

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Tumorbiologie

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Klaus Pantel

**Nachweisverfahren zur Anreicherung und Detektion  
zirkulierender Tumorzellen aus dem Blut von Patienten mit  
Glioblastoma multiforme**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Johannes Claus Holtschmidt  
aus Düsseldorf

Hamburg 2010

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.08.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Klaus Pantel**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Manfred Westphal**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Glatzel**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Protokollverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Fragestellung.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1. Glioblastoma multiforme.....	4
1.1.1. Einordnung in die Familie der Gliome und Klassifikationssysteme .....	4
1.1.2. Epidemiologie .....	5
1.1.3. Ätiologie.....	6
1.1.4. Klinik und Diagnose.....	7
1.1.5. Therapie.....	9
1.1.6. Prognose .....	11
1.1.7. Von Glioblastomen häufig exprimierte Proteine .....	12
1.1.7.1. GFAP .....	12
1.1.7.2. S-100 $\beta$ .....	12
1.1.7.3. EMMPRIN .....	12
1.1.7.4. Ki-67 .....	13
1.1.8. Entstehungswege primärer und sekundärer Glioblastome .....	13
1.1.8.1. Einfluss von p53 .....	13
1.1.8.2. EGFR-Überexpression .....	14
1.1.9. Extraneurale Metastasierung .....	15
1.2. Transmission durch Spenderorgane .....	20
1.3. Disseminierte und zirkulierende Tumorzellen .....	23
1.3.1. Disseminierte und zirkulierende Tumorzellen .....	23
1.3.2. Anreicherungsverfahren für CTC.....	26

<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1. Materialien.....	28
2.1.1. Patientenkollektiv .....	28
2.1.2. Zelllinien und Materialien für deren Kultivierung.....	29
2.1.3. Dichtegradientenzentrifugation .....	30
2.1.4. MACS® Zellseparation.....	31
2.1.5. Immunfluoreszenz und Immunzytochemie .....	31
2.1.6. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Filtertest .....	35
2.1.7. Diaminobenzidin (DAB) Immunhistochemie .....	38
2.1.8. Geräte .....	39
2.2. Methoden.....	40
2.2.1. Etablierung von Nachweismethoden für CTC glialen Ursprungs.....	40
2.2.2. Kultivierung der Tumorzelllinien.....	42
2.2.3. Untersuchung der Zelllinien auf deren Expression von GFAP, p53, Ki67, EMMPRIN und EGF-Rezeptor.....	43
2.2.4. EGF-Rezeptor-FISH an Zellpräparationen .....	45
2.2.5. In-vitro-Versuche zur Bestimmung von Wiederfindungsraten („Spiking“- Versuche) .....	49
2.2.5.1. OncoQuick-Zentrifugation .....	50
2.2.5.2. Boyant-Dichtegradient-Zentrifugation .....	51
2.2.5.3. Ficoll-Gradient .....	52
2.2.5.4. Detektionssysteme zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen	54
2.2.6. Immunenzymatischer Nachweis mit alkalischer Phosphatase .....	55
2.2.7. Mikromanipulation.....	56
2.2.8. Komparative Genomische Hybridisierung CGH .....	57
2.2.9. Zellseparation mit ferromagnetischen Antikörpern .....	58
2.2.10. Untersuchung von Patientenmaterial .....	61
2.2.10.1. Untersuchung von Gewebeschnitten .....	61
2.2.10.1.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten .....	61
2.2.10.1.2 EMMPRIN und EGFR Immunhistochemie.....	62
2.2.10.2. Untersuchung der Blutproben von Patienten (Zytospins) .....	64

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
3.1.	Ergebnisse der Vorversuche .....	66
3.1.1.	Charakterisierung der Zelllinien.....	66
3.1.2.	Anreicherung der Tumorzellen über Dichtegradienten-Zentrifugation ..	67
3.1.2.1.	OnkoQuick .....	67
3.1.2.2.	Boyant-Gradient .....	68
3.1.2.3.	Ficoll-Gradient .....	69
3.1.2.4.	Vergleich der Ergebnisse.....	71
3.1.3.	Fluoreszenzmikroskopie der in-vitro-Versuche .....	72
3.2.	Ergebnisse der Untersuchung von Patientenmaterial .....	73
3.2.1.	Ergebnisse der Untersuchung der Primärtumore .....	73
3.2.2.	Ergebnisse der Untersuchung von Patientenblut.....	77
3.2.2.1.	Immunzytochemische Untersuchungen.....	77
3.2.2.2.	Immunfluoreszenz und FISH.....	78
3.2.2.3.	Mikromanipulation und CGH.....	81
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
4.1.	Interpretation der Ergebnisse.....	84
4.2.	Alternative Nachweisverfahren/ Lösungsansätze.....	88
4.3.	Ausblick.....	92
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>114</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>115</b>
<b>10.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>116</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Glioblastom in der MRT .....	9
Abbildung 2: Genetische Eigenschaften primärer und sekundärer Glioblastome.....	15
Abbildung 3: Schemazeichnung Immunfluoreszenz.....	44
Abbildung 4: Filtertest.....	46
Abbildung 5: Schemazeichnung FISH .....	49
Abbildung 6: Schemazeichnung OncoQuick .....	51
Abbildung 7: Schemazeichnung Boyant density gradient.....	52
Abbildung 8: Schemazeichnung Ficoll-Gradient .....	54
Abbildung 9: Schemazeichnung Immunzytochemie .....	56
Abbildung 10: Schemazeichnung CGH .....	58
Abbildung 11: MACS® Zellseparation.....	61
Abbildung 12: Wiederfindungsraten Boyant density gradient .....	69
Abbildung 13: Wiederfindungsraten Ficoll-Gradient .....	70
Abbildung 14: „Spiking-Versuche“ .....	73
Abbildung 15: EGFR-FISH und EGFR-CISH an Primärtumoren .....	76
Abbildung 16: EGFR- und EMMPRIN-Immunhistochemie .....	76
Abbildung 17: Immunzytochemie Patientenblut.....	80
Abbildung 18: Immunfluoreszenz und FISH an Patientenblut .....	81
Abbildung 19: Mikromanipulation mit zirkulierender GFAP-positiver Zelle .....	83
Abbildung 20: CGH-Profil einer möglichen CTC .....	83
Abbildung 21: CGH-Profil des entsprechenden Primärtumors.....	83

## **PROTOKOLLVERZEICHNIS**

Protokoll 1: Immunfluoreszenz an Zellpräparationen .....	45
Protokoll 2: Filtertest .....	46
Protokoll 3: Probenansatz für FISH .....	47
Protokoll 4: FISH an Zellpräparationen 1. Tag .....	48
Protokoll 5: FISH an Zellpräparationen und Parafinschnitten 2. Tag .....	48
Protokoll 6: Aufarbeitung von Vollblut mit OncoQuick.....	50
Protokoll 7: Aufarbeitung von Vollblut mit Boyant density gradient.....	52
Protokoll 8: Aufarbeitung von Vollblut mit Ficoll-Paque Plus.....	53
Protokoll 9: GFAP – alkalische Phosphatase Immunzytochemie .....	56
Protokoll 10: MACS®-Zellseparation.....	60
Protokoll 11: FISH an Parafinschnitten 1. Tag.....	62
Protokoll 12: DAB Immunhistochemische Färbung an Gewebeschnitten .....	64

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: WHO Klassifikation astrozytärer Tumore .....	5
Tabelle 2: Zielorgane systemischer Metastasierung von Gliomen.....	16
Tabelle 3: Veröffentlichte Fälle extraneuraler Metastasen von Patienten mit Glioblastom zwischen 2003 und 2009.....	18
Tabelle 4: Fallveröffentlichungen Glioblastometastasen-Transmission durch Spenderorgane.....	21
Tabelle 5: Patientenkollektiv inklusive histopathologischer Begutachtung.....	28
Tabelle 6: Verwendete Antikörper .....	34
Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper .....	38
Tabelle 8: Charakterisierung von Zelllinien.....	66
Tabelle 9: Ergebnisse der Untersuchung der Primärtumore.....	75
Tabelle 10: GFAP-Immunzytochemie.....	77
Tabelle 11: GFAP Immunfluoreszenz.....	79
Tabelle 12: Ergebnisse der Untersuchung von Patientenblut.....	80

## **FRAGESTELLUNG**

Eine klinisch manifeste Metastasierung bei primären Hirntumoren ist ein seltenes Ereignis. Es wird geschätzt, dass es beim Glioblastoma Multiforme nur in 0,2% bis 2% der Erkrankungsfälle zu diesem generalisierten Erkrankungsstadium kommt (Hsu et al. 1998). Bisher ist ungeklärt, warum ein solches Fortschreiten der Erkrankung trotz des lokal invasiven Wachstums von Glioblastomen nicht häufiger erfolgt. Insbesondere wäre von Interesse, ob tumorbiologische Eigenschaften dieser Tumore einer Disseminierung entgegenstehen. Hieraus ließen sich dann eventuell Rückschlüsse auf den Vorgang der Metastasierung bei anderen Neoplasien ziehen. Einer anderen Vermutung nach könnte eine klinisch okkulte Disseminierung von Tumorzellen durchaus häufiger geschehen, die aufgrund der kurzen Überlebenszeit von Glioblastom-Patienten von nur gut einem Jahr zum Todeszeitpunkt klinisch noch nicht fassbar wird. Veröffentlichungen aus der Transplantationschirurgie zeigen, dass eine solche okkulte Disseminierung in die parenchymatösen Organe häufiger sein könnte als bislang vermutet (Armanios et al. 2004). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich zirkulierende Tumorzellen (CTC) im Blut von Glioblastom-Patienten als Zeichen eines frühen Stadiums der Disseminierung nachweisen lassen.

Der Nachweis von CTC bei verschiedenen Karzinomen ist seit einigen Jahren bekannt und Gegenstand aktueller Forschung (Cristofanilli et al. 2004). Hierbei werden die CTC epithelialer Herkunft durch immunologische Färbungen des Zytoskelettes (Zytokeratine) von den mononukleären Zellen (MNC) des Blutes unterschieden. Analog besteht das Zytoskelett bei Astrozyten, den Vorläuferzellen von Glioblastomen, aus dem sauren Gliafaserprotein (GFAP). In einem ersten Schritt sollte daher die Identifizierung möglicher zirkulierender Glioblastom-Tumorzellen über immunologische Färbungen des GFAP erfolgen. In einem zweiten Schritt sollte der Verdacht, dass es sich bei zirkulierenden GFAP-positiven Zellen tatsächlich um Tumorzellen handelt, weiter erhärtet werden. Hierzu wäre der Nachweis eines weiteren für das Glioblastom typischen Proteins, wie die nukleäre Akkumulation des Zellzyklusproteins p53, die membranständige Expression von EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) oder von EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer), in GFAP-positiven Zellen des peripheren Blutes möglich. Ein weiterer starker

Hinweis wäre der Nachweis einer Amplifikation des EGFR-Gens in diesen Zellen, die in ca. 40% der Glioblastome beobachtet wird (Ohgaki et al. 2004). Zu diesem Zweck wurde eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit einer EGFR-Gen-Sonde an den Primärtumoren und Zytospins der Patienten-Blutproben durchgeführt. Einzelne GFAP-positive Zellen wurden mittels Mikromanipulation von den umgebenden MNC der Patienten Blutproben isoliert und an Frau Dr. S. Langer (Institut für Humangenetik im Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München; Direktor: Univ. Prof. Dr. med. T. Meitinger) versendet. Dort erfolgte eine Komparative Genomische Hybridisierung (CGH) zur Untersuchung auf genomische Aberrationen in diesen Zellen.

Um adäquates Material für die oben genannten Untersuchungen zu gewinnen, musste zunächst eine Separation der MNC von den restlichen Blutbestandteilen erfolgen. In der Literatur werden unterschiedliche Verfahren beschrieben, die dies mittels Zentrifugation über Dichtegradienten erzielen. Andere Verfahren setzen Ferropartikel-markierte Antikörper ein, die Tumorzellen über von ihnen exprimierte Antigene in einem Magnetfeld selektieren (Positivselektion) oder Leukozyten über ihre Antigene aus der Blutprobe entfernen (Depletion). Die Durchführbarkeit einer solchen Isolierung von zirkulierenden Glioblastom-Tumorzellen sowie die anschließende Charakterisierung über immunologische Färbungen, FISH und Mikromanipulation wurde ausführlich in in-vitro-Versuchen erprobt, da bisher keine solchen Verfahren zur Isolierung von zirkulierenden Glioblastom-Tumorzellen in der Literatur beschrieben wurden. Bei diesen in-vitro-Versuchen wurden zahlreiche Glioblastom-Tumorzelllinien auf Ihre Eignung untersucht, das Vorhandensein solcher CTC im peripheren Blut zu simulieren.

Nach Abschluss der Vorversuche wurde bei 12 Patienten, die an der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Westphal) an einem Glioblastoma Multiforme operiert wurden, perioperativ 10 ml venöses Blut entnommen. Diese Blutproben wurden umgehend, gemäß den im Folgenden beschriebenen Verfahren bearbeitet. Das positive Votum der Ethikkommission sowie das Einverständnis der Patienten lag der Klinik für Neurochirurgie vor.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit der Klärung der folgenden Fragen, die bisher nicht ausreichend in der Literatur beantwortet wurden:

- Welche Zelllinien können für die Durchführung von in-vitro-Versuchen zur Bestimmung von Tumorzell-Wiederfindungsraten eingesetzt werden?
- Ist es technisch möglich, zirkulierende Glioblastom-Tumorzellen weitgehend von den restlichen Blutbestandteilen zu separieren? Welches Verfahren liefert zuverlässige Ergebnisse bei in-vitro-Versuchen?
- Können zirkulierende GFAP-positive Zellen im Blut von Glioblastom-Patienten nachgewiesen werden?
- Lassen sich diese Zellen mit zusätzlichen immunologischen Färbungen, FISH oder CGH weiter charakterisieren?
- Lassen sich Rückschlüsse ziehen, die für die Sicherheit der Verwendung von Spenderorganen verstorbener Glioblastom-Patienten relevant sein können?

# **1. EINLEITUNG**

## **1.1. GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

### **1.1.1. Einordnung in die Familie der Gliome und Klassifikationssysteme**

Gliome gehören zu den hirneigenen Tumoren neuroepithelialen Ursprungs. Zur Familie der Gliome zählen astrozytäre Tumore, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome, Ependymome, Tumore des Plexus choroideus sowie seltene andere neuroepitheliale Tumore. Die häufigste Untergruppe ist die der Astrozytome, welche ihren Ursprung von den Gliazellen des Gehirnes, den Astrozyten nehmen.

Die Astrozytome werden, wie auch alle anderen primären Hirntumore, von der WHO (World Health Organization) in vier Grade eingeteilt, wobei das Astrozytom WHO-Grad IV oder Glioblastoma Multiforme die häufigste Form ist. Das Glioblastoma Multiforme, im Folgendem Glioblastom genannt, stellt gleichzeitig die häufigste primäre Hirntumorentität insgesamt dar (Lantos et al. 2002).

Dieser Ausdruck für den bösartigsten Vertreter aller Gliome geht auf Bailey und Cushing zurück, die 1926 einen ersten Versuch unternahmen, eine Klassifikation der Gliome zu etablieren (Bailey & Cushing 1926). Weitere Klassifikationen erschienen von Kernohan und Ringertz (Kernohan et al. 1949, Ringerzt 1950). Die parallel verwandten Klassifikationssysteme erschwerten die Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Daten untereinander und im zeitlichen Verlauf, so dass eine international einheitliche histologische Klassifikation benötigt wurde. Im Jahr 1979 veröffentlichte dann die WHO die erste Auflage der WHO-Klassifikation „Histological typing of tumours of the central nervous system“ (Zülch 1979). Modifikationen an dieser erfolgten 1993 (Kleihues et al. 1993), 2000 (Kleihues & Sobin 2000) und 2002 (Kleihues et al. 2002), bevor im Jahr 2007 die vierte überarbeitete Auflage (Louis et al. 2007) erschien.

Nach dieser neuesten Version werden die primären Hirntumore, wie gewohnt, in die WHO-Grade I – IV eingestuft. Die sechs Kriterien, die hierfür berücksichtigt werden, sind Zellatypie, Differenzierungsgrad, Mitoserate, Zelldichte, Endothelproliferation und Nekrose. Der WHO-Grad I ist bei den astrozytären Tumoren für das Pilozytische Astrozytom sowie das Subependymale Riesenzell-Astrozytom reserviert. Tumore, die

ausschließlich Zelltypen aufweisen, werden zum WHO-Grad II gezählt. Kommen Anaplasie und eine erhöhte mitotische Aktivität hinzu, entspricht dies WHO-Grad III. Endothelproliferationen und Nekrosen als Zeichen eines rasanten Tumorwachstums erlauben die Einstufung in WHO-Grad IV.

<b>WHO-Klassifikation astrozytärer Tumore</b>				
<b>WHO-Grad</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Subependymales Riesenzell Astrozytom	•			
Pilozytisches Astrozytom	•			
Pilomyxoides Astrozytom		•		
Diffuses Astrozytom		•		
Pleomorphes Xanthoastrozytom		•		
Anaplastisches Astrozytom			•	
Glioblastom				•
Riesenzellglioblastom				•
Gliosarkom				•

**Tabelle 1: WHO Klassifikation astrozytärer Tumore**

Quelle: Louis et al. 2007

Ein weiteres gebräuchliches Klassifikationssystem ist das St. Anne/Mayo System (Daumas-Duport et al. 1988). Im Gegensatz zum WHO-System bezieht es sich aber nicht auf alle Neoplasien des ZNS, sondern ausschließlich auf infiltrierend wachsende Astrozytome. Daher wird das vorwiegend bei Kindern auftretende Pilozytische Astrozytom hier nicht erfasst. Grad I entspricht im St. Anne/Mayo System einem diffusen Astrozytom ohne zelluläre Atypie. Die Grade II – IV entsprechen wieder denen der WHO-Klassifikation.

### 1.1.2. Epidemiologie

Gleichwohl das Glioblastom eine gesonderte Stellung unter den primären Hirntumoren einnimmt, da er nicht nur der häufigste, sondern gleichzeitig auch der bösartigste Hirntumor ist, wird in den Registern der Gesundheitsberichtserstattung des Bundes oder den Registern der IARC (International Agency for Research on Cancer) jedoch nicht

zwischen den unterschiedlichen Hirntumorentitäten differenziert. In den gängigen Registern wird nur die Inzidenz bösartiger Neubildungen des Gehirns insgesamt geführt. Angaben zur Inzidenz der jeweiligen Hirntumore schwanken daher je nach Quelle. Primäre Hirntumore machen in der Bundesrepublik Deutschland, mit einer Inzidenz von 4 - 6 pro 100.000 Einwohner, ca. 2 - 3 % aller bösartigen Neubildungen aus (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2008). Das Glioblastom ist hierbei, mit einer Inzidenz von 3 – 4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern, der häufigste primäre Hirntumor (Lantos et al. 2002). Das mittlere Erkrankungsalter beträgt für das Glioblastom 61,3 Jahre (Lantos et al. 2002). Es ist somit eine Erkrankung des Erwachsenenalters und bevorzugt mit einem Verhältnis von 1,27:1 das männliche Geschlecht (Ohgaki & Kleihues 2005a).

### 1.1.3. Ätiologie

Die Genese des Glioblastoms ist, wie bei den meisten anderen Hirntumoren, weitestgehend unbekannt. Grundsätzlich wird zwischen zwei Entstehungswegen des Glioblastoms unterschieden. Die Einteilung in primäre und sekundäre Glioblastome wurde erstmals durch den Neuropathologen Hans-Joachim Scherer eingeführt, der schon im Jahre 1940 eine längere Erkrankungszeit für sekundäre Glioblastome feststellen konnte (Scherer 1940). Das primäre Glioblastom entsteht ohne eine klinisch oder histopathologisch nachweisbare vorbestehende Läsion. Primäre Glioblastome sind den sekundären Glioblastomen mit einem Anteil von 80 – 90 % zahlenmäßig weit überlegen und entstehen mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 62 Jahren bevorzugt bei älteren Patienten (Dropcho & Soong 1996, Ohgaki & Kleihues 2007). Sekundäre Glioblastome hingegen entstehen durch Progression aus einem niedriggradigeren Astrozytom. Diese weniger häufigen Läsionen entstehen bevorzugt bei jüngeren Patienten (Durchschnittsalter 45 Jahre) nach längerem klinischem Verlauf (Ohgaki & Watanabe 1999).

Eine Zunahme der Inzidenz über die letzten Jahrzehnte, vor allem in höheren Altersgruppen, lässt sich nur zum Teil durch die Verbesserung der bildgebenden Diagnostik sowie die gestiegene Lebenserwartung der Gesamtbevölkerung erklären (Davis & Schwartz 1988). Durch die erhöhte Inzidenz für Gehirntumoren in bestimmten

Berufsgruppen und höheren Altersgruppen wurden elektromagnetische Strahlung, onkogene Viren (Del Valle et al. 2000) sowie verschiedene Schwermetalle und Pestizide (Smith-Rooker et al. 1992) als krebsauslösende Faktoren verdächtigt. Ein Zusammenhang konnte aber nicht bewiesen werden. Auch strahlentherapeutische Maßnahmen werden in der Literatur als Risikofaktoren für die Entstehung genannt (Balasubramaniam et al. 2007, Menon et al. 2007, Salvati et al. 1991).

Ein familiär gehäuftes Auftreten von Astrozytomen und anderen primären Hirntumoren gibt es im Rahmen des Li-Fraumeni-Syndroms, einer autosomal-dominant vererbten Keimbahnmutation des TP53 Tumorsuppressorgens (Malkin et al. 1990). Eine weitere autosomal-dominant erbliche Prädisposition für Astrozytome ist das Turcot-Syndrom Typ 1. Hierbei treten vermehrt Glioblastome vergesellschaftet mit dem HNPCC-Syndrom (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma) auf (Paraf et al. 1997).

#### 1.1.4. **Klinik und Diagnose**

Aufgrund der unklaren Genese des Glioblastoms spielen Früherkennung und Prävention außer bei den im Abschnitt 1.1.3 erwähnten hereditären Syndromen keine Rolle. Meist ist die präklinische Anamnese recht kurz. Bei den meisten Patienten mit einem primären Glioblastom vergehen vom Auftreten erster klinischer Symptome bis zur histologischen Sicherung der Diagnose weniger als 3 Monate. Dies trifft nicht für die Gruppe der sekundären Glioblastome zu. Für solche, die aus einem WHO-Grad III-Gliom entstanden sind, beträgt diese Zeitspanne im Durchschnitt 1,4 Jahre. Die Progression aus einem Gliom WHO Grad II dauert im Durchschnitt sogar 5,3 Jahre (Ohgaki & Kleihues 2005b).

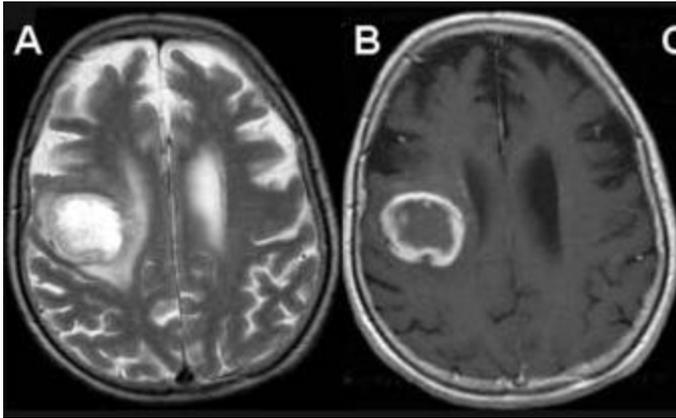
Zu Beginn ist die Symptomatik diffus und eher diskret. Zeichen der intrakraniellen Raumforderung sind Persönlichkeits- oder Stimmungsveränderungen sowie Kopfschmerzen, gegebenenfalls mit Übelkeit und Erbrechen. Kompression und Destruktion der umliegenden Hirnstrukturen durch den Tumor können eindrucksvollere Symptome, wie neurologische Herdsymptome und hirnorganische Krampfanfälle, hervorrufen. Selten kommt es durch Tumoreinblutung zu schlaganfallähnlichen Ereignissen (Albert 1986). Die Steigerung des intrakraniellen Druckes durch

Tumorwachstum und Ausbildung eines perifokalen Ödems erfordert bei Einklemmungsgefahr eine sofortige Hirndrucktherapie.

Differentialdiagnostisch müssen Hirnmetastasen extrazerebraler Tumore, zerebrale Lymphome und ein entzündlicher Ursprung der Symptomatik ausgeschlossen werden. Ergibt sich klinisch neurologisch der Verdacht auf einen Hirntumor, so muss eine kraniale Bildgebung mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgen. Im CT imponiert das Glioblastom als gemischt hypo-hyperdense Raumforderung. Nach Kontrastmittelgabe kann ein zentrales nekrotisches Areal, welches hypodens erscheint, von einem Kontrastmittel anreichernden, also hyperdensen, reichlich vaskularisierten, ringförmigen Tumoranteil unterschieden werden. Nach außen schließt das hypodense perifokale Ödem an. Die Kontrastmittelverstärkung korreliert hierbei mit den soliden Anteilen des Tumors. Eine Infiltration des Hirngewebes durch maligne Zellen reicht jedoch weit in das perifokale Ödem hinein (Burger 1983). Für die optimale Planung der operativen Therapie und der Strahlentherapie ist die Kenntnis über die weitere Ausdehnung unerlässlich.

In der T2-Wichtung der MRT lassen sich das durch Störung der Blut-Hirn-Schranke ausgetretene Plasmawasser und damit die Größe des Ödems geeigneter abschätzen (Modic 1991). Die so bestimmte hyperdense Ödemzone ist von infiltrierenden Tumorzellen durchsetzt. Sogar außerhalb der mit T2-Wichtung ermittelten Ödemzone konnten infiltrierende maligne Zellen nachgewiesen werden (Giese & Westphal 2001). Die MRT mit und ohne Kontrastmittelgabe gilt als diagnostisches Mittel der Wahl.

Die Sicherung der Diagnose kann mittels stereotaktischer Biopsie oder offener Operation erfolgen. Die stereotaktische Biopsie liefert in über 90 % ein diagnostisches Ergebnis und ist damit vergleichbar mit der histologischen Untersuchung von Resektaten (Ostertag et al. 1980). Derart kann eine neuropathologische Sicherung der Diagnose auch bei primär nicht operablen Patienten mit geringem Risiko erfolgen (Hall 1998).



**Abbildung 1: Glioblastom in der MRT**

- A) T2 Wichtung zeigt peritumorales Ödem
- B) T1 Wichtung mit ringförmiger Kontrastmittelanreicherung

Quelle: Bode et al. 2006

### 1.1.5. Therapie

Grundsätzlich stehen bei der Therapie des Glioblastoms drei Therapieoptionen zur Verfügung: Die operative Resektion, die Strahlentherapie und die medikamentöse Chemotherapie. Als Standardtherapie gilt die radikale Tumorresektion gefolgt von adjuvanter Radiochemotherapie.

Bei der Operationsplanung muss das Ziel der maximalen Tumorreduktion sorgfältig gegen das Risiko durch den Eingriff provozierte neurologische Defizite abgewogen werden. Die Literaturlage bezüglich der prognostischen Relevanz der maximalen Radikalität der Operation ist uneinheitlich. Fast alle Studien zu dieser Fragestellung sind retrospektiv erhoben worden und daher wenig aussagekräftig. Viele Autoren sehen einen Vorteil der radikalen Resektion (Hess 1999, Vuorinen et al. 2003). Manche Autoren konnten, bei gleichartiger Strahlentherapie in beiden Patientengruppen, keinen signifikanten Unterschied der Überlebenszeiten von Patienten mit Operation und denen mit Biopsie feststellen (Kreth et al. 1999).

Bedingt durch die Invasivität des Glioblastoms ist eine komplette Resektion nahezu unmöglich. Daher wird in der Regel eine externe Strahlentherapie angeschlossen. Nach den aktuellen Empfehlungen wählt man eine Gesamtdosis von 60 Gy in Fraktionen von 1,8-2,0 Gy (Laperriere et al. 2002). Für Patienten im schlechten Allgemeinzustand kann

eine verkürzte Gesamtbestrahlungszeit mit 30-45 Gy Gesamtdosis und erhöhten Einzeldosen von 3 Gy von Vorteil sein (Brada et al. 1999).

Im Vergleich zur gut etablierten Strahlentherapie nimmt die Chemotherapie einen geringeren Stellenwert ein, da sie nicht geeignet ist, eine vergleichbare Überlebensverlängerung herbeizuführen. Seit drei Jahrzehnten kommen viele unterschiedliche chemotherapeutische Agenzien zum Einsatz, in der Hauptsache sind dies Nitrosoharnstoffverbindungen. In einer Metaanalyse wurde eine Verlängerung des medianen Überlebens um 2 Monate durch adjuvante Radiochemotherapie gegenüber adjuvanter Strahlentherapie allein beobachtet (Glioma Meta Analysis Trialists Group 2002). Jedoch beinhaltete diese Analyse Studien unterschiedlicher Therapieschemata. In neuerer Zeit ist die Wirkung von Temozolomid in der adjuvanten Therapie untersucht worden. Stupp et al. konnten in einer randomisierten Phase-3-Studie einen Überlebensvorteil unter Therapie mit Temozolomid nachweisen. Hier konnte eine Verlängerung des medianen Überlebens von 12,1 auf 14,6 Monate beobachtet werden (Stupp et al. 2005). Grundsätzlich ist die Indikation zur adjuvanten Radiochemotherapie aufgrund ihrer Toxizität abhängig vom Allgemeinzustand und Alter des Patienten.

Neuere Therapiekonzepte beziehen molekularbiologische Eigenschaften des Tumors in die Therapieplanung mit ein. Eine Therapie mit Temozolomid zeigt demnach ein besseres Ansprechen beim Vorliegen methylierter MGMT (Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase) im Vergleich zu nicht methylierter MGMT im Primärtumor (Hegi et al. 2005). Eine andere Gruppe beschreibt wie eine Deletion im Bereich des EGFR-Gens zu einer neuen Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne, der sogenannten Variante III des EGFR führt und damit ein geeignetes Epitop für eine Immuntherapie bietet (Li et al. 2010). Alternativ können Tyrosinkinase-Inhibitoren bei EGFR-exprimierenden Primärtumoren zum Einsatz kommen (Gadji et al. 2009). Eine andere Immuntherapie zielt auf eine Subpopulation von Tumorzellen in Glioblastomen, die den Stammzellmarker CD133 exprimieren. Diese Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aus und sind relativ resistent gegenüber Radio- und Chemotherapie. Man vermutet, dass eine gezielte Therapie gegen diese Zellen daher mit einer Verbesserung der Überlebenszeiten einhergehen könnte (Ji et al. 2010).

#### 1.1.6. Prognose

Die Prognose des Glioblastoms ist trotz aller medizinischen Fortschritte überaus schlecht und führt in der Regel nach Ausschöpfen aller therapeutischer Optionen und einer Erkrankungsdauer von wenig mehr als einem Jahr zum Tod. Heutzutage sind rein operative Ansätze sehr selten. Studien aus den 1970er Jahren zeigen schon, dass der Einsatz der adjuvanten Strahlentherapie einen entscheidenden Einfluss auf die Überlebenszeit hat, die adjuvante Chemotherapie jedoch nicht so sehr. So konnte das mediane Überleben durchschnittlich von 4 Monaten bei Operation allein auf 9 – 12 Monate nach Operation und adjuvanter Radiotherapie gesteigert werden (Walker et al. 1978, Walker et al. 1979). Neuere Studien konnten eine weitere Steigerung des medianen Überlebens um 2,5 Monate auf 14,6 Monate durch zusätzlichen Einsatz adjuvanter Chemotherapie belegen (Stupp et al. 2005).

Ca. 2 – 5% der Glioblastom-Patienten überleben als sogenannte „Long-Term-Survivors“ länger als 3 Jahre (Scott et al. 1999). Tumore dieser Patienten zeigen häufiger eine Überexpression des nukleären Proteins p53 und seltener eine Überexpression von mdm2 (Murine Double-Minute Oncogene), einem Zellzyklusprotein, das das Tumorsuppressorprotein p53 inhibiert. Ein statistisch signifikanter Expressionsunterschied konnte jedoch nicht belegt werden (Burton et al. 2002).

Bemerkenswert ist, dass Patienten mit sekundärem Glioblastom signifikant länger überleben als Patienten mit primärem Glioblastom. Dies ist mit ihrem deutlich niedrigeren Alter erklärbar (Ohgaki et al. 2004). Diese Patienten sind im Durchschnitt 17 Jahre jünger (Ohgaki & Kleihues 2005b), und das Alter der Patienten und ihr Allgemeinzustand, gemessen anhand des Karnofsky-Indexes, sind die wichtigsten prognostischen Faktoren (Walker et al. 1978 Laws et al. 2003). Negative prognostische Faktoren sind das Ausmaß an Nekrose und ein „Loss of Heterocycosity“ (LOH) auf Chromosom 10. Eine Amplifikation des Gens für den EGF-Rezeptor, eine Mutation des TP53-Tumorsuppressorgens oder eine Mutation des „Phophatase and Tensin Homology Genes“ (PTEN) sind nicht mit Überlebenszeiten korreliert (Ohgaki et al. 2004).

### **1.1.7. Von Glioblastomen häufig exprimierte Proteine**

#### **1.1.7.1. GFAP**

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) ist ein Intermediärfilament der Gliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Es bildet das Zytoskelett der Astrozyten und dient als Markerprotein für ihre Identifizierung. Mit immunhistochemischen Färbungen lässt sich GFAP auch in differenzierten Astrozytomen, besser differenzierten astrozytären Anteilen von Glioblastomen und Medulloblastomen sowie anderen primären ZNS-Tumoren mit gliomatösen Anteilen nachweisen (Eng & Rubinstein 1978). Der teilweise Verlust der GFAP-Expression astrozytärer Tumore scheint zwar ein Maß für den Grad der Differenzierung zu sein, ist aber kein Schritt in der Tumoprogession von Astrozytomen (Wilhelmsson et al. 2003).

Andere von Glioblastomen regelhaft exprimierte Proteine sind S-100 $\beta$ , Ki-67, EMMPRIN, p53 und der EGF-Rezeptor. Diese sind aber nicht ZNS-spezifisch.

#### **1.1.7.2. S-100 $\beta$**

S-100 $\beta$  gehört zur Familie der Calcium-bindenden Proteine und wird in Astrozytomen und Glioblastomen nachgewiesen. Da es aber auch in Gewebe außerhalb des ZNS nachgewiesen wird (Melanozyten, Adipozyten und vor allem Lymphozyten), kam es als Screeningmarker für zirkulierende Glioblastomtumorzellen nicht in Betracht (Van Eldik et al. 1986). Wie in der Fragestellung bereits erwähnt, sollten ja gerade Proteine ausgewählt werden, mit denen sich Tumorzellen von Zellen des peripheren Blutes unterscheiden lassen.

#### **1.1.7.3. EMMPRIN**

EMMPRIN, synonym auch CD147, Basigin oder M6 genannt, wird von vielen malignen Tumoren, u.a. von Astrozytomen, aber auch vom normalen Hirngewebe exprimiert. Dabei steigt der Grad der Expression analog mit dem WHO-Grad der Läsion (Sameshima et al. 2000) und ist im Glioblastom mit ca. 80% am höchsten (Riethdorf et al. 2006). EMMPRIN wurde ursprünglich aus der humanen Lungenkrebszelllinie LX1 isoliert (Ellis et al. 1989). EMMPRIN befindet sich auf der Oberfläche von Tumorzellen

und stimuliert umliegende Stromazellen zur Produktion von Matrix Metalloproteinasen (MMPs). Dies steht im Verdacht, die Tumorzellinvasion durch Arrosion der umgebenden extrazellulären Matrix zu begünstigen (Kataoka et al. 1993).

#### ***1.1.7.4. Ki-67***

Die Proliferation in Glioblastomen ist intra- und intertumoral sehr unterschiedlich. Die mitotische Aktivität von Astrozytomen kann anhand des Proliferationsmarkers Ki-67 bestimmt werden. Die Wachstumsfraktion wird je nach Quelle mit 12 - 15% für Glioblastome angegeben und steigt mit dem WHO-Grad (Burger et al. 1986, Karamitopoulou et al. 1994). Ein Zusammenhang zwischen Größe der Wachstumsfraktion und klinischem Verlauf konnte nicht bewiesen werden (Moskowitz et al. 2006).

#### **1.1.8. Entstehungswege primärer und sekundärer Glioblastome**

Wie bereits erwähnt, können Glioblastome primär bzw. de novo entstehen (95% der Fälle), oder sie entwickeln sich langsam aus einer vorbestehenden, niedrig-gradigeren Läsion (5% der Fälle) (Dropcho & Soong 1996). Für diese beiden Subtypen existieren charakteristische genetische Alterationen. Beiden gemein und gleichzeitig am häufigsten ist ein Verlust von Anteilen des langen Arms von Chromosom 10, ein sogenannter LOH (Loss of Heterocycocity) auf Chromosom 10. Dieser kann mit jeder anderen genetischen Alteration kombiniert vorkommen. Ein LOH auf 10q wird auch bei niedrig-gradigen Astrozytomen nachgewiesen, ist aber mit über 70% bei Glioblastomen am häufigsten zu finden. Meist ist hier das gesamte Chromosom 10 verloren gegangen. Es wird daher vermutet, dass ein LOH von 10q einen entscheidenden Schritt in der Tumoprogession von Gliomen mit Verlust von Tumorsuppressor-Genen darstellt (Ichimura et al. 1998).

##### ***1.1.8.1. Einfluss von p53***

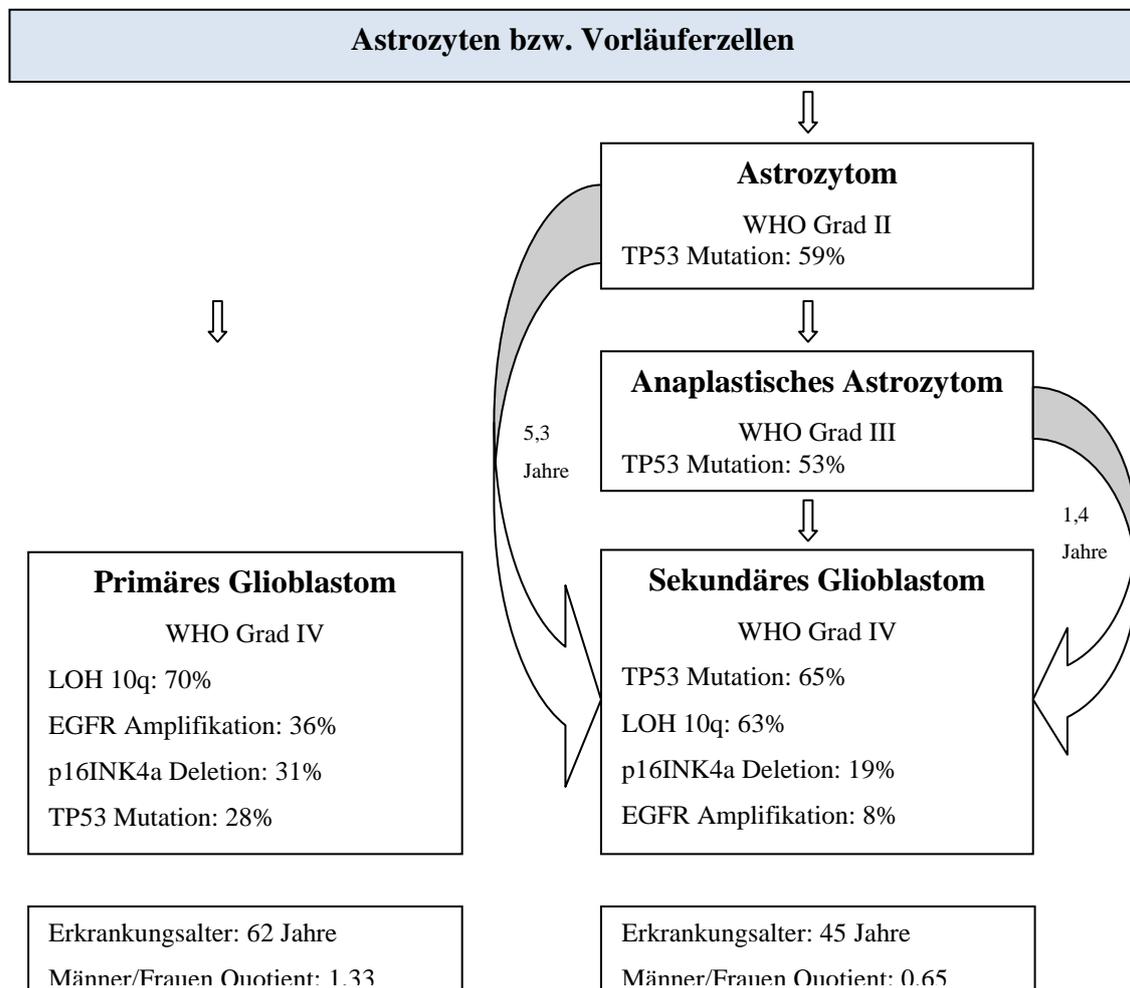
Das Tumorsuppressor-Protein p53 gilt als Wächter des Genoms (Lane 1992). Es hat entscheidenden Einfluss auf DNA-Reparatur-Mechanismen, verschiedene Zellzyklusproteine, Zelldifferenzierung, Neovaskularisierung und Apoptose (Bogler et

al. 1995). Es besetzt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der Transkription proapoptotischer Gene, die letztendlich über Cytochrom C und Caspasen zum programmierten Zelltod führen (Levine 1997). Mutationen im TP53-Gen finden sich signifikant häufiger bei sekundären (65%) als bei primären Glioblastomen (28%). Interessanterweise unterscheiden sich die beiden Subtypen auch in der Lokalisation der TP53-Mutation, was die Annahme unterschiedlicher Entstehungswege primärer und sekundärer Glioblastome unterstreicht (Ohgaki et al. 2004).

#### ***1.1.8.2. EGFR-Überexpression***

Der EGF-Rezeptor, synonym auch ErbB1 oder HER1 genannt, ist ein transmembraner Rezeptor, der nach Binden eines Liganden einen mitotischen Stimulus nach intrazellulär überträgt (Arteaga 2002). Er gehört zur Familie der humanen EGF-Rezeptoren (HER) und besitzt, wie die meisten von diesen, Tyrosinkinaseaktivität. Im ZNS wird der EGF-Rezeptor bereits in der Embryonalzeit exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation, Migration und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen (Wong & Guillaud 2004). Eine Amplifikation des EGFR-Gens ist eine häufige genetische Alteration in Glioblastomen. Vornehmlich wird sie in primären, seltener in sekundären Glioblastomen beobachtet (36% vs. 8%) (Ohgaki et al. 2004). In der Mehrzahl der Fälle liegen die amplifizierten DNA-Abschnitte extrachromosomal in Form von sogenannten „Double-Minute Chromosomen“ (Bigner et al. 1987) vor. Sauter et al. konnten bis zu 250 solcher Kopien des EGFR-Gens pro Zelle nachweisen. Gleichzeitig kann auch eine Polysomie des Chromosoms 7, das die genetische Information des EGFR trägt, bestehen (Sauter et al. 1996). Die Amplifikate des EGFR-Gens sind vielfach mutiert. Unter diesen Mutationen kommt am häufigsten die Variante III des EGFR (EGFRvIII) vor (Biernat et al. 2004). Diese Form ist konstitutiv, d.h. Liganden-unabhängig aktiv. Insgesamt dominiert jedoch die Expression von Wildtyp-EGFR. Dieser Wildtyp-EGFR wird erst durch Ligandenbindung (EGF, „Transforming Growth Factor  $\alpha$ “ (TGF- $\alpha$ ), Amphiregulin (AR), „Heparin-Binding-EGF“ (HB-EGF), „ $\beta$ -Cellulin“ ( $\beta$ -CEL), Epinephrin (EPI)) aktiviert und dimerisiert. Beide, d.h. Wildtyp EGFR und EGFRvIII, stimulieren über die Phosphatidylinositol 3- Kinase (PI3K) und die „Rat Sarcoma (RAS)/mitogen-activated Proteincinase“ die Zellproliferation (Narita et al. 2002).

Weitere molekularbiologische Besonderheiten primärer und sekundärer Glioblastome sind der Übersicht halber in Abbildung 2 zusammengefasst.



**Abbildung 2: Genetische Eigenschaften primärer und sekundärer Glioblastome**

Quellen: Modifiziert nach Ohgaki, et al. 2004 und Ohgaki & Kleihues 2007

### 1.1.9. Extraneurale Metastasierung

1926 formulierten Bailey und Cushing die Hypothese, nach der bei Gliomen niemals Metastasen außerhalb des ZNS entstehen (Bailey & Cushing 1926). Obwohl seither zahlreiche Veröffentlichungen erschienen sind, die diese Behauptung widerlegen, ist die systemische Metastasierung von primären Hirntumoren dennoch ein seltenes Ereignis. Es wird geschätzt, dass in nur 0,2 – 2% der Glioblastompatienten eine klinisch erkennbare Filialisierung geschieht (Hsu et al. 1998). Kritik an der Theorie, dass Hirntumoren zu einer Metastasierung befähigt wären, begegnete Weiss 1955. Um die

Läsionen eindeutig dem Primarius im ZNS zuordnen zu können, legte er die sogenannten „Weiss-Kriterien“ fest (Weiss 1955): 1. Ein histologisches Charakteristikum eines primären Hirntumors muss nachgewiesen werden; 2. Die Anamnese muss ergeben, dass zuerst Symptome eines primären Hirntumors auftraten; 3. Eine Autopsie muss erfolgen, um einen anderen Primarius auszuschließen; 4. Morphologisch müssen Primärherd und Metastase Übereinstimmungen zeigen. Selten beginnt die klinische Symptomatik mit Symptomen, die durch Filiae hervorgerufen werden (Dolman 1974). Dies führte zur Abschaffung des zweiten Kriteriums. Die übrigen „Weiss-Kriterien“ werden auch heute noch anerkannt.

Mehrere Autoren haben versucht, die zahlreichen Fallbeschreibungen, die seit Bailey und Cushing erschienen sind, möglichst vollzählig zusammenzutragen und zu analysieren (Pasquier et al. 1980, Hoffman & Duffner 1985, Huang et al. 1995).

Zielorgane systemischer Metastasierung	Relative Häufigkeit
Lunge, Pleura	60%
Lymphknoten, hauptsächlich zervikal und mediastinal	51%
Knochen, vornehmlich Achsenskelett	30%
Leber	22%
Herz, Nebenniere, Niere, Pankreas, Schilddrüse, Peritoneum	Vereinzelt

**Tabelle 2: Zielorgane systemischer Metastasierung von Gliomen**

Quelle: Pasquier et al. 1980

Pasquier et al. sammelten über die reinen Fallzahlen hinaus auch klinische Daten der Patienten mit extraneuralen Metastasen von Astrozytomen, Glioblastomen und Gliosarcomen. Bei 72 Fällen (51 hiervon Glioblastome) zwischen 1928 und 1980 stellten sie fest, dass diese Patienten in der Mehrzahl jünger (zwischen 20 und 50 Jahren) und männlichen Geschlechts (M/F Quotient 1,8) waren. Diese Patienten wiesen ebenfalls mit 18,2 Monaten ein längeres medianes Überleben auf als Glioblastompatienten ohne Metastasierung. Von ihnen waren 89% mindestens einmal craniotomiert worden, was Spekulationen über eine intraoperative Aussaat von Tumorzellen hervorbrachte. In 11% der Fälle folgte die Metastasierung einem, während der Craniotomie implantierten, Liquor-Shunt zu Peritoneum, Pericard oder Pleura. Nur

in weiteren 11% wurden systemische Metastasen ohne Voroperation oder Shuntimplantation beobachtet (Pasquier et al. 1980).

Aktuelle Fallbeschreibungen zeigen ähnliche Beobachtungen wie die von Pasquier et al. beschriebenen. In Tabelle 3 sind die 39 Fälle extraneuraler Metastasierung bei Patienten mit Glioblastom aufgeführt, die zwischen 2003 und 2009 in englischer, französischer, oder deutscher Sprache veröffentlicht wurden. Intradurale Absiedelungen, wie z. B. Abtropfmetastasen im Spinalkanal, wurden nicht berücksichtigt. Auch hier lässt sich ein junges Durchschnittsalter (52,1 Jahre) und ein Vorwiegen männlicher Patienten (M/F Quotient 2,17) beobachten. Fast alle Patienten (92,1%) wurden vor dem Auftreten von Metastasen craniotomiert. In absteigender Reihenfolge waren bei den Patienten folgende Organe/Orte betroffen: Lunge/Pleura (38,5%), Knochen (36%), Lymphknoten (23,1%) und die Kopfhaut im Bereich der Craniotomienarbe (23,1%). Weitere Orte metastatischer Absiedelungen waren die Leber (15,4%), Ohrspeicheldrüse (10,3%), die Milz (10,3%), Mediastinum (10,3%), Pankreas, Niere und Retroperitoneum (zusammen 10,3%).

Fallveröffentlichungen 2003 bis 2009						
Veröffentlichung	Alter/ Geschlecht	Ort	OP	Rad.	Chem.	Über- leben
Adn et al. 2003	k.A.	Lunge, Pleura	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Ates et al. 2003	40 J. (m)	Supraclaviculäre LK	Ja	Nein	Nein	18 Mo.
Jahraus et al. 2003	6 J. (w)	Femur, Pelvis	Nein	Ja	Ja	6 Mo.
Kühn et al. 2003	58 J. (m)	Parotis, Leber	Ja	Ja	Nein	>10 Mo.
Ueda et al. 2003	42 J (m)	Lunge, Epicard, Niere, Pankreas, Leber, Skelett, LK	4x	Ja	Ja	91 Mo.
Yasuhara et al. 2003	47 J. (m)	Milz, Lunge	Ja	Ja	Ja	6 Mo.
Allan 2004	60 J. (m)	Lokal subcutan	Ja	Ja	k.A.	14 Mo.
Fabi et al. 2004	43 J. (m)	Wirbelsäule	Ja	Ja	Nein	>66 Mo.
Montagne et al. 2004	74 J. (m)	Skelett, Lunge, Milz, LK	Nein	Nein	Nein	3 Mo.
Moon et al. 2004	35 J. (w)	Lokal subcutan, zervikale LK	4x	Ja	Ja	48 Mo.
Chivukula et al. 2005	62 J. (m)	Lunge	2x	Ja	Ja	>14 Mo.

Bouillot-Eimer et al. 2005	60 J. (w)	Lokal subcutan	Nein	Ja	Ja	>8 Mo.
Mirzayan et al. 2005	30 J. (m)	Skelett, Mediastinum, LK	Ja	Ja	Ja	k.A.
Ogungbo et al. 2005	49 J. (w)	Parotis	Ja	Ja	Ja	16 Mo.
Rajagopalan et al. 2005	60 J. (m)	Skelett	2x	Ja	Ja	22 Mo.
Schultz et al. 2005	74 J. (w)	Lokal subcutan	Ja	Nein	Ja	14 Mo.
Taha et al. 2005	33 J. (m)	Parotis, Zervikale LK	2x	Ja	k.A.	k.A.
Tuominen et al. 2005	25 J. (m)	Mediastinum	2x	Ja	Ja	81 Mo.
Utsuki et al. 2005	42 J. (m)	Wirbelsäule	Ja	Ja	Ja	37 Mo.
Astner et al. 2006	54 J. (m)	Wirbelsäule, Leber	Ja	Ja	Ja	36 Mo.
Chelly et al. 2006	26 J. (m)	Skelett	Ja	k.A.	k.A.	>18 Mo.
Didelot et al. 2006	74 J (m)	Skelett, Lunge, Milz, LK	Ja	Ja	Ja	4 Mo.
Mujic et al. 2006	39 J. (m)	Pankreas, Dünndarm, Lunge	Ja	Ja	Nein	26 Mo.
Kos et al. 2007	66 J. (m)	Lokal subcutan	Ja	Ja	k.A.	k.A.
Kraft et al. 2007	58 J. (m)	Parotis, Lunge, Pleura, Orbita, Herz, Skelett, Leber, LK	Ja	Ja	Ja	16 Mo.
Saad et al. 2007	13 J. (m)	Lokal subcutan, Leber, Lunge	Ja	Ja	Ja	10
Mentrikoski et al. 2008	58 J. (w)	Lokal subcutan	2x	Ja	Ja	>16 Mo.
Templeton et al. 2008	58 J (m)	Lunge, Femur, Retroperitoneum	Ja	Ja	Ja	11 Mo.
	47 J. (w)	Pleura	Ja	Ja	Ja	24 Mo.
Senetta et al. 2009	48 J (w)	Lokal subcutan	Ja	Ja	Ja	k.A.
	53 J. (w)	Lokal subcutan	Ja	Ja	Ja	6 Mo.
Miliaras et al. 2009	64 J (m)	Skapula, Subcutan	Ja	Ja	k.A.	10 Mo.
Sammelveröffentlichung von 7 Fällen. Alter und Überlebenszeiten sind Durchschnittswerte.						
Piccirilli et al. 2008	(63-74J.) 4x(m); 3x(w)	4x Lunge, 1x Leber, 1x Humerus, 1x LK	Ja	Ja	Ja	31 Mo. (25-35 Mo.)

LK = Lymphknoten; Lokal subcutan = Extracranielle Absiedelung im Bereich des Craniotomie Zugangs;  
k.A. = keine Angabe

**Tabelle 3: Veröffentlichte Fälle extraneuraler Metastasen von Patienten mit Glioblastom zwischen 2003 und 2009.**

Die genauen Gründe, warum Glioblastome trotz ihres lokal sehr invasiven Wachstums nur selten systemisch metastasieren, sind weiterhin unbekannt. Als mögliche Erklärungen werden physikalische Barrieren bzw. Hinderungsgründe, wie die Blut-Hirn-Schranke, Kompression und Thrombosierung intracerebraler Venen durch den Tumor und die Einscheidung der venösen Sinus durch die Dura Mater genannt (Schweitzer et al. 2001). Das Fehlen intracerebraler lymphatischer Gefäße als Ursache wird immer noch kontrovers diskutiert. McComb konnte bereits 1983 eine lymphatische Drainage von Liquor nach extrakraniell nachweisen (McComb 1983). In einem SCID-Maus-Modell (Severe-Combined-Immundeficient) zeigten Glioblastometastasen außerhalb des ZNS im Vergleich zu Metastasen von Karzinomen oder Sarkomen ein ähnliches Wachstumsverhalten (Huang et al. 1995). Ein mangelndes extrakranielles Wachstum wird daher nicht angenommen. Bei dieser Untersuchung bleibt jedoch ein möglicher hemmender Einfluss des menschlichen Immunsystems auf das Metastasenwachstum unbeachtet. Denkbar wäre, dass sich eine bereits frühzeitig erfolgte okkulte Tumorzell-Dissemination aufgrund der kurzen Überlebenszeiten von Glioblastompatienten bis zum Todeszeitpunkt klinisch noch nicht manifestiert.

Ein entscheidender Faktor für die Metastasierung scheint die Exposition venöser und lymphatischer Gefäße sowie des extraduralen Gewebes gegenüber Tumorzellen während der Operation zu sein (Huang et al. 1995). Die Fähigkeit einzelner Zellen, sich aus dem Verband des primären Hirntumors zu lösen und nach Penetration das Gefäßsystem zu erreichen, liefert eine mögliche Erklärung für die Fälle, in denen eine Metastasierung ohne Voroperation oder Liquorshuntimplantation erfolgt (Liwnicz & Rubinstein 1979). Der genaue Weg der Metastasierung konnte bisher noch nicht beschrieben werden. Das gehäufte Auftreten von Lungenmetastasen spricht für eine hämatogene, der häufige Befall zervikaler Lymphknoten, für eine lymphogene Metastasierung (Schweitzer et al. 2001).

Interessanterweise weisen die Metastasen nicht immer die gleichen genetischen Alterationen auf wie der Primärtumor. Bei den sechs Patienten, deren Metastasen von Park et al. molekulargenetisch untersucht wurden, zeigten sich bei zwei Patienten unterschiedliche TP53-Mutationen in Primärtumor und Metastasen (Park et al. 2000).

Dies lässt vermuten, dass nicht notwendigerweise der dominierende Zell-Typ metastasiert oder eine Mutation erst zu einem Zeitpunkt nach der Dissemination entsteht. Park et al. fanden bei vier der sechs Patienten TP53-Mutationen und nur bei einem eine Amplifikation des EGFR-Gens. Da Patienten mit metastasierten Glioblastom meist jünger sind, stünde dies im Einklang mit der Beobachtung, dass jüngere Patienten generell häufiger TP53 Mutationen aufweisen (Ohgaki et al. 2004). Andere Autoren beschreiben, dass Tumorzellen zumindest in-vitro, d.h. nach Wegfall des Selektionsdruckes im Tumorzellverband, ihre EGFR-Amplifikation verlieren (Bigner et al. 1990). Dies könnte ebenfalls ein mögliches häufigeres Auftreten von TP53-Mutationen in Glioblastometastasen erklären.

## **1.2. TRANSMISSION DURCH SPENDERORGANE**

Im Jahr 2006 wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika laut des jährlichen Berichts der UNOS (United Network for Organ Sharing) und der OPTN (Organ Procurement and Transplantation Network) bei 8.024 verstorbenen Spendern Organe zur Transplantation entnommen. Bei nur 57 (0,7%) unter diesen 8.024 wurde ein primärer Hirntumor als Todesursache genannt (Annual Report of the US OPTN/SRTR, 2007). Gleichzeitig versterben in den Vereinigten Staaten jährlich über 13.000 Menschen an einem Hirntumorleiden (DeAngelis 2001). Der Grund, warum nur eine geringe Anzahl dieser verstorbenen Patienten zur Organspende zugelassen wird, liegt darin, dass in der Vergangenheit Transmissionen von Hirntumormetastasen der Organspender auf den Organempfänger beschrieben wurden.

Bei den in der Literatur beschriebenen Fällen kam es insgesamt zur Übertragung eines Glioblastoms von 7 Spendern auf 11 Organempfänger (Morse et al. 1990, Ruiz et al. 1993, Colquhoun et al. 1994, Jonas et al. 1996, Frank et al. 1998, Armanios et al. 2004, Fatt et al. 2008). Bei allen Fällen wurde die gliale Herkunft der metastatischen Absiedlung im Transplantat durch immunhistochemischen Nachweis von GFAP bewiesen. Frank et al. konnten darüber hinaus dem Organspender die Läsion im Transplantat und eine systemische Metastase des Empfängers mittels Microsatelliten-DNA-Fingerprinting zuordnen. Ihnen gelang es ebenfalls, die gleiche Punktmutation des TP53-Gens in Primärtumor des Spenders, Läsion im Transplantat und systemischer

Metastase des Empfängers nachzuweisen (Frank et al. 1998). Weitere Fälle in der Literatur, bei denen ein primärer Hirntumor durch Organspende übertragen wurde, betreffen ein malignes Meningeom (Bosmans et al. 1997) und ein Medulloblastom (Lefrancois et al. 1987).

<b>Fallveröffentlichungen Glioblastometastasen-Transmission durch Spenderorgane</b>									
<b>Veröffent-lichung</b>	<b>Spender</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Krankheits-dauer</b>	<b>OP</b>	<b>Shunt</b>	<b>Empfänger</b>	<b>Organ</b>	<b>Latenz</b>	<b>Über-leben</b>
Morse 1990	14 J.	Gliom	k.A.	k.A.	Nein	44 J. (w)	Leber	9 Mo.	10 Mo.
Ruiz 1993	42 J. (m)	GBM	6 Mo.	Ja	Nein	48 J. (w)	l. Niere	17 Mo.	> 32 Mo.
						23 J. (w)	r. Niere	18 Mo.	> 32 Mo.
Colquhoun 1994	32 J. (m)	GBM	k.A.	Ja	Nein	32 J. (m)	l. Niere	10 Mo.	k.A.
						23 J. (w)	r. Niere	10 Mo.	k.A.
Jonas 1996	48 J (w)	GBM	4 Mo.	Ja	Nein	28 J. (w)	Leber	4 Mo.	6 Mo.
Frank 1998	47 J (w)	GBM	4 Mo.	Ja	k.A.	29 J. (w)	Leber	k.A.	5 Mo.
Armanios 2004	29 J. (m)	GBM	3 J.	Nein	Nein	28 J. (m)	Lunge	3 Mo.	4 Mo.
						k.A.	Leber	k.A.	Tod
						k.A.	Niere	k.A.	Tod
Fatt 2008	k.A.	GBM	A.B.	Nein	Nein	58 J. (m)	Lunge	12 Mo.	k.A.

k.A. =keine Angabe; GBM = Glioblastoma multiforme; J. = Jahre; Mo = Monate; A.B. = Autopsiebefund; OP = Kraniotomie

**Tabelle 4: Fallveröffentlichungen Glioblastometastasen-Transmission durch Spenderorgane**

Betrachtet man die Fälle von Jonas et al. und Colquhoun et al., scheint das Risiko einer Transmission bei Organspendern mit Glioblastom nicht unerheblich zu sein. Jonas et al. beschrieben eine Transmission unter vier Spendern mit Glioblastom. Bei 19 von Colquhoun et al. registrierten Transplantaten von Glioblastompatienten kam es zu zwei Transmissionen. Mindestens sechs der insgesamt 11 betroffenen Organempfänger erlagen wenige Monate nach der Transplantation den übertragenen Metastasen. Lediglich die vier von Ruiz et al. und Colquhoun et al. beschriebenen Patienten mit Nierentransplantat konnten nach Absetzen der immunsuppressiven Therapie und Transplantatnephrektomie gerettet werden. Die Zeit bis zu einer Retransplantation konnte hier durch Dialysetherapie überbrückt werden. Die Möglichkeit, das befallene Transplantat umgehend operativ zu entfernen und die immunsuppressive Therapie zu beenden, bietet sich für Empfänger von z. B. Leber- oder Lungentransplantaten nicht. Für diese Patienten würde ein solcher Transplantationszwischenfall wahrscheinlich einen letalen Ausgang nehmen.

Im Jahr 2002 veröffentlichten Kauffman et al. eine Studie, bei der sie alle von der UNOS registrierten Organspenden von 42.340 zwischen 1992 und 1999 Verstorbenen analysierten. Insgesamt wurden 1.220 Organe von 397 Patienten mit intrakranieller Neoplasie transplantiert. Bei keinem der Empfänger konnte nach einem medianem Follow-up von 36 Monaten eine Transmission dieser Neoplasie nachgewiesen werden (Kauffman et al. 2002). Allerdings befanden sich unter diesen 397 Spendern nur 17 mit einem Glioblastom, bei den meisten Spendern war die Hirntumorentität dagegen unbekannt und nicht histologisch gesichert. In einer weiteren Studie wurden dann zwischen 2000 und 2005 die Empfänger der Organe von 39.455 verstorbenen Organspendern registriert. Hierunter befanden sich 1.069 Spender mit maligner Vorerkrankung. 175 Organe stammten von Spendern mit Glioblastomen. Insgesamt kam es zu vier letalen Transmissionen, drei davon durch einen Spender mit Glioblastom (Armanios et al. 2004) und eine durch einen Spender mit malignem Melanom, erstaunlicherweise 30 Jahre nach der Diagnose (Kauffman et al. 2007).

Die UNOS rät daher weiterhin zur Vorsicht im Umgang mit Spendern mit maligner Vorerkrankung, wie einem Glioblastom. Organe solcher Spender scheinen mit nur 2,2% an den insgesamt transplantierten Organen nur einen geringen Beitrag zur Beseitigung des bestehenden Organmangels zu leisten. Aufgrund der hohen Sterblichkeit Organsuchender auf der Warteliste aber hält die UNOS eine Verwendung solcher Organe, insbesondere für dringliche Patienten trotz der bekannten Risiken für vertretbar (Kauffman et al. 2007). Die Entscheidung, ob solche Organe verwendet werden, liegt letztendlich bei dem transplantierenden Zentrum und bedarf selbstverständlich der Zustimmung des Organempfängers.

Aufgrund der fatalen Folgen einer Transmission wäre es wünschenswert, potentielle Organspender, bei denen es bereits zu einer systemischen Streuung von Tumorzellen gekommen ist, zu identifizieren, um sie von einer eventuellen Organspende ausschließen zu können. Derart könnten weiterhin Organe von Verstorbenen mit primären Hirntumoren verwendet werden, während das Risiko einer Transmission gesenkt werden könnte. Wie die Fälle von Armanios et al. und Fatt et al. zeigen, können eine subklinische Dissemination und eine nachfolgende Transmission durch

Organspende auch ohne eine Craniotomie in der Vorgeschichte geschehen. Daher reicht es nicht aus, lediglich die Spender mit Risikofaktoren wie z. B. Craniotomie oder Liquorshuntimplantation auszuschließen. Es müsste eine geeignete Methode gefunden werden, mittels derer sich eine Dissemination von Tumorzellen bereits in einem frühen Stadium nachweisen lässt, da die meisten Glioblastompatienten bereits versterben, bevor eine Dissemination klinisch nachgewiesen werden kann. Der Versuch, zirkulierende Tumorzellen (CTC) im Blut von Glioblastompatienten als Zeichen eines frühen Stadiums der Dissemination nachzuweisen, sollte in der vorliegenden Arbeit unternommen werden.

### **1.3. DISSEMINIERTE UND ZIRKULIERENDE TUMORZELLEN**

#### **1.3.1. Disseminierte und zirkulierende Tumorzellen**

Disseminierte Tumorzellen (DTC) sind einzelne Zellen, die auch nach Entfernung des Primärtumors in verschiedenen Kompartimenten des Körpers von Krebspatienten, wie z. B. Knochenmark nachgewiesen werden können. Sie können einzeln oder in Zellclustern vorliegen. DTC werden auch als Mikrometastasen bezeichnet, wobei DTC im Unterschied zu Metastasen keine Adhäsion an bzw. Penetration von Blutgefäßen oder extravaskuläre Proliferation zeigen (Hermanek 1999). Andere Autoren legen die Unterscheidung anhand der Größe der Absiedlung fest. Hiernach wären Absiedlungen  $<0,2$  mm per Definition DTC und Absiedlungen  $>0,2$  mm Mikrometastasen. Entgegen früherer Meinungen, dass die Dissemination von Tumorzellen in die Körperperipherie zu einem späten Zeitpunkt in der Tumorprogression erfolgt (Fidler 2003), scheint diese Dissemination, zumindest beim Mammakarzinom, in einer frühen Phase der Erkrankung zu geschehen (Pantel et al. 2008b). Es kommt hier frühzeitig zu einer primären, hämatogenen Dissemination auch ohne den primären Befall lokaler Lymphknoten, die Häufigkeit des Nachweises von DTC korreliert jedoch mit der Anzahl von Lymphknotenmetastasen (Braun et al. 2005). Auch bei anderen Karzinomen lassen sich im Knochenmark von 20-40% der Patienten ohne Lymphknoten-, oder Fernmetastasen einzelne disseminierte Tumorzellen nachweisen (Lindemann et al. 1992, Pantel et al. 1996, Thorban et al. 1996). Die Hypothese einer frühzeitigen, primär hämatogenen Dissemination wird zum einen von Beobachtungen gestützt, die belegen, dass hämatogener und lymphogener Metastasierung unterschiedliche molekulare

Mechanismen zu Grunde liegen (Wölfle et al. 2003), zum anderen dadurch, dass DTC sich in ihren molekularen Eigenschaften von denen des Primärtumors unterscheiden und weitere genetische Alterationen vermutlich erst nach erfolgter Dissemination erlangen (Schmidt-Kittler et al. 2003).

Es wird angenommen, dass sich die Mehrheit der DTC in einem nicht proliferierenden Zustand befindet, der sogenannten G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus (Pantel et al. 1993). Möglicherweise ist hierin der Grund zu finden, warum sie von herkömmlichen Chemotherapeutika, die vor allem auf mitotisch aktive Zellen abzielen, nicht erfasst werden (Braun et al., 2000a, Müller et al. 2005). Es ist nicht geklärt, warum DTC über Jahre bis Jahrzehnte hinweg als sogenannte dormante Zellen im Knochenmark verweilen können, bis es nach Ausschwemmen in die Blutbahn zur Entstehung von Metastasen kommt (Pantel et al. 1997). Weiterhin ist nicht geklärt, ob Knochenmark ein spezielles Reservoir für DTC darstellt oder ob das Auftreten von DTC im Knochenmark Zeichen einer allgemeinen Dissemination in parenchymatöse Organe ist (Pantel & Brakenhoff 2004). Der Nachweis von DTC im Knochenmark bei epithelialen Tumoren ist in den letzten zwei Jahrzehnten vielfach beschrieben worden. Ihr Auftreten wurde bei den in westlichen Staaten weit verbreiteten Karzinomen wie Mamma-, Prostata-Bronchial-, und Karzinomen des Gastrointestinaltraktes erforscht (Alix-Panabières et al. 2008). Hierbei konnte insbesondere für das Auftreten von DTC im Knochenmark bei Patientinnen mit Mammakarzinom eine negative prognostische Relevanz bezüglich des rezidivfreien und gesamten Überlebens eruiert werden (Braun et al. 2005).

Ein verbreitetes Verfahren zur Anreicherung von DTC aus dem Knochenmark ist die Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll-Hypaque (Pantel et al. 1994). Dabei werden die mononukleären Zellen (MNC) von den übrigen Bestandteilen des Knochenmarkes getrennt. Anschließend wird von diesen Zellen eine bestimmte Anzahl auf Objektträger überführt und immunzytochemisch gefärbt. Es hat sich seit vielen Jahren bewährt, DTC bei Karzinomen mit monoklonalen Antikörpern gegen Zytokeratine, den Intermediärfilamenten epithelialer Zellen, zu identifizieren (Braun et al. 2000b). Um die Sensitivität zu steigern, werden solche Antikörper verwendet, die gleichzeitig gegen unterschiedliche Zytokeratine gerichtet sind (Pantel et al. 1994). Man schätzt, dass

mithilfe solcher sogenannter Panzytokeratin-Antikörper DTC mit einer Grenze von 1 DTC pro  $10^6$  MNC im Knochenmark nachgewiesen werden können (Braun et al. 2000b).

Neben der beschriebenen prognostischen Relevanz von DTC im Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen konnte die Annahme, dass es sich bei diesen Zytokeratin-positiven Knochenmarkszellen tatsächlich um Tumorzellen handelt, mit zytogenetischen Untersuchungen weiter erhärtet werden (Gangnus et al. 2004, Schmidt-Kittler et al. 2003). Es lassen sich jedoch auch gewebespezifische Proteine, wie z. B. PSA (Prostata Spezifisches Antigen) in Zytokeratin-positiven DTC bei Prostatakarzinompatienten mittels immunzytochemischer Doppelfärbungen nachweisen (Oberneder et al. 1994). Auch EMMPRIN, das häufig von Glioblastomen exprimiert wird, konnte auf diese Weise auf der Oberfläche von DTC von Mammakarzinom-Patientinnen nachgewiesen werden (Reimers et al. 2004). Andere Autoren konnten chromosomale Aberrationen und tumortypische Genamplifikationen (HER-2neu Amplifikationen) in DTC beim Mammakarzinom mittels FISH feststellen (Müller et al. 1996, Vencent-Salomon et al. 2007). Einige Arbeitsgruppen beschreiben z. B. das Auftreten HER-2-positiver DTC bei initial HER-2-negativem Primärtumor bei Mammakarzinom-Patientinnen. Möglicherweise ergeben sich also über die weitere molekulargenetische Untersuchung dieser Zellen neue gezielte Therapieoptionen (Pantel et al. 2008a). Von den DTC abzugrenzen sind die CTC (Zirkulierende Tumorzellen). Diese Tumorzellen zirkulieren im peripheren Blut und sind nicht ortsständig. Die tumorbiologischen Eigenschaften von CTC und die prognostische Relevanz ihres Nachweises bei epithelialen Neoplasien sind Gegenstand aktueller Studien. Es ist nicht bekannt, wie lange diese Zellen im peripheren Blut überleben und wie viele von ihnen befähigt sind, Metastasen zu bilden. Ähnlich wie die DTC scheinen CTC sich in einem nicht proliferativen Zustand zu befinden. Müller et al. konnten keine Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in CTC nachweisen (Müller et al. 2005). Der maligne Ursprung der CTC konnte, wie schon bei den DTC, mit zytogenetischen Untersuchungen bewiesen werden (Fehm et al. 2002, Klein et al. 2002). Ähnlich wie für DTC konnte auch für den Nachweis von CTC bei Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinom eine negative Korrelation mit dem rezidivfreien und dem

Gesamtüberleben beschrieben werden (Cristofanilli et al. 2004). Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass mit der Untersuchung auf CTC die Wirksamkeit systemischer Therapien eingeschätzt werden kann. Aufgrund der geringeren Invasivität der venösen Blutentnahme im Vergleich zur Knochenmarkspunktion sind durch diese Verlaufskontrollen möglich. Der Therapieerfolg bzw. eine Änderung der therapeutischen Strategie könnte mittels wiederholter Blutprobenentnahmen überwacht werden (Pantel et al. 2008b).

### 1.3.2. Anreicherungsverfahren für CTC

Um Untersuchungsmaterial zur Isolierung von CTC aus dem peripheren Blut zu gewinnen, ist im Gegensatz zur Gewinnung von DTC lediglich eine venöse Blutentnahme erforderlich. Aufgrund der Invasivität einer Knochenmarkspunktion und den damit verbundenen Umständen für Patient und Untersucher, scheint die Untersuchung von Blut auf CTC eine sinnvolle Alternative darzustellen. Zur Isolierung von CTC aus peripherem Blut stehen unterschiedliche Anreicherungsverfahren zur Verfügung. Die CTC können mittels Dichtegradienten-Zentrifugation, wie z. B. über Ficoll (Pantel et al. 1994), OncoQuick z. B. (Müller et al. 2003), Boyant-Density-Gradient (Brandt & Griwatz 1996), oder mittels immunomagnetischer Anreicherung (Bilkenroth et al. 2001) von den übrigen Blutbestandteilen separiert werden. Für mehrere Karzinomarten ist mittlerweile ein automatisiertes Testverfahren (CellSearch (Veridex, Warren, USA)) zur Detektion von CTC zugelassen worden. Das CellSearch System kombiniert immunomagnetische Anreicherung epithelialer Zellen mit einer Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratinen in epithelialen Zellen. Darüber hinaus erkennt es unspezifisch gefärbte Leukozyten mit Antikörpern gegen Leukozyten-Antigene (Cristofanilli et al. 2004, Riethdorf et al. 2007). Da bisher weder ein System zur primären Anreicherung noch zur Detektion von CTC glialen Ursprungs etabliert wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit u.a. die bewährte Dichtegradienten-Anreicherung mit Ficoll angewendet. Für diesen Gradienten und für den OncoQuick-Gradienten sind in der Literatur CTC-Wiederfindungsraten von zwischen 80% und 90% in in-vitro-Versuchen beschrieben worden (Rosenberg et al. 2002).

Analog zum Screening nach Zytokeratin-positiven Zellen bei Karzinompatienten sollte in der vorliegenden Arbeit über die Expression von GFAP nach CTC gefahndet werden. Eine Expression von GFAP in Zellen des peripheren Blutes ist bisher nicht beschrieben worden. GFAP wurde daher als Marker für den glialen Ursprung von CTC bei Glioblastompatienten verwendet. In einem weiteren Schritt wurden dann ausgewählte tumorbiologische Eigenschaften zirkulierender GFAP-positiver Zellen untersucht.

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1. MATERIALIEN

#### 2.1.1. Patientenkollektiv

In der Zeit vom 21.07.2005 bis zum 24.02.2006 wurden von 12 Patienten, die an der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. M. Westphal) an einem Glioblastom operiert wurden, Blutproben entnommen. Das positive Votum der Ethikkommission sowie das schriftliche Einverständnis der Patienten lagen der Klinik für Neurochirurgie vor. Das mediane Alter zum Zeitpunkt der Operation betrug 65,5 Jahre. Es wurden perioperativ 10 ml Blut durch venöse Punktion gewonnen. Die sterilen Monovetten enthielten EDTA zur Antikoagulation. Die Blutproben wurden der sofortigen Aufarbeitung mit Ficoll-Paque Plus gemäß Abschnitt 2.2.5.3 zugeführt. Von den hierbei gewonnenen Zellsuspensionen wurde zunächst die Gesamtzellzahl bestimmt und anschließend wurden Zytospins à 700.000 Zellen hergestellt. Hierzu wurden die Zellen für 3 min bei 1200 U/min auf Superfrost (Menzel) und auf silanisierte (Dako) Objektträger zentrifugiert. Danach wurden die Zytospins über Nacht bei Raumluft getrocknet, in Laboraluminiumfolie verpackt und bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C gelagert.

Patientenkollektiv							
Fall Nr.	Alter in J. (Geschlecht)	GFAP- ICH	Ki-67- IHC	p53- ICH	EGFR- PCR	Diagnose	Resektatgröße
1	47 (w)	+	25%	15%	+	Glioblastom	Pflaumengroß
2	49 (m)	+	35%	57%	-	Glioblastom 1. Rezidiv	Walnussgroß
3	67 (w)	+	-	-	+	Glioblastom	Mandarinengroß
4	70 (m)	+	Hoch	90%	-	Riesenzellglioblastom	Erbsgroß
5	64 (m)	+	30%	50%	-	Glioblastom	Haselnußgroß
6	75 (w)	+	10%	5%	-	Glioblastom	Walnussgroß
7	49 (w)	+	14%	-	-	Glioblastom 1. Rezidiv	Haselnussgroß
8	58 (m)	+	30%	60%	-	Glioblastom 4. Rezidiv	Multifokal
9	81 (m)	+	-	-	-	Anapl. Oligoastrozytom	6x6x1,5 cm
10	62 (w)	+	10%	20%	-	Glioblastom	2,5x1,5x0,5 cm
11	69 (m)	+	10%	-	-	Glioblastom	k.A.
12	67 (m)	+	25%	35%	-	Glioblastom	1,9x1x1,2 cm

**Tabelle 5: Patientenkollektiv inklusive histopathologischer Begutachtung**

In Tabelle 5 wird das Patientenkollektiv inklusive der histopathologischen Begutachtung der Resektate durch das Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg (Direktor: Univ. Prof. Dr. M. Glatzel) vorgestellt. Eine der klinisch als Glioblastom diagnostizierten Läsionen stellte sich hier als Anaplastisches Oligoastrozytom (WHO-Grad III) heraus. Die Tabelle enthält ebenfalls die Ergebnisse einer Polymerase-Ketten-Reaktions-Untersuchung (PCR) der Resektate auf Vorliegen einer EGFR-Amplifikation durch die Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf.

### 2.1.2. Zelllinien und Materialien für deren Kultivierung

Alle verwendeten Zelllinien konnten freundlicherweise von der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Westphal) bezogen werden. Die Glioblastomzelllinien G22, G44, G112, G140, G169 wurden dort etabliert.

#### Weitere Zelllinien:

U373	Glioblastom	ATCC HTB-17
A431	Epidermoidkarzinom	ATCC CRL-1555
HBL100	Mammakarzinom	ATCC HTB-124

<u>Materialien für die Zellkultur</u>	<u>Hersteller/Bezugsquelle:</u>
Zellkulturmedium D-MEM 21969-035	Gibco, Grand Island, NY, USA
L-Glutamin	Gibco
Fetales Kälberserum FCS	Gibco
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco
Dulbeccos ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> und NaH <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Gibco
Trypsin Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BD Falcon™ T25 bzw. T75 Kulturflasche	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

CellTracker™

Molecular Probes, Eugene,  
OR, USA

### 2.1.3. Dichtegradientenzentrifugation

#### Materialien für alle Dichtegradienten

#### Hersteller/Bezugsquelle:

Trypan Blue Solution (0,4%)

Sigma

Neubauer Zählkammer

Marienfeld, Lauda-

Königshofen, Deutschland

Erythrolyse Puffer

R&D Systems, Wiesbaden-

Nordenstadt, Deutschland

Objektträger Super Frost

Menzel Gläser,

Braunschweig, Deutschland

Objektträger Silanized Slides

Dako, Glostrup, Dänemark

#### Materialien für Ficoll-Gradient

#### Hersteller/Bezugsquelle:

Falcon Röhren 50 ml

BD Biosciences

Hank's Solution ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Phenolrot

Biochrom, Berlin,

Deutschland

PBS Dulbeccos ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Gibco

Ficoll-Paque Plus™

Amersham Pharmacia

Biotech, Upsala, Schweden

#### Materialien für Boyant Gradienten

#### Hersteller/Bezugsquelle:

Falcon Röhren 15 ml

BD Biosciences

Fetales Kälberserum FCS

Gibco

PBS Dulbeccos ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Gibco

PolymorphPrep™

BRL, Eggenstein,

Deutschland

Nycoprep™

BRL

#### Materialien für OncoQuick

#### Hersteller/Bezugsquelle:

OncoQuick Röhren

Greiner Bio-One,

Falcon Röhrchen 50 ml  
OncoQuick Puffer

Frickenhausen, Deutschland  
BD Biosciences  
Greiner Bio-One

#### 2.1.4. MACS® Zellseparation

##### Materialien für die MACS® Zellseparation

##### Hersteller/Bezugsquelle:

MACS® LC-Säule

Miltenyi Biotech GmbH,  
Bergisch Gladbach,  
Deutschland

Auto MACS® Running Buffer

Miltenyi

MiniMACS® Separator (Magnet)

Miltenyi

Microbeads Goat-anti-Rabbit

Miltenyi

Microbeads Rat-anti-Mouse

Miltenyi

PBS Dulbeccos ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{NaH}_2\text{CO}_3$

Gibco

Falcon Röhrchen 15 ml

BD Biosciences

#### 2.1.5. Immunfluoreszenz und Immunzytochemie

##### Materialien Immunfluoreszenz/Immunzytochemie

##### Hersteller/Bezugsquelle:

Epimet Solution B (Formaldehyd 37%)

Micromet, München,  
Deutschland

Dako Pen

Dako

PBS Dulbeccos ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{NaH}_2\text{CO}_3$

Gibco

Dako Protein Blocking (X0909)

Dako

Dako Verdünnungsmedium (S2022)

Dako

Tris (Trizma base)

Sigma

NaCl

J. T. Baker, Deventer,  
Niederlande

Tween 20

Promega, Modison, WI,  
USA

Tris buffered Saline with Tween (TBST) Puffer 1x

Materialien zusätzlich für Immunfluoreszenz Hersteller/Bezugsquelle:

Dako Verdünnungsmedium (S3022)	Dako
Vectashield DAPI Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Materialien zusätzlich für Immunzytochemie Hersteller/Bezugsquelle:

Envision™ (K4017)	Dako
Tris Puffer	Gibco
Levamisol	Sigma
NaNO <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neufuchsin	Merck
Naphtol-AS-Biphosphat	Sigma
N,N-Dimethylformamid	Merck
HCL 5M	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Meyers-Hämalaun	Merck
HOAC 0,1%	Merck
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
Glyzergel Mounting Medium	Dako
BCIP/NBT AP Conjugate Substrate Kit (Nr. 170-6432)	BioRad, Hercules, CA, USA
Epimet Epithelial Cell Detection Kit (FAR 9863)	Micromet
Sterile Syringe Filter 0,2 µm PES	VWR, Batavia, IL, USA
PBS Puffer 1x	

Neufuchsin Substratlösung:

- A 78,8 ml entionisiertes H<sub>2</sub>O mit  
4,2 ml 1 M Tris Puffer und  
200 µl 0,625 M Levamisol vermischen
- B 415 µl NaNO<sub>2</sub>  
166 µl Neufuchsin dazugeben und 3 Minuten inkubieren

C 42 mg Naphtol-AS-Biphosphat in  
500 µl Dimethylformamid auflösen  
Zuerst Lösung B danach Lösung C zu Lösung A mischen und dann mit  
Vorsatzfilter filtrieren.

BCIP/NBT Substratlösung:

2.328 µl Aqua dest. mit  
97 µl alkalische Phosphatase (AP)- Puffer (25x)  
(BioRad, BCIP/NBT AP Conjugate Substrate Kit) und  
25 µl Solution A (BioRad, BCIP/NBT AP Conjugate Substrate Kit) und  
25 µl Solution B (BioRad, BCIP/NBT AP Conjugate Substrate Kit) und  
25 µl Solution H (Epimet Epithelial Cell Detection Kit) versetzen  
Kurz vor Gebrauch ansetzen und mit Vorsatzfilter filtrieren.

PBS Puffer 10x (pH 7,4):

90 g NaCl mit 14,33 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  und  
2,67 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen. Auf pH 7,4 titrieren.  
Für 1x PBS im Verhältnis 1:9 mit Aqua dest. verdünnen.

TBST Puffer 10x (pH 7,6):

181,65 g Tris (Trizma base, Sigma) mit  
262,98 g NaCl auf 2500 ml mit entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen  
15 ml Tween-20 hinzugeben und mit  
ca. 170 ml 25% HCl den auf pH 7,6 titrieren.  
Danach auf 3000 ml mit entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen.  
Für 1x TBST im Verhältnis 1:9 mit entionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnen.

Verwendete Antikörper:

<b>Primärantikörper</b>					
<b>Name (Klon)</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Antigen</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Firma</b>
GFAP (Kat. Nr. Z334)	-	Kaninchen	GFAP	Polyklonal	Dako
EGFR (E20)	-	Maus	EGFR	IgG1κ	Dako
CD147 (HIM6)	-	Maus	EMMPRIN	IgG1κ	BD Biosciences
p53 (DO-1)	-	Maus	p53	IgG2ακ	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ki-67 (MIB-1)	-	Maus	Ki-67	IgG1κ	Dako
GFAP (Kat. Nr. 131-15019)	Alexa Fluor™ 488	Maus	GFAP	IgG1κ	Molecular Probes
A45-B/B3-Cy3	Cyanin 3	Maus	Panzytokeratin	IgG1κ	Micromet
<b>Isotypkontrolle</b>					
MOPC-21	-	Maus	Unbekannt	IgG1κ	Sigma
Mouse IgG2a	-	Maus	Aspergillus Niger Glucose Oxidase	IgG2ακ	Dako
<b>Sekundärantikörper</b>					
Alexa Fluor™ 488	Alexa Fluor™ 488	Ziege	Maus IgG	Fab- Fragment	Molecular Probes
Alexa Fluor™ 546	Alexa Fluor™ 546	Ziege	Maus IgG	Fab- Fragment	Molecular Probes

<b>Gebrauchsverdünnung der Antikörper</b>			
<b>Name (Klon)</b>	<b>Immunfluoreszenz</b>	<b>Immunzytochemie</b>	<b>Immunhistochemie</b>
GFAP (Kat. Nr. Z334)	1 : 100	1 : 500	
EGFR (E20)	1 : 50		1 : 100
CD147 (HIM6)	1 : 300	1 : 10.000	1 : 2.000
p53 (DO-1)	1 : 100		
Ki-67 (MIB-1)	1 : 50		
GFAP (Kat. Nr. 131-15019)	1 : 500		
A45-B/B3-Cy3	1 : 300		
Alexa Fluor™ 488 Alexa Fluor™ 546	1 : 200		

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper**

### 2.1.6. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Filtertest

<u>Materialien für die FISH</u>	<u>Hersteller/Bezugsquelle:</u>
Humane Cot-1 DNA	Roche, Penzberg, Deutschland
Humane Plazentare (HPL) DNA	Sigma
Dextranblau	Fluka, Deisenhofen, Deutschland
Natriumacetat	Merck
Proteinase K	Roche
Ethanol	J. T. Baker
Fixogum Rubber Cement	Marabuwerke, Tamm, Deutschland
Formamid	Fluka
Tween-20	Promega
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Vectashield DAPI Mounting Medium	Vector Laboratories
Xylol	Fluka
Natriumbisulfit	Sigma
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck
Hybond™ Nitrozellulosemembran	Amersham Bioscinces, Little Chalfon, Großbritannien
Tris·Cl	Sigma
Calcium Chlorid	Merck
Magnesium Chlorid	Sigma
Triton X-100	Sigma
NBT/BCIP Stock Solution	Roche

#### 20x SSC Puffer (pH 7,0):

175,3 g NaCl und

88,2 g Na<sub>3</sub>-Citrat-2H<sub>2</sub>O auf 1000 ml mit entionisiertem H<sub>2</sub>O.

Auf pH 7 titrieren und autoklavieren. Bei Raumtemperatur lagern.

4x SSC/Tween Puffer (pH 7,0):

120 ml 20x SSC Puffer auf 600 ml mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen.  
0,6 ml Tween-20 dazugeben

2x SSC Puffer (pH 7,0):

20 ml 20x SSC Puffer auf 200 ml mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen.

50% Vol. Formamid/2x SSC Puffer (pH 7,2):

40 ml 20x SSC Puffer und  
200 ml Formamid auf 400 ml mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen.  
Auf pH 7,2 titrieren.

0,1x SSC Puffer (pH 7,0):

1,5 ml 20x SSC Puffer auf 300 ml mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen.

3% BSA Blockinglösung:

150 mg BSA in  
5 ml 4x SSC/Tween Puffer lösen.  
Aliquotieren und bei -20°C lagern.

1% BSA Verdünnungspuffer:

3% BSA Blockinglösung im Verhältnis 1:3 mit  
4x SSC/Tween Puffer verdünnen.

Denaturierungslösung (pH 7,4):

35 ml Formamid und  
1,5 ml 20x SSC Puffer auf 50 ml mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen.  
Auf pH 7,4 titrieren. Aliquotieren und bei -20°C lagern.

Mastermix zur Hybridisierung:

2 g Dextransulfat und  
10 ml deionisiertes Formamid und

2 ml 20x SSC Puffer auf 20 ml mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen.  
Bei 70 °C lösen und auf pH 7,0 einstellen.  
Aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Proteinase K Stocklösung (1 mg/ml):

10 mg Proteinase K in 10 ml entionisiertem H<sub>2</sub>O lösen.  
Aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Proteinase K Gebrauchslösung für FISH an Zellpräparationen (0,1 µg/ml):

1 ml 1 M Tris·Cl und  
100 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O auf 50 ml mit entionisiertem H<sub>2</sub>O auffüllen.  
Auf pH 7,5 titrieren und auf 37 °C vorwärmen.  
5 µl Proteinase K Stocklösung (1 mg/ml) kurz vor Gebrauch dazugeben.

Proteinase K Gebrauchslösung für FISH an Gewebeschnitten (0,25 mg/ml):

Proteinase K Stocklösung (1 mg/ml) kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:4 mit vorgewärmten 2x SSC Puffer verdünnen.

30% Natriumbisulfit Pretreatment Lösung für FISH an Gewebeschnitten:

0,6 g Natriumbisulfit in  
2 ml 2x SSC Puffer bei 45 °C lösen.

Puffer AP1 für Filtertest (pH 7,5):

0,1 M Tris·Cl  
0,1 M NaCl  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 ml/l Triton X-100

Puffer AP2 für Filtertest (pH 7,5):

30 mg/ml BSA in Puffer AP1 geben.

Puffer AP3 für Filtertest (pH 9,5):

0,1 M Tris·Cl

0,1 M NaCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>

NBT/BCIP Färbelösung für Filtertest:

200 µl NBT/BCIP Stock Solution in 10 ml Puffer AP3 verdünnen.

Verwendete Sekundärantikörper:

Name	Bestell- nr.	Herkunft	Antigen	Isotyp	Gebrauchs- verdünnung	Firma
Anti-Digoxigenin- Fluorescein	11 207 741 910	Ziege	Digoxigenin	Fab- Fragment	1:200	Roche
Anti-Digoxigenin- Rhodamine	11 207 750 910	Ziege	Digoxigenin	Fab- Fragment	1:200	Roche
Anti-Digoxigenin- alkalische- Phosphatase	1 093 274	Ziege	Digoxigenin	Fab- Fragment	1:5.000	Roche

**Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper FISH/CISH**

**2.1.7. Diaminobenzidin (DAB) Immunhistochemie**

Materialien für DAB Immunhistochemie

Hersteller/Bezugsquelle:

Target Retrieval Solution

Dako

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Blocking Solution (S2023)

Dako

Envision™ (K5007A)

Dako

Lösung C (K5507C)

Dako

Lösung B (K5007B)

Dako

Proteinase K (S3200)

Dako

Eukitt

O. Kindler GmbH, Freiburg

Alle weiteren für die DAB-Immunhistochemie verwendeten Materialien und Antikörper wurden bereits im Abschnitt 2.1.5 aufgeführt.

### 2.1.8. Geräte

#### Zentrifugen

Heraeus Multifuge® 3 S-R

Heraeus Biofuge Pico

Rotofix 32

#### Hersteller/Bezugsquelle:

Kendro Laboratory Products,  
Langensfeld, Deutschland

Kendro Laboratory Products  
Hettich Zentrifugen,  
Tuttlingen, Deutschland

#### Mikroskope

Axiostar plus

Axioplan 2 Imaging

Axiovert 200

#### Hersteller/Bezugsquelle:

Carl Zeiss, Göttingen,  
Deutschland

Carl Zeiss

Carl Zeiss

#### Weitere Geräte

PTC-200 Peltier Thermal Cycler

TDO 60 Tissue Drying Oven

Thermomixer compact

GFL Wasserbäder

Vortex Genie 2

Automated Cellular Imaging System ACIS

TransferMan NK2

Custom Tip Type III (40 µm)

#### Hersteller/Bezugsquelle:

MJ Research, Watertown,  
MA, USA

Medite, Burgdorf,  
Deutschland

Eppendorf, Hamburg,  
Deutschland

Gesellschaft für  
Labortechnik,  
Burgwedel, Deutschland

Scientific Industries,  
Bohemia, NY, USA

ChromaVision Medical  
System, San Juan  
Capistrano, CA, USA

Eppendorf

Eppendorf

## **2.2. METHODEN**

### **2.2.1. Etablierung von Nachweismethoden für CTC glialen Ursprungs**

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren noch keine geeigneten Nachweismethoden für CTC glialen Ursprungs bekannt. Daher waren Vorversuche zur Simulation des Vorhandenseins solcher Zellen sowie deren Detektion in einem Verfahren mit reproduzierbaren Ergebnissen notwendig.

Hierzu mussten zunächst Zelllinien ausgewählt werden, die in ihrem Expressionsmuster mit möglichen CTC vergleichbar sind. Es wurden mehrere Glioblastom-Zelllinien sowie die Epidermoidkarzinom-Zelllinie A431 von der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. M. Westphal) bezogen und in Kultur genommen. Aufgrund der Ergebnisse von Immunfluoreszenzfärbungen wurden dann die Glioblastom-Zelllinie U373 und die Epidermoidkarzinom-Zelllinie A431 für die meisten weiteren Versuche ausgewählt. Unter den verwendeten Zelllinien wies die Zelllinie U373 als einzige und zu einem sehr hohen Anteil eine gleichzeitige Expression der Antigene GFAP, EMMPRIN und p53 auf. Daher war sie geeignet, bei in-vitro-Versuchen als positive Kontrolle für CTC zu fungieren. Eine vermehrte Expression des EGF-Rezeptors ließ sich bei gleichzeitiger Expression von GFAP bei keiner der Glioblastom-Zelllinien nachweisen, da eine Überexpression bzw. Amplifikation bei den meisten Glioblastom-Zelllinien nicht nachzuweisen ist. Die Zelllinie A431 wurde daher als Positiv-Kontrolle für eine Überexpression des EGF-Rezeptors und Amplifikation des EGFR-Gens verwendet.

Anschließend wurden Versuche durchgeführt, bei denen U373-Zellen in Vollblutproben gesunder Probanden verdünnt wurden. Bei diesen sogenannten „Spiking Versuchen“ sollte erprobt werden, ob sich Gliomzellen aus dem Blut mit verschiedenen Zellseparationsgradienten anreichern lassen. Zur Anwendung kamen die Aufarbeitungen mittels Ficoll-Paque Plus-, OncoQuick- und Bouyant-Dichtegradienten. Hierbei sollten Wiederfindungsraten für den jeweiligen Gradienten ermittelt werden. Dazu war es erforderlich weitere Methoden zu etablieren, mit denen die eingebrachten U373-Zellen nach Anreicherung durch die Gradienten von den normalen MNC des Blutes unterschieden werden konnten.

Da GFAP derzeit der spezifischste Marker für Zellen glialen Ursprungs ist und eine Expression von GFAP in Zellen des peripheren Blutes nicht beschrieben wurde, sollten die Blutproben auf GFAP-positive Zellen untersucht werden. Hierzu wurden Immunzytochemie- und Immunfluoreszenzfärbungen erprobt, mit denen die eingebrachten U373-Zellen selektiv erkannt werden sollten. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-GFAP Antikörper (Dako Z334) verwendet. Für die Immunzytochemie kamen als sekundäres System, d.h. zum Nachweis der gebundenen anti-GFAP Antikörper, ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Ziege anti-Kaninchen/Maus-IgG Antikörper (Envision™, Dako K4017) zum Einsatz. Bei der Immunfluoreszenz Färbung wurden mit Fluorochromen konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Alexa Fluor™ 488, Alexa Fluor™ 546) als Sekundärantikörper verwendet.

Nachfolgend wurde ein weiterer Primärantikörper getestet, um nach den GFAP-positiven U373-Zellen im Blut zu suchen. Dieser ist ein monoklonaler Maus anti-GFAP Antikörper (Molecular Probes, Kat. Nr. 131-15019), welcher direkt mit einem Fluorochrom (Alexa Fluor™ 488) konjugiert ist. Durch den Einsatz eines direkt konjugierten Primärantikörpers sollte versucht werden, die Spezifität der Färbung für GFAP zu erhöhen, da Reaktionen der sekundären Antikörper mit MNC des Blutes beobachtet wurden.

Eine weitere Möglichkeit, die U373-Zellen von den MNC des Blutes zu unterscheiden, besteht darin, einen fluoreszierenden Farbstoff in diese Zellen einzuschleusen. Dazu wurden die U373-Zellen kurz vor dem Einbringen in das Probandenblut mit dem Fluoreszenz Farbstoff CellTracker™ inkubiert. Es wurde vermutet, dass sich mit diesem Nachweisverfahren die höchsten Wiederfindungsraten erzielen lassen, da die Markierung mittels CellTracker™ unabhängig vom Expressionsgrad der Zelllinie für GFAP ist und hierbei auch keine Färbung mit eventuellen Verlusten von U373-Zellen während der Waschschrte notwendig ist. Dieses Verfahren kann nicht für die Untersuchung von Patienten-Blutproben verwendet werden und hatte daher nur Bedeutung für die Bestimmung von Wiederfindungsraten in den Vorversuchen.

Da wie schon eingangs erwähnt mit unspezifischen Reaktionen zwischen den MNC des Blutes und den verwendeten Antikörpern gerechnet werden musste, wurden Doppelnachweismethoden etabliert. Dabei wurde zuerst die Expression von GFAP mit einer Fluoreszenzfärbung nachgewiesen. Danach wurde ein weiteres der Antigene Ki-67, p53, EMMPRIN und EGF-Rezeptor mit einem Fluorochrom eines anderen Spektrums in den U373-Zellen markiert. Durch den Nachweis zweier in Glioblastomen vorkommender Antigene in einer Zelle sollten U373-Zellen bzw. CTC von unspezifisch gefärbten Blutzellen unterschieden werden. Alternativ wurde nach erfolgter Fluoreszenzmarkierung einer Zelle mit anti-GFAP Antikörpern versucht, einen Nachweis für die Amplifikation des EGFR-Gens in der gleichen Zelle mittels FISH zu erzielen. Hierzu wurde die Zelllinie A431 verwendet, da keine der verwendeten Glioblastom-Zelllinien eine Amplifikation des EGFR-Gens aufwies bzw. keine solche Zelllinie verfügbar ist. Es wird vermutet, dass die meisten Glioblastom-Zelllinien eine Amplifikation des EGFR-Gens nach Wegfall des Selektionsdruckes im Tumorzellverband verlieren (Bigner et al. 1990).

### 2.2.2. Kultivierung der Tumorzelllinien

Die von der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf etablierten Glioblastom-Zelllinien G22, G44, G112, G140 und G169 sowie die Glioblastom-Zelllinie U373 und die Epidermoidkarzinom-Zelllinie A431 wurden bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte unter streng sterilen Maßnahmen. Alle Tumorzelllinien wurden mit D-MEM 21969-035 Medium, das zusätzlich mit 10% v/v fetalem Kälberserum (FCS) und 4mol/l (entspricht 584 mg/l) L-Glutamin versetzt wurde, kultiviert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen nach zwei bis fünf Tagen gesplittet und in neue Kulturflaschen überführt. Hierzu wurden nach dem Abpipettieren des alten Mediums abgestorbene und gelöste Zellen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit 2 ml 1xTrypsin-EDTA je T75 Kulturflasche vom Flaschenboden gelöst. Die Proteolyse wurde nach 2 Minuten durch Zugabe eines Überschusses von 15 ml des Kulturmediums abgestoppt. Diese Zellsuspension wurde bei 12.000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

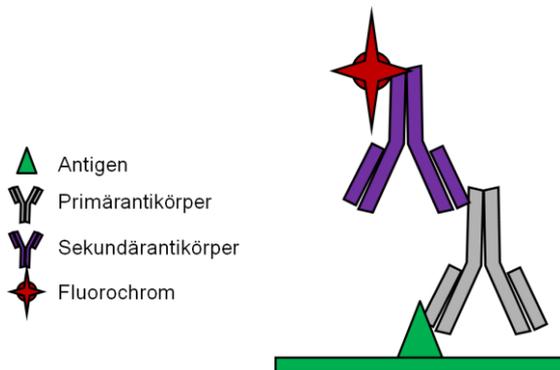
Zur Herstellung von Zytospins wurden die Zellen ebenfalls mit 1xTrypsin-EDTA vom Kulturflaschenboden gelöst und abzentrifugiert, dann in PBS Puffer resuspendiert und bei 1200 U/min für 3 Minuten auf Superfrost Objektträger (OT) (Menzel) zentrifugiert. Diese Zytospins wurden in Laboraluminiumfolie verpackt und bei -80 °C gelagert.

Zusätzlich wurden Aliquote aller Zellen zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff hergestellt. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben gelöst und abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei Konfluenz je T75 Kulturflasche in 4 Aliquote à 1ml überführt. Dazu wurden die sedimentierten Zellen in 3.600 µl Kulturmedium zuzüglich 400 µl DMSO resuspendiert. Bevor die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten, wurden sie für mindestens einen Tag bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.2.3. Untersuchung der Zelllinien auf deren Expression von GFAP, p53, Ki67, EMMPRIN und EGF-Rezeptor.**

Es wurde nach einer Zelllinie gesucht, die eine hohe Expression aller zu untersuchender Antigene aufwies. Zur Evaluierung der Expression der Antigene wurden an Zytospins aller Zelllinien Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierbei wurden in Kaninchen und Mäusen hergestellte primäre Antikörper eingesetzt. Für die Doppelfärbungen sollten nacheinander zwei primäre Antikörper eingesetzt werden, die nicht in der gleichen Spezies erzeugt wurden. Dies geschah, um ein Binden des zweiten Sekundärantikörpers an den ersten Primärantikörper zu verhindern. Da eine Doppelfärbung für GFAP und zusätzlich ein weiteres Antigen angestrebt wurde, wurde für GFAP ein Kaninchen-Antikörper (Dako Z334) ausgewählt. Für die nachfolgende Färbung des zweiten Antigens (P53, EMMPRIN, Ki-67 oder EGF-Rezeptor) dagegen Maus-Antikörper. Jeweils nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Zytospins mit Alexa Fluor™ 488- bzw. Alexa Fluor™ 546-konjugierten Sekundärantikörpern aus der Ziege inkubiert. Diese sind gegen Immunglobuline der Tierspezies gerichtet, in welcher die primären Antikörper hergestellt wurden (Ziege anti-Kaninchen-IgG Antikörper und Ziege anti-Maus-IgG Antikörper). Um hierbei Kreuzreaktionen der beiden sekundären Antikörper untereinander zu vermeiden, war es

unbedingt notwendig, dass beide sekundären Antikörper in derselben Spezies hergestellt worden waren (hier Ziege).



**Abbildung 3: Schemazeichnung Immunfluoreszenz**

Protokoll Immunfluoreszenz an Zellpräparationen von Zelllinien	
1.	Objektträger 30 min bei Raumtemperatur (RT) auftauen lassen; danach Aluminiumfolie entfernen
2.	Zytospin mit Dako Pen umkreisen
3.	Fixierung: 1 ml Epimet „Solution B“ 1 min bei 13.000 g zentrifugieren; 135 µl aus dem Überstand in 10 ml PBS (Gibco) verdünnen; Hiervon 200-300 µl je OT für 15 min in feuchter Kammer
4.	2 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen
5.	20 min Dako Protein Blocking
6.	Protein Blocking abkippen
7.	30 min mit mind. 120 µl Primärantikörper inkubieren (in Dako Verdünnungsmedium (S2022))
8.	3 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen
9.	Ab jetzt im Dunklen arbeiten. 45 min mit mind. 120 µl Sekundärantikörper inkubieren (in Dako Verdünnungsmedium (S3022))
	Für einfache Färbung mit Schritt 15 fortfahren
10	3 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen
11.	20 min Dako Protein Blocking; danach nur abkippen
12.	30 min mit mind. 120 µl des zweiten Primärantikörpers inkubieren (in Dako Verdünnungsmedium (S2022))

13.	3 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen
14.	45 min mit mind. 120 µl des zweiten Sekundärantikörpers inkubieren (in Dako Verdünnungsmedium (S3022))
15.	3 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen; danach 3 min in Aqua dest
16.	Eindeckeln mit Vectashield DAPI „mounting medium“

**Protokoll 1: Immunfluoreszenz an Zellpräparationen**

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop, und es wurden Photographien aller Färbungen angefertigt.

**2.2.4. EGF-Rezeptor-FISH an Zellpräparationen**

Ungefähr 40% der Glioblastome weisen eine Amplifikation des EGFR-Gens auf (Ohgaki et al. 2004). Um CTC auf das Vorliegen einer solchen Amplifikation untersuchen zu können, wurde eine FISH an Zellpräparationen erprobt. Ein vermutlicher Selektionsvorteil, den die Glioblastomzellen durch die Überexpression des EGF-Rezeptors in vivo genießen, geht bei der Kultivierung in-vitro jedoch verloren (Bigner et al. 1990). Glioblastom-Zelllinien mit persistierender EGFR-Gen-Amplifikation sind daher sehr selten. Alternativ wurde die Epidermoidkarzinom-Zelllinie A431 als positive Kontrolle verwendet, als negative Kontrolle ohne EGFR-Gen-Amplifikation die Mammakarzinom Zelllinie HBL 100. Ziel war es, eine EGFR-Gen-Amplifikation an zirkulierenden GFAP-positiven Zellen nachweisen zu können.

Die für die FISH verwendete EGFR-Sonde wurde am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster hergestellt. Hier wurden Klone des PAC RP5-1091E12 (P1 derived Artificial Chromosome) (NCBI Acc. No. AC006977) verwendet. Dies ist ein Vektor, der sich zur Klonierung großer DNA-Moleküle eignet und sich von dem Bakteriophagen P1 ableitet. Dieser PAC RP5-1091E12 beinhaltet neben dem Promoter die Introns und Exone 1 bis 20, also große Teile des EGFR-Gens. Die mit dem PAC klonierten DNA-Fragmente wurden per Nick-Translation mit Digoxigenin-11-dUTP-markierten Nukleotiden versehen (Hamsen, 2003). Das so in die Sonde eingebrachte Digoxigenin liefert das Antigen für den Sekundärantikörper. Nachdem während der FISH eine Hybridisierung zwischen DNA-

Sonde und EGFR-Gen erfolgt ist, können mit sekundären Ziege-anti-Digoxigenin-Antikörpern (Roche) die hybridisierte Sonde und damit Kopien des EGFR-Gens sichtbar gemacht werden. Zu diesem Zweck wurden mit Rhodamin- (Roche, 11 207 750 910) und mit Fluorescein- (Roche, 11 207 741 910) konjugierte Antikörper verwendet.

Ein für die Markierung ausreichender Gehalt der Sonde an Digoxigenin wurde mittels eines Filtertestes (Dot-Blots) nachgewiesen. Dazu wurden Verdünnungsschritte der Sonde sowie einer Positivkontrolle mit ausreichender Markierung auf einer Nitrozellulosemembran fixiert. Die Membran wurde anschließend mit einem anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase-Konjugat (Roche, 1 093 274) inkubiert. Mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat/ Nitroblau Tetrazolium Chlorid (NBT/BCIP)-Färbelösung (Roche, 1 681 451)) konnte dann die an die Membran gebundene Sonde sichtbar gemacht werden.

Protokoll Filtertest	
1.	Je 1 µl der 1:10; 1:100; 1:1.000 und 1:10.000 verdünnten Sonde und Positivkontrolle auf Nitrozellulosemembran auftragen
2.	2 min bei 600 W in der Mikrowelle fixieren
3.	Kurz mit AP1 Puffer equilibrieren danach 10 min mit AP2 Puffer inkubieren
4.	10 min mit Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugat inkubieren
5.	2 mal 3 min mit AP1 Puffer waschen
6.	3 mal 3 min mit AP3 Puffer waschen
7.	Visualisierung mit NBT/BCIP Färbelösung über Nacht

#### Protokoll 2: Filtertest

Quelle: Modifiziert nach Hamsen 2003

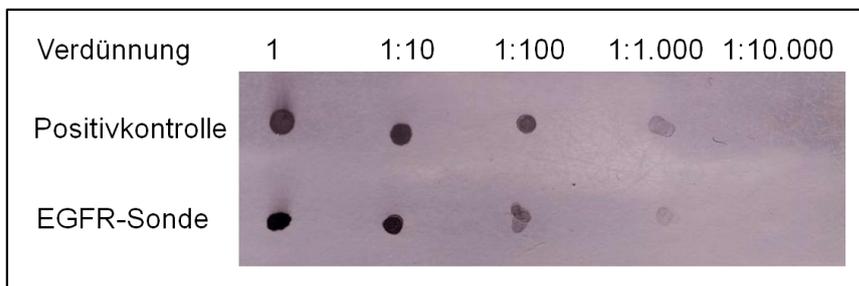


Abbildung 4: Filtertest

Für die FISH wurden pro Objektträger 10 µl Probenansatz der EGFR-DNA-Sonde eingesetzt. Dieser wurde unmittelbar vor der Hybridisierung wie folgt hergestellt.

Protokoll Probenansatz pro Objektträger:	
Sonde DIG	2 µl
Humane Cot-1-DNA	50 µl
HPL-DNA	1 µl
Dextranblau	1 µl
Natriumazetat 1M	7,7 µl

1.	Zugabe von 100% eiskaltem Ethanol (das 2,5 fache Volumen des Probenansatzes)
2.	Für 1 Std. bei -80 °C fällen
3.	30 min bei 12.200 g zentrifugieren
4.	Überstand abpipettieren und für 3 min bei 37 °C trocknen
5.	In 10 µl Mastermix pro Objektträger, bei 37 °C lösen
6.	5 min bei 70 °C denaturieren
7.	20 min bei 43 °C Preanealing
8.	Für mindestens 5 min auf Eis stellen

**Protokoll 3: Probenansatz für FISH**

Quelle: Modifiziert nach Hamsen 2003

Für die Hybridisierung der Sonde mit der Ziel-DNA ist eine Denaturierung der DNA notwendig. Die Schmelztemperatur der Ziel-DNA und der DNA-Sonde wurde hierzu durch den Einsatz Formamid-haltiger Lösungen gesenkt. Der Überschuss an DNA-Sonde wurde nach der Hybridisierung mit 50% Vol. Formamid/2xSSC Puffer entfernt. Die Detektion der Sondenmoleküle erfolgte mit 1 µg/ml Anti-Digoxigenin-Fluorescein (Roche 11 207 741 910).

Protokoll Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Zellpräparationen	
1. Tag	
1.	Objektträger 30 min bei RT auftauen lassen; danach auswickeln

2.	Zytospin mit Dako Pen umkreisen
3.	5 min im Wasserbad bei 73 °C denaturieren
4.	2 min 70% eiskalter Ethanol
5.	Je 2 min 70%, 90%, 100% Ethanol bei RT
6.	5-10 min lufttrocknen
7.	7 min mit Proteinase K-Lösung 0,1 µg/ml in feuchter Kammer im Brutschrank bei 37 °C inkubieren
8.	Je 2 min 70% und 80% eiskalter Ethanol
9.	2 min 100% Ethanol bei RT
10.	5-10 min lufttrocknen
11.	10 min in feuchter Kammer bei 37 °C im Brutschrank vorwärmen
12.	10 µl Probe pro OT aufgeben, luftblasenfrei eindecken und mit Fixogum versiegeln
13.	Über Nacht bei 37 °C hybridisieren

**Protokoll 4: FISH an Zellpräparationen 1. Tag**

Quelle: Modifiziert nach Hamsen 2003

2. Tag	
1.	4 mal 5 min in 50% vol. Formamid/2xSSC Puffer bei 45 °C im Wasserbad
2.	3 mal 5 min in 0,1xSSC Puffer bei 60 °C im Wasserbad
3.	3 min in 4xSSC/Tween Puffer bei 45 °C im Wasserbad
4.	30 min mit 4xSSC/Tween Puffer inkl. 3% BSA in feuchter Kammer bei 37 °C im Brutschrank absättigen
5.	Kurz eintauchen in 4xSSC/Tween Puffer bei 45 °C im Wasserbad
6.	Ab jetzt im Dunklen arbeiten 45 min in feuchter Kammer bei 37 °C im Brutschrank mit Anti-Digoxigenin-Fluorescein inkubieren
7.	3 mal 5 min in 4xSSC/Tween Puffer bei 45 °C im Wasserbad
8.	5 min Aqua dest.
9.	Eindeckeln mit Vectashield DAPI „mounting medium“

**Protokoll 5: FISH an Zellpräparationen und Parafinschnitten 2. Tag**

Quelle: Modifiziert nach Hamsen 2003

Um nun die Expression von GFAP oder anderen Proteinen sowie die EGF-Rezeptor-Amplifikation gleichzeitig in der gleichen Zelle sichtbar zu machen, wurde der FISH eine Immunfluoreszenzfärbung vorgeschaltet. Die Zytospins wurden gemäß dem Protokoll 1: Immunfluoreszenz an Zellpräparationen gefärbt, jedoch ohne dass eine Gegenfärbung des Kernes mit 4,6-Diaminidino-2-Phenylindol (DAPI) erfolgte. Zur Stabilisierung wurden diese Zytospins erneut für 15 min mit Epimet „Solution B“ fixiert. Während der gesamten Durchführung der FISH mussten die Objektträger nun sorgfältig vor direkter Lichteinstrahlung geschützt werden.

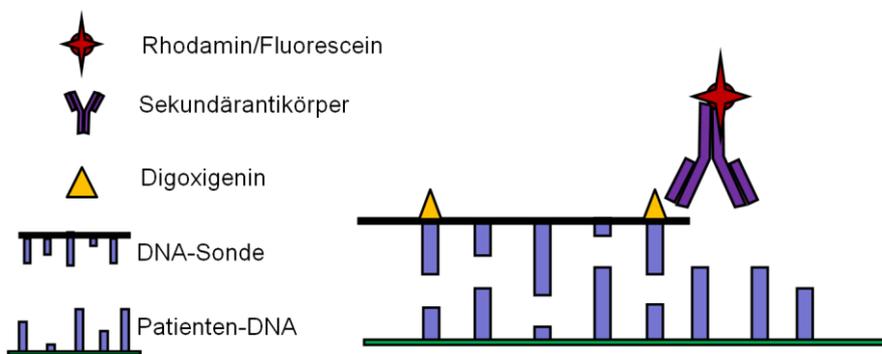


Abbildung 5: Schemazeichnung FISH

### 2.2.5. In-vitro-Versuche zur Bestimmung von Wiederfindungsraten („Spiking“-Versuche)

Um die Tumorzellen aus Vollblut anreichern zu können, müssen die mononukleären Zellen von den restlichen Bestandteilen des Blutes weitgehend getrennt werden. Hierfür stehen unterschiedliche Gradienten zur Verfügung, die mittels Zentrifugation die MNC aufgrund ihrer Dichte abtrennen. Da noch nicht bekannt war, mit welchem Verfahren sich etwaige zirkulierende Glioblastom-Tumorzellen zuverlässig anreichern lassen, wurden Vergleichsversuche mit den Dichtegradienten OncoQuick, Boyant-Dichtegradient und Ficoll-Gradienten durchgeführt. Hierzu wurden errechnete Anzahlen von Zellen der Zelllinien U373, G112 und A431 in venösem Vollblut gesunder Probanden verdünnt („Spicken“ bzw. „Spiken“), um das Vorhandensein von CTC zu simulieren. Das Blut wurde mittels venöser Punktion mit sterilen Einmal-Monovetten gewonnen, die EDTA zur Antikoagulation enthielten. Nach der Aufarbeitung über die Gradienten wurden Zytospins der gewonnenen MNC Fraktionen angefertigt und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.5.1. OncoQuick-Zentrifugation

Der OncoQuick-Gradient dient der Anreicherung von CTC aus antikoaguliertem Blut. Es besteht aus einem sterilen, 50 ml fassenden Laborröhrchen. In diesem sind 20 ml eines Trennmediums vorgelegt, welches mit einer porösen Trennscheibe (sog. Fritte) überlagert ist. Diese kann nun mit bis zu 30 ml Blut überschichtet werden und gemäß dem unten angegebenen Protokoll aufgearbeitet werden. Laut Herstellerangaben kann mit diesem Verfahren eine Wiederfindungsrate von ca. 72% erzielt werden. Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten für Glioblastom-Zelllinien mit dem OncoQuick-Verfahren wurden 15.000 Zellen der Zelllinie G112 in 15 ml Vollblut eines gesunden Probanden verdünnt und wie in Protokoll 6 folgt aufgearbeitet.

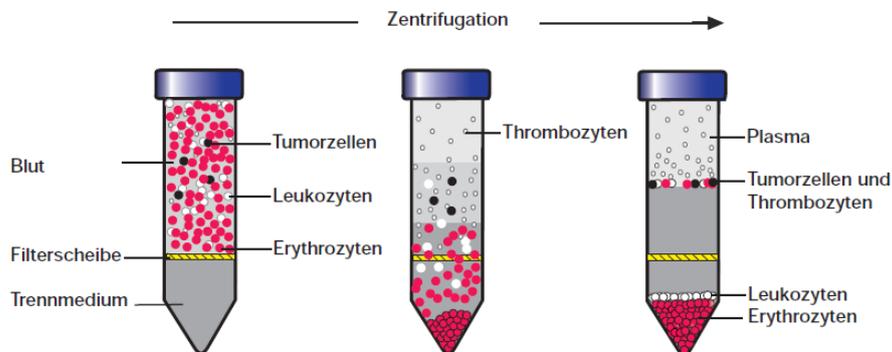
Protokoll Aufarbeitung von Vollblut mit OncoQuick	
1.	Zentrifuge, Blut, OncoQuick-Röhrchen, und OncoQuick-Puffer auf 4 °C kühlen
2.	Blut auf 30 ml mit kalter Hanks-Lösung auffüllen und 10 min mit 400 g bei 4 °C zentrifugieren; bis auf 10 ml abpipettieren und auf 20 ml mit PBS Puffer auffüllen.
3.	Verdünntes Blut in das OncoQuick-Röhrchen geben; 20 min bei 1.600 g und 4°C mit geringer Beschleunigung und ungebremsten Auslauf zentrifugieren.
4.	Überstand in neues Falcon Röhrchen; auf 50 ml mit OncoQuick-Puffer auffüllen
5.	10 min bei 200 g und 4°C pelletieren; Schritt 4 und 5 wiederholen
6.	Überstand bis auf 5 ml abpipettieren und Pellet resuspendieren
7.	10 µl der Suspension mit 10 µl Trypan blue solution in Mikrotiter Platte mischen; 10 µl der Mischung in Neubauer Zählkammer geben und Zellzahl bestimmen

#### Protokoll 6: Aufarbeitung von Vollblut mit OncoQuick

Quelle: Modifiziert nach OncoQuick-Gebrauchsanleitung, Greiner Bio-One GmbH

Die in der Suspension gewonnene Zellzahl wurde durch Auszählen in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Es wurden Zytospins mit je der gleichen Zellzahl hergestellt und bei -80 °C gelagert. Da die Gesamtzellzahl der Suspension bekannt war, konnte die durchschnittlich zu erwartende Anzahl simulierter CTC je Zytospin berechnet werden.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop, indem die Zytospins mäanderförmig durchsucht wurden.



**Abbildung 6: Schemazeichnung OncoQuick**

Quelle: Aus OncoQuick-Gebrauchsanleitung, Greiner Bio-One GmbH

### 2.2.5.2. Boyant-Dichtegradient-Zentrifugation

Es wurden auch mehrere Versuche unternommen, Tumorzellen mithilfe des Boyant-Dichtegradienten aus Vollblut anzureichern. Mit diesem Gradienten wurden bereits in der Vergangenheit epitheliale Zellen aus dem peripheren Blut von Prostatakarzinom-Patienten angereichert. Bei in-vitro-Versuchen mit Karzinom-Zelllinien wurden Wiederfindungsraten von bis zu 90% erreicht. Die Blutbestandteile werden bei diesem zweischichtigen Gradienten ihrem spezifischen Gewicht entsprechend aufgetrennt. Die epithelialen Zellen reichern sich nach der Zentrifugation an der Interphasengrenze zwischen Thrombozyten-haltigen Plasma und der NycoPrep Lösung an und können mit einer Pipette geborgen werden (Brandt & Griwatz 1996). Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden zunächst 15 ml Falcon-Röhrchen für 2 Stunden mit 1% v/v FCS/PBS gesättigt. Anschließend wurden 1.000 Zellen der Zelllinie U373 in 5 ml venös gewonnenem EDTA Vollblut eines gesunden Probanden verdünnt.

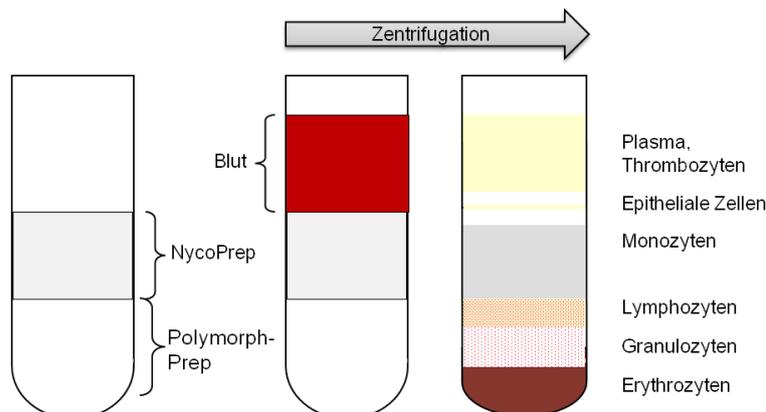
Protokoll Aufarbeitung von Vollblut mit Boyant density gradient	
1.	3 ml PolymorphPrep in abgesättigtes 15 ml Falcon-Röhrchen vorlegen
2.	Vorsichtig mit 3 ml NycoPrep überschichten
3.	Vorsichtig mit 5 ml EDTA Vollblut überschichten
4.	30 min bei 480 g und RT mit geringer Beschleunigung und ungebremsten

	Auslauf zentrifugieren
5.	3 ml Überstand, danach 3 mal je 2 ml abpipettieren, in je ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführen und mit gleichen Volumen PBS auffüllen
6.	Die 4 gewonnenen Fraktionen 15 min bei 300 g und RT pelletieren
7.	Überstand abpipettieren und je nach Pellet Größe mit PBS resuspendieren
8.	10 µl der Suspension mit 10 µl Trypan blue solution in Mikrotiter Platte mischen; 10 µl der Mischung in Neubauer Zählkammer geben und Zellzahl je Fraktion bestimmen

**Protokoll 7: Aufarbeitung von Vollblut mit Boyant density gradient**

Quelle: Modifiziert nach Brandt & Griwatz 1996

Es wurden Zytospins der verschiedenen Fraktionen angefertigt, um durch eine immunzytochemische Färbung Rückschlüsse ziehen zu können, in welcher Fraktion sich die Tumorzellen anreichern lassen.



**Abbildung 7: Schemazeichnung Boyant density gradient**

Quelle: Modifiziert nach Brandt & Griwatz 1996

**2.2.5.3. Ficoll-Gradient**

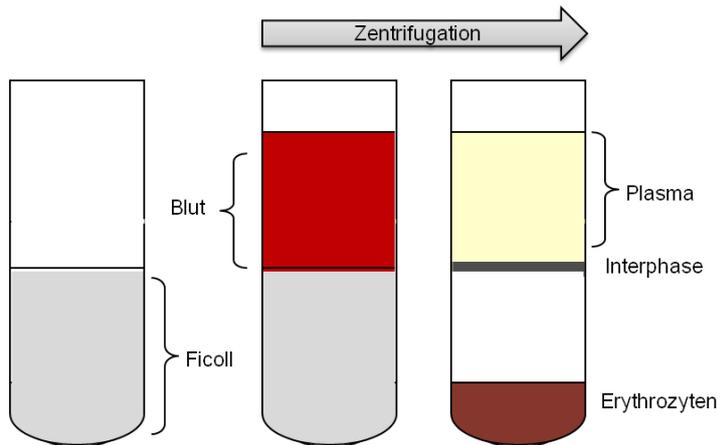
Um die Wiederfindungsrate für die Anreicherung mit Ficoll abzuschätzen, wurden ebenfalls „Spiking-Versuche“ durchgeführt. Dies ist ein in der Literatur vielfach beschriebenes Verfahren zur Anreicherung DTC und CTC aus Blut und Knochenmark. In vergleichenden in-vitro-Versuchen mit Vollblut wurden Wiederfindungsraten von ca. 80% festgestellt (Rosenberg et al. 2002). Bei diesem einschichtigen Gradienten bildet sich an dem Trennmedium (Ficoll-Paque Plus, Amersham) eine Interphase aus MNC,

die mit einer Pipette geborgen werden. Wieder diente die Zelllinie U373 dazu, zirkulierende Glioblastom-Tumorzellen zu simulieren. 15 ml EDTA Vollblut wurden mit 5.000 Zellen dieser Zelllinie versetzt und anschließend aufgearbeitet.

Protokoll Aufarbeitung von Vollblut mit Ficoll	
1.	Blut in 50 ml Falcon Röhrchen geben und auf 30 ml mit kalter Hanks-Lösung auffüllen
2.	15 min mit 400 g bei 4 °C zentrifugieren
3.	Überstand bis auf 10 ml abpipettieren und Sediment mit kaltem PBS Puffer auf 30 ml auffüllen
4.	20 ml Ficoll-Paque Plus in ein neues 50 ml Röhrchen vorlegen und sauber mit dem verdünnten Sediment überschichten
5.	30 min mit 400 g bei 4 °C zentrifugieren mit ungebremsten Auslauf
6.	Überstand und Interphase mit MNC Fraktion in ein neues 50 ml Röhrchen abpipettieren und bis auf 50 ml mit kaltem PBS Puffer auffüllen
7.	10 min mit 400 g bei 4 °C zentrifugieren
8.	Wenn das Sediment makroskopisch eine hohe Anzahl Erythrozyten aufweist, Überstand bis auf wenige ml abpipettieren und Erythrolyse durchführen; sonst weiter bei 11.
9.	Zum Sediment 1 ml Erythrolyse Puffer zugeben und 3 min vorsichtig schütteln
10.	Mit PBS Puffer auf 50 ml auffüllen und 10 min mit 400 g bei 4 °C zentrifugieren
11.	Überstand bis auf wenige ml abpipettieren; je nach Zellzahl auf 5 ml oder 10 ml mit PBS Puffer auffüllen
12.	10 µl der Suspension mit 10 µl Trypan blue solution in Mikrotiter Platte mischen; 10 µl der Mischung in Neubauer Zählkammer geben und Zellzahl bestimmen

**Protokoll 8: Aufarbeitung von Vollblut mit Ficoll-Paque Plus**

Auch bei diesen Versuchen wurden Zytopins mit protokollierten Zellzahlen angefertigt. Auf diese Weise konnte nach immunzytochemischen Färbungen errechnet werden, wie viele U373 Zellen sich in der erhaltenen Zellsuspension befanden.



**Abbildung 8: Schemazeichnung Ficoll-Gradient**

#### ***2.2.5.4. Detektionssysteme zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen***

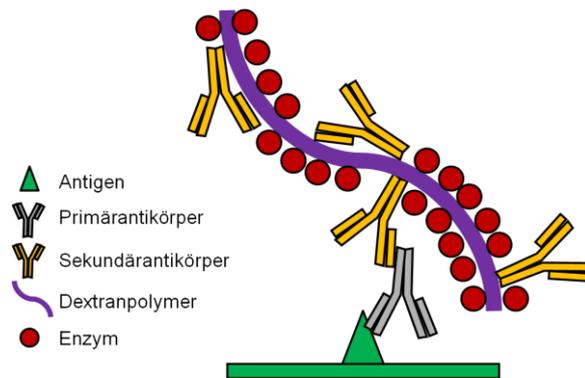
Um die Zellen, die vor der Aufarbeitung über die Gradienten in das Blut eingebracht wurden, optisch nachzuweisen, kamen unterschiedliche Detektionsmethoden zur Anwendung. Zweck dieser Untersuchungen war es, die Anzahl der in den Zellsuspensionen angereicherten, simulierten CTC bestimmen zu können. Somit ließen sich Wiederfindungsraten für Glioblastom-Zellen für die unterschiedlichen Gradienten bestimmen und vergleichen. Zum Nachweis wurden Immunfluoreszenzfärbungen (s. Abschnitt 2.2.3), immunenzymatische Färbemethoden (s. Abschnitt 2.2.6) sowie das Markieren mit CellTracker™ (Molecular Probes C7025) durchgeführt.

CellTracker™ CMFDA (5-Chloromethylfluorescein Diacetat) ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der in lebenden Zellen mit Thiolgruppen Thioether ausbildet und so die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Der Farbstoff wurde in serumfreiem D-MEM Medium (Gibco) auf eine Konzentration von 1,5 µM verdünnt. Anschließend wurden die Zellen in der Kulturflasche für 20 min bei 37°C mit dem verdünnten Farbstoff inkubiert und für die „Spiking“-Versuche verwendet. Die mit CellTracker™ markierten Zellen waren dann ohne weitere Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

### 2.2.6. Immunezymatischer Nachweis mit alkalischer Phosphatase

Bei Tumoren epithelialen Ursprungs ist seit langem die immunzytochemische Färbung von disseminierten Zytokeratin-positiven Tumorzellen im Knochenmark mit löslichen alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP) Immunkomplexen bekannt (Pantel et al. 1994). Hierbei wird der monoklonale Maus-Antikörper A45-B/B3 (Ig G<sub>1K</sub>) als primärer Antikörper eingesetzt, der gegen verschiedene humanen Zytokeratine gerichtet ist. Da die Immunglobuline des APAAP Immunkomplexes ebenfalls von Mäusen stammen, ist es möglich, diese Immunkomplexe über einen Brückenantikörper mit dem Primärantikörper nicht-kovalent zu verbinden. Dieser Brückenantikörper (Dako Z0259) ist gegen Maus-Immunglobuline gerichtet und wird in Kaninchen hergestellt.

In den vorliegenden Versuchen wurden die Zytospins jedoch mit einem polyklonalen anti-GFAP-Antikörper vom Kaninchen (Dako Z0334) als Primärantikörper inkubiert. Eine Kopplung des APAAP Komplexes an den Primärantikörper mittels eines Brückenantikörpers war also nicht möglich. Stattdessen wurde zum Nachweis ein Envision™ System (Dako K4017) verwendet. Dies ist ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Dextran-Polymer, das mit einem Gemisch aus anti-Maus / anti-Kaninchen Immunglobulinen der Ziege konjugiert ist. Eine endogene alkalische Phosphatase-Aktivität von Leukozyten, wie sie in der Literatur beschrieben ist, wurde durch Zugabe von Levamisol zur Substrat Lösung unterdrückt (Gower et al. 1985). Nach Visualisierung mit der Neufuchsin-Substrat-Lösung konnten die Zytospins mit dem Automated Cellular Imaging System ACIS (ChromaVision Medical System) auf das Vorhandensein bzw. die Anzahl der simulierten GFAP-positiven CTC untersucht werden.



**Abbildung 9: Schemazeichnung Immunzytochemie**

Protokoll GFAP – alkalische Phosphatase Immunzytochemie	
1.	Objektträger 30 min bei RT auftauen lassen; auswickeln; mit Dako Pen umkreisen
2.	Fixierung: 1ml Epimet Solution B 1 min bei 13.000 g zentrifugieren; 135 µl aus dem Überstand in 10 ml PBS Puffer (Gibco) verdünnen; Hiervon 200-300 µl je OT für 15 min in feuchter Kammer
3.	2 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen
4.	20 min Dako Protein Blocking
5.	Protein Blocking abkippen
6.	30 min mit mind. 120 µl Primär Antikörper inkubieren (in Dako Verdünnungsmedium (S2022)); danach 3 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen
7.	20 min mit Envision™ (Dako K 4017) inkubieren; danach 3 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen
8.	20 min mit unmittelbar zuvor hergestellter Neufuchsin Substrat Lösung inkubieren
9.	3 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen
10.	Kerngegenfärbung mit Hämalaun
11.	Mit Glyzergel eindeckeln

**Protokoll 9: GFAP – alkalische Phosphatase Immunzytochemie**

### 2.2.7. Mikromanipulation

Um GFAP-positive Zellen in den Zytopins hinsichtlich ihrer molekularbiologischen Eigenschaften weiter untersuchen zu können, sollten einzelne dieser Zellen von den

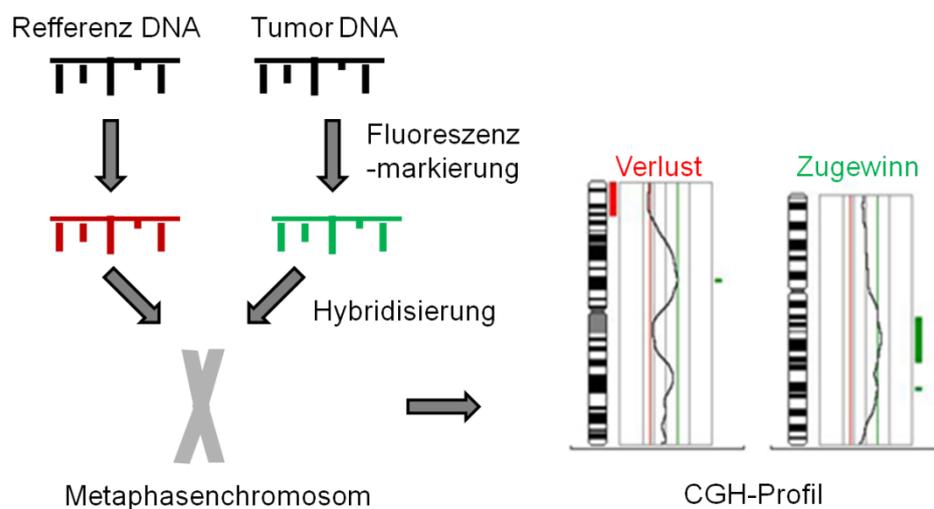
restlichen MNC des Blutes isoliert werden. Bei diesem Verfahren wurden Zytospins gemäß dem unter Abschnitt 2.2.6 aufgeführten Protokoll immunzytochemisch gefärbt. Anders als dort beschrieben, erfolgte jedoch keine Fixierung der Zellen zu Beginn und keine Kernfärbung nach der Färbung. Die Zellen und die in ihnen enthaltene DNA sollten derart für eine anschließende CGH (Komparative Genomische Hybridisierung)-Analyse weitestgehend unbeschädigt bleiben. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls ein anderes Substrat der alkalischen Phosphatase verwendet. Die hier verwendete BCIP/NBT-Substratlösung wurde kurz vor Gebrauch gemäß der unter Abschnitt 2.1.5 angegebenen Anleitung angesetzt, mit Vorsatzfilter filtriert und für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden Substratrückstände mit 1xPBS Puffer entfernt und die Zytospins mit 1xPBS Puffer feucht gehalten.

Unter dem Inversionsmikroskop (Axiovert, Zeiss) wurde der Erfolg der GFAP-Färbung anhand der Positivkontrolle U373 kontrolliert. Da für die Mikromanipulation kein Deckglas verwendet wird, war es erforderlich, die Objektträger stets feucht zu halten. Die GFAP-positiven Zellen konnten nun mit einer 45° abgeschrägten 40 µm Durchmesser Kapillare (Custom Tip Type III, Eppendorf) von den umgebenden MNC gelöst, mit Hilfe des TransferMan NK2 (Eppendorf) angesogen und in ein steriles 200 µl Eppendorf Tube überführt werden. Hierzu wurde ein Reservoir von 10 µl DNase-freiem A. dest. (PCR-grade) auf die Innenseite des Deckels des Reagenzgefäßes vorgelegt, welches die Zelle aufnimmt. Die Zellen wurden umgehend und gekühlt an Frau Dr. S. Langer vom Institut für Humangenetik im Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. T. Meitinger) versendet. Dort wurden die Zellen zur CGH weiterbearbeitet.

#### **2.2.8. Komparative Genomische Hybridisierung CGH**

Bei der CGH wird eine zu testende DNA mit der gleichen Menge normaler Referenz-DNA vergleichend (komparativ) mit Metaphasenchromosomen hybridisiert. Mit diesem zytogenetischen Untersuchungsverfahren lassen sich unbalancierte Zugewinne (gains) und Verluste (losses) an genetischer Information nachweisen. Die zu testende DNA wird dazu mit einem Fluorochrom des einen Spektrums (meist Fluoreszein also Grün), die normale Referenz DNA mit einem Fluorochrom eines anderen Spektrums (meist

Rhodamin also Rot) markiert. Durch Fluoreszenzmikroskopie und digitale Bildverarbeitung können dann DNA-Zugewinne und -Verluste auf chromosomaler Ebene evaluiert werden. Die Emissionintensitäten der beiden Fluorochrome werden gemessen und ins Verhältnis gesetzt. Da bei diesem Verfahren nur der DNA Gehalt im Vergleich zur normalen DNA gemessen wird, werden balancierte Mutationen und Polyploidie nicht erfasst. Deletionen werden dabei ab einer Größe von 8,3 Mb auf Einzelzell-Niveau, Amplifikationen bereits bei geringeren Größen detektiert. Die DNA-Menge der einzelnen Zellen, die an das Institut für Humangenetik der Technischen Universität München versendet wurden, musste dort vor der CGH durch eine WGA (Whole Genome Amplification) deutlich erhöht werden (Fiegler, et al. 2006). Ergebnis dieser CGH ist dann ein DNA-Profil auf Einzelzell Niveau, das tumorspezifische Deletionen bzw. Amplifikationen mit ihrer Lokalisation auf dem entsprechenden Chromosom sichtbar macht.



**Abbildung 10: Schemazeichnung CGH**

### 2.2.9. Zellseparation mit ferromagnetischen Antikörpern

Es wurden zusätzlich zu der bereits erwähnten Zellseparation über Dichtegradienten Versuche unternommen, die Konzentration möglicher CTC in den gewonnenen Zellsuspensionen zu steigern. Nach der Aufarbeitung von Blutproben (10 ml) mit Ficoll ergab sich im Durchschnitt eine Gesamtzellzahl von über  $10^7$  MNC. Einzelne CTC in dieser Anzahl an Zellen mit Immunfärbungen zu markieren und zu identifizieren, ist

daher ein sehr zeit- und kostenintensives Unterfangen. Es sollte daher ein Verfahren getestet werden, mit dem sich die Untersuchung von Patientenblut beschleunigen und verfeinern ließe.

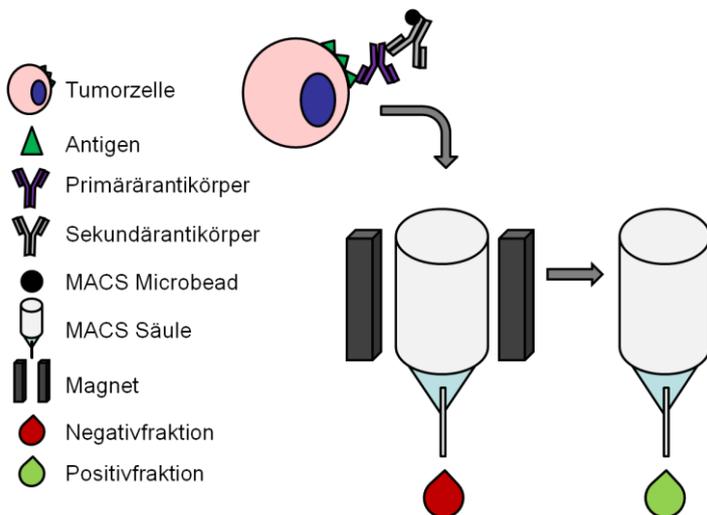
Hierzu liefert die Markierung der CTC mit ferromagnetischen Antikörpern Lösungsansätze. Nachdem mit dem Ficoll-Gradienten eine Zellsuspension gewonnen wird, die entweder CTC oder Zelllinien-Zellen enthält, können diese mit magnetischen Antikörpern markiert und in einem Magnetfeld separiert werden. Hierbei werden die CTC oder Zelllinien-Zellen in der Suspension zunächst mit Primärantikörpern gegen GFAP bzw. EMMPRIN markiert. Die Antikörper sollen dabei mit der gleichen Konzentration wie für die Immunfluoreszenz eingesetzt werden. Danach wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Dieser Sekundärantikörper ist mit 50 nm messenden, paramagnetischen Partikeln konjugiert, sogenannten Microbeads. Lässt man nun die Zellsuspension über eine MACS®-Säule laufen, die sich in einem starken Magnetfeld befindet, so werden die zuvor markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, die übrigen hingegen können die Säule passieren und werden mit einem geeigneten Gefäß aufgefangen. Man erhält die so genannte Negativfraktion, die aus unmarkierten Leukozyten besteht. Entfernt man den Magneten, der die Säule umgibt, so lassen sich die markierten Zellen mit einem Puffer eluieren. Man erhält die so genannte Positivfraktion, die idealerweise hauptsächlich aus zuvor markierten Zellen besteht. Damit erreicht man eine derart geringe Zellzahl, die nur noch die Untersuchung eines Objektträgers erforderlich macht bzw. die Untersuchung größerer Blutvolumina bei geringerem Aufwand ermöglicht. Das genaue Vorgehen nach Empfehlungen der Firma Miltenyi Biotech ist im folgenden Protokoll erläutert.

Protokoll - MACS® Zellseparation mit anti-CD147 (EMMPRIN) bzw. anti-GFAP	
1.	Eine bestimmte Zellzahl U373 in 10 ml EDTA Vollblut eines Probanden verdünnen und nach Protokoll Ficoll-Paque Plus Schritte 1 bis 10 aufarbeiten.
2.	Pellet in 4 ml PBS Puffer resuspendieren und in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführen.
3.	4 ml 8% Paraformaldehyd vorsichtig dazugeben. Für 30 min bei 4 °C fixieren.
4.	10 min bei 500 g und 4 °C zentrifugieren. Überstand verwerfen, Pellet in 1 ml

	PBS resuspendieren.
5a.	Dazu so viel anti-CD147 das insgesamt in der 1 ml Suspension eine Verdünnung von 1:300 erreicht wird. Für 10 min inkubieren bei 4 °C (gleiche Konzentration wie bei Immunfluoreszenzfärbung).
5b.	Dazu so viel anti-GFAP das insgesamt in der 1 ml Suspension eine Verdünnung von 1:100 erreicht wird (gleiche Konzentration wie bei Immunfluoreszenzfärbung)
6.	Mit 2 ml Auto MACS® Puffer versetzen und bei 500 g und 4 °C für 10 min zentrifugieren.
7.	Überstand verwerfen und Schritt 6 wiederholen.
8a.	Pellet in 160 µl Auto MACS® Puffer resuspendieren. 40 µl Rat-anti-Mouse Microbeads dazu und für 15 min bei 4 °C inkubieren.
8b.	Pellet in 160 µl Auto MACS® Puffer resuspendieren. 40 µl Goat-anti-Rabbit Microbeads dazu und für 15 min bei 4 °C inkubieren.
9.	Mit 2 ml Auto MACS® Puffer versetzen und bei 500 g und 4 °C für 10 min zentrifugieren.
10.	Pellet in 1 ml Auto MACS® Puffer resuspendieren.
11.	LC-Säule mit blauer Spritzenkanüle versehen, im Magneten platzieren und 500 µl Auto MACS® Puffer vorlegen und durchlaufen lassen.
12.	Die 1 ml Zellsuspension darauf geben und unter der Säule mit 15 ml Falconröhrchen wieder aufnehmen. Insgesamt 3 Mal mit 500 µl Auto MACS® Puffer nachspülen. Die gesammelten 2,5 ml entsprechen der Negativfraktion.
13.	LC-Säule aus dem Magneten entfernen, ohne Kanüle in ein 2 ml Eppendorf Laborröhrchen stellen und 1ml Auto MACS® Puffer und leichtem Stempeldruck die Positivfraktion auspressen.
14.	Zwei Zytospins der Positivfraktion anfertigen, davon eines für die Negativkontrolle.
15.	Die Zytopins können jetzt wie gewohnt nach dem Protokoll für die Immunfluoreszenz gefärbt werden.

**Protokoll 10: MACS®-Zellseparation**

Quelle: Modifiziert nach Miltenyi Biotech



**Abbildung 11: MACS® Zellseparation**

## 2.2.10. Untersuchung von Patientenmaterial

### 2.2.10.1. Untersuchung von Gewebeschnitten

Vom Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Univ. Prof. Dr. M. Glatzel) wurden Gewebeschnitte der jeweiligen Primärtumore bezogen. Am dortigen Institut waren die Primärtumore bereits hinsichtlich der Expression der Proteine GFAP, Ki-67 und P53 beurteilt worden. Zusätzlich zu den routinemäßigen Untersuchungen sollte anhand der überlassenen Gewebeschnitte eine Expression von EMMPRIN und des EGF-Rezeptors sowie eine Amplifikation des EGFR-Gens überprüft werden. Dies geschah mit dem Ziel, zirkulierende GFAP-positive Zellen über diese Marker zusätzlich charakterisieren zu können und bei ihnen ähnliche molekularbiologische Eigenschaften wie im Primärtumor nachweisen zu können. Hierbei konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich etwaige CTC aufgrund der Heterogenität des Primärtumors auch von der Mehrzahl der Primärtumor-Zellen unterscheiden können.

#### 2.2.10.1.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten

Für die Untersuchung der Gewebeschnitte auf Amplifikation des EGFR-Gens wurden ebenfalls Digoxigenin-11-dUTP markierte Klone des PAC RP5-1091E12 (P1 derived artificial chromosome) (NCBI Acc. No. AC006977) verwendet. Der Ansatz dieser DNA-Sonde folgte der gleichen Vorgehensweise, wie sie schon im Abschnitt 2.2.4

beschrieben wurde. Da es sich um in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte handelte, mussten die Arbeitsschritte vor der Hybridisierung in leicht veränderter Form durchgeführt werden. So musste eine Vorbehandlung mit 0,3 g/ml Natriumbisulfit erfolgen sowie eine höhere Konzentration von 250 µg/ml an Proteinase K zum Gewebsverdau eingesetzt werden. Am Tag nach der Hybridisierung konnte so verfahren werden, wie schon bei der FISH an Zellpräparationen beschrieben (s. Abschnitt 2.2.4).

Protokoll Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Parafinschnitten	
1. Tag	
1.	Erhitzen der Schnitte für 2 Std. auf 60 °C
2.	2 mal 15 min in Xylol zum Deparaffinieren
3.	2 mal 5 min in 100% Ethanol; danach 10 min trocknen
4.	15 min 0,3 g/ml Natriumbisulfit bei 45 °C
5.	10 Sek. in 2x SSC Puffer bei RT
6.	45 min 250 µg/ml Proteinase K bei 45 °C
7.	10 Sek. in 2x SSC Puffer bei RT
8.	Je 2 min 70%, 90% und 100% Ethanol bei RT; danach 10 min trocknen
9.	10 min bei 75 °C denaturieren
10.	2 min 70% eiskalter Ethanol; danach je 2 min 70%, 90% und 100% Ethanol bei RT
11.	Mindestens 10 min bei 37 °C trocknen und vorwärmen
12.	10 µl Probe pro OT aufgeben, luftblasenfrei eindecken und mit Fixogum versiegeln
13.	Über Nacht bei 37 °C hybridisieren

**Protokoll 11: FISH an Parafinschnitten 1. Tag**

Quelle: Modifiziert nach Hamsen 2003

*2.2.10.1.2 EMMPRIN und EGFR Immunhistochemie*

Für die Untersuchung der Primärtumore auf eine Expression von EMMPRIN sowie des EGF-Rezeptors wurden immunhistochemische Färbungen mit Diaminobenzidin DAB vorgenommen. Dabei wurden die gleichen Primärantikörper wie bei der Immunfluoreszenz verwendet, jedoch in einer stärkeren Verdünnung (anti-CD147 von

BD Bioscience 1:2.000; anti-EGFR von Dako 1:100). Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit einem EnVision™ System (Dako) inkubiert, welches an die primären Antikörper bindet. Bei diesem Reagenz handelt es sich um ein mit Peroxidase konjugiertes Dextranpolymer, das Antikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus-Immunglobuline enthält. Wasserstoffperoxid dient der Peroxidase als Substrat. Freiwerdende Protonen oxidieren nachfolgend das zuvor farblose Chromogen Diaminobenzidin. Bei der Oxidation entsteht ein braunes, in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln, unlösliches Präzipitat. Mit diesem Chromogen kann aber auch die Aktivität von endogenen Peroxidasen in Peroxisomen und Mitochondrien sichtbar gemacht werden. Daher muss eine solche endogene Peroxidaseaktivität vor Zugabe des Chromogens durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Block (Dako S 2023) unterdrückt werden.

Protokoll Diaminobezidin DAB Immunhistochemische Färbung an Gewebeschnitten	
1.	Schnitte für 30 min – 60 min bei 65 °C im Glasständer heizen
2.	2 mal 10 min in Xylol stellen
3.	Je 2 mal 20 Sek. in absteigender Ethanolreihe 100%, 96%, 80%; danach in Aqua dest. Stellen
4.	Für EMMPRIN-Färbung: Schnitte in Plastikkuvette 20 min bei 800 W in Dako Target Retrieval Solution in der Mikrowelle kochen; Pufferstand bei Bedarf nachfüllen, danach 10 min abkühlen lassen
4.	Für EGFR-Färbung: Schnitte mit Proteinase-K (Dako S3200) (1:2 mit Aqua dest. verdünnt) für 6 min Gewebsverdau; danach 5 min in Aqua dest. stellen
5.	3 min in 1xTBST Puffer waschen
6.	5 min H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Block (Dako S 2023) in feuchter Kammer
7.	3 min in 1xTBST Puffer waschen
8.	Für EMMPRIN-Färbung: 30 min mit anti-CD147 (BD Biosciences) inkubieren
8.	Für EGFR-Färbung: bei 4°C über Nacht mit anti-EGFR (Dako) inkubieren
9.	3 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen
10.	15 min Envision™ (Dako K 5007A)
11.	3 mal 3 min in 1xTBST Puffer waschen
12.	1 Teil Lösung Dako K5007C in 50 Teilen Lösung Dako 5007B verdünnen; damit Schnitte 1 min - 5 min je nach Farbumschlag inkubieren

13.	In Aqua dest. spülen; danach Kernegefärbung mit Hämalaun
14.	je 2 mal 20 Sek. in 80%, 96% Ethanol; 2 mal 2 min 100% Ethanol, 2 mal 2 min Xylol; mit Eukitt eindeckeln

**Protokoll 12: DAB Immunhistochemische Färbung an Gewebeschnitten**

**2.2.10.2. Untersuchung der Blutproben von Patienten (Zytospins)**

Die technische Durchführbarkeit der Anreicherung aus dem Blut sowie der unterschiedlichen Nachweisverfahren für zirkulierende Glioblastom-Tumorzellen wurde in den umfangreichen Vorversuchen gezeigt. Die asservierten Zytospins der Patienten wurden nun mit den oben beschriebenen Färbungen auf das Vorhandensein GFAP-positiver Zellen untersucht. Ein Teil der Zytospins wurde wie unter Abschnitt 2.2.6 eingehend erläutert mit einer immunzytochemischen Färbung mit anti-GFAP (Dako Z334) und alkalischer Phosphatase bearbeitet. Die Auswertung erfolgte hier mit dem Automated Cellular Imaging System (ACIS, ChromaVision).

Der überwiegende Teil der Zytospins wurde mit anti-GFAP (Dako Z334) und sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, wie ausführlich unter Abschnitt 2.2.3 besprochen, gefärbt. Die Entscheidung für die Immunfluoreszenz als Hauptuntersuchungsmethode wurde getroffen, da die Immunfluoreszenz im Gegensatz zur Immunzytochemie den Vorteil bot, mittels Doppelfärbungen GFAP-positive Zellen weiter zu charakterisieren. Hierzu wurden die Zytospins zusätzlich auf p53-, EMMPRIN- und EGFR-positive Zellen durchsucht. Wies der Primärtumor in den histopathologischen Untersuchungen zu einem hohen Anteil eine Expression von p53 auf, so wurden die Zytospins mit einer Doppelfärbung durch anti-GFAP- und anti-p53-Antikörper gefärbt. Im Anschluss wurden die Zytospins am Fluoreszenzmikroskop auf GFAP-positive Zellen untersucht, die gleichzeitig eine nukleäre Akkumulation von p53 aufwiesen. Analog wurden Zytospins mit einer Doppelfärbung anti-GFAP und anti-EGFR gefärbt, wenn der Primärtumor zu einem hohen Anteil den EGF Rezeptor exprimierte. Für den Fall, dass der Primärtumor weder p53 noch EGFR exprimierte, wurden die Zytospins mit einer Doppelfärbung unter Einsatz von anti-GFAP- und anti-CD147 (EMMPRIN)-Antikörper untersucht. Bei zwei der Primärtumore zeigte sich in der FISH eine deutliche Amplifikation des EGFR-Gens. Zytospins dieser Patienten

wurden im Anschluss an eine anti-GFAP Fluoreszenzfärbung einer FISH mit einer EGFR-Gen-Sonde unterzogen. Hiermit wurde versucht, eine EGFR-Amplifikation in GFAP-positiven Zellen des peripheren Blutes nachzuweisen. Ein solcher Nachweis würde als starker Hinweis für das Vorliegen zirkulierender Glioblastom-Tumorzellen gewertet werden.

Mit diesen Verfahren wurden alle MNC, die aus 10 ml Vollblut der Patienten gewonnen wurden, untersucht. Insgesamt wurden bei den zwölf Patienten-Blutproben  $1,49 \times 10^8$  MNC von den restlichen Blutbestandteilen separiert. Hiervon wurden  $1,33 \times 10^7$  Zellen immunzytochemisch auf GFAP-positive Zellen untersucht, zusätzliche  $2,8 \times 10^6$  Zellen dienten als Negativkontrollen. Weitere  $1,16 \times 10^8$  Zellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen unterzogen und manuell am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Hier wurden zusätzlich  $1,54 \times 10^7$  Zellen als Negativkontrollen ausgewertet.

Der Patient Nummer 3 wies in allen Färbungen die höchste Anzahl GFAP-positiver Zellen auf. Zytospins dieses Patienten wurden, wie genau unter Abschnitt 2.2.7 erläutert, immunenzymatisch gefärbt. Unter  $2,8 \times 10^6$  Zellen fanden sich hier 16 GFAP-positive Zellen. Es gelang, 12 dieser GFAP-positiven Zellen mittels Mikromanipulation zu isolieren und diese Zellen einzeln in 200 µl Eppendorf Reagenzgefäße zu überführen. Zum Transport wurden diese Zellen in einem Tropfen von 10µl DNase-freiem A. dest. (PCR-grade) transferiert und gekühlt an das Institut für Humangenetik im Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Thomas Meitinger) verschickt. An diesem Institut wurde dann eine WGA (Whole Genome Amplification) der DNA dieser Zellen durchgeführt, welche anschließend in einer CGH-Analyse näher charakterisiert werden konnte. Derart war es möglich, ein CGH-Profil einzelner GFAP-positiver Zellen des peripheren Blutes zu generieren.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE

##### 3.1.1. Charakterisierung der Zelllinien

Während der Vorversuche wurden verschiedene Zelllinien auf die Expression Glioblastom-typischer Proteine untersucht. Es wurde nach einer Zelllinie gesucht, in der sich eine gleichzeitige Expression der Proteine GFAP, p53, EMMPRIN und EGF-Rezeptor nachweisen lässt. Hierzu wurden Immunfluoreszenzfärbungen an allen Zelllinien durchgeführt. Für die Beurteilung der Expression wurden folgende Kriterien festgelegt:

Negativ (-)	0% der Zellen zeigen eine Expression des Antigens
Schwach positiv (+)	weniger als 50% der Zellen zeigen eine starke Expression, oder mehr als 50% der Zellen zeigen eine schwache Expression
Mäßig positiv (++)	zwischen 50% und 90% zeigen eine starke Expression
Stark positiv (+++)	über 90% der Zellen zeigen eine starke Expression

Charakterisierung von Zelllinien durch Immunfluoreszenz					
Zelllinie	GFAP	p53	EMMPRIN	EGFR	Ki-67
U373	+++	+++	+++	-	+++
G22	+	++	+++	-	+
G44	+	-	+++	+++	+++
G112	+++	++	+++	-	+++
G140	+	+++	+++	-	+++
G169	+	+	+++	-	++
A431	+	+++	+++	+++	+++

(-) = negativ; (+) = schwach positiv; (++) = mäßig positiv; (+++) = stark positiv

**Tabelle 8: Charakterisierung von Zelllinien**

Ziel war es, unter Verwendung von Zelllinien das Vorhandensein von zirkulierenden GFAP-positiven Zellen im Blut bei in-vitro-Versuchen zu simulieren. Um hierbei Wiederfindungsraten bestimmen zu können, war eine konstante Expression von GFAP

durch möglichst alle Zellen dieser Zelllinie eine notwendige Voraussetzung. Bei diesen Versuchen sollten auch Doppelnachweismethoden eingesetzt werden. Daher sollte eine Zelllinie ausgewählt werden, die eine konstante Expression von GFAP und zusätzlich eine Expression der weiteren Proteine zeigte. Die Zelllinien G112 und U373 weisen eine starke Expression von GFAP auf, der Anteil der Zellen, die darüber hinaus eine nukleäre Akkumulation von p53 zeigen, war bei der Zelllinie U373 jedoch höher. Daher wurde für die „Spiking-Versuche“ vornehmlich die Zelllinie U373 verwendet. Weiterhin konnte in keiner der Glioblastom-Zelllinien eine gleichzeitige Überexpression von EGF-Rezeptor und p53 beobachtet werden. Lediglich die Zelllinie G44 exprimiert vermehrt den EGF-Rezeptor. Eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigte eine leichte Amplifikation des EGFR-Gens mit durchschnittlich 2,6 Kopien pro G44-Zelle (83 Signale bei 32 ausgezählten Zellen). Aufgrund der lediglich leichten EGFR-Amplifikation und einer schwachen Expression von GFAP konnte sie daher nicht für die „Spiking-Versuche“ verwendet werden. Als Positivkontrolle für EGFR Überexpression bzw. Amplifikation wurde deshalb die Epidermoidkarzinom-Zelllinie A431 eingesetzt. In der Literatur ist eine deutliche EGFR-Amplifikation von ca. 30 Kopien pro A431-Zelle beschrieben (Merlino et al. 1984). Diese Ergebnisse konnten mit einer FISH bestätigt werden. Interessanterweise weist diese Zelllinie darüber hinaus in der Immunfluoreszenz eine amorphe, teils granuläre, schwache zytoplasmatische Expression von GFAP auf.

### **3.1.2. Anreicherung der Tumorzellen über Dichtegradienten-Zentrifugation**

#### **3.1.2.1. OncoQuick**

Für „Spiking-Versuche“ mit dem OncoQuick-Gradienten wurde die Zelllinie G112 verwendet. Mit diesem Verfahren ließ sich jedoch nur ein geringer Anteil der in 15 ml Vollblut verdünnten Zellen wiederfinden. Die Zellsuspension, die nach Aufbereitung über den OncoQuick-Gradienten gewonnen wurde und MNC wie G112-Zellen enthielt, war sehr zellarm. Dies wäre insofern von Vorteil, dass nur eine geringe Zellzahl bzw. Anzahl an Objektträgern pro Patient untersucht werden müsste. Die Zytospins der gewonnenen Zellsuspension wurden mit Immunfluoreszenzfärbungen auf die Häufigkeit von GFAP- bzw. EMMPRIN-positiven Zellen untersucht. Es wurde jedoch lediglich eine maximale Wiederfindungsrate von ca. 10% erzielt (1.464 Zellen von

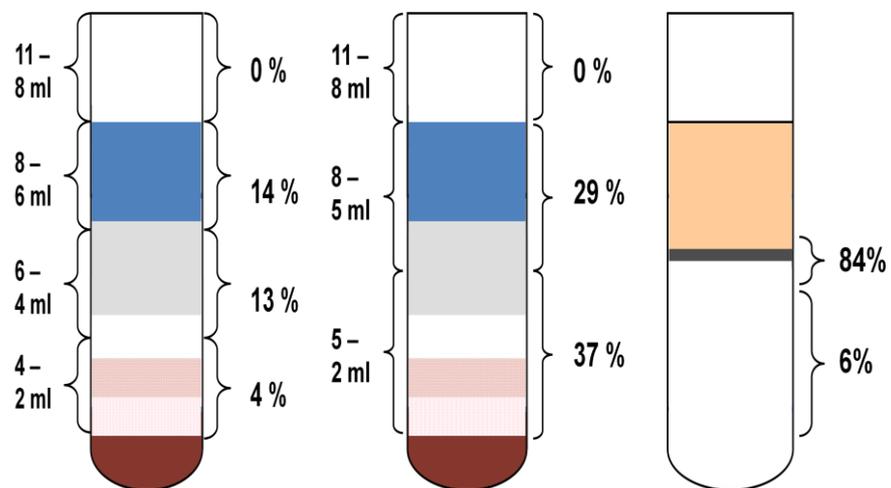
ursprünglich 15.000 eingesetzten G112-Zellen). Diese geringe Wiederfindungsrate lässt sich zu einem Anteil damit erklären, dass die Zellsuspensionen nach der Zentrifugation eine hohe Anzahl an Thrombozyten enthielten. Dies verminderte die Haftung der Zellen an den Objektträgern und hatte einen flächenhaften Verlust von Zellmaterial während der Färbungen zur Folge. Deshalb wurde diese Methode nicht zur Aufbereitung von Patientenblut verwendet.

### **3.1.2.2. Boyant-Gradient**

Für die Bestimmung von Wiederfindungsraten von zirkulierenden Gliomzellen mit dem Boyant-Gradienten wurde die Zelllinie U373 eingesetzt. Da nicht bekannt war, in welchem Bereich des Gradienten sich Tumorzellen glialen Ursprungs anreichern lassen würden, wurde bis auf das Erythrozytensediment der gesamte Gradient in einzelnen Fraktionen untersucht. Zytospins der einzelnen Fraktionen wurden immunzytochemisch mit anti-GFAP (Dako) und alkalischer Phosphatase gefärbt (Versuch A). Alternativ wurden die Zellen vor Einbringen in das Probanden-Blut mit CellTracker™ markiert, und anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Versuch B). Bei beiden Versuchsanordnungen (A und B) zeigte sich eine Verteilung der U373-Zellen auf viele Fraktionen. Lediglich die obersten 3 ml klaren Überstandes waren frei von U373-Zellen. In einem weiteren Versuch wurden dann U373-Zellen in DMEM Medium anstatt in Vollbut verdünnt (Versuch C). Hierbei konnte die Bestimmung der Zellzahl nach Aufarbeiten mit dem Gradienten in einer Neubauer Zählkammer erfolgen, da die gewonnene Zellsuspension ausschließlich U373-Zellen enthielt. Es wurden 84% der Zellen im Bereich der Grenze zwischen Medium- und Gradienten-Flüssigkeit gefunden. Eine solche scharfe Trennung der U373-Zellen von den Blutbestandteilen ließ sich aber nicht erzielen. Wie in Abbildung 12 ersichtlich zeigte sich in den Versuchsanordnungen A und B vielmehr eine relativ homogene Verteilung der eingesetzten U373-Zellen über den Gradienten. Es wird angenommen, dass das Dichteverhältnis des Gradienten für den Versuch, Tumorzellen glialen Ursprungs aus Blut zu isolieren, ungünstig ist. Weiterhin kam es auch bei diesem Gradienten zu flächigen Zellverlusten bei der Färbung der Zytospins. Dies wurde wie beim OncoQuick-Gradienten auf die hohe Anzahl von Thrombozyten in den angereicherten Zellfraktionen zurückgeführt. Es war ebenfalls ungünstig, dass die

Fraktionen, die eine hohe Anreicherung von U373-Zellen erbrachten, gleichzeitig sehr zellreiche Fraktionen waren. Dies würde die Untersuchung großer Zellzahlen und damit Objektträgern erfordern, obwohl nur ein Volumen von 5 ml Blut eingesetzt würde. Im Versuch A bedeutet dies eine Untersuchung von ca.  $10^7$  Zellen, um eine Wiederfindungsrate von 27% (14% + 13%) in den beiden mittleren Fraktionen zu erzielen. Aus den o.a. Gründen kam der Boyant-Gradient für die Untersuchung von Patientenblut daher ebenfalls nicht zum Einsatz.

Boyant-Gradient	GFAP-AP-ICC Versuch A	CellTracker™ Versuch B	Neubauer Zählkammer Versuch C
-----------------	--------------------------	---------------------------	----------------------------------



Anzahl U373:	1.000	1.500	250.000
Verdünt in:	5 ml Vollblut	5 ml Vollblut	5 ml Medium (Gibco)
Färbung:	GFAP-alkalische Phosphatase	CellTracker™	Trypan blue
Auswertung:	Durchlicht-Mikroskop	Fluoreszenz-Mikroskop	Neubauer Zählkammer
Wiederfindungsrate:	31%	66%	~90%

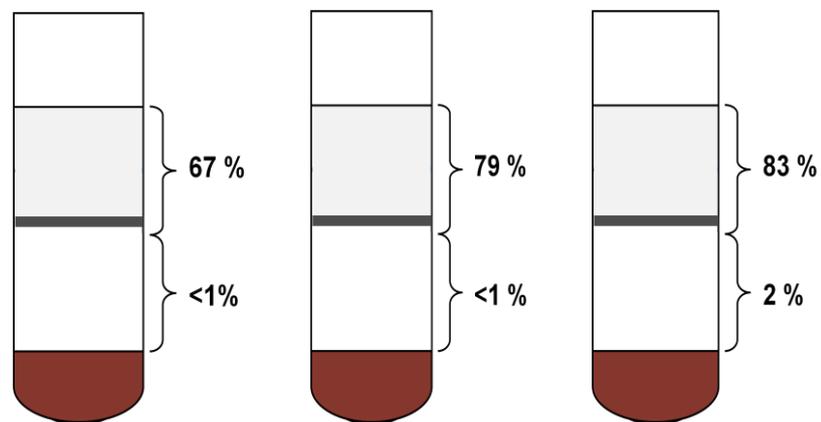
Abbildung 12: Wiederfindungsraten Boyant density gradient

### 3.1.2.3. Ficoll-Gradient

Ob sich Tumorzellen glialen Ursprungs mit dem Ficoll-Gradienten anreichern lassen, war ebenfalls nicht bekannt. Zur Bestimmung von Wiederfindungsraten wurden erneut „Spiking-Versuche“ mit der Zelllinie U373 durchgeführt. Die angefertigten Zytospins wurden mit anti-GFAP (Dako) inkubiert und anschließend erfolgte die chromogene

Visualisierung mit alkalischer Phosphatase. Die derart bearbeiteten Zytospins konnten am Automated Cellular Imaging System ACIS (Chroma Vision) ausgewertet werden. Für dieses Verfahren wurde eine Wiederfindungsrate von 67% bestimmt. Alternativ wurden Wiederfindungsraten mit Immunfluoreszenzfärbungen von anti-GFAP(Dako) (79%), anti-GFAP (Molecular Probes) (ca. 40%), anti-GFAP (Dako) und anti-p53 (Calbiochem) (ca. 75%), anti-GFAP (Dako) und anti-EMMPRIN (BD Biosciences) (ca. 80%) bestimmt. Weiterhin wurde ein Versuch mit dem Fluoreszenzfarbstoff CellTracker™ durchgeführt. Hierbei konnten bis zu 83% der Zellen wiedergefunden werden. Bei Versuchen zur Optimierung der Anreicherung mit dem Ficoll-Gradienten wurden ebenfalls Zytospins der zu verwerfenden Überstände angefertigt. Bei der Untersuchung des Überstandes der Hank's Solution konnten nach der Zentrifugation einige U373-Zellen (8,5% der eingesetzten Zellen) entdeckt werden. Die Dauer der Zentrifugation nach Zugabe von Hank's Solution wurde daher von 10 auf 15 Minuten erhöht.

Ficoll-Gradient	GFAP-AP-ICC	GFAP-IF	CellTracker™
-----------------	-------------	---------	--------------



Anzahl U373:	5.000	5.000	3.000
Verdünnt in:	15 ml Vollblut	15 ml Vollblut	15 ml Vollblut
Färbung:	GFAP-alkalische Phosphatase	GFAP Immunfluoreszenz	CellTracker™
Auswertung:	Automated Cellular Imaging System ACIS (Chroma Vision)	Fluoreszenz-Mikroskop	Fluoreszenz-Mikroskop
Wiederfindungsrate:	67%	79%	83%

Abbildung 13: Wiederfindungsraten Ficoll-Gradient

#### ***3.1.2.4. Vergleich der Ergebnisse***

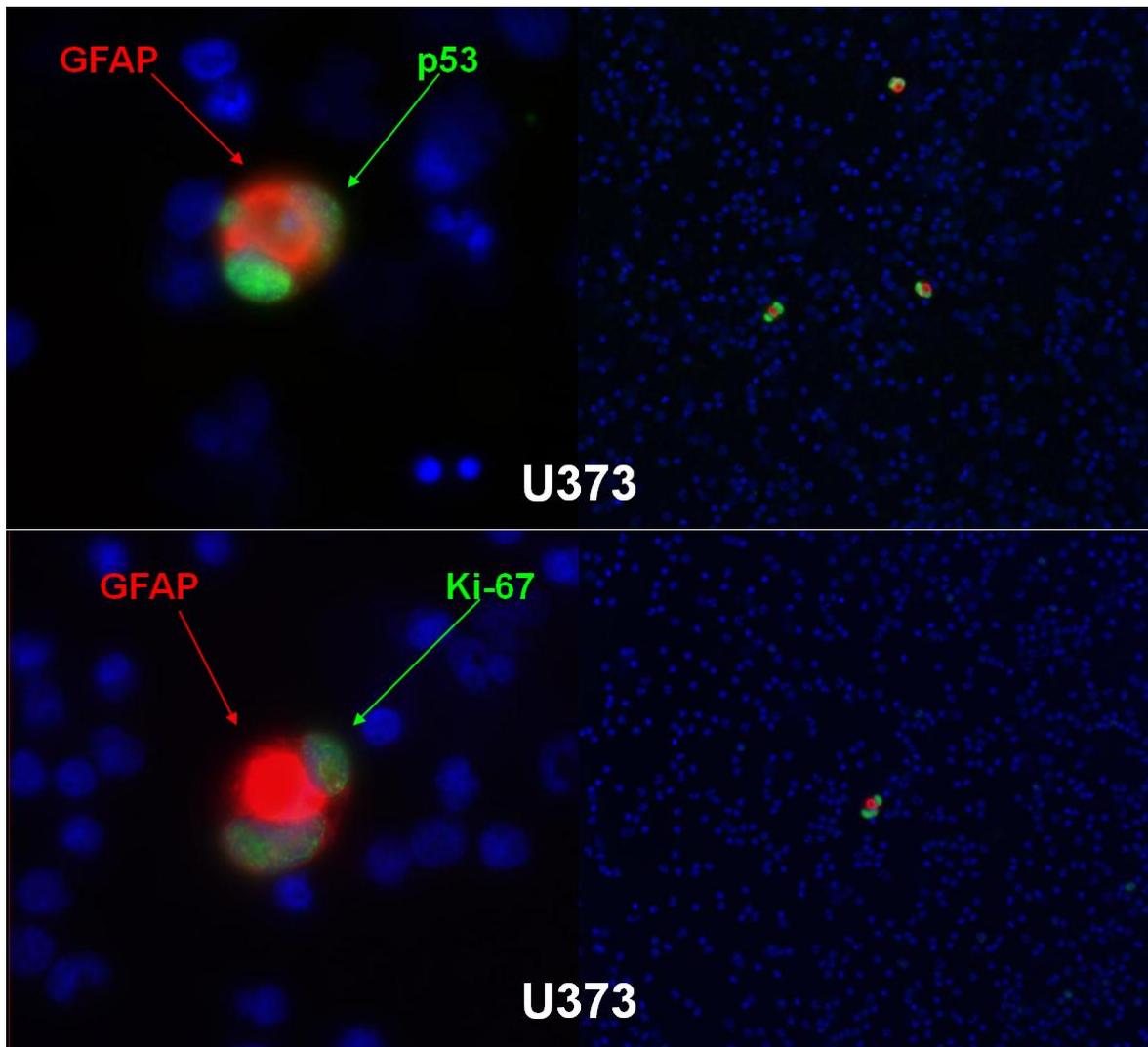
Im Vergleich der Gradienten konnten mit dem Ficoll-Gradienten die höchsten Wiederfindungsraten erzielt werden. Die Anreicherungsraten von Glioblastom-Zellen waren höher, wenn eine Detektion der Glioblastom-Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz durchgeführt wurde als wenn eine chromogene Detektion der Glioblastom-Zellen erfolgte. Die meisten Zellen konnten durch Markierung mit CellTracker™ wiedergefunden werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei diesem Verfahren keine Färbung der Zytospins mit eventuellem Verlust von Zellen notwendig ist. Des Weiteren ist die Markierung mit CellTracker™ unabhängig von der Expression von GFAP in den gesuchten Zellen. Dieser Vorteil bei der Bestimmung von Wiederfindungsraten besteht jedoch nur bei den in-vitro-Versuchen mit Zelllinien. Der Farbstoff kann durch Inkubation von Zellkulturen in lebende Zellen aufgenommen werden und kann nach Binden an Thiolgruppen die Zellmembran nicht mehr passieren. Da die Markierung der Zellen also vor dem Verdünnen in Probandenblut und der Anreicherung über Dichtegradienten erfolgt, kann er nicht zur Detektion CTC im Patientenblut eingesetzt werden.

Die Aufnahme von CellTracker™ durch die Zellen hat jedoch auch einen negativen Aspekt. Nach dem Einschleusen dieses Farbstoffes sind die U373-Zellen stark deformiert, so dass nicht mehr mit Sicherheit zwischen vitalen und avitalen Zellen unterschieden werden kann. In der Folge gestaltet sich die genaue Bestimmung der eingesetzten Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Kammer schwierig. Weiterhin fand sich bei allen Gradienten auf vielen der untersuchten Zytospins nach den Färbungen GFAP-positiver Zelldetritus. Dies lässt vermuten, dass einige der gespickten Tumorzellen der mechanischen Belastung während der Zentrifugationsschritte nicht standhalten. Dies würde einen Teil der nicht wiedergefundenen Zellen erklären.

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse wurde der Ficoll-Gradient für die Anreicherung CTC aus Patientenblut ausgewählt, da hier die höchste Wiederfindungsrate erzielt werden konnte. Weitere Vorteile sind ein geringerer Zellverlust bei den Färbungen durch geringere Anzahlen von Thrombozyten in den

angereicherten Zellsuspensionen sowie die Möglichkeit zur automatischen Auswertung mit dem ACIS System.

### 3.1.3. Fluoreszenzmikroskopie der in-vitro-Versuche



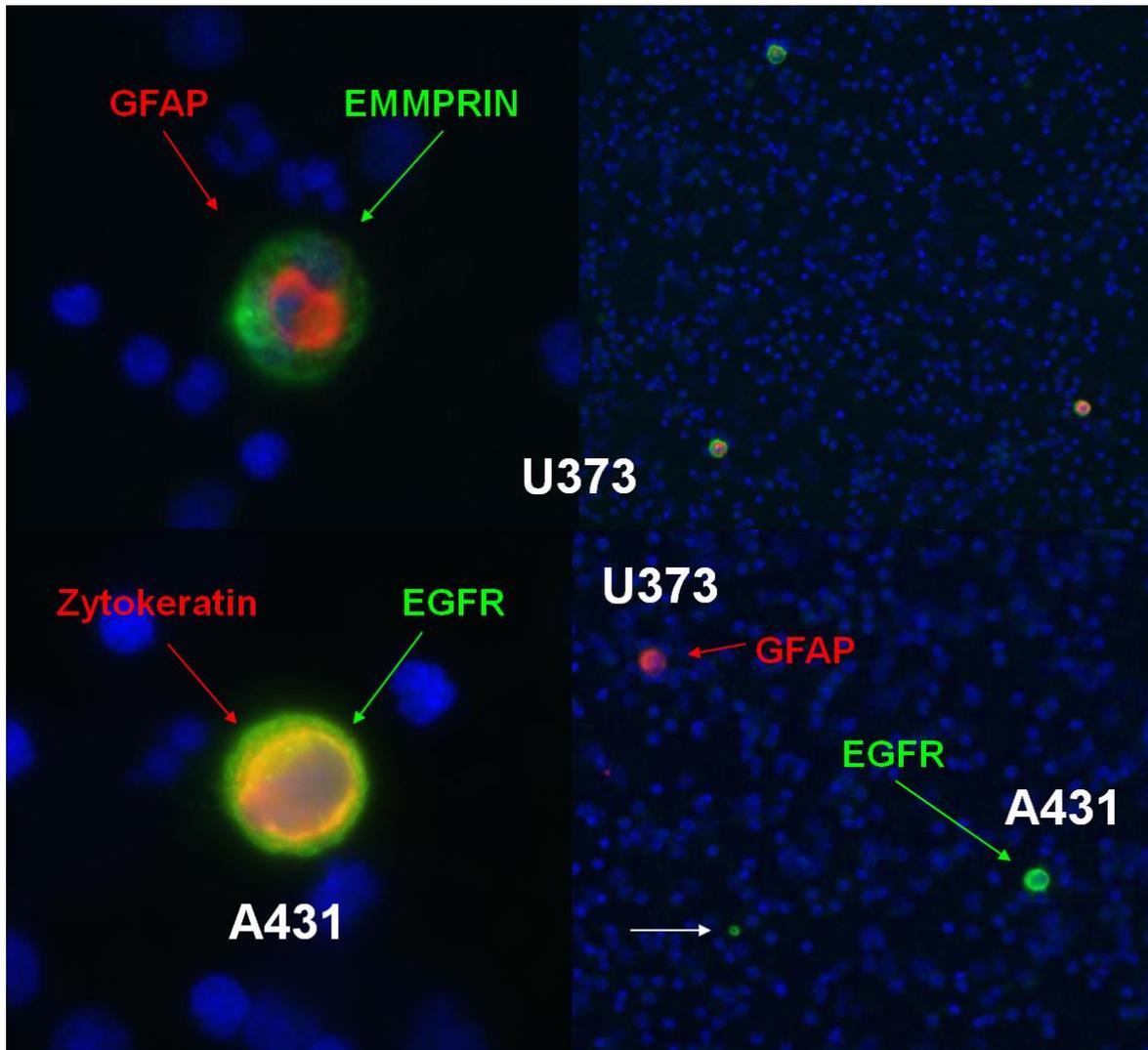


Abbildung 14: „Spiking-Versuche“

Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit Angabe der eingesetzten Zelllinien (weiß) und der markierten Antigene (farbig). In der Übersicht sind die Tumorzellen von den Zellkernen (blau) der MNC deutlich unterscheidbar. Die Vergrößerung zeigt die nukleäre Akkumulation von p53 und Ki-67, das Zytoskelett aus Zytokeratin bzw. GFAP sowie die membranständige Expression von EMMPRIN und EGFR. Unspezifische Reaktion (weißer Pfeil).

### 3.2. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG VON PATIENTENMATERIAL

#### 3.2.1. Ergebnisse der Untersuchung der Primärtumore

Die Primärtumore wurden am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Univ. Prof. Dr. M. Glatzel) bereits hinsichtlich der Expression der Proteine GFAP, Ki-67 und P53 untersucht. Zusätzlich zu den

routinemäßigen Untersuchungen sollte anhand von Gewebeschnitten eine Expression von EMMPRIN und des EGF-Rezeptors sowie eine Amplifikation des EGFR-Gens in Zellen des Primärtumors überprüft werden. Dies erfolgte über Immunhistochemie sowie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen des EGFR-Gens. Die Intensität der immunhistochemischen Färbung wurde in vier Grade eingeteilt: negativ, schwach positiv, mäßig positiv und stark positiv.

Negativ ( - )	weniger als 10% der Zellen zeigen eine Expression des Antigens
Schwach positiv ( + )	zwischen 10% und 50% der Zellen zeigen eine starke Expression, oder mehr als 50% der Zellen zeigen eine schwache Expression
Mäßig positiv ( + + )	zwischen 50% und 80% zeigen eine starke Expression
Stark positiv ( + + + )	über 80% der Zellen zeigen eine starke Expression

Die Primärtumore zeigten in 17% (2 von 12) der Fälle eine mäßige, in 83% (10 von 12) eine starke Farbintensität für EMMPRIN. Dies deckt sich mit Angaben in der Literatur, die eine hohe Expression von EMMPRIN in höher-gradigen Gliomen beschreiben (Riethdorf et al. 2006, Sameshima et al. 2000).

Die Expression des EGF-Rezeptors dagegen scheint inter- und intratumoral sehr variabel zu sein. Insgesamt wurden 75% (9 von 12) Primärtumore als EGFR-positiv gewertet. Eine starke Farbeintensität konnte in 17% (2 von 12), eine mäßige in 8% (1 von 12) und eine schwache Expression in 50% (6 von 12) der Fälle beobachtet werden. Bei 25% (3 von 12) der Primärtumore, die als EGFR-negativ gewertet wurden, zeigten nur einzelne Zellen oder Zellgruppen eine starke Färbung des EGF-Rezeptors bei sonst flächig fehlender Färbung des restlichen Präparates.

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde eine experimentelle Sonde verwendet. Die Gewebeschnitte waren teilweise derart zellreich, dass es zu einer Überlagerung der Zellkerne kam. Weiterhin wurde bei der angewendeten

Vorgehensweise keine Zentromer-Sonde eingesetzt, die eine Bestimmung der Anzahl des Chromosoms 7 je Zelle ermöglicht hätte. Während der DNA Replikation können jedoch aneuploide Tumorzellen bis zu 8 Kopien pro Zellkern aufweisen (Tanner et al. 2000). Folglich konnte nicht sicher zwischen einer möglichen chromosomalen Polyploidie und einer schwachen Amplifikation des EGFR-Gens unterschieden werden. Ließ sich keine Anzahl von mehr als 10 Kopien des EGFR-Gens je Zelle feststellen, wurde der Fall als nicht amplifiziert gewertet. Unter analoger Anwendung dieser von Tanner et al. beschriebenen Kriterien wurden 17% (2 von 12) der Primärtumore als amplifiziert gewertet. Diese Ergebnisse wurden durch eine PCR des EGFR-Gens, die in der Klinik für Neurochirurgie durchgeführt wurde, bestätigt. Auch bei der FISH konnten einzelne Zellen mit einer Amplifikation des EGFR-Gens beobachtet werden bei nicht erhöhter Kopien-Anzahl im umgebenden Gewebe.

Ergebnisse der Untersuchung der Primärtumore						
Fall Nr.	EMMPRIN-IHC	EGFR-IHC	EGFR-FISH	EGFR-PCR	p53-IHC	Ki-67-IHC
1.	++	+++	11,1 Kopien	+	15%	25%
2.	+++	+	n.a.	-	57%	35%
3.	+++	+++	Cluster	+	0%	0%
4.	+++	+	n.a.	-	90%	Sehr hoch
5.	+++	+	n.a.	-	50%	30%
6.	+++	-	n.a.	-	5%	10%
7.	+++	++	n.a.	-	0%	14%
8.	+++	+	n.a.	-	60%	30%
9.	+++	-	n.a.	-	0%	0%
10.	+++	+	n.a.	-	20%	10%
11.	++	-	n.a.	-	0%	10%
12.	+++	+	n.a.	-	35%	25%

(-) = negativ; (+) = schwach positiv; (++) = mäßig positiv; (+++) = stark positiv; n.a. = nicht amplifiziert

**Tabelle 9: Ergebnisse der Untersuchung der Primärtumore**

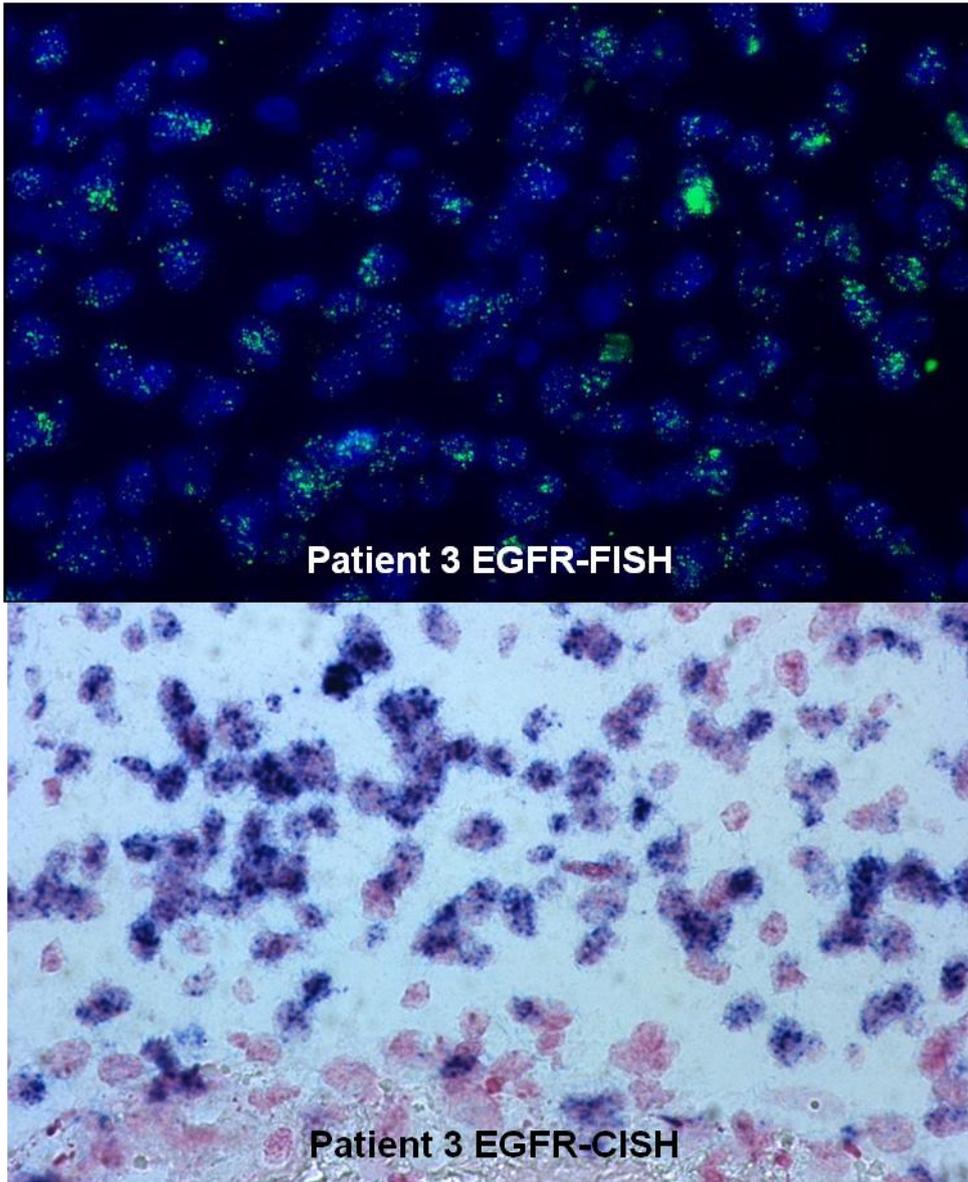


Abbildung 15: EGFR-FISH und EGFR-CISH an Primärtumoren

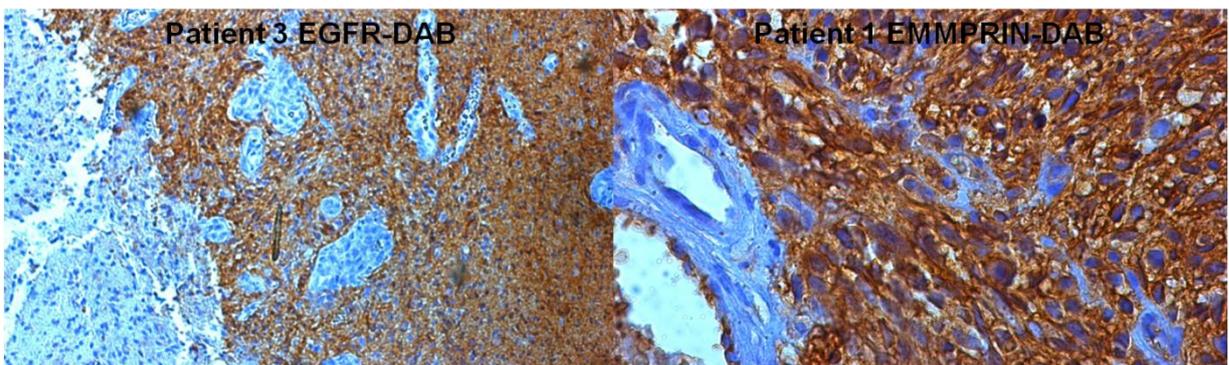


Abbildung 16: EGFR- und EMMPRIN-Immunhistochemie

### 3.2.2. Ergebnisse der Untersuchung von Patientenblut

#### 3.2.2.1. Immunzytochemische Untersuchungen

Von den ersten 4 Patienten (Fall 1 bis 4) wurden Zytospins mit der immunzytochemischen Färbung (alkalische Phosphatase) auf das Vorhandensein GFAP-positiver Zellen untersucht. Die Auswertung erfolgte mit dem ACIS-System (ChromaVision). Insgesamt wurden zunächst  $11,2 \times 10^6$  Zellen von vier Patienten untersucht. Unter diesen Zellen fanden sich insgesamt 14 mögliche CTC. Bei 75% (3 von 4) der Patienten konnten demnach GFAP-positive Zellen gefunden werden. Wie bereits im methodischen Teil der Arbeit erwähnt, wurde ein polyklonaler Primärantikörper (Dako Z334) eingesetzt. Für die Negativkontrolle konnte daher kein Antikörper gleichen Isotyps verwendet werden. Bei Untersuchung der Negativkontrollen, die also ohne Zugabe eines Primärantikörpers gefärbt wurden, konnten in 50% (2 von 4) der Fälle positive Zellen (3 Zellen unter  $2,8 \times 10^6$  MNC) beobachtet werden. Dies lässt die Möglichkeit einer unspezifischen Reaktion des Sekundärantikörpers mit Zellen des peripheren Blutes vermuten. Ob die positiven Zellen im Patientenblut nun tatsächlich GFAP exprimieren, oder ob die Färbung dieser Zellen auf einer unspezifischen Interaktion der Zellen mit dem Sekundärantikörper beruht, lies sich mit dieser Untersuchung nicht eruieren. Auch eine statistische Auswertung solcher Ergebnisse kam aufgrund des zu erwartenden kleinen Patientenkollektivs nicht in Betracht.

GFAP Immunzytochemie				
Fall Nr.	Untersuchte Zellen (in $10^6$ )	GFAP-positive Zellen	Zellen für Negativkontrolle (in $10^6$ )	Positive Zellen in Negativkontrolle
1.	4,2	3	0,7	0
2.	2,1	1	0,7	0
3.	2,8	10	0,7	2
4.	2,1	0	0,7	1
$\Sigma$	11,2	14	2,8	3

Tabelle 10: GFAP-Immunzytochemie

Wie bereits im methodischen Teil erwähnt, mussten daher alternative Nachweismethoden entwickelt werden. Diese sollte ebenso sensitiv wie die Immunzytochemie sein, jedoch deutlich spezifischer. Die Immunzytochemie lieferte den Vorteil einer automatischen Auswertung mit dem ACIS-System (ChromaVision), bei Verwenden einer Immunfluoreszenzfärbung musste eine solche Auswertung der Zytospins manuell am Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Eine Immunzytochemie kann prinzipiell auch als Doppelfärbung zweier Antigene erfolgen, der Farbunterschied fällt hier jedoch nicht so deutlich aus, was die Auswertung erschwert. Der Vorteil der Immunfluoreszenz liegt also darin, dass die Kombination zweier Antigene untersucht werden kann, der Nachteil jedoch in der Notwendigkeit einer manuellen Auswertung.

### **3.2.2.2. Immunfluoreszenz und FISH**

In der vorliegenden Studie wurden alle gewonnenen mononukleären Patientenzellen mit Immunfluoreszenzfärbungen auf die Expression von GFAP untersucht. Abzüglich der Zellen, die bereits für die Immunzytochemie verwendet wurden, ergab dies eine Summe von insgesamt  $116,2 \times 10^6$  MNC. Entsprechend der Expression des Primärtumors wurden die Zytospins der MNC zusätzlich auf die Expression eines zweiten Antigens untersucht:  $45,5 \times 10^6$  auf eine Expression von p53,  $4,9 \times 10^6$  auf eine Expression des EGF-Rezeptors und  $20,3 \times 10^6$  auf das membranständige EMMPRIN. Eine Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde nicht durchgeführt, da dieser häufig in normalen Blutzellen nachgewiesen werden konnte und daher nicht zur Identifizierung von CTC geeignet war. Eine weitere Charakterisierung möglicher CTC wäre hiermit jedoch möglich. Bei  $4,9 \times 10^6$  Zellen wurde nach Identifizierung GFAP-positiver Zellen in den Zytospins eine EGFR-FISH angeschlossen.

Es gelang mit der Immunfluoreszenz bei 58,3% (7 von 12) der Patienten, GFAP-positive Zellen nachzuweisen. Unter  $116,2 \times 10^6$  gefärbten mononukleären Patientenzellen konnten 15 GFAP-positive Zellen detektiert werden. Dies entspricht einer Häufigkeit von ca. einer GFAP-positiven Zelle je  $5,2 \times 10^6$  MNC, wenn man sich auf die  $77,7 \times 10^6$  MNC der Patienten mit Nachweis GFAP-positiver Zellen bezieht.

Jedoch ließ sich bei keiner dieser Zellen die Expression eines weiteren Glioblastom-typischen Proteins nachweisen. Ebenso zeigten die mittels EGFR-FISH markierten GFAP-positiven Zellen keine zusätzliche Amplifikation des EGFR-Gens. Ein solcher Nachweis hätte als starker Hinweis auf das Vorliegen zirkulierender Glioblastomtumorzellen gewertet werden können. Die Frage, ob es sich bei den detektierten GFAP-positiven Zellen tatsächlich um eine Expression von GFAP oder eine unspezifische Färbung durch den Sekundärantikörper handelte, blieb also weiter unbeantwortet.

Auch in den Negativkontrollen der Immunfluoreszenz fanden sich 2 positive Zellen, je eine bei Patient 3 und Patient 4 (entsprechend 16,7% der Patienten). Zwei weitere positive Zellen wurden in den Isotypkontrollen beobachtet, je eine für IgG1κ und IgG2ακ.

GFAP Immunfluoreszenz								
Fall Nr.	Untersuchte Zellen (in 10 <sup>6</sup> )					GFAP-positive Zellen	Negativ-Kontrolle (in 10 <sup>6</sup> )	GFAP-positive Zellen in Negativkontrolle
	GFAP	+p53	+EGFR	+EMMPRIN	+EGFR-FISH			
1.	11,2	0	1,4	1,4	1,4	2	0,7	0
2.	4,2	4,2	0	0	0	1	0,7	0
3.	7,7	0	3,5	0,7	3,5	6	1,4	1
4.	12,6	12,6	0	0	0	0	1,4	1
5.	18,9	11,9	0	2,8	0	2	2,1	0
6.	6,3	0	0	2,1	0	0	1,4	0
7.	3,5	0	0	3,5	0	0	0,7	0
8.	6,3	6,3	0	0	0	2	0,7	0
9.	9,8	0	0	4,2	0	0	1,4	0
10.	14,7	4,2	0	0	0	1	2,1	0
11.	14,7	0	0	5,6	0	1	2,1	0
12.	6,3	6,3	0	0	0	0	0,7	0
Σ	116,2	45,5	4,9	20,3	4,9	15	15,4	2

Tabelle 11: GFAP Immunfluoreszenz

Ergebnisse der Untersuchung von Patientenblut				
Fall Nr.	Immunzytochemie inklusive Mikromanipulation		Immunfluoreszenz	
	GFAP-positive Zellen	Negativkontrolle	GFAP-positive Zellen	Negativkontrolle
1.	3	0	2	0
2.	1	0	1	0
3.	26	2	6	1
4.	0	1	0	1
5.			2	0
6.			0	0
7.			0	0
8.			2	0
9.			0	0
10.			1	0
11.			1	0
12.			0	0
$\Sigma$	30	3	15	2
Relative Häufigkeit:	$30/(14 \times 10^6)$ $= 1/(4,7 \times 10^5)$	$3/(2,1 \times 10^6)$ $= 1/(7 \times 10^5)$	$15/(77,7 \times 10^6)$ $= 1/(5,2 \times 10^6)$	$2/(2,8 \times 10^6)$ $= 1/(1,4 \times 10^6)$

Tabelle 12: Ergebnisse der Untersuchung von Patientenblut

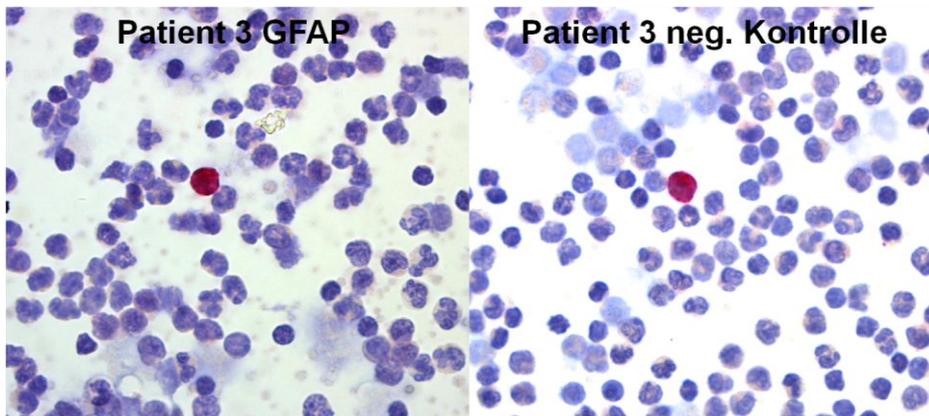


Abbildung 17: Immunzytochemie Patientenblut

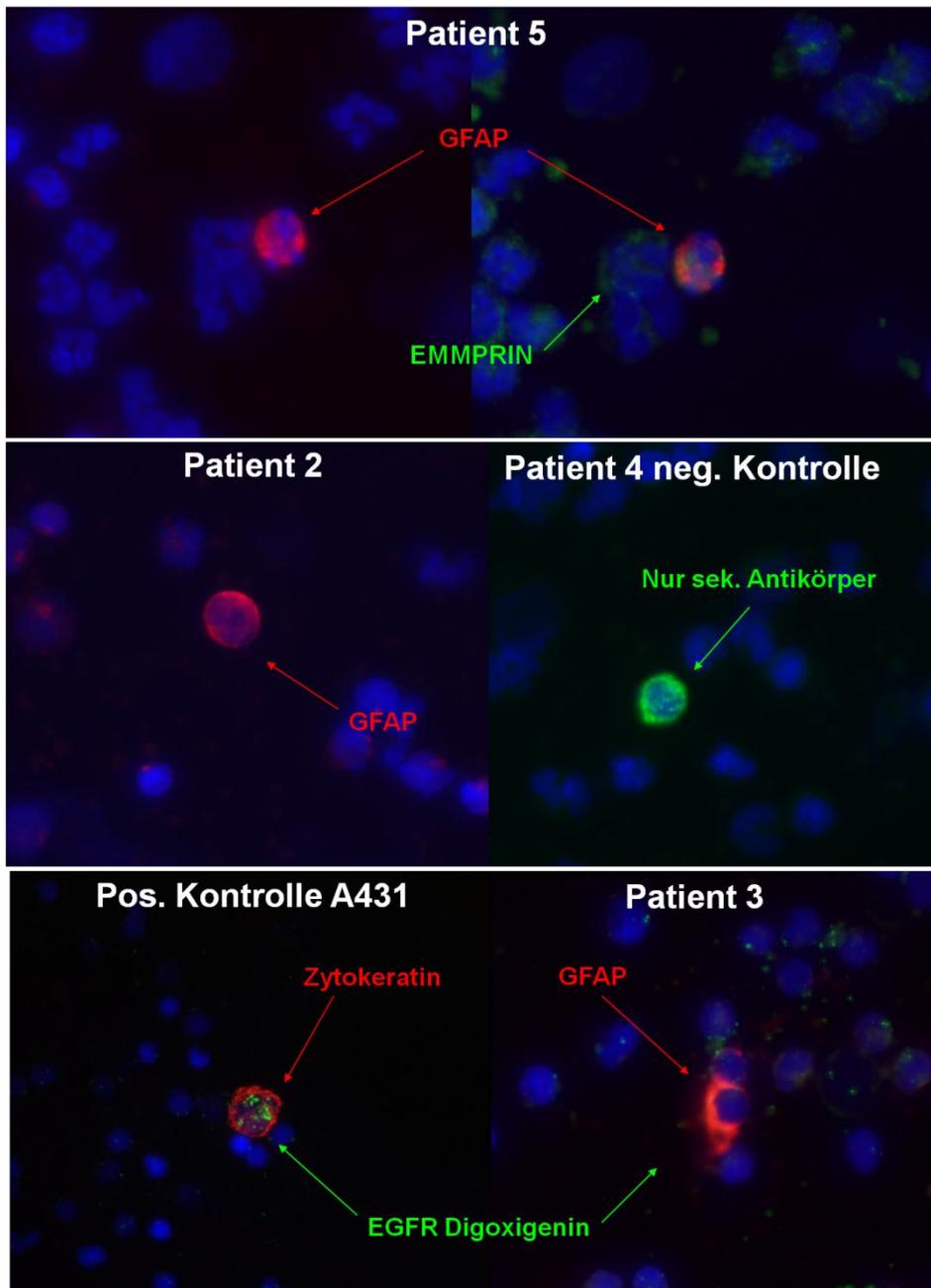


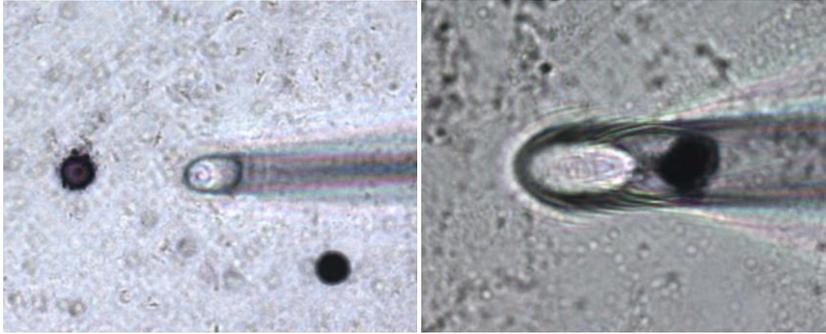
Abbildung 18: Immunfluoreszenz und FISH an Patientenblut

### 3.2.2.3. Mikromanipulation und CGH

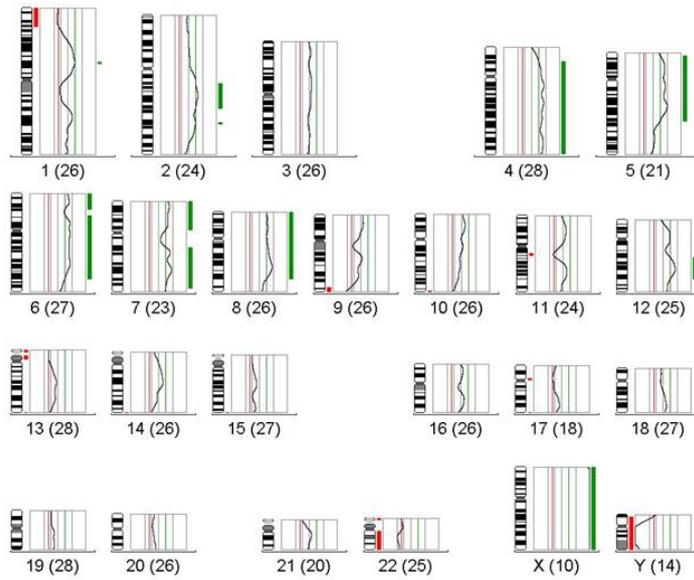
Eine Methode, mögliche zirkulierende Glioblastomtumorzellen weiter zu charakterisieren und sie aufgrund genomischer Aberrationen als Tumorzellen einordnen zu können, ist die Isolierung einzelner GFAP-positiver Zellen und die konsekutive molekularbiologische Untersuchung. Da die vorher beschriebenen Untersuchungen keinen Hinweis darauf erbrachten, dass es sich bei den GFAP-positiven Zellen tatsächlich um

Zellen malignen Ursprungs handelte, sollte ein solcher Verdacht mittels einer CGH einzelner dieser Zellen weiter erhärtet werden. Bei Patient Nummer 3 hatten sich in den vorhergehenden Färbungen viele GFAP-positive Zellen nachweisen lassen. Daher wurden  $5,6 \times 10^6$  Zellen dieses Patienten zunächst aufgehoben, um einen Versuch der Isolierung einzelner Zellen mittels Mikromanipulation zu unternehmen. Nach immunenzymatischer Färbung gemäß Abschnitt 2.2.7 fanden sich 16 GFAP-positive Zellen unter  $2,8 \times 10^6$  MNC, von denen 12 erfolgreich isoliert werden konnten.

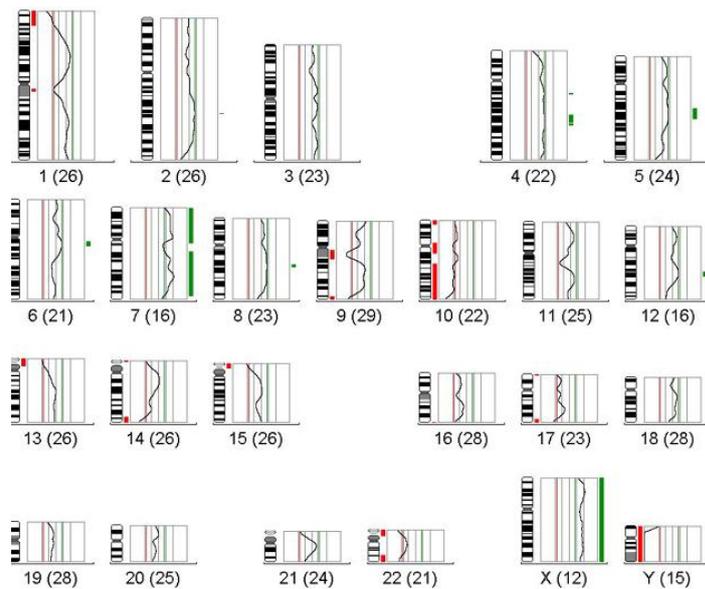
Die CGH der einzelnen Zellen gelang bei 9 von diesen und zeigte bei 5 Zellen ein Normalprofil. Vier der untersuchten Zellen zeigten jedoch ein aberrantes CGH-Profil. Drei davon zeigten nur knapp über dem Schwellenwert liegende Aberrationen, eine jedoch deutliche. Das deutlich aberrante Profil einer CTC wird in Abbildung 20 dargestellt. Hier ließ sich ein Zugewinn an genetischer Information auf den Chromosomen 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 und 12 nachweisen. Der Ort auf dem Chromosom 7p12, an dem die genetische Information des EGFR-Gens liegt war demnach auch amplifiziert. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Untersuchung des Primärtumors, der eine deutliche Amplifikation des EGFR-Gens aufwies. Weiterhin ließen sich Deletionen auf dem Chromosom 22 nachweisen. Der Verlust des Y Chromosoms zeigt an, dass es sich um ein weibliches Karyogramm handelt. Betrachtet man das CGH-Profil des zugehörigen Primärtumors in Abbildung 21, zeigt sich ein ähnliches Profil. Die Zugewinne und Verluste an DNA-Gehalt auf den korrespondierenden Chromosomen ähneln sich deutlich, wenngleich die Aberrationen bei dem Primärtumor nicht so deutlich ausgeprägt sind. Diese Erkenntnis ist ein starker Hinweis darauf, dass es sich bei einem Teil der gefunden zirkulierenden GFAP-positiven Zellen tatsächlich um zirkulierende Glioblastomzellen handelt. Die Tatsache, dass die Blutprobenentnahme der Patienten perioperativ erfolgte, lässt Raum zur Spekulation. Zum einen könnte es sich also um CTC, zum anderen um unter der Operation in den Blutkreislauf eingeschleppte Glioblastomzellen handeln. Der Blutentnahmezeitpunkt wurde so gewählt, um die Wahrscheinlichkeit des Antreffens von CTC zu erhöhen. Es kann also nicht beantwortet werden, ob sich solche CTC auch präoperativ im Blut nachweisen lassen können. Zumindest perioperativ scheint ihr Nachweis hier gelungen.



**Abbildung 19: Mikromanipulation mit zirkulierender GFAP-positiver Zelle**



**Abbildung 20: CGH-Profil einer möglichen CTC**



**Abbildung 21: CGH-Profil des entsprechenden Primärtumors**

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**

Seit einigen Jahren schon ist der Nachweis von CTC im Blut von Karzinompatienten in der Literatur beschrieben worden. Ähnlich wie bei den DTC im Knochenmark gelang es hierbei z. B., das Vorhandensein von CTC im Blut von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom mit dem rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberleben zu korrelieren und derart eine prognostische Relevanz hinsichtlich des klinischen Verlaufes aufzuzeigen (Cristofanilli et al. 2004). Da die venöse Blutentnahme im Vergleich zur Knochenmarkspunktion ein wenig invasives Verfahren zur Materialgewinnung ist, sind hierdurch wiederholte Verlaufskontrollen möglich. Die Überwachung des Therapieerfolges einer Chemotherapie oder einer Änderung des Therapieregimes könnte durch wiederholte Untersuchung auf CTC erfolgen (Pantel et al. 2008b).

Ein Nachweis von CTC bei Glioblastompatienten ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Der vergebliche Versuch CTC im Blut von solchen Patienten über die Detektion von GFAP-Transkripten nachzuweisen, wurde bereits vor einigen Jahren unternommen (Böhm et al. 2003). Die von dieser Arbeitsgruppe gewählte Vorgehensweise wird im Abschnitt 4.3 beschrieben. Die wiederholten Berichte über die systemische Metastasierung von Glioblastomen und die Beschreibung durch Organspende übertragener Glioblastometastasen lassen vermuten, dass CTC bei Glioblastompatienten irgendwann im Erkrankungsverlauf vorhanden sind. Aufgrund des kurzen klinischen Verlaufes der Erkrankung wird das Metastasierungspotential von Glioblastomen möglicherweise unterschätzt. Erkenntnisse darüber, ob das relativ seltene Auftreten klinisch apparenter Metastasen also im kurzen Krankheitsverlauf oder in den tumorbiologischen Eigenschaften von Glioblastomen im Vergleich mit anderen Malignomen begründet ist, liegen bisher nicht vor. Der Nachweis von CTC wäre daher ein wichtiger Schritt, um diese interessante Frage zu klären. Die Etablierung von Nachweisverfahren für CTC im Blut von Glioblastompatienten wurde in dieser Arbeit beschrieben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen und die daraus ableitbaren Schlussfolgerungen sollen im Folgenden diskutiert werden.

Die Tatsache, dass bei 7 der 12 Patienten (58,3%) GFAP-positive Zellen im peripheren Blut gefunden wurden, lässt mehrere Schlussfolgerungen zu. Erstens: Es könnte sich tatsächlich um zirkulierende Glioblastom-Tumorzellen handeln. Zweitens: Es handelt sich um falsch positive Ergebnisse, die auf einer unspezifischen Reaktion von Leukozyten mit dem Primär- und/oder Sekundärkörper beruhen. Drittens: Es handelt sich um eine ektope Expression von GFAP durch Leukozyten, die aufgrund ihres seltenen Auftretens von ca. 1 zu  $3 \times 10^6$  Zellen bisher nicht beobachtet wurde. Viertens: Es handelt sich bei einem Teil der Zellen um zirkulierende Glioblastom Tumorzellen, beim anderen Teil um falsch positive Ergebnisse.

Geht man davon aus, dass es sich um CTC handelt, müsste man weiterhin annehmen, dass diese Zellen im Zuge der Dissemination eine Expression von p53, EGFR und EMMPRIN nicht mehr aufweisen. Bei keiner der im peripheren Blut detektierten GFAP-positiven Zellen ließen sich diese Antigene nachweisen, obwohl die entsprechenden Primärtumore diese Antigene zumindest heterogen exprimierten. Alternativ wäre denkbar, dass gerade die zur Dissemination befähigten Zellen aus unbekanntem Gründen eine solche Expression nicht aufweisen. Allerdings stehen dieser Vermutung die Beobachtungen bei der Untersuchung der Negativkontrollen im Wege. Falsch positive Ergebnisse bzw. Zellen fanden sich sowohl in der Immunzytochemie als auch in der Immunfluoreszenz. Es war keine Negativkontrolle mit einem Antikörper gleichen Isotyps und ungerichteter Spezifität möglich, da ein polyklonaler anti-GFAP Primärantikörper (Dako Z334) eingesetzt wurde. Die Tatsache, dass sich auch Zellen in den Negativkontrollen fanden, die also ohne den Einsatz eines Primärantikörpers eine Immunreaktion zeigten, deutet hier auf eine unspezifische Reaktion zwischen den Leukozyten und den unterschiedlichen Sekundärantikörpern hin. Auf der anderen Seite schränkt das Fehlen eines Antikörpers gleichen Isotyps für die Negativkontrolle deren Aussagekräftigkeit ein.

Aus demselben Grund erscheint eine ektope Expression von GFAP durch Leukozyten ebenfalls eher unwahrscheinlich, wenn man eine unspezifische Immunreaktion unterstellt.

GFAP-positive Zellen und positive Zellen in den Negativkontrollen wurden bei der Immunfluoreszenz mit einer relativen Häufigkeit zwischen 1 pro  $5,2 \times 10^6$  bis 1 pro  $1,4 \times 10^6$  MNC (bezogen auf die Summe aller Patienten mit positiven Zellen) detektiert. Interessanterweise gelang ein Nachweis mit der Immunzytochemie deutlich häufiger. Die relative Häufigkeit betrug hier 1 GFAP-positive Zelle pro  $4,7 \times 10^5$  MNC und 1 positive Zelle in der Negativkontrolle pro  $7 \times 10^5$  MNC (ebenfalls nur auf die Summe der Patienten mit positiven Zellen bezogen). Insgesamt sticht jedoch der 3. Patient heraus, der mit einer positiven Zelle pro  $1,9 \times 10^5$  MNC (ICC) und einer Zelle pro  $1,3 \times 10^6$  MNC (IF) die höchste relative Häufigkeit bot. Dennoch fanden sich auch hier falsch positive Ergebnisse mit einer ähnlichen Häufigkeit von 1 Zelle pro  $3,5 \times 10^5$  MNC (ICC) und 1 Zelle pro  $1,4 \times 10^6$  MNC (IF). Wegen der geringen Patientenzahl ist eine ungleichmäßige Verteilung positiver Zellen oder das Fehlen solcher Zellen in den unterschiedlichen Untersuchungen möglicherweise auch zufällig bedingt.

Ein Nachweis positiver Zellen in Negativkontrollen bei immunenzymatischen Färbungen mit alkalischer Phosphatase wurde bereits in der Literatur beschrieben. Hier wurde bei der Untersuchung von Knochenmarksaspiraten gesunder Probanden auf Zytokeratin-positive Zellen eine unspezifische Färbung hämatopoetischer Zellen beobachtet (Borgen et al. 1998). Borgen et al. beschreiben eine Färbung hämatopoetischer Zellen ohne Zugabe eines Primärantikörpers, Isotypkontrolle oder Sekundärantikörpers. Die Inkubation mit alkalischer Phosphatase und Substratlösung alleine bewirkte eine Färbung dieser Zellen. Eine Immunreaktion bzw. Färbung nur mit Substratlösung blieb, wie auch in den eigenen Ergebnissen beobachtet wurde, aus. Eine endogene alkalische-Phosphatase-Aktivität der Zellen wurde daher ausgeschlossen. Die unspezifisch gefärbten Zellen wurden durch eine nachträgliche Färbung gegen Leukozytenantigene weiter charakterisiert. Aufgrund einer Positivität für die humanen Leichtkettenmoleküle  $\kappa$  und  $\lambda$  bei gleichzeitiger Negativität für das CD45 Antigen folgerten die Autoren, dass es sich hierbei um Plasmazellen handelt. Durch Zugabe von Levamisol in die Substratlösung wurde in den eigenen Versuchen die endogene alkalische-Phosphatase-Aktivität unterdrückt.

Der Unterschied der relativen Häufigkeit GFAP-positiver Zellen in Immunzytochemie und Immunfluoreszenz könnte zum einen zufällig und in der geringen Patientenzahl begründet sein. Zum anderen könnte dies aber auch auf eine unspezifische Färbung von Plasmazellen in den Negativkontrollen durch das alkalische-Phosphatase-Detektionssystem hindeuten. Eine genaue Klärung dieser Frage ist nicht möglich, da nicht exakt dieselben Objektträger in beiden Untersuchungen verwendet wurden.

Bezieht man ebenfalls die Farbintensität in der Immunfluoreszenz und morphologische Aspekte in diese Überlegungen mit ein, so lassen sich dennoch Unterschiede erkennen. Die meisten Zellen, u.a. alle falsch positiven Zellen, zeigten einen schmalen amorph bis leicht granulär gefärbten Zytoplasmasaum. Einige der GFAP-positiven Zellen zeigten jedoch einen breiteren, teils filamentös gefärbten Zytoplasmasaum. Ebenfalls interessant ist, dass manche GFAP-positive Zellen bei Patient 3 deutlich größer waren als die umgebenden MNC. Aus diesem Grund gelang es bei manchen Zellen nicht, sie während der Mikromanipulation mit der 40µm Glaskapillare aufzunehmen und für die CGH zu isolieren. Möglicherweise hätte sich unter diesen mehr Zellen mit aberranten CGH-Profil nachweisen lassen.

Auch wenn nur in einem Fall in der CGH ein deutlich aberrantes und dem Primärtumor ähnliches CGH-Profil zirkulierender GFAP-positiver Zelle zeigte, so ist dies ein starker Hinweis auf das Vorhandensein zirkulierender Glioblastom-Tumorzellen im peripheren Blut bei diesem Patienten. Die einzelnen genetischen Aberrationen in CTC und zugehörigem Primärtumor korrelierten dabei deutlich, wie in Abbildung 20 und Abbildung 21 ersichtlich. Wenn auch die Aberrationen im Primärtumor weniger stark ausgeprägt waren, ließ sich z. B. ein Zugewinn an genetischer Information auf Chromosom 7 in beiden CGH-Profilen nachweisen. Der lange Arm des Chromosoms 7, auf dem das EGFR-Gen lokalisiert ist (7p12), zeigte demnach auch einen deutlichen Zugewinn, welches mit der festgestellten EGFR-Amplifikation des Primärtumors korreliert. Die Vermutung, dass es sich bei einem Teil der GFAP-positiven Zellen um falsch positive Ergebnisse handelt, erscheint aber aufgrund der weiter oben beschriebenen Ergebnisse ebenfalls möglich. Zu beachten bleibt auch, dass es sich bei den detektierten Zellen aufgrund des perioperativen Blutentahmezeitpunktes auch um

intraoperativ in die Blutbahn eingeschleppte Gliomzellen handeln könnte, die nur zum Operationszeitpunkt im peripheren Blut zirkulierten.

#### **4.2. ALTERNATIVE NACHWEISVERFAHREN/ LÖSUNGSANSÄTZE**

Es wurden bisher keine erfolgreichen Nachweisverfahren für zirkulierende Glioblastom Tumorzellen in der Literatur beschrieben. Um ein solches für die Untersuchung von Patientenblut auswählen zu können, wurden unterschiedliche Verfahren zur Anreicherung und unterschiedliche Detektionssysteme bereits während der Vorversuche dieser Arbeit in in-vitro-Versuchen erprobt. Einige dieser Verfahren mussten jedoch als nicht geeignet verworfen werden und wurden daher für die Untersuchung von Patientenmaterial nicht weiter verwendet. Aus diesem Grund erfolgte keine ausführliche Beschreibung im methodischen Teil dieser Arbeit. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse sollen aber an dieser Stelle Erwähnung finden, um weitere Lösungsansätze von weniger zielführenden Verfahren abgrenzen zu können.

Unter anderem wurde eine immunzytochemische Färbung von GFAP (Dako Z334) mit Diaminobenzidin DAB getestet als Alternative für das in 2.2.6 beschriebene Verfahren, welches alkalische Phosphatase und Neufuchsin erfordert. Hierbei wurde ein Envision™-System (Dako) verwendet, das mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist. Das Chromogen DAB bildet durch Oxidation ein braunes, unlösliches Präzipitat. Derart wurden GFAP-positive Zellen braun gefärbt und detektiert. Mit diesem Enzymsubstrat kann aber auch die Aktivität von endogenen Peroxidasen in Peroxisomen und Mitochondrien sichtbar gemacht werden. Eine Unterdrückung der endogenen Peroxidase aller Leukozyten gelang mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von Wasserstoffperoxid nicht. Es fanden sich hier reichlich falsch positive MNC, die nur mit dem Substrat inkubiert worden waren.

Es wurde weiterhin eine Chromogene-in-situ-Hybridisierung (CISH) mit der zuvor beschriebenen EGFR-Sonde getestet. Die Kombination aus anti-GFAP/DAB Färbung und CISH wurde als weniger lichtlabile Alternative zur Kombination aus Immunfluoreszenz und FISH entwickelt. Hierbei wurde die hybridisierte EGFR-Sonde mit einem alkalische-Phosphatase-konjugierten anti-Digoxigenin Antikörper (Roche)

inkubiert und konnte durch Substratzugabe (BCIP/NBT) sichtbar gemacht werden. Für den GFAP-Nachweis konnte daher nicht ebenfalls das gleiche Chromogen eingesetzt werden. Für das Enzym alkalische-Phosphatase wurde alternativ Peroxidase verwendet. Eine Detektion GFAP-positiver Zellen und der konsekutive Nachweis einer EGFR-Amplifikation konnten aufgrund der oben beschriebenen endogenen Peroxidaseaktivität der Leukozyten mit diesem Verfahren aber nicht erfolgen.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurden auf den Zytospins MNC beobachtet, die eine unspezifische Reaktion mit den sekundären Fluoreszenzantikörpern (Alexa Fluor™ 488 und Alexa Fluor™ 546, Molecular Probes) zeigten. Ein weiterer Versuch zielte daher darauf ab, die Spezifität der Immunfluoreszenz Markierung von GFAP durch den Einsatz eines direkt markierten Primärantikörpers (Anti-GFAP, Clone 131-15019, Molecular Probes) zu erhöhen. Dies ist ein monoklonaler Maus-anti-GFAP Antikörper, der direkt mit einem Fluorochrom (Alexa Fluor™ 488) konjugiert ist. Bei in-vitro-Versuchen wurde dieser Antikörper an Zytospins MNC gesunder Probanden getestet. Es wurden keine MNC beobachtet, die eine unspezifische Reaktion zeigten. Mit diesem monoklonalen Antikörper konnte jedoch bei Zytospins, die mit einzelnen Glioblastomzellen (U373) versetzt wurden, lediglich eine Wiederfindungsrate von ca. 40% erzielt werden. Im Vergleich hierzu ließ sich eine Wiederfindungsrate von 79% bei Verwenden des polyklonalen Kaninchen anti-GFAP-Antikörpers (Dako Z334) mit Immunfluoreszenz erreichen. Eine weitere Erhöhung der Arbeitskonzentration wäre mit Einbußen bei der Spezifität der Färbung verbunden. Zusätzlich wäre eine Doppelfärbung eines weiteren Antigens mit diesem Antikörper nicht absolut negativ gewesen, da die Primärantikörper für EGFR, EMMPRIN und p53 ebenfalls murinen Ursprungs sind und daher Kreuzreaktionen zwischen den Primärantikörpern beobachtet wurden.

Aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich konstatieren, dass sich zirkulierende GFAP-positive Zellen im Blut von 7 von 12 Glioblastompatienten nachweisen ließen. Der Nachweis weiterer malignitätsverdächtiger Kriterien dieser Zellen ließ sich aber nur bei einem Patienten durch eine CGH erbringen. Um an diesen Zellen systematisch, weitere vom Primärtumor exprimierte Proteine oder genetische Aberrationen zu

detektieren und diese damit von unspezifisch reagierenden MNC abgrenzen zu können, wäre die weitere Anreicherung etwaiger CTC wünschenswert. Der ungleichmäßigen Verteilung der einzelnen möglichen CTC auf die Objektträger oder auch dem fehlenden Nachweis vorhandener CTC könnte derart entgegengewirkt werden. Vielleicht aber ist ihre Häufigkeit im Blut von Glioblastom-Patienten tatsächlich höher und die o.b. Anreicherungsverfahren sind im Gegensatz zu den Ergebnissen der Vorversuche bei der klinischen Anwendung nicht sensitiv genug. Die Tatsache, dass sich bei den Blutproben der 12 hier untersuchten Patienten, bei denen immerhin durchschnittlich mehr als  $10^7$  MNC untersucht wurden, nur eine Zelle nachweisen ließ, die neben einer Expression von GFAP auch eindeutige malignitätsverdächtige Kriterien aufwies, verdeutlicht die Notwendigkeit zusätzlicher Anreicherungsverfahren für CTC oder aber der Suche nach weiteren Markern.

GFAP gilt als das spezifischste Protein zur Identifikation astrozytärer Zellen. Die Heterogenität seiner Expression im Primärtumor und in sich von ihm lösenden CTC beeinträchtigt möglicherweise ebenfalls den Nachweis der CTC. Mit RNA-Microarrays könnten Expressionsanalysen an Glioblastomen durchgeführt werden. Es könnte untersucht werden, welche RNA-Moleküle spezifisch von Glioblastomzellen exprimiert werden. Antikörper gegen die Proteine, für die diese RNA-Transkripte kodieren, könnten allein oder gemeinsam mit anti-GFAP-Antikörpern für den immunhistochemischen oder Immunfluoreszenz-Nachweis von CTC eingesetzt werden.

Bevor aber Versuche zum Nachweis von CTC im peripheren Blut mit Immunfluoreszenzfärbungen unternommen werden sollten, muss die Konzentration der CTC in den zu untersuchenden Zellsuspensionen durch geeignete Verfahren gesteigert werden. Das Volumen der Blutproben könnte beispielsweise erhöht werden, um die Wahrscheinlichkeit der Detektion von CTC zu steigern. Um einzelne CTC, die womöglich nur mit einer Häufigkeit von 1 Zelle pro  $10^7$  bis  $10^8$  MNC auftreten, von dieser Anzahl MNC gezielt zu trennen, könnte man ebenfalls die Ergebnisse von Expressionsanalysen einsetzen. Man könnte also versuchen, die zirkulierenden Gliomzellen anhand von spezifisch exprimierten Proteinen zu selektieren und durch eine Kopplung mit dem Nachweis von GFAP zu detektieren. Wie im methodischen Teil

dieser Arbeit unter Abschnitt 2.2.9 vorgestellt, könnte eine Separation der CTC durch Separation mit ferromagnetischen Sekundärantikörpern (MACS® Microbeads) erfolgen.

Bei der immunmagnetischen Zellsortierung werden Antikörper eingesetzt, die an Oberflächenantigene der Zellen binden und direkt oder über einen Sekundärantikörper an magnetisierbare Microbeads gebunden werden können. Nachdem die Zellsuspension mit diesen Antikörpern inkubiert wurde, wird die Zellsuspension in eine mit Stahlwolle gefüllte Säule gegeben. In einem Magnetfeld werden so die mit Microbeads markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während nicht markierte Zellen diese passieren können. Nach Entfernen des Magnetfeldes können die markierten Zellen aus der Säule eluiert werden. Dieses Vorgehen wird als Positivselektion benannt. Bei der Negativselektion werden Primärantikörper eingesetzt, die gezielt gegen Oberflächenantigene von Leukozyten gerichtet sind. Nach Inkubation mit einem Microbead-beladenen Sekundärantikörper würden die Leukozyten in der magnetisierten Säule zurückgehalten und die Konzentration CTC in der Zellsuspension wird erhöht.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit magnetischer Positivselektion in Blut verdünnte U373-Gliomzellen anzureichern. Die Zellen wurden hierzu mit Primärantikörpern gegen GFAP bzw. EMMPRIN inkubiert und über einen Sekundärantikörper an Microbeads gekoppelt. Die genaue Vorgehensweise wird im Abschnitt 2.2.9 beschrieben. Es konnten jedoch lediglich Wiederfindungsraten von 12,4% bis 18,4% für eine Positivselektion EMMPRIN-exprimierender U373-Zellen erreicht werden. Diese Zellen konnten nach der magnetischen Anreicherung über die Expression von GFAP bei der Immunfluoreszenzfärbung identifiziert werden. Eine Positivselektion mittels GFAP gelang jedoch nicht. Eine Bindung des Primärantikörpers an die eingesetzten U373-Zelllinienzellen während der Separation konnte hierbei mit Immunfluoreszenz demonstriert werden. Es kam jedoch wiederholt zur Agglutination von U373-Zellen, was möglicherweise ein Binden an die magnetisierte Säule verhinderte. Die Zellen fanden sich ausschließlich in der Negativfraktion, d.h. in dem Teil der Zellsuspension, der nach einer magnetischen Separation verworfen werden sollte. Aufgrund der relativ geringen Wiederfindungsraten für die Positivselektion

EMMPRIN-exprimierender U373-Zellen wurde die ferromagnetische Anreicherung nicht für die Untersuchung von Patientenblut eingesetzt.

Die Versuche zur Selektion mit ferromagnetischen Antikörpern zeigen, dass eine zusätzliche Anreicherung von CTC über von ihnen exprimierte Oberflächenantigene mit ferromagnetischen Antikörpern zwar prinzipiell möglich ist, bei diesem Verfahren jedoch zusätzliche Wasch- und Zentrifugationschritte mit Überführen der Zellsuspension von Gefäß zu Gefäß nötig sind. Hieraus ergibt sich also ein zusätzlicher mechanischer Stress für die gesuchten Zellen, der möglicherweise die Wiederfindungsrate negativ beeinträchtigt. Eine weitere Entwicklung des vom Hersteller empfohlenen Arbeitsprotokolls zur Adaptation an die Anreicherung zirkulierender Gliomzellen ist also erforderlich. Alternativ ist ebenso eine Anreicherung über andere Oberflächenantigene möglich. Eine Markierung der Gliomzellen mit Microbeads könnte z. B. auch mit Antikörpern gegen EGFR oder CD133 erfolgen. Zur Suche nach zusätzlichen möglichen Markerproteinen, über die eine immunomagnetische Anreicherung bzw. eine Detektion zirkulierender Gliomzellen erfolgen könnte, könnten wie oben beschrieben RNA Microarrays eingesetzt werden.

### **4.3. AUSBLICK**

Die Weiterentwicklung der Verfahren zur Isolierung von CTC aus dem Blut von Karzinom-Patienten wird aktuell vielfach beschrieben. Insbesondere die Zulassung des CellSearch-Systems durch die FDA (Food and Drug Administration) ermöglichte die weitere Standardisierung der CTC-Isolation. Vielleicht lassen sich bereits erzielte Fortschritte auf diesem Feld, wie z. B. die immunomagnetische Selektion von Zellen epithelialer Herkunft mit anti-EpCAM-Antikörpern auf die Suche nach zirkulierenden Gliomzellen übertragen. Beim CellSearch-System wird die Kombination aus Positivselektion eines Oberflächenantigens mit der Färbung des Zytoskelettes epithelialer Zellen kombiniert. Gleichzeitig werden Leukozyten über ihre Oberflächenantigene erkannt. Durch solch eine Verknüpfung der magnetischen Anreicherung über Oberflächenantigene, dem Fluoreszenznachweis von GFAP sowie dem Erkennen von Leukozyten mit unspezifischer Immunreaktion könnte der Nachweis zirkulierender Gliomzellen in einem standardisiertem Verfahren erfolgen. Wie oben

erwähnt, ist hierfür die Identifikation neuer Markerproteine zur Selektion und Detektion zirkulierender Gliomzellen erforderlich. In neueren Veröffentlichungen wurden unter Verwendung von Microarrays Genexpressionsprofile von Glioblastomen erstellt, die den Einfluss einer Überexpression bestimmter Proteine mit dem klinischen Verlauf korrelieren konnten. Hier konnten unter vielen anderen die Stammzell-Marker CD133 und Nestin identifiziert werden (Colman et al. 2010). Möglicherweise ergibt sich hier eine neue Perspektive. Nach der Stammzelltheorie sind die Stammzellen eine Subpopulation im Primärtumor, in denen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung erhalten bleibt. Nach Dissemination in die Körperperipherie können daher aus diesen Zellen durch Proliferation manifeste Metastasen entstehen. Diese Eigenschaft ähnelt denen der dormanten DTC bzw. CTC. Darüber hinaus besteht in der Therapieresistenz der DTC und CTC sowie der Therapieresistenz der Glioblastome mit Überexpression von Stammzellmarkern eine weitere Ähnlichkeit (Murat et al. 2008, Colman et al. 2010).

Eine weitere Verfahrensweise zum Nachweis disseminierter Tumorzellen aus dem Blut von Malignompatienten sind PCR-basierte Untersuchungen. Hierbei wurde bereits Ende der 1990er Jahre eine Sensitivität von 1 zu  $10^7$  MNC für die Detektion von DTC beschrieben (Brakenhoff et al. 1999). Es besteht zum einen die Möglichkeit, im Primärtumor exprimierte mRNA direkt aus dem Vollblut mittels Reverser Transkriptase (RT) und nachfolgender quantitativer PCR nachzuweisen. Alternativ kann der mRNA-Nachweis nach Anreicherung der DTC und CTC mit immunomagnetischen Anreicherungsverfahren unternommen werden (Pantel et al. 2008b). Bereits vor einigen Jahren wurde der Versuch unternommen mit PCR-basierten Verfahren CTC im Blut von Glioblastompatienten nachzuweisen. Hierbei wurde eine Real-Time RT-PCR für GFAP-Transkripte (mRNA) an 3 ml Zitrat-Blut durchgeführt. Bei keinem der Patienten ließ sich derart eine GFAP Expression im peripheren Blut nachweisen. Kalibriert wurde dieses System auf eine Nachweisgrenze zur Detektion einer GFAP-positiven Zelle (hier ebenfalls Zelllinie U373) unter  $10^6$  GFAP negativen Zellen. (Böhm et al. 2003). Sollen PCR-basierte Nachweisverfahren zur Detektion zirkulierender Gliomzellen zum Einsatz gelangen, ist die Identifikation glioblastomspezifischer mRNA-Marker erforderlich, wie sie bereits bei anderen Neoplasien gelang (Bai et al. 2007). Alternativ wäre der Einsatz einer Array-CGH möglich, um Amplifikationen bestimmter chromosomaler Bereiche zu

identifizieren, die für Glioblastome spezifisch sind. Mit einer Whole-Genome-Amplification an GFAP-positiven Einzelzellen durchgeführt, die mittels Mikromanipulation gewonnen wurden, könnte dann das genetische Material vervielfältigt werden. Mit einer anschließenden quantitativen PCR wäre es möglich, den Grad der Amplifikation einzelner Glioblastom-spezifischer genomischer Regionen zu ermitteln.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die umfangreichen Veröffentlichungen von Case Reports über extraneurale Metastasierung von Glioblastomen und Übertragungen von Glioblastometastasen durch Organspenden legen die Möglichkeit einer systemischen Aussaat von Tumorzellen im Krankheitsverlauf nahe. Fälle, in denen eine solche Disseminierung auch ohne eine Kraniotomie geschieht, zeigen, dass eine intraoperative Verschleppung von Tumorzellen in die Blutbahn hierfür nicht eine zwingende Voraussetzung ist. Möglicherweise wird das Metastasierungspotential von Glioblastomen aufgrund der weiterhin recht kurzen Überlebenszeit dieser Patienten unterschätzt. Der Nachweis von CTC aus dem Blut von Glioblastom-Patienten scheint technisch möglich zu sein. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Nachweismethoden demonstriert. Diese Verfahren wurden in in-vitro-Versuchen evaluiert. Es konnten bei 7 von 12 der untersuchten Patientenblutproben zirkulierende GFAP-positive Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen werden. Bei einem der 12 Patienten konnten weitere Malignitätskriterien an diesen Zellen aufgezeigt werden. Eine höhere Prävalenz an Patienten im subklinisch generalisierten Erkrankungsstadium ist nach Literaturlage in der Transplantationschirurgie auch nicht zu erwarten. Die CGH-Profile der CTC sowie des Primärtumors des entsprechenden Patienten zeigten deutliche Ähnlichkeiten. Obwohl die zumindest heterogene Expression von EMMPRIN, p53, EGFR an den Primärtumoren mit Immunhistochemie bewiesen wurde, ließ sich diese an den detektierten GFAP-positiven Zellen nicht belegen. Eine Amplifikation des EGFR-Gens konnte mit einer EGFR-FISH bei 2 von 12 der Primärtumore beobachtet werden. Diese war aber bei zirkulierenden GFAP-positiven Zellen der entsprechenden Patienten nicht nachzuweisen. Die Weiterentwicklung von Nachweisverfahren wie die immunomagnetische Anreicherung von zirkulierenden Gliomzellen, die Negativselektion mittels Leukozytendepletion oder PCR-basierte Nachweisverfahren sind erforderlich. Um Aussagen über die Häufigkeit, die tumorbiologischen Eigenschaften oder die klinische Relevanz zirkulierender Gliomzellen treffen zu können, ist die Entwicklung sensitiver Methoden erforderlich. Erkenntnisse darüber, ob die relativ seltene Metastasierung von Glioblastompatienten im kurzen klinischen Erkrankungsverlauf oder aber in den tumorbiologischen Eigenschaften etwaiger zirkulierender Gliomzellen begründet liegt, lassen sich aktuell noch nicht gewinnen.

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen sowie der Literaturlage im Bereich der Transplantationschirurgie lässt sich folgern, dass Spenderorgane von Glioblastompatienten lediglich als mögliche Brückenlösung bei klinisch dringendem Handlungsbedarf auf der Empfängerseite verwendet werden sollten. Vor dem Hintergrund des weltweit bestehenden Organmangels wäre die Identifizierung solcher Organspender mit okkulten Disseminierungen von Gliomzellen wünschenswert, um diese von der Organspende auszuschließen. Im Umkehrschluss könnten Organspender ohne Nachweis von CTC vielleicht mit erhöhter Sicherheit und damit häufiger zur Organspende zugelassen werden.

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACIS	Automated Cellular Imaging System
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CGH	Comparative genomische Hybridisierung
CISH	Chromogene in situ Hybridisierung
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	Disseminierte Tumorzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metallo Proteinase Inducer
Fab	Fragment Antigen-binding
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
HNPCC	Hereditary Non Polyposis Coli Carcinoma
HPL-DNA	Humane plazentare DNA
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICC	Immunzytochemie
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunoglobulin
LOH	Loss of Heterocycosity
MGMT	Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase
MNC	Mononukleäre Zellen

MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NBT	Nitroblau Tetrazolium Chlorid
OPTN	Organ Procurement and Transplantation Network
OT	Objekträger
PAC	P1-derived Artificial Chromosome
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTEN	Phosphatase and Tensin Homology Gene
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCID	Severe Combined Immunodeficient
SSC	Saline Sodium Citrate Buffer
TBST	Tris Buffered Saline with Tween
UNOS	United Network for Organ Sharing
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nerven System
CTC	Zirkulierende Tumorzellen

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Adn, M., Riffaud, L., Amlashi, S. F., Saikali, S., Brassier, G., & Morandi, X. (2003). Pleuro-pulmonary metastases of a cerebral glioblastoma. *Presse Med* 32: 1417.
- Albert, F. K. (1986). Tumor hemorrhage in intracranial tumors. *Neurochirurgia* 29: 67-74.
- Alix-Panabières, C., Riethdorf, S., & Pantel, K. (2008). Circulating Tumor Cells and Bone Marrow Micrometastasis. *Clin Cancer Res* 14: 513-521.
- Allan, R. S. (2004). Scalp metastasis from glioblastoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 559.
- Annual Report of the US OPTN/SRTR. (2007). Transplant Data 1997-2006. *HHS/HRSA/HSB/DO* .
- Armanios, M. Y., Grossman, S. A., Yang, S. C., White, B., Perry, A., Burger, P. C., Orens, J. B. (2004). Transmission of glioblastoma multiforme following bilateral lung transplantation from an affected donor: case study and review of the literature. *Neuro Oncol* 6: 259-263.
- Arteaga, C. L. (2002). Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 7: 31-39.
- Astner, S., Pihusch, R., Nieder, C., Rachinger, W., Lohner, H., Tonn, J. C., Molls J. C., Grosu, A. L. (2006). Extensive local and systemic therapy in extraneural metastasized glioblastoma multiforme. *Anticancer Res* 26: 4917-4920.
- Ates, L. E., Bayindir, C., Bilgic, B., & Karasu, A. (2003). Glioblastoma with lymph node metastases. *Neuropathology* 23: 146-149.
- Bai, V. U., Kaseb, A., Tejwani, S., Divine, G. W., Barrack, E. R., Menon, M., Pardee, A. B., Reddy, G. P. (2007). Identification of prostate cancer mRNA markers by averaged differential expression and their detection in biopsies, blood, and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2343-2348.
- Bailey, P., & Cushing, H. (1926). *A Classification of Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis*. J. B. Lippincott, Philadelphia.
- Balasubramaniam, A., Shannon, P., Hodaie, M., Laperriere, N., Michaels, H., & Guha, A. (2007). Glioblastoma multiforme after stereotactic radiotherapy for acoustic neuroma: case report and review of the literature. *Neuro Oncol* 9: 447-453.

- Biernat, W., Huang, H., Yokoo, H., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (2004). Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol* 14: 131-136.
- Bigner, S. H., Wong, A. J., Mark, J., Muhlbaier, L. H., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Bigner, D. D. (1987). Relationship between gene amplification and chromosomal deviations in malignant human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 29: 165-170.
- Bigner, S. H., Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Mark, J., Friedmann, H. S., Bigner, D. D. (1990). Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50: 8017-8022.
- Bilkenroth, U., Taubert, H., Riemann, D., Rebmann, U., Heynemann, H., & Meye, A. (2001). Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation. *Int J Cancer* 92: 577-582.
- Bode, M. K., Ruohonen, J., Nieminen, M. T., & Pyhtinen, J. (2006). Potential of diffusion imaging in brain tumors: a review. *Acta Radiol* 47 (6): 585-594.
- Bogler, O., Huang, H. J., Kleihues, P., & Cavenee, W. K. (1995). The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* 15: 308-327.
- Böhm, C., Wassmann, H., & Paulus, W. (2003). No evidence of tumour cells in blood of patients with glioma. *Mol Pathol* 56: 187-189.
- Borgen, E., Beiske, K., Trachsel, S., Nesland, J. M., Kvalheim, G., Herstad, T. K., Schlichting, E., Qvist, H., Naume, B. (1998). Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J Pathol.* 185 (4): 427-34.
- Bosmans, J. L., Ysebaert, D., DeCock, A. M., Hauben, E., Muylle, L., Schrijvers, D., van Marck, E., Eykens, E., DeBroe, M. E. (1997). Interferon-alpha and the cure of metastasis of a malignant meningeoma in a kidney allograft recipient: A case report. *Transplant Proc* 29: 838.
- Bouillot-Eimer, S., Loiseau, H., & Vital, A. (2005). Subcutaneous tumoral seeding from a glioblastoma following stereotactic biopsy: case report and review of the literature. *Clin Neuropathol* 24(6): 247-251.
- Brada, M., Sharpe, G., Rajan, B., Britton, J., Wilkins, P. R., Guerrero, J., Hines, F., Traish, D., Ashley, S. (1999). Modifying radical radiotherapy in high grade gliomas:

shortening the treatment time through acceleration. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43: 287-292.

Brakenhoff, R. H., Stroomer, J. G., ten Brink, C., de Bree, R., Weima, S. M., Snow, G. B., et al. (1999). Sensitive detection of squamous cells in bone marrow and blood of head and neck cancer patients by E48 reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 5: 725-732.

Brandt, B., & Griwatz, C. (1996). Two layer boyant density centrifugation gradient for enrichment of prostate-derived cells and cell clusters from peripheral blood. *Clin Chem* 42: 1881-1882.

Braun, S., Kentenich, C., Janni, W., Hepp, F., de Waal, J., Wilgeroth, F., et al. (2000a). Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 18: 80-86.

Braun, S., Pantel, K., Müller, P., Janni, W., Hepp, F., Kentenich, C. R., et al. (2000b). Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 342: 525-533.

Braun, S., Vogl, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P., Coombes, R. C., et al. (2005). A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353: 793-802.

Burger, P. C. (1983). Pathologic anatomy and CT correlations in the glioblastoma multiforme. *Appl Neurophysiol* 46: 180-187.

Burger, P. C., Shibata, T., & Kleihues, P. (1986). The use of monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol* 10: 611-617.

Burton, E. C., Lamborn, K. R., Forsyth, P., Scott, J., O'Campo, J., Uyehara-Lock, J., et al. (2002). Abberant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors. *Clin Cancer Res* 8: 180-187.

Chelly, I., Mekni, A., Ferchichi, L., Houissa, S., Kchir, N., Haouet, S., et al. (2006). Bone metastasis from a glioblastoma: An unusual course!. *Neurochirurgie* 52: 367-370.

Chivukula, M., Dincer, H. E., Biller, J. A., Krouwer, H. G., Simon, G., & Shidham, V. (2005). FNAB cytology of extra-cranial metastasis of glioblastoma multiforme may resemble a lung primary: a diagnostic pitfall. *Cytojournal* 2: 9.

- Colman, H., Zhang, L., Sulman, E. P., McDonald, J. M., Shooshtari, N. L., Rivera, A., et al. (2010). A multigene predictor of outcome in glioblastoma. *Neuro Oncol* 12: 49-57.
- Colquhoun, S. D., Robert, M. E., Shaked, A., Rosenthal, J. T., Millis, T. M., Farmer, D. G., et al. (1994). Transmission of CNS malignancy by organ transplantation. *Transplantation* 57: 970-974.
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., et al. (2004). Circulating tumor cells, disease progression and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351: 781-791.
- Daumas-Duport, C., Scheithauer, B., O'Fallon, J., & Kelly, P. (1988). Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62: 2152-2165.
- Davis, J. D., & Schwartz, J. (1988). Trends in cancer mortality: US white males and females. *Lancet* 1: 633-636.
- DeAngelis, L. M. (2001). Brain Tumors. *N Engl J Med* 344: 114-123.
- Del Valle, L., Azizi, A. A., Krynska, B., Enam, S., Croul, S. E., & Khalili, K. (2000). Reactivation of human neurotropic JC Virus expressing oncogenetic protein in a recurrent glioblastoma multiforme. *Ann Neurol* 48: 932-936.
- Didelot, A., Taillandier, L., Grignon, Y., Vespignani, H., & Beauchesne, P. (2006). Concomitant bone marrow metastasis of a glioblastoma multiforme revealed at the diagnosis. *Acta Neurochir (Wien)* 148: 997-1000.
- Dolman, C. L. (1974). Lymph node metastasis as first manifestation of glioblastoma. Case report. *J Neurosurg* 41: 607-609.
- Dropcho, E. J., & Soong, S. J. (1996). The prognostic impact of prior low-grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology* 47: 684-690.
- Ellis, S. M., Nabeshima, K., & Biswas, C. (1989). Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Res* 49: 3385-3391.
- Eng, L. F., & Rubinstein, L. J. (1978). Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J Histochem Cytochem* 26: 513-522.
- Fabi, A., Vidiri, A., Carapella, C., Pace, A., Occhipinti, E., Caroli, F., et al. (2004). Bone metastasis from glioblastoma multiforme without central nervous system relapse: a case report. *Anticancer Res* 24: 2563-2565.

- Fatt, M. A., Horton, K. M., & Fishman, E. K. (2008). Transmission of metastatic glioblastoma multiforme from donor to lung transplant recipient. *J Comput Assist Tomogr* 32: 407-409.
- Fehm, T., Sagalowsky, A., Clifford, E., Beitsch, P., Saboorian, H., Euhus, D., et al. (2002). Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* 8: 2073-2084.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nature Rev Cancer* 3: 453-458.
- Fiegler, H., Geigl, J. B., Langer, S., Rigler, D., Porter, K., Unger, K., et al. (2006). High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res.* 35(3): e15
- Frank, S., Müller, J., Bonk, C., Haroske, G., Schackert, H. K., & Schackert, G. (1998). Transmission of glioblastoma multiforme through liver transplantation. *Lancet* 352: 31.
- Gadji, M., Crous, A. M., Fortin, D., Kreck, J., Torchia, M., Mai, S., et al. (2009). EGF receptor inhibitors in the treatment of glioblastoma multiform: old clinical allies and newly emerging therapeutic concepts. *Eur J Pharmacol* 625: 23-33.
- Gangnus, R., Langer, S., Breit, E., Pantel, K., & Speicher, M. R. (2004). Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 10: 3457-3464.
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes. (2008). *Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin
- Giese, A., & Westphal, M. (2001). Treatment of malignant glioma. A problem beyond the margins of resection. *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 217-225.
- Glioma Meta Analysis Trialists (GMT) Group. (2002). Chemotherapy for high-grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD003913.
- Gower, W. R., McSweeney, E. M., Dyben, T. E., & Fabri, P. J. (1985). Identification of gastrin-producing cells in cell cultures and smears: an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) technique. *J Histochem Cytochem* 33: 1087-1089.
- Hall, W. A. (1998). The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions. *Cancer* 82: 1749-1755.
- Hansen, G. (2003). *Herstellung egfr-spezifischer DNA-Sonden für die in-situ-Hybridisierung*. Diplomarbeit. Fachhochschule Gelsenkirchen.

- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., & Weller, M. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 997-1003.
- Hermanek, P. (1999). Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer Res* 19: 2771-2774.
- Hess, K. R. (1999). Extend of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *J Neurooncol* 42: 227-231.
- Hoffman, H., & Duffner, P. (1985). Extraneural Metastases of Central Nervous System Tumors. *Cancer* 56: 1778-1782.
- Hsu, E., Keene, D., Ventureyra, E., Matzinger, M. A., Jimenez, C., Wang, H. S., et al. (1998). Bone marrow metastasis in astrocytic gliomata. *J Neurooncol* 37: 285-293.
- Huang, P., Allam, A., Taghian, A., Freeman, J., Duffy, M., & Suit, H. (1995). Growth and metastatic behavior of five human glioblastomas compared with nine other histological types of human tumor xenografts in SCID mice. *J Neurosurg* 83: 308-315.
- Ichimura, K., Schmidt, E. E., Miyakawa, A., Goike, H. M., & Collins, V. P. (1998). Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* 22: 9-15.
- Jahraus, C. D., Dishop, M. K., Bayliff, S. L., Lee, C., & St Clair, W. H. (2003). Atypical presentation and progression of glioblastoma multiforme in a 6-year-old girl: multidisciplinary case report. *J Pediatr Hematol Oncol* 25: 243-247.
- Ji, J., Black, K. L., & Yu, J. S. (2010). Glioma stem cell research for the development of immunotherapy. *Neurosurg Clin N Am* 21: 159-166.
- Jonas, S., Bechstein, W. O., Lemmens, H. P., Neuhaus, R., Thalmann, U., & Neuhaus, P. (1996). Liver graft-transmitted glioblastoma multiforme. A case report and experience with 13 multiorgan donors suffering from primary cerebral neoplasia. *Transpl Int* 9: 426-429.
- Karamitopoulou, E., Perentes, E., Diamantis, I., & Maraziotis, T. (1994). Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol* 87: 47-54.

- Kataoka, H., DeCastro, R., Zucker, S., & Biswas, C. (1993). Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res* 53: 3154-3158.
- Kauffman, H. M., McBride, M. A., Cherikh, W. S., Spain, P. C., & Delmonico, F. L. (2002). Transplant tumor registry: donors with central nervous system tumors. *Transplantation* 73: 579-582.
- Kauffman, H. M., Cherikh, W. S., McBride, M. A., Cheng, Y., & Hanto, D. W. (2007). Deceased donors with a past history of malignancy: an organ procurement and transplantation network/united network for organ sharing update. *Transplantation* 84: 272-274.
- Kelly, P. J., Dumas-Duport, C., Kispert, D. B., Kall, B. A., Scheithauer, B. W., & Illig, J. J. (1987). Imaging-based stereotaxic serial biopsies in untreated intracranial neoplasms. *J Neurosurg* 66: 865-874.
- Kernohan, J. W., Mabon, R. F., Svien, H. J., & Adson, A. W. (1949). A simplified classification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 24: 71-75.
- Kleihues, P., Burger, P. C., & Scheithauer, B. W. (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 3: 255-268.
- Kleihues, P., & Sobin, L. H. (2000). World Health Organisation classification of tumors. *Cancer*: 2887.
- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., et al. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 215-225.
- Klein, C. A., Blankenstein, T. J., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N. H., et al. (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumor cells in minimal residual cancer. *Lancet* 360: 683-689.
- Kos, S., Wetzel, S. G., & Ott, H. W. (2007). Extracranial spread of a glioblastoma: MRT and MR-perfusion. *Rofa* 179: 1200-1001.
- Kraft, M., Lang, F., Braunschweig, R., & Janzer, R. C. (2007). Parotid gland metastasis from glioblastoma multiforme: a case report and review of the literature. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 265: 709-711.

- Kreth, F. W., Berlis, A., Spiropoulou, V., Faist, M., Scheremet, R., Rossner, R., et al. (1999). The role of tumor resection in the treatment of glioblastoma multiforme in adults. *Cancer* 86: 2117-2123.
- Kühn, U., Köhler, H. H., & Jecker, P. (2003). [Rare tumors of the parotid gland. Lymphadenoma of a sebaceous gland and extracranial metastasis from glioblastoma]. *HNO* 51: 417-420.
- Lane, D. P., & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.
- Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.
- Lantos, P. L., Louis, D. N., Rosenblum, M. K., & Kleihues, P. (2002). *Tumours of the Nervous System*. Oxford University Press. London.
- Laperriere, N., Zuraw, L., & Cairncross, G. (2002). The Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol* 64: 259-273.
- Laws, E. R., Parney, I. F., Huang, W., Andersen, F., Morris, A. M., Asher, A., et al. (2003). Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: Data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg* 99: 467-473.
- Lefrancois, N., Touraine, J. L., Cantarovich, D., Cantarovich, F., Faure, J. L., Dubernard, J. M., et al. (1987). Transmission of medulloblastoma from cadaver donor to three organ transplant recipients. *Transplant Proc* 19: 2242.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
- Li, G., Mitra, S., & Wong, A. J. (2010). The epidermal growth factor variant III peptide vaccine for treatment of malignant gliomas. *Neurosurg Clin N Am* 21: 87-93.
- Lindemann, F., Schlimok, G., Dirschedl, P., Witte, J., & Riethmüller, G. (1992). Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 340: 685-689.
- Liwnicz, B. H., & Rubinstein, L. J. (1979). The pathways of extraneural spread in metastasizing gliomas: A report of three cases and a critical review of the literature. *Hum Pathol* 10: 453-467.

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., et al. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 114: 97-109.

Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Nelson, C. E., Kim, D. H., et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* 250: 1233-1238.

McComb, J. G. (1983). Recent research into the nature of cerebrospinal fluid formation and absorption. *J Neurosurg* 59: 369-383.

Menon, R., Muzumdar, D., Shah, A., & Goel, A. (2007). Glioblastoma multiforme following cranial irradiation and chemotherapy for acute lymphocytic leukaemia. Report of 3 cases. *Pediatr Neurosurg* 43: 369-374.

Mentrikoski, M., Johnson, M. D., Korones, D. N., & Scott, G. A. (2008). Glioblastoma multiforme in skin: a report of 2 cases and review of the literature. *Am J Dermatopathol* 30: 381-384.

Merlino, G. T., Xu, Y. H., Ishii, S., Clark, A. J., Semba, K., Toyoshima, K., et al. (1984). Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science* 224: 417-419.

Miliaras, G., Tsitsopoulos, P. P., Markoula, S., Kyritsis, A., Polyzoidis, S., & Malamou-Mitsi, V. (2009). Multifocal glioblastoma with remote cutaneous metastasis: a case report and review of the literature. *Cen Eur Neurosurg* 70 (1): 39-42.

Mirzayan, M. J., Samii, M., Petrich, T., Börner, A. R., Knapp, W. H., & Samii, A. (2005). Detection of multiple extracranial metastases from glioblastoma multiforme by means of whole-body [18F]FDG-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32: 853.

Miyaki, M., Iijima, T., Shiba, K., Aki, T., Kita, Y., Yasuno, M., et al. (2001). Alterations of repeated sequences in 5'upstream encoding regions in colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer and Turcot syndrome. *Oncogene* 20: 5215-5218.

Modic, M. T. (1991). Advances in contrast-enhanced MR imaging. Neurologic applications. *AJR Am J Roentgenol* 156: 239-245.

Montagne, K., Marie, B., Cahn, V., Hennequin, V., Didelot, A., N'Seir, R., et al. (2004). Systemic metastasis at the time of diagnosis of a glioblastoma. *Ann Pathol* 24: 268-270.

Moon, K. S., Jung, S., Lee, M. C., Kim, I. Y., Kim, H. W., Lee, J. K., et al. (2004). Metastatic glioblastoma in cervical lymph node after repeated craniotomies: report of a case with diagnosis by fine needle aspiration. *J Korean Med Sci* 19: 911-914.

Morse, J. H., Turcotte, J. G., Merion, R. M., Campbell, D. A., Burtch, G. D., & Lucey, M. R. (1990). Development of a malignant tumor in a liver transplant graft procured from a donor with a cerebral neoplasm. *Transplantation* 50: 875-877.

Moskowitz, S. I., Jin, T., & Prayson, R. A. (2006). Role of MIB 1 in predicting survival in patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 76: 193-200.

Müller, P., Weckermann, D., Riethmüller, G., & Schlimok, G. (1996). Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 88: 8-16.

Müller, V., Stahmann, N., Zabel, T., Goetz, A., Jänicke, F., Thomssen, C., et al. (2003). Detection and characterization of circulating tumor cells in the blood of patients undergoing therapy for primary or metastatic breast cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 44: 562.

Müller, V., Stahmann, N., Riethdorf, S., Rau, T., Zabel, T., Goetz, A., et al. (2005). Circulating tumor cells in breast cancer: Correlation to bone marrow micrometastases, heterogenous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 11: 3678-3685.

Mujic, A., Hunn, A., Taylor, A. B., & Lowenthal, R. M. (2006). Extracranial metastases of a glioblastoma multiforme to the pleura, small bowel and pancreas. *J Clin Neurosci* 13: 677-681.

Murat, A., Migliavacca, E., Gorlia, T., Lambiv, W. L., Shay, T., Hamou, M. F., et al. (2008). Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 26: 3015-3024.

Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H. J., Furnari, F. B., & Cavenee, W. K. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res* 62: 6764-6769.

Oberneder, R., Riesenberger, R., Kriegmair, M., Bitzer, U., Klammert, R., Schneede, P., et al. (1994). Immunocytochemical detection and phenotypic characterization of

micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *Urol Res* 22: 3-8.

Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., et al. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population based study. *Cancer Res* 64: 6892-6899.

Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2005a). Epidemiology and ethiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 109: 93 - 108.

Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2005b). Population based-studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64 , 479-489.

Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170 , 1445-1453.

Ohgaki, H., & Watanabe, K. (1999). A case History of glioma progression. *Acta Neuropathol* 97: 525-532.

Ogungbo, B. I., Perry, R. H., Bozzino, J., & Mahadeva, D. (2005). Report of GBM metastasis to the parotid gland. *J Neurooncol* 74 , 337-338.

Ostertag, C. B., Mennel, H. D., & Kiessling, M. (1980). Stereotactic biopsy of brain tumors. *Surg Neurol* 14: 275-283.

Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S., Kutter, D., Lindemann, F., Schaller, G., et al. (1993). Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85: 1419-1424.

Pantel, K., Schlimok, G., Angstwurm, M., Weckermann, D., Schmaus, W., Gath, H., et al. (1994). Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother* 3: 165-173.

Pantel, K., Izbicki, J. R., Passlick, B., Angstwurm, M., Häussinger, K., Thetter, O., et al. (1996). Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 347: 649-653.

Pantel, K., von Knebel-Doeberitz, M., Izbicki, J. R., & Riethmüller, G. (1997). Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Chirurg* 68: 1241-1250.

- Pantel, K., & Brakenhoff, R. H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4: 448-456.
- Pantel, K., Alix-Panabières, C., & Riethdorf, S. (2008a). Circulating Tumor Cells: Detection and Clinical Relevance. *Accredbook*: 603-610.
- Pantel, K., Brakenhoff, R. H., & Brandt, B. (2008b). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8: 329-340.
- Paraf, F., Jothy, S., & Van Meir, E. G. (1997). Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J Clin Oncol* 15: 2744-2758.
- Park, C. C., Hartmann, C., Folkerth, R., Loeffler, J., Wen, P. Y., Fine, H. A., et al. (2000). Systemic metastasis in glioblastoma may represent the emergence of neoplastic subclones. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 1044-1050.
- Pasquier, B., Pasquier, D., N'Golet, A., Panh, M. H., & Couderc, P. (1980). Extraneural Metastases of Astrocytomas and Glioblastomas. *Cancer* 45: 112-125.
- Piccirilli, M., Brunetto, G. M., Rocchi, G., Giangaspero, F., & Salvati, M. (2008). Extra central nervous system metastases from cerebral glioblastoma multiforme in elderly patients. Clinico-pathological remarks on our series of seven cases and critical review of the literature. *Tumori* 94: 40-51.
- Rajagopalan, V., El Kamar, F. G., Thayaparan, R., & Grossbrad, M. L. (2005). Bone marrow metastases from glioblastoma multiforme--A case report and review of the literature. *J Neurooncol* 72: 157-161.
- Reimers, N., Zafrakas, k., Assmann, V., Egen, C., Riethdorf, L., Riethdorf, S., et al. (2004). Expression of extracellular matrix metalloprotease inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma. *Clin Cancer Res* 15: 3422-3428.
- Riethdorf, S., Reimers, N., Assman, V., Kornfeld, J. W., Terraciano, L., Sauter, G., et al. (2006). High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer* 119: 1800-1810.
- Riethdorf, S., Fritsche, H., Müller, V., Rau, T., Schindlbeck, C., Rack, B., et al. (2007). Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the CellSearch System. *Clin Cancer Res* 13: 920-928.
- Ringerzt, N. (1950). Grading of gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand* 27: 51-64.

Rosenberg, R., Gertler, R., Friederichs, J., Fuehrer, K., Dahm, M., Phelps, R., et al. (2002). Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* 49: 150-158.

Ruiz, J. C., Cotorruelo, J. G., Tudela, V., Ullate, P. G., Val Bernal, F., deFrancisco, A. L., et al. (1993). Transmission of glioblastoma multiforme to two kidney transplant recipients from the same donor in the absence of ventricular shunt. *Transplantation* 55: 682-683.

Saad, A. G., Sachs, J., Turner, C. D., Proctor, M., Marcus, K. J., Wang, L., et al. (2007). Extracranial metastases of glioblastoma in a child: case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 29: 190-194.

Salvati, M., Artico, M., Caruso, R., Rocchi, G., Orlando, E. R., & Nucci, F. (1991). A report on radiation-induced gliomas. *Cancer* 67: 392-397.

Sameshima, T., Nabeshima, K., Toole, B. P., Yokogami, K., Okada, Y., Goya, T., et al. (2000). Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas. *Int J Cancer* 88: 21-27.

Santos, A. V., Saraiva, P. F., & Santiago, B. (2003). Extracranial metastasis of glioblastoma multiforme. *Acta Med Port* 16: 209-211.

Sauter, G., Maeda, T., Waldmann, F. M., Davis, R. L., & Feuerstein, B. G. (1996). Patterns of epidermal growth factor receptor amplification in malignant gliomas. *Am J Pathol* 148: 1047-1053.

Scherer, H. J. (1940). Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am J Cancer* 40: 159-198.

Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T. J., et al. (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7737-7742.

Schultz, S., Pinsky, G. S., Wu, N. C., Chamberlain, M. C., Rodrigo, A. S., & Martin, S. E. (2005). Fine needle aspiration diagnosis of extracranial glioblastoma multiforme: Case report and review of the literature. *Cytojournal* 2: 19.

Schweitzer, T., Vince, G. H., Herbold, C., Roosen, K., & Tonn, J. C. (2001). Extraneural metastases of primary brain tumor. *J Neurooncol* 53: 107-114.

- Scott, J. N., Rewcastle, N. B., Brasher, P. M., Fulton, D., MacKinnon, J. A., Hamilton, M., et al. (1999). Which Glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population based study. *Ann Neurol* 46: 183-188.
- Senetta, R., Trevisan, E., Rudà, R., Benech, F., Soffietti, R., & Cassoni, P. (2009). Skin metastases of glioblastoma in the absence of intracranial progression are associated with a shift towards a mesenchymal immunophenotype: report of two cases. *Acta Neuropathol* 188 (2): 313-316.
- Smith-Rooker, J. L., Garrett, A., Hodges, L. C., & Shue, V. (1992). Prevalence of glioblastoma multiforme subjects with prior herbicide exposure. *J Neuroscience Nursing* 24: 260-264.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 387-396.
- Taha, M., Ahmad, A., Wharton, S., & Jellinek, D. (2005). Extra-cranial metastasis of glioblastoma multiforme presenting as acute parotitis. *Br J Neurosurg* 19: 348-351.
- Tanner, M., Gancberg, D., Di Leo, A., Larsimont, D., Rouas, G., Piccart, M. J., et al. (2000). Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol.* 157 (5): 1467-72.
- Templeton, A., Hofer, S., Töpfer, M., Sommacal, A., Fretz, C., Cerny, T., et al. (2008). Extraneural spread of glioblastoma--report of two cases. *Onkologie* 31: 192-194.
- Thorban, S., Roder, J. D., Nekarda, H., Funk, A., Siewert, J. R., & Pantel, K. (1996). Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with esophageal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88: 1222-1227.
- Tuominen, H., Lohi, J., Maiche, A., Törmänen, J., & Baumann, P. (2005). Mediastinal metastasis of glioblastoma multiforme evolving from anaplastic astrocytoma. *J Neurooncol* 75: 225-226.
- Ueda, S., Mineta, T., Suzuyama, K., Furuta, M., Shiraishi, T., & Tabuchi, K. (2003). Biologic characterization of a secondary glioblastoma with extracranial progression and systemic metastasis. *Neuro Oncol* 5: 14-18.
- Utsuki, S., Tanaka, S., Oka, H., Iwamoto, K., Sagiuchi, T., & Fujii, K. (2005). Glioblastoma multiforme metastasis to the axis. Case report. *J Neurosurg* 102: 540-542.

- Van Eldik, L. J., Jensen, R. A., Ehrenfried, B. A., & Whetsell, W. O. (1986). Immunohistochemical localisation of S100 beta in human nervous system tumors by using monoclonal antibodies with specificity for the S100 beta polypeptide. *J Histochem Cytochem* 34: 977-982.
- Vincent-Salomon, A., Piegra, J. Y., Couturier, J., d'Enghien, C. D., Nos, C., Sigal-Zafrani, B., et al. (2007). HER2 status of bone marrow micrometastasis and their corresponding primary tumours in a pilot study of 27 cases: a possible tool for anti-HER2 therapy management? *Br J Cancer* 96: 654-659.
- Vuorinen, V., Hinkka, S., Färkkilä, M., & Jääskeläinen, J. (2003). Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people. A randomized study. *Acta Neurochir* 145: 5-10.
- Walker, M. D., Alexander, E. J., Hunt, W. E., MacCarty, C. S., Mahaley, M. S., Mealey, J. J., et al. (1978). Evaluation of BCNU and/or Radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 49: 333-343.
- Walker, M. D., Strike, T. A., & Sheline, G. E. (1979). An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 5: 1725-1731.
- Weiss, L. (1955). A metastasizing ependymoma of the cauda equina. *Cancer* 8: 161-171.
- Wilhelmsson, U., Eliasson, C., Bjerkvig, R., & Pekny, M. (2003). Loss of GFAP expression in high grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene* 22: 3407-3411.
- Wölfle, U., Cloos, J., Sauter, G., Riethdorf, L., Jänicke, F., van Diest, p., et al. (2003). Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 63: 5679-5684.
- Wong, R. W., & Guillaud, L. (2004). The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 147-156.
- Yasuhara, T., Tamiya, T., Meguro, T., Ichikawa, T., Sato, Y., Date, I., et al. (2003). Glioblastoma with metastasis to the spleen--case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 43: 452-456.
- Zülch, K. J. (1979). *Histological typing of tumours of the central nervous system*. WHO. Genf

## **8. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle bedanke ich mich sehr herzlich bei dem Direktor des Institutes für Tumorbiologie Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pantel für die Vergabe dieses herausforderungsvollen Themas sowie für die Bereitstellung aller für die Durchführung dieser Arbeit erforderlichen Hilfsmittel und wissenschaftlicher Unterstützung.

Mein ausdrücklicher Dank gilt ebenfalls Frau Dr. Sabine Riethdorf für die ständige Betreuung und Anleitung im Labor sowie den Ansporn zum Verfassen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. med. Manfred Westphal (Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) und Frau Prof. Dr. med. Katrin Lamszus (Wissenschaftliche Leiterin des Hans Dietrich Hermann Labor für Hirntumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) sowie Herrn Prof. Dr. med. Markus Glatzel (Direktor des Institutes für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) für die freundliche Zusammenarbeit.

Frau Dr. Sabine Langer vom Institut für Humangenetik des Klinikums Rechts der Isar in München gebührt mein Dank für die Überlassung der CGH-Profile.

Für die Unterstützung bei den Versuchen danke ich dem gesamten Team des Institutes für Tumorbiologie, insbesondere Frau Malgorzata Stoupiec und Frau Antje Andreas für die fröhliche Stimmung im Labor.

Weiterhin danke ich meinem Vater Dr. Claus Holtschmidt und meiner verstorbenen Mutter Dr. Christine Holtschmidt-Wolf für die finanzielle Unterstützung, die mir mein Studium ermöglichte.

Zuletzt danke ich in tiefer Zuneigung meinem Bruder Dr. Philipp Holtschmidt für Anstoß, stetigen Ansporn und für die Nachsichtigkeit mit der er meine Launen ertragen hat. Frau Leonie von Eichel widme ich die erste und gleichzeitig schwierigste Seite dieser Arbeit.

## 9. LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Geburtsdatum 6. Juni 1979  
Geburtsort Düsseldorf  
Nationalität deutsch

### ARBEITSERFAHRUNG

---

Seit Nov. 2008 **Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck**  
Klinik für Chirurgie, Chefarzt Univ. Prof. Dr. med. H. P. Bruch

### AUSBILDUNG

---

Okt. 2003 – Mai 2008 **Universität Hamburg**  
Abschluss des Studiums der Humanmedizin

Jul. 2005 **USMLE Step 1**

Okt. 2001 – Okt. 2003 **Rheinische-Friedrich-Willhelms-Universität Bonn**  
Studium der Humanmedizin bis zur ärztlichen Vorprüfung

Nov. 1998 – Jul. 2001 **Universität Passau**  
Studium der Betriebswirtschaftslehre bis zum Vordiplom

Aug. 1989 – Jun. 1998 **Aloisiuskolleg, Bonn-Bad Godesberg**

Jul. 1995 – Feb. 1996 **Georgetown Preparatory School, Washington D.C.**

Aug. 1985 – Jun. 1989 **Katholische Grundschule, Wachtberg**

### PRAKTISCHES JAHR

---

Okt. 2007 – Jan. 2008 **Klinikum Alten Eichen, Plastische Chirurgie, Hamburg**

Jun. 2007 – Okt. 2007 **Universitätsklinik Hamburg Eppendorf, Onkologie und Kardiologie, Zentrum für Innere Medizin, Hamburg**

Apr. 2007 – Jun. 2007 **Mount Sinai Hospital, Leber- und Nierentransplantation, Hepatobiliäre Chirurgie, New York City**

Feb. 2007 – Mär. 2007 **Kings' College Hospital, Kardio- und Thoraxchirurgie, London**

## **10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....