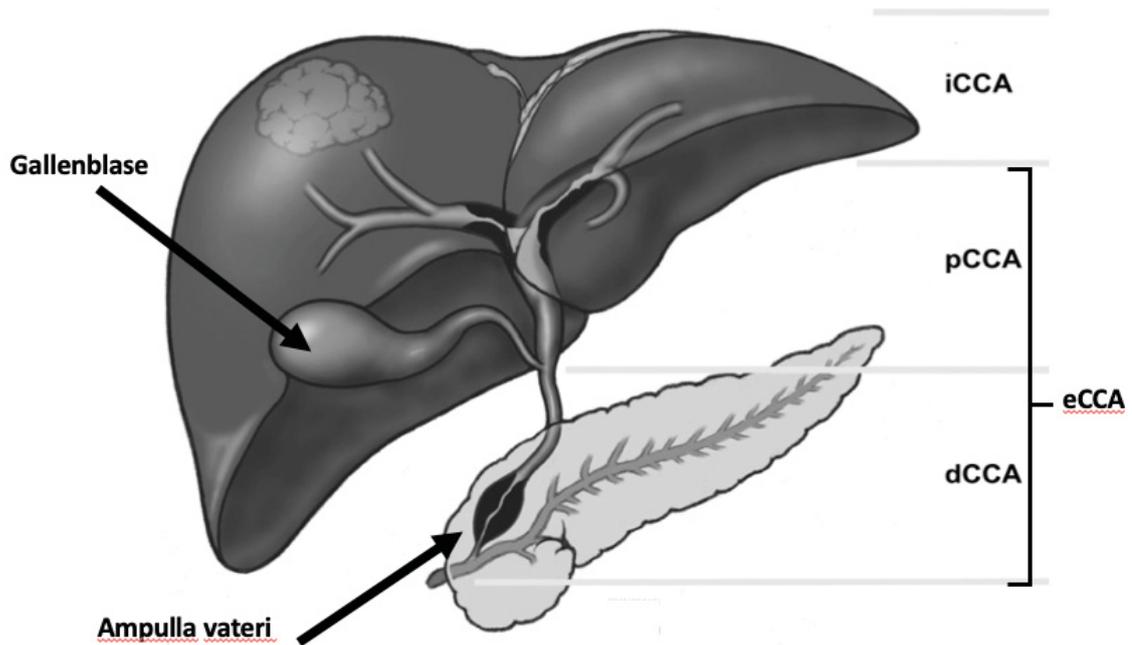


Abb. 1: Anatomische Einteilung des Cholangiokarzinoms. Das iCCA bezeichnet die kleinen Gallengänge innerhalb der Leber. Tumore an der Hepatikusgabel werden als pCCA zusammengefasst und Tumore kaudal der Einmündung des Ductus cysticus fallen in die Kategorie dCCA. Die pCCA und die dCCA werden als eCCA zusammengefasst [4].

1.1.2 Epidemiologie Deutschland

In Deutschland wurden im Jahr 2018 etwa 5080 neue Fälle mit einem eCCA und der Gallenblase registriert [5]. Hinzu kommen etwa 2000 Patienten mit einem iCCA, die aufgrund der ICD-Kodierung als primär maligne Lebertumore erfasst werden [2]. Somit liegt die Gesamtinzidenz in Deutschland bei mehr als 7000 Neuerkrankungen pro Jahr. Hinter dem hepatozellulären Karzinom bildet das CCA die zweitgrößte Gruppe der malignen Lebererkrankungen und ist für 10% aller primären Leberkarzinome verantwortlich [6]. Diese Erkrankung hat eine schlechte Prognose, denn die relative 10-Jahres Überlebensrate beträgt bei den Frauen und Männern jeweils 17 % (Abb. 2). Die Ursache liegt in dem fortgeschrittenem Tumorstadium bei der Entdeckung des Karzinoms. 68 % der Frauen und 65 % der Männer haben bei Erstdiagnose bereits ein nach der *Union for International Cancer Control* (UICC) klassifiziertes Stadium III oder IV [5]. 2019 betrug das mittlere Sterbealter der Frauen in Deutschland bei 79 Jahren

und für die Männer bei 76 Jahren [5]. Es handelt sich folglich um ein sehr aggressives Karzinom, woran vor allem die älteren Menschen erkranken.

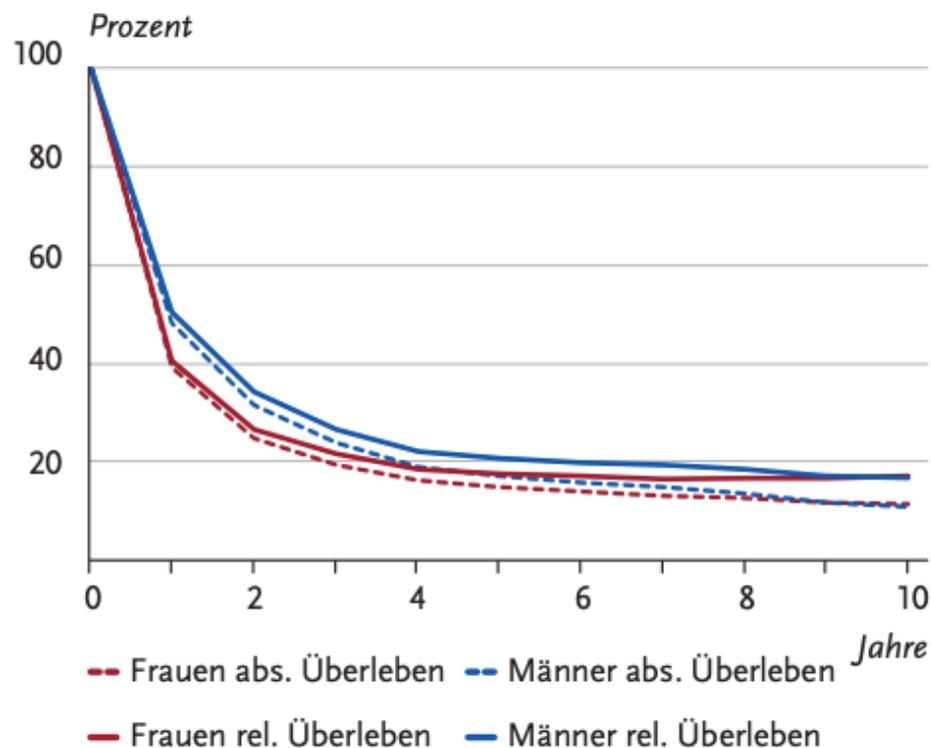


Abb. 2: Absolute und relative Überlebensrate bis 10 Jahre nach Erstdiagnose, nach Geschlecht, ICD-10 C23-24, Deutschland 2017-2018. Auf der x-Achse sind die Jahre und auf der y-Achse das Überleben in Prozent abgebildet. Die rote durchgezogene Linie stellt das absolute Überleben der Frauen und die blaue durchgezogene Linie das absolute Überleben der Männer dar. Die rote unterbrochene Linie visualisiert das relative Überleben der Frauen, wohingegen die blaue unterbrochene Linie das relative Überleben der Männer anzeigt [5].

1.1.3 Risikofaktoren

Zu den Risikofaktoren zählen vor allem Vorerkrankungen am Gallengangsystem. Hierbei zeigt sich, dass Patienten mit einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) das höchste Risiko tragen. Sie haben ein 400-fach erhöhtes Risiko gegenüber der Normalbevölkerung an einem CCA zu erkranken [6]. Bei 13,7 % der PSC-Patienten treten Gallenblasenpolypen auf, die mit zunehmender Größe das Risiko für ein Gallenblasenkarzinom steigern [2].

Weitere Risikofaktoren sind Erkrankungen der Leber. Hier zu nennen sind die Hepatitis B und C, sowie die Leberzirrhose [6]. Noxen, wie das 1.2-Dichloropropan, das in der Druckindustrie verwendet wird, oder auch Asbest, Nikotin- und Alkoholkonsum zählen zu den Risikofaktoren für ein CCA [6]. Stoffwechselerkrankungen, wie ein Diabetes mellitus Typ II oder Adipositas werden genauso mit einem CCA in Verbindung gebracht [6]. Auch genetische Polymorphismen [6] und unterschiedliche regionale Risikofaktoren, wie zum Beispiel der parasitäre Befall der Leber in Thailand [7] oder die gehäufte Bildung von Lebersteinen in Korea [6] spielen eine Rolle bei der Entwicklung eines CCAs.

Trotz dieser heterogenen Sammlung an Risikofaktoren werden fast 50 % der Diagnosen mit einem CCA in den westlichen Industrienationen ohne einen dieser genannten Risikofaktoren gestellt [6].

1.1.4 Früherkennung und prophylaktische Maßnahmen

Für die asymptomatische deutsche Bevölkerung sind keine Früherkennungsmaßnahmen aufgrund der niedrigen Inzidenz etabliert [2]. Lediglich bei Patienten mit einer bekannten PSC soll eine Bildgebung und eine Tumormarkerbestimmung mit CA 19-9 alle 6 Monate durchgeführt werden [2, 8]. Als Bildgebung soll eine Abdomensonographie im Wechsel mit einer nativen Magnetresonanztomographie (MRT) inklusive einer Magnetresonanzcholangiopankreatikographie (MRCP) erfolgen. Hierbei kann eine Sensitivität von 89 % und eine Spezifität von 75 % erreicht werden [2]. Bei Patienten ohne Risikofaktor für ein Gallenblasenkarzinom mit Nachweis eines Gallenblasenpolypen von < 9 mm sollte eine sonographische Kontrolle in sechs Monaten erfolgen. Sollte der Polyp < 6 mm sein, reicht eine sonographische Kontrolle in zwölf Monaten [2]. Bei Gallenblasenpolypen \geq 10 mm sollte unabhängig von der Symptomatik eine Cholezystektomie angeboten werden [2].

1.1.5 Therapie

Der einzig kurative Ansatz besteht in der kompletten Resektion (R0) des Karzinoms. Aufgrund des hohen Rezidivrisikos von 40-80 % sollte den Patienten nach chirurgischer Tumorentfernung (R0, R1) eine adjuvante Chemotherapie mit Capecitabin angeboten werden [2]. Bei grenzwertig operablen Tumoren kann eine neoadjuvante Chemotherapie erwogen werden [2]. Bei weiterhin lokal fortgeschrittenem inoperablem iCCA nach neoadjuvanter Chemotherapie ohne Tumorprogression kann eine Lebertransplantation durchgeführt werden. Hierbei beträgt die Gesamtüberlebensrate nach fünf Jahren 83 % [2]. Auch beim irresektablen, nichtmetastasierten pCCA, welches die Mayo-Kriterien (Tabelle 1) erfüllt, kann eine Lebertransplantation unter Studienbedingungen erwogen werden. Die Fünfjahres-Gesamtüberlebensrate beträgt hierbei zwischen 50 % und 80 % [2]. Für alle Patienten im metastasierten Stadium oder Patienten, welche die Kriterien einer Lebertransplantation nicht erfüllen, bleibt nur ein palliatives Konzept. Dieses besteht aus einer palliativen Chemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin [2].

Tabelle 1: Mayo-Kriterien. In der Tabelle sind die Kriterien für eine Lebertransplantation bei einem irresektablen pCCA dargestellt [2].

Mayo-Kriterien
Irresektables pCCA oder pCCA in PSC-Zirrhose
Tumor-Durchmesser < 3 cm
keine LK-Metastasen (obligate chirurgische Exploration)
keine extrahepatische Tumormanifestation
histologisch/zytologisch bestätigtes pCCA oder CA19-9 > 1000 kU/L mit Vorliegen radiologischer Zeichen einer malignen Stenose

1.1.6 TNM-Klassifikation, UICC-Stadien, ICD-10

Die *Tumor-Nodes-Metastasis* (TNM)-Klassifikation dient dazu, das Stadium eines Karzinoms zu beschreiben. Sie liefert Informationen über die Größe und Eindringtiefe

(T-Kategorie), über den Befall von lokalen Lymphknotenmetastasen (L-Kategorie) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Kategorie). Anhand des TNM-Status werden von der UICC klinische Stadien von I bis IV zur internationalen Vergleichbarkeit und Therapieplanung vergeben.

Nach der 10. Revision der *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD-10) wurden in dieser Arbeit Patienten mit einem intrahepatischem Gallengangskarzinom (C22.1), einer bösartigen Neubildung der Gallenblase (C23), einer bösartigen Neubildung des extrahepatischen Gallengangs (C24.0) und einer bösartigen Neubildung der Ampulla Vateri (C24.1) untersucht. Jeder dieser Codes hat eine eigene TNM-Klassifikation mit UICC-Stadieneinteilung. Diese kann in der TNM-Klassifikation der 8. Auflage nachgelesen werden.

1.2 Pathogenese des Cholangiokarzinoms

Ist man früher noch davon ausgegangen, dass sich das CCA ausschließlich aus den Cholangiozyten entwickelt [9], weisen neuere Studien darauf hin, dass der Ursprung des CCA von mehreren Zelllinien ausgehen könnte [10]. Diskutiert werden die hepatischen Progenitorzellen, die Hepatozyten, die peribiliären Drüsen und die Cholangiozyten (Abb. 3). Ein Teil der CCAs entsteht nach chronischen Entzündungen, mechanischer Verletzung und Cholestase. Diese Bedingungen führen zur proinflammatorischen Zytokinausschüttung mit Aktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies, Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und zur Persistenz von toxischen Gallensäuren. In diesem Milieu werden Mutationen und weitere Zellproliferation begünstigt [10, 11].

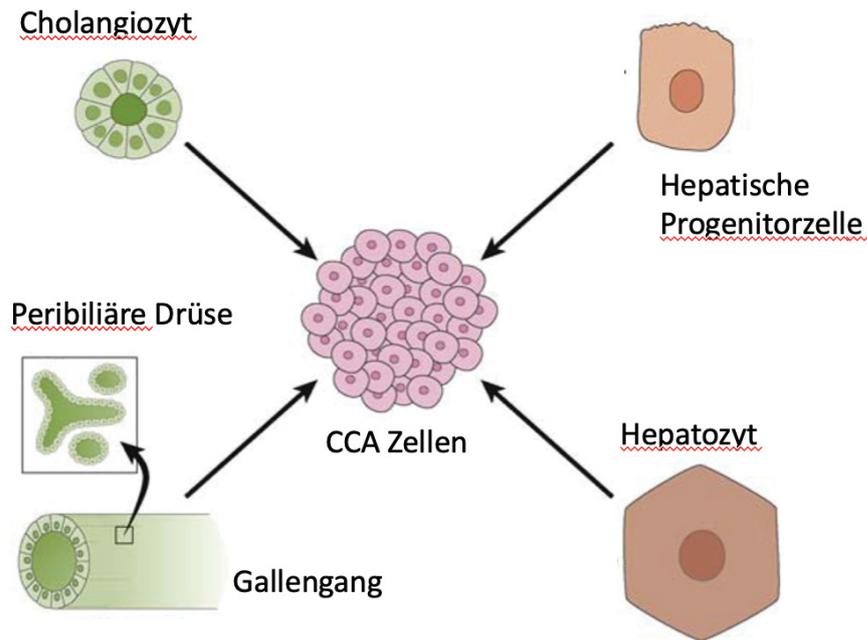


Abb.3: Ursprungszellen für CCA. Dargestellt sind die vier diskutierten verschiedenen Ursprünge von CCA-Zellen. Es handelt sich um den Cholangiozyten, die hepatische Progenitorzelle, die peribiliäre Drüse und den Hepatozyten [3].

1.2.1 Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)

Die EMT ist ein Zellprogramm, mit dessen Hilfe epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften erlangen. Diese Zellen sind in der Lage, durch Änderung der Polarität und Auflösung der Adhäsionsmoleküle sich aus dem Zellverband zu lösen. Phänotypisch bilden diese Zellen Ausläufer aus, womit sie Migrationseigenschaften erlangen. Am Zielort angekommen, erfolgt eine Rückprogrammierung, die sogenannte Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET), nach der die Zelle ihre finale Funktion ausübt. Dieses Zellprogramm kommt physiologisch in der Embryonalentwicklung und in der Wundheilung vor [12].

Zusätzlich spielt es in der Tumorprogression eine große Rolle. Das Modell der EMT ist ein Erklärungsansatz, wie Metastasen entstehen [13]. Es ist bekannt, dass die eingangs unter 1.2 erwähnte Veränderung der Zellumgebung zur pathologischen Aktivierung der EMT führen [14]. So aktivierte Zellen vom Primärtumor erhalten Anschluss zum Lymph- und Blutkreislaufsystem. Die zirkulierenden Tumorzellen

(CTCs) siedeln sich dann in den Lymphknoten und im Knochenmark an und werden von da an weiter als DTCs bezeichnet. Die DTCs haben letztendlich das Potential, Metastasen zu bilden [15] (Abb. 4).

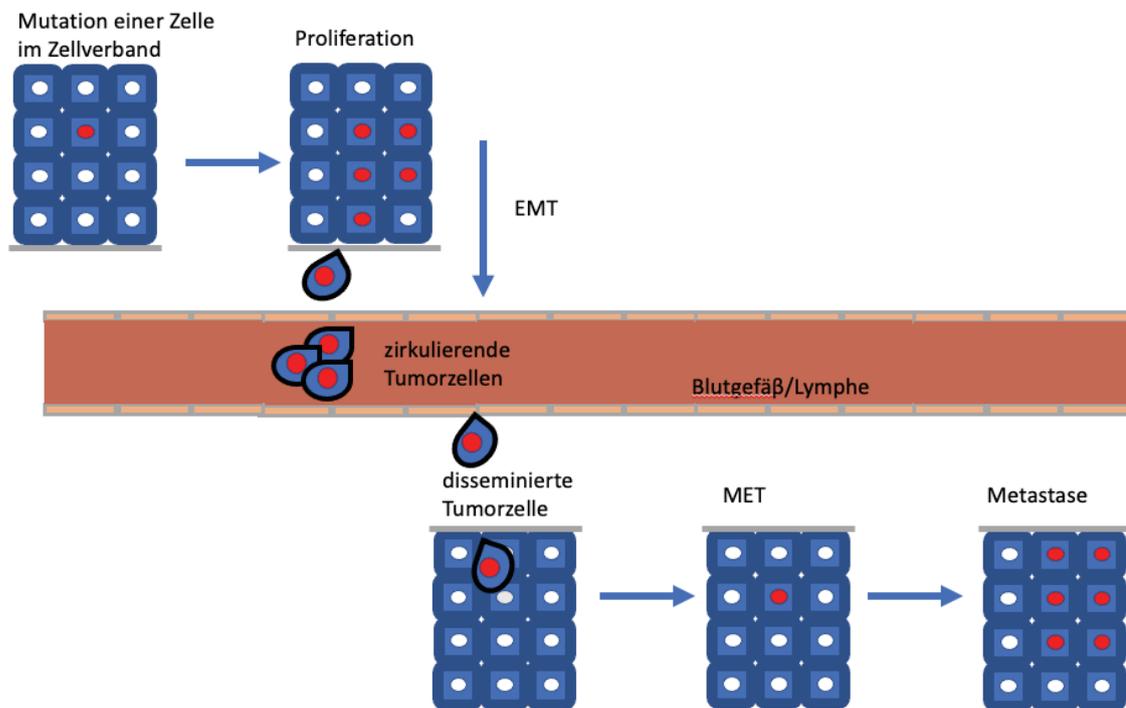


Abb. 4: Verlauf der Metastasierung: Eine Zelle mutiert in einem Zellverband und vermehrt sich. Durch die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) gelangen die mutierten Zellen in die Blutgefäße oder in die Lymphe und werden dort als zirkulierende Tumorzellen bezeichnet. Beim Austritt aus dem Gefäßsystem wandern diese Zellen in den Zellverband ein und werden als disseminierte Tumorzellen deklariert. Nach der Mesenchymalen-Epithelialen-Transition (MET) können diese Zellen Metastasen ausbilden.

1.2.2 Heterogenität

Es konnte gezeigt werden, dass sich die DNA-Profile der DTCs verschiedener Tumorentitäten von ihren jeweiligen Primärtumoren unterscheiden [16]. Es bleibt die Frage, wie man dieses Ergebnis bewertet. Im Allgemeinen gibt es zwei Modelle, die die Tumorprogression erklären [16]:

1.2.2.1 Lineare Progression

Das erste Modell beschreibt eine lineare Progression. Hier wird die fertig ausgebildete maligne Zelle vom Primärtumor abgespalten und in die Peripherie gestreut. Nach Adaptation an die neue Umgebung bildet diese Zelle ohne weitere Mutationen eine Metastase. Nach dieser Theorie müssten sich die DNA-Profile von DTC und Primärtumor ähnlich sein.

1.2.2.2 Parallele Progression

Das zweite Modell beschreibt die parallele Progression. Dieser Ansatz basiert darauf, dass unausgereifte maligne Zellen sich früh vom Primärtumor trennen und erst in der Peripherie nach zahlreichen Mutationen eine Metastase bilden. In diesem Fall würden sich die DNA-Profile von DTC und Primärtumor unterscheiden [17].

1.3 Analyse von disseminierten Tumorzellen

1.3.1 Charakteristika von disseminierten Tumorzellen

Der A45-B/B3 Antikörper ist ein monoklonaler Panzytokeratinantikörper und reagiert mit allen Zellen, die die Epitope von Cytokeratine 8, 18 und 19 exprimieren (Epithelien und Mesothelien). Diese Eigenschaft wird genutzt, um zwischen Tumoren epithelialen und mesenchymalen Ursprungs zu unterscheiden [18].

Cytokeratin 7 ist ein guter Marker, um extrahepatische und intrahepatische Gallengangskarzinome zu detektieren [19]. Zusätzlich kann die Expression von Cytokeratin 7 dazu verwendet werden, um zwischen einem intrahepatischem Cholangiokarzinom und einem hepatischen Karzinom zu unterscheiden. Letzteres zeigt keine Cytokeratin 7 Expression [20].

Zellkulturexperimenten konnten zeigen, dass DTCs im Knochenmark ein zeitlich limitiertes proliferatives Potential haben. Dieser Zustand wird auch „*dormancy*“

genannt. Hierbei exprimieren nur wenige Tumorzellen die Proliferationsmarker Ki-67 und p120, was als Beweis für den „Ruhezustand“ gilt [21, 22]. Pantel K et al kultivierten die DTCs aus dem Knochenmark und etablierten neue Zelllinien [23].

In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass CK positive Zellen aus einem histopathologisch tumorfreien Lymphknoten von Ösophaguskarzinom-Patienten metastatisches Potential haben. Nach Identifizierung mit monoklonalen Antikörpern und Etablierung einer Zelllinie wurden diese Zellen subkutan in immunsupprimierte Mäuse gespritzt. Das Ergebnis war die Ausbildung von lokalen Tumoren und auch von Fernmetastasen in der Maus [24, 25].

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die CK positiven Zellen in Lymphknoten und im Knochenmark verweilen und unter bestimmten Bedingungen zur Streuung des Primärtumors führen.

1.3.2 Anforderung der immunhistochemischen Färbung

Es wurde eine Färbung etabliert, mit der Voraussetzung Zellen epithelialen Ursprungs und mit cholangiozellulären Antigenen zu identifizieren. Eine Visualisierung der Zellkerne stellte die Unversehrtheit der ganzen Zelle sicher. Dabei wurden die Fluorochrome so gewählt, dass es keine Interferenzen in den Wellenlängenbereichen gab. Zusätzlich waren die Antikörper von unterschiedlichen Ursprüngen, damit es nicht zu Kreuzreaktionen kam. Jede Färbung hatte Kontrollen, um unspezifische Bindungen auszuschließen und korrekte Bindungen nachzuweisen. Mit diesem hohen Anforderungsprofil entstand die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung. Details zu dieser Färbung sind im Methodenteil dieser Arbeit zu finden.

1.3.3 Prinzip der Einzelzell-CGH

Die Grundlagen der Einzelzell-CGH [26] basieren auf der Analyse von genomischer DNA aus mehreren Zellen mit Hilfe der „klassischen“ CGH [27, 28]. Die Amplifikation

der DNA einer einzelnen Zelle geschieht nach Ligation von Adaptoren, welche als Template für die spezifischen Primer dienen (Abb. 5).

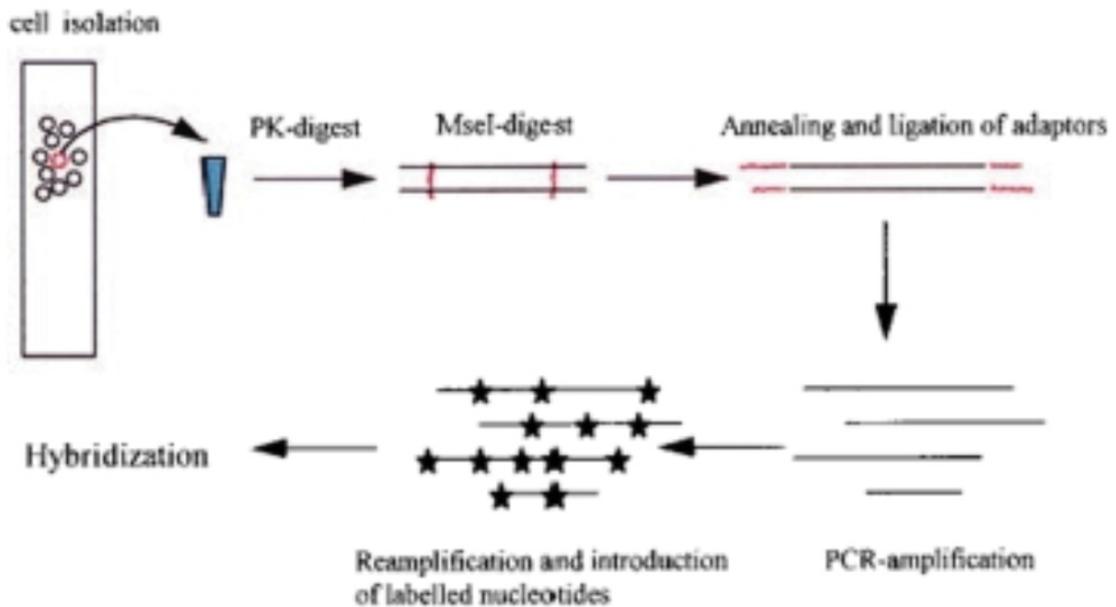


Abb. 5: Schematische Darstellung der Einzelzell-CGH. Zu sehen ist die Reihenfolge von der Zellisolation über den Proteinnase-K-Verdau, dem MseI-Verdau, dem *Annealing* und der Ligation der Adapter, der Vermehrung durch die Polymerasenkettenreaktion, der Reamplifikation und das *Labeln* der Nucleotide bis hin zur Hybridisation [26].

Die Abbildung 5 zeigt, wie die Proteine der Einzelzelle zuerst durch die Proteinase K verdaut werden. Hierbei wird die Zellmembran aufgelöst und die Proteine des Zytoplasmas gespalten. Dadurch werden die Nucleinsäuren des Zellkerns freigelegt.

Durch das Restriktionsenzym MseI wird die DNA in Fragmente geschnitten, um eine optimale Länge für die später stattfindende Hybridisierung der DNA zu erhalten. Hierbei schneidet das Restriktionsenzym MseI die Sequenz TTAA nach dem ersten Thymin mit einem überhängenden Ende.

Im nächsten Schritt erfolgt die Ligation der spezifischen Primer. Dazu wird der Primer LIB1 an das 3`-Ende ligiert und der Primer ddMSE11 an das 5`-Ende der DNA. Die Vermehrung des Genoms erfolgt mit der primären PCR.

Danach erfolgt die Kontrolle mittels einer Multiplex-PCR. Hierbei werden Primer-Paare für unterschiedliche Genabschnitte von verschiedenen Chromosomen eingesetzt, um das komplette Genom zu repräsentieren (Tabelle 2). Dabei wandern die PCR-Produkte aus der Multiplex-PCR im elektrischen Feld auf einem Agarosegel. Durch die unterschiedlichen Größen der PCR-Produkte kann differenziert werden, welche Exons erfolgreich amplifiziert wurden. Je mehr Genomabschnitte nachweisbar sind, desto höher ist Qualität der genomischen DNA [29]. In dieser Arbeit wurden die Proben weiterverarbeitet, die mindestens drei Banden aufwiesen.

Tabelle 2: Lokalisierung, Sequenz und Produktgröße der Primer-Paare der Multiplex-PCR [29]

Primer Paar	Gen	Chromosom	Richtung	Sequenz	Produktgröße
1	LAMC1	1q	FWD	tctgctttgggcattctct	111
1	LAMC1		REV	ttctaacaggttgggggatg	
2	CADPS	3p	FWD	ccccacccttctcactaca	175
2	CADPS		REV	gtgtgcacataccaccgaag	
3	GRIK5	19q	FWD	ctagctcccaccaacctcag	232
3	GRIK5		REV	ctcgtgatcccgttgatct	
4	NEK9	14q	FWD	gcaggagggaacctgtatga	288
4	NEK9		REV	caggaaagaaagcccacaga	
5	PICK1	22q	FWD	tcgtatgctggagtctgtg	358
5	PICK1		REV	gggatggctttgttgagta	
6	DNAH9	17p	FWD	gggtctcatcaccagcattt	401
6	DNAH9		REV	gccatctccacatggtctt	

Nach erfolgter Kontrolle wird eine weitere PCR durchgeführt. Hierbei werden die Fluorochrome Cy3 (Referenz) und Cy5 (Probe) in die DNA eingebaut. Dies geschieht mit der markierten Base Uracil, die entweder den Farbstoff Cy3 oder Cy5 trägt. Danach erfolgt die Hybridisierung auf dem *Microarray*.

1.3.4 Prinzip der *Microarray*-CGH

Die Auswertung der markierten DNA der Einzelzell-CGH erfolgt analog zur „klassischen“ CGH.

Es handelt sich um eine Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und digitaler Bildanalyse mittels einer Software.

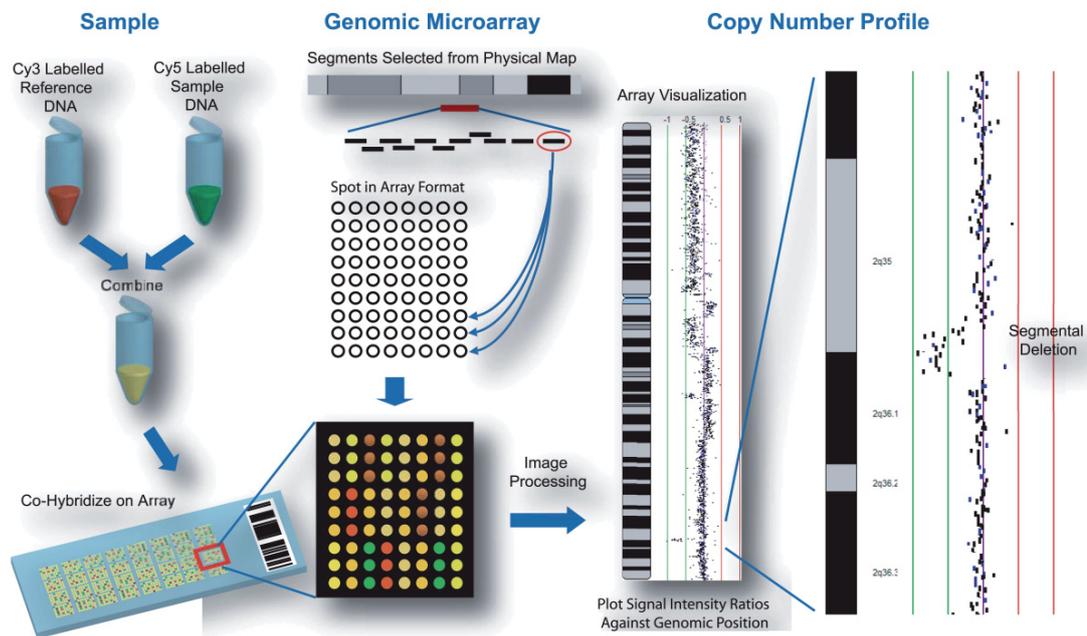


Abb. 6: Schema vergleichende genomische Hybridisierung. Die Proben- und Referenz-DNA werden vermengt und auf einen Array-Objekträger hybridisiert. Mit einem Photometer werden die unterschiedlichen Signalstärken detektiert und mit einer Software ausgewertet. Diese erstellt aCGH-Profile, womit chromosomale Aberrationen festgestellt werden können [30].

Die obere Abbildung zeigt, wie die markierte Referenz- und Proben-DNA auf die normalen Metaphasenchromosomen hybridisiert werden. Durch eine vergleichende Analyse der Emissionen von den unterschiedlichen Fluorochrome entlang der Chromosomenachse können chromosomale Aberrationen identifiziert werden. Die Länge der normalen Chromosomenmetaphasen beträgt 180 kb. Damit können in der

Krebsforschung sogenannte „*hot spots*“ identifizieren werden, die zum Beispiel, für die Analyse von Progression und klonaler Evolution der Tumoren entscheidend beitragen.

1.4 Ziele der Arbeit

Zusammengefasst handelt es sich beim Cholangiokarzinom um einen sehr aggressiven Tumor, der häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Neue Methoden zur Früherkennung könnten das Überleben dieser Patienten maßgeblich verbessern. Hier setzt die Forschung dieser Arbeit an.

Die Zielsetzung der Arbeit ist, die DTCs aus Lymphknoten- und Knochenmarksproben von Patienten, die an einem Cholangiokarzinom erkrankt sind, anhand einer geeigneten immunhistochemischen Färbung zu identifizieren.

In einem zweiten Schritt erfolgt die Genanalyse der DTCs. Dabei werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Gelingt eine reproduzierbare immunhistochemische Färbung zur Identifizierung der DTCs?
- Welchen prognostischen Wert haben die DTCs auf das Überleben?
- Gibt es Amplifikationen oder Deletionen auf den Chromosomen der DTCs?
- Gibt es Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Genanalysen von DTCs aus den Knochenmarks- und Lymphknotenproben?
- Gibt es eine Korrelation der Ergebnisse der Genanalysen der DTCs aus Knochenmarks- und Lymphknotenproben mit der Progenetix-Datenbank?
- Welches Modell der Heterogenität unterstützen die Ergebnisse der DNA-Profile der DTCs?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

A45 B/B3 *Mouse* Pancytokeratin Cy3 direkt markiert, 1 mg/mL (Micromet, designed)

AB-Serum (Biotest, 805135)

Acetonitrile (Sigma, 271004-1l)

Agarose (Sigma, A9539)

Anti-Cytokeratin 7 *antibody, rabbit* (abcam, ab68459)

Anti-Mouse-AlexaFluor 488, 2000 µg/mL (Invitrogen, A11029)

Anti-Rabbit-AlexaFluor 555, 2000 µg/mL (Invitrogen, A21430)

ATP (Roche, 11140965001)

BSA (Promega, R3961)

Buffer C, 10x (Promega, R001A)

CK 19 Primer for (MWG, GAA GAT CCG CGA CTG GTA C)

CK 19 Primer rev (MWG, TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG)

ddMSE11 (MWG 5´TAACTGACAGCdd-3´)

dNTPs (GE Healthcare, illustra dNTP Set, 28-4065-52)

DMSO (Sigma-Aldrich, 67-68-5)

DPBS (Gibco, 14190-169)

DPBS 10x ohne Magnesium und Calcium (Gibco, 14200-083)

Dream Taq Green PCR Master Mix (Fermentas, K1082)

Expand Long Template PCR System (Roche, 11681842001)

FCS (Sigma-Aldrich, F6765-100 ml)

Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, 17-1440-03)

GelRed (Biotium, 41003)

Gene Ruler, 50 bp Ladder (Fermentas, SM0373)

Gene Ruler, 100 bp Ladder (Fermentas, SM0428)

Hanks-Lösung (Biochrom AG, L2045)

Hoechst33342, 10 mg/mL (Invitrogen, H3570)

Igepal CA-630 (Sigma, 18896)

LIB1 (MWG 5'-AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT-3')

Mopc21, *Mouse* Isotype (Sigma, M9269)

Mse I hc (NEB, R0525M)

Nukleasefreies Wasser (Gibco, 10977015)

One Phor All Buffer

- Tris-Acetat, 12,5 g (Fluka, 93337)
- Magnesium-Acetat, 50 mL (Fluka 63052)
- Kalium-Acetat, 50 ml (Fluka, 95843)
- 500 ml destilliertes Wasser

p53 2/3 Primer 3' (MWG, CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA)

p53 2/3 Primer 5' (MWG, GAA GTG TCT CAT GCT GGA TC)

Paraformaldehyd (Merck, 8.18715.0100)

Primer Mix:

- LAMC1 (111 bp), *Forward:* TCTGCTTTGGGCATTCTT; *Reverse:* CATCCCCAACCTGTTAGAA
- CADPS (175 bp), *Forward:* CCCACCCCTTCTTCACTACA; *Reverse:* CTTCGGTGGTATGTGCACAC
- GRIK5 (252 bp), *Forward:* CTAGCTCCCACCAACCTCAG; *Reverse:* AGATCAACGGGATCATCGAG
- NEK 9 (288 bp), *Forward:* GCAGGAGGGAACCTGTATGA; *Reverse:* TCTGTGGGCTTTCTTTCTG
- PIK1 (358 bp), *Forward:* TCGTATGCTGGAGTCCTGTG; *Reverse:* TACCTCAACAAAGCCATCCC
- DNAH9 (401 bp), *Forward:* GGGTCTCATCACCACCAGCATTT; *Reverse:* AAGACCATGTGGAAGATGGC

Proteinase K (Roche, 03115828001)

Rabbit Isotype, 20 mg/mL (Dako, X0903)

RPMI + Glutamax (Gibco, 61870044)

Stabilization and Drying Solution (Agilent, 5185-5979)

Sure Print 4x180k aCGH Bundle (Agilent, 65922A)

T4 DNA Ligase *high concentrated* (Roche, 10799009001)

TE *Buffer* (Promega, V6231)

Tris-Borat-EDTA-Puffer (Sigma, T4415)

Triton X-100-Lyse-Puffer (thermo scientific, J62289.AP)

Trypanblau 0,4 % in 0.9 % NaCl (Gibco, 1520-061)

Trypsin-EDTA 0,05 % (Gibco, 25300054)

Türk Lösung (Onprax Medical, L42092)

Tween-20 (Sigma, P9416)

2.1.2 Geräte und Materialien

CellTram Air (eppendorf)

Durchlichtmikroskop (Leica, 8407003)

Einmal-Petrischale (Winlab, 763144IN)

Einwegskalpelle Nr. 10, steril (TWV-Grund, 71330850)

Elektrophorese-Kammer VARIA (Roth)

Färbekasten nach Hellendahl (Duran, DU233140001)

Fluoreszenzmikroskop (Leica)

Haftobjektträger (thermo scientific, XMZ-252B-AD-CE24)

Hybridization Chamber Kit- SureHyn enabled, stainless (Agilent, G2534A)

Infinite 200 PRO NanoQuant Microplate

Kühlzentrifuge (Hettich, Universal 30 RF Typ 1402)

Hettich Zubehör:

- Ausschwingrotor Nr. 1624
- Zyto-Hygienebecher Nr. 1660
- Zyto-Spannplatte Nr. 1470
- Zyto-Kammer mit Dichtung Nr. 1475
- Leichtmetall Nutgehänge Nr. 1381

- Einsatz 15 ml Zentrifugenröhrchen Nr. 1347
- Einsatz 50 ml Zentrifugenröhrchen Nr. 1384
- Rotor Nr. 1424A

Laborkühlschrank für 4°C (Liebherr, Mediline Lkexv 3600)

Labortiefkühlschrank für -20°C (Liebherr, Mediline Lgex 3410)

Labortiefkühlschrank für -80°C (GRAM-BioLine, GRUL570L)

Magnetrührer (Heidolph, MR 3001 K)

Medicons (Dako, 79400)

Medimachine System Automated (Dako, BZ10124085)

Microarray Scanner (Agilent, G2565AA)

Mikro-Haematokrit-Kapillare (VWR, 521-9100)

Neubauerzählkammer (Marienfeld, X89516.68)

Objekträger (ISO 8037)

Ozon-Barrier Slide Cover (Agilent, G2505-60550)

PCR-Cycler (Bio-Rad, T100 PCR)

PCR Gefäße 0,2 mL (Eppendorf, 0030 124.332)

Pinzette abgerundet, 12 cm, sterilisiert (BAEHR PODOLINE, 71332442)

Pipette *Research plus G*, 3-Pack, Option 2, 2-20 µL / 20-200 µL / 100-1000 µl, inklusive epT.I.P.S-Boxen (Eppendorf, 3123000918)

Pipettor (Eppendorf, 4430000026)

Power Supply (PeakTech, P 6205)

Puller (Mikroschmiede, P97)

Safe Lock Tubes, 1,5 mL (eppendorf, VB-0306)

Safe Lock Tubes, 0,5 mL, braun (eppendorf, EP0030121155)

Sicherheitswerkbank, Klasse II, MSC-Advantage (Thermo Scientific)

Slide Holder (Agilent, G2505-60525)

Stripetten, steril, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (Corning Costar, CLS4487, CLS4488, CLS4489, CLS4490)

TransferMan (eppendorf, NK 2)

VersaDoc MP 5000 (Bio-Rad)

Wärmeschrank (Mettler, 38146)

Wasserbad (memmert, WNE 45)

Zellkulturflaschen, steril, 250 ml, 25 ml (greiner bio-one, GB658175, GB690175)

Zellsieb 70 µm (BD Falcon, 352350)

Zentrifugenröhrchen, steril, 15 ml, 50 ml (greiner bio-one, GB188261-N, GB227270)

2.1.3 Zellkultur

HELA-410 (DSMZ, ACC 57)

2.1.4 Software

Feature Extraction Protocol (Version 10.7.3.1)

Genomic Workbench (Agilent Technologies, Version 5.0.14)

Progenetix (www.progenetix.org)

SPSS Statistics (IBM, Version 22.0)

2.2 Patienten und Gewebeproben

Insgesamt standen 88 Knochenmarks- und 7 Lymphknoten-Proben von 88 CCA-Patienten zur Verfügung. Die Patienten wurden zwischen 2006 und 2016 an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf und Dresden operiert. Einschlusskriterium war die eindeutige Diagnose eines CCA durch einen Facharzt der Pathologie. Die *Follow-up* Daten und klinische Parameter wurden aus den Patientenakten erhoben. Hinzu kamen die Ergebnisse aus den Experimenten. Die Tabelle 3 zeigt die relevanten Auswertungsparameter.

Tabelle 3: Klinische Parameter dieser Studie

Klinische Parameter der ausgewählten Patienten

Alter: <69 versus ≥ 69

Geschlecht: männlich versus weiblich

T-Kategorie: pT1-2 versus pT3-4

N-Kategorie: pN0 versus pN1-3

M-Kategorie: M0 versus M1

Grading: G1-2 versus G3-4

Residualtumor: R0 versus R1

UICC: I-II versus III-IV

KM-DTC negativ versus KM-DTC positiv

LK-DTC negativ versus LK-DTC positiv

DTC negativ versus DTC positiv

CK7 negativ versus CK7 positiv

A45-B/B3 negativ versus A45/B3 positiv

A45-B/B3 oder CK7 negativ versus A45-B/B3 und CK7 positiv

2.3 Aktenzeichen des Ethikvotums

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vergab im Rahmen ihrer ethischen und rechtlichen Beratung ihr positives Ethikvotum für diese Studie mit dem Aktenzeichen 2316.

2.4 Patientenproben

2.4.1 Lymphknotenaufbereitung

Die Zielsetzung war es, die LK soweit aufzuarbeiten, dass die DTCs aus dem Zellverband gelöst und separat auf einem Haftobjektträger zum Liegen kamen.

Dabei wurden die LK von einem Patienten in eine Petrischale gelegt. Danach erfolgte mit einem Skalpell und einer Pinzette die Zerkleinerung der LK und die Entfernung von überschüssigem Gewebe.

Die vorbereiteten LK wurden in ein Medicon gegeben und mit 1 mL DPBS aufgefüllt. Das verschlossene Medicon mit der Patientenprobe wurde für 30 sec mit Hilfe der Medimaschine geschreddert, um die LK-Zellen aus ihrem Zellverband zu lösen. Im Anschluss erfolgte der Transfer der entstandenen Zellsuspension mit einer 1-mL-Pipettenspitze vom Medicon in ein 50-mL-Zentrifugenröhrchen. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis kein Gewebe mehr im Medicon vorhanden war.

Anschließend wurde die Zellsuspension auf 10 mL mit DPBS aufgefüllt und durch ein 70- μ m-Zellsieb filtriert, um überschüssiges Gewebe zu entfernen. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 300 G für 10 min. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in DPBS resuspendiert.

Davon wurden 10 μ L entnommen und mit 90 μ L Türks-Lösung gemischt. Die anschließende Inkubationszeit betrug 5 min bei Raumtemperatur. Die in der Türk-Lösung enthaltene Essigsäure hämolysierte die Erythrozyten und färbte die Leukozytenkerne mit Gentianaviolett an, wodurch sie besser sichtbar wurden.

Daraufhin erfolgte die Auszählung in der Neubauer Zählkammer unter dem Durchlichtmikroskop. Die Gesamtzellzahl wurde durch folgende Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times 10}{4} \times 1000$$

Die ursprüngliche Zellsuspension wurde auf 500 000 Zellen / mL mit DPBS eingestellt. Davon wurden 333 µL jeweils auf einen der drei Slots eines Haftobjektträgers pipettiert. Zusätzlich wurden 1 000 000 Zellen in insgesamt zwei Slots eines *Cytospins* pipettiert und bei 300 G für 3 min zentrifugiert. Der Überstand der *Cytospins* wurde abpipettiert und verworfen.

Bei den Haftobjektträgern sedimentierten die Zellen nach 30 min auf den Boden und der Überstand konnte abgegossen werden. Die Haftobjektträger und die *Cytospins* wurden bei Raumtemperatur getrocknet und daraufhin bei -20°C zur Lagerung eingefroren. Die *Cytospins* wurden angefertigt, um als spätere Kontrolle zu dienen.

2.4.2 Knochenmarksaufbereitung

Die Zielsetzung war es, die Knochenmarksproben der Patienten soweit aufzuarbeiten, dass die DTCs aus dem dickflüssigen Knochenmark separat auf einem Haftobjektträger zum Liegen kamen.

Dafür wurden 10 mL Knochenmark von einem Patienten in ein 50-mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert.

Anschließend erfolgte das Hinzufügen der Hanks-Lösung im Verhältnis 1:2. Die Hanks-Lösung ist ein Puffer, der ein biologisches Medium nachahmt und die Zellen stabilisiert.

Daraufhin wurde die Probe mit 170 G für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Stripette bis zum Zellpellet abpipettiert und verworfen.

Das Zellpellet konnte daraufhin in 30 mL DPBS gelöst und über ein 70- μ m-Zellsieb filtriert werden, um größere Gewebereste zu entfernen.

Anschließend wurde in einem neuen 50-mL-Zentrifugenröhrchen 15 mL Ficoll-Lösung vorgelegt und mit der gereinigten Zellsuspension vorsichtig überschichtet, so dass zwei Phasen entstanden. Daraufhin erfolgte die erneute Zentrifugation mit 550 G für 30 min. Die Ficoll-Lösung ist ein hochverzweigtes Saccharose-Polymer, das einen Dichtegradienten erzeugt. Nach der Zentrifugation entstand eine Interphase mit mononukleären Zellen, worunter auch die DTCs zu finden sind.

Diese Interphase wurde vorsichtig abpipettiert und in 20 mL DPBS in einem frischem 50-mL-Zentrifugenröhrchen resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 356 G für 6 min, um die Zellen zu waschen. Der Überstand wurde abgegossen und erneut in DPBS resuspendiert.

Ab hier erfolgten die Zellzählung und die weiteren Schritte analog zur Lymphknotenaufbereitung.

2.5 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung CK 7 / A45-B/B3 / Hoechst

Pro Patienten wurden 1 000 000 Zellen untersucht. Als Positiv-Kontrolle dienten die HELA-Zellen aus der Zellkultur. Für die Negativ-Kontrolle dienten die *Cytospin*-Objektträger vom Patienten und die entsprechenden Isotypen-Antikörper. Die Außenbereiche der *Cytospin*-Objektträger wurden mit einem Fettstift markiert, um ein Auslaufen der Reagenzien zu vermeiden.

Der erste Schritt bestand darin, 333 μ L 20% AB-Serum/DPBS auf alle Proben zu pipettieren. Das AB-Serum diente zum Blockieren von nicht spezifischen hydrophoben Seitenketten der Patientenproben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde das AB-Serum von den Objektträgern abgegossen.

Das primäre Antikörpergemisch bestand aus dem CK 7 Antikörper in einem Verhältnis von 1:100. Der Pancytokeratin-Antikörper A45-B/B3 wurde 1:500 verdünnt. Als Verdünnungsmedium diente ein 10% AB-Serum/DPBS Gemisch. Der CK 7 Antikörper stammte aus einem Hasen und war direkt markiert mit einem Cy3 Farbstoff. Der Pancytokeratin Antikörper A45-B/B3 stammte aus der Maus und war unmarkiert. Da beide Antikörper aus verschiedenen Tieren synthetisiert wurden, konnten im weiteren Verlauf keine Kreuzreaktion auftreten. Der Panzyotokeratin-Antikörper A45-B/B3 richtete sich gegen die Cytokeratine 8, 18 und 19. Dieses Primärgemisch wurde jeweils mit 100 μ L auf die Patientenproben (Abb. 7) und auf die Positiv-Kontrolle pipettiert.

Parallel wurde ein zweites primäres Antikörpergemisch für die Negativ-Kontrolle angesetzt. Dazu wurde der X0903 Antikörper und der MOPC 21 Antikörper auf 2 μ g/mL mit 10% AB-Serum/DPBS verdünnt. Der X0903 Antikörper stammte aus dem Hasen und der MOPC 21 Antikörper aus der Maus. Beide Antikörper dienten als Isotypen-Kontrolle und besaßen keine Bindungsstellen für humane Antigene.

Die Inkubationszeit betrug für beide primären Antikörpergemische 45 min. Die Objektträger lagerten abgedunkelt in einer Metallbox, damit die Fluorochrome nicht vorzeitig vom Tageslicht angeregt wurden.

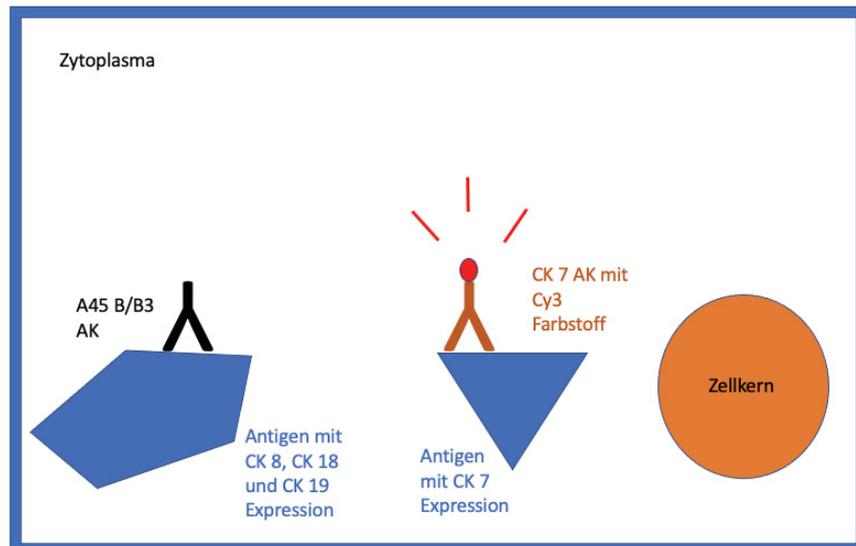


Abb. 7: Erste Färbereaktion mit Bindung der A45 B/B3 Antikörper und CK 7 Antikörper an die entsprechenden Antigene: Der A45-B/B3 Antikörper (schwarz) bindet mit seinem Fab-Fragment an die Antigene von CK 8, 18 und 19. Der Cy3-markierte CK-7 Antikörper (orange-rot) bindet mit seinem Fab-Fragment an das Antigen CK 7.

Anschließend wurden alle Objektträger 3 min gewaschen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um sicherzustellen, dass alle nicht gebundenen Antikörper auch entfernt worden sind.

Der Antikörper Alexa Fluor 488, der mit den Hasen-Antikörpern reagiert, wurde auf 10 µg/mL mit 10% AB-Serum/DPBS verdünnt. 100 µL von diesem Ansatz wurden auf alle Patientenproben und die Positiv-Kontrolle pipettiert (Abb. 8). Dieser Schritt diente zur Visualisierung der bereits markierten CK 8, CK 18 und CK19 Antigene mit dem A45 B/B3 Antikörper.

Ein zweiter Ansatz mit dem Alexa Fluor 555 Antikörper, der gegen Hasen-Antikörper gerichtet ist und der bereits bekannte Alexa Fluor 488 Antikörper wurden jeweils auf 10 µg/mL mit 10% AB-Serum/DPBS verdünnt. 100 µL von diesem Ansatz wurden auf die Negativ-Kontrolle und auf die Isotypen-Kontrolle pipettiert.

Die Inkubationszeit betrug für beide Ansätze 30 min.

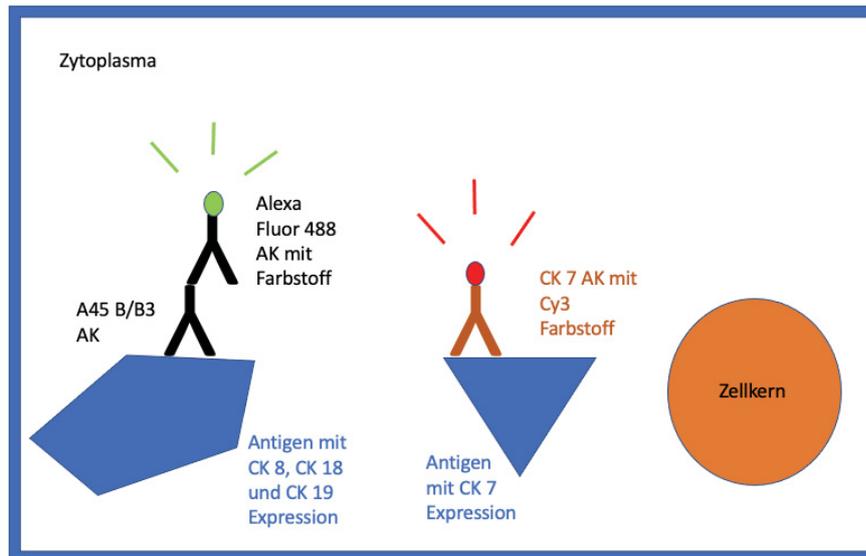


Abb. 8: Zweite Färbereaktion mit der Bindung vom Alexa Fluor Antikörper an den A45 B/3 Antikörper: Links im Bild ist zu sehen, wie der Primärantikörper A45-B3/B3 mit seinem Fab-Fragment an die Antigene mit den Cytokeratinen 8,18 und 19 bindet. In einer zweiten Reaktion bindet der Alexa-Fluor-488-Antikörper (grün) mit seinem Fab-Fragment an das Fc-Fragment vom A45-B/B3-Antikörper.

Danach erfolgte erneut das Waschen für 3 min in DPBS. Dieser Vorgang wurde ebenfalls drei Mal wiederholt, um erneut überschüssige Antikörper auszuwaschen.

Hiernach wurden auf alle Objektträger 100 μ L 1%-Paraformaldehyd pipettiert, um die Färbereaktionen zu fixieren.

Anschließend wurden alle Objektträger erneut drei Mal 3 min gewaschen.

In einem letzten Schritt erfolgte die Verdünnung vom Hoechst-Farbstoff auf 2 μ g/mL. Dieser Farbstoff ist zellpermeabel und bindet an die Nukleinsäuren des Zellkerns (Abb. 9, Abb. 10) aller Zellen. Von diesem Ansatz wurden 100 μ L auf alle Objektträger pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 2 min.

Danach konnten die Objektträger abgedunkelt über Nacht in einer DPBS gefüllten Küvette im 4°C Kühlschrank gelagert werden.

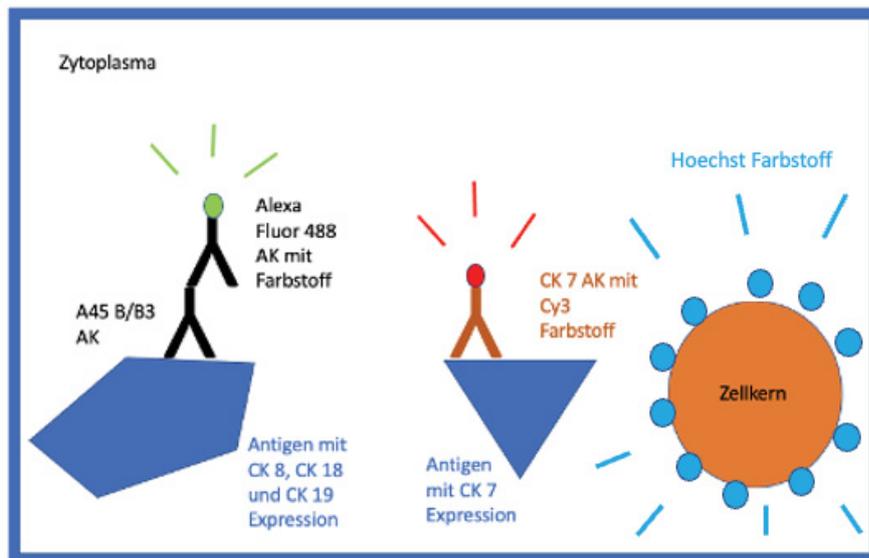


Abb. 9: Dritte Färbereaktion mit der Bindung vom Hoechst Antikörper an den Zellkern: Schematische Darstellung, wie der Hoechstfarbstoff an die Nukleinsäuren des Zellkernes bindet (hellblaue Kugeln).

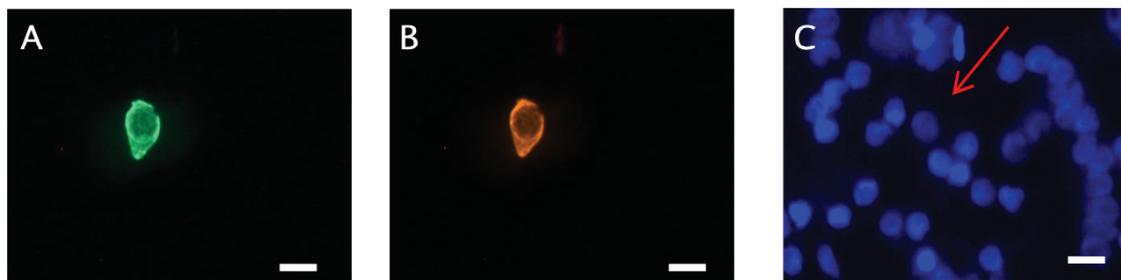


Abb. 10: Die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung einer DTC. Die Antikörper visualisieren die Cytokeratine 8, 18 und 19 (A, grün) und das Cytokeratin 7 (B, rot). In der Abbildung C ist die Kernfärbung mittels Hoechst (blau) dargestellt. Der rote Pfeil markiert dieselbe Zelle, die in der Abbildung A und C zu sehen ist. Größenstandard = 10 μm (weißer Balken)

2.6 Picken von Einzelzellen

In einem abgedunkelten Raum wurden die Objektträger mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Von jedem Färbegang wurden zuerst die Positiv-Kontrolle und die Negativ-Kontrolle überprüft. Diese Kontrollen zeigten, ob die Färbung funktioniert hatte. Danach erfolgte die Überprüfung der Isotypen-Kontrolle vom Patienten, um unspezifische Patientenreaktionen auszuschließen.

Nachdem sichergestellt wurde, dass die Kontrollen korrekt waren, wurde die Patientenobjektträger gescreent. Dabei mussten die Proben mit drei unterschiedlichen Filtern, die die Wellenlängenbereiche grün (490-575 nm), blau (420-490 nm) und gelb-orange (575-650 nm) abdeckten, separat durchleuchtet werden. Alle Zellen, die CK 7 positiv (orange) und/oder CK 8/18/19 (grün) und einen intakten Zellkern (blau) hatten, wurden mit einem Mikromanipulator gepickt. Diese Zellen entsprachen den DTCs.

Dazu wurde vorher mit einem Puller eine Mikrokapillare gezogen, die in den Mikromanipulator eingespannt wurde. Die Mikrokapillare war mit 0,5% Igepal/DPBS getränkt, damit die gepickte Zelle nicht am Glas der Mikrokapillare festklebte. Zusätzlich diente das Igepal zur Aufreinigung der Einzelzelle. Die Einzelzelle wurde mit dem Mikromanipulator aufgesaugt und anschließend in einen 1 μ L Tropfen bestehend aus 0,5% Igepal/DPBS auf einem *Chamber*-Objektträger transferiert. Danach erfolgte die Aufnahme der Einzelzelle vom *Chamber*-Objektträger mit einer 1 μ L Pipette. Alle diese Schritte wurden unter Sichtkontrolle mit dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt (Abb. 11). Zuletzt erfolgte der Transfer der Einzelzelle in den Proteinase K Verdau-Ansatz.

Zu jeder gewonnen Patientenprobe wurden zusätzlich periphere unmarkierte Leukozyten als Referenz zur kranken Zelle gepickt. Zuletzt erfolgte eine Kratzprobe vom Patienten-Objektträger. Sie diente als Kontrolle für die Polymerase-Kettenreaktion-Reaktion (PCR).

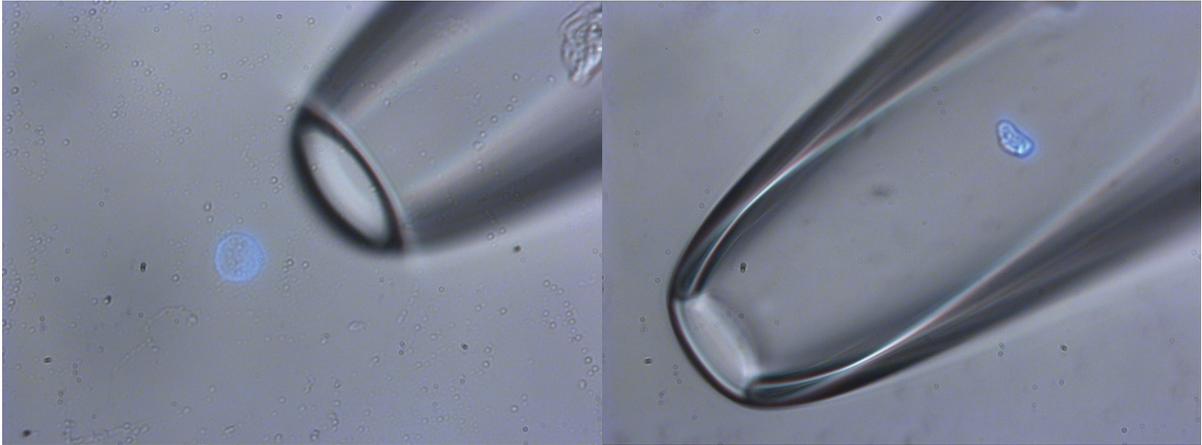


Abb. 11: Transfer einer DTC. Zu sehen ist eine fluoreszierende DTC, die unter Sicht in eine Glaskapillare aufgezogen wird. Damit die DTC schadenfrei vom Objektträger gelöst werden kann, ist es wichtig, dass die Glaskapillare keine scharfen Kanten hat. Aus diesem Grund wurden alle Glaskapillaren vorher im Puller bearbeitet. Der Sog zum Aufnehmen der Zelle entsteht durch das Eppendorf-*celltram-air*-System. Die blaue Farbe ist die Emission vom Hoechst Farbstoff.

2.7 MSE PCR

Alle Arbeitsschritte dieses Kapitels wurden unter der Werkbank durchgeführt, um Verunreinigungen der Proben-DNA zu vermeiden. Analog zu jeder gepickten DTC wurde ein entsprechender peripherer Leukozyt desselben Patienten als gesunde Referenzzelle mitgeführt. Konnte ein peripherer Leukozyt nicht mitgeführt werden, wurden Leukozyten aus einem geschlechterspezifischen Pool von gesunden Patienten mitgeführt.

2.7.1 Proteinase K Verdau

Dieser Ansatz beinhaltet pro *Tube* folgende Reagenzien:

- 0,2 μL *One Phor All Buffer (OPA)*
- 0,13 μL Tween 10 %
- 0,13 μL Igepal 10 %
- 0,26 μL Proteinase K 10 mg/mL

- 1,28 µL nukleasefreies Wasser
- 1 µl gepickte Zelle

Das Tween unterstützt den Lysevorgang und ist gleichzeitig ein Emulgator. Die Proteinase K dient zur Verdauung von Proteinen.

Der Ansatz wurde für 10 h bei 42°C in den *Cycler* gestellt. Danach erfolgte für 10 min bei 80 °C die Inaktivierung der Proteinase K. Anschließend erfolgte der MseI Verdau.

2.7.2 MseI Verdau

Folgende Reagenzien wurden zum dem Proteinase K Verdau Ansatz hinzugefügt:

- 0,2 µL OPA
- 0,2 µL MseI (high concentrate 100 U)
- 1,6 µL nukleasefreies Wasser

Der Ansatz wurde für 3 h bei 37°C in den *Cycler* gestellt. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms MseI bei 65°C für 5 min. Der nächste Arbeitsschritt war das *Preannealing*.

2.7.3 Preannaeling

In diesem Reaktionsschritt erfolgte die Bindung der Primer LIB1 und ddMse11. Sie dienten als Adapter für die spätere DNA-Hybridisierung. Folgende Reagenzien wurden angesetzt:

- 0,5 µL OPA
- 0,5 µL LIB 1 100 µM
- 0,5 µL ddMse11 100 µM
- 1,5 µL nukleasefreies Wasser

Der Ansatz wurde auf 65°C erhitzt und jede Minute um 1°C bis auf 15°C im *Cycler* reduziert. Danach erfolgte die Ligation.

2.7.4 Ligation

Folgende Reagenzien wurden zu dem *Preannealing*-Ansatz hinzugefügt:

- 1 µL ATP 10 mM
- 1 µL T4-DNA-Ligase

Das ATP dient als Energielieferant für die T4-DNA-Ligase. Die insgesamt 5 µL dieses Ansatzes wurden zu der Msel verdauten Zelle hinzupipettiert. Die Ligation erfolgte bei 15°C über Nacht im *Cycler*. Danach ging es weiter mit der primären PCR.

2.7.5 Primäre PCR

Folgende Reagenzien wurden zu den Adaptern ligierten DNA-Fragmenten hinzugefügt:

- 2 µL dNTPs 10 mM
- 3 µL Puffer 1
- 35 µL nukleasefreies Wasser
- 1 µL DNA PolMix

Die dNTPs sind die Basen und Bausteine für die Polymerase. Die Tabelle 4 zeigt die Einstellungen für den *Cycler* für die Hybridisierung der Einzelzell-DNA.

Tabelle 4: Cycler-Programmierung für die primäre PCR

1x		14x		8x		22x		1x	
68°C	3'	94°C	40''	94°C	40''	94°C	40''	68°C	3'40''
		57°C	30''	57°C	30''+1°C /Zyklus	65°C	30''	4°C	unbegrenzt
		68°C	1'30''+1''/ Zyklus	68°C	1'45''+1''/ Zyklus	68°C	1'53''+1''/ Zyklus		

Danach wurde eine Kontrolle mit Hilfe der Multiplex PCR durchgeführt.

2.7.6 Multiplex PCR

Dazu wurde folgende Reagenzien angesetzt:

- 1 µL LAMC1 *Forward* 100 µM
- 1 µL LAMC1 *Reverse* 100 µM
- 1 µL GRIK5 *Forward* 100 µM
- 1 µL GRIK5 *Reverse* 100 µM
- 0,5 µL NEK9 *Forward* 100 µM
- 0,5 µL NEK9 *Reverse* 100 µM
- 0,4 µL CADPS *Forward* 100 µM
- 0,4 µL CADPS *Reverse* 100 µM
- 0,4 µL PICK1 *Forward* 100 µM
- 0,4 µL PICK2 *Reverse* 100 µM
- 0,4 µL DNAH9 *Forward* 100 µM
- 0,4 µL DNAH9 *Reverse* 100 µM
- 46,1 µL nukleasefreies Wasser
- 5 µl DreamTag Green PCR Master Mix (2x)
- 0,5 µl primäres PCR-Produkt aus der Einzelzellamplifikation

Als Positiv-Kontrolle diente die Kratzprobe vom Patienten oder wahlweise genomische Pool-DNA von einem gesunden Menschen. Als Negativ-Kontrolle wurde nukleasefreies Wasser mitgeführt. Daraufhin wurde folgendes Programm für den *Cycler* gewählt (Tabelle 5):

Tabelle 5: *Cycler*-Programmierung für die Multiplex-PCR

1x		33x		1x		1x	
95°C	2'	95°C	30''	72°C	5'	4°C	unbegrenzt
		60°C	40''				
		72°C	1'				

2.7.7 Agarose-Gel Elektrophorese

Dazu wurde ein 1,5 % Agarosegel (bestehend aus Agarose und TBE-Puffer) mit 0,1 Promille GelRed gegossen. Das Agarosegel wurde an den Seitenrändern mit 5 µL 50 bp *Ladder* geladen. Die restlichen Taschen des Agarosegels wurden mit 10 µL vom jeweiligen PCR-Produkt geladen.

Anschließend wurde eine Spannung mit 130 Volt für 65 min angelegt. Die Auswertung erfolgte im VersaDoc-Photometer (Abb. 12).

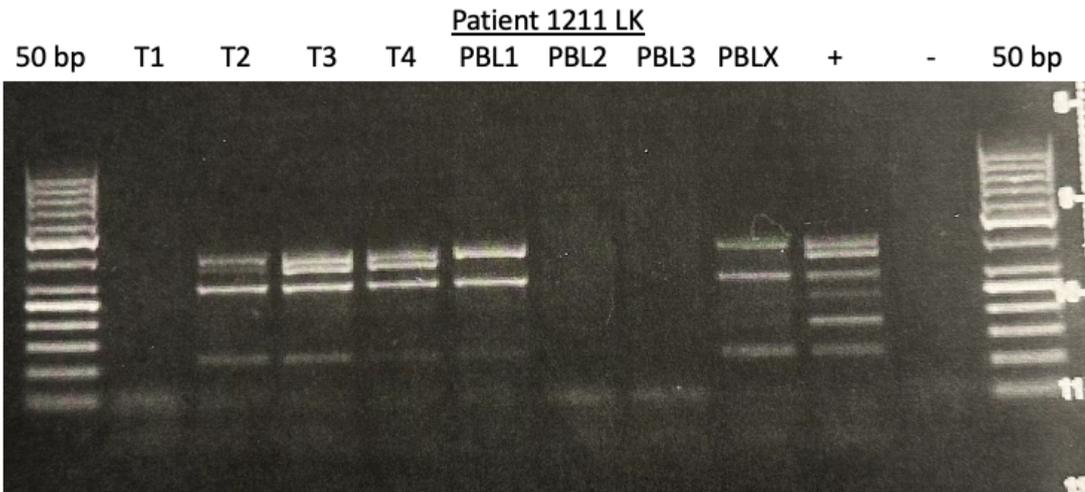


Abb. 12: Ergebnis der Multiplex-PCR vom Patientin 1211 LK. An den Seiten sind die DNA-Leitern (50 bp) mit den PCR-Produkten im Abstand von 50 *basepairs* zu sehen. Die Negativkontrolle (-, Wasser) zeigt keine Bande. Die Positivkontrolle (+, Kratzprobe) zeigt alle 6 Banden und bildet somit von oben nach unten die PCR-Produkte DNAH9, PICK1, NEK9, GRIK5 CADPS und LAMC1 ab. Von den peripheren Blutleukozyten (PBL) hat lediglich die Probe PBLX drei PCR-Produkte abgebildet. Die DTC (T2, T3, T4) zeigen 4 PCR-Produkte, wohingegen die DTC (T1) kein PCR-Produkt zeigt.

2.8 Microarray-CGH

2.8.1 Einzelzell-DNA Aufreinigung

In diesem Arbeitsschritt erfolgt die Aufreinigung der Einzelzell-DNA.

Dazu wurde die Patientenprobe auf ein Gesamtvolumen von 480 μ L mit *TE-Buffer* aufgefüllt.

In das Amicon-Reaktionsgefäß wurde die Amicon-Säule platziert. Diese enthält eine Membran mit einer Durchlässigkeit von 30 kDa zur Filterung der Patientenprobe. Auf die Amicon-Säule wurden die 480 μ L verdünnte Patientenprobe pipettiert und für 10 min bei 14 000 G bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Durchfluss wurde verworfen und erneut 480 μ L *TE-Buffer* auf die Amicon-Säule hinzugefügt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 14 000 G bei Raumtemperatur.

Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Die Amicon-Säule wurde invertiert in ein frisches 2 ml Amicon Reaktionsgefäß platziert und für 1 min mit 1000 G bei Raumtemperatur zentrifugiert.

1,5 µL von der Probe wurden zur dsDNA-Konzentrationsmessung im NanoQuant verwendet. Der TE-*Buffer* diente zur Kalibrierung.

2.8.2 Labeling

Dazu wurde das Agilent *SureTag DNA Labeling Kit* verwendet.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis unter der Werkbank durchgeführt.

- 1 µg Probe
- auf 24 µL mit nukleasefreiem Wasser auffüllen
- 5 µL Primer

Der Ansatz wurde für 3 min auf 98°C im *Cycler* erhitzt und anschließend auf 37°C runtergekühlt. Hier musste der *Cycler* pausiert und die Probe für 5 min auf Eis gelagert werden. In der Zwischenzeit wurde der Mastermix mit folgendem Ansatz im lichtgeschütztem braunem 1,5 mL-Reaktionsgefäß für die Patientenprobe vorbereitet:

- 2 µL nukleasefreies Wasser
- 10 µL 5x Puffer
- 5 µL 10x dNTPs
- 3 µL Cy5-dUTPs
- 1 µL Exo-Klenow Fragment

Für die Referenzprobe wurde folgender Ansatz vorbereitet:

- 2 µL nukleasefreies Wasser
- 10 µL 5x Puffer
- 5 µL 10x dNTPs
- 3 µL Cy3-dUTPs

- 1 µL Exo-Klenow Fragment

Nach den 5 min wurde der Mastermix zur Patienten- und Referenzprobe hinzupipettiert. Das Gesamtvolumen der entsprechenden Proben betrug 50 µL. Danach wurde das folgende Programm im *Cycler* fortgesetzt (Tabelle 6):

Tabelle 6: *Cycler*-Programmierung für das *Labeling*

1x		1x		1x	
37°C	120'	65°C	10'	4°C	unbegrenzt

Nachdem die Proben markiert wurden, erfolgte erneut die Aufreinigung der DNA analog zum Protokoll vom Kapitel 2.8.1.

Nach der Aufreinigung fand die Messung der Aktivität der Proben im NanoQuant statt. Zur Kalibration wurde der TE-Buffer verwendet. Mit Hilfe folgender Formel konnte die spezifische Aktivität berechnet werden:

$$\text{Spezifische Aktivität für Cy3} = \left(\frac{[\text{Cy3}] \text{ pmol}/\mu\text{L}}{[\text{DNA}] \text{ ng}/\mu\text{L}} \right) \times 1000$$

Die Zielwerte für Cy3 und Cy5 sollten zwischen 20 und 60 liegen.

Die totale DNA-Konzentration wurde zwischen 8 und 14 µg mit folgender Formel berechnet:

$$9 \text{ bis } 14 \mu\text{g} = \frac{\text{DNA Konzentration}}{\mu\text{L}} \times 25\mu\text{L}$$

2.8.3 Probenvorbereitung für Hybridisation

Es wurden 19,5 μL der Probe mit 19,5 μL Referenz in einem braunem Reaktionsgefäß gemischt. Danach wurde der Mastermix wie folgt vorbereitet:

- 5 μL Cot-1 DNA (1 mg/mL)
- 11 μL 10fach *blocking buffer*
- 55 μL 2fach Hi-RPM *buffer*

Die humane Cot-1 DNA dient zur Blockierung von unspezifischen Bindungen auf dem *Microarray*.

Der Mastermix wurden zur Probe hinzupipettiert und gemixt. Anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation bei 6000 G, um Probenrückstände aus dem Deckel des Reaktionsgefäßes zu entfernen. Das Probengesamtvolumen betrug 110 μL . Die Probe wurde für 3 min bei 98°C in den *Cycler* gestellt und danach für 30 min bei 37°C runtergekühlt. Danach erfolgte eine erneute kurze Zentrifugation der Probe bei 6000 G. Die Proben wurden zur Zwischenlagerung bei 37°C in den *Cycler* gestellt.

2.8.4 *Microarray* Hybridisation

Der Inkubator wurde auf 67°C vorgeheizt. Daraufhin erfolgte die *Microarray*-Nummer und die Probennummer Beschriftung (Abb. 13).

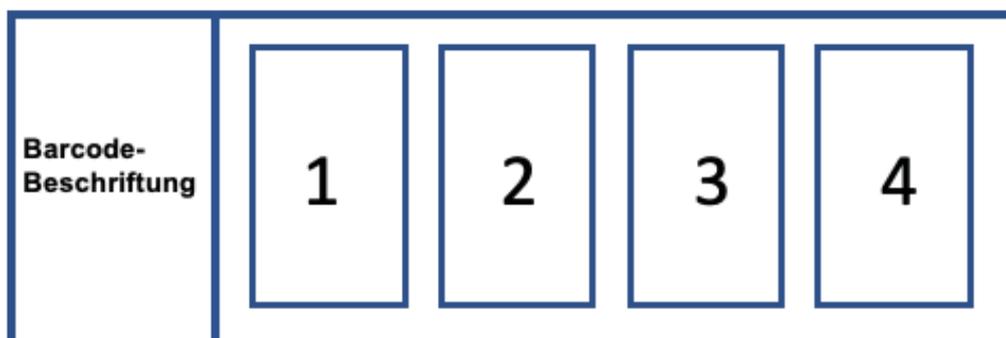


Abb. 13: Beschriftung der *Microarray*-Objektträger: Ganz links wird der Barcode des *Microarray*-Objektträgers notiert. Die Patientenprobenbeschriftungen kommen in die Platzhalter 1 bis 4.

Anschließend wurden der Dichtungsobjektträgers (Abb.14) in die Metallkammer gelegt und 100 μ L Probe jeweils in einen Gummiring pipettiert.

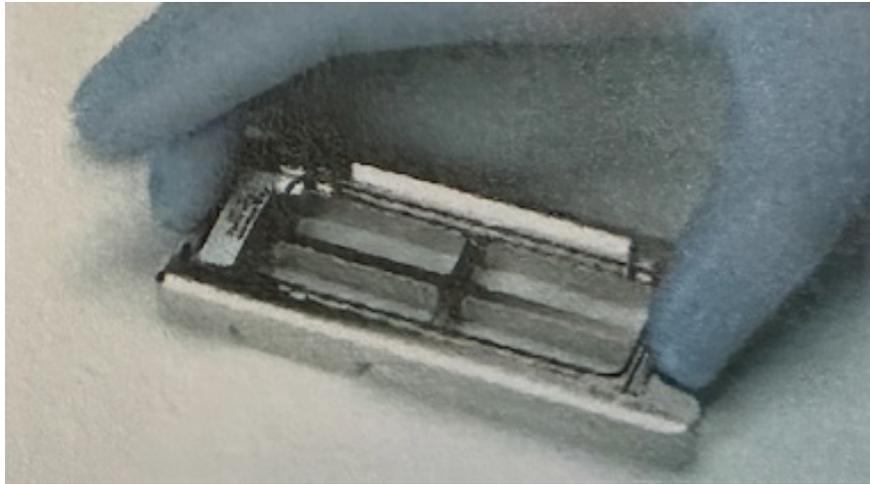


Abb. 14: Korrektes Platzieren der Dichtungsobjektträger: Die Gummierung zeigt dabei nach oben.

Danach wurde der *Microarray*-CGH Objektträger mit der Seite „Agilent“ auf den Dichtungsobjektträger gelegt und fixiert (Abb. 15).

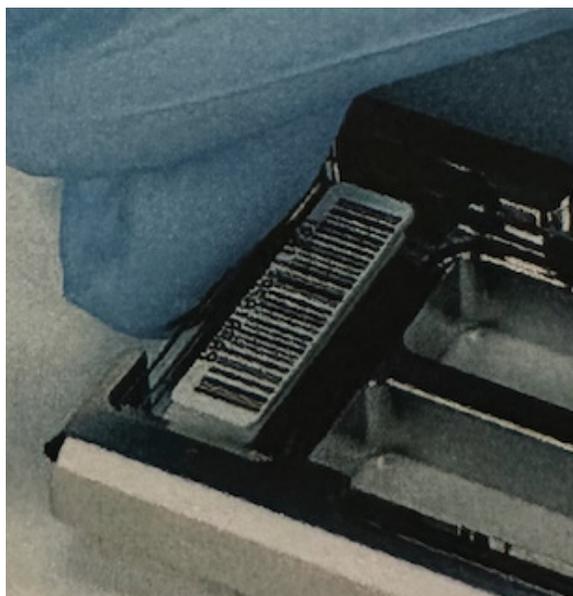


Abb. 15: Der Barcode des *Microarray*-Objektträger zeigte nach oben. Somit ist gewährleistet, dass sich die Oligonukleotide vom dem *Microarray*-Objektträger nach unten zeigen.

Dabei war zu beachten, dass eventuelle Luftblasen zwischen *Microarray*- und Dichtungsobjektträger frei beweglich waren.

Die vorbereiteten Objektträger wurden 24 h rotierend bei 20 rpm bei 67°C in den Inkubator gestellt. Die kontinuierliche Rotation bewirkte eine gleichmäßige Hybridisierung auf dem *Microarray*.

Für den Folgetag wurden die Stabilisierungslösung und der Waschpuffer 2 in einen separaten 40°C Inkubator gestellt.

2.8.5 Das Waschen der *Microarrays*

Der Waschpuffer 2 und die Stabilisierungslösung wurden 30 min vor dem Waschen aus dem Inkubator geholt und auf Raumtemperatur runtergekühlt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten von hier an unter dem Abzug. Die Waschpuffer 1 und 2 wurden jeweils mit dem Magnetmixer gemischt. Danach konnten, die unten genannten Reagenzien in den Färbewannen vorgelegt werden. Anschließend wurde der Waschpuffer 2 in einem Wasserbad auf 37°C aufgeheizt. Das Waschen der *Microarrays* erfolgte nach diesem Protokoll:

- Microarray*- und Dichtungsobjektträger vorsichtig mit einer Pinzette im Waschpuffer 1 trennen.
- Microarrays* für 5 min in Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur waschen.
- Microarrays* für 1 min bei 37°C in Waschpuffer 2 waschen.
- Microarrays* für 10 sec bei Raumtemperatur in Acetonitril waschen.
- Microarrays* für 30 sec in der Stabilisierungslösung halten.

Zuletzt wurden die *Microarrays* vorsichtig in die schwarzen Plastikhalterungen von Agilent gelegt und zusammen mit einem Ozon-Barrier-Objektträger fixiert.

2.8.6 Scannen der *Microarrays*

Eine eingescannte Bilddatei der ausgewerteten *Microarrays* ermöglichte die Analyse der chromosomalen Zugewinne und Verluste mit Hilfe einer Auswertungssoftware. Dafür wurden die *Microarrays* in das Scannerkarussell des *Microarray-Scanner* eingespannt. Der *Second-harmonic-generation-Yttrium-Aluminium-Granat-Lasers* regte das Fluorochrom Cy3 mit einer Emissionswellenlänge von 532 nm an. Der *Helium-Neon-Laser* regte wiederum das Fluorochrom Cy5 mit einer Emissionswellenlänge von 633 nm an. Die so gewonnenen Signale durchliefen verschiedene Filter und *Photomultiplier*, um die elektrische Signalwirkung zu verstärken. Als Ergebnis wurde eine Bilddatei im Tif-Format erstellt (Abb. 16).

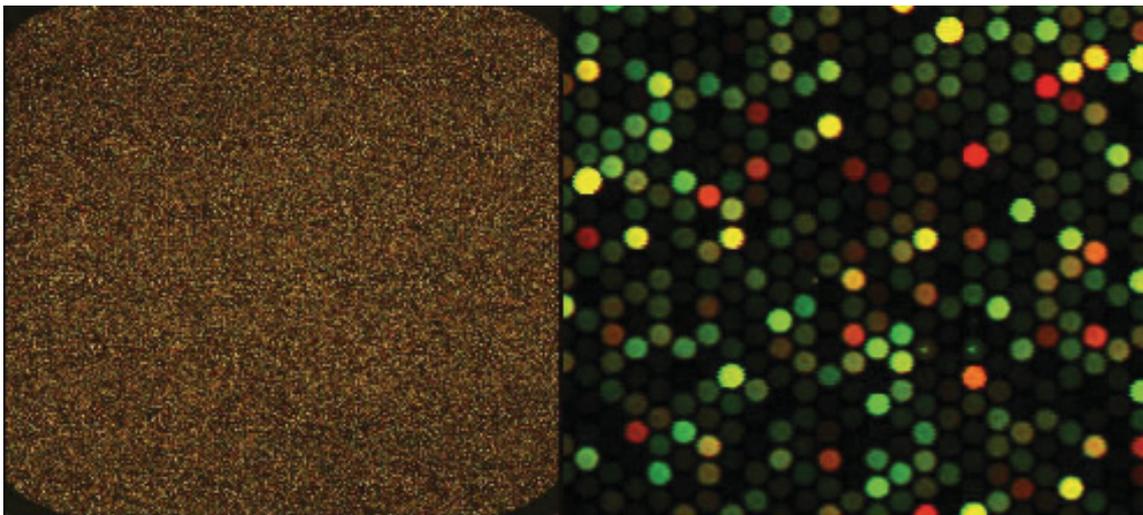


Abb. 16: Tif-Bilddatei vom *Microarray Scanner*. Die gelben Spots zeigen eine gleichmäßige Hybridisierung der Proben-DNA und der Referenz-DNA. Auf der rechten Seite ist eine Vergrößerung des linken Bildausschnitts zu sehen. Hier zeigt sich in Form von grünen Spots eine Unterrepräsentation von Proben-DNA, wohingegen die rot-orangen Spots eine Überrepräsentation der Proben-DNA darstellen.

2.8.7 Extraktion der Daten und Auswertung

Die Tif-Bilddatei wurde in das Datenextraktionsprogramm *Feature Extraction* geladen und in eine Textdatei umgewandelt. Diese konnte wiederum in die *Genomic Workbench Software* importiert werden. Für die Analyse der Datei wurde der

aberration detection method 2 (ADM-2) Algorithmus mit einer Schwelle von 6.0 und eine diploid peak Zentralisierung zur Auswertung der Kopienzahlalterationen benutzt. Genetische Mutationen in Tumoren kommen nicht in allen Zellen vor, deshalb wurde ein Aberrationsfilter definiert, der nur solche Ereignisse als eindeutig positiv erkennt, die ein Minimum \log_2 ratio von ≥ 0.25 aufweisen. Darüber hinaus mussten mindestens drei Oligonukleotide betroffen sein. Die Ergebnisse wurden in so genannte *penetrance plots* betrachtet. Diese zeigen den prozentualen Anteil der Amplifikationen und Deletionen auf den betroffenen Regionen (Abb. 17).

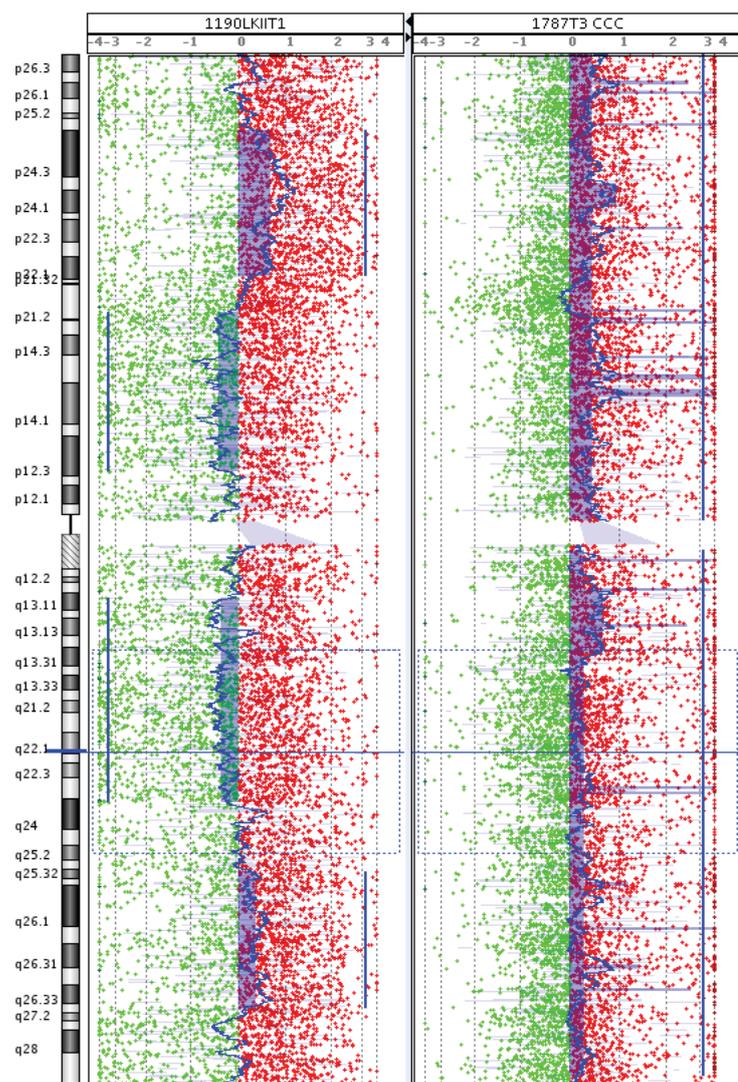


Abb. 17: Darstellung eines aCGH-Profiles mit chromosomalen Amplifikationen und Deletionen. Die y-Achse zeigt links das komplette Chromosom 3 von einer DTC aus dem Lymphknoten (links) und einer DTC aus dem Knochenmark (rechts). Die blaue horizontale Achse gibt Auskunft über die \log_2 ratio. Die blaue vertikale Linie bildet eine Ausgleichsgerade zwischen den Oligonukleotiden und verdeutlicht Zugewinne (hohes \log_2 ratio nach rechts verschoben) oder Verluste (negatives \log_2 ratio nach links verschoben). Im Vergleich ist zu sehen, dass die DTC aus dem Lymphknoten von p21.2 – q22.3 Verluste aufzeigt, wohingegen die DTC aus dem Knochenmark Zugewinne vorweist.

Die spezifischen Paarvergleiche zwischen den DTC-Profilen aus den Lymphknoten und Knochenmark sowie den Primärtumoren wurden mit dem internetbasierten Analyseprogramm für genomische Daten *progenetix* durchgeführt.

2.8.8 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Statistiksoftware SPSS verwendet.

Die klinischen Parameter der Patienten und auch die Färbeergebnisse wurden zunächst mit einer Kaplan-Meier-Schätzer auf das Überleben überprüft. Die grafische Darstellung erfolgte mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven. Anschließend fand eine vergleichende Analyse der zwei Merkmale innerhalb der Risikogruppe mittels eines Log-Rank-Tests statt. Alle Parameter wurden mittels einer univariaten Analyse auf das mediane Gesamtüberleben überprüft. Die multivariate Analyse für das relative Risiko früher zu versterben wurde mit der Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Um die Kopienzahlveränderungen von KM-DTC gegen die LK-DTC zu vergleichen wurde der Mann Whitney Test verwendet. Die grafische Darstellung der Kopienzahlveränderungen erfolgte mit Hilfe eines Streudiagramms. Das Konfidenzintervall wurde auf 95% gesetzt. Folglich werden die Ergebnisse mit einem p -Wert von 0,05 oder weniger als signifikant bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung klinischer Daten

In dieser Studie standen von 88 CCA-Patienten 88 Knochenmarksproben und 7 Lymphknotenproben zur Verfügung, die zwischen 2006 und 2016 an den Universitätskliniken in Düsseldorf und Dresden operiert wurden. Das mediane Erkrankungsalter betrug 69 Jahre. Von den 88 auswertbaren Patientendaten waren 45 männlich und 43 weiblich. 38 Patienten hatten bereits bei der Diagnose einen großen Tumor (pT3-4) und 36 Patienten hatten einen Lymphknotenbefall (pN1-3). Bei 21 Patienten (M1) konnten bereits Fernmetastasen nachgewiesen werden. Von den 84 Patienten konnten lediglich 66 tumorfrei (R0) reseziert werden. Das bedeutet, dass bei 21 % der Patienten pathologisches Tumorgewebe nach der Operation in situ verblieb oder Patienten sogar während der Operation verstorben sind. Zusammengefasst hatten 43 % der Patienten bei der Diagnose bereits ein hohes Krebsstadium (UICC III-IV) (Abb. 18; Tabelle 7). Diese klinischen Ergebnisse bestätigen die statistische Datenerhebungen von 2018 in Deutschland. Das CCA befällt die ältere Patientenpopulation und ist bei Diagnose häufig bereits fortgeschritten.

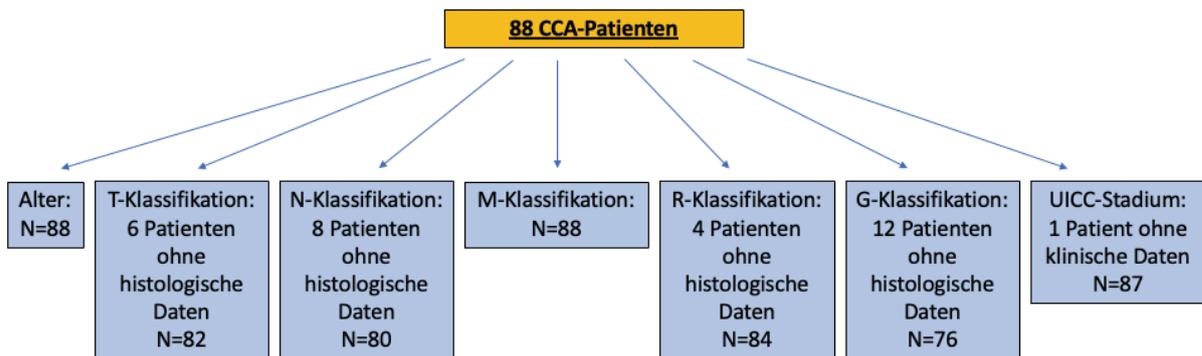


Abb. 18: Flowchart der verfügbaren histologischen und klinischen Daten der 88 CCA-Patienten.

3.2 Auswertung der Färbeergebnisse

In 23 von 88 auswertbaren Knochenmarksproben konnten DTCs nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass in 26 % der Knochenmarksproben CK 7 und/oder A45 B/B3 positive Zellen zu finden waren. In 4 von 7 auswertbaren Lymphknotenproben wurden CK 7 und/oder A45 B/B3 positive Zellen detektiert. Das entspricht einer Quote von 57 %. Bei der Zusammenfassung von Lymphknoten- und Knochenmarksproben konnten 26 von 88 Proben positiv auf DTCs getestet werden. Somit waren in 30 % aller Proben DTCs zu finden (Abb. 19; Tabelle 7).

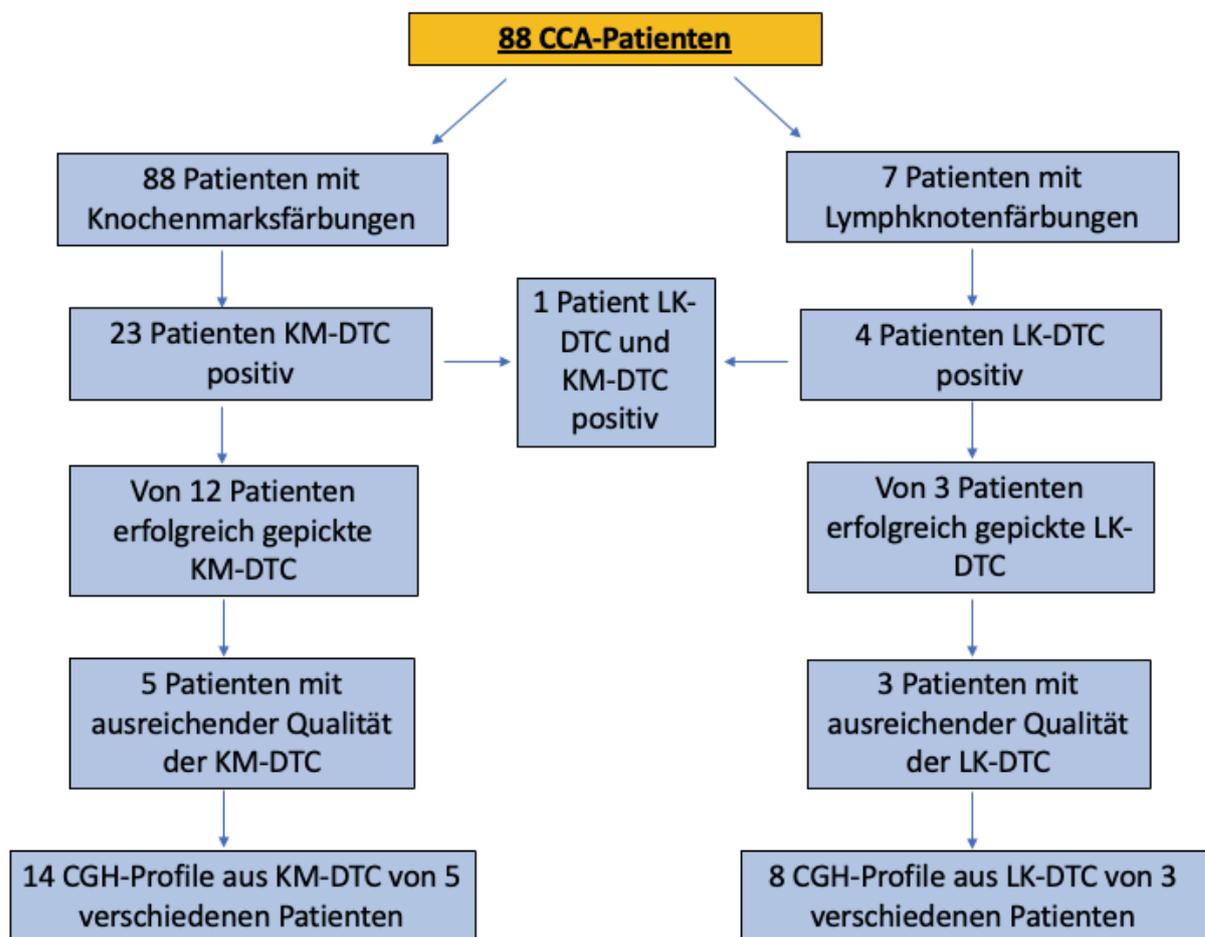


Abb. 19: Flowchart der verarbeiteten Knochenmarks- und Lymphknotenproben der 88 CCA-Patienten.

3.3 Überlebenszeitanalysen der CCA-Kohorte

3.3.1 Auswertung der TNM-Daten

Beim Alter konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,01$) im Hinblick auf das mediane Gesamtüberleben festgestellt werden. Die Patienten, die älter als 69 Jahre waren, hatten ein medianes Gesamtüberleben von 4 Monaten. Dazu im Vergleich hatten die die jüngeren Patienten ein medianes Gesamtüberleben von 23 Monaten (Abb. 20, Tabelle 7).

Bei der Betrachtung des medianen Gesamtüberlebens zeigte der Risikofaktor Tumorgröße ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p<0,01$). Die Patienten mit einer T-Kategorie 1-2 hatten ein medianes Gesamtüberleben von 23 Monaten gegenüber von 6 Monaten bei der Tumorkategorie 3-4 (Abb. 20).

Auch das *Grading* konnte einen signifikanten Unterschied ($p=0,03$) vorweisen. Die Patienten mit einem *Grading* von 1-2 lebten im Median 17 Monate länger als die Patientin mit einem *Grading* von 3-4, die im Median nur 6 Monate lebten (Abb. 20, Tabelle 7).

Ebenso zeigten die Patienten mit einem einer R0-Resektion ein signifikant ($p=0,01$) höheres medianes Gesamtüberleben von 15 Monaten im Vergleich zu einer R1- oder R2-Resektion, die nur ein medianes Gesamtüberleben von 1 Monat zeigten (Abb. 20, Tabelle 7).

Die Multivariate-Analyse lieferte für das Alter (>69 Jahre) ein 2,22-fach erhöhtes Risiko früher zu versterben und war damit signifikant ($p=0,01$). Ebenso hatten Patienten mit einer hohen T-Kategorie (T3-4) ein 2,51-fach erhöhtes Risiko zu versterben. Auch dieses Ergebnis war signifikant ($p<0,01$). Die restlichen Parameter zeigten in der Multivariaten-Analyse keine Signifikanzen auf das Risiko früher zu versterben (Tabelle 7).

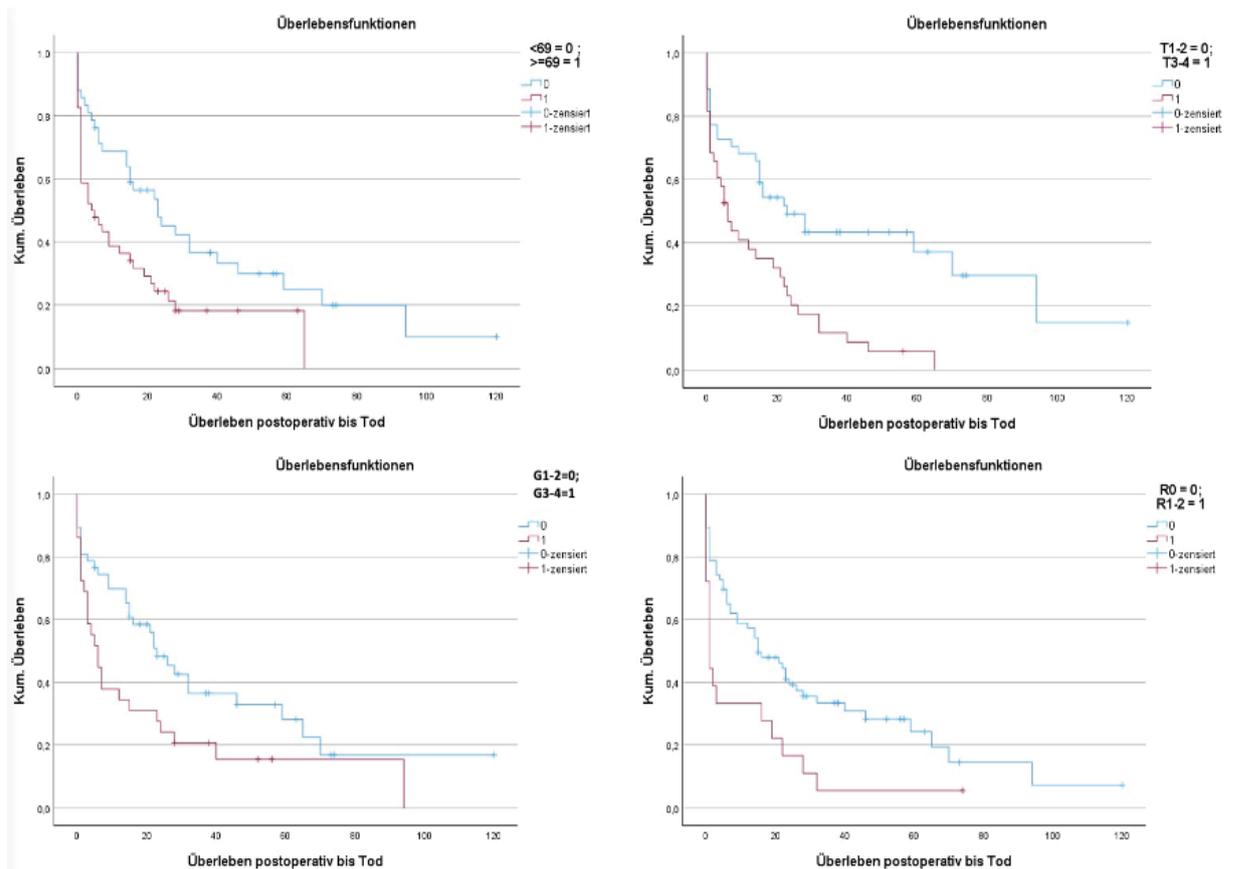


Abb. 20: Kaplan-Meier-Überlebenskurven: Auf der y-Achse ist jeweils das kumulative Überleben der Patienten dargestellt. Die x-Achse zeigt das Überleben der Patienten in Monaten an. Die obere linke Graphik zeigt den Vergleich zwischen Patienten, die jünger als 69 Jahre sind (blau) und Patienten die 69 oder älter sind (rot). Die obere rechte Graphik vergleicht die Patienten mit einem hohem Tumorstadium 3-4 (rot) mit Patienten mit einem geringerem Tumorstadium 1-2 (blau). Die untere linke Graphik stellt die Patienten mit einem niedrigem Grading 1-2 (blau) mit Patienten mit einem hohem Grading 3-4 (rot) gegenüber. Die untere rechte Graphik veranschaulicht die Patienten mit einer resektionsfreien Operation (blau) und die Patienten mit verbliebenen Tumorresten nach einer Operation (rot).

3.3.2 Auswertung der DTC und der CK-Expression

Es konnte in der Auswertung gezeigt werden, dass die Patienten, in deren Knochenmark DTCs gefunden wurden im Median 2 Monate länger lebten, als Patienten die keine DTCs im Knochenmark hatten. Allerdings war dieses Resultat nicht signifikant ($p=0,79$). Die Patienten, die keine DTCs in den Lymphknoten hatten, lebten im Median 36 Monate länger, als die Patienten, die DTCs im Lymphknoten aufwiesen. Auch das Resultat war nicht signifikant ($p=0,07$). Vergleich man die Patienten, bei denen DTCs nachgewiesen wurden, mit Patienten bei denen keine DTCs gefunden wurden,

dann lebten die DTC positiven Patienten im Median 2 Monate länger. Bei diesem Vergleich wurde nicht zwischen Knochenmark- und Lymphknotenproben unterschieden. Dieses Resultat war ebenfalls nicht signifikant ($p=0,85$) (Tabelle 7).

Es wurde auch die Expression der unterschiedlichen CK untersucht. Die Patienten die CK 7 positive Proben hatten, lebten im Median 8 Monate länger, als die Patienten, die CK 7 negative Proben besaßen. Dieser Vergleich war nicht signifikant ($p=0,57$). Bei A45-B/B3 negativen Proben lebten die Patienten im Median 2 Monate länger als die Patienten, die A45-B/B3 negativ waren. Das Ergebnis war nicht signifikant ($p=0,86$). Zuletzt wurden noch die doppelt positiven Proben mit den negativen Proben verglichen. Die Patienten mit doppelt positiven Proben für A45-B/B3 und CK 7 lebten im Median 2 Monate länger, als die Patienten mit negativen Proben. Auch hier bestand keine Signifikanz ($p=0,78$) (Tabelle 7).

Tabelle 7: Überlebensanalysen der CCA-Patienten

Überlebensanalysen der CCA-Patientenkohorte (n = 88)				
Risikofaktor	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	Medianes Gesamtüberleben (Monate)	p-Wert	Relatives Risiko (95% Konfidenzintervall)	p-Wert
Alter: <69 (n = 42) vs ≥ 69 (n = 46)	23,0 vs 4,0	0,01	2,22 (1,26 - 3,93)	0,01
Geschlecht: weiblich (n = 43) vs männlich (n = 45)	16,0 vs 7,0	0,40	-	n.s.
T-Kategorie: pT1-2 (n = 44) vs pT3-4 (n = 38)*	23,0 vs 6,0	<0,01	2,51 (1,43 - 4,42)	<0,01
N-Kategorie: pN0 (n = 44) vs pTN1-3 (n = 36)**	14,0 vs 14,0	0,91	-	n.s.
M-Kategorie: M0 (n = 67) vs M1 (n = 21)***	15,0 vs 7,0	0,08	-	n.s.
Grading: G1-2 (n = 47) vs G3-4 (n = 29)****	23,0 vs 6,0	0,03	-	n.s.
Residualtumor: R0 (n = 66) vs R1-2 (n = 18)*****	15,0 vs 1,0	0,01	-	n.s.
UICC: I-II (n = 47) vs III-IV (n = 40)*****	19,0 vs 6,0	0,06	-	n.s.
KM-DTC ^{negativ} (n = 65) vs KM-DTC ^{positiv} (n = 23)	14,0 vs 16,0	0,79	-	n.s.
LK-DTC ^{negativ} (n = 3) vs LK-DTC ^{positiv} (n = 4)	40,0 vs 14,0	0,07	-	n.s.
DTC ^{negativ} (n = 62) vs DTC ^{positiv} (n = 26)	12,0 vs 16,0	0,85	-	n.s.
CK7 ^{negativ} (n = 81) vs CK7 ^{positiv} (n = 7)	14,0 vs 22,0	0,57	-	n.s.
A45-B/B3 ^{negativ} (n = 76) vs A45-B/B3 ^{positiv} (n = 12)	14,0 vs 16,0	0,86	-	n.s.
A45-B/B3 oder CK7 ^{negativ} (n = 69) vs A45-B/B3 oder CK7 ^{positiv} (n = 19)	14,0 vs 16,0	0,78	-	n.s.

Abkürzungen & Erläuterungen: T-Kategorie = Primärtumorgröße; N-Kategorie = Lymphknotenmetastasen; M-Kategorie = Fernmetastasen; DTC = disseminierte Tumorzelle; KM = Knochenmark; LK = Lymphknoten; n.s. = nicht signifikant in multivariater Analyse; * von 6 Patienten histologische Daten des Primärtumors nicht vorhanden; ** von 6 Patienten histologische Daten der Lymphknoten nicht vorhanden; *** von 1 Patienten unbekannter Metastasen-Status; **** von 12 Patienten histologische Daten des Primärtumors nicht vorhanden beziehungsweise nicht auswertbar bei Zustand nach Chemotherapie; ***** von 4 Patienten histologische Daten der Resektionsränder des Primärtumors nicht vorhanden; ***** von 1 Patienten klinische Daten nicht vorhanden

3.4 Gesamt-aCGH-Analyse

3.4.1 Profile von DTC aus den Lymphknotenproben

Mit Hilfe der *Genomic Workbench* Software von Agilent wurden von allen 8 Lymphknotenproben einzelne aCGH-Profile erstellt. Die Amplifikationen stellten sich mit positiven *Logratio*-Zahlen dar und wurden mit roten Balken visualisiert. Die Deletionen stellten sich mit negativem *Logratio*-Zahlen dar und wurden mit grünen Balken angezeigt. Von allen 8 Lymphknotenproben wurden die Daten zusammengefasst und auf dem entsprechenden Chromosom abgebildet. So konnten für jedes Chromosom die Zugewinne und Verluste der DNA bewertet werden.

Dabei konnte festgestellt werden, dass vor allem die Chromosomen 6, 10, 22 und Y deutliche DNA-Verluste aufwiesen. Wohingegen die Chromosomen 15, 20 und X Zugewinne zeigten. Allerdings entstanden auch gemischte Profile. So zeigte der Chromosomenarm 3p starke Verluste, wohingegen auf dem Chromosomenarm 3q starke Zugewinne zu sehen sind. Gleiches galt für das Chromosom 8. Auch hier waren Verluste im Chromosomenarm 8q zu sehen und wiederum Zugewinne im Chromosomenarm 8q. Ebenfalls zeigte der Chromosomenarm 17p Verluste und 17q Zugewinne (Abb. 21).

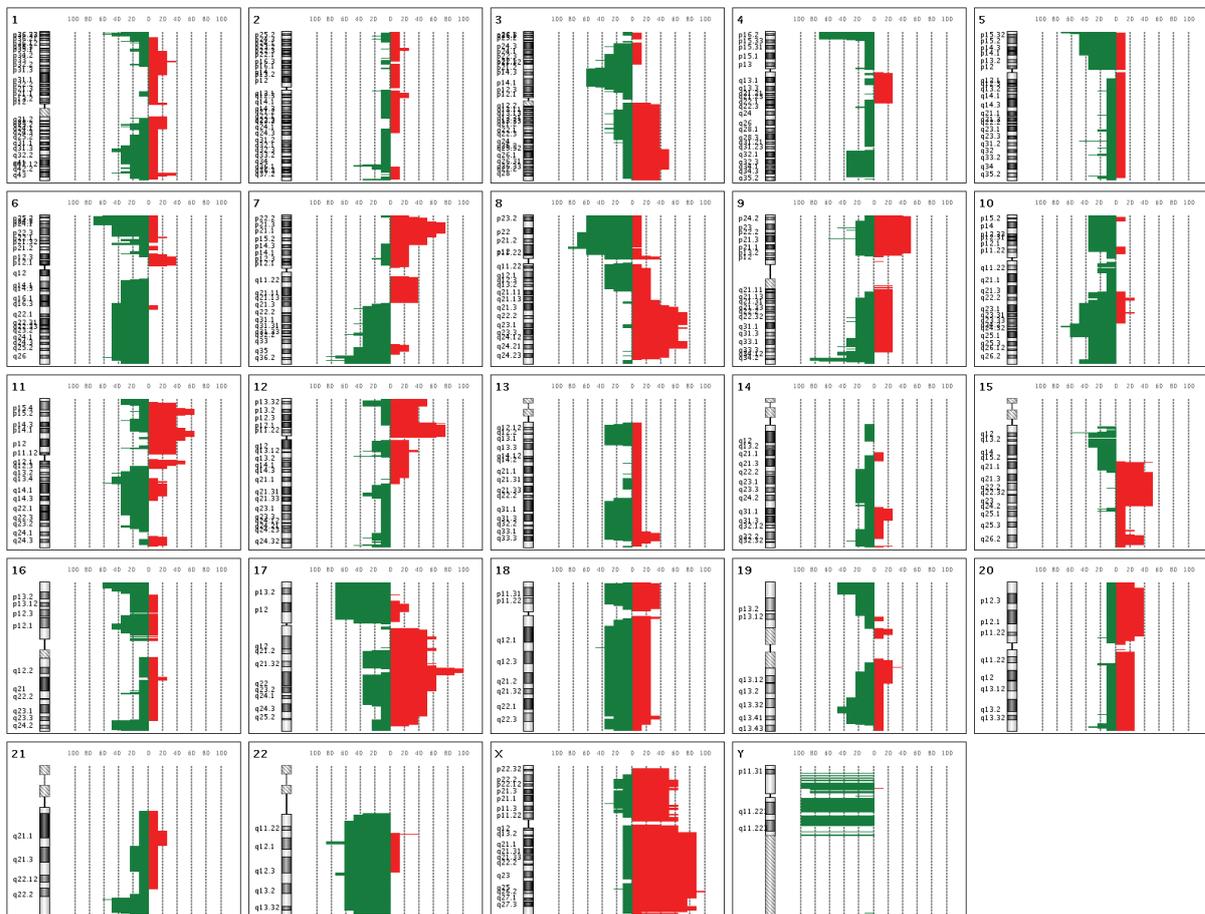


Abb. 21: Zusammenfassender *Penetrance Plot* der 8 Lymphknotenproben. Zu sehen sind links in den jeweiligen Graphiken die Chromosomen 1 – 22 und die entsprechenden Geschlechtschromosomen X und Y. Alle Zugewinne sind mit roten Balken und alle Verluste mit grünen Balken dargestellt. In dieser Gesamtübersicht sind die Signale aller 8 Lymphknotenproben auf den jeweiligen Chromosomen zusammengefasst.

3.4.2 Profile von DTC aus den Knochenmarksproben

Auch in dieser Auswertung wurden alle aCGH-Profile der 14 Knochenmarksproben zusammengefasst auf einem Chromosom dargestellt. Dabei zeigten die Chromosomen 13, 18 und 21 DNA-Zugewinne, wohingegen auf dem Chromosom 4 eindeutige DNA-Verluste zu erkennen sind. Bei den restlichen Chromosomen sind die Zugewinne und Verluste überwiegend ausgeglichen. Insgesamt fällt auf, dass die Knochenmarksproben in ihrer Gesamtheit ein deutlich heterogeneres DNA-Profil haben als die Lymphknotenproben. Dies zeichnet sich auch in der geringeren Signalstärke der Amplifikationen und Deletionen aus, die an den geringeren *Logratio*-Zahlen abzulesen sind (Abb. 22).

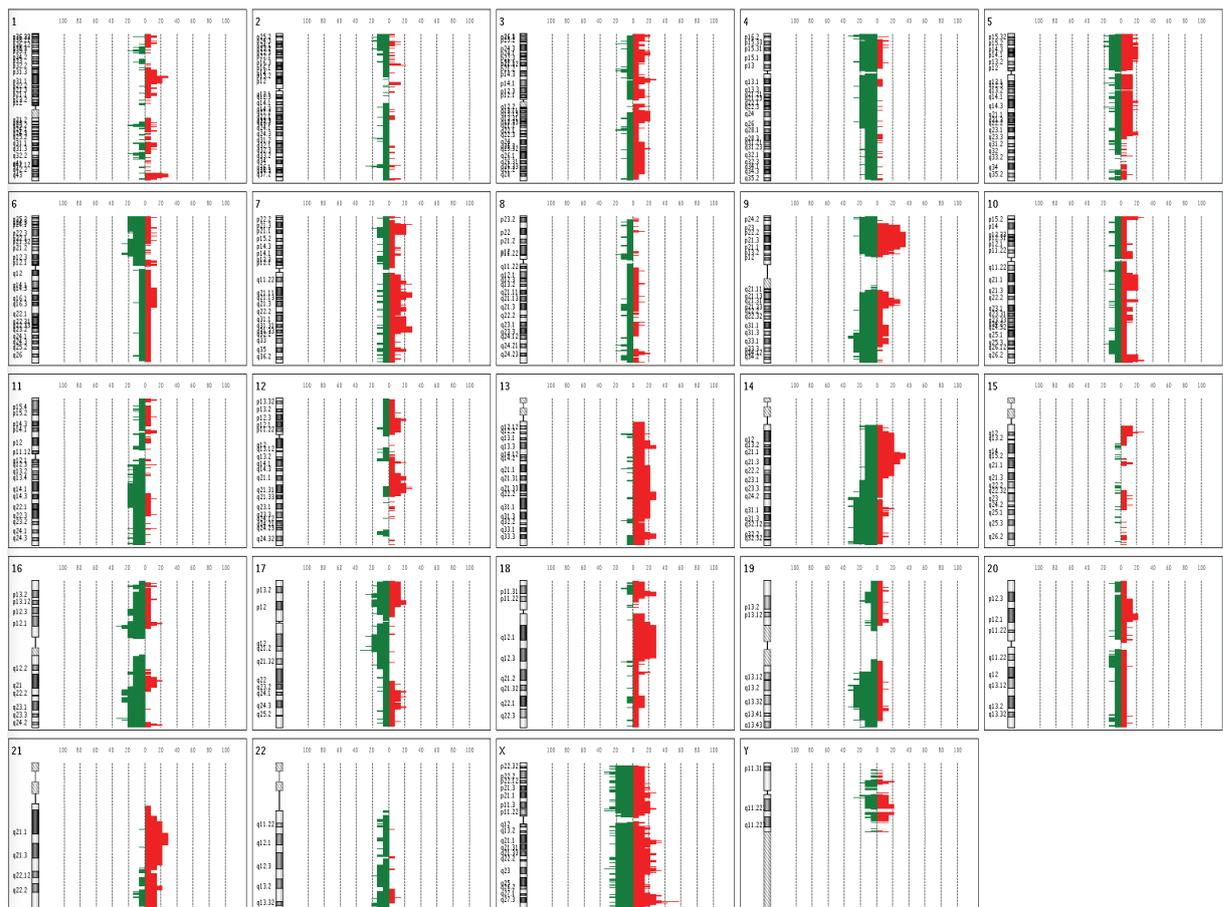


Abb. 22: Zusammenfassender Penetrance Plot der 14 Knochenmarksproben. Zu sehen sind links in den jeweiligen Graphiken die Chromosomen 1 – 22 und die entsprechenden Geschlechtschromosomen X und Y. Alle Zugewinne sind mit roten Balken und alle Verluste mit grünen Balken dargestellt. In dieser Gesamtübersicht sind die Signale aller 14 Lymphknotenproben auf den jeweiligen Chromosomen zusammengefasst.

3.4.3 Vergleichende Analyse der aberranten Genome von KM-DTC und LK-DTC

Zuletzt wurden die aberranten Genome von den KM-DTC mit den aberranten Genomen der LK-DTC verglichen. Die KM-DTC hatten im Median ein 9,98 % aberrantes Genom, wohingegen die LK-DTC ein 34,34 % aberrantes Genom hatten. Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,01$). Die Ergebnisse wurden in einem Streudiagramm dargestellt (Abb. 23). Die Kopienzahlveränderungen von KM-DTC und LK-DTC hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben.

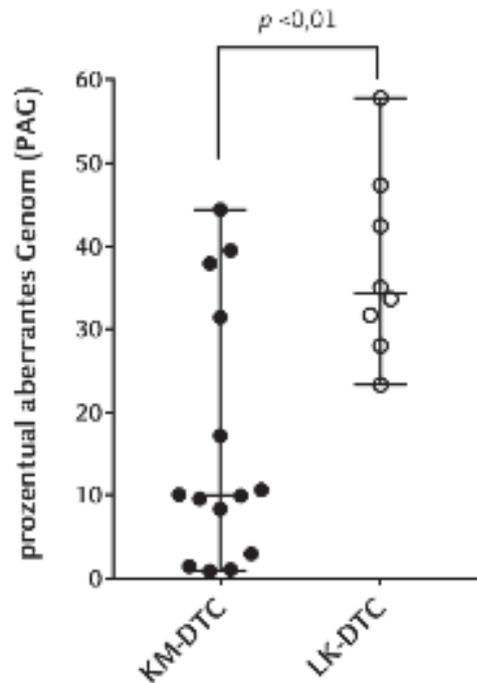


Abb. 23: Streudiagramm zur Darstellung des prozentual aberranten Genoms: Auf der Ordinate sind prozentualen Abweichungen der Genome abzulesen. Die Abszisse benennt die Probenkohorte (KM-DTC – disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark; LK-DTC – disseminierte Tumorzellen aus den Lymphknoten). Jeder Punkt steht stellvertretend für ein CGH-Profil der entsprechenden Probenkohorte.

3.5 Vergleichende kumulative Darstellung aller DTC-Proben

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten chromosomalen Zugewinne und Deletionen von KM-DTC und LK-DTC wurden in Gegenüberstellung mit den Primärtumoren aus der *Progenetix*-Datenbank verglichen. Die *Progenetix*-Datenbank ist eine *online*

Bibliothek für aCGH-Profile, in die Untersucher ihre Daten hochladen können. Insgesamt standen zu diesem Zeitpunkt 54 Profile von Primärtumoren von CCA-Patienten zur Verfügung.

In dieser Gesamtdarstellung ist noch einmal zu erkennen, dass die Knochenmarksproben ein deutlich heterogeneres DNA-Profil haben als die Lymphknotenproben. Die Lymphknotenproben zeigen dagegen stärkere Verluste oder Zugewinne. Bei der differenzierten Betrachtung der KM-DTC und der LK-DTC im Vergleich zu den Primärtumoren sind auch Gemeinsamkeiten zu sehen. Auf den Chromosomen 3p, 4 und 6 sind sehr ähnliche Verluste abzulesen. Wohingegen auf den Chromosomen 7 und 8 ähnliche Muster der Amplifikationen zu sehen sind (Abb. 24).

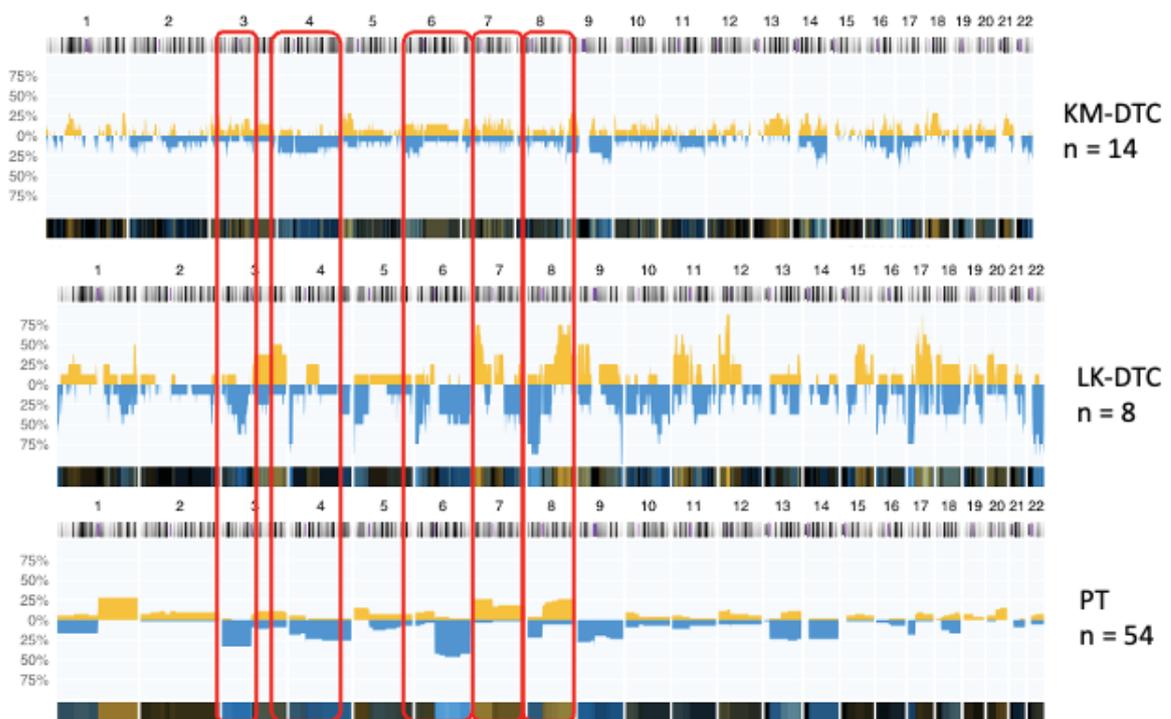


Abb. 24: Vergleichende kumulative Darstellung: In dieser Abbildung sind die DNA-Profile der Knochenmarksproben (KM-DTC), der Lymphknotenproben (LK-DTC) und der primären Tumoren vom CCA (PT) zu sehen. Die erste Abszisse zeigt die durchnummerierten Chromosomen. Auf der zweiten Abszisse sind die Amplifikationen (gelb) und die Deletionen (blau) abzulesen. Die dritte Abszisse zeigt die *Heatmap* der jeweiligen Chromosomen. Die Ordinate gibt Zugewinne oder Verluste in Prozent an. Die rotmarkierten Kästen heben die Bereiche auf den Chromosomen hervor, die die gleichen Muster zeigen.

4 Diskussion

Das CCA hat zwar nur einen Anteil von 2 % an allen Karzinomen, allerdings tritt es zunehmend in den westlichen Industrienationen auf und hat eine Relevanz für die deutsche Bevölkerung. Die Patienten präsentieren sich häufig bereits in einem fortgeschritteneren Tumorstadium. Vor allem der Metastasen- und der Lymphknoten-Status sind die wichtigsten Determinanten auf das postoperative Outcome [31]. Auch wenn die Patienten als operabel eingestuft werden, ist die postoperative Morbidität, zum Beispiel beim pCCA, mit 13 % sehr hoch. Betrachtet man die Langezeitbeobachtung von > 90 Tagen liegt die Morbidität beim pCCA sogar bei 38 % [32].

Die in dieser Studie erhobenen klinischen Daten der Patientenkohorte mit einem CCA unterstützen die Aussage, dass es sich um einen aggressiven Tumor handelt. Es konnte gezeigt werden, dass das höhere Alter der Patienten zu einer höheren Morbidität führt ($p=0,01$). Auch ein fortgeschrittener Tumor, der sich in seiner zunehmenden Größe präsentiert ($p<0,01$) und wenig ausdifferenziert ist ($p=0,03$), geht mit einer schlechteren Prognose auf das Gesamtüberleben einher. Ebenfalls verstarben die Patientin früher, wenn Tumorreste nach einer Operation im Körper verblieben ($p=0,01$). Alle diese Parameter waren in dieser Arbeit signifikant.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ältere Patienten ($p=0,01$) ein 2,22-fach und Patienten mit einem großen Tumor ($p<0,01$) ein 2,51-fach erhöhtes Risiko haben früher zu versterben. Beide Ergebnisse waren signifikant.

Zahlreiche Studien über Mamma-Karzinom-Patientinnen haben bereits gezeigt, dass das Vorhandensein von DTC im KM mit einer ungünstigen Prognose auf das Überleben einhergehen [33, 34].

Diese Arbeit hat überprüft, ob es möglich ist, mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung DTCs im Knochenmark und im Lymphknoten zu detektieren. In einem weiteren Schritt wurde die klinische Aussagekraft von DTCs als Prognosefaktor für das Gesamtüberleben von CCA-Patienten analysiert.

Die selbst etablierte Immunfluoreszenzfärbung war reproduzierbar und lieferte zum Teil neue Ergebnisse. In einer Studie von Alex-Panabières et al wurde von Krebspatienten mit verschiedenen Tumorentitäten, worunter keine CCA-Patienten waren, eine Detektionsrate von 20% an DTC im Knochenmark publiziert [35]. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal für die Kohorte der CCA-Patienten ebenfalls eine Detektionsrate von 27 % an KM-DTC und deckt sich somit mit der publizierten Aussage, dass circa jeder vierte bis fünfte Krebspatientin KM-DTC aufweist.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass die CCA-Patienten, die im KM-DTCs vorwiesen, im Median 2 Monate länger lebten (16 versus 14 Monate) als die Patientin, die keine DTCs im KM hatten. Dagegen lebten die Patienten, die keine DTCs in den Lymphknoten hatten, im Median 26 Monate (40 versus 14 Monate) länger als die Patienten mit DTC positiven Lymphknoten. Jedoch verstarben die DTC negativen Patienten im Median 4 Monate früher als die DTC positiven Patienten (12 versus 16 Monate). Dieses Resultat kommt dadurch zustande, dass die Patienten, die LK-DTC negativ waren, positive KM-DTCs aufwiesen. Ebenso ist die statistische Aussagekraft der Lymphknotenproben mit n=7 niedrig. In der Gesamtschau konnte hier keine klinische Signifikanz der DTC für das mediane Gesamtüberleben der CCA-Patienten festgestellt werden. Allerdings zeigte die Betrachtung innerhalb der Untergruppen von LK-DTC eine Tendenz zum längeren Überleben, wenn die DTC negativ waren. Somit sind weitere Analysen notwendig, um die These zu unterstützen, dass die DTC als Prognosefaktor für CCA-Patienten geeignet sind.

In der Literatur sind für das iCCA Zugewinne auf den Chromosomen 1q und 7p und auf den Chromosomen 4q, 3p, 6q, 9p, 9q, 13q und 17p Verluste beschrieben [36]. Diese Ergebnisse werden auch mit den Daten aus der *Progenetix*-Datenbank der Primärtumoren vom CCA unterstützt (Abb. 24). Diese Arbeit liefert die ersten Daten von LK-DTC und KM-DTC von CCA-Patienten überhaupt. Bei den LK-DTC und KM-DTC dieser Studie konnten die Verluste auf dem Chromosom 7p bestätigt werden. In dieser Kohorte zeigten interessanterweise die LK-DTC auf dem Chromosom 1q mehr Verluste als Zugewinne, wohingegen die KM-DTC mehr Zugewinne aufwiesen. Die Verluste auf den Chromosomen 4q, 17p und 9q konnten sowohl bei den LK-DTC als auch bei den KM-DTC nachgewiesen werden. Beim den Chromosomen 3p und 6q bestätigten die LK-DTC deutliche Verluste, wohingegen die KM-DTC ein heterogenes

DNA-Profil mit Gewinnen und Verlusten ergaben. Beim Chromosom 9p bestätigten wiederum die KM-DTC die Verluste und die LK-DTC zeigten in der Gesamtheit mehr Zugewinne. Die KM-DTC zeigten beim Chromosom 13q mehr Amplifikationen und die die LK-DTC bestätigten erneut die Deletion aus der Publikation. In der Gesamtheit betrachtet zeigten die KM-DTC prozentual weniger Alterationen als die LK-DTC. Dies konnte auch in einer vergleichenden Clusteranalyse der beiden Gruppen mit einem signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) nachgewiesen werden. Die LK-DTC hatten ein 24% aberranteres Genom als die KM-DTC. Dieser Umstand kann ein Erklärungsansatz sein, warum die die LK-DTC vorwiegend die publizierten Ergebnisse bestätigen und die KM-DTC zum Teil abweichen. Da die Aberrationen der LK-DTC deutlicher ausfallen, sind sie auch leichter zu interpretieren. Es bleibt die Frage, welche Aussagekraft sich hinter dieser Analyse verbirgt und welche Theorie der Tumor-Progression unterstützt wird.

Viele Studien konnten zeigen, dass eine frühe Ausbreitung von unterschiedlichen Zellen, die parallel zum Primärtumor koevolutionäre Veränderungen durchlaufen, zu Metastasen führen [17, 37-39]. Für diese Beobachtung spricht das heterogene DNA-Profil der KM-DTC, da diese Profile kein klares Muster von Amplifikationen und Deletionen im Vergleich zum Primärtumor aufweisen. Somit könnten diese Ergebnisse in Richtung der parallelen Progression gedeutet werden.

Auf der anderen Seite gibt es viele Publikationen die eine lineare Progression der Metastasenbildung beschrieben haben, wo die Genmodifikationen in der Masse des Primärtumors entstanden sind [35, 40-44]. Für diese Theorie würden vor allem die DNA-Profile der LK-DTC sprechen, die ähnliche Genom-Aberrationen haben, welche auch die Primärtumore aufweisen.

Zusammenfassend kann es möglich sein, dass beide Theorien der Tumorprogression korrekt sind. Schließlich konnte in den Ergebnissen auch gezeigt werden, dass es durchaus Bereiche auf den Chromosomen gab, wo sowohl bei den KM-DTC als auch den LK-DTC und Primärtumoren Kongruenz herrschte. Somit bleibt eine gewisse Heterogenität der Ergebnisse.

In eine reflektierte Schlussfolgerung gehört auch, dass der Primärtumor der CCA-Patienten aus verschiedenen Bereichen des biliären Traktes stammt. In dieser Studie

wurden die Primärtumoren aus den iCCA, pCCA und dCCA als gleiche Tumorentität angesehen. Dies kann ebenfalls zu einem heterogenen Resultat beitragen. Gerade in Hinblick auf die verschiedenen Theorien von der Ursprungszelle eines CCA, die in der Einleitung erklärt wurden, kann eine Subspezifizierung des CCA sinnvoll sein. Diese Studie leistet eine Pionierarbeit auf dem Feld der DTC vom CCA. Weitere Analysen sind notwendig, um zu zeigen, ob die distinkten genetischen Veränderungen der DTCs einen Einfluss auf die Progression und die Metastasierung beim CCA haben.

In den weiteren Untersuchungen sollte auch kritisch berücksichtigt werden, dass die Analyse-Technologien mittlerweile weiter fortgeschritten sind. Die Kosten für die erste Sequenzierung des menschlichen Genoms im Jahr 2001 betrug 3 Milliarden US-Dollar und dauerte 13 Jahre [45]. 2009 sanken die Kosten bereits auf 100.000 US-Dollar pro Sequenzierung [45]. Als 2014 mit dieser Arbeit begonnen wurde, waren *Microarrays* immer noch kosteneffektiver und verlässlicher als die damals beliebte RNA-Sequenzierung [46]. Deswegen wurden damals für diese Studie zur Analyse die *Microarrays* ausgewählt.

Unter dem Sammelbegriff des *next-generation sequencing* (NGS) stehen heute neuere und günstigere Analyse-Verfahren zur Verfügung. Der Vorteil der NGS besteht in der einzelbasengenauen Analyse des menschlichen Genoms und ist unabhängig von vorselektierten Zielen auf der DNA [47]. Somit ermöglichen diese neuen Technologien unbekannte Genveränderungen aufzudecken und sollten in die Überlegung weiterer Forschungsversuche einbezogen werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Forner, A., et al., *Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma*. Liver Int, 2019. **39 Suppl 1**: p. 98-107.
2. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF) *Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome Langversion 3.0*. 2022, AWMF-Registernummer: 032/053OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-biliaere-karzinome/2022>.
3. Rizvi, S. and G.J. Gores, *Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Cholangiocarcinoma*. Gastroenterology, 2013. **145**(6): p. 1215-1229.
4. Razumilava, N. and G.J. Gores, *Classification, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013. **11**(1): p. 13-21 e1; quiz e3-4.
5. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), *Krebs in Deutschland für 2017/2018 13. Ausgabe*. Berlin, 2021: p. 56-59.
6. Khan, S.A., S. Tavolari, and G. Brandi, *Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors*. Liver Int, 2019. **39 Suppl 1**: p. 19-31.
7. Kamsa-ard, S., et al., *Risk Factors for Cholangiocarcinoma in Thailand: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Asian Pac J Cancer Prev, 2018. **19**(3): p. 605-614.
8. Isayama, H., et al., *Clinical guidelines for primary sclerosing cholangitis 2017*. J Gastroenterol, 2018. **53**(9): p. 1006-1034.
9. Khan, S.A., et al., *Cholangiocarcinoma*. Lancet, 2005. **366**(9493): p. 1303-14.
10. Rodrigues, P.M., et al., *Pathogenesis of Cholangiocarcinoma*. Annu Rev Pathol, 2020.
11. Berthiaume, E.P. and J. Wands, *The molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma*. Semin Liver Dis, 2004. **24**(2): p. 127-37.
12. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
13. Micalizzi, D.S., S.M. Farabaugh, and H.L. Ford, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 117-34.
14. Gonzalez, D.M. and D. Medici, *Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition*. Sci Signal, 2014. **7**(344): p. re8.
15. Wang, H., et al., *Circulating and disseminated tumor cells: diagnostic tools and therapeutic targets in motion*. Oncotarget, 2017. **8**(1): p. 1884-1912.
16. Stoecklein, N.H. and C.A. Klein, *Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis*. Int J Cancer, 2010. **126**(3): p. 589-98.
17. Klein, C.A., *Parallel progression of primary tumours and metastases*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 302-12.
18. Kasper, M., et al., *Histological evaluation of three new monoclonal anti-cytokeratin antibodies. I. Normal tissues*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1987. **23**(2): p. 137-47.
19. Cabibi, D., et al., *Expression of cytokeratin 7 and 20 in pathological conditions of the bile tract*. Pathol Res Pract, 2003. **199**(2): p. 65-70.
20. Liu, L.Z., et al., *CK7/CK19 index: A potential prognostic factor for postoperative intrahepatic cholangiocarcinoma patients*. J Surg Oncol, 2018. **117**(7): p. 1531-1539.
21. Pantel, K., et al., *Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 1993. **53**(5): p. 1027-31.

22. Pantel, K., et al., *Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(17): p. 1419-24.
23. Pantel, K., et al., *Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(15): p. 1162-8.
24. Hosch, S., et al., *Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 6836-40.
25. Scheunemann, P., J.R. Izbicki, and K. Pantel, *Tumorigenic potential of apparently tumor-free lymph nodes*. N Engl J Med, 1999. **340**(21): p. 1687.
26. Klein, C.A., et al., *Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4494-9.
27. Kallioniemi, A., et al., *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. Science, 1992. **258**(5083): p. 818-21.
28. du Manoir, S., et al., *Quantitative analysis of comparative genomic hybridization*. Cytometry, 1995. **19**(1): p. 27-41.
29. Knijnenburg, J., et al., *Optimized amplification and fluorescent labeling of small cell samples for genomic array-CGH*. Cytometry A, 2007. **71**(8): p. 585-91.
30. Chari, R., W.W. Lockwood, and W.L. Lam, *Computational methods for the analysis of array comparative genomic hybridization*. Cancer Inform, 2007. **2**: p. 48-58.
31. Khan, A.S. and L.A. Dageforde, *Cholangiocarcinoma*. Surg Clin North Am, 2019. **99**(2): p. 315-335.
32. Gilbert, T.M., et al., *Long-term morbidity after surgery for perihilar cholangiocarcinoma: A cohort study*. Surg Oncol, 2022. **45**: p. 101875.
33. Hartkopf, A.D., et al., *Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients - results from a large single-centre analysis*. Eur J Cancer, 2014. **50**(15): p. 2550-9.
34. Wiedswang, G., et al., *Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(18): p. 3469-78.
35. Alix-Panabieres, C., S. Riethdorf, and K. Pantel, *Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5013-21.
36. Sia, D., et al., *Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies*. Oncogene, 2013. **32**(41): p. 4861-70.
37. Klein, C.A., *Cancer. The metastasis cascade*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1785-7.
38. Husemann, Y., et al., *Systemic spread is an early step in breast cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 58-68.
39. Klein, C.A. and N.H. Stoecklein, *Lessons from an aggressive cancer: evolutionary dynamics in esophageal carcinoma*. Cancer Res, 2009. **69**(13): p. 5285-8.
40. Pantel, K., C. Alix-Panabieres, and S. Riethdorf, *Cancer micrometastases*. Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(6): p. 339-51.
41. Pantel, K. and C. Alix-Panabieres, *Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives*. Trends Mol Med, 2010. **16**(9): p. 398-406.
42. Janni, W., et al., *The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence*. Cancer, 2005. **103**(5): p. 884-91.
43. Riethdorf, S., H. Wikman, and K. Pantel, *Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients*. Int J Cancer, 2008. **123**(9): p. 1991-2006.
44. Kang, Y. and K. Pantel, *Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients*. Cancer Cell, 2013. **23**(5): p. 573-81.

45. Sboner, A., et al., *The real cost of sequencing: higher than you think!* Genome Biol, 2011. **12**(8): p. 125.
46. Mantione, K.J., et al., *Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq.* Med Sci Monit Basic Res, 2014. **20**: p. 138-42.
47. Hu, T., et al., *Next-generation sequencing technologies: An overview.* Hum Immunol, 2021. **82**(11): p. 801-811.

Danksagung

Meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein und meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Birte Möhlendick bin ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und der ausgezeichneten Betreuung sehr dankbar. Ebenso möchte ich mich bei dem gesamten Laborteam um Prof. Stoecklein bedanken. Sie haben mich alle tatkräftig unterstützt und waren allzeit ansprechbar. Mein Dank gilt auch den Ärzten der Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf, die die Knochenmarksproben und die Lymphknotenproben bereitgestellt haben. Bedanken möchte ich mich auch bei den ärztlichen Kollegen der Universität Dresden, die weitere Knochenmarksproben zur Bearbeitung bereitgestellt haben. Ohne dieses wertvolle Patientenmaterial wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank auch Frau Brandt, die mich tatkräftig mit den *Follow-up* Daten der Patienten versorgt hat.

Ich möchte besonders hervorheben, dass all diese Menschen auch Abseits des experimentellen Alltags durch Menschlichkeit und enorme Zuwendung überzeugten. Jeder zukünftige Doktorant kann sich glücklich schätzen, mit Ihnen/euch zusammenzuarbeiten.

Einen besonderen Dank möchte ich auch meiner Frau Gülsah Ökmen und meiner Familie widmen. Sie alle haben mich unterstützt und motiviert, diese Doktorarbeit fertigzustellen. Dank dieses Rückhalts konnte der stressige Berufsalltag eines Arztes in Einklang mit einer parallelen Promotion gebracht werden.

Ebenso möchte ich mich bei meinem besten Freund Matthias Kissing bedanken, der mir bei der Korrektur geholfen hat.

Vielen Dank an Sie/euch alle!