

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Tumorbiologie

Direktor: Prof. Dr. med. K. Pantel

## **Vergleich verschiedener Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Karzinompatienten**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Vivian Butting  
aus Braunschweig

Hamburg 2009

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.04.2010**

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

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

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof.Dr. med. W. Fiedler**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. B. Nshan**

# Inhaltsverzeichnis

## Verzeichnis der Abkürzungen

<b>Fragestellung</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 KM-Aspiration und Untersuchungsmaterial	16
2.2 Beschreibung des Patientenkollektivs	17
2.3 KM-Aufbereitung und Primärscreening	18
2.3.1 KM-Aufbereitung über das OncoQuick®-System	18
2.3.2 KM-Aufbereitung über das Ficoll™-System	21
2.4 Immunzytochemie	26
2.4.1 Charakterisierung der verwendeten Antikörper	26
2.4.2 Spezifitätskontrolle	27
2.4.3 APAAP-Immunzytochemie	28
2.5 Immunfluoreszenzdoppelfärbung	32
2.6 Evaluierung und Kategorisierung der CK-positiven Zellen	36
2.7 Statistische Auswertung	39
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1 Detektion von CK-positiven Zellen nach OncoQuick®-Anreicherung	40
3.1.1 Detektion von DTC	40
3.1.2 Detektion von fraglichen Tumorzellen	41
3.1.3 Detektion von hämatopoetischen und fraglich hämatopoetischen Zellen	42
3.1.4 Detektion von CK-positiven morphologisch den DTC ähnlichen Zellen im KM tumorfreier Patienten	44
3.1.5 Korrelation zwischen dem primären Nachweis von DTC und histopathologischen Parametern	44
3.2 Detektion von CK-positiven Zellen nach Ficoll™-	

Anreicherung	47
3.2.1 Detektion von DTC	47
3.2.2 Detektion von fraglichen Tumorzellen	49
3.2.3 Detektion von hämatopoetischen und fraglich hämatopoetischen Zellen	49
3.2.4 Detektion von CK-positiven morphologisch den DTC ähnlichen Zellen im KM tumorfreier Patienten	52
3.2.5 Korrelation zwischen dem primären Nachweis von DTC und histopathologischen Parametern	52
3.3 Vergleich der OncoQuick <sup>®</sup> -und Ficoll <sup>™</sup> -Anreicherung	55
3.4 Vergleich der mit den Antikörpern A45-B/B3 und AE-1/AE-3 erhobenen Daten	60
3.4.1 Korrelation zwischen dem primären Nachweis von DTC mit dem AE-1/AE-3-Antikörper und histopathologischen Parametern	63
3.5 Detektion von DTC an ausgewählten Fällen über Immun- fluoreszenzdoppelfärbung	64
<b>4. Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1 Vergleich verschiedener Methoden zur Anreicherung und zum Nachweis von DTC	65
4.2 Klinische Relevanz des DTC-Nachweises	70
4.3 Verwendung verschiedener pan-Zytokeratin-Antikörper	74
4.4 Morphologische Beurteilung der DTC	78
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>Danksagung</b>	<b>101</b>

**Lebenslauf** **102**

**Eidesstattliche Erklärung** **103**

## Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACIS	Automated Cellular Imaging System
AJCC	American Joint Comittee on Cancer
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
°C	Grad Celsius
CK	Zytokeratin
CTC	zirkulierende Tumorzelle (circulated tumour cell)
CMV	Zytomegalievirus
chron. kalz.	chronisch kalzifiziert
DFS	disease free survival (rezidivfreies Gesamtüberleben)
DMSF	distant-metastasis free survival (metastasenfreies Gesamtüberleben)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	disseminierte Tumorzelle (disseminated tumor cell)
EMA	epitheliales Membranantigen
et al.	et alii
EpCAM	epithelium specific antigen
Fa.	Firma
G	Grading
HC	hämatopoetische Zelle (hematopoetic cell)
Hrsg.	Herausgeber
I. E.	Internationale Einheit
ISET	Isolation by size of epithelial tumor cells
k. A.	keine Angaben
kDa	kilo Dalton
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
lymph. metast.	lymphogen metastasiert

MEMS	micro electro-mechanical system
min	Minute
ml	Milliliter
mM	(milli) Molar
MNC	mononukleäre Zellen
MRD	minimal residuelle Erkrankung
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NSCLC	non-small-cell-lung-cancer
Nr.	Nummer
OS	overall survival (Gesamtüberleben)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHC	fraglich hämatopoetische Zelle (probable hematopoetic cell)
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenierogenii)
pT	pathologisches Tumorstadium
pN	pathologischer Nodal-(Lymphknoten) Status
pM	pathologischer Fernmetastasenstatus
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real Time Polymerasekettenreaktion
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TAG 12	tumorassoziiertes Protein 12
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
u. a.	unter anderem
U/min	Units/Minute
UIC	fragliche Tumorzelle (uninterpretatable cell)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf (Hamburg)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
( $\mu$ )l	(micro) Liter
%	Prozent

## Fragestellung

Die Zielstellung dieser Arbeit lag darin, die beiden Gradientensysteme OncoQuick® und Ficoll™ hinsichtlich ihrer Effizienz in der Anreicherung von DTC aus dem Kompartiment KM miteinander zu vergleichen. Hierzu wurden Knochenmarkaspirate von 122 Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten (Kolon-, Magen-, Lungen-, Ösophagus-, Pankreas-, Papillenkarcinom) parallel über die beiden Dichtezentrifugationssysteme aufgearbeitet. Anschließend wurden diese Proben durch den Nachweis der Zytokeratinexpression mit der APAAP-Methode immunzytochemisch auf das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen untersucht. Die Auswertung erfolgte mithilfe des ACIS (Automated Cellular Imaging System) der Firma Clariant (Aliso Viejo/USA). Ein weiteres Ziel bestand darin, die beiden in der Immunzytochemie etablierten pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 und AE-1/AE-3 in Bezug auf ihre Sensitivität und Spezifität zu vergleichen. Dafür wurden alle Fälle mit Hilfe von A45-B/B3 analysiert, und an ausgewählten Fällen wurde zusätzlich der pan-Zytokeratin-Antikörper AE-1/AE-3 vergleichend getestet. Nachfolgend wurden die erhobenen Daten kategorisiert. Unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS wurde zunächst eine deskriptive Statistik durchgeführt, für welche sowohl für das Gesamtkollektiv als auch für jede einzelne Tumorentität die Häufigkeitsverteilungen, die Mittelwerte und Prozentwerte bestimmt worden sind.

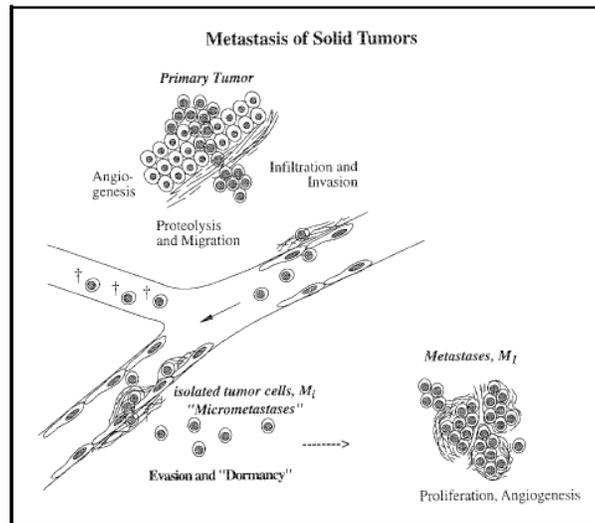
Im Einzelnen wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welche der beiden Methoden zur Anreicherung von Tumorzellen aus KM (Ficoll™ - oder OncoQuick®-Dichtegradientenzentrifugation) ist hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität vorteilhafter und in der Klinik zur Prognosefindung einsetzbar?
2. Können DTC im KM von Patienten, die an einem Bronchial-, Kolon-, Magen-, Ösophagus-, Pankreas- oder Papillenkarcinom erkrankt sind, auch mit dem OncoQuick®-System nachgewiesen werden?
3. Korreliert die Detektion von DTC mit relevanten klinisch-morphologischen Daten?
4. Welcher pan-Zytokeratin-Antikörper eignet sich am besten für den Nachweis von DTC aus humanem KM?

## 1. Einleitung

Solide epitheliale Tumoren, wie Karzinome der Mamma, der Lunge, des Magens, des Kolons, des Ösophagus und des Pankreas stellen die Mehrzahl aller jährlichen Krebsneuerkrankungen dar (Boyle et al., 2004). Diese Karzinome zählen zu den häufigsten krebsbezogenen Todesursachen in den westlichen Industrienationen. Die geschätzte Krebsmortalitätsrate in Deutschland liegt derzeit bei ca. 336.100 Krebsneuerkrankungen pro Jahr auf beide Geschlechter bezogen. Entscheidend für Therapieplanung und Prognose sind die Erfassung des Tumorstadiums und der Ausdehnung des Karzinoms im Gewebe zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, der Lymphknotenstatus und die eventuell bereits vorhandene Fernmetastasierung. Dennoch werden bei vielen Krebspatienten trotz vermeintlich kurativer Resektion (d.h. auf Heilung ausgerichtet) des Primärtumors im späteren Verlauf Tumorrezidive diagnostiziert. Hierbei scheint eine frühzeitige okkulte Tumorzell dissemination einzelner Zellen aus dem Verband eines soliden epithelialen Tumors in das KM oder periphere Blut, auch *minimal residual disease (MRD)* genannt, eine wichtige Rolle zu spielen (Pantel et al., 1993, Pantel et al., 1997). Konventionelle klinische Diagnoseverfahren wie Magnetresonanztomographie, Sonographie oder Röntgendiagnostik können diese disseminierten Tumorzellen (DTC) bisher nicht nachweisen (Schlimok et al., 1987). Nach ihrem Detektionsort werden DTC im KM und CTC im peripheren Blut unterschieden (Pantel et Brakenhoff, 2004; Pantel et al., 2008). In den vergangenen Jahren hat eine rasante technische Entwicklung von eben diesen immunzytochemischen Nachweisverfahren im KM und peripheren Blut auf der Einzel-Zell-Ebene stattgefunden (Pantel et Alix-Panabières, 2007; Pantel et Brakenhoff, 2008; Pantel et al., 2009).

Wie wir bereits wissen, ist die Voraussetzung für die Disseminierung ein Ablauf komplexer Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene. Einzelne Zellen lösen sich demnach aus dem Tumorzellverband und entwickeln die Fähigkeit zu lokal-invasivem Wachstum mit aktiver Penetration kleinerer Blut- und Lymphgefäße (Abbildung 1, Pantel et al., 1999, Pantel et Brakenhoff, 2004). Dieser Prozess ist höchstwahrscheinlich selektiv, die Auslöser für die zellulären Veränderungen, die das Abschilfern sowie das Eindringen in die Blutbahn und ins KM einzelner Zellen fördern, konnten bisher jedoch noch nicht identifiziert werden (Pantel et Brakenhoff, 2004).



**Abbildung 1. Die Metastasierungskaskade solider epithelialer Tumoren.** Proteolyse und Migration fördernde Faktoren begünstigen das Abschilfern einzelner Tumorzellen vom Primärtumor in das umliegende Stroma. Zunächst wird die epitheliale Basalmembran passiert, dann kommt es zur Invasion in kleinere Blutgefäße. Ein sehr geringer Teil der zirkulierenden Tumorzellen schafft es, am Gefäßendothel zu adhären, die Basalmembran zu penetrieren und im umliegenden Gewebe zu einer Fernmetastase zu proliferieren (Pantel et al., 1999).

Durch hoch sensitive und spezifische immunzytochemische Nachweisverfahren ist die Detektion einer einzelnen DTC im KM und CTC im peripheren Blut unter Millionen physiologischer hämatopoetischer Zellen möglich geworden (Mansi et al., 1987; Schlimok et al., 1987; Pantel et al., 1994; Pantel et al., 2008; Pantel et Brakenhoff, 2008). Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass DTC auch aus verschiedenen epithelialen Primärtumoren trotz ihres unterschiedlichen Metastasierungspotentials eine hohe Affinität zum KM besitzen, wodurch dieses Kompartiment für eine mögliche Therapieüberwachung an Bedeutung gewonnen hat (Funke et Schraut, 1998; Pantel et al., 1999; Braun et Pantel, 2000b; Pantel et Brakenhoff, 2004; Zach et al., 2006; Pantel et Alix-Panabières, 2007). Beispielsweise konnten beim Kolon-, beim Pankreas- sowie beim Ösophaguskarzinom ebenfalls DTC im KM nachgewiesen werden (Lindemann et al., 1992; Pantel et al., 1993; Thorban et al., 1996a; Thorban et al., 1996; Weitz et al., 1999; Thorban et al., 2000). Bei diesen Tumorentitäten stellt das KM normalerweise nicht den primären Metastasierungsort dar. Diese Feststellung lässt vermuten, dass das KM als wichtiges Reservoir für DTC

im Zellzyklusstadium G<sub>0</sub> fungiert und eine mögliche Quelle für die spätere Rezirkulation und Metastasierung in andere parenchymatöse Organe sein könnte (Meng et al., 2004; Müller et al., 2005; Pantel et Brakenhoff, 2008). Die Tatsache, dass sowohl DTC als auch CTC Monate bis zum Teil Jahre nach kompletter „Heilung“ detektiert werden können, lässt den Schluss zu, dass diese Zellen möglicherweise befähigt sind, zwischen verschiedenen Kompartimenten zu zirkulieren (Pantel et al., 2008; Pantel et al., 2009).

In verschiedenen prospektiven klinischen Studien, beispielsweise für das Mamma-, das Kolon- oder das Pankreaskarzinom, konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von DTC ein wichtiger, von den üblichen prognostisch relevanten Faktoren unabhängiger Risikomarker für die mittlere Überlebenszeit oder ein rezidivfreies Intervall ist (Schlimok et al., 1990; Schlimok et al., 1990a; Lindemann et al., 1992; Pantel et al., 1993; Pantel et al., 1993a; Braun et Pantel, 1995; Jauch et al., 1996; Thorban et al., 1996; Pantel et al., 1996; Pantel et al., 1997; Thorban et al., 1999; Roder et al., 1999; Pantel et al., 1999; Braun et al., 2000a bis c; Pantel et Otte, 2001; Wiedswang et al., 2003; Müller et Pantel, 2004; Braun et al., 2005).

**Tabelle 1 : Immunzytochemische Studien zur prognostischen Relevanz der DTC im KM (modifiziert nach Pantel et al., 1999, Riethorf et al., 2008).**

Tumortyp	Markerprotein	Detektionsrate (%)	Prognostische Relevanz (Literatur)
Mammakarzinome	EMA, Tag 12 <sup>#</sup>	38/100 (38)	DFS, OS (Mansi, 91)
	CK	18/49 (37)	DFS (Cote, 91)
	EMA*	89/350 (25)	DFS°, OS^ (Harbeck, 94)
	Tag 12	315/727(43)	DFS, OS (Diel, 96)
	pan-CK (A45-B/B3)	199/552 (36)	DMSF, OS (Braun, 00c)
	CK 19	35/59 (60)	DSF (Jung, 03)
	pan-CK (A45-B/B3)	93/621 (15)	OS, DMSF+ (Berois, 03)
	pan-CK (A45-B/B3)	69/265 (26)	OS (Schindlbeck, 05)
	pan-CK (A45-B/B3)	30/228 (13)	DFS, OS (Janni, 05)
	Kolonkarzinome	CK18	28/88 (32)
pan-CK (A45-B/B3)		40/167 (24)	DFS, OS(Leinung, 00)
CK20		42/127 (33)	DFS, OS (Kienle, 03)
CK20		6/37 (16)	OS (Koch, 05)
Bronchialkarzinome	CK18	83/139(60)	DFS (Pantel, 93b)
	CK	17/43 (40)	DFS (Cote, 95)
	CK 18 (CK 2)	84/139 (60)	OS (Passlick, 99)
	CK 18 (CK 2)	27/58 (47)	OS (Sugio, 02)

\*EMA = epithelial membrane antigen; CK = Zytokeratin;

#Tag 12 = tumor associated protein 12;

°DFS = disease free survival; ^OS = overall survival;

+DMSF = distant metastasis-free survival;

Die am besten etablierte Methode für den Nachweis der DTC im KM ist eine immunzytochemische Analyse der MNC-Fraktion nach vorheriger Anreicherung durch bspw. einen Dichtegradienten (Fehm et al., 2006, Pantel et al., 2009). Durch eine derartige immunzytochemische Reaktion mit Bindung von beispielsweise pan-Zytokeratin-Antikörpern an epitheliale Zellen werden die DTC anschließend z.B. mit Hilfe der APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) visualisiert (Pantel et al., 1994; Pantel et al., 1999; Pantel et al., 2009).

Da die DTC nur in sehr geringer Konzentration ( $1 \times 10^5$  bis  $10^6$ ) im KM vorkommen, ist eine direkte Detektion ohne vorherige Anreicherung nur sehr schwer durchführbar. Zur Anreicherung dieser im KM und im Blut vorkommenden DTC stehen derzeit u. a. zwei Dichtegradientensysteme zur Verfügung. Das Ficoll™-Dichtegradientensystem ist seit Jahren zum Nachweis von DTC in Blut und KM etabliert (Fa. Amersham Biosciences, Piscataway/USA). Ursprünglich wurde die Substanz für die

Zellseparation von MNC aus humanem peripher venösem Blut optimiert (*Boyum, 1968*). In der klinischen Hämatologie und Onkologie hat sich Ficoll™ in den letzten Jahren bereits etabliert und zum „Goldstandard“ entwickelt. Zunehmend drängt jedoch auch ein neues System zur Zellseparation für die beiden Medien Blut oder KM auf den Markt. Seit 2000 steht mit dem OncoQuick®-System (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen) ein weiteres Dichtegradientenzentrifugationssystem zur Verfügung. OncoQuick® wurde ebenfalls für die Anreicherung von DTC aus humanem peripher venösem Blut entwickelt. In vergleichenden Studien für die Anreicherung von MNC aus diesem Medium ging hervor, dass OncoQuick® im Gegensatz zu Ficoll™ die Ko-Anreicherung von MNC mit einer hohen „tumor cell recovery rate“ signifikant reduziert (*Rosenberg et al., 2002; Dahm et al., 2003; Gertler et al., 2003*).

Für die Anreicherung von CTC hingegen stehen weitere bspw. auf Mikrofiltern basierende Verfahren, ISET oder MEMS, zur Verfügung (*Naume et al., 1997; Vona et al., 2000; Pinzani et al., 2006; Zheng et al., 2007*). Ferner drängen ebenso Verfahren, wie beispielsweise das Cellsearch™-System, auf den Markt (Fa. Johnson&Johnson, New Brunswick/USA), die ohne vorherige Dichtezentrifugation auf der immunomagnetischen Anreicherung von epithelialen Zellen basieren (*Cristofanilli et al., 2004; Riethdorf et al., 2007*).

Die heute mehr als 20 bekannten Zytokeratine als Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen sind Targets für die immunzytochemische Nachweisreaktion mit Hilfe von pan-Zytokeratin-Antikörpern. Zytokeratine werden von maligne entarteten und nicht entarteten Platten- oder Zylinderepithelzellen, aber gewöhnlich nicht von hämatopoetischen Zellen exprimiert (*Moll et al., 1982; Schlimok, 1988; Pantel et al., 1996*). Der monoklonale pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3, der vorwiegend die Zytokeratinkomponenten 8, 18 und 19 detektiert, konnte in zahlreichen Untersuchungen und Studien für den Nachweis von DTC überzeugen (*Pantel et al., 1994; Pantel et al., 2003; Pantel et Brakenhoff, 2004; Müller et al., 2005; Pantel et al., 2008*). Andere Arbeitsgruppen, die den monoklonalen pan-Zytokeratin-Antikörper AE-1/AE-3 für die Detektion von DTC im KM und peripherem Blut verwendet haben, konnten ebenfalls repräsentative Ergebnisse erzielen (*Wiedswang et al., 2003; Naume et al., 2004*). Dennoch variierte die Detektionsrate der DTC im KM erheblich,

so dass von einer unterschiedlich hohen Spezifität und Sensitivität der einzelnen Nachweisverfahren auszugehen ist (*Riethdorf et al., 2008*).

Ergebnisse bisheriger Studien verdeutlichen, dass es darüber hinaus trotz der hohen Spezifität der standardisierten immunzytochemischen Verfahren gelegentlich zu falsch-positiven Ergebnissen durch hämatopoetische Progenitorzellen kommen kann, die nur sehr schwer von DTC zu unterscheiden sind (*Brugger et al., 1994; Pantel et al., 1994; Borgen et al., 1999; Naume et al., 2004*). Um diese falsch-positiven Zellen von DTC zu separieren, ist eine morphologische Evaluierung und Kategorisierung der detektierten Zellen daher derzeit unumgänglich (*Pantel et al., 1994, Borgen et al., 1999; Naume et al., 2004*). Eine bedeutende Rolle spielen verschiedene zellmorphologische Kriterien, wie beispielsweise die Kern-Plasma-Relation, die Kernmorphologie oder eine zytoplasmatische Mikrovakuolisierung, da eine molekulare Untersuchung von DTC bisher nur in Einzelfällen durchgeführt werden konnte (*Klein et al., 2002; Naume et al., 2004*). Die derzeit gängigste morphologische Kategorisierung unterteilt die DTC in vier Gruppen als Tumorzellen (TC), fragliche Tumorzellen (UIC), hämatopoetische Zellen (HC) und fraglich hämatopoetische Zellen (PHC) (*Naume et al., 2004, Borgen et al., 2006*). Verschiedene Studien zeigten, dass vor allem den DTC und UIC eine prognostische Relevanz beigemessen werden kann (*Pantel et al., 1994; Borgen et al., 1999, Naume et al., 2004; Pantel et Brakenhoff, 2004*).

Neben den immunologischen und zytometrischen Verfahren haben seit einiger Zeit auch moderne hochsensitive molekulare Methoden Einzug in die DTC-Detektionsverfahren gehalten (*Smith et al., 1991; Pantel et Otte, 2000*). Die Methoden basieren auf der molekularen Detektion von DTC über bekannte genetische Alterationen der DNA oder mRNA als auch dem Nachweis der spezifischen Expression z.B. von Zytokeratin-mRNA oder EpCAM-mRNA im Plasma (*Alix-Panabières et al., 2007; Pantel et al., 2008*). Als nachteilig erwies sich jedoch, dass die vorhandenen Zellen weder morphologisch analysiert noch für spätere Analysen isoliert werden können. Ferner konnte keine Aussage über die Vitalität einer Zelle getroffen werden, da die einzelnen isolierten DNA-Fragmente auch in apoptotischen Zellen vorkommen können (*Schwarzenbach et al., 2007; Schwarzenbach et al., 2008*).

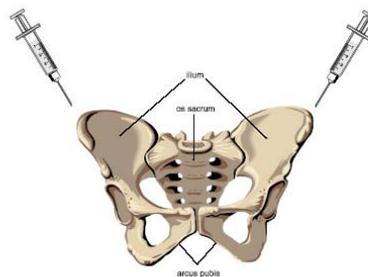
In dieser Arbeit soll ein direkter Vergleich der beiden Dichtegradientensysteme OncoQuick<sup>®</sup> und Ficoll<sup>™</sup> sowie der etablierten pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B-3 und AE-1/AE-3 erfolgen. Ziel ist es einerseits, eine Schlussfolgerung hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität zu ziehen. Andererseits soll untersucht werden, ob eine der beiden Methoden zur Prognosefindung in der Klinik etabliert werden könnte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 KM-Aspiration und Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen wurden an KM-Aspiraten durchgeführt, die in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Visceral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. J. R. Izbicki entnommen wurden. Bei dem klinischem Verdacht auf ein Karzinom, ohne klinischen Anhalt für eine lymphogene oder hämatogene Fernmetastasierung, wurde nach der Intubationsnarkose, aber vor Beginn der Primäroperation, eine Beckenkammpunktion durchgeführt. Für die Materialentnahme wurde zuvor das schriftliche Einverständnis der Patienten zur KM-Aspiration und zur weiteren Verwendung für wissenschaftliche Zwecke eingeholt.

Das Material wurde routinemäßig durch eine KM-Punktion des Beckenkamms im Bereich der Spinae iliacae anteriores superiores unter sterilen Kautelen mit einer Biopsienadel (Gallini medical devices, Ref. No. AM15/43; 15G, 43mm) entnommen und getrennt in 20 ml Spritzen, die mit jeweils 10.000 IE Heparin versetzt waren, abgefüllt. Eine Schnittinzision der Haut am Punktionsort sollte das Kontaminationsrisiko der Probe mit epithelialen Hautzellen verhindern. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend dem bei *Pantel et al. 1994* beschriebenen Protokoll.



**Abbildung 2. Punktionsstellen der KM-Punktion (Pantel et Brakenhoff, 2004)**

## 2.2 Beschreibung des Patientenkollektivs

Bei den Aspiraten handelte es sich um Material von insgesamt 122 Patienten im Alter zwischen 28 und 82 Jahren mit Karzinomen der Lunge (n=7/5,7%), des Magens (n=15/12,3%), des Kolons (n=25/20,5%), des Ösophagus (n=20/16,4%), des Pankreas (n=33/27%) und der Papille (n=8/6,5%). Bei weiteren 14 (11,5%) Patienten konnte postoperativ histopathologisch kein Tumor gesichert werden, obwohl klinisch zunächst der Verdacht bestand.

Im praktischen Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Knochenmarkaspirate der Patienten mit primären Tumoren der oben aufgeführten Entitäten zunächst nach den im Folgenden detailliert beschriebenen Methoden aufgearbeitet. Die rezidierten Tumoren sind am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. med. G. Sauter entsprechend der TNM-Klassifikation histopathologisch klassifiziert worden.

Von den insgesamt 122 untersuchten Patienten waren 90 (74%) Männer und 32 (27%) Frauen. Das Durchschnittsalter der untersuchten Patienten betrug 63,3 Jahre, bei den Frauen 59,2 Jahre und bei den Männern 64,8 Jahre im Einzelnen.

**Tabelle 2. Gesamtkollektiv der Patienten entsprechend der Tumorentitäten**

<b>Tumorentität</b>	<b>Anzahl der Patienten (n=122)</b>	<b>♂</b>	<b>♀</b>
Bronchial	7	6	1
Kolon	25	18	7
Magen	15	11	4
Ösophagus	20	15	5
Pankreas	33	26	7
Papille	8	4	4
Sonstige	14	10	4

## 2.3 KM-Aufbereitung und Primärscreening

### 2.3.1 KM-Aufbereitung über das OncoQuick®-Systems

Das OncoQuick®-Gradientensystem (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen) ist seit 2000 auf dem Markt und dient der Anreicherung von MNC. Diese können aus Vollblut, 15 bis 25 ml antikoaguliertem Blut oder KM gewonnen werden. Durch mehrfach wiederholte Zentrifugations- und Waschschriffe sollen sich die im KM befindlichen Zellen entsprechend ihrer Dichte entlang eines Dichtegradienten anreichern. Durch ein spezifisches Trennmedium und eine poröse Trennscheibe werden die enthaltenen korpuskulären Blut- beziehungsweise KM-Anteile entsprechend ihrer Dichte getrennt. Laut Beschreibung des Herstellers kommt es zur Separation der Zellen mit geringerer Dichte, die unter anderem die Tumorzellen beinhalten. Diese Zellfraktion mit der geringeren Dichte wird in der Interphase des oberen Kompartiments angereichert.

#### Puffer, Waschlösungen

##### **Puffer**

- |                     |                                 |
|---------------------|---------------------------------|
| • Dulbecco's Puffer | Gibco (Gaithersburg/USA)        |
| • OncoQuick®-Puffer | Greiner bio-one (Frickenhausen) |

##### **Waschlösungen**

- |                |                   |
|----------------|-------------------|
| • Hanks-Lösung | Biochrom (Berlin) |
|----------------|-------------------|

#### Knochenmark

- |                    |               |
|--------------------|---------------|
| • Humanknochenmark | UKE (Hamburg) |
|--------------------|---------------|

#### Sonstige Materialien

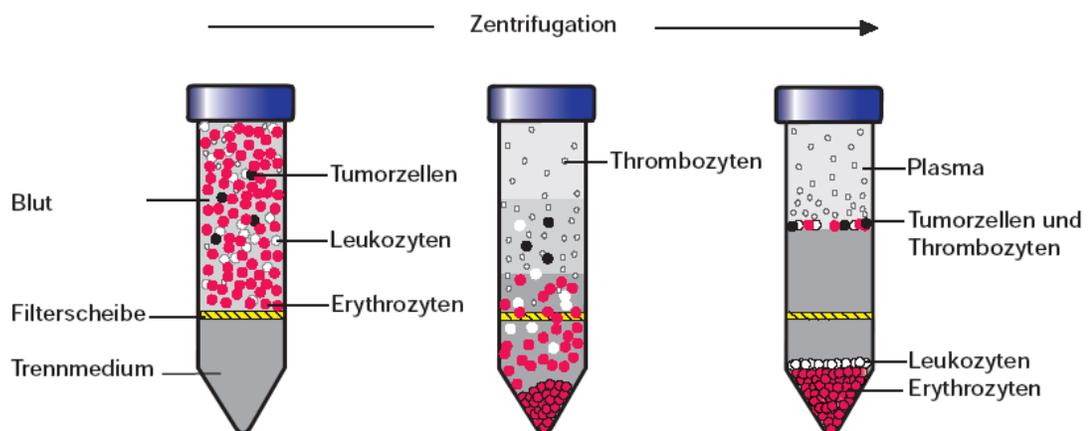
- |                               |                                 |
|-------------------------------|---------------------------------|
| • Falcon®-Röhrchen            | Falcon (Heidelberg)             |
| • OncoQuick®-Röhrchen         | Greiner bio-one (Frickenhausen) |
| • Trypanblaulösung            | Sigma (Missouri/USA)            |
| • Neubauer Zählkammer         | Marienfeld (Lauda-Königshofen)  |
| • SuperFrostPlus-Objektträger | Hecht (Sondheim)                |

## Durchführung der Aufarbeitung mit OncoQuick®

### Arbeitsschritte (alle Schritte unter der Steril-Bank ausführen):

1. Zentrifuge auf 4°C kühlen und Eis vorbereiten
2. OncoQuick®-Röhrchen kurz anzentrifugieren (1 min. bei 1400 U/min)
3. Gekühltes Knochenmark in Falcon®-Röhrchen (50 ml) überführen, Menge bestimmen und auf 30 ml mit Hanks-Puffer® auffüllen, schwenken
4. Für 10 Minuten bei 1400 U/min zentrifugieren
5. Überstand bis auf 10 ml mit einer Pipette abnehmen und auf 20 ml mit PBS-Puffer (Gibco) auffüllen, erneut schwenken
6. 15 bis 25 ml mit einer Pipette entnehmen und vorsichtig in das OncoQuick®-Röhrchen laufen lassen
7. Für 20 Minuten bei 3100 U/min mit langsamem Anlauf und ungebremstem Auslauf erneut zentrifugieren
8. Kompletten Überstand in ein neues Falcon®-Röhrchen (50 ml) überführen und mit OncoQuick®-Puffer auf 50 ml auffüllen, erneut schwenken und für 10 Minuten bei 1400 U/min zentrifugieren
9. Überstand mit einer sterilen Pipette (25 ml) vorsichtig bis auf 5 ml abpipettieren
10. Zellpellet vorsichtig resuspendieren und erneut mit 1x OncoQuick®-Puffer auf 50 ml auffüllen
11. Für 10 Minuten bei 1400 U/min zentrifugieren

12. Überstand mit einer sterilen Pipette bis auf 1 bis 2 ml abpipettieren
13. Zellpellet vorsichtig resuspendieren und das Gesamtvolumen der Suspension bestimmen
14. 10 µl Trypanblau mit 10 µl Zellsuspension mischen und in einer Neubauer-Zählkammer die MNC auszählen, 4 Eckquadrate werden ausgezählt
15. Gesamtzellzahl mit folgender Formel ermitteln:  
Summe der Eckquadrate : 4 x 2 x 10<sup>4</sup> x Volumen
16. Zytospins mit 700.000 Zellen pro Zytospin auf SuperFrostPlus-Objektträgern anfertigen
17. Für 3 Minuten bei 11000 U/min erneut zentrifugieren und anschließend abkippen
18. Zytospins über Nacht trocknen lassen
19. Am nächsten Tag Zytospins färben oder anschließend in Aluminiumfolie Rücken an Rücken einwickeln und bei -80° C lagern



**Abbildung 3. KM-Aufbereitung über OncoQuick® (Greiner bio-one, Gebrauchsanleitung OncoQuick®)**

### 2.3.2 KM-Aufbereitung über das Ficoll™-Systems

Ficoll-Paque™ Plus (Fa. Amersham Biosciences, Piscataway/USA) besteht aus einer Mischung von Ficoll™ PM400 und Natriumdiatrizoat. Ficoll™ PM400 entsteht durch Copolymerisation von Saccharose und Epichlorhydrin. Das Produkt ist für die Zellseparation von MNC aus Vollblut und KM entwickelt worden. Durch wiederholte Wasch- und Zentrifugationsschritte werden bei dieser Methode die Zellen entsprechend ihrer Dichte separiert. Die Dichte von Ficoll-Paque™ Plus beträgt 1,077 g/ml.

#### Puffer, Waschlösungen

##### **Puffer**

- Dulbecco's Puffer Gibco (Gaithersburg/USA)
- H-Lyse Puffer, 1x Konzentrat R&D Systems (Minneapolis/USA)

##### **Waschlösungen**

- Hanks-Lösung Biochrom (Berlin)
- Ficoll-Paque™ Plus Amersham Biosciences (Piscataway/
- Waschpuffer, 1x Konzentrat USA)

#### Knochenmark

Humanknochenmark UKE (Hamburg)

#### Sonstige Materialien

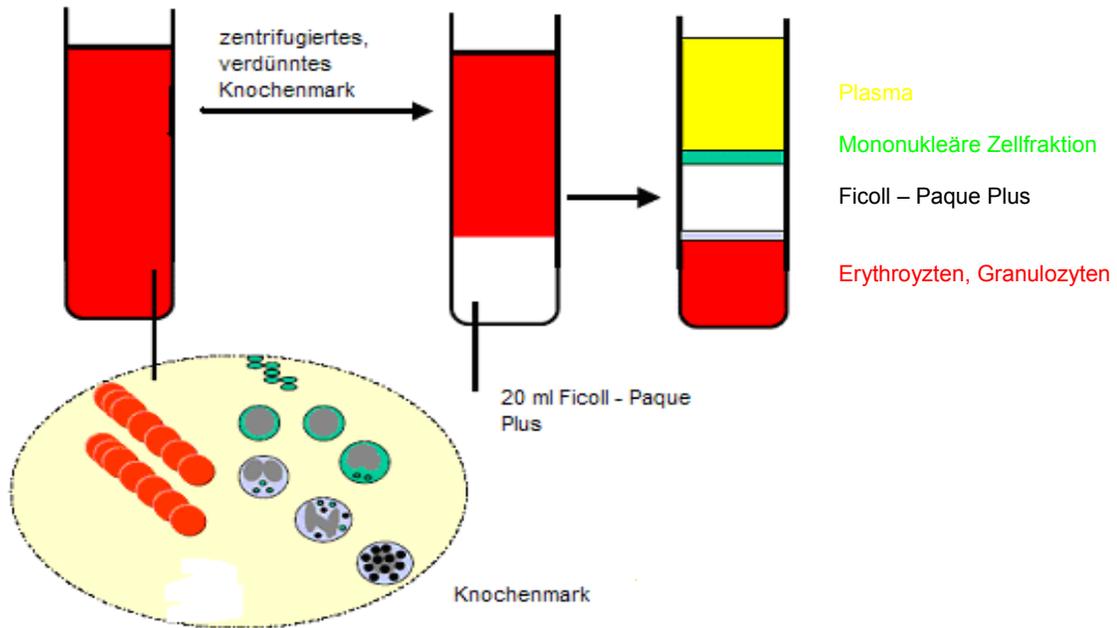
- Falcon®-Röhrchen Falcon (Heidelberg)
- Trypanblaulösung Sigma (Missouri/USA)
- Neubauer Zählkammer Marienfeld (Lauda-Königshofen)
- SuperFrostPlus-Objektträger Hecht (Sondheim)

## Durchführung der Aufarbeitung mit Ficoll™

### Arbeitsschritte (alle Schritte unter der Steril-Bank ausführen):

1. 3 Falcon®-Röhrchen und 1 Cryo-Röhrchen beschriften
2. Knochenmark in Falcon®-Röhrchen geben
3. Knochenmark bei 1400 U/min für 5 Minuten zentrifugieren und 1,5 ml Plasma in Cyro-Röhrchen bei -20 °C einfrieren
4. Falcon®-Röhrchen mit kalter Hanks-Lösung bis 30 ml auffüllen
5. 10 Minuten bei 1400 U/min und 4 °C zentrifugieren
6. Oberen Überstand mit Fettphase bis auf ca. 10 ml abpipettieren, das Sediment mit kaltem PBS-Puffer auf 30 ml auffüllen
7. 20 ml Ficoll-Paque™ Plus in ein Falcon®-Röhrchen geben und mit dem verdünnten Knochenmark vorsichtig überschichten
8. 30 Minuten bei 1400 U/min und 4 °C ohne Bremse zentrifugieren
9. Überstand und Interphase in ein neues Falcon®-Röhrchen sofort abpipettieren und bis 50 ml mit PBS-Puffer auffüllen
10. 10 Minuten bei 1400 U/min und 4 °C zentrifugieren
11. Überstand abgießen
12. Weist das Sediment deutlich Erythrozyten auf, eine Erythrozytenlyse mit dem „Whole Blood Erythrocyte Lysing Kit“ durchführen

13. 1 ml H-Lyse Buffer 1x Konzentrat zum Sediment hinzufügen und das Röhrchen für 3 Minuten auf den Rollenmischer legen
14. 50 ml Ficoll-Paque™ Plus-Waschpuffer 1x Konzentrat auffüllen und 10 Minuten bei 1400 U/min. zentrifugieren
15. Waschpuffer abgießen und mit PBS-Puffer auf ca. 10 ml auffüllen
16. 10 µl Suspension und 10 µl Trypanblaulösung in einer Mikrotiterplatte mischen und in einer Neubauerzählkammer 4 Quadrate auszählen und Mittelwert ermitteln (Sollwert je Quadrat 50-300 Zellen!)
17. Gesamtzellzahl = Konzentration x Volumen (ml)
18. Ist die Zellzahl zu hoch, Suspension mit PBS-Puffer verdünnen
19. Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen herstellen und 12 SuperFrostPlus-Objektträger mit je 700.000 Zellen anfertigen
20. Für 3 Minuten bei 11000 U/min erneut zentrifugieren und anschließend abkippen
21. 6 SuperFrostPlus-Objektträger über Nacht trocknen, anschließend färben
22. Die restlichen 6 SuperFrostPlus-Objektträger über Nacht trocknen, anschließend in Aluminiumfolie Rücken an Rücken einwickeln und bei  $-80^\circ \text{C}$  lagern

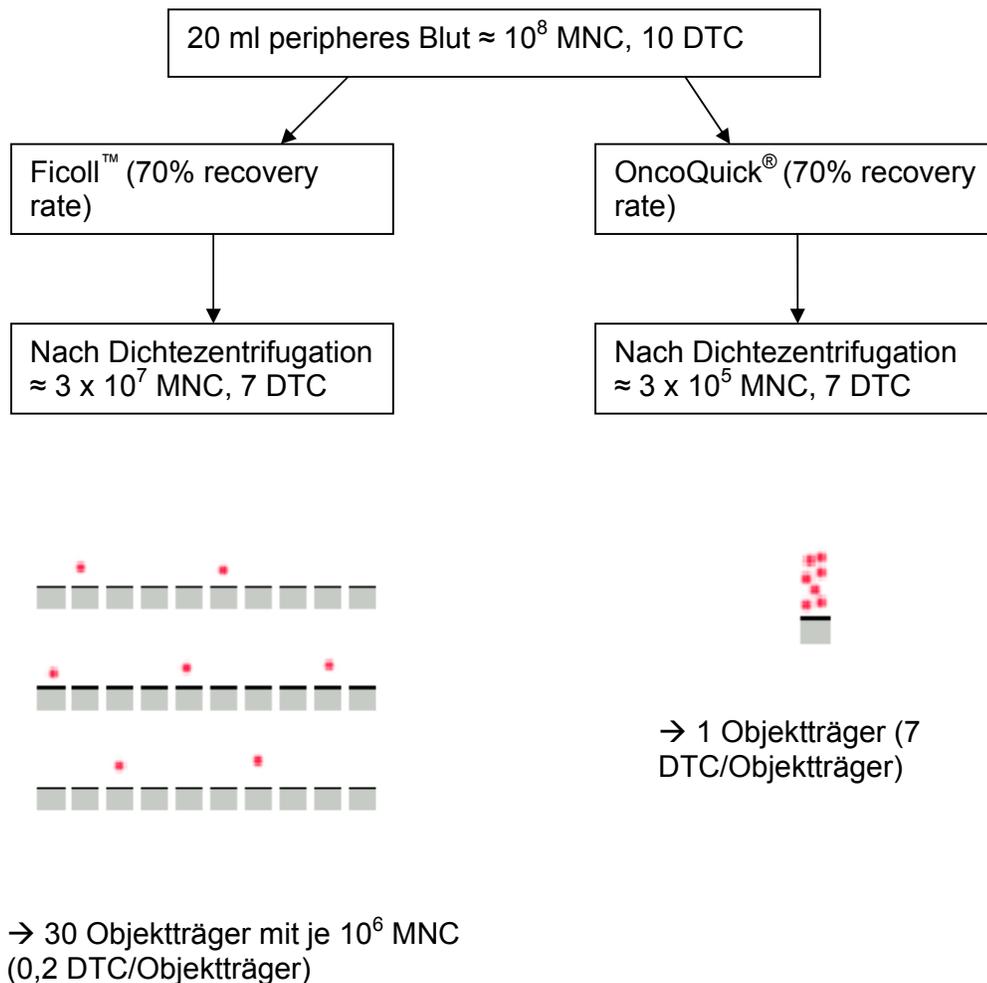


**Abbildung 4. KM-Aufbereitung über Ficoll™**

Nach Anreicherung der MNC mit Hilfe des OncoQuick®-Systems stehen ein bis drei Objektträger mit je 700.000 MNC für die Immunzytochemie mit A45-B/B-3 und der Isotypkontrolle zur Verfügung. Nach Anreicherung mit Ficoll™ liegen mindestens 12 Objektträger mit jeweils 700.000 MNC vor, wovon zunächst je drei Objektträger mit A45-B/B-3 und der Isotypkontrolle immunzytochemisch untersucht werden. Die übrigen sechs Objektträger werden für weitere Untersuchungen bei – 80 °C gelagert. Der Vorteil von OncoQuick® besteht laut Herstellerangaben darin, dass nach Anreicherung der MNC erheblich weniger Objektträger zur Auswertung benötigt werden und dass die angereicherte Dichte von DTC auf einem Objektträger dementsprechend viel höher sein soll. Daher soll der Aufwand für die Auswertung erheblich zeit- und kostengünstiger sein.

Ein Vergleich der beiden Aufbereitungen ist in Abbildung 5 dargestellt.

## Ficoll™ vs. OncoQuick®



**Abbildung 5. Vergleich von OncoQuick® und Ficoll™ nach der Anreicherung.** 20 ml Blut beinhalten nach Dichtezentrifugation  $10^8$  MNC und 10 DTC). Bei der Verwendung von Ficoll™ und einer angenommenen Detektionsrate von 70% setzt sich die zu untersuchende Zellfraktion aus  $3 \times 10^7$  MNC und sieben DTC zusammen. Folglich benötigt man 30 Objektträger, um alle sieben DTC zu detektieren. Im Vergleich hierzu beträgt die Gesamtanzahl von MNC  $3 \times 10^5$  und sieben DTC bei einer ebenfalls angenommenen Detektionsrate von 70% für OncoQuick®. Dementsprechend muss nur ein Objektträger, auf dem alle DTC vorhanden sind, ausgewertet werden (modifiziert nach [www.hexal-gentech.de](http://www.hexal-gentech.de)).

## 2.4 Immunzytochemie

### 2.4.1 Charakterisierung der verwendeten Antikörper

Zytokeratine gehören zu den Intermediärfilamenten, die Bestandteile des epithelialen Zytoskeletts sind und ein den Kern umspannendes, dichtes Netzwerk sowohl in normalen als auch in malignen epithelialen Zellen bilden. Entsprechend ihrer Zusammensetzung aus spezifischen Polypeptiduntereinheiten werden sie in fünf Klassen, bestehend aus neun Gruppen, unterteilt. Die Zytokeratine gehören zu den Klassen I und II und stellen eine komplexe, multigene Proteinfamilie dar. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 40 und 68 kDa. Aufgrund ihrer Eigenschaften werden sie in saure und neutral-basische Zytokeratine eingeteilt. Heute sind inzwischen mehr als 20 verschiedene Zytokeratine bekannt, die vorwiegend in Plattenepithelien oder Zylinderepithelien exprimiert werden (*Moll, 1982*). Mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die gegen die epithelialen Zytokeratine gerichtet sind, ist es möglich, freie epitheliale Tumorzellen oder kleine Tumorzellaggregate in mesenchymalen Organen zu identifizieren, die mit konventionellen Diagnosemethoden nicht detektierbar sind (*Pantel et al., 1994; von Knebel Doeberitz et al., 1996*).

Bei den von uns verwendeten Antikörpern handelt es sich im Einzelnen um die Folgenden:

1. A45-B/B3 (Fa. Micromet, München) ist ein aufgereinigter Maus-monoklonaler pan-Zytokeratin-Antikörper, der zur Immunglobulinklasse IgG<sub>1</sub> gehört. Vorwiegend werden von diesem Antikörper die Zytoskelettkomponenten CK 8, 18, 19 detektiert. Die Antikörperkonzentration beträgt 2 µg/ml, das entspricht einer verwendeten Verdünnung von 1:100.
2. AE-1/AE-3 (Fa. LOXO, Dossen) ist ebenfalls ein aufgereinigter Maus-monoklonaler pan-Zytokeratin-Antikörper zugehörig zur Immunglobulinklasse IgG<sub>1</sub>. Dieser Antikörper detektiert vorwiegend die Zytoskelettkomponenten CK 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 19. Die Antikörperkonzentration beträgt 2 µg/ml, das entspricht einer verwendeten Verdünnung von 1:100.
3. MOPC-21 (Fa. Sigma, Missouri/USA) ist ein muriner Immunglobulin-Isotyp aus Mausmyelom IgG<sub>1</sub>, welches keine humanen Epitope IgA, IgM, IgG<sub>2b</sub> und IgG<sub>3</sub>

erkennt. Daher wird es als Isotypkontrolle für die durchgeführte APAAP-Immunzytochemie und Immunfluoreszenzdoppelfärbungen verwendet. Die Antikörperkonzentration beträgt 1 mg/ml, das entspricht einer verwendeten Verdünnung von 1:500.

4. Anti-Human Ki67-Antigen (Fa. Dako, Glostrup/Dänemark), Klon MIB-1, wird als Referenz monoklonaler Maus-Antikörper für die Demonstration von Ki67-Antigen in der Immunzytochemie verwendet. MIB-1 gehört zu der Immunglobulinklasse IgG<sub>1</sub>, kappa. Die Antikörperkonzentration beträgt 80 mg/l, das entspricht einer verwendeten Verdünnung von 1:100.

5. A45-B/B3 direkt markiert mit Fluorchrom Cy3-Mono-NHS (Fa. Mircomet, München) detektiert überwiegend die Zytoskelettkomponenten CK 8, 18, 19. Der Antikörper gehört zur Immunglobulinklasse IgG<sub>1</sub> und ist ebenfalls ein monoklonaler Maus-pan-Zytokeratin-Antikörper. Die verwendete Antikörperkonzentration beträgt 2 µg/ml, das entspricht einer verwendeten Verdünnung von 1:50.

#### **2.4.2 Spezifitätskontrolle**

Der Erfolg des immunzytochemischen Nachweises von DTC im KM hängt entscheidend von der Spezifität der verwendeten Antikörper ab. Daher wurden zusätzlich zur Immunzytochemie Spezifitätskontrollen mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Als Isotypkontrolle wurde Maus IgG<sub>1κ</sub> Immunglobulin, Klon MOPC-21 (Fa. Sigma, Deisenhofen), verwendet. Die Haptenbindungsspezifität wurde nicht bestimmt. Die verwendete Konzentration betrug 1:500 (1 mg/ml). Für die als Negativkontrolle dienenden Objektträger wurden NIH/3T3-Zellen (3 bis 5x10<sup>3</sup> Zellen), murine Mausfibroblasten, zusammen mit MCF-7-Zellen (1x10<sup>3</sup> Zellen) zentrifugiert und anschließend als Zytospin aufgetragen und verwendet. Bei den MCF-7-Zellen handelte es sich um humane Mammakarzinomzellen mit bekannter Zytokeratinpositivität. Auf die Weise konnten positive und negative Färberesultate verifiziert werden.

Eine Probe wurde als positiv gewertet, wenn eine CK-positive Zelle detektiert wurde und diese den morphologischen Kriterien einer DTC (*siehe ab S. 35*) entsprach. Wenn in der Isotypkontrolle CK-positive, den DTC morphologisch ähnliche Zellen, detektiert worden sind, wurde dieser Fall von uns als falsch positiv gewertet und wurde in die weitere Auswertung nicht miteinbezogen.



## **Gegenfärbung**

- Meyers Hämalaun Merck (Darmstadt)
- 0,1 % HOAC (Essigsäure 100%) Merck (Darmstadt)
- 0,1 % NaHCO<sub>3</sub> Merck (Darmstadt)

## Antikörper und Seren

- AB-Serum Biotest (Dreieich)
- APAAP, D 0651 Dako (Glostrup/Dänemark)
- Rabbit Anti-Mouse Z 0259 Dako (Glostrup/Dänemark)
- Humanknochenmark UKE (Hamburg)
- Monoklonaler Maus-Antikörper A45-B/B3 Micromet AG (München)
- Monoklonaler Maus-Antikörper AE1/AE3 LOXO (Dossenheim)
- Maus IgG1<sub>κ</sub> (MOPC-21) Sigma (Missouri/USA)

## Verdünnung der Antikörper und Seren

- AB-Serum: 1:10 mit PBS
- 10 x PBS: 1:10 mit Aqua dest.
- A45-B/B3 (0,2 mg/ml bis 2 mg/ml variiert je nach Charge): 1:100 mit 10 % AB/PBS-Serum
- MOPC-21 (1 mg/ml): 1:500 mit 10% AB/PBS-Serum
- Z 0259: 1:20 mit 10% AB/PBS-Serum
- APAAP: 1:100 mit 10% AB/PBS-Serum

Arbeitsschritte (Alle Inkubationsschritte bei Zimmertemperatur, in einer feuchten Kammer und mit Arbeitsschutzausrüstung durchführen):

1. Objektträger etwa 30 Minuten zunächst bei Zimmertemperatur lagern
2. Objektträger beschriften und die Zellareale mit Dako-Pen umkreisen
3. Für 5 Minuten in Aceton fixieren, dann 3 x 3 Minuten in PBS spülen
4. 150 µl 10%ige AB/PBS-Lösung auf jeden Zytospin pipettieren und 20 Minuten inkubieren
5. Lösung abkippen und sofort je 3 Objektträger mit 100 µl Primärantikörper A45/B-3 oder AE-1/AE-3 und 100 µl MOPC-21 beschichten und 45 Minuten inkubieren
6. Zytospins 3 x 3 Minuten in PBS waschen, A45/B-3 bzw. AE-1/AE-3 und MOPC-21 getrennt waschen
7. Mit 100 µl Z 0259 beschichten und für 30 Minuten erneut inkubieren
8. Zytospins 3 x 3 Minuten in PBS waschen und mit 100 µl APAAP-Komplex beschichten und für 30 Minuten inkubieren
9. Während der Inkubation die Substratlösung frisch ansetzen
10. Zytospins 3 x 3 Minuten in PBS waschen und mit 150 µl Substrat für 20 Minuten erneut inkubieren
11. Zytospins 3 x 3 Minuten in PBS waschen und mit Hämatoxylin 20 Sekunden gegenfärben
12. 1 x kurz in H<sub>2</sub>O dest. tauchen

13. 3 bis 4 x in 0,1% HOAC tauchen

14. 3 bis 4 x in H<sub>2</sub>O dest. tauchen

15. 30 Sekunden in 0,1% NaHCO<sub>3</sub> tauchen und anschließend die Zytospins 3 x 3 Minuten in PBS waschen

16. Objektträger mit Glyzergel / Mounting medium und Eindeckgläschen versiegeln

## 2.5 Immunfluoreszenzdoppelfärbung

An speziell ausgewählten Fällen wurden weitere Untersuchungen mittels einer Immunfluoreszenzzytochemie unter Verwendung des Proliferationsmarkers Ki67 durchgeführt. Hierfür wurden Zellen verwendet, welche über Ficoll™ aufgearbeitet und separiert worden sind. Nach Aufarbeitung mit der OncoQuick®-Methode stand nicht genügend separiertes Zellmaterial für weitere Untersuchungen zu Verfügung, so dass die Immunfluoreszenzzytochemie lediglich anhand von Ficoll™-Proben durchgeführt werden konnte.

### Chemikalien

Dako Pen	Dako (Glostrup/Dänemark)
Solution B (Epimet)	Baxter (Deerfield/USA)

### Puffer, Verdünnungsmedien und Farblösungen

#### **1 x TBST, pH: 7,6**

181,65 g Tris	
262,98 g NaCl	Baker (Deventer/Holland)
auf 2,5 l entioniertem Wasser	
+ 15 g Tween 20	Merck (Darmstadt)
+ ca. 170 ml 5% HCl	Merck (Darmstadt)
auf 3 l auffüllen	

#### **1 x PBS, pH : 7,4**

1,2 mM	NaOH	Baker (Deventer/Holland)
3,0 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck (Darmstadt)
7,0 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck (Darmstadt)
150 mM	NaCl	Baker (Deventer/Holland)

- Dulbecco's Puffer
  - Verdünnungsmedium grün (S2022)
  - Verdünnungsmedium weiss (S3022)
- |  |                          |
|--|--------------------------|
|  | Gibco (Gaithersburg/USA) |
|  | Dako (Glostrup/Dänemark) |
|  | Dako (Glostrup/Dänemark) |

- Protein-Blocking (X0909) Dako (Glostrup/Dänemark)

### **Gegenfärbung**

Vectashield<sup>®</sup> Mounting medium with DAPI Vector (Burlingame/USA)

### Antikörper

- Monoklonaler Maus-Antikörper Ki67 Dako (Glostrup/Dänemark)
- Maus IgG1<sub>κ</sub> (MOPC-21) Sigma (Missouri/USA)
- Monoklonaler Maus-Antikörper A45-B/B3  
direkt markiert mit Fluorchrom Cy3 Micromet (München)
- Monoklonaler Kaninchen-Antikörper  
Alexa Fluor 488 MoBiTec (Göttingen)

### Verdünnung der Antikörper

- 10 x TBST: 1:10 mit Aqua dest.
- 10 x PBS: 1:10 mit Aqua dest.
- Ki-67 (80 mg/l): 1:50 mit Dako Verdünnungsmedium grün (S2022)
- MOPC-21 (1 mg/ml): 1:5 mit Dako Verdünnungsmedium grün (S2022)
- Alexa Fluor 488 (2 mg/ml): 1:200 mit Dako Verdünnungsmedium weiß (S3022)
- A45-B/B3 direkt markiert mit Fluorchrom Cy3 (0,303 mg/ml): 1:300 mit Dako Verdünnungsmedium grün (S2022)

Arbeitsschritte (Alle Inkubationsschritte bei Zimmertemperatur in einer schwarzen, feuchten Kammer und mit Arbeitsschutzausrüstung durchführen):

1. Objektträger etwa 30 Minuten bei Zimmertemperatur akklimatisieren lassen
2. Objektträger beschriften und die Zellareale mit Dako-Pen umkreisen
3. 1 ml Solution B bei 1300 U/min. zentrifugieren
4. 135 µl (Überstand der Solution B) und 10 ml PBS-Puffer mischen
5. Zytospins mit der Lösung für 15 Minuten fixieren
6. Zytospins 2 x 3 Minuten in TBST waschen
7. 2 bis 3 Tropfen Protein-Blocking auf die Zytospins auftragen und für 20 Minuten inkubieren
8. Protein-Blocking abkippen und sofort 3 Objektträger mit 100 µl Ki67 und 1 Objektträger mit 100 µl MOPC-21 beschichten und 30 Minuten inkubieren
9. Zytospins 3 x 3 Minuten in TBST waschen
10. Folgende Arbeitsschritte in dunkler Umgebung durchführen: alle Objektträger mit 100 µl Alexa Fluor 488 für 45 Minuten inkubieren
11. Zytospins erneut 3 x 3 Minuten in TBST waschen
12. 2 bis 3 Tropfen Protein-Blocking auf die Zytospins auftragen und für 20 Minuten inkubieren

13. Lösung abkippen und sofort alle Objektträger mit 100 µl A45-B/B3 direkt markiertem Cy3 für 45 Minuten inkubieren
  
14. Zytospins 2 x 3 Minuten in TBST waschen und in PBS überführen, mit DAPI gegenfärben

## 2.6 Evaluierung und Kategorisierung der CK-positiven Zellen

Die immunzytochemische Detektion von DTC im KM von Karzinompatienten ist von entscheidender prognostischer Relevanz (*Pantel et Brakenhoff, 2004; Pantel et al., 2008*). Zuweilen werden aber auch andere Zellgruppen, höchstwahrscheinlich Progenitorzellen der Erythropoese und Granulopoese, von der APAAP -Methode aufgrund von Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper detektiert (*Pantel et al., 1994*). Eine morphologische Evaluierung verbessert die Spezifität der Detektion von DTC, um falsch-positive Zellen so gut wie möglich ausschließen zu können. Daher wurden die detektierten CK-positiven Zellen anhand morphologischer Kriterien kategorisiert und vier Gruppen zugeordnet. Dieser Einteilung zugrundeliegende Kriterien wurden nach Naume und Borgen et al. modifiziert und angewendet (*Borgen et al., 1999; Naume et al., 2004; Borgen et al., 2006*).

- a) Immunhistochemisch mit dem entsprechenden pan-Zytokeratin-Antikörper positive Tumorzelle (DTC, disseminated tumor cell)
- b) Immunhistochemisch mit dem entsprechenden pan-Zytokeratin-Antikörper positive fragliche Tumorzelle (UIC, uninterpretable cell)
- c) Immunhistochemisch mit dem entsprechenden pan-Zytokeratin-Antikörper positive hämatopoetische Zelle (HC, hematopoetic cell)
- d) Immunhistochemisch mit dem entsprechenden pan-Zytokeratin-Antikörper positive unklar hämatopoetische Zelle (PHC, probable hematopoetic cell).

### a) Disseminierte Tumorzellen (DTC)

Dieser Gruppe wurden Zellen zugeordnet, die optisch eine hohe Kern-Plasma-Relation, einen homogen basophilen und nahezu runden Kern haben. Häufig sind Tumorzellen auch größer als hämatopoetische Zellen. Allerdings trifft dieses Kriterium nur bedingt zu, da sowohl kleinzellige Karzinome als auch Stamm- und Progenitorzellen teilweise eine tumorzellähnliche Größe aufweisen können.



**Abbildung 6. DTC im KM-Aspirat**

**b) Fragliche Tumorzellen (UIC)**

Als fragliche Tumorzelle wurden die Zellen kategorisiert, deren Kern und Zytoplasma nicht eindeutig morphologisch abgrenzbar waren. In diese Kategorie fielen auch defekte, tumorzellähnliche Zellen.



**Abbildung 7. UIC im KM-Aspirat**

**c) Hämatopoetische Zellen (HC)**

Die Zellen dieses Zelltypus haben eine niedrigere Kern-Plasma-Relation als DTC. Der Kern ist meist exzentrisch gelegen. Diese Zellen besitzen häufig Zytoplasmaausläufer sowie eine zytoplasmatische Mikrovakuolisierung. Im Allgemeinen ist das Zytoplasma verhältnismäßig schwach gefärbt.



**Abbildung 8. HC im KM-Aspirat**

#### **d) Unklar hämatopoetische Zellen (PHC)**

Diese Zellen erfüllen morphologische Kriterien der unklar hämatopoetischen Zellen, wie beispielsweise eine schwache Färbung oder einen exzentrisch gelegenen Kern. Diese Zellen sind morphologisch eindeutig intakt, vom Erscheinungsbild jedoch sehr heterogen und nicht eindeutig kategorisierbar.



**Abbildung 9. PHC im KM-Aspirat**

Die Verwendung der hier beschriebenen morphologischen Kriterien sollte jedoch kritisch betrachtet werden, da es sich lediglich um morphologische Parameter handelt. Eine genetische Identifikation der detektierten Zellen durch molekulare Marker würde sicherlich präzisere Ergebnisse erbringen.

Im Folgenden werden die beiden Gruppen HC und PHC zusammen abgehandelt, da sie sich morphologisch sehr ähneln und die möglicherweise maligne Komponente den als TC und UIC beschriebenen Zelltypen zugeordnet wird (*Naume et al., 2004; Borgen et al., 2006*).

## 2.7 Statistische Auswertung

Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 122 Patienten, die präoperativ nach Einleitung der Primärnarkose einer KM-Punktion aus dem Beckenkamm zugeführt worden sind. Die entnommenen Aspiate wurden dann parallel über OncoQuick® und Ficoll™ aufgearbeitet, und die separierten Zellsuspensionen wurden anschließend immunzytochemisch mit der APAAP-Methode verarbeitet. Zusätzlich wurden die pathohistologischen Daten dieser Patienten erfasst. Die erhobenen pseudonymisierten Patientendaten sind zunächst in Excel-Dateien überführt worden. Die statistische Auswertung erfolgte anschließend mit der Statistiksoftware 'Statistical Package for the Social Sciences 11.0' (SPSS Inc., Chicago, USA), in das die vorbereiteten Excel-Dateien überführt worden sind. Die Einteilung der Tumorstadien wurde gemäß der TMN-Klassifikation des AJCC (American Joint Committee on Cancer) am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. med. G. Sauter durchgeführt. Die Signifikanzprüfung zwischen kategorialen Variablen wurde mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Detektion von CK-positiven Zellen nach OncoQuick®-Anreicherung**

Von den 122 KM-Aspiraten, die über OncoQuick® aufgearbeitet worden sind, konnten 72 (59%) ausgewertet werden. In 38 Fällen ergab die immunzytochemische Analyse aufgrund einer sehr geringen Zellzahl auf den Objektträgern keine auswertbaren Ergebnisse. In weiteren sechs Fällen war zu wenig Aspiratmaterial vorhanden, um genügend Ausgangsmaterial für die immunzytochemische Analyse zur Verfügung zu haben, und in sechs Fällen erwies sich das OncoQuick®-Röhrchen während der Zentrifugationsschritte als defekt, so dass ein großer Teil der Zellen verloren ging und eine Auswertung nicht möglich war.

##### **3.1.1 Detektion von DTC**

Bei sieben (10%) von insgesamt 72 auszuwertenden Patientenproben ließen sich Zellen, die die Kriterien für DTC erfüllten, zum Zeitpunkt der Primärdiagnose im KM nachweisen. Es handelte sich um sieben männliche Patienten, von denen zwei an einem Pankreaskarzinom und vier Patienten an einem Papillenkarzinom erkrankt waren. In einem weiteren Fall handelte es sich um eine chronische Pankreatitis, wie sich später anhand des Operationsresektates histopathologisch feststellen ließ.

Im KM von sechs der sieben Patienten konnte jeweils eine DTC detektiert werden. In einem Fall konnten insgesamt 17 DTC im KM gefunden werden. Bei diesem Patienten entsprachen in der Isotypkontrolle darüber hinaus zwei Zellen unseren zytomorphologischen Kriterien einer HC. Dieser Patient war an einem duktalem Adenokarzinom der Papilla Vateri erkrankt, welches häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird. In den Isotypkontrollen der anderen sechs Patienten wurden keine weiteren Zellen detektiert.

**Tabelle 3. Detektion von DTC nach OncoQuick®-Separation**

Geschlecht	Tumorentität	Histologie	OncoQuick® (DTC)	OncoQuick® (Isotypkontrolle)
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	1	unauffällig
m	Pankreas	neuroendokrines Karzinom	1	unauffällig
m	Papille	duktales Adenokarzinom	1	unauffällig
m	Papille	mukoid-muzinös Adenokarzinom	1	unauffällig
m	Papille	duktales Adenokarzinom	1	unauffällig
m	Papille	duktales Adenokarzinom	17	2 HC
m		chron. Pankreatitis	1	unauffällig



**Abbildung 10 und 11. DTC im KM-Aspirat nach OncoQuick®-Separation**

### 3.1.2 Detektion von fraglichen Tumorzellen (UIC)

In zwei (3%) der insgesamt 72 auswertbaren Knochenmarkproben konnten UIC gefunden werden. In beiden Fällen handelte es sich um ein Karzinom der Papilla Vateri. In einem Fall konnte eine UIC und in dem anderen Fall fünf UIC nachgewiesen werden. Die nachweislichen fünf UIC fanden sich im KM des Patienten, in dem bereits 17 DTC detektiert worden sind. Die Isotypkontrollen waren unauffällig.



**Abbildung 12. UIC im KM-Aspirat nach OncoQuick®-Separation**

### **3.1.3 Detektion von hämatopoetischen (HC) und fraglich hämatopoetischen Zellen (PHC)**

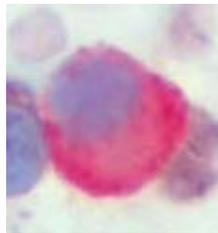
Zwei PHC ließen sich lediglich in einem Knochenmarkaspirat (1,4%) nachweisen. Bei dem Tumor handelte es sich um ein duktales Adenokarzinom der Papilla Vateri. Dieses Aspirat stammte erneut von dem Patienten, bei dem bereits 17 DTC sowie fünf UIC detektiert worden sind. Die Isotypkontrolle war unauffällig.

Bei 17 (24%) von 72 Patienten konnten HC im KM nachgewiesen werden. Zwölf der 17 Patienten waren Männer und fünf waren Frauen. Zwei (3%) der 17 Patienten waren an einem Bronchialkarzinom, ein (1,4%) Patient an einem Magenkarzinom, drei (4%) Patienten an kolorektalen Karzinomen, vier (5,6%) Patienten an einem Ösophaguskarzinom und jeweils drei (4%) Patienten an einem Pankreas- bzw. Papillenkarzinom erkrankt. In zwei Fällen der Pankreaskarzinome handelte es sich um bereits lymphogen metastasierte neuroendokrine Tumoren.

Im Durchschnitt konnten pro Aspirat drei HC detektiert werden. In einem Fall konnten 13 HC Zellen nachgewiesen werden. In diesem Aspirat waren ebenfalls 17 DTC, zwei PHC und fünf UIC detektiert worden.

**Tabelle 4. Detektion von HC nach OncoQuick®-Separation**

Geschlecht	Tumorentität	Histologie	OncoQuick® (HC)
m	Bronchial	Plattenepithelkarzinom	2
m	Bronchial	k.A.	1
m	Magen	Adenokarzinom	2
w	Kolon	Adenokarzinom	1
w	Kolon	Adenokarzinom	1
w	Kolon	k.A.	2
m	Ösophagus	Adenokarzinom	8
m	Ösophagus	Adenokarzinom	3
w	Ösophagus	Adenokarzinom	1
m	Ösophagus	Adenokarzinom	2
m	Pankreas	Adenokarzinom	3
m	Pankreas	k.A.	2
m	Pankreas	lymph. metast., neuroendokrines Karzinom	7
w	Pankreas	lymph. metast., neuroendokrines Karzinom	1
m	Papille	mukoid-muzinöses Adenokarzinom	3
w	Papille	duktales Adenokarzinom	4
m	Papille	duktales Adenokarzinom	13



**Abbildung 13 und 14. HC im KM-Aspirat nach OncoQuick®-Separation**

### **3.1.4 Detektion CK-positiver morphologisch den DTC ähnlichen Zellen im KM tumorfreier Patienten**

Gesondert erwähnt werden muss ein Fall eines Patienten, bei dem eine DTC im KM detektiert worden ist, der aber zum Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme an einer chronischen Pankreatitis litt. Diese Diagnose ging aus dem histopathologischen Befund des befundenen Pathologen hervor. In der dazugehörigen Isotypkontrolle wurden keine weiteren Zellen detektiert.

### **3.1.5 Korrelation zwischen dem primären Nachweis von DTC und histopathologischen Parametern**

Bei sieben (10%) der insgesamt auswertbaren 72 Knochenmarkproben konnten immunzytochemisch DTC nachgewiesen werden. Dieses Kollektiv bestand ausschließlich aus männlichen Patienten im Alter von 47 bis 74 Jahren (Median: 59 Jahre).

Bei 65 (90%) der untersuchten Personen des Gesamtkollektivs ließen sich keine den morphologischen Kriterien nach zu urteilende DTC nachweisen. Unter diesen Patienten befanden sich 27 Frauen und 38 Männer im Alter zwischen 28 und 82 Jahren (Mittelwert: 64 Jahre).

Da sich häufig erst intraoperativ das lokale Tumorstadium und eine mögliche Operabilität herausstellten, konnte nicht in allen Fällen die TNM-Klassifikation angewendet werden. Die TNM-Klassifikation kann sowohl durch den Pathologen am OP-Präparat mit dem Präfix p als auch durch den Kliniker mit dem Präfix c anhand festgelegter Kriterien definiert werden. In vielen metastasierten Fällen kann häufig keine Angaben zu dem lokalen Ausbreitungsmuster T (Tumorstadium) erfolgen. Hier spricht dann der in der Klinik tätige Arzt von einem Stadium IV (lokal fortgeschritten und lymphogen oder hämatogen metastasiert) oder beim Bronchialkarzinom vom sogenannten extensive disease.

Bei unserem untersuchten Patientenkollektiv konnten in zwei der sieben Fälle Angaben zu der lokalen Tumorausbreitung gemacht. Hierbei handelte es sich um lokal begrenzte Tumoren (pT 1 und 2). Eine lymphogene oder hämatogene Fernmetastasierung bestand bei diesen beiden Patienten zum Zeitpunkt der Operation

nicht. Bei den restlichen Patienten geht aus den vorliegenden Unterlagen hervor, dass sich Befunde intraoperativ als nicht resektabel mit beispielsweise einer Infiltration in die Mesenterialwurzel oder lokaler peritonealer Karzinose herausstellten. Demnach fand hier keine Einteilung entsprechend der TNM-Klassifikation der Pathologen statt. Klinisch handelte es sich um fortgeschrittene Stadien, die nicht weiter entsprechend der TNM-Klassifikation differenziert wurden. Als Differenzierungsgrad wurde überwiegend ein Grading von 2 bis 3 genannt. Dies entspricht einer mäßig bis schlechten Differenzierung.

Wie bereits beschrieben, konnten in einem Fall 17 DTC in dem über OncoQuick® aufgearbeiteten Knochenmarkaspirat eines Patienten mit Papillenkarzinom nachgewiesen werden. Bei diesem Patient stellte der befundene Pathologe folgende Klassifikation auf: pT2 pN1 G2. Es handelte sich somit um ein lymphogen metastasiertes duktales Papillenkarzinom.

**Tabelle 5. Patientencharakteristika in Abhängigkeit des Nachweises von DTC**

	<b>DTC vorhandenen</b>	<b>keine DTC vorhanden</b>
<b>Anzahl der Patienten</b>	7	65
<b>Geschlecht</b>		
männlich	7	38
weiblich	0	27
<b>Altersmittelwert</b>	59	64
<b>Tumorgroße</b>		
pT1	1	6
pT2 - pT4	1	36
keine Angaben	5	23
<b>Lymphknotenmetastasen</b>		
pN0	1	19
pN1 - pN3	1	22
keine Angaben	5	24
<b>Fernmetastasen</b>		
p oder cM0	2	0
p oder cM1	0	5
keine Angaben	5	60
<b>Grading</b>		
G1		1
G1 - G2		0
G2	2	23
G2 - G3	1	4
G3		12
keine Angaben	4	25
<b>Tumorentität</b>		
Bronchialkarzinom	0	4
Magenkarzinom	0	5
Ösophaguskarzinom	0	13
Kolonkarzinom	0	18
Pankreaskarzinom	2	15
Papillenkarzinom	4	1
Sonstige	1	9

### **3.2 Detektion von CK-positiven Zellen nach Ficoll™-Anreicherung**

Von den insgesamt 122 KM-Aspiraten, die mit Ficoll™ aufgearbeitet worden sind, konnten insgesamt 112 (92%) ausgewertet werden. Drei Proben waren, bedingt durch eine zu hohe Zelldichte auf den Objektträgern, nicht auswertbar. In sieben weiteren Fällen war kein beziehungsweise zu wenig Material nach Aspiration für die Anwendung von Ficoll™ vorhanden.

#### **3.2.1 Detektion von DTC**

Bei 12 (11%) von insgesamt 112 auswertbaren Patientenproben ließen sich zum Zeitpunkt der Primärdiagnose DTC im KM nachweisen. Es handelt sich um Aspireate von neun Patienten und drei Patientinnen. Von den männlichen Patienten waren zwei Patienten an einem Magenkarzinom, zwei an einem kolorektalen Karzinom, zwei an Ösophaguskarzinom und drei weitere Patienten an einem Pankreaskarzinom erkrankt. Eines der kolorektalen Karzinome war zum Zeitpunkt der Knochenmarkbiopsie bereits lymphogen metastasiert. In diesem Fall handelte es sich um eine Rezidivkrankung. Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt des Nachweises der DTC jeweils in einem Fall an einem Pankreaskarzinom, einem Papillenkarzinom und einer Zytomegalie-Kolitis (CMV) erkrankt. In den Aspiraten konnte in 10 von 12 Fällen jeweils eine DTC detektiert werden. In zwei weiteren Fällen konnten je einmal zwei und einmal drei DTC nachgewiesen werden. Die meisten DTC konnten im KM der Patientin detektiert werden, die an einer CMV-Kolitis erkrankt. In fünf der 12 parallel durchgeführten Isotypkontrollen konnten wir in unterschiedlicher Anzahl HC sowie in einem Fall eine UIC nachweisen. Insgesamt fanden sich in den Isotypkontrollen nach Aufarbeitung mit Ficoll™ im Vergleich zu OncoQuick® vermehrt HC.

**Tabelle 6. Detektion von DTC nach Ficoll™-Separation**

Geschlecht	Tumorentität	Histologie	Ficoll™ (DTC)	Ficoll™ (Isotypkontrolle)
m	Magen	mukoid-muzinöses Karzinom	1	7 HC, 1 UTC
m	Magen	Adenokarzinom	1	unauffällig
m	Kolon	Adenokarzinom	1	3 HC
m	Kolon	Adenokarzinom	1	unauffällig
m	Ösophagus	Adenokarzinom	1	unauffällig
m	Ösophagus	Adenokarzinom	2	unauffällig
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	1	22 HC
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	1	unauffällig
w	Pankreas	duktales Adenokarzinom	1	1 HC
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	1	unauffällig
w	Papille	pseudopapilläres Karzinom	1	unauffällig
w		CMV-Kolitis	3	3 HC



**Abbildung 15 und 16. DTC im KM-Aspirat nach Ficoll™-Separation**

### 3.2.2 Detektion von fraglichen Tumorzellen (UIC)

Bei sechs (5,3%) von insgesamt 112 Patienten konnten UIC im KM detektiert werden. Das KM stammte von drei Patienten und drei Patientinnen. In vier von sechs Knochenmarkaspiraten wurde je eine UIC detektiert. Im KM eines Patienten, der an einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas erkrankt war, wurden drei UIC detektiert. Vier UIC wurden im KM einer Patientin gefunden, in deren Operationspräparat eine CMV-Kolitis nachgewiesen worden war. In einem Fall mit einer UIC stellte sich postoperativ das Operationspräparat als ein chronisch entzündlicher Prozess im Sinne einer Cholangitis heraus.

**Tabelle 7. Detektion von UIC nach Ficoll™-Separation**

Geschlecht	Tumorentität	Histologie	Ficoll™ (UIC)
m	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	1
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	3
w	Pankreas	duktales Adenokarzinom	1
w	Papille	Adenokarzinom	1
m		Cholangitis	1
w		CMV-Kolitis	4

### 3.2.3 Detektion von hämatopoetischen (HC) und fraglich hämatopoetischen Zellen (PHC)

In vier (3,5%) von 112 auswertbaren Knochenmarkproben konnten PHC gefunden werden. Es handelte sich um Proben von drei Patienten und einer Patientin. In zwei von vier Fällen konnte je eine PHC detektiert werden. Im KM eines Patienten, der an einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus erkrankt war, wurden drei PHC detektiert. Bei einer Patientin, die an einem Adenokarzinom der Papilla Vateri erkrankt war, konnten zwei PHC im Knochenmarkaspirat nachgewiesen werden.

**Tabelle 8. Detektion von PHC nach Ficoll™-Separation**

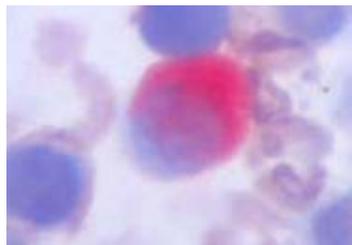
Geschlecht	Tumorentität	Histologie	Ficoll™ (PHC)
m	Kolon	muzinöses Adenokarzinom	1
m	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	3
m	Pankreas	Adenokarzinom	1
w	Papille	Adenokarzinom	2

In 48 (42,8%) von 112 Knochenmarkaspiraten konnten HC nachgewiesen werden. Im Durchschnitt wurden sechs HC pro Patient gefunden. In Einzelfällen wurden mehr als 10 Zellen detektiert, in einem Fall wurden sogar 35 HC nachgewiesen. Von den insgesamt 48 Patienten mit HC im KM waren zwei (1,8%) an einem Bronchialkarzinom, acht (7,1%) an einem Magenkarzinom, sechs (5,3%) an einem kolorektalen Karzinom, sieben (6,3%) an einem Ösophaguskarzinom, 13 (11,6%) an einem Pankreaskarzinom und drei (2,7%) Patienten an einem Papillenkarzinom erkrankt. In acht (7%) weiteren Fällen konnten ebenfalls HC im KM nachgewiesen werden. Die Operationsresektate dieser acht Patienten wurden später histopathologisch als tumorfrei diagnostiziert. In vier (50%) von den acht tumorfreien Fällen handelte es sich um entzündliche Läsionen wie beispielsweise um eine Pankreatitis.

**Tabelle 9. Detektion von HC nach Ficoll™-Separation**

Geschlecht	Tumorentität	Histologie	Ficoll™ (HC)
m	Bronchial	k.A.	2
m	Bronchial	Plattenepithelkarzinom	5
m	Kolon	Adenokarzinom	1
m	Kolon	Adenokarzinom	1
m	Kolon	Adenokarzinom	1
m	Kolon	Adenokarzinom	1
m	Kolon	Adenokarzinom	5
w	Kolon	Adenokarzinom	2
w	Magen	siegelringzelliges Karzinom	3
w	Magen	siegelringzelliges Karzinom	5
m	Magen	Adenokarzinom	9
w	Magen	Adenokarzinom	16
w	Magen	Adenokarzinom	32
m	Magen	Adenokarzinom	6
m	Magen	Adenokarzinom	4

w	Magen	mukoid-muzinöses Adenokarzinom	2
w	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	1
m	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	6
m	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	4
m	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	1
m	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	3
m	Ösophagus	Adenokarzinom	2
m	Ösophagus	Adenokarzinom	26
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	10
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	2
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	35
w	Pankreas	duktales Adenokarzinom	1
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	1
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	1
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom.	1
w	Pankreas	lymph. metast. neuroendokrines Karzinom	1
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom,	6
m	Pankreas	muzinöses Adenokarzinom	1
m	Pankreas	Adenokarzinom (Lebermetastasen)	7
m	Pankreas	intraduktales papillär-muzinöses Adenokarzinom	5
m	Pankreas	Adenokarzinom	2
m	Papille	mukoid-muzinöses Adenokarzinom	13
m	Papille	Adenokarzinom	7
w	Papille	Adenokarzinom	1
w	Papille	Adenokarzinom	3
m		Cholangitis	18
m		chron. Pankreatitis	1
m		tumorfrees Resektat	2
m		Leberverfettung	8
m		chron. kalz. Pankreatitis	3
w		CMV-Kolitis	1
m		tumorfrees Resektat	10
m		duktale Hyperplasie des Pankreas	2



**Abbildung 17. HC im KM-Aspirat nach Ficoll™-Separation**

### **3.2.4 Detektion CK-positiver morphologisch den DTC ähnlichen Zellen im KM tumorfreier Patienten**

Interessanterweise konnten wir in dem KM einer tumorfreien Patientin, welches über Ficoll™ aufgearbeitet worden ist, drei Zellen, die die Kriterien von DTC erfüllten, nachweisen. Aus dem histopathologischen Befund konnten wir später entnehmen, dass es sich bei dieser Patientin um eine CMV-Kolitis des Darmes gehandelt hat. In der Isotypkontrolle konnten wir drei HC detektieren.

### **3.2.5 Korrelation zwischen dem primären Nachweis von DTC und histopathologischen Parametern**

Bei 12 (11%) der insgesamt auswertbaren 112 Knochenmarksproben konnten immunzytochemisch DTC nachgewiesen werden. Dieses Kollektiv besteht aus neun männlichen und zwei weiblichen Patienten im Alter von 28 bis 75 Jahren (Mittelwert: 63 Jahre).

Bei 100 (89,3%) der untersuchten Personen des Gesamtkollektivs ließen sich keine DTC nachweisen. Unter diesen Patienten befanden sich 27 Frauen und 73 Männer im Alter zwischen 28 und 82 Jahren (Median: 64 Jahre).

Bei den Tumoren, bei denen wir DTC im KM nachweisen konnten, handelte es sich fast ausnahmslos um Karzinome drüsigen Ursprunges unterschiedlicher histologischer Untergruppierungen. Sie waren zum Teil noch lokal begrenzt oder hatten bereits auf benachbarte Organe übergreifen (pT4). Des Weiteren wiesen einige der untersuchten Tumoren bereits eine lymphogene Metastasierung mit oder ohne bereits stattgefundene hämatogene Fernmetastasierung auf. Die histologische Differenzierung war mit hoch- bis niedrigdifferenzierten Formen sehr variabel. In einem Fall handelte es sich bereits um das Rezidiv eines Kolonkarzinoms. Bei diesem Patienten waren bereits ein Prostata- sowie ein Harnblasenkarzinom in der Eigenanamnese bekannt. Bei dem Patienten, der an einem Magenkarzinom mit der TMN-Klassifikation pT3 pN0 pM0 erkrankt war, handelte es sich ebenfalls um ein Lokalrezidiv. Ferner wurde 2003 ein Plattenepithelkarzinom der Lunge, lokal nicht fortgeschritten, in kurativer Intention operiert. In dem Fall der Patientin mit einem Pankreaskarzinom, wo histologisch Lebermetastasen (pM1) nachgewiesen werden

konnten, ist aus der Vorgeschichte ein lokal nicht fortgeschrittenes und ebenfalls kurativ operiertes Kolonkarzinom bekannt. Bei dem Patienten mit der TMN-Klassifikation pT3 pN1 pM1, histopathologisch ein Pankreaskarzinom, wurde 2007 ein Prostatakarzinom nachgewiesen, welches auch kurativ resiziert wurde. Lediglich bei zwei Patienten wurde keine TNM-Klassifikation aus den klinischen Unterlagen übermittelt.

**Tabelle 10. Korrelation zwischen dem primären Nachweis von DTC und den histopathologischen Parametern**

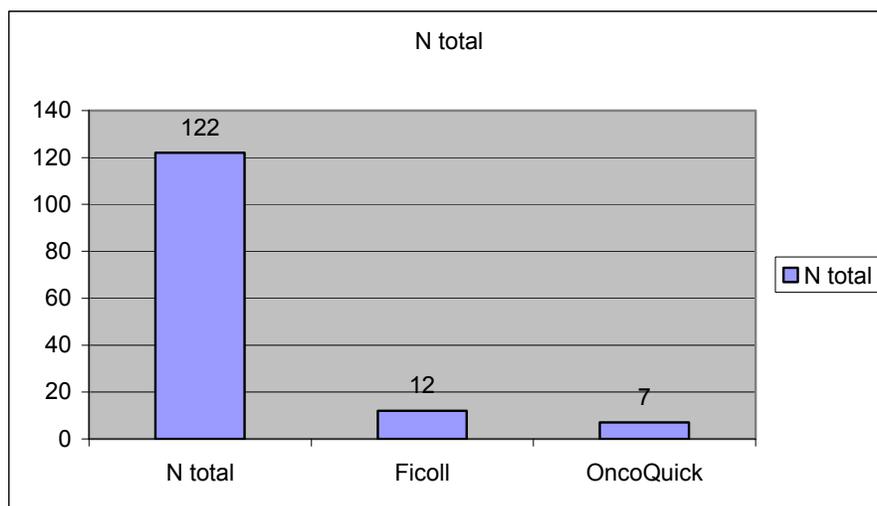
Geschlecht	Tumorentität	histologischer Typ	pT	pN	pM	Grading	Rezidiv
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	3	1	1	1	
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	k.A.	k.A.	1	k.A.	
w	Pankreas	duktales Adenokarzinom	k.A.	k.A.	1	k.A.	
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	3	1	0	k.A.	
w	Papille	solid-pseudopapilläres Karzinom	3	0	0	1	
m	Kolon	Adenokarzinom	4	0	0	2	ja
m	Kolon	Adenokarzinom	1	2	0	2	
m	Ösophagus	Adenokarzinom	1	1	0	3	
m	Ösophagus	Adenokarzinom	3	1	0	3	
m	Magen	mukoid-muzinöses Karzinom	3	0	0	3	ja
m	Magen	Adenokarzinom	1	0	0	2	
w		CMV-Kolitis					

**Tabelle 11. Patientencharakteristika in Abhängigkeit des Nachweises von DTC**

	<b>DTC vorhanden</b>	<b>DTC nicht vorhanden</b>
<b>Anzahl der Patienten</b>	12	100
<b>Geschlecht</b>		
männlich	9	73
weiblich	3	27
<b>Altersmittelwert</b>	63	64
<b>Tumorgröße</b>		
pT1	3	10
pT2 - pT4	6	48
keine Angaben	3	42
<b>Lymphknotenmetastasen</b>		
pN0	5	26
pN1 - pN3	5	37
keine Angaben	2	37
<b>Fernmetastasen</b>		
p oder cM0		0
p oder cM1	3	10
keine Angaben	9	90
<b>Grading</b>		
G1	2	1
G1 - G2	0	1
G2	3	25
G2 - G3	0	1
G3	3	23
keine Angaben	4	49
<b>Tumorentität</b>		
Bronchialkarzinom	0	5
Magenkarzinom	2	14
Ösophaguskarzinom	2	17
Kolonkarzinom	2	22
Pankreaskarzinom	4	23
Papillenkarzinom	1	6
Sonstige	1	13

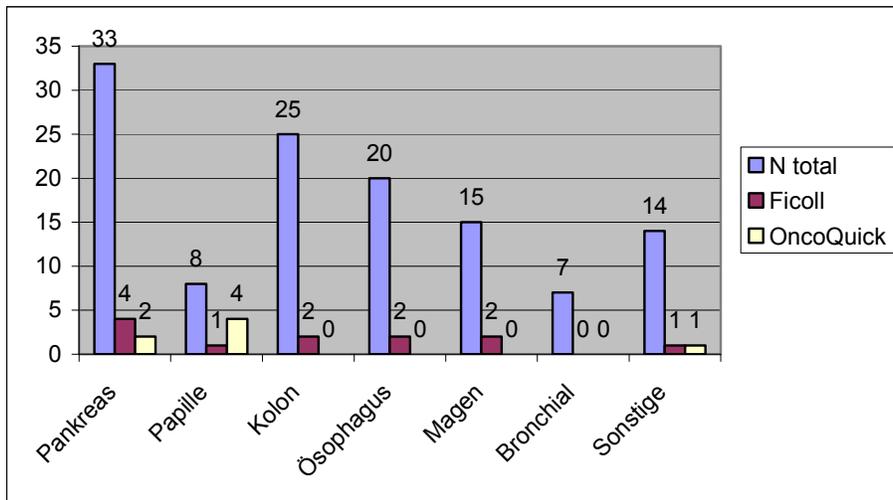
### 3.3 Vergleich der OncoQuick® - und Ficoll™ -Anreicherung

Bei 19 von insgesamt 122 Patienten (16%) ließen sich DTC zum Zeitpunkt der Primärdiagnose der jeweiligen Tumorentität mit dem Antikörper A45-B/B3 im KM nachweisen. Von den anfänglich 122 Proben konnten nach Aufarbeitung mit OncoQuick® jedoch nur 72 (59%) ausgewertet werden. Nach der Aufarbeitung mit Ficoll™ standen von den 122 noch 112 (92%) Proben zur Verfügung.



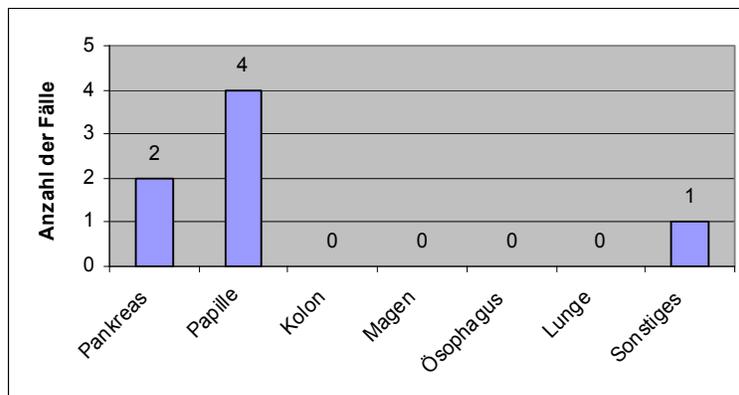
**Abbildung 18. Gesamtanzahl der Fälle mit DTC nach Ficoll™ - und OncoQuick®-Anreicherung**

Im Durchschnitt stand Material von 17 Patienten pro Tumorentität für unsere Versuche zur Verfügung. In den Knochenmarkspiraten von Bronchialkarzinompatienten konnten wir weder mit OncoQuick® noch mit Ficoll™ DTC nachweisen. Im Gegensatz dazu konnten in fünf von acht Knochenmarkspiraten von Patienten mit Papillenkarzinom DTC sowohl mit OncoQuick® als auch mit Ficoll™ nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise konnte hier jedoch in keinem Fall eine übereinstimmende Detektion von DTC erreicht werden. In den Knochenmarkspiraten von Kolon-, Magen- oder Ösophaguskarzinomen, die über OncoQuick® aufgearbeitet worden sind, konnten wir in keinem einzigen Fall DTC nachweisen.



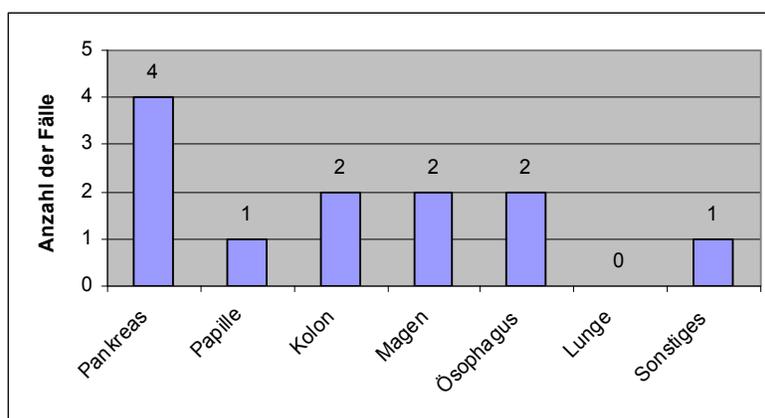
**Abbildung 19. Anzahl der tumorspezifischen Fälle mit DTC nach OncoQuick®- und Ficoll™-Anreicherung**

Im KM, welches über OncoQuick® aufgearbeitet worden ist, konnten in zwei Pankreaskarzinom-Fällen, in vier Papillenkarzinom-Fällen und in einem tumorfreien Fall DTC detektiert werden. Histopathologisch handelte sich bei dem tumorfreien Fall um eine chronische Pankreatitis. In sechs der insgesamt sieben Aspirate wurde je eine DTC nachgewiesen, in einem Fall konnten 17 DTC detektiert werden. Hierbei handelte es sich um das Knochenmarkaspirat eines Patienten, der an einem Papillenkarzinom erkrankt war. Das folgende Balkendiagramm zeigt die Verteilung der Detektion von DTC auf die einzelnen Tumorentitäten der OncoQuick®-Proben.



**Abbildung 20. Verteilung der Detektion von DTC bei den OncoQuick®-Proben**

In dem über Ficoll™ aufgearbeiteten KM konnten DTC in je zwei Fällen mit Magenkarzinom, kolorektalem Karzinom und Ösophaguskarzinom sowie in vier Fällen mit Pankreaskarzinom und in je einem Fall mit Papillenkarzinom und einem tumorfreien Fall detektiert werden. Bei dem histopathologisch als tumorfrei bezeichnetem Operationsmaterial handelte es sich um eine CMV-Kolitis. In 10 der 12 Fälle konnte je eine DTC im KM detektiert werden. Bei einem Patienten mit der histopathologischen Diagnose eines Ösophaguskarzinoms konnten zwei DTC im KM detektiert werden. In einem Fall konnten sogar drei DTC im KM nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich überraschenderweise um das KM der Patientin mit der CMV-Kolitis.



**Abbildung 21. Verteilung der Detektion von DTC bei den Ficoll™-Proben**

Überraschenderweise konnten in keinem Fall übereinstimmend DTC in den über Ficoll™ und OncoQuick® aufgearbeiteten Proben detektiert werden. In fünf (26%) der 12 Fälle, bei denen mit Ficoll™ DTC detektiert werden konnten, konnten die OncoQuick®-Proben leider nicht beurteilt werden, da die geringe Zellzahl auf den Objektträgern auch keine adäquate lichtmikroskopische Beurteilung ermöglichte. Fraglich bleibt hier daher, ob es in diesen fünf Fällen nicht doch eine Übereinstimmung gegeben hätte. In zwei (10%) weiteren über Ficoll™ positiven Fällen konnten lediglich HC in den mit OncoQuick® aufgearbeiteten Proben detektiert werden. In zwei (10%) positiven OncoQuick®-Fällen konnten in den Ficoll™-Proben ebenfalls lediglich nach den morphologischen Kriterien zu urteilen HC detektiert werden. Auch in dem Fall bei dem über OncoQuick® 17 DTC nachgewiesen werden konnten, konnten in dem dazugehörigen Ficoll™-Material keine DTC oder andere

klassifizierbare CK-positive Zellen detektiert werden. Darüber hinaus wurden in den jeweiligen Isotypkontrollen der über Ficoll™ aufgearbeiteten Proben im Vergleich zur OncoQuick® zahlreiche HC oder PHC nachgewiesen. Lediglich in einer Isotypkontrolle der OncoQuick®-Proben konnte eine CK-positive, den DTC morphologisch ähnliche Zelle, identifiziert werden.

**Tabelle 12. Vergleich der OncoQuick®- und Ficoll™-Anreicherung**

Geschlecht	Tumor-entität	Histologie	Ficoll™ (DTC)	OncoQuick® (DTC)	Ficoll™ (Isotyp-kontrolle)	OncoQuick® (Isotyp-kontrolle)
m	Pankreas	duktales Adeno-karzinom	1	n.z.b	22 HC	n.z.b
m	Pankreas	duktales Adeno-karzinom	2 HC	1	unauffällig	unauffällig
m	Pankreas	duktales Adeno-karzinom	1	n.z.b	unauffällig	n.z.b.
w	Pankreas	duktales Adeno-karzinom	1	n.z.b	1 HC	n.z.b.
m	Pankreas	duktales Adeno-karzinom	1	0	unauffällig	unauffällig
m	Pankreas	neuroendokrines Karzinom	0	1	1 HC	unauffällig
m	Papille	Adenokarzinom	0	1	unauffällig	unauffällig
m	Papille	Adenokarzinom	0	1	unauffällig	unauffällig
m	Papille	mukoid-muzinöses Karzinom	13 HC	1	17 HC	unauffällig
w	Papille	pseudopapilläres Karzinom	1	0	unauffällig	unauffällig
m	Papille	duktales Adeno-karzinom	0	17	unauffällig	2 HC
m	Kolon	Adenokarzinom	1	n.z.b	unauffällig	n.z.b.
m	Kolon	Adenokarzinom	1	0	3 HC	1 DTC
m	Ösophagus	Adenokarzinom	1	8 HC	unauffällig	16 HC
m	Ösophagus	Adenokarzinom	2	2 HC	unauffällig	unauffällig
m	Magen	mukoid-muzinöses Karzinom	1	0	7 HC, 1 PHC	unauffällig
m	Magen	Adenokarzinom	1	0	unauffällig	unauffällig
m		chron. Pankreatitis	0	1	unauffällig	unauffällig
w		CMV-Kolitis	5	n.z.b	3 HC	n.z.b

In weiteren 19 (16%) von 122 Fällen konnten in den jeweiligen Isotypkontrollen CK-positive den DTC morphologisch ähnliche Zellen nachgewiesen werden, so dass diese Proben nicht in die Auswertung einbezogen werden konnten. In fünf der 19 Fälle konnten DTC sowohl nach Färbung mit dem pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 als auch tumorähnliche Zellen in der Isotypkontrolle detektiert werden.

Es handelte sich hierbei um Proben von drei Magenkarzinom-, sechs Pankreaskarzinom-, drei Ösophaguskarzinom und vier kolorektalen Karzinom-Fällen sowie um die Probe eines Leiomyoms (gutartiger muskulärer Tumor), die Probe eines Patienten mit Cholangitis und eine weitere tumorfreie Resektatprobe.

**Tabelle 13. Detektion von CK-positiven den DTC morphologisch ähnlichen Zellen in der Isotypkontrolle**

Geschlecht	Tumorentität	Histologie	A45-B/B3 (DTC)	Isotypkontrolle (DTC)
w	Magen	siegelringzelliges Karzinom	0	1
m	Magen	Adenokarzinom	1	3
m	Magen	Adenokarzinom	3	1
m	Pankreas	duktales Adenokarzinom	0	2
m	Pankreas	lymph. met. Adenokarzinom	0	1
m	Pankreas	lymph. met. neuroendokrines Karzinom	2	2
m	Pankreas	Adenokarzinom, Lebermetastasen	0	1
m	Pankreas	Adenokarzinom	0	1
m	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	0	1
m	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	0	2
m	Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	0	1
m	Kolon	siegelringzelliges Karzinom	5	4
w	Kolon	Adenokarzinom	4	2
m	Kolon	Adenokarzinom	0	1
m	Kolon	Adenokarzinom	0	1
m		Leiomyom	0	3
m		tumorfreies Resektat	0	1
m		tumorfreies Resektat	0	1
m		Cholangitis	0	1

In vier OncoQuick®-Proben und in 15 Ficoll™-Proben konnten in der Isotypkontrolle Zellen, die die morphologischen Kriterien von DTC aufwiesen, in unterschiedlicher Anzahl nachgewiesen werden.

Interessanterweise konnten in einem Fall übereinstimmend Zellen, die die Kriterien von DTC aufwiesen, in der Isotypkontrolle detektiert werden. Hierbei fanden sich vier

Zellen in der über OncoQuick® aufgearbeiteten Probe und in der über Ficoll™ aufgearbeiteten Probe ließen sich 15 den DTC morphologisch ähnliche Zellen nachweisen. Es handelte sich hierbei um das Knochenmarkaspirat eines männlichen Patienten, der an einem Adenokarzinom des Pankreas, TNM-Klassifikation nicht bekannt, erkrankt war. Mit dem Antikörper A45-B/B3 konnten im KM dieses Patienten jedoch keine DTC detektiert werden.

### **3.4 Vergleich der mit den Antikörpern A45-B/B3 und AE-1/AE-3 erhobenen Daten**

Ein weiteres Ziel unserer Arbeit war der direkte Vergleich der Ergebnisse, die durch den Einsatz zweier verschiedener pan-Zytokeratin-Antikörper erhalten wurden.

Der direkte Vergleich von OncoQuick® und Ficoll™ erwies sich jedoch als problematisch. Aufgrund der zu geringen Zellzahl, die nach Aufarbeitung mit OncoQuick® vorhanden war, stand uns kein weiteres Material für die Austestung des AE-1/AE-3-Antikörpers zur Verfügung. Daher haben wir lediglich zusätzliche immunzytochemische Untersuchungen mit dem Antikörper AE-1/AE-3 an KM-Aspiraten, die über Ficoll™ aufgearbeitet worden sind, durchgeführt.

Für die Austestung des AE-1/AE-3-Antikörpers haben wir uns drei verschiedene Kollektive von KM-Proben zusammengestellt. Wir haben Proben von Patienten getestet, in denen wir immunzytochemisch mit dem A45-B/B3 in Ficoll™-Proben keine DTC nachweisen konnten. In dem zweiten Kollektiv befanden sich Knochenmarkproben, bei denen wir mit dem A45-B/B3 in Ficoll™-Proben HC nachweisen konnten. In den KM-Aspiraten des dritten Kollektivs haben wir mit dem A45-B/B3 in OncoQuick®-Proben DTC nachweisen können, zur Austestung wurden jedoch über Ficoll™ aufgearbeitete Proben verwendet.

Unser erstes Kollektiv bestand aus KM-Proben von 18 Patienten, die an verschiedenen Tumorentitäten erkrankt waren und in denen über Ficoll™ keine DTC nachgewiesen werden konnten. Mit dem Antikörper AE-1/AE-3 konnten in 11 (61,1 %) der 18 Fälle übereinstimmend zum Antikörper A45-B/B3 ebenfalls keine DTC detektiert werden. In drei Fällen konnten wir den morphologischen Kriterien nach zu

urteilen HC nachweisen. Interessanterweise konnten wir in zwei Fällen jeweils eine DTC nachweisen, obwohl sowohl die OncoQuick<sup>®</sup>-, als auch die Ficoll<sup>™</sup> - Proben mit dem A45-B/B3 zuvor negativ waren. Es handelte sich um je einen Kolonkarzinom- und einen Pankreaskarzinomfall. In zwei Fällen konnten wir auch in der Isotypkontrolle den DTC morphologisch ähnliche Zellen nachweisen, so dass diese Fälle als nicht auswertbar eingestuft worden sind.

**Tabelle 14. Vergleich von A45-B/B3 und AE-1/AE-3 im Nachweis von DTC**

Geschlecht	Tumorentität	Ficoll <sup>™</sup> (A45-B/B3)	OncoQuick <sup>®</sup> (A45-B/B3)	Ficoll <sup>™</sup> -Objektträger (AE-1/AE-3)
m	Kolon	negativ	negativ	1 DTC
m	Kolon	negativ	negativ	10 HC
m	Kolon	negativ	negativ	negativ
w	Kolon	negativ	n.z.b.	negativ
w	Kolon	negativ	n.z.b.	negativ
m	Kolon	negativ	negativ	negativ
m	Ösophagus	negativ	negativ	negativ
m	Ösophagus	negativ	3 HC	negativ
w	Ösophagus	negativ	1 HC	negativ
m	Pankreas	negativ	negativ	negativ
m	Pankreas	negativ	negativ	3 HC
m	Pankreas	negativ	n.z.b.	negativ
w	Pankreas	negativ	n.z.b.	1 DTC
m	Bronchial	negativ	negativ	negativ
m	Magen	negativ	n.z.b.	negativ
m	Magen	negativ	negativ	Isotypkontrolle: 1 DTC
w	Magen	negativ	negativ	3 HC, Isotypkontrolle: 1 DTC
m	tumorfreies Resektat	negativ	n. z. b.	1 HC



**Abbildung 22. Nachweis von DTC mit dem Antikörper AE-1/AE-3**

Unser zweites Kollektiv bestand aus KM-Proben von insgesamt acht Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten, bei denen wir mit dem Antikörper A45-B/B3 den morphologischen Kriterien nach zu urteilen HC in wechselnder Anzahl, zwischen einer und 32 HC, detektiert haben.

Mit dem Antikörper AE-1/AE-3 konnten wir ebenfalls in vier (50%) Fällen HC nachweisen, jedoch waren auch in drei dieser vier Fälle in der Isotypkontrolle HC. In einem Fall konnten nur in der Isotypkontrolle HC gefunden werden und vier weitere Fälle waren negativ. Interessanterweise konnten in einem Fall eines Pankreaskarzinoms sowohl in der Isotypkontrolle als auch in der mit dem Antikörper AE-1/AE-3 verwendeten Probe je zwei DTC nachgewiesen werden.

**Tabelle 15. Vergleich von A45-B/B3 und AE-1/AE-3 im Nachweis von HC**

Geschlecht	Tumorentität	Ficoll™ (A45-B/B3)	OncoQuick® (A45-B/B3)	Ficoll™ -Objektträger (AE-1/AE-3)
m	Pankreas	1 HC	n.z.b.	negativ
m	Pankreas	5 HC	n.z.b.	negativ
m	Pankreas	2 HC	n.z.b.	HC (auch Isotypkontrolle)
m	Pankreas	20 HC	n.z.b.	5 HC, 2 DTC (auch Isotypkontrolle)
m	Papille	7 HC	n.z.b.	negativ, Isotypkontrolle: 1 HC
m	Kolon	1 HC	n.z.b.	negativ
w	Kolon	1 HC	1 HC	1 HC
w	Magen	32 HC	n.z.b.	2 HC, Isotypkontrolle: 4 HC

Bei unserem dritten Kollektiv konnten in dem über OncoQuick® aufgearbeiteten und immunzytochemisch mit dem Antikörper A45-B/B3 untersuchten KM jeweils eine DTC nachgewiesen werden. In den Untersuchungen mit dem Antikörper AE-1/AE-3 konnten in einem von drei Fällen ebenfalls eine DTC ohne auffällige Isotypkontrolle gefunden werden. Darüber hinaus konnten ebenfalls HC nachgewiesen werden.

In dem Fall der chronischen Pancreatitis, wo nach OncoQuick-Anreicherung eine DTC detektiert werden konnte, fand sich eine DTC immunzytochemisch nach Verwendung des AE-1/AE-3-Antikörpers in der Probe nach Ficoll-Anreicherung, die zuvor mit dem A45-B/B3 unauffällig gewesen war. Hier fanden sich jedoch auch CK-positive den DTC morphologisch ähnliche Zellen in der Isotypkontrolle, so dass dieser Fall nicht weiter in die Auswertung mit einbezogen werden konnte.

**Tabelle 16. Vergleich von A45-B/B3 und AE-1/AE-3 im Nachweis von DTC**

Geschlecht	Tumorentität	Ficoll™ (A45-B/B3)	OncoQuick® (A45-B/B3)	Ficoll™-Objektträger (AE-1/AE-3)
m	chron. Pancreatitis	negativ	1 DTC	1 DTC, Isotypkontrolle: 2 DTC
m	Pankreas	2 HC	1 DTC	1 DTC, 4 HC
m	Papille	30 HC	1 DTC	16 HC, Isotypkontrolle: 38 HC, 3 DTC



**Abbildung 23. Nachweis einer DTC mit dem Antikörper AE-1/AE-3**

### **3.4.1 Korrelation zwischen dem primären Nachweis von DTC mit dem AE-1/AE-3-Antikörper und histopathologischen Parametern**

Mit dem Antikörper AE-1/AE-3 konnten bei drei (10,3 %) der insgesamt 29 ausgewählten Patienten jeweils eine DTC detektiert werden, ohne dass in der Isotypkontrolle den DTC morphologisch ähnliche Zellen nachweisbar waren. Es handelte sich um zwei Pankreaskarzinomfälle und einen Kolonkarzinomfall. In zwei Fällen hatte bereits eine lymphogene Metastasierung stattgefunden, jedoch noch keine hämatogene Fernmetastasierung. Es handelte sich in beiden Fällen um Karzinome niedrig- bis mittelgradigen Differenzierungsgrades.

Interessanterweise konnten in einem Pankreaskarzinom-Fall übereinstimmend jeweils eine DTC sowohl mit dem AE-1/AE-3 als auch mit dem A45-B/B3 nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um KM, welches über OncoQuick® aufgearbeitet worden ist. Anhand der klinischen Unterlagen handelt es sich wiederum hierbei um einen lokal fortgeschrittenen, intraoperativ nachweislichen inoperablen Befund. Demnach gab es keine TNM-Klassifikation.

**Tabelle 17. Korrelation zwischen dem Nachweis der DTC und histopathologischen Parametern**

Geschlecht	Tumorentität	Anzahl DTC A45-B/B3 OncoQuick® (AE-1/AE-3)	pT	pN	pM	Grading
m	Pankreas	1 (1)	k.A.	k. A.	k. A.	k.A.
w	Pankreas	0 (1)	3	1	0	1 - 2
m	Kolon	0 (1)	2	1	0	2

### 3.5 Detektion von DTC an ausgewählten Fällen über Immunfluoreszenz-doppelfärbung

In weiteren Immunfluoreszenzstudien haben wir versucht, die DTC hinsichtlich ihrer potenziellen Proliferationsaktivität zu testen. Hierfür haben wir den Proliferationsmarker Ki67 verwendet.

Unser verwendetes Kollektiv bestand aus den KM-Proben von Patienten, bei denen wir mit dem Antikörper A45-B/B3 DTC nach der Aufarbeitung durch OncoQuick® oder Ficoll™ nachweisen konnten. Bei den verwendeten Objektträgern handelte es sich wiederum um die Ficoll™-Proben, weil keine weiteren OncoQuick®-Proben zur Verfügung standen.

Nachträglich ist davon auszugehen, dass auf den Parallelobjektträgern keine DTC vorhanden waren, da mit der Immunfluoreszenzdoppelfärbung keine DTC gefunden werden konnten. Wir können dementsprechend keine Aussage hinsichtlich der proliferativen Aktivität der DTC treffen.

**Tabelle 18. Vergleich von A45-B/B3 und Ki67**

DTC (A45-B/B3)	DTC (Ki67 + Alexa Fluor 488 + A45-B/B3 + Cy 3)
1 positiv	negativ
17 positiv	negativ
1 positiv	negativ
3 positiv	negativ
1 positiv	negativ
2 positiv	negativ
1 positiv	negativ

## 4. Diskussion

### 4.1 Vergleich verschiedener Methoden zur Anreicherung und zum Nachweis von DTC

Die mittlere Überlebenszeit sowie das rezidivfreie Intervall von Karzinompatienten sind durch das Auftreten einer lymphogenen oder hämatogenen Fernmetastasierung begrenzt. Die Ursache scheint eine frühzeitige okkulte Disseminierung, auch *minimal residual disease (MRD)* genannt, einzelner Zellen aus dem primären Tumorzellverband eines soliden epithelialen Tumors zu sein (*Pantel et al., 1993; Pantel et al., 1997; Pantel et Brakenhoff, 2004; Pantel et al., 2009*). Ein Nachweis der MRD zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mittels herkömmlicher bildgebender Nachweisverfahren, wie bspw. der Computertomographie, ist derzeit nicht möglich.

Die anfänglich angewendeten auf zytomorphologischen Kriterien basierenden Nachweismethoden zur Detektion der DTC im KM und der CTC im peripheren Blut im Rahmen der MRD erwiesen sich aufgrund falsch-positiver Nachweisraten als unzulässig und wurden durch vorwiegend epithelspezifische immunzytochemische Nachweismethoden abgelöst (*Engell, 1955; Stahel et al., 1985; Mansi et al., 1987; Schlimok et al., 1987; Pantel et al., 1994; Fehm et al., 2006; Pantel et al., 2008; Pantel et al., 2009*). Hierbei werden vorab MNC aus bis zu 20 ml Knochenmarkaspirat mittels einer Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, und anschließend werden die separierten DTC mittels immunzytochemischer Reaktion durch Bindung eines pan-Zytokeratin-Antikörpers visualisiert. Mit dieser Methode können bei etwa 20–30% der Karzinompatienten DTC nachgewiesen werden, wobei sich in 70–80% der Fälle unter  $1 \times 10^6$  angereicherten MNC nur eine einzelne DTC detektieren lässt (*Pantel et Otte 2001; Pantel et Brakenhoff; 2008*). Aufgrund dieser sehr geringen Konzentration der DTC gestaltet sich daher die direkte Detektion ohne vorherige Anreicherung als sehr schwierig. Zur Anreicherung und Erhöhung der Detektionsrate der DTC im KM und der CTC im Blut stehen derzeit mit OncoQuick<sup>®</sup> und Ficoll<sup>™</sup> zwei Dichtegradientensysteme zur Verfügung. Ficoll<sup>™</sup> Hypaque gilt seit langer Zeit als „Goldstandard“ für die Zellseparation der MNC aus peripherem Blut (*Charbord et al., 1992*). Laut Herstellerangaben hat es sich in der Hämatologie und Onkologie für die Isolierung von MNC aus peripheren Blut bewährt und ist bei Verwendung mit anderen Medien, wie bspw. KM, leicht an dieses adaptierbar (*Arkin*

*et al., 1991; Deguchi et Kehl, 1991*). Für die Verwendung des Separationsmediums sind weder eine spezielle Laborausrüstung noch tumorspezifische Antikörper notwendig (Fa. Amersham Biosciences, 2005). Im Vergleich hierzu wirbt die Herstellerfirma von OncoQuick® mit einem minimalen Zeitaufwand für die Wasch- und Separationsschritte. Zur Detektion der DTC aus der MNC-Fraktion sind ebenso weder die Verwendung von tumorspezifischen Antikörpern noch das Vorhandensein spezieller Laborausrüstung nötig (Fa. Greiner bio-one, 2000).

Nach verschiedenen Wasch- und Separationsschritten stehen am Ende zwischen ein bis 12 Objektträger zur weiteren Verwendung zur Verfügung, wobei die Anzahl der Gesamtpräparate pro Gradientensystem erheblich variiert. Um eine vergleichende Aussage zur Effektivität der beiden Dichtegradientensysteme machen zu können, bedarf es zudem der Bestimmung der „Cell recovery rate“ (CRR) an tumorfreien Kontrollkollektiven. Eine periphere Blutentnahme für eine Zellseparation ist für einen Probanden wesentlich schonender und weniger aufwendig. Dem gegenüber steht die KM-Aspiration, welche unter stationären, sterilen Kautelen sowie mindestens unter lokalanästhesiologischen Bedingungen erfolgen muss. Für einen Vergleich der Effektivität beider Anreicherungsverfahren wurde daher bisher nur peripheres Blut eingesetzt (*Kraeft et al., 2000; Witzig et al., 2002; Rosenberg et al., 2002, Gertler et al., 2003, Dahm et al., 2003; Müller et al., 2005*). Hierbei zeigte sich eine CRR für MNC nach OncoQuick®-Zentrifugation von durchschnittlich 87% und nach Ficoll™-Separation von 84% (*Rosenberg et al., 2002, Dahm et al., 2003*). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass OncoQuick® im Vergleich zu Ficoll™ die Gesamtanzahl an auszuwertenden Präparaten und die Ko-Anreicherung von MNC signifikant reduziert und damit die Tumorzelldichte auf einem einzelnen Objektträger deutlich erhöhen kann (*Rosenberg et al., 2002; Gertler et al., 2003; Dahm et al., 2003*).

Neben den immunzytochemischen Nachweismethoden für DTC im KM und CTC im peripheren Blut stehen ebenso molekulare Detektionsverfahren zur Verfügung. Die molekulare Detektion von DTC über isolierte DNA oder mRNA auf der Basis einer PCR erlaubt jedoch keine morphologische Identifikation einer einzelnen DTC oder deren Isolierung für weiterführende Analysen (*Brakenhoff et al., 1999*). Eine wichtige Voraussetzung bei dieser Methode für die Detektion ist die Kenntnis spezifischer genetischer Alterationen der DNA (*Alix-Panabières et al., 2007; Pantel et al., 2008*). Darüber hinaus ist das Vorhandensein von DNA nicht mit der Intaktheit bzw. der Lebensfähigkeit einer DTC gleichzusetzen, da das DNA-Molekül sehr stabil ist und

diese Fragmente ebenso in apoptotischen Zellen vorkommen können (Schwarzenbach *et al.*, 2007a und b; Schwarzenbach *et al.*, 2008). Als Methode der Wahl hat sich deshalb die Detektion von bestimmten mRNA-Species über die RT-PCR erwiesen. Sie ist hoch sensitiv, erlaubt Hochdurchsatz-Analysen, und durch eine geeignete Primerauswahl lässt sich praktisch die Expression jedes Gens analysieren. Als nachteilig erweist sich jedoch die Instabilität der RNA, die spezielle Verarbeitungs- und Lagerungskonditionen erfordert (Becker *et al.*, 2004).

Das CellSearch™-System wiederum basiert auf der immunomagnetischen Anreicherung der CTC im peripheren Blut. Das Verfahren ist standardisiert und automatisiert und identische Lagerungs- und Verarbeitungsbedingungen führten in verschiedenen Arbeitsgruppen zu gut reproduzierbaren Ergebnissen (Hayes *et al.*, 2006; Riethdorf *et al.*, 2007; Sastre *et al.*, 2008). Bisher fand jedoch noch keine Anwendung für die Detektion von DTC aus KM statt.

In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt im Vergleich der beiden zur Anreicherung von DTC etablierten Dichtegradientensysteme OncoQuick® und Ficoll™. Nach Anreicherung mit OncoQuick® standen bspw. durchschnittlich ein bis drei Zytospinpräparate mit je ca.  $10^6$  MNC zur Verfügung, hingegen waren es bei Ficoll™ ca. 12 Zytospinpräparate mit je ca.  $10^6$  MNC pro Objektträger. Unsere erhobenen Daten bestätigen somit die von Gertler und Rosenberg 2002 und 2003 festgestellten Untersuchungen, dass OncoQuick® die Gesamtanzahl an auszuwertenden Präparaten und die Ko-Anreicherung von MNC signifikant reduziert. Nach paralleler Anreicherung über beide Systeme konnten DTC im KM einzelner, jedoch nicht im KM sämtlicher in unseren Untersuchungen eingeschlossenen Tumorentitäten, in unterschiedlicher Anzahl detektiert werden. Nach Ficoll™-Aufarbeitung fanden sich DTC bei 12 von 112 (11%) auswertbaren Patientenproben. Im Einzelnen konnten DTC bei einem Papillen-, je zwei Kolon-, Ösophagus- und Magenkarzinompatienten sowie bei vier Pankreaskarzinompatienten im KM nachgewiesen werden. In einem Fall konnte histologisch kein Karzinomnachweis erbracht werden, es handelte sich histologisch um eine virale Infektion (CMV-Kolitis). In den über das Dichtegradientensystem OncoQuick® aufgearbeiteten Patientenproben konnten bei 7 von 72 (10%) auswertbaren Proben DTC im KM detektiert werden. Es handelte sich hierbei um vier Papillen- und zwei Pankreaskarzinome sowie ein tumorfreies Resektat mit nachweislicher chronischer Pankreatitis.

Eine zu geringe Zellzahl der MNC fand sich vorwiegend nach OncoQuick®-Anreicherung, wobei wir im Durchschnitt ein bis drei Objektträger zur Verfügung hatten. Als nachteilig erwies sich bspw., dass bei einem Teil der Patienten demzufolge keine Isotypkontrolle durchgeführt werden konnte. Diese erschwerte wiederum die Vergleichbarkeit der Ergebnisse im weiteren Verlauf. Es traten ebenso wiederholt patientenspezifische z. T. erhebliche Zellverluste während der Waschvorgänge auf. Zudem konnte eine nicht unerhebliche Kontamination der Objektträger, zumeist nach Ficoll™-Anreicherung, mit Erythrozyten trotz durchgeführter Lyse nicht immer verhindert werden. Der dadurch wiederholt vorhandene Thrombozyten- und Erythrozytenüberschuss mit folglich hoher Zelldichte auf dem einzelnen Objektträger erschwerte zusätzlich die automatische Auswertung am ACIS. Nachträglich mussten daher eine Vielzahl der Objektträger beider Anreicherungsmethoden lichtmikroskopisch erneut beurteilt werden. Die manuelle Einzelbeurteilung aller Objektträger bedeutete einen erheblichen Mehraufwand an benötigter Arbeitszeit pro Patient und beeinträchtigte somit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Nach Auswertung unserer erhobenen Daten lässt sich feststellen, dass wir die Aussage von *Rosenberg et al. 2002*, OncoQuick® erhöhe signifikant die Tumorzelldichte auf den einzelnen Objektträgern, derzeit nicht bestätigen können. In unseren Untersuchungen detektierten wir in der Mehrzahl der Fälle bei Ficoll™ als auch bei OncoQuick® nur eine einzelne DTC im KM der Karzinompatienten. Nach OncoQuick®-Anreicherung konnten in einem Fall 17 DTC nachgewiesen werden. Und nach Ficoll™-Anreicherung gab es eine Detektion mit zwei und eine Detektion mit drei DTC. Wir können daher in unserer Arbeit aufgrund der geringen Zahl detektierter DTC und der damit verbundenen Schwankungen hinsichtlich des Nachweises von DTC beim Vergleich parallel angefertigter Objektträger keine gesicherte Aussage über die CRR und die Effektivität beider Separationssysteme von DTC im KM treffen. Interessanterweise konnten wir nach Anwendung des OncoQuick®-Systems lediglich in den KM-Proben von Pankreas- und Papillenkarcinompatienten DTC nachweisen. Bei Bronchial-, Magen-, Kolon- oder Ösophaguskarzinompatienten konnten wir keine DTC im KM nachweisen. Nicht zu vernachlässigen bleibt in diesem Zusammenhang auch die geringe Fallzahl von durchschnittlich 17 Patienten pro Kollektiv, so dass unsere Ergebnisse nicht repräsentativ sind. In den über das Ficoll™-System aufgearbeiteten positiven KM-

Proben handelte es sich um Magen-, Kolon-, Ösophagus-, Pankreas- und Papillenkarzinompatienten, wobei das Verhältnis relativ ausgewogen ist. Auch hier konnten wir interessanterweise keine DTC im KM von Bronchialkarzinompatienten nachweisen. Dies ist möglicherweise nur Zufall, denn andere Arbeitsgruppen konnten bereits DTC im KM immunzytochemisch hinreichend nachweisen (*Pantel et al., 1993b; Pantel et al., 1996a; Passlick et al., 1999; Riethdorf et al., 2007; Brunsvig et al., 2008*). Aus der Klinik ist ebenso hinreichend bekannt, dass der Knochen einer der bevorzugten Metastasierungsorte des Bronchialkarzinoms ist. Warum wir dennoch keine DTC nachweisen konnten, kann nur spekuliert werden. Am naheliegendsten ist daher wiederum von einem Zellverlust während der Wasch- und Separationsschritte als Ursache für dieses Problem auszugehen. Andererseits ergaben sternale oder costale KM-Punktionen wesentlich höhere Detektionsraten (*Pantel et al., 1996b; Passlick et al., 1999*). Somit könnte auch ein uneinheitliches Verteilungsmuster dieses Ergebnis erklären. Unsere Ergebnisse sind beim Bronchialkarzinom, aufgrund eines sehr kleinen Kollektivs mit sieben Patienten, nicht hinreichend repräsentativ dieses Missverhältnis zu erklären.

Interessanterweise handelte es sich bei zwei positiven KM-Proben nach vorheriger Ficoll™-Anreicherung bereits um Rezidivkrankungen. Des Weiteren waren drei Patienten bereits an anderen Tumoren erkrankt. Ob sich hieraus schlussfolgern lässt, dass sich DTC im KM von Karzinompatienten nach Ficoll™-Anreicherung häufig erst in fortgeschrittenen Stadien oder bei insgesamt hoher Tumorlast nachweisen lassen, müsste in größeren Kollektiven erneut untersucht werden.

Überraschenderweise konnten zudem in keinem Fall DTC nach paralleler Anreicherung über OncoQuick® und Ficoll™ detektiert werden. Ursächlich hierfür sind womöglich wiederum Probleme in den Wasch- und Separationsschritten. Optimierte wurde Ficoll™ ursprünglich für humanes peripheres Blut (*Charbord et al., 1992*). Peripheres Blut und KM-Aspirate unterscheiden sich jedoch sowohl in ihrer physiologischen Zellzusammensetzung als auch in ihren chemischen Eigenschaften. Im KM befinden sich bspw. viele hämatopoetische Progenitorzellen, die unter physiologischen Bedingungen im peripheren Blut nicht vorhanden sind. Es ist somit durchaus möglich, dass unterschiedliche Reaktionen während der Wasch- und Separationsschritte mit den einzelnen Gradientensystemen zu erwarten sind und einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Detektionsraten der DTC im KM haben könnten. Eine Optimierung der jeweiligen Anreicherungsprotokolle und

Dichtegradienten für die Separation von DTC aus humanem KM-Proben ist somit unumgänglich, um in erneuten Studien mit größeren Patientenkollektiven der einzelnen Tumorentitäten höhere Detektionsraten zu erzielen. Wünschenswert wäre ebenfalls, ein automatisiertes und standardisiertes und zudem auf der immunomagnetischen Anreicherung basierendes Verfahren, wie bspw. das CellSearch™-System, ebenfalls für die Anreicherung von DTC aus dem KM zu etablieren.

#### **4.2 Klinische Relevanz des DTC-Nachweises**

In umfangreichen Kontrolleexperimenten an gesunden Probanden wurde bereits gezeigt, dass im KM oder peripherem Blut gesunder Probanden wenige oder keine DTC nachweisbar sind (*Pantel et al., 1994; Pantel et al., 1996; Allard et al., 2004; Balic et al., 2005; Borgen et al., 2006*). Die Aussagekraft des Nachweises von DTC im KM von Karzinompatienten wird weiterhin dadurch unterstrichen, dass in anderen Studien keine DTC im KM tumorfreier Kontrollkollektive nachgewiesen werden konnten (*O`Sullivan et al., 1999; Pantel et al., 1999; Putz et al., 1999*). Darüber hinaus konnte in molekulargenetischen Untersuchungen gezeigt werden, dass es sich bei den meisten immunzytochemisch CK-positiven Zellen im KM um DTC handelt (*Klein et al., 2002; Schmidt-Kittler et al., 2003; Gangnus et al., 2004*). Ferner haben molekularbiologische Untersuchungen gezeigt, dass die im KM nachgewiesenen DTC durchaus tumorassoziierte Charakteristika wie bspw. eine ausgeprägte genetische Heterogenität aufweisen, die den Schluss auf ein malignes Potential zulassen (*Schlimok et al., 1991; Pantel et al., 1993; Braun et Pantel, 1996; Pantel et al., 1996; Pantel et al., 1997; Putz et al., 1999; Klein et al., 1999; Klein et al., 2002*). In multivariaten Analysen konnten zahlreiche Arbeitsgruppen zeigen, dass das Vorhandensein von DTC im KM bei Patienten mit epithelialen Tumoren der Mamma, der Prostata, der Lunge und des Kolon mit einer erhöhten Rezidiv- und Letalitätsrate korreliert und somit als ein von konventionellen Stagingmethoden unabhängiger prognostischer Faktor anzusehen ist (*Diel et al., 1992; Lindemann et al., 1992; Pantel et al., 1993a; Pantel et al., 1996a; Schlimok et al., 1990a; Braun et al., 2000a bis c; Wiedswang et al., 2003; Müller et Pantel, 2004; Pantel et Wölfe, 2005; Braun et al., 2005; Wiedswang et al., 2006*). In einer 1999 publizierten Studie

konnten bei 87,5% der untersuchten Kolonkarzinom-Patienten DTC darüber hinaus in lokoregionären LK nachgewiesen werden, wohingegen bei nur 21,4% der Patienten DTC im KM und bei 12,5% CTC im peripheren Blut nachgewiesen werden konnten (Weitz et al., 1999). Durch die immunzytochemischen Nachweisverfahren konnten bereits einzelne DTC oder kleinere Tumorzellverbände in histopathologisch unauffälligen LK bei Pankreas-, Ösophagus-, Mamma- oder Lungenkarzinomen nachgewiesen werden (Izbicki et al., 1997; Kubuschok et al., 1999; Herbert et al., 2007; Bogoevski et al., 2004).

Darüber hinaus konnten DTC interessanterweise ebenso im KM von Patienten mit Kolon-, Ösophagus-, Pankreas- oder Magenkarzinom nachgewiesen werden, obwohl das KM bei diesen Tumorentitäten nicht den primären Metastasierungsort darstellt (Lindemann et al., 1992; Pantel et al., 1993; Thorban et al., 1996a; Thorban et al., 1996; Weitz et al., 1999; Thorban et al., 2000). Während Diel et al. 1996 beim Brustdrüsenkarzinom feststellten, dass ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC im KM und der Tumorgroße ( $p < 0,001$ ), der lokoregionären Lymphknotenmetastasierung ( $p = 0,001$ ) und dem histologischen Differenzierungsgrad ( $p = 0,002$ ) besteht, konnten Braun et al. 2000 einen Zusammenhang des Knochenmarkstatus mit der Tumorgroße ( $p < 0,001$ ) sowie mit der histologischen Differenzierung ( $p = 0,017$ ) beschreiben. Eine 2005 veröffentlichte Metaanalyse der Ergebnisse aus verschiedenen europäischen und nordamerikanischen Zentren an insgesamt 4703 Patientinnen mit Mammakarzinom im Stadium I, II oder III ergab eine signifikante Korrelation des DTC-Nachweises im KM sowohl zum rezidivfreien Intervall als auch zum Gesamtüberleben der Patientinnen in einem Beobachtungszeitraum von 10 Jahren (Braun et al., 2005). Bei 1438 (30,6%) Patientinnen konnten zum Zeitpunkt der Primärdiagnose DTC nachgewiesen werden. Das Vorhandensein der DTC im KM korrelierte mit einem höheren Primärtumorstadium, einer schlechteren histologischen Differenzierung sowie einem positiven Lymphknotenstatus oder bereits stattgefundenener Fernmetastasierung ( $P < 0,001$  für alle Variablen).

Nicht unweigerlich außer Betracht gelassen werden darf sicherlich auch die Punktions- und Entnahmestelle des KM, da eine möglicherweise uneinheitliche Verteilung der DTC im KM des Skelettsystems erschwerend hinzukommt (Schlimok et al., 1987; Maguire et al., 2000). Die Zugänglichkeit zu diesem Kompartiment ist jedoch eingeschränkt, da es sich hier um einen operativen Eingriff handelt, der einer

anschließenden teilstationären Überwachung bedarf. Üblicherweise erfolgt die Punktion im Bereich der Spinae iliacae anteriores superiores. Beim Bronchial- und Ösophaguskarzinom konnte dennoch bspw. gezeigt werden, dass eine sternale oder costale Punktion zu höheren Detektionsraten der DTC führt (*Pantel et al., 1996b; Passlick et al., 1999; Mattioli et al., 2001*). Die Ursache dieses möglicherweise uneinheitlichen Verteilungsmusters der DTC im KM ist bisher noch unklar. Dennoch gilt die bilaterale Knochenmarkspunktion der Beckenkämme derzeit als Standardmethode (*Schlimok et al., 1990; Pantel et al., 1994; Funke et al., 1996, Riethdorf et al., 2008*).

Im Vergleich hierzu drängen immer häufiger Nachweisverfahren für die Detektion der CTC aus peripherem Blut auf den Markt (*Pantel et al., 2009*). Als Vorteil erweist sich die verhältnismäßig leichte Zugänglichkeit zu diesem Kompartiment (*Pantel et al., 2009*). Aktuell gibt es jedoch nur sehr wenige Studien, die die Detektion von CTC und DTC direkt miteinander vergleichen (*Pantel et al., 2009*). Beim Mammakarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass DTC im KM häufiger als CTC im peripheren Blut detektiert werden können (*Müller et al., 2005; Wiedswang et al., 2006; Bidard et al., 2008*). Zudem scheinen die CTC nur eine kurze Zeit im peripheren Blut zu zirkulieren und unterliegen schnelleren Apoptosevorgängen (*Mehes et al., 2001, Meng et al., 2004*). Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Detektion von DTC im KM daher als prognostischer Faktor zur Prognoseetablierung in der Klinik vorrangig zu bewerten.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir eine DTC-Detektionsrate im KM von 16% (19/122 Patienten) erzielen. Bei 2 der positiv auf DTC getesteten Proben wurde der initiale Tumorverdacht postoperativ durch die histopathologische Diagnostik nicht bestätigt. Obwohl bekannt ist, dass das KM-Gewebe mesenchymalen Ursprungs ist und sich dort in der Regel keine epithelialen Zellen befinden, konnten wir in unseren Untersuchungen je eine DTC-ähnliche Zelle im KM mit beiden Dichtegradientensystemen von zwei tumorfreien Patienten detektieren. Eine Kontamination des Knochenmarkspirates durch abgeschilferte, epitheliale Hautzellen ist ebenso nicht ausgeschlossen (*Pantel et al., 1994*). Die histopathologische Untersuchung demaskierte in einem Fall eine chronische Pankreatitis und in dem anderen Fall eine CMV-Kolitis. Bei dem ersten Fall ist es durchaus denkbar, dass es sich hier um eine Präneoplasie handelt, aus welcher später ein Pankreaskarzinom hervorgehen könnte. Der Zusammenhang zwischen präneoplastischen Veränderungen als Folge einer chronischen Pankreatitis ist

klinisch bekannt. Andererseits wäre aber auch denkbar, dass intraoperativ eine Probe ohne einen Tumoranteil aus einer suspekten Läsion des Pankreas entnommen worden ist, da das Pankreaskarzinom zum Teil sehr inhomogene intraparenchymatöse Verteilungsmuster aufweist. Nicht außer Acht gelassen werden darf daher in diesem speziellen Zusammenhang der Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion. DTC können bei Patienten gefunden werden, obwohl der Primärtumor noch nicht entdeckt worden ist oder bei Patienten, die ein Tumorrezidiv erleiden, welches zum Zeitpunkt der Disseminierung klinisch noch nicht anderweitig in Erscheinung getreten ist (*Allard et al., 2004, Pantel et al., 2009*). Möglicherweise persistieren aber auch DTC im KM, obwohl der Primärtumor entfernt worden ist (*Allard et al., 2004, Pantel et al., 2009*). Bei der CMV-Kolitis handelt es sich um eine virale Entzündung der Dickdarmschleimhaut, die per se nicht mit einer malignen Entartung vergesellschaftet ist. Unklar bleibt daher weiterhin der Ursprung der DTC im KM des Patienten, der diese Erkrankung aufwies. Wie bereits in der Klinik hinreichend bekannt ist, kann es durch chronisch entzündliche Veränderungen als Folge einer sich im Ungleichgewicht befindlichen Homöostase zur Freisetzung epithelialer Zellen kommen. Dies geschieht unter anderem bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie bspw. dem Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa. Beide Erkrankungen gelten ebenso als Präkanzerose des Kolonkarzinoms. Eine abschließende Aussage darüber, ob es sich bei diesen detektierten CK-positiven Zellen um Tumorzellen handelt, kann jedoch ohne molekulare Zusatzuntersuchungen nicht getroffen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DTC trotz eines unterschiedlichen Metastasierungspotentials eine hohe Affinität zum KM besitzen (*Funke et Schraut, 1998; Pantel et al., 1999; Braun et Pantel, 2000b; Pantel et Brakenhoff, 2004; Pantel et Alix-Panabières, 2007*). Die prognostische Relevanz der DTC im KM von Tumorpatienten unterschiedlichster Tumorentitäten hinsichtlich des rezidivfreien Intervalls sowie des Gesamtüberlebens wurde ebenso bereits in zahlreichen Studien belegt (*Schlimok et al., 1990; Schlimok et al., 1990a; Lindemann et al., 1992; Pantel et al., 1993; Pantel et al., 1993a; Braun et Pantel, 1995; Jauch et al., 1996; Thorban et al., 1996; Pantel et al., 1996; Pantel et al., 1997; Thorban et al., 1999; Roder et al., 1999; Pantel et al., 1999; Braun et al., 2000a bis c; Pantel et Otte, 2001; Wiedswang et al., 2003; Müller et Pantel, 2004; Braun et al., 2005*). Inwieweit Tumorgröße, lokoregionäre Lymphknotenmetastasierung und histologische Differenzierung mit

dem Nachweis der DTC im KM in unseren Untersuchungen korrelieren, können wir aufgrund niedriger Fallzahlen mit durchschnittlich 17 Patienten pro Kollektiv und fehlender klinischer Daten nicht beurteilen. In unseren Kollektiven variieren die Tumorgröße sowie der Nachweis lokoregionärer bzw. hämatogener Fernmetastasen stark. In zwei Fällen handelte es sich bereits um ein Rezidiv der Tumorerkrankung. Am häufigsten konnten wir DTC bei Patienten, die am Pankreas- oder Papillenkarzinom erkrankt waren, nachweisen. Diese beiden Tumorentitäten liegen anatomisch relativ dicht bei einander, werden häufig erst in einem fortgeschrittenen, nicht mehr heilbarem Stadium diagnostiziert und entsprechen in der histologischen Differenzierung meist einem Adenokarzinom. Zudem fanden sich Patienten mit Zweitkarzinomen in der Eigenanamnese.

Der klinische Nutzen der DTC-Detektion erfordert ein weiterführendes Verständnis der biologischen Abläufe der Tumorzell dissemination sowie der molekularen Charakteristika. Weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven sind somit zur Etablierung der DTC-Detektion als klinischer Verlaufsparemeter unumgänglich.

#### **4.3 Verwendung verschiedener pan-Zytokeratin-Antikörper**

Zytokeratine erwiesen sich für den Nachweis von DTC im Blut, in LK oder im KM als geeignete Marker, die durch konventionelle diagnostische Verfahren nicht erfasst werden können (*Schlimok et al., 1987; Mansi et al., 1987; Schlimok et al., 1990; Diel et al., 1992; Moss et al., 1991; Pantel et al., 1993, Pantel et al., 1994, Braun et al., 1996; Pantel et al., 1996; Pantel et al., 1997; Müller et al., 2005*). Sie stellen als vernetzte Filamente einen essentiellen Bestandteil des Zytoskeletts epithelialer Zellen dar und werden auch in Tumorzellen epithelialen Ursprungs exprimiert. Zytokeratine, als fester Bestandteil des Zytoskeletts epithelialer Zellen, weisen eine hohe Spezifität für epitheliale Zellen auf (*Braun et al., 2000b*). *Debus et al.* entwickelten den monoklonalen Antikörper CK2 gegen die Zytokeratinkomponente 18 (*Debus et al., 1982*). *Pantel et al.* und *Schaller et al.* berichteten über eine mögliche Herabregulation der Expression von CK18 in epithelialen Zellen, was die Nachweisrate der DTC erheblich beeinflussen könnte (*Pantel et al., 1994; Schaller et al., 1996*). In der Folgezeit führte die Verwendung des pan-Zytokeratin-Antikörpers A45-B/B3 DTC im Vergleich mit CK2 hingegen zu einer signifikant erhöhten DTC-

Detektionsrate (*Pantel et al., 1994*). Pan-Zytokeratin-Antikörper berücksichtigen durch ein breites Zytokeratinspektrum die antigene Heterogenität einzelner DTC und ihr Einsatz führt insgesamt zu einer höheren Sensitivität (*Borgen et al., 1999; Braun et al., 2000a; Braun et Pantel, 2000b; Braun et al., 2000c; Kasimir-Bauer et al., 2002*). Bei dem häufig verwendeten Antikörper A45-B/B3, der gegen ein gemeinsames Epitop der Zytokeratinkomponenten CK8, CK18 und CK19 gerichtet ist, konnte eine Spezifität von bis zu 98% festgestellt werden (*Stigbrand et al., 1998; Braun et Pantel, 2000b*).

Andere Arbeitsgruppen haben stattdessen den pan-Zytokeratin-Antikörper AE-1/AE-3 verwendet, der eine Vielzahl anderer Zytoskelettkomponenten (CK 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 14, 15, 16 und 19) detektiert, wobei das Gesamtspektrum der Detektion dieses pan-Zytokeratin-Antikörpers wie auch das des Antikörpers A45-B/B3 noch nicht bekannt ist (*Borgen et al., 1998; Borgen et al., 1999; Naume et al., 2001; Wiedswang et al., 2003; Naume et al., 2004*). Hier wurden ebenfalls vergleichbar gute Ergebnisse erzielt. Weiterhin ist unklar, welcher der verwendeten pan-Zytokeratin-Antikörper als Standard geeignet ist. Es wurde daher eine Standardisierung des immunzytochemischen Tumorzellnachweises im KM erarbeitet (*Pantel et al., 1994; Pantel et al., 2003; Fehm et al., 2006*).

***Tabelle 19. Kriterien zur Standardisierung der immunzytochemischen Methode zum Nachweis von DTC im KM (Pantel et al., 1994; Pantel et al., 2003; Fehm et al., 2006)***

- 1.) hohe Spezifität und Sensitivität
- 2.) Reproduzierbarkeit
- 3.) Robustheit
- 4.) Objektive Auswertung
- 5.) Möglichkeit einer automatischen Auswertung der Präparate
- 6.) Quantifizierung der Tumorlast
- 7.) Charakterisierung der Tumorzellen
- 8.) Erwiesene klinische Bedeutung

In einer kürzlich durchgeführten europäischen Studie wurden die drei am besten etablierten immunzytochemischen DTC-Detektionsverfahren vergleichend analysiert (*Borgen et al., 2006*). Das KM von 48 gesunden Probanden wurde parallel in drei verschiedenen Instituten unter Verwendung der pan-Zytokeratin-Antikörper A45-

B/B3, AE-1/AE-3 sowie des Zytokeratin-Antikörpers CK2 immunzytochemisch aufgearbeitet, durch die APAAP-Methode visualisiert sowie am ACIS (Fa. Clariant, Aliso Viejo/USA) beziehungsweise am MDS1 (Fa. Applied Imaging, Newcastle upon Tyne/Großbritannien) ausgewertet. Hierbei erwiesen sich die pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 sowie AE-1/AE-3 im Vergleich zum Antikörper CK2 als spezifischer (*Borgen et al., 2006*). In einer weiteren Studie wurde ein Konzept für die standardisierte Detektion von DTC im KM von Brustkrebspatientinnen auf bereits bestehenden Kriterien basierend zusammengefasst (*Fehm et al., 2006*).

**Tabelle 20. Standards für die Detektion von DTC durch immunzytochemische Untersuchungsmethoden (*Fehm et al., 2006*)**

1. 5 bis 10 ml KM-Aspirat sollte aus der Spina ilica anterior superior oder posterior superior stammen und mit Heparin oder Ethylenediamintetrasäure versetzt sein
2. Lagerung der Proben bei +4°C bis -20°C, weitere Verwendung innerhalb der nächsten 24 h
3. Ficoll™ als Dichtegradientensystem zur Anreicherung der MNC verwenden
4. Zytospins über Nacht bei +4°C oder Raumtemperatur trocknen, dann weitere immunzytochemische Schritte einleiten oder bei -20°C bis -80°C lagern
5. Fixierung: 5 Minuten in Aceton (entsprechend dem A45-B/B3-Protokoll\*) oder 10 Minuten in Aceton (entsprechend dem AE1/AE3-Protokoll<sup>o</sup>) oder 10 Minuten in gepuffertem Formalin bei Raumtemperatur<sup>#</sup>
6. A45-B/B3 oder AE1/AE3 als pan-Zytokeratin-Antikörper verwenden, APAAP-Methode anwenden
7. Blockierung der endogenen alkalinen Phosphatase
8. als Positivkontrolle Brustkrebszelllinien, z. B. MCF-7, kombiniert mit MNC vom KM oder Leukozyten verwenden, Isotypenkontrollen (IgG) als Negativkontrollen
9. Analyse und Validierung sollte von zwei unabhängigen Wissenschaftlern erfolgen

\**Pantel et al., 1994*

<sup>o</sup>*Borgen et al., 1999, Wiedswang et al., 2003*

<sup>#</sup>*Choesmel et al., 2004*

Basierend auf den von *Pantel et al. 1994* und von *Borgen et al. 1999* dann weiterentwickelten zytomorphologischen und phänotypischen Kriterien wurden Standards für die Detektion sowie die Klassifikation der DTC festgelegt. Eine DTC gilt somit als DTC, wenn die von *Pantel et al.* und *Borgen et al.* festgelegten zytomorphologischen Kriterien erfüllt sind (*Fehm et al., 2006*).

In unseren Untersuchungen versuchten wir durch den Einsatz der beiden pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 und AE-1/AE-3 zu klären, welcher sich für den Nachweis von DTC aus humanem KM am besten eignet. Hierbei konnten wir in drei (10%) von insgesamt 29 ausgewählten Fällen DTC im KM mithilfe des pan-Zytokeratin-Antikörpers AE-1/AE-3 detektieren. Im Vergleich hierzu konnten wir mit dem Antikörper A45-B/B3 bei 19 (16%) von 122 Patienten DTC im KM detektieren. Aufgrund der geringen Fallzahl der AE-1/AE-3-Fälle von 29 Patienten können wir keine statistische Aussage zu der Sensitivität und Spezifität des Antikörpers treffen. Auffallend ist jedoch, dass mithilfe des AE-1/AE-3-Antikörpers DTC im KM von Patienten detektiert werden konnten, wo zuvor mit dem A45-B/B3 keine DTC nachgewiesen werden konnten. Hierbei handelte es sich um einen Kolon- und zwei Pankreaskarzinompatienten. In fünf Fällen konnten in der Isotypkontrolle DTC-ähnliche Zellen detektiert werden, so dass diese nicht mit in unsere Auswertung miteinbezogen werden konnten. Insgesamt fanden sich nach Anwendung des AE-1/AE-3-Antikörpers vermehrt auffällige Isotypkontrollen mit nachweislichen HC oder DTC-ähnlichen Zellen. Für einen objektiven Vergleich der Detektionsraten der beiden verwendeten Antikörper müssten daher entweder größere Kollektive oder Fälle mit höherer DTC-Anzahl vergleichend untersucht werden. Der Einsatz von Detektionssystemen, die eine höhere Tumorzellausbeute gewährleisten könnten, wäre ebenso erstrebenswert.

Um die Vorteile beider pan-Zytokeratin-Antikörper ergänzend nutzen zu können, wäre ein „Cocktail“ beider Antikörper ein interessanter Ansatz, dessen Spezifität jedoch sorgfältig geprüft werden müsste. Auch eine Doppelimmunfärbung mit beiden Antikörpern über zwei verschiedene Detektionssysteme oder Fluoreszenzfarbstoffe würde helfen, die Frage zu klären, ob diese Antikörper verschiedene DTC detektieren und somit unterschiedliche Spezifitäten aufweisen können. Ferner werden die Zytokeratine als einzige molekulare Marker nicht mehr ausreichen, da auch immer häufiger hämatopoetisch erscheinende Zellen als mögliche DTC immunzytochemisch detektiert werden. In unseren Untersuchungen konnten mit beiden pan-Zytokeratin-

Antikörpern neben den DTC eine Vielzahl andere hämatopoetische Zellen detektiert werden. Anhand der festgelegten morphologischen Kriterien erfolgte die Differenzierung zwischen DTC, UIC, PHC und HC. Es ist naheliegend, dass sich die alleinige immunzytochemische Tumorzell-detektion in Zukunft nicht behaupten wird. Den vergleichsweise hohen Detektionsraten der DTC-ähnlichen Zellen in den Isotypkontrollen wird man ebenfalls mehr Aufmerksamkeit schenken müssen, um einen hohen Standard und eine präzise Aussagekraft der Ergebnisse gewährleisten zu können.

#### **4.4 Morphologische Beurteilung der DTC**

Mit dem erfolgreichen zytomorphologischen Nachweis der DTC gestaltete sich anfänglich die mikroskopische Identifizierung der Zellen schwierig. Nicht unerheblich waren ebenso die Erfahrung und das subjektive Einschätzungsvermögen der Untersucher. Zwar konnten die DTC durch den immunzytochemischen Nachweis mit pan-Zytokeratin-Antikörpern visualisiert werden, jedoch fehlten zunächst allgemeine Standardrichtlinien der immunzytochemischen Detektion, um eine CK-positive Zelle sicher als DTC zu klassifizieren. Daher basierte das Ergebnis eines positiven KM-Aspirates in immunzytochemischen Studien zunächst auf unterschiedlichen Kriterien. In einigen Studien basierte bspw. ein positives Ergebnis auf der Präsenz immunzytochemisch positiver Zellen relativ unabhängig von der Morphologie (*Lindemann et al., 1992; Jauch et al., 1996; Pantel et al., 1996a; Braun et Pantel, 2000b*). In der Weiterentwicklung der Methode wurde vermehrt neben der CK-Positivität auch die Morphologie berücksichtigt. Es erfolgte eine Einteilung der CK-positiven Zellen in DTC und falsch-positive hämatopoetische Zellen (*Pantel et al., 1994*). Ein malignes Potential war somit nicht mit der immunzytochemischen CK-Positivität gleichzusetzen (*Harbeck et al., 1994; Pantel et al., 1996; Gebauer et al., 2001; Wiedswang et al., 2003; Mansi et al., 1999*). Als mögliche Ursache dieser falsch-positiven Ergebnisse werden Kreuzreaktionen zwischen den verwendeten monoklonalen Antikörpern und den Zytoskelettkomponenten der hämatopoetischen Zellen diskutiert (*Pantel et al., 1994*.) Ebenso ist eine illegitime Expression von epithelialen oder tumorassoziierten Antigenen in normalen hämatopoetischen Zellen vorstellbar (*Pantel et al., 1994; Borgen et al., 1998; Borgen et al., 1999; Naume et al., 2004*). Aufgrund von Überschneidungen in den Kriterien der Zellmorphologie

kann sich zudem die Festlegung auf ein positives Ergebnis, also Vorhandensein einer DTC, in einzelnen Fällen sehr schwierig gestalten. Das ist ein besonderes Problem im KM, wo morphologisch heterogene hämatopoetische und mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen nur sehr schwer von epithelialen Tumorzellen zu unterscheiden sind. 1999 wurden von *Borgen et al.* zytomorphologische und phänotypische Kriterien zur Kategorisierung einer DTC festgelegt (*Borgen et al., 1999*). Durch die molekularen Analysen konnte 2002 gezeigt werden, dass es sich zumindest bei einem Teil der CK-positiven Zellen um DTC handelt und aufgrund nachweisbarer genetischer Alterationen von einem malignen Charakter dieser Zellen auszugehen ist (*Klein et al., 2002; Fehm et al., 2002*).

Auf der Basis der 1994 von *Pantel et al.* erhobenen Daten bezüglich der Morphologie der DTC beschrieben *Naume et al.* 2004 erstmalig vier morphologisch unterschiedliche Zellkategorien bei Mammakarzinompatientinnen und deren unterschiedliche Assoziation mit einem rezidivfreien Intervall und der Gesamtüberlebenszeit (*Naume et al., 2004*). Die Autoren stellten fest, dass neben der klassischen DTC eine weitere Zellkategorie, die als UIC deklariert wurde, ebenfalls mit einem signifikant reduzierten Überleben bei Brustkrebspatientinnen assoziiert ist (*Naume et al., 2004*). Dies ließ die Vermutung zu, dass es sich bei diesen Zellen um zerstörte oder gealterte DTC handeln könnte.

Für die Validierung des immunzytochemischen Nachweises von DTC im KM wurden ebenfalls Analysen von KM-Aspiraten tumorfreier Patienten durchgeführt (*Lindemann et al., 1992; Jauch et al., 1996; Pantel et al., 1996; Braun et Pantel, 2000b; Wiedswang et al., 2003*). Es konnte gezeigt werden, dass im KM oder peripheren Blut gesunder Probanden wenige oder keine DTC nachweisbar sind (*Pantel et al., 1994; Pantel et al., 1996; Allard et al., 2004; Balic et al., 2005; Borgen et al., 2006; Bidard et al., 2008*). Die Kombination aus der Anwendung der morphologischen Kriterien und Negativkontrollen wurde bisher nur wenige Male angewendet (*Wiedswang et al., 2003; Naume et al., 2004*). Deshalb wurden unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. K. Pantel in der europäischen Konsensuskommission Richtlinien zur Standardisierung der immunzytochemische Detektion der DTC festgelegt und veröffentlicht. Ein KM-Befund gilt nur dann als positiv, wenn eine immunzytochemisch CK-positive Zelle gefunden wird, den zytomorphologischen Kriterien einer DTC entspricht und zytomorphologische DTC-ähnliche Zellen in der korrespondierenden Negativkontrolle fehlen (*Pantel et al., 1994; Naume et al., 2001;*

*Fehm et al., 2006; Pantel et al., 2008*). Falsch-positive Zellen können in 90% anhand einfacher morphologischer Kriterien identifiziert und ausgeschlossen werden (*Borgen et al., 1999; Naume et al., 2004*). Demnach gilt eine Probe auf DTC als positiv, wenn mehr als eine DTC im aufgearbeiteten Material nachweisbar ist.

***Tabelle 21. Zytomorphologische und phänotypische Kriterien von detektierten und immunzytochemisch mittels pan-Zytokeratin-Antikörper visualisierter DTC (Borgen et al., 1999; Wiedswang et al., 2003)***

1. Zellcluster
2. vergrößerter Zellkern
3. sichtbare Zytokeratinfilamente
4. vergrößerte Nucleoli
5. erhöhte Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kernes

In unserer Arbeit haben wir sowohl Negativkontrollen als auch die von der europäischen Konsensuskommission festgelegten morphologischen Kategorien zur Differenzierung der CK-positiven Zellen angewendet. Unter Zugrundelegen aller beschriebenen Kriterien sind in unserer Arbeit bei insgesamt 16% (19/122 Patienten) der Karzinompatienten zum Zeitpunkt der Primärdiagnose unterschiedlicher Tumorentitäten DTC im KM nachweisbar gewesen. Neben den DTC konnten wir in wechselnder Anzahl UIC bei acht (6,5%) von 122 Patienten, HC bei 73 (60%) von 122 Patienten und PHC bei fünf (4%) von 122 Patienten detektieren. Aufgrund unvollständiger klinischer Daten bezüglich der TNM-Klassifikation und nicht erfasster Follow-up-Daten können wir keine Aussage im Hinblick auf ein reduziertes Überleben oder einen frühen Krankheitsprogreß treffen. Anhand der durchgeführten Korrelation zwischen dem Nachweis der DTC und den histopathologischen Parametern lässt sich dennoch feststellen, dass das Vorhandensein der DTC im KM einerseits nicht unbedingt mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert sein muss. Andererseits besteht zum Detektionszeitpunkt nicht immer eine klinisch bekannte lymphogene oder hämatogene Fernmetastasierung. In zwei Fällen handelte sich bereits um lokale Rezidive. Trotz niedriger Fallzahlen und unvollständiger klinischer Daten lässt sich jedoch im Hinblick auf den Nachweis der DTC feststellen, dass die DTC zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung im KM vorkommen können. Ob die von uns

als UIC beschriebenen Zellen auch mit einem reduzierten Überleben der Patienten vergesellschaftet sind, können wir wiederum aufgrund der zu niedrigen Fallzahlen und fehlender, klinischerseits nicht erfasster Follow-up-Daten nicht beurteilen. Darüber hinaus haben wir 19 (16%) von 122 Patientenproben nicht in die Auswertung einbeziehen können, da diese den DTC morphologisch ähnliche Zellen in den Negativkontrollen aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Weiterentwicklung der Tumorzelldetektion zur Etablierung als prognostische Methode in der Klinik von entscheidender Bedeutung ist. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass DTC im KM von Karzinompatienten noch nach abgeschlossener adjuvanter Therapie oder Jahre nach einer zurückliegenden chirurgischen Intervention nachgewiesen werden können und häufig mit einem erhöhten Rezidivrisiko vergesellschaftet waren (*Wiedswang et al., 2004, Naume et al., 2004; Janni et al., 2005*). In der 2005 aus verschiedenen europäischen und nordamerikanischen Zentren publizierte Mammakarzinommetanalyse konnte gezeigt werden, dass bei mehr als 30% der Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits DTC im KM vorhanden waren, obwohl klinischerseits noch keine lymphogene oder hämatogene Fernmetastasierung nachweisbar war (*Braun et al., 2005*). In der 10-Jahres-Follow-up-Studie zeigte sich, dass das Vorhandensein verglichen mit dem Fehlen der DTC mit einer insgesamt schlechteren Prognose und früherem Rezidiv vergesellschaftet ist (*Braun et al., 2005*). Auch bei den anderen Karzinomentitäten, die ebenso von uns untersucht worden sind, finden sich zahlreiche Studien, die belegen, dass das Vorhandensein von DTC im KM mit einer schlechteren Prognose und einem verkürzten rezidivfreien Intervall einhergeht (*Pantel et al., 1993b; Passlick et al., 1999; Sugio et al., 2002; Berois et al., 2003; Kienle et al., 2003; Koch et al., 2005; Riethdorf et al., 2008*). Beim Prostatakarzinom konnten *Köllermann et al.* bspw. zeigen, dass das Vorhandensein von DTC im KM bereits vor einer neoadjuvanten Therapie mit einer schlechteren Prognose und möglicherweise geringerem Benefit vergesellschaftet ist (*Köllermann et al., 2008*). Gerade diese Studie und die Metaanalyse von *Braun et al.* aus dem Jahr 2005 untermauern die enorme Wichtigkeit und zunehmende medizinische Relevanz des frühzeitigen DTC-Nachweises. Umfassende multivariate Analysen mit größeren Fallzahlen sind daher zwingend erforderlich, um die prognostische Relevanz der Tumorzelldetektion auch bei anderen häufig vorkommenden Tumorentitäten wissenschaftlich zu belegen. Die Erforschung der komplexen

biologischen Abläufe der Tumorzell dissemination und das Überleben der DTC im KM gehört ebenso zu den vordringlichen Aufgaben wie die Optimierung der Tumorzell detektion. Damit könnten die Detektion und die Charakterisierung von DTC zukünftig zur frühzeitigen Prognoseeinschätzung und Therapieoptimierung bei Karzinompatienten beitragen.

## 5. Zusammenfassung

Therapie und Heilung maligner Tumorerkrankungen haben in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte gemacht. Die postoperative Überlebenszeit mit Verlängerung und Verbesserung der Lebensqualität und der damit einhergehenden kurativen Therapieintention der Patienten werden als übergeordnetes Ziel angesehen. Etablierte histopathologische Parameter, wie bspw. die TNM-Klassifikation oder die UICC-Stadiengruppierung, erlauben derzeit nur eine relativ unzureichende Risikoklassifizierung der Patienten. In den letzten zehn Jahren wurde daher das Interesse an immunzytochemischen und molekularen Analyseverfahren geweckt, mit denen der Nachweis und die Phänotypisierung einzelner frühdisseminierter Tumorzellen im KM, in LK und im peripheren Blut von Karzinompatienten möglich geworden ist.

Mit Ficoll™ und OncoQuick® stehen für die Anreicherung von DTC aus KM und CTC aus humanem peripherem Blut u.a. zwei Dichtegradientensysteme zur Verfügung. Der „Goldstandard“ für den routinemäßigen Nachweis von DTC ist derzeit die Immunzytochemie mit Verwendung eines pan-Zytokeratin-Antikörpers und anschließender Visualisierung der Immunreaktion über die APAAP-Methode.

In unseren Studien wurden KM-Aspirate von 122 an unterschiedlichen Tumorentitäten erkrankten Patienten (Bronchial-, Kolon-, Magen-, Ösophagus-, Pankreas-, Papillenkarcinome) auf das Vorliegen von DTC untersucht. Hierbei stand der Vergleich der beiden Dichtegradientensysteme im Vordergrund. Ferner fand ein Vergleich der am häufigsten immunzytochemisch angewandten pan-Zytokeratin-Antikörper statt. Ziel war es herauszufinden, welcher der zwei getesteten Antikörpern für den Nachweis von DTC aus humanem KM am besten geeignet erscheint.

Eine Probe wurde als positiv gewertet, wenn mindestens eine DTC detektiert, die von *Pantel et al. 1994* und von *Fehm et al. 2006* erweiterten morphologischen Kriterien einer DTC angewendet und die Isotypkontrolle als unauffällig gewertet werden konnten. Bei 19 (16%) von 122 Patienten des Gesamtkollektivs wurden zum Zeitpunkt der Primärdiagnose DTC im KM detektiert. In dem mit Hilfe des OncoQuick®-Systems aufgearbeiteten Material konnten in sieben von 72 auswertbaren Fällen (10%) DTC nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei ausschließlich um KM-Proben von Patienten, die am einem Pankreas- und Papillenkarcinom erkrankt waren. Unklar bleibt weiterhin, ob OncoQuick® DTC im KM

von Bronchial-, Magen-, Kolon- und Ösophaguskarzinomen detektieren kann. Mit dem Dichtegradientensystem Ficoll™ konnten in 12 von 112 auswertbaren Fällen (11%) DTC im KM von Pankreas-, Papillen-, Magen-, Ösophagus- und Kolonkarzinompatienten detektiert werden. Es gab keine KM-Probe, in der parallel nach Anreicherung der MNC mit Hilfe beider Methoden DTC detektiert werden konnten. Interessanterweise wurden insgesamt mehr HC und PHC, auch den in Negativkontrollen, nach Anreicherung mit Ficoll™ detektiert. Zudem fanden sich in einem tumorfreien Fall nach Ficoll™-Anreicherung die meisten DTC. Auch wurden in dem über Ficoll™ aufgearbeiteten Material in sechs Fällen UIC detektiert, während es bei OncoQuick® nur zwei Fälle mit UIC-Detektion gab. Die Aussagekraft der Dichtegradientensysteme wird unter anderem durch einen zu hohen Zellverlust während der verschiedenen Wasch- und Separationsschritte gemindert. Ferner ist die Anreicherung insgesamt ineffektiv und gering, so dass eine Technik mit einer höheren Effektivität erstrebenswert wäre.

Zwischen dem Nachweis der DTC und den bekannten etablierten Prognosefaktoren wie Tumorgröße, Lymphknotenstatus und histopathologisches Grading, konnte auch aufgrund der geringen Fallzahl pro Tumorentität und fehlender klinischer Follow-up-Daten keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. In zwei positiven Fällen nach Ficoll™-Anreicherung handelte es sich um Rezidiverkrankungen und in drei positiven Fällen um Zweitkarzinome.

Das OncoQuick®-System ist tendenziell mit einer höheren Spezifität des DTC-Nachweises assoziiert, da insgesamt weniger UIC, HC und PHC detektiert worden sind. Welcher Antikörper zum DTC-Nachweis am besten geeignet ist und ob eine Kombination verschiedener pan-anti-Zytokeratin-Antikörper die DTC-Detektionsrate, d.h. die Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität erhöhen könnte, müsste durch Folgeuntersuchungen an größeren Fallzahlen analysiert werden.

## 6. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1. Die Metastasierungskaskade solider epithelialer Tumoren (Pantel et al., 1999)
- Abbildung 2. Punktionsstellen der KM-Punktion (Pantel et Brakenhoff, 2004)
- Abbildung 3. KM-Aufbereitung über OncoQuick® (Gebrauchsanleitung Greiner bio-one)
- Abbildung 4. KM-Aufbereitung über Ficoll™
- Abbildung 5. Vergleich von OncoQuick® und Ficoll™ (modifiziert nach [www.hexal-gentech.de](http://www.hexal-gentech.de))
- Abbildung 6. DTC im KM-Aspirat
- Abbildung 7. UIC im KM-Aspirat
- Abbildung 8. HC im KM-Aspirat
- Abbildung 9. PHC im KM-Aspirat
- Abbildung 10. DTC im KM-Aspirat nach OncoQuick®-Separation
- Abbildung 11. DTC im KM-Aspirat nach OncoQuick®-Separation
- Abbildung 12. UIC im KM-Aspirat nach OncoQuick®-Separation
- Abbildung 13. HC im KM-Aspirat nach OncoQuick®-Separation
- Abbildung 14. HC im KM-Aspirat nach OncoQuick®-Separation
- Abbildung 15. DTC im KM-Aspirat nach Ficoll™-Separation
- Abbildung 16. DTC im KM-Aspirat nach Ficoll™-Separation
- Abbildung 17. HC im KM-Aspirat nach Ficoll™-Separation
- Abbildung 18. Gesamtanzahl der Fälle mit DTC bei Ficoll™ und OncoQuick®
- Abbildung 19. Anzahl der tumorspezifischer Fälle mit DTC nach OncoQuick®- und Ficoll™-Anreicherung
- Abbildung 20. Verteilung der Detektion von DTC bei den OncoQuick®-Proben
- Abbildung 21. Verteilung der Detektion von DTC bei den Ficoll™-Proben
- Abbildung 22. Nachweis einer DTC mit dem Antikörper AE-1/AE-3
- Abbildung 23. Nachweis einer DTC mit dem Antikörper AE-1/AE-3

## 7. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1. Immunzytochemische Studien zur prognostischen Relevanz der DTC im KM (Pantel et al., 1999)
- Tabelle 2. Gesamtkollektiv der Patienten entsprechend der Tumorentitäten
- Tabelle 3. Detektion von DTC nach OncoQuick<sup>®</sup>-Separation
- Tabelle 4. Detektion von HC nach OncoQuick<sup>®</sup>-Separation
- Tabelle 5. Patientencharakteristika in Abhängigkeit des Nachweises von DTC
- Tabelle 6. Detektion von DTC nach Ficoll<sup>™</sup>-Separation
- Tabelle 7. Detektion von UIC nach Ficoll<sup>™</sup>-Separation
- Tabelle 8. Detektion von PHC nach Ficoll<sup>™</sup>-Separation
- Tabelle 9. Detektion von HC nach Ficoll<sup>™</sup>-Separation
- Tabelle 10. Korrelation zwischen dem primären Nachweis von DTC und histopathologischen Parametern
- Tabelle 11. Patientencharakteristika in Abhängigkeit des Nachweises von DTC
- Tabelle 12. Vergleich der OncoQuick<sup>®</sup>- und Ficoll<sup>™</sup>-Anreicherung
- Tabelle 13. Detektion von CK-positiven den DTC morphologisch ähnlichen Zellen in der Isotypkontrolle
- Tabelle 14. Vergleich von A45-B/B3 und AE-1/AE-3 im Nachweis von DTC
- Tabelle 15. Vergleich von A45-B/B3 und AE-1/AE-3 im Nachweis von HC
- Tabelle 16. Vergleich von A45-B/B3 und AE-1/AE-3 im Nachweis von DTC
- Tabelle 17. Korrelation zwischen dem primären Nachweis von DTC und histopathologischen Parametern
- Tabelle 18. Vergleich von A45-B/B3 und Ki67
- Tabelle 19. Kriterien zur Standardisierung der immunzytochemischen Methode zum Nachweis von DTC im KM (Pantel et al., 1994; Pantel et al., 2003; Fehm et al., 2006)
- Tabelle 20. Standards für die Detektion von DTC durch immunzytochemische Untersuchungsmethoden (Fehm et al., 2006)
- Tabelle 21. zytomorphologische und phänotypische Kriterien von detektierten und immunzytochemisch mittels pan-Zytokeratin-Antikörper visualisierter DTC (Borgen et al., 1999; Wiedswang et al., 2003)

## 8. Literaturverzeichnis

1. Alix-Panabières, C., Vendrell, J. P., Pelle, O., Rebillard, X., Riethdorf, S. Müller, V., Fabbro, M., Pantel, K. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin Chem* 53:537-539, 2007.
2. Allard, W. J., Matera, J., Craig Miller, M., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., Tibbe, A. G. J., Uhr, J. W., Terstappen, L. W. M. M. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant disease. *Clin Cancer Res* 10:6897-6904, 2004.
3. Arkin, S., Naprstek, B., Guarini, L., Ferrone, S, Lipton, J. M. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (CD 54) on hematopoietic progenitors. *Blood* 5:948-953, 1991.
4. Balic, M., Dandachi, N., Hofmann, G., Samonigg, H., Oibner, H., Obwallner, A., van der Kooi, A., Tibbe, A. G. J., Doyle, G. V., Terstappen, L. W. M. M., Bauernhofer, T. Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom* 68:25-30, 2005.
5. Becker, S., Becker-Pergola, G., Fehm, T., Wallwiener, D., Solomayer, E. F. Time is an important factor when processing samples for the detection of disseminated tumor cells in blood/bone marrow by reverse transcription-PCR. *Clin Chem* 50:785-786, 2004.
6. Berois, N., Varangot, M., Sonora, C., Zarantonelli, L., Pressa, C., Lavina, R., Rodriguez, J. L., Delgado, F., Porchet, N., Aubert, J. P., Osinaga, E. Detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells using an RT-PCR assay of MUC5B mRNA. *Int J Cancer* 103:550-555, 2003.
7. Bidard, F. C., Vincent-Salomon, A., Gomme, S., Nos, C., de Rycke, Y., Thiery, J. P., Sigal-Zafrani, B., Mignot, L., Sastre-Garau, X., Pierga, J. Y. Disseminated tumor cells of breast cancer patients: a strong prognostic factor for distant and local relapse. *Clin Cancer Res*, 11:3306-3311, 2008.
8. Bidard, F.C., Vincent-Salomon, A., Sigal-Zafrani, B., Diéras, V., Mathiot, C., Mignot, L., Thiery, J.P., Sastre-Garau, X., Pierga, J. Y. Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol* 19:496-500, 2008.
9. Bogoevski, D. Yekebas, E. F., Schurr, P., Kaifi, J. T., Kutup, A., Erbersdobler, A., Pante, K., Izbicki, J. R. Mode of spread in the early phase

- of lymphatic metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma: prognostic significance of nodal microinvolvement. *Ann Surg* 240:993-1000, 2004.
10. Borgen, E., Beiske, K., Trachsel, S. et al. Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow: non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. *J Pathol* 185:427-434, 1998.
  11. Borgen, E., Naume, B., Nesland, J. M., et al. Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in Bone marrow and blood. I. Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy* 1:377-388, 1999.
  12. Borgen, E., Pantel, K., Schlimok, G., Müller P., Otte, M., Renolen, A., Ehnle, S., Coith, C., Seland J. M., Naume, B. 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* 70:400-409, 2006.
  13. Boyle, P., Ferlay, J. Cancer incidence and mortality in Europe. *Ann Oncol* 16:481-488, 2004.
  14. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21 97:77-89, 1968.
  15. Brakenhoff, R. H., Stroomer, J. G., ten Brink, C., de Bree, R., Weima, S. M., Snow, G. B., van Dongen, G. A. Sensitive detection of squamous cells in bone marrow and blood of head and neck cancer patients by E48 reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 5:725-732, 1999.
  16. Braun, S., Pantel, K. Immunodiagnosis and immunotherapy of isolated tumor cells disseminated bone marrow of patients with colorectal cancer. *Tumori*. May-June; 81 (3 Suppl): 78-83, 1995.
  17. Braun, S., Pantel, K. Biological characteristics of micrometastatic carcinoma cells in bone marrow. *Curr-Top-Microbiol-Immunol*, 213(pt 1):163-177, 1996.
  18. Braun, S., Kentenich, C., Janni, W., Hepp, F., De Waal, J., Willgeroth, F., Sommer, H., Pantel, K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy of the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 18:80-86, 2000a.
  19. Braun, S., Pantel, K. Diagnostik und klinische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark. *Dtsch Med Wochenschr* 125:237-139, 2000b.

20. Braun, S., Pantel, K., Müller, P., Janni, W., Hepp, F., Kentenich, CH.R.M., Gastroph, S., Trimpl, A., Wischnik, A., Dimpfl, Th., Kindermann, G., Riethmüller, G., Schlimok, G. Cytokeratin-positive bone marrow micrometastases and survival of breast cancer patients with stage I-III disease. *N Engl J Med* 342:525-533, 2000c.
21. Braun, S. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353:793-802, 2005.
22. Brugger, W., Bross, K. J., Glatt, M. et al. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 83:636, 1994.
23. Brunsvig, P. F., Flatmark, K., Aamdal, S., Hoifodt, H., Le, H., Jakobsen, E., Sandstad, B., Fodstad, O. Bone marrow micrometastases in advanced stage non-small-cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer*, 2:170-176, 2008.
24. Charbord, P., Newton, I., Schaal, J. P., Herve, P. The separation of human cord blood by density gradient does not induce a major loss of progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1:109-110, 1992.
25. Choesmel, V., Anract, P., Hoifodt, H., Thiery, J. P., Blin, N. A relevant immunomagnetic assay to detect and characterize epithelial cell adhesion molecule-positive cells in bone marrow from patients with breast carcinoma: immunomagnetic purification of micrometastases. *Cancer* 101:693-703, 2004.
26. Cote, R. J., Rosen, P. P., Lesser, M. L., Old, L. J., Osborne, M. P. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastasis. *J Clin Oncol* 9:1749-1756, 1991.
27. Cote, R. J., Beattie, E. J., Chaiwun, B, Shi S. R., Harvey, J., Chen S. C. Detection of occult bone marrow micrometastasis in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg* 222:415-423, 1995.
28. Cristofanilli, M., Budd, GT, Ellis, MJ., Stopeck, A., Matera, J., Miller, MC., Reuben, JM., Doyle, GV., Allard, WJ., Terstappen, LW., Hayes, DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351:781-791, 2004.
29. Dahm, M., Hiller, C., Götz, A., Rosenberg R. OncoQuick a novel density gradient centrifugation system for the enrichment of disseminated tumor

- cells in peripheral blood. 1<sup>st</sup> Workshop on the detection of disseminated tumor cells/micrometastases. April 11-11, 2003.
30. Debus, E., Weber, K., Osborne, M. Monoclonal cytokeratin antibodies that distinguish simple from stratified squamous epithelia: characterization on human tissue. *EMBO J* 1:1641-1647 1982.
  31. Deguchi, Y., Kehrl, J. H. Selective expression of two homobox genes in CD34-positive cells from human bone marrow. *Blood* 2:323-328, 1991.
  32. Diel, IJ, Kaufmann, M., Goerner, R., Costa, SD., Kaul, S., Bastert, G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J Clin Oncol* 10:1534-39, 1992.
  33. Diel, I. J., Kaufmann, M., Costa, S. D., Holle, R., von Mickwitz, G., Solomayer, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 88:1652-1658, 1996.
  34. Engell, HC. Cancer cells in the circulating blood. *Acta Chir Scand*, Supp 201, 1955.
  35. Fehm, T., Sagalowsky, A., Clifford, E. Cytogenetic evidence that circulating tumor cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res* 8:2073-2084, 2002.
  36. Fehm, T., Braun, S., Müller, V., Janni, W., Gebauer, G., Marth, C., Schindlbeck, C., Wallwiener, D, Borgen, E, Naume, B., Pantel, K. Solomayer, E. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* 107:885-892, 2006.
  37. Funke, I., Schraut, W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 16:557-566, 1998.
  38. Funke, I., Schraut W., Schildberg, FW. Metaanalysis of studies on the prognostic relevance of bone marrow micrometastasis. *Experimentelle und Klinische Onkologie II*, 1996.
  39. Gangnus, R., Langer, S., Breit, E., Pantel, K., Speicher, MR. Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 10:3457-3464, 2004.

40. Gebauer, G., Fehm, T, Merkle, E. et al. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 19:3669-3674; 2001.
41. Gertler, R., Rosenberg, R, Führer, K., Dahm, M., Nekarda, H., Siewert, J. R. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Result Cancer Res* 162:149-155, 2003.
42. Harbeck, N., Untch, M., Pache, L., Eiermann, W. Tumor cell detection in bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Brit J Cancer* 69:566-571, 1994.
43. Hayes, D. F., Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Miller, M. C., Matera, J., Allard, W. J., Doyle, G. V., Terstappen, L. W. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 12:4218-4224, 2006.
44. Herbert, G. S., Sohn, V. Y., Brown, T. A. The impact of nodal isolated tumor cells on survival of breast cancer patients. *Am J Surg* 193:571-573, 2007.
45. Izbicki, J. R., Hosch, S. B., Pichlmeier, U., Rehders, A., Busch, C., Niendorf, A., Passlick, B., Broelsch, C. E. Pantel, K. Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N Engl J Med* 337:1188-1194, 1997.
46. Köllermann, J., Weikert, S., Schostak, M., Kempkensteffen, C., Kleinschmidt, K., Rau, Th., Pantel, K. Prognostic significance of disseminated tumor cells in the bone marrow of prostate cancer patients treated with neoadjuvant hormone treatment. *J Clin Oncol* 26:4928-4933, 2008.
47. Kubuschok, B., Passlick, B., Izbicki, J. R., Thetter, O., Pantel, K. Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell-lung cancer. *J Clin Oncol* 17:19-24, 1999.
48. Janni, W., Rack, B., Schindlbeck, C., Strobl, B., Rjosk, D., Braun, S., Sommer, H., Pantel, K., Gerber, B., Friese, K. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk of recurrence. *Cancer* 103:884-891, 2005.
49. Jauch, K., Heiss, M. M., Grützner, U., Funke, I., Pantel, K., Babic, R. Eissner, H. J., Riethmüller, G., Schildberg, F. W. The prognostic significance

- of early disseminated tumor cells in bone marrow of patients with gastric cancer. *New Engl J Med*, 1994.
50. Jauch, K. W., Heiss, M. M., Gruetzner, U., Funke, I., Pantel, K., Babic, R., Eissner, H. J., Riethmüller, G., Schildberg, F. W. Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol* 6:1810-1817, 1996.
51. Jung, Y. S., Lee, K. J., Kim, H. J., Yim, H. E., Park, J. S., Soh, E. Y., Kim, M. W., Park, H. B. Clinical significance of bone marrow micrometastasis detected by nested rt-PCR for keratin 19 in breast cancer patients. *Jpn j Clin Oncol* 33:167-172, 2003.
52. Kasimir-Bauer, S., Oberhoff, C., Schinlder A. E., Seeber, S. A summary of two clinical studies on tumor cell dissemination in primary and metastatic breast cancer: Methods, prognostic significance and implication for alternative treatment protocols (Review). *Int J Oncol* 20:1027-1034, 2002.
53. Kienle, P., Koch, M., Autschbach, F., Benner, A., Treiber, M., Wannemacher, M., von Knebel Doeberitz, M., Buchler, M., Herfath, C., Weitz, J. Decreased detection rate of disseminated tumor cells of rectal cancer patients after preoperative chemoradiation: a first step towards a molecular surrogate marker for neoadjuvant treatment in colorectal cancer. *Ann Surg* 238:324-330, 2003.
54. Klein, C. A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J. A., Pantel, K., Speicher, M. R., Riethmüller, G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4494-4499, 1999.
55. Klein, C. A., Blankenstein, T. J., Schmidt-Kittler, O. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* 360:683-689, 2002.
56. Koch, M., Kienle, P., Hinz, U., Antolovic, D., Schmidt, J., Herfath, C., von Knebel Doeberitz, M., Weitz, J. Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 241:199-205, 2005.
57. Kraeft S. K., Sutherland R., Gravelin L. Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system. *Clin Cancer Res* 6:3552-2559, 2000.

58. Lindemann, F., Schlimok, G., Dirschedl, P., Witte, J., Riethmüller, G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 340:685-689, 1992.
59. Leinung, S., Wurl, P., Schonfelder, A., Weiss, C. L., Roder, I., Schonfelder, M. Detection of cytokeratin-positive cells in bone marrow in breast cancer and colorectal carcinoma in comparison with other factors of prognosis. *J Hematother Stem Cell Res* 9:905-911, 2000.
60. Maguire, D., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., Morgan, J., Shanahan, F. Bone marrow micrometastases and gastrointestinal cancer detection and significance. *Am J Gastroenterol* 95:1644-1651, 2000.
61. Mansi, J. L., Berger, U., Easton, D. et al. Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 295: 1093-1096, 1987.
62. Mansi, J. L., Easton, D., Berger, U, Gazet, J. C., Ford, H. A. T., Dearnaley, D., et al. Bone marrow micrometastasis in primary breast cancer: prognostic significance after 6 year follow-up. *Eur J Cancer* 27:1552-1555, 1991.
63. Mansi, J. L., Gogas, H., Bliss, J. M. et al. Outcome of primary breast cancer patients with micrometastases: a long term follow up study. *Lancet* 354:197-202, 1999.
64. Mattioli, S., D'Ovidio, F., Tazzari, P., Pilotti, V., Daddi, N., Bandini, G., Pivvioli, M., Pileri, S. Iliac crest biopsy versus rib segment resection for the detection of bone marrow isolated tumor cells from lung and esophageal cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 19:576-579, 2001.
65. Mehes, G., Witt, A., Kubista, E., Ambros, P. F. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol* 159:17-20, 2001.
66. Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E. P. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 10:8152-8162, 2004.
67. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-14, 1982.
68. Moss, T.J., Reynolds, C.P., Sather, H.N., Romansky, S.G., Hammond, G.D., Seeger, R.C. Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastases in neuroblastoma. *N Engl J Med* 4:219-226, 1991.

69. Müller, V. Pantel, K. Bone marrow micrometastases and circulating tumor cells: current aspects and future perspectives. *Breast Cancer Res* 6:258-261, 2004.
70. Müller, V., Stahmann, N., Riethdorf, S., Rau, T., Zabel, T., Goetz, A., Jänicke, F., Pantel, K. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 11:3678-3685, 2005.
71. Naume, B., Borgen, E., Beiske, K. et al. Immunomagnetic techniques for the enrichment and detection of isolated carcinoma cells in bone marrow and peripheral blood. *J Hematother* 6:103-104, 1997.
72. Naume, B., Borgen, E., Kvalheim, G. et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 7:4122-4129, 2001.
73. Naume, B., Wiedswang, G., Borge, E., Kvalheim, G., Karesen, R., Qvist, H., Janbu, J., Harbitz, T., Nesland, J. M. The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients. *Clin Canc Res* 10:3091-3097, 2004.
74. O'Sullivan, GC., Sheehan, D., Clake, A., Shanahan, F. Micrometastases in esophagogastric cancer: high detection rate in resected rib segments. *Gastroenterology*, 166:543-548, 1999.
75. Pantel, K., Koprowski, H., Riethmüller, G. Conference on cancer micrometastasis: Biology, methodology and clinical significance. *Int J Oncol* 3:1019-1022, 1993.
76. Pantel, K., Braun, S., Schlimok, G., Riethmüller, G. Micrometastatic tumour cells in bone marrow in colorectal cancer. *Lancet* 341:501, 1993a.
77. Pantel, K., Izbicki, JR., Angstwurm, M., Braun, S., Passlick, B., Karg, O., Thetter, O., Riethmüller, G. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable NSCLC. *Cancer Res* 53:1027-1031, 1993b.
78. Pantel, K., Schlimok, G., Angstwurm, M., Weckermann, D., Schmaus, W., Gath, H., Passlick, B, Izbicki, J., Riethmüller, G. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *Hematother.* 3:165-173, 1994.

79. Pantel, K., Riethmüller, G. Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 213:1-18, 1996.
80. Pantel, K., Izbicki, J., Passlick, B., Angstwurm, M., Haussinger, K., Thetter, O., et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet* 347:649-653, 1996a.
81. Pantel, K., Izbicki, J., Passlick, B., Angstwurm, M., Haussinger, K., Thetter O., Riethmüller, G. Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer with overt metastases. *Lancet* 347:649-653, 1996b.
82. Pantel, K., von Knebel Doeberitz, M., Izbicki, J.R., Riethmüller, G. Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien. *Der Chirurg* 68:1241-1250, 1997.
83. Pantel, K., Cote, R. J., Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst* 91:1113-1124, 1999.
84. Pantel, K., Otte, M. Identification and characterisation of minimal residual disease in solid tumors. *Acta Med Austriaca Suppl* 52:8-12, 2000.
85. Pantel, K., Otte M. Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumor cells. *Semin Cancer Biol* 5:327-337; 2001.
86. Pantel, K., Müller, V., Auer, M., Nusser, N., Harbeck, N., Barun, S. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Research* 9:6326-6334, 2003.
87. Pantel, K., Brakenhoff, R. H. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 6:448-456, 2004.
88. Pantel, K., Wölfle, U. Minimal residual disease in breast cancer: detection and clinical relevance. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 89:68-75, 2005.
89. Pantel, K., Alix-Panabieres, C. The clinical significance of circulating tumour cells. *Nature Clin Pract Oncol* 4:62-63, 2007.
90. Pantel, K., Brakenhoff, R. H., Brandt, B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumor cells. *Nat Rev Cancer* 8:329-340, 2008.

91. Pantel, K., Alix-Panbières, C., Riethdorf, S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 6:339-351, 2009.
92. Passlick, B., Kubuschok, B., Izbicki, J., Thetter, O., Pantel, K. Isolated tumor cells in bone marrow predict reduced survival in node-negative non-small-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 68:2053-2058, 1999.
93. Pinzani, P., Salvadori, B. Simi, L., Bianchi, S., Distante, V., Cataliotti, L., Pazzagli, M., Orlando, C. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with realtime reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection. *Hum Pathol* 37:711-718, 2006.
94. Putz, E., Witter, K., Offner, S., Stosiek, P., Zippelius, A., Johnson, J., Zahn, R., Riethmüller, G., Pantel, K. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models from human micrometastasis. *Cancer Research* 59:241-248, 1999.
95. Riethdorf, S., Fritsche, H., Müller, V., Rau, T., Schindlbeck, C., Rack, B., Janni, W., Coith, C., Beck, K., Jänicke, F., Jackson, D., Gornet, T., Cristofanilli, M., Pantel K. Detection of circulating tumours cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellCearch System. *Clin Cancer Res* 13:920-928, 2007.
96. Riethdorf, S., Wikman, H., Pantel, K. Review: Biological relevance of dissminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer* 9:1991-2006; 2008.
97. Roder, J. D., Thorban, S., Pantel, K., Siewert, J. R. Mircometastases in bone marrow. Prognostic indicators for pancreatic cancer. *World J Surg* 9:888-891, 1999.
98. Rosenberg, R., Gertler, R., Friedrichs, J., Fuehrer, K., Dahm, M., Phelps, R., Thorban, S., Nekarda, H., Siewert, J. R. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* 49:150-158, 2002.
99. Sastre, J., Maestro, M.L., Puente, J., Veganzones, S., Alfonso, R., Rafael, S., García-Saenz, J. A., Vidaurreta, M., Martín, M., Arroyo, M., Sanz-Casla, M. T., Díaz-Rubio, E. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Ann Oncol* 19:935-938, 2008.

100. Schaller, G., Fuchs, I., Pritze, W., Ebert, A., Herbst, H., Pantel, K. Elevated keratin-18-protein expression indicates a favourable diagnosis in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2:1879-1885, 1996.
101. Schindlbeck, C., Kampik, T., Janni, W., Rack, B., Jeschke, U., Krajewski, S., Sommer, H., Friese, K. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 7:1174-1185, 2005.
102. Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B. et al. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:8672-8676, 1987.
103. Schlimok, G. Mikrometastasen epithelialer Tumoren im Knochenmark Immunzytochemischer Nachweis und *in-vivo* Markierung mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Ludwig-Maximilians-Universität München, Habilitationsschrift, 1988.
104. Schlimok, G., Riethmüller, G. Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow. *Semin Cancer Biol* 3:207-215, 1990.
105. Schlimok, G., Funke, I., Bock, B., Schweiberer, B., Witte, J., Riethmüller, G. Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization and prognostic significance. *J Clin Oncol* 8:831-837, 1990a.
106. Schlimok, G., Funke, I., Pantel, K., Lindemann, F., Witte, J., Riethmüller, G. Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: Methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer* 27:1461-1465, 1991.
107. Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T.J., Kaufmann, M., Diebold, J., Arnholdt, H., Muller, P., Bischoff, J., Harich, D., Schlimok, G., Riethmüller, G., Eils, R., Klein, C.A. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 13:7737-7742, 2003.
108. Schwarzenbach, H., Muller, V., Beeger, C., Gottberg, M, Stahmann, N., Pantel, K. A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor

- tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 9:R66, 2007a.
109. Schwarzenbach, H., Chun, FK., Lange, I., Carpenter, S., Gottberg, M., Erbersdobler, A., Friedrich, MG., Huland, H., Pantel, K. Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer. *Int J Cancer* 120:1465-1471, 2007b.
110. Schwarzenbach, H., Chun, FK., Muller, I., Seidel, C., Urban, K., Erbersdobler, A., Huland, H., Pantel, K., Friedrich, MG. Microsatellite analysis of allelic imbalance in tumour and blood from patients with prostate cancer. *BJU Int* 102:253-258, 2008.
111. Smith, B., Selby, P., Southgate, J., Pittman, K., Bradley, C. Blair, G. E. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 338:1227-1229, 1991.
112. Stahel, RA, Mabry, M., Skarin, AT., Speak, J., Bernal, SD. Detection of bone marrow metasis in small-cell lung cancer by monoclonal antibody. *J Clin Oncol* 3:455-61, 1985.
113. Stigbrand, T., Andrs, C., Bellanger, L., Bishr, O. M., Bodenmüller, H., Bonfrer, H., Brundell, J., Einarsson, R., Erlandsson, A., Johansson, A., Leca, J. F., Levi, M., Meier, T., Nap, M., Nustad, K., Seguin, P., Sjodin, A., Sundstrom, B., van Dalen, A., Wiebelhaus, E., Wiklund, B., Arlestig, L., Hilgers, J. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumour Biol* 19:132-152, 1998.
114. Sugio, K., Kase, S., Sakada, T., Yamazaki, K., Yamaguchi, M., Ondo, K., Yano, T. Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and betacatenin: risk assessment by immunohistochemistry. *Surgery* 131:226-231, 2002.
115. Thorban, S., Roder, J. D. Pantel, K., Siewert, J. R. Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with pancreatic carcinoma detected by immunocytochemical staining. *Eur J Cancer* 2:363-365, 1996.
116. Thorban, S., Roder, J. D., Nekarda, H., Funk, A., Pantel, K., Siewert, J. R. Disseminated epithelial tumor cells in bone marrow of patients with oesophageal cancer: detection and prognostic significance. *World J Surg* 5:567-572, 1996a.

117. Thorban, S., Roder, J. D., Siewert, J. R. Detection of micrometasis in bone marrow of pancreatic cancer patients. *Ann Oncol* 4:111-113, 1999.
118. Thorban, S., Rosenberg, R., Busch, R., Roder, R. J. Epithelial cells in bone marrow of oesophageal cancer patients: a significant prognostic factor in multivariate analysis. *Br J Cancer* 1:35-39, 2000.
119. Vona, G., Sabile, A., Louha, M., Sitruk, V., Romana, S., Schutze, K., Capron, F., Franco, D., Pazzagli, M., Vekemans, M., Lacour, B., Brechot, C. Isolation by size of epithelial tumour cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 156:57-63, 2000.
120. von Knebel Doeberitz, M., Gerbert, J., Herfarth, Ch. Der Einfluß molekularer Diagnoseverfahren auf die Therapie maligner Erkrankungen. *Chirurg* 67:967, 1996.
121. Weitz, J., Kienle, P., Magener, A., Koch, M., Schrödel, A., Willeke, F., Autschbach, F., Lacroix, J., Lehnert, T., Herfath, C., von Knebel Doeberitz, M. Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin Cancer Res* 5:1830-1836, 1999.
122. Wiedswang, G., Borgen, E., Karesen, R., Kvalheim, G., Nesland, J. M., Qvist, H., Schlichting, E., Sauer, T., Janbu, J., Harbitz, T., Naume, B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *Journal of Clin Oncol* 21:3469-3478, 2003.
123. Wiedswang, G., Borgen, E., Schirmer, C., Kaaresen, R., Kvalheim, G. Nesland, J. M. Naume, B. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer* 118:2013-2019, 2006.
124. Witzig T. E., Bossy, B., Kimlinger T. et al. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin Cancer Res* 8:1085-1091, 2002.
125. Zach, O. Lutz, D. Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow. *Curr Opin Oncol* 1848-56, 2006.
126. Zheng, S., Lin, H., Lui, JQ., Balic, M., Datar, R., Cote, RJ., Tai, YC. Membrane microfilter device for selective capture electrolysis and genomic

analysis of human circulating tumor cells. J Chromatogr A 1162:154-161, 2007.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Klaus Pantel, Direktor des Institutes für Tumorbologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, für seine wissenschaftliche Betreuung und sein stetiges Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Großer Dank gebührt auch Frau Dr. rer. nat. Sabine Riethdorf aus dem Institut für Tumorbologie für ihr unentwegt offenes Ohr für meine Unsicherheiten und Fragen, ihre produktive und zugleich konstruktive Kritik, die mich mehrfach zu weiterem Tatendrang angeregt und meine Arbeit bereichert hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Antje Andreas und Frau Malgorzata Stoupiec für die Hilfe in allen labortechnischen Fragen, die zahlreichen aufmunternden Worte und die Herzlichkeit, die sie mir entgegenbrachten, ebenfalls bedanken.

Herrn Dr. med. Pakula aus dem Archiv der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich sehr für die Bereitsstellung der klinischen Daten.

Dank gebührt auch allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Tumorbologie für die hilfreiche Unterstützung und das lustige Beisammensein.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinem Freund Patrick Paulat, der immer für mich da ist, mich wieder aufgebaut und ermuntert hat, diese Arbeit fertig zu stellen.

## Lebenslauf

### **Eidesstattliche Erklärung**

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

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

Unterschrift: .....