

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Tumorbilogie

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pantel

**Detektion, Charakterisierung und prognostische Relevanz
von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit
Vulvakarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Svenja Schmidbauer
aus Nürnberg

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:** *13.09.2016*

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: *Prof. Dr. Klaus Pantel*

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: *Prof. Dr. Volkmar Müller*

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	6
2. Einleitung	7
2.1 Tumoren der Vulva.....	7
2.1.1 Epidemiologie	7
2.1.2 Histologie und Pathogenese.....	8
2.1.3 Klinisches Bild: Diagnostik, Klassifikation, Therapie und Prognose.....	9
2.1.4 Rolle molekularer Marker als prognostische Prädiktoren	11
2.2 Der Metastasierungsprozess.....	13
2.3 Die Rolle von disseminierten Tumorzellen im Metastasierungsprozess und deren klinische Relevanz.....	16
2.4 Die Rolle von zirkulierenden Tumorzellen im Metastasierungsprozess und deren klinische Relevanz.....	17
2.5 Nachweisverfahren zirkulierender Tumorzellen	20
2.6 Metastasierung, disseminierte und zirkulierende Tumorzellen beim Vulvakarzinom.....	21
2.7 Fragestellung	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Patientenproben.....	23
3.2 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mit dem Ficoll-Paque™ PLUS-System.....	23
3.2.1 Einführung in die Methodik	23
3.2.2 Verfahrensprotokoll für die Anreicherung von Tumorzellen.....	25
3.3 Detektion und Charakterisierung von Tumorzellen mittels Immunzytochemie.....	25
3.3.1 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase – Färbung.....	25
3.3.1.1 Einführung in die Methodik.....	25
3.3.1.2 Verfahrensprotokoll für den Färbevorgang.....	26
3.3.1.3 Evaluierung der Färbeergebnisse	27
3.3.2 Immunfluoreszenzdoppelfärbung	28
3.3.2.1 Einführung in die Methodik.....	28
3.3.2.2 Verfahrensprotokoll für den Färbevorgang.....	29
3.3.2.3 Evaluierung der Färbeergebnisse	29
3.3.3 Herstellung der Positivkontrollobjektträger	31
3.3.3.1 Zelllinien	31
3.3.3.2 Verfahrensprotokoll für die Zellkultur.....	31
3.3.3.3 Anfertigung der Zytospins	32

3.4 Patientendatenerhebung.....	32
3.5 Statistische Auswertung.....	33
4. Ergebnisse	34
4.1 Charakteristika des Patientenkollektivs	34
4.2 Detektion von CTC mittels APAAP-Färbung.....	35
4.2.1 Histopathologische Tumorparameter und CTC-Status.....	38
4.2.2 Outcome und CTC-Status	41
4.3 Detektion von EGFR-exprimierenden CTC mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung.....	44
5. Diskussion	48
5.1 Begrenzungen der Methoden	48
5.1.1 Eingesetzte Blutmenge.....	48
5.1.2 HPV-Status	49
5.2 Interpretation der Ergebnisse.....	49
5.2.1 CTC-Nachweis mittels etablierter Methode.....	49
5.2.1.1 CTC bei VIN	50
5.2.1.2 CTC bei Zustand nach Vaginalkarzinom.....	51
5.2.1.3 Unbekanntes CK-Expressionsprofil von CTC bei VSCC	52
5.2.2 Zusammenhang von CTC und Histopathologie.....	53
5.2.3 Prognostische Bedeutung der CTC	54
5.2.4 Nachweis EGFR-exprimierender CTC.....	56
5.2.4.1 Apoptose und Nachweis von Zellfragmenten im Blut	57
5.2.4.2 EGFR-Expression und EMT.....	59
5.2.4.3 Vergleich mit APAAP-Färbung.....	59
5.3 Allgemeine Diskussion.....	60
5.3.1 Biologische Eigenschaften von CTC.....	60
5.3.2 Rolle der Eigenschaften von CTC für die Detektionsmethoden	61
5.3.3 Rolle der Eigenschaften von CTC für die klinische Relevanz.....	62
5.4 Schlussfolgerungen und Perspektiven	64
6. Zusammenfassung in deutscher und englischer Sprache	66
6.1 Zusammenfassung.....	66
6.2 Abstract.....	67
7. Abkürzungsverzeichnis.....	68
8. Literaturverzeichnis.....	70
9. Abbildungsverzeichnis.....	85

10. Tabellenverzeichnis	87
11. Anhang	88
11.1 Materialliste für Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mit dem Ficoll-Paque™ PLUS-System	88
11.2 Verfahrensprotokoll für die Anreicherung von Tumorzellen	89
11.3 Materialliste APAAP-Färbung.....	90
11.4 Verfahrensprotokoll für den APAAP-Färbevorgang.....	92
11.5 Materialliste Immunfluoreszenzdoppelfärbung.....	93
11.6 Verfahrensprotokoll für den Immunfluoreszenz-Färbevorgang	94
11.7 Materialliste Zellkultur	95
11.8 Verfahrensprotokoll Zellkultur.....	96
11.9 Fragebogen Follow-up	97
11.10 Charakteristika aller Patientinnen mit VSCC - gesamt und geordnet nach Ergebnissen der APAAP- und Immunfluoreszenzdoppelfärbung ...	98
12. Danksagung.....	100
13. Lebenslauf.....	101
14. Eidesstattliche Erklärung.....	102

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Die Folgen der Metastasenbildung sind die häufigste Todesursache von Tumorerkrankungen. Die Entschlüsselung des Metastasierungsprozesses ist deshalb von größtem Interesse. Dazu konnte die Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) in den letzten Jahrzehnten einen großen Beitrag zur leisten. CTC sind erfolgversprechende Marker für Prognoseeinschätzung und Therapieplanung und stehen am Beginn der klinischen Einführung.

Das Vulvakarzinom ist eine relativ seltene Tumorentität, deren Inzidenz aber über die letzten Jahrzehnte immer weiter angestiegen ist. Die Therapie erfolgt individualisiert und in spezialisierten Zentren. Sie ist mit hoher Morbidität verbunden und systemische Therapien sind wenig erfolgreich. Neben den herkömmlichen histopathologischen Parametern werden deshalb Marker benötigt, die das Risiko stratifizieren und Therapieentscheidungen mittragen können. CTC könnten als solch ein Marker dienen. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein erster Versuch der Detektion von CTC in Patientinnen mit Vulvakarzinom mit bekannten Methoden unternommen. CTC wurden auf die Expression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) hin untersucht, da EGFR in vielen Tumoren der Vulva überexprimiert wird und ein Zeichen des metastatischen Potentials zu sein scheint.

Ziel dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob bei Patientinnen mit Vulvakarzinom CTC im Blut vorhanden sind und ob deren Nachweis prognostisch relevant ist. Zudem sollen biologische Eigenschaften dieser Zellen durch Analyse von Oberflächenmarkern untersucht werden. Dabei sollen Antworten auf folgende Fragen gefunden werden:

- (1) Sind CTC im Blut von Patientinnen mit Vulvakarzinom verschiedener Stadien mit einer bereits etablierten Methode nachweisbar?
- (2) Existiert ein Zusammenhang von histopathologischen Tumorparametern und dem präoperativen Nachweis von CTC?
- (3) Hat der präoperative Nachweis von CTC prognostische Aussagekraft?
- (4) Exprimieren die detektierten CTC EGFR?

2. EINLEITUNG

Krebserkrankungen sind lebensbedrohliche bösartige Neubildungen, die von allen Geweben des Körpers ausgehen können. Es sind über 100 Arten von Malignomen beschrieben. Diese besitzen stark heterogene biologische Eigenschaften. Die Gemeinsamkeit aller Neoplasien besteht in unreguliertem Zellwachstum und der Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung in andere Gewebe. Karzinome sind Malignome die von Epithelzellen ausgehen, sie machen etwa 85% aller Neubildungen aus (Pecorino 2005). Die bereits hohe und weiter zunehmende Prävalenz und die insgesamt hohe Letalität machen Krebserkrankungen zu einem herausragend wichtigen Thema der Medizin. Im Jahr 2012 starben in Deutschland 221.611 Menschen an den Folgen von bösartigen Neubildungen. Sie machten damit 25,5% aller Todesfälle aus und lagen an zweiter Stelle nach den Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems (Statistisches Bundesamt 2013).

2.1 Tumoren der Vulva

2.1.1 Epidemiologie

Tumoren der Vulva sind relativ selten, sie machen nur 3,5-8% aller gynäkologischen Tumoren aus (Fischer *et al.* 2009). Die epidemiologischen Daten verschiedener Ländern sind sehr heterogen und aufgrund uneinheitlicher Datenerfassung schwer vergleichbar. Lange war auch die Krebsregistrierung in Deutschland unvollständig (Dittmer *et al.* 2011). Für die Jahre 2009 und 2010 liegen erstmals bundesweit belastbare Daten vor (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut 2013). Danach erkrankten im Jahr 2010 224.910 Frauen an bösartigen Neoplasien, 3.190 davon an Vulvatumoren. Sie waren nach Tumoren der Mamma, des Uterus, des Ovars und der Zervix die fünfthäufigste gynäkologische Entität. Unter allen Krebserkrankungen bei Frauen standen sie an 16. Stelle. Das Lebenszeitrisiko einer Frau einen Vulvatumor zu entwickeln lag bei 0,6%. Im Jahr 2010 verstarben in Deutschland 749 Patientinnen aufgrund von Tumoren der Vulva. Die Inzidenz hat stark zugenommen: Innerhalb von 10 Jahren hat sich diese mehr als verdoppelt und lag im Jahr 2010 bei 4,6 pro 100.000 (altersstandardisiert). Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 72 Jahren (Median).

Der Vergleich mit einer großen Datenbasis der USA zeigt sowohl Differenzen als auch Übereinstimmungen (Surveillance, Epidemiology, and End Results [SEER] at the National

Cancer Institute 2014). Das Vulvakarzinom lag ebenfalls an fünfter Stelle der gynäkologischen Tumoren. Das Lebenszeitrisiko wurde mit 0,3% angegeben (für den Zeitraum von 2009 bis 2011). Laut SEER lag die altersstandardisierte Inzidenz (für den Zeitraum von 2007 bis 2011) bei 2,4, das mittlere Alter bei Diagnosestellung bei 68 Jahren. Die Ursachen für die Unterschiede sind -unter genauer Kenntnis der Datenerhebung- noch zu klären. Dennoch wurde auch in den USA ein Inzidenzanstieg beobachtet: Von 2001 bis 2011 stieg die Inzidenz im Durchschnitt um 0,5% pro Jahr. Nicht nur die Inzidenz sondern auch die Altersstruktur hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verändert. Zwar treten die meisten Fälle im Senium auf, die jüngeren Altersgruppen sind jedoch immer häufiger betroffen. Im Vergleich der letzten fünf Dekaden stieg die Anzahl unter 50-jähriger betroffener Frauen signifikant um das Drei- bis Sechsfache an (Jones *et al.* 1997; Joura *et al.* 2000; Hampl *et al.* 2008).

2.1.2 Histologie und Pathogenese

90-95% aller Tumoren der Vulva sind Plattenepithelkarzinome (Vulvar squamous cell carcinoma, VSCC). Bei den übrigen handelt es sich um Melanome, Adenokarzinome und Sarkome (Gordon 2006). In den letzten Jahren haben neue Erkenntnisse die Vorstellung der Entstehung von VSCC grundlegend geändert. Es wurde postuliert, dass zwei verschiedene Entstehungswege existieren. Diese unterscheiden sich durch das Vorliegen einer Infektion mit bestimmten Typen humaner Papillomaviren (HPV; van der Avoort *et al.* 2006; Del Pino *et al.* 2013). Es sind mehr als 100 HPV-Typen bekannt, nur einige davon haben onkogenes Potential (Cogliano 2005). Diese werden als Hochrisiko (hr)-Typen bezeichnet. Für VSCC sind in der Literatur hr-HPV-Infektionsraten zwischen 15% und 79% zu finden (Del Pino *et al.* 2013). In einer Analyse von knapp 1.400 Vulvakarzinom-Fällen weltweit lag der Durchschnitt bei 40,1%. Am häufigsten war hr-HPV-16 gefolgt von -33, und -18 (de Sanjosé *et al.* 2013). Die hr-HPV assoziierte Pathogenese führt über prämaligne Vorstufen, die intraepithelialen Neoplasien vom klassischen Typ (vulvar intraepithelial neoplasia, VIN). Dabei steigt die Rate der hr-HPV-Infektionen über die VIN-Grade I-III an (van der Avoort *et al.* 2006). Klassische VIN treten meist bei jüngeren Frauen auf und führen am häufigsten zu nicht-keratinisierenden Karzinomen (Hart 2001; de Sanjosé *et al.* 2013). Beim hr-HPV-unabhängigen Weg werden als mögliche Vorstufen VIN vom differenzierten Typ und chronisch-inflammatorische Prozesse wie Lichen sclerosus vermutet. In diesen Fällen liegen weitaus seltener hr-HPV-Infektionen vor. Meist sind postmenopausale Frauen betroffen, am häufigsten entwickeln sich differenzierte

keratinisierende VSCC (Hart 2001). Eine Ursache für den Anstieg der Vulvakarzinom-Inzidenz unter jüngeren Frauen ist die Zunahme von HPV-Infektionen und der starke Anstieg von VIN, welche am häufigsten in der Altersgruppe zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr vorkommen (Judson *et al.* 2006). Als Gründe für das vermehrte Auftreten von HPV-Infektionen werden die frühere Aufnahme sexueller Aktivität und höhere Promiskuität angenommen.

2.1.3 Klinisches Bild: Diagnostik, Klassifikation, Therapie und Prognose

Im Anfangsstadium sind Vulvakarzinome häufig symptomarm, die meisten Patientinnen konsultieren ihren Gynäkologen wegen anhaltendem Pruritus oder wegen palpabler oder sichtbarer Hautveränderungen. Ergibt sich in der kolposkopischen Kontrolle der Verdacht auf ein Vulvakarzinom, wird eine Biopsie der Läsion entnommen und die Lymphabflusswege werden untersucht. Wurde ein Vulvakarzinom histologisch gesichert, folgt das Tumor-Staging. Die endgültige Feststellung des Tumorstadiums kann erst nach operativem Eingriff erfolgen. Klassifiziert wird nach dem chirurgischen Staging-System der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO; siehe Tabelle 1) und der TNM-Klassifikation der Union for International Cancer Control (UICC; siehe Tabelle 2). Es werden die Parameter lokale Tumorausbreitung (T), Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasierung (M) erfasst, die Bewertungskriterien beider Klassifikationen sind weitgehend deckungsgleich.

Bislang existiert kein Therapiestandard für das Vulvakarzinom, da wegen der geringen Inzidenz randomisierte klinische Studien fehlen. Die Behandlung wird individuell festgelegt und sollte in spezialisierten Zentren erfolgen. Als Goldstandard gilt die vollständige operative Entfernung der Tumormasse. Das Ausmaß des Eingriffs hängt von pathologischen Parametern wie Tumorgröße, -lokalisierung und -invasionstiefe ab. Um die damit einhergehende hohe Morbidität und den Verlust von Lebensqualität zu verringern, erfolgte in den letzten Jahren ein Wandel hin zu einer weniger invasiven Behandlung (Baiocchi und Rocha 2014; Günther *et al.* 2014). In Fällen von lokal fortgeschrittenen Karzinomen kann eine neoadjuvante Radiochemotherapie erwogen werden, um einen weniger radikalen operativen Eingriff zu ermöglichen (Van Doorn *et al.* 2009; Shylasree *et al.* 2011). Zur Detektion von Lymphknotenmetastasen ist die Sentinel-Lymphonodektomie, wenn von geschulten und erfahrenen Untersuchern durchgeführt, eine verlässliche Methode (Selman *et al.* 2005; Van der Zee *et al.* 2008; Hassanzade *et al.* 2013). Sind Lymphknoten befallen, wird eine Lymphonodektomie durchgeführt.

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms nach aktueller FIGO-Klassifikation (Pecorelli 2009) mit Angaben zur Prognose (Hacker 2009). Abk.: FIGO=Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique.

FIGO-Stadium	Befund	5-Jahres-Überlebensrate
I	Tumor auf Vulva und Perineum begrenzt	90,4%
Ia	Tumorgröße ≤ 2cm und Stromainvasionstiefe ≤ 1mm	
Ib	Tumorgröße > 2cm oder Stromainvasionstiefe > 1mm	
II	Tumor jeder Größe mit Ausbreitung auf angrenzende perineale Strukturen (unteres Drittel der Urethra oder der Vagina, Anus)	77,1%
III	Tumor jeder Größe mit oder ohne Ausbreitung auf angrenzende perineale Strukturen mit inguino-femoralem Lymphknotenbefall	51,3%
IIIa	1-2 Lymphknotenmetastasen < 5mm oder 1 ≥ 5mm	
IIIb	≥ 3 Lymphknotenmetastasen <5mm oder ≥ 2 ≥ 5mm	
IIIc	Lymphknotenmetastasen mit Kapselüberschreitung	
IV	Tumor erreicht andere Regionen (obere zwei Drittel der Urethra oder Vagina) oder fernere Strukturen	18,0%
IVa	Tumor erreicht mindestens eine der folgenden Strukturen: obere Urethral- oder Vaginalmukosa, Mukosa der Blase oder des Rektums, Beckenknochen oder Vorliegen unverschieblicher oder ulzerierender inguino-femoraler Lymphknoten	
IVb	Fernmetastasen inklusive pelviner Lymphknoten	

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms nach TNM-Klassifikation der UICC (7.Auflage 2011). Abk.: FIGO=Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique, UICC= Union for International Cancer Control.

T1a	entspricht FIGO Ia	N1a	≤ 2 Lymphknoten < 5mm	M1	Fernmetastasen
T1b	entspricht FIGO Ib	N1b	1 Lymphknoten > 5mm		
T2	entspricht FIGO II	N2a	≥ 3 Lymphknoten < 5mm		
		N2b	≥ 2 Lymphknoten > 5mm		
		N2c	Kapselüberschreitung		
T3	Obere Urethra/Vagina, Blase, Rektum, Knochen oder Fixierung am Beckenknochen	N3	unverschieblicher oder ulzerierender Lymphknoten		

Eine adjuvante Radiotherapie kann die Prognose verbessern (Mahner *et al.* 2013; Sirák *et al.* 2013). Der Nutzen von Chemotherapien in fortgeschrittenen Stadien und palliativen Situationen ist begrenzt (Wagenaar *et al.* 2001; Santeufemia *et al.* 2012). Die Rezidivrate über alle Stadien hinweg wird zwischen 12 und 37% angegeben (Coulter und Gleeson 2003), die meisten Rezidive treten innerhalb der ersten beiden Jahre nach Erstdiagnose auf. Am häufigsten sind Lokalrezidive, gefolgt von Rezidiven in Lymphknoten und in Form von Fernmetastasen, wobei das Outcome in Reihenfolge der Nennung bedeutend schlechter wird (Maggino *et al.* 2000). Um eine Entscheidungsgrundlage für das therapeutische Vorgehen schaffen zu können, wurden verschiedene klinische und histopathologische Faktoren auf ihre prognostische Relevanz hin untersucht. Die Ergebnisse sind heterogen.

Konsens besteht darin, dass der Lymphknotenstatus der wichtigste prognostische Faktor ist, die 5-Jahresüberlebensrate sinkt von 70-98% auf 12-41%, wenn Lymphknoten befallen sind (Gonzalez Bosquet *et al.* 2005; Hacker 2009; Gadducci *et al.* 2012; Woelber *et al.* 2012a). Neben diesen klinisch-pathologischen Parametern wird auch versucht, prognostisch relevante molekularbiologische Marker zu identifizieren.

2.1.4 Rolle molekularer Marker als prognostische Prädiktoren

Es wurde eine Reihe von Markern untersucht, die für die Pathogenese von Vulvakarzinomen bedeutend sind. Aufgrund der Seltenheit dieses Karzinoms fehlen jedoch häufig große Studien mit multivariaten Analysen. Deshalb ist es bisher nicht gelungen, einen dieser Marker als Standard in der klinischen Diagnostik oder Therapie zu etablieren (Knoop *et al.* 2009; Gadducci *et al.* 2012). Die best untersuchten molekularen Marker, für die signifikante Korrelationen mit dem Outcome gefunden wurden, sind: Die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen regulierenden Isoformen von CD-44-v3, -v4, -v6, -v9 und -v10 (cluster of differentiation; Tempfer *et al.* 1996a,b, 1998; Rodríguez-Rodríguez *et al.* 1999, 2000; Hefler *et al.* 2002), der führend an der Neoangiogenese beteiligte VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor; Obermair *et al.* 1996; Bamberger und Perrett 2002), die Zellzyklusregulatoren p14, p16 und p21 (Knoop *et al.* 2004, 2006; Tringler *et al.* 2007; Holm *et al.* 2013; Lavorato-Rocha *et al.* 2013), der Tumorsuppressor p53 (Kohlberger *et al.* 1995; Hoffmann *et al.* 1999; Scheistrøen *et al.* 1999; Salmaso *et al.* 2000) und der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). EGFR (auch ErbB1 oder HER-1 genannt) gehört neben HER-2/neu, HER-3 und HER-4 zur ErbB-Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Sie sind transmembranöse Rezeptortyrosinkinasen, die über multiple intrazelluläre Signalwege Proliferation, Differenzierung, Transformation und antiapoptotische Funktionen regulieren. Alterationen von EGFR spielen in der Pathogenese vieler Karzinome eine große Rolle (Normanno *et al.* 2006) und stellen einen Hauptangriffspunkt gezielter Therapien da. Seit etwa zwei Jahrzehnten hat das große Interesse an der Entwicklung spezifischer EGFR-Inhibitoren nicht abgenommen. Mehrere Wirkstoffe sind bereits zugelassen und werden derzeit bei einigen Entitäten wie beispielsweise metastasierten kolorektalen oder Kopf-Hals-Karzinomen in klinischen Phase III-Studien eingesetzt (Dhomen *et al.* 2012; Yewale *et al.* 2013). EGFR hat auch für die Pathogenese, Prognose und Behandlung von VSCC eine Bedeutung. Erstens zeigen veränderte Expressionsmuster von EGFR die Entdifferenzierung der Tumorzellen an: Physiologisch wird EGFR in der Basalschicht des Plattenepithels der Vulva

am stärksten exprimiert, und nimmt zur Oberfläche hin mit dem Grad der Ausdifferenzierung ab. In VSCC-Gewebe wurde jedoch eine erhöhte EGFR-Expression in den oberflächlichen Epithelschichten gefunden (Berchuck *et al.* 1990). Zweitens wurde beobachtet, dass die EGFR-Expressionsrate von benignem Vulvagewebe über die VIN-Stufen, Primärtumoren und Metastasen signifikant ansteigt (Johnson *et al.* 1997; Wu *et al.* 2001; Brustmann 2007). Die Expression von EGFR scheint also ein Malignitätsmerkmal zu sein, welches mit dem metastatischen Potential der Tumorzellen korreliert. Der prognostische Wert von EGFR wurde mehrfach untersucht. Es wurde gezeigt, dass Patientinnen mit erhöhter Genamplifikation eine signifikant schlechtere Überlebensrate aufweisen (Growdon *et al.* 2008; Woelber *et al.* 2012b). Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die Expression von EGFR in VSCC.

Tabelle 3: Literaturübersicht zu EGFR in VSCC. Es ist zu beachten, dass nicht in allen Studien die gleichen Kriterien zur Bewertung der EGFR-Färbung angewandt wurden. Abk.: DFS=Disease-free survival, EGFR=Epidermal Growth Factor Receptor, FIGO=Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique, OS= Overall survival. Symbole: „n“=Anzahl der untersuchten Fälle, „-“=nicht durchgeführt.

Publikation	n	Stadien	Rate der EGFR-Expression	Signifikante Korrelation mit histopathologischen Parametern	Signifikante Korrelation mit Outcome
Johnson <i>et al.</i> (1997)	61	Keine Angabe	89%	Lymphknotenbefall	Ja, DFS
Wu <i>et al.</i> (2001)	25	Keine Angabe	68%	Nein	-
Oonk <i>et al.</i> (2007)	197	T1/T2	68%	Invasionstiefe, Grading, Lymphknotenbefall	-
Fons <i>et al.</i> (2007)	50	FIGO I-IV	55%	-	Nein
Brustmann (2007)	22	FIGO I-II	73%	Nein	Nein
Lee <i>et al.</i> (2007)	19	FIGO I-IV	94%	Nein	-
Growdon <i>et al.</i> (2008)	41	FIGO I-IV	70%	Stage	Ja, OS
Woelber <i>et al.</i> (2012b)	135	FIGO I-IV	95%	EGFR-Genamplifikation	-
de Melo Maia <i>et al.</i> 2014	85	FIGO I-IV	61%	Invasionstiefe	Ja, DFS

Die Therapie von EGFR-überexprimierenden VSCC mit EGFR-Inhibitoren scheint erfolgversprechend, bedarf aber weiterer Untersuchung. Bei Behandlungsversuchen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib unter anderem in einer Phase II-Studie zeichnete sich ein gutes Ansprechen ab, die Langzeitwirkung ist jedoch fraglich (Olawaiye *et al.* 2007; Bacha *et al.* 2010; Horowitz *et al.* 2012).

In vorliegender Arbeit wurde EGFR als Marker zur Charakterisierung von CTC gewählt, da VSCC eine hohe Expressionsrate aufweisen und dieser auch prognostische Bedeutung zugeschrieben wurde. Ist EGFR ein Merkmal des Metastasierungspotentials von Tumorzellen, kann vermutet werden, dass auch die CTC in der Blutbahn welche metastasogenes Potential besitzen EGFR exprimieren könnten. Durch den Nachweis von EGFR auf CTC könnten die Patientinnen identifiziert werden, die von einer Therapie mit EGFR-Inhibitoren profitieren würden.

2.2 Der Metastasierungsprozess

Metastasierung bedeutet die Entstehung sekundärer Tumormasse in Geweben außerhalb des Ursprungsorgans. Die wesentlichen Schritte des Metastasierungsvorgangs sind in Abbildung 1 dargestellt. Um den Zellverband des Primärtumors zu verlassen, werden Zell-Zell-Verbindungen sowie die Fixierung an der extrazellulären Matrix (ECM) gelöst. Mit Hilfe von Proteasen bahnen sich die Tumorzellen einen Weg durch Stroma und ECM (Migration). Es folgen die Penetration von Gefäßwänden zum Eintritt in die Zirkulation (Intravasation) und der Transport im Blut bzw. in der Lymphe. In entfernten Kapillarbetten verlassen Tumorzellen die Gefäße (Extravasation) und infiltrieren umliegendes Gewebe. Zuletzt wird durch die Proliferation im Mikromilieu des Zielorgans die Metastase gebildet (Kolonisierung; Pecorino 2005).

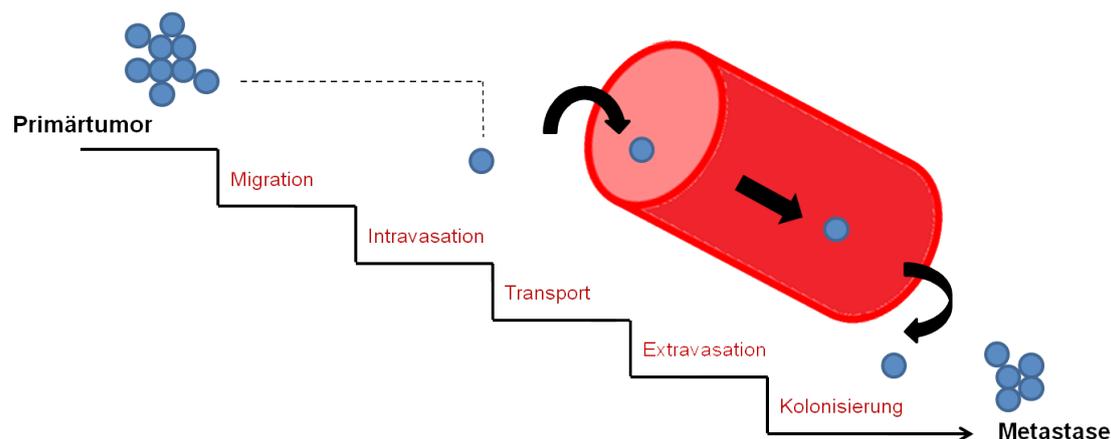


Abbildung 1: Stark vereinfachtes Schema der Metastasierungsprozesses.

Metastasierung ist die Hauptursache für den tödlichen Verlauf von Krebserkrankungen. Die Aufklärung des Metastasierungsprozesses hat deshalb größte Bedeutung für die Entwicklung erfolgreicher onkologischer Therapien. Der Metastasierungsvorgang ist höchst komplex, und

obwohl dessen Erforschung mit größtem Interesse vorangetrieben wird, befindet man sich noch immer am Anfang seiner Entschlüsselung.

Im Jahr 1829 entwickelte Jean Claude Recamier den Begriff „Metastase“ (Recamier 1829 in Talmadge und Fidler 2010) und seit der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts werden ständig neue Erkenntnisse hinzugewonnen. Die folgende Darstellung ist eine kurze Übersicht der wichtigsten Erklärungsmodelle, die ausführlich in verschiedenen Übersichtsarbeiten diskutiert wurden (Pantel und Brakenhoff 2004; Geiger und Peeper 2009; Klein 2009; Talmadge und Fidler 2010; Valastyan und Weinberg 2011; Seyfried und Huysentruyt 2013).

In den 1960er und 70er Jahren erstmals entdeckt und seitdem mehrfach beschrieben ist Folgendes: Primärtumoren sind biologisch sehr heterogen, es sind zahlreiche Zellveränderungen nötig, um alle Schritte der Metastasierung erfolgreich zu durchlaufen (Talmadge und Fidler 2010), und es existieren zwei verschiedene Ausbreitungswege - ein hämatogener und einen lymphogener (Pantel und Brakenhoff 2004). In dieser Zeit wurde auch das Metastasierungsmodell vorgeschlagen welches davon ausgeht, dass nur ein kleiner Anteil der Zellen des Primärtumors metastatisches Potential besitzt. Diese Zellen bilden alle zur Metastasierung nötigen Fähigkeiten aus, bevor sie in einer späten Krankheitsphase disseminieren (Klein 2009; Talmadge und Fidler 2010).

Neuere Untersuchungen – vor allem die Analyse einzelner disseminierter Zellen und von Genexpressionsprofilen– stellen dieses Modell jedoch in Frage (Klein 2009). Sie deuten darauf hin, dass Tumorzellen den Primärtumor bereits in frühen Stadien verlassen, sich parallel zum Primarius weiterentwickeln und nur einige der disseminierten Zellen durch einen Selektionsprozess die komplette Metastasierungsfähigkeit erlangen (Valastyan und Weinberg 2011). Die Differenzen dieser Modelle aufzuklären ist klinisch hoch relevant: Um Therapietargets für die Behandlung von Metastasen ausmachen zu können, muss bekannt sein, ob dafür der Primärtumor oder disseminierte Zellen analysiert werden müssen. Dies hängt also davon ab, in welcher Phase und in welchen Zellen das metastatische Potential determiniert wird. Eine weitere wichtige Feststellung war, dass die Metastasierung ein hochgradig ineffizienter Prozess ist. Nur aus einem äußerst geringen Teil der disseminierten Zellen entstehen tatsächlich Metastasen, die größte Limitierung stellt die Kolonisierung da (Geiger und Peeper 2009).

Ein Erklärungsansatz dafür, wie es Tumorzellen gelingen kann, diesen Prozess dennoch erfolgreich zu durchlaufen, ist die Theorie der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT; vgl. Abbildung 2). Sie besagt, dass die Schritte von Migration bis Extravasation dadurch ermöglicht

werden, dass Zellen des Primärtumors ihren epithelialen Phänotyp verlieren und mesenchymale Zelleigenschaften annehmen (Seyfried und Huysentruyt 2013). Zur Kolonisierung des Zielorgans soll unter Einfluss des dortigen Mikromilieus diese Umwandlung wieder rückgängig gemacht werden, also eine mesenchymale-epitheliale Transformation (MET) ablaufen. Da diese Hypothese zum Großteil auf *in vitro*-Beobachtungen beruht, bedarf es weitergehender *in vivo*-Untersuchungen, um die Bedeutung der EMT im Metastasierungsprozess zu evaluieren (Kalluri und Weinberg 2009; Iwatsuki *et al.* 2010; Yao *et al.* 2011).

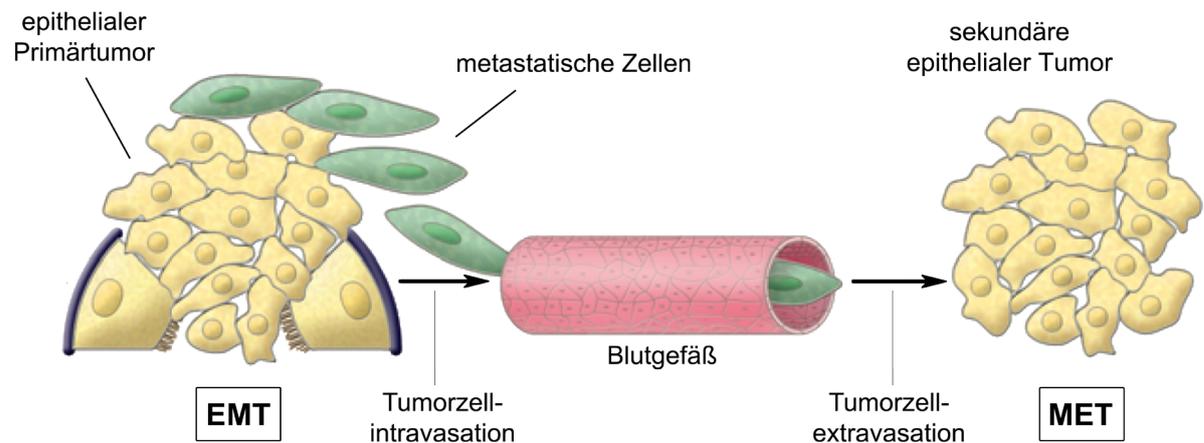


Abbildung 2: Schema der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT). Modifiziert aus Kalluri und Weinberg 2009. Zellen des Primärtumors akquirieren mesenchymale Eigenschaften (grün) und dringen in das Blutgefäßsystem ein. Später verlassen sie die Blutgefäße um sich an einem anderen Ort im Gewebe anzusiedeln. Dazu nehmen die Zellen wieder epithelialen Charakter an (mesenchymale-epitheliale Transformation, MET).

Ein weiteres kontrovers diskutiertes Modell der Metastasierung ist die Tumorstammzell-Hypothese. Danach handelt es sich bei Metastasen-bildenden Zellen um eine Subpopulation maligner Zellen, die Stammzellcharakter besitzen (CSC). Sie nutzen also Mechanismen, die auch während der physiologischen Gewebsentwicklung ablaufen: Migration und unbegrenztes Wachstum durch asymmetrische Zellteilung (Antoniou *et al.* 2013, Shiozawa *et al.* 2013; O'Connor *et al.* 2014).

Das Verständnis des Metastasierungsvorgangs unterliegt ständigen Veränderungen. Keines der bislang beschriebenen Modelle ist unumstritten und vermag eine umfassende Erklärung aller Beobachtungen zu erbringen. Unterscheidet sich der Metastasierungsprozess von Entität zu Entität, wird die Aufklärung noch deutlich komplexer. Einen großen Beitrag zum Verständnis der Metastasenbildung hat die mit Hilfe neuer Techniken möglich gewordene Detektion und Analyse einzelner disseminierter Zellen geleistet. Dabei wurden Tumorzellen im Knochenmark

und im Blut untersucht. Die Nomenklatur dieser Zellen ist uneinheitlich, die Begriffe disseminierte Tumorzellen (DTC) für Zellen im Knochenmark und zirkulierende Tumorzellen (CTC) für Zellen im peripheren Blut haben sich in der Literatur behauptet und werden im Folgenden entsprechend verwendet.

2.3 Die Rolle von disseminierten Tumorzellen im Metastasierungsprozess und deren klinische Relevanz

DTC wurden bislang in zahlreichen Karzinomentitäten nachgewiesen (Zach und Lutz 2006). Bei Patienten in nicht metastasierten Stadien wurden in 20-60% DTC detektiert (Alix-Panabières *et al.* 2008) – auch bei Entitäten, die nicht primär ossär metastasieren. Es wird angenommen, dass das Knochenmark ein Reservoir für DTC darstellt von dem aus sie rezirkulieren und andere Gewebe besiedeln (Pantel *et al.* 2008). Möglicherweise ist das Knochenmark aber nicht das einzige Kompartiment und DTC halten sich gleichzeitig bereits in anderen Organen auf, wo sie jedoch der konventionellen bildgebenden Detektion nicht zugänglich sind. Um zu verstehen welche Bedeutung diese Tumorzellen im Knochenmark für den Metastasierungsprozess haben, wurden die biologischen Eigenschaften von DTC untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass DTC bei Patienten in Frühstadien der Erkrankung ein großes Spektrum genetischer Varianz aufweisen, während DTC bei Patienten mit metastasierten Tumoren homogener sind (Klein *et al.* 2002; Schmidt-Kittler *et al.* 2003). Dies spricht dafür, dass im Laufe der Dissemination ein Selektionsprozess stattfindet, welcher von den Tumorzellen überwunden wird, die alle für eine erfolgreiche Metastasierung benötigten Eigenschaften besitzen bzw. erwerben. Bestimmte molekulare Zelleigenschaften gehen dabei mit einer höheren Aggressivität einher. Beispielsweise wurde beobachtet, dass bei Mammakarzinomen die Expression von HER-2/neu im Primärtumor und DTC stark heterogen ist und das Vorkommen von HER-2/neu-positiven DTC mit einem schlechteren Outcome korreliert (Braun *et al.* 2001; Hartkopf *et al.* 2013; Banys *et al.* 2014). Bei der Evaluation der Zellvermehrungsaktivität von DTC, wurde eine interessante Beobachtung gemacht, die als „Cancer dormancy“ bezeichnet wird (Páez *et al.* 2012; Sosa *et al.* 2014). Tumorzellen persistieren demnach lange in einem Zustand ohne zu proliferieren. Es wurde nämlich nachgewiesen, dass DTC eine geringe Proliferationskapazität besitzen (Pantel *et al.* 1993; Solakoglu *et al.* 2002) und auch Jahre nach dem Auftreten eines Primärtumors vorhanden sind (Wiedswang *et al.* 2004; Janni *et al.* 2011). Obwohl noch nicht sicher geklärt ist, welche und wie viele DTC ausschlaggebend für die Metastasenbildung sind,

befindet sich die Detektion von DTC auf dem Weg zur klinischen Nutzung. Sie könnte einerseits als prognostischer Indikator das Tumorstaging zum Diagnosezeitpunkt verbessern sowie als Monitoringinstrument für die Wirksamkeit adjuvanter systemischer Therapien dienen. Für ersteres liegen große Studien zum Mamma-, Prostata-, Bronchial- und kolorektalen Karzinom vor. Nicht alle konnten eine signifikante inverse Korrelation zwischen dem Nachweis von DTC zum Zeitpunkt der primären Tumorresektion und dem rezidivfreien bzw. Gesamtüberleben zeigen (Braun *et al.* 2000, 2005; Yasumoto *et al.* 2003; Köllermann *et al.* 2008; Weckermann *et al.* 2009; Rahbari *et al.* 2010; Rusch *et al.* 2011). Die meisten Daten und die beste Evidenz liegen für das Mammakarzinom vor. Dafür konnte auch gezeigt werden, dass die Persistenz von DTC nach (neo)adjuvanter Therapie mit einem signifikant schlechteren Outcome einhergeht (Janni *et al.* 2011; Mathiesen *et al.* 2012, Synnestvedt *et al.* 2012; Gruber *et al.* 2014). Ein routinemäßiger Einsatz in der Klinik ist bislang jedoch nicht erreicht worden. Da das Knochenmark kein leicht zugängliches Kompartiment ist, und die Qualität der Proben schwer standardisiert werden kann (Pantel *et al.* 2008), gewinnt die CTC-Detektion besonders für den Einsatz zur Therapiekontrolle an Bedeutung.

2.4 Die Rolle von zirkulierenden Tumorzellen im Metastasierungsprozess und deren klinische Relevanz

Die Entnahme von peripherem Blut ist ein wenig invasiver Eingriff und ist im Gegensatz zu Gewebebiopsien, denen sich Tumoren in unzugänglichen Positionen entziehen können, immer durchführbar. Im Sinne einer „Liquid Biopsy“ kann die Untersuchung von CTC mehr Informationen generieren als die von Primärtumoren oder Metastasen allein (Pantel und Alix-Panabières 2013). Tumorzellen im Blut zeigen, dass eine systemische Ausbreitung der Krebserkrankung vorliegt. CTC können von sowohl von Primärtumoren als auch von Metastasen ins Blut abgegeben werden. Die Aufklärung der Biologie dieser Zellen und deren Bedeutung in der Tumorpathogenese steht trotz des rapiden Wissenszuwachses erst am Anfang. Bereits 1869 wurde die Entdeckung von Tumorzellen im Blut beschrieben (Ashworth 1869 in Becker *et al.* 2014). In den letzten beiden Jahrzehnten konnten große Fortschritte auf dem Gebiet gemacht werden. Bekannt ist, dass CTC bei zahlreichen Karzinomen vorkommen, und zwar in extrem geringer Konzentration. Beispielsweise wurden bei über 900 Patienten mit metastasierten Tumoren verschiedener Entitäten in keinem Fall mehr als 84 CTC in 7,5ml Vollblut gefunden (Allard *et al.* 2004), in nicht metastasierten Stadien sind es meist deutlich

weniger (Rack *et al.* 2014). CTC halten sich nur kurz im Blutkreislauf auf, die Halbwertszeit wird auf wenige Stunden geschätzt. Dennoch können sie noch Jahrzehnte nach Behandlung des Primärtumors nachgewiesen werden (Meng *et al.* 2004), was dafür spricht, dass eine Quelle replikationsfähiger Zellen existieren muss (vgl. „Cancer dormancy“ Kapitel 2.3). Dies war interessanterweise auch bei Patienten ohne Tumorrezidiv der Fall. Diese Beobachtung zeigt, dass nicht alle CTC in der Lage sind Metastasen zu bilden. Es wurde festgestellt, dass CTC biologisch sehr heterogen sind und ein unterschiedliches metastatisches Potential besitzen (Wicha und Hayes 2011; Alix-Panabières und Pantel 2014a). Im Tiermodell zeigten Baccelli *et al.* (2013), dass zur erfolgreichen Metastasenbildung über 1.000 CTC nötig sind, und sich unter diesen nur einige sogenannte metastasis-initiating cells (MIC) befinden. Die molekulare Charakterisierung von CTC ist also von großem Interesse, so können – unter anderem – CTC mit hohem Metastasierungspotential identifiziert werden. So wurde beobachtet, dass CTC Merkmale von EMT und Stammzellen besitzen (vgl. Kapitel 5.3.3), und es wird vermutet, dass die Subpopulation von CTC, die diese Charakteristika aufweist für die Metastasierung verantwortlich ist (Książkiewicz *et al.* 2012; Tinhofer *et al.* 2014). Obwohl die Rolle von CTC im Metastasierungsprozess noch nicht aufgeklärt ist, gibt es bereits vielversprechende Ergebnisse zur klinischen Relevanz von CTC. Derzeit werden über 300 klinische CTC-Studien durchgeführt (eingetragen unter <http://clinicaltrials.gov>, Stand November 2014). Dabei werden CTC erstens als prognostischer Marker und zweitens zur Therapieoptimierung eingesetzt. Es wurden zahlreiche Karzinomarten untersucht, der Wert des CTC-Nachweises als Prognoseindikator wurde durchaus unterschiedlich bewertet. Die meisten Daten liegen für das Mammakarzinom vor. Für diese Entität wurde eine starke Evidenz beschrieben, für metastasierte Tumoren ist diese noch besser belegt als für Frühstadien (Rack *et al.* 2012). So zeigte beispielsweise eine aktuelle Meta-Analyse mit knapp 2.000 Patienten in metastasierten Stadien, dass der CTC-Status vor und unter Therapie ein unabhängiger prognostischer Faktor ist (Bidard *et al.* 2014). Eine große Meta-Analyse mit über 6.000 Patienten ergab zudem, dass das Vorhandensein von CTC vor, während und nach Therapie einen verlässlichen Indikator sowohl in metastasierten als auch in frühen Stadien darstellt (Zhang *et al.* 2012). Dies wurde im Rahmen der prospektiven SUCCESS-Studie mit über 2.000 nicht metastasierten Patienten in multivariater Analyse bestätigt (Rack *et al.* 2014). Neben dem Mammakarzinom ist die negative Assoziation von CTC und rezidivfreiem bzw. Gesamtüberleben durch große Meta-Analysen gut belegt für metastasierte sowie nicht metastasierte Prostata- (Goldkorn *et al.* 2014; Ma *et al.* 2014) und kolorektale Karzinome (Rahbari *et al.* 2010; Groot Koerkamp *et al.* 2013). Meta-Analysen mit geringeren Fallzahlen sprechen außerdem für die prognostische

Bedeutung von CTC bei nicht-/kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Truini *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014), Ovarialkarzinomen (Romero-Laorden *et al.* 2014) und Pankreaskarzinomen (Han *et al.* 2014; Ma *et al.* 2014). In Kopf-Hals-Tumoren und Melanomen wurden mehrfach CTC nachgewiesen, deren Rolle ist jedoch noch unklar (Khoja *et al.* 2015; Kulasinghe *et al.* 2015). Zudem existieren einzelne CTC-Studien für Tumoren der Niere, der Leber, des Ösophagus, des Magens und der Harnblase (Paterlini-Brechot und Benali 2007; Liberko *et al.* 2013; Reeh *et al.* 2015). Neben der prognostischen Bedeutung haben CTC enormes Potential neue Möglichkeiten in der Therapieplanung zu schaffen: Einerseits könnte deren Nachweis zur Kontrolle der Wirksamkeit adjuvanter systemischer Therapien eingesetzt werden. Andererseits können durch die Charakterisierung von CTC Angriffspunkte für die Metastasentherapie identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass CTC einen geeigneten Surrogat-Parameter für das Therapiemonitoring darstellen. Die CTC-Detektion scheint konventionellen Bildgebungstechniken sogar überlegen zu sein (Budd *et al.* 2006). Schon Wochen bevor Tumoren radiologisch sichtbar wurden, konnte damit ein Therapieversagen erkannt werden (Liu *et al.* 2009), was einen frühzeitigen Therapiewechsel ermöglicht. Dass CTC als Indikator des Therapieerfolgs geeignet sind, wurde für das metastasierte Mammakarzinom jüngst in der großen multizentrischen Phase III-Studie SWOG S0500 belegt (Smerage *et al.* 2014). Gelingt es CTC nicht nur zu quantifizieren sondern auch deren molekularbiologische Eigenschaften und Genalterationen zu enthüllen, sind große Fortschritte in der Individualisierung der Metastasentherapie zu erwarten (Becker *et al.* 2014). Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz von HER-2/neu Antikörpern bei Mammakarzinom-Patientinnen mit HER-2/neu-negativen Primärtumor und HER-2/neu-positiven CTC: Georgoulis *et al.* (2012) zeigten in einer Phase II-Studie, dass die Behandlung eine signifikante Reduktion des Rezidivrisikos erbringt. Dies wird derzeit in der knapp 3.000 Patienten einschließenden multizentrischen randomisierten Phase III-Studie DETECT III überprüft. Daneben könnten CTC in Zukunft auch einen Beitrag dazu leisten Therapieresistenzen zu erklären und vorauszusagen. Bei Kolorektal- und Prostatakarzinomen wurden Genmutationen in CTC entdeckt, die für den Resistenzmechanismus verantwortlich sein könnten (Alix-Panabières und Pantel 2014a). Die Charakterisierung von CTC kann also nicht nur einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung des Metastasierungsprozesses leisten, sondern hat bereits jetzt eine neue Dimension in der Diagnostik und Behandlung von Tumoren geschaffen. Die bislang gewonnenen Erkenntnisse über CTC wecken große Hoffnungen und eine rasche Weiterentwicklung ist zu erwarten. Zur routinemäßigen klinischen Einsatzfähigkeit bedarf es weiterer großer randomisierter kontrollierter Studien und besonders einer Standardisierung der Detektionsmethoden.

2.5 Nachweisverfahren zirkulierender Tumorzellen

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Methoden zur Detektion von CTC entwickelt. Die schnell anwachsenden Erkenntnisse der biologischen Eigenschaften der Tumorzellen machten umfangreiche technische Weiter- und Neuentwicklungen möglich. Viele davon besitzen großes Potential, auf dem Weg zum klinischen Einsatz gilt es nun einige Herausforderungen zu überwinden (Yu *et al.* 2011; Parkinson *et al.* 2012; Alix-Panabières und Pantel 2014b; Becker *et al.* 2014; Kim *et al.* 2014) und die Validierung in großen multizentrischen prospektiven Studien zu erreichen.

Der bislang einzige im Jahr 2004 von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassene Assay ist das CellSearch[®]-System (Veridex LLC). Es wird eingesetzt um den Therapieerfolg bei Patienten mit metastasierten Mamma-, Prostata- und Kolonkarzinomen zu überprüfen. Obwohl prospektive multizentrische Studien gezeigt haben, dass das Vorhandensein einer gewissen Anzahl von CTC mit erniedrigten Überlebensraten assoziiert ist, hat bis dato keine der onkologischen Fachgesellschaften eine Empfehlung für die Anwendung von CellSearch[®] ausgesprochen.

Große Herausforderungen bei der Detektion sind die sehr niedrige Anzahl von CTC im Blut (einzelne CTC unter Millionen hämatopoetischer Zellen), und die ausgeprägte Heterogenität der Zellen innerhalb eines Tumors sowie zwischen den Patienten und den verschiedenen Entitäten. Die Methode muss deshalb sehr sensitiv und gleichzeitig spezifisch sein. Aus diesem Grund werden meist mehrere Schritte kombiniert: Zunächst wird die Zellfraktion, die potentiell CTC enthält angereichert, dann folgt die eigentliche Detektion. Zur Anreicherung werden unterschiedliche Eigenschaften von Tumorzellen und hämatopoetischen Zellen ausgenutzt. Sie können entweder über Größe, Dichte oder Flexibilität der Zellen separiert werden oder mittels spezifischer Oberflächenantigene, meist EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) für Karzinomzellen oder CD45 für Leukozyten. Zur Detektion werden hauptsächlich immunologische und PCR-basierte (polymerase chain reaction) Verfahren angewandt. Für immunzytochemische (ICC) Färbungen werden Antikörper gegen tumorzellspezifische Epitope benötigt, als Standardmarker haben sich Zytokeratine (CK) etabliert. Sie sind Bestandteile des Zytoskeletts von Epithelzellen, von ihnen sind mittlerweile über 20 verschiedenen Typen sind (Hesse *et al.* 2001).

Für VSCC stehen bislang keine Daten zur CTC-Analyse zur Verfügung, deshalb wurde in dieser Arbeit auf bereits etablierte Methoden zurückgegriffen, sie entsprechen den Empfehlungen

zur Standardisierung der Detektion von DTC mittels Immunzytochemie (Fehm *et al.* 2006). Da unbekannt ist welche Oberflächenantigene exprimiert werden, erfolgte die Anreicherung über ein Dichtegradientensystem. Zum Einsatz kam das lang erprobte Ficoll-Paque™ (GE Healthcare), welches 1968 von Bøyum (Bøyum 1968a,b) entwickelt wurde und noch immer als Goldstandard gilt. In mehreren Zentrifugationsschritten werden dabei mononukleäre Zellen (MNC) aus dem Blut extrahiert. Im Vergleich zum Dichtegradientensystem OncoQuick® (Greiner Bio-One), welches vergleichbare Wiederfindungsraten aufweist, scheint die Gefahr Tumorzellen zu eliminieren geringer zu sein (Rosenberg *et al.* 2002; Gertler *et al.* 2003; Gerges *et al.* 2010).

Zur Detektion wurde der Antizytokeratin-Antikörper A45-B/B3 gewählt, der seit Jahrzehnten breite Anwendung in der DTC- und seit kürzerem auch in der CTC-Detektion findet. Auch die in dieser Arbeit eingesetzte APAAP-Technik (alkalische Phosphatase-antialkalische Phosphatase) gilt als Standard-Chromogennachweis. Die APAAP-Methode ist hochsensitiv, da mehrere Antikörperschichten eingesetzt werden um das Ursprungssignal zu amplifizieren (Brooks 2012). Die Auswertung der Färbungen wurde mittels dem automatischen Scansystem Automated Cellular Imaging System® (ACIS®, ChromaVision Medical Systems) vorgenommen, welches Tumorzellen verlässlich erkennt und mit dem eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht werden kann als bei manueller Auswertung (Bauer *et al.* 2000; Becker *et al.* 2005).

Zur Analyse der EGFR-Expression wurde eine Fluoreszenz-basierte Methode angewendet. Für diese Doppelfärbung wurden ebenfalls gegen CK gerichtete Antikörper verwendet. Da das CK-Expressionsmuster von CTC bei VSCC nicht bekannt ist, wurde ein Antikörpercocktail eingesetzt der möglichst viele CK abdeckt. Der darin enthaltene AK AE1/AE3 zählt -wie A45-B/B3- zu den am häufigsten zur Detektion eingesetzten AK, auch der AK C11 wurde vielfach verwendet. Zur Auswertung dieser Fluoreszenzfärbung wurde ein bereits erfolgreich eingesetztes automatisches Scansystem, das Ariol® Applied Imaging genutzt.

2.6 Metastasierung, disseminierte und zirkulierende Tumorzellen beim Vulvakarzinom

Vulvakarzinome metastasieren fast ausschließlich über den lymphatischen Weg. Regelmäßig sind zuerst inguinale Lymphknoten betroffen, bevor sich eine femorale und pelvine Ausbreitung entwickelt. Eine hämatogene Streuung erfolgt meist erst spät und fast nie ohne vorherigen Lymphknotenbefall. Rezidive treten am häufigsten im Bereich der Vulva auf, seltener regional

oder entfernt, dies geht jedoch mit einer besonders schlechten Prognose einher (Hacker 2009). Für das Vulvakarzinom gibt es bislang nur wenige Untersuchungen zu disseminierten Zellen. Beschrieben wurden DTC-Raten von 5% (1 von 22; Banys *et al.* 2009) bzw. 16% (10 von 64; Walter *et al.* 2014) bei Primärdiagnose. In beiden Fällen wurde zur Detektion der Antikörper A45-B/B3 verwendet. Publikationen über den Nachweis von CTC bei Patientinnen mit Vulvakarzinom gibt es bisher nicht.

2.7 Fragestellung

Die Folgen der Metastasenbildung sind die häufigste Todesursache von Tumorerkrankungen. Die Entschlüsselung des Metastasierungsprozesses ist deshalb von größtem Interesse. Dazu konnte die Detektion und Charakterisierung von CTC in den letzten Jahrzehnten einen großen Beitrag leisten. CTC sind erfolversprechende Marker für Prognoseeinschätzung und Therapieplanung und stehen am Beginn der klinischen Einführung. Auch beim Vulvakarzinom werden neben den herkömmlichen histopathologischen Parametern Marker benötigt, die eine Risikostratifizierung erlauben und Therapieentscheidungen mittragen können. In vorliegender Arbeit wird ein erster Versuch der Detektion und Charakterisierung von CTC im Blut von Patientinnen mit Vulvakarzinom unternommen.

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob bei Patientinnen mit Vulvakarzinom CTC im Blut detektierbar sind, und ob deren Nachweis prognostisch relevant ist. Zudem sollen biologische Eigenschaften dieser Zellen durch Analyse des Oberflächenmarkers EGFR untersucht werden. Dabei sollen Antworten auf folgende Fragen gefunden werden:

- (1) Sind CTC im Blut von Patientinnen mit Vulvakarzinom verschiedener Stadien mit einer bereits etablierten Methode nachweisbar?
- (2) Existiert ein Zusammenhang von histopathologischen Tumorparametern und dem präoperativen Nachweis von CTC?
- (3) Hat der präoperative Nachweis von CTC prognostische Aussagekraft?
- (4) Exprimieren die detektierten CTC EGFR?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientenproben

Die Proben für die Untersuchung stammten von Patientinnen, die zur operativen Behandlung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms der Vulva in die gynäkologische Abteilung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) aufgenommen wurden. Im Zeitraum von November 2009 bis Februar 2012 konnten 52 Blutproben gesammelt werden. Es wurden sowohl Patientinnen mit Erstdiagnose als auch mit Rezidiv eines Vulvakarzinoms eingeschlossen. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung des Blutes für wissenschaftliche Zwecke lag von allen Patientinnen vor. Ebenso ein positives Votum der Ethikkommission Hamburg (Ethics Committee of the Medical Board Hamburg reference number 190504).

Die venöse Punktion zur Entnahme des Blutes erfolgte einen Tag vor der Operation oder unmittelbar vor dem Eingriff. Es wurden EDTA-Röhrchen (S-Monovette EDTA KE/7,5ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) verwendet, um die Koagulation des Vollblutes zu verhindern. Das Volumen der gewonnenen Blutproben lag zwischen 4 und 18ml. Die Proben wurden bei Raumtemperatur (RT; 18-20°C, im Folgenden nicht einzeln erwähnt) aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet, um einen möglichst hohen Anteil an lebenden mononukleären Zellen (MNC) isolieren zu können.

Alle im Folgenden beschriebenen Verfahrensprotokolle für die Aufarbeitung des Blutes sowie für die anschließenden Färbungen wurden am Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf ausgearbeitet.

3.2 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mit dem Ficoll-Paque™ PLUS-System

3.2.1 Einführung in die Methodik

Bei Ficoll-Paque™ PLUS handelt es sich um ein Medium, welches die Isolation von MNC aus peripherem Vollblut ermöglicht. Das Prinzip der von Bøyum (Bøyum 1968a,b) entwickelten Methode basiert auf der Bildung eines Dichtegradienten der Blutbestandteile, die mittels Zentrifugation aufgetrennt werden. Die benötigte Mindestmenge an Blut liegt bei 2ml. Neben peripherem Blut ist auch die Aufarbeitung von Knochenmark und Nabelschnurblut möglich. Ficoll-Paque™ PLUS ist ein wässriges steriles Medium mit einer Dichte von $1.077 \pm 0,001$ g/ml

bei 20°C, das aus Ficoll PM400 und Natriumdiatrizoat besteht. Ficoll PM400 ist ein synthetisch hergestelltes stark verzweigtes Polymer. Natriumdiatrizoat verleiht dem Medium die nötige Dichte und Osmolarität zur Zellseparation.

Das Blut wird zunächst mit einer Salzlösung verdünnt, um die Aggregation von Erythrozyten zu verhindern. Bei diesem Prozess würden auch MNC aggregieren und somit für die weitere Zelltrennung nicht zur Verfügung stehen. Ficoll-Paque™ PLUS-Medium verleiht den verschiedenen Blutkomponenten eine spezifische Dichte, weshalb sich nach mehreren Zentrifugationsschritten die in Abbildung 3 zu sehende Schichtung ergibt. Zuunterst setzen sich die Erythrozyten ab, die bei Kontakt mit Ficoll-Paque™ PLUS aggregieren. Die zweite Schicht wird hauptsächlich von Granulozyten gebildet, die durch den osmotischen Druck des Ficoll-Paque™ PLUS eine so hohe Dichte erreichen, dass sie dieses durchwandern. In der Intermediärschicht sammeln sich MNC, also Lymphozyten und Monozyten sowie andere Partikel ähnlicher Dichte, hauptsächlich Thrombozyten. Gibt es Tumorzellen epithelialen Ursprungs in der Probe, so sind sie ebenfalls in dieser Fraktion enthalten. Zellfreies Blutplasma bildet die oberste Schicht. Die sich anschließenden Waschschrte dienen der Eliminierung von Thrombozyten sowie Ficoll-Paque™ PLUS-Medium- und Plasmaresten. Laut Hersteller können mit diesem Medium 60% ± 20% der in der Blutprobe enthaltenen MNC extrahiert werden. Nach Extraktion soll die hergestellte Lösung 95 ± 5% MNC enthalten, von denen über 90% lebend sein sollen, sowie maximal 5% Granulozyten und 10% Erythrozyten.

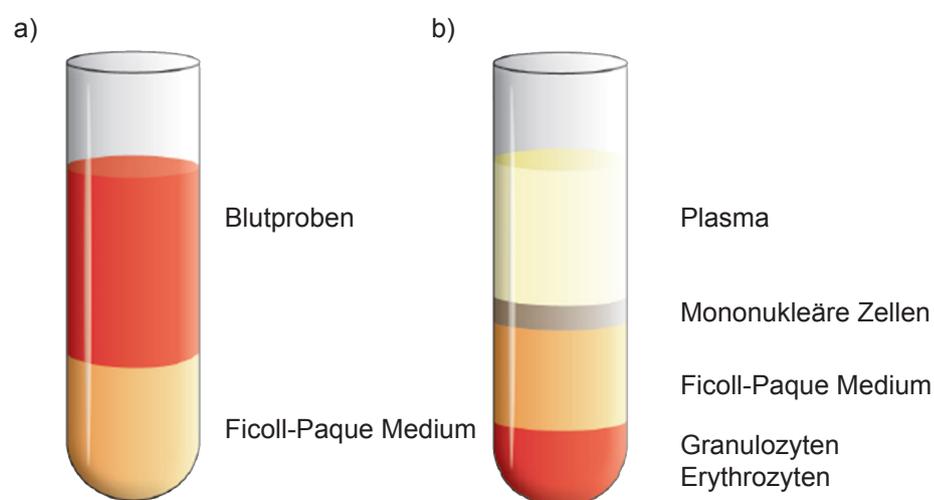


Abbildung 3: Blutaufarbeitung mit Ficoll-Paque™ PLUS, Probe vor und nach Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung aus GE Healthcare Bio-Sciences AB Data file 18-1152-69 AD, 2010). (a) Tube mit von Patientenblut überschichtetem Ficoll-Paque™ PLUS-Medium. (b) Tube nach Aufarbeitung mit sich ergebender Schichtung.

3.2.2 Verfahrensprotokoll für die Anreicherung von Tumorzellen

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank bei RT durchgeführt. Soweit nichts anderes angegeben, wurden alle Zentrifugationsschritte mit der Einstellung für Beschleunigung und Abbremsung auf Stufe neun durchgeführt. Das detaillierte Protokoll sowie die Materialliste finden sich im Anhang (Kapitel 11.1 und 11.2).

3.3 Detektion und Charakterisierung von Tumorzellen mittels Immunzytochemie

3.3.1 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase – Färbung

3.3.1.1 Einführung in die Methodik

Die APAAP-Färbung ist eine chromogene Methode, bei der Zellen im Durchlichtmikroskop detektiert werden. Es handelt sich um ein indirektes Verfahren bei dem drei verschiedene Antikörper eingesetzt werden. Zunächst werden die Proben mit einem Primärantikörper inkubiert, der gegen ein spezifisches Antigen gerichtet ist. Als Primärantikörper diente bei dieser Färbung der Antizytokeratin-Antikörper A45-B/B3 der laut Herstellerangaben gegen CK 8, 18 und 19 gerichtet ist und in Mäusen hergestellt wurde. Im zweiten Schritt wird ein sekundärer Antikörper verwendet, der in der Lage ist an Fc-Teile muriner Antikörper zu binden. Er dient somit als Brückenantikörper zwischen dem Primärantikörper und dem ebenfalls murinen APAAP-Komplex (Abbildung 4). Um dieses Bindungsverhalten zu ermöglichen, muss der Brückenantikörper im Überschuss zugegeben werden, sodass nur ein Arm des Fab-Fragmentes an den Primärantikörper bindet und der andere für die Bindung des APAAP-Komplexes zur Verfügung steht. Bei dem APAAP-Komplex handelt es sich um einen löslichen Immunkomplex aus murinem monoklonalem IgG1-Antikörper und dem Enzym alkalische Phosphatase. Antigenträgende Zellen werden durch eine Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht: Die alkalische Phosphatase hydrolysiert Naphthol-AS-BI-Phosphat, die dabei entstehenden Produkte reagieren mit Neufuchsin und bilden Azofarbstoffe, welche im Spektrum des sichtbaren Lichtes rötlich erscheinen. Im Substrat enthaltenes Levamisol sorgt für die Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase der Zellen. Durch die Gegenfärbung mit Hämalaun färben sich Zellkerne lila.

Als Positivkontrolle wurden Zytospins mit Zellen der Mausfibroblasten-Zelllinien 3T3 und der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 verwendet (vgl. Kapitel 3.3.3.1). Als Negativkontrolle

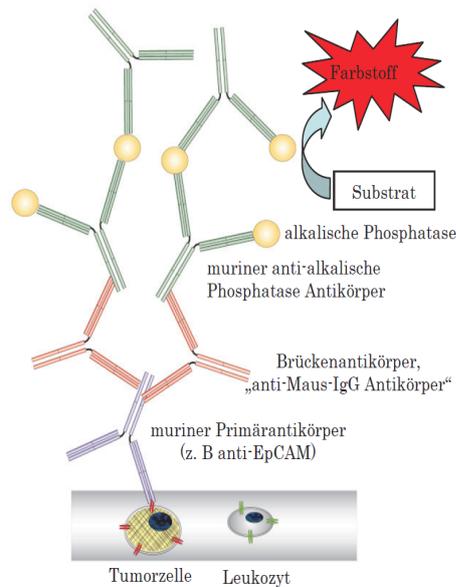


Abbildung 4: Schematische Darstellung der APAAP-Färbung (modifizierte Abbildung aus Dissertation Alpers I 2012). Der Primärantikörper bindet an aus Blut isolierten Tumorzellen, die das Antigen tragen. Der Brückenantikörper ist gegen murine Antikörper gerichtet und bindet somit sowohl den Primärantikörper als auch den APAAP-Komplex, bestehend aus murinem anti-alkalische Phosphatase-Antikörper und dem Enzym alkalische Phosphatase. Dieses katalysiert die Substrat-Chromogenreaktion. Abk: APAAP=alkalische Phosphatase-anti alkalische Phosphatase.

wurden OT verwendet auf denen mittels Ficoll-Paque™ PLUS-System isolierte MNC der Patientenprobe aufgetragen waren. Statt dem Primärantikörper A45-B/B3 wurde ein muriner Isotypenantikörper eingesetzt, der keine humanen Zytokeratinepitope erkennt. Pro Probe wurden drei OT mit A45-B/B3 als Primärantikörper sowie drei OT mit dem Isotypenkontroll-Antikörper als Primärantikörper gefärbt.

3.3.1.2 Verfahrensprotokoll für den Färbevorgang

Für die Negativkontrollen wurden während des gesamten Vorganges getrennte Färbekammern verwendet. Sowohl bei der A45-B/B3- als auch bei der Isotypenkontroll-Reihe wurde eine Positivkontrolle mitgeführt. Alle Inkubationsschritte wurden bei RT in einer feuchten Kammer durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass das Zellareal während des gesamten Färbevorgangs mit Flüssigkeit benetzt war. OT, die bei -80°C gelagert wurden, wurden 30 Min. vor Beginn der Färbung in Aluminiumfolie bei RT aufgetaut. Das detaillierte Protokoll und die Auflistung des Materials befinden sich im Anhang (Kapitel 11.3 und 11.4).

3.3.1.3 Evaluierung der Färbeergebnisse

Die Analyse der APAAP-gefärbten OT erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Kontroll-OT manuell beurteilt, dann ein automatisches computergesteuertes Screening der Test-OT durchgeführt. Anschließend wurde die Morphologie der detektierten Elemente von zwei geschulten Untersuchern unabhängig voneinander geprüft und bewertet. Das Screening erfolgte mittels des automatischen Scansystems Automated Cellular Imaging System II (ACIS®; ChromaVision Medical Systems, Inc., San Juan Capistrano, California, USA), welches die Analyse von auf OT fixierten und gefärbten Zellen ermöglicht. Zu dem System gehören ein computergesteuertes Lichtmikroskop (10x, 20x, 40x, 60x Objektiv) mit integrierter Kamera (ACIS® Microscope Unit) und eine Farberkennungssoftware. Die OT werden von der ACIS® Microscope Unit automatisch gescannt, wobei jedes Scanareal von der Kamera erfasst wird. Diese Daten werden in die Software übertragen, welche Bilder der detektierten Elemente nach Farbe, Intensität, Größe, Lokalisation und Form geordnet anzeigt. Die Software wurde auf die Detektion der Farbstoffe Neufuchsin und Hämalaun eingestellt. Vor jeder Nutzung wurde eine automatische Kalibrierung des Systems vorgenommen. Die vom ACIS® II detektierten Elemente wurden von zwei geschulten Untersuchern unabhängig voneinander evaluiert (mir selbst, S.S. und einer Wissenschaftlerin K.H.-E.). CTC-verdächtige Elemente wurden auf dem OT relokalisiert und in zahlreichen Ebenen fokussiert und beurteilt. Hierbei wurde die Morphologie der Elemente auf Charakteristika von Tumorzellen überprüft. Die Evaluation erfolgte nach den Kriterien der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection (Borgen *et al.* 1999). Wie in dieser Klassifikation vorgeschlagen wurden die Elemente in drei Kategorien eingeteilt: „Tumour cell“ (TC), „probable TC“, „TC negative“. In Tabelle 4 sind die Kriterien für die Zuordnung in die jeweilige Kategorie aufgelistet. Zu berücksichtigen ist, dass nicht alle Eigenschaften vorhanden sein müssen, um ein Element der jeweiligen Kategorie zuzuordnen; es muss jeweils mindestens ein Kriterium erfüllt sein. Gemäß Borgen *et al.* (1999) wurden die Zellen der Kategorie „probable TC“ dann als CTC-positiv (CTC⁺) gewertet, wenn die Kontrollen mit dem Isotypenantikörper negativ ausfielen.

Die Positivkontrollen wurden manuell mit dem Lichtmikroskop Axiostar plus (Carl Zeiss AG, Oberkochen) beurteilt. Die in Kapitel 3.2 zu findenden Abbildungen der detektierten Zellen wurden mit dem Ariol® SL-50 Applied Imaging-System Version 3.3 (vgl. Kapitel 3.3.2.3) erstellt, da dieses eine bessere Kamera besitzt als das ACIS® II.

Tabelle 4: Kriterien für die Evaluation immunzytochemisch gefärbter Zellen nach ISHAGE Working Group (Borgen et al. 1999). Die Eigenschaften die in Tabelle_M&M_1 für „probable TC“ bzw. hämatopoetische Zellen aufgelistet sind, sind nicht pathognomonisch, kommen aber in der erwähnten Kategorie häufiger vor als in der jeweils anderen. Abk.: TC=tumour cell.

Kategorie	Definition	Eigenschaften
TC	Zellen die pathognomonische Merkmale epithelialer Tumorzellen besitzen	<ul style="list-style-type: none"> • Deutlich erhöhte Kern-Plasma-Relation • Cluster von mindestens zwei Zellen
Probable TC	Zellen die weder pathognomonische Tumorzellmorphologie noch besondere Charakteristika von hämatopoetischen Zellen besitzen	<ul style="list-style-type: none"> • Heterogenes stark gefärbtes Zytoplasma • Erhöhte Farbstoffanlagerung perinukleär • Irreguläre Granula im Zytoplasma • Färbung bedeckt den Kern teilweise • Fein gestipptes Chromatin • Irreguläre Kernmembran • Unscheinbare Nukleoli
TC negative	Falsch-positive unspezifisch gefärbte hämatopoetische Zellen	<ul style="list-style-type: none"> • Homogenes schwach gefärbtes Zytoplasma • Mikrovakuolen oder Pin-point-Vakuolen enthaltendes Zytoplasma • Typische Pouches an der Zelloberfläche • Ähnlichkeit des Zellkerns mit dem von Plasmazellen
	Die Probe kontaminierende Plattenepithelzellen der Haut	<ul style="list-style-type: none"> • Kein Zellkern • Häufig bräunliche Farbe
	Artefakte	Farbstoffablagerungen

Fünf von 52 APAAP-gefärbten Proben konnten nicht bewertet werden, da die Negativkontrolle „positiv“ ausfiel – das heißt auch bei Einsatz des Isotypenantikörpers wurden Zellen angefärbt. Eine unspezifische Färbung konnte somit nicht ausgeschlossen werden (Casenr. 28, 29, 44, 46, 50).

3.3.2 Immunfluoreszenzdoppelfärbung

3.3.2.1 Einführung in die Methodik

Bei der im Folgenden beschriebenen Doppelfärbung wurden drei Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsmaxima verwendet, sodass eine Differenzierung der verschiedenen Antigene möglich war. Zur Visualisierung der Zytokeratinexpression wurde ein Antikörpercocktail aus den direkt Alexa Fluor® 488-gelabelten Panzytokeratin-Antikörpern C11 und AE1/AE3 eingesetzt. Der monoklonale Antikörper C11 detektiert CK 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18. Der monoklonale Antikörper AE1 bindet an CK der Klassen 10, 14, 15, 16 und 19. Der monoklonale Antikörper AE3 ist gegen CK 1 bis 8 gerichtet. Das Anregungsmaximum von Alexa Fluor® 488 liegt bei einer Wellenlänge von 490nm, sein Emissionsmaximum bei 525nm und erscheint somit im Spektrum des sichtbaren Lichts grün. Zur Untersuchung

der EGFR-Expression wurde als Primärantikörper ein monoklonaler muriner Anti-EGFR-Antikörper eingesetzt. Zu dessen Visualisierung diente ein sekundärer Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 546 gelabelt war. Dieser IgG-Antikörper stammt aus Hasenserum und ist in der Lage an Fc-Fragmente von Mausantikörpern zu binden. Das Anregungsmaximum von Alexa Fluor® 546 liegt bei 556nm, sein Emissionsmaximum bei 573nm und erscheint somit orange. Zur Darstellung der Zellkerne wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI genutzt, welcher an A-T-reiche Regionen der DNA bindet. Die maximale Exzitation liegt um 360nm, die maximal emittierte blaue Fluoreszenz um 460nm. Alle Angaben dieses Kapitels zu Exzitations- und Emissionsmaxima sowie Antikörpereigenschaften sind Angaben der Hersteller. Als Positivkontrolle dienten OT mit MNC aus dem Blut gesunder Probanden versehen mit EGFR-exprimierenden Mammakarzinom-Zellen der Linie MDA-MB-468. Pro Probe wurden drei OT gefärbt. Jede Färbung enthielt einen Positivkontroll-OT.

3.3.2.2 *Verfahrensprotokoll für den Färbevorgang*

Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT in einer feuchten dunklen Kammer. Alle Antikörper, Reagenzien, Puffer und Lösungen – mit Ausnahme von Solution B - wurden bei 4°C aufbewahrt und erst kurz vor deren Einsatz aus dem Kühlgerät entnommen. Das Zellareal war während des gesamten Färbevorgangs mit Flüssigkeit benetzt. Sind die OT bei -80°C gelagert worden, wurden diese 30 Min. vor Beginn der Färbung in Aluminiumfolie bei RT aufgetaut. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde die auf den OT aufgebrachte Flüssigkeit abgekippt, was im detaillierten Protokoll im Anhang (Kapitel 11.6) nicht einzeln erwähnt wird. Die Auswertung erfolgte mindestens sechs Stunden später um sicherzustellen, dass die Fluoreszenz des DAPI bereits vollständig entwickelt war und höchstens nach sieben Tagen, um möglichst wenig Verlust an Fluoreszenzintensität zu erzielen.

3.3.2.3 *Evaluierung der Färbeergebnisse*

Die Analyse der fluoreszenzgefärbten OT erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde ein automatisches computergesteuertes Screening durchgeführt. Anschließend wurde die Morphologie der detektierten Elemente von geschulten Untersuchern geprüft und bewertet. Das Screening der OT erfolgte mittels des halbautomatischen Scansystems Ariol® SL-50 Applied Imaging-System Version 3.3 (Molecular Devices Ltd., New Milton, UK; bis Juli

2011 Applied Imaging, A Genetix Company, New Milton, GB). Das computergesteuerte Mikroskop Olympus® BX61 (OLYMPUS LIFE SCIENCE EUROPA GmbH, Hamburg) besitzt mehrere Fluoreszenzkanäle und einen Durchlichtkanal (5x, 10x, 20x, 40x, 100x Objektiv). Die integrierte digitale Kamera fertigt 10x-Bilder aller Scanareale des OT an, welche dann in die Bildanalysesoftware übertragen und in dieser angezeigt werden. Es wurde der auf die Detektion von CTC zugeschnittene „Cellsight Assay“ mit dem Skript „CTC10X_PFB_reverse“ verwendet. Der Kanal, mit welchem die EGFR-Expression detektiert wurde, wurde als Screeningkanal verwendet. Wurde in diesem Kanal ein auffälliges Zellsignal detektiert, nahm die Kamera zusätzlich Bilder aller anderen Kanäle auf und zeigte diese dem Anwender an. Der Scanvorgang erfolgte voll automatisch. Es wurden drei verschiedene Fluoreszenzfilter mit den für die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe passenden Eigenschaften verwendet (vgl. Kapitel 3.3.2.1): Für DAPI der Filterblock DAPI, zur Detektion von Alexa Fluor® 488 der Filterblock FITC bzw. TRITC für Alexa Fluor® 546. Vor jedem Scanvorgang wurden die Kameraeinstellungen manuell an der jeweiligen Probe kalibriert um eine exakte Analyse zu gewährleisten. Dafür wurde ein Blickfeld des OT einer Patientenprobe in allen Fluoreszenzkanälen beurteilt und abhängig von der Fluoreszenzintensität die Bildqualität für jeden Kanal festgelegt. Diese kann mittels der drei Parameter „Gain“ (Sensibilität), „Offset“ (Schwellenwert) und „Exposure“ (Belichtungszeit) reguliert werden. War die Fluoreszenzintensität mehrerer Proben vergleichbar, wurden sie mit den gleichen Kalibrierungseinstellungen gescannt. Die vom Ariol® detektierten Elemente wurden von zwei trainierten Personen (mir selbst, S.S. und einer Wissenschaftlerin K.H.-E.) unabhängig voneinander evaluiert. CTC-verdächtige Elemente wurden auf dem OT relokalisiert und deren Eigenschaften in allen Kanälen und Vergrößerungsstufen beurteilt. Positivitätskriterien waren ein im DAPI-Kanal sichtbarer Zellkern und eine typische Morphologie der fluoreszenzgefärbten Antigene. Im Fall von EGFR musste eine randständige Färbung vorliegen, bei der Zytokeratinexpression wurde auf die Sichtbarkeit deren Strukturen als Teil des intrazellulären Zytoskeletts geachtet. Als Grundlage für die Beurteilung der Zellmorphologie dienten die Kriterien der European ISHAGE Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection (Borgen *et al.* 1999; siehe Kapitel 3.3.1.3). Beispielbilder positiver Zellen sind in Abbildung 5 zu sehen. Die Qualität der Positivkontrolle wurde durch manuelle Nutzung des Mikroskops beurteilt.

In drei von 52 Fällen standen nicht ausreichend viele OT mit Patientenmaterial für die Immunfluoreszenzfärbung zur Verfügung (Casenr. 25, 29, 30), weshalb nur 49 Proben gefärbt werden konnten.

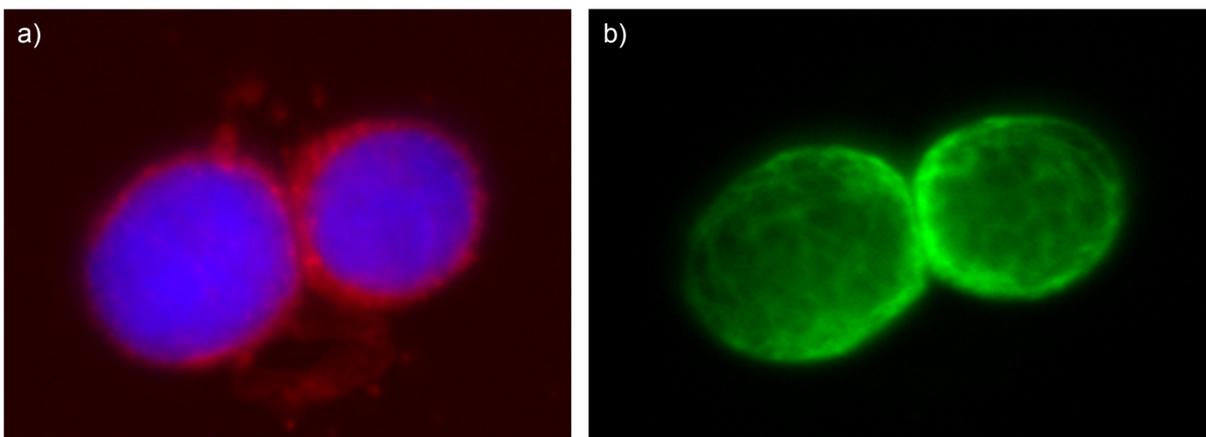


Abbildung 5: Fotos eines Zellclusters der Linie MDA-MB-468 nach Immunfluoreszenzdoppelfärbung. Positivkontrolle aus eigener Färbung. **(a)** Filterblock DAPI und TRITC: blau= mit DAPI gefärbte Zellkerne, rot= mit Alexa Fluor® 546 visualisierte EGFR-Expression. **(b)** Filterblock FITC: grün= mit Alexa Fluor® 488 gefärbte Zytokeratine. Fotos erstellt mittels Ariol® Applied Imaging-System Version 3.3 (Molecular Devices Ltd., New Milton, UK). Abk.: DAPI=4',6-diamidino-2-phenylindol; EGFR=epidermal growth factor receptor.

3.3.3 Herstellung der Positivkontrollobjektträger

3.3.3.1 Zelllinien

Für die Positivkontrolle der APAAP-Färbung wurden OT mit 3T3- und MCF7-Zellen verwendet. Bei der Zelllinie 3T3 handelt es sich um murine Fibroblasten, also Zellen die keine Zytokeratine exprimieren (Todaro und Green 1963). MCF7 ist eine humane Mammakarzinom-Zelllinie, die aus Adenokarzinomzellen eines Pleuraergusses etabliert wurde und Epithelzellcharakteristika aufweist (Soule *et al.* 1973). Als Positivkontrolle für die Immunfluoreszenzfärbung dienten Zellen der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane Adenokarzinomzellen eines Pleuraergusses, die eine hohe Amplifikationsrate des EGFR-Gens sowie eine starke Expression von EGFR aufweisen (Filmus *et al.* 1985).

3.3.3.2 Verfahrensprotokoll für die Zellkultur

Alle Arbeitsschritte wurden bei RT unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Das Medium, der Puffer und die Reagenzien wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden bei -80°C in flüssigem Stickstoff in Cryo Tubes mit 10% DMSO-haltigem Medium aufbewahrt. Das detaillierte Protokoll und die Materialliste befinden sich im Anhang (Kapitel 11.7 und 11.8).

3.3.3.3 *Anfertigung der Zytospins*

Auf jeden Kontroll-OT für die APAAP-Färbung wurden etwa 500 MCF7- und 700.000 3T3-Zellen aufgetragen. Zur Herstellung der Kontroll-Zytospins für die Immunfluoreszenzfärbung wurde über das Ficoll-Paque™ PLUS-System aufgearbeitetes Blut (siehe Kapitel 3.2) von gesunden Probanden verwendet. Jeder Zytospin wurde mit etwa 500 Zellen der Linie MDA-MB-468 und 700.000 MNC bestückt. Die Anfertigung der Zytospins entspricht den Arbeitsschritten 18 bis 24 des Verfahrensprotokolls im Kapitel 11.2. Lediglich für Punkt 21 ergibt sich eine Änderung: Es wurden die Suspensionen von MCF7 und 3T3-Zellen bzw. MDA-MB-468-Zellen und MNC in einem Polypropylenröhrchen im Verhältnis 1:1.400 gemischt. Die eingesetzte Menge an Suspension war abhängig von der Anzahl der herzustellenden OT.

3.4 Patientendatenerhebung

Die verwendeten Patientendaten stammen aus folgenden Informationsquellen: Primär wurden elektronische Patientenakten des UKE ausgewertet, und in eine Datenbank für Vulvakarzinom-Forschung eingegeben, welche in der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie ausgearbeitet wurde. Die Datenbank befand sich auf einem passwortgeschützten Computer ohne Internetverbindung, auch für die einzelnen Dateien waren mit einem Passwortschutz versehen. Für die Erhebung des Follow-up wurden zusätzlich Informationen von den ambulant betreuenden Gynäkologen und/oder Hausärzten per Fragebogen eingeholt. In einigen Fällen wurden Patientinnen direkt telefonisch kontaktiert. An der Datenerhebung waren mehrere Personen beteiligt: Ein Teil der Daten stammt aus einer Datenbank, die von Lis-Femke Griebel und Nicole Häringer im Rahmen ihrer bislang unveröffentlichten Dissertationen an der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des UKE geführt wurde. Daten aller nicht darin geführten Patientinnen wurden von mir selbst erhoben. Der dabei verwendete Fragebogen, der zur Follow-up-Erhebung an die ambulant betreuenden Ärzte gesendet wurde, ist im Anhang (Kapitel 11.9) zu finden. Es wurde der Stand der Datenbank von August 2014 verwendet. Im Untersuchungszeitraum erschienen neue Versionen der TNM- und FIGO-Klassifikation. Ab 2010 wurde die siebte Auflage der UICC und die 2009 publizierte Auflage der FIGO-Klassifikation angewandt (siehe Kapitel 2.1.3). Sechs Patientinnen wurden noch im Jahr 2009 durch das Institut für Pathologie gemäß voriger Versionen klassifiziert. Zur Datenauswertung wurde für diese soweit möglich eine Einordnung in die neuen Klassifikationen vorgenommen.

3.5 Statistische Auswertung

Aus der Analyse der prognostischen Relevanz des CTC-Nachweises mittels APAAP-Färbung wurden alle Patientinnen ausgeschlossen, die kein Vulvakarzinom hatten (Casenr. 26, 32, 40, 41, 43, 48) sowie die Patientinnen bei denen eine Nachresektion stattfand (Casenr. 39, 49). Die Fälle von VIN bzw. Z.n. Vaginalkarzinom sind sowohl histopathologisch als auch bezüglich der Prognose nicht vergleichbar. Letzteres gilt auch für die Fälle der Nachresektionen, da der CTC-Status zu einem anderen Zeitpunkt nämlich nach Entfernung des Primärtumors bestimmt wurde, und bei Blutentnahme kein Tumorgewebe mehr vorhanden war. Somit wurden 39 Fälle zur Verfügung.

Es wurde eine rein deskriptive Auswertung durchgeführt und die Ergebnisse qualitativ graphisch dargestellt, da aufgrund der geringen Anzahl CTC⁺-Fälle keine aussagekräftige induktive statistische Analyse möglich war. Die Graphiken wurden aus organisatorischen Gründen teils mit IBM® SPSS® Statistics Version 22 (IBM Corporation 2013) und teils mit der Open Source statistischen Software R 3.1.1 (R Core Team 2014) für MacOS 10.6.8 erstellt. Für die Auswertung mit R. wurden die Daten aus dem Programm Excel mit dem Paket xlsx (Dragulescu 2014) importiert. Die Graphiken wurden in Form von Vektorgraphiken mit dem Paket RSvgDevice (Luciani *et al.* 2014) exportiert. Die Bearbeitung aller Graphiken erfolgte mit Adobe® Illustrator® CS4 14.0.0 (Adobe Systems, Inc., San Jose, Kalifornien, USA).

4. ERGEBNISSE

4.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von 52 Patientinnen mit Vulvakarzinom untersucht. In sieben Fällen stellte sich nach Aufarbeitung der Blutprobe heraus, dass kein Plattenepithelkarzinom der Vulva vorlag, sondern dass es sich um folgende Diagnosen handelte: Fünf Patientinnen hatten eine präkanzeröse high-grade VIN III-Läsion (Casenr. 26, 40, 41, 43, 48), bei zwei von ihnen wurde drei bzw. 39 Monate zuvor ein Vulvakarzinom diagnostiziert (Casenr. 26, 43). Bei einer Patientin wurde der Verdacht auf ein Rezidiv eines Vaginalkarzinoms ausgeschlossen (Casenr. 32). In zwei weiteren Fällen handelte es sich zwar um Patientinnen mit VSCC, allerdings fand die Blutentnahme abweichend vom oben genannten Vorgehen statt: Die beiden Proben wurden bei Tumornachresektion 23 bzw. 26 Tage nach dem Ersteingriff entnommen. In der pathologischen Untersuchung des Nachresektats wurde in beiden Fällen kein Tumorgewebe nachgewiesen (Casenr. 39, 49). Unter den VSCC-Fällen ergaben sich folgende Besonderheiten: In einem Fall wurde zeitgleich ein Urothelkarzinom diagnostiziert und operativ entfernt (Casenr. 28), in zwei Fällen erfolgte vor Operation und Blutentnahme eine neoadjuvante Radiochemotherapie mit Cisplatin (Casenr. 7, 29). Tabelle 5 gibt eine Übersicht der Diagnosen und Sonderfälle. Eine ausführliche Auflistung der Patientencharakteristika aller VSCC-Fälle ist im Anhang zu finden.

Tabelle 5: Fallzahlen und Besonderheiten der in die Untersuchung eingeschlossenen Patientinnen geordnet nach Diagnosen. Abk.: VIN=vulvar intraepithelial neoplasia; Z.n.=Zustand nach.

Diagnose	Fallzahl absolut	Fallzahl prozentual	Besonderheiten
Vulvakarzinom Erstdiagnose	34	65,4%	1 Fall simultan Zweitkarzinom 2 Fälle neoadjuvante Radio- chemotherapie
Vulvakarzinom Rezidiv	10	19,2%	-
Vulvakarzinom Nachresektion	2	3,9%	-
VIN III	5	9,6%	2 Fälle Z.n. Vulvakarzinom
Z.n. Vaginalkarzinom	1	1,9%	-
Gesamt	52	100%	

Die Altersstruktur des Patientenkollektivs ist in Abbildung 6 zu sehen. Das Durchschnittsalter bei Blutentnahme betrug 65 Jahre (Median: 65, Minimum: 35, Maximum: 88 Jahre).

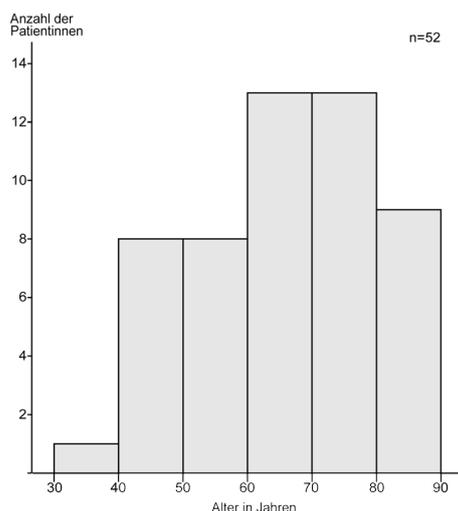


Abbildung 6: Altersstruktur des Patientenkollektivs.

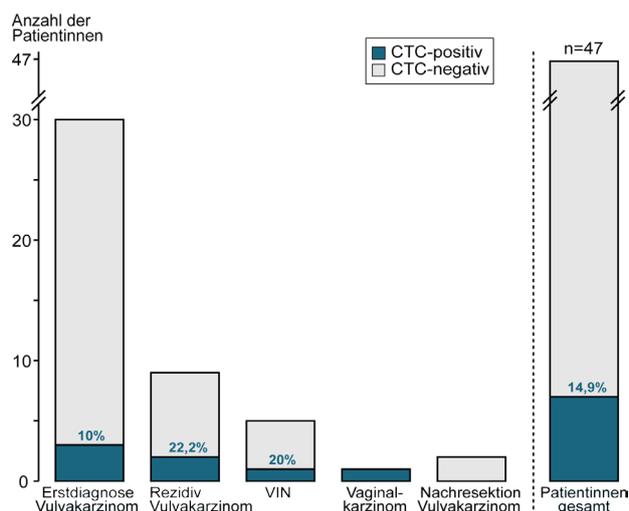


Abbildung 7: Anzahl der CTC+ und CTC-Fälle je Diagnosekategorie und gesamt. Abk.: VIN= vulvar intraepithelial neoplasia.

4.2 Detektion von CTC mittels APAAP-Färbung

Insgesamt konnten 47 Proben ausgewertet werden. Davon waren 40 (85,1%) CTC-negativ (CTC⁻) und sieben (14,9%) CTC⁺ (vgl. Abbildung 7). Der Anteil der CTC⁺-Fälle war unter den Rezidiv-Patientinnen mehr als doppelt so hoch wie bei Patientinnen mit Erstdiagnose (22,2% bzw. 2/9 vs. 10% bzw. 3/30). Auch in einem der fünf VIN-Fälle wurde eine CTC detektiert (Casenr. 48) sowie im Fall der Patientin mit Vaginalkarzinom in der Vorgeschichte (Casenr. 32).

Bei fünf Proben konnte die Färbung nicht ausgewertet werden (Casenr. 28, 29, 44, 46, 50). Darunter befanden sich der Fall der Patientin mit simultanem Urothelkarzinom (Casenr. 28) sowie einer der Fälle in denen eine neoadjuvante Therapie durchgeführt wurde (Casenr. 29).

Unter den rund 2×10^6 analysierten MNC pro Probe befanden sich in zwei der sieben positiven Proben jeweils zwei CTC, in den übrigen fünf jeweils eine CTC (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht der APAAP-positiven Proben. Abk.: APAAP=alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase; Casenr.=casenumber; TC=tumour cell(s), TC?=probable TC, VIN=vulvar intraepithelial neoplasia; Z.n.=Zustand nach. Symbol: *=Vulvakarzinom.

	Rezidiv *	Erstdiagnose *	Rezidiv *	Erstdiagnose *	Erstdiagnose *	VIN	Z.n. Vaginalkarzinom
Anzahl CTC/Probe	2	2	1	1	1	1	1
Kategorisierung nach Borgen <i>et al.</i> (1999)	1TC 1TC?	2TC?	1TC	1TC	1TC?	1TC	1TC?
Casenr.	34	22	18	38	16	48	32
	28,60%		71,40%				

Bei vier der insgesamt neun detektierten Zellen lagen morphologische Eigenschaften vor, die pathognomonisch für epitheliale Tumorzellen sind (siehe Abbildung 8). Drei der Zellen zeigten eine deutliche Erhöhung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns (Abbildung 8a-c); die Zytokeratinfärbung überdeckte teilweise den Kern. Eine Zelle ist zudem deutlich größer als die CK-negativen Zellen der Umgebung (Abbildung 8b). Bei einer anderen Zelle waren irreguläre Granula im Zytoplasma zu sehen (Abbildung 8d). Alle vier Zellen hatten ein inhomogen stark gefärbtes Zytoplasma. Die fünf anderen detektierten Zellen zeigten keine pathognomonische Tumorzellmorphologie aber besaßen Eigenschaften, die bei epithelialen Tumorzellen häufiger anzutreffen sind als bei hämatopoetischen Zellen (siehe Abbildung 9). Sie wurden der Kategorie „probable TC“ zugeordnet. Alle Zellen besaßen ein heterogen stark gefärbtes Zytoplasma. Bei den Zellen in Abbildung 9a-b bedeckt die Färbung teilweise den Zellkern. Abbildung 9c-d zeigen irreguläre Granula im Zytoplasma der Zellen. Gemäß den Kriterien der ISHAGE Working Group (Borgen *et al.* 1999) wurden die Zellen der Kategorie „probable TC“ als CTC⁺- gewertet.

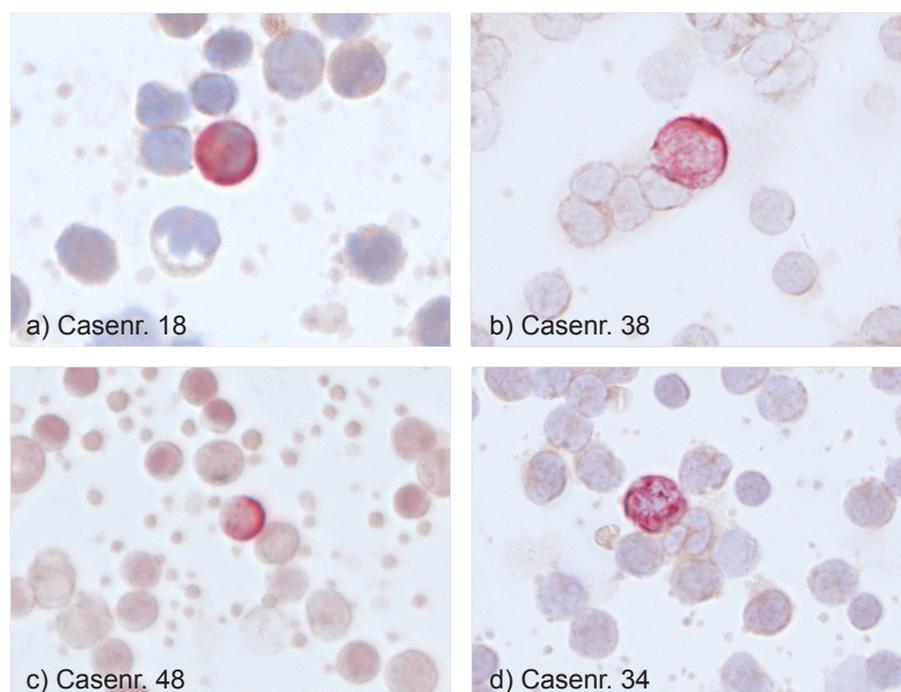


Abbildung 8: Zellen der Kategorie „TC“ nach Blutaufarbeitung über Ficoll-Paque™ PLUS-System und Detektion mit Antizytokeratin-Antikörper A45-B/B3 mittels APAAP-Färbung. Vier TC in vier verschiedenen Blutproben. Die Zytokeratine der TC sind rötlich angefärbt, Zytokeratin-negative Zellen durch die Gegenfärbung bläulich. Fotos erstellt mittels Ariol® Applied Imaging-System Version 3.3. Abk.: Casenr.=casenumber; TC=tumour cell(s); APAAP=alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase.

Bei der Patientin mit VIN-Läsion bei der eine CTC nachgewiesen wurde (Casenr. 48), handelte es sich um eine 67-jährige Patientin mit multiplen Gewebepathologien. Es lagen Dysplasien

der Vulva im Sinne von VIN I bis III, ein Condyloma acuminatum sowie eine zervikale intraepitheliale Läsion Grad III vor. Im Zervixabstrich wurde hr-HPV nachgewiesen. Während des 14 monatigen Follow-up traten keine Gewebeveränderungen auf. Die Patientin mit dem Vaginalkarzinom in der Vorgeschichte (Casenr. 32) war zum Zeitpunkt der Blutuntersuchung 62 Jahre alt. Das Plattenepithelkarzinom (pT₂, pN₀, G2, L₀, V₀, R₀) wurde drei Jahre zuvor erstmals diagnostiziert und mit vorderer Exenteration inklusive Adnektomie beidseits, Vulvektomie sowie pelviner und inguinaler Lymphonodektomie beidseits behandelt. Im Beobachtungszeitraum von 18 Monaten nach Blutentnahme blieb die Patientin rezidivfrei.

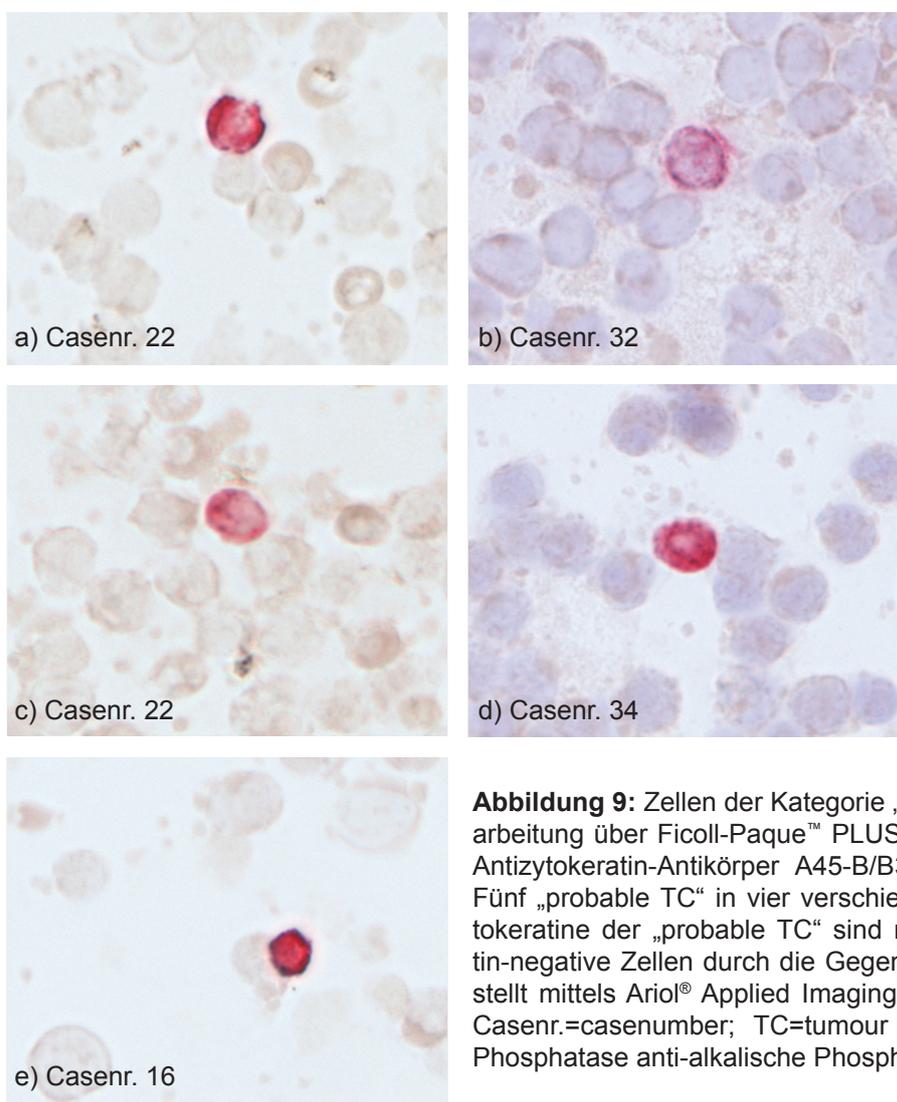


Abbildung 9: Zellen der Kategorie „probable TC“ nach Blutaufarbeitung über Ficoll-Paque™ PLUS-System und Detektion mit Antizytokeratin-Antikörper A45-B/B3 mittels APAAP-Färbung. Fünf „probable TC“ in vier verschiedenen Blutproben. Die Zytokeratine der „probable TC“ sind rötlich angefärbt, Zytokeratin-negative Zellen durch die Gegenfärbung bläulich. Fotos erstellt mittels Ariol® Applied Imaging-System Version 3.3. Abk.: Casenr.=casenumber; TC=tumour cell(s); APAAP=alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase.

Aus den folgenden Analysen des Zusammenhangs histopathologischer Parameter und dem präoperativen CTC-Nachweis mittels APAAP-Färbung sowie dessen prognostischer Relevanz wurden ausgeschlossen: 1. Alle Patientinnen, die kein Vulvakarzinom hatten (Casenr. 26, 32, 40, 41, 43, 48). Diese Fälle von VIN sind prämaligne bzw. im Fall von Z.n. Vaginalkarzinom

eine andere Entität betreffend, und deshalb sowohl histopathologisch als auch bezüglich der Prognose nicht vergleichbar. 2. Patientinnen bei denen eine Nachresektion stattfand (Casenr. 39, 49). Auch in diesen Fällen ist keine Vergleichbarkeit gegeben, da der CTC-Status unter anderen Bedingungen bestimmt wurde - nämlich zu einem Zeitpunkt an dem der Primärtumor bereits entfernt war und sich bei Blutentnahme kein Tumorgewebe mehr nachweisen lies. Folglich standen 39 Fälle für die Analysen zur Verfügung. Von diesen 39 Fällen waren 5 CTC⁺ (12,8%) und 34 CTC⁻ (87,2%).

4.2.1 Histopathologische Tumorparameter und CTC-Status

Untersucht wurden die Parameter TNM- und FIGO-Stadium, Gewebedifferenzierungsgrad, Lymphgefäß- und Gefäßinvasion, Begleitdysplasie sowie Tumorgröße und Gewebeinvasionstiefe. Weil die Anzahl befallener Lymphknoten häufiger bekannt war, als die Zuordnung in N-Stadien, wurde zusätzlich der Parameter Lymphknotenbefall gebildet, der lediglich zwischen positivem oder negativem Lymphknotenstatus unterscheidet.

Die Mehrheit der Patientinnen (22/39) hatte T1b-Tumoren (56,4%), die zweitgrößte Gruppe (3/39) war die der T2-Tumoren (7,7%), andere T-Stadien waren nur einzeln vertreten (jeweils ein Fall bzw. 2,6% yT0 und T1a), in 12 von 39 Fällen konnte das T-Stadium nicht ermittelt werden (30,8%; vgl. Abbildung 10). CTC wurden nachgewiesen im Fall der Patientin mit T1a-Tumor, in 9,1% der T1b-Fälle (2/22) sowie in 16,7% der unbekannt T-Stadien (2/12).

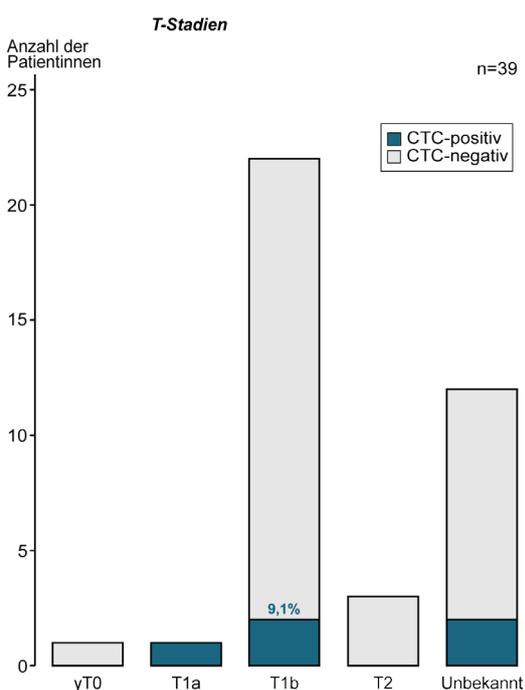


Abbildung 10: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den T-Stadien der TNM-Klassifikation der UICC (7. Auflage 2009). Abk.: UICC=Union for International Cancer Control; "y"=Zustand nach neoadjuvanter Therapie.

Die meisten Patientinnen (18/39) befanden sich in Stadium N0 (46,2%), 7 von 39 (17,9%) in Stadium N1, 5 von 39 (12,8%) in Stadium N2, in neun Fällen (23,1%) war das N-Stadium unbekannt (Abbildung 11). CTC⁺-Fälle traten bei den N0-Stadien sowie in der Gruppe der nicht bekannten N-Stadien auf: 3 von 18 (16,7%) bzw. 2 von 9 (22,2%). Bei fünf Patientinnen konnte wegen fehlender Pathologie-Daten keine Bestimmung der N-Stadien erfolgen, die Anzahl befallener Lymphknoten war jedoch bekannt. Deshalb wurde zusätzlich der Parameter „Lymphknotenbefall“ gebildet, der lediglich zwischen positiven und negativen Lymphknotenstatus unterscheidet. Befallene Lymphknoten hatten 17 von 39 (43,6%) der Patientinnen, in vier Fällen blieb dies unbekannt (vgl. Abbildung 12). Im Unterschied zum Parameter „N-Stadium“ traten CTC⁺-Fälle auch unter den Patientinnen mit Lymphknotenbefall auf (1/17 vs. 3/18) ohne Befall, der Anteil CTC⁺-Proben lag mit 5,9% dennoch niedriger als in der Gruppe ohne Lymphknotenbefall (16,7%).

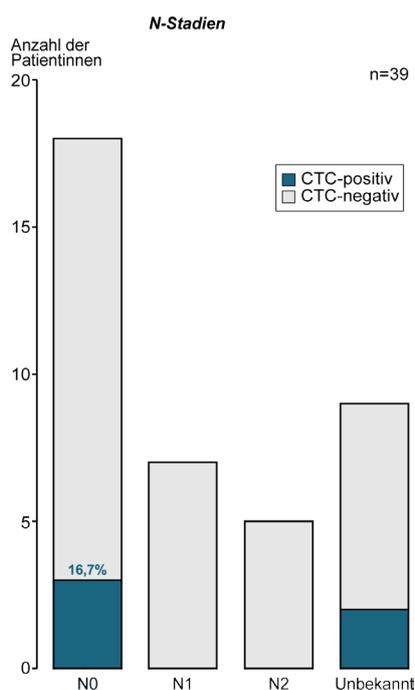


Abbildung 11: Häufigkeit von CTC⁺-en und CTC⁻-negativen Fällen in den N-Stadien der TNM-Klassifikation der UICC (7. Auflage 2009) ohne Unterkategorien. Abk.: UICC=Union for International Cancer Control.

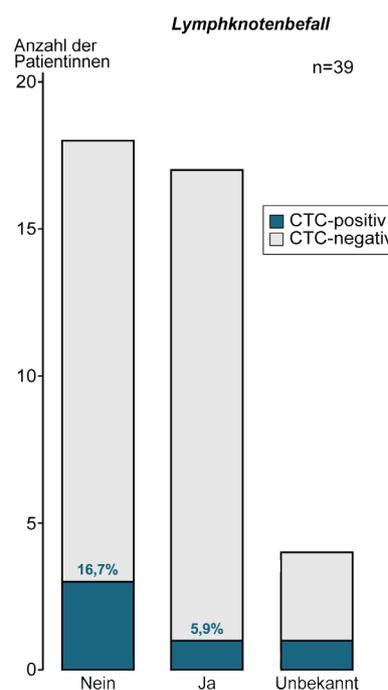


Abbildung 12: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen unter den Patientinnen mit und ohne Lymphknotenbefall.

Fernmetastasierte Tumoren (M1) hatten 5 von 39 Patientinnen (12,8%), der Anteil von CTC⁺-Proben lag mit 40% (2/5) in dieser Gruppe deutlich höher als unter den Patientinnen ohne Fernmetastasierung mit 8,8% (3/34; M0; Abbildung 13).

Die Fälle waren relativ gleichmäßig auf alle FIGO-Stadien verteilt, wobei mit 11 von 39 (28,2%) Stadium I am häufigsten war, gefolgt von Stadium III mit 7 von 39 (17,9%) und Stadium II und IV mit jeweils fünf Fällen (12,8%), in 11 Fällen lagen keine Daten zum FIGO-Stadium vor (28,2%; Abbildung 14). Mit Ausnahme des Stadiums III, indem keine CTC⁺-Fälle auftraten, war der CTC⁺-Anteil in den übrigen Stadien annähernd gleich hoch, und zwar zwischen 18,2% und 20%, 1 der 11 Fälle unbekannter FIGO-Stadien war CTC⁺ (9,1%).

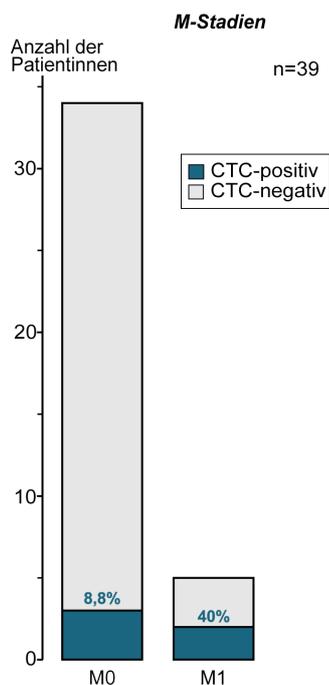


Abbildung 13: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den M-Stadien der TNM-Klassifikation der UICC (7. Auflage 2009). M0=Keine Fernmetastasierung; M1=Fernmetastasierung. Abk.: UICC=Union for International Cancer Control.

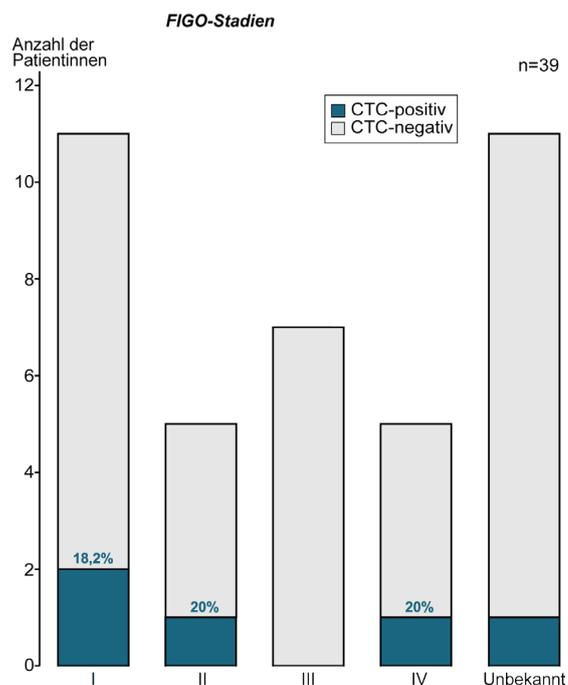


Abbildung 14: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den FIGO-Stadien (Klassifikation von 2009) ohne Unterkategorien. Abk.: FIGO=Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique.

Die meisten Tumoren 26 von 39 (66,7%) waren mittelgradig differenziert (G2), mit 9 von 39 waren knapp ein Viertel schlecht (G3) und nur einzelne (2/39) gut differenziert (G1), in zwei Fällen war das Grading unbekannt (Abbildung 15). Vier der CTC⁺-Patientinnen hatten G2-Tumoren., dies entspricht einem Anteil von 15,4% der G2-Fälle. Bei einer CTC⁺-Patientin lagen keine Daten zum Differenzierungsgrad vor.

Bei 6 der 39 Patientinnen (15,4%) waren Lymphgefäße von Tumorgewebe (L1; Abbildung 16), bei zweien (5,1%) Blutgefäße infiltriert (V1; Abbildung 17). In diesen Gruppen wurden häufiger CTC nachgewiesen als in den Gruppen bei denen keine Infiltration vorlag (L0 bzw. V0): Bei der Lymphangiainvasion war es 1 von 6 L1-Fällen (16,7%) gegenüber 3 von 25 L0-Fällen (12%). Der Unterschied fiel bei der Angiainvasion drastischer aus: Es wurden bei allen V1-Fällen CTC detektiert (100%) und bei 2 der 29 V0-Fällen (6,9%).

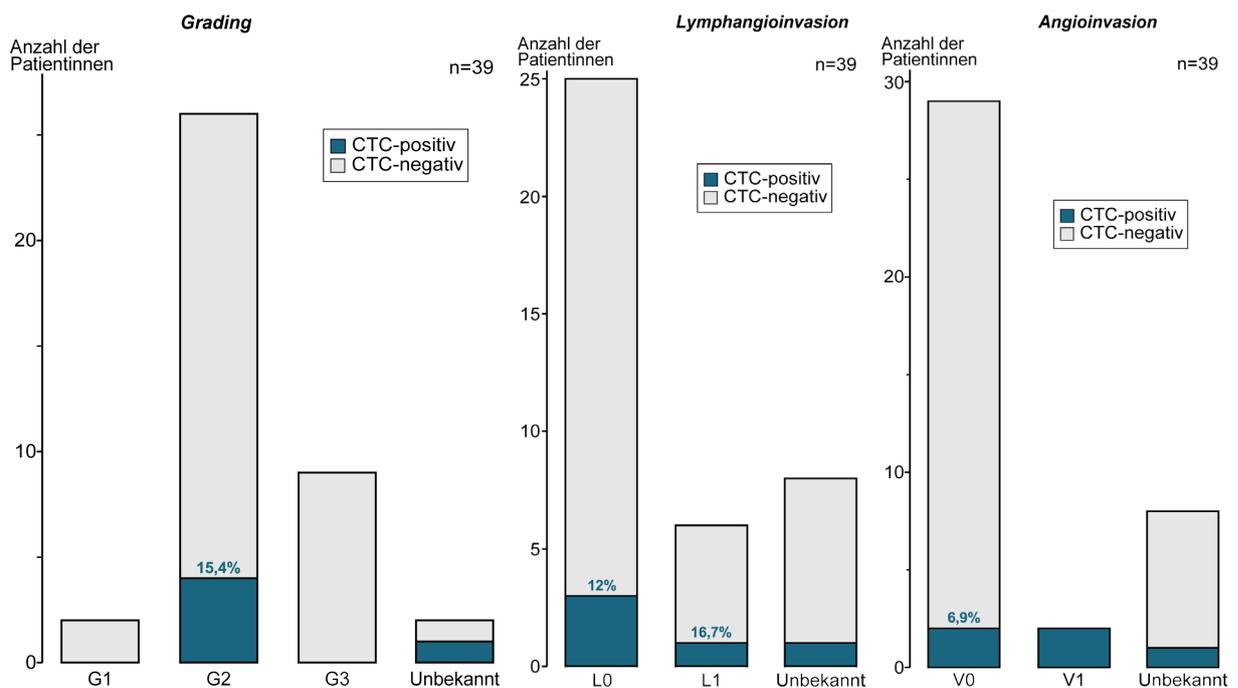


Abbildung 15: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den verschiedenen Gewebedifferenzierungsgraden (Grading). G1=gut differenziert, G2=mäßig differenziert, G3=schlecht differenziert.

Abbildung 16: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen unter den Patientinnen mit und ohne Lymphangiostasis. L0=Keine Lymphgefäßinvasion; L1=Lymphgefäßinvasion.

Abbildung 17: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen unter den Patientinnen mit und ohne Angiostasis. V0=Keine Gefäßinvasion, V1=Gefäßinvasion.

Zusätzliche Gewebedysplasien kamen bei einem Drittel der Patientinnen vor (13/39), in zwei Fällen lagen keine Daten dazu vor. Unter diesen 13 waren die VIN mit 70% am häufigsten (Grad I-III), 15% machte Lichen sclerosus aus, bei ebenfalls 15% lag beides vor (vgl. Abbildung 18). Der CTC⁺-Anteil war in letztgenannter Gruppe mit 50% am höchsten, während der Anteil bei alleiniger VIN (11,1%) etwas größer war als ohne Begleitdysplasie (8,3%) und in den Fällen von nur Lichen sclerosus keine CTC detektiert wurden.

Beim Vergleich von Infiltrationstiefe und Tumorgöße der CTC⁺ und CTC⁻-Gruppe fiel auf, dass es sich bei den zwei bzw. drei CTC⁺-Fällen für die Daten vorliegen, nicht um besonders große oder tief infiltrierende Tumoren handelt (keiner der CTC⁺-Fälle liegt oberhalb der oberen Whisker, vgl. Abbildung 19).

4.2.2 Outcome und CTC-Status

Follow-up-Daten konnten in allen 39 Fällen erhoben werden. Die durchschnittliche Beobachtungsdauer lag bei 17 Monaten (Median: 15, Minimum: 2, Maximum: 40). Es wurde

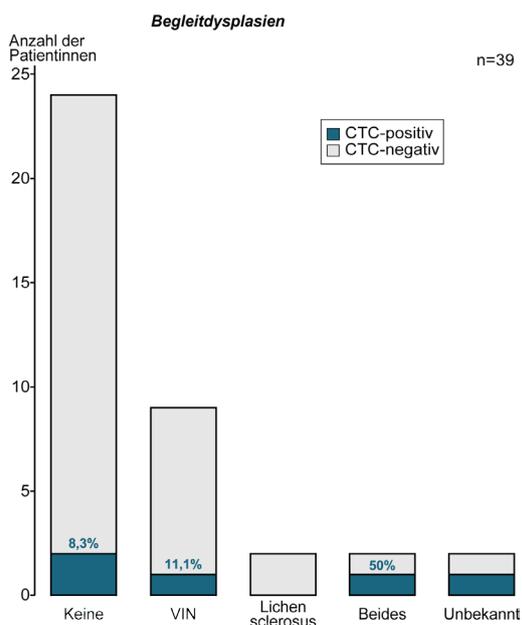


Abbildung 18: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC-Fällen in den Gruppen der Patientinnen mit verschiedenen Begleitdysplasien der Vulva. In der Kategorie VIN sind die Stufen I-III inkludiert. Abk.: VIN= vulvar intraepithelial neoplasia.

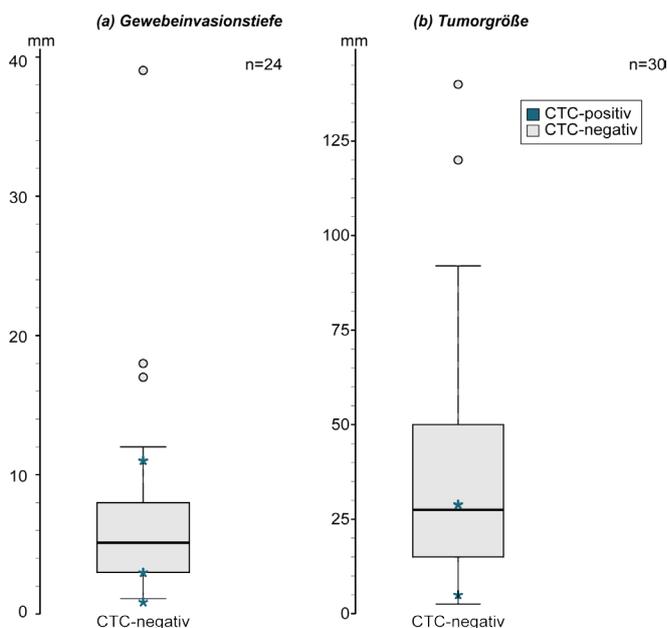


Abbildung 19: Vergleich der (a) Gewebeinvasionstiefe und (b) Tumorgröße (in mm) von CTC- und CTC⁺-Fällen. Verteilung der CTC-Fälle im Boxplot, blaue Sternchen markieren die CTC⁺-Fälle. Die horizontal hervorgehobenen Striche repräsentieren den Median, die Boxen werden begrenzt von den 25%- und 75%-Quartilen, die Whisker zeigen den 1,5-fachen Bereich der Boxlänge an, die Punkte sind Ausreißer.

das rezidivfreie sowie das krankheitsspezifische und das Gesamtüberleben erfasst. Bei 23,1% (9/39) der Patientinnen trat im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv auf, in 10,3% (4/39) kam es zum Krankheitsprogress (Abbildung 20). Unter Patientinnen mit Rezidiv wurden keine CTC nachgewiesen aber die Hälfte der Fälle progredienten Verläufe waren CTC⁺ (2/4). Auch in der rezidivfreien Gruppe wurden in 3 von 26 Fällen CTC detektiert (11,5%). Im Beobachtungszeitraum verstarben 11 der 39 der Patientinnen (28,2%), neun davon an Folgen der Tumorerkrankung (81,8%). In der Gruppe der verstorbenen Patientinnen wurden häufiger CTC nachgewiesen: 2 von 11 (18,2%) vs. 3 von 28 (10,7%). Der Unterschied fällt mit 2 von 9 (22,2%) noch größer aus wenn nur tumorbedingten Todesfälle berücksichtigt werden (vgl. Abbildung 21). In der Kaplan-Meier-Analyse des krankheitsspezifischen Überlebens war zu sehen, dass die Kurve der CTC⁺-Fälle fast im gesamten Bereich mit deutlichem Abstand zur CTC-Kurve verläuft (siehe Abbildung 22). Im Follow-up-Zeitraum trat mit 35,9% bei etwas über einem Drittel der Patientinnen ein Rezidiv oder Todesfall auf. In dieser Gruppe wurden mit 2 von 14 (14,2%) vs. 3 von 25 (12,0%) häufiger CTC detektiert, wobei auch hier der Unterschied deutlicher ausgeprägt ist, wenn nur tumorbedingten Todesfälle – also 2 von 12 (16,7%) - berücksichtigt werden (Abbildung 23).

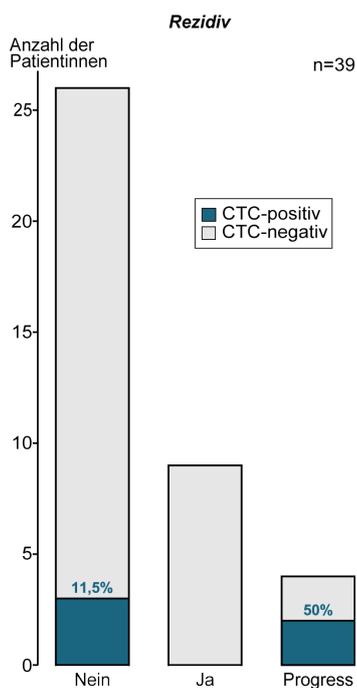


Abbildung 20: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen unter den Patientinnen mit und ohne Rezidiv.

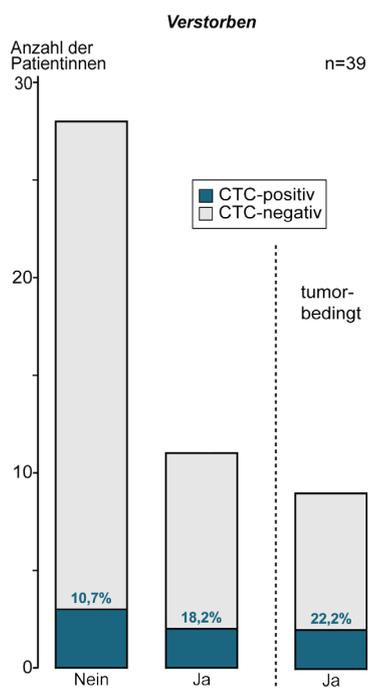


Abbildung 21: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen unter allen bzw. tumorbedingt verstorbenen und lebenden Patientinnen.

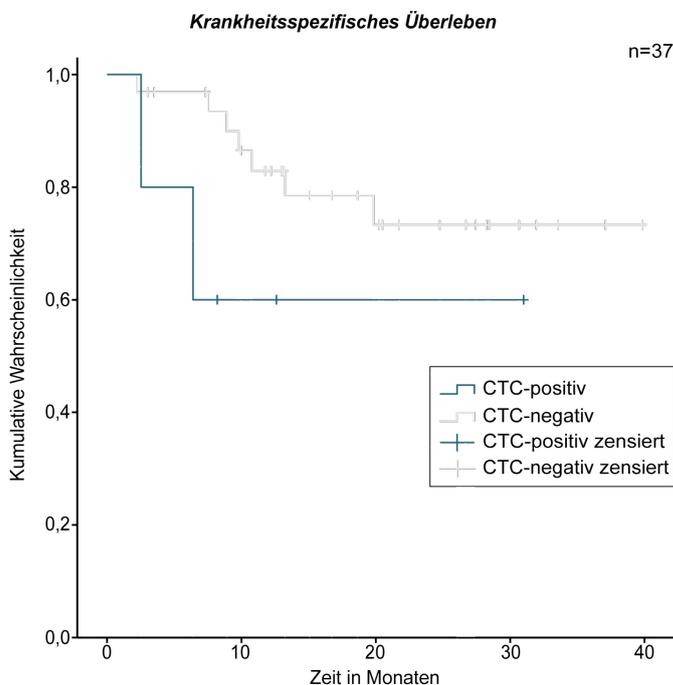


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Analyse des krankheitsspezifischen Überlebens.

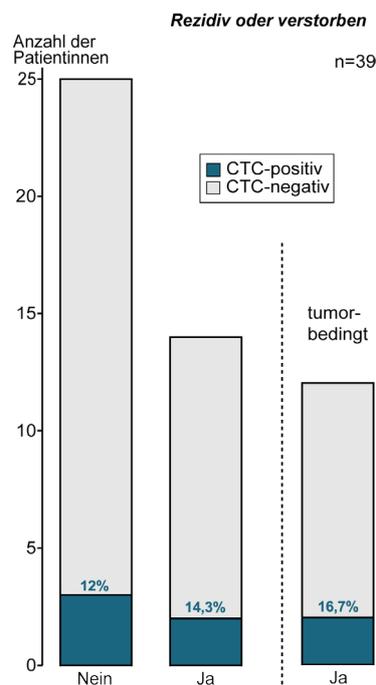


Abbildung 23: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den Gruppen in denen ein Rezidiv tumorbedingte Todesfälle auftraten bzw. keins dieser Ereignisse eintrat.

4.3 Detektion von EGFR-exprimierenden CTC mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung

In drei Fällen konnte keine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt werden, da nicht genügend Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand (Casenr. 25, 29, 30). In 46 der übrigen 49 Proben wurden keine CTC detektiert, drei Proben enthielten auffällige Elemente. Wurden nur VSCC-Fälle betrachtet, in denen die Blutentnahme zu vergleichbarem Zeitpunkt stattgefunden hatte, enthielten 3 von 41 (7,3%) der Proben CTC-verdächtige Elemente (Tabelle 7).

Tabelle 7: Anzahl der Immunfluoreszenz-gefärbten und CTC-verdächtigen Fälle geordnet nach Diagnosen. Abk.: CTC=circulating tumour cell(s); VIN=vulvar intraepithelial neoplasia; Z.n.=Zustand nach.

Diagnose	Fallzahlen	
	gefärbt	CTC-verdächtig
Vulvakarzinom, Erstdiagnose	31	3
Vulvakarzinom, Rezidiv	10	0
Vulvakarzinom, Nachresektion	2	0
VIN III	5	0
Z.n. Vaginalkarzinom	1	0
Gesamt	49	3 (6,1%)

Diese Proben enthielten jeweils ein, zwei bzw. drei auffällige Elemente. Ihr Färbeverhalten bezüglich der untersuchten Antigene ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Färbeverhalten der mittels Immunfluoreszenzfärbung detektierten Elemente. Element 3 ist ein Cluster aus zwei Objekten. Abk.: Casenr.=casenumber; EGFR=epidermal growth factor receptor; CK=cytokeratin; DAPI=4',6-diamidino-2-phenylindol. Symbole: "+"=Färbung positiv; "-"=Färbung negativ.

	EGFR	CK	DAPI
Casenr. 5			
Element 1	+	-	+
Casenr. 7			
Element 1	+	+	-
Element 2	+	+	-
Casenr. 15			
Element 1	+	+	+
Element 2	+	+	-
Element 3	+/+	+/+	+/-

In Abbildung 24 sind mittels Ariol® erstellte Fotos der sechs detektierten Elemente zu sehen. Das Element in Abbildung 24a besaß im Vergleich zu den Zellen der Umgebung einen vergrößerten Kern, der inhomogen gefärbt war. Obwohl die Erhöhung der Kern-Plasma-

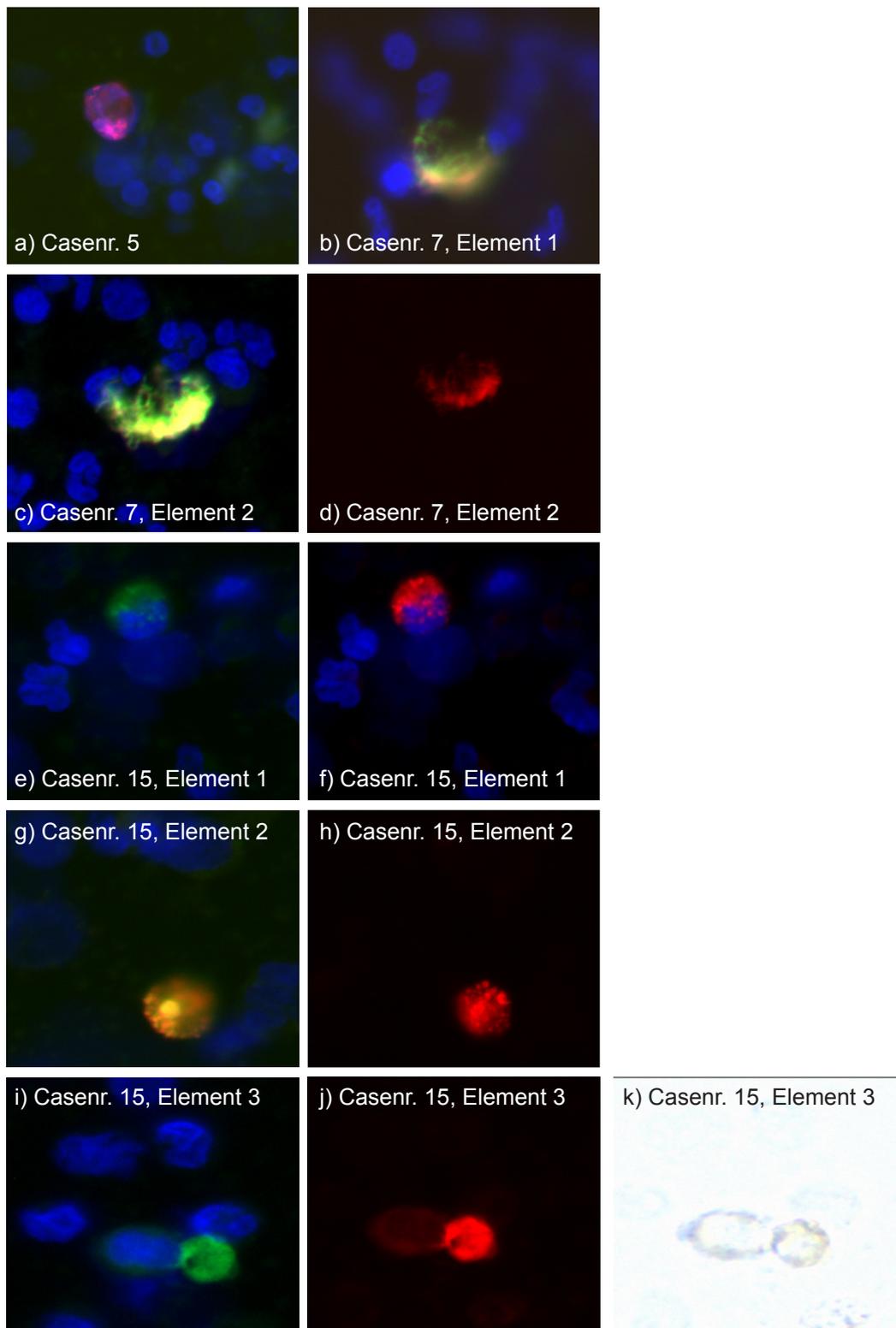


Abbildung 24: Elemente nach Blutaufarbeitung über Ficoll-Paque™ PLUS-System und Immunfluoreszenzdoppelfärbung. Rot: mit Alexa Fluor® 546 visualisierte EGFR-Expression. Grün: mit Alexa Fluor® 488 gefärbte Zytokeratine. Blau: mit DAPI gefärbte Zellkerne. Der EGFR-Kanal ist dann einzeln abgebildet, wenn die EGFR-Färbung durch Überlappung nicht im Gesamtbild sichtbar ist. Sechs Elemente in drei verschiedenen Blutproben. k) Aufnahme im Durchlichtkanal. Fotos erstellt mittels Ariol® Applied Imaging-System Version 3.3. Abk.: Casenr.=casenumber; DAPI=4',6-diamidino-2-phenylindol; EGFR=epidermal growth factor receptor.

Relation nach ISHAGE-Kriterien eine pathognomonische Eigenschaft von TC ist, wurde diese Zelle als „fragliche CTC“ bewertet, da keine Zytokeratinfärbung vorlag. Die EGFR-Färbung überzog den Zellkern und besaß Spots mit höherer Farbtintensität. Element 1 der Casenr. 7 (Abbildung 24b) wies eine randbetonte EGFR- sowie eine netzartige CK-Färbung auf, die nicht die ganze Zelle umschloss. Die Inhomogenität ist ein Merkmal der ISHAGE-Kategorie „probable TC“, jedoch besaß das Element keinen Zellkern. Element 2 derselben Casenr. enthielt ein weiteres Element, bei dem kein Zellkern sichtbar war, sondern welches von einer schleierartigen DAPI-Färbung umgeben war (Abbildung 24c-d). EGFR und CK wiesen eine aufgelockerte, unregelmäßige Struktur auf. Die Probe mit der Casenr. 15 enthielt drei Elemente unterschiedlicher Morphologie und Färbeverhalten. Element 1 (Abbildung 24e-f) besaß einen intakten Kern sowie eine granulöse, nicht vollständig die Zelle umschließende EGFR- und CK-Färbung. Sie erfüllte mit den irregulären Granula und der den Kern teils bedeckenden Färbung die Kriterien der Kategorie „probable TC“. Im Fall von Element 2 war kein Zellkern erkennbar, es wies aber ebenfalls eine granulöse EGFR- und CK-Färbung auf (Abbildung 24g-h). Beim dritten detektierten Element der Probe handelte es sich um ein Cluster zweier Objekte (Abbildung 24i-k). Nach ISHAGE-Kriterien ist also ein pathognomonisches Merkmal von TC vorhanden. Das Linke hatte einen intakten Zellkern, EGFR und CK waren schwach positiv, das Rechte war jedoch zellkernlos, EGFR und CK waren intensiver und leicht inhomogen. Somit wurden in 2 von 41 VSCC-Fällen fragliche CTC detektiert (4,8%), in einem Fall CTC-Zellfragmente (vgl. Tabelle 9).

Tabelle 9: Färbeverhalten der mittels Immunfluoreszenzfärbung detektierten Elemente. Element 3 ist ein Cluster aus zwei Objekten. Abk.: Casenr.=casenumber; CTC=circulating tumour cell(s); EGFR=epidermal growth factor receptor; CK=cytokeratin; DAPI=4',6-diamidino-2-phenylindol; TC=tumour cell(s); TC?=probable TC. Symbole: „+“=Färbung positiv; „-“=Färbung negativ.

	EGFR	CK	DAPI	Bewertung
Casenr. 5				fraglich CTC*
Element 1	+	-	+	morphologisch TC, CK
Casenr. 7				CTC-Zellfragmente
Element 1	+	+	-	morphologisch TC? aber zellkernlos
Element 2	+	+	-	morphologisch TC? aber zellkernlos
Casenr. 15				fraglich CTC*
Element 1	+	+	+	morphologisch TC?
Element 2	+	+	-	morphologisch TC? aber zellkernlos
Element 3	+/+	+/+	+/-	morphologisch TC aber teils zellkernlos

Bei den drei Patientinnen mit CTC-verdächtigen Elementen handelte es sich um die Erstdiagnose eines Vulvakarzinoms. Tabelle 10 enthält klinische und Follow-up-Daten dieser Patientinnen.

Die Patientin mit der Casenr. 7 befand sich in fortgeschrittenem Tumorstadium mit Befall retroperitonealer Lymphknoten, die Patientin mit der Casenr. 5 hatte fünf tumorbefallene inguinale Lymphknoten. Bei Casenr. 15 handelte es sich um eine Patientin in einem frühen Stadium. Im Beobachtungszeitraum traten keine Rezidive oder Todesfälle auf. In keinem der drei Fälle wurden mittels APAAP-Färbung CTC nachgewiesen.

Tabelle 10: Patientencharakteristika der Fälle mit fraglich positiven CTC in der Immunfluoreszenzfärbung. Casenr.=casenumber; FIGO=Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique; G2=mäßig differenziert. Symbole: "y"=nach neoadjuvanter Therapie; "-"=keine Daten verfügbar.

	Alter	T-Stadium	Tumorbefallene Lymphknoten	M-Stadium	FIGO-Stadium	Grade
Casenr. 5	60	-	5	0	-	G2
Casenr. 7	40	yT0	-	1	IVb	-
Casenr. 15	41	T1b	0	0	Ib	G2

	Tumorgröße (cm)	Invasionstiefe (cm)	Lymph-/Angioinvasion	Begleitdysplasie	Raucher
Casenr. 5	5,4	1,8	Nein	Nein	Nein
Casenr. 7	-	-	-	Nein	Ja
Casenr. 15	1,3	0,4	Nein	Nein	Ja

	adjuvante Therapie	Follow-up-Dauer (Monate)	Rezidiv	Verstorben
Casenr. 5	Radiatio	20	Nein	Nein
Casenr. 7	neoadjuvante Radiochemotherapie	13	Nein	Nein
Casenr. 15	Keine	3	Nein	Nein

5. DISKUSSION

Vor Interpretation dieser Ergebnisse werden zunächst der Einfluss der untersuchten Blutmenge sowie die Berücksichtigung des HPV-Vorkommens erwogen. Der Reihenfolge der Fragestellung entsprechend werden die Ergebnisse kurz zusammengefasst und interpretiert. Da keine Daten zum CTC-Nachweis bei VSCC vorliegen, werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Erkenntnissen über DTC bei VSCC und CTC bei anderen Tumorentitäten verglichen. Insbesondere wird die CK-Expression bei VSCC erörtert. Ferner wird die Bedeutung des Nachweises von CTC im Blut von Patientinnen mit Z.n. Vaginalkarzinom und VIN diskutiert. Bei Beurteilung der Prognoserelevanz wird auf die Rolle der Anzahl detektierter CTC und die Verwendung von Cut-off-Werten eingegangen. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzdoppelfärbung werden besonders vor dem Hintergrund diskutiert, dass Apoptose ein häufiger Prozess der Tumorzell dissemination ist, und auch der Nachweis von Zellfragmenten Bedeutung hat. Es wird kurz auf das Phänomen EGFR-positiver aber CK-negativer Zellen eingegangen. Zudem wird ein Vergleich zur APAAP-Färbung gezogen. Die allgemeine Diskussion beleuchtet die Heterogenität und das verschieden ausgeprägte metastatische Potential von CTC, zwei Faktoren die weitreichende Auswirkungen auf die Detektionsmethoden sowie die klinische Relevanz besitzen. Dabei wird besonders Wert gelegt auf die Rolle von EMT und CSC. Am Ende des Kapitels werden Schlussfolgerungen aus vorliegender Arbeit gezogen und Perspektiven für zukünftige Forschungsarbeiten aufgezeigt.

5.1 Begrenzungen der Methoden

5.1.1 Eingesetzte Blutmenge

In der vorliegenden Arbeit wurden verschieden große Blutvolumina pro Probe untersucht. Da alle angereicherten MNC auf OT aufgebracht wurden (700.000 MNC/OT), stieg die Anzahl der angefertigten OT mit zunehmender Blutmenge. Unabhängig davon wie viele OT hergestellt wurden, wurden zufällig drei OT pro Probe für die Färbungen ausgewählt. Sollten die CTC im Blut jedoch nicht gleichmäßig verteilt sein, könnte die Analyse unterschiedlicher Blutmengen zur Folge haben, dass die Wahrscheinlichkeit CTC zu detektieren nicht für jede Probe gleich ist. Für diese Annahme einer inhomogenen Verteilung spricht die Beobachtung, dass Tumorzellen als Zellcluster auftreten können (Borgen *et al.* 1999). Tatsächlich war die durchschnittliche Blutmenge der CTC⁺-Proben mit 13,1ml größer als die der CTC⁻-Proben mit 9,3ml. Um einen möglichen Bias sicher auszuschließen, sollte die analysierte Blutmenge vereinheitlicht werden.

5.1.2 HPV-Status

Es hat sich gezeigt, dass der HPV-Status eine entscheidende Rolle für Vulvakarzinome spielt: HPV-assoziierte und HPV-unabhängige VSCC unterscheiden sich nicht nur bezüglich der Pathogenese, sondern auch Epidemiologie, klinisches Verhalten und möglicherweise auch die Prognose sind verschieden. Manche Autoren fordern deshalb sie als zwei verschiedene Entitäten zu betrachten (Del Pino *et al.* 2013). In dieser Arbeit konnte bei der Analyse der histopathologischen Parameter und der Prognose der HPV-Status nicht einbezogen werden, da die Proben in einem Zeitraum gesammelt wurden, in dem der HPV-Gewebestatus in der Klinik noch nicht regelhaft ermittelt wurde. Lediglich bei 9 von 52 Patientinnen war der Status bekannt. Es ist denkbar, dass auch Unterschiede in den biologischen Eigenschaften und dem prognostischen Wert von CTC zwischen HPV-assoziierten und HPV-unabhängige VSCC existieren. Deshalb sollte dieser Faktor bei zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

5.2 Interpretation der Ergebnisse

5.2.1 CTC-Nachweis mittels etablierter Methode

Mittels der etablierten Methoden - der Anreicherung mit dem Ficoll-Paque™ PLUS-System und der Detektion mit dem Antikörper A45-B/B3 mittels APAAP-Technik - waren CTC in 12,8% der Blutproben von Vulvakarzinom-Patientinnen nachweisbar. Unter den Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme ein Rezidiv hatten war die Rate deutlich höher als bei Erstdiagnose. Dies lässt vermuten, dass CTC für die Ausbildung von Rezidivtumoren der Vulva eine Rolle spielen. Tumorzellen die den Primarius verlassen haben, könnten nach operativer Entfernung des Tumors in dormantem Zustand verbleiben und unter geeigneten Bedingungen wieder proliferieren. Für den Übergang in eine erneute Proliferationsphase ist ein passendes in den Geweben herrschendes Mikroenvironment nötig (Comen *et al.* 2011). Da bei VSCC die meisten Rezidive lokal auftreten, scheint das Ursprungsgewebe ein geeignetes Milieu zur wiederholten Tumorbildung zu sein. CTC wurden in metastasierten Stadien häufiger detektiert, waren aber ebenfalls in Frühstadien nachweisbar. Die Konzentration von CTC war in allen Fällen sehr gering. Über den Nachweis von CTC bei Patientinnen mit Vulvakarzinom liegen bislang keine Publikationen vor. Es wurden aber bereits über die Detektion von DTC berichtet: Die Positivitätsrate lag bei 5% bzw. 16% (Banys *et al.* 2009; Walter *et al.* 2014), die CTC-Detektionsrate vorliegender Arbeit liegt somit in dieser Größenordnung. Mit 22 bzw. 64

Patientinnen waren die Fallzahlen in den eben genannten Untersuchungen jedoch ebenfalls gering.

5.2.1.1 CTC bei VIN

Interessanterweise wurde auch im Blut einer Patientin mit VIN eine CTC detektiert, welche die pathognomonische Morphologie von Tumorzellen aufwies. Neoplastische Zellen in der Blutzirkulation zu finden ist insofern unerwartet, als dass es sich bei der VIN um ein intraepitheliales Geschehen handelt, bei dem die Invasivität noch nicht so stark ausgeprägt ist, dass die Basallamina überschritten wird. Dass dennoch CTC nachgewiesen wurden, bedeutet, dass es entweder unentdeckte invasive Gewebeanteile gab, was unwahrscheinlich ist, da im 14-monatigen Nachbeobachtungszeitraum keine Vulvopathologien auftraten; oder neoplastische Zellen der Vulva sind früher als bisher angenommen in der Lage das Ursprungsgewebe zu verlassen. Bislang gibt es keine Publikationen über die CTC-Analyse im Blut von VIN-Patientinnen. Allerdings ist der Nachweis bei nicht-malignen Erkrankungen für andere Entitäten in der Literatur beschrieben. Bei benignen Erkrankungen der Mamma wurden in 1% der Proben CTC detektiert (Cristofanilli *et al.* 2004), wenn auch in sehr niedriger Konzentration. Auch bei Patienten mit benignen kolorektalen Erkrankungen wurden CTC nachgewiesen. Hardingham *et al.* (2000) und Pantel *et al.* (2012) fanden bei Patienten mit adenomatösen Veränderungen in 10% bzw. 8,3% CTC, bei anderen meist inflammatorischen Erkrankungen wie Morbus Crohn und Divertikulitis in 11,5% bzw. 12,2% und 22% (abhängig von der angewandten Methode). Beide Autoren gehen davon aus, dass es sich bei den detektierten Zellen nicht um Tumorzellen sondern um nicht-maligne Epithelzellen handelt, die durch den Ablauf entzündlicher Prozesse Zugang zur Blutbahn erlangt haben. Dies ist möglich, da die eingesetzten Marker (CK und EpCAM) epithelspezifisch sind, also von mesenchymalen Blutzellen differenzieren können, jedoch nicht zwischen normalen und neoplastischen Epithelzellen. Dafür dass es sich um benigne Epithelzellen handelt spricht, dass in der Arbeit von Pantel *et al.* (2012) im dreijährigen Beobachtungszeitraum kein Fall von maligner Tumorerkrankung auftrat. Zudem war die Anzahl detektierter Zellen signifikant geringer als in der Vergleichsgruppe der Patienten mit malignen Kolontumoren. Im Blut von Patienten mit benignen Prostata-Erkrankungen wurden ebenfalls zirkulierende Prostataepithelzellen nachgewiesen (Murray *et al.* 2013). In dieser Untersuchung konnte sogar ausgeschlossen werden, dass es sich bei den detektierten Zellen um Tumorzellen handelte, da diese das malignitätsspezifische Enzym P504S nicht exprimierten.

Zudem war der Nachweis von zirkulierenden Zellen mit chronischer Prostatitis verbunden. Dass entzündliche Prozesse in kausalem Zusammenhang mit der Progression von Tumoren stehen, ist gut belegt (Coussens und Werb 2002; Grivennikov *et al.* 2010). Interaktionen von Tumoren und inflammatorischen Zellen und Signalmolekülen in deren Mikroenvironment spielen eine entscheidende Rolle in der Tumorentwicklung, beispielsweise für Invasion und Migration. Das Inflammation den Eintritt von Zellen in die Blutzirkulation erleichtert, zeigten Rhim *et al.* (2012) in einem Mausmodell: Die Initiierung von Pankreatitis führte zu einer signifikanten Erhöhung von Pankreasepithelzellen im Blut - sowohl bei Mäusen mit Adenokarzinom des Pankreas als auch bei Mäusen mit benignen Läsionen und in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse lassen in Bezug auf die vorliegende Arbeit zwei Schlüsse zu: Erstens lässt die Detektion zirkulierender Epithelzellen bei benignen Neoplasien vermuten, dass es sich auch im Fall der VIN nicht um eine CTC sondern um eine nicht-maligne Epithelzelle handeln könnte. Zweitens passen mehrere Beobachtungen zu der Feststellung, dass auch bei inflammatorischen Erkrankungen epitheliale Zellen im Blutgefäßsystem auftreten: Bei der CTC⁺-Patientin mit VIN wurden hr-HPV-assoziierte Dysplasien diagnostiziert, und bei VSCC-Patientinnen, die mehrere Begleitdysplasien hatten, wurden häufiger Zellen im Blut nachgewiesen. Der Nachweis zirkulierender Epithelzellen im Blut mittels epithelspezifischer Marker ist also bei Patientinnen mit benignen Erkrankungen der Vulva möglich, und könnte durch inflammatorische Prozesse begünstigt werden. Für die CTC-Detektion mittels der häufig eingesetzten epithelspezifischen Marker bedeutet dies, dass bei Patientinnen mit entzündlichen und/oder benignen Erkrankungen falsch-positive Ergebnisse auftreten können. Um dies zu verhindern, ist eine weitere Charakterisierung der Zellen nötig, die deren Malignität zu identifizieren vermag.

5.2.1.2 CTC bei Zustand nach Vaginalkarzinom

Die Blutprobe der drei Jahre nach Erstdiagnose rezidivfreien Vaginalkarzinom-Patientin enthielt ebenfalls eine CTC. Bei dieser Tumorentität können CTC also auch ohne klinisch manifesten Rückfall über Jahre persistieren. Veröffentlichungen über einen DTC- oder CTC-Nachweis bei Patientinnen mit Vaginalkarzinom gibt es bislang nicht. Der Nachweis von CTC drei Jahre nach Diagnose und Behandlung könnte bedeuten, dass auch bei dieser Tumorentität „Cancer dormancy“ eine Rolle spielt (vgl. Kapitel 2.3). Zwar treten die meisten Vaginalkarzinom-Rezidive lokal und innerhalb der ersten beiden Jahre auf, die selteneren Rezidive in Form von Fernmetastasen jedoch zu einem späteren Zeitpunkt (Slomovitz und Coleman 2012).

Ein längeres Follow-up sowie die Untersuchung mehrerer Fälle könnte diese Beobachtung aufklären.

5.2.1.3 *Unbekanntes CK-Expressionsprofil von CTC bei VSCC*

Bislang ist nicht bekannt, welche CK von CTC bei Patientinnen mit VSCC exprimiert werden. Zytokeratinmuster von normalem Epithel bleiben während der malignen Transformation meist erhalten, deshalb werden CK in vielen Karzinomentitäten als Tumormarker eingesetzt. Am häufigsten kommen in Tumoren CK 8, 18, und 19 vor (Moll *et al.* 1982), die CK-Expression ist jedoch vom Epithelzelltyp abhängig. Über das Expressionsmuster von CK bei VSCC ist relativ wenig bekannt. Hier gibt es Studien, zum CK-Nachweis in Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen und DTC. In Primärtumoren wurde unter Einsatz von AK die gegen nur ein Zytokeratin gerichtet sind das Vorkommen von CK 5-8, 10, 13-14, 17 und 19, sowie ausschließlich bei Rezidivtumoren CK 20 beobachtet werden (Pereira *et al.* 2011; Fons *et al.* 2006; Weikel *et al.* 1996; Ansink *et al.* 1995; Ivanyi *et al.* 1989). Nicht alle Zellen eines Tumors trugen jedoch CK-Antigene. Meist wurde eine heterogene Expression beschrieben, die oft abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen variierte. Die Positivitätsraten für einzelne CK fielen in den Studien teils stark unterschiedlich aus. Dies kann neben der Heterogenität der Tumoren auch auf meist niedrige Fallzahlen und unterschiedliche Methoden zurückgeführt werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Expressionsrate von der Tumorlokalisation (Ansink *et al.* 1995) und dem Tumorstadium (Ivanyi *et al.* 1989) abhängig sein kann. Dass nahezu alle VSCC CK5/6 und 14-positiv waren, wurde mehrfach belegt (Pereira *et al.* 2011; Fons *et al.* 2006; Weikel *et al.* 1996; Ansink *et al.* 1995). Zudem wurde ein Trend hin zu einem schlechteren Outcome bei CK 8-Nachweis und Verlust der CK 10-Expression beobachtet (Weikel *et al.* 1996; Ivanyi *et al.* 1989). Durch den Einsatz von pan-CK-AK, können zwar keine Aussagen über das Vorhandensein einzelner CK getroffen werden, aber es zeigt, dass mittels dieser AK eine Detektion möglich ist. So stellten Esquius *et al.* (1991) fest, dass unter Einsatz des pan-CK-AK AE1 und AE3 alle VSCC-Tumoren (n=16) intensiv angefärbt werden. Im Gegensatz zu AE3 waren mit AE1 jedoch schlechter differenzierte Bereiche der Tumoren weniger bis gar nicht gefärbt. Studien zur CK-Expression in Lymphknotenmetastasen und DTC in VSCC wurden ebenfalls mit pan-CK-AK durchgeführt: Tumorzellen in Lymphknoten wurden von Auger und Colgan (1990) mittels eines AK gegen CK 3-6 und 9-11 detektiert, sowie von Narayansingh *et al.* (2005) und Regauer (2009) mittels eines AK gegen CK 5, 6, 8, 17

und wahrscheinlich auch 19. DTC im Knochenmark wurden mittels A45-B/B3 nachgewiesen (Walter *et al.* 2014; Banys *et al.* 2009). Laut Herstellerangaben ist dieser AK gerichtet gegen CK 8, 18 und 19, es gibt jedoch Westernblot-Analysen, die eine Reaktivität gegenüber CK 7 und 18 zeigten. (Effenberger *et al.* 2011). In Anbetracht dieser Ergebnisse, kann kein eindeutiges CK-Expressionsprofil für primäre VSCC erstellt werden. Außerdem ist nicht sicher, dass die CK-Expression während des Metastasierungsvorgangs unverändert bleibt. Joosse *et al.* (2012) beschrieben beispielsweise eine Veränderung des Expressionsmusters bei Mammakarzinomen. Dennoch konnten bei VSCC-Patientinnen mehrfach mittels pan-CK-AK disseminierte Zellen im Knochenmark und in Lymphknoten detektiert werden. Durch den Einsatz solcher pan-CK-AK in vorliegender Arbeit soll die Wahrscheinlichkeit erhöht werden damit CTC nachweisen zu können.

5.2.2 Zusammenhang von CTC und Histopathologie

Da die Gesamtfallzahl nicht sehr groß und die Anzahl CTC-positiver Fälle gering war, konnten keine Korrelationen von histopathologischen Parametern und dem CTC-Status mithilfe statistischer Tests berechnet werden. Die Häufigkeiten des CTC-Vorkommens wurden in den verschiedenen Ausprägungen der Parameter beschrieben. Innerhalb der aus 48 Patientinnen bestehenden Kohorte konnten für die meisten Faktoren keine deutlichen Unterschiede in Bezug auf den CTC-Status gezeigt werden: CTC⁺-Fälle traten weder in höheren T-, N- und FIGO-Stadien auf noch wurden CTC häufiger bei schlecht differenzierten Tumoren, Lymphknotenbefall oder größeren bzw. tief infiltrierenden Tumoren detektiert. Dass bei der Tumorgröße bzw. dem T-Stadium kein Einfluss auf den CTC-Status zu beobachten war, könnte daran liegen, dass die Größe des Tumors kein Maß für seine Aggressivität darstellen muss. Auch kleine Primärtumore können bereits metastatische Absiedlungen gebildet haben, während dies bei lokal fortgeschrittenen Tumoren nicht immer der Fall ist. Für den Befall von Lymphknoten ist vorstellbar, dass sich die Tumorzellen nur lymphatisch aber nicht hämatogen verbreitet haben und sich somit keine CTC im Blut nachweisen lassen. Da das FIGO-Stadium den Fortschritt der Erkrankung, Differenzierungsgrad und Invasionstiefe die Aggressivität von Tumoren beschreiben, wäre durchaus ein Einfluss auf das Vorkommen von CTC zu erwarten gewesen. Vermutlich konnte dies wegen der geringen Fallzahl jedoch nicht beobachtet werden. Deutliche Unterschiede im CTC-Status zeigten sich allerdings beim M-Stadium, der Gefäßinvasion und dem Auftreten von zusätzlichen Dysplasien neben dem Vulvakarzinom,

wobei die Differenz beim Befall der Blutgefäße am stärksten ausfiel. Ein bestehender Einfluss von Fernmetastasierung und Gefäßinvasion ist naheliegend, da die hämatogene Verbreitung eine Voraussetzung für ersteres ist und durch letzteres ein Zugang zum Blutgefäßsystem möglich wird. Der erhöhte CTC⁺-Anteil unter den Patientinnen mit mehreren Begleiddysplasien könnte dafür sprechen, dass auch Eigenschaften des umliegenden Gewebes den Eintritt von Tumorzellen in die Blutbahn CTC beeinflussen, besonders wenn dysplastisches Gewebe direkt an den Tumor angrenzt.

Dass der CTC-Status häufig nicht mit histopathologischen Parametern korreliert, während die Korrelation mit dem Krankheitsverlauf gut belegt ist, ist für andere Entitäten beispielsweise für das Mammakarzinom beschrieben worden. Molloy *et al.* (2011) fanden keine Assoziation mit den Parametern Tumorgröße, Nodalstatus, Grading und Angioinvasion, Rack *et al.* (2014) für keine der klinisch-pathologischen Variablen außer dem Lymphknotenbefall. Auch der DTC-Nachweis bei VSCC-Patientinnen war nicht signifikant mit klinisch-pathologischen Faktoren assoziiert (Walter *et al.* 2014).

5.2.3 Prognostische Bedeutung der CTC

Die Frage, ob der präoperative Nachweis von CTC eine prognostische Aussagekraft besitzt, konnte lediglich anhand deskriptiver Analysen beantwortet werden. Dass es in der Gruppe der CTC⁺-Patientinnen deutlich häufiger zu einem Krankheitsprogress kam (2/5 vs. 2/34), ist ein Hinweis darauf, dass die Wahrscheinlichkeit höher sein könnte einen progredienten Verlauf zu entwickeln wenn CTC nachweisbar sind. Ließe sich dies in größeren Studien bestätigen, könnte der Nachweis von CTC ein Entscheidungskriterium für den Umfang adjuvanter Therapien werden. Bei im Beobachtungszeitraum tumorbedingt verstorbenen Patientinnen wurden deutlich häufiger CTC nachgewiesen als in der Vergleichsgruppe bestehend aus nicht oder nicht tumorbedingt Verstorbenen. Es kann vermutet werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem CTC-Nachweis und dem krankheitsspezifischen Überleben besteht. Diese Vermutung wurde durch die Kaplan-Meier-Analyse unterstützt. Im aussagekräftigen Bereich um die mediane Follow-up-Dauer liegen die Überlebenswahrscheinlichkeitskurven deutlich auseinander. Wegen der zensierten Fälle in diesem Abschnitt und der geringen Anzahl CTC⁺-Patientinnen ist die Aussagekraft jedoch eingeschränkt. Bei Zusammenfassung der Ereignisse „Rezidiv“ und „Tod“ ist der CTC⁺-Anteil in der Gruppe ohne Ereignis zwar geringer, allerdings ist der Unterschied weniger stark ausgeprägt als beim Vergleich der tumorbedingten Todesfälle, da sich unter den

CTC⁺ keine Rezidivfälle sondern lediglich zwei Progressfälle befanden. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass CTC⁺-Patientinnen einen ungünstigeren Krankheitsverlauf bezüglich Krankheitsprogress und krankheitsspezifischer Überlebensrate aufweisen. Um dies zu bestätigen sind Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven nötig.

Dass CTC prognostische Relevanz besitzen wurde mittlerweile für viele Karzinomarten und verschiedene Methoden belegt. Die stärkste Evidenz gibt es für metastasierte Mammakarzinome gefolgt von Prostata- und kolorektalen Karzinomen, auch für Frühstadien gibt es zunehmend Studien welche die Relevanz bestätigen (Balic *et al.* 2013; Alix-Panabières und Pantel 2014a). Die wegen der hohen Reproduzierbarkeit in Phase III-Studien eingesetzte CellSearch[®]-Technik ist derzeit die einzige von der FDA für den klinischen Einsatz zugelassene. Trotz der zahlreichen Ergebnisse, die die prognostische Relevanz belegen, bleibt zu klären welche Rolle die Anzahl detektierter Zellen spielt. Der Nutzen verschiedener Cut off-Level wird kontrovers diskutiert und fällt auch entitätsabhängig unterschiedlich aus. Der 2004 für metastasierte Mammakarzinome erstmals von Cristofanilli und Kollegen vorgeschlagene Cut off-Wert von fünf CTC in 7,5ml Blut (Probe CTC⁺ wenn ≥ 5 CTC in 7,5ml) hat sich als Standard etabliert und wird auch in klinischen Studien, beispielsweise in SWOG S0500 und DETECT (vgl. Kapitel 2.4) eingesetzt. Nolé *et al.* (2008) bestätigten die prognostische Relevanz dieses Wertes, befanden aber zusätzlich einen Schwellenwert von 20 CTC/7,5ml Blut als prognostisch bedeutsam. Auch Weissenstein *et al.* (2010) bestätigten den Grenzwert von fünf CTC in 7,5ml, stellten jedoch fest, dass eine Risikostratifizierung in drei Gruppen (0 CTC, 1-4 CTC und ≥ 5 CTC in 7,5ml Blut) der Dichotomisierung überlegen ist. Botteri *et al.* (2010) schlugen vor statt der Dichotomisierung die CTC-Anzahl als kontinuierliche Variable zu erfassen und eine Trendanalyse durchzuführen, da sie mit zunehmender Anzahl von CTC einen nichtlinearen Anstieg der Progressions- und Sterberate mit einer Abschwächung ab fünf CTC beobachteten. Patienten ohne CTC-Nachweis wiesen ein besonders günstiges Risikoprofil auf im Vergleich zu Patienten mit einer oder mehr CTC. Auch für nichtmetastasierte Mammakarzinome konnten Bidard *et al.* (2010) zeigen, dass bereits der Nachweis einer einzelnen CTC in 7,5ml Blut vor neoadjuvanter Therapie prognostisch relevant ist. Für metastasierte kastrationsresistente Prostatakarzinome zeigten Scher *et al.* (2009) und Danila *et al.* (2003), dass die Anzahl von CTC als kontinuierliche Variable prognostischen Wert für die Gesamtüberlebensrate besitzt. De Bono *et al.* (2008) fanden Signifikanz für den Cut off-Wert von fünf CTC in 7,5ml Blut. Für metastasierte hormonsensible Prostatakarzinome wurde ein optimaler Schwellenwert von drei CTC in 7,5ml Blut ermittelt (Goodman *et al.* 2011). Bei metastasierten kolorektalen Tumoren

findet derzeit ein Cut off-Wert von drei CTC in 7,5ml Blut Anwendung (Cohen *et al.* 2008). Bis auf die Arbeitsgruppe um Weissenstein (2010) wurden alle genannten Untersuchungen mit der CellSearch®-System durchgeführt. Tibbe *et al.* (2007) entwickelten ein Modell, welches die Statistik der Detektionsschritte dieser Methode beschreibt. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass der Cut off-Wert von fünf CTC/7,5ml nicht biologisch sondern methodisch bedingt ist. Könnte eine vollkommene Fehlerfreiheit erreicht werden, läge der Grenzwert bei einer CTC in 7,5ml Blut. Dieser Cut-Off-Wert hat sich bereits für das Ösophaguskarzinom als prognostisch relevant erwiesen (Reeh *et al.* 2015). Zur Untersuchung der prognostisch relevanten CTC-Anzahl bei Einsatz der in vorliegender Arbeit angewandten Methoden liegen bislang keine Daten vor. Für die DTC-Detektion mittels Dichtegradienten und APAAP-Färbung bei Mammakarzinomen zeigten Naume *et al.* (2004), dass schon der Nachweis einer DTC in 2×10^6 MNC signifikant mit einer schlechteren Prognose korreliert. Auch in vorliegender Arbeit wurden 2×10^6 MNC pro Probe untersucht, diese Menge richtet sich nach den Empfehlungen zur Standardisierung der DTC-Detektion (Borgen *et al.* 1999; Fehm *et al.* 2006). Für DTC wurde gezeigt, dass die Analyse von 2×10^6 MNC eine bessere Korrelation mit dem Outcome ergibt, als die Untersuchung einer größeren MNC-Anzahl: Es wurden je Probe 2×10^6 , 4×10^6 , und 6×10^6 MNC untersucht, wobei in 22, 46, und 52 von 97 Proben CTC gefunden wurden, bei der Untersuchung von 6×10^6 MNC war die Korrelation mit dem Outcome jedoch niedriger (nicht signifikant) als bei der Untersuchung von 2×10^6 MNC (signifikant; Wiedswang *et al.* 2003). Da der prognostisch relevante Schwellenwert von Tumorentität und Detektionsmethode abhängt, kann derzeit kein Vergleich des CTC-Nachweises bei VSCC gezogen werden.

5.2.4 Nachweis EGFR-exprimierender CTC

In der zur Analyse der EGFR-Expression durchgeführten Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurden in 3 der 41 der VSCC-Proben (7,3%) insgesamt sechs CTC-verdächtige Elemente gefunden. Nur eins davon konnte gemäß der Kriterien nach Borgen *et al.* (1999) bewertet werden (Casenr. 15, Element 1). Das Element der Casenr. 5 wurde trotz seiner CK-Negativität aufgrund des nach ISHAGE pathognomonischen Zeichens der verschobenen Kern-Plasma-Relation sowie dem Nachweis eines epithelialen Markers (EGFR) als fragliche CTC gewertet. Die restlichen Elemente hatten die Gemeinsamkeit, dass sie teils zwar morphologische ISHAGE-Kriterien erfüllen, jedoch keinen Zellkern besaßen. Es könnte sich dabei um Zellfragmente handeln, die durch unvollständigen apoptotischen Zelluntergang entstanden sind (vgl. Abbildung 24b, c, g).

5.2.4.1 Apoptose und Nachweis von Zellfragmenten im Blut

Ein Großteil der ins Blut gelangten Tumorzellen geht unter (Meng *et al.* 2004). Auch wenn noch nicht alle Regulationsmechanismen bekannt sind hat sich gezeigt, dass die Apoptose ein zentraler Mechanismus im Metastasierungsvorgang ist (Mehlen und Puisieux 2006): Der Grund für den Untergang vieler CTC ist die durch mechanischen Stress oder natürliche Killerzellen induzierte Apoptose, weshalb die Inhibition der Apoptose ein entscheidendes Merkmal metastasierungsfähiger Zellen ist. In Apoptose befindliche CTC wurden mehrfach nachgewiesen. Bei metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen fanden Méhes *et al.* (2001) Fälle mit ausschließlich apoptotischen CTC sowie Fälle mit intakten und apoptotischen CTC, wobei die Anzahl der apoptotischen die der intakten meist überstieg. Mikroskopisch wurden verschiedene Stadien der Zellyse beobachtet: Eine zunehmende Kernlyse bis hin zum völligen Fehlen von DAPI-Signalen begleitet von CK-Veränderungen von filament- bis einschlusskörperchenartiger Struktur. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei metastasierten Prostatakarzinomen gemacht (Larson *et al.* 2004): Mittels Fluoreszenzmikroskopie waren bei acht von zehn Patienten weniger als 10% der CTC intakt (minimal 3%, maximal 76%; 17% aller detektierten CTC). Die restlichen Elemente wurden als beschädigte Zellen gewertet wenn die CK-Färbung fleckförmig und ein naheliegender zugehöriger Zellkern auszumachen war, oder wenn es sich um CK-positive Objekte ohne erkennbare Morphologie einer Zelle und ohne Kernmaterial handelte, als Zellfragmente. Das fleckige CK-Muster wurde als Korrelat der Zersetzung der CK durch Apoptose gedeutet. Dies wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft: Der Großteil beschädigter Zellen exprimierte den Apoptosefrühmarker M30, während die meisten Zellfragmente weder M30- noch DAPI-positiv waren. In der Studie von Rossi *et al.* (2010) wurde bei verschiedenen Karzinomentitäten eine M30-Expression zwischen 79% und 92% beobachtet, ohne dass eine signifikante Korrelation mit histopathologischen Parametern vorlag. Kallergi *et al.* (2013) verglichen das Vorkommen apoptotischer CTC bei Mammakarzinom-Patientinnen in frühen und metastasierten Stadien und stellten fest, dass bei Letztgenannten der Anteil signifikant geringer ist, als bei Ersteren (metastasiertes vs. frühes Stadium: Caspase 33% vs. 78,6%, M30 52% vs. 93%). Denkbar wäre, dass in Spätstadien durch einen Selektionsprozess die im Blut überlebensfähigen und metastasierungsfähigen CTC übrig bleiben, während die in Frühstadien nachgewiesenen CTC häufig apoptotisch werden und somit der Apoptosenachweis eine günstigere Prognose anzeigt. Bei metastasierten Mammakarzinomen fanden Smerage *et al.* (2013) mittels der Marker M30 und Bcl-2, dass 42% bzw. 62% der CTC apoptotisch waren, eine inverse Korrelation von CTC-Anzahl und

M30/Bcl-2-positiven CTC, und dass die Bcl-2-Expression mit einem besseren Outcome assoziiert war. Die Untersuchung der Relevanz fragmentärer Objekte wurde in einer größeren Studie für metastasierte Prostatakarzinome durchgeführt (Coumans *et al.* 2010). Es wurde das CellSearch®-System eingesetzt und damit detektierte Objekte, die nach den konventionellen Morphologiekriterien als negativ gelten, analysiert. Dabei wurden fünf zusätzliche Gruppen von Objekten definiert: Granuläre CTC mit mindestens drei CK-Punkten erhöhter Intensität in Verbindung mit einem intakten Zellkern gewisser Größe, große bzw. kleine Tumorzellfragmente mit positivem CK- und DAPI-Signal oberhalb bzw. unterhalb einer gewissen Größe, sowie DNA-lose große und kleine Tumor-Mikropartikel mit positivem CK-Signal. Mit abnehmender Übereinstimmung mit den herkömmlichen CTC-Positivitätskriterien wurden zunehmend mehr Objekte pro Probe identifiziert, jedoch nahm gleichzeitig die Spezifität ab. Für alle fünf Objektgruppen wurde eine signifikante Korrelation mit dem Gesamtüberleben gefunden, in multivariater Analyse waren zwei dieser Kategorien gleichwertig mit dem prognostischen Wert der konventionellen CTC-Kriterien. Apoptotische CTC kommen also regelhaft bei mehreren Karzinomarten vor, deren prognostischer Wert ist jedoch noch unklar. Zwar sind diese Zellen nicht in der Lage die Metastasenbildung zu initiieren, die Fähigkeit von Zellen den Primärtumor zu verlassen ist jedoch gegeben. Finden sich gleichzeitig intakte CTC in der Blutbahn, können sich unter diesen Zellen MIC befinden. Falls ausschließlich apoptotische CTC detektiert wurden, ist dennoch nicht ausgeschlossen, dass MIC zirkulieren oder im Verlauf aus dem Primarius hervorgehen. Die Ergebnisse von Coumans *et al.* (2010) machen jedoch deutlich, dass die Detektion vermutlicher Tumorzellfragmente durchaus prognostisch relevant sein kann. Die in vorliegender Arbeit detektierten CK⁺/EGFR⁺/DAPI-Objekte weisen eine große Ähnlichkeit zu denen von Méhes *et al.* (2001) und Larson *et al.* (2004) beschriebenen Zellen auf – könnten also durchaus als apoptotische CTC interpretiert werden. Möglicherweise ist auch die CK⁺/EGFR⁺/DAPI⁺-Zelle (Abbildung 24e-f) eine Zelle die sich in einer frühen Apoptosephase befindet. Auch hier war eine granuläre Färbung zu beobachten, die in Abbau befindlichen CK entsprechen könnte, während der Zellkern noch vorhanden ist. Die beiden Patientinnen mit möglichen apoptotischen CTC (Casenr. 7, 15) befanden sich in verschiedenen fortgeschrittenen Tumorstadien, Casenr. 15 in einem frühen Stadium, Casenr. 7 im metastasierten Stadium nach neoadjuvanter Therapie. Diese könnte zusätzlich Zellysevorgänge induziert haben. In beiden Fällen trat kein Rezidiv auf (innerhalb der ersten 13 Monate bei Casenr. 7 bzw. 3 Monate bei Casenr. 15), wegen der geringen Fallzahl ist jedoch eine Aussage zum prognostischen Wert dieser Zellen kaum möglich.

5.2.4.2 EGFR-Expression und EMT

Eine der detektierten EGFR⁺-Zellen enthielt zwar einen Kern, exprimierte allerdings keine Zytokeratine (vgl. Abbildung 24a). Da keine negative Leukozyten-Selektion stattfand, handelt es sich entweder um eine unspezifische Färbung einer hämatopoetischen Zelle, oder um eine CTC, die keine oder nicht die mit dem Antikörpercocktail erkennbaren CK exprimiert. Denkbar ist eine Herunterregulation der CK-Expression im Rahmen von EMT (vgl. Kapitel 2.2 und 5.2.1.3). In mehreren Studien, wurden Hinweise auf einen Zusammenhang von EGFR-Expression und EMT gefunden: In der *in vitro*-Studie von Chang *et al.* (2012) wurde in einer Pankreaskarzinom-Zelllinie durch die Inhibition der EGFR-Expression ein signifikanter Rückgang der Expression mesenchymaler Marker induziert, sowie ein signifikanter Verlust der Zellmotilität. Serrano *et al.* (2014) fanden bei Patientinnen mit nicht-metastasiertem Mammakarzinom, eine signifikante Korrelation von EGFR-exprimierenden CTC und CK-negativen CTC mit mesenchymalen Eigenschaften. Bei Stimulation von EGFR in Zellen der Linie MCF7 wurde ein kompletter Verlust der CK sowie eine Erhöhung der mesenchymalen Marker beobachtet. Die Autoren vermuteten, dass EMT durch die Aktivierung des EGFR-Signalweges induziert wird. Die Annahme, dass bei der hier detektierten Zelle ein kausaler Zusammenhang von EGFR-Expression und CK-Negativität besteht, ist möglich jedoch rein hypothetisch.

5.2.4.3 Vergleich mit APAAP-Färbung

Mit der Immunfluoreszenzfärbung wurde in einem Fall von 41 VSCC-Proben (2,4%) eine fragliche CK⁺-CTC detektiert – und damit weniger als in der APAAP-Färbung mit 5 positiven von 39 Fällen (12,8%). Die Konzentration von CTC lag mit einer bis drei Zellen pro Probe in der gleichen Größenordnung. Konkordante, also in beiden Färbungen positive Fälle gab es nicht.

Da der in der Immunfluoreszenzfärbung eingesetzte AK-Cocktail von C11/AE1/AE3 ein deutlich breiteres CK-Spektrum abdeckt als der in der APAAP-Färbung eingesetzte AK A45-B/B3, wäre zu erwarten gewesen, dass mittels Immunfluoreszenzfärbung nicht weniger sondern mehr CTC detektiert werden können. Möglicherweise detektieren die AK AE1 und AE3 jedoch weniger CK als angenommen, eine Westernblot-Analyse zeigte lediglich eine Reaktivität beider AK gegenüber der CK 5, 7, 8 und 19 – wobei CK 7 auch von A45-B/B3 erkannt wird (Effenberger

et al. 2011). Wegen der sehr geringen Konzentration von CTC und kleinem Patientenkollektiv ist es plausibel, dass das gegenteilige Ergebnis ein rein statistisches Phänomen sein könnte. Möglich wäre auch, dass durch den Einsatz der APAAP-Technik die Sensitivität erhöht wird. Ein Vergleich von A45-B/B3 und AE1/AE3 wurde von Effenberger *et al.* (2011) bei der Detektion von DTC im Knochenmark nicht-fernetastasierter Mammakarzinom-Patientinnen durchgeführt. Bei dieser Untersuchung wurden mit AE1/AE3 tatsächlich mehr DTC⁺-Fälle detektiert als mit A45-B/B3, jedoch war die Detektion mittels A45-B/B3 prognostisch von größerer Relevanz als mittels AE1/AE3. Zudem ließen sich DTC in nur 3,2% der positiven Fälle in beiden Färbungen nachweisen. Daraus lässt sich schließen, dass die DTC hinsichtlich ihres CK-Expressionsusters heterogen waren, was mit unterschiedlich malignem Potential einherging. Dies wäre durchaus auch für das Vulvakarzinom denkbar und könnte ein Grund für die fehlende Konkordanz sein. Die AK A45-B/B3 und AE1/AE3 wurden auch auf ihre Spezifität hin verglichen, dabei zeigte sich eine Gleichwertigkeit der AK (Borgen *et al.* 2006).

5.3 Allgemeine Diskussion

5.3.1 Biologische Eigenschaften von CTC

Aus experimentellen Modellen wurde abgeleitet, dass Millionen von CTC kontinuierlich ins Blut abgegeben werden (Balic *et al.* 2013; Joosse *et al.* 2014). Während die meisten Zellen rasch in Apoptose gehen, gelingt es nur einem kleinen Teil in der Blutzirkulation zu überleben und – nach verschieden langer Latenz - unter geeigneten Bedingungen Metastasen auszubilden. In Anbetracht der hohen Apoptoserate ist es nicht unerwartet, dass wie in vorliegender Arbeit, Zellfragmente im Blut detektieren werden konnten. In zahlreichen Studien wurde festgestellt, dass die Konzentration von CTC im Blut sehr gering ist - besonders bei Patienten in Frühstadien. (Allard *et al.* 2004; Rack *et al.* 2014). Dies war auch in vorliegender Arbeit der Fall. Die CTC-Forschung der letzten Jahre führte zu folgenden beiden Erkenntnissen, welche die Diskussion um Detektionsmethoden und klinischer Einsatzfähigkeit von CTC maßgeblich beeinflussen. Erstens die Beobachtung, dass CTC eine ausgeprägte geno- und phänotypische Heterogenität aufweisen (Alix-Panabières und Pantel 2014a). Und zweitens, dass diese heterogenen CTC einen unterschiedlichen Grad an Metastasierungspotential aufweisen. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass nicht alle Patienten bei denen CTC detektiert werden Rezidive entwickeln. Entscheidend ist demnach die Frage, welche der CTC metastasierungsfähige Zellen (MIC) sind und wie diese detektiert werden können. Eine eindeutige Charakterisierung und Definition

von MIC gibt es bislang nicht, dies bleibt ein bedeutendes Ziel der CTC-Forschung. Es gibt jedoch zunehmende Evidenz dafür, dass es sich bei MIC um EMT-fähige Zellen mit Stammzellcharakter handelt (Baccelli und Trumpp 2012; Książkiewicz *et al.* 2012; Tinhofer *et al.* 2014). Neue Untersuchungen weisen darauf hin, dass daneben ein EMT-unabhängiger Mechanismus der Disseminierung existiert (Joosse *et al.* 2014; vgl. Kapitel 5.3.3). Alle eben genannten Erkenntnisse über die biologischen Eigenschaften von CTC haben weitreichende Konsequenzen einerseits für die Detektionstechniken, andererseits für die klinische Relevanz von CTC.

5.3.2 Rolle der Eigenschaften von CTC für die Detektionsmethoden

Zur Anreicherung und Detektion von CTC stehen mittlerweile über 40 Assays zur Verfügung (Parkinson *et al.* 2012) und laufend werden weitere entwickelt. Besonders für die Untersuchung bei Patienten in Frühstadien sind neue Assays mit hoher Sensitivität erforderlich, die dennoch die Rate falsch-positiver Ergebnisse möglichst gering halten können (Alix-Panabières und Pantel 2014a). Aufgrund niedrigster Konzentrationen von CTC muss eine ausreichende Blutmenge untersucht werden, beim Großteil der eingesetzten Detektionsverfahren muss diese jedoch durch den hohen methodischen Aufwand begrenzt werden. Ein vielversprechender Ansatz ist deshalb die *in vivo*-Analyse, bei der bis zu 1,5 Liter Blut filtriert werden können (GILUPI CellCollector™; Saucedo-Zeni *et al.* 2012). Auch die Heterogenität von CTC stellt eine große Herausforderung für die Detektionsmethoden dar. Sowohl Oberflächenmarker als auch physikalische Eigenschaften der Zellen können variieren, beispielsweise kann durch EMT die EpCAM-Expression vermindert sein und die Flexibilität der Zellen zunehmen (Chen *et al.* 2013), sodass EpCAM- und verformbarkeitsbasierte Techniken CTC verfehlen können. Effiziente CTC-Assays müssen deshalb in der Lage sein, die Analyse mehrerer Eigenschaften zu kombinieren. Dies erschwert jedoch wiederum wegen des großen Aufwands die klinische Einsatzfähigkeit. Um die Heterogenität von CTC erfassen zu können, muss ein Assay in der Lage sein die Zellen nach Detektion für anschließende Analysen zur Verfügung zu stellen. Ein Verfahren, was dies leisten kann, ist beispielsweise der CTC-iChip. Damit können lebende Zellen Genom- und Expressionsanalysen unterzogen und zur Zellkultur verwendet werden (Ozkumur *et al.* 2013). Das unterschiedliche metastatische Potential von CTC wirft außerdem die Frage auf, wie viele Zellen untersucht werden müssen, um repräsentative Zellen aller Subpopulationen detektieren zu können. Es existieren bereits einige Techniken, die Lösungen

für die eben genannten Herausforderungen bieten und deren Funktionsfähigkeit bestätigt wurde, deren klinische Validität aber noch bewiesen werden muss.

5.3.3 Rolle der Eigenschaften von CTC für die klinische Relevanz

Die Tatsache, dass das metastatische Potential von CTC unterschiedlich ist, ist für den klinischen Einsatz von größter Wichtigkeit. Die Frage ist, welche prognostische Bedeutung dem Nachweis welcher Zellen beizumessen ist.

Die für die Prognose ausschlaggebenden MIC wurden häufig als EMT-fähige Zellen beschrieben, eine Reihe von Untersuchungen mesenchymaler Antigene auf CTC sind durchgeführt worden. Bei Mamma-, Bronchial-, Prostata-, hepatozellulären und Karzinomen des Kopf-/Halsbereichs wurden Zellen mit sowohl epithelialen als auch mesenchymalen Charakteristika, detektiert (Gradilone *et al.* 2011; Kallergi *et al.* 2011; Lecharpentier *et al.* 2011; Balasubramanian *et al.* 2012, Chen *et al.* 2013; Li *et al.* 2013). Dabei ergaben sich Hinweise darauf, dass eine solche Koexpression bei aggressiveren Tumoren häufiger vorkommt: In den Studien von Kallergi *et al.* (2011) und Li *et al.* (2013) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen M0 und M1-Stadien bzw. den TNM-Stadien, Chen *et al.* (2013) fanden eine signifikant höhere Expressionsraten von EMT-Genen bei kastrationsresistenten Prostatakarzinomen im Vergleich zu hormonsensiblen oder immuntherapiezugänglichen. In den zuvor genannten Publikationen lag die Rate von mit epithelialen Markern detektierten CTC, die mesenchymale Antigene trugen, zwischen 43% und 100%. Lecharpentier *et al.* (2011) und Mego *et al.* (2012) wiesen CTC mit rein mesenchymalen Merkmalen nach, Balasubramanian *et al.* (2012) fanden sogar deutlich mehr solcher Zellen als semi-mesenchymale. In der Studie von Gradilone *et al.* (2011) wurden EMT-Marker in CK⁻-Proben häufiger nachgewiesen als in CK⁺ (55% vs. 43%), die prognostische Relevanz von EMT-Markern war der bei reiner CK-Detektion überlegen.

Zudem gibt es Hinweise darauf, dass es sich bei MIC um EMT-fähige Zellen handelt, die zusätzlich Stammzellmarker exprimieren. Die meisten Daten liegen für Mammakarzinome vor: Aktas *et al.* (2009) konnten sowohl bei CTC⁺ als auch bei CTC⁻-Patientinnen CSC- und EMT-Marker nachweisen, wobei der Anteil unter den CTC⁺ größer war (62% vs. 7% für EMT-Marker, 69% vs. 14% für CSC-Marker). Die Blutproben stammten von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom vor und während palliativer Therapie. EMT- und CSC-Marker wurden bei Patientinnen die nicht auf die Therapie ansprachen deutlich häufiger nachgewiesen (62% vs.

10% bzw. 44% vs. 5%). Im Blut von Patientinnen aller Stadien wiesen Raimondi *et al.* (2011) in CTC⁺-Proben (EpCAM⁺/CK⁺) in 46% CSC-Marker nach, in 18% bzw. 28% EMT-Marker. Das Vorhandensein des CSC-Phänotyps korrelierte mit dem Tumorstadium und dem Nachweis von EMT-Markern. Unter den CTC-Proben waren mit 35% bzw. 38% mehr EMT-Marker-positiv. In einem Patientenkollektiv ohne Metastasen fanden Barrière *et al.* (2012) bei CTC⁺-Fällen 31% EMT-Marker, 21% CSC-Marker und in 13% beide. In einer Studie mit knapp 450 ebenfalls nicht-metastasierten Fällen konnten Kasimir-Bauer *et al.* (2012) in 72% bzw. 46% der CTC⁺-Proben EMT- bzw. CSC-Marker nachweisen, in CTC⁻-Proben 18% bzw. 5%. Eine Assoziation des Nachweises von EMT- bzw. CSC-Markern mit klinisch-pathologischen Variablen wurde dabei nicht beobachtet, der Zusammenhang mit der Prognose wurde nicht untersucht. Für metastasierte Karzinome zeigte Giordano *et al.* (2012), dass unter EMT-positiven CTC signifikant häufiger CSC zu finden sind als unter EMT-negativen und, dass unter den Stammzellmarker-positiven Zellen deutlich mehr EpCAM-negativ waren als EpCAM-positiv. Auch für metastasierte Prostatakarzinome existieren einzelne Studien. Armstrong *et al.* (2011) stellten fest, dass über 80% der CTC eine Koexpression von epithelialen, mesenchymalen und Stammzellmarkern aufweisen. Chen *et al.* (2013) fanden, dass CSC-Marker häufig nachweisbar und mit dem Vorkommen von EMT-Markern assoziiert sind.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CTC mesenchymalen Phänotyps aber häufig auch Zellen mit sowohl epithelialen als auch mesenchymalen Charakteristika vorkommen. MIC, die EMT-Fähigkeit und Stammzellcharakter besitzen, kommen sowohl bei Patienten mit und ohne nachweisbar epitheliale CTC vor, und könnten mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Bei Beurteilung dieser Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Vergleichbarkeit der Studien begrenzt ist, da viele verschiedene mesenchymale und CSC-Marker sowie Methoden eingesetzt, und meist kleine Patientenkohorten untersucht wurden. Große standardisierte Studien sind nötig, um den prognostischen Wert von EMT- und CSC-Markern zu evaluieren (Bednarz-Knoll *et al.* 2012).

Für den Einsatz von epithelspezifischen Markern – wie in vorliegender Arbeit – würde die Annahme, dass EMT-fähige Zellen mit Stammzellcharakter die Fraktion der MIC bilden bedeuten, dass ein wichtiger, für die Metastasierung verantwortlicher Teil der Zellen unerkannt bliebe, und somit deren prognostische Aussagekraft eingeschränkt wäre. Lediglich Zellen mit sowohl epithelialen als auch mesenchymalen Eigenschaften könnten detektiert werden. Die prognostische Relevanz von CTC, die mit epithelspezifischen Assays wie beispielsweise CellSearch[®] nachgewiesen werden, ist jedoch gut belegt. Ein Modell, was dies erklären würde,

beinhaltet, dass diese epithelialen CTC passiv ins Blut gelangen wenn MIC vorhanden sind, die den Zugang zur Zirkulation ermöglichen. CTC mit epithelialen Eigenschaften wären also lediglich ein Surrogatparameter für das Metastasierungspotential (Joosse und Pantel 2013). Ein anderes Modell beschreibt, dass Cluster von Zellen verschiedener – auch gemischter – Phänotypen in die Blutbahn gelangen, wobei die EMT-Zellen für Migration und Intravasation verantwortlich sind, während nur im Cluster enthaltene epitheliale Zellen zur Extravasation und Kolonisierung fähig sind (Książkiewicz *et al.* 2012).

5.4 Schlussfolgerungen und Perspektiven

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass CTC bei Patientinnen mit Vulvakarzinom aller Stadien nachweisbar sind, und zwar häufiger bei Rezidiven als bei Ersttumoren. Bei VSCC sind Lokalrezidive am häufigsten. Dass in solchen Fällen dennoch CTC nachgewiesen werden können zeigt, dass die Entstehung der Rezidive auf hämatogener Beteiligung beruht. Da bei VSCC bereits DTC nachgewiesen wurden, könnte auch bei dieser Entität das Knochenmark ein Reservoir für Tumorzellen sein. In allen Fällen in denen Fernmetastasen vorlagen, waren CTC nachweisbar. Der Einsatz der CTC-Detektion zur Ergänzung der Diagnostik wäre somit denkbar. Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass der Nachweis von CTC bei VSCC prognoserelevant ist. Auch das Vorhandensein von apoptotischen Tumorzellen und Tumorzellfragmenten könnten eine prognostische Bedeutung haben. Werden epitheliale Marker zur Detektion eingesetzt, sind auch bei inflammatorischen benignen Erkrankungen der Vulva zirkulierende Epithelzellen nachweisbar. Die Feststellung, dass beim Vorliegen mehrerer Begleiddysplasien häufiger CTC gefunden wurden, wirft zudem die Frage auf, ob Inflammation den Eintritt von Tumorzellen in die Blutzirkulation zu erleichtern vermag. Es wurden CTC bzw. apoptotische CTC bei Patientinnen gefunden, die EGFR exprimieren. EGFR könnte also auch bei der Metastasenbildung von VSCC eine Rolle spielen. Das Vorkommen einer EGFR⁺/CK⁻-Zelle passt zur Hypothese, dass der EMT-Prozess durch den EGFR-Signalweg induziert werden kann.

Diese Arbeit war lediglich ein erster Schritt der CTC-Analyse bei VSCC. Um aufzuklären welche Rolle CTC bei dieser Tumorentität spielen, sind Untersuchungen größerer Patientenkollektive unabdingbar. Sie könnten die Fragen klären, ob CTC häufiger in fortgeschrittenen Stadien nachweisbar sind als in frühen -ob sie also den Krankheitsprogress abbilden- und ob doch Zusammenhänge mit histopathologischen Parametern bestehen, insbesondere der Befall von Lymphknoten und dem CTC-Status. Mit größeren Fallzahlen könnte auch geklärt werden,

ob bei Patientinnen mit Begleitdysplasien tatsächlich häufiger CTC nachgewiesen werden können und ob dies mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Zudem könnten sie zeigen, ob sich die prognostische Relevanz bestätigen lässt. Wäre dies der Fall, könnte die CTC-Analyse ein Entscheidungskriterium für die Durchführung adjuvanter Therapien werden. Dazu muss allerdings auch untersucht werden, welche Anzahl von CTC prognostisch relevant ist – besonders vor dem Hintergrund, dass Begleitdysplasien bei VSCC häufig sind und diese ebenfalls zur Ausschwemmung epithelialer Zellen ins Blut – vermutlich in geringerer Konzentration als malignes Gewebe – führen. Auch der prognostische Wert des Nachweises von nicht intakten Tumorzellen könnte evaluiert werden.

Für weitere CTC-Untersuchungen bei VSCC sind methodisch verschiedene Gesichtspunkte zu bedenken. Zunächst sollte die eingesetzte Blutmenge vereinheitlicht werden, um einen möglichen methodischen Einfluss auszuschließen. Auch der HPV-Status sollte berücksichtigt werden, da HPV für die Pathogenese und möglicherweise auch für die Prognose eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Werden zur Detektion CK-AK eingesetzt, sollten wegen der Inhomogenität der CK-Expression innerhalb eines Vulvakarzinoms AK mit großem CK-Spektrum eingesetzt werden, die möglichst CK5/6 und 14 abdecken, da deren Expression in Primärtumoren am besten belegt ist. Eine zukünftige Arbeit könnte sich dem Vergleich der CK-Expression von Primarius, CTC und Metastasen widmen, um den gezielten Einsatz von CK-AK zur CTC-Detektion zu ermöglichen und deren prognostische Relevanz zu erhöhen.

Die Untersuchung von EGFR bei VSCC-CTC könnte interessante Erkenntnisse liefern. Werden größere Patientenkollektive untersucht kann ermittelt werden, ob die Expression von EGFR einen Einfluss auf die Prognose hat. Durch einen Vergleich der EGFR-Expression und –Genmutation von Primarius, CTC und Metastasen könnten wiederum die Änderungen im Laufe des Metastasierungsvorgangs ermittelt werden. Dies könnte in weiteren Schritten auch als Therapietarget systemischer Therapien eingesetzt werden. Zur Stützung der Hypothese, dass per EGFR-Signalkaskade EMT induziert werden kann, sind kombinierte Analysen von EGFR und mesenchymalen Markern auf CTC notwendig.

Zusammenfassend bilden die vorliegenden Ergebnisse eine gute Basis für weiterführende Untersuchungen zu Biologie und klinischer Relevanz von CTC beim Vulvakarzinom.

6. ZUSAMMENFASSUNG IN DEUTSCHER UND ENGLISCHER SPRACHE

6.1 Zusammenfassung

Im Metastasierungsvorgang spielen CTC eine entscheidende Rolle. Sie werden bei mehreren Tumorentitäten als prognostischer Marker eingesetzt. Das Vulvakarzinom ist eine relativ seltene Tumorentität, die Inzidenz nimmt jedoch besonders unter jüngeren Frauen deutlich zu. Es gibt kein Standardtherapieverfahren, welches das Ausmaß des operativen Eingriffs sowie die Durchführung adjuvanter Therapien vorgibt. Um eine bessere Prognoseeinschätzung und Therapieplanung zu erreichen, wurden etliche molekulare Marker untersucht. Ein Großteil der VSCC exprimiert EGFR, dies könnte prognostisch relevant sein. Zudem zeigten Therapieversuche mit EGFR-Inhibitoren Erfolge. In vorliegender Arbeit wurde untersucht, ob CTC mittels etablierter Methoden bei VSCC nachweisbar sind, ob deren Nachweis mit histopathologischen Parametern korreliert und prognostisch relevant ist, und ob CTC EGFR exprimieren.

Peripheres Blut von 52 Patientinnen (Erstdiagnose und Rezidiv) wurde präoperativ analysiert. Die Isolation mononukleärer Zellen erfolgte mittels Dichtegradientensystem. Zur Detektion wurden pan-CK-AK eingesetzt, einerseits durchlichtmikroskopisch mittels APAAP-Technik, andererseits in Kombination mit EGFR per Immunfluoreszenzdoppelfärbung.

In 12,8% der Fälle ließen sich CTC nachweisen, häufiger bei Patientinnen mit Tumorrezidiv. Deshalb kann vermutet werden, dass CTC bei der Entwicklung von Rezidiven eine Rolle spielen. CTC traten häufiger auf, wenn im Primärtumor Gefäße oder Lymphgefäße von Tumorgeewebe befallen waren, sowie beim Vorliegen von Fernmetastasen. CTC scheinen also bei VSCC eine systemische Ausbreitung der Erkrankung anzuzeigen. CTC wurden auch häufiger detektiert, wenn mehrere Begleitdysplasien vorlagen, möglicherweise können diese den Eintritt von Tumorzellen in die Blutbahn erleichtern. Bei Krankheitsprogress und bei tumorbedingt verstorbenen Patientinnen wurden häufiger CTC nachgewiesen. Ließe sich diese Beobachtung bei größeren Patientenkollektiven bestätigen, wäre ein Einsatz der CTC-Detektion zur Ergänzung der Diagnostik denkbar. Es wurden insgesamt sechs CTC-verdächtige EGFR⁺-Elemente gefunden. Keines davon konnte eindeutig als CTC definiert werden, die meisten waren zwar CK⁺, ein Zellkern war nicht oder nur teilweise sichtbar. Vermutlich handelte es sich um apoptotische Zellen, welche möglicherweise ebenfalls prognostisch bedeutsam sind. Im Fall eines EGFR⁺/CK-Elementes könnte es sich um eine in EMT-befindliche Zelle handeln. Die Kombination epithelialer und mesenchymaler Marker könnte diese Frage klären. Bei einer Patientin mit VIN wurde ebenfalls eine CTC detektiert, vermutlich handelte es sich um eine benigne Epithelzelle. Bei Assays mit rein epithelspezifischen Markern muss deshalb beachtet werden, dass es beim Vorliegen von inflammatorischen benignen Erkrankungen zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann.

6.2 Abstract

CTC play a crucial role in the process of metastatic spread. They are used as a prognostic marker for several tumour entities. Vulvar carcinoma is a relatively rare tumour entity; yet, its incidence increases considerably especially among younger women. There is currently no standard treatment to determine the extent of surgery or the application of adjuvant therapies. In order to improve the prediction of the prognosis and therefore guide treatment decisions, numerous molecular markers have been investigated. Most of VSCC express EGFR, which could be of prognostic value. In addition, therapy trials with EGFR inhibitors have been successful. In this thesis, I investigated if CTC are detectable in patients with VSCC using well-established methods, if their detection correlates with histopathological parameters, and if this has any prognostic value, as well as whether CTC express EGFR.

Peripheral blood samples from 52 patients (initial diagnosis and relapse) were analysed before surgery. Separation of mononuclear cells was carried out using a density gradient centrifugation system. Pancytokeratin antibodies were used for detection with light microscope and APAAP staining, and combined with EGFR for dual immunofluorescence staining.

CTC were detectable in 12.8% of all VSCC cases, more frequently in patients with recurrent carcinoma. It can thus be assumed that CTC are relevant for the emergence of tumour relapse. CTC were more often present when the tumour affected blood or lymphatic vessels, as well as in cases of distant metastases. It therefore seems that the detection of CTC in VSCC patients indicates a systemic spread of the disease. Moreover CTC occurred more frequently when several types of dysplasia adjacent to the tumour were present, which could possibly facilitate the access of tumour cells to the bloodstream. CTC were also more often detected in patients with progressive disease and among the patients who died from vulvar cancer. If confirmed in larger studies, the detection of CTC could supplement existing diagnostic tools. A total of six potential CTC and EGFR⁺ objects were detected. None of them could be definitely identified as CTC. Indeed, most of them were positive for cytokeratins but lacked completely or partly a cell nucleus. These are probably apoptotic cells, which might also prove to be of prognostic relevance. The single EGFR⁺/CK⁻ object detected might be a cell undergoing EMT. To confirm this, both epithelial und mesenchymal markers could be used. The CTC detected in the blood of a patient with VIN was probably a benign epithelial cell. When using only epithelial specific markers, it should be considered that there might be false positive results in case of benign inflammatory lesions.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abk.	Abkürzung/en
ACIS®	Automated Cellular Imaging System
A. dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
AK	Antikörper
APAAP	alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
ASCO	American Society of Clinical Oncology
bzw.	beziehungsweise
Casnr.	Fallnummer (casenumber)
CD	Unterscheidungsgruppen (cluster of differentiation)
CK	Zytokeratine (cytokeratins)
CSC	Tumorstammzellen (cancer stem cell/s)
CTC	zirkulierende Tumorzelle/n (circulating tumour cell/s)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DFS	krankheitsfreies Überleben (disease-free survival)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTC	disseminierte Tumorzelle/n (disseminated tumour cell/s)
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor)
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül (epithelial cell adhesion molecule)
Fab	antigenbindendes Fragment (fragment antigen binding)
FBS	fetales Rinderserum (fetal bovine serum)
Fc	kristallisierbares Fragment (crystallisable fragment)
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
ggf.	gegebenenfalls
HPV	humanes Papillomavirus
hr	hochrisiko-
ICC	Immunzytochemie (immunocytochemistry)
MET	mesenchymale-epitheliale Transition
MIC	metastasen-initiierende Zellen (metastasis-initiating cells)
Min.	Minute/n
MNC	mononukleäre Zellen (mononuclear cells)
Nr.	Nummer
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
OT	Objektträger
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RT	Raumtemperatur
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
Sek.	Sekunde/n

T	Thymin
TC	Tumorzelle/n (tumour cell/s)
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	Umdrehungen
UICC	Union for International Cancer Control
UK	United Kingdom
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
USA	United States of America
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
vgl.	vergleiche
VIN	intraepitheliale Neoplasie der Vulva (vulvar intraepithelial neoplasia)
vs.	versus
VSCC	Plattenepithelkarzinom/e der Vulva (vulvar squamous cell carcinoma)
Z.n.	Zustand nach

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S (2009) Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 11(4): R46.
- Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K (2008) Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res* 14(16): 5013-5021.
- Alix-Panabières C, Pantel K (2014a) Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 14(9): 623-631.
- Alix-Panabières C, Pantel K (2014b) Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* 14(1): 57-62.
- Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Tersappen LW (2004) Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 10(20): 6897-6904.
- Alpers I (2012) Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Hamburg.
- Ansink A, Mooi WJ, van Doornwaard G, van Tinteren H, Heintz AP, Ivanyi D (1995) Cytokeratin subtypes and involucrin in squamous cell carcinoma of the vulva. An immunohistochemical study of 41 cases. *Cancer* 76(4): 638-643.
- Antoniou A, Hébrant A, Dom G, Dumont JE, Maenhaut C (2013) Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: a cell population or a cell property? *Cell Cycle* 12(24): 3743-3748.
- Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull JD, Herold CI, Marcom PK, George DJ, Garcia-Blanco MA (2011) Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res* 9(8): 997-1007.
- Auger M, Colgan TJ (1990) Detection of metastatic vulvar and cervical squamous carcinoma in regional lymph nodes by use of a polyclonal keratin antibody. *Int J Gynecol Pathol* 9(4): 337-342.
- Baccelli I, Trumpp A (2012) The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol* 198(3): 281-293.
- Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, Klein C, Saini M, Bäuerle T, Wallwiener M, Holland-Letz T, Höfner T, Sprick M, Scharpf M, Marmé F, Sinn HP, Pantel K, Weichert W, Trumpp A (2013) Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 31(6): 539-544.
- Bacha OM, Levesque E, Renaud MC, Lalancette M (2010) A case of recurrent vulvar carcinoma treated with erlotinib, an EGFR inhibitor. *Eur J Gynaecol Oncol* 32(4): 423-424.
- Baiocchi G, Rocha RM (2014) Vulvar cancer surgery. *Curr Opin Obstet Gynecol* 26(1): 9-17.
- Balasubramanian P, Lang JC, Jatana KR, Miller B, Ozer E, Old M, Schuller DE, Agrawal A, Teknos TN, Summers TA Jr, Lustberg MB, Zborowski M, Chalmers JJ (2012) Multiparameter analysis, including EMT markers, on negatively enriched blood samples from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *PLoS One* 7(7): e42048.
- Balic M, Williams A, Lin H, Datar R, Cote RJ (2013) Circulating tumor cells: from bench to bedside. *Annu Rev Med* 64: 31-44.
- Bamberger ES, Perrett CW (2002) Angiogenesis in benign, pre-malignant and malignant vulvar lesions. *Anticancer Res* 22(6C): 3853-3865.

- Banys M, Solomayer EF, Becker S, Krawczyk N, Gardanis K, Staebler A, Neubauer H, Wallwiener D, Fehm T (2009) Disseminated tumor cells in bone marrow may affect prognosis of patients with gynecologic malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 19(5): 948-952.
- Banys M, Krawczyk N, Fehm T (2014) The role and clinical relevance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Cancers (Basel)* 6(1): 143-152.
- Barrière G, Riouallon A, Renaudie J, Tartary M, Rigaud M (2012) Mesenchymal and stemness circulating tumor cells in early breast cancer diagnosis. *BMC Cancer* 12: 114.
- Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ, Hawes D, Decker WJ, Priddy C, Bossy B, Ludmann S, Yamamoto K, Masih AS, Espinoza FP, Harrington DS (2000) Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res* 6(9): 3552-3559.
- Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Emig R, Wallwiener D, Solomayer EF (2005) Image analysis systems for the detection of disseminated breast cancer cells on bone-marrow cytospins. *J Clin Lab Anal* 19(3): 115-119.
- Becker TM, Caixeiro NJ, Lim SH, Tognela A, Kienzle N, Scott KF, Spring KJ, de Souza P (2014) New frontiers in circulating tumor cell analysis: A reference guide for biomolecular profiling toward translational clinical use. *Int J Cancer* 134(11): 2523-2533.
- Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K (2012) Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev* 31(3-4): 673-687.
- Berchuck A, Rodriguez G, Kamel A, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Bast RC Jr (1990) Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva, and vagina. *Obstet Gynecol* 76(3 Pt 1): 381-387.
- Bidard FC, Mathiot C, Delalogue S, Brain E, Giachetti S, de Cremoux P, Marty M, Pierga JY (2010) Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol* 21(4): 729-373.
- Bidard FC, Fehm T, Ignatiadis M, Smerage JB, Alix-Panabières C, Janni W, Messina C, Paoletti C, Müller V, Hayes DF, Piccart M, Pierga JY (2013) Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. *Cancer Metastasis Rev* 32(1-2): 179-188.
- Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, Grisanti S, Generali D, Garcia-Saenz JA, Stebbing J, Caldas C, Gazzaniga P, Manso L, Zamarchi R, de Lascoiti AF, De Mattos-Arruda L, Ignatiadis M, Lebofsky R, van Laere SJ, Meier-Stiegen F, Sandri MT, Vidal-Martinez J, Politaki E, Consoli F, Bottini A, Diaz-Rubio E, Krell J, Dawson SJ, Raimondi C, Rutten A, Janni W, Munzone E, Carañana V, Agelaki S, Almici C, Dirix L, Solomayer EF, Zorzino L, Johannes H, Reis-Filho JS, Pantel K, Pierga JY, Michiels S (2014) Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 15(4): 406-414.
- Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad Ø, Diel I, Solomayer E-F, Theoharous P, Coombes RC, Smith BM, Wunder E, Marolleau J-P, Garcia J, Pantel K (1999) Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy* 1(5): 377-388.
- Borgen E, Pantel K, Schlimok G, Müller P, Otte M, Renolen A, Ehnle S, Coith C, Nesland JM, Naume B (2006) A European interlaboratory testing of three well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow. Results from analysis of normal bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 70(6): 400-409.

- Botteri E, Sandri MT, Bagnardi V, Munzone E, Zorzino L, Rotmensz N, Casadio C, Cassatella MC, Esposito A, Curigliano G, Salvatici M, Verri E, Adamoli L, Goldhirsch A, Nolè F (2010) Modeling the relationship between circulating tumour cells number and prognosis of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 122(1): 211-217.
- Bøyum A (1968a) Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97: 31-50.
- Bøyum A (1968b) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97: 77-89.
- Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G (2000) Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 342(8): 525-533.
- Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmüller G, Pantel K (2001) ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res* 61(5):1890-1895.
- Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K (2005) A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353(8): 793-802.
- Brooks SA (2012) Basic immunocytochemistry for light microscopy. *Methods Mol Biol* 878: 1-30.
- Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, Matera J, Repollet M, Doyle GV, Terstappen LW, Hayes DF (2006) Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 12(21): 6403-6409.
- Brustmann H (2007) Epidermal Growth Factor Receptor Is Involved in the Development of an Invasive Phenotype in Vulvar Squamous Lesions, but Is Not Related to MIB-1 Immunoreactivity. *Int J Gynecol Pathol* 26: 481-489.
- Chang ZG, Wei JM, Qin CF, Hao K, Tian XD, Xie K, Xie XH, Yang YM (2012) Suppression of the epidermal growth factor receptor inhibits epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer PANC-1 cells. *Dig Dis Sci* 57(5): 1181-1189.
- Chen CL, Mahalingam D, Osmulski P, Jadhav RR, Wang CM, Leach RJ, Chang TC, Weitman SD, Kumar AP, Sun L, Gaczynska ME, Thompson IM, Huang TH (2013) Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of EMT-related genes in metastatic prostate cancer. *Prostate* 73(8): 813-826.
- Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F (2005) Carcinogenicity of human papillomaviruses. *The Lancet Oncology* 6(4): 204.
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ (2008) Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26(19): 3213-3221.
- Comen E, Norton L, Massagué J (2011) Clinical implications of cancer self-seeding. *Nat Rev Clin Oncol* 8(6): 369-377.
- Coulter J, Gleeson N (2003) Local and regional recurrence of vulvar cancer: management dilemmas. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17(4): 663-681.
- Coumans FA, Doggen CJ, Attard G, de Bono JS, Terstappen LW (2010) All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* 21(9): 1851-1857.

- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860-867.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351(8): 781-791.
- Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, Lilja H, Schwartz L, Larson S, Fleisher M, Scher HI (2007) Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13(23): 7053-7058.
- De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D (2008) Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14(19): 6302-6309.
- Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J (2013) Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Histopathology* 62(1): 161-175.
- De Melo Maia B, Fontes AM, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, de Brot L, Baiocchi G, Stiepcich MM, Soares FA, Rocha RM (2014) EGFR expression in vulvar cancer: clinical implications and tumor heterogeneity. *Hum Pathol* 45(5): 917-925.
- De Sanjosé S, Alemany L, Ordi J, Tous S, Alejo M, Bigby SM, Joura EA, Maldonado P, Laco J, Bravo IG, Vidal A, Guimerà N, Cross P, Wain GV, Petry KU, Mariani L, Bergeron C, Mandys V, Sica AR, Félix A, Usubutun A, Seoud M, Hernández-Suárez G, Nowakowski AM, Wilson G, Dalstein V, Hampf M, Kasamatsu ES, Lombardi LE, Tinoco L, Alvarado-Cabrero I, Perrotta M, Bhatla N, Agorastos T, Lynch CF, Goodman MT, Shin HR, Viarheichyk H, Jach R, Cruz MO, Velasco J, Molina C, Bornstein J, Ferrera A, Domingo EJ, Chou CY, Banjo AF, Castellsagué X, Pawlita M, Lloveras B, Quint WG, Muñoz N, Bosch FX; HPV VVAP study group (2013) Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *Eur J Cancer* 49(16): 3450-3461.
- Dhomen NS, Mariadason J, Tebbutt N, Scott AM (2012) Therapeutic targeting of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *Crit Rev Oncog* 17(1): 31-50.
- Dittmer C, Katalinic A, Mundhenke C, Thill M, Fischer D (2011) Epidemiology of vulvar and vaginal cancer in Germany. *Arch Gynecol Obstet* 284: 169-174.
- Dragulescu AA (2014) xlsx: Read, write, format Excel 2007 and Excel 97/2000/XP/2003 files. R package version 0.5.7. [Online im Internet] URL: <http://CRAN.R-project.org/package=xlsx> [Stand: 25.12.2014, 14:52]
- Effenberger KE, Borgen E, Eulenburger CZ, Bartkowiak K, Grosser A, Synnestvedt M, Kaarsen R, Brandt B, Nesland JM, Pantel K, Naume B (2011) Detection and clinical relevance of early disseminated breast cancer cells depend on their cytokeratin expression pattern. *Breast Cancer Res Treat* 125(3): 729-738.
- Esquius J, Brisigotti M, Matias-Guiu X, Prat J (1991) Keratin expression in normal vulva, non-neoplastic epithelial disorders, vulvar intraepithelial neoplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 10(4): 341-355.
- Fehm T, Braun S, Muller V, Janni W, Gebauer G, Marth C, Schindlbeck C, Wallwiener D, Borgen E, Naume B, Pantel K, Solomayer E (2006) A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* 107(5): 885-892.
- Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, Buick RN (1985) MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem Biophys Res Commun* 128(2): 898-905.

- Fischer D, Katalinic A, Mundhenke C, Dittmer C, Diedrich K, Thill M (2009) Epidemiologie maligner Erkrankungen der Vagina und Vulva. *Onkologe* 15:8-14.
- Fons G, Burger MP, Ten Kate FJ, van der Velden J (2007) Identification of potential prognostic markers for vulvar cancer using immunohistochemical staining of tissue microarrays. *Int J Gynecol Pathol* 26(2): 188-193.
- Gadducci A, Tana R, Barsotti C, Guerrieri ME, Genazzani AR (2012) Clinico-pathological and biological prognostic variables in squamous cell carcinoma of the vulva. *Crit Rev Oncol Hematol* 83(1): 71-83.
- GE Healthcare Life Sciences (2011) Data file 11-0031-35 AC.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB (2010) Isolation of mononuclear cells Methodology and applications Data file 18-1152-69 AD.
- Geiger TR, Peeper DS (2009) Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1796(2): 293-308.
- Georgoulas V, Bozionelou V, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Kalbakis K, Xyrafas A, Mavroudis D (2012) Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. *Ann Oncol* 23(7): 1744-1750.
- Gerges N, Rak J, Jabado N (2010) New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Br Med Bull* 94: 49-64.
- Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR (2003) Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res* 162: 149-155.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Berlin. [Online im Internet] URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content-/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html [Stand: 30.09.2014, 13:27]
- Giordano A, Gao H, Anfossi S, Cohen E, Mego M, Lee BN, Tin S, De Laurentiis M, Parker CA, Alvarez RH, Valero V, Ueno NT, De Placido S, Mani SA, Esteva FJ, Cristofanilli M, Reuben JM (2012) Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther* 11(11): 2526-2534.
- Goldkorn A, Ely B, Quinn DI, Tangen CM, Fink LM, Xu T, Twardowski P, Van Veldhuizen PJ, Agarwal N, Carducci MA, Monk JP 3rd, Datar RH, Garzotto M, Mack PC, Lara P Jr, Higano CS, Hussain M, Thompson IM Jr, Cote RJ, Vogelzang NJ (2014) Circulating tumor cell counts are prognostic of overall survival in SWOG S0421: a phase III trial of docetaxel with or without atrasentan for metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 32(11): 1136-1142.
- Goodman OB Jr, Symanowski JT, Loudyi A, Fink LM, Ward DC, Vogelzang NJ (2011) Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with hormone-sensitive prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 9(1): 31-38.
- Gonzalez Bosquet J, Magrina JF, Gaffey TA, Hernandez JL, Webb MJ, Cliby WA, Podratz KC (2005) Long-term survival and disease recurrence in patients with primary squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol* 97(3): 828-833.
- Gordon AN (2006) Vulvar Carcinoma. In: Bieber EJ (Hrsg.) *Clinical Gynecology*. 1. Auflage, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, S. 631-642.
- Gradilone A, Raimondi C, Nicolazzo C, Petracca A, Gandini O, Vincenzi B, Naso G, Aglianò AM, Cortesi E, Gazzaniga P (2011) Circulating tumour cells lacking cytokeratin in breast cancer: the importance of being mesenchymal. *J Cell Mol Med* 15(5): 1066-1070.

- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140(6): 883-899.
- Groot Koerkamp B, Rahbari NN, Büchler MW, Koch M, Weitz J (2013) Circulating tumor cells and prognosis of patients with resectable colorectal liver metastases or widespread metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 20(7): 2156-2165.
- Growdon WB, Boisvert SL, Akhavanfard S, Oliva E, Dias-Santagata DC, Kojiro S, Horowitz NS, Iafrate AJ, Borger DR, Rueda BR (2008) Decreased survival in EGFR gene amplified vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol* (2): 289-297.
- Gruber I, Fehm T, Taran FA, Wallwiener M, Hahn M, Wallwiener D, Krawzyck N, Hoffmann J, Hartkopf AD (2014) Disseminated tumor cells as a monitoring tool for adjuvant therapy in patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 144(2): 353-360.
- Günther V, Malchow B, Schubert M, Andresen L, Jochens A, Jonat W, Mundhenke C, Alkatout I (2014) Impact of radical operative treatment on the quality of life in women with vulvar cancer--a retrospective study. *Eur J Surg Oncol* 40(7): 875-882.
- Hacker NF (2009) Vulvar Cancer. In: Berek und Hacker's Gynecologic Oncology. Berek JS, Hacker NF, 5. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, S. 536-575.
- HAMPL M, Deckers-Figiel S, Hampl JA, Rein D, Bender HG (2008) New aspects of vulvar cancer: Changes in localization and age of onset. *Gynecol Oncol* 109(3): 340-345.
- Han L, Chen W, Zhao Q (2014) Prognostic value of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol* 35(3): 2473-2480.
- Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD, Kotasek D, Dobrovic A (2000) Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *Int J Cancer* 89(1): 8-13.
- Hart WR (2001) Vulvar intraepithelial neoplasia: historical aspects and current status. *Int J Gynecol Pathol* 20(1): 16-30.
- Hartkopf AD, Banys M, Meier-Stiegen F, Hahn M, Röhm C, Hoffmann J, Helms G, Taran FA, Wallwiener M, Walter C, Neubauer H, Wallwiener D, Fehm T (2013) The HER2 status of disseminated tumor cells in the bone marrow of early breast cancer patients is independent from primary tumor and predicts higher risk of relapse. *Breast Cancer Res Treat* 138(2): 509-517.
- Hassanzade M, Attaran M, Treglia G, Yousefi Z, Sadeghi R (2013) Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in squamous cell carcinoma of the vulva: systematic review and meta-analysis of the literature. *Gynecol Oncol* 130(1): 237-245.
- Hefler LA, Concin N, Mincham D, Thompson J, Swarte NB, van Eijkeren MA, Sie-Go DM, Hammond I, McCartney AJ, Tempfer CB, Speiser P (2002) The prognostic value of immunohistochemically detected CD44v3 and CD44v6 expression in patients with surgically staged vulvar carcinoma: a multicenter study. *Cancer* 94(1): 125-130.
- Hesse M, Magin TM, Weber K (2001) Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* 114(Pt 14): 2569-2575.
- Hoffmann G, Casper F, Weikel W, Kümmerle T, Pollow B, Schaffrath M, Hofmann M, Pollow K (1999) Value of p53, urokinase plasminogen activator, PAI-1 and Ki-67 in vulvar Carcinoma. *Zentralbl Gynakol* 121(10): 473-478.
- Holm R, Førsund M, Nguyen MT, Nesland JM, Trope CG (2013) Expression of p15INK^{4b} and p57KIP² and relationship with clinicopathological features and prognosis in patients with vulvar squamous cell carcinoma. *PLoS One* 8(4): e61273.
- Horowitz NS, Olawaiye AB, Borger DR, Growdon WB, Krasner CN, Matulonis UA, Liu JF, Lee J, Brard L, Dizon DS (2012) Phase II trial of erlotinib in women with squamous cell carcinoma of the vulva. *Gynecol Oncol* 127(1): 141-146.

- Ivanyi D, Ansink A, Mooi WJ, de Kraker NW, Heintz AP (1989) Absence of differentiation-related expression of keratin 10 in early stages of vulvar squamous carcinoma. *Differentiation* 42(2): 124-129.
- Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M (2010) Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 101(2): 293-299.
- Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, Synnestvedt M, Fehm T, Jückstock J, Borgen E, Rack B, Braun S, Sommer H, Solomayer E, Pantel K, Nesland J, Friese K, Naume B (2011) Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis. *Clin Cancer Res*. 17(9): 2967-2976.
- Johnson GA, Mannel R, Khalifa M, Walker JL, Wren M, Min KW, Benbrook DM (1997) Epidermal growth factor receptor in vulvar malignancies and its relationship to metastasis and patient survival. *Gynecol Oncol* 65(3): 425-429.
- Jones RW, Baranyai J, Stables S (1997) Trends in squamous cell carcinoma of the vulva: the influence of vulvar intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 90:448-452.
- Joesse SA, Hannemann J, Spötter J, Bauche A, Andreas A, Müller V, Pantel K (2012) Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res* 18(4): 993-1003.
- Joesse SA, Pantel K (2013) Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res* 73(1): 8-11.
- Joesse SA, Gorges TM, Pantel K (2014) Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med* 7(1): 1-11.
- Joura EA, Lösch A, Haider-Angeler MG, Breitenecker G, Leodolter S (2000) Trends in vulvar neoplasia. Increasing incidence of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva in young women. *J Reprod Med* 45(8): 613-615.
- Judson PL, Habermann EB, Baxter NN, Durham SB, Virnig BA (2006) Trends in the incidence of invasive and in situ vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol* 107(5): 1018-22.
- Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S (2011) Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 13(3): R59.
- Kallergi G, Konstantinidis G, Markomanolaki H, Papadaki MA, Mavroudis D, Stournaras C, Georgoulas V, Agelaki S (2013) Apoptotic circulating tumor cells in early and metastatic breast cancer patients. *Mol Cancer Ther* 12(9): 1886-1895.
- Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6): 1420-1428.
- Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T (2012) Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* 14(1): R15.
- Khoja L, Lorigan P, Dive C, Keilholz U, Fusi A (2015) Circulating tumor cells as tumor biomarkers in melanoma: detection methods and clinical relevance. *Ann Oncol* 26(1): 33-39.
- Kim K, Lee KH, Lee J, Choi J (2014) Overview of current standpoints in profiling of circulating tumor cells. *Arch Pharm Res* 37(1): 88-95.
- Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmüller G (2002) Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 360(9334): 683-689.
- Klein CA (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 9(4): 302-312.

- Knopp S, Bjørge T, Nesland JM, Tropé C, Scheistrøen M, Holm R (2004) p16INK4a and p21Waf1/Cip1 expression correlates with clinical outcome in vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol* 95(1): 37-45.
- Knopp S, Nesland JM, Tropé C, Holm R (2006) p14ARF, a prognostic predictor in HPV-negative vulvar carcinoma. *Am J Clin Pathol* 126(2): 266-276.
- Knopp S, Tropé C, Nesland JM, Holm R (2009) A review of molecular pathological markers in vulvar carcinoma: lack of application in clinical practice. *J Clin Pathol* 62(3): 212-218.
- Kohlberger P, Kainz C, Breitenecker G, Gitsch G, Sliutz G, Kölbl H, Tschachler E, Reinthaller A (1995) Prognostic value of immunohistochemically detected p53 expression in vulvar carcinoma. *Cancer* 76(10): 1786-1789.
- Köllermann J, Weikert S, Schostak M, Kempkensteffen C, Kleinschmidt K, Rau T, Pantel K (2008) Prognostic significance of disseminated tumor cells in the bone marrow of prostate cancer patients treated with neoadjuvant hormone treatment. *J Clin Oncol* 26(30): 4928-4933.
- Książkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ (2012) Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology* 79(4): 195-208.
- Kulasinghe A, Perry C, Jovanovic L, Nelson C, Punyadeera C (2015) Circulating Tumour Cells in Metastatic Head and Neck Cancers. *Int J Cancer* 136(11): 2515-2523.
- Larson CJ, Moreno JG, Pienta KJ, Gross S, Repollet M, O'hara SM, Russell T, Terstappen LW (2004) Apoptosis of circulating tumor cells in prostate cancer patients. *Cytometry A* 62(1): 46-53.
- Lavorato-Rocha AM, de Melo Maia B, Rodrigues IS, Stiepcich MM, Baiocchi G, Cestari FM, Carvalho KC, Soares FA, Rocha RM (2013) Prognostication of Vulvar Cancer Based on p14(ARF) Status: Molecular Assessment of Transcript and Protein. *Ann Surg Oncol* 20(1): 31-39.
- Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC, Farace F (2011) Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 105(9): 1338-1341.
- Lee TS, Jeon YT, Kim JW, Won JK, Park NH, Park IA, Juhn YS, Kang SB, Lee HP, Song YS (2007) Increased cyclooxygenase-2 expression associated with inflammatory cellular infiltration in elderly patients with vulvar cancer. *Ann N Y Acad* 1095: 143-153.
- Li YM, Xu SC, Li J, Han KQ, Pi HF, Zheng L, Zuo GH, Huang XB, Li HY, Zhao HZ, Yu ZP, Zhou Z, Liang P (2013) Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease. *Cell Death Dis* 4: e831.
- Liberko M, Kolostova K, Bobek V (2013) Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice. *Crit Rev Oncol Hematol* 88(2): 338-356.
- Liu MC, Shields PG, Warren RD, Cohen P, Wilkinson M, Ottaviano YL, Rao SB, Eng-Wong J, Seillier-Moiseiwitsch F, Noone AM, Isaacs C (2009) Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 27(31): 5153-5159.
- Luciani TJ, Decorde M, Lise V (2014) RSvgDevice: An R SVG graphics device. R package version 0.6.4.4. [Online im Internet] URL: <http://www.darkridge.com/~jake/RSvg/> [Stand: 25.12.2014, 14:59]
- Ma X, Xiao Z, Li X, Wang F, Zhang J, Zhou R, Wang J, Liu L (2014) Prognostic role of circulating tumor cells and disseminated tumor cells in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol* 35(6): 5551-5560.

- Ma XL, Li YY, Zhang J, Huang JW, Jia HY, Liu L, Li P (2014) Prognostic role of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(15): 6015-6020.
- Maggino T, Landoni F, Sartori E, Zola P, Gadducci A, Alessi C, Soldà M, Coscio S, Spinetti G, Maneo A, Ferrero A, Konishi De Toffoli G (2000) Patterns of recurrence in patients with squamous cell carcinoma of the vulva. A multicenter CTF Study. *Cancer* 89(1): 116-122.
- Mahner S, Trillsch F, Kock L, Rohsbach D, Petersen C, Kruell A, Harter P, Jaenicke F, Woelber L (2013) Adjuvant therapy in node-positive vulvar cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 13(7): 839-844.
- Mathiesen RR, Borgen E, Renolen A, Løkkevik E, Nesland JM, Anker G, Ostenstad B, Lundgren S, Risberg T, Mjaaland I, Kvalheim G, Lønning PE, Naume B (2012) Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival. *Breast Cancer Res* 14(4): R117.
- Mego M, Mani SA, Lee BN, Li C, Evans KW, Cohen EN, Gao H, Jackson SA, Giordano A, Hortobagyi GN, Cristofanilli M, Lucci A, Reuben JM (2012) Expression of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in primary breast cancer: The effect of neoadjuvant therapy. *Int J Cancer* 130(4): 808-816.
- Méhes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF (2001) Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol* 159(1): 17-20.
- Mehlen P, Puisieux A (2006) Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 6(6): 449-458.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW (2004) Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 10(24): 8152-8162.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31(1): 11-24.
- Molloy TJ, Bosma AJ, Baumbusch LO, Synnestvedt M, Borgen E, Russnes HG, Schlichting E, van't Veer LJ, Naume B (2011) The prognostic significance of tumour cell detection in the peripheral blood versus the bone marrow in 733 early-stage breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 13(3): R61.
- Murray NP, Reyes E, Badínez L, Orellana N, Fuentealba C, Olivares R, Porcell J, Dueñas R (2013) Circulating Prostate Cells Found in Men with Benign Prostate Disease Are P504S Negative: Clinical Implications. *J Oncol*: 165014.
- Narayansingh, Miller ID, Sharma M, Welch CJ, Sharp L, Parkin DE, Cruickshank ME (2005) The prognostic significance of micrometastases in node-negative squamous cell carcinoma of the vulva. *Br J Cancer* 92(2): 222-224.
- Naume B, Wiedswang G, Borgen E, Kvalheim G, Kåresen R, Qvist H, Janbu J, Harbitz T, Nesland JM (2004) The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells. *Clin Cancer Res* 10(9): 3091-3097.
- Nolé F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, Medici M, Verri E, Adamoli L, Rotmensz N, Goldhirsch A, Sandri MT (2008) Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol* 19(5): 891-897.
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366(1): 2-16.

- Obermair A, Kohlberger P, Bancher-Todesca D, Tempfer C, Sliutz G, Leodolter S, Reinthaller A, Kainz C, Breitenecker G, Gitsch G (1996) Influence of microvessel density and vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 63(2): 204-209.
- O'Connor ML, Xiang D, Shigdar S, Macdonald J, Li Y, Wang T, Pu C, Wang Z, Qiao L, Duan W (2014) Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer Lett* 344(2): 180-187.
- Olawaiye A, Lee LM, Krasner C, Horowitz N (2007) Treatment of squamous cell vulvar cancer with the anti-EGFR tyrosine kinase inhibitor Tarceva. *Gynecol Oncol* 106(3): 628-630.
- Oonk MH, de Bock GH, van der Veen DJ, Ten Hoor KA, de Hullu JA, Hollema H, van der Zee AG (2007) EGFR expression is associated with groin node metastases in vulvar cancer, but does not improve their prediction. *Gynecol Oncol* 104(1): 109-113.
- Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, Emmink BL, Miyamoto DT, Brachtel E, Yu M, Chen PI, Morgan B, Trautwein J, Kimura A, Sengupta S, Stott SL, Karabacak NM, Barber TA, Walsh JR, Smith K, Spuhler PS, Sullivan JP, Lee RJ, Ting DT, Luo X, Shaw AT, Bardia A, Sequist LV, Louis DN, Maheswaran S, Kapur R, Haber DA, Toner M (2013) Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. *Sci Transl Med* 5(179): 179ra47.
- Páez D, Labonte MJ, Bohanes P, Zhang W, Benhanim L, Ning Y, Wakatsuki T, Loupakis F, Lenz HJ (2012) Cancer dormancy: a model of early dissemination and late cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 18(3): 645-653.
- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmüller G (1993) Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 85(17): 1419-1424.
- Pantel K, Brakenhoff RH (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4(6): 448-456.
- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008) Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8(5): 329-340.
- Pantel K, Denève E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, Riethdorf S, Alix-Panabières C (2012) Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem* 58(5): 936-940.
- Pantel K, Alix-Panabières C (2013) Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 73(21): 6384-6388.
- Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C, Cristofanilli M, Deisseroth A, Hayes DF, Kapke G, Kumar P, Lee JSh, Liu MC, McCormack R, Mikulski S, Nagahara L, Pantel K, Pearson-White S, Punnoose EA, Roadcap LT, Schade AE, Scher HI, Sigman CC, Kelloff GJ (2012) Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med* 10: 138.
- Pereira TC, Share SM, Magalhães AV, Silverman JF (2011) Can we tell the site of origin of metastatic squamous cell carcinoma? An immunohistochemical tissue microarray study of 194 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 19(1): 10-14.
- Paterlini-Brechot P, Benali NL (2007) Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 253(2): 180-204.
- Pecorelli S, FIGO Committee on Gynecologic Oncology, European Institute of Oncology (2009) Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynecol Obstet* 105(2): 103-104.
- Pecorino L (2005) *Molecular Biology of Cancer Mechanisms, Targets and Therapeutics*. Oxford University Press.

- Rack B, Andergassen U, Janni W, Neugebauer J (2012) CTCs in primary breast cancer (I). Recent Results Cancer Res 195: 179-185.
- Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, Friedl TW, Lorenz R, Tesch H, Fasching PA, Fehm T, Schneeweiss A, Lichtenegger W, Beckmann MW, Friese K, Pantel K, Janni W; SUCCESS Study Group (2014) Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. J Natl Cancer Inst 106(5).
- Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, Diener MK, Büchler MW, Koch M, Weitz J (2010) Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. Gastroenterology 138(5): 1714-1726.
- Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, Palazzo A, Saltarelli R, Spremberg F, Cortesi E, Gazzaniga P (2011) Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 130(2): 449-455.
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Version 3.1.1. [Online im Internet] URL: <http://www.R-project.org/> [Stand: 25.12.2014, 15:13]
- Reeh M, Effenberger KE, Koenig AM, Riethdorf S, Eichstädt D, Vettorazzi E, Uzunoglu FG, Vashist YK, Izbicki JR, Pantel K, Bockhorn M (2015) Circulating Tumor Cells as a Biomarker for Preoperative Prognostic Staging in Patients With Esophageal Cancer. Ann Surg 261(6): 1124-1130.
- Regauer S (2009) Histopathological work-up and interpretation of sentinel lymph nodes removed for vulvar squamous cell carcinoma. Histopathology 55(2): 174-181.
- Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ (2012) EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. Cell 148(1-2): 349-361.
- Rodríguez-Rodríguez L, Sancho-Torres I, Miller Watelet L, Gibbon DG, Comerci JT, Mesonero C (1999) Prognostic value of CD44 expression in invasive squamous cell carcinoma of the vulva. Gynecol Oncol 75(1): 34-40.
- Rodríguez-Rodríguez L, Sancho-Torres I, Gibbon DG, Watelet LF, Mesonero C (2000) CD44-9v and CD44-10v are potential molecular markers for squamous cell carcinoma of the vulva. J Soc Gynecol Investig 7(1): 70-75.
- Romero-Laorden N, Olmos D, Fehm T, Garcia-Donas J, Diaz-Padilla I (2014) Circulating and disseminated tumor cells in ovarian cancer: a systematic review. Gynecol Oncol 133(3): 632-639.
- Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, Thorban S, Nekarda H, Siewert JR (2002) Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. Cytometry 49(4): 150-158.
- Rossi E, Basso U, Celadin R, Zilio F, Pucciarelli S, Aieta M, Barile C, Sava T, Bonciarelli G, Tumolo S, Ghiotto C, Magro C, Jirillo A, Indraccolo S, Amadori A, Zamarchi R (2010) M30 neopeptide expression in epithelial cancer: quantification of apoptosis in circulating tumor cells by CellSearch analysis. Clin Cancer Res 16(21): 5233-5243.
- Rusch VW, Hawes D, Decker PA, Martin SE, Abati A, Landreneau RJ, Patterson GA, Inculet RI, Jones DR, Malthaner RA, Cohen RG, Ballman K, Putnam JB Jr, Cote RJ (2011) Occult metastases in lymph nodes predict survival in resectable non-small-cell lung cancer: report of the ACOSOG Z0040 trial. J Clin Oncol 29(32): 4313-4319.
- Salmaso R, Zen T, Zannol M, Perin D, Marchiori S, Marchetti M (2000) Prognostic value of protein p53 and ki-67 in invasive vulvar squamous cell carcinoma. Eur J Gynaecol Oncol 21(5): 479-483.

- Santeufemia DA, Capobianco G, Re GL, Miolo GM, Fadda GM, Cherchi PL, Tumolo S (2012) Cisplatin-gemcitabine as palliative chemotherapy in advanced squamous vulvar carcinoma: report of two cases. *Eur J Gynaecol Oncol* 33(4): 421-422.
- Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroj R, Gasiorowski L, Murawa D, Nowaczyk P, Tomasi T, Weber E, Dworacki G, Morgenthaler NG, Jansen H, Propping C, Sterzynska K, Dyszkiewicz W, Zabel M, Kiechle M, Reuning U, Schmitt M, Lücke K (2012) A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol* 41(4): 1241-1250.
- Scheistrøen M, Tropé C, Pettersen EO, Nesland JM (1999) p53 protein expression in squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer* 85(5): 1133-1138.
- Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, Heller G (2009) Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol* 10(3): 233-239.
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA (2003) From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13): 7737-7742.
- Selman TJ, Luesley DM, Acheson N, Khan KS, Mann CH (2005) A systematic review of the accuracy of diagnostic tests for inguinal lymph node status in vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 99(1): 206-214.
- Serrano MJ, Ortega FG, Alvarez-Cubero MJ, Nadal R, Sanchez-Rovira P, Salido M, Rodríguez M, García-Puche JL, Delgado-Rodríguez M, Solé F, García MA, Perán M, Rosell R, Marchal JA, Lorente JA (2014) EMT and EGFR in CTCs cytokeatin negative non-metastatic breast cancer. *Oncotarget* 5(17): 7486-7497.
- Seyfried TN, Huysentruyt LC (2013) On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog* 18(1-2): 43-73.
- Shiozawa Y, Nie B, Pienta KJ, Morgan TM, Taichman RS (2013) Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacol Ther* 138(2): 285-293.
- Shylasree TS, Bryant A, Howells RE (2011) Chemoradiation for advanced primary vulval cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 13(4): CD003752.
- Siráková I, Hodek M, Petera J, Zoul Z, Vošmik M, Jansa J (2013) Radiotherapy in vulvar cancer treatment. *Ceska Gynekol* 78(3): 257-262.
- Slomovitz BM, Coleman RL (2012) Invasive Cancer of the Vagina. In: *Clinical Gynecologic Oncology*. Di Saia PJ, Creasman WT, Mannel RS, McMeekin DS, Mutch DG, 8. Auflage, Saunders, Elsevier Inc., Philadelphia, USA, S. 245-259.
- Smerage JB, Budd GT, Doyle GV, Brown M, Paoletti C, Muniz M, Miller MC, Repollet MI, Chianese DA, Connelly MC, Terstappen LW, Hayes DF (2013) Monitoring apoptosis and Bcl-2 on circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *Mol Oncol* 7(3): 680-692.
- Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, Tejwani S, Schott AF, O'Rourke MA, Lew DL, Doyle GV, Gralow JR, Livingston RB, Hayes DF (2014) Circulating Tumor Cells and Response to Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol* 32(31): 3483-3489.
- Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, Breit E, Scheunemann P, Heumos I, Pichlmeier U, Schlimok G, Oberneder R, Kollermann MW, Kollermann J, Speicher MR, Pantel K (2002) Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4): 2246-2251.
- Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA (2014) Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 14(9): 611-622.

- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51: 1409-1416.
- Statistisches Bundesamt Todesursachen 2012 nach ICD-10 [Online im Internet] URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html> [Stand: 30.09.2014, 13:17]
- Surveillance, Epidemiology, and End Results at the National Cancer Institute (2014) Cancer Statistics Stat Fact Sheets: Vulvar Cancer. [Online im Internet] URL: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/vulva.html> [Stand: 30.09.2014, 17:05]
- Synnestvedt M, Borgen E, Wist E, Wiedswang G, Weyde K, Risberg T, Kersten C, Mjaaland I, Vindi L, Schirmer C, Nesland JM, Naume B (2012) Disseminated tumor cells as selection marker and monitoring tool for secondary adjuvant treatment in early breast cancer. Descriptive results from an intervention study. *BMC Cancer* 12(1): 616.
- Talmadge JE, Fidler IJ (2010) AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 70(14): 5649-5669.
- Tempfer C, Sliutz G, Haeusler G, Speiser P, Reinthaller A, Breitenecker G, Vavra N, Kainz C (1998) CD44v3 and v6 variant isoform expression correlates with poor prognosis in early-stage vulvar cancer. *Br J Cancer* 78(8): 1091-1094.
- Tempfer C, Gitsch G, Haeusler G, Reinthaller A, Koelbl H, Kainz C (1996a) Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 expression in patients with carcinoma of the vulva. *Cancer* 78(2): 273-277.
- Tempfer C, Gitsch G, Hanzal E, Reinthaller A, Koelbl H, Kainz C (1996b) Expression of the adhesion molecule CD44v3 is a prognostic factor in vulvar carcinoma. *Anticancer Res* 16(4A): 2029-2031.
- Tibbe AG, Miller MC, Terstappen LW (2007) Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry A* 71(3): 154-162.
- Tinhofer I, Saki M, Niehr F, Keilholz U, Budach V (2014) Cancer stem cell characteristics of circulating tumor cells. *Int J Radiat Biol* 90(8): 622-627.
- Todaro GJ, Green H (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17: 299-313.
- Tringler B, Grimm C, Dudek G, Zeillinger R, Tempfer C, Speiser P, Joura E, Reinthaller A, Hefler LA (2007) p16INK4a expression in invasive vulvar squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15(3): 279-283.
- Truini A, Alama A, Dal Bello MG, Coco S, Vanni I, Rijavec E, Genova C, Barletta G, Biello F, Grossi F (2014) Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients by CellSearch System. *Front Oncol* 4: 242.
- Valastyan S, Weinberg RA (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147(2): 275-292.
- Van der Avoort IAM, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JMM, de Hullu JA, de Wilde PCM, Bulten J, Melchers WJG, Massuger LFAG (2006) Vulvar Squamous Cell Carcinoma is a Multifocal Disease Following Two Separate and Independent Pathways. *Int J Gynecol Pathol* 25(1): 22-29.
- Van der Zee AG, Oonk MH, De Hullu JA, Ansink AC, Vergote I, Verheijen RH, Maggioni A, Gaarenstroom KN, Baldwin PJ, Van Dorst EB, Van der Velden J, Hermans RH, van der Putten H, Drouin P, Schneider A, Sluiter WJ (2008) Sentinel node dissection is safe in the treatment of early-stage vulvar cancer. *J Clin Oncol* 26(6):884-889.
- Van Doorn HC, Ansink A, Verhaar-Langereis M, Stalpers L (2006) Neoadjuvant chemoradiation for advanced primary vulvar cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 19(3): CD003752.

- Wagenaar HC, Colombo N, Vergote I, Hoctin-Boes G, Zanetta G, Pecorelli S, Lacave AJ, van Hoesel Q, Cervantes A, Bolis G, Namer M, Lhommé C, Guastalla JP, Nooij MA, Poveda A, Scotto di Palumbo V, Vermorken JB (2001) Bleomycin, methotrexate, and CCNU in locally advanced or recurrent, inoperable, squamous-cell carcinoma of the vulva: an EORTC Gynaecological Cancer Cooperative Group Study. *European Organization for Research and Treatment of Cancer. Gynecol Oncol* 81(3): 348-354.
- Walter CB, Taran FA, Wallwiener M, Rothmund R, Kraemer B, Krawczyk N, Blassl C, Melcher C, Wallwiener D, Fehm T, Hartkopf AD (2014) Prevalence and prognostic value of disseminated tumor cells in primary endometrial, cervical and vulvar cancer patients. *Future Oncol* 10(1): 41-48.
- Weckermann D, Polzer B, Ragg T, Blana A, Schlimok G, Arnholdt H, Bertz S, Harzmann R, Klein CA (2009) Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *J Clin Oncol* 27(10): 1549-1556.
- Weikel W, Moll R, Brumm C, Wilkens C, Knapstein PG (1996) Cytokeratin and vimentin expression in primary and recurrent carcinoma of the vulva: correlations with prognostic factors and the course of disease. *Int J Gynecol Pathol* 15(4): 326-337.
- Weissenstein U, Schumann A, Reif M, Link S, Toffol-Schmidt DU, Heusser P (2012) Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies. *BMC Cancer* 12: 206.
- Wicha MS, Hayes DF (2011) Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J Clin Oncol* 29(12): 1508-1511.
- Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Naume B (2003) Detection of isolated tumor cells in BM from breast-cancer patients: significance of anterior and posterior iliac crest aspirations and the number of mononuclear cells analyzed. *Cytotherapy* 5(1): 40-45.
- Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B (2004) Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 10(16): 5342-5348.
- Woelber L, Eulenburg C, Choschzick M, Kruell A, Petersen C, Giesecking F, Jaenicke F, Mahner S (2012a) Prognostic role of lymph node metastases in vulvar cancer and implications for adjuvant treatment. *Int J Gynecol Cancer* 22(3): 503-508.
- Woelber L, Hess S, Bohlken H, Tennstedt P, Eulenburg C, Simon R, Giesecking F, Jaenicke F, Mahner S, Choschzick M (2012b) EGFR gene copy number increase in vulvar carcinomas is linked with poor clinical outcome. *J Clin Pathol* 65(2): 133-139.
- Wu X, Xin Y, Yao J, Hasui K, Tsuyama S, Yonezawa S, Murata F (2001) Expression of epithelial growth factor receptor and its two ligands, transforming growth factor-alpha and epithelial growth factor, in normal and neoplastic squamous cells in the vulva: an immunohistochemical study. *Med Electron Microsc* 34(3): 179-184.
- Yao D, Dai C, Peng S (2011) Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res* 9(12): 1608-1620.
- Yasumoto K, Osaki T, Watanabe Y, Kato H, Yoshimura T (2003) Prognostic value of cytokeratin-positive cells in the bone marrow and lymph nodes of patients with resected nonsmall cell lung cancer: a multicenter prospective study. *Ann Thorac Surg* 76(1): 194-201.
- Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A (2013) Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials* 34: 8690-8707.
- Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA (2011) Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol* 192(3): 373-382.

- Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F, Madden MW, Donaldson MC, Desai R, Zhu H, Comaills V, Zheng Z, Wittner BS, Stojanov P, Brachtel E, Sgroi D, Kapur R, Shioda T, Ting DT, Ramaswamy S, Getz G, Iafrate AJ, Benes C, Toner M, Maheswaran S, Haber DA (2014) Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 345(6193): 216-220.
- Zach O, Lutz D (2006) Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow. *Curr Opin Oncol* 18(1): 48-56.
- Zhang J, Wang HT, Li BG (2014) Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Small-Cell Lung Cancer Patients: a Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(19): 8429-8433.
- Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, Liu J, Pantel K (2012) Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res* 18(20): 5701-5710.

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schema des Metastasierungsprozesses.

Abbildung 2: Schema der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT).

Abbildung 3: Blutauflagerung mit Ficoll-Paque™ PLUS, Probe vor und nach Dichtegradientenzentrifugation.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der APAAP-Färbung.

Abbildung 5: Fotos eines Zellclusters der Linie MDA-MB-468 nach Immunfluoreszenzdoppelfärbung.

Abbildung 6: Altersstruktur des Patientenkollektivs.

Abbildung 7: Anteil der CTC⁺- und CTC⁻-negativen Fälle nach Diagnosegruppe und gesamt.

Abbildung 8: Zellen der Kategorie „TC“ nach Blutauflagerung über Ficoll-Paque™ PLUS-System und Detektion mit Antizytokeratin-Antikörper A45-B/B3 mittels APAAP-Färbung.

Abbildung 9: Zellen der Kategorie „probable TC“ nach Blutauflagerung über Ficoll-Paque™ PLUS-System und Detektion mit Antizytokeratin-Antikörper A45-B/B3 mittels APAAP-Färbung.

Abbildung 10: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den T-Stadien der TNM-Klassifikation der UICC (7. Auflage 2009).

Abbildung 11: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den N-Stadien der TNM-Klassifikation der UICC (7. Auflage 2009) ohne Unterkategorien.

Abbildung 12: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in der Gruppe der Patientinnen mit und ohne Lymphknotenbefall.

Abbildung 13: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den M-Stadien der TNM-Klassifikation der UICC (7. Auflage 2009).

Abbildung 14: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den FIGO-Stadien (Klassifikation von 2009) ohne Unterkategorien.

Abbildung 15: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den verschiedenen Gewebedifferenzierungsgraden.

Abbildung 16: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in der Gruppe der Patientinnen mit und ohne Lymphgefäßinvasion.

Abbildung 17: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in der Gruppe der Patientinnen mit und ohne Gefäßinvasion.

Abbildung 18: Häufigkeit von CTC⁺- und CTC⁻-Fällen in den Gruppen der Patientinnen mit verschiedenen Begleitdysplasien.

Abbildung 19: Boxplot der Verteilung der (a) Gewebeinvasionstiefe und (b) Tumorgröße in der CTC⁻-Gruppe mit Eintrag der CTC⁺-Fälle.

Abbildung 20: Häufigkeit des Auftretens eines Rezidivs in der CTC⁺- und CTC⁻-Gruppe.

Abbildung 21: Häufigkeit von Todesfällen in der CTC⁺- und CTC⁻-Gruppe.

Abbildung 22: Kaplan-Meier-Analyse des krankheitsspezifischen Überlebens.

Abbildung 23: Häufigkeit des Auftretens von Rezidiven oder Todesfällen in der CTC⁺- und CTC⁻-Gruppe.

Abbildung 24: Elemente nach Blutaufarbeitung über Ficoll-Paque™ PLUS-System und Immunfluoreszenzdoppelfärbung.

10. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms nach aktueller FIGO-Klassifikation von 2009.

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms nach TNM-Klassifikation der UICC (7.Auflage 2011).

Tabelle 3: Literaturübersicht zu EGFR in VSCC.

Tabelle 4: Kriterien für die Evaluation immunzytochemisch gefärbter Zellen nach ISHAGE Working Group (Borgen *et al.* 1999).

Tabelle 5: Fallzahlen und Besonderheiten der in die Untersuchung eingeschlossenen Patientinnen geordnet nach Diagnosen.

Tabelle 6: Übersicht der APAAP-positiven Proben.

Tabelle 7: Anzahl der Immunfluoreszenz-gefärbten und CTC⁺-Fälle geordnet nach Diagnosen.

Tabelle 8: Färbeverhalten der mittels Immunfluoreszenzfärbung detektierten Elemente.

Tabelle 9: Färbeverhalten der mittels Immunfluoreszenzfärbung detektierten Elemente und deren Bewertung.

Tabelle 10: Patientencharakteristika der Fälle mit fraglich positiven Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung.

11. ANHANG

11.1 Materialliste für Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mit dem Ficoll-Paque™ PLUS-System

Reagenzien

Produktbezeichnung	Hersteller
Hanks' Salt Solution	Biochrom AG (Berlin)
Gibco® DPBS (1x)	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare GmbH (München)
Trypanblaulösung 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

Sonstige Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
Polypropylenröhrchen 50 ml	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)
Pasteurpipette 7ml, steril	VWR International GmbH (Darmstadt)
H-Lyse Buffer (10x)	R&D Systems® (Minneapolis, USA)
Nunc® MicroWell® Mini Trays, 72 Well	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Deckgläser 24x32mm	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Objektträger SuperFrost/Plus	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG (Sondheim)
A.dest.	

Geräte

Produktbezeichnung	Hersteller
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Multifuge 3S-R Heraeus	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Zählkammer Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
Lichtmikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Zytozentrifuge Rotofix 32	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)
Zytospinaufhängung 1660	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)
Zytospinrotor 1626	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)
Zytospintrichter 1666	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)
Zytospinvorrichtung 1662	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)

11.2 Verfahrensprotokoll für die Anreicherung von Tumorzellen

1. Blut aus EDTA-Röhrchen in 50ml-Polypropylentubes geben
2. Abhängig von der Blutmenge auf 30-50ml mit gekühlter (4°C) Hanks' Salt Solution auffüllen (je größer das Blutvolumen desto mehr Hanks' Salt Solution)
3. Tubes für 10 Min. bei 4°C mit 1.400U/Min. zentrifugieren
4. Obere zellfreie Schicht mit Pasteurpipette bis auf 7,5–10ml abnehmen
5. Sediment mit auf 4°C gekühltem DPBS auf 30ml auffüllen
6. In ein zweites Tube 20ml gekühltes (4°C) Ficoll-Paque™ PLUS geben
7. Ficoll-Paque™ PLUS-Phase vorsichtig mittels Pasteurpipette mit Zellsuspension überschichten
8. Tubes für 30 Min. bei 4°C mit 1.400U/Min. zentrifugieren. Für diesen Zentrifugationsschritt sind die die Einstellungen für Beschleunigung und Abbremsung auf Stufe 1 umzustellen
9. Überstand und Interphase sofort mit Pasteurpipette abnehmen und in ein weiteres Tube überführen
10. Tubes mit gekühltem DPBS auf 50ml auffüllen
11. Zentrifugation für 10 Min. bei 4°C mit 1400 U/Min.
12. Überstand abgießen, verwerfen und Pellet durch Schwenken des Tubes vorsichtig resuspendieren

Da das Sediment meist Erythrozyten enthält, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt:

13. Lysepuffer im Verhältnis 1:10 mit *A. dest.* verdünnen
14. 1ml davon je Tube zur Zellsuspension geben und 2 Min. schwenken
15. Reaktion durch Auffüllen mit DPBS auf 30ml stoppen
16. Zentrifugation für 10 Min. bei 4°C mit 1.400U/Min.
17. Überstand abgießen, Sediment resuspendieren und abhängig vom Volumen mit gekühltem DPBS verdünnen, sodass 5-20ml Suspension entstehen

Die Berechnung der Zellzahl erfolgt mittels einer Neubauer Zählkammer:

18. Herstellung einer 1:1 Verdünnung mit Trypanblau, welches tote Zelle anfärbt, die in der Auszählung nicht berücksichtigt werden. 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau in Mikrotiterplatte mischen, davon 10µl in eine Kammer der Neubauer Zählkammer pipettieren.
19. Zellen in allen 4 Quadranten auszählen und daraus Durchschnittswert bilden (Sollwert 50-300 Zellen/Quadrant)
20. Berechnung der Zellzahl/ml: Durchschnittswert der Zellen pro Quadrant*2*10⁴. Wegen der 1:1-Verdünnung wird mit dem Faktor 2 multipliziert, anschließend mit dem Faktor 10⁴ um das Volumen der Kammer zu berücksichtigen. Ein Quadrant besitzt eine Fläche von 1mm², die Kammer eine Höhe von 0,1mm. Das Volumen beträgt demnach 0,1mm³ weshalb mit 10 multipliziert wird um 1mm³ bzw. 1µl zu erhalten. Durch die Multiplikation mit dem Faktor 1000 erhält man den Wert pro ml.
21. Berechnung der Gesamtzellzahl: Zellzahl/ml*Volumen der Zellsuspension in ml

Auf jeden Objektträger (OT) wurden etwa 700.000 Zellen aufgetragen.

22. Berechnung der benötigte Menge an Zellsuspension pro Trichter: 700.000/Zellzahl/ml
23. Zellsuspension in Zytokammern pipettieren, der Boden des Trichters soll mit Suspension bedeckt sein
24. Zytokammern in Zytocentrifuge für 3 Min. bei 1.200U/Min. zentrifugieren
25. Überstand abkippen, OT aus Zytokammern nehmen und über Nacht bei RT trocknen lassen
26. Bei nicht direkter Weiterverarbeitung jeweils zwei OT in Aluminiumfolie bei -80°C lagern

11.3 Materialliste APAAP-Färbung

Antikörper

Produktbezeichnung	Hersteller
A45-B/B3 monoclonal mouse IgG1	Micromet AG (München)
1:100 in AB-Serum 10% verdünnt	
IgG1 Isotype Control from murine myeloma clone MOPC 21	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
1:500 in AB-Serum 10% verdünnt	
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins Z0259	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
1:20 in AB-Serum 10% verdünnt	
APAAP, mouse, monoclonal	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
1:100 in AB-Serum 10% verdünnt	

Reagenzien, Puffer und Lösungen

Produktnamebezeichnung	Hersteller
Aceton	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
PBS, pH=7,4	
9g NaCl (0,154M)	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
1,43g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (0,008M)	Merck KGaA (Darmstadt)
0,27g KH ₂ PO ₄ (0,002M)	Merck KGaA (Darmstadt)
1l A.dest.	
AB-Serum 10%	
10ml humanes Serum der Blutgruppe AB	Biotest Medical Diagnostics GmbH (Dreieich)
90ml PBS	
Tris-Pufferlösung (1M), pH 9,5:	
121,14g Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
1l A.dest.	
Levamisol-Lösung (0,625M)	
1,5g Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
10ml A.dest.	
aliquotiert bei -20°C gelagert	
Natriumnitrit-Lösung (0,56M)	
1,16g NaNO ₂	Merck KGaA (Darmstadt)
30ml A.dest.	
aliquotiert bei -20°C gelagert	
Neufuchsin-Lösung 5%	
5g Neufuchsin	Merck KGaA (Darmstadt)
100ml HCl (2M)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert	
Naphtol-AS-BI-Phosphat aliquotiert bei -20°C gelagert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
N,N-Dimethylformamid	Merck KGaA (Darmstadt)
Mayers-Hämalaun-Lösung 1:5	
50 ml Mayers-Hämalaun, filtriert	Merck KGaA (Darmstadt)
250ml A.dest.	
Essigsäure 0,1%	
1ml CH ₃ COOH	Merck KGaA (Darmstadt)
1l A.dest.	

Natriumhydrogencarbonat-Lösung 0,1%	
1g NaHCO ₃	Merck KGaA (Darmstadt)
1l A.dest.	

Sonstiges Verbrauchsmaterial

Produktbezeichnung	Hersteller
Färbekammer	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Filtrierpapier Whatman™	GE Healthcare GmbH (München)
Erlenmeyerkolben DURAN®	SCHOTT AG (Mitterteich)
Dako Pen	Dako Deutschland GmbH (Hamburg)
Glycergel®, Aqueous Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH (Hamburg)
Deckgläser 24x32mm	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Spritze 20ml, steril	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Spitzenvorsatzfilter, steril	VWR International GmbH (Darmstadt)

11.4 Verfahrensprotokoll für den APAAP-Färbevorgang

1. Filtrierpapierstreifen mit *A. dest.* befeuchten und Färbekammern damit auslegen
2. Zellareal auf OT mit Fettstift Dako Pen umkreisen
3. OT in Glasküvetten einsortieren und zur Zellfixierung 5 Min. in Aceton tauchen
4. Zum Waschen Glasküvetten 3 Mal für je 3 Min. in PBS tauchen

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde AB-Serum verwendet:

5. OT in feuchte Kammern einsortieren, auf das Zellareal je 150µl AB-Serum 10% pipettieren und 20 Min. inkubieren
6. AB-Serum 10% abkippen, pro OT 125µl des jeweiligen Primärantikörpers zugeben und 45 Min. inkubieren
7. Primär-AK abkippen und 3 Waschschrte à 3 Minuten mit PBS durchführen
8. OT in feuchte Kammern einsortieren, pro OT 125µl Sekundär-AK zugeben und 30 Min. inkubieren
9. Abkippen der AK und weiterer Waschvorgang mit PBS für 3x3 Min.
10. Auf jeden OT 125µl APAAP-Komplex pipettieren und 30 Min. inkubieren
11. APAAP-Komplex abkippen und weiterer Waschvorgang mit PBS für 3x3 Min.

Währenddessen wurde Substratlösung angefertigt:

12. Lösung 1: 78,8ml *A. dest.* mit 4,2ml Tris-Lösung in Glaskolben mischen und mit 200µl Levamisol versetzen
13. Lösung 2: 415µl NaNO₂ mit 166µl Neufuchsin versetzen und 3 Min. inkubieren
14. Lösung 3: In 500µl Dimethylformamid 42mg Naphtol-AS-BI-Phosphat lösen
15. Lösungen mischen und mittels Spritze mit Vorsatzfilter filtrieren
16. 150µl Substratlösung pro OT auftragen und 20 Min. inkubieren
17. Substratlösung entfernen und weiterer Waschvorgang mit PBS für 3x3 Min.

Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der Gegenfärbung:

18. Eintauchen der Färbegestelle mit den OT in Farbküvetten in folgender Reihenfolge:
 - 15 Sek. Mayers-Hämalaun
 - 1x kurz *A. dest.*
 - 3x kurz Essigsäure 0,1%
 - 3x kurz *A. dest.*
 - 30 ek. Natriumhydrogencarbonat-Lösung 0,1%
19. OT 3x3 Min. in *A. dest.* waschen
20. Zum Eindeckeln jeweils 2 Tropfen von im Wasserbad erwärmten Glycergel® auf Zellareal geben
21. Deckgläser möglichst luftblasenfrei auflegen und vorsichtig andrücken
22. OT mindestens zwölf Stunden bei RT trocknen lassen und bis zur Auswertung bei RT an lichtgeschütztem Ort lagern

11.5 Materialliste Immunfluoreszenzdoppelfärbung

Antikörper

Produktbezeichnung	Hersteller
Monoclonal Mouse Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor, Clone E30	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
Alexa Fluor® 546 rabbit anti-mouse IgG	Molecular probes® life technologies™ (Eugene, USA)
Anti-Pan-Cytokeratin (AE1/AE3) Alexa Fluor® 488	eBioscience (Frankfurt)
Pan-Keratin (C11) Mouse mAb (Alexa Fluor® 488 Conjugate)	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)

Reagenzien, Puffer und Lösungen

Produktbezeichnung	Hersteller
Fixation Solution B	Micromet AG (München)
Gibco® DPBS (1x)	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Protein Block, Serum-Free, Ready-To-Use	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
Dako REAL™ Antibody Diluent	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
Mouse Serum (Normal)	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
VECTASHIELD® Mounting medium for fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, USA)

Sonstiges Ge- und Verbrauchsmaterial

Produktbezeichnung	Hersteller
Färbekammer	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Filtrierpapier Whatman™	GE Healthcare GmbH (München)
Polypropylenröhrchen 15 ml	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)
Eppendorf Safe-Lock Gefäße™ 0,5-2ml	Eppendorf AG (Hamburg)
Deckgläser 24x32mm	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)

Geräte

Produktbezeichnung	Hersteller
Biofuge pico Heraeus	Kendro Laboratory Prodcuts (Hanau)
VORTEX-GENIE2®	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, USA)

11.6 Verfahrensprotokoll für den Immunfluoreszenz-Färbevorgang

1. Filtrierpapierstreifen mit *A. dest.* befeuchten und Färbekammern damit auslegen
2. Zellareal auf OT mit Fettstift Dako Pen umkreisen

Zur Fixierung der Zellen wurde Solution B verwendet:

3. 150µl Solution B in 500µl Eppendorf-Tube 5 Min. bei 13.000U/Min. zentrifugieren, um die zur Konservierung enthaltenen Festpartikel zu sedimentieren
4. 135µl des Überstandes abnehmen, zu 10ml DPBS in Polypropylentube pipettieren und kurz mit Vortexer schütteln
5. Pro OT 150µl zugeben und 10 Min. inkubieren
6. 3 Waschschrte à 3 Min. mit 150µl DPBS pro OT durchführen
7. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen OT mit je 2 Tropfen Proteinblock benetzen und 20 Min. inkubieren
8. EGFR-AK im Verhältnis 1:50 mit Dako REAL™ Diluent verdünnen, 100µl pro OT zugeben und 30 Min. inkubieren
9. 3 Waschschrte à 3 Min. mit 150µl DPBS pro OT durchführen
10. AK Alexa Fluor® 546 1:200 mit Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components verdünnen, pro OT 100µl aufgetragen und 45 Min. inkubieren
11. 3 Waschschrte à 3 Min. mit 150µl DPBS pro OT durchführen
12. Pro OT 100µl von 1:10 mit DPBS verdünntem Mausserum auftragen und 20 Min. inkubieren
13. AK C11 und AE1/AE3 im Verhältnis 1:300 mit Dako REAL™ Diluent verdünnen, 100µl pro OT zugeben und 45 Min. inkubieren
14. 3 Waschschrte à 3 Min. mit 150µl DPBS pro OT durchführen
15. 1 Tropfen DAPI-Medium auf Deckglas geben und vorsichtig mit Pinzette auf OT drücken
16. Bis zur Auswertung der OT diese bei 4°C lichtgeschützt lagern.

11.7 Materialliste Zellkultur

Zelllinien

Name	ATCC®-Nummer
3T3	CRL-2752™
MCF7	HTB-22™
MDA-MB-468	HTB-132™

Kulturmedium, Puffer und Reagenzien

Produktbezeichnung	Hersteller
Kulturmedium	
450ml DMEM High Glucose (4,5g/l) Medium	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
50ml FBS Mycoplex	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
5ml Gibco® L-Glutamine (200mM)	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
5ml Gibco® Pen Strep (Penicillin 10.000Units/ml, Streptomycin 10.000µg/ml)	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Gibco® DPBS (1x)	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Gibco® 0,25% Trypsin-EDTA (1x)	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
DMSO	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)

Sonstiges Verbrauchsmaterial

Produktbezeichnung	Hersteller
Cryo Tubes Nunc® IVF 1,8ml	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
Zellkulturflasche 75	TPP® Techno Plastik Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Polypropylenröhrchen 15-50 ml	Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen)

Geräte

Produktbezeichnung	Hersteller
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)
CO ₂ -Zellkulturinkubator HERAccl® 150	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, USA)
Wasserbad 1002	GFL- Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Inverses Mikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH (Wetzlar)
Multifuge 3S-R Heraeus	Kendro Laboratory Products (Hanau)
VORTEX-GENIE2®	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, USA)

11.8 Verfahrensprotokoll Zellkultur

1. Cryo Tubes im Wasserbad bei 37°C auftauen
2. Zellsuspension in mit 10ml Kulturmedium gefüllte Kulturflasche überführen und am Folgetag Mediumswechsel durchführen, da DMSO toxisch auf Zellen wirkt
3. Kulturflasche im Brutschrank bei 37°C in 10%iger CO₂-Atmosphäre inkubieren
4. Konfluenz der Zellen regelmäßig unter dem Mikroskop prüfen, Medium 2x wöchentlich wechseln oder sobald pH-Farbumschlag von rot zu gelb sichtbar wird

Bei etwa 80% Konfluenz wurden die Zelllinien passagiert:

5. Medium aus Kulturflasche mit Pipette abnehmen
6. Zum Entfernen des übrigen Mediums 5ml DPBS in Kulturflasche geben, diese schwenken und DPBS nach etwa 20 Sek. entfernen
7. 2ml Trypsin-EDTA in Kulturflasche geben und 2-5 Min. im Brutschrank bei 37°C inkubieren, um Adhärenz der Zellen aufzuheben
8. Zum Stoppen des Vorgangs sofort nach Ablösen der Zellen 10ml Kulturmedium zugeben
9. Zellsuspension in Polypropylenröhrchen überführen und 3 Min. bei 1.200U/Min. zentrifugieren
10. Überstand abgießen und abhängig von der Weiterverwendung vorgehen:
 - a) Zur weiteren Kultivierung Pellet mit 10ml Medium resuspendieren und jeweils die Hälfte des Volumens in neue Zellkulturflaschen pipettieren
 - b) Zur Herstellung von Kontroll-OT Pellet mit DPBS resuspendieren
 - c) Zum Einfrieren der Zellen Pellet mit 6ml Medium, versetzt mit 10% DMSO, resuspendieren. Kurz mit Vortexer mischen und je 1,5ml in Cryo Tubes pipettieren. Sofort für 2 Stunden bei -20°C einfrieren und anschließend über Nacht bei -80°C aufbewahren, um die Zellen an die Temperatur zu adaptieren. Die Aufbewahrung erfolgt dann in flüssigem Stickstoff.

11.9 Fragebogen Follow-up



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Institut für Tumorbiologie

Prof. Dr. med. Klaus Pantel
Direktor

Zentrum für Experimentelle
Medizin

Martinistraße 52
20246 Hamburg
Raum 02.7.062.1
Telefon: (040) 7410-53503
Telefax: (040) 7410-55379
izbicki@uke.uni-hamburg.de
www.uke.uni-hamburg.de

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Martinistraße 52 20246 Hamburg
Institut für Tumorbiologie



Ansprechpartner/-in:



Hamburg, 00.00.2013

Bitte per Fax an

oder elektronisch an

Name der Patientin:

Geburtsdatum: _____

Diagnose: Vulvakarzinom

heutiges Datum: _____

1. Lokales Tumorrezidiv? NEIN
 JA, Datum der Diagnosestellung: _____
2. Lymphknotenbefall? NEIN
 JA, Lokalisation: _____ Anzahl? ____
3. Fernmetastasen? NEIN
 JA, Lokalisation: _____
4. Patientin verstorben? NEIN
 JA, wann? _____
5. Tod tumorbedingt? NEIN
 JA
6. Raucherin ? NEIN
 Ja

Herzlichen Dank für Ihre Mühe.

11.10 Charakteristika aller Patientinnen mit VSCC - gesamt und geordnet nach Ergebnissen der APAAP- und Immunfluoreszenzdoppelfärbung

		Vulvakarzinom- fälle	APAAP- Färbung			Immunfluoreszenz- färbung		
		gesamt	CTC+	CTC-	NZB	?CTC+	CTC-	NZB
		46	5	36	5	3	40	3
Unter- gruppierungen Diagnose	Erstdiagnose	34	3	27	4	3	28	3
	Rezidiv	10	2	7	1	-	10	-
	Nachresektion	2	-	2	-	-	2	-
HPV-Nachweis	Negativ	16	2	13 (1)	1	-	15 (1)	1
	Positiv	3	-	2	1	2	1	-
	Unbekannt	27	3	21 (1)	3	1	24 (1)	2
EGFR-Expression	Negativ	18	3	15	-	3	15	-
	Positiv	2	-	2	-	-	2	-
	Unbekannt	26	2	19 (2)	5	-	23 (2)	3
Nikotinkonsum	Nein	28	4	22 (2)	2	1	25 (2)	2
	Ja	9	1	6	2	2	7	-
	Unbekannt	9	-	8	1	-	8	1
T-Stadium	yT0	1	-	1	-	1	-	-
	T1a	2	1	1 (1)	-	-	2 (1)	-
	T1b	30	2	26 (1)	2	2	26 (1)	2
	T2	4	-	2	2	-	3	1
	T3	2	1	1	-	-	2	-
	Unbekannt	7	1	5	1	-	7	-
N-Stadium	N0	22	3	17 (2)	2	2	19 (2)	1
	N1	9	-	7	2	-	8	1
	<i>N1a</i>	5	-	5	-	-	5	-
	<i>N1b</i>	4	-	2	2	-	3	1
	N2	7	-	7	-	1	5	1
	<i>N2a</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N2b</i>	1	-	1	-	-	1	-
	<i>N2c</i>	6	-	6	-	1	4	1
	N3	-	-	-	-	-	-	-
Unbekannt	8	2	5	1	-	8	-	
M-Stadium	M0	43	4	34 (2)	5	2	38 (2)	3
	M1	2	1	1	-	1	1	-
	Unbekannt	1	-	1	-	-	1	-
FIGO- Klassifikation	I	17	3	14 (2)	-	1	16	-
	<i>Ia</i>	2	1	1 (1)	-	-	2 (1)	-
	<i>Ib</i>	15	2	13 (1)	-	1	14 (1)	-
	II	4	-	2	2	-	3	1
	III	15	-	13	2	-	13	2
	<i>IIIa</i>	8	-	7	1	-	8	-
	<i>IIIb</i>	1	-	1	-	-	1	-
	<i>IIIc</i>	2	-	2	-	-	1	1
	<i>IIIx</i>	4	-	3	1	-	3	1
	IV	6	2	4	-	2	4	-
	<i>IVa</i>	4	1	3	-	1	3	-
	<i>IVb</i>	2	1	1	-	1	1	-
	Unbekannt	4	-	3	1	-	4	-

Lymphknotenbefall	Nein	22	3	17 (2)	2	2	19 (2)	1
	Ja	17	1	16	2	1	14	2
	Unbekannt	7	1	3	1	-	7	-
Anzahl befallener Lymphknoten	0	22	3	17 (2)	2	2	19 (2)	1
	1	9	-	8	1	-	9	-
	2	3	-	2	1	-	1	2
	3	2	-	2	-	-	2	-
	4	2	-	2	-	-	2	-
	5	1	-	1	-	1	-	-
	7	1	-	1	-	-	1	-
	Unbekannt	6	2	3	1	-	6	-
Grading	G1	2	-	2	-	-	2	-
	G2	31	4	24 (2)	3	2	28 (2)	1
	G3	10	-	8	2	-	8	2
	Unbekannt	3	1	2	-	1	2	-
Lymphangioinvasion	L0	29	3	22	4	2	25	2
	L1	6	1	5	-	-	6	-
	Unbekannt	11	1	9 (2)	1	1	9 (2)	1
Angioinvasion	V0	33	2	27	4	2	29	2
	V1	2	2	-	-	-	2	-
	Unbekannt	11	1	9 (2)	1	1	9 (2)	1
Rezidiv	Nein	32	3	26 (2)	3	3	27 (2)	2
	Ja	10	-	8	2	-	9	1
	Progress	4	2	2	-	-	4	-
Verstorben	Nein	34	3	27 (2)	4	0	29 (2)	2
	Ja	12	2	9	1	-	11	1
	<i>Tumorbedingt</i>	10	2	7	1	-	9	1
	<i>Andere Ursache</i>	2	-	2	-	-	2	-
Tumor in der Vorgeschichte	Nein	37	4	29 (1)	4	3	31 (1)	3
	Ja	9	1	7 (1)	1	-	9 (1)	-
Durchschnittliche Tumorgroße in mm		36,5	16,5	36,75	43,2	33,5	37,6	27,0
Durchschnittliche Gewebeinvasionstiefe in mm		6,9	5,0	6,9	8,5	11,0	6,7	6,4

In der Spalte „NZZ“ sind die Fälle aufgeführt, in denen die Färbung nicht auswertbar war bzw. bei denen nicht genug Material für die Färbung zur Verfügung stand. In Klammern ist die Anzahl der Patientinnen angegeben, bei denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Nachresektion durchgeführt und kein Tumorgewebe nachgewiesen wurde.

Abk.: APAAP=alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase; CTC= circulating tumour cell(s); EGFR=epidermal growth factor receptor; FIGO= Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique; HPV= humanes Papillomavirus; NZZ= nicht zu bewerten. Symbole: „CTC+“=CTC nachgewiesen; „CTC-“=keine CTC nachgewiesen; „?CTC+“=fragliche CTC; „-“=kein Fall in der Kategorie vorhanden“.

12. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit in verschiedener Weise unterstützt haben, auch wenn im Folgenden nicht alle namentlich genannt werden.

Ich möchte mich bei allen Patientinnen bedanken, die durch Ihr Einverständnis zur Probenentnahme zu Forschungszwecken diese Arbeit ermöglicht haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel für die Bereitschaft zur Umsetzung dieser Arbeit am Institut für Tumorbiologie und für die Begutachtung meiner Dissertation.

Frau Dr. rer. nat. Katharina Harms-Effenberger danke ich dafür, dass sie mir die Möglichkeit einräumte dieses Thema zu bearbeiten und für die ausdauernde Unterstützung und Betreuung.

Großer Dank gilt auch PD Dr. med. Linn Wölber für die gute Zusammenarbeit, für die Ermöglichung des Zugangs zu den klinischen und pathologischen Daten, sowie ihr und den Mitarbeitern der Klinik für Gynäkologie für die Bereitstellung der Proben. Besonders möchte ich mich bei Lis-Femke Griebel bedanken für ihr Engagement und die Zeit die sie aufbrachte, um mir die Arbeit mit der Datenbank zu ermöglichen.

Susanne Hoppe und Sandra Schwentesius danke ich für die Betreuung und Unterstützung bei Aufarbeitung der Blutproben und Durchführung der APAAP-Färbung.

Herzlich bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Corinna Eichelser und Dr. rer. nat. Iris Alpers für die wissenschaftlichen Diskussionen und Beratung bei methodischen Fragen. Für das Korrekturlesen und die konstruktive Kritik danke ich Dr. rer. nat. Corinna Eichelser und Dr. rer. nat. Moritz Beckmann.

Zudem möchte ich mich bei Andrea Großer für die statistische Beratung bedanken.

Ein außerordentlicher Dank gilt Dr. rer. nat. Ivan Calandra, erstens für die Unterstützung bei der Durchführung der statistischen Auswertung, der Erstellung von Graphiken und der Formatierung. Zweitens -und noch bedeutender- war die Geduld, die ihm niemals ausging und mit der er es schaffte mich auch in den schwierigsten Phasen der Arbeit zum Weitermachen zu ermutigen.

13. LEBENSLAUF

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

14. 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Srećko Schmidt', written in a cursive style.