

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. H. Einsele

**Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) in venösem  
Vollblut von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren**

Untersuchungen in vitro

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Nadine Müller**  
aus Höchberg

Würzburg, Oktober 2016

Referent: **Prof. Dr. med. V. Kunzmann**  
Medizinische Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg

Koreferent: **PD Dr. med. A. Wiegering**  
Chirurgische Klinik I der Universität Würzburg

Dekan: **Prof. Dr. med. M. Frosch**

Tag der mündlichen Prüfung: 07. August 2017

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Zirkulierende Tumorzellen.....	1
1.2 Methoden zum Nachweis von CTCs.....	3
1.2.1 Isolierung von CTCs aus venösem Vollblut.....	4
1.2.2 Detektion von CTCs.....	5
1.2.3 Kombinierte Verfahren .....	8
1.2.4 Neueste Entwicklungen.....	9
1.3 CTCs als prognostischer und prädiktiver Marker bei soliden Tumoren .....	12
1.3.1 Prognoseabschätzung bei metastasierten soliden Tumoren .....	12
1.3.2 CTCs bei nicht-metastasierten Tumoren.....	20
<b>2 Ziele der Untersuchungen</b> .....	22
<b>3 Material und Methoden</b> .....	23
3.1 Patienten.....	23
3.2 Zellbiologische Techniken .....	23
3.2.1 Zellen.....	23
3.2.2 Kultur der Zelllinien.....	24
3.2.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen .....	25
3.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	25
3.3 Antikörper .....	26
3.3.1 Antikörper für die FACS-Analyse .....	26
3.3.2 MicroBeads für das MACS-Verfahren.....	26
3.4 Waschpuffer und Lösungen .....	27
3.5 Methoden.....	28
3.5.1 Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Gradient).....	28
3.5.2 MACS .....	28
3.5.3 FACS-Analyse .....	29
3.6 Geräte.....	30
3.7 Statistische Analyse.....	31

<b>4 Ergebnisse</b> .....	32
4.1 Vorversuche .....	32
4.1.1 Nachweisgrenze EpCAM-positiver Tumorzellen in der FACS-Analyse.....	32
4.1.2 Anreicherung EpCAM-positiver Tumorzellen durch MACS .....	35
4.1.3 Anreicherung und relativer Verlust von Monozyten durch MACS .....	36
4.1.4 Relativer Verlust von Tumorzellen durch Dichtegradientenzentrifugation .....	38
4.1.5 Absoluter Verlust von Monozyten durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS ...	39
4.1.6 Absoluter Verlust von Tumorzellen durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS ..	40
4.1.7 Verlust von Tumorzellen durch Lyse von Erythrozyten .....	42
4.1.8 Untersuchung von Patientenmaterial mit Isotypkontrolle und Negativkontrolle .....	42
4.1.9 Leukozytendepletion mithilfe von MACS .....	44
4.2 Ergebnisse des Patientenkollektivs .....	46
4.2.1 Protokoll.....	46
4.2.2 Normalspender .....	47
4.2.3 Patienten .....	49
<b>5 Diskussion</b> .....	58
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	70
Abkürzungsverzeichnis .....	71
Literaturverzeichnis.....	74
Danksagung	
Lebenslauf	

# 1 Einleitung

## 1.1 Zirkulierende Tumorzellen

Die Prognose von Patienten mit malignen Tumorerkrankungen hängt unabhängig von der Größe des Primärtumors von der Existenz von Metastasen im Knochenmark oder in peripheren Organen wie zum Beispiel der Leber, der Lunge oder des Gehirns ab. Vorhandene Organmetastasen (Tumorstadium M1) stellen hier trotz neuartiger Kombinationschemotherapie und Targeted Therapy den limitierenden Faktor für das Überleben der Patienten dar und sind für die meisten tumorbedingten Todesfälle verantwortlich. Aus diesem Grund erhalten viele Tumorpatienten im M0-Stadium eine adjuvante Chemotherapie, um eventuell vorhandene Mikrometastasen zu eradizieren.

Da moderne hochauflösende Bildgebungsverfahren und Serummarker wie zum Beispiel das CEA beim Kolorektalen Karzinom nur unzureichend Informationen über eine beginnende Metastasierung und das Outcome der Patienten liefern können, besteht in der Onkologie die dringende Notwendigkeit, neue sensitive Methoden zur Detektion einer Tumordissemination und zum Echtzeit-Monitoring der Effektivität der Anti-Tumor-Therapie zu entwickeln[1].

Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (Circulating tumor cells, CTCs) ist daher einer der meist beforschten Ansätze zum Nachweis von Tumordissemination. Mittlerweile existieren über 400 klinische Studien, die CTCs als neuen Biomarker für solide Tumoren propagieren.

CTCs sind maligne Zellen, die entweder von einem Primärtumor oder von manifesten Organmetastasen stammen und frei im peripheren Blut von Tumorpatienten zirkulieren, jedoch nicht bei Gesunden oder bei Patienten mit benignen Erkrankungen vorkommen[2]. Sie sind oft schon in der frühen Wachstumsphase des Primärtumors in der Blutbahn zu finden und können in peripheren Organen Metastasen ausbilden. CTCs weisen eine hohe Heterogenität auf und sind noch nicht vollständig charakterisiert[3]. Ihre Malignität gilt aufgrund ihrer Aneuploidie als nachgewiesen[4].

Nach Schätzungen in präklinischen Modellen sterben die meisten CTCs in der Zirkulation ab und nur etwa 0,01% der ursprünglich vorhandenen CTCs können die Ausbildung von Metastasen oder auch Sekundärmetastasen herbeiführen[5]. Wenn die CTCs sich nach dem Verlassen der Blutbahn als Tumorzellcluster im Knochenmark oder in peripheren Organen angesiedelt und Mikrometastasen gebildet haben, werden sie disseminierte Tumorzellen (Disseminated tumor cells, DTCs) genannt[6]. Mit dem Nachweis von DTCs ist eine MRD (minimal residual disease) vorhanden. Dabei gilt das Knochenmark als Indikatororgan für eine MRD. Da DTCs im Knochenmark trotz hochauflösender Bildgebung nicht sichtbar gemacht werden können, kann man sie nur mittels Knochenmarkspunktion gewinnen. Obwohl im Knochenmark häufig DTCs von metastasierten soliden Tumoren zu finden sind[7], ist es in zahlreichen Studien nicht gelungen, DTCs als unabhängigen prognostischen Marker zum Beispiel beim Mamma-Karzinom darzustellen[8–12]. Braun et al. konnten jedoch in einer Meta-Analyse einen deutlichen Zusammenhang von DTCs im Knochenmark und einer schlechteren Prognose bei Mamma-Karzinom-Patientinnen finden[13]. Nach der Resektion des Primärtumors können DTCs oder Mikrometastasen jahrelang in einem Ruhezustand verweilen, bevor sie Metastasen ausbilden, was die Aussage über die Prognose der Patienten erschwert[14].

Da DTCs nur mit einer geringen Inzidenz bei Tumorpatienten nachweisbar sind und nur mit einer gewissen Invasivität gewonnen werden können, hat man sich in der Folgezeit auf den Nachweis von CTCs konzentriert. Die Gewinnung von CTCs mittels Punktion einer peripheren Vene hat sowohl bei Ärzten als auch bei Patienten eine höhere Akzeptanz und gilt als minimal invasiver Zugang zu frühen Metastasierungsereignissen[15].

Nach neuen Erkenntnissen kann ein Teil der hoch aggressiven CTCs durch Rückwanderung in den Primärtumor dort sogar zum Rezidiv führen (sogenanntes Self-seeding oder Cross-seeding)[16].

CTCs sind keineswegs ausschließlich Gegenstand der heutigen Onkologie, sondern bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts Thema im Zusammenhang mit Tumorpatienten.

Im Jahr 1869 wurden CTCs erstmals von Thomas Ashworth, einem australischen Pathologen, beschrieben. Er entdeckte unter dem Mikroskop im Blut eines verstorbenen Tumorpatienten Zellen, die ihm zu Zellen des Primärtumors identisch erschienen[17]. Er verglich die Zellmorphologie der CTCs mit der Morphologie von Zellen aus verschie-

denen Tumormanifestationen im Körper des Patienten und kam zu dem Schluss, dass die CTCs durch einen Großteil der Zirkulation gewandert sein müssen, um vom Primärtumor zu anderen Organen im Körper zu gelangen[17].

Über ein Jahrhundert waren CTCs für die Analyse unzugänglich[18].

Mit Beginn der 80er Jahre konnten schließlich Fortschritte in der Detektion von CTCs im Blut gemacht werden. Mittels Immunhistochemie konnten erstmals Tumorzellen im Blut mit einer Detektionsrate von 1 CTC in  $10^4$  Blutzellen nachgewiesen werden[19]. Bei Patienten mit CTCs im Blut konnten häufiger Tumormanifestationen in Lymphknoten oder im Knochenmark diagnostiziert werden[20]. In den folgenden Jahrzehnten sind zahlreiche vielversprechende Verfahren zum Nachweis von CTCs im Blut entwickelt worden (siehe Kapitel 1.2).

Nachdem man CTCs mit relativ guter Sensitivität und Spezifität nachweisen konnte, konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf das Thema, welche Rolle CTCs bei der Diagnostik und Behandlung von Tumorpatienten spielen.

Heute wird folgendes Potential in CTCs gesehen[6, 21]: man möchte mithilfe des CTCs-Nachweises bei Tumorpatienten zusätzliche Informationen zur Vorhersage des Metastasierungsrisikos, des Metastasierungsfortschritts und der Prognose gewinnen. Außerdem soll durch die Untersuchung von CTCs ein Echtzeit-Monitoring des Therapieansprechens und eine Vorhersage über die Wirksamkeit von targeted therapy möglich sein. Somit soll der behandelnde Arzt neben Bildgebung und Serummarkern weitere wichtige Hilfen für seine Therapieentscheidungen erhalten.

## **1.2 Methoden zum Nachweis von CTCs**

Grundsätzlich sind zum Nachweis von CTCs zwei Schritte notwendig, die unabhängig voneinander oder in Kombination durchgeführt werden können. Zuerst müssen die CTCs aus dem Vollblut der Patienten isoliert und angereichert werden, um sie dann identifizieren und qualitativ und quantitativ analysieren zu können. Aufgrund ihrer Rarität in der Zirkulation (ca. 1 CTC pro  $10^6$  Leukozyten) sollten die Methoden eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen, um falsch negative und falsch positive

Ergebnisse zu vermeiden[1]. Dies stellt nach wie vor noch die größte Herausforderung beim Nachweis von CTCs dar.

### **1.2.1 Isolierung von CTCs aus venösem Vollblut**

Um CTCs von den restlichen Blutzellen zu trennen, nutzt man die physikalischen und biologischen Eigenschaften wie Größe, Dichte und Proteinexpression der verschiedenen Zellpopulationen.

#### **Isolierung von CTCs aufgrund morphologischer Eigenschaften**

Mit dem ISET-Mikrofilter (Isolation by size of epithelial tumor cells), der von Vona et al. entwickelt wurde, werden die CTCs aufgrund ihrer großen Größe (mindestens 8  $\mu\text{m}$ ) von den restlichen Blutzellen mit einer Sensitivität von 1 CTC/ml Blut getrennt[22]. Dieses Verfahren ist vergleichsweise günstig, schnell und einfach durchzuführen und hat den Vorteil, dass die Zellmorphologie der CTCs intakt bleibt und somit weitere Methoden wie Immunzytochemie oder Immunfluoreszenz im Anschluss angewendet werden können. Da manche CTCs auch durchaus kleiner als die 8  $\mu\text{m}$ -Filterpore sein können und somit verloren gehen[23], weist diese Methode jedoch eine eher geringe Spezifität auf.

Die Isolierung von CTCs mittels Dichtegradientenseparation basiert auf der unterschiedlichen Dichte der Zellpopulationen im Blut. CTCs und mononukleäre Zellen haben eine geringere Dichte als die Trennschicht und die restlichen Blutzellen ( $\leq 1.077$  g/ml) und können so einfach und unter dem Erhalt ihrer Vitalität gewonnen werden[24]. Ficoll Hypaque® arbeitet mit einer einfachen Trennflüssigkeit, Oncoquick® enthält zusätzlich noch eine Membran, die die Vermischung der Schichten nach der Zentrifugation verhindern soll[25] und RosetteSep® erleichtert durch bispezifische Antikörper zwischen Leukozyten und Erythrozyten die CTC-Isolation[26]. Dennoch entsteht bei diesen Verfahren aufgrund der geringeren Spezifität ein gewisser Verlust von CTCs[27].

Da die Größe von CTCs stark variieren kann, werden vermehrt Verfahren, die auf photoakustischen und photothermischen Methoden basieren, verwendet[28].



### **Isolierung von CTCs aufgrund immunologischer Eigenschaften**

Verfahren, die auf der spezifischen Proteinexpression von CTCs basieren, sind aufgrund ihrer höheren Spezifität weit verbreitet. Dabei werden entweder spezifische Marker für epitheliale Zellen wie EpCAM[29] oder Zytokeratine[30] oder tumorspezifische Marker wie beispielsweise Her2-Neu,  $\alpha$ -Fetoprotein oder CEA verwendet[31].

Sehr breite Anwendung findet die immunomagnetische Isolation von CTCs im MACS-Verfahren[32]. Dabei werden monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene von CTCs oder Leukozyten, die an magnetische MicroBeads gekoppelt sind, verwendet und die CTCs durch eine positive oder negative Selektion vom Leukozytenhintergrund getrennt. Dieses Verfahren hat im Vergleich zu Dichtegradientenseparationsverfahren eine höhere Wiederfindungsrate mit hoher Reproduzierbarkeit und Genauigkeit[33]. Es können jedoch durch Markierung von Nicht-Tumorzellen falsch-positive Ergebnissen und durch Antigenverlust bei CTCs falsch-negativen Ergebnissen entstehen[18, 31, 33].

Der von Nagrath et al. entwickelte CTC-Chip enthält mit EpCAM-Antikörpern beschichtete Säulen, auf denen die CTCs beim Durchpumpen der Blutprobe durch den Chip fixiert werden. So können CTCs ohne Zwischenschritte – und damit ohne große Verluste – unter Erhalt ihrer Vitalität isoliert werden. Mit dieser Methode konnten bei Patienten mit Malignomen der Lunge, des Kolons, der Mamma, der Prostata und des Pankreas eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität von annähernd 100% erreicht werden[34]. Dieses Verfahren fand bis jetzt jedoch nur in der Forschung Verwendung und wurde noch nicht in größeren Studien validiert.

### **1.2.2 Detektion von CTCs**

Da nach der Isolation von CTCs weiterhin einige Leukozyten in der Probe vorhanden sind, müssen die CTCs im Anschluss auf Einzelzellniveau identifiziert werden[35]. Dies kann entweder mithilfe von PCR-basierten Methoden geschehen oder mithilfe von Methoden, die auf den physikalischen Eigenschaften oder der Antigen-Charakteristik der CTCs basieren.

## **Nukleinsäurebasierte Methoden**

In den 90er Jahren erlebten molekulare Verfahren wie die PCR mit Detektionsraten von 1 CTC in  $10^6$  Zellen ihren Durchbruch im Nachweis von CTCs beim Prostata-Karzinom[36], beim Hepatozellulären Karzinom (HCC)[37] und beim Mamma-Karzinom[38].

Da mittels PCR im Blut nicht nur DNA von vitalen Tumorzellen, sondern auch freie DNA von abgestorbenen - für die Analyse irrelevanten - Tumorzellen nachgewiesen wird, ist diese Methode für den Nachweis von CTCs eher ungeeignet. Aus diesem Grund wird heute die RT-PCR zum Nachweis der etwas instabileren mRNA bevorzugt[7]. Mittels RT-PCR kann die Expression von Genen, die für epitheliale Zellen (zum Beispiel EpCAM oder CK), bestimmte Organe (zum Beispiel PSA für die Prostata) oder Malignome (zum Beispiel CEA für das Kolorektale Karzinom) spezifisch sind[7], analysiert werden. Somit erhält man einen indirekten Beweis für die Existenz von CTCs in der Zirkulation[21]. Die Anzahl an spezifischen Markern, die für die CTC-Detektion verwendet werden können, ist sehr groß. In verschiedenen Studien werden unterschiedlichste Marker verwendet. Xi et al. arbeiten beispielsweise beim Kolon-Karzinom mit TM4SF3 als Marker[39]. Findeisen et al. analysieren beim Kolon-Karzinom dagegen das SERPINB5-Gen[40]. Vaiopoulos et al. entwickelten für die CTC-Detektion bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom und Magen-Karzinom einen Multiplex-PCR-Assay, der die Expression von Zytokeratin 19 und 20 und des EGFR untersucht[41]. Ein Multimarker-Panel für das Kolorektale Karzinom wurde von Barbazán et al. an 50 Patienten getestet[42].

Mit der RT-PCR wird dabei generell die höchste Sensitivität bei der CTC-Detektion erreicht[43], außerdem ist sie ein günstiges Verfahren mit hoher Reproduzierbarkeit. Ein deutlicher Nachteil dieses Verfahrens besteht jedoch darin, dass die Tumorzellen für die Analyse lysiert werden müssen, dabei ihre Zellmorphologie verlieren und somit nicht mehr für immunologische Verfahren verwendet werden können. Außerdem können falsch-positive Ergebnisse durch Kontamination, Pseudogene, unspezifische Amplifikation[44–46] oder durch vermeintlich spezifische Marker wie das CEA oder CK, die unter Umständen auch von Leukozyten exprimiert werden können[47], entstehen.

Die Anzahl derartiger falsch-positiver Ergebnisse kann durch die Anwendung einer spezifischeren quantitativen qRT-PCR[48] oder einer Multimarker-RT-PCR[35] vermin-

dert werden.

### **Immunfluoreszenz-Verfahren**

Bereits 1990 konnten CTCs mittels Durchflusszytometrie mit einer Detektionsrate von 1 in  $10^4$  Blutzellen nachgewiesen werden[49]. Durch Verbesserungen der Technik wurden bald Detektionsraten von 1 CTC in  $10^6$  Zellen (ungefähr 1 CTC in 0,5ml Blut) erreicht[50].

Heute werden in vielen großen klinischen Studien Verfahren angewandt, die auf Immunfluoreszenz und Zytometrie basieren, da hierbei die Zellstruktur der CTCs erhalten bleibt[21]. Dabei wird die Expression von unterschiedlichen Antigenen auf der Zelloberfläche von CTCs und Blutzellen genutzt. Die Identifizierung und die quantitative Analyse der CTCs erfolgt mithilfe von monoklonalen Antikörpern, die an spezifische CTC-Antigene gekoppelt sind. Allerdings können bei der Verwendung verschiedener Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen unterschiedliche Ergebnisse entstehen, wie Antolovic et al. es für EpCAM-Antikörper beim Kolorektalen Karzinom zeigten[51]. Ein weiterer Nachteil dieser Methode besteht in der geringeren Sensitivität im Vergleich zu PCR-Verfahren[52, 53]. Daneben können durch die Identifizierung von Leukozyten, die ähnliche Antigene exprimieren, falsch-positive Ergebnisse entstehen[54].

Ein Versuch zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität wurde von Watanabe et al. mit einer Multifarben-Durchflusszytometrie unternommen[55].

Nur in der Forschung wird daneben die FAST-Technik (Fiber-optic array scanning technology) verwendet. Bei dieser Methode werden die CTCs fluoreszenzmarkiert und auf einem Objektträger identifiziert[56]. Dabei können CTCs ohne Anreicherungsschritte und damit verbundenem Zellverlust detektiert werden. Über den klinischen Nutzen der FAST existieren allerdings nur wenige Daten.

Einen anderen Ansatz verfolgt der EPISPOT (Epithelial immunospot), der auf ELISA-Technik (Enzyme-linked immunospot assay) basiert. Mit dem EPISPOT können Proteine, die von CTCs sezerniert werden, nachgewiesen werden[57]. Da nur vitale CTCs mit funktionierendem Stoffwechsel Proteine wie zum Beispiel CKs, MUC oder PSA synthetisieren können, sind abgestorbene CTCs von der Analyse automatisch ausgeschlossen.

### 1.2.3 Kombinierte Verfahren

Das CellSearch® System der Firma Veridex (Raritan, New Jersey, USA) stellt das führende automatische System zur CTC-Detektion dar. Als einziges System ist es von der U.S. FDA (Food and Drug Administration) für den klinischen Gebrauch freigegeben[1]. Es findet in großen CTC-Studien über das Colon-Karzinom, Mamma-Karzinom und Prostata-Karzinom Verwendung[18, 32, 33, 58, 59] (s. Kapitel 1.3). Standardmäßig werden für die CTC-Analyse 7,5ml venöses Vollblut verwendet. Nach der automatischen Trennung der Zellen vom Plasma werden die CTCs mit Ferro-Nanopartikeln, die an EpCAM-Antikörper gekoppelt sind, markiert und im CellTrackMagnet von den Blutzellen mittels magnetischer Separation getrennt. Anschließend erfolgt eine Färbung der Probe mit monoklonalen Antikörpern gegen die Zytokeratine CK8, CK18, CK19, CD45 und gegen DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) – einem Marker für Nucleinsäuren. Im CellTracksAnalyzer II – einem semiautomatischen 4-Kanal-Fluoreszenzmikroskop – wird die Probe gescannt und automatisch eine Abbildung erstellt, die im Anschluss von einem geübten Untersucher ausgewertet wird. CTCs werden als Zellen identifiziert, die DAPI und CK8/18/19 positiv und CD45 negativ sind. Die initiale Validierung des CellSearch® Systems erfolgte in einer Studie mit über 900 Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten[2]. Dabei konnte die hohe Sensitivität und Spezifität des Systems deutlich herausgestellt werden. Riethdorf et al. konnten bei Mamma-Karzinom-Patientinnen eine Wiederfindungsrate von 82% feststellen[60]. Tewes et al. beschrieben ebenfalls eine hohe Spezifität und Reproduzierbarkeit des Systems[33]. Die Nachteile des CellSearch® Systems bestehen in den hohen Kosten und der subjektiven visuellen Analyse.

Der AdnaTest kombiniert eine immunomagnetische Zellseparation mithilfe von Antikörpern gegen epitheliale und tumorspezifische Antigene mit einem qRT-PCR-Assay[61]. Verwendet wurde dieses System bis jetzt zur CTC-Detektion beim Kolon-Karzinom, Mamma-Karzinom und beim Prostata-Karzinom. Es weist eine hohe Sensitivität und Spezifität auf, lässt aber wenig Flexibilität und Spielraum für ergänzende Methoden.

Ozkumur et al. entwickelten kürzlich ein Verfahren, das eine größenbasierte hydrodynamische Zellseparation mit einer immunomagnetischen positiven oder negativen Se-

lektion verbindet, und nannten es „CTC-iChip“[62]. Aufgrund der geringen Größe des Mikrofluidik-Chips können nur geringe Blutvolumina untersucht werden, was den limitierenden Faktor dieser Methode darstellt.

#### **1.2.4 Neueste Entwicklungen**

Ein neues Verfahren zur Identifizierung lebender CTCs, die potentiell Metastasen ausbilden können, basiert auf der selektiven Akkumulation von photosensibilisierenden Molekülen in lebenden und malignen Zellen, die mittels photodynamischer Technik nachgewiesen werden können[63, 64]. Die gefilterten Zellen aus einer Probe von 7,5 ml Vollblut werden dabei mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), einem Zwischenprodukt der Hämbiosynthese, inkubiert. Von vitalen Zellen wird die 5-ALA in Protoporphyrin IX metabolisiert, das rot fluoresziert. Aufgrund der unterschiedlichen Enzymaktivität bei normalen und Tumorgewebe ist die 5-ALA-induzierte Protoporphyrin-IX-Akkumulation bei Tumorzellen höher als bei nicht-malignen Zellen[65] und damit zur Detektion von CTCs unabhängig von deren EpCAM-Expression geeignet.

Yabusaki et al. entwickelten für 8 verschiedene Tumorentitäten eine CTC-Detektionsmethode, die auf der Infektion mit einem rekombinanten Telomerase-spezifischen Adenovirus basiert[66]. Dabei wurden CTCs mittels Immunzytochemie als GFP-positive Zellen identifiziert.

Bei den oben beschriebenen Methoden zur CTC-Detektion kann jeweils nur ein limitiertes Blutvolumen untersucht werden. Da CTCs jedoch nur in geringer Anzahl in der Zirkulation vorhanden sind, sind sie in der zu untersuchenden Blutprobe nur schwer zu finden. Dieses Problem versuchte man durch die folgenden neuen Technologien zu lösen.

2011 wurde eine Auswaschung von CTCs aus dem Blut mittels Leukapherese zur anschließenden ex vivo Analyse mit FACS und RT-PCR propagiert. Eifler et al. zeigten, dass mittels Leukapherese  $13,5 \times 10^9$  mononukleäre Zellen mit 87%iger Effizienz gewonnen werden können[67]. Mit diesem Verfahren kann eine große Anzahl von CTCs in der Zirkulation analysiert werden. Es bedarf jedoch noch einer Optimierung, um die Belastung für den Patienten zu minimieren und das Verfahren an den klinischen Ge-

brauch zu adaptieren[35].

Der GILUPI® Nanodetektor, dessen Oberfläche mit EpCAM-Antikörpern beschichtet ist, wurde 2012 von Saucedo-Zeni et al. entwickelt. Der Detektor verbleibt für 30 Minuten in der Armvene des Patienten und kann CTCs in vivo binden. So können ca. 1,5 l Blut auf CTCs untersucht werden[68]. Die CTCs können im Anschluss für immunzytochemische oder PCR-basierte Analysen vom Detektor abgelöst werden. In klinischen Studien mit Bronchial-Karzinom-Patienten und Mamma-Karzinom-Patientinnen konnte gezeigt werden, dass mit dem GILUPI® Nanodetektor eine größere Anzahl an CTCs als mit dem CellSearch® System isoliert werden kann[68]. Um die Relevanz dieses Systems für den klinischen Gebrauch zu prüfen, bedarf es jedoch noch einer Validierung in großen Multicenter-Studien[35].

Auch trotz dieser großen Anzahl an verschiedenen Methoden zur Isolierung und Detektion von CTCs, existiert noch kein Verfahren, das eine optimale Sensitivität und Spezifität aufweist und gleichzeitig schnell, einfach und kostengünstig ist. Die Debatte um das optimale Verfahren ist in der Literatur allgegenwärtig. Dotan et al. bemängeln beispielsweise, dass viele Methoden noch nicht in großen Studien validiert worden sind[21]. Goodman et al. diskutieren auf der anderen Seite über den optimalen Cutoff im bereits validierten CellSearch System[69]. Dagegen propagieren Alix-Panabières et al. das CellSearch® System eindeutig als Goldstandard für die Detektion von CTCs[6]. Um abschließend einen Überblick über die zahlreichen Methoden zum CTC-Nachweis zu geben, sind die oben genannten Verfahren im Vergleich in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1:** Zusammenfassung und Vergleich von Methoden zur CTC-Isolation und -Detektion

	<b>Prinzip</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
<i>Physikalische Isolation</i>			
<b>ISET-Filter</b>	Separation aufgrund der Größendiskrepanz zwischen CTCs und normalen Blutzellen	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ einfach, schnell und günstig</li> <li>▪ minimaler Zellverlust</li> <li>▪ Erhalt der Zellmorphologie</li> <li>▪ Isolierung von EpCAM-negativen CTCs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ geringe Spezifität</li> <li>▪ Verlust von CTCs, die kleiner als die Filterpore sind</li> </ul>
<b>Dichtegradienten-Separation</b>	Separation aufgrund der Dichtediskrepanz zwischen verschiedenen Blutzellpopulationen	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ einfach und günstig</li> <li>▪ Erhalt der Zellmorphologie</li> <li>▪ Isolierung von EpCAM-negativen CTCs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ geringe Spezifität</li> </ul>
<i>Immunologische Isolation</i>			
<b>MACS</b>	Isolierung von CTCs mittels immunomagnetischen MicroBeads	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hohe Reproduzierbarkeit und Genauigkeit</li> <li>▪ Erhalt der Zellmorphologie</li> <li>▪ viele verschiedene Antikörper verfügbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ falsch-positive Ergebnisse durch Markierung von Nicht-Tumorzellen</li> <li>▪ falsch-negative Ergebnisse durch Antigenverlust bei CTCs</li> </ul>
<b>CTC-Chip</b>	Fixierung von CTCs auf mit EpCAM-Antikörpern beschichteten Mikrosäulen	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Erhalt der Zellvitalität</li> <li>▪ minimale Bearbeitung der Probe</li> <li>▪ sehr hohe Sensitivität und Spezifität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ nicht kommerziell verfügbar</li> <li>▪ fehlende Validierung in größeren Studien</li> </ul>
<i>Detektion</i>			
<b>PCR</b>	Analyse der Expression von Kandidatengen für epitheliale, organspezifische oder tumorspezifische Marker	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hohe Sensitivität</li> <li>▪ schnell und günstig</li> <li>▪ hohe Reproduzierbarkeit</li> <li>▪ geringes Probenvolumen ausreichend</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Verlust der Zellmorphologie</li> <li>▪ keine weiteren Analysen möglich</li> <li>▪ falsch-positive Ergebnisse durch Kontamination oder unspezifische Amplifikation</li> <li>▪ falsch-negative Ergebnisse aufgrund von geringen Expressionslevels</li> </ul>

<b>Zytometrie</b>	Detektion mittels monoklonaler Antikörper, die gegen Antigene auf der Oberfläche von CTCs gerichtet sind	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ günstig</li> <li>▪ Erhalt der Zellmorphologie</li> <li>▪ mit verschiedenen Isolationstechniken kombinierbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ falsch-positive Ergebnisse durch Identifizierung von Blutzellen, die ähnliche Antigene exprimieren</li> <li>▪ falsch-negative Ergebnisse durch Antigenverlust bei CTCs</li> </ul>
<b>FAST</b>	Identifizierung von fluoreszenzmarkierten CTCs auf einem Objektträger	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ keine vorherige Isolierung der CTCs notwendig</li> <li>▪ geringer Zellverlust</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ wenige Daten</li> <li>▪ nur in der Forschung verwendet</li> </ul>
<b>EPISPOT</b>	Nachweis von Proteinen, die von CTCs sezerniert werden	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ nur Nachweis vitaler CTCs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ wenige Daten</li> </ul>
<i>Kombinierte Verfahren</i>			
<b>CellSearch System</b>	Kombination aus immunomagnetischer Zellseparation und Fluoreszenzmikroskopie	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hohe Sensitivität und Spezifität</li> <li>▪ automatische, quantitative Analyse</li> <li>▪ hohe Reproduzierbarkeit</li> <li>▪ kommerziell verfügbar</li> <li>▪ große Validierungsstudien</li> <li>▪ Erhalt der Zellmorphologie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hohe Kosten</li> <li>▪ Übung des Untersuchers erforderlich</li> </ul>
<b>AdnaTest</b>	Kombination aus immunomagnetischer Zellseparation und qRT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ hohe Sensitivität und Spezifität</li> <li>▪ Möglichkeit der CTC-Charakterisierung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ keine Flexibilität</li> </ul>

### 1.3 CTCs als prognostischer und prädiktiver Marker bei soliden Tumoren

#### 1.3.1 Prognoseabschätzung bei metastasierten soliden Tumoren

Laut Goodman et al. können CTC-Zahlen die stattfindende Metastasierung reflektieren[69]. Aus diesem Grund existieren zahlreiche Beobachtungen über die Korrelation von CTCs mit dem Outcome der Patienten, das vor allem von einer Fernmetastasierung



abhängt. Dabei muss zwischen verschiedenen Outcomeparametern unterschieden werden. Prognoseparameter wie das Gesamtüberleben (overall survival, OS) geben Informationen über das klinische Outcome des Patienten unabhängig von der Behandlung. Vorhersageparameter wie das Progressions-freie Überleben (progression free survival, PFS) informieren über den Nutzen einer Therapie in Bezug auf das klinische Outcome des Patienten[70]. Abfall oder Verschwinden von CTCs werden dabei als positives Therapieansprechen gewertet. Eine persistierende CTC-Präsenz oder Zunahme kann dagegen Therapieresistenz oder eine inkomplette Eradizierung der CTCs bedeuten, auch wenn klinisch oder radiologisch keine Metastase fassbar ist[1].

Versuche der CTC-Evaluation wurden schon bei zahlreichen Malignomen wie dem Bronchial-Karzinom[71], Ovarialkarzinom[72], Pankreas-Karzinom[73] oder Malignen Melanom[74] unternommen. Der umfassendste und überzeugendste Nachweis eines klinischen Nutzens durch CTC-Detektion ist in zahlreichen Studien über das metastasierte Mamma-, Prostata- und Kolorektale Karzinom zu finden[21]. An dieser Stelle sollen die Studien in den Fokus gestellt werden, die zum CTC-Nachweis das validierte CellSearch® System benutzen haben. Viele andere Methoden sind zum heutigen Zeitpunkt noch nicht in großen Studien validiert worden. Ihre Ergebnisse besitzen somit keine ausreichende Aussagekraft[7].

### **Mamma-Karzinom**

Die Prävalenz von CTCs im Blut von Mamma-Karzinom-Patientinnen variiert in verschiedenen Studien in einem Rahmen von 26% bis 49%[2, 26, 58, 60, 75, 76].

Cristofanilli et al. konnten in einer prospektiven Multicenter-Studie mit 177 Mamma-Karzinom-Patientinnen zeigen, dass Patientinnen mit einer ungünstigen CTC-Zahl  $\geq 5/7,5\text{ml}$  Blut vor Therapiebeginn im Vergleich zu Patientinnen mit  $< 5$  CTCs ein kürzeres OS (10,1 versus  $>18$  Monate;  $p<0,001$ ) und PFS (2,7 versus 7,0 Monate;  $p<0,001$ ) aufweisen[58]. Sie legten als erstes die Grenze von 5 CTCs zwischen günstigen und ungünstigen CTC-Zahlen fest, die in den nachfolgenden Studien übernommen wurde. In einer Folgestudie mit 83 Patientinnen mit neu diagnostiziertem metastasiertem Mamma-Karzinom zeigten sich auch im Follow-up während der First-line-Therapie ähnliche Ergebnisse[77]. Patientinnen, die 4 Wochen nach Therapiebeginn eine Reduktion der CTCs aufwiesen, zeigten ein längeres PFS (2,1 versus 8,9 Monate;  $p=0,007$ ) und OS

(11,1 versus >18 Monate;  $p=0,0029$ ). CTCs vor Beginn einer First-line-Therapie wurden als unabhängiger Prognoseparameter dargestellt. Außerdem konnte dadurch die Progression der Erkrankung und das Überleben der Patientinnen früher als mit radiologischen Methoden aufgezeigt werden[77].

Budd et al. zeigten ebenfalls, dass Patientinnen mit einer ungünstigen CTC-Zahl von  $\geq 5/7,5\text{ml}$  sowohl bei vorhandenen als auch bei fehlenden radiologischen Zeichen einer Progression ein kürzeres PFS und OS aufweisen[75]. Somit können durch die CTC-Bestimmung ergänzend zur Bildgebung oder sogar auch frühzeitiger mit höherer Reproduzierbarkeit Informationen zur Prognose gewonnen werden.

In einer großen retrospektiven Studie mit 185 Patientinnen stellten Dawood et al. ein verkürztes OS bei Patientinnen mit einer ungünstigen CTC-Zahl  $\geq 5$  im Vergleich zu Patientinnen mit einer günstigen CTC-Zahl  $< 5$  (15,0 versus 28,3 Monate;  $p<0,0001$ ) fest[76]. Bei 38,5% der Patientinnen mit kurzem OS fanden sie CTCs  $\geq 5$  unabhängig vom Hormon- oder Her2Neu-Status und vom Ort der Fernmetastasierung[76].

Bidard et al. konnten im Gegensatz zu den oben genannten Studien jedoch nicht zeigen, dass mithilfe der CTC-Zahlen während der Therapie auch eine Voraussage über das Therapieansprechen getroffen werden kann[78]. Sie stellten nur einen Zusammenhang zwischen der Basis-CTC-Zahl vor Therapiebeginn und dem OS her. Die Frage, ob Änderungen der Therapie, die aufgrund von CTC-Zahlen vorgenommen werden, das Outcome der Patienten verbessern, sollen in der SWOG S0500-Studie (Smerage 2014) und der METABREAST-Studie geklärt werden.

Anhand einer retrospektiven Analyse von CTC-Daten neu diagnostizierter Mamma-Karzinom-Fälle fanden Giuliano et al., dass positive CTC-Zahlen (CTC  $\geq 5/7,5\text{ml}$ ) mit einem kürzeren OS (21,9 versus 40,1 Monate;  $p<0,001$ ) und PFS (7 versus 12 Monate;  $p<0,001$ ) einhergehen[79]. Bei Patientinnen mit einer Überexpression von Her2-Neu boten die Basis-CTC-Zahlen jedoch keine prognostischen Informationen.

Auch Giordano et al. konnten in ihrer Studie mit 517 Mamma-Karzinom-Patientinnen bestätigen, dass CTCs  $\geq 5/7,5\text{ml}$  mit einem kürzeren OS (18,3 versus 32,4 Monate;  $p<0,001$ ) verbunden ist[79]. Der prognostische Wert ist außer bei Her2-Neu-positiven Patientinnen unabhängig vom Tumorsubtyp und der -lokalisation.

## **Prostata-Karzinom**

Bei Patienten mit metastasiertem Prostata-Karzinom wurden in verschiedenen Studien CTCs zu einem Prozentsatz zwischen 35 und 65% nachgewiesen[59, 80–84].

Moreno et al. konnten in einer Pilotstudie zeigen, dass CTCs  $\geq 5/7,5$ ml mit schlechtem Outcome des Patienten assoziiert sind und dass CTCs in ihrer Vorhersagekraft anderen klinischen Parametern überlegen sind[59].

Die größte Studie zum klinischen Wert von CTCs beim Prostata-Karzinom mit 231 Patienten wurde von de Bono et al. durchgeführt. Sie stellten fest, dass eine CTC-Zahl vor Therapiebeginn  $\geq 5/7,5$  ml im Gegensatz zu einer CTC-Zahl  $< 5/7,5$ ml mit einem kürzeren OS assoziiert ist (11,5 versus 21,7 Monate;  $p < 0,0001$ )[80]. Vor Beginn der Therapie wiesen 57% der Patienten ungünstige CTC-Zahlen auf, 2 bis 5 Wochen danach nur noch 39%. Patienten mit einer ungünstigen CTC-Zahl  $\geq 5/7,5$ ml zu allen Zeitpunkten vor und während der Therapie zeigten das kürzeste OS von 6,8 Monaten. Dagegen wiesen Patienten, die während der Therapie günstige CTC-Zahlen entwickelten, ein deutlich verbessertes OS von 21,3 Monaten auf. Ein OS von  $> 26$  Monaten fand sich nur bei Patienten, die von Anfang an CTCs  $< 5/7,5$ ml zeigten[80]. De Bono et al. stellten außerdem dar, dass die CTC-Detektion vor und während der Therapie eine größere Voraussagekraft als das PSA-Level bietet.

Olmos et al. konnten bestätigen, dass Patienten mit CTCs  $\geq 5/7,5$ ml ein kürzeres OS haben als Patienten mit CTCs  $< 5/7,5$ ml (19,5 versus  $> 30$  Monate;  $p = 0,012$ ) und dass sich das OS bei einem CTC-Abfall während der Therapie verlängern kann[83]. Daneben wurden CTCs in dieser Studie als sensitiver Marker zum Monitoring des Krankheitszustandes des Patienten während der Therapie dargestellt.

Folkersma et al. kamen zu dem Ergebnis, dass Patienten mit CTCs  $\geq 4/7,5$ ml ein kürzeres OS (24 versus 45 Monate;  $p < 0,001$ ) und ein kürzeres PFS (7 versus 44 Monate;  $p < 0,001$ ) aufweisen als Patienten mit CTCs  $< 4/7,5$ ml[85]. Sie bezeichneten CTC-Zahlen außerdem als unabhängigen prognostischen Faktor.

## **Kolorektales Karzinom**

Die erste CTC-Isolation beim metastasierten Kolorektalen Karzinom mittels CellSearch® System wurde von Cohen et al. im Jahr 2006 durchgeführt[86]. 2008 publizierten

sie eine große prospektive Multicenter-Studie mit 430 Patienten, in der CTCs vor und während einer Firstline- oder Secondline-Therapie analysiert wurden. Als Grenze zwischen günstiger und ungünstiger CTC-Zahl wurden 3 CTCs/7,5ml festgelegt, da beim Kolorektalen Karzinom im Gegensatz zu anderen Tumoren aufgrund der Filterung durch den Portalkreislauf weniger CTCs in der Zirkulation vorhanden sind. Vor Therapiebeginn hatten 26% der Patienten  $\geq 3$  CTCs/7,5ml und ein damit assoziiertes medianes PFS von 4,6 Monaten und ein OS von 9,4 Monaten. Diese waren signifikant kürzer als das PFS und OS von Patienten mit  $< 3$  CTCs/7,5ml (7,9 und 18,5 Monate;  $p=0,0002$  und  $p<0,0001$ )[32]. In einer multivariablen Analyse zeigte sich, dass die Basis-CTC-Zahl im Vergleich zu therapeutischen und klinischen Faktoren die höchste Voraussagekraft für das Überleben der Patienten hat. Auch während der Therapie können CTCs prognostische Informationen in Ergänzung zur Bildgebung liefern. Patienten, die unter der Therapie günstige CTC-Zahlen entwickelten, zeigten im Verlauf ein ähnliches PFS und OS wie Patienten, die von Anfang an günstige CTC-Zahlen hatten[32]. In einer Reevaluati-  
onsstudie konnten Cohen et al. außerdem zeigen, dass die Basis-CTCs auch in spezifischen Untergruppen (nach Therapieregime, Leberbeteiligung, Alter, Leistungsvermögen) unabhängiger prognostischer Marker sind[87].

Eine zweite große Untersuchung zu CTCs beim metastasierten Kolorektalen Karzinom ist die Studie von Tol et al. mit 467 Patienten, die daneben in die CAIRO-2-Studie eingeschlossen sind. CTCs wurden vor und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie gemessen und ungünstige CTCs wieder als  $\geq 3/7,5$ ml Blut definiert. Insgesamt wurden bei 29% der Patienten Basis-CTCs  $\geq 3/7,5$ ml gefunden. Das Vorhandensein ungünstiger CTC-Zahlen vor und während der Therapie stellte im Gegensatz zu günstigen CTCs einen signifikanten negativen prognostischen Faktor für das PFS (8,2 versus 10,5 Monate;  $p=0,0005$ ) und das OS (13,7 versus 22,2 Monate;  $p<0,0001$ ) dar[88]. 3 bis 5 Wochen nach Therapiebeginn wiesen die Patienten jedoch eine geringere CTC-Positivität als in den Cohen-Studien auf, was sich eventuell durch die zusätzliche Bevacizumab-Gabe in der CAIRO-2-Studie erklären lässt. Wann der CTC-Nachweis während der Therapie am aussagekräftigsten ist, bleibt noch unklar.

Diese Ergebnisse konnten in anderen kleineren Studien bestätigt werden[89–91]. Simkens et al. erklärten dagegen, dass mithilfe von CTCs während der Therapie keine Vorhersage über das PFS und OS möglich ist[92]. Hiraiwa et al. konnten ebenfalls keine

statistische Signifikanz beim metastasierten Kolorektalen Karzinom zwischen Patienten mit  $<$  oder  $\geq 2$  CTCs/7,5ml feststellen[93]. Inwieweit diese Ergebnisse jedoch aussagekräftig sind, bleibt aufgrund der kleinen Kollektivgröße zweifelhaft.

Neueste Studien belegen eindeutig, dass Patienten mit positiven CTC-Zahlen eine schlechtere Prognose aufweisen. Sastre et al. konnten zeigen, dass CTCs  $\geq 3$  mit einem kürzeren OS (17,7 versus 25,1 Monate;  $p=0,0002$ ) und PFS (7,8 versus 12 Monate;  $p=0,0059$ ) einhergehen[94]. Aggarwal et al. fanden in ihrer Studie mit 217 Patienten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen den CTC-Zahlen vor Therapiebeginn und dem OS (11,7 bei CTCs $<3$  versus 20,8 bei CTCs  $\geq 3$ ;  $p=0,001$ )[89]. Somit sind die Basis-CTC-Zahlen unabhängig vom CEA-Wert als unabhängiger prognostischer Faktor zu sehen[89].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die großen Studien beim Mamma-, Prostata- und Kolorektalen Karzinom die Hypothese untermauern, dass CTCs einen starken unabhängigen Vorhersageparameter für das Outcome der Patienten darstellen. In Tabelle 2 sind diese Studien nochmals zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Studien, die CTCs als prognostischen Marker bei metastasierten Tumoren bewerten

Studie	Anzahl der Patienten	Ergebnisse	p-Wert
<i>Mamma-Karzinom</i>			
<b>Cristofanilli et al. (2004)</b>	177	▪ Basis-CTCs $\geq 5/7,5$ ml mit reduziertem PFS und OS assoziiert	p < 0,001 p < 0,001
<b>Cristofanilli et al. (2005)</b>	83	▪ CTCs $\geq 5/7,5$ ml vor und während der Therapie mit reduziertem PFS und OS assoziiert	p = 0,007 p = 0,0029
<b>Budd et al. (2006)</b>	138	▪ CTCs $\geq 5/7,5$ ml bei Patienten mit und ohne radiologischen Progress mit reduziertem OS assoziiert ▪ CTCs bieten zusätzliche Informationen zur Bildgebung	p = 0,0039
<b>Dawood et al. (2008)</b>	185	▪ Basis-CTCs $\geq 5/7,5$ ml mit reduziertem OS assoziiert	p < 0,0001
<b>Giuliano et al. (2011)</b>	235	▪ Basis-CTCs $\geq 5/7,5$ ml mit reduziertem OS und PFS assoziiert ▪ CTC-Bestimmung bei Her2-Neupositiven Patientinnen ohne prognostische Information	p < 0,001
<b>Giordano et al. (2012)</b>	517	▪ Basis-CTCs $\geq 5/7,5$ ml mit reduziertem OS assoziiert	p < 0,001
<i>Prostata Karzinom</i>			
<b>Olmos et al. (2008)</b>	119	▪ Basis-CTCs $\geq 5/7,5$ ml mit reduziertem OS assoziiert ▪ CTCs als sensitiver Marker zur Überwachung während der Therapie	p = 0,012
<b>de Bono et al. (2008)</b>	213	▪ Basis-CTCs $\geq 5/7,5$ ml mit reduziertem OS assoziiert ▪ CTCs haben eine größere Vorhersagekraft für das OS als die PSA-Werte	p < 0,0001
<b>Folkersma et al. (2012)</b>	90	▪ Basis-CTCs $\geq 4/7,5$ ml mit reduziertem OS und PFS assoziiert ▪ CTCs $\geq 4/7,5$ ml als unabhängiger prognostischer Faktor	p < 0,001
<i>Kolorektales Karzinom</i>			
<b>Cohen et al. (2008, 2009)</b>	430	▪ CTCs $\geq 3/7,5$ ml vor und während der Therapie mit reduziertem PFS und OS assoziiert ▪ Basis-CTCs haben höhere Vorhersagekraft für das OS als klinische und therapeutische Faktoren ▪ Basis-CTCs als starker prognostischer Faktor auch in Untergruppen	p = 0,0002 p < 0,0001
<b>Tol (2010)</b>	467	▪ CTCs $\geq 3/7,5$ ml vor und während der Therapie mit reduziertem PFS und OS assoziiert	p = 0,0005 p < 0,0001

<b>Sastre et al. (2012)</b>	180	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Basis-CTCs <math>\geq 3/7,5\text{ml}</math> mit reduziertem OS und PFS assoziiert</li> </ul>	<p><math>p = 0,0002</math> <math>p = 0,0059</math></p>
<b>Aggarwal et al. (2012, 2013)</b>	217	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Basis-CTCs <math>\geq 3/7,5\text{ml}</math> mit reduziertem OS assoziiert</li> <li>▪ CTCs bieten zusätzliche prognostische Informationen zum Zeitpunkt von 3-5 und 6-12 Wochen nach Therapie</li> </ul>	<p><math>p = 0,001</math></p>

### Weitere gastrointestinale Tumore

Über den prognostischen Wert von CTCs bei weiteren gastrointestinalen Tumoren existieren nur kleine Studien, die aufgrund ihrer Heterogenität nur eine geringe Aussagekraft haben[95]. Da bei den Untersuchungen dieser Arbeit auch Patienten mit Magen- und Pankreas-Karzinom und mit NET eingeschlossen sind, sollen hier dennoch einige Beispiele angeführt werden.

Matsusaka et al. fanden in einer Studie mit 52 Patienten mit metastasiertem Magen-Karzinom unter der Verwendung des CellSearch® Systems heraus, dass der CTC-Status eng mit dem Therapieansprechen korreliert[96]. Patienten mit hohen CTCs  $\geq 4/7,5\text{ml}$  Blut unter der Therapie wiesen ein deutlich schlechteres Outcome als Patienten mit niedrigen CTCs auf (PFS 1,4 versus 4,9 Monate, OS 3,5 versus 11,7 Monate)[96]. Zhou et al. fanden auch, dass der Nachweis von micor-RNA-106a und micro-RNA-17 mittels RT-PCR mit der Anzahl von CTCs korreliert[97].

Für das primäre Hepatozelluläre Karzinom (HCC) konnten Vona et al. in ihrer ISET-Entwicklungsstudie zeigen, dass CTCs  $\geq 4/7,5\text{ml}$  mit einem reduzierten OS assoziiert sind[98].

Über CTCs beim metastasierten Pankreas-Karzinom existieren nur wenige kleine Studien mit dem CellSearch® System[2, 73, 99] mit Patientenzahlen von 14 bis 40. Kurihara et al. konnten ein eindeutig verkürztes Überleben bei Stadium IVb-Patienten mit CTCs  $\geq 1/7,5\text{ml}$  feststellen (52,5 versus 308,3 Tage;  $p < 0,01$ )[73]. Kürzlich veröffentlichten de Albuquerque et al. eine Studie, in der CTCs bei 34 Pankreaskarzinom-Patienten mit immunomagnetischer Zellseparation angereichert und anschließend mittels RT-qPCR mit einem Multimarker mRNA-Panel detektiert wurden. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass der Nachweis von CTCs mit einem kürzeren PFS (66 versus 138

Tage;  $p=0,01$ ) assoziiert ist und dass 47,1% der Patienten vor Therapiebeginn CTCs aufweisen[100].

Bei Patienten mit einem NET im Pankreas fanden Khan et al. eine stärkere EpCAM-Expression als bei anderen gastrointestinalen Tumoren[101]. Außerdem konnten sie bei 21% von 16 Patienten CTCs unter Verwendung des CellSearch® Systems detektieren und dabei eine Assoziation mit der Tumorprogression feststellen[101].

### **1.3.2 CTCs bei nicht-metastasierten Tumoren**

Auch bei Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren lassen sich teilweise CTCs im Blut nachweisen. Inwiefern dabei Aussagen über die Prognose des Patienten getroffen werden können, soll anhand der folgenden Studien dargestellt werden.

Ignatiadis et al. fanden bei 40,8% von 444 Patientinnen mit Mamma-Karzinom im Stadium I bis III vor adjuvanter Therapie eine CK19 mRNA-Positivität und ein damit assoziiertes kürzeres OS[102]. Außerdem konnten sie zeigen, dass eine CK19 mRNA-Positivität vermehrt mit Lymphknotenbefall, dem Auftreten von Rezidiven und mit krankheitsbezogenen Todesfällen einhergeht und somit auch ein Vorhersageparameter für das PFS darstellt[103]. Weitere Studien konnten zeigen, dass auch in frühen Tumorstadien ohne klinischen oder radiologischen Nachweis von Metastasen zwischen den CTC-Zahlen und der Prognose der Patientinnen eine signifikante Korrelation besteht [104–106]. 2010 wurden daher CTCs in der neuen Ausgabe des TNM-Tumorstagings für das Mamma-Karzinom aufgenommen[107]. Der Nachweis von CTCs wird als  $cM_0(i+)$  klassifiziert, was bedeutet, dass keine klinischen Zeichen für die Existenz von Fernmetastasen bestehen, jedoch Tumorzellen im Blut, Knochenmark oder in Lymphknoten nachgewiesen werden können.

In einer großen Metaanalyse von 36 Studien über CTCs beim M0-Kolorektalen Karzinom (3094 Patienten) schrieben Rahbari et al. CTCs aus dem peripheren Blut einen prognostischen Wert in Bezug auf ein kürzeres rückfallfreies Überleben (recurrence free survival, RFS) und OS zu[108]. Sie stellten dabei außerdem fest, dass CTCs aus dem Knochenmark oder Portalvenen-CTCs keine signifikante Assoziation mit dem OS aufweisen[108]. Lu et al. untersuchten eine prospektive Kohorte von CRC-Patienten im



Stadium III. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das Vorhandensein von CTC-Markern in ihrem RNA-basierten Assay mit einem schlechteren OS und PFS einhergeht[109]. Zum Monitoring des Therapieansprechens bei nicht-metastasierten Patienten sind CTCs aufgrund ihrer sehr geringen Anzahl jedoch weniger geeignet[110].

## 2 Ziele der Untersuchungen

Die Entwicklung von CTC-Detektionsmethoden mit hoher Sensitivität und Spezifität ist Ziel vieler Studien und Untersuchungen, die verschiedenste maligne Tumoren einschließen. Im Laufe der Jahre sind zahlreiche Methoden zur Anreicherung und Detektion von CTCs im Blut von Patienten etabliert worden. Die große Anzahl der Methoden geht dabei allerdings mit einer großen Heterogenität in der CTC-Detektion einher. Nicht alle Methoden sind für eine bestimmte Tumorentität geeignet. Vor allem bei gastrointestinalen Tumoren ist die Anzahl von CTCs im peripheren Blut aufgrund der Filterung durch das Pfortadersystem sehr gering, was den CTC-Nachweis erschwert. An dieser Stelle mangelt es an einfachen und günstigen Methoden, die den Nachweis dieser raren Tumorzellen im Blut erlauben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine einfache, schnelle und zuverlässige Methode mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität zur CTC-Detektion aus venösem Vollblut zu etablieren, die auf die Besonderheiten bei gastrointestinalen Malignomen zugeschnitten ist. Hierzu wurde zunächst in Modellen mit Tumorzellen aus Tumorzelllinien die Tumorzell-Anreicherung mittels MACS-Verfahren unter möglichst geringem Zellverlust optimiert. Für den Tumorzellnachweis mittels FACS-Analyse wurde ein fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM und im weiteren Verlauf auch ein Universalantikörper gegen Zytokeratine verwendet. Das gefundene Protokoll wurde im Anschluss an Blutproben von 42 Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Tumoren getestet. Dabei sollte durch die Bestimmung der CTC-Zahlen von Patienten und gesunden Normalspendern unter Verwendung dieser Methode gezeigt werden, dass Patienten eine höhere Anzahl an CTCs aufweisen als Normalspender.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Patienten**

Nach Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung zur Blutentnahme und zur Durchführung der folgenden Untersuchungen wurde Vollblut von 42 Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten (Kolorektales Karzinom, n = 7; Pankreaskarzinom, n = 13; Adenokarzinom des Magens und des gastroösophagealen Übergangs, n = 17; Cholangiozelluläres Karzinom, n = 3; Neuroendokriner Tumor des Gastrointestinaltrakts, n = 2) entnommen. 8 Patienten aus der Gruppe mit Adenokarzinom des Magens waren Studienpatienten aus einer explorativen Studie zu Catumaxomab in der Behandlung der Peritonealkarzinose bei Patienten mit Adenokarzinom des Magens vor Gastrektomie (AIO-STO-0110). Diese Patienten waren mit der Durchführung der Begleitstudie einverstanden. Genaue Daten zum Patientenkollektiv finden sich im Ergebnisteil (siehe Kapitel 4.2). Eine Genehmigung zur Durchführung dieses Projektes und der Begleitstudie für Studienpatienten durch die Ethikkommission lag vor.

### **3.2 Zellbiologische Techniken**

#### **3.2.1 Zellen**

Zur Durchführung der Vorversuche wurden folgende Zellen verwendet:

##### **PBMC**

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kapitel 3.5.1) aus dem Blut von gesunden Normal Spendern isoliert, mit HBSS (Hank's Buffered Salt Solution, Gibco®, Life Technologies Corp., Darmstadt) gewaschen und in HBSS resuspendiert.

## Tumorzelllinien

Folgende Tumorzelllinien wurden für die Untersuchungen verwendet:

**Tabelle 3:** Verwendete Tumorzelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Tumorentität</b>	<b>Quelle</b>	<b>Kulturmedium</b>
<b>PANC-1</b>	Humanes Pankreas Epitheloidkarzinom	CLS Cell Lines Services, Eppenheim	90% RPMI-1640 10% FCS 1mM Natriumpyruvat
<b>Aspc-1</b>	Humanes Pankreas Adenokarzinom	CLS Cell Lines Services, Eppenheim	90% RPMI 10% FCS
<b>HT-29</b>	Humanes Colon Adenokarzinom (DSMZ-Nr. ACC 299)	DSMZ, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig	90% RPMI-1640 10% FCS

### 3.2.2 Kultur der Zelllinien

Die oben genannten Zelllinien wurden im Brutschrank in entsprechendem Medium (siehe Tabelle 3) in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe (je nach Volumen des Mediums) bei 37 °C in 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich ausschließlich um adhärent wachsende Zellen, die sich bei der Proliferation am Boden der Kulturflasche anheften. Nach makroskopischer und mikroskopischer Kontrolle des Zellwachstums und bei sichtbarer Konfluenz erfolgte 1-2 mal wöchentlich unter sterilen Bedingungen ein Passagieren der Zellen. Hierzu wurde das alte Medium abpipettiert und der Boden der Kulturflasche mit aufgewärmtem Trypsin benetzt. Zum effektiveren Ablösen der Zellen von der Kunststoffoberfläche erfolgte eine 5-minütige Inkubation im Brutschrank und anschließend ein leichtes Anklopfen der Kulturflasche. Die abtrypsinierten Zellen wurden in entsprechendem Medium gewaschen und anschließend resuspendiert. Sie waren nun für weitere Arbeiten geerntet, konnten gezählt (siehe Kapitel 3.2.3) und bei Bedarf in Medium verdünnt in eine neue Zellkulturflasche ausgesät werden. Bei noch unzureichendem Wachstum wurde nur ein Medienwechsel durchgeführt.

### 3.2.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Um die Anzahl der PBMCs oder der Zellen aus den Tumorzelllinien zu bestimmen, wurden diese zunächst mit Trypanblaulösung (0,4 % Trypanblau in 0,9 % iger NaCl-Lösung) (Merck, Darmstadt) gefärbt. Hierzu wurden 10 µl Trypanblaulösung und 10 µl der Zellsuspension in einer Färbekammer vermischt und eine Neubauer-Zählkammer (Neubauer Improved, Tiefe 0,100 mm, Fläche 0,0025 mm<sup>2</sup>) mit 10 µl dieses Gemisches befüllt. Die vitalen Zellen in zwei von vier Kammern wurden unter dem Mikroskop visuell ausgezählt. Die vitalen, hellen und ungefärbten Zellen waren dabei deutlich von den toten, blau gefärbten Zellen zu differenzieren. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl pro Milliliter berechnet:  $\frac{1}{2} x * 10^4 * 2$ , wobei x die Anzahl der ausgezählten Zellen bezeichnet,  $10^4$  den Kammerfaktor und 2 den Verdünnungsfaktor darstellt.

### 3.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um die Tumorzelllinien für weitere Versuche dauerhaft zu erhalten, wurden sie nach dem Ernten aus der Zellkulturflasche und dem Zählen in speziellen Kryocaps (Volumen 1,8 ml, für  $10^7$  Zellen) (Nunc, Wiesbaden) eingefroren. Dazu wurde die gewünschte Zellzahl in 0,9 ml Medium 1 (RPMI mit 40 % FCS) aufgenommen und unmittelbar vor dem Einfrieren mit derselben Menge Medium 2 (RPMI mit 20 % DMSO) versetzt, so dass die Zellen in RPMI mit 20 % FCS und 10% DMSO Endkonzentration eingefroren wurden. Das DMSO (Dimethylsulfoxid) verhindert beim Gefriervorgang die Kristallisation innerhalb der Zellen, ist aber für die Zellen toxisch. Anschließend mussten die Zellen schrittweise abgekühlt werden, um sie möglichst schonend einzufrieren und Schäden in der Zellstruktur zu vermeiden. Hierzu wurden die Probe zunächst auf Eis gelagert, im Anschluss für 1 Stunde bei - 20 °C tiefgefroren und danach in einen Gefrierschrank mit - 80 °C überführt. Für eine Langzeitaufbewahrung wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um die tiefgefrorenen Zellen möglichst schonend wieder aufzutauen, wurden sie im Kryocap im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und mit 20 ml HBSS gewaschen, um das zytotoxische DSMO zu entfernen. Nach dem Resuspendieren in HBSS konnten die auf-

getauten Zellen für weitere Arbeiten genutzt werden oder mit Kulturmedium in Zellkulturflaschen kultiviert werden.

### 3.3 Antikörper

#### 3.3.1 Antikörper für die FACS-Analyse

Folgende monoklonale Antikörper wurden zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet:

**Tabelle 4:** Verwendete Antikörper für die FACS-Analyse

<b>Antigen</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>	<b>Konjugation</b>	<b>Quelle</b>
CD 14	IgG2a (Maus)	TÜK4	FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD 45	IgG2b (Maus)	30-F11	PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 326 (EpCAM)	IgG1 (Maus)	HEA-125	PE	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD 45	IgG2a (Maus)	HI30	APC	Becton Dickinson, Heidelberg
Pan-Zytokeratin	IgG1 (Maus)	C-11	FITC	Sigma-Aldrich, San Jose, USA
Kontrolle	IgG1 (Maus)	MOPC-31C	PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
Kontrolle	IgG1 (Maus)	MOPC-31C	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Kontrolle	IgG1 (Maus)	MOPC-31C	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg

#### 3.3.2 MicroBeads für das MACS-Verfahren

Zur magnetischen Zellseparation wurden folgende MicroBeads, die an monoklonale Antikörper gekoppelt sind, verwendet:

**Tabelle 5:** Verwendete MicroBeads für die MACS-Zellseparation

<b>Antigen</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Quelle</b>
CD 45	IgG2a (Maus)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD 45 (Vollblut)	IgG2a (Maus)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
PE	IgG1 (Maus)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD 14	IgG2a (Maus)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD 326	IgG1 (Maus)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD 3 (Vollblut)	IgG2a (Maus)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

### **3.4 Waschpuffer und Lösungen**

#### **Ammoniumchlorid-Lyse zum Entfernen der Erythrozyten**

Für den Lysepuffer werden in 400 ml destilliertem Wasser 3,22 g Ammoniumchlorid, 0,34g Natriumhydrogencarbonat und 0,0148 g EDTA gelöst.

#### **MACS-Puffer**

500 ml PBS (Phosphate buffered Saline, Gibco®) werden mit 5 ml FCS (fötales Kälberserum, Gibco®) und 5 ml EDTA (200 mM) vermischt und sterilfiltriert (Minisart® NML Spritzenvorsatzfilter 0,20 µm, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen).

#### **FACS-Puffer**

500 ml PBS werden mit 5 ml FCS und 500 µl 20 % iger Natriumazid-Lösung vermischt.

## **3.5 Methoden**

### **3.5.1 Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Gradient)**

Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein physikalisches Verfahren zur Trennung verschiedener Zellpopulationen in einer Probe nach ihrer Schwebedichte. Dieses Verfahren wurde zur Isolierung von PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) aus humanem Vollblut verwendet. Hierzu wurde ein definiertes Volumen (9-24 ml) an EDTA-Vollblut im Verhältnis 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und in einem 50 ml-Falkon-Röhrchen vorsichtig auf die vorgelegte Trenn-Lösung (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Schweden) – ein synthetisches Saccharosepolymer – geschichtet. Das Mischungsverhältnis von Ficoll-Lösung und verdünntem Blut betrug dabei 1:1. Es folgte eine Zentrifugation bei 2290 Umdrehungen für 25 Minuten ohne Bremse, um eine Vermischung der Schichten nach der Zentrifugation zu verhindern. Danach war eine Vierschichtung der Probe zu erkennen. Die PBMCs befanden sich in der Interphase zwischen der Plasmaschicht und der Ficollschicht. Nach Abpipettieren des Plasmaüberstandes konnte die mononukleäre Zellschicht vorsichtig abgenommen und in ein weiteres Falcon-Röhrchen transferiert werden. Das Zellsediment bildeten Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen. Die PBMCs wurden zweimal mit RPMI-Medium gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 1320 Umdrehungen für 8 Minuten wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert. Mit den isolierten PBMCs konnte nun weiter gearbeitet werden.

### **3.5.2 MACS**

Mithilfe des MACS-Verfahrens (Magnetic activated cell sorting) (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) können verschiedene Zellpopulationen in einer Zellsuspension mittels einer Markierung mit magnetischen Teilchen in einem starken magnetischen Feld aufgetrennt werden. Diese Methode wurde zum einen zur Anreicherung von Monozyten und Tumorzellen als auch zur Depletion von Leukozyten eingesetzt.



Die Zielzellen in der Probe wurden mit speziellen Antikörper-MicroBeads, die an bestimmte Oberflächenantigene binden, markiert. Nach der Durchmischung der Probe mithilfe des Vortex-Gerätes erfolgte eine Inkubation bei 4 °C für 15 Minuten. Nach dem Waschen mit MACS-Puffer wurde die Probe bei 1320 Umdrehungen/Minute für 8 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Nach dem Äquilibrieren der Säule mit der entsprechenden Menge MACS-Puffer konnte die vorbereitete Probe auf die Säule aufgebracht werden. Die unmarkierten Zellen liefen durch die Säule in ein Auffangröhrchen, während die magnetisch markierten Zellen in der Säule verblieben. Bei der Depletion (Negativselektion) war die Zellsuspension im Auffangröhrchen idealerweise frei von der markierten Zellpopulation und konnte direkt weiter verwendet werden. Zur Positivselektion der markierten Zellen musste die Zellmasse in der Säule mit 3 ml Elutionspuffer versetzt werden, mithilfe eines mitgelieferten Stempels zügig herausgedrückt und in einem weiteren Röhrchen aufgefangen werden. Die Zellen wurden nach dieser Prozedur nochmals mit MACS-Puffer gewaschen.

Für die nachfolgenden Versuche wurden der VarioMACS-Separator und je nach der zu absorbierenden Zellzahl MS-, LS- oder LD-Säulen zusammen mit 30 µm Preseparation-Filtern (Miltenyi Biotec) verwendet. Zur Gewinnung von Monozyten wurden diese direkt mit CD14-gekoppelten MicroBeads markiert. Zur Depletion von Leukozyten erfolgte ebenfalls eine direkte Markierung mit CD45-gekoppelten MicroBeads. Um Tumorzellen zu gewinnen wurde zum einen eine direkte Markierung mit EpCAM-gekoppelten MicroBeads durchgeführt als auch eine indirekte Markierung der Zellen mit EpCAM-PE und anti-PE-MicroBeads.

### **3.5.3 FACS-Analyse**

Mithilfe der FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting) können Informationen über Größe und Struktur von Zellen gewonnen werden. Außerdem kann die Expression von verschiedenen Oberflächenantigenen und intrazellulären Antigenen qualitativ und quantitativ analysiert werden.

Die Zellen in der Probe werden vom Gerät aspiriert und passieren einzeln nacheinander einen Laserstrahl. Dabei wird das Licht je nach Größe und Struktur der Zellen in verschiedene Richtungen gestreut. Fluoreszenzmoleküle auf bzw. in Zellen werden angeregt und emittieren daraufhin Licht mit einem molekülabhängigen Spektrum. Detektoren sammeln das gestreute und emittierte Licht und wandeln es in elektrische Signale um.

Zur Messung der Expression von Oberflächenmolekülen wurde die Probe mit FACS-Puffer gewaschen, in FACS-Röhrchen transferiert und mit einem oder mehreren spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern in optimaler Konzentration gefärbt. Nach der Durchmischung der Probe mithilfe des Vortex-Gerätes und einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4 °C in einem lichtgeschütztem Raum wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (8 min bei 1320 U/min, 20 °C). Das Zellpellet wurde in 100-200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Als Analysegeräte wurden der FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) und der FACScan (Becton Dickinson) verwendet und zur Auswertung der Messdaten das Programm CellQuest 3.3 (Becton Dickinson) benutzt. Pro Messung wurden 5.000-2.000.000 Zellen analysiert und der absolute und relative Anteil der verschiedenen Zellpopulationen bestimmt. Tote Zellen wurden durch Nutzung der vorderen und seitlichen Streuungsparameter aufgrund ihrer geringen Größe und Granularität von der Analyse ausgeschlossen.

### 3.6 Geräte

<b>Blutbildanalysegerät:</b>	Sysmex XT 1800i
<b>Brutschrank:</b>	Hera Cell (Thermo Scientific, Waltham, USA)
<b>Durchflusszytometer:</b>	3-Kanal FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA) 4-Kanal FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA)

	Cell Quest 3.3 (Becton Dickinson, San Jose, USA) als Messungs- und Analysesoftware
<b>MACS-Gerät:</b>	VarioMACS (Miltenyi Biotec, Auburn, USA)
<b>Mikroskop:</b>	Zeiss
<b>Sterilbank:</b>	BioGard Hood 1360-122 (The Baker Company, Inc., San- ford, Maine, USA)
<b>Vortex:</b>	Vortex Genie 2™ (Scientific Industries, Inc., New York, USA)
<b>Zentrifuge:</b>	Rotanta/AP mit Rotor 5094 A (Hettich, Tuttlingen)

### 3.7 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten der Patienten und gesunden Normalspender wurden in das Programm Excel und anschließend in das Statistikprogramm SPSS überführt. Mit der Unterstützung des Instituts für Klinische Epidemiologie und Biometrie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Vorstand: Prof. Dr. P. Heuschmann) erfolgte eine biometrische Auswertung.

Die verschiedenen Tumorentitäten und die gesunden Normalspender wurden in Box Plots dargestellt. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum berechnet. Die Signifikanzen zwischen den verschiedenen Gruppen wurden unter Anwendung des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben berechnet. Für den Test galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vorversuche

Um die Nachweisgrenze von Tumorzellen im Blut mittels FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) und deren Beeinflussung durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS-Verfahren (magnetic activated cell sorting) zu untersuchen, wurden zunächst Experimente mit PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) und Tumorzellen aus kultivierten Tumorzelllinien durchgeführt. Dabei wurden PBMCs gesunder Normalspender (siehe Tabelle 6) verwendet, die aus venösem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden. Das Ziel bestand darin, ein Verfahren zu entwickeln, das unter geringem Verlust von Zellen und mit höchstmöglicher Spezifität und Sensitivität Tumorzellen in Vollblut identifizieren kann.

**Tabelle 6:** Gesunde Normalspender (NS)

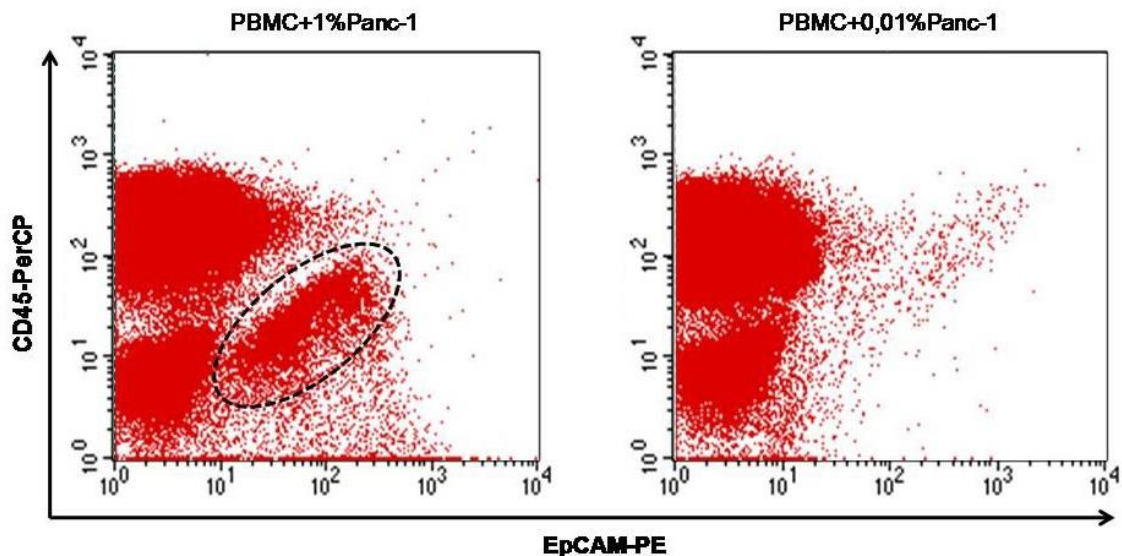
<b>Spender</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>
1	w	23
2	w	50
3	m	25
4	m	56
5	m	52

#### 4.1.1 Nachweisgrenze EpCAM-positiver Tumorzellen in der FACS-Analyse

Zunächst sollte die Grenze bestimmt werden, mit welcher EpCAM-positive Tumorzellen vor dem Leukozytenhintergrund in der FACS-Analyse gerade noch eindeutig nachgewiesen werden können. Hierzu wurden PBMCs (Lymphozyten und Monozyten) aus dem venösen Vollblut mehrerer gesunder Normalspender mittels Dichtegradientenzent-

rifugation isoliert und Tumorzellen verschiedener Tumorzelllinien, die das tumorassoziierte Antigen EpCAM tragen, als Modellzellpopulation für CTCs verwendet. Dabei wurde jeweils zu einer definierten Menge PBMCs eine definierte Menge Tumorzellen hinzugefügt.

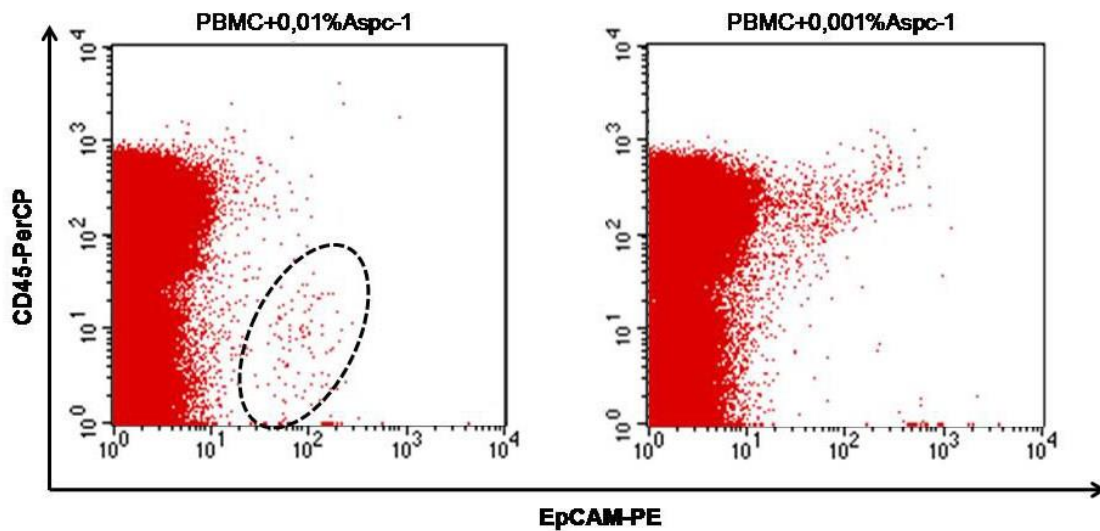
Zuerst wurden jeweils  $1 \times 10^6$  PBMCs eines Normalspenders in fünf verschiedenen Ansätzen mit jeweils 10%, 5%, 1%, 0,1% und 0,01% Tumorzellen der Pankreas-Karzinom-Zelllinie Panc-1 versetzt. Nach der Färbung mit PE-markierten EpCAM (=CD326)-Antikörpern und PerCP-markierten CD45-Antikörpern erfolgte die Analyse im FACScan-Gerät, wobei jeweils insgesamt  $3 \times 10^5$  Zellen akquiriert wurden. Tumorzellen wurden als EpCAM-positive und CD45-negative Zellen definiert und waren als Zellpopulation im rechten unteren Quadranten identifizierbar. Aufgrund der geringen Anzahl von Tumorzellen konnte im Ansatz mit 0,01% Panc-1-Zellen im Gegensatz zu den Ansätzen mit einer höheren Tumorzellzahl keine eindeutige Tumorzellpopulation definiert werden (siehe Abbildung 1). Die Identifizierung einer Tumorzellpopulation wird außerdem durch die Tatsache erschwert, dass Tumorzellen der Panc-1-Zelllinie das Protein EpCAM nur in geringer Höhe exprimieren und somit von den EpCAM-negativen Leukozyten nur schwer abgrenzbar sind.



**Abbildung 1:** Durchflusszytometrische Analyse der Proben mit PBMCs von NS 1 mit 1% (linke Abbildung) und 0,01% (rechte Abbildung) zugesetzten Tumorzellen der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1. In der linken Abbildung ist eine eindeutige EpCAM-positive und CD45-negative Tumorzellpopulation vor dem Leukozytenhintergrund identifizierbar, in der rechten Abbildung aufgrund der geringeren Anzahl an Tumorzellen jedoch nicht.

Zum Vergleich wurden in einer weiteren Versuchsreihe PBMCs eines Normalspenders mit Tumorzellen einer weiteren Pankreaskarzinomzelllinie, der Aspc-1-Zelllinie, versetzt. Hierzu wurden zu jeweils  $4 \times 10^6$  PBMCs Tumorzellen in den Abstufungen 1%, 0,1%, 0,01% und 0,001% bezogen auf die Anzahl der PBMCs beigefügt. Die Färbung der Probe erfolgte wiederum mit PE-markierten EpCAM-Antikörpern und PerCP-markierten CD45-Antikörpern. Durch die Erhöhung der Anzahl der akquirierten Zellen in der FACS-Analyse auf  $1 \times 10^6$  Zellen und durch eine verbesserte Einstellung der Fluoreszenzkanäle am FACS-Gerät konnte die Identifizierung EpCAM-positiver Tumorzellen als Tumorzellpopulation optimiert werden. Hierbei konnten Tumorzellen, die zu 0,01% zugefügt worden waren, im Gegensatz zu der vorherigen Versuchsreihe eindeutig als Zellpopulation identifiziert werden. Im Ansatz mit 0,001% Tumorzellen zeigten sich dennoch nur sehr wenige Tumorzellen, die eine genaue Identifizierung einer Tumorzellpopulation unmöglich machten (siehe Abbildung 2).

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Nachweisgrenze EpCAM-positiver Tumorzellen im FACS von der verwendeten Tumorzelllinie und der damit verbundenen unterschiedlich hohen EpCAM-Expression und Lokalisation der Tumorzellpopulation im Analyseplot und vor allem von der aufgenommenen Gesamtzellzahl abhängt. Daher wurde für die folgenden Versuche festgelegt, dass stets  $1 \times 10^6$  Zellen in der FACS-Analyse akquiriert werden. Außerdem wurde die Nachweisgrenze für Tumorzellen von 0,01% in einer Probe als Basis für die folgenden Untersuchungen definiert.



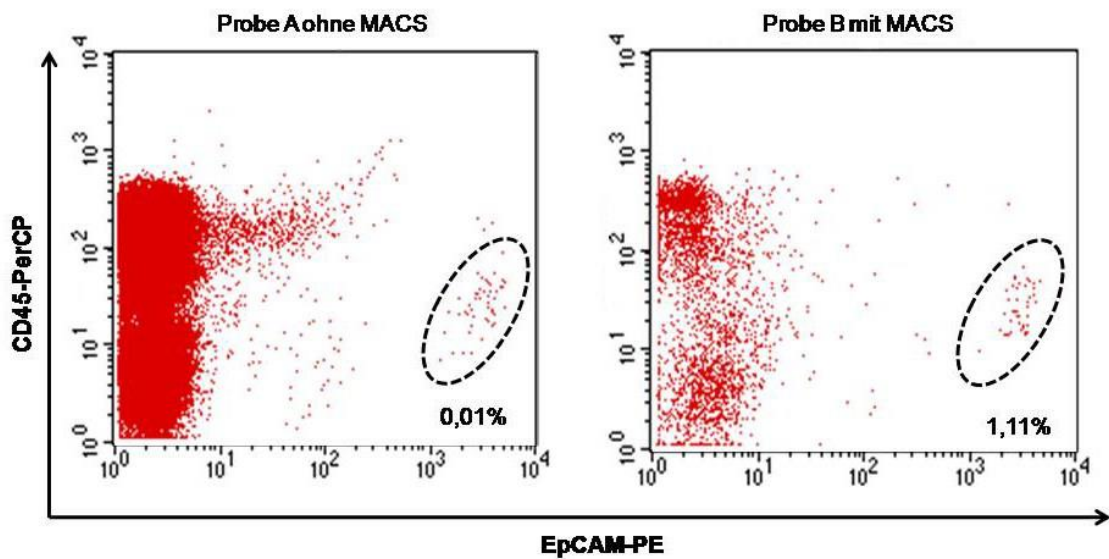
**Abbildung 2:** Durchflusszytometrische Analyse der Proben mit PBMCs von NS 2 mit 0,01% (linke Abbildung) und 0,001% (rechte Abbildung) zugesetzten Pankreaskarzinomzellen der Aspc-1-Zelllinie. In der linken Abbildung ist eine eindeutige EpCAM-positive und CD45-negative Tumorzellpopulation vor dem Leukozytenhintergrund identifizierbar, in der rechten Abbildung aufgrund der geringeren Anzahl an Tumorzellen jedoch nicht.

#### 4.1.2 Anreicherung EpCAM-positiver Tumorzellen durch MACS

Des Weiteren wurden Versuche mit dem Ziel durchgeführt, die Identifizierung von Tumorzellen vor dem Leukozytenhintergrund zu erleichtern. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Anreicherung von Tumorzellen mittels MACS versucht.

Dazu wurden in zwei Proben PBMCs eines Normalspenders mit jeweils 0,01% Tumorzellen der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 versetzt und anschließend mit PerCP-konjugierten CD45-Antikörpern und PE-konjugierten EpCAM-Antikörpern gefärbt. Bei Probe A wurde zum Vergleich keine Tumorzellanreicherung mittels MACS durchgeführt, wobei die Tumorzellen in Probe B mittels MACS mithilfe von PE-MicroBeads positiv selektioniert und erst anschließend im FACS-Gerät analysiert wurden. Bei der FACS-Analyse wurden alle in der Probe enthaltenen Zellen aufgenommen. Bei Probe B war eine deutliche Reduktion des Leukozytenhintergrundes erkennbar, was die Abgrenzung der Tumorzellen von den Leukozyten vereinfachte.

Der Prozentsatz der enthaltenen Tumorzellen wurde aus der Anzahl der identifizierten Tumorzellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der Probe bestimmt und betrug in Probe A ohne MACS 0,01%. Da durch die Tumorzellanreicherung im MACS in Probe B der Leukozytenhintergrund und damit die Gesamtzellzahl deutlich reduziert werden konnte, zeigte sich hier für die Tumorzellen ein um zwei Zehnerpotenzen erhöhter Prozentsatz von 1,11%, wobei die absolute Anzahl an Tumorzellen annähernd gleich geblieben ist (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Durchflusszytometrische Analyse der Proben mit PBMCs von NS 3 mit (rechte Abbildung) und ohne (linke Abbildung) vorgeschaltete Tumorzellanreicherung mittels MACS. Die Tumorzellpopulation ist in beiden Abbildungen aufgrund der hohen Expression von EpCAM auf der Zelloberfläche von HT-29-Zellen eindeutig zu identifizieren. Durch die Positivselektion der Tumorzellen mittels MACS in Probe B konnte eine deutliche Reduktion des Leukozytenhintergrundes erreicht werden (rechte Abbildung), wodurch der prozentuale Anteil an Tumorzellen von 0,01% ohne MACS auf 1,11% mit MACS erhöht werden konnte.

#### 4.1.3 Anreicherung und relativer Verlust von Monozyten durch MACS

Das MACS-Verfahren geht durch die mechanische Manipulation und die notwendigen Waschschrte allerdings stets mit einem Verlust von Zellen aller Populationen einher. Um zu verifizieren, in welchem Ausmaß Zielzellen mithilfe des MACS-Verfahrens vor dem Hintergrund anderer Zellpopulationen angereichert werden können und daneben in



ihrer Anzahl vermindert werden, wurden Untersuchungen mit Monozyten als Modellzellpopulation durchgeführt, da Monozyten im Gegensatz zu Tumorzellen neben der FACS-Analyse auch mittels Blutbildanalyse als zweites Analysemodul quantitativ erfasst werden können.

Zunächst wurde mittels maschineller Blutbildanalyse im Vollblut eines Normalspenders der Monozytenanteil bestimmt. Dieser betrug 2,8%. Im Ansatz A wurden die Monozyten aus 100µl lysiertem Vollblut mittels FACS analysiert, als Zellpopulation im rechten unteren Quadranten identifiziert und der prozentuale Monozytenanteil bestimmt. Im Ansatz B wurden die Monozyten aus 2 ml Vollblut zunächst mithilfe von Vollblut-CD14-MicroBeads im MACS-Verfahren isoliert. Der Monozytenanteil wurde danach sowohl mittels Blutbildanalyse als auch mittels FACS-Analyse bestimmt. Zur FACS-Analyse wurden bei beiden Proben FITC-konjugierte CD14-Antikörper verwendet und zur besseren Vergleichbarkeit die gleiche Anzahl von Zellen akquiriert.

Bei der vergleichenden Analyse von Ansatz A vor MACS und B nach MACS zeigte sich eine erfolgreiche Anreicherung von Monozyten in Ansatz B in eher geringem Ausmaß, wobei sich die Prozentwerte aus der Blutbildanalyse und aus dem FACS in etwa entsprachen (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Prozentualer Monozytenanteil vor und nach MACS in der Blutbildanalyse und im FACS

<b>Analysemodul</b>	<b>Monozytenanteil vor MACS</b>	<b>Monozytenanteil nach MACS</b>
Blutbildanalyse	2,8%	14,9%
FACS	2,9%	12,1%

Daneben sollte der Verlust von Monozyten durch die Schritte des MACS-Verfahrens eruiert werden. Dazu wurde die Anzahl von Monozyten in Probe B vor und nach dem MACS verglichen. Von den  $3,8 \times 10^5$  ursprünglich eingesetzten Monozyten waren nach dem MACS nur noch  $7,1 \times 10^4$  vorhanden, was einem deutlichen Monozytenverlust von 80% entspricht.

#### 4.1.4 Relativer Verlust von Tumorzellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Aufgrund des relativ hohen Verlustes von Zellen durch das MACS-Verfahren wurde nach Alternativen zur Reduktion des Leukozytenhintergrundes bei der Identifizierung von Tumorzellen gesucht. Da die Dichtegradientenzentrifugation zur Depletion von Granulozyten und Erythrozyten und zur Anreicherung von Tumorzellen neben dem MACS-Verfahren eine möglich Option darstellt, sollte das Ausmaß des Verlustes von Tumorzellen durch dieses Verfahren bestimmt werden.

Dazu wurde in verschiedenen Ansätzen jeweils ein definiertes Volumen an Vollblut eines Normalspenders mit 1% (Probe A), 0,1% (Probe B) und 0,01% (Probe C) Kolonkarzinomzellen der HT-29-Zelllinie versetzt. Die Anzahl der zugesetzten Tumorzellen bezog sich dabei auf die Anzahl der in der Probe enthaltenen Lymphozyten und Monozyten (~PBMCs), die zuvor mittels Blutbildanalyse bestimmt worden war. Bei den Proben A, B und C wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Hypaque® durchgeführt, wodurch die in derselben Schicht liegenden PBMCs und Tumorzellen isoliert wurden. Zusätzlich wurde zum Vergleich eine Probe D mit 1% HT-29-Zellen ohne Dichtegradientenzentrifugation vorbereitet. Für die FACS-Analyse wurden alle Proben mit PerCP-konjugierten CD45-Antikörpern und PE-konjugierten EpCAM-Antikörpern inkubiert und jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen akquiriert. Im Anschluss wurde der prozentuale Tumorzellanteil bestimmt.

Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil von Tumorzellen nach der Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation in den Proben A, B und C deutlich um jeweils eine Zehnerpotenz im Vergleich zur ursprünglichen eingesetzten Zellzahl verringert ist (siehe Tabelle xy).

Außerdem wurde deutlich, dass sich der Tumorzellanteil in Probe D ohne Dichtegradientenzentrifugation – allein durch die Probenbearbeitung für die FACS-Analyse – von 1% auf 0,48% reduziert hat (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Prozentualer Tumorzellanteil vor der Probenbearbeitung, nach dem Ficoll und ohne Ficoll

	<b>Tumorzellanteil vor der Probenbearbeitung</b>	<b>Tumorzellanteil nach Ficoll</b>	<b>Tumorzellanteil ohne Ficoll</b>
<b>Probe A</b>	1%	0,12%	
<b>Probe B</b>	0,1%	0,01%	
<b>Probe C</b>	0,01%	0,001%	
<b>Probe D</b>	1%		0,48%

#### **4.1.5 Absoluter Verlust von Monozyten durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS**

Um neben dem prozentualen auch den absoluten Verlust an Zielzellen in der Dichtegradientenzentrifugation und im MACS zu eruieren, wurden erneut Versuche mit Monozyten als Modellzellpopulation durchgeführt, da sie im Gegensatz zu Tumorzellen auch mittels maschineller Blutbildanalyse quantitativ erfasst werden können.

Dazu wurde zunächst der Monozytenanteil im Vollblut eines Normalspenders maschinell bestimmt. Im Anschluss wurden 2 ml dieses Vollblutes ficolliert und danach der Monozytenanteil sowohl mittels Durchflusszytometrie als auch mittels maschineller Blutbildanalyse eruiert. Es folgte eine Positivselektion der Monozyten im MACS mithilfe von CD14-MicroBeads und eine abschließende durchflusszytometrische Analyse und Blutbildanalyse zur Bestimmung der Monozytenanzahl.

Von den ursprünglich in der Probe enthaltenen  $1 \times 10^6$  Monozyten waren nach der Dichtegradientenzentrifugation noch  $5,4 \times 10^5$  Monozyten enthalten, was einem prozentualen Monozytenverlust von 46% entspricht. Nach dem MACS waren nur noch  $9 \times 10^4$  Monozyten vorhanden, was einem Verlust von 83% bei der Kombination von Dichtegradientenzentrifugation und MACS-Verfahren gleichkommt (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Absoluter und prozentualer Verlust von Monozyten nach Dichtegradientenzentrifugation und MACS

<b>Zeitpunkt der Analyse</b>	<b>Absolute Monozytenzahl</b>	<b>Absoluter Monozytenverlust</b>	<b>Prozentualer Monozytenverlust</b>
Vor Beginn der Probenbearbeitung	$1 \times 10^6$		
Nach der Dichtegradientenzentrifugation	$5,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	46%
Nach dem MACS	$9 \times 10^4$	$4,5 \times 10^5$	83%

#### **4.1.6 Absoluter Verlust von Tumorzellen durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS**

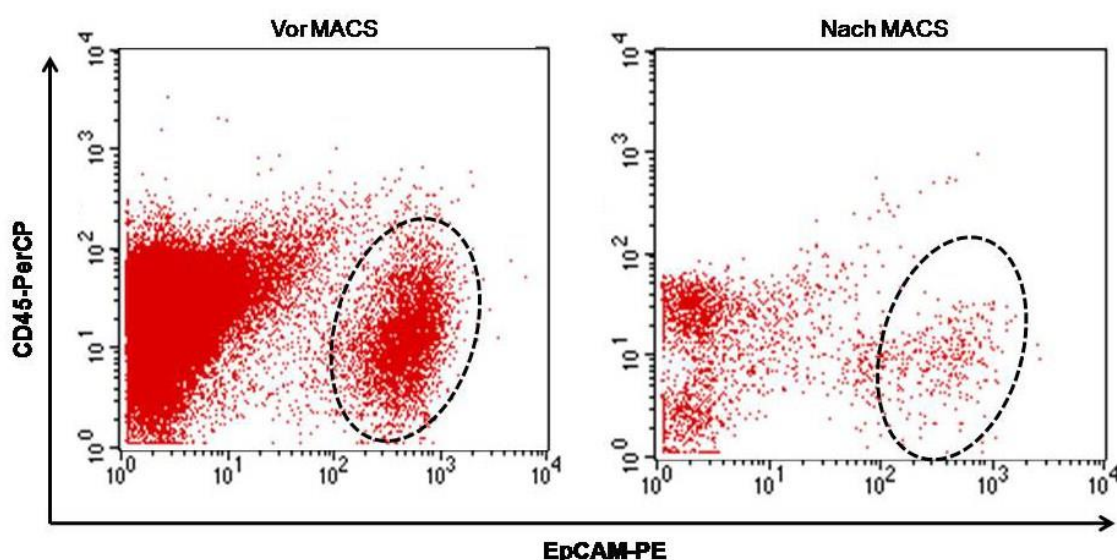
Wie für die Monozyten als Modellzellpopulation sollten im Folgenden ebenfalls absolute Werte für den Verlust von Tumorzellen durch Dichtegradientenzentrifugation und MACS-Verfahren gewonnen werden.

Dazu wurde der Anteil von Lymphozyten und Monozyten (~PBMCs) im Vollblut eines Normalspenders mittels maschineller Blutbildanalyse bestimmt. Zu 5ml dieses Blutes wurden  $1,4 \times 10^5$  (=1%) Kolonkarzinomzellen der HT-29-Zelllinie bezogen auf die Anzahl der PBMCs dazugegeben. Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden die PBMCs und die Tumorzellen in der Probe isoliert. Es folgte die Inkubation der Probe mit PE-markierten EpCAM-Antikörpern und PerCP-markierten CD45-Antikörpern für die FACS-Analyse und Anti-PE-MicroBeads für die Anreicherung der Tumorzellen mittels MACS. Eine FACS-Analyse mit einer Bestimmung des Tumorzellanteils sowie eine Bestimmung der Anzahl von PBMCs mittels maschineller Blutbildanalyse erfolgten sowohl nach der Dichtegradientenzentrifugation als auch nach dem MACS-Verfahren. Für die FACS-Analyse wurden stets alle in der Proben enthaltenen Zellen aufgenommen. Aus dem Prozentsatz der enthaltenen Tumorzellen und der Gesamtzahl der PBMCs konnte die absolute Tumorzellzahl und damit der absolute Tumorzellverlust nach der Dichtegradientenzentrifugation berechnet werden. Dabei zeigte sich ein deutlicher Verlust von 54,2% der ursprünglich in der Probe enthaltenen Tumorzellen (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Verlust von Tumorzellen durch Dichtegradientenzentrifugation

<b>Zeitpunkt der Analyse</b>	<b>Absolute Tumorzellzahl</b>	<b>Absoluter Tumorzellverlust</b>	<b>Prozentualer Tumorzellverlust</b>
Vor der Probenbearbeitung	$1,4 \times 10^5$		
Nach der Dichtegradientenzentrifugation	$6,4 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$	54,2%

Eine exakte Bestimmung des absoluten Tumorzellverlustes durch das MACS-Verfahren war nicht möglich, da die maschinelle Bestimmung der Anzahl an PBMCs in der Probe nach dem MACS aus gerätetechnischen Gründen nicht durchführbar war. Die Anzahl der PBMCs wäre bei der Berechnung der Tumorzellanzahl als Bezugsgröße unabdingbar gewesen. Ein deutlicher relativer Verlust lässt sich allerdings in Abbildung 4 erkennen.



**Abbildung 4:** Durchflusszytometrische Analyse einer Probe aus ficolliertem Vollblut von NS 5 mit 1% zugesetzten HT-29-Zellen bezogen auf die Anzahl der enthaltenen PBMCs vor (linke Abbildung) und nach (rechte Abbildung) dem MACS. Die Tumorzellen sind als EpCAM-positive und CD45-negative Zellpopulation im rechten unteren Quadranten identifizierbar. In der linken Abbildung ist durch die Positivselektion der Tumorzellen mittels MACS unter Verwendung von PE-markierten MBs eine deutliche Abnahme der Gesamtzellzahl und auch der Tumorzellpopulation zu erkennen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der hohe Verlust der ohnehin nur sehr geringen Zahl an Tumorzellen durch die Dichtegradientenzentrifugation und das MACS mit PE-konjugierten MicroBeads als nicht tolerabel angesehen und nach Alternativen gesucht, den Leukozytenhintergrund zur einfacheren Identifizierung der Tumorzellpopulation zu reduzieren.

#### 4.1.7 Verlust von Tumorzellen durch Lyse von Erythrozyten

Zur Reduktion der Zellmasse in der Probe wurde im Folgenden eine Erythrozytenlyse mittels Ammoniumchlorid durchgeführt. Dabei konnte eine deutliche Verringerung der Erythrozytenmasse erreicht werden. Jedoch geht auch dieses Verfahren mit einem Verlust von weiteren Zellpopulationen einher. Zur genaueren Verifizierung des Verlustes an Tumorzellen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

Ein definiertes Volumen an Vollblut eines Normalspenders wurde in zwei Ansätzen mit jeweils 1% HT-29-Zellen bezogen auf die Anzahl der enthaltenen PBMCs versetzt. Um den Verlust an Tumorzellen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten während der Probenbearbeitung zu untersuchen erfolgte bei Probe A die Lyse nach der Färbung mit PE-markierten EpCAM-Antikörpern und PerCP-markierten CD45-Antikörpern für die FACS-Analyse, bei Probe B vor der Färbung. Anschließend wurden in der FACS-Analyse alle Zellen akquiriert und der Tumorzellanteil in der Probe bestimmt.

Es zeigte sich bei Probe B mit 45% ein geringerer Verlust an Tumorzellen als bei Probe A mit 54% (siehe Tabelle 11). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die Erythrozytenlyse bei den nachfolgenden Versuchen stets vor der Färbung mit Antikörpern durchgeführt und als fester Bestandteil zur Reduktion der Zellmasse in der Probe integriert.

**Tabelle 11:** Absoluter und prozentualer Verlust von Tumorzellen durch Erythrozytenlyse

<b>Zeitpunkt der Analyse</b>	<b>Absolute Tumorzellzahl</b>	<b>Absoluter Tumorzellverlust</b>	<b>Prozentualer Tumorzellverlust</b>
Vor der Probenbearbeitung	$3,4 \times 10^4$		
Lyse nach der Färbung (Probe A)	$1,6 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	54%
Lyse vor der Färbung (Probe B)	$1,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	45%

#### 4.1.8 Untersuchung von Patientenmaterial mit Isotypkontrolle und Negativkontrolle

Zur Testung der Durchführbarkeit des gefundenen Verfahrens bei Patientenmaterial wurden Untersuchungen mit venösem Vollblut von Tumorpatienten durchgeführt. Dazu wurden jeweils 7,5ml Vollblut von 3 Patienten mit metastasiertem Kolorektalem Karzi-

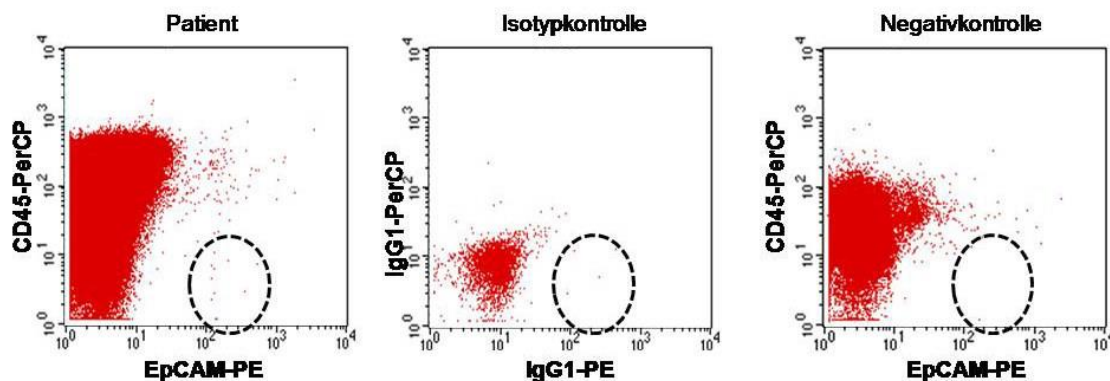
nom mit 48ml Ammoniumchloridlyse lysiert und mit PE-konjugierten EpCAM-Antikörpern und PerCP-konjugierten CD45-Antikörpern inkubiert. Bei der FACS-Analyse wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen aufgenommen.

Da die CTCs im Analyseplot des FACS nur schwer eindeutig identifizierbar waren, wurde bei der Untersuchung des folgenden Patientenmaterials zur besseren Abgrenzbarkeit der CTC-Population zusätzlich jeweils eine Isotypkontrolle der verwendeten Antikörper zur Detektion fehlerhafter Bindungen und eine Negativkontrolle mit gesunden Probanden vorgenommen.

Die Isotypkontrolle erfolgte mit 100µl Vollblut des Patienten, das mit Anti-IgG1-PE-, Anti-IgG1-FITC- und Anti-IgG1-PerCP-Antikörpern inkubiert worden war.

Es zeigte sich in der Isotypkontrolle eine deutlich reduzierte Gesamtzellmasse, jedoch auch die Lokalisation von Zellen in CTC-Feldern als Ausdruck von unspezifischen Bindungen der verwendeten Antikörper (siehe Abbildung 5).

Die Negativkontrollen von gesunden Normalspendern ergaben keine Zellen in CTC-Feldern und wurden aus diesem Grund bei den folgenden Versuchen nicht weiter durchgeführt.



**Abbildung 5:** Durchflusszytometrische Analyse einer Probe eines Patienten mit metastasiertem CRC (linke Abbildung), der dazugehörigen Isotypkontrolle (Abbildung in der Mitte) und der Negativkontrolle von NS 1 (rechte Abbildung). CTCs liegen als EpCAM-positive und CD45-negative Zellen im dargestellten Bereich und sind in der Patientenprobe deutlich erkennbar. In der Isotypkontrolle zeigten sich ebenfalls wenige Dots im CTC-Feld als Ausdruck von unspezifischen Bindungen der verwendeten Antikörper. Die Negativkontrolle ergab keine EpCAM-positiven Zellen.

#### **4.1.9 Leukozytendepletion mithilfe von MACS**

Nachdem durch Optimierung der Einstellungen am FACScan-Gerät in der Isotypkontrolle weiterhin keine ausreichende Präzision erzielt werden konnte, wurde der Nutzen einer Leukozytendepletion als Negativselektion mittels MACS-Verfahren untersucht.

Hierzu wurde wiederum auf eine Modellprobe aus lysiertem Vollblut von Spender 5 mit zugesetzten Pankreaskarzinomzellen der Aspc-1-Linie zurückgegriffen. Im Vergleich wurden fünf verschiedene Varianten zur Durchführung des MACS-Verfahrens auf die Effektivität der Leukozytendepletion und das Maß des Tumorzellverlustes untersucht.

Für Variante A und B wurden jeweils 1ml Vollblut mit 245 Aspc-1-Zellen verwendet. In Probe A erfolgte das MACS mit CD45-Microbeads für Vollblut und einer speziellen Säule für Vollblut. Im Anschluss erfolgte die Analyse mittels FACS. Dabei wurden stets alle in der Probe enthaltenen Zellen aufgenommen und analysiert.

Für Probe B wurden PE-konjugierte CD45-Antikörper, PE-Microbeads und ebenfalls eine spezielle Säule für Vollblut eingesetzt.

1ml Vollblut mit 10 Aspc-1-Zellen war jeweils in den Proben C, D und E enthalten.

In Probe C wurden CD45-Microbeads für Vollblut und eine MS-Säule genutzt, in Probe D CD45-Microbeads ohne Vollblutspezifität und eine LD-Säule. Im Vergleich zu den oben genannten Varianten des MACS wurde eine Probe (E) ohne zwischengeschaltetes MACS analysiert.

Variante D zeigte den geringsten Tumorzellverlust durch MACS (siehe Tabelle 12) und eine gute Leukozytendepletion und wurde für die weiteren Untersuchungen zur Erleichterung der Identifizierung EpCAM-positiver Zellen in der FACS-Analyse favorisiert. Unterstützend wurden im Folgenden zusätzlich FITC-konjugierte Zytokeratin-Antikörper als weiterer spezifischer Marker für Zellen epithelialen Ursprungs eingesetzt. CTCs zeigen in der FACS-Analyse eine Doppelfluoreszenz im Hinblick auf die Markierung mit EpCAM-PE-Antikörpern und Zytokeratin-FITC-Antikörper.



**Tabelle 12:** Verschiedenen MACS-Varianten im Vergleich

	<b>Microbeads</b>	<b>Säule</b>	<b>Prozentualer Tumorzellverlust</b>	<b>Leukozyten- depletion</b>
<b>Probe A</b>	Vollblut CD45	Vollblut	40%	gering
<b>Probe B</b>	PE	Vollblut	85%	gut
<b>Probe C</b>	Vollblut CD45	MS	60%	gut
<b>Probe D</b>	CD45	LD	30%	gut
<b>Probe E</b>	keine	keine	20%	keine

Die Leukozytendepletion mittels MACS zeigte auch in Untersuchungen mit Patientematerial Erfolge in Form einer einfacheren und eindeutigeren Identifizierung von Tumorzellen aufgrund der deutlichen Reduktion des Leukozytenhintergrundes. In den parallel durchgeführten Isotypkontrollen zeigten sich in den CTC-Feldern keine oder nur wenige Dots, woraufhin für die Isotypkontrolle keine weitere Notwendigkeit gesehen wurde. Artefakte in der FACS-Analyse konnten durch den Ersatz der CD45-PerCP-Antikörper durch CD45-APC-Antikörper und durch die Neueinstellung des FITC-Kanals am FACS-Gerät (Calibur) fast vollständig eliminiert werden.

Das gefundene Verfahren wurde als Protokoll für die Messung und Analyse von Proben von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren und gesunden Normal Spendern festgelegt (siehe Kapitel 4.2.1).

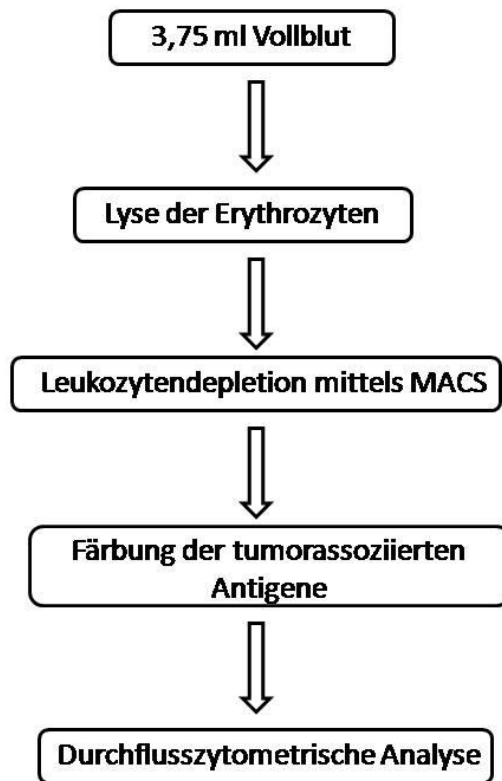
## 4.2 Ergebnisse des Patientenkollektivs

### 4.2.1 Protokoll

Zum Vergleich der Anzahl von CTCs im Blut von Patienten mit fortgeschrittenen Gastrointestinaltumoren und von gesunden Normalspendern wurde Vollblut von 42 Patienten und 11 Normalspendern mit dem gefundenen Verfahren analysiert.

Dazu wurden jeweils 3,75 ml Vollblut zunächst mit Ammoniumchloridlyse lysiert.

Um die Anzahl weiterer Zellpopulationen neben den CTCs möglichst gering zu halten, wurde eine Leukozytendepletion mittels MACS-Verfahren durchgeführt. Hierzu wurden CD45-MicroBeads und LD-Säulen verwendet. Die Leukozytendepletion zeigte jedoch unterschiedliche Erfolgsraten, die auf die Individualität der Zellpopulationen in jeder einzelnen Blutprobe zurückzuführen sind. Für die anschließende Durchflusszytometrie folgte die Färbung der tumorassoziierten Antigene mit Anti-CD326-PE, Anti-CK-FITC und 10 Anti-CD45-APC. Für die FACS-Analyse wurden jeweils alle in der Probe enthaltenen Zellen aquiriert. Zur objektiven Lokalisation der CTCs im Analyse-Dotplot wurde ein Gate (G2) festgelegt, in dem die CTCs liegen, die doppelt positiv für EpCAM und Zytokeratin sind (siehe Abbildung 6). Im Folgenden wurde für jede Probe die absolute Anzahl der CTCs bestimmt. Diese CTC-Zahl wurde stets in auf 3,75 ml Vollblut bezogen.



**Abbildung 6:** Darstellung der Arbeitsschritte des Protokolls, nach dem alle Proben von Patienten und Normalspendern analysiert wurden

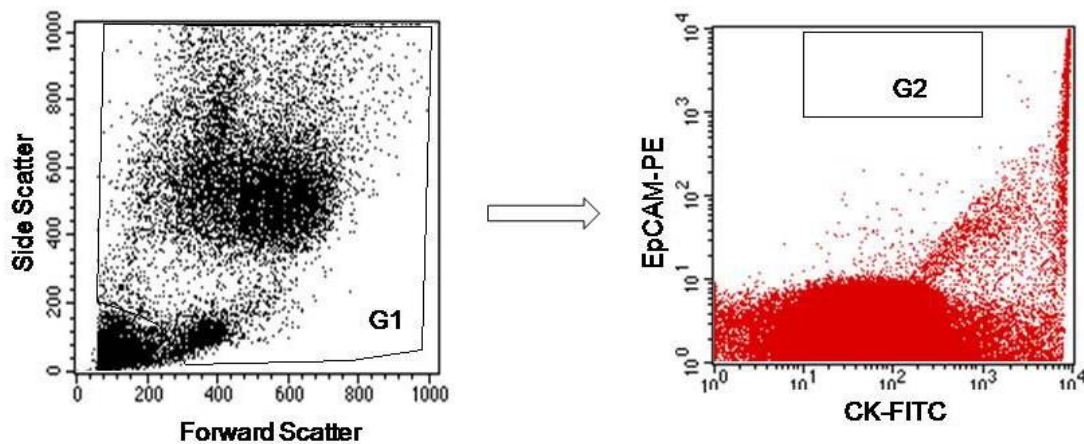
#### **4.2.2 Normalspender**

Das Vergleichskollektiv wurde von 10 gesunden Normalspendern unterschiedlichen Geschlechts und Alters gebildet (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Vergleichskollektiv der gesunden Normalspender

Proband	Geschlecht	Alter	Anzahl EpCAM-positiver Zellen/3,75 ml Vollblut
A	w	51	0
B	m	56	0
C	m	51	0
D	w	56	2
E	m	52	1
F	w	56	0
G	w	64	1
H	w	62	2
I	m	68	1
J	w	22	0

Bei keinem der 10 Normalspender konnten  $> 2$  CTCs in den 3,75 ml untersuchten Vollblutes nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7). Somit galten alle Normalspender als CTC-negativ.



**Abbildung 7:** Durchflusszytometrische Analyse der Probe von Normalspender A. In der linken Abbildung sind alle im FACS aquirierten Zellen zunächst in einem Punktdiagramm mit dem Vorwärts-Scatter auf der Ordinate und dem Seit-Scatter auf der Abszisse dargestellt. Das festgelegte Gate G1 enthält alle vitalen Zellen. In einem zweiten Punktdiagramm mit der FITC-Fluoreszenz auf der Ordinate und der PE-Fluoreszenz auf der Abszisse (rechte obere Abbildung) werden alle Zellen aus G1 aufgerufen und das Gate G2 festgelegt, wo die EpCAM- und CK-positiven CTCs erwartet werden. Bei diesem Normalspender beträgt die Anzahl der CTCs 0.

Bei 3 von 10 Normalspendern (30%) wurden 2 CTCs nachgewiesen. Nach der oben festgelegten Definition würden diese Normalspender als CTC-positiv gelten. Aufgrund von unspezifischen Bindungen wurden sie jedoch als falsch positiv gewertet.

#### 4.2.3 Patienten

Bei 42 Patienten mit gastrointestinalen Tumoren wurde mit oben genannter Methode die Anzahl von CTCs im peripheren Vollblut bestimmt. Alle Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Messungen in einem fortgeschrittenen Tumorstadium mit nachgewiesener Fernmetastasierung. Patienten mit 5 verschiedenen Tumorentitäten wurden in das Kollektiv eingeschlossen (Kolorektales Karzinom, n = 7; Pankreaskarzinom, n = 13; Adenokarzinom des Magens und des gastroösophagealen Übergangs, n = 17; Cholangiozelluläres Karzinom, n = 3; Neuroendokriner Tumor des Gastrointestinaltrakts, n = 2).

Zum Teil hatten die Patienten zum Zeitpunkt der Messungen bereits eine Therapie in Form eines operativen Eingriffs, einer Chemotherapie oder einer Radiatio erhalten (siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14:** Übersicht über das Patientenkollektiv mit Geschlecht, Alter, Tumorentität, Vortherapie zum Zeitpunkt der Messung und Anzahl der CTCs/3,75 ml Vollblut. (S) = Patient der AIO-STO-0110 Studie

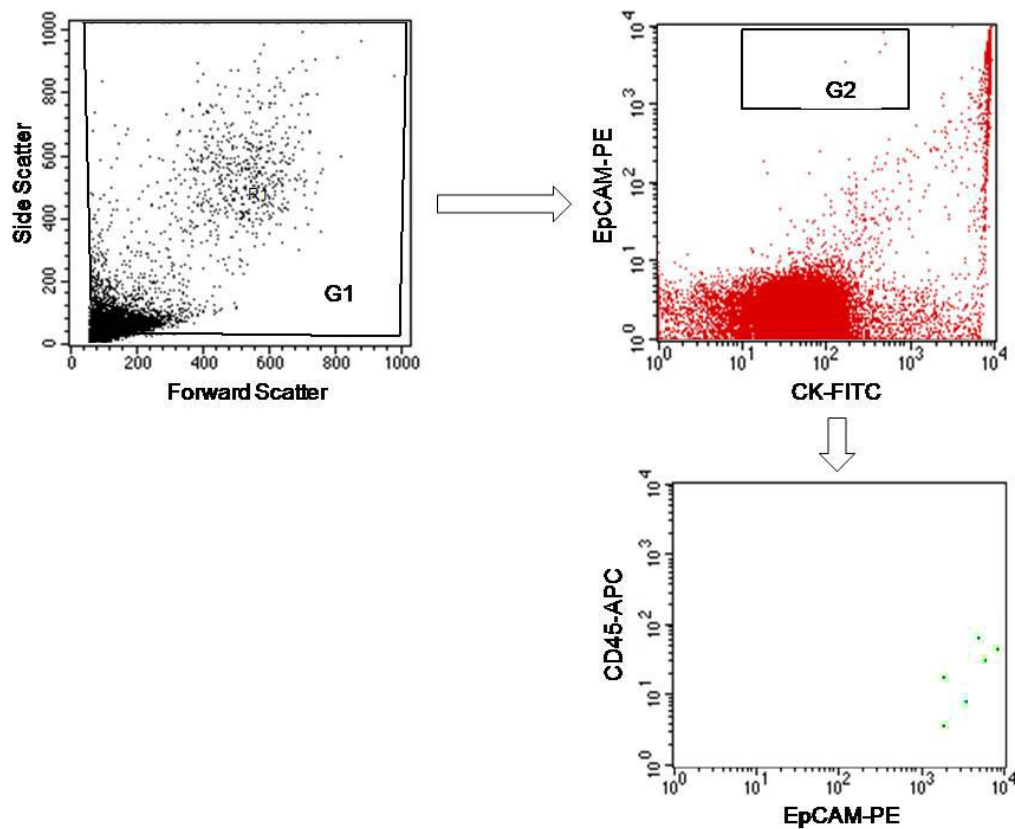
<b>Patient</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter [Jahren]</b>	<b>Tumorentität</b>	<b>bisherige Therapie</b>	<b>CTC</b>
<b>P 1</b>	m	70	Adeno-Ca des Pankreas	keine	2
<b>P 2</b>	m	67	NET des rektosigmoidalen Übergangs	keine	10
<b>P 3</b>	w	71	Adeno-Ca des Pankreas-Corpus	Z.n. Gastroenterostomie und Ctx	7
<b>P 4 (S)</b>	w	65	Adeno-Ca des Magens	keine	7
<b>P 5</b>	w	41	AEG vom diffusen Typ	Z.n. Ovariectomie	5
<b>P 6</b>	m	52	Duktales Adeno-Ca des Pankreas-Kopfes	keine	5
<b>P 7</b>	m	74	Adeno-Ca des Pankreas-Kopfes	keine	5
<b>P 8</b>	w	54	CRC des Colon descendens	Z.n. Hemikolektomie links und Ctx	3
<b>P 9</b>	m	64	CRC des Rektums	Z.n. neoadjuvanter Rtx/Ctx und Rektumresektion	7

<b>P 10</b>	w	52	CRC des Rektums	Z.n. neoadjuvanter Rtx/Ctx und Rektumresektion	4
<b>P 11</b>	m	51	AEG Typ1	Z.n. neoadjuvanter Ctx	2
<b>P 12</b>	m	83	CCC	keine	0
<b>P 13</b>	w	65	CRC des Sigmas	Z.n. Hemikolektomie links	0
<b>P 14 (S)</b>	w	48	Adeno-Ca des Magens	keine Ctx	6
<b>P 15</b>	m	79	Adeno-Ca des Pankreas-Kopfes	Z.n. Whipple-OP und Ctx	1
<b>P 16</b>	m	65	CRC des Sigmas	Z.n. Pankreasresektion und Lebermetastasenresektion	3
<b>P 17</b>	m	59	NET des Ileums	Z.n. Ctx	0
<b>P 18</b>	m	45	Adeno-Ca des Pankreas-Corpus	keine	0
<b>P 19</b>	w	70	CCC	Z.n. Hemihepatektomie und Ctx	0
<b>P 20</b>	w	69	CCC	keine	0
<b>P 21</b>	w	66	AEG	keine	0
<b>P 22</b>	m	60	CRC des Rektums	Z.n. neoadjuvanter Ctx und Rektumresektion	3
<b>P 23</b>	w	73	CRC des Rektums	Z.n. Rektumresektion, Metastasenresektion und Ctx	0
<b>P 24</b>	w	62	Adeno-Ca des Pankreas-Kopfes	keine	1
<b>P 25</b>	w	73	Adeno-Ca des Pankreas	keine	0
<b>P 26 (S)</b>	m	55	Adeno-Ca des Magens	Ctx	0
<b>P 27</b>	m	52	Siegelringzell-Ca des Magens vom diffusen Typ	keine	1
<b>P 28 (S)</b>	m	58	Adeno-Ca des Magens	keine	0
<b>P 29 (S)</b>	w	63	Adeno-Ca des Magens	keine	3
<b>P 30</b>	m	65	Adeno-Ca des Pankreas-Kopfes	keine	3
<b>P 31</b>	m	76	Adeno-Ca des Magen-Antrums	Z.n. Magenresektion	0
<b>P 32 (S)</b>	m	75	Adeno-Ca des Magens	Z.n. Ctx	3
<b>P 33 (S)</b>	m	37	Adeno-Ca des Magens	keine	2
<b>P 34</b>	w	60	duktales Adeno-Ca des Pankreasschwanzes	Z.n. Ctx	0
<b>P 35</b>	m	73	Adeno-Ca des Pankreas	Z.n. Ctx	2
<b>P 36 (S)</b>	m	45	Adeno-Ca des Magens	Z.n. Ctx	2
<b>P 37</b>	m	60	Adeno-Ca des Magens	keine	7
<b>P 38</b>	w	45	Adeno-Ca des Magen-corpus vom Mischtyp	keine	3

<b>P 39</b>	m	59	Adeno-Ca des Magens	Z.n. Ctx	2
<b>P 40</b>	w	46	Adeno-Ca des Pankreas-Kopfes	Z.n. Pankreasresektion	7
<b>P 41</b>	w	62	muzinöses Ca des Pankreas-Kopfes	keine	1
<b>P 42</b>	m	58	Adeno-Ca des Magens	keine	1

Bei der Analyse des Materials aus der durchflusszytometrischen Messung der Patientenproben wurde eine einheitliche Gatingstrategie angewandt. Zunächst wurden alle aufgenommenen Zellen in einem Punktediagramm mit dem Vorwärts-Scatter auf der Ordinate und dem Seit-Scatter auf der Abszisse dargestellt. Um die toten Zellen von der weiteren Analyse auszuschließen wurde das Gate G1 festgelegt, in dem sich alle vitalen Zellen befinden. In einem zweiten Punktediagramm mit der Fluoreszenz Zytokeratin-FITC auf der Ordinate und der Fluoreszenz EpCAM-PE auf der Abszisse werden die Zellen aus dem Gate G1 aufgerufen. Mit dem Gate G2 wurde das Gate festgelegt, in dem die CTCs liegen, die sowohl EpCAM auf ihrer Zelloberfläche exprimieren als auch Zytokeratine als Zeichen ihres epithelialen Ursprungs aufweisen.

Als Kontrolle wurde in einem dritten Diagramm die Fluoreszenz EpCAM-PE gegen die Fluoreszenz CD45-APC aufgetragen und das Gate G2 aufgerufen. Im rechten unteren Quadranten liegen die CTCs, die eine EpCAM-Positivität und eine CD45-Negativität besitzen (siehe Abbildung 8).

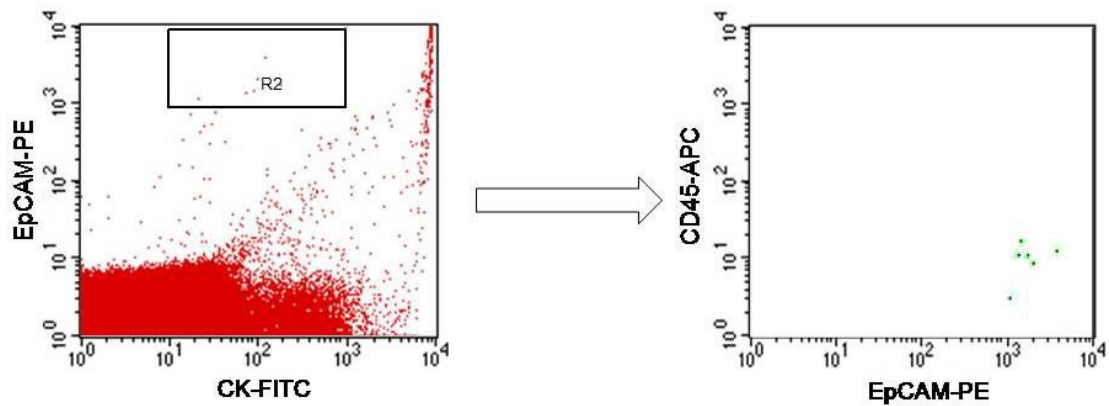


**Abbildung 8:** Gatingstrategie bei der durchflusszytometrischen Analyse einer Patientenprobe. In der linken Abbildung sind alle in FACS acquirierten Zellen zunächst in einem Punktediagramm mit dem Vorwärts-Scatter auf der Ordinate und dem Seit-Scatter auf der Abszisse dargestellt. Das festgelegte Gate G1 enthält alle vitalen Zellen. In einem zweiten Punktediagramm mit der FITC-Fluoreszenz auf der Ordinate und der PE-Fluoreszenz auf der Abszisse (rechte obere Abbildung) werden alle Zellen aus G1 aufgerufen und das Gate G2 festgelegt, das die EpCAM- und CK-positiven CTCs enthält. Die rechte untere Abbildung zeigt, dass die CTCs aus G2 in einem anderen Punktediagramm mit der PE-Fluoreszenz auf der Ordinate und der APC-Fluoreszenz auf der Abszisse als EpCAM-positive und CD45-negative Zellen im rechten unteren Feld liegen.

### Patienten mit Magenkarzinom

7 von 17 Patienten (41%) mit einem Adenokarzinom des Magens, des gastroösophagealen Übergangs oder einem Siegelringzellkarzinom des Magens zeigten CTC-Zahlen  $>2$  und wurden somit als CTC-positiv gewertet.

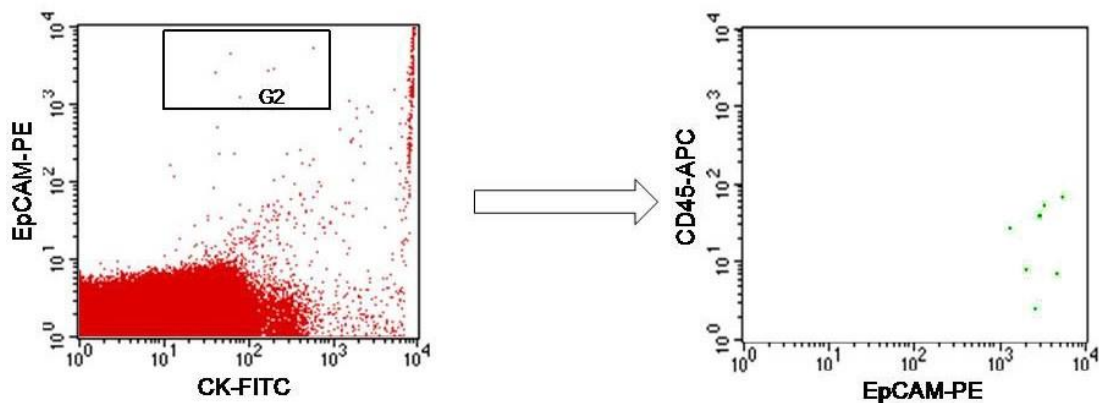




**Abbildung 9:** Durchflusszytometrische Analyse der Probe von Patient P14 mit Magenkarzinom. Die CTCs sind im linken Diagramm im Gate G2 als Zellpopulation mit Doppelfluoreszenz für CK-FITC und EpCAM-PE zu finden. Im rechten Diagramm liegen die EpCAM-positiven und CD45-negativen CTCs im rechten unteren Quadranten.

### Patienten mit Pankreaskarzinom

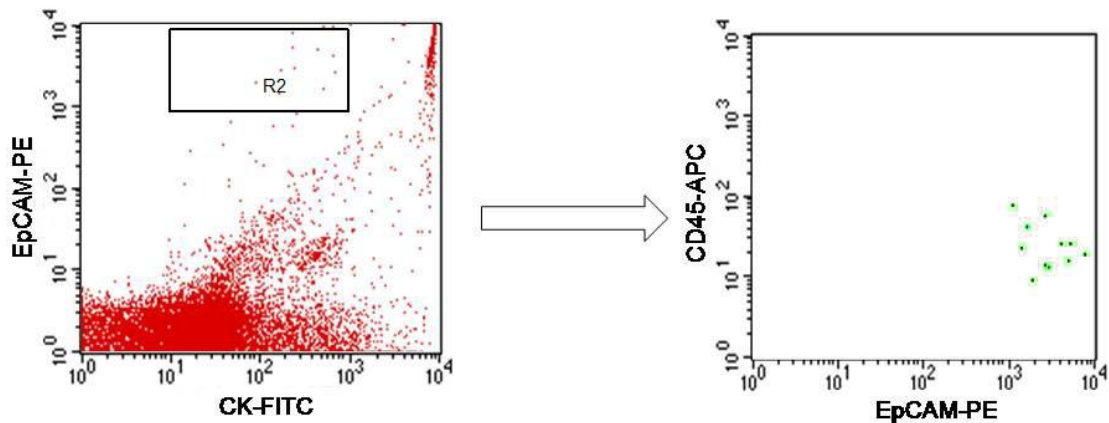
Bei 5 von 13 Patienten (38%) mit einem Adenokarzinom des Pankreaskopfes, -corpus oder -schwanzes konnten >2 CTCs nachgewiesen werden.



**Abbildung 10:** Durchflusszytometrische Analyse der Probe von Patient P7 mit Pankreaskarzinom. Die CTCs sind im linken Diagramm im Gate G2 als Zellpopulation mit Doppelfluoreszenz für CK-FITC und EpCAM-PE zu finden. Im rechten Diagramm liegen die EpCAM-positiven und CD45-negativen CTCs im rechten unteren Quadranten.

### Patienten mit Kolorektalem Karzinom

5 von 7 Patienten (71%) mit einem Kolorektalen Karzinom waren CTC-positiv und wiesen somit >2 CTCs auf.



**Abbildung 11:** Durchflusszytometrische Analyse der Probe von Patient P13 mit Kolorektalem Karzinom. Die CTCs sind im linken Diagramm im Gate G2 als Zellpopulation mit Doppelfluoreszenz für CK-FITC und EpCAM-PE zu finden. Im rechten Diagramm liegen die EpCAM-positiven und CD45-negativen CTCs im rechten unteren Quadranten.

### Patienten mit cholangiozellulärem Karzinom

Bei keinem der 3 Patienten mit einem cholangiozellulären Karzinom konnten CTCs nachgewiesen werden.

### Patienten mit neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltrakts

1 von 2 (50%) Patienten mit einem neuroendokrinen Tumor des Darms waren CTC-positiv.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Patienten mit gastrointestinalen Tumoren in 43% der Fälle >2 CTCs/3,75ml Vollblut aufwiesen und damit als CTC-positiv gelten. Dabei zeigten Patienten mit Kolorektalem Karzinom mit 71% den höchsten Anteil an CTC-Positivität. Bei den gesunden Normalspendern ließen sich in keinem Fall >2 CTCs nachweisen (siehe Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Übersicht über den Anteil CTC-positiver Proben bei den Normalspendern und den Patienten. Dabei gilt eine Probe als CTC-positiv, wenn  $>2$  CTCs/3,75ml Vollblut enthalten sind. Ca=Karzinom, CRC=Kolorektales Karzinom, CCC=Cholangiozelluläres Karzinom, NET=Neuroendokriner Tumor, NS=Normalspender

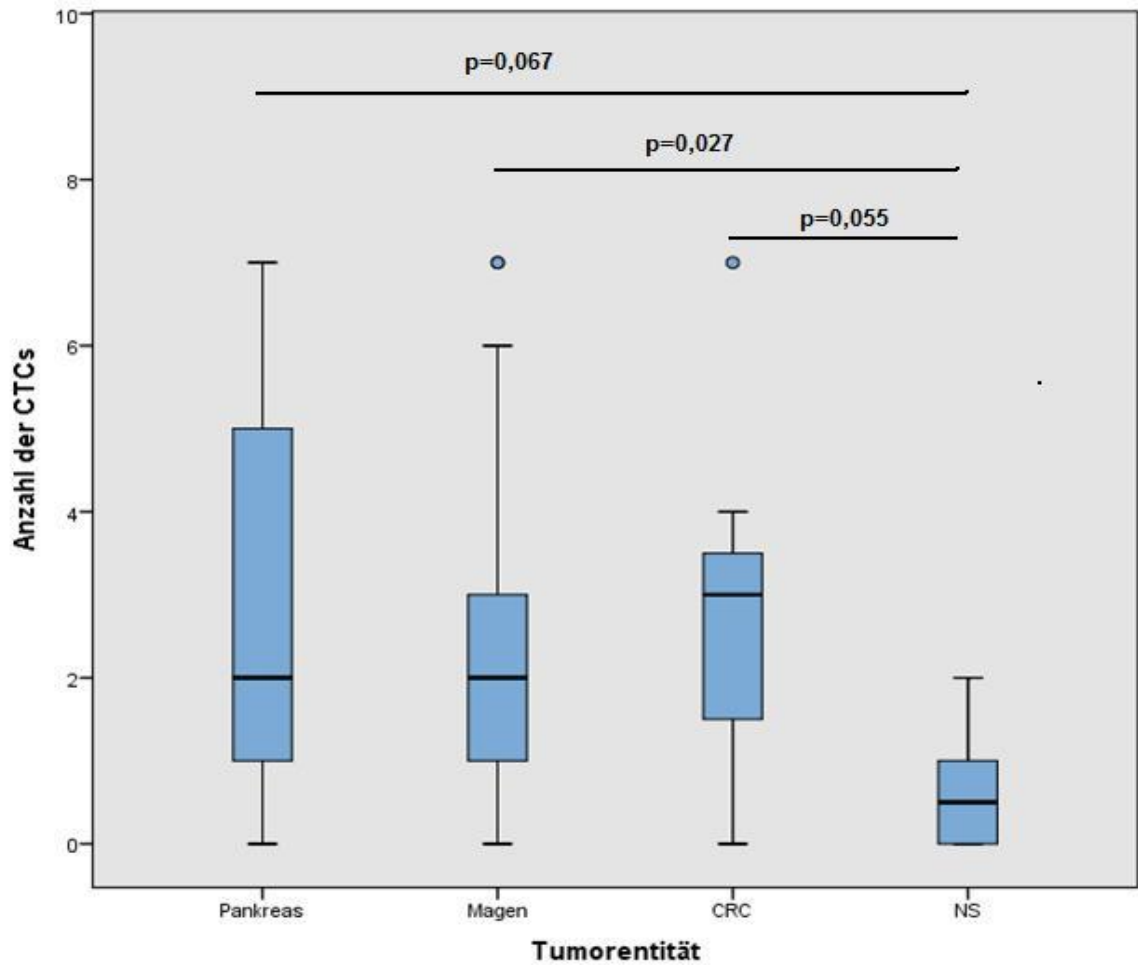
	<b>Anzahl der Proben</b>	<b>CTC positiv</b>	<b>Prozentualer Anteil der CTC-positiven Proben</b>
<b>Pankreas Ca</b>	13	5	38%
<b>Magen Ca</b>	17	7	41%
<b>CRC</b>	7	5	71%
<b>CCC</b>	3	0	0%
<b>NET</b>	2	1	50%
<b>NS</b>	10	0	0%

Die Anzahl an CTCs in 3,75ml peripherem Vollblut lag im gesamten Patientenkollektiv im Durchschnitt bei 2,57. Der Mittelwert in der Gruppe der gesunden Normalspender betrug 0,70 und war damit signifikant geringer als in der Gruppe der Patienten ( $p=0,034$ ).

Innerhalb des Patientenkollektivs zeigten Patienten mit Kolorektalem Karzinom mit 2,86 CTCs/3,75ml Vollblut den höchsten Durchschnitt, wenn die Gruppe mit NET aufgrund der sehr großen Streuung der zwei Werte und die Gruppe mit CCC wegen des Fehlens von CTCs von der Analyse ausgeschlossen werden. Der Mittelwert der Patienten mit Pankreas-Karzinom belief sich auf 2,62 und differierte vom Vergleichskollektiv allerdings ohne Signifikanz ( $p=0,067$ ). Ebenfalls unterschied sich der Mittelwert der Gruppe mit Kolorektalem Karzinom mit 2,86 knapp nicht signifikant von der Vergleichsgruppe der Normalspender ( $p=0,055$ ). Auch wenn bei diesen Patientengruppen definitionsgemäß kein signifikanter Unterschied zum Vergleichskollektiv festgestellt werden konnte, ist eine deutliche Tendenz der Irrtumswahrscheinlichkeit in Richtung  $p<0,05$  zu erkennen und bei größerem Patienten- und Vergleichskollektiv ein signifikanter Unterschied zu erwarten.

In der Gruppe der Patienten mit Magen-Karzinom unterschied sich der Mittelwert von 2,59 signifikant von der Vergleichsgruppe der Normalspender ( $p=0,027$ ) (siehe Abbildung 12).

Die Patientengruppen untereinander unterschieden sich nicht signifikant voneinander.



	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>Pankreas Ca</b>	2,62	2,567	0	7
<b>Magen Ca</b>	2,59	2,373	0	7
<b>CRC</b>	2,86	2,410	0	7
<b>CCC</b>	0	0	0	0
<b>NET</b>	5,00	7,071	0	10
<b>NS</b>	0,70	0,823	0	2

**Abbildung 12:** Anzahl der CTCs in 3,75ml peripheren Vollblut von Patienten mit Pankreas-Karzinom, Magen-Karzinom, Kolorektalem Karzinom (CRC) und von gesunden Normal Spendern (NS). Die Box Plots repräsentieren jeweils eine Studiengruppe. Der Mittelwert wird durch die dicke horizontale Linie gekennzeichnet, 25'igste und 75'igste Perzentile durch die Box, 10'ige und 90'igste Perzentile als Whisker. ° Extreme Werte.

Bei der vergleichenden Analyse von Gruppe A (Patienten mit Magen- oder Pankreas-Karzinom ohne Chemotherapie) und Gruppe B (Patienten mit Magen oder Pankreas-Karzinom nach Chemotherapie) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der CTCs festgestellt werden ( $p=0,657$ ) (siehe Tabelle 16). Hierbei ist bei größeren Patientenkollektiven ein signifikanter Unterschied zu erwarten. In Gruppe A waren 10 von 21 Proben (48%) CTC-positiv ( $>2$  CTCs/3,75 ml Vollblut). In Gruppe B konnten jedoch erwartungsgemäß nur in 2 von 9 Proben (22%)  $> 2$  CTCs nachgewiesen werden.

**Tabelle 16:** Anzahl der CTCs bei Patienten mit Magen- oder Pankreaskarzinom ohne (Gruppe A) und nach Chemotherapie (Gruppe B). Eine Probe gilt als CTC-positiv, wenn  $>2$  CTCs/3,75 ml enthalten sind.

	<b>Anzahl der Patienten</b>	<b>Mittelwert der CTC- Anzahl</b>	<b>SD</b>	<b>Mini- mum</b>	<b>Maxi- mum</b>	<b>CTC- positiv absolut</b>	<b>CTC- positiv relativ</b>
<b>Ohne Chemo- therapie</b>	21	2,81	2,56	0	7	10	48%
<b>Nach Chemo- therapie</b>	9	2,11	2,09	0	7	2	22%

## 5 Diskussion

Die meisten Todesfälle aufgrund einer Tumorerkrankung resultieren nicht aus dem Wachstum des Primärtumors, sondern aus der Ausbildung von Fernmetastasen. Um sich in sekundären Organen ansiedeln zu können, müssen die Tumorzellen vom Primärtumor durch die periphere Zirkulation wandern, wo sie mit verschiedenen Verfahren detektiert werden können.

Das in dieser Arbeit entwickelte CTC-Detektionsverfahren basiert auf immunologischen Methoden, die das epitheliale Antigenmuster von CTCs zur Selektion nutzen. Damit reiht sich dieses Verfahren in eine große heterogene Gruppe von zytologischen Assays ein. Ein großer Vorteil der zytologischen Analyse besteht darin, dass die Zellen nach der Detektion für weitere Analysen und Charakterisierungen zur Verfügung stehen. Molekulare Detektionsmethoden dagegen weisen eine sehr große Heterogenität in Bezug auf die verwendeten Marker und auf die Ergebnisse der eher kleinen Studien auf. Zur DNA- oder RNA-Analyse ist dabei eine Lyse der CTCs notwendig, die im Anschluss keine weiteren Untersuchungen der Zellstruktur zulässt.

Zur Detektion der CTCs aus venösem Vollblut wird in dieser Arbeit zuerst eine Erythrozytenlyse vorgenommen, im Anschluss eine Leukozytendepletion mittels MACS-Verfahren durchgeführt und die CTCs mittels FACS-Analyse identifiziert. Verluste von CTCs durch die notwendigen Schritte der Probenbearbeitung sind dabei jedoch unvermeidbar. Beispielsweise ist jeder Waschgang der Probe zur Entfernung von Lyse- oder MACS-Puffer oder nach Antikörperfärbung mit Zellverlusten verbunden. Durch die Verwendung eines Erythrozytenlysepuffers anstatt der Erythrozytendepletion mittels Dichtegradientenzentrifugation konnte der Verlust von CTCs verringert werden, was auch Krüger et al. bereits gefunden hatten[111]. Nach der Lyse verbleibt dennoch eine gewisse Anzahl von Erythrozyten in der Probe, die bei der durchflusszytometrischen Analyse zusammen mit den toten Zellen in der Probe mittels Gating von den Leukozyten und CTCs getrennt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden müssen. Die Gefahr des CTC-Verlustes durch die Leukozytendepletion mittels MACS-Verfahren wurde vor dem Hintergrund der deutlich besseren CTC-Detektion in Kauf genommen. Von einer Positivselektion der CTCs durch MACS oder andere Verfahren

wurde in Anlehnung an die Ergebnisse von Lara et al. Abstand genommen, da die Informationen über den Phänotyp der Tumorzellen für eine hochspezifische Selektion unzureichend sind[112]. Unter Verwendung von CD45-MicroBeads zur Negativselektion zeigte sich in den Vorversuchen mit 30% die geringste Rate an CTC-Verlusten. Außerdem wird bei der Positivselektion durch die Antikörper-Färbung eine Manipulation an den zu untersuchenden Tumorzellen vorgenommen, die eine weitere Analyse nach der quantitativen Detektion erschweren könnte[112].

Mit diesem Assay konnte eine Wiederfindungsrate von 55% der eingesetzten Tumorzellen erreicht werden. Das CellSearch® System der Firma Veridex, das als einziges System von der U.S. FDA (Food and Drug Administration) für den klinischen Gebrauch freigegeben[1] ist, weist zum Vergleich mit ungefähr 80% eine höhere Wiederfindungsrate auf. In Modellsystemen kann mit dem CellSearch® System eine Tumorzelle in 7,5 ml Blut identifiziert werden[2, 60], das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren kann daneben eine Tumorzelle in 3,75 ml Blut identifizieren.

Ein großer Nachteil des CellSearch® Systems besteht jedoch darin, dass die CTCs in jeder Probe bei der Analyse von einem Untersucher identifiziert werden müssen. Trotz Erfahrung und Sachverstand führt diese Subjektivität zu ungleichen Ergebnissen bei verschiedenen Untersuchern. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode arbeitet bei der Identifizierung der CTCs, die ebenfalls von einem Untersucher mithilfe einer Analysesoftware durchgeführt wird, dagegen mit eindeutig festgelegten Gates, sodass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich höher ist. Tabelle 17 vergleicht zusammenfassend das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren mit dem CellSearch® System.

**Tabelle 17:** Vergleich des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens mit dem CellSearch® System

	<b>Eigenes Verfahren</b>	<b>CellSearch® System</b>
Subjektivität und Reproduzierbarkeit	Niedrigere Subjektivität und höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch eine festgelegte Gatingstrategie	Höhere Subjektivität und geringere Reproduzierbarkeit durch Einzelzellidentifikation durch einen Untersucher
Selektion der CTCs	Negativselektion der CTCs → geringerer Verlust von CTCs mit unspezifischem Antigenmuster	Positivselektion der CTCs → Manipulation der CTCs, wodurch weitergehende Analysen erschwert werden
Wiederfindungsrate	55 %	80 %
Sensitivität	Detektion von 1 CTC in 3,75 ml Vollblut	Detektion von 1 CTC in 7,5 ml Vollblut
Antigenspektrum	EpCAM, panCK	EpCAM, CK 8/18/19/45, DAPI

Allgemein existiert bei den verschiedenen Analysemethoden (siehe Kapitel 1.2) eine relativ große Spannbreite bei der Anzahl der detektierten CTCs. Die Ursache liegt wahrscheinlich in den unterschiedlichen Definitionen einer CTC[7, 34, 39, 51]. Die CTC-Definition im CellSearch®System wurde in prospektiven klinischen Studien validiert[18, 32, 33, 58, 59]. Für den entwickelten Assay ist die Durchführung einer derartigen Validierung mit einer Änderung und Erweiterung des Antigenspektrums inklusive Vitalitätsmarkern durch zukünftige Studien dringend erforderlich.

Dennoch stellt das vorgestellte Verfahren eine einfache und kosteneffektive Möglichkeit dar, CTCs aus venösem Vollblut ohne vorherige aufwendige Materialbearbeitung mit guter Sensitivität und Spezifität zu detektieren. Dabei können bis zu  $3 \times 10^6$  Zellen in einer Probe aquiriert und analysiert werden. Bei der quantitativen Bestimmung der CTC-Zahlen von Patienten und Normalspendern mithilfe dieses Verfahrens konnte festgestellt werden, dass Patienten mit gastrointestinalen Tumoren annähernd signifikant höhere Zahlen von CTCs im peripheren Blut aufweisen als gesunde Normalspender, was von Allard et al. bereits gezeigt worden war[2] Aufgrund der eher geringen Größe des Patientenkollektivs von 42 und des Vergleichskollektivs von 10 Probanden ist eine Validierung des Systems mit deutlich größeren Kollektiven erforderlich, um die Stabilität, Spezifität und Sensitivität näher festlegen zu können und signifikante Unterschiede zwischen der Patienten- und der Vergleichsgruppe zu gewinnen.



## **Herausforderungen bei der CTC-Detektion**

Die wahrscheinlich größte Herausforderung bei der Detektion von CTCs im venösen Vollblut von Tumorpatienten ist ihre äußerst geringe Anzahl in der peripheren Zirkulation. Durch die effektiven Eliminationsmechanismen des Immunsystems vor allem durch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) überleben weniger als 0,1% der CTCs in der Zirkulation auf dem Weg zu sekundären Organen[5]. Außerdem beträgt zum Beispiel bei Mamma-Karzinom-Patientinnen die Halbwertszeit von CTCs im peripheren Blut nur 1 bis 2,4 Stunden[113].

Vor allem bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren ist die Anzahl von CTCs im Blut aufgrund der Filterung durch die vorgeschaltete Portalzirkulation besonders niedrig. Das stellt hohe Anforderungen an das Detektionsverfahren, das eine sehr hohe Sensitivität aufweisen muss.

CTCs weisen daneben eine große Heterogenität auf, da sie entweder vom Primärtumor oder von verschiedenen Metastasen in sekundären Organen stammen können[6]. Besonders im Vergleich zu den in den Vorversuchen verwendeten Tumorzellen aus jahrelang kultivierten und stabilen Zelllinien stellen CTCs eine deutlich inhomogenere Zellpopulation dar und weisen daneben eine geringere Widerstandsfähigkeit während des Analyseprozesses auf[114]. Besonders die Identifizierung potentiell metastasenbildender CTCs und die Unterscheidung von der weniger aggressiven Population stellt große Anforderungen an das Detektionsverfahren, die mit dem vorgestellten Verfahren noch nicht erfüllt werden können. Daher ist es von großer Bedeutung, dieses Verfahren in Zukunft an einer deutlich größeren Anzahl von Tumorpatienten zu validieren, um die Heterogenität der CTCs zu relativieren. Des Weiteren sollte dabei die Frage diskutiert werden, wie viele CTCs pro Probe unter Berücksichtigung der Heterogenität analysiert werden sollten.

Eine Erweiterung des zu analysierenden Antigenspektrums ist dabei unter Umständen wenig zielführend, da durch die höhere Anzahl an verwendeten Antikörpern die Reinheit der detektierten CTC-Population gemindert werden könnte[114].

Zur Identifizierung der CTCs im Vollblut wurde die Tatsache genutzt, dass CTCs von Karzinomen im Gegensatz zu den anderen Zellpopulationen im Blut epitheliale Marker

wie EpCAM und Zytokeratine exprimieren. Somit wurden diese epithelialen Marker im Sinn von Tumormarkern verwendet. Bereits im Jahr 1979 wurde EpCAM von Koprowski et al. erstmalig als Tumor-assoziiertes Antigen beschrieben[115]. Heute gilt die Verwendung von EpCAM-Antikörpern und Pan-Zytokeratin-Antikörpern zur CTC-Detektion mittels Durchflusszytometrie als Goldstandard und hat sich in zahlreichen großen Studien bewährt[32, 77, 80]. Auch in dieser Arbeit konnten CTCs mit dieser Strategie erfolgreich detektiert werden.

Trotzdem stellt die Identifizierung der Tumorzellen weiterhin eine Herausforderung dar. Einige der CTC-Marker werden aus unbekanntem Gründen auch von Leukozyten exprimiert[21], was zu falsch positiven Ergebnissen führt.

Des Weiteren kann die Höhe der Expression von EpCAM und Zytokeratinen bei CTCs sehr stark variieren[116], so dass ein Detektionsassay für unterschiedliche Expressionsmuster der epithelialen Marker funktionieren muss. Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren ist in der Lage, sowohl Tumorzellen der HT-29-Zelllinie mit besonders hoher Expression von EpCAM als auch Tumorzellen von Patienten mit niedriger EpCAM-Expression eindeutig zu identifizieren.

EpCAM wird von CTCs verschiedener Tumorentitäten – wie zum Beispiel beim Mamma-Karzinom, Kolorektalen Karzinom, Prostata-Karzinom und weiteren epithelialen Tumoren – exprimiert. So konnten in dieser Arbeit CTCs von Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Tumoren mit dem identischen Verfahren analysiert werden. Dennoch ist kein Test für alle Tumortypen kompatibel. Zur Erhöhung der Testspezifität ist die Verwendung tumorspezifischer Marker, wie zum Beispiel das PSA für das Prostata-Karzinom, zu etablieren.

Die meisten CTC-Detektionsmethoden basieren auf der alleinigen Verwendung von EpCAM-Antikörpern, was zu Beginn der Untersuchungen in dieser Arbeit ebenfalls praktiziert wurde. Durch die Ergänzung um den intrazellulären Zytokeratin-Marker konnte die Sensitivität und Spezifität des Assays deutlich erhöht werden, was bereits Deng et al. zeigen konnten[117].

Watanabe et al. versuchten die Spezifität durch die Verwendung eines Multifarben-Assays weiter zu erhöhen[55], wobei allerdings einige CTCs der Identifizierung entgehen könnten, da nicht alle CTCs das gleiche Antigenespektrum aufweisen.

CTCs mit epitheliale Antigenmuster sind nur im Blut von Patienten mit malignen Tumoren und nicht bei Gesunden oder Patienten mit benignen Erkrankungen zu finden, was Allard et al. im Jahr 2004 in ihrer CellSearch-Validierungsstudie publizierten [2]. Überraschenderweise konnten Pantel et al. 8 Jahre später bei Patienten mit benignen Kolonerkrankungen – wie zum Beispiel Divertikulose, Polypen, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder Endometrioseherden im Colon – mithilfe des CellSearch-Systems epitheliale Zellen mit dem Phänotyp und den Eigenschaften von CTCs nachweisen, wobei jedoch bei gesunden Normalspendern keine positiven Ergebnisse erzielt wurden [118]. Aufgrund dieser Beobachtungen ist der Stellenwert immunologischer Methoden – inklusive des in dieser Arbeit verwendeten Assays - zur Detektion von CTCs bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom und vorheriger oder begleitender benigner Kolonerkrankung vor allem in Bezug auf die mangelnde Spezifität zu diskutieren.

CTCs werden während ihrer Zirkulation im Blut nachgewiesen. Dort kommen sie in Kontakt mit den Zellen des Immunsystems, die primär für die Elimination von Tumorzellen verantwortlich sind. Daneben wird das Immunsystem auch für einen kritischen Faktor gehalten, der das Tumorwachstum und die Metastasierung beeinflussen kann[15]. Talmadge et al. konnten zeigen, dass myeloide Suppressorzellen (so genannte MDSCs, myeloid-derived suppressor cells) den Primärtumor infiltrieren, die Immunantwort unterdrücken und somit das Tumorwachstum und die Dissemination fördern können[119]. MDSCs konnten auch im peripheren Blut von Tumorpatienten nachgewiesen werden[120], wo sie möglicherweise mit den CTCs direkt interagieren und diesen dazu verhelfen, sich auf dem Weg zu sekundären Organen der Elimination durch die Immunabwehr zu entziehen[15]. Da die CD45-positiven MDSCs mit den CTCs Zellcluster bilden, entgehen diese CTCs wiederum dem in dieser Arbeit verwendeten Detektionsverfahren. Das kann zum einen aus der Depletion dieser Zellcluster im MACS mit CD45-Microbeads oder aus der fehlenden Fähigkeit der Durchflusszytometrie zur Zellclusteranalyse resultieren. Mit PCR-basierten Verfahren könnten auch diese CTCs eventuell identifiziert werden.

Nicht nur Zellen des Immunsystems, sondern auch Thrombozyten spielen bei Tumorerkrankungen eine bedeutende Rolle und interagieren in der Zirkulation mit den CTCs.

Thrombosen im venösen System sind eine häufige Komplikation bei Tumorerkrankungen, wobei das Ausmaß der Thrombosierung von der Tumorentität abhängt[121]. Bei den meisten Malignomen, wie zum Beispiel dem Kolorektalen Karzinom, dem Magenkarzinom und dem Bronchialkarzinom, gehen Thrombosen mit einer schlechteren Prognose einher[121–125]. Das lässt sich durch die Tatsache erklären, dass Thrombozyten das Überleben von CTCs in der Zirkulation fördern und deren Extravasation und die Ansiedlung in einem neuen Gewebe erleichtern[126]. Auf der anderen Seite können CTCs Thrombozyten aktivieren und zur Aggregation bringen, was Tumorzell-induzierte Plättchenaggregation (tumor cell-induced platelet aggregation, TCIPA) genannt wird[127] und periphere oder zentrale Thrombosen hervorrufen kann. Zellcluster aus CTCs und Thrombozyten haben möglicherweise ein höheres Potential, sich in Sekundärorganen anzusiedeln. Die in diesen Clustern enthaltenen aktiven und aggressiven CTCs können der Detektion mittels Durchflusszytometrie, die eine Einzelzellanalyse darstellt, entgehen oder Artefakte generieren[107].

Des Weiteren haben experimentelle Untersuchungen an Mäusen gezeigt, dass Thrombozyten durch ihre Bindung an CTCs bei diesen eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) auslösen können[128].

Die Auswirkungen der Bindung von Thrombozyten an CTCs für die CTC-Detektion sind jedoch bis jetzt nur ansatzweise untersucht und bedürfen weiterer intensiver Forschung.

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) stellt einen komplexen Prozess im Rahmen der Zellplastizität dar, durch den CTCs auf dem Weg zum Ort der Metastasierung ihren epithelialen Phänotyp vollständig oder teilweise verlieren und Eigenschaften mesenchymaler Zellen annehmen können. Dabei kommt es zunehmend zum Verlust von epithelialen Markern wie EpCAM und Zytokeratinen, wobei die Expression von mesenchymalen Proteinen wie Vimentin oder N-Cadherin gesteigert wird[129]. Dieser Mechanismus, der physiologischerweise während der Organogenese in der Embryonalzeit und während der Wundheilung stattfindet, führt zu Zelldifferenzierung, Verlust der apikal-basolateralen Zellpolarität, zunehmender Zellmotilität und zum Verlust der Zelladhäsion durch Veränderung der Zell-Zell-Verbindungen[35, 130]. EMT ist häufig mit erhöhter Aggressivität von Tumorzellen und Resistenz gegen Apoptose und Anoikis

verbunden[131, 132], steigert ihre Fähigkeit zur Migration in fremde Gewebe[133] und ist somit Grundvoraussetzung für invasives Wachstum und Metastasierung[134, 135].

Der umgekehrte Prozess, mesenchymal-epitheliale Transition (MET) genannt, spielt wahrscheinlich eine fundamentale Rolle bei der Ausbildung von neuen Metastasen, nachdem die CTCs in Sekundärorgane eingewandert sind[134]. Über die Trigger, die die Balance zwischen EMT und MET während des Metastasierungsprozesses kontrollieren, ist bis jetzt jedoch wenig bekannt[136].

Obwohl die Rolle von EMT für CTCs noch debattiert wird, unterstützen neueste Untersuchungen die These, dass CTCs während der Dissemination ihren Phänotyp stets ändern[137–139]. Gorges et al. konnten in vivo zeigen, dass EMT während der Entstehung von Metastasen in Mamma-Karzinom-tragenden Mäusen stattfindet und mit einer Herunterregulierung der EpCAM-Expression und einer Hochregulierung von mesenchymalen Markern wie COL52A, EGFR, PDGFRB oder Plastin 3 verbunden ist[134, 140, 141].

Die Ergebnisse neuester Untersuchungen lassen vermuten, dass EMT insbesondere Tumorzellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften betrifft[142]. Derartige Tumorstammzellen (Cancer stem cells, CSCs) sind als tumorbildende Zellen bekannt[143], die im Vergleich zu anderen Tumorzellpopulationen ein höheres Selbsterneuerungspotential und kanzerogenes Potential aufweisen[144, 145]. Aktas et al. fanden, dass CTCs, die EMT- und Stammzeleigenschaften aufweisen, mit einer schlechteren Prognose und mit Therapieresistenz bei Patientinnen mit metastasiertem Mamma-Karzinom einhergehen[146]. Des Weiteren stellten sie bei 69% der Patientinnen CSC-Marker wie CD44 oder ALDH1 (Aldehyddehydrogenase1) bei den CTCs fest[146].

Durch den Verlust oder die Herunterregulierung von epithelialen Markern auf der Zelloberfläche von CTCs durch EMT ist es möglich, dass bei der in dieser Arbeit verwendeten EpCAM-basierten Detektionsmethode nicht alle CTCs erfasst werden und die Anzahl der CTCs im Blut der Patienten tatsächlich höher ist als gemessen. Dabei sind wahrscheinlich vor allem diejenigen CTCs der Detektion entgangen, die sich gerade im EMT-Prozess befinden und die die besonders aggressive Subpopulation mit Tendenz zur Metastasenbildung darstellen. Diese Tatsache könnte auch erklären, warum nur 14% der untersuchten Patienten mehr als 5 CTCs pro Probe aufwiesen.

Es ist davon auszugehen, dass sich im peripheren Blut von Tumorpatienten sowohl

epitheliale EpCAM-positive als auch mesenchymale EpCAM-negative CTCs befinden[134]. Mithilfe EpCAM-unabhängiger Detektionsmethoden könnten beide Populationen erfasst werden. Daher ist es notwendig, in Zukunft neue Marker für die CTC-Detektion zu etablieren und Methoden zu entwickeln, die auch die mesenchymale Subpopulation erfassen.

Zur Detektion der aggressiven CSC-Subpopulation wurden in neuesten Untersuchungen für viele unterschiedliche Tumorentitäten beispielsweise Stammzellmarker wie CD44, CD24 und CD133 verwendet[147]. Li et al. benutzten CD44 als tumorassoziiertes Antigen beim Magen-Karzinom und konnten zeigen, dass der Nachweis von CD44-positiven CTCs bei Patienten mit Magen-Karzinom im Vergleich zu CD44-negativen CTCs mit einer schlechteren Prognose einhergeht[148]. Kantara et al. postulierten den Nachweis von CD44-positiven CSCs bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom als neues Instrument für die Diagnostik von Mikrometastasierung und Rezidiven[149]. Auch Baccelli et al. konnten zeigen, dass EpCAM-positive CTCs, die zusätzlich auch eine Positivität für CD 44 aufweisen, bei Mamma-Karzinom-Patientinnen mit einem niedrigeren OS und mit einer höheren Anzahl an Metastasen einhergehen[150].

Mithilfe von Genexpressionsanalysen fanden Steinert et al. heraus, dass einige CTCs eine Hochregulierung von CD47 als einen potentiellen Mechanismus zum Entgehen des Immunsystems zeigen und damit eine potentiell metastasenbildende Subpopulation bilden[151]. Zur Detektion dieser CTCs kann somit auch CD47 in das zu untersuchende Antigenespektrum aufgenommen werden.

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass kein universeller Marker für CTCs im Blut von Tumorpatienten existiert, sondern dass ein umfangreiches Spektrum an Antigenen untersucht werden muss, um auch besonders aggressive und metastasenbildende CTCs zu detektieren. Hierbei wäre beispielsweise denkbar, zunächst CD 44-positive Zellen zu detektieren und auf diesen Zellen nach CTC-Markern wie EpCAM und CK zu fahnden.

## **Perspektiven**

Mithilfe des in dieser Arbeit beschriebenen Verfahrens können CTCs im Blut von Tumorpatienten zwar quantitativ nachgewiesen werden, jedoch kann keine Aussage über deren Herkunft, Aggressivität oder Therapieresistenz getroffen werden.

Eine molekulare Charakterisierung von CTCs im Anschluss an die Detektion im peripheren Blut könnte zum besseren Verständnis der Tumorbiologie und zur Entwicklung einer individualisierten Therapie und neuen Biomarkern für Staging-Verfahren beitragen. Das in den letzten Jahren gewonnene bessere Verständnis der Metastasierungsmechanismen, wie zum Beispiel die EMT und die Transformation von Tumorzellen von CSCs zu differenzierten Zellen, und der technische Fortschritt bei der CTC-Detektion und -analyse könnten dabei den Prozess beschleunigen, neue Targets für die spezifische Krebstherapie zu identifizieren.

Mithilfe der molekularen Charakterisierung lässt sich die Expression tumorspezifischer Gene und Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen der CTCs bestimmen und eine Chromosomenanalyse durchführen. Außerdem kann eine Charakterisierung der CTCs im Anschluss an das Detektionsverfahren die Spezifität bei der Identifizierung der CTC-Population deutlich erhöhen. Lianidou et al. sehen die molekulare Charakterisierung in diesem Rahmen als absolute Notwendigkeit bei der CTC-Analyse zur Vermeidung von falsch-positiven Ergebnissen[152].

Außerdem kann mithilfe der CTC-Charakterisierung möglicherweise das Ursprungsgewebe oder -organ einer CTC identifiziert werden. Es ist vorstellbar, dass freigesetzte CTCs eine spezifische Lungen-, Leber- oder Gehirnsignatur aufweisen, die mithilfe einer molekularen Analyse bestimmt werden kann[107]. Neben der Fülle an Informationen in Tiermodellen ist jedoch bei Tumorpatienten nur sehr wenig darüber bekannt. Derartige Informationen wären in der Klinik sehr nützlich, um okkulte Metastasen oder sogar den Ort des Primärtumors bei einem Karzinom unbekannter Herkunft zu ermitteln[107].

Die Möglichkeiten, die eine molekulare Charakterisierung von CTCs bieten kann, sind zahlreich und vielsprechend, teilweise aber noch theoretisch. Da die technische Durchführung eines DNA-oder RNA-basierten Systems zur molekularen Charakterisierung von einzelnen CTCs, die durch eine hohe genetische Heterogenität mit verschiedenen Aberrationen gekennzeichnet sind, noch eine große Herausforderung darstellt, bedarf es weiterer intensiver Forschung.

Auch für die pharmazeutische Industrie ist die phänotypische und genotypische Charakterisierung von CTCs von großem Interesse, mit besonderem Augenmerk auf die Entwicklung neuer Medikamente, die spezifisch die hochaggressive Subpopulation von

CTCs eradizieren können.

Ein weiteres wichtiges Ziel der weiterführenden Charakterisierung von CTCs ist die Identifizierung von therapieresistenten Zellklonen. Der Gebrauch des Echtzeit-Monitorings von CTCs zur Mutationsanalyse kann dabei zu beträchtlichen Verbesserungen in der Krebstherapie führen[107]. Darüber hinaus kann evaluiert werden, ob die diagnostischen oder therapeutischen Interventionen die Freisetzung von CTCs beeinflussen und wenn ja, ob diese Freisetzung für das Outcome der Patienten relevant ist. Auch pharmakodynamische Untersuchungen im Hinblick auf

die Dosierung eines Medikaments und Drugmonitoring lassen sich durch die molekulare Charakterisierung von CTCs unterstützen. Die Mutationen, die dabei bei CTCs gefunden werden, ähneln denen im Primärtumor und in Metastasen[153, 154], so dass CTCs als „liquide Biopsie“ des Primärtumors in Bezug auf die Therapieresistenz gelten[35]. Zum Beispiel ist bekannt, dass Mutationen im KRAS-Protein die Effektivität einer Therapie mit EGFR-Blockern bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom erniedrigen[155]. Wenn diese Mutationen durch den Nachweis bei CTCs nachgewiesen werden können, kann die Therapie unter Umständen zum Wohl des Patienten geändert werden.

Im peripheren Blut von Tumorpatienten lassen sich nicht nur intakte CTCs, sondern auch Fragmente wie deren DNA nachweisen. CTCs werden dabei als Tumorzellen vom Primärtumor oder von Metastasen als lebensfähige oder apoptotische Zellen in die Zirkulation freigesetzt, wobei zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) meist als Fragment von nekrotischen oder apoptotischen Tumorzellen im peripheren Blut zirkuliert. CtDNA kann dabei sowohl von CTCs als auch von okkulten Mikrometastasen in sekundären Organen stammen.

Die Detektion von ctDNA kann aus Plasma oder Serum von Tumorpatienten erfolgen und bedarf somit im Vergleich zur Detektion von CTCs keiner mühsamen Anreicherungs- und Identifizierungsverfahren[107]. Demzufolge wird in neuesten Publikationen postuliert, dass die Analyse von ctDNA in Zukunft die Detektion von CTCs zur Überwachung des Tumorprogresses ablösen könnte[156–158]. Jedoch liefert die Detektion und Charakterisierung von lebenden CTCs tiefere Einblicke in die Tumorbiologie und die Metastasierungprozesse.

Eine Kombination aus ctDNA-Analyse und CTC-Detektion hätte für den zusätzlichen



Informationsgewinn wahrscheinlich das größte Potential und wäre auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer MRD-Marker zielführend[6].

In Zukunft müssen noch bessere Strategien und Verfahren entwickelt werden, die auch in der Lage sind, EMT-Subpopulationen von Tumorzellen mit niedrigerer oder keiner EpCAM-Expression, die besonders aggressiven metastasenbildenden Zellen und den Teil der CTCs mit organspezifischen Signaturen zur Identifizierung ihres Herkunftsortes zu isolieren und zu analysieren.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Analyse von CTCs im klinischen Gebrauch nach wie vor kein etablierter Teil des Routine-Tumorstagings, was hauptsächlich der Tatsache geschuldet ist, dass mit den aktuell verfügbaren Methoden nur sehr wenige CTCs in einem begrenzten Blutvolumen detektiert werden können. Deshalb ist es absolut notwendig, neue und innovative Ansätze im Hinblick auf deren Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität zu evaluieren, um sie in der klinischen Routine einsetzen zu können.

## 6 Zusammenfassung

Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) sind maligne Zellen, die in sehr geringer Anzahl im peripheren Blut von Tumorpatienten zu finden sind. Sie können entweder vom Primärtumor oder von Metastasen in sekundären Organen stammen und sind in der Lage, sich nach dem Verlassen der Blutbahn in verschiedenen Geweben anzusiedeln und neue Metastasen auszubilden. Der Nachweis dieser CTCs im Blut ist mittlerweile zu einem vielversprechenden und viel beforschten Gebiet der Onkologie geworden. Das Vorhandensein von CTCs im Blut von Tumorpatienten kann ein früher Indikator für eine Metastasierung sein, als zuverlässiger Vorhersageparameter für die Prognose dienen und die Effektivität einer Therapie aufzeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein immunologisches Verfahren entwickelt, womit CTCs in venösem Vollblut schnell und einfach als EpCAM- und Zytokeratin-positive und CD45-negative Zellen nachgewiesen werden können. Dabei erfolgt nach einer Lyse der Erythrozyten in der Probe eine Leukozytendepletion mittels MACS (magnetic-activated cell sorting) und die Identifikation der Tumorzellen mittels FACS-Analyse mit einer festgelegten Gatingstrategie. Mit diesem Verfahren wurden Blutproben von 42 Patienten mit metastasierten gastrointestinalen Tumoren und von 10 gesunden Normalspendern auf die Anzahl von CTCs/3,75ml Blut untersucht. Dabei wiesen die Patienten annähernd signifikant ( $p=0,076$ ) mehr CTCs auf als die Normalspender. In 43% der Fälle hatten die Patienten  $>2$  CTCs/3,75ml Vollblut und galten damit als CTC-positiv. Patienten mit Kolorektalem Karzinom zeigten mit 71% den höchsten Anteil an CTC-Positivität. Bei den gesunden Normalspendern ließen sich in keinem Fall  $>2$  CTCs nachweisen.

Nach einer Evaluation dieser Methode in einer weiteren Studie mit einem größeren Patienten- und Vergleichskollektiv könnte eine höhere Beweisebene erreicht werden, die den Einsatz in der klinischen Routine ermöglicht. Daneben sind eine weitere Optimierung des FACS-Verfahrens und eine Erweiterung des Antigenspektrums bei der CTC-Detektion zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität erforderlich. Patienten würden von diesem einfachen und wenig invasivem CTC-Detektionsverfahren vor allem im Hinblick auf eine Individualisierung der Therapie und auf das Vermeiden einer Übertherapie deutlich profitieren.

## Abkürzungsverzeichnis

AEG	Adenocarcinoma of esophagogastric junction
ALA	Aminolevulin acid
APC	Allophycocyanin
Ca	Carcinoma
CCC	Cholangiocellular carcinoma
CD	Cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CK	Cytokeratin
CSC	Cancer stem cell
CTC	Circulating tumor cell
ctDNA	Circulating tumor DNA
Ctx	Chemotherapie
CRC	Colorectal Cancer
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTC	Disseminated tumor cell
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

GFP	Green fluorescent protein
HBSS	Hank´s buffered salt solution
HCC	Hepatocellular carcinoma
Ig	Immunglobulin
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MACS	Magnetic activated cell sorting
MB	MicroBead
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MRD	Minimal residual disease
MUC	Mucin
NaCl	Natriumchlorid
NET	Neuroendokriner Tumor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NS	Normalspender
OS	Overall survival
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridininchlorophyll
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor beta
PFS	Progression free survival
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
RFS	Recurrence free survival

RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
Rtx	Radiotherapie
SD	Standardabweichung

## Literaturverzeichnis

1. Sun Y, Yang X, Zhou J et al. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2011; 137 (8): 1151–1173.
2. Allard WJ, Matera J, Miller MC et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with non-malignant diseases. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10 (20): 6897–6904.
3. Klein CA, Blankenstein TJF, Schmidt-Kittler O et al. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 2002; 360 (9334): 683–689.
4. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8 (7): 2073–2084.
5. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.* 1970; 45 (4): 773–782.
6. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu. Rev. Med.* 2012; 63: 199–215.
7. Zhe X, Cher ML, Bonfil RD. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. *Am J Cancer Res* 2011; 1 (6): 740–751.
8. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML et al. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J. Clin. Oncol.* 1991; 9 (10): 1749–1756.
9. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM et al. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet* 1999; 354 (9174): 197–202.
10. Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16 (2): 557–566.
11. Gebauer G, Fehm T, Merkle E et al. Micrometastases in axillary lymph nodes and bone marrow of lymph node-negative breast cancer patients--prognostic relevance after 10 years. *Anticancer Res.* 2003; 23 (5b): 4319–4324.

12. Landys K, Persson S, Kovarík J et al. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998; 49 (1): 27–33.
13. Braun S, Vogl FD, Naume B et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353 (8): 793–802.
14. Uhr JW, Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108 (30): 12396–12400.
15. Balic M, Williams A, Lin H et al. Circulating Tumor Cells: From Bench to Bedside. *Annu. Rev. Med.* 2012.
16. Kim M, Oskarsson T, Acharyya S et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009; 139 (7): 1315–1326.
17. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *The Medical Journal of Australia* 1869; 14: 146–147.
18. Negin BP, Cohen SJ. Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges. *Curr Treat Options Oncol* 2010; 11 (1-2): 1–13.
19. Ellis G, Ferguson M, Yamanaka E et al. Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients. *Cancer* 1989; 63 (12): 2509–2514.
20. Pelkey TJ, Frierson HF, Bruns DE. Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors. *Clin. Chem.* 1996; 42 (9): 1369–1381.
21. Dotan E, Cohen SJ, Alpaugh KR, Meropol NJ. Circulating tumor cells: evolving evidence and future challenges. *Oncologist* 2009; 14 (11): 1070–1082.
22. Vona G, Sabile A, Louha M et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am. J. Pathol.* 2000; 156 (1): 57–63.
23. Mostert B, Sleijfer S, Foekens JA, Gratama JW. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2009; 35 (5): 463–474.
24. Griwatz C, Brandt B, Assmann G, Zänker KS. An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood. *J. Immunol. Methods* 1995; 183 (2): 251–265.

25. Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K et al. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res.* 2003; 162: 149–155.
26. Hayes DF, Smerage JB. Circulating tumor cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 95: 95–112.
27. Balic M, Dandachi N, Hofmann G et al. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 68 (1): 25–30.
28. Nedosekin DA, Juratli MA, Sarimollaoglu M et al. Photoacoustic and photothermal detection of circulating tumor cells, bacteria and nanoparticles in cerebrospinal fluid in vivo and ex vivo. *J Biophotonics* 2013; 6 (6-7): 523–533.
29. Trzpis M, McLaughlin PMJ, Leij LMFH de, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am. J. Pathol.* 2007; 171 (2): 386–395.
30. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* 2008; 8 (5): 329–340.
31. Sleijfer S, Gratama J, Siewerts AM et al. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? *Eur. J. Cancer* 2007; 43 (18): 2645–2650.
32. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26 (19): 3213–3221.
33. Tewes M, Aktas B, Welt A et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009; 115 (3): 581–590.
34. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; 450 (7173): 1235–1239.
35. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clin. Chem.* 2012.
36. Israeli RS, Miller WH, Su SL et al. Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res.* 1994; 54 (24): 6306–6310.



37. Komeda T, Fukuda Y, Sando T et al. Sensitive detection of circulating hepatocellular carcinoma cells in peripheral venous blood. *Cancer* 1995; 75 (9): 2214–2219.
38. Noguchi S, Aihara T, Motomura K et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am. J. Pathol.* 1996; 148 (2): 649–656.
39. Xi L, Nicastrì DG, El-Hefnawy T et al. Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung cancers. *Clin. Chem.* 2007; 53 (7): 1206–1215.
40. Findeisen P, Röckel M, Nees M et al. Systematic identification and validation of candidate genes for detection of circulating tumor cells in peripheral blood specimens of colorectal cancer patients. *Int. J. Oncol.* 2008; 33 (5): 1001–1010.
41. Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Gkioka E et al. Detection of circulating tumor cells in colorectal and gastric cancer using a multiplex PCR assay. *Anticancer Res.* 2014; 34 (6): 3083–3092.
42. Barbazán J, Muínelo-Romay L, Vieito M et al. A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 2014; 135 (11): 2633–2643.
43. Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG et al. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br. J. Cancer* 2005; 92 (5): 906–912.
44. Lambrechts AC, Bosma AJ, Klaver SG et al. Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 1999; 56 (3): 219–231.
45. Fabisiwicz A, Kulik J, Kober P et al. Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Acta Biochim. Pol.* 2004; 51 (3): 747–755.
46. Chen AK, Behlke MA, Tsourkas A. Avoiding false-positive signals with nuclease-vulnerable molecular beacons in single living cells. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35 (16): e105.
47. López-Guerrero JA, Bolufer-Gilabert P, Sanz-Alonso M et al. Minimal illegitimate levels of cytokeratin K19 expression in mononucleated blood cells detected by a reverse transcription PCR method (RT-PCR). *Clin. Chim. Acta* 1997; 263 (1): 105–116.

48. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; 1 (3): 1559–1582.
49. Leslie DS, Johnston WW, Daly L et al. Detection of breast carcinoma cells in human bone marrow using fluorescence-activated cell sorting and conventional cytology. *Am. J. Clin. Pathol.* 1990; 94 (1): 8–13.
50. Racila E, Euhus D, Weiss AJ et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95 (8): 4589–4594.
51. Antolovic D, Galindo L, Carstens A et al. Heterogeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different EpCAM-specific antibodies. *BMC Biotechnol.* 2010; 10: 35.
52. Wang L, Wang Y, Liu Y et al. Flow cytometric analysis of CK19 expression in the peripheral blood of breast carcinoma patients: relevance for circulating tumor cell detection. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2009; 28: 57.
53. Hu Y, Fan L, Zheng J et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer patients utilizing multiparameter flow cytometry and assessment of the prognosis of patients in different CTCs levels. *Cytometry A* 2010; 77 (3): 213–219.
54. Goeminne JC, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells. *Ann. Oncol.* 2000; 11 (7): 785–792.
55. Watanabe M, Uehara Y, Yamashita N et al. Multicolor detection of rare tumor cells in blood using a novel flow cytometry-based system. *Cytometry A* 2014; 85 (3): 206–213.
56. Hsieh HB, Marrinucci D, Bethel K et al. High speed detection of circulating tumor cells. *Biosens Bioelectron* 2006; 21 (10): 1893–1899.
57. Alix-Panabières C, Müller V, Pantel K. Current status in human breast cancer micrometastasis. *Curr Opin Oncol* 2007; 19 (6): 558–563.
58. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351 (8): 781–791.
59. Moreno JG, Miller MC, Gross S et al. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 2005; 65 (4): 713–718.
60. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13 (3): 920–928.

61. Cristofanilli M. The biological information obtainable from circulating tumor cells. *Breast* 2009; 18 Suppl 3: S38-40.
62. Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med* 2013; 5 (179): 179ra47.
63. Pogue BW, Gibbs-Strauss S, Valdés PA et al. Review of Neurosurgical Fluorescence Imaging Methodologies. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 2010; 16 (3): 493–505.
64. Matsusaka S, Kozuka M, Takagi H et al. A novel detection strategy for living circulating tumor cells using 5-aminolevulinic acid. *Cancer Lett.* 2014.
65. Peng Q, Berg K, Moan J et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem. Photobiol.* 1997; 65 (2): 235–251.
66. Yabusaki M, Sato J, Kohyama A et al. Detection and preliminary evaluation of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with eight types of cancer using a telomerase-specific adenovirus. *Oncol. Rep.* 2014; 32 (5): 1772–1778.
67. Eifler RL, Lind J, Falkenhagen D et al. Enrichment of circulating tumor cells from a large blood volume using leukapheresis and elutriation: proof of concept. *Cytometry B Clin Cytom* 2011; 80 (2): 100–111.
68. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *International journal of oncology* 2012.
69. Goodman OB, Fink LM, Symanowski JT et al. Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009; 18 (6): 1904–1913.
70. Denlinger CS, Cohen SJ. Progress in the development of prognostic and predictive markers for gastrointestinal malignancies. *Curr Treat Options Oncol* 2007; 8 (5): 339–351.
71. Wu C, Hao H, Li L et al. Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2009; 4 (1): 30–36.
72. Fan T, Zhao Q, Chen JJ et al. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2009; 112 (1): 185–191.

73. Kurihara T, Itoi T, Sofuni A et al. Detection of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a preliminary result. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15 (2): 189–195.
74. Mocellin S, Hoon D, Ambrosi A et al. The prognostic value of circulating tumor cells in patients with melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12 (15): 4605–4613.
75. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells versus imaging—predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12 (21): 6403–6409.
76. Dawood S, Broglio K, Valero V et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? *Cancer* 2008; 113 (9): 2422–2430.
77. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23 (7): 1420–1430.
78. Bidard F, Mathiot C, Delalogue S et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 2010; 21 (4): 729–733.
79. Giuliano M, Giordano A, Jackson S et al. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. *Breast Cancer Res.* 2011; 13 (3): R67.
80. Bono JS de, Scher HI, Montgomery RB et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14 (19): 6302–6309.
81. Danila DC, Heller G, Gignac GA et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13 (23): 7053–7058.
82. Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC et al. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13 (7): 2023–2029.
83. Olmos D, Arkenau H, Ang JE et al. Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-centre experience. *Ann. Oncol.* 2009; 20 (1): 27–33.
84. Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL et al. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J. Clin. Oncol.* 1995; 13 (5): 1195–1200.

85. Resel Folkersma L, San José Manso L, Galante Romo I et al. Prognostic significance of circulating tumor cell count in patients with metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Urology* 2012; 80 (6): 1328–1332.
86. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6 (2): 125–132.
87. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2009; 20 (7): 1223–1229.
88. Tol J, Koopman M, Miller MC et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann. Oncol.* 2010; 21 (5): 1006–1012.
89. Aggarwal C, Meropol NJ, Punt CJ et al. Relationship among circulating tumor cells, CEA and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2012.
90. Wong SCC, Chan CML, Ma BBY et al. Clinical significance of cytokeratin 20-positive circulating tumor cells detected by a refined immunomagnetic enrichment assay in colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15 (3): 1005–1012.
91. Molnar B, Ladanyi A, Tanko L et al. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7 (12): 4080–4085.
92. Simkens LHJ, Tol J, Terstappen LWMM et al. The predictive and prognostic value of circulating endothelial cells in advanced colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy and bevacizumab. *Ann. Oncol.* 2010; 21 (12): 2447–2448.
93. Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann. Surg. Oncol.* 2008; 15 (11): 3092–3100.
94. Sastre J, Maestro ML, Gómez-España A et al. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study. *Oncologist* 2012; 17 (7): 947–955.
95. Bidard FC, Ferrand FR, Huguet F et al. Disseminated and circulating tumor cells in gastrointestinal oncology. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2012; 82 (2): 103–115.

96. Matsusaka S, Chìn K, Ogura M et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci.* 2010; 101 (4): 1067–1071.
97. Zhou H, Guo J, Lou Y et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using microRNA as a marker. *J. Mol. Med.* 2010; 88 (7): 709–717.
98. Vona G, Estepa L, Bérout C et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. *Hepatology* 2004; 39 (3): 792–797.
99. Z'graggen K, Centeno BA, Fernandez-del Castillo C et al. Biological implications of tumor cells in blood and bone marrow of pancreatic cancer patients. *Surgery* 2001; 129 (5): 537–546.
100. Albuquerque A de, Kubisch I, Breier G et al. Multimarker gene analysis of circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: a feasibility study. *Oncology* 2012; 82 (1): 3–10.
101. Khan MS, Tsigani T, Rashid M et al. Circulating tumor cells and Ep-CAM expression in neuroendocrine tumors. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17 (2): 337–345.
102. Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25 (33): 5194–5202.
103. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14 (9): 2593–2600.
104. Zhang L, Riethdorf S, Wu G et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18 (20): 5701–5710.
105. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol.* 2012; 13 (7): 688–695.
106. Tryfonidis K, Kafousi M, Perraki M et al. Detection of Circulating Cytokeratin-19 mRNA-Positive Cells in the Blood and the Mitotic Index of the Primary Tumor Have Independent Prognostic Value in Early Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* 2014.

107. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat. Rev. Cancer* 2014; 14 (9): 623–631.
108. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138 (5): 1714–1726.
109. Lu C, Uen Y, Tsai H et al. Molecular detection of persistent postoperative circulating tumour cells in stages II and III colon cancer patients via multiple blood sampling: prognostic significance of detection for early relapse. *Br. J. Cancer* 2011; 104 (7): 1178–1184.
110. Lim SH, Becker TM, Chua W et al. Circulating tumour cells and circulating free nucleic acid as prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2014; 346 (1): 24–33.
111. Krüger W, Datta C, Badbaran A et al. Immunomagnetic tumor cell selection--implications for the detection of disseminated cancer cells. *Transfusion* 2000; 40 (12): 1489–1493.
112. Lara O, Tong X, Zborowski M, Chalmers JJ. Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation. *Exp. Hematol.* 2004; 32 (10): 891–904.
113. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10 (24): 8152–8162.
114. Alix-Panabières C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* 2014; 14 (1): 57–62.
115. Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K et al. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet.* 1979; 5 (6): 957–971.
116. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett.* 2007; 253 (2): 180–204.
117. Deng G, Herrler M, Burgess D et al. Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2008; 10 (4): R69.
118. Pantel K, Denève E, Nocca D et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin. Chem.* 2012; 58 (5): 936–940.
119. Talmadge JE, Donkor M, Scholar E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26 (3-4): 373–400.

120. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI et al. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009; 58 (1): 49–59.
121. Sierko E, Wojtukiewicz MZ. Inhibition of platelet function: does it offer a chance of better cancer progression control? *Semin. Thromb. Hemost.* 2007; 33 (7): 712–721.
122. Wan S, Lai Y, Myers RE et al. Preoperative platelet count associates with survival and distant metastasis in surgically resected colorectal cancer patients. *J Gastrointest Cancer* 2013; 44 (3): 293–304.
123. Gao J, Zhang H, Xia Y. Increased platelet count is an indicator of metastasis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol.* 2013; 34 (1): 39–45.
124. Ikeda M, Furukawa H, Imamura H et al. Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2002; 9 (3): 287–291.
125. Monreal M, Fernandez-Llamazares J, Piñol M et al. Platelet count and survival in patients with colorectal cancer--a preliminary study. *Thromb. Haemost.* 1998; 79 (5): 916–918.
126. Stegner D, Dütting S, Nieswandt B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thromb. Res.* 2014; 133 Suppl 2: S149-57.
127. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1968; 61 (1): 46–52.
128. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011; 20 (5): 576–590.
129. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 7 (2): 131–142.
130. May CD, Sphyris N, Evans KW et al. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2011; 13 (1): 202.
131. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 2006; 172 (7): 973–981.



132. Yu M, Ting DT, Stott SL et al. RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. *Nature* 2012; 487 (7408): 510–513.
133. Thompson EW, Haviv I. The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nat. Med.* 2011; 17 (9): 1048–1049.
134. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 2012; 12: 178.
135. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the cross-roads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* 2008; 14 (6): 818–829.
136. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; 31 (3-4): 673–687.
137. Hou J, Krebs M, Ward T et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am. J. Pathol.* 2011; 178 (3): 989–996.
138. Mego M, Mani SA, Lee B et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in primary breast cancer: The effect of neoadjuvant therapy. *Int. J. Cancer* 2012; 130 (4): 808–816.
139. Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E et al. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2011; 13 (3): R59.
140. Asiedu MK, Ingle JN, Behrens MD et al. TGFbeta/TNF(alpha)-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Res.* 2011; 71 (13): 4707–4719.
141. Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T et al. Platin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Res.* 2013; 73 (7): 2059–2069.
142. Mani SA, Guo W, Liao M et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133 (4): 704–715.
143. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414 (6859): 105–111.
144. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100 (7): 3983–3988.

145. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23 (43): 7274–7282.
146. Aktas B, Tewes M, Fehm T et al. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2009; 11 (4): R46.
147. Mimeault M, Batra SK. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2014; 23 (2): 234–254.
148. Li M, Zhang B, Zhang Z et al. Stem cell-like circulating tumor cells indicate poor prognosis in gastric cancer. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 981261.
149. Kantara C, O'Connell MR, Luthra G et al. Methods for detecting circulating cancer stem cells (CCSCs) as a novel approach for diagnosis of colon cancer relapse/metastasis. *Lab. Invest.* 2014.
150. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31 (6): 539–544.
151. Steinert G, Schölch S, Niemietz T et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res.* 2014; 74 (6): 1694–1704.
152. Lianidou ES, Markou A, Strati A. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer: challenges and promises for individualized cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; 31 (3-4): 663–671.
153. Heitzer E, Auer M, Gasch C et al. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res.* 2013; 73 (10): 2965–2975.
154. Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K et al. Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nat. Biotechnol.* 2014; 32 (5): 479–484.
155. Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat. Med.* 2013; 19 (11): 1450–1464.
156. Dawson S, Tsui DWY, Murtaza M et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368 (13): 1199–1209.
157. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32 (6): 579–586.

158. Kidess E, Jeffrey SS. Circulating tumor cells versus tumor-derived cell-free DNA: rivals or partners in cancer care in the era of single-cell analysis? *Genome Med* 2013; 5 (8): 70.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. V. Kunzmann für das Überlassen des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen und die ausgezeichnete Betreuung in allen Arbeitsphasen. Er hat mir in zahlreichen persönlichen Gesprächen mit seinem Fachwissen, sowie mit konstruktiver Kritik und vielen Ideen immer wieder nötigen Anstoß gegeben und somit maßgebend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn PD Dr. med. A. Wiegering danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Koreferates.

Für die Möglichkeit, die Untersuchung an der Medizinischen Poliklinik Würzburg durchführen zu können, bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H. Einsele.

Ein großes Dankeschön gilt allen wissenschaftlich technischen Mitarbeiterinnen des Immunbiologischen Labors für die Unterstützung und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Besonderen Dank geht an Frau Dr. Brigitte Kimmel, die mir mit ihrer unendlichen Geduld, hoher Fachkompetenz und unermüdlichem Engagement insbesondere in der Anfangsphase der Laborarbeit eine sehr große Hilfe und Unterstützung war. Auch für die vielen Anmerkungen und Korrekturvorschläge in der Phase des Schreibens danke ich ihr sehr.

Daneben möchte ich auch meinen Eltern herzlich danken, ohne die das Studium und die Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären. Danke für den stetigen Zuspruch und das Motivieren von Anfang bis Ende dieser Arbeit. Ein besonderer Dank geht auch an Johannes Gebhardt für seine Unterstützung sowie für das Korrekturlesen, die Hilfe bei der Textverarbeitung und Bearbeitung der Abbildungen.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Name: Nadine Müller  
Geburtsdaten: 1. Dezember 1987 in Würzburg  
Anschrift: Raitelsbergstraße 26, 70188 Stuttgart  
E-Mail-Adresse: nadine-mueller@freenet.de  
Konfession: röm.-katholisch

## **Schulische Ausbildung**

1994 - 1998 Volksschule Höchberg  
1998 – 2007 St.-Ursula-Schule Würzburg, Abitur im Juni 2007

## **Studium der Humanmedizin**

2007 – 2014 Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
09/2009 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## **Praktisches Jahr**

02 – 06/2013 Missionsärztliche Klinik Würzburg  
Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie  
06 – 09/2013 Universitätsklinikum Würzburg  
Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und  
Allergologie  
09/2013 – 01/2014 Universitätsklinikum Würzburg  
Medizinische Klinik und Poliklinik I und II

Seit 11/2014 Assistenzärztin in der Abteilung für Dermatologie und  
Allergologie im Klinikum Stuttgart