

Interphasezytogenetik mit DNA-Sonden für Chromosom 8 zur Detektion zirkulierender Tumorzellen beim Mammakarzinom

B. M. Ghadimi^{1,2}
J. Uhr³
Th. Tucker³
Kerstin Heselmeyer-Haddad²
G. Auer⁴
Th. Ried²
H. Becker¹

Interphase Cytogenetics with DNA-Probes for Chromosome 8 to Detect Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients

Zusammenfassung

Der Mikrometastasenachweis im Knochenmark bzw. Blut wird bei soliden epithelialen Tumoren zunehmend zum sensitiveren Tumorstaging benutzt. Der Nutzen der herkömmlichen Nachweismethoden epithelialer Antigene wie durch RT-PCR oder Immunhistochemie wird durch die oft mangelnde Spezifität kontrovers diskutiert. In der vorgestellten Studie wurde durch den direkten Nachweis der tumorspezifischen Chromosom 8 Alteration versucht, zirkulierende Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit Mammakarzinomen unterschiedlicher Stadien spezifisch zu detektieren. In einer geblindeten Studie wurden sowohl Abklatschpräparate primärer Mammakarzinome sowie zirkulierende Tumorzellen aus dem Blut derselben Patientinnen untersucht. Zirkulierende Tumorzellen wurden durch immunmagnetische Zellanreicherung aus dem Blut isoliert und auf einen Objektträger zentrifugiert. Auf diesen Zytospins erfolgte im zweiten Schritt eine 2-Farben Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit Zentromerproben 7 und 8. Nach Analyse von 27 Patientinnen mit unterschiedlichen benignen und malignen Mammatumoren können wir zeigen, daß das Alterationsmuster des Chromosom 8 zwischen Primärtumor und zirkulierenden Tumorzellen identisch ist. Weiterhin zeigt sich eine stadienabhängige Nachweisrate zirkulierender Tumorzellen beim duktalem Mammakarzinom. Bei den benignen Mammatumoren zeigten sich in keinem Fall Chromosom 8 Alterationen im peripheren Blut. Überraschend war, daß sich bei 2 der 4 untersuchten Patientinnen mit einem T1N0 Mammakarzinom im peripheren Blut Tumorzellen nachweisen ließen. Die vorgelegte Studie demonstriert erstmalig, daß mit Hilfe der Interphasezytogenetik

Summary

The detection of micrometastases in the bone marrow or peripheral blood of cancer patients is increasingly used for a more sensitive tumor staging and prognostication. The potential value of the currently used techniques for the detection of epithelial antigens by RT-PCR or immunohistochemistry in respect of specificity is currently controversially discussed. In the present study we demonstrate a new approach which enables the direct visualization of the tumor specific alteration of chromosome 8 in circulating tumor cells. We have therefore studied breast cancer patients with various tumor stages and tried to determine the frequency of circulating tumor cells in the peripheral blood by using interphase cytogenetics for chromosome 7 and 8. Imprints of primary breast cancers and cytopins with circulating tumor cells of corresponding patients were studied in a blinded fashion. The blood samples were generated by immunomagnetic enrichment of circulating tumor cells from peripheral blood by ferrofluid and centrifugation onto cover slips. These cytopins were then hybridized with centromer probes 7 and 8. After analyzing 27 patients with benign as well as malignant breast tumors we can demonstrate that the chromosomal pattern between malignant tumor and corresponding circulating tumor cells is identical. Furthermore, the detection of circulating tumor cells directly correlates with the primary tumor stage. We did not find any cells with chromosome 8 alterations in the patients with benign disease. Surprisingly, even in early breast cancers (T1N0) interphase cytogenetics identified circulating tumor cells in 2 out of 4 patients. In conclusion, interphase cytogenetics represent a non-invasive, sensitive and specific assay for the direct visualiza-

Institutsangaben

- ¹Klinik für Allgemein Chirurgie, Georg-August-Universität Göttingen
²National Cancer Institute, NIH, USA
³Institute of Immunology, Southwestern Medical Center, Dallas, USA
⁴Cancer Center Karolinska, Stockholm, Sweden

Korrespondenzadresse

Dr. med. B. M. Ghadimi · Klinik für Allgemein Chirurgie · Universitätsklinikum Göttingen · Robert Koch-Straße 40 · 37075 Göttingen · e-mail: mghadimi@surgery-goettingen.de

Bibliografie

Zentralbl Chir 2001; 126: 922-925 © J. A. Barth Verlag in MVH Medizinverlage Heidelberg GmbH & Co. KG · ISSN 0044-409X

zirkulierende Tumorzellen beim Mammakarzinom sensitiv und spezifisch nachgewiesen werden können. Inwieweit diese Zellen eine prognostische Einschätzung zulassen, werden größere prospektive Studien zeigen.

Schlüsselwörter

Mammakarzinom · Mikrometastasen · Chromosom 8 · Interphasazytogenetik · Tumorstaging

tion of circulating tumor cells in the peripheral blood. The prognostic value of these findings remains to be further evaluated in larger prospective studies.

Key words

Breast cancer · Micrometastases · Chromosome 8 · Interphase cytogenetics · Tumorstaging

Mammakarzinome zählen in Europa und Nordamerika zu den häufigsten soliden Malignomen überhaupt. Die Metastasierung dieser Tumoren ist die wichtigste Ursache für die krebisbezogene Mortalität der betroffenen Patientinnen. Die Entwicklung und Einsatz adjuvanter oder palliativer Therapiestrategien ist in hohem Maße von einem präzisen Tumorstaging abhängig. Das heutige Tumorstaging ist nach wie vor maßgeblich durch die klinisch-pathologische Diagnostik bestimmt. In den letzten Jahren wurde allerdings durch die Entwicklung von Techniken wie der Immunhistochemie und PCR-basierten Methodiken versucht, zirkulierende und damit metastatische Tumorzellen sowohl im Blut wie auch im Knochenmark nachzuweisen. Insbesondere der Nachweis epithelialer Epitope, wie z.B. Zytokeratine, Mucine, Mammaglobin und CEA wird als prognostischer Faktor bei soliden Tumoren wie Mamma- und kolorektalen Karzinomen benutzt [1, 2, 3, 8, 13, 17, 19].

Mit solchen Ansätzen könnten neue Marker für das Tumorstaging und die Indikationsstellung zusätzlicher Therapiestrategien bestehen. Als problematisch erscheint neben der oft niedrigen Spezifität das fehlende prognostische Potential der benutzten Marker. Aus diesem Grund wäre neben dem Nachweis einer Mikrometastasierung, insbesondere auch eine genetische Charakterisierung der zirkulierenden Tumorzellen von hohem klinischen Interesse. Solch eine tumorbiologische Charakterisierung könnte Aufschluß über das individuelle Risikopotential geben und so über eine individualisierte Tumorthherapie entscheiden. Ein weiterer Nachteil, insbesondere der Studien, die lediglich eine immunhistochemische Anfärbung der Tumorzellen unternommen haben, war die deutlich niedrigere Sensitivität gegenüber PCR-basierten Techniken. Eine Möglichkeit, die Sensitivität zu erhöhen, besteht in der immunomagnetischen Anreicherung unter Verwendung von Ferrofluid und epithelialen Antikörpern. Damit konnte eine Tumorzelle unter 10^6 normalen Blutzellen nachgewiesen und eine Sensitivität wie bei PCR-basierten Ansätzen erreicht werden [12, 16].

Mammakarzinome zeigen ein spezifisches rekurrentes Muster chromosomaler Alterationen, die auch durch Verwendung spezifischer DNA-Sonden im Interphasenukleus durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nachweisbar sind. Insbesondere das Chromosom 8 zeigt in den meisten Fällen einen Gewinn [4], welcher durch entsprechende Zentromerproben nachgewiesen werden kann. Der Vorteil der FISH-Technologie besteht darin, daß diagnostische und prognostische (z.B. erbB2) DNA-Sonden auf Tumorzellen unter Verwendung verschiedener Chromophore gleichzeitig hybridisieren und diese damit diagnostiziert und spezifiziert werden können. In der vorgestellten Arbeit haben wir Interphase-FISH verwandt, um einzelne zirkulierende Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit organbegrenzten Mammakarzinomen zu detektieren. Die Isolation von zirkulierenden Tumorzellen wurde durch immunomagnetische Anrei-

cherung unter Verwendung von Ferrofluid und epithelialen Antikörpern vorgenommen.

Patienten und Methodik

Patientinnen

Die Studie erfolgte einfach geblindet, so daß erst nach Auswertung der FISH-Experimente retrospektiv das Tumorstadium bekannt wurde. Die histologische Einteilung der Tumoren erfolgte nach der UICC-Nomenklatur. Es wurden ausschließlich invasive ductale Mammakarzinome untersucht.

Tumorimprints und Blutzytospins

Nach schriftlicher Einwilligung der Patientinnen wurden Abklatschpräparate (Imprints) aus dem aufgeschnittenen Tumor vorgenommen. Die Objektträger wurden anonymisiert markiert, luftgetrocknet und in einer Alkoholreihe fixiert, dehydriert und bei -20°C gelagert. Patientendaten, wie Alter und Tumorstadium wurden nach erfolgter Auswertung retrospektiv im Sinne einer geblindeten Studie erfaßt. Außerdem wurde von den gleichen Patientinnen sowie Kontrollpersonen 10 ml Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Bei den Tumorpatientinnen wurde das Blut präoperativ entnommen. Für die immunomagnetische Tumorzellanreicherung benutzen wir das System der Firma Immunicon (Huntingdon Valley, PA). Dabei wurden monoklonale Antikörper gegen „epithelial cell adhesion molecule“ (EPCAM) benutzt, die an epitheliale Zellen binden. Es wurde der EPCAM-Antikörper GA73.3 (freundlicherweise bereitgestellt durch D. Herlyn, Wistar Institute, Philadelphia) an kleinste Eisenpartikel (= ferrofluid) gebunden (für eine detaillierte Beschreibung, siehe [10]). Das Blut wurde mit dieser „ferrofluid“ für 15 min inkubiert und danach für 10 min einem magnetischen Feld zur Zellseparation ausgesetzt. Die durch das magnetische Feld isolierte Zellfraktion wurde dann nach Entfernung des Blutes durch einen Puffer resuspendiert und auf einen Objektträger als Zytospin zentrifugiert (für eine detaillierte Beschreibung siehe [15]).

Interphase-FISH

Zentromer spezifische Proben für die Chromosomen 7 und 8 (Vysis) wurden zur Hybridisierung auf die Zytospins benutzt, um Tumorzellen nachzuweisen. Die Zentromer Proben 7 und 8 wurden in einem 2-Farben-FISH-Experiment ko-hybridisiert. Die Zentromer 8 Probe diente zur Detektion der Tumorzellen, die Zentromer 7 Probe als interne Kontrolle einer suffizienten Hybridisierung (Chromosom 7 ist bei Mammakarzinomen nicht verändert). Die FISH-Experimente erfolgten nach Standardmethoden [7] und wurden durch ein Leica DMRXA Mikroskop mit einer CCD Kamera (Sensys, Photometrics, Tucson, AZ) und Leica Q-FISH Software aufgenommen. Fünfhundert Zellen pro Zytospin wurden standardmäßig analysiert.



Abb. 1 Zwei-Farben-FISH-Experiment an Zellen, die durch Ferrofluid aus dem Blut isoliert werden. Hier wurde die Zelllinie SKBR-3 ins Blut gesunder Probanden gegeben und isoliert. Die Abbildung zeigt eine Ko-Hybridisierung mit DNA-Sonden für Chromosome 7 (in rot) und 8 (in grün). Außerdem immunhistochemische Anfärbung gegen Zytokeratin (rot) und Kerngegenfärbung (blau). Man sieht eine etwas größere Zelle, die rötlich gefärbt ist und Zytokeratine exprimiert. Sie weist im Nukleus zwei rote Punkte als Zeichen der Diploidie für Chromosom 7 und ein Signal in grün für die bekannte Monosomie 8 der Zelllinie SKBR-3 auf. Die kleinere Zelle zeigt keine Expression von Zytokeratin (nicht rötlich gefärbt, keine epitheliale Tumorzelle) und zeigt diploide Signale für Chromosom 7 und 8 auf.

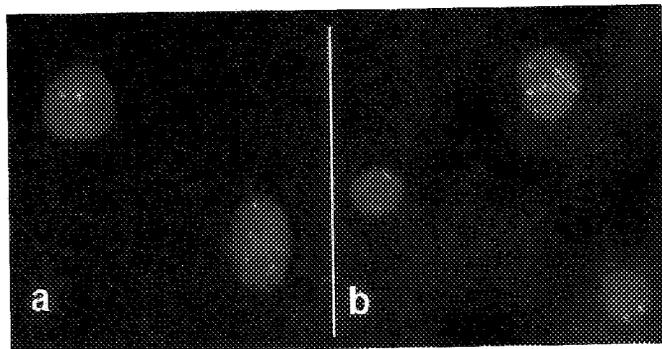


Abb. 2 In dieser Abbildung wird ein Paar aus Abklatschpräparat (a) eines Mammakarzinoms und aus einem Blutzytospin (b) der gleichen Patientin gezeigt. Hier wurden DNA-Sonden für Chromosom 8 (gelb) zur Detektion von Tumorzellen verwendet. Die Nuklei sind mit einer roten Kerngegenfärbung angefärbt. Es zeigt sich, daß das chromosomale Alterationsmuster im Abklatschpräparat identisch zu dem im Blutzytospin ist (Pentasonomie). Die internen Kontrollen mit Chromosom 7 sind in dieser Abbildung nicht gezeigt.

Tab. 1 Zusammenfassung der TNM-Stadien sowie der Interphase-FISH Ergebnisse der untersuchten Mammakarzinome

Stadium	n	Imprint	Blutzytospin
T1N0	4	4/4	2/4
T1N1	4	4/4	3/4
T2N1	5	5/5	3/5
T3N1	4	4/4	4/4

Ergebnisse

Vor Beginn der Studie mit primärem humanen Material wurde die angewandte FISH-Technik für diese Experimente zunächst mit der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 optimiert. Dabei wur-

den die Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen in humanes Blut suspendiert und über Ferrofluid wieder isoliert. Die Zelllinie SKBR3 weist eine Monosomie für das Chromosom 8 auf, welche in dem Zweifarben-FISH-Experiment verifiziert werden konnte (Abb. 1). Die APAAP-Färbung gegen Zytokeratin zeigt die epitheliale Herkunft der Zelle. In den durchgeführten Verdünnungsreihen mit der Zelllinie SKBR3 konnte gezeigt werden, daß mit der immunomagnetischen Anreicherung und nachfolgender Interphase-FISH etwa 1 Tumorzelle aus 1 ml Blut isoliert und detektiert werden kann.

In der durchgeführten Studie erfolgte die Analyse von 6 gesunden Kontrollpersonen und 27 Patientinnen mit benignen Veränderungen der Brust (Fibroadenome und Mastopathien) sowie Karzinomen unterschiedlicher Stadien (Tab. 1). Es wurden jeweils „matched pairs“ für jede Patientin angefertigt, die aus einem Abklatschpräparat des Brustgewebes und dem dazu gehörigen Zytopsin aus dem Blut stammen (Abb. 2). Die angefertigten Präparate wurden mit einer Nummer versehen und geblendet analysiert. In der Kontrollgruppe der gesunden Probanden (n = 6) wurden in keinem Fall Zellen mit chromosomalen Veränderungen im peripheren Blut gefunden.

Die Gruppe der Patientinnen mit benignen Mammaveränderungen bestand aus 8 Patientinnen, die histologisch ein Fibroadenom oder eine Mastopathie aufwiesen. In diesen Fällen zeigten sich ausschließlich diploide Zellen in den Imprints sowie in den Zytopsinen. Chromosomale Alterationen waren nicht nachweisbar. In vier der vier untersuchten Imprints der T1N0 Mammakarzinome fanden sich entweder eine Trisomie, Tetrasomie sowie Pentasonomie des Chromosoms 8 in der Majorität der analysierten Zellen. Die restlichen Zellen der Imprints wiesen lediglich zwei Kopien der Zentromer 8 Probe auf. In den dazu korrespondierenden Blutzytopsinen konnten in zwei Fällen zirkulierende Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Zahl der detektierten Tumorzellen in allen Blutzytopsinen war größer als 2% der ausgezählten Zellen (> 10 Tumorzellen pro 500 ausgezählter Zellen). Das Muster chromosomaler Alterationen war in jedem Fall im Imprint und im korrespondierenden Zytopsin identisch (z. B. Pentasonomie für Zentromer 8 im Imprint und ebenfalls Pentasonomie im Zytopsin, s. Abb. 2). Bei den T1N1 (n = 4) Mammakarzinomen fanden sich in allen Primärtumoren entsprechende Zentromer 8 Alterationen, welche in 3 der 4 Zytopsinen zu detektieren waren. In der Gruppe der T2N1 Karzinome (n = 5) wurden ebenfalls in allen Primärtumoren chromosomale Veränderungen gefunden. Hier konnten bei 3 der 5 Patientinnen ebenfalls zirkulierende Tumorzellen im Blut nachgewiesen werden. Bei den lokal fortgeschrittenen T3N1 Mammakarzinomen (n = 4) zeigten sich bei allen Patientinnen sowohl im Imprint als auch im Blut Tumorzellen (Tab. 1).

Diskussion

In den letzten Jahren wurde durch die Anwendung neuer Techniken der molekularen Zytogenetik gezeigt, daß alle soliden epithelialen Tumoren ein spezifisches und rekurrentes Muster chromosomaler Veränderungen aufweisen. Dieses ist durch Gewinne bzw. Verluste ganzer Chromosomen, Chromosomenarme oder -abschnitte gekennzeichnet [16]. Aus klinischer Sicht sind diese chromosomalen Alterationsmuster interessant, da sie 1) spezifisch für einen malignen Tumor sind und 2) direkt mit Hilfe von

DNA-Sonden auch im klinischen Präparat nachweisbar sind. Sie können daher zur Tumordiagnostik und additiv zum verbesserten Tumorstaging eingesetzt werden [5]. In der modernen Onkologie gehört der Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Knochenmark bzw. im Blut (Minimal Residual Disease) zunehmend zum Tumorstaging [14]. Die Detektion metastastischer Einzelzellen beim Mammakarzinom erfolgt in der Regel über den immunhistochemischen bzw. PCR-basierten Nachweis epithelialer Epitope als indirekten Hinweis auf zirkulierende Tumorzellen. Die Probleme sind evident, da neben der Existenz von Pseudogenen auch die ektope Expression epithelialer Antigene die Spezifität solcher Testsysteme erniedrigt [1, 3, 11]. Aus diesem Grund haben wir in der vorgestellten Studie den direkten Nachweis tumorspezifischer chromosomaler Veränderungen mit Hilfe von FISH-Analysen gewählt. Wir konnten zeigen, daß FISH-Analysen in Kombination mit einer immunomagnetischen Tumorzellanreicherung sensitiv und spezifisch sind. Der Vorteil liegt darin, daß über den direkten Nachweis von Tri-, Tetra- bzw. Pentasomien des Chromosoms 8 Tumorzellen spezifisch nachgewiesen werden können. Wir konnten zeigen, daß die detektierten zirkulierenden Tumorzellen die gleiche zytogenetische Alteration aufwiesen wie der korrespondierende Primärtumor. Dies bedeutet, daß im Falle ausschließlicher Trisomien 8 im Primärtumor, diese auch bei den im Blut nachgewiesenen Tumorzellen vorlag. Bei Primärtumoren, die z.B. gemischt Trisomien und Pentasomien des Chromosoms 8 aufwiesen, konnten wir ein entsprechendes Muster auch in den Tumorzellen im Blut finden. Der zytogenetische Nachweis mikrometastatischer Tumorzellen bei soliden epithelialen Tumoren wurde kürzlich erstmalig publiziert [9]. Allerdings wurde in dieser Studie eine Tumorzelllinie aus mikrometastatisch durchsetzten Lymphknoten eines Ösophaguskarzinoms gewonnen und durch Multicolor-FISH untersucht. Bei dieser Zelllinie konnte eine Insertion des Chromosoms 13 in das Chromosom 1 gefunden werden. Der Nachweis zytogenetischer Abberationen mit Hilfe von Zelllinien und Spectral Karyotyping bzw. Multicolor-FISH wird sicher für die experimentelle Tumorforschung interessant bleiben, aber aufgrund der Komplexität der Methoden nicht im klinischen Alltag als Routinetechnik Einzug halten. Der von uns beschriebene Ansatz mit Hilfe der Interphasezytogenetik ist ein deutlich einfacherer und praktikabler Weg, der es auch erlaubt, größere Probenmengen in einem adequate Zeitraum zu analysieren. Voraussetzung ist allerdings, daß die zu untersuchende chromosomale Alteration für die jeweilige Tumorentität bekannt ist. Die Interphasezytogenetik bietet auch den großen Vorteil, neben chromosomalen DNA-Sonden auch prognostisch wichtige Gen-Sonden simultan zu verwenden. Durch einen solchen Ansatz könnten gleichzeitig mehrere eingesetzte Sonden eine umfassende Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen ermöglichen [18]. Die Signifikanz für das klinische Management onkologischer Patienten wäre enorm.

Weiterhin demonstrieren unsere Daten, daß selbst bei frühen Tumorstadien des Mammakarzinoms, wie T1N0, ein signifikanter Anteil der Patientinnen zirkulierende Tumorzellen aufweist. Dieser Anteil steigt entsprechend des Tumorstadiums an und erreicht bei der kleinen Fallzahl (n = 4) der fortgeschrittenen Karzinome (T3N1) 100%. Es ist unwahrscheinlich, daß bei all diesen Patientinnen ein metastatisches Tumorleiden vorliegt. Die Überlebensfähigkeit und insbesondere das metastatische Potential dieser Zellen kann mit dem von uns angewandten Assay sicher nicht erfaßt werden. Faktum bleibt aber, daß diese Tumorzellen

die ersten Schritte der Metastasierungskaskade [6] erfolgreich passiert haben. Die prognostische Relevanz eines solchen Tumorzellnachweises bleibt zumindestens in dieser Studie offen und muß durch größere prospektive Studien mit entsprechend langen Nachbeobachtungszeiten geklärt werden.

Literatur

- Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 1813–1820
- Castells A, Boix L, Bessa X, Gargallo L, Pique JM. Detection of colonic cells in peripheral blood of colorectal cancer patients by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1998; 78: 1368–1372
- Eltahir EM, Mallinson DS, Birnie GD, Hagan C, George WD, Purushotham AD. Putative markers for the detection of breast carcinoma cells in blood. *Br J Cancer* 1998; 77: 1203–1207
- Forozan F, Mahlamaki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, Gooden GC, Ethier SP, Kallioniemi A, Kallioniemi OP. Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res* 2000; 60: 4519–4525
- Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Auer G, Ried T. Interphase cytogenetics: at the interface of genetics and morphology. *Anal Cell Pathol* 1999; 19: 3–6
- Ghadimi BM, Schlag PM. Tumormetastasierung: Molekulare Mechanismen und potenzielle Therapieoptionen. *Chirurg* 1998; 69: 1315–1322
- Ghadimi BM, Schröck E, Walker RL, Wangsa D, Jauho A, Meltzer P, Ried T. Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 154: 525–536
- Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S, Watanabe H, Ogawa M, Nakamura Y. Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet* 1995; 345: 1257–1259
- Hosch S, Kraus J, Schenemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schumacher U, Witter K, Speicher MR, Pantel K. Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 6836–6840
- Kemshead JT, Hancock JP, Libert PA. A model system for the enrichment of tumor cells from peripheral blood and bone marrow using immunomagnetic ferrofluids. *Prog Clin Biol Res* 1994; 389: 593–600
- Lambrechts AC, van't Veer LJ, Rodenhuis S. The detection of minimal numbers of contaminating epithelial tumor cells in blood or bone marrow: use, limitations and future of RNA-based methods. *Ann Oncol* 1998; 9: 1269–1276
- Naume B, Borgen E, Beiske K, Herstad TK, Ravnas G, Renolen A, Trachsel S, Thrane-Steen K, Funderud S, Kvalheim G. Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated breast carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood. *J Hematother* 1997; 6: 103–114
- Pantel K, Braun S, Schlimok G, Riethmüller G. Micrometastatic tumour cells in bone marrow in colorectal cancer. *Lancet* 1993; 341: 501
- Pantel K, von Knebel Doeberitz M. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 95–101
- Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LWMM, Uhr JW. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 4589–4594
- Ried T, Liyanage M, du Manoir S, Heselmeyer K, Auer G, Macville M, Schrock E. Tumor cytogenetics revisited: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J Mol Med* 1997; 75: 801–814
- Soeth E, Vogel I, Roder C, Juhl H, Marxsen J, Kruger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 1997; 57: 3106–3110
- Slovak ML, Tcheurekdjian L, Zhang FF, Murata-Collins JL. Simultaneous detection of multiple genetic aberrations in single cells by spectral fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 2001; 61: 831–836
- Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2015–2019