

Detektion und Charakterisierung von  
zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut  
von Patientinnen mit Ovarialkarzinom

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik  
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

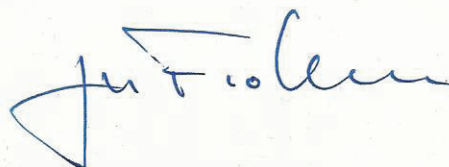
Iris Alpers

aus Hamburg

HAMBURG 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. K. Pantel  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. U. Wienand  
Tag der Disputation: 02. März 2012

Hamburg, den 22. Februar 2012

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Fromm', is written over a faint, illegible stamp or watermark.

Professor Dr. J. Fromm  
Vorsitzender des Promotionsausschusses  
Biologie

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von März 2006 bis Dezember 2011 im Institut für Tumorbiologie des Universitäts-Klinikums Hamburg-Eppendorf angefertigt.

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. med. Klaus Pantel  
Prof. Dr. rer. nat. Udo Wienand

Gutachter der Disputation: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Brandt  
Dr. rer. nat. Sabine Lüthje

Datum der Disputation: 02.03.2012

## *Zusammenfassung*

Das Ovarialkarzinom wird bei 75 % der Patientinnen erst in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO Stadium III und IV) diagnostiziert, da es keine Frühsymptome zeigt und sensitive Tumormarker bislang nicht verfügbar sind. In diesen späten Krankheitsstadien hat sich der Tumor bereits im Peritoneum ausgebreitet, welches eine umfangreiche chirurgische Behandlung und eine aggressive Chemotherapie notwendig macht. Bislang fehlen Parameter, die ein Wiederauftreten der Krebserkrankung und das Ansprechen auf die Chemotherapie anzeigen. Ziel ist es, den Therapieerfolg zum Zeitpunkt der Diagnose zu prognostizieren. So kann die Therapie der einzelnen Patientinnen auf die Aggressivität und Resistenz des Tumors hin angepasst werden. Der Nachweis und die molekulare Charakterisierung von im Blut zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) könnte hierbei einen wichtigen Beitrag leisten und helfen, den Mechanismus der intraperitonealen Ausbreitung sowie der Fernmetastasierung des Ovarialkarzinoms besser zu verstehen.

In dieser Arbeit wurden CTCs im Blut von Patientinnen mit Ovarialkarzinom durch Dichtegradientenzentrifugation sowie auf einer EpCAM (epitheliales Zelladhäsionsmolekül)-basierenden Zellseparation angereichert. Der CTC Nachweis erfolgte über epithelspezifische Zytokeratinproteine (CK 5/7/8/18). Zum Zeitpunkt der Operation wurden in 3,6 % (5 von 139) der Proben CTCs nachgewiesen, während sechs Monate nach Therapie in keiner (0 von 56) der Proben CTCs detektiert wurden. Die niedrigen Detektionsraten sowie die Expressionsergebnisse der Markerantigene von Primärtumor, Metastasen und Asziteszellen deuten darauf hin, dass die CTCs die Protein-Expression der epithelialen Marker verlieren und somit der Detektion entgehen können. Daher wurde in dieser Arbeit erfolgreich eine neue Methode für den Nachweis von CTCs etabliert, indem auf die EpCAM-basierende Anreicherung verzichtet wurde. Mit Hilfe der optimierten Nachweismethode wurden die CTCs durch mehrere Markerantigene (Zytokeratin 5/7/8/18, EpCAM, HER-2, EGFR, EMA) detektiert. Aufgrund der deutlich verbesserten Sensitivität erhöhten sich die Detektionsraten auf 26,3 % (30 von 112) für die Proben zum Zeitpunkt der Operation und auf 7,6 % (6 von 79) für die Proben sechs Monate nach Therapie.

Es zeigte sich, dass zum Zeitpunkt der Operation der positive CTC-Status signifikant mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen korrelierte (p-Wert: 0,006), was die klinische Relevanz der CTCs für die Fernmetastasierung des Ovarialkarzinoms belegte. In Blutproben, die sechs Monate nach der Therapie abgenommen wurden, war der



positive CTC-Status signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert (p-Wert 0,0001).

Für die Untersuchung genetischer Aberrationen wurden Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-Analysen (FISH-Analysen) für die Chromosomenbereiche 3q26 und 8q24 durchgeführt. Diese Abschnitte eignen sich besonders, da in therapieresistenten Tumoren für diese Bereiche häufig ein chromosomaler Zugewinn vorliegt. Anhand der FISH-Analysen konnte gezeigt werden, dass die immunzytochemisch detektierten Zellen genetische Aberrationen aufwiesen, was den malignen Ursprung dieser Zellen bestätigte. Außerdem wurden Zellen mit chromosomalem Zugewinn identifiziert, welche die Markerproteine nicht exprimierten. Somit zeigte sich, dass eine Subpopulation der CTCs die epithelialen Marker nicht exprimieren.

Aufgrund der hohen Anzahl von CTCs einer Probe konnten diese bezüglich der Expression der Markerproteine untersucht werden. Es zeigte sich, dass die CTCs nicht alle Markerproteine exprimierten und heterogen bezüglich der Proteinexpression waren. Über 90 % der CTCs dieser Probe waren negativ für EpCAM, während der kleinere Anteil EpCAM schwach exprimierte. Der Phänotyp der Zellen der Metastasen mit geringer EpCAM-Expression entsprach dem Großteil der CTCs und belegte somit die Hypothese, dass die EpCAM-Expression der CTCs beim Ovarialkarzinom nicht stabil ist. In dieser Arbeit wurden vergleichende Studien im Mausmodell durchgeführt. Im Blut von SCID-Mäusen, die nach Xenotransplantation von Zellen der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 Tumore im Peritoneum gebildet hatten, konnten ebenfalls CTCs nachgewiesen werden. Diese waren genau wie die CTCs der humanen Proben heterogen bezüglich des chromosomalen Bereiches 3q26 und größtenteils negativ für EpCAM. Dies spiegelte sich auch in den peritonealen Tumoren wider, die fast vollständig kein EpCAM exprimierten.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die CTCs sehr heterogen bezüglich chromosomalen Veränderungen und der Proteinexpression sind. Vergleichend mit Zellen des Primärtumors, scheinen die epithelialen Marker, insbesondere EpCAM, in CTCs vermindert vorzuliegen. In dieser Arbeit konnten somit erstmalig die CTCs des Ovarialkarzinoms genotypisch als auch phänotypisch vergleichend mit Primärtumor, Metastasen und Asziteszellen charakterisiert und ihre klinische Relevanz untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen maßgeblich dazu bei, das Wissen über die Bedeutung sowie die klinische Relevanz der CTCs und die Disseminierung beim Ovarialkarzinom zu erhöhen.

## *Abkürzungsverzeichnis*

AB-Serum	humanes Serum der Blutgruppe <b>AB</b>
APAAP	<b>Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase</b>
ATP	<b>Adenosin</b> triphosphat
bp	Basenpaare ( <i>base pairs</i> )
CA 125	<i>Cancer</i> -Antigen 125
ca.	circa
CD45	<i>cluster of differentiation</i> 45, Leukozytenantigen
CK	Zytokeratin
CTC	zirkulierende Tumorzelle ( <i>circulating tumor cell</i> )
Cy3	<i>Cyanine Dye 3</i>
DAB	3,3'- <b>Diaminobenzidin</b> -Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6'- <b>Diamidin</b> -2-phenylindol
ddNTPs	<b>Dideoxyribo</b> nukleosidtriphosphate
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	<b>Dimethylformamid</b>
DMSO	<b>Dimethylsulfoxid</b> s
DNA	Desoxyribo <b>nukleinsäure</b> ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTPs	<b>Desoxyribo</b> nukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DTC	disseminierte Tumorzelle ( <i>disseminated tumor cell</i> )
dUTPs	<b>Desoxyuridin</b> triphosphat
EDTA	<b>Ethylendiamin</b> tetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
EMA	epitheliale Membranantigen
EMT	<b>Epitheliale-Mesenchymale Transition</b> ( <i>epithelial-mesenchymal transition</i> )
EpCAM	epitheliale Zelladhäsionsmolekül ( <i>epithelial cell adhesion molecule</i> )
evtl.	eventuell
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF-b	<i>fibroblast growth factor-basis</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FISH	<b>Fluoreszenz in situ</b> Hybridisierung
FKS	<b>fetales Kälberserum</b> ,
g	<b>Gramm</b>
G	<i>Grading</i>
G1	hoch differenzierte Tumore
G2	mäßig differenzierte Tumore
G3	gering beziehungsweise undifferenzierte Tumore
h	Stunde
HE	<b>Hämatoxylin-Eosin</b>
HER-2	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 ( <i>epidermal growth factor receptor 2</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase
ICC	Immunzytochemie ( <i>immuncytochemistry</i> )
IST	<b>Insulin, Selen, Transferrin</b>
LB	<i>lysogeny broth</i>

LMP	niedrigem malignen Potential
LOH	Verlust der Heterozygotie ( <i>Loss of Heterozygosity</i> )
M	Metastasen-Status
M	Molar
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
mOsm	Milliosmol
MRD	minimale residuale Krebserkrankung ( <i>minimal residual disease</i> )
MUC-1	Mucin 1, entspricht EMA
N	Normal
N	Lymphknoten-Status ( <i>Nodes</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optischen Dichte
OVCAD	<i>Ovarian Cancer Diagnosis</i>
PAC	P1 abgeleitetes artifizielles Chromosomen ( <i>P1-derived artificial chromosome</i> )
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PSA	prostataspezifische Antigen
p-Wert	Wahrscheinlichkeits-Wert ( <i>probability</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
SCID	severe combined immunodeficiency
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
T	Tumor-Status
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline mit Tween 20</i>
TEC	Tris, EDTA, Citrat
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
TNM	Tumor-, Lymphknoten-, Metastasen-Status
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i>
UKE	Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
V	Volt
x g	Mehrfaches der Gravitation
Zent.	Zentromer

# *Inhaltsverzeichnis*

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Krebserkrankungen</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Eierstockkrebs</b>	<b>1</b>
1.2.1 Epidemiologie	1
1.2.2 Histologische Klassifikation des Eierstockkrebses	1
1.2.3 Diagnostik, Therapie und Prognose	3
1.2.4 Ursprung des Ovarialkarzinoms	4
<b>1.3 Metastasierung</b>	<b>6</b>
1.3.1 Metastatische Kaskade	6
1.3.2 Minimale residuale Krebserkrankung	8
1.3.3 Metastasierung beim Ovarialkarzinom	10
1.3.4 Methoden zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen	12
<b>1.4 Die OVCAD-(Ovarian Cancer Diagnosis) Studie</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Aufgabenstellung</b>	<b>15</b>
<b>2 Material</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Patientenproben</b>	<b>17</b>
<b>2.2 SCID-Xenograft-Mausproben</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Zelllinien</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Chemikalien und Bioreagenzien</b>	<b>18</b>
<b>2.5 Käuflich erworbene Kits</b>	<b>21</b>
<b>2.6 Antikörper und Streptavidin</b>	<b>21</b>
<b>2.7 Enzyme</b>	<b>22</b>
2.7.1 Restriktionsendonukleasen	22
2.7.2 Polymerase Kettenreaktion	22
<b>2.8 PAC-Klone und FISH-Sonden</b>	<b>23</b>
<b>2.9 Oligonukleotide</b>	<b>23</b>
<b>2.10 Puffer, Lösungen und Medien</b>	<b>23</b>
2.10.1 Allgemeine Puffer und Lösungen	24
2.10.2 Puffer und Lösungen für die Immunzytologie	24
2.10.3 Puffer und Lösungen für Immunhistochemie	26
2.10.4 Puffer und Lösungen für FISH-Analysen	26
2.10.5 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	27
2.10.6 Nährmedien für Bakterien	28
2.10.7 Zellkulturmedien für eukaryotische Zellen	28

2.10.8 Dichtegradientenmedien	29
<b>2.11 Laborgeräte</b>	<b>29</b>
2.11.1 Allgemeine Laborgeräte	29
2.11.2 Zentrifugen und Zubehör	30
2.11.3 Mikroskope und Zubehör	31
<b>2.12 Verbrauchsmaterial</b>	<b>31</b>
<b>2.13 Verwendete Programme und Datenbanken</b>	<b>32</b>
<b>3 Methoden</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Anreicherung und Detektion von zirkulierenden Tumorzellen aus peripherem Blut</b>	<b>33</b>
3.1.1 Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus peripherem Blut von Ovarialkarzinompatientinnen durch Dichtegradientenzentrifugation	33
3.1.2 Automatisierte immunmagnetische Anreicherung von CTCs durch das <i>CellSearch™ Profile Kit</i> unter Verwendung des <i>CellTracks® AutoPrep Systems</i>	34
3.1.3 Isolierung von SK-OV-3 CTCs aus dem Blut von SCID-Xenograft-Mäusen durch Ficoll-Paque™ Plus Dichtegradientenzentrifugation	35
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer	36
3.1.5 Anfertigung von Zytospinpräparaten	37
3.1.6 Immunzytochemisches Protokoll zur Detektion von CTCs unter Verwendung von anti-Zytokeratin Antikörpern	37
3.1.7 Immunzytochemisches Protokoll zur Detektion von CTCs unter Verwendung eines Antikörpercocktails	39
3.1.8 Immunzytochemisches Protokoll zur Detektion von SK-OV-3 CTCs der SCID-Xenograft-Maus-Proben unter Verwendung von HER-2- und EpCAM-Antikörpern	41
3.1.9 Auswertungsprotokoll der immunzytochemischen Detektion von CTCs aus peripherem Blut	42
<b>3.2 Immunzytochemische Charakterisierung der CTCs aus peripherem Blut und Asziteszellen</b>	<b>43</b>
3.2.1 Immunzytochemische Fluoreszenzdoppelfärbung zur Charakterisierung der CTCs	43
3.2.2 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Färbung	44
<b>3.3 Immunhistologische Analysen von Dünnschnitten aus in Paraffin eingebettetem Gewebe</b>	<b>46</b>
3.3.1 Anfertigung von Mikrotomschnitten	46
3.3.2 Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte	47
3.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten	47
3.3.4 Vorbehandlung der Gewebeschnitte für die Immunhistochemie	47
3.3.5 Nachweis der Antikörperbindung unter Verwendung des <i>DAKO REAL™ Detection System Kits</i>	49
3.3.6 Nachweis der Antikörperbindung unter Verwendung des <i>DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Kits</i>	50
3.3.7 Protokoll zur Zellkernfärbung mittels Mayers Hämalaunlösung	51
<b>3.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung</b>	<b>51</b>
3.4.1 Isolierung der PAC-DNA zur Herstellung der FISH-Sonden	51

3.4.2	Fluoreszenzmarkierung der FISH-Sonden	53
3.4.3	FISH an Zytospinpräparaten für die Chromosomenbereiche 3q26 und 8q24	53
3.4.4	FISH an Paraffingewebeschnitten von Karzinomgewebe für den Chromosomenbereich 3q26 und 8q24	55
3.4.5	Protokoll zur Auswertung der FISH-Analysen	57
<b>3.5</b>	<b><i>Molekularbiologische Methoden</i></b>	<b>58</b>
3.5.1	Isolierung genomischer DNA	58
3.5.2	Bestimmung der DNA Konzentration mittels NanoDrop ND-1000-Spektrometer	58
3.5.3	Amplifikation von DNA durch Polymerase Kettenreaktion	59
3.5.4	Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren	60
3.5.5	Restriktionsspaltung von DNA	60
3.5.6	DNA Sequenzierung	61
3.5.7	Aufreinigung von DNA	63
<b>3.6</b>	<b><i>Zellkulturmethoden</i></b>	<b>64</b>
3.6.1	Kultivierung von Tumorzelllinien und Asziteszellen	64
3.6.2	Kryokonservieren und Auftauen von Zellen	65
<b>3.7</b>	<b><i>Statistische Auswertung</i></b>	<b>66</b>
<b>4</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Darstellung der Verfahren zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen</i></b>	<b>67</b>
4.1.1	Etablierung eines zweistufigen Protokolls aus Dichtegradienten-zentrifugation und immunmagnetischer Zellseparation	67
4.1.2	Optimierung des Protokolls zur immunzytochemischen Detektion von Zytokeratin exprimierenden Zellen durch Antigendemaskierung	69
<b>4.2</b>	<b><i>Anwendung des optimierten Protokolls zur Detektion von CTCs in Blutproben eines Patientenkollektives mit rezidiviertem Ovarialkarzinom</i></b>	<b>70</b>
<b>4.3</b>	<b><i>Detektion von CTCs in Blutproben der OVCAD-Studie von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom</i></b>	<b>72</b>
4.3.1	Analyse der Blutproben der OVCAD-Studie von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom	72
4.3.2	Statistische Auswertung des CTC Nachweises in Korrelation mit klinischen Daten und dem Therapieverlauf	73
<b>4.4</b>	<b><i>Analyse der Protein-Expression der epithelialen Proteine EpCAM und Zytokeratin von primären und kultivierten Asziteszellen des Ovarialkarzinoms</i></b>	<b>76</b>
<b>4.5</b>	<b><i>Verwendung eines SCID-Maus-Xenograft-Modells zur Untersuchung des Phänotyps der hämatogen disseminierten CTCs beim Ovarialkarzinom</i></b>	<b>79</b>
4.5.1	Immunzytochemische Detektion von SK-OV-3 CTCs aus dem Blut von SCID-Xenograft-Mäusen	79
4.5.2	Bestätigung des Nachweises von SK-OV-3 CTCs im Blut der SCID-Xenograft-Mäuse durch Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierungs-Analysen	81

<b>4.6 Detektion von CTCs in Blutproben der OVCAD-Studie von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom durch Verwendung eines modifizierten Detektionsprotokolls</b>	<b>85</b>
4.6.1 Optimierung des Protokolls zur immunzytochemischen Detektion der CTCs durch Verwendung eines Antikörpercocktails	86
4.6.2 Analyse von Blutproben der OVCAD-Studie unter Verwendung des modifizierten Protokolls	88
4.6.3 Statistische Auswertung des CTC Nachweises unter Verwendung des modifizierten Protokolls in Korrelation mit klinischen Daten und dem Therapieverlauf	90
4.6.4 Detektion von nicht klar einzuordnenden fraglichen Zellen und ihre klinische Bedeutung	95
<b>4.7 Nachweis von chromosomalen Zugewinnen in CTCs durch FISH-Analysen</b>	<b>97</b>
4.7.1 Evaluierung der FISH-Sonden durch Analysen an Leukozyten von gesunden Spendern	98
4.7.2 FISH-Analysen an immunzytochemisch durch den Antikörpercocktail detektierten CTC positiven Proben der OVCAD-Studie	100
4.7.3 Bestätigung von immunzytochemisch schwach positiv detektierten CTCs aus den Blutproben einer Patientin beider Zeitpunkte Q und H durch FISH-Analysen	101
4.7.4 FISH-Analyse einer Probe mit immunzytochemisch als fraglich klassifizierten Zellen	103
<b>4.8 Analysen der chromosomalen Aberrationen der Bereiche 3q26 und 8q24 der CTCs der Probe B151Q im Vergleich zum Primärtumor</b>	<b>104</b>
<b>4.9 Analysen der Antigenexpression und chromosomalen Aberrationen der CTCs der Probe H071Q im Vergleich zum Primärtumor, Metastasen und Asziteszellen</b>	<b>106</b>
4.9.1 Immunzytochemische Charakterisierung der CTCs	107
4.9.2 Vergleich der Protein-Expression von EpCAM und Zytokeratin von Primärtumor, Milz- und Lebermetastase	109
4.9.3 Vergleichende FISH-Analysen der Bereiche 3q26 und 8q24 zwischen CTCs, Primärtumor, Milz- und Lebermetastasen und Asziteszellen	110
4.9.4 Nachweis einer tumorspezifischen Mutation des <i>p53</i> -Gens aus genomischer DNA der Blutprobe H071Q	114
<b>5 Diskussion</b>	<b>118</b>
<b>5.1 Bedeutung der hämatogenen Disseminierung beim Ovarialkarzinom</b>	<b>119</b>
<b>5.2 Diskussion der Methoden zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen</b>	<b>120</b>
5.2.1 Ursprüngliches, zweistufiges Protokoll mit EpCAM und Zytokeratin als Detektionsmarker	120
5.2.2 Modifiziertes einstufiges Protokoll zur Detektion von CTCs durch Verwendung eines Antikörpercocktails	122
<b>5.3 Diskussion der Detektionsrate von CTCs im peripheren Blut beim Ovarialkarzinom</b>	<b>123</b>
<b>5.4 Prognostische Bedeutung von CTCs im peripheren Blut beim Ovarialkarzinom</b>	<b>126</b>
<b>5.5 Bedeutung der Detektion von nicht klar einzuordnenden fraglichen Zellen</b>	<b>128</b>
<b>5.6 Phänotypische und genotypische Heterogenität der CTCs beim Ovarialkarzinom</b>	<b>130</b>
5.6.1 Heterogenität der Expression der Markerproteine zur Detektion der CTCs	130
5.6.2 Heterogenität von chromosomalen Zugewinnen in CTCs	132

<i>5.7 Diskussion des Fallbeispiels H071 zur Untersuchung der hämatogenen Disseminierung des Ovarialkarzinoms</i>	<i>134</i>
<i>5.8 Mögliche hämatogene Disseminierungswege beim Ovarialkarzinom</i>	<i>136</i>
<i>5.9 Ausblick</i>	<i>137</i>
<i>6 Literaturverzeichnis</i>	<i>139</i>
<i>7 Abbildungsverzeichnis</i>	<i>145</i>
<i>8 Tabellenverzeichnis</i>	<i>147</i>
<i>9 Anhang</i>	<i>149</i>
<i>9.1 p53-Sequenz der PCR-Amplifikate</i>	<i>149</i>
<i>9.2 Aligment der Sequenz von Exon 8 des p53-Gens</i>	<i>150</i>
<i>9.3 Klinische Daten des Patientenkollektives der OVCAD-Studie</i>	<i>150</i>
<i>10 Danksagung</i>	<i>152</i>
<i>11 Eidesstattliche Versicherung</i>	<i>153</i>



# ***1 Einleitung***

## ***1.1 Krebserkrankungen***

Krebserkrankungen sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Jedes Jahr werden in Europa etwa 3 Millionen Krebsfälle neu diagnostiziert und etwa 1,7 Millionen Menschen versterben jährlich an den Folgen der Krebserkrankung. Solide Tumore, die von epithelialen Geweben abstammen, repräsentieren den Hauptanteil mit ungefähr 2,7 Millionen neu diagnostizierten Krebsfällen in Europa pro Jahr (Ferlay *et al.*, 2010). Krebs bezeichnet eine Gruppe von bösartigen Erkrankungen, die aus unkontrollierten Teilungen von Zellen resultieren. Die Zellen dieser entstandenen Tumore haben die Fähigkeit erlangt, der Wachstumskontrolle des Organismus zu entgehen. Komplexe Basisprozesse wie Zellteilung, Apoptose und Zellmigration sind fehlreguliert. Maligne Tumore wachsen invasiv, indem sie die normalen Gewebebarrieren überwinden und in umliegende Gewebe eindringen. Weiterhin sind sie in der Lage, in entfernte Organe zu streuen, sie metastasieren (Wagener und Müller, 1999).

## ***1.2 Eierstockkrebs***

### **1.2.1 Epidemiologie**

Eierstockkrebs ist die fünft häufigste Krebstodesursache und die häufigste Todesursache bei gynäkologischen Malignomen. In Deutschland erkranken jährlich ungefähr 9.600 Frauen neu an einem malignen Tumor der Eierstöcke. Das Lebenszeitrisiko einer Frau an Eierstockkrebs zu erkranken, liegt etwa bei 1,8 % (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2008).

### **1.2.2 Histologische Klassifikation des Eierstockkrebses**

Die histologische Klassifikation von Ovarialtumoren durch die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) basiert auf der Histogenese der Eierstöcke (Scully, 1975). Aufgrund ihrer Abstammung werden die Neoplasien des Ovars

in epitheliale, Stroma- und Keimzelltumore klassifiziert. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung aller Neoplasien in gut- (benigne) und bösartige (maligne) Tumore sowie Borderline-Tumore (Tumore mit niedrigem malignen Potential (LMP)) (Kaku *et al.*, 2003; Kaufmann *et al.*, 2006). Aus histologischer Sicht sind Ovarialtumore sehr heterogen. Etwa zweidrittel aller Ovarialneoplasien sind epithelialen Ursprungs. Die epithelialen Tumore, die Karzinome, machen mit etwa 85-90 % den Hauptanteil der malignen Ovarialtumore aus. Aufgrund der vorherrschenden Differenzierung der Tumorzellen werden die Tumore weiter unterteilt (Soslow, 2008). Die vier häufigsten histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms sind seröse, muzinöse, endometrioider und Klarzellkarzinome (siehe Tabelle 1.1) (Seidman *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2006).

**Tabelle 1.1: Histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms.**

Histologische Subtypen	Histologische Ähnlichkeit	Häufigkeit
Seröser Tumor	Tubenepithel	50-85 %
Muzinöser Tumor	Endozervix	3-20 %
Endometrioider Tumor	Endometrium	8-19 %
Klarzelliger (= hellzelliger) Tumor	Mesonephroid	ca. 5%
Transitionalzelliger Tumor	Urothel	sehr selten
Undifferenzierter Tumor	keine	5-30 %

Die Vielfalt im Erscheinungsbild ist Ausdruck der verschiedenen Differenzierungspotenzen des Zölomepithels, von dem das Oberflächenepithel des Ovars abstammt (Auersperg *et al.*, 2001). Mit etwa 50-85 % der Ovarialkarzinome kommen seröse Tumore am häufigsten vor (Seidman *et al.*, 2004). Seröse Ovarialtumore sind gekennzeichnet durch zystische Hohlräume, die von einem serösen Epithel ausgekleidet und mit gelblicher Flüssigkeit gefüllt sind. Sie zeichnen sich durch eine frühzeitige Ausdehnung über das ganze Abdomen sowie durch eine frühe lymphatische Metastasierung aus (Meerpohl und Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie, 1993). Nach histopathologischem *Grading* unterscheiden sich die Tumore in hoch differenzierte (G1), mäßig differenzierte (G2) und gering beziehungsweise undifferenzierte (G3) Tumore. Ovarialkarzinome werden mittels TNM- (Tumor-, Lymphknoten-, Metastasen-Status) und FIGO- (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) Klassifikation eingeteilt (Pecorelli *et al.*, 1999). Die FIGO-Klassifikation ist eine klinische Stadieneinteilung gynäkologischer Tumore basierend auf Lokalisation und Ausdehnung. Eine Übersicht zur Stadieneinteilung gibt Tabelle 1.2.

**Tabelle 1.2: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms (TNM-Klassifikation und FIGO-Stadium).**

**TX:** Primärtumor kann nicht beurteilt werden; **T0:** kein Primärtumor; **T1:** Tumor begrenzt auf Ovarien; **T2:** Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus; **T3:** Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien, mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens; **MX:** Fernmetastasen können nicht beurteilt werden; **M0:** Keine Fernmetastasen; **M1:** Fernmetastasen; **NX:** Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden; **N0:** Keine regionäre Lymphknotenmetastasen; **N1:** Regionäre Lymphknotenmetastasen (Verändert nach Kaufmann *et al.*, 2006).

TMN-Klassifikation	FIGO-Stadium	Befundsituation
<b>T1, N0, M0</b>	<b>I</b>	<b>Tumor begrenzt auf Ovarien</b>
T1a, N0, M0	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b, N0, M0	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien
T1c, N0, M0	IC	Tumor begrenzt auf ein Ovar oder beide Ovarien mit Kapselruptur, Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
<b>T2, N0, M0</b>	<b>II</b>	<b>Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus</b>
T2a, N0, M0	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n)
T2b, N0, M0	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
T2c, N0, M0	IIC	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
<b>T3, N0, M0; oder jedes T, N1, M0</b>	<b>III</b>	<b>Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien, mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen</b>
T3a, N0, M0	IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b, N0, M0	IIIB	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung $\leq 2$ cm
T3c, N0, M0; oder jedes T, N1, M0	IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens oder N1, größte Ausdehnung $> 2$ cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>jedes T und N, M1</b>	<b>IV</b>	<b>Fernmetastasen (ausgenommen Peritonealmetastasen)</b>

### 1.2.3 Diagnostik, Therapie und Prognose

Es gibt bislang keine effektive *Screening*-Methode, um das Ovarialkarzinom in einem frühen Krankheitsstadium diagnostizieren zu können (Joyner und Runowicz, 2009). Gerade bei dem Ovarialkarzinom ist die Wirksamkeit klassischer Diagnoseverfahren sehr eingeschränkt. Zwar wird seit einigen Jahren als Tumormarker das Glycoprotein CA 125 (*Cancer-Antigen 125*) im Serum der Patientinnen zur Diagnose herangezogen, doch ist dessen Aussagekraft limitiert (Nossov *et al.*, 2008). Der Marker CA 125 ist zwar

hilfreich für die Kontrolle des Therapieansprechens aber zu unspezifisch für die Frühdiagnose (van der Burg *et al.*, 1992). Da die Erkrankung im frühen Stadium in der Regel keine Beschwerden verursacht und eine effektive *Screening*-Methode zur Diagnose früher Krankheitsstadien nicht existiert, wird das Ovarialkarzinom meist diagnostiziert, wenn die Erkrankung nicht mehr auf die Ovarien beschränkt ist. Erst in späten Krankheitsstadien, wenn der Bauchumfang der Patientinnen infolge des Tumorstadiums sowie durch das häufige Vorkommen von reichlich Aszitesflüssigkeit (Erguss in der freien Bauchhöhle) zunimmt und daraus folgend Beschwerden auftreten, wird das Ovarialkarzinom diagnostiziert. Bei etwa 75 % der Betroffenen erfolgt die Diagnose erst in einem sehr späten Stadium (FIGO III und IV) (Marsden *et al.*, 2000). Diese spät diagnostizierten Patientinnen haben eine schlechte Krankheitsprognose, etwa 75 % versterben innerhalb fünf Jahre nach Diagnosestellung. Bei 25 % der Patientinnen tritt ein Rezidiv der Erkrankung innerhalb von sechs Monaten nach Beendigung der Therapie auf (Bast, 2003). Wird die Erkrankung dagegen im frühen Krankheitsstadium FIGO I diagnostiziert, können mehr als 90 % nach erfolgter Therapie geheilt werden (Bast, 2003). Die Standardbehandlung beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom ist eine primäre Operation mit dem Ziel einer vollständigen Tumorresektion. Ein postoperativer Tumorrest ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (du Bois *et al.*, 2009). Anschließend folgt eine Platin- und Paclitaxel-basierte Chemotherapie (Marsden *et al.*, 2000).

#### 1.2.4 Ursprung des Ovarialkarzinoms

Der Ursprung des Ovarialkarzinoms wird zurzeit stark diskutiert. Nach einem neuen Modell nach Kurman *et al.* können Ovarialkarzinome nach histologischen Aspekten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Gruppen unterscheiden sich deutlich in ihrer Aggressivität. Die erste Gruppe umfasst endometrioides, muzinöses, Klarzell- und gut differenzierte seröse Karzinome. Diese Tumore zeichnen sich durch genetische Stabilität aus. Sie entwickeln sich stufenweise und haben eine niedrige Wachstumsrate. Zu der zweiten Gruppe zählen mäßig und schlecht differenzierte seröse Karzinome. Sie repräsentieren mit etwa 75 % den Hauptanteil aller Ovarialkarzinome und sind für 90 % der Todesfälle verantwortlich. Sie sind genetisch instabil und haben ein schnelles Tumorstadium (Piek *et al.*, 2004; Kurman *et al.*, 2008).

Diese der zweiten Gruppe zugehörigen serösen Karzinome des Ovars werden fast immer im späten, weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert. In diesen späten Krankheitsstadien hat sich das Karzinom bereits über benachbarte peritoneale Oberflächen ausgebreitet, und das Karzinom hat das Becken befallen einschließlich ovariellen Oberflächen, dem distalen Tubenepithel und der peritonealen Auskleidung. Seröse Ovarial-, Tuben- und Peritonealkarzinome sind sich in ihrer Morphologie und ihrem klinischen Verhalten sehr ähnlich. Entwicklungsbiologisch stammen die Gewebe alle vom mesodermalen Zölomepithel ab. In weit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung ist der Ursprung schwer auszumachen, da gewöhnlich die Eierstöcke, Eileiter als auch die Abdominalhöhle vom Tumor befallen sind. Es existieren drei Hypothesen bezüglich des Ursprungs dieser Tumore. Ursprungsort könnten demnach das Oberflächenepithel der Ovarien, das Epithel der Eileiter oder das sekundäre Müller-System sein (Piek *et al.*, 2004).

Nach der traditionellen Theorie entsteht das Ovarialkarzinom aus dem Oberflächenepithel des Ovars oder aus Inklusionszysten (Feeley und Wells, 2001). Diese Theorie wird von einigen Studien gestützt, in welchen spezifische genetische Läsionen des Oberflächenepithels der Ovarien im Mausmodell Karzinome induzierten (Orsulic *et al.*, 2002; Flesken-Nikitin *et al.*, 2003). Auch morphologische und genetische Analysen deuten darauf hin, dass das Oberflächenepithel der Ovarien Entstehungsort dieser Ovarialtumore sein könnte (Auersperg *et al.*, 1997; Shih Ie und Kurman, 2004).

Das Oberflächenepithel der Ovarien ist ein modifiziertes Mesothel, welches die Ovarien umschließt. Sowohl feinstrukturell als auch histochemisch unterscheidet sich das ovarielle Oberflächenepithel nicht vom Peritonealepithel. Entwicklungsgeschichtlich leiten sich beide vom Zölomepithel (Müller-Epithel, Mesothel) ab, aus dem auch das Epithel von Tube und Uterus hervorgeht (Auersperg *et al.*, 2001). Aufgrund der gemeinsamen Abstammung vom Zölomepithel bilden die epithelialen Ovarialtumore mit den Tumoren des pelvinen Peritoneums, der Eileiter und des Uterus eine histogenetische Einheit (Müller-Tumore) (Kaufmann *et al.*, 2006). Neueste Studien deuten allerdings darauf hin, dass die Ovarien vielfach nicht der Entstehungsort seröser Ovarialkarzinome sind (Dubeau, 2008). Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die distalen Eileiter oder genauer die Epithelzellen des Fimbrientrichters Ursprungsort zahlreicher schlecht differenzierter seröser Ovarial-, Tuben- und Peritonealkarzinome sind (Piek *et al.*, 2004; Crum *et al.*, 2007; Dubeau, 2008).

### **1.3 Metastasierung**

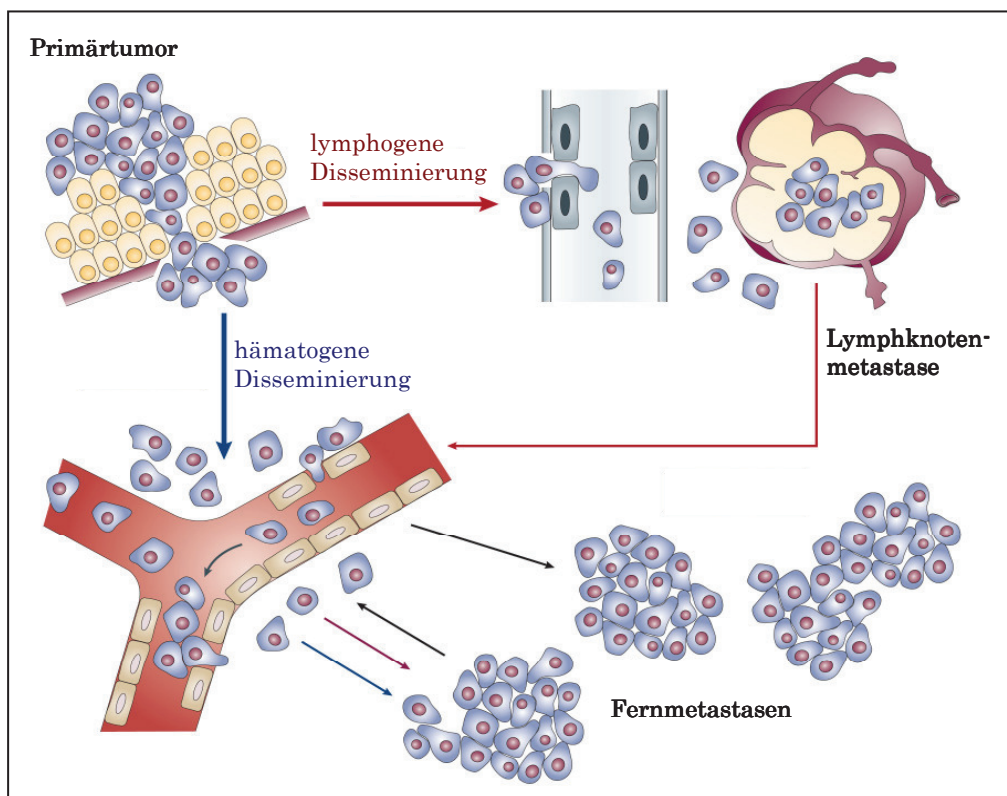
Unter Metastasierung wird die Streuung von Tumorzellen des Primärtumors und die Bildung von Tochter Tumoren (Metastasen) an entfernten Stellen des Körpers verstanden. Etwa 90 % der durch Krebs hervorgerufenen Todesursachen basieren auf der metastatischen Streuung des Primärtumors (Mehlen und Puisieux, 2006). Krebsmetastasen entstehen, wenn sich Zellen von einem primären oder metastatischen Tumor ablösen, in den Blutkreislauf oder das Lymphsystem eintreten und an anderen distanten Stellen im Körper zu wachsen beginnen. Die Metastasierung kann hämatogen, über den Blutweg oder lymphogen mit dem Lymphstrom erfolgen (Pantel *et al.*, 2009). Weiterhin können Metastasen direkt innerhalb von Körperhöhlen (zum Beispiel in der Peritonealhöhle) oder durch Implantation (Verschleppung von Tumorzellen zum Beispiel bei chirurgischen Eingriffen) entstehen (Shimizu *et al.*, 2004; Naora und Montell, 2005).

#### **1.3.1 Metastatische Kaskade**

Das traditionelle Metastasierungsmodell geht davon aus, dass nur wenige Zellen die Fähigkeit zu metastasieren besitzen und diese in späten Stadien der Erkrankung entstehen (Fidler, 2003). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen der Metastasen genetisch als auch phänotypisch von den Zellen des zugehörigen Primärtumors unterscheiden. Dies lässt den Schluss zu, dass Subpopulationen des Primärtumors in einem späten Krankheitsverlauf metastatische Eigenschaften erlangen können (Fidler und Kripke, 1977; Pantel und Brakenhoff, 2004). Neuere Studien deuten allerdings darauf hin, dass die meisten Zellen des Primärtumors einen metastatischen Phänotyp besitzen und die Streuung früh in der Tumorgenese stattfindet (Bernards und Weinberg, 2002). Die Entstehung der distanten Metastasen erfordert einige funktionale Ereignisse, zu denen Tumorzellinvasion, das Überleben von zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) im Blutsystem sowie die Ansiedlung (*Homing*) der Tumorzellen an distanten Orten mit folgendem Tumorwachstum zählen (Wikman *et al.*, 2008). Um zu metastasieren, müssen Zellen des Primärtumors invasive und migratorische Eigenschaften besitzen beziehungsweise diese erlangen. Durch Aktivierung oder Sekretierung verschiedener Proteasen wird die Basalmembran und die Extrazelluläre Matrix zerstört, so dass die Tumorzellen entweder ins Blutsystem oder Lymphsystem gelangen können (Ahmad und Hart, 1996; Maheswaran und Haber, 2010).



Um im Lymph- oder Blutsystem überleben zu können, müssen disseminierte Zellen in der Lage sein, großen Scherkräften in der Zirkulation standzuhalten und sowohl dem Immunsystem als auch dem programmierten Zelltod (Apoptose) zu entgehen. Apoptose wird normalerweise durch den Verlust des Zell-Zell Kontaktes und der Zell-Matrix Interaktionen induziert (Mehlen und Puisieux, 2006). Es wird vermutet, dass die Zellen in der Zirkulation ihren epithelialen Phänotyp verlieren und mesenchymal differenzieren. Dieser Prozess wird als Epitheliale-Mesenchymale Transition (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) bezeichnet. In der Embryonalentwicklung ist die EMT ein wichtiger physiologischer Vorgang. Während der EMT durchlaufen die epithelialen Zellen mehrere biochemische Veränderungen, wodurch diese einen mesenchymalen Phänotyp erlangen. Durch diese Veränderung werden die Zellen invasiver, sie erlangen migratorische Fähigkeiten und können der Apoptose entgehen (Kalluri und Weinberg, 2009).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der metastatischen Kaskade.** Zellen des Primärtumors, die genetische Veränderungen tragen, haben invasive und migratorische Fähigkeiten erlangt. Somit können sie die Basalmembran zerstören und ins umliegende Stroma eindringen. Diese Tumorzellen können die Extrazelluläre Matrix sowie Gefäßwände zerstören und entweder ins Blutsystem (blaue Pfeile) oder Lymphsystem (rote Pfeile) eindringen. Durch die hämatogene Disseminierung gelangen Tumorzellen an distante Orte und Fernmetastasen können entstehen. Weiterhin können auch Tumorzellen der Metastasen ins Blutsystem gelangen (schwarze Pfeile), wodurch weitere Fernmetastasen entstehen können. Lymphogen disseminierte Tumorzellen gelangen in Lymphknoten und nach Proliferationen bilden sich Lymphknotenmetastasen. Zellen der Lymphknotenmetastase können darüber hinaus in distante Organe disseminieren und Fernmetastasen bilden (verändert nach Pantel und Brakenhoff, 2004).

Es existieren zwei Modelle zur metastatischen Streuung von Tumorzellen (siehe Abbildung 1.1) (Pantel und Brakenhoff, 2004). Im ersten Modell disseminieren Tumorzellen in frühen Krankheitsstadien sowohl hämatogen als auch lymphogen. Nach Zellteilungen entstehen Lymphknotenmetastasen, während hämatogen disseminierte Zellen sterben oder in einem inaktiven „schlafenden“ (*dormant*) Zustand verbleiben. In späteren Krankheitsstadien metastasieren die Zellen der Lymphknotenmetastasen hämatogen und es entstehen Fernmetastasen. In diesem späten Krankheitsstadium kann die hämatogene Disseminierung vom Primärtumor, den Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen erfolgen. Diese Theorie stützt sich auf die Tatsache, dass das Vorkommen von Fernmetastasen häufig mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen korreliert, wie es zum Beispiel bei Kopf-Hals Karzinome der Fall ist (Leemans *et al.*, 1993). Das zweite Modell besagt, dass Tumorzellen in einer hohen Frequenz direkt und hauptsächlich hämatogen disseminieren, ohne zwingend vorher Lymphknotenmetastasen gebildet zu haben. Dieses Modell scheint für die Metastasierung bei Brustkrebs am wahrscheinlichsten zuzutreffen, da 20-30 % der Brustkrebspatientinnen ohne Tumorbefall der Lymphknoten, Fernmetastasen im Verlauf der Erkrankung entwickeln (Braun *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Minimale residuale Krebserkrankung

Die minimale residuale Krebserkrankung (*minimal residual disease*, MRD) ist als das Vorhandensein von Krebszellen, die nach Entfernung des primären Tumors durch Routinediagnostik nicht detektierbar sind, definiert (Pantel *et al.*, 2008). Diese Tumorzellen werden im Allgemeinen im Knochenmark disseminierte Tumorzellen (*disseminated tumor cells*, DTCs) und im Blutsystem CTCs genannt (Pantel und Brakenhoff, 2004; Pantel *et al.*, 2008). Der Begriff DTCs wird zudem noch allgemeiner verwendet und beschreibt sowohl Tumorzellen, die sich im Knochenmark, Lymphsystem als auch im Blutsystem befinden.

Die Disseminierung von Tumorzellen in das Knochenmark ist heutzutage weitestgehend als ein unabhängiger prognostischer Marker bestätigt (Vogel *et al.*, 2002; Wolfle *et al.*, 2006; Wikman *et al.*, 2008). In letzter Zeit wird zusätzlich die klinische Signifikanz von disseminierten Tumorzellen im peripheren Blut untersucht (Cristofanilli *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2006). Vor etwa 150 Jahren wurden erstmals epitheliale Tumorzellen im Blut einer Brustkrebspatientin identifiziert (Ashworth *et al.*, 1869). Seitdem konnte



gezeigt werden, dass CTCs ein entscheidendes Bindeglied zwischen Primärtumor und metastatischer Erkrankung ist (Maheswaran und Haber, 2010). Der Mechanismus, der dazu führt, dass Krebszellen in die Blutzirkulation gelangen, ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Es wird aber vermutet, dass ihr Vorhandensein Voraussetzung für die Entstehung von hämatogenen Metastasen ist (Pantel und Brakenhoff, 2004). Daher liegt es nahe, dass die Identifikation der CTCs ein Biomarker für den metastatischen Krankheitsverlauf sein könnte (Attard und de Bono, 2011). Eine signifikante Assoziation zwischen CTC Anzahl und Gesamtüberleben konnte bereits für mehrere Tumorentitäten (Brust-, Prostata- und Kolorektalkrebs) gezeigt werden (Cristofanilli, 2006; Cohen *et al.*, 2008; de Bono *et al.*, 2008).

Der Nachweis von CTCs im Blut ist von besonderer Bedeutung, da das Blut einen dynamischen Prozess widerspiegelt. Patel *et al.* konnten zeigen, dass die Überlebenszeit von CTCs im Blut von bis zu 24 Stunden relativ kurz ist, vergleichend mit DTCs, die mehrere Jahre überleben können (Patel *et al.*, 2002). Die Detektion der CTCs legt somit die Vermutung nahe, dass ein permanenter Zufluss von Tumorzellen in das Blutsystem stattfindet. Klinische Studien konnten in den letzten Jahren zeigen, dass CTCs am häufigsten bei fortgeschrittener Krebserkrankung nachgewiesen werden (Riethdorf *et al.*, 2007; Maestro *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2010). Weiterhin wurde der prognostische Wert von CTCs bei nicht metastasierten Brustkrebspatientinnen anhand einer Langzeitstudie von Wülfing *et al.* evaluiert. Bei etwa 50 % der Patientinnen konnten CTCs nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Präsenz und die Anzahl von HER-2 positiven CTCs mit einem signifikant verkürzten krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben korreliert (Wülfing *et al.*, 2006).

Zusätzlich zur prognostischen Relevanz könnte der Nachweis von CTCs auch eine Beurteilung von Therapieerfolg als auch einen frühzeitigen Nachweis der Tumorneubildung ermöglichen. Somit könnte die Detektion von CTCs eine vielversprechende neue Diagnostikmethode werden, um bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium den Krankheitsverlauf und Therapieerfolg verfolgen zu können. Eine Rezidivkrankung könnte somit frühzeitig diagnostiziert werden (Cristofanilli und Mendelsohn, 2006; Hayes *et al.*, 2006).

In einer Studie von Schmidt *et al.* wurde im peripheren Blut von Prostatakrebspatienten PSA-positive CTCs isoliert und unter Verwendung von Antikörpern immunphänotypisch charakterisiert. Es wurden in der Studie zwei Hauptpopulationen von Zellen aus dem Blut von Prostatakrebspatienten identifiziert. Zum einen wurden in 35% der untersuchten Blutproben rundgeformte Zellaggregate potentieller Krebszellen

entdeckt, welche Proliferations-assoziierte, nicht aber Apoptose-assoziierte Proteine exprimierten. Weiterhin wurden in fast jeder Probe eine große Anzahl zirkulierender dysmorpher Zellkluster nachgewiesen, die positiv für die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen waren. Die Studie zeigte, dass die CTCs einen heterogenen Phänotyp besitzen und nur eine Subpopulation die Eigenschaften zur metastatischen Streuung haben (Schmidt *et al.*, 2004). In einer weiteren Studie von Schmidt *et al.* wurden die detektierten CTCs von Prostatakrebspatienten und verschiedenen *Foci* des Primärtumors mittels Mikrosattelitenanalysen untersucht und verglichen. Durch die Ergebnisse konnte die Hypothese unterstützt werden, dass bei Prostatakrebs die CTCs von distinkten *Foci* des Primärtumors stammen. Außerdem zeigte die Studie, dass die Größe des Tumorfokus nicht in Relation zur Disseminierung von Tumorzellen steht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Heterozygotität (*Loss of Heterozygoty*, LOH) der Gene *PTEN* und *BRCA1* mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl mit dem Auftreten von CTCs im peripheren Blut von Prostatapatienten als auch mit einem frühen biochemischen Rezidiv assoziiert waren (Schmidt *et al.*, 2006). Somit lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die molekulare Charakterisierung von CTCs im peripheren Blut von Patienten, die an soliden Tumoren leiden, das Potential hat, spezifische Krebsdiagnostik für die Therapieprognose zu werden.

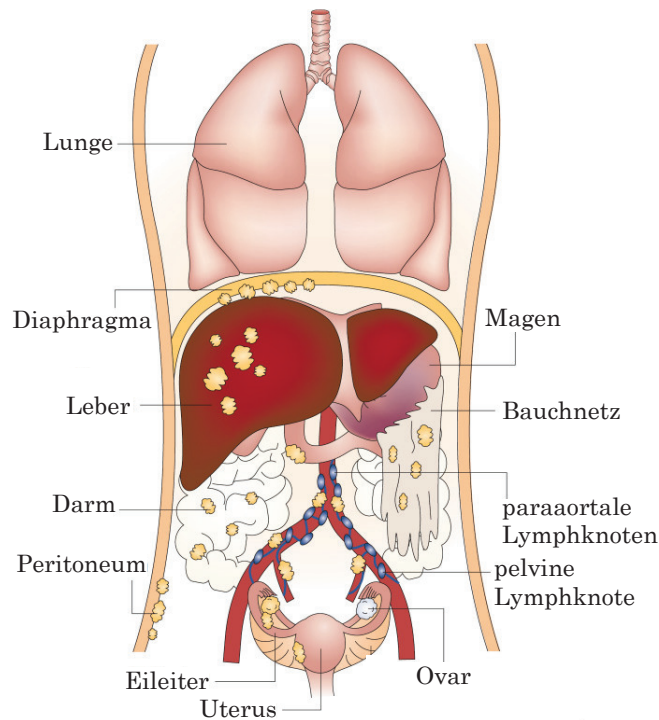
Da CTCs sehr heterogen sind, könnte eine genaue molekulare Charakterisierung dieser Zellen zur Identifikation von diagnostisch und therapeutisch relevanten Zielstrukturen führen (Klein *et al.*, 2002; Fehm *et al.*, 2009; Swennenhuis *et al.*, 2009). Das könnte neue und individuelle Therapieformen ermöglichen. Weiterhin könnte die Entwicklung der Einzelzelltechnologie ein *Profiling* der Zellen ermöglichen, wodurch die Therapieform angepasst werden könnte (Eliane *et al.*, 2008). Die aktuelle CTC-Forschung fokussiert sich auf die Identifikation von neuen diagnostischen und therapeutischen Biomarkern, die von diesen Zellen synthetisiert werden (Diamandis *et al.*, 2011).

### 1.3.3 Metastasierung beim Ovarialkarzinom

Die Metastasierung beim Ovarialkarzinom unterscheidet sich stark im Vergleich zu Karzinomen anderer Organe (Chambers *et al.*, 2002; Pantel und Brakenhoff, 2004).

Ovarialkarzinome breiten sich hauptsächlich mit der Zirkulation der Peritonealflüssigkeit in der Peritonealhöhle aus (siehe Abbildung 1.2). Weiterhin kann sich das Ovarialkarzinom direkt durch Ausweitung in benachbarte Organe wie Uterus und

Eileiter ausbreiten (Naora und Montell, 2005). Die Peritonealhöhle ist die größte Körperhöhle, in der sich die Bauchorgane wie unter anderem die Ovarien, der Uterus, die Leber und der Darm befinden. Ausgekleidet wird die Peritonealhöhle von mesothelialen Zellen des Peritoneums (Feki *et al.*, 2009). Der komplexe Mechanismus der intraperitonealen Disseminierung ist noch nicht vollständig geklärt. Er beinhaltet das Ablösen der Zellen vom Primärtumor, Migration und Implantation (Tan *et al.*, 2006). Tumorzellen, die sich vom Primärtumor abgelöst haben, können innerhalb der peritonealen Höhle durch die peritoneale Flüssigkeit transportiert werden. Diese Streuung in der Bauchhöhle ist häufig mit einer Aszitesbildung (Erguss in der freien Bauchhöhle) assoziiert (Naora und Montell, 2005). Carmignani *et al.* konnten zeigen, dass sich die abgelösten Zellen nicht umgehend anheften, sondern passiv in der Peritonealflüssigkeit durch Hydrodynamik zu distanten Bereichen gelangen (Carmignani *et al.*, 2003; Feki *et al.*, 2009). Hat sich der Tumor intraperitoneal ausgebreitet, wird dieses als Peritonealkarzinose bezeichnet. Tumorzellnester sind häufig am Bauchnetz (Omentum), Diaphragma, auf dem Peritoneum des Douglas-Raumes und im kleinen Becken zu finden. Weiterhin finden sich Tumorabsiedlungen unter anderem an der Oberfläche von Darm, Leber und Magen (Naora und Montell, 2005; Kaufmann *et al.*, 2006) (siehe Abbildung 1.2). Die Letalität des Ovarialkarzinoms basiert zumeist auf der Ausbreitung der Tumorzellen in der Peritonealhöhle. Die Peritonealkarzinose führt zur Kachexie (Abmagerung), zum Ileus (Darmverschluss) und schließlich zum Tode der Patientinnen (Gynäkologie und Geburtshilfe, Breckwoldt Kaufmann). Außerdem erfolgt häufig eine lymphogene Metastasierung über die Lymphbahnen in die pelvinen und abdominalen Lymphknoten (Morice *et al.*, 2003). In späten Krankheitsstadien (FIGO III und IV) sind in etwa 65 % der Fälle Lymphknotenmetastasen vorhanden (Tsuruchi *et al.*, 1993; Carnino *et al.*, 1996). Hämatogene Fernmetastasen sind beim Ovarialkarzinom zwar möglich, aber selten. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es nur wenige Arbeiten, die den CTC-Status beim Ovarialkarzinom untersucht haben. Aufgrund unterschiedlicher Methoden und Patientenkollektiven variierten die CTC-positiven Detektionsraten zwischen 7 % bis 100 % (Marth *et al.*, 2002; Judson *et al.*, 2003; He *et al.*, 2008; Ntouroupi *et al.*, 2008; Wimberger *et al.*, 2009; Aktas *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.2 : Metastatische Streuung des Ovarialkarzinoms.** In frühen Stadien ist der Tumor (als gelbe Masse dargestellt) auf ein oder beide Ovarien begrenzt, wobei die Kapsel intakt ist. Sobald diese zerstört ist, streut der Tumor außerhalb der Grenzen der Ovarien. Dies kann direkt durch Ausdehnung und Invasion in benachbarte Gewebe wie Uterus und Eileiter erfolgen. Außerdem können Tumorzellen, die sich vom Tumor abgelöst haben und durch die Peritonealflüssigkeit transportiert werden, an entfernte Gewebe gelangen, wodurch peritoneale Metastasen entstehen (verändert nach Naora und Montell, 2005).

### 1.3.4 Methoden zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen

Zum Nachweis von bis zu einer CTC in einer Million hämatopoetischer Zellen sind hoch sensitive *Assays* erforderlich. Es werden hauptsächlich zwei methodische Ansätze zum Nachweis von CTCs angewandt. Zum einen werden immunologische *Assays* unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen Epithel-spezifische Proteine durchgeführt. Zum anderen werden Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-basierte Methoden verwendet, mit deren Hilfe gewebsspezifische Transkripte nachgewiesen werden (Pantel *et al.*, 2008). Aufgrund der geringen Anzahl von CTCs benötigen die meisten Verfahren zusätzlich zur Detektionsmethode einen Voranreicherungsschritt. Häufig basiert diese Anreicherung auf einer Dichtegradientenzentrifugation und/oder einer immunmagnetischen Zellseparation. Aufgrund unterschiedlicher Schwebedichten können durch eine Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen und die möglicherweise vorhandenen CTCs von anderen Blutzellen abgetrennt werden. Häufig verwendete Dichtemedien sind *Ficoll-Hypaque* (GE Healthcare) (Pantel und

Brakenhoff, 2004) und *OncoQuick* (*Greiner Bio-one*)(Gertler *et al.*, 2003). Weiterhin wurde von Griwatz *et al.* ein Dichtegradient basierend auf den Dichtemedien *PolymorphPrep* und *NycoPrep* (*Axis-Shild PoC AS*) entwickelt, wodurch eine 20-fache Anreicherung der CTCs aus Blut erreicht wurde (Griwatz *et al.*, 1995). Eine weitere Methode ist die immunmagnetische Zellseparation, bei der Antikörper verwendet werden, die mit magnetischen Partikeln fusioniert sind. Mit Hilfe eines magnetischen Feldes werden Zellen, die von diesen Antikörpern gebunden werden, von den übrigen Zellen separiert. Bei der „Positiv“-Anreicherung werden Antikörper eingesetzt, die sich gegen tumorspezifische oder epitheliale Antigene richten und somit zu einer Anreicherung von CTCs führen. Dagegen werden in einer „Negativ“-Anreicherung Antikörper verwendet, die das Leukozytenantigen CD45 (*Cluster of differentiation 45*) binden. Dadurch werden CD45 exprimierende Leukozyten von den möglicherweise vorhandenen CTCs abgetrennt (Wikman *et al.*, 2008; Aktas *et al.*, 2011). Zur Detektion von CTCs durch Immunzytochemie (*immunocytochemistry*, ICC) werden Antikörper benötigt, welche sich gegen Epitope richten, die ausschließlich von CTCs und nicht von hämatopoetischer Zellen exprimiert werden. Aufgrund des Fehlens von allgemeinen tumorspezifischen Antigenen werden CTCs gewöhnlich durch epithel-spezifische Antigene detektiert. Häufig werden gegen verschiedene Zytokeratine gerichtete Antikörper verwendet, da Zytokeratine von Zellen epithelialen Ursprungs, aber nicht von hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Weiterhin werden in einigen Arbeiten Antikörper eingesetzt, die das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (*epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM) oder epitheliale Wachstumsfaktorrezeptoren binden (Riethdorf und Pantel, 2010). Das bekannteste und einzige FDA (*Food and Drug Administration*) verifizierte System zum Nachweis von CTCs ist das *CellSearch™* System (Veridex, LLC) (Allard *et al.*, 2004). Durch die weitestgehend automatisierte Aufarbeitung garantiert das *CellSearch™* System eine standardisierte und optimierte Isolierung von CTCs. In diesem System werden CTCs durch mit Ferrofluid gekoppelte, gegen EpCAM gerichtete Antikörper angereichert. Für gewöhnlich wird EpCAM sowohl von normalen als auch malignen Epithelzellen exprimiert. Die CTCs werden anschließend durch eine anti-Zytokeratin Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert. Zusätzlich werden Leukozyten durch fluoreszenzmarkierte CD45 Antikörper visualisiert. In einer Multicenter-Studie, die Blutproben von metastasierten Brustkrebspatientinnen auf das Vorhandensein von CTCs untersuchten, konnten Riethdorf *et al.* zeigen, dass das *CellSeach™* System CTCs mit einer hohen Spezifität und Sensitivität detektiert (Riethdorf *et al.*, 2007). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde zusätzlich zu den bereits

beschriebenen Methoden eine Vielzahl an Verfahren zum Nachweis von CTCs entwickelt, wie PCR-basierte *Assays* (Zieglschmid et al., 2005), der CTC-*Chip* (Nagrath et al., 2007) oder der EPISPOT (Alix-Panabieres et al., 2007). Es existiert allerdings weiterhin ein Bedarf an der Entwicklung von spezifischen und sensitiven *Assays* zum Nachweis von CTCs.

#### ***1.4 Die OVCAD-(Ovarian Cancer Diagnosis) Studie***

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Teilprojektes der europäischen Studie OVCAD (*Ovarian Cancer Diagnosis*) durchgeführt. Die OVCAD-Studie befasste sich mit der frühzeitigen Diagnose von minimaler residualer Krebserkrankung des Ovarialkarzinoms und der Identifizierung von Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose, die nicht von der Standardtherapie profitieren. Die Studie umfasste elf akademische und vier industrielle Partner-Gruppen aus Belgien, Deutschland, Frankreich, Israel, den Niederlanden und Deutschland. Die Projekt-Koordination dieses größten EU-Projekts zur Krebsdiagnostik erfolgte an der Universitätsklinik für Frauenheilkunde der Medizinischen Universität Wien unter der Leitung von Prof. Dr. Robert Zeillinger.

Die OVCAD-Studie hatte zum einen das Ziel, jene Patientinnen zum Zeitpunkt des ersten chirurgischen Eingriffes identifizieren zu können, bei denen die Standardtherapie versagt. Es sollten molekulare Marker identifiziert werden, die zum Zeitpunkt der Diagnose des Ovarialkarzinoms Aussagen über den zukünftigen Therapieerfolg zulassen. Die Standardtherapie umfasst ein chirurgisches Entfernen des Tumors, gefolgt von einer Platin-basierter Chemotherapie. Bei 25 % aller Patientinnen versagt die Therapie und viele sterben innerhalb der folgenden fünf Jahre. Tatsächlich bestehen Zweifel, ob für diese Frauen die Standardtherapie überhaupt einen Nutzen bringt. Durch Identifizierung von molekularen Markern sollte eine bessere Typisierung von Tumoren des Ovarialkarzinoms erfolgen. Somit sollten die Patientinnen, die statt der Standardtherapie eine alternative Therapie benötigen, bereits zum Zeitpunkt der ersten Diagnose identifiziert werden. Infolgedessen könnten diesen Patientinnen die physischen und psychischen Belastungen der Standardtherapie erspart bleiben.

Außerdem war die Entwicklung molekularer Methoden, die es ermöglichen, minimale residuale Krebserkrankungen bei Ovarialkarzinompatientinnen zu identifizieren, Forschungsinhalt der Studie. Durch die Identifizierung von minimalen residualen Krebserkrankungen ist es möglich, frühzeitig einzugreifen, wenn die Standardtherapie



versagt. Weiterhin sollte durch die Studie ein besseres Verständnis für den Mechanismus der minimalen residualen Krebserkrankung als auch des Therapieversagens erlangt werden. Somit könnten Ansatzpunkte für neue Therapien identifiziert, charakterisiert und Beiträge zur Entwicklung neuer Therapien geleistet werden. Um diese Ziele zu erforschen, wurden molekulare Marker und deren Muster bei über 200 Ovarialkarzinompatientinnen untersucht. Hierfür wurden Gewebeproben, Blut und Aszitesflüssigkeit zum Zeitpunkt der Diagnose auf molekulare Marker hin analysiert. Sechs Monate nach Ende der Standardtherapie wurden wiederholt Analysen durchgeführt. Es sollten Marker bestimmt werden, die besonders häufig bei jenen 25 % der Frauen auftraten, bei denen die Therapie versagte. Somit hätte man zukünftig bereits zum Zeitpunkt der Diagnose Hinweise auf ein Versagen der Standardtherapie. Weiterhin wurden die Ursachen für das Versagen der Therapie untersucht, damit neue Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Therapien identifiziert werden können.

### ***1.5 Aufgabenstellung***

Aufgrund der fehlenden Frühsymptomatik und Früherkennung wird das Ovarialkarzinom bei 75 % der Patientinnen erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium (FIGO Stadium III und IV) diagnostiziert. In diesen späten Krankheitsstadien sind bereits distante Metastasen im Peritoneum vorhanden, was eine umfangreiche Operation und eine aggressive Chemotherapie notwendig macht. Es fehlen bislang Parameter, die den Erfolg dieser beiden Therapieformen anzeigen. Es existiert bislang keine Möglichkeit, Patientinnen, die eine besonders aggressive Tumorerkrankung haben und nicht von der Therapie profitieren, zum Zeitpunkt der Diagnose zu identifizieren. Aufgrund dieser Problematik gibt es einen Bedarf an prognostischen Parametern, die Aussagen über die Aggressivität, Therapieansprechen und Metastasierungspotential des Ovarialkarzinoms erlauben. Die Detektion und Charakterisierung der CTCs könnte hierbei einen wichtigen Beitrag leisten. Weiterhin sollte untersucht werden, ob der CTC Nachweis das Potential besitzt, als Indikator für minimale residuale Krebserkrankung ein Wiederauftreten der Erkrankung (Rezidiv) frühzeitig zu diagnostizieren. Durch die Identifizierung von minimalen residualen Erkrankungen ist es möglich, frühzeitig einzugreifen, wenn die Standardtherapie versagt.

Im Rahmen des EU-Projektes OVCAD sollte eine spezifische und sensitive Anreicherungs- und Detektionsmethode etabliert werden, um CTCs im Blut von

Patientinnen mit Ovarialkarzinom detektieren zu können. Durch die Charakterisierung der CTCs sollte der maligne Ursprung der Zellen bestätigt werden. Außerdem könnten durch die Charakterisierung der Zellen prognostische und therapeutisch relevante Eigenschaften identifiziert und das Wissen über den Mechanismus der Tumorzell-disseminierung beim Ovarialkarzinom erhöht werden.



## ***2 Material***

### ***2.1 Patientenproben***

Der Großteil der in dieser Arbeit analysierten Blutproben wurden im Rahmen der europäischen Studie OVCAD (*Ovarian Cancer Diagnosis*) abgenommen, aufgearbeitet und zur Verfügung gestellt. In der OVCAD-Studie wurde das Patientenmaterial (Tumorgewebe, Blut, Aszitesflüssigkeit) von 275 Patientinnen im Zeitraum von 2005 bis 2008 von fünf klinischen Zentren entnommen und aufgearbeitet:

- Klinik für Gynäkologie, Charité- Universitätsmedizin Berlin, Deutschland (97 Patientinnen).
- Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und gynäkologische Onkologie, Universitätskrankenhaus Leuven, Belgien (79 Patientinnen)
- Klinik für Gynäkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), Deutschland (46 Patientinnen).
- Universitätsklinik für Frauenheilkunde, Medizinische Universität Wien, Österreich (42 Patientinnen).
- Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich (11 Patientinnen).

Alle Patientinnen waren an einem histologisch gesicherten Ovarialkarzinom der FIGO-Stadien II-IV erkrankt. Das Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung betrug im Median 58 Jahre (18 bis 85 Jahre). Alle Patientinnen wurden durch eine Operation behandelt, der eine Platinium-basierte Chemotherapie folgte. Eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten 49 Patientinnen und 33 Patientinnen bekamen die adjuvante Chemotherapie in Form einer intraperitonealen Therapie. Klinische Parameter und Informationen der Patientinnen sind im Ergebnisteil dieser Arbeit in den Tabellen 4.6, 4.7, 4.14 und 4.15 sowie im Anhang in den Tabellen 9.1 und 9.2 dargestellt. Die Blutproben der rezidierten Patientinnen wurden auch im Rahmen der OVCAD-Studie abgenommen und aufgearbeitet. Die Proben wurden von den Zentren Berlin und Hamburg zur Verfügung gestellt. Für die Entnahme des Patientenmaterials für Forschungszwecke gaben alle Patientinnen ihr Einverständnis und das Vorhaben wurde durch das jeweilige lokale Ethikkomitee genehmigt.

## 2.2 SCID-Xenograft-Mausproben

Die Tierexperimente wurden am Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Schumacher durchgeführt. Es wurden jeweils eine Million Zellen der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 ins Peritoneum von sechs weiblichen SCID-Mäusen (SCID: *severe combined immunodeficiency*) injiziert. Nachdem die SK-OV-3 Zellen im Peritoneum Tumoren gebildet hatten, wurden den Mäusen, bevor diese getötet wurden, Blut abgenommen. Hierfür wurden die Tiere mit Ketamin/Rompun narkotisiert und das Blut durch eine terminale Herzpunktion entnommen. Anschließend wurden die Tiere getötet (zervikal disloziert), die Organe und Tumore entnommen und diese in Paraffin eingebettet. Das Blut und Paraffingewebeschnitte der peritonealen Tumoren wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2.1: Tumormasse der SCID-Xenograft-Mäuse.**

Maus Nummer	Tumorgewicht [g]	Tumorentstehungszeit [Tage]
1	kein Tumor	84
2	0,71	84
3	0,72	84
4	0,43	84
5	0,98	84
6	0,17	84

## 2.3 Zelllinien

Zelllinie	Typ	Ursprungsgewebe	Literatur
MCF-7	Adenokarzinom der Brust	Pleuraerguss	(Soule <i>et al.</i> , 1973)
MDA-MB-468	Adenokarzinom der Brust	Pleuraerguss	(Cailleau <i>et al.</i> , 1978)
SK-OV-3	Ovariales Adenokarzinom	Aszites	(Fogh <i>et al.</i> , 1977)

## 2.4 Chemikalien und Bioreagenzien

Chemikalien und Bioreagenzien	Hersteller/Vertreiber
AB-Serum	Biotest AG, Dreieich
Aceton	J.T. Baker, Deventer Niederlande
Bactoagar	BD Medical, Le Pont de Claix, Frankreich
<i>Bacto<sup>TM</sup> Yeast Extract</i> (Hefeextrakt)	BD Medical, Le Pont de Claix, Frankreich
Bactotrypton	BD Medical, Le Pont de Claix, Frankreich
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt

Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Citratpuffer (pH 6) 10 x	Dako, Glostrup Dänemark
<i>Dako REAL™ Antibody Diluent</i>	Dako, Glostrup Dänemark
<i>Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution</i>	Dako, Glostrup Dänemark
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dextransulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
<i>DMEM High Glucose-Medium</i> ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
<i>DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder)</i>	Roche Applied Science, Penzberg
<i>Desoxynucleoside Triphosphate Set</i> (dNTPs)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DPBS-Puffer (1x) ( <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> )	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
dUTPs (Spektrum orange) ( <b>D</b> esoxy <b>U</b> ridin <b>T</b> riphosphat)	Abbott Molecular, Des Plaines USA
EGF ( <i>epidermal growth factor</i> ) (0,5 mg/ml)	Strathmann, Hamburg
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure 96 %	Merck, Darmstadt
Ethanol (Molekularbiologie abs.)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Ethanol 99 %	Walter-CMP GmbH, Kiel
Ethanol 70 %	Walter-CMP GmbH, Kiel
Ethanol 80 %	Walter-CMP GmbH, Kiel
Ethanol 96 %	Walter-CMP GmbH, Kiel
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
<b>E</b> thylendiamintetra <b>a</b> ccetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
<i>Eukitt</i>	O. Kindler GmbH, Freiburg
<i>Fetal Bovine Serum Mycoplex</i> ( <b>F</b> etales <b>K</b> älber <b>S</b> erum: FKS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
FGF-b ( <i>fibroblast growth factor-basisch</i> ) (50 µg/ml)	Strathmann, Hamburg
FISH <i>Enzyme Reagent</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycerol (60 %)	Serva, Heidelberg
<i>Glyzergel Mounting Medium</i>	Dako, Glostrup Dänemark
Heat Pretreatment-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
humane Cot 1-DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
IST (Insulin, Selen, Transferrin) (100 x)	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Levamisol	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
L-Glutamine 200 mM (100 x)	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

---

Mayers-Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Deventer Niederlande
murine Cot 1-DNA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
N,N Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Naphthol AS-BI Phosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit (NaNO <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Natronlauge 1 N (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natronlauge 2 N (NaOH)	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Serva, Heidelberg
Nonidet P-40	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
nukleasefreies Wasser	Qiagen, Hilden
<i>Nycodenz</i>	Axis-Shild PoC AS, Oslo Norwegen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
RPMI 1640-Medium ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Salzsäure 1 N (HCl)	Merck, Darmstadt
Salzsäure 2 N (HCl)	Merck, Darmstadt
<i>Seakem</i> LE Agarose	Lonza, Rockland USA
Tetramethylammoniumchlorid (TMAC)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Tricin</i> (1 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Na <sub>3</sub> -Citrat x 2 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Triton x 100	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
<i>Trizma base</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Trypanblaulösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Trypsin-EDTA-Lösung (25 %)	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein
Trysin Tablette (1 mg gepuffert)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Tween-20	Merck, Darmstadt
<i>Vectashield<sup>®</sup> Mounting Medium with Dapi</i>	Vector Laboratories, Burlingame USA
<i>Xylene</i> (Xylol)	J.T. Baker, Deventer Niederlande
<i>Xylene Cyanole FF</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis USA

---

## 2.5 Käuflich erworbene Kits

Verwendete käufliche Systeme ( <i>Kits</i> )	Hersteller/Vertreiber
<i>BigDye<sup>®</sup> Terminator v.1.1. Cycle Sequencing Ready Reaction Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>BioPrime DNA Labeling System</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Bio-Spin 30 Tris Columns</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules USA
<i>CellSearch<sup>®</sup> Profile Kit</i>	Veridex LLC, Warren USA
<i>DAKO REAL<sup>™</sup> Detection System</i>	Dako, Glostrup Dänemark
<i>DAKO REAL<sup>™</sup> EnVision<sup>™</sup> Detection System</i>	Dako, Glostrup Dänemark
<i>NucleoSeq Säulchen</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>QIAGEN<sup>®</sup> Large-Construct Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAmp<sup>®</sup> DNA Micro Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAmp<sup>®</sup> DNA Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden

## 2.6 Antikörper und Streptavidin

Antigen	Klon	Ursprungs-organismus	Firma	Verdünnung
<b>Primärantikörper des Antikörpercocktail:</b>				
EGFR (528)	sc-120	Maus	Santa Cruz, Heidelberg	1:400
<i>Epithelial Antigen (EpCAM)</i>	<i>Clone Ber-EP4</i>	Maus	Dako, Glostrup Dänemark	1:400
humanes epitheliales Membranantigen (EMA)	<i>Clone E29</i>	Maus	Dako, Glostrup Dänemark	1:400
<i>Mab to Keratin K5+K8</i>	<i>Ks 5+8.22/C22</i>	Maus	Progen, Heidelberg	1:400
NCL-ESA (EpCAM) <i>Epithelial Specific Antigen</i>	VU-1D9	Maus	Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, England	1:400 (ICC) 1:75 (IHH)
PAN Zytokeratine (CK 7/18)	A45-BB3-Cy3	Maus	Micromet, München	1:400
ErbB-2 Onkoprotein	NCL-CB11	Maus	Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, England	1:400 (ICC) 1:40 (IHH)
<b>Weitere Primärantikörper:</b>				
p53 (Ab-6)	DO-1	Maus	Calbiochem, Merck, Darmstadt	1:2000
Alexa <sup>®</sup> Fluor 488 anti-human CD45 ( <i>Cluster of differentiation</i> )	Clone H130	Maus	BioLegend, Biozol, Eching	1:250
Calretinin	pK	Kaninchen	Dianova, Hamburg	1:100

human EpCAM	AF960	Ziege	R & D Systems, Wiesbaden	1:100
PAN Zytokeratine (CK 7/18)	A45-BB3	Maus	Micromet, München	1:200
PAN Zytokeratine (4,5,6,8,10,13,18)	C11	Maus	abcam, Cambridge, England	
PAN Zytokeratine (CK 5/7/19)	AE1/ AE3	Maus	Millipore, Billerica, USA	

**Sekundärantikörper:**

Alexa Fluor® 488 <i>goat anti-mouse</i> IgG		Ziege	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	1:200
Alexa Fluor® 546 <i>donkey anti-goat</i> IgG		Affe	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	1:200
APAAP-Komplex (Alkalische- Phosphatase-Anti-Alkalische- Phosphatase)		Maus	Dako, Glostrup Dänemark	1:100
<i>Polyclonal Goat Anti-Rabbit</i> <i>Immunoglobulins/AP</i>		Ziege	Dako, Glostrup Dänemark	1:200
<i>Polyclonal Rabbit Anti-Mouse</i> <i>Immunoglobulins</i>		Kaninchen	Dako, Glostrup Dänemark	1:20
<i>Polyclonal Rabbit Anti-Mouse</i> <i>Immunoglobulins/Biotinylated</i>		Kaninchen	Dako, Glostrup Dänemark	1:200

**Streptavidin:**

Streptavidin Alexa Fluor® 488			Invitrogen GmbH, Karlsruhe	1:1000
Streptavidin Alexa Fluor® 594			Invitrogen GmbH, Karlsruhe	1:1000

**2.7 Enzyme****2.7.1 Restriktionsendonukleasen**

Enzym	Puffer	T [°C]	Schnittstelle (5' → 3')	Hersteller/Vertreiber
<i>Bst</i> NI	NEB2/ BSA	60	CCW GG	New England BioLabs GmbH (Frankfurt)

**2.7.2 Polymerase Kettenreaktion**

Enzym	Puffer	Magnesium	Hersteller/Vertreiber
<i>AmpliTaq Gold</i> ® DNA <i>Polymerase</i>	<i>GeneAmp</i> ® PCR Gold <i>Buffer</i>	<i>MgCl<sub>2</sub> Solution</i> (25mM)	Applied Biosystems, Darmstadt

## 2.8 PAC-Klone und FISH-Sonden

Für die Herstellung der DNA-Sonden (DNA: *desoxyribonucleic acid*), wurden artifizielle Chromosomen verwendet, sogenannte PAC-DNA (PAC: *P1-derived artificial chromosome*), die komplementäre DNA für diese chromosomalen Bereiche enthielt. Zur Herstellung der 3q26-Sonde wurde der Klon RP11-250A4 verwendet und für die 8q24-Sonde der Klon RP11-240b13. Die Bakterienklone, die die PAC-DNA enthielten, wurden freundlicherweise von Dr. Heinz-Ulrich G. Weier, Universität Kalifornien zur Verfügung gestellt. Die Referenzsonde vom Zentromer des Chromosomens 7 Spektrum Aqua markiert, wurde von der Firma Kreatech (Amsterdam, Niederland) bezogen.

## 2.9 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MW Operon (Ebersberg) mit dem Reinheitsgrad HPSF (*High Purity Salt Free*) synthetisiert. Die Sequenzen der p53-Amplifikate sind im Anhang aufgeführt.

Oligonukleotide		Sequenz (5' → 3')	Annealing Temperatur [°C]	Amplikon [bp]
p53 Exon 5/6	<i>forward (sense)</i>	CACTTGTGCCCTGACTTTC	58	477
	<i>reverse (antisense)</i>	ACTGACAACCACCCCTTAACC		
p53 Exon 7	<i>forward (sense)</i>	CTGCTTGCCACAGGTCTC	58	267
	<i>reverse (antisense)</i>	TGGAAGAAATCGGTAAGAGG		
p53 Exon 8/9	<i>forward (sense)</i>	TTAGGCTCCAGAAAGGACAAG	58	560
	<i>reverse (antisense)</i>	CAGGAGCCATTGTCTTTGAG		
p53 Exon 8				
kleines Fragment	<i>forward (sense)</i>	TGATTTCTTACTGCCTCTTGC	58	132
	<i>reverse (antisense)</i>	CGGAGATTCTCTTCCTCTGTG		

## 2.10 Puffer, Lösungen und Medien

Die benutzten Puffer, Lösungen sowie ihre Zusammensetzungen sind nachfolgend aufgeführt. Puffer als Bestandteile käuflich erworbener *Kits*, käuflich erworbene Puffer und Lösungen sowie Puffer für Restriktionsendonukleasen und Polymerasen werden nicht berücksichtigt.

### 2.10.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

#### Allgemeine Puffer und Lösungen:

<b>1 % FKS-PBS-Lösung</b>	1 ml	FKS
	ad 100 ml	1 x PBS-Puffer
<b>1 x PBS</b>	9 g	NaCl (0,154 M)
	1,43 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (0,008 M)
	0,27 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,002 M)
	ad 1 l	destilliertes Wasser
		pH 7,4 einstellen
<b>8 % PFA-PBS-Lösung</b>	8 g	PFA
	ad 100 ml	1 x PBS-Puffer
		pH 7,4 einstellen mit NaOH

### 2.10.2 Puffer und Lösungen für die Immunzytologie

#### Puffer und Lösungen für Immunzytologie:

<b>10 % AB-Serum-PBS-Lösung</b>	10 ml	AB-Serum
	ad 100 ml	1 x PBS-Puffer
<b>APAAP-Substrat-Lösungen:</b>		
Lösung 1	78,8 ml	destilliertes Wasser
	4,2 ml	Tris-Puffer (1 M, pH 9,5)
	200 µl	Levamisol-Lösung (0,625 M)
Lösung 2	415 µl	Natriumnitrit-Lösung (0,56 M)
	166 µl	5 % Neufuchsin-Lösung
Lösung 3	42 mg	Naphthol AS-BI Phosphat
	500 µl	Dimethylformamid (DMF)
<b>DAPI-Lösung (0,5 µg/ml)</b>	5 µl	DAPI-Stammlösung (100 µg/ml)
	ad 1 ml	1 x PBS-Puffer
<b>DAPI-Stammlösung (100 µg/ml)</b>	1 mg	DAPI
	ad 10 ml	destilliertes Wasser



---

<b>0,1 % Essigsäure</b>	1 ml ad 1 l	Essigsäure destilliertes Wasser
<b>Levamisol-Lösung (0,625 M)</b>	1,5 g ad 10 ml	Levamisol destilliertes Wasser aliquotieren und bei -20 °C lagern
<b>Mayers-Hämalaun-Lösung (1:5)</b>	50 ml ad 250 ml	Mayers-Hämalaunlösung destilliertes Wasser filtriert
<b>0,1 % Natriumhydrogencarbonat-Lösung</b>	1 g ad 1 l	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) destilliertes Wasser
<b>Natriumnitrit-Lösung (0,56 M)</b>	3,87 g ad 100 ml	Natriumnitrit (NaNO <sub>2</sub> ) destilliertes Wasser aliquotieren und bei -20 °C lagern
<b>5 % Neufuchsin-Lösung</b>	5 g ad 100 ml	Neufuchsin 2 N Salzsäure (HCl) filtrieren, aliquotieren und bei -20 °C lagern
<b>4 % PFA-PBS -Lösung</b>	4 g ad 100 ml	PFA 1 x PBS-Puffer pH 7,4 einstellen mit NaOH
<b>Tris-EDTA-Puffer</b>	1,21 g 0,37 g 0,5 ml ad 1 l	<i>Trizma base</i> (10 mM) EDTA (1 mM) Tween-20 (0,05 %) destilliertes Wasser pH 9,0 einstellen mit HCl
<b>1 M Tris-Puffer</b> (Tris: <b>Tris</b> (hydroxymethyl)-aminomethan)	121,1 g ad 1 l	<i>Trizma base</i> destilliertes Wasser pH 9,5 einstellen mit HCl
<b>0,2 % Triton x 100-PBS-Lösung</b>	200 µl ad 100 ml	Triton x 100 1 x PBS-Puffer

---

### 2.10.3 Puffer und Lösungen für Immunhistochemie

#### Puffer und Lösungen für Immunhistochemie:

---

**TBST-Puffer** (TBST: *Tris-Buffered Saline* mit

Tween 20)	60,5 g	<i>Trizma base</i> (0,5 M)
	87,7 g	NaCl (1,5 M)
	5 ml	Tween-20 (0,5 %)
	ad 1 l	destilliertes Wasser
		pH 7,6 einstellen mit HCl

**TEC-Puffer** (TEC: Tris, EDTA, Citrat)

	2,5 g	<i>Trizma base</i> (0,02 M)
	5 g	EDTA (0,017 M)
	3,2 g	Na <sub>3</sub> -Citrat x 2 H <sub>2</sub> O (0,3 M)
	ad 1 l	destilliertes Wasser
		pH 7,8 einstellen mit HCl

---

### 2.10.4 Puffer und Lösungen für FISH-Analysen

#### Puffer und Lösungen für FISH-Analysen:

---

**FISH-Fixierungspuffer**

(2 % Formaldehyd in Methanol)

5,4 ml	37% Formaldehyd
ad 100 ml	Methanol

**50 % Formamid / 2 x SSC-Puffer**

(50 % Formamid; 0,3 M NaCl; 0,03 M

 Natriumcitrat) (SSC: *saline-sodium citrate*)

500 ml	Formamid
100 ml	20 x SSC-Puffer
ad 1 l	destilliertes Wasser
	pH 7,2 einstellen

**Hybridisierungspuffer**

(0,6 M NaCl; 0,06 M Natriumcitrat;

20 % Dextransulfat; 50 % Formamid)

2 g	Dextransulfat
5 ml	Formamid
2 ml	20 x SSC-Puffer
ad 10 ml	destilliertes Wasser
	aliquotieren und bei -20 °C lagern

**2 x SSC-0,3 % NP-40-Puffer**

(0,3 M NaCl; 0,03 M Natriumcitrat;

0,3 % Nonidet P-40)

100 ml	20 x SSC-Puffer
3 ml	Nonidet P-40
ad 1 l	destilliertes Wasser
	pH 7,0 einstellen

---

<b>20 x SSC-Puffer</b>	175,3 g	Natriumchlorid (NaCl) (3 M)
(3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat)	88,2 g	Na <sub>3</sub> -Citrat x 2 H <sub>2</sub> O (0,3 M)
	ad 1 l	destilliertes Wasser
		pH 7,0 einstellen
		autoklavieren
<b>2 x SSC-Puffer</b>	100 ml	20 x SSC-Puffer
(0,3 M NaCl; 0,03 M Natriumcitrat)	ad 1 l	destilliertes Wasser
		pH 7,0 einstellen
<b>0,1 x SSC-Puffer</b>	5 ml	20 x SSC-Puffer
(0,015 M NaCl; 0,0015 M Natriumcitrat)	ad 1 l	destilliertes Wasser
		pH 7,0 einstellen

---

### 2.10.5 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

#### Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden:

---

<b>DNA-Beladungspuffer</b>	6 ml	Glycerol (60 %)
	0,37 g	EDTA (100 mM)
	15 mg	Bromphenolblau (0,15 %)
	15 mg	<i>Xylene Cyanol FF</i> (0,15 %)
	ad 10 ml	destilliertes Wasser
<b>3 M Natriumacetat</b>	2,46 g	Natriumacetat, pH 5.2
	ad 10 ml	destilliertes Wasser
		pH 5,2 einstellen
<b>50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)</b>	242 g	<i>Trizma base</i> (2 M)
	18,6 g	EDTA (50 mM)
	ad 1 l	destilliertes Wasser
		pH 8,5 einstellen mit Essigsäure

---

## 2.10.6 Nährmedien für Bakterien

### Nährmedien für Bakterien:

---

<b>TB-Medium (Chloramphenicol) (TB: <i>terrific broth</i>)</b>		
TB-Lösung 1	12 g	<i>Bactotrypton</i> (1,2 %)
	24 g	Hefeextrakt (2,4 %)
	4 ml	Glycerin (0,4 %)
	ad 900 ml	destilliertes Wasser autoklavieren
TB-Lösung 2	2,31 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,017 M)
	12,54 g	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0,072 M)
	ad 100 ml	destilliertes Wasser pH 7,2, autoklavieren
	TB-Lösung 1 und 2 nach dem Autoklavieren vereinen Chloramphenicol (25 µg/ml)	
<b>LB-Chloramphenicol Agar-Platten</b> (LB: <i>Iysogeny broth</i> )	10 g	<i>Bactotrypton</i> (1,0 %)
	5 g	Hefeextrakt (0,5 %)
	15 g	Bactoagar (1,5 %)
	10 g	NaCl (1,0 %)
	ad 1 l	destilliertes Wasser autoklavieren
	Chloramphenicol (25 µg/ml)	

---

## 2.10.7 Zellkulturmedien für eukaryotische Zellen

### Zellkulturmedien für eukaryotische Zellen:

---

<b>Zellkulturmedium 1</b>	90%	DMEM-Medium
	10%	FKS
	2 mM	Glutamin (200 mM)
	200 U/ml	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)
<b>Zellkulturmedium 2</b>	90%	RPMI 1640- Medium
	10%	FKS
	2 mM	L-Glutamin (200 mM)
	200 U/ml	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)
	1 fach	IST (100 x)
	50 ng/ml	EGF (0,5 mg/ml)
	10 ng/ml	FGF-b (50 µg/ml)
<b>Einfrriermedium</b>	90%	Zellkulturmedium 1 oder 2
	10%	DMSO

---

## 2.10.8 Dichtegradientenmedien

Dichtegradientenmedien	Hersteller/Vertreiber
<i>Ficoll-Paque™ Plus</i>	GE <i>Heathcare</i> , Uppsala Schweden
<b><i>NycoPrep</i> (Dichte 1,069 g/ml)</b>	
130 g <i>Nycodenz</i> (13 %)	Axis-Shild PoC AS, Oslo Norwegen
5,8 g NaCl (0,1 M)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
5 ml 1 M <i>Tricin</i> (0,005 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
ad 1 l destiliertes Wasser	
pH 7,4 einstellen, Dichte überprüfen	
<b><i>PolymorphPrep</i> (Dichte 1,113 g/ml)</b>	Axis-Shild PoC AS, Oslo Norwegen

## 2.11 Laborgeräte

### 2.11.1 Allgemeine Laborgeräte

Allgemeine Laborgeräte	Hersteller/Vertreiber
Analysenwaage CPA224S-OCE	Sartorius AG, Göttingen
Automatic-Sarpette®	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Bio imaging system</i> , GeneGenius	Syngene, Cambridge UK
<i>CellSearch® System</i> , <i>CellTracks® AutoPrep® System</i>	Veridex LCC, Raritan USA
CO <sub>2</sub> -Zellkulturinkubator HERAccl® 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Dampfkochtopf <i>Decloaking Chamber™</i>	Biocare Medical, Concord USA
Eisbereiter FM-120 DE	Hoshizaki, Amsterdam, Niederlande
<i>Elektrophorese power supply consort e 143</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Elektrophoresekammer <i>ComPhor L Mini/Midi</i>	Bioplastics, Landgraaf Niederlande
FISH- <i>Thermoblock</i> , MJ Research PTC-200	Biozym, Hessisch Oldendorf
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Kirchdorf
<i>GeneAmp® PCR System 9700</i>	Applied Biosystem, Kalifornien USA
<i>Genetic Analyser 3130</i>	Applied Biosystem, Kalifornien USA
Gerierruhe -80 °C, KLT 4785	Kryotec-Kryosafe GmbH, Hamburg
Heizblock HBT 130	HLC Biotech, Bovenden
Laborautoklav Varioklav 75 S	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim
<i>Magnetic Cell Separator</i>	Immunicon, Huntingdon Valley
Magnetrührer MR 3000	Heidolph, Schwabach
<i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg

---

Mikrobiologische Sicherheitswerkbank <i>HERAsafe®</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Mikrobiologischer Brutschrank, Function Line	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Mikrowelle 800	Severin, Sundern
Paraffinstreckbad	Medax, Neumünster
pH-Meter inoLab pH <i>level 1</i>	WTW, Weilheim
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präzisionswaage BP 610	Sartorius AG, Göttingen
Reinstwasser-System <i>Ultra Clear</i>	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
<i>Scanner</i> Epson 1680	EPSON Deutschland GmbH, Meerbusch
Schlittenmikrotom SM2000 R	Leica, Nussloch
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Stickstoff-Gefrierbehälter LS 4800	Taylor-Wharton, Theodore, USA
<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Vortex-Genie 2</i>	Scientific Industries, Bohemia USA
Wärmeschrank, Tissue Drying Oven TDO 66	Medite, Burgdorf
Wasserbad 1002 und 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wasserbad HI 1210	Leica, Nussloch
Zählkammer, Neubauer <i>improved</i>	Optik Labor, Fried

---

### 2.11.2 Zentrifugen und Zubehör

<b>Zentrifugen und Zubehör</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC-5C Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich, Tuttlingen
Zytozentrifuge Rotofix 32	Hettich, Tuttlingen
Zytospin Aufhängung 1660	Hettich, Tuttlingen
Zytospin-Rotor 1626	Hettich, Tuttlingen
Zytospin-Trichter 1666	Hettich, Tuttlingen
Zytospin-Vorrichtung 1662	Hettich, Tuttlingen

---

### 2.11.3 Mikroskope und Zubehör

Mikroskope und Zubehör	Hersteller/Vertreiber
Fluoreszenzmikroskop <i>Axioplan 2 Imaging, MetaSystem</i>	Zeiss, Göttingen
Filterblock DAPI: Set 01	Zeiss, Göttingen
Filterblock Alexa Fluor 488: MC-2B	AHF Analysentechnik AG, Tübingen
Filterblock Spektrum orange: MC-4	AHF Analysentechnik AG, Tübingen
Filterblock Spektrum aqua: Aqua	AHF Analysentechnik AG, Tübingen
10 x Objektiv: Fluor	Zeiss, Göttingen
40 x Objektiv: Plan-Neofluar	Zeiss, Göttingen
63 x Öl Objektiv: Plan-Neofluar	Zeiss, Göttingen
100 x Öl Objektiv: Plan-Neofluar	Zeiss, Göttingen
Software isis: <i>in situ imaging system</i>	Zeiss, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop DM LB	Leica, Nussloch
Fluoreszenz Einrichtung Systemmikroskop DM LB	Leica, Nussloch
Filterblock DAPI: A	Leica, Nussloch
Filterblock Alexa Fluor 488: I3	Leica, Nussloch
Filterblock Alexa Fluor 594: N2.1	Leica, Nussloch
Filterblock Cy-3: +Y3	Leica, Nussloch
10 x Objektiv: HC PL Fluotar 506505	Leica, Nussloch
20 x Objektiv: HC PL Fluotar 506003	Leica, Nussloch
40 x Objektiv: Pl Fluotar 506004	Leica, Nussloch
100 x Öl Objektiv: PL Fluotar 506009	Leica, Nussloch
Kamera: KAPPA DX 30 <i>color camera System</i>	Kappa, Gleichen
<i>Kappa ImageBase Software</i>	Kappa, Gleichen
Lichtmikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar

### 2.12 Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders beschrieben, wurde das Verbrauchsmaterial, wie Pipettenspitzen, Pasteurpipetten, Falconröhrchen und Reaktionsgefäße von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht) und Greiner *Bio One* (Frickenhausen) und VWR (Darmstadt) bezogen.



Verbrauchsmaterial	Hersteller/Vertreiber
Aluminiumfolie	Universal, Bristol England
<i>Antifect N Liquid</i>	Schülke und Mayr, Norderstedt
Dako-Pen	Dako, Glostrup Dänemark
Deckgläschen 24 x 32 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Färbekammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Handschuhe Nitrile Nitra-Tex	Ansell, Brüssel, Belgien
Handschuhe <i>Peha-soft satin Powderfree</i>	Hartmann, Heidenheim
Objektträger <i>SuperFrost/ Plus</i>	Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
S-Monovette EDTA KE/ 7,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterillium	Bode, Hamburg

### 2.13 Verwendete Programme und Datenbanken

#### Programme:

- SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Version 19.0) Statistikprogramm.
- EndNote X1, Literaturverwaltungsprogramm.
- *Sequence Analysis Tool (Applied Biosystems)*, Auswertungssoftware für Sequenzierungen.
- FinchTV ([www.geospiza.com/finchtv/](http://www.geospiza.com/finchtv/)) Software zur Visualisierung von Sequenzierungsdateien.
- *ClustalWV2.0* ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) *Onlinetool* zur Erstellung von Alignmentsequenzen zwischen einer oder mehrerer Proben und einer Referenzsequenz.
- *Primer3plus* ([www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi](http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)) *Software* zum Design von Primern.
- *NEBcutter V2.0* ([tools.neb.com/NEBcutter2/index.php](http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php)) *Onlinetool* zur Suche von Restriktionsspaltstellen in DNA Sequenzen.

#### Datenbanken:

- NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Literatur, DNA, RNA, Proteindatenbanken, BLAST Tools zum Sequenzabgleich und vieles mehr.
- IARC TP53 Datenbank ([www-p53.iarc.fr](http://www-p53.iarc.fr)) P53-Datenbank mit Mutationslisten, Fallregistern und vieles mehr.

## 3 Methoden

### 3.1 Anreicherung und Detektion von zirkulierenden Tumorzellen aus peripherem Blut

#### 3.1.1 Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus peripherem Blut von Ovarialkarzinompatientinnen durch Dichtegradientenzentrifugation

Zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) in Blutproben erfolgte eine Aufkonzentrierung dieser Zellen über eine Dichtegradientenzentrifugation, die von Griwatz und Brandt entwickelt und beschrieben wurde (Griwatz *et al.*, 1995; Brandt und Griwatz, 1996).

Pro Patientin wurden zwischen 15 und 30 ml EDTA-Blut aufgearbeitet. Die Aufarbeitung der Blutproben der OVCAD-Studie (**O**varian **C**ancer **D**iagnosis) wurde durch die klinischen Zentren der Studie in Berlin und Hamburg (Deutschland), Wien und Innsbruck (Österreich) sowie Leuven (Belgien) nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt. Die Monozytenphase mit den möglichen CTCs des Gradienten wurde mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, in PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*) resuspendiert und für weitere Analysen für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Im Institut für Tumorbiologie wurden sowohl alle Blutproben von Patientinnen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) als auch Blutproben von gesunden Spendern zur Optimierung des Gradientenprotokolls aufgearbeitet. Außerdem wurden durch diese Methode Asziteszellen aus Aszitesflüssigkeit isoliert. Es wurde für jeweils 5 ml Blut ein Gradient in einem 15 ml Falconröhrchen angefertigt, so dass pro Patientenprobe zwischen drei und sechs Dichtegradienten entstanden. Um einen Zellverlust durch unspezifische Bindung der Zellen an der Oberfläche der 15 ml Falconröhrchen zu verhindern, wurden diese mit einer 1% igen FKS-PBS-Lösung (FKS: fetales Kälberserum) vorinkubiert. Nach Entleeren der FKS-PBS-Lösung wurden in jedes Röhrchen vorsichtig 3 ml *PolymorphPrep* (Dichte: 1,113 g/ml, Osmolarität: 460 mOsm) gegeben und dann mit 3 ml *NycoPrep* (Dichte: 1,068 g/ml, Osmolarität: 335 mOsm) überschichtet. Anschließend wurde jeder Gradient mit 5 ml Blut überschichtet und bei Raumtemperatur für 20 min bei 450 x g zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt bildet der Gradient separate Schichten unterschiedlicher Dichte aus (siehe Abbildung 3.1). Wichtig ist hierbei, dass die Zentrifugation langsam

startet und ohne einen aktiven Bremsvorgang langsam endet, da eine Durchwirbelung die Trennung der verschiedenen Zellfraktionen zerstört. Die oberste Schicht, bestehend aus Blutplasma, wurde vorsichtig abgenommen. Unter dem Plasma liegt eine Schicht, in der sich hauptsächlich Monozyten befinden. Wie Griwatz *et al.* zeigen konnten, befinden sich in dieser Schicht möglicherweise CTCs. Diese Monozytenfraktion wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 4 % PFA fixiert. Hierfür wurde zur Monozytenfraktion das gleiche Volumen einer 8% igen PFA-PBS-Lösung tropfenweise unter leichtem Schütteln zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 400 x g pelletiert und in 30 ml PBS-Puffer aufgenommen. Diese wurden dann bis zur Verwendung für weitere Analysen bei 4 °C gelagert. Von Blutproben, die in anderen OVCAD-Zentren aufgearbeitet wurden, wurden die fixierten und in PBS-Puffer aufgenommenen Monozytenfraktionen an das Institut für Tumorbilogie verschickt und freundlicherweise für weitere Analysen zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 3.1: Auftrennung von Blutproben durch Dichtegradientenzentrifugation.** Nach dem Zentrifugationsschritt haben sich die Zellbestandteile aufgetrennt und die Monozytenfraktion, die möglicherweise CTCs enthält, kann separat abgenommen und für weitere Analysen verwendet werden.

### 3.1.2 Automatisierte immunmagnetische Anreicherung von CTCs durch das *CellSearch™ Profile Kit* unter Verwendung des *CellTracks® AutoPrep Systems*

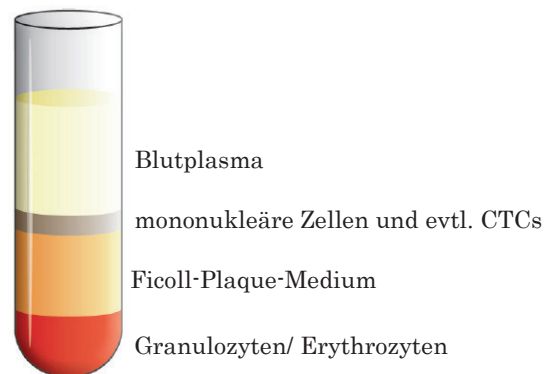
Das *CellSearch™ Profile Kit* ist entwickelt worden, um unter Verwendung des *CellTracks® AutoPrep Systems* CTCs epithelialen Ursprungs aus Blutproben

anzureichern. Dieses *CellTracks*<sup>®</sup> *AutoPrep* System garantiert durch die weitestgehend automatisierte Aufarbeitung eine standardisierte und optimierte Isolierung von CTCs. Das *CellSearch*<sup>™</sup> *Profile Kit* enthält ein *Capture*-Reagenz auf Ferrofluidbasis. Das Ferrofluidreagenz besteht aus Nanopartikeln mit einem magnetischen Kern, der von einer polymeren Schicht von Antikörpern mit Bindungsspezifität für das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (*epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM) Antigen umgeben ist. Die Durchführung wurde weitestgehend nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Da das *CellSearch*<sup>™</sup> *Profile Kit* ursprünglich für die Aufarbeitung von Vollblutproben bestimmt ist, musste die Durchführung etwas variiert werden. Die durch Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen fixierten und in PBS-Puffer aufgenommenen Zellen wurden durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 400 x g pelletiert. Das Zellpellet wurde in 3,5 ml *Dilution*-Puffer (Veridex, *Profile-Kit*) aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß des *Profile-Kits* überführt. Bis zu acht Proben können parallel im *CellTrack*<sup>®</sup> *AutoPrep* System automatisch aufgearbeitet werden. Da das System üblicherweise Vollblut aufarbeitet und es aufgrund der fehlenden Erythrozyten der Proben zu Fehlermeldungen des Systems kommt, wurden diese als Kontrollen gestartet und somit das Problem umgangen. Nachdem die Aufarbeitung im System abgeschlossen wurde, wurden die Reaktionsgefäße mit den aufkonzentrierten möglichen CTCs aus dem Gerät genommen und zur weiteren Aufkonzentrierung in einen Magneten gestellt und für 10 min inkubiert. Zellen, die von *Ferrofluid* gekoppelten Antikörpern gebunden wurden, wurden vom Magneten zurück gehalten, während der Überstand durch Invertieren verworfen wurde. Die Zellen wurden in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und die Zellsuspension auf zwei Objektträger verteilt aufgetragen. Die Lösung wurde über Nacht getrocknet und anschließend wurden die Objektträger entweder immunzytochemisch gefärbt oder in Alufolie luftdicht verpackt und bei -80 °C gelagert.

### **3.1.3 Isolierung von SK-OV-3 CTCs aus dem Blut von SCID-Xenograft-Mäusen durch Ficoll-Paque<sup>™</sup> Plus Dichtegradientenzentrifugation**

Nach Xenotransplantation von Zellen der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 in SCID-Mäuse (SCID: *severe combined immunodeficiency*) wurde deren Blut auf CTCs hin untersucht. Zur Isolierung von mononukleären Zellen und den möglichen CTCs aus Blutproben der SCID-Xenograft Mäuse wurde eine *Ficoll-Paque*<sup>™</sup> *Plus*

Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür wurde *Ficoll-Paque™ Plus* verwendet, welches eine Dichte von 1,077 g/ml besitzt. Durch die *Ficoll-Paque™ Plus* Dichtegradientenzentrifugation können mononukleäre Zellen und epitheliale Tumorzellen, die sich in der gleichen Fraktion des Dichtegradienten anreichern, von Erythrozyten, Granulozyten und Blutplasma getrennt werden (Rosenberg *et al.*, 2002) (siehe Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2: Auftrennung von Blutproben durch *Ficoll-Paque™ Plus* Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung Handbuch GE-Healthcare *Ficoll-Paque™*).** Nach dem Zentrifugationsschritt haben sich die Zellbestandteile aufgetrennt. Die mononukleären Zellen, möglicherweise auch CTCs, befinden sich in einer separaten Fraktion und können isoliert abgenommen und für weitere Analysen verwendet werden.

Es wurden zwischen 100 µl und 700 µl Blut der Mäuse aufgearbeitet. Das Blut wurde mit PBS-Puffer auf 2 ml aufgefüllt. In 15 ml Falconröhrchen wurden pro Blutprobe 5 ml *Ficoll-Paque™ Plus* gegeben und anschließend vorsichtig mit dem in PBS-Puffer verdünnten Blut überschichtet. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 400 x g wurde die Interphase, die die mononukleären Zellen und möglicherweise CTCs enthielt, abgenommen und in ein neues 15 ml Falconröhren überführt. Die Zellsuspension wurde mit PBS-Puffer auf 15 ml aufgefüllt und die Zellen durch Zentrifugation bei 400 x g für 10 min pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml PBS-Puffer aufgenommen, die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.1.4) und Zytospinpräparate angefertigt (siehe Kapitel 3.1.5).

### 3.1.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauerzählkammer verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Objektträger, in den ein Gitternetz eingätzt ist. Mit aufgelegtem Deckgläschen ergibt sich ein Raum mit genau definiertem Volumen, in den

Flüssigkeit durch Kapillarkräfte eingesogen wird. Zur Bestimmung der Anzahl und der Vitalität der Zellen wurden 10 µl der Suspension entnommen und mit 10 µl Trypanblau-Lösung vermischt. Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff, der an Zellproteine bindet. Dieser Vitalfarbstoff ist nicht membrangängig und färbt daher nur tote Zellen, bei denen die Membranintegrität nicht mehr gegeben ist, blau an, während vitale Zellen nicht gefärbt werden. Anschließend wurden 10 µl der mit Trypanblau versetzten Zellsuspension in die Neubauerzählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurde anschließend die Anzahl der Zellen in vier Großquadranten der Zählkammer bestimmt und deren Gesamtzahl pro Volumen mit nachfolgender Formel ausgerechnet:

$$\text{Gesamtanzahl der Zellen} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} / 2 * 10^4 * \text{Volumen der Suspension (ml)}$$

### **3.1.5 Anfertigung von Zytospinpräparaten**

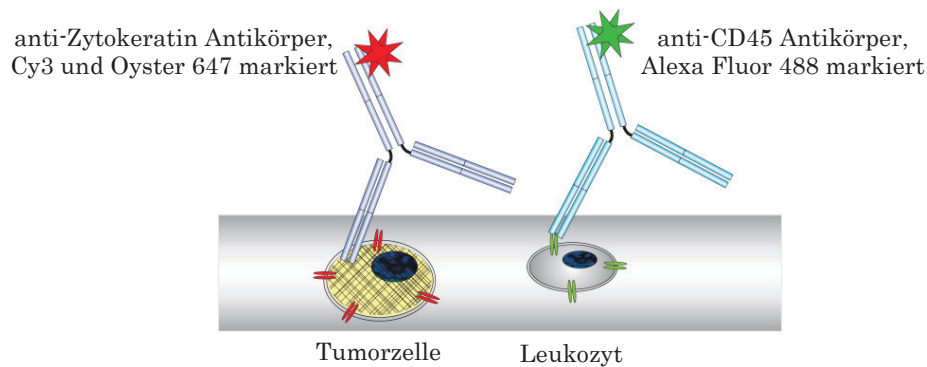
Um Zellen analysieren zu können, wurden diese durch die Anfertigung von Zytospins auf Objektträger gebracht. Pro Patientenprobe wurden drei Objektträger mit jeweils 200.000 Zellen angefertigt. Hierfür wurden Objektträger in Zytospinvorrichtungen gelegt und spezielle Trichter auf diesen fixiert. In die Trichter wurden Zellsuspensionen mit der gewünschten Anzahl an Zellen gegeben und die Vorrichtungen in eine Zytospinzentrifuge (Rotofix 32, Hettich) gestellt. Durch Zentrifugation für 3 min bei 160 x g wurden die Zellen auf die Objektträger gebracht, und der Überstand wurde anschließend verworfen. Die fertigen Zytospinpräparate wurden über Nacht getrocknet und am nächsten Tag immunzytochemisch gefärbt oder in Alufolie luftdicht verpackt und bei -80 °C gelagert.

### **3.1.6 Immunzytochemisches Protokoll zur Detektion von CTCs unter Verwendung von anti-Zytokeratin Antikörpern**

Zur Detektion der CTCs wurde eine immunzytochemische Färbung durchgeführt (siehe Abbildung 3.3). Nach Anreicherung der CTCs aus peripherem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation und nachfolgender immunmagnetischer Zellseparation wurde die erhaltene Zellsuspension auf zwei Objektträger verteilt und über Nacht getrocknet. Die Zellareale wurden mit einem Fettstift (Dako *Pen*) umrandet und für 10 min mit PBS-Puffer rehydriert. Die Objektträger wurden in Objektträgerküvetten

mit kochendem Tris-EDTA-Puffer (Tris: **Tris**(hydroxymethyl)-aminomethan, EDTA: **Ethylendiamintetraacetat**) gestellt und für 5 min inkubiert, um die Antigene für nachfolgende Antikörperbindungen zugänglich zu machen. Diese sogenannte Antigendemaskierung ist notwendig, da die Zellen sowohl durch PFA nach der Dichtegradientenzentrifugation als auch im Veridex System während der immunmagnetischen Zellseparation fixiert wurden. Durch die Durchführung dieses Antigendemaskierungsschrittes kann ein wesentlich intensiveres Fluoreszenzsignal zur Detektion von Zytokeratin-positiven Zellen erreicht werden. In die Küvette mit kochendem Tris-EDTA-Puffer wurde nach der Inkubation zur Abkühlung kaltes Wasser zugefügt. Die abgekühlten Objektträger wurden aus der Küvette genommen, in eine Färbekammer gelegt und das Zellareal sofort mit PBS-Puffer bedeckt. Für eine bessere Zugänglichkeit der Antikörper für intrazelluläre Antigen erfolgte anschließend eine Permeabilisierung der Zellen für 10 min mit einer 0,2 % igen Triton-X100-PBS-Lösung. Nach drei Waschschritten für jeweils 2 min mit PBS-Puffer wurde für 20 min mit 10 % AB-Serum-PBS-Lösung (AB-Serum: humanes Serum der Blutgruppe AB) blockiert, um unspezifische Proteinwechselwirkungen zu verhindern. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Antikörperlösung in 10 % AB-Serum-PBS-Lösung für 45 min. Die Antikörperlösung enthielt den Pan-Zytokeratin (CK 7/18) Antikörper A45-BB3-Cy3 (1:300) (Cy3: **Cyanine Dye 3**), einen Oyster 647 markierten Zytokeratin 5/8 Antikörper (1:500) und zur Identifizierung von Leukozyten den CD45 bindenden Antikörper CD45-Alexa Fluor 488 (1:150). Nach der Antikörperinkubation wurde die Zellen für 2 min mit PBS Puffer gewaschen und anschließend wurde zur Zellkernfärbung eine DAPI-Lösung (DAPI: 4',6-**Diamidin-2-phenylindol**) auf die Zellen gegeben und für 2 min inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS-Puffer für jeweils 2 min wurden die Zellen in PBS-Puffer eingedeckelt. Hierfür wurde vorsichtig ein Deckgläschen auf das Zellareal gelegt und dieses mit Nagellack luftdicht verschlossen.





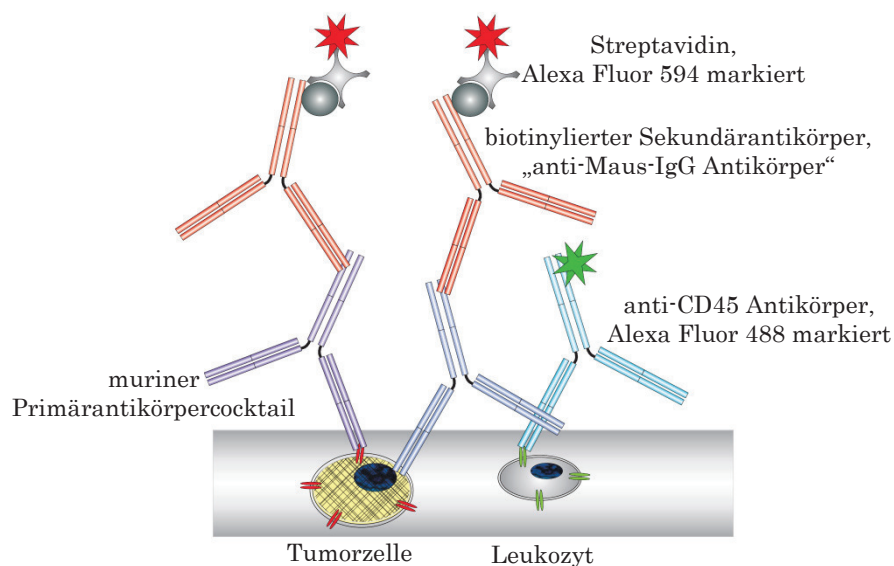
**Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der immunzytochemischen Färbung zur Detektion von CTCs unter Verwendung von anti-Zytokeratin Antikörpern.** Zur Detektion von CTCs wurden der Cy3 markierte anti-pan-Zytokeratin (CK 7/18) Antikörper A45-BB3-Cy3 und der Oyster 647 markierte anti-Zytokeratin 5/8 verwendet. Zur Detektion von Leukozyten wurden gegen CD45 gerichtete Alexa Fluor 488 markierte Antikörper verwendet.

### 3.1.7 Immunzytochemisches Protokoll zur Detektion von CTCs unter Verwendung eines Antikörpercocktails

Nach der Anreicherung durch Dichtegradientenzentrifugation wurde nach der modifizierten Methode zur Identifizierung der CTCs direkt eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Im Unterschied zum zuvor verwendeten Protokoll wurde zusätzlich zu den gegen Zytokeratin (CK 5/7/8/18) gerichteten Antikörpern, Antikörper, die EpCAM, den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER-2), das epitheliale Membranantigen (*epithelial membrane antigen*, EMA) und den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) binden, verwendet (siehe Abbildung 3.4).

Pro Patientenprobe wurden, wenn möglich, 600.000 Zellen immunzytochemisch analysiert. Es wurden pro Probe dreimal jeweils 200.000 Zellen durch die Anfertigung eines Zytospins auf einen Objektträger gebracht. Nachdem die Fläche des Zytospins mit einem Fettstift (Dako Pen) umrandet wurde, wurden die Zellen für 10 min in PBS-Puffer inkubiert. Für eine bessere Zugänglichkeit der Antikörper für intrazelluläre Antigene erfolgte anschließend eine Permeabilisierung der Zellen für 10 min mit einer 0,2% igen Triton-X100-PBS Lösung. Nach drei Waschschritten für jeweils 2 min mit PBS-Puffer wurde für 20 min mit AB-Serum-PBS-Lösung (10 %) blockiert, um unspezifische Proteinwechselwirkungen zu verhindern. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Primärantikörpercocktails in AB-Serum-PBS-Lösung (10 %) für 45 min. Der Primärantikörpercocktail beinhaltet Antikörper, die Pan-Zytokeratine (CK 5/7/8/18), EpCAM, HER-2, EMA und EGFR erkennen. Nach drei Waschschritten mit PBS-Puffer

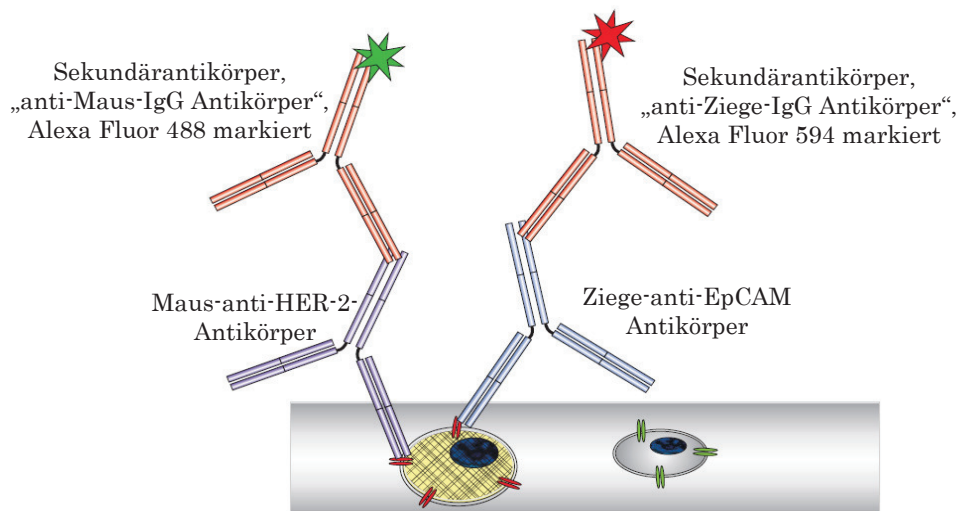
für jeweils 10 min erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers für weitere 45 min in AB-Serum-PBS-Lösung (10 %). Dieser sekundäre Antikörper war biotinyliert und bindete spezifisch die konstanten murinen Antikörperdomänen der hier verwendeten primären Antikörper. Nach weiteren drei Waschschrritten mit PBS Puffer für jeweils 10 min wurden fluoreszenzmarkiertes Streptavidin (Streptavidin Alexa Fluor 594 konjugiert) sowie zur Detektion von Leukozyten gegen CD45 (*Cluster of differentiation* 45, Leukozytenantigen) gerichtete fluoreszenzmarkierte Antikörper (anti-CD45 Alexa Fluor 488) in AB-Serum-PBS-Lösung (10 %) auf die Objektträger gegeben und für 45 min inkubiert. Das fluoreszenzmarkierte Streptavidin bindet spezifisch an das Biotin des sekundären Antikörpers und diente daher zur Visualisierung der Antikörperbindungen des Primärantikörpercocktails. Die Streptavidin-Biotin-Bindung ist eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen und eignet sich daher als immunhistologisches Detektionssystem. Nach weiteren zwei Waschschrritten mit PBS-Puffer für jeweils 10 min wurde für die Zellkernfärbung eine DAPI-Lösung zu den Zellen gegeben und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum zweimal für jeweils 2 min in PBS-Puffer gewaschen und dann in PBS-Puffer eingedeckelt. Hierfür wurde vorsichtig ein Deckgläschen auf das Zellareal gelegt und dieses mit Nagellack luftdicht verschlossen.



**Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der immunzytochemischen Färbung zur Detektion von CTCs unter Verwendung eines Antikörpercocktails.** Zur Detektion der CTCs wurde ein Antikörpercocktail verwendet, der murine Antikörper gegen verschiedene Tumorantigene enthielt. Anschließend wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper zugegeben, der die konstante Antikörperdomäne der primären Antikörper bindet. Zur Visualisierung der Antikörperbindung wurde Alexa Fluor 594 markiertes Streptavidin verwendet, welches spezifisch ans Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Zur Detektion von Leukozyten wurde ein gegen CD45 gerichteter Alexa Fluor 488 markierter Antikörper verwendet.

### 3.1.8 Immunzytochemisches Protokoll zur Detektion von SK-OV-3 CTCs der SCID-Xenograft-Maus-Proben unter Verwendung von HER-2- und EpCAM-Antikörpern

Zur Detektion von SK-OV-3 CTCs in Mausblutproben wurden immunzytochemische Färbungen gegen HER-2 sowie Doppelfärbungen gegen HER-2 und EpCAM durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.8 und Abbildung 3.5). Da bekannt ist, dass SK-OV-3 Zellen HER-2 im hohen Maße überexprimieren (Hung *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1993), eignet sich dieses Antigen als Marker für die Identifizierung der SK-OV-3 CTCs. Das Färbeprotokoll wurde größtenteils wie im Kapitel 3.1.7 beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass andere Antikörperlösungen verwendet wurden.



**Abbildung 3.5:** Schematische Darstellung der immunzytochemischen Färbung zur Detektion von SK-OV-3 CTCs unter Verwendung von HER-2 und EpCAM Antikörpern. Zur Detektion der SK-OV-3 CTCs wurde ein muriner anti-HER2 Antikörper verwendet und zur Visualisierung der Antikörperbindung wurden Alexa 488 markierte sekundäre Antikörper eingesetzt, die die konstante Antikörperdomäne des murinen Primärantikörpers binden. Zur Charakterisierung der Zellen wurde ein aus der Ziege stammender anti-EpCAM Antikörper verwendet und zur Visualisierung der Antikörperbindung wurden Alexa 594 markierte sekundäre Antikörper benutzt, die die konstante Antikörperdomäne der aus der Ziege stammenden Antikörper binden.

Für die HER-2-Färbung wurde im ersten Antikörperschritt ein muriner Primärantikörper anti-HER-2 (1:400) in 10 % AB-Serum-PBS-Lösung eingesetzt, und im zweiten Antikörperschritt wurde ein sekundärer Alexa 488 markierter anti-Maus-IgG Antikörper (1:200 in 10 % AB-PBS-Lösung) verwendet. Für die Doppelfärbung gegen HER-2 und EpCAM wurde im ersten Antikörperschritt zusätzlich zum anti-HER-2 Antikörper ein aus der Ziege stammender anti-EpCAM Antikörper (1:100 in 10 % AB-

Serum-PBS-Lösung) verwendet und im zweiten Antikörperschritt zusätzlich zu den sekundären Alexa 488 markierten anti-Maus-Antikörpern Alexa 594 markierte sekundäre Antikörper (1:200 AB-Serum-PBS-Lösung) benutzt, welche die konstante Antikörperdomäne der aus der Ziege stammenden Antikörper binden.

### **3.1.9 Auswertungsprotokoll der immunzytochemischen Detektion von CTCs aus peripherem Blut**

Die immunzytochemische Detektion von CTCs wurde am Fluoreszenzmikroskop (Leica DMLB) analysiert und ausgewertet. Das gesamte Zytospinareal eines Objektträgers wurde zur Detektion von möglichen CTCs systematisch unter Verwendung des Fluoreszenzkanals für Cy3 (Filterblock +Y3, Leica) oder Alexa Fluor 594 (Filterblock N2.1, Leica) mikroskopiert. Zum Analysieren und Auswerten eines Objektträgers wurde im Allgemeinen ein 20 x (HC PL FLUOTAR, Leica) oder 40 x (PL FLUOTAR, Leica) Objektiv verwendet. Im DAPI-Kanal (Filterblock A, Leica) wurde überprüft, ob die Zellen einen intakten Zellkern besitzen. Im Alexa Fluor 488-Kanal (Filterblock I3) wurde die Leukozyten-Gegenfärbung analysiert. Zusätzlich wurde die Morphologie der Zelle im Durchlichtkanal beurteilt. Wenn Zellen vielversprechend und interessant erschienen, wurden sie unter Verwendung eines 100 x Öl-Objektives genauer betrachtet und analysiert. Mit Hilfe der Digitalkamera der Firma KAPPA und der *Software KAPPA ImageBase* wurden die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbungen durch Fotos dokumentiert.

Zellen, die als CTCs klassifiziert wurden, mussten folgende Kriterien erfüllen:

- Spezifisches Fluoreszenzsignal im Cy3- und/oder Alexa Fluor 594-Kanal (CTC-Färbung)
- Kein Fluoreszenzsignal im Alexa Fluor 488-Kanal (Leukozyten-Färbung)
- Intakter Zellkern
- Intakte Zellmorphologie

Leukozyten hatten durch die CD45-Leukozyten-Färbung ein spezifisches Fluoreszenzsignal im Alexa Fluor 488-Kanal, während ein Signal im Cy3- und Alexa Fluor 594-Kanal fehlte. Somit konnten diese gut identifiziert werden.

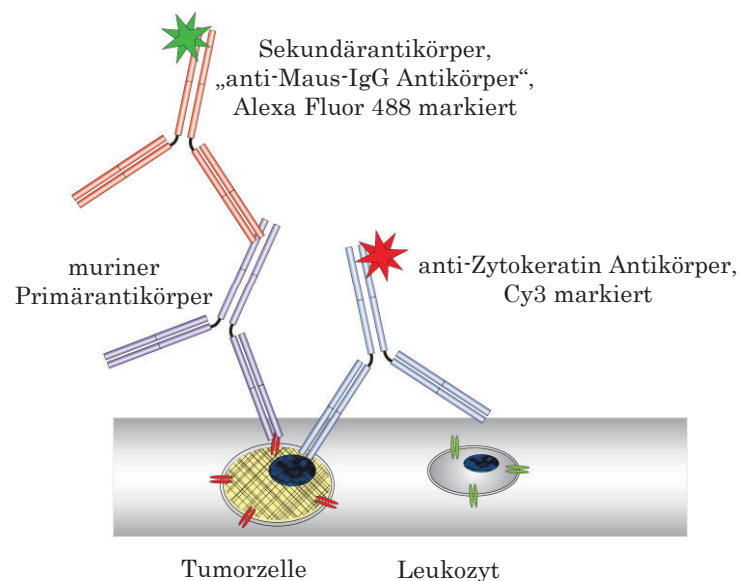
Zusätzlich zu den detektierten CTCs und Leukozyten wurden auch Zellen identifiziert, die durch fehlende oder nicht eindeutige Kriterien nicht klar als Leukozyt oder CTC

klassifiziert werden konnten. Diese Zellen wurden als fragliche Zellen bezeichnet. Diese Zellen hatten zum Beispiel eine auffällige Zellmorphologie mit großem Zellkern (typische Kriterien für mögliche CTCs), aber weder ein Fluoreszenzsignal im Cy3 und Alexa Fluor 594-Kanal noch im Alexa Fluor 488-Kanal (doppelt negative Zellen). Auch Zellen, die sowohl im Fluoreszenzkanal Cy3 und Alexa Fluor 594 als auch im Kanal Alexa Fluor 499 ein Signal hatten (doppelt positive Zellen), wurden als fragliche Zellen klassifiziert. Außerdem wurden Zellen als fraglich klassifiziert, wenn diese nur eine sehr geringe Fluoreszenz für die CTC-Färbung aufwiesen und die Fluoreszenz nicht eindeutig als spezifisch oder als Hintergrundfluoreszenz zugeordnet werden konnte.

### ***3.2 Immunzytochemische Charakterisierung der CTCs aus peripherem Blut und Asziteszellen***

#### **3.2.1 Immunzytochemische Fluoreszenzdoppelfärbung zur Charakterisierung der CTCs**

Zur genaueren Charakterisierung der CTCs der Probe H071Q wurden immunzytochemische Fluoreszenzdoppelfärbungen durchgeführt. Es wurde ein direkt mit Cy3 markierter anti-Zytokeratin Antikörper (A45-BB3-Cy3) und zusätzlich jeweils ein weiterer muriner Primärantikörper, der verschiedene Tumorantigene bindet, verwendet (anti-EpCAM, anti-HER-2, anti-EGFR, anti-Vimentin Antikörper). Diese Antikörper wurden durch Alexa Fluor 488 markierte sekundäre anti-Maus-IgG Antikörper visualisiert (siehe Abbildung 3.6). Das Färbeprotokoll wurde größtenteils wie im Kapitel 3.1.7 beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass andere Antikörperlösungen verwendet wurden. Im ersten Antikörperschritt wurde ein muriner Primärantikörper eingesetzt, der das Tumorantigen von Interesse bindet. Im zweiten Antikörperschritt wurde der sekundäre Alexa 488 markierte anti-Maus-IgG Antikörper (1:200 in AB-Serum-PBS-Lösung) verwendet und nach mehreren Waschschritten im dritten Antikörperschritt der Cy3 markierte anti-Zytokeratin Antikörper (1:300 in AB-Serum-PBS-Lösung).



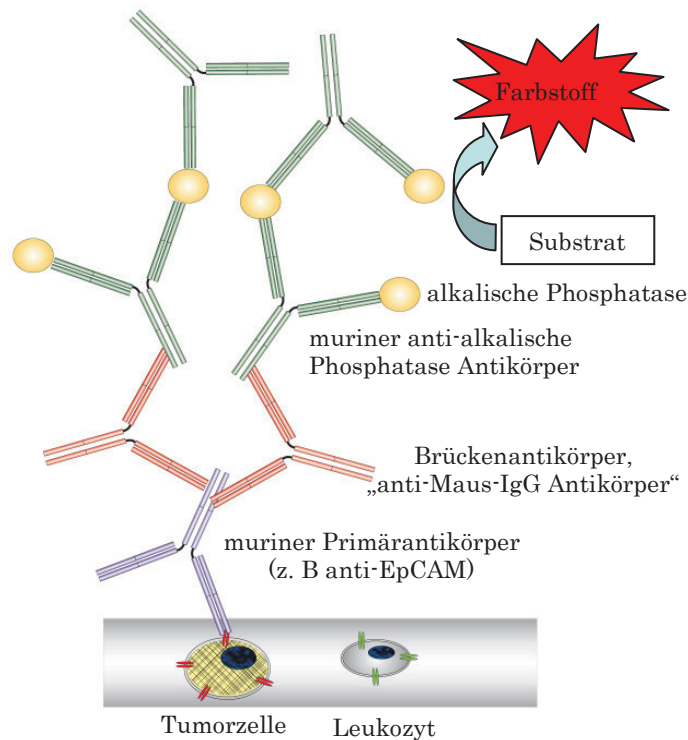
**Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der immunzytochemischen Fluoreszenzdoppelfärbung zur Charakterisierung von CTCs.** Die CTCs wurden durch einen direkt mit Cy3 markierten anti-Zytokeratin Antikörper (A45-BB3-Cy3) detektiert. Zusätzlich wurde zur Charakterisierung der Zellen ein weiterer Antikörper (gegen verschiedene Tumorantigene) verwendet. Zur Visualisierung der Antikörperbindung wurden Alexa 488 markierte sekundäre Antikörper verwendet, die die konstante Antikörperdomäne des jeweiligen Primärenantikörpers binden.

### 3.2.2 Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Färbung

Zur genaueren Charakterisierung der CTCs der Probe H071Q wurde zusätzlich zur Fluoreszenzfärbung für das Antigen EpCAM eine weitere Färbemethode durchgeführt. Anhand der immunzytochemischen Fluoreszenzdoppelfärbung für das Antigen EpCAM konnte nicht sicher geklärt werden, ob die EpCAM Expression der CTCs gänzlich bei allen CTCs verloren gegangen ist, oder ob einige Zellen noch leicht EpCAM exprimieren. Außerdem wurde zur immunzytochemischen Charakterisierung der Asziteszellen die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Färbung (APAAP-Färbung) für verschiedene Tumorantigene durchgeführt. Da Zellen, die aus Aszitesflüssigkeit isoliert wurden, eine starke Autofluoreszenz aufwiesen, konnten zur Charakterisierung dieser Zellen keine Fluoreszenzfärbungen durchgeführt werden. Die APAAP-Färbung ist eine sehr sensitive durchlichtmikroskopische Färbemethode. Bei dieser Färbung wird im ersten Schritt ein muriner Primärantikörper verwendet, der das gewünschte Antigen bindet. Als Sekundärantikörper wird dann ein Antikörper verwendet, der dessen konstante murine Antikörperdomäne bindet. Anschließend wird der APAAP-Komplex hinzugegeben, der aus löslichen Immunkomplexen aus alkalischer Phosphatase und



monoklonalen murinen anti-alkalische-Phosphatase Antikörpern besteht. Der Sekundärantikörper fungiert als Brücke zwischen Primärantikörper und APAAP-Komplex, da dieser sowohl die konstante Domäne des murinen Primärantikörpers als auch den Antikörper des APAAP-Komplexes bindet. Zur Visualisierung der Antikörperbindungen wird ein Substrat zugegeben, welches durch die alkalische Phosphatase zu einem Farbstoff umgewandelt wird (siehe Abbildung 3.7). Die alkalische Phosphatase hydrolysiert Naphtolphosphatester zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole reagieren mit Neufuchsin und bilden unlösliche Azofarbstoffe. Endogene alkalische Phosphatasen werden durch die Zugabe von Levamisol gehemmt.



**Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der APAAP-Färbung.** Zur Charakterisierung und Detektion der Zellen wurde ein muriner Primärantikörper verwendet. Als Sekundärantikörper wird ein Antikörper verwendet, der dessen konstante murine Antikörperdomäne bindet. Anschließend wird der APAAP-Komplex hinzu gegeben, der aus löslichen Immunkomplexen aus intestinaler alkalischer Phosphatase und monoklonalen murinen anti-alkalischen-Phosphatase Antikörpern besteht. Der Sekundärantikörper fungiert als Brückenantikörper. Zur Visualisierung der Antikörperbindungen wird ein Substrat durch die alkalische Phosphatase zu einem Farbstoff umgewandelt.

Die Zellareale der Zytospinpräparate wurden mit einem Fettstift (Dako *Pen*) umrandet und die Zellen für 10 min mit einer 4%igen PFA-PBS-Lösung fixiert. Nach drei Waschschritten für jeweils 2 min mit PBS-Puffer wurde für 20 min mit AB-Serum-PBS-Lösung (10 %) blockiert, um unspezifische Proteinwechselwirkungen zu verhindern.



Anschließend erfolgte die Inkubation des gewünschten murinen Primärantikörpers in AB-Serum-PBS-Lösung (10 %) für 45 min. Nach drei Waschschrritten mit PBS-Puffer für jeweils 2 min erfolgte die Inkubation des sekundären Brückenantikörpers für weitere 30 min in AB-Serum-PBS-Lösung (10 %). Die Objektträger wurden dreimal für jeweils 2 min in PBS-Puffer gewaschen und der APAAP-Komplex in AB-Serum-PBS-Lösung (10 %) für 30 min auf die Zellen gegeben. Nach drei weiteren Waschschrritten für jeweils 2 min mit PBS-Puffer wurde die Färbung entwickelt, indem die Substratlösung für 20 min auf die Zellen gegeben wurde. Die Substratlösung wurde zuvor angesetzt, indem 4,2 ml Tris-Puffer (1 M, pH 9,5) und 200 µl Levamisol-Lösung (0,625 M) in 78,8 ml H<sub>2</sub>O verdünnt wurden (Lösung 1). Es wurden zu 415 µl Natriumnitrit-Lösung (0,56 M) 166 µl Neufuchsin (5 %) gegeben (Lösung 2) und nach einer dreiminütigen Inkubation zur Lösung 1 gegeben. Anschließend wurden Lösung 3, bestehend aus 42 mg Naphthol-AS-Bi-Phosphat gelöst in 500 µl N,N-Dimethylformamid, zur vereinten Lösung 1 und 2 gegeben. Diese Substratlösung wurde bevor sie auf die Zellen gegeben wurde, filtriert. Nach der Entwicklung wurden die Zellen dreimal für jeweils 3 min in PBS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Zellkernfärbung, indem die Objektträger für 10 s in Mayers Hämalaun-Lösung (1:5, filtriert) gestellt wurden. Anschließend wurden die Objektträger einmal kurz in destilliertes Wasser, viermal in 0,1 % ige Essigsäure, viermal in destilliertes Wasser getaucht und dann für 30 s in 0,1 % iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung inkubiert. Nach drei Waschschrritten für jeweils 3 min in destilliertem Wasser wurden die Objektträger eingedeckelt. Hierfür wurde *Glyzergel Mounting* Medium im Wasserbad erwärmt, auf das Zellareal gegeben und ein Deckgläschen vorsichtig aufgelegt.

### ***3.3 Immunhistologische Analysen von Dünnschnitten aus in Paraffin eingebettetem Gewebe***

#### **3.3.1 Anfertigung von Mikrotomschnitten**

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde auf -20 °C gekühlt. Anschließend wurden mittels Schlittenmikrotom 3-5 µm dicke Schichten angefertigt. Diese Gewebeschnitte wurden mit einer Pinzette oder einem Pinsel aufgenommen und in ein auf 40 °C erwärmtes Wasserbad überführt, wodurch sich die Schnitte auf der Wasseroberfläche streckten. Die gestreckten Paraffinschnitte wurden dann möglichst glatt auf einen

Objektträger gezogen und zum Trocknen auf eine 37 °C warme Heizplatte gelegt. Die Schnitte wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert und anschließend bis zu weiteren Analysen bei Raumtemperatur gelagert.

### **3.3.2 Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte**

Zu Beginn jeder immunhistologischen Färbung an Paraffingewebeschnitten müssen diese deparaffiniert und rehydriert werden. Hierfür wurden die Objektträger mit den Paraffingewebeschnitten für mindestens eine Stunde bei 60 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde das Paraffin der Gewebeschnitte entfernt, indem die Objektträger zweimal für jeweils 15 min in Xylol inkubiert wurden. Zur Rehydrierung wurden die Objektträger zweimal für jeweils 10 min in 100% igem Ethanol und anschließend für jeweils 1 min zweimal in 96% igem Ethanol, zweimal in 80% igem Ethanol und einmal in 70% igem Ethanol inkubiert und anschließend in destilliertes Wasser gestellt.

### **3.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Übersichtsfärbung, bei der sich die Zellkerne blauviolett und das Zytoplasma (basische Strukturen) rot anfärben. Bevor die Paraffingewebeschnitte gefärbt werden konnten, mussten diese deparaffiniert und rehydriert werden (siehe Kapitel 3.3.2). Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 30 s in Meyers Hämalaun-Lösung inkubiert. Das Bläuen des Hämalauns erfolgte mittels Spülen mit laufendem Leitungswasser für 5 min. Die Gewebeschnitte wurden für 30 s in Eosin gefärbt, anschließend in destilliertem Wasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) für jeweils 2 min inkubiert. Nach zweifacher Inkubation für 2 min in Xylol wurde *Eukitt* auf das Gewebe gegeben und mit einem Deckgläschen eingedeckelt.

### **3.3.4 Vorbehandlung der Gewebeschnitte für die Immunhistochemie**

Zu Beginn aller immunhistologischen Färbungen wurden die Paraffingewebeschnitte als erstes deparaffiniert und rehydriert (siehe Kapitel 3.3.2). Für immunhistologische

Färbungen gegen verschiedene Antigene wurden die Gewebeschnitte unterschiedlich vorbehandelt um ein optimales Färbeergebnis zu erzielen. Es wurden für die unterschiedlichen Antikörper folgende Vorbehandlungsverfahren gewählt:

#### *3.3.4.1 Zytokeratin-Färbung (A45-BB3, AE1/AE3, C11)*

Zur immunhistochemischen Detektion von Zytokeratin mit den gegen verschiedene Zytokeratine gerichteten Antikörpern A45-BB3, AE1/AE3 und C11 wurden die Gewebeschnitte durch eine Hitzebehandlung vorbehandelt. Hierfür wurden die Objektträger in eine Küvette mit Citratpuffer (pH 6,0) gestellt und im Dampfkochtopf für 5 min auf 125 °C erhitzt. Anschließend wurde die Küvette aus dem Dampfkochtopf genommen, zum Abkühlen mit offenem Deckel für 10 min stehen gelassen und dann die Objektträger kurz in destilliertes Wasser gestellt. Nachdem die Objektträger dreimal für jeweils 3 min mit TBST-Puffer (TBST: *Tris-Buffered Saline* mit Tween 20) gewaschen wurden, wurden die primären anti-Zytokeratin Antikörper in *Dako REAL™ Antibody Diluent* verdünnt, auf die Gewebeschnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der A45-BB3 Antikörper wurde 1:200, die AE1/AE3 Antikörper 1:1000 und der C11 Antikörper 1:200 verdünnt. Anschließend erfolgte die Detektion durch die Verwendung des *DAKO REAL™ Detection System Kits* (siehe Kapitel 3.3.5).

#### *3.3.4.2 EpCAM-Färbung*

Um eine EpCAM-Färbung durchzuführen, wurden die Gewebeschnitte enzymatisch durch Trypsin vorbehandelt. Hierfür wurde eine Trypsintablette (1 mg Trypsin, gepuffert) in 1 ml destilliertem Wasser gelöst, die Trypsinlösung auf die Gewebeschnitte gegeben und für 10 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min in destilliertem Wasser inkubiert und dreimal für jeweils 3 min in TBST-Puffer gewaschen. Zur Inhibierung von endogenen Peroxidasen wurde eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Blockierung für 5 min durch *Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution* durchgeführt und anschließend wieder dreimal für jeweils 3 min in TBST-Puffer gewaschen. Der anti-EpCAM Antikörper wurde in *Dako REAL™ Antibody Diluent* 1:75 verdünnt, auf die Gewebeschnitte gegeben und für 60 min inkubiert. Anschließend

---

erfolgte die Detektion durch die Verwendung des *DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Kits* (siehe Kapitel 3.3.6).

#### *3.3.4.3 HER-2-Färbung*

Für eine HER-2-Färbung wurden die Gewebeschnitte für 20 min in kochendem Citratpuffer (pH 6,0) inkubiert. Hierfür wurden die Objektträger in eine Küvette mit Citratpuffer gestellt, in der Mikrowelle erhitzt und für 20 min im kochenden Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Küvette aus der Mikrowelle genommen und zum Abkühlen mit offenem Deckel für 15 min stehen gelassen. Nachdem die Objektträger dreimal für jeweils 3 min mit TBST-Puffer gewaschen wurden, wurde der anti-HER-2 Antikörper in *Dako REAL™ Antibody Diluent* 1:40 verdünnt, auf die Gewebeschnitte gegeben und für 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion durch die Verwendung des *DAKO REAL™ Detection System Kits* (siehe Kapitel 3.3.5).

#### *3.3.4.4 p53-Färbung*

Für eine p53-Färbung wurden die Gewebeschnitte für 20 min in kochendem TEC-Puffer (pH 7,8) (TEC: **T**ris, **E**DTA, **C**itrat) inkubiert. Hierfür wurden die Objektträger in eine Küvette mit TEC-Puffer gestellt, in der Mikrowelle erhitzt und für 20 min im kochenden Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Küvette aus der Mikrowelle genommen und zum Abkühlen mit offenem Deckel für 15 min stehengelassen. Nachdem die Objektträger dreimal für jeweils 3 min mit TBST-Puffer gewaschen wurden, wurde der anti-p53 Antikörper in *Dako REAL™ Antibody Diluent* 1:2000 verdünnt, auf die Gewebeschnitte gegeben und für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion durch die Verwendung des *DAKO REAL™ Detection System Kits* (siehe Kapitel 3.3.5).

### **3.3.5 Nachweis der Antikörperbindung unter Verwendung des *DAKO REAL™ Detection System Kits***

Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurden die Objektträger dreimal für jeweils 3 min in TBST-Puffer gewaschen. Dann wurden die Gewebeschnitte für 10 min mit der Lösung A des *Kits* inkubiert. Diese Lösung A enthält biotinylierte Ziege-Anti-Maus-IgG

und Ziege-Anti-Kaninchen-IgG Antikörper, die an den jeweiligen Primärantikörper binden. Nach weiteren drei Waschschrritten für 3 min in TBST-Puffer wurde eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Blockierung durchgeführt, um endogene Peroxidasen zu inhibieren. Hierfür wurde für 5 min *Dako REAL™ Peroxidase-Blocking-Solution* auf die Gewebeschnitte gegeben. Nach weiteren drei Waschschrritten für 3 min in TBST-Puffer wurde Lösung B für 10 min auf den Gewebeschnitten inkubiert. Die Lösung B des *Kits* enthält an Streptavidin konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP). Dieses Streptavidin bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers der Lösung A. Anschließend wurde dreimal für jeweils 3 min mit TBST-Puffer gewaschen. Zur Entwicklung der Färbung wurde die 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-(DAB) Substratlösung angesetzt. Hierfür wurde *Dako REAL™ DAB + Chromogen* (Lösung C) 1:50 in *Dako REAL™ Substrate Buffer* (Lösung D) verdünnt und für 10 min auf den Gewebeschnitten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in destilliertes Wasser gestellt, bevor die Hämalaun-Zellkernfärbung durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3.3.7).

### **3.3.6 Nachweis der Antikörperbindung unter Verwendung des *DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Kits***

Nach der Inkubation des Primärantikörpers (anti-EpCAM) wurden die Objektträger dreimal für jeweils 3 min in TBST-Puffer gewaschen. Dann wurden die Gewebeschnitte für 15 min mit der Lösung A des *Kits* inkubiert. Die Lösung A des *DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Kits* enthält Dextran-Komplexe, die mit Peroxidase-molekülen und sekundären Antikörpern gegen Kaninchen-IgG und Maus-IgG Antikörpern gekoppelt sind. Anschließend wurde dreimal für jeweils 3 min mit TBST-Puffer gewaschen. Zur Entwicklung der Färbung wurde die DAB-Substratlösung angesetzt, indem *Dako REAL™ DAB + Chromogen* (Lösung C) 1:50 in *Dako REAL™ Substrate Buffer* (Lösung B) verdünnt und für 10 min auf den Gewebeschnitten inkubiert wurde. Anschließend wurden die Objektträger in destilliertes Wasser gestellt, bevor die Hämalaun-Zellkernfärbung durchgeführt wurde.

### 3.3.7 Protokoll zur Zellkernfärbung mittels Mayers Hämalaunlösung

Die Objektträger wurden für 2 s in Meyers Hämalaun-Lösung inkubiert. Das Bläuen des Hämalauns erfolgte mittels Spülen mit laufendem Leitungswasser für 5 min. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dehydriert. Hierfür wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) für jeweils 2 min inkubiert. Nach zweifacher Inkubation für 2 min in Xylol wurde *Eukitt* auf das Gewebe gegeben und mit einem Deckgläschen eingedeckelt.

### 3.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) beruht auf der Hybridisierung chromosomaler Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA) mit artifiziellen komplementären DNA-Sequenzen, die als Sonden bezeichnet werden. Mit ihrer Hilfe können spezifische Nukleinsäuresequenzen in Zellen nachgewiesen werden. Damit können die Anzahl und die Lage bestimmter chromosomaler Bereiche zum Beispiel in einer Tumorzelle bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden FISH-Analysen für den Chromosomenbereich 3q26 und 8q24 durchgeführt. Für die Herstellung der DNA-Sonden wurden artifizielle Chromosomen verwendet, sogenannte PAC-DNA (PAC: *P1-derived artificial chromosome*), die komplementäre DNA für diese chromosomalen Bereiche enthielt. Zur Herstellung der 3q26-Sonde wurde der Klon RP11-250A4 verwendet und für die 8q24-Sonde der Klon RP11-240b13. Diese Bakterienklone, die die PAC-DNA enthielten, wurden freundlicherweise von Heinz-Ulrich G. Weier, Universität Kalifornien, zur Verfügung gestellt.

#### 3.4.1 Isolierung der PAC-DNA zur Herstellung der FISH-Sonden

Die Isolierung der PAC-DNA aus Bakterien erfolgte durch die Verwendung des *Large-Construct Kits* (Qiagen). Die Methode basiert auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979), einem Verdau mit ATP-abhängiger Endonuklease und anschließender Anionenaustauschchromatographie. Die Durchführung erfolgte mit geringen Abweichungen gemäß Anleitung des Herstellers. Ein den PAC enthaltender Bakterienklon wurde von einer LB-Agarplatte

(LB: *Lysogeny Broth*) gepickt und in 2 ml TB-Medium (TB: *Terrific Broth*) mit einem geeigneten Selektionsantibiotikum (Chloramphenicol 25 µg/ml) angeimpft. Diese Vorkultur wurde bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (300 rpm) für ungefähr 8 h inkubiert. Anschließend wurden mit 1 ml dieser Vorkultur 500 ml mit Antibiotikum versetztem TB-Medium angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 300 rpm über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 6000 x g und 4 °C pelletiert und das Zellpellet in 20 ml P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 20 ml P2-Puffer hinzugegeben und durch vier- bis sechsmal Invertieren gemischt. Nach 5 min Inkubation wurden 20 ml P3-Puffer hinzugegeben und nach vier- bis sechsmaligem Invertieren für 10 min auf Eis inkubiert. Es wurde für 30 min bei 4 °C und 20.000 x g zentrifugiert und der PAC-DNA beinhaltende Überstand durch einen zuvor angefeuchteten Filter filtriert. Zur Präzipitation der DNA wurde zu dem gereinigten Lysat das 0,6 fache Volumen (ca. 36 ml) Isopropanol gegeben und gemischt. Der Überstand wurde nach 30 min Zentrifugation (4 °C, 15.000 x g) verworfen, das DNA-Pellet in 5 ml 70 % igem Ethanol gewaschen, erneut für 15 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das an der Luft getrocknete Pellet wurde in 9,5 ml auf 37 °C vorgewärmten EX-Puffer resuspendiert, bevor 200 µl ATP (Adenosintriphosphat) abhängige Exonuklease und 300 µl ATP-Lösung hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. Die PAC-DNA wurde über eine Säule aufgereinigt. Hierfür wurde die QIAGEN-tip 500 Säule mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert. Nachdem 10 ml QS-Puffer zur DNA-Lösung gegeben wurde, wurde diese auf die Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und die DNA wurde eluiert, indem 15 ml auf 65 °C vorgewärmter QF-Puffer auf die Säule gegeben wurde. Die DNA des Eluats wurde durch die Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach dem Mischen der Lösung wurde jeweils 1 ml der Lösung in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 15.000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Zum Waschen der DNA wurde jeweils 250 µl 70 % iges Ethanol auf die DNA-Pellets gegeben, für weitere 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die DNA-Pellets wurden für 5-10 min an der Luft getrocknet und die DNA anschließend in jeweils 200 µl AE-Puffer aufgenommen. Die Qualität und Quantität der DNA wurde spektroskopisch mit Hilfe des *NanoDrop Spektrometers* bestimmt (siehe Kapitel 3.5.2).



### 3.4.2 Fluoreszenzmarkierung der FISH-Sonden

Zur Herstellung der fluoreszenzmarkierten FISH-Sonden wurde die Methode des *Random-Primings* unter Verwendung des *BioPrime DNA Labeling System* (Invitrogen) gewählt. Hierfür wurde 1 µg der isolierten PAC-DNA (siehe Kapitel 3.4.1) in 18 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen, für 5 min bei 100 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Der Markierungsansatz wurde folgendermaßen angesetzt:

**Tabelle 3.1: Standardansatz zur Fluoreszenzmarkierung der FISH-Sonden.**

Volumen	Reagenz
18 µl	1 µg PAC-DNA in H <sub>2</sub> O
5 µl	10 x dNTPs
5 µl	0,5 mM dUTPs (fluoreszenzmarkiert Spektrum Orange) (Desoxyuridintriphosphat)
20 µl	2,5 x <i>random</i> Hexamere
1 µl	Klenow Fragment der DNA-Polymerase I

Die *random* Hexanukleotide hybridisieren statistisch zufällig als Primer an die DNA. Die Markierung erfolgte durch den Einbau der fluoreszenzmarkierten dUTPs (Abbott Molecular) bei der Synthese eines neuen Doppelstranges. Nach der Inkubation bei 37 °C für 2-6 h wurden nicht gebundene Nukleotide mit Hilfe von *Bio-Spin 30 Tris Säulchen* (BioRad) entfernt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Aufreinigung der DNA durch Ethanol-fällung (siehe Kapitel 3.5.7) wurden die markierten DNA-Sonden in 25 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.4.3 FISH an Zytospinpräparaten für die Chromosomenbereiche 3q26 und 8q24

Die molekulare Charakterisierung der CTCs diente dem Nachweis aggressiver Tumorzellklone und der Malignitätssicherung. Um die Ergebnisse der Immunzytochemie zu bestätigen, wurden FISH-Analysen an ausgewählten Proben für den Chromosomenbereich 3q26 und 8q24 durchgeführt. Hierfür wurden aus den nach Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Zellsuspensionen weitere Zytospinpräparate angefertigt (siehe Kapitel 3.1.5) und zur Identifizierung der CTCs vor der FISH-Analyse

eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Die immunzytochemische Färbung wurde wie bereits im Kapitel 3.1.7 beschrieben durchgeführt, mit der Änderung, dass Alexa Fluor 488 konjugiertes Streptavidin anstelle von Alexa Fluor 594 konjugiertem Streptavidin eingesetzt wurde. Da aufgrund der mikroskopischen Voraussetzungen die Anzahl von gleichzeitig anwendbaren Fluoreszenzfarbstoffen limitiert war, wurde keine Leukozytenfärbung gegen CD45 durchgeführt. Für die Identifizierung von CTCs in Patientenproben wurde im Allgemeinen der in Kapitel 3.1.7 beschriebene Antikörpercocktail verwendet, mit Ausnahme der Patientenprobe H071Q. Die CTCs dieser Probe wurden zuvor immunzytochemisch charakterisiert, mit dem Ergebnis, dass die CTCs dieser Probe nur durch anti-Zytokeratin Antikörper detektiert wurden und nicht durch die übrigen Antikörper des Antikörpercocktails. Daher wurden für die Detektion der CTCs der Probe H071Q vor der FISH-Analyse nur anti-Zytokeratin Antikörper verwendet. Zur Identifizierung der SK-OV 3 CTCs, die aus dem Blut der Mäuse isoliert wurden, wurde ein gegen HER-2 gerichteter Antikörper verwendet. Zu Beginn jeder FISH-Analyse wurden die Zellen der Zytospinpräparate fixiert. Hierfür wurden die Objektträger für 3 min in eiskaltem 75% igem Ethanol inkubiert. Dieser Fixierungsschritt wurde nicht durchgeführt, wenn die Zellen bereits nach der Dichtegradientenzentrifugation mit PFA fixiert waren. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für jeweils 2 min in PBS-Puffer gewaschen. Parallel wurde FISH-Vorbehandlungspuffer (*Spot-Light Tissue Heat Pretreatment Buffer*, Invitrogen) in einer Küvette im Wasserbad auf 97 °C erwärmt. Die Objektträger wurden für 10 min darin inkubiert. Anschließend wurde die Küvette aus dem Wasserbad genommen und mit offenem Deckel für 15 min abgekühlt. Danach wurden die Objektträger dreimal für jeweils 2 min in PBS-Puffer gewaschen. FISH-Enzympuffer wurde auf 37 °C im Wärmeschrank vorgewärmt und dann auf das Zellareal gegeben und für 10 min im Wärmeschrank bei 37 °C und wassergesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 2 min in PBS-Puffer wurden die Zellen dehydriert. Hierfür wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) für jeweils 2 min inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in den Wärmeschrank bei 37 °C gelegt, bis diese vollständig trocken waren. Zur Vorbereitung der FISH-Sonde wurden pro Zytospinpräparat 1 µl humane Cot 1-DNA (oder murine Cot 1-DNA bei Mausproben), 2 µl 3q26-Sonde (Spektrum orange markiert) oder 8q24-Sonde (Spektrum orange markiert), 1 µl Zentromer 7-Sonde (Spektrum aqua markiert) und 6 µl FISH-Hybridisierungspuffer zusammenpipettiert und gut gemischt. Da die FISH-Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, wurde ab diesem

Arbeitsschritt wenn möglich Lichteinstrahlung vermieden um die FISH-Probe vor Licht zu schützen. Es wurden jeweils 10 µl dieser FISH-Probe auf ein Zellareal pipettiert und durch das Auflegen eines Deckgläschens gleichmäßig verteilt. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Deckgläschen durch das Auftragen von Fixogum verschlossen. Die Objektträger wurden nun in einen FISH-Thermoblock gelegt und das in Tabelle 3.2 aufgeführte FISH-Programm gestartet.

**Tabelle 3.2: FISH-Programm.**

Temperatur	Zeit	Schritt
95 °C	3 min	Denaturierung
37 °C	≥ 16 h	Hybridisierung

Nachdem für mindestens 16 Stunden der Hybridisierungsschritt bei 37 °C durchgeführt wurde, wurden die Objektträger aus dem Thermoblock genommen und das *Fixogum* mit dem Deckgläschen vorsichtig entfernt. Die Objektträger wurden dreimal für jeweils 10 min in 46 °C warmen 50 % Formamid/ 2 x SSC-Puffer (SSC: *saline-sodium citrate*), zweimal für jeweils 10 min in 46 °C warmen 2 x SSC-Puffer und einmal für 5 min in 46 °C warmen 0,1 x SSC-Puffer gewaschen. Anschließend wurde *Vectaschild® Mounting Medium* mit DAPI auf die Zellareale gegeben und die Objektträger eingedeckelt, indem vorsichtig ein Deckgläschen auf das Zellareal gelegt wurde und dieses mit Nagellack luftdicht verschlossen wurde.

#### 3.4.4 FISH an Paraffingewebeschnitten von Karzinomgewebe für den Chromosomenbereich 3q26 und 8q24

Die Gewebedünnschnitte wurden wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben angefertigt. Zu Beginn der FISH-Analyse wurden die Gewebeschnitte deparaffiniert und rehydriert (siehe Kapitel 3.3.2). Anschließend wurden zur Fixierung der Gewebeschnitte diese für 10 min in -20 °C kaltem FISH-Fixierungspuffer (2% Formaldehyd in Methanol) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für jeweils 2 min in PBS-Puffer gewaschen. Zur Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurde zuvor FISH-Vorbehandlungspuffer (*Spot-Light Tissue Heat Pretreatment Buffer*, Invitrogen) in einer Küvette im Wasserbad auf 97 °C erwärmt und die Objektträger für 10 min in diesem inkubiert. Anschließend wurde die Küvette aus dem Wasserbad genommen und zum Abkühlen mit offenem Deckel für 15 min stehengelassen. Danach wurden die

Objektträger dreimal für jeweils 2 min in PBS-Puffer gewaschen. Die FISH-Enzymlösung wurde auf 37 °C im Wärmeschrank vorgewärmt, auf die Gewebeschnitte gegeben und für 10 min im Wärmeschrank bei 37 °C und wassergesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 2 min in PBS-Puffer wurden die Gewebeschnitte dehydriert. Hierfür wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) für jeweils 2 min inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in den Wärmeschrank bei 37 °C gelegt, bis diese komplett trocken waren. Zur Vorbereitung der FISH-Probe wurden pro Gewebeschnitt 1 µl humane Cot-DNA, 2 µl 3q26-Sonde (Spektrum orange markiert) oder 8q24-Sonde (Spektrum orange markiert), 1 µl Zentromer 7-Sonde (Spektrum aqua markiert) und 6 µl FISH-Hybridisierungspuffer zusammenpipettiert und gut gemischt. Da die FISH-Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, wurde ab diesem Arbeitsschritt, wenn möglich, Lichteinstrahlung vermieden und die FISH-Probe vor Licht geschützt. Es wurden jeweils 10 µl dieser FISH-Probe auf einen Gewebeschnitt pipettiert und durch das Auflegen eines Deckgläschens auf der gesamten Gewebefläche gleichmäßig verteilt. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Deckgläschen durch das Auftragen von Fixogum verschlossen. Die Objektträger wurden nun in einen FISH-Thermoblock gelegt und das in Tabelle 3.2 aufgeführte FISH-Programm gestartet.

Nachdem für mindestens 16 Stunden der Hybridisierungsschritt bei 37 °C durchgeführt wurde, wurden die Objektträger aus dem Thermoblock genommen und das Fixogum mit dem Deckgläschen vorsichtig entfernt. Zuvor wurde in einer Küvette im Wasserbad 2 x SSC/NP-40 Puffer auf 72 °C erwärmt. Die Objektträger wurden für jeweils 2 min erst in 72 °C warmen 2 x SSC/NP-40 Puffer, dann in Raumtemperatur-warmen 2 x SSC/NP-40 Puffer und PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dehydriert, indem die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) für jeweils 2 min inkubiert wurden. Danach wurden die Objektträger in den Wärmeschrank bei 37 °C gelegt, bis diese komplett trocken waren und mit *Vectaschild® Mounting Medium* mit DAPI eingedeckelt. Hierfür wurde vorsichtig ein Deckgläschen auf das Zellareal gelegt und dieses mit Nagellack luftdicht verschlossen.

### 3.4.5 Protokoll zur Auswertung der FISH-Analysen

Die Auswertung der FISH-Analysen erfolgte unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops *Axiostar plus* (Zeiss). Die Tumoreareale wurden identifiziert, indem HE-gefärbte Gewebeschnitte (siehe Kapitel 3.3.3) mikroskopisch beurteilt wurden. Für die Auswertung der FISH-Analysen an Gewebeschnitten wurden im DAPI-Kanal (Filterblock 1, Zeiss) Zellen gesucht, die vereinzelt lagen und nicht von weiteren Zellen überlagert wurden. Nur diese Zellen wurden für die Analysen verwendet, da die FISH-Signale eindeutig einem Zellkern zugeordnet werden konnten. Tumoreareale wurden eindeutig identifiziert, indem parallel HE gefärbte Gewebeschnitte (siehe Kapitel 3.3.3) des gleichen Paraffinblocks durch Mikroskopieren beurteilt wurden. Auch bei der Auswertung von FISH-Analysen an Zytospinpräparaten wurde darauf geachtet, dass nur vereinzelt Zellen analysiert wurden. Da meistens zusätzlich zur FISH-Analyse eine immunzytochemische Färbung durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3.1.7 und 3.1.8), konnten die CTCs durch Fluoreszenz im Alexa Fluor 488-Kanal (Filterblock MC-2B) identifiziert werden. Die Hybridisierungssignale für die Spektrum orange-markierten Sonden 3q26 und 8q24 wurden unter Verwendung des entsprechenden Fluoreszenzkanals (Filterblock MC-4) analysiert. Als Referenzsonde wurde eine Spektrum aqua-markierte Sonde des Zentromerbereichs von Chromosomen 7 verwendet. Zur Analyse der Zentromersonde wurde der Fluoreszenzkanal Aqua (Filterblock AQUA) verwendet. Die Signalauswertung erfolgte bei einer 1000-fachen Vergrößerung (100 x Öl Objektiv *Plan-Neofluar*). An Gewebeschnitten oder Zelllinien wurden jeweils die FISH-Signale von 100 Zellen bestimmt und für beide Sonden der Mittelwert errechnet. Anschließend wurde das Verhältnis von Signalen der DNA-Sonde zur Referenzsonde bestimmt. Ein Verhältnis von  $\geq 1,5$  wurde als DNA-Gewinn und  $\leq 0,75$  als DNA-Verlust definiert. Die Spezifität der Sonden wurde an Leukozyten von gesunden Spendern bestimmt (siehe Kapitel 4.6.1).

### ***3.5 Molekularbiologische Methoden***

#### **3.5.1 Isolierung genomischer DNA**

Zur Isolierung von genomischer DNA sowohl aus Tumorgewebe als auch aus Zellkulturzellen und Leukozyten wurde entweder das *QIAmp® DNA Micro Kit* oder das *QIAmp® DNA Mini Kit* (Qiagen) verwendet.

Um genomische DNA aus Tumorgewebe zu isolieren, wurde das Gewebe mit dem Skalpell zerkleinert und entweder etwa 10 mg (*QIAmp® DNA Micro Kit*) oder bis zu 25 mg (*QIAmp® DNA Mini Kit*) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolierung von genomischer DNA aus Leukozyten wurde die Blutprobe zuvor durch Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kapitel 3.1.1) aufgearbeitet, die erhaltene Leukozyten-Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (10 min, 400 x g) pelletiert. Kulturzellen wurden wie im Kapitel 3.6.1 beschrieben geerntet und die Zell-Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (10 min, 400 x g) pelletiert.

Wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, wurden zu dem Gewebe oder den Zellen 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Qiagen) gegeben und über Nacht im Thermoblock bei 56 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufarbeitung genau nach Angaben des Herstellers. Zur Elution der genomischen DNA wurde zwischen 20 µl und 50 µl nukleasefreies Wasser verwendet. Die Qualität und Quantität der DNA-Probe wurde durch Messungen am *NanoDrop ND-1000-Spektrometer* bestimmt (siehe Kapitel 3.5.2). Bis zur Verwendung wurde die genomische DNA bei -20 °C gelagert.

#### **3.5.2 Bestimmung der DNA Konzentration mittels NanoDrop ND-1000-Spektrometer**

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann durch die Absorption bei 260 nm bestimmt werden. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung lässt sich durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm abschätzen. Basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste liegt das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm. Das Verhältnis der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm  $OD_{260}/OD_{280}$  sollte zwischen

1.8 und 2.0 betragen, wobei ein Wert von 1,8 einer reinen DNA-Lösung entspricht. Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit dem *NanoDrop-1000-Spektrometer* (PeqLab) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Für jede Messung wurde 1 µl DNA-Lösung verwendet.

### 3.5.3 Amplifikation von DNA durch Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) ermöglicht die spezifische Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Mullis *et al.*, 1986). Dabei werden Oligonukleotide (*Primer*) mit bekannter Sequenz eingesetzt, die das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren. Die PCR lässt sich in drei grundsätzliche Reaktionsschritte unterteilen. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang bei 94 °C aufgetrennt (Denaturierung). Im nächsten Schritt (*Annealing*) wird die Temperatur erniedrigt und die spezifischen *Primer* binden entsprechend ihrer Sequenz an den komplementären Bereich auf dem DNA-Strang. Wird nun die Temperatur auf 72°C erhöht, erfolgt die sogenannte Elongationsphase, in der eine hitzestabile DNA-Polymerase in Gegenwart von freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Komplementärstränge synthetisiert. Durch eine zyklische Wiederholung dieser drei Reaktionsschritte kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes. Um unspezifische Bindungen der *Primer* zu minimieren wurde Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) zum Ansatz gegeben. Es wurden verschiedene Bereiche des p53-Gens (Exon 5/6, Exon 7, Exon 8/9) amplifiziert. Folgender Standard PCR-Ansatz wurde unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank *HERAsafe, Thermo Fisher Scientific*) zusammenpipettiert:

**Tabelle 3.3: Standard PCR-Ansatz (20µl).**

Volumen	Reagenz
2 µl	PCR Gold Puffer (10 x)
1,6 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1,6 µl	dNTPs (2,5 mM)
1 µl	TMAC (2 mM)
0,2 µl	<i>Primer</i> vorwärts (10 µM)
0,2 µl	<i>Primer</i> rückwärts (10 µM)
0,2 µl	Polymerase (5 U/µl)
5,2 µl	nukleasefreies Wasser
8 µl	<i>Template</i> -DNA (5ng/µl)



Die Reaktion wurde im Thermozykler mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

**Tabelle 3.4: PCR Programm zur Amplifikation von DNA-Bereiche des *p53*-Gens.**

	Temperatur	Zeit	Schritt
	95 °C	10 min	primäre Denaturierung
35 Zyklen	95 °C	30 sec	Denaturierung
	61°C	30 sec	<i>Annealing</i>
	72 °C	45 sec	Elongation
	72 °C	7 min	terminale Elongation
	4 °C	∞	Kühlung

### 3.5.4 Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können durch eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt werden. Für die Herstellung von 1-2 % igen Agarose-Gelen (abhängig von der Größe der Nukleinsäuren) wurde die Agarose in 1 x TAE-Puffer (TAE: **T**ris-**A**cetate-**E**DTA) in der Mikrowelle geschmolzen, nach kurzem Abkühlen mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die Gelapparatur gegossen. Zur Aussparung der Geltaschen wurde ein geeigneter Gelkamm verwendet. Nachdem das Gel durch Abkühlung fest geworden war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in der Elektrophoreseapparatur mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen geladen. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurden 5 µl eines geeigneten DNA-Größenstandards mit auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei ungefähr 100 V etwa für 25 min. Nach der Auftrennung wurde das Gel mit Hilfe eines Transilluminators analysiert. Hierfür wurde das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt (Anregungswellenlänge 234 nm) und die DNA-Banden des Gels am Geldokumentationssystem (Syngene, Cambridge USA) visualisiert und dokumentiert.

### 3.5.5 Restriktionsspaltung von DNA

DNA kann mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Restriktionsendonukleasen erkennen eine spezifische DNA-Sequenz und spalten die Phosphodiesterbindungen beider Stränge des DNA-Moleküls hydrolytisch. Zum



Nachweis von mutierter Tumor-DNA der CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q, wurde eine Restriktionsspaltung mit der Restriktionsendonuklease *Bst*N I durchgeführt. Durch Sequenzierung der Tumor-DNA der Patientin H071 konnte eine Mutation im *p53*-Gen festgestellt werden. Die Restriktionsendonuklease *Bst*N I erkennt und spaltet unmutierte Leukozyten-DNA, während die mutierte DNA-Sequenz der vom Tumor stammenden Zellen nicht gespalten wird. Nach der Isolierung von genomischer DNA aus der Blutprobe H071Q wurde das Exons 8/9 des *p53*-Gens durch eine PCR amplifiziert. Durch die Restriktionsspaltung des Restriktionsenzym *Bst*N I wurde nicht mutierte Leukozyten-DNA gespalten und konnte somit nicht für eine folgende Amplifikation als Template dienen. Somit wurde selektiv mutierte, vom Tumor stammende DNA amplifiziert und die spezifische Mutation konnte durch Sequenzierung der DNA nachgewiesen werden. Das Restriktionsenzym *Bst*N I, der *NEBuffer 2* und *Purified BSA* wurde von der Firma *New England BioLabs* bezogen. Der 60 µl Restriktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

**Tabelle 3.5: Restriktionsansatz des Restriktionsenzym *Bst*N I.**

Volumen	Reagenz
52,4 µl	PCR-Amplifikat p53 Exon 8/9 (aufgereinigt <i>NucleoSEQ</i> Säulchen, siehe Kapitel 3.5.7.3)
6 µl	<i>NEBuffer 2 (10 x)</i>
0,6 µl	<i>Purified BSA (100 x)</i>
1 µl	Restriktionsenzym <i>Bst</i> N I (10.000 Units/ml)

Der Restriktionsansatz wurde über Nacht bei 60 °C im Heizblock inkubiert. Der Erfolg der Restriktionsspaltung wurde anhand eines analytischen DNA-Gels durch Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5.4) überprüft. Nach Aufreinigung der DNA wurde die DNA-Konzentration anschließend mittels *NanoDrop Spektrometers* (siehe Kapitel 3.5.2) bestimmt.

### 3.5.6 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung mit *BigDye*-Terminatoren basiert auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Jede DNA-Probe wird nur einer einzigen Sequenzierungsreaktion unterworfen, die alle vier unmarkierten dNTPs enthält. Der Abbruch der enzymatischen Synthese erfolgt durch den Einbau

eines der vier Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs), die unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind. Alle so entstandenen Oligonukleotide können in einem Sequenziergel anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz identifiziert und so die DNA-Sequenz direkt abgelesen werden. Die DNA Sequenzierung wurde unter Verwendung des *BigDye® Terminator V.1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* (Applied Biosystem) durchgeführt. Der Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

**Tabelle 3.6: Standard DNA-Sequenzieransatz.**

Volumen	Reagenz
x µl	<i>Template</i> -DNA (ca. 10 ng PCR Produkt)
3 µl	5 x Sequenzierungs-Puffer
2 µl	<i>BigDye-Terminator Ready Reaction Mix ABI V1.1</i> (Polymerase, dNTPs, ddNTPs, Puffer 2,5 x)
1 µl	<i>Primer</i> (10 µM) mit ddH <sub>2</sub> O auf 20 µl auffüllen

Die Reaktion wurde im Thermozykler mit folgendem Sequenzierprogramm durchgeführt:

**Tabelle 3.7: Temperaturprogramm für die Sequenzierung.**

	Temperatur	Zeit	Schritt
25 Zyklen	96 °C	30 sec	Denaturierung
	50 °C	15 sec	<i>Annealing</i>
	60 °C	4 min	Elongation
	4 °C	∞	Kühlung

Der Sequenzieransatz wurde anschließend mit 80 µl ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt sowie mit 300 µl 96 % Ethanol (Raumtemperatur) gefällt. Es folgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 x g. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die DNA mit 250 µl 70 % Ethanol (Raumtemperatur) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15.000 x g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand erneut verworfen und die DNA mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem *Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer* unter Verwendung des Polymers POP7 und 36 cm langen Kapillaren (*Applied Biosystems*). Die Auswertung der Sequenzanalysen

---

erfolgte mittels der *Sequence Analysis Software V3.07 (Applied Biosystems)*, *FinchTV V1.4* und dem *Online Alignment Tool ClustelW*. Die Referenzsequenzen wurden aus der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) Datenbank bezogen.

### 3.5.7 Aufreinigung von DNA

#### 3.5.7.1 Aufreinigung von DNA durch Ethanol-Fällung

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit einem Zehntel Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und drei Volumenteilen 96 % igem Ethanol oder alternativ einem Volumenteil Isopropanol versetzt und kurz vermischt. Die Zugabe der Salzlösung mit leicht saurem pH-Wert gewährleistet eine quantitative Fällung der DNA, während der Alkohol die Dehydratisierung und Zusammenlagerung der DNA-Moleküle bewirkt. Die DNA bildet unter diesen Bedingungen einen unlöslichen Niederschlag. Durch eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 15.000 x g und 4 °C wurde das DNA-Präzipitat pelletiert. Das Nukleinsäurepellet wurde mit 200 µl 70 %igem eiskalten Ethanol durch eine Zentrifugation für 10 min bei 15.000 x g und 4 °C gewaschen, wodurch die mitgefällten Salze größtenteils entfernt wurden. Das Nukleinsäurepellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in einer geeigneten Menge nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

#### 3.5.7.2 Aufreinigung von DNA durch Extraktion aus Agarosegelen

Die DNA-Probe wurde durch Gelelektrophorese im Agarosegel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.5.4), die DNA-Bande der richtigen Größe aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde aus dem Gel mit Hilfe des *QIAquick® Gel Extraction Kits* (Qiagen) extrahiert. Das ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen und das dreifache Volumen QG-Puffer zum einfachen Volumen des Gelstücks gegeben. Das Gel wurde durch eine zehnmünütige Inkubation bei 50 °C und gelegentlichem Vortexen im QG-Puffer aufgelöst. Anschließend wurde ein Gelvolumen Isopropanol ins Reaktionsgefäß gegeben und nach Mischen wurden bis zu 800 µl der Lösung auf eine *QIAquick Spin* Säule, welches auf ein Sammelgefäß gestellt wurde, gegeben. Nach einer 1 minütigen Zentrifugation bei 15.000 x g wurde der Durchlauf verworfen, die restliche Menge der Lösung auf die gleiche Säule gegeben und wiederholt zentrifugiert. Nachdem der Durchlauf verworfen wurde, wurden zum Waschen der Säule

750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und nach der 1 minütigen Zentrifugation der Durchlauf verworfen. Um den restlichen Waschpuffer zu entfernen wurde die leere Säule für 1 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die DNA durch 30-50 µl nukleasefreies Wasser eluiert. Hierfür wurde das Wasser auf die Säule gegeben, kurz inkubiert und durch Zentrifugation ins Reaktionsgefäß überführt. Die Qualität und Quantität der DNA wurde durch das *NanoDrop Spektrometer* bestimmt (siehe Kapitel 3.5.2).

### *3.5.7.3 Aufreinigung von DNA durch NucleoSEQ Säulchen*

Das Hydratgel der *NucleoSEQ*-Säulchen wurde über Nacht oder mindestens für 30 min in 600 µl destilliertem Wasser hydriert. Überschüssiges Wasser wurde durch eine 2 minütige Zentrifugation bei 750 x g in ein Sammelgefäß überführt und verworfen. Anschließend wurden 300 µl destilliertes Wasser auf die Säule gegeben, wieder für 2 min bei 750 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die aufzureinigende DNA-Lösung wurde auf die Säule gegeben und durch Zentrifugieren (4-6 min, 750 x g) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

## **3.6 Zellkulturmethoden**

### **3.6.1 Kultivierung von Tumorzelllinien und Asziteszellen**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank (*HERA safe, Thermo Fisher Scientific*) durchgeführt. Die Zelllinien und Asziteszellen wurden in sterilen Kulturflaschen der Firma Nunc kultiviert. Die Kultivierung der Tumorzelllinien erfolgte mit supplementiertem DMEM-Medium (DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Zellkulturmedium 1) in Hera150-Brutschränken (Kendro) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und 10 % CO<sub>2</sub>. Die Kultivierung von Asziteszellen erfolgte mit supplementiertem RPMI 1640-Medium (PPMI: *Roswell Park Memorial Institute*) (Zellkulturmedium 2) in Hera150-Brutschränken (Kendro) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre, 5 % CO<sub>2</sub> und 10 % O<sub>2</sub>. Die Zellen wurden abhängig von ihrer Zellteilungsrate ein bis zweimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen bei einer Konfluenz von etwa 80 % passagiert. Hierzu wurden die adhärent wachsenden Zellen mit 37 °C warmen PBS-Puffer

gewaschen und eine 37 °C warme Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) auf die Zellen in der Kulturflasche gegeben. Durch eine 2-5 minütige Inkubation der Trypsin/EDTA-Lösung in Verbindung mit Klopfen auf das Kulturgefäß wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Das EDTA komplexiert Calcium und Magnesium, so dass die Verbindung der Zellen zum Gefäßboden geschwächt wird. Das Trypsin spaltet die Adhäsionsproteine. Da EDTA in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt und Trypsin die Zellmembranen auflösen kann, wird zu der Zellsuspension sofort nach dem Ablösen der Zellen FKS-haltiges Medium zugegeben, da dieses Calcium- und Magnesiumionen sowie trypsininhibierende Serumproteine enthält. Der Vorgang wurde durch Zugabe von vorgewärmtem Medium gestoppt und die resuspendierten Zellen in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und durch Zentrifugation für 3 min bei 400 x g pelletiert. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und in einer Dichte von 20-30 % in Zellkulturflaschen ausgesät und weiter kultiviert.

### **3.6.2 Kryokonservieren und Auftauen von Zellen**

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden diese kryokonserviert. Eukaryotische Zellen können durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) für lange Zeit gelagert und anschließend wieder in Kultur genommen werden. Um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, wird den Zellen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam das Wasser entzogen. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen trypsiniert und nach einer Zentrifugation (3 min, 400 x g) in Einfriermedium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde 1 ml in ein Kryoröhrchen (Nunc) überführt und dieses in eine Einfrierbox aus Styropor gestellt. Zunächst wurde diese Einfrierbox für 2 h bei -20 °C, dann über Nacht bei -80 °C eingefroren und schließlich wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen eines solchen Zellaliquots im 37 °C Wasserbad wurde die Zellsuspension möglichst schnell in 10 ml serumhaltigem Medium für den entsprechenden Zelltyp aufgenommen und zentrifugiert (3 min, 400 x g). Der Überstand wurde entfernt, die Zellen im entsprechenden Zellkulturmedium aufgenommen, in eine Kulturflasche überführt und kultiviert.

### ***3.7 Statistische Auswertung***

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Computer-Programms SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, Version 19.0) durchgeführt. Eine mögliche Korrelation zwischen den einzelnen Faktoren wurde mittels Chi<sup>2</sup>-Test und dem Fisher-Exakt-Test ermittelt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte unter 0,05 beurteilt. Der Chi<sup>2</sup>-Test wird zur Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen eingesetzt, also bei Variablen mit nominalem Skalenniveau. Durch den Chi<sup>2</sup>-Test wird die Unabhängigkeit von zwei Alternativmerkmalen geprüft. Der Fisher-Exakt-Test entspricht im Anwendungsgebiet dem Chi<sup>2</sup>-Test. Er ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit, welcher auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert. Zur Beurteilung, ob die Detektion von CTCs prognostische Aussagekraft in Hinsicht auf das Gesamtüberleben oder das krankheitsfreie Überleben hat, wurden Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Die Signifikanzen wurden durch *Log Rank*-Tests bestimmt wobei auch hier p-Werte von unter 0,05 als statistisch signifikant beurteilt wurden. Der Log Rank-Test ist ein nichtparametrischer Test zum Vergleich von Überlebensraten in zwei oder mehr unverbundenen Stichproben.

## 4 Ergebnisse

### *4.1 Darstellung der Verfahren zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen*

#### **4.1.1 Etablierung eines zweistufigen Protokolls aus Dichtegradientenzentrifugation und immunmagnetischer Zellseparation**

Die Anzahl von zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) im Blut ist sehr gering ist, daher benötigt ihre Detektion eine effektive, sensitive und spezifische Anreicherungsmethode. Das Verhältnis zwischen CTCs und Leukozyten kann bis zu 1:10<sup>6</sup> betragen (Pantel *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde ein kombiniertes Protokoll, bestehend aus einer Dichtegradientenzentrifugation und einer immunmagnetischen Zellseparation, etabliert. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde von Griwatz *et al.* entwickelt und trennt die zellulären Bestandteile des Blutes aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten auf (siehe Kapitel 3.1.1 und Abbildung 4.1). Es konnte gezeigt werden, dass sich die CTCs in der separaten Monozytenfraktion befinden. Der Gradient erreichte eine 20-fache Anreicherung der CTCs, und die Wiederfindungsrate betrug zwischen 70-90 % (Griwatz *et al.*, 1995). Hierauf basierend wurde ein Protokoll für den Nachweis von CTCs im peripheren Blut von Ovarialkarzinompatientinnen etabliert. Hierfür wurden „*spiking*“-Experimente durchgeführt, in denen eine definierte Anzahl Zellen einer Karzinomzelllinie (MCF-7 oder SK-OV-3) in Blutproben von gesunden Spendern gegeben wurde. Zur Visualisierung dieser Karzinomzellen wurden anschließend immunzytochemische Färbungen mit fluoreszenzmarkierten, gegen Zytokeratin (CK 7/18) gerichteten Antikörpern (A45-BB3-Cy3) durchgeführt und ihre Anzahl am Fluoreszenzmikroskop bestimmt (siehe Kapitel 3.1.6). Anhand dieses Modellsystems für CTCs in Blutproben von Karzinompatienten wurde die Anreicherungsmethode etabliert und die Wiederfindungsrate der Karzinomzellen bestimmt. Für eine effektive Anreicherung der CTCs war die exakte Einhaltung des Gradientenprotokolls unerlässlich (siehe Kapitel 3.1.1). Um eine optimale Anreicherung zu gewährleisten, mussten die Dichtemedien einen pH-Wert von genau 7,4 aufweisen. Des Weiteren war es von entscheidender Bedeutung, die Arbeitsschritte bei Raumtemperatur (22 °C) durchzuführen sowie eine Durchwirbelung des Gradienten zu vermeiden.



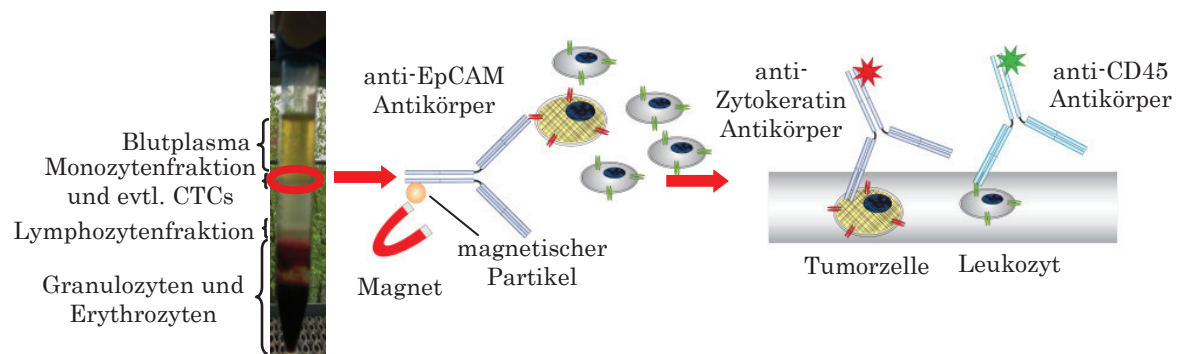
Nach Etablierung der Dichtegradientenzentrifugation konnte eine Wiederfindungsrate von etwa 80 % erreicht werden, welches der Wiederfindungsrate von Griwatz *et al.* entspricht. Um eine Aussage bezüglich der Verteilung der Karzinomzellen im Gradienten geben zu können, wurden zusätzlich zur Monozytenphase, die die Karzinomzellen enthalten sollte, weitere Phasen des Gradientens auf Vorhandensein von Karzinomzellen analysiert. In Tabelle 4.1 sind typische Verteilungsergebnisse der Karzinomzellen exemplarisch an vier Gradientenversuchen gezeigt. In der Monozytenphase konnten zwischen 73,3 % und 95 % der Karzinomzellen detektiert werden. In der Plasmaphase befanden sich in keinem Fall Karzinomzellen. Ein geringer Anteil der Karzinomzellen wurde in einer der sich unter der Monozytenphase befindenden Phasen, der Mittelphase (ca. 5 %) und Lymphozytenphase (ca. 7 %), nachgewiesen. Somit zeigte sich, dass die Monozytenphase den Hauptanteil der Karzinomzellen enthielt und sich die Methode zur Anreicherung von CTCs eignet.

**Tabelle 4.1: Detektionsrate von Karzinomzellen und ihre Verteilung im Dichtegradienten.** In den Versuchen 1 und 2 wurden MCF-7 Zellen verwendet, in den Versuchen 3 und 4 SK-OV-3 Zellen.

Phase	Versuch 1 (MCF-7)	Versuch 2 (MCF-7)	Versuch 3 (SK-OV-3)	Versuch 4 (SK-OV-3)
Plasma	0 %	0 %	0 %	0 %
<b>Monozyten</b>	<b>86,3 %</b>	<b>95 %</b>	<b>80 %</b>	<b>73,3 %</b>
Mittel	0 %	3 %	6,6 %	10 %
Lymphozyten	13 %	0 %	3,3 %	10 %

Zur weiteren Anreicherung wurde nach der Dichtegradientenzentrifugation eine EpCAM (epitheliale Zelladhäsionsmolekül, *epithelial cell adhesion molecule*) basierte immunmagnetische Zellseparation mit Hilfe des *CellSearch<sup>TM</sup> Profile Kits* unter Verwendung des *CellTracks<sup>®</sup> AutoPrep Systems* durchgeführt. Das *CellTrack<sup>®</sup> AutoPrep System* garantiert durch die weitestgehend automatisierte Aufarbeitung eine standardisierte und optimierte Isolierung von CTCs (siehe Kapitel 3.1.2 und Abbildung 4.1). Zur Identifizierung der CTCs wurde eine immunzytochemische Färbung unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten, gegen Zytokeratin (CK 5/7/8/18) gerichteten Antikörpern durchgeführt. Zusätzlich wurden zur Visualisierung von Leukozyten fluoreszenzmarkierte, gegen das Leukozytenantigen CD45 (**C**luster of **d**ifferentiation 45) gerichtete Antikörper verwendet (siehe Kapitel 3.1.6 und Abbildung 4.1).





1) Dichtegradientenzentrifugation 2) immunmagnetische Zellseparation 3) Immunzytochemie

#### Abbildung 4.1: Detektionsmethode von CTCs.

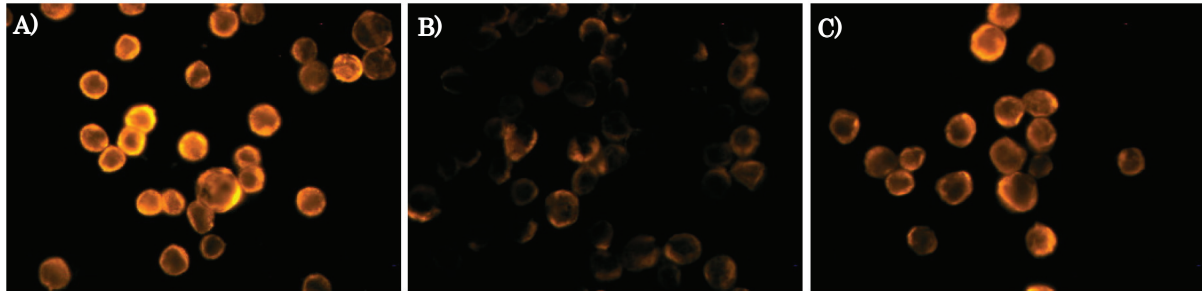
1) Anreicherung der Tumorzellen aus dem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation. Die möglichen Tumorzellen befinden sich in der Monozytenphase des Gradienten. 2) Weitere Anreicherung durch eine immunmagnetische Zellseparation. In diesem System werden gegen EpCAM (exprimiert von Tumorzellen) gerichtete Antikörper verwendet, die mit magnetischen Partikeln gekoppelt sind. Nach Anlegen eines magnetischen Feldes können dadurch EpCAM positive Zellen angereichert werden. 3) Zur Identifizierung der CTCs wurden Antikörper gegen Zytokeratin (CK 5/7/8/18) verwendet und zur Detektion von Leukozyten gegen CD45 gerichtete Antikörper.

Wurde die immunmagnetische Zellseparation separat durchgeführt, konnten in „spiking“- Experimenten zwischen 70 % und 90 % der Zellen nachgewiesen werden. Nach der Durchführung der gesamten Anreicherungsmethode bestehend aus Dichtegradientenzentrifugation, immunmagnetischer Zellseparation und immunzytochemischer Detektion konnten etwa 60 % der Karzinomzellen detektiert werden.

#### 4.1.2 Optimierung des Protokolls zur immunzytochemischen Detektion von Zytokeratin exprimierenden Zellen durch Antigendemaskierung

Es zeigte sich, dass die Intensität des Fluoreszenzsignals der immunzytochemischen Färbung nach der Durchführung der Anreicherungsschritte deutlich reduziert war. Eine mögliche Ursache könnte in der Fixierung der Proben liegen. Im Aufarbeitungsprotokoll der EU-Studie OVCAD (*Ovarian Cancer Diagnosis*) wurden die Monozytenfraktionen mit den möglichen CTCs in Suspension mit Paraformaldehyd fixiert (siehe Kapitel 3.1.1). Diese Fixierung war notwendig, da das Blut in verschiedenen klinischen Zentren aufgearbeitet wurde, und somit Versand und Lagerung möglich waren. Durch die Fixierung werden Proteine mittels Methylenbrücken quervernetzt. Dadurch kann die Konformation von Antigenen so verändert werden, dass die Epitope für die Antikörper nicht mehr zugänglich sind, und somit das Detektionssignal abnimmt (siehe Abbildung 4.2 B). Um diese Problematik zu umgehen, wurde ein Antigendemaskierungsschritt

durchgeführt, indem die Objektträger mit den fixierten Zellen in Tris-EDTA-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Ethylendiamintetraacetat-Puffer) (pH 9,0) gekocht wurden (siehe Kapitel 3.1.6). Durch diese Behandlung wurden die Quervernetzungen gelöst, so dass die Epitope für die Antikörper zugänglich wurden.



**Abbildung 4.2: Optimierung der immunzytochemischen anti-Zytokeratin-Färbung durch Antigen-demaskierung.** Zellen der Zytokeratin exprimierenden Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurden durch den fluoreszenzmarkierten pan-Zytokeratin-Antikörper A45-BB3-Cy3 (CK 7/18) detektiert. Die Zellen der Färbungen B und C wurden entsprechend dem Protokoll der OVCAD-Studie vorfixiert. Als Positiv-Kontrolle wurden nicht vorbehandelte MCF-7 Zellen verwendet. **A:** nicht vorfixierte MCF-7 Zellen; **B:** vorfixierte MCF-7 Zellen ohne Antigen-demaskierung behandelt; **C:** vorfixierte MCF-7 Zellen mit Antigen-demaskierung behandelt. Vergrößerung 400 x.

Wie aus Abbildung 4.2 ersichtlich wird, konnte die antikörperbasierte Detektion von Zytokeratin (CK 7/18) an vorfixierten MCF-7 Zellen durch die Antigen-demaskierung verbessert werden. Durch die Antigen-demaskierung war das Fluoreszenzsignal deutlich intensiver im Vergleich zur Färbung an vorfixierten MCF-7 Zellen, bei denen keine Antigen-demaskierung durchgeführt wurde (siehe Abbildung 4.2 B und C).

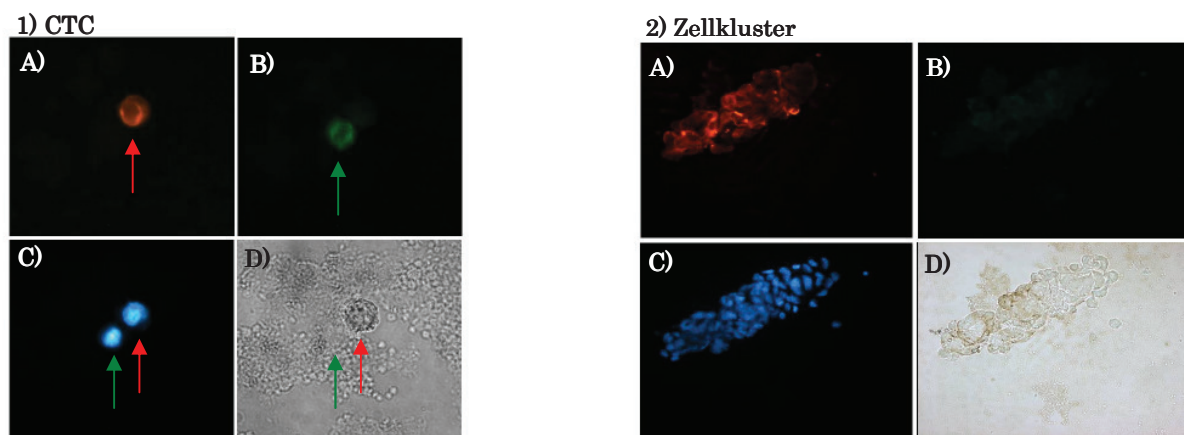
#### ***4.2 Anwendung des optimierten Protokolls zur Detektion von CTCs in Blutproben eines Patientenkollektives mit rezidiviertem Ovarialkarzinom***

Zur Evaluierung des optimierten Anreicherungsprotokolls wurden Blutproben von Patientinnen mit rezidivierter Erkrankung des Ovarialkarzinoms untersucht. Da die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins von CTCs bei rezidivierten Erkrankungen höher als bei primären Karzinomerkrankungen ist, eigneten sich diese Blutproben zur Überprüfung des Protokolls (Engel *et al.*, 1999; Poveda *et al.*, 2011). Unter Verwendung des optimierten Protokolls wurden Blutproben (15-30 ml) von 49 Patientinnen mit einer Rezidivkrankung aufgearbeitet und analysiert.

**Tabelle 4.2: Detektionsrate von CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit rezidivierter Ovarialkarzinomerkrankung.**

Gesamtzahl	CTC negative Proben	CTC positive Proben	Proben mit Zellkluster
49 (100 %)	41 (83,7 %)	8 (16,3 %)	1 (2 %)

In acht (16,3%) von 49 Blutproben wurden CTCs (Zytokeratin positive und CD45 negative Zellen) detektiert (siehe Tabelle 4.2 und Abbildung 4.3.1). In einer Probe wurde zusätzlich ein zirkulierender Zellkluster nachgewiesen (siehe Tabelle 4.3 und Abbildung 4.3.2). Die Anzahl der detektierten CTCs lag zwischen einer und 15 Zellen pro Blutprobe (mittlere Anzahl 3,6 Zellen pro Blutprobe) (siehe Tabelle 4.3).



**Abbildung 4.3: CTC (1) und Zellkluster (2) isoliert aus dem Blut von rezidierten Ovarialkarzinompatientinnen. A:** Zytokeratin-Färbung der CTCs; **B:** CD45-Färbung der Leukozyten; **C:** DNA-Färbung durch DAPI; **D:** Durchlicht. Rote Pfeile: CTC; grüne Pfeile: Leukozyt. Vergrößerung: 1) CTC 1000 x und 2) Zellkluster: 400 x.

**Tabelle 4.3: Anzahl der detektierten CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit rezidivierter Ovarialkarzinomerkrankung.**

Probe	Anzahl der detektierten CTCs
H023	1
H024	6
K001	15
R002	3 + 1 Zellkluster
O640	1
O891	1
O494	1
O478	1

### 4.3 Detektion von CTCs in Blutproben der OVCAD-Studie von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom

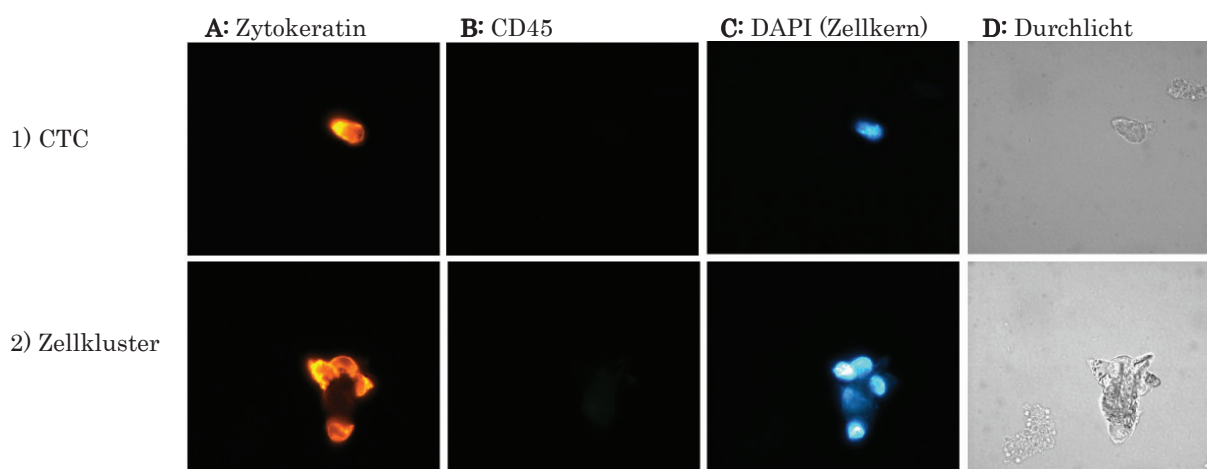
#### 4.3.1 Analyse der Blutproben der OVCAD-Studie von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom

Nach der Evaluierung der optimierten Methode wurden Blutproben der OVCAD-Studie von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom aufgearbeitet und analysiert. Es wurden zum einen Blutproben analysiert, die vor der Operation abgenommen wurden (Zeitpunkt Q) und zum anderen Blutproben, die sechs Monate nach Beendigung der Chemotherapie abgenommen wurden (Zeitpunkt H).

**Tabelle 4.4: Detektionsrate von CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom.** Blutproben des Zeitpunktes Q wurden vor der Operation abgenommen, Blutproben des Zeitpunktes H sechs Monate nach Chemotherapie.

Zeitpunkt	analysiert	negativ	positiv
Zeit Q (vor Operation)	139 (100 %)	134 (96,4 %)	5 (3,6 %)
Zeit H (6 Monate nach Therapie)	56 (100 %)	56 (100 %)	0 (0,0 %)

Es wurden 139 Blutproben des Zeitpunktes Q analysiert und in fünf Proben (3,6 %) CTCs detektiert (siehe Tabelle 4.4 und Abbildung 4.4.1). Es wurde zwischen einer und fünf CTCs pro Probe detektiert. Die mittlere Anzahl der identifizierten CTCs betrug 1,8 Zellen pro Blutprobe. In einer Probe konnte zusätzlich ein Zellcluster detektiert werden (siehe Tabelle 4.5 und Abbildung 4.4.2). In keiner der 56 analysierten Proben des Zeitpunktes H konnten CTCs detektiert werden (siehe Tabelle 4.4).



**Abbildung 4.4: CTC (1) und Zellcluster (2) isoliert aus dem Blut von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom (Probe L063Q).** A: Zytokeratin-Färbung der CTCs; B: CD45-Färbung der Leukozyten; C: DNA-Färbung durch DAPI; D: Durchlicht. Vergrößerung 400 x.

**Tabelle 4.5: Anzahl der detektierten CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom und klinische Daten.**

Probe	FIGO Klassifikation	TNM Klassifikation	Grading	Histologie	Anzahl der detektierten CTCs
L063Q	IIIC	pT: 3c; pN: N1; pM: M0	G2- mäßig differenziert	seröser Tumor	5 + Zellkluster
B095Q	IIIB	pT: 3c; pN: NX; pM: MX	G3- schlecht differenziert	seröser Tumor	1
B102Q	IIIC	pT: 3c; pN: N1; pM: MX	G3- schlecht differenziert	seröser Tumor	1
B108Q	IIIC	pT: 3c; pN: N1; pM: M0	G2- mäßig differenziert	seröser Tumor	1
H048Q	IV	pT: 3c; pN: NX; pM: M1	G3- schlecht differenziert	seröser Tumor	1

#### 4.3.2 Statistische Auswertung des CTC Nachweises in Korrelation mit klinischen Daten und dem Therapieverlauf

Um den diagnostischen und prognostischen Wert der CTCs zu analysieren, wurden die gewonnenen Daten statistisch ausgewertet. Die klinischen Daten des analysierten Patientenkollektives sind in Tabelle 4.6 dargestellt. Die Daten der zum Zeitpunkt Q (vor der Operation) abgenommenen Blutproben wurden zusätzlich nach CTC-Status unterteilt aufgeführt. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den CTC-Status positiv und negativ bewerteten Patientengruppen festgestellt werden (Chi<sup>2</sup>-Test). Die Mehrheit der Patientinnen hatte einen serösen Tumor (Zeitpunkt Q: 85,6 %, Zeitpunkt H: 82,1 %) und das FIGO-Stadium IIIC (Zeitpunkt Q: 79,9 %, Zeitpunkt H: 76,8 %). Das Alter der Patientinnen der Proben zum Zeitpunkt Q lag zwischen 18 und 83 Jahren (Altersdurchschnitt 58 Jahre) und das Alter der Patientinnen der Proben des Zeitpunktes H zwischen 18 und 81 Jahren (Altersdurchschnitt 57 Jahre). Der Beobachtungszeitraum zur Erfassung der klinischen Daten bezüglich des weiteren Krankheitsverlaufes (*follow-up*-Daten) lag zwischen 1 bis 49 Monaten (Mittelwert 31 Monate) bei den Patientinnen der Proben des Zeitpunktes Q und 14 bis 50 Monaten (Mittelwert 38 Monate) bei den Proben des Zeitpunktes H.

**Tabelle 4.6: Klinische Daten des analysierten Patientenkollektives der OVCAD-Studie.** Die Daten der zum Zeitpunkt Q (vor der Operation) abgenommenen Blutproben wurden zusätzlich nach ihrer CTC Bewertung unterteilt aufgeführt.

	Gesamt Zeit Q	CTC Status Zeit Q		Gesamt Zeit H
		negativ	positiv	
<b>Histologie</b>				
klarzelliger Tumor	1 (0,7 %)	1 (0,7 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
endometrioider Tumor	6 (4,3 %)	6 (4,5 %)	0 (0,0 %)	4 (7,1 %)
gemischter epithelialer Tumor	9 (6,5 %)	9 (6,7 %)	0 (0,0 %)	5 (8,9 %)
muzinöser Tumor	2 (1,4 %)	2 (1,5 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
seröser Tumor	119 (85,6 %)	114 (85,1 %)	5 (100 %)	46 (82,1 %)
undifferenzierter Tumor	2 (1,4 %)	2 (1,5 %)	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)
Fehlende Angaben	0	0	0	0
<b>FIGO-Stadium</b>				
IIA	3 (2,2 %)	3 (2,2 %)	0 (0,0 %)	2 (2,6 %)
IIB	2 (1,4 %)	2 (1,5 %)	0 (0,0 %)	2 (3,6 %)
IIC	3 (2,2 %)	3 (2,2 %)	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)
IIIA	2 (1,4 %)	2 (1,5 %)	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)
IIIB	4 (2,9 %)	3 (2,2 %)	1 (20,0 %)	2 (3,6 %)
IIIC	111 (79,9 %)	108 (80,6 %)	3 (60 %)	43 (76,8 %)
IV	14 (10,1 %)	13 (9,7 %)	1 (20 %)	5 (8,9 %)
fehlende Angaben	0	0	0	0
<b>Histopathologisches Grading</b>				
G1	9 (6,5 %)	9 (6,7 %)	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)
G2	39 (28,1 %)	37 (27,6 %)	2 (40,0 %)	16 (28,6 %)
G3	90 (64,7 %)	88 (65,7 %)	2 (40,0 %)	39 (69,6 %)
Gx	1 (0,7 %)	0 (0,0 %)	1 (20 %)	0 (0,0 %)
fehlende Angaben	0	0	0	0
<b>TMN-Klassifikation:</b>				
pT				
1b	1 (0,7 %)	1 (0,8 %)	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)
1c	2 (1,4 %)	2 (1,5 %)	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)
2a	3 (2,2 %)	3 (2,3 %)	0 (0,0 %)	2 (3,6 %)
2b	4 (2,9 %)	4 (3,0 %)	0 (0,0 %)	4 (7,1 %)
2c	2 (1,4 %)	2 (1,5 %)	0 (0,0 %)	2 (3,6 %)
3a	4 (2,9 %)	4 (3,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
3b	12 (8,7 %)	12 (9,0 %)	0 (0,0 %)	5 (8,9 %)
3c	110 (79,7 %)	105 (78,9 %)	5 (100 %)	41 (73,2 %)
fehlende Angaben	1	1	0	0
pN				
N0	34 (24,5 %)	34 (25,4 %)	0 (0,0 %)	12 (21,4 %)
N1	77 (55,4 %)	74 (55,2 %)	3 (60,0 %)	29 (51,8 %)
NX	28 (20,1 %)	26 (19,4 %)	2 (40,0 %)	15 (26,8 %)
fehlende Angaben	0	0	0	0
M				
M0	85 (61,2 %)	83 (61,9 %)	2 (40,0 %)	37 (66,1 %)
M1	16 (11,5 %)	15 (11,2 %)	1 (20,0 %)	6 (10,7 %)
MX	38 (27,3 %)	36 (26,9 %)	2 (40,0 %)	13 (23,2 %)
fehlende Angaben	0	0	0	0
<b>Resttumor nach der Operation</b>				
kein Resttumor	95 (68,3 %)	92 (68,7 %)	3 (60,0 %)	46 (82,1 %)
<= 0.5 cm	17 (12,2 %)	16 (11,9 %)	1 (20,0 %)	4 (7,1 %)
0.5 - 1 cm	10 (7,2 %)	9 (6,7 %)	1 (20,0 %)	3 (5,4 %)
1 - 2 cm	5 (3,6 %)	5 (3,7 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
> 2 cm	12 (8,6 %)	12 (9,0 %)	0 (0,0 %)	3 (5,4 %)
fehlende Angaben	0	0	0	0
<b>Aszites</b>				
vorhanden	109 (78,4 %)	105 (78,4 %)	4 (80 %)	47 (83,9 %)
nicht vorhangen	30 (21,6 %)	29 (21,6 %)	1 (20 %)	9 (16,1 %)
fehlende Angaben	0	0	0	0

In Tabelle 4.7 sind das Ansprechen der Therapie und der klinische Verlauf der Patientinnen aufgeführt. Als *Responder* wurden Patientinnen definiert, die sechs Monate plus 21 Tage nach der Beendigung der Chemotherapie weder ein Rezidiv der Erkrankung bekommen hatten noch aufgrund der Erkrankung verstorben waren. *Non-Responder* dagegen wiesen in diesem Zeitraum bereits ein Rezidiv auf oder waren an der Erkrankung verstorben.

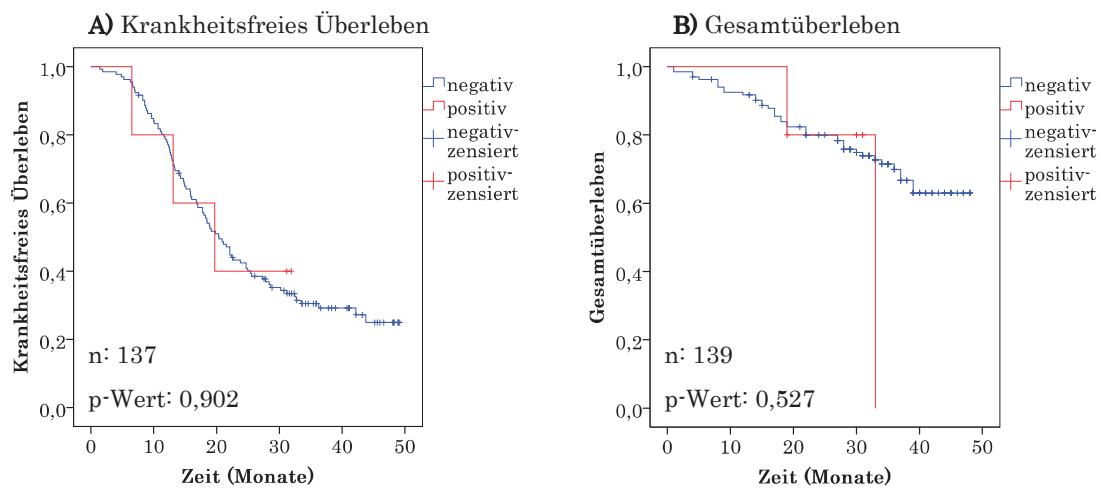
**Tabelle 4.7: Klinische Daten zum Therapieansprechen und klinischen Verlauf des analysierten Patientenkollektives der OVCAD-Studie.** Die Daten der zum Zeitpunkt Q (vor der Operation) abgenommenen Blutproben wurden zusätzlich nach ihrer CTC Bewertung unterteilt aufgeführt.

	Gesamt Zeit Q	CTC Status Zeit Q		Gesamt Zeit H
		negativ	positiv	
<b>Therapieansprechen</b>				
<i>Responder</i>	107 (77,5 %)	103 (77,4 %)	4 (80,0 %)	47 (83,9 %)
<i>Non-Responder</i>	31 (22,5 %)	30 (22,6 %)	1 (20,0 %)	9 (16,1 %)
fehlende Angaben	1	1	0	0
<b>Rezidiv oder verstorben aufgrund der Erkrankung</b>				
nein	42 (30,7 %)	40 (30,3 %)	2 (40,0 %)	18 (32,1 %)
ja	95 (69,3 %)	92 (69,7 %)	3 (60,0 %)	38 (67,9 %)
fehlende Angaben	2	2	0	0

Auf die Therapie sprachen 78 % der Patientinnen des Zeitpunktes Q und 84 % der Patientinnen des Zeitpunktes H an (*Responder*). Bei 70 % der Patientinnen der Proben des Zeitpunktes Q und bei 68 % des Zeitpunktes H trat ein Rezidiv der Erkrankung auf oder sie verstarben aufgrund der Erkrankung.

Da in keiner der Blutproben des Zeitpunktes H, die nach der Therapie abgenommen wurden, CTCs detektiert werden konnten, beschränkt sich die statistische Auswertung zum krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben auf die Proben, die zum Zeitpunkt Q abgenommen wurden. In Abbildung 4.5 sind die Kaplan-Meier-Überlebensanalysen dargestellt, aufgeteilt nach CTC positiv und CTC negativ bewerteten Proben. In den Analysen für die Blutproben, die vor der Operation abgenommen wurden (Zeitpunkt Q), unterscheiden sich krankheitsfreies Überleben und das Gesamtüberleben bei beiden Gruppen nicht signifikant (p-Wert krankheitsfreies Überleben: 0,902; p-Wert Gesamtüberleben: 0,527). Da allerdings die Anzahl an positiv bewerteten Proben von fünf sehr gering war, haben die Analysen nur eine bedingte Aussagekraft. Das krankheitsfreie Überleben betrug bei den Patientinnen der Proben des Zeitpunktes Q im Durchschnitt 25,9 Monate und das Gesamtüberleben 38,5 Monate.





**Abbildung 4.5:** Kaplan-Meier-Überlebensanalysen für die Proben des Zeitpunktes Q (abgenommen vor der Operation). A: Krankheitsfreies Überleben; B: Gesamtüberleben.

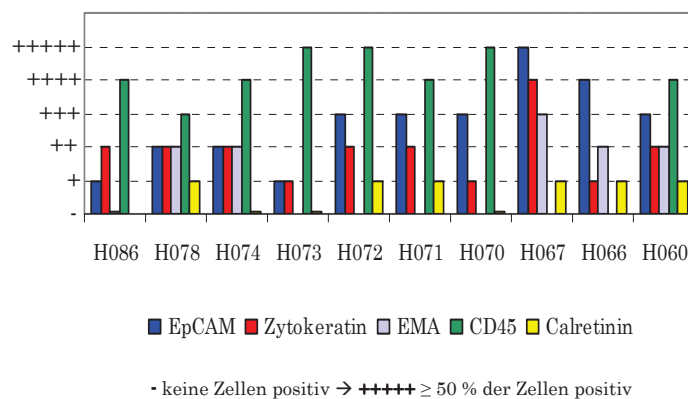
#### **4.4 Analyse der Protein-Expression der epithelialen Proteine EpCAM und Zytokeratin von primären und kultivierten Asziteszellen des Ovarialkarzinoms**

Aufgrund des verwendeten Protokolls zur Detektion der CTCs ist es notwendig, dass diese sowohl EpCAM als Anreicherungsmarker für die immunmagnetischen Zellseparation als auch Zytokeratin (CK 5/7/8/18) als Detektionsmarker für die immunzytochemische Färbung exprimieren. Einige Studien weisen darauf hin, dass CTCs ihre epithelialen Marker im Blut verlieren und somit der Detektion entgehen (Bonnomet *et al.*, 2010; Kallergi *et al.*, 2011; Lecharpentier *et al.*, 2011). Die niedrige Detektionsrate von 3,6 % CTC positive Proben (siehe Kapitel 4.3) der Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom könnte darauf hindeuten, dass auch hier ein Verlust der Protein-Expression des EpCAM oder der Zytokeratine vorliegt. Deshalb wurde die Protein-Expression der CTC Markerantige EpCAM und Zytokeratin untersucht.

Da vom Tumor stammende Zellen, die sich in der Aszitesflüssigkeit von Ovarialkarzinompatientinnen befinden, Vorläufer von CTCs sein könnten, eignen sich diese Zellen für Analysen, um mögliche Aussagen über CTCs treffen zu können (Shield *et al.*, 2009). Die immunzytochemische Charakterisierung der Asziteszellen könnte Hinweise auf die Stabilität und Heterogenität der Zellen bezüglich ihrer Protein-Expression von EpCAM und Zytokeratin geben. Da sowohl EpCAM als auch Zytokeratin für die Detektion von CTCs notwendige Marker sind, ist die Verteilung und Häufigkeit der Zellen für diese Marker von besonderem Interesse. Zur Aufreinigung und Anreicherung



der Asziteszellen, die vom Tumor stammen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.1). Da die Asziteszellen eine hohe Eigenfluoreszenz aufwiesen, konnte zur immunzytochemischen Charakterisierung der Zellen keine Fluoreszenzdoppelfärbung durchgeführt werden. Somit wurde separat für jedes Antigen eine lichtmikroskopische Färbung unter Verwendung der Alkalischen Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Methode durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2). Zur Detektion von Zytokeratin (CK 7/18) wurde für diese Analysen der Pan-Zytokeratin-Antikörper A45-BB3 verwendet und zur Detektion von EpCAM der Antikörper NCL-ESA. Als zusätzlicher Marker für den epithelialen Phänotyp der Zellen wurde die Expression des epithelialen Membranantigens (EMA) untersucht. Als Mesothel-Marker wurde außerdem die Calretinin-Expression analysiert. Zur Visualisierung der Leukozyten wurde eine Färbung gegen das Leukozytenantigen CD45 durchgeführt. Die Ergebnisse der Färbungen an Asziteszellen für die verschiedenen Antigene wurden vergleichend analysiert und die relative Häufigkeit an positiv gefärbten Zellen bestimmt. Die Auswertung ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

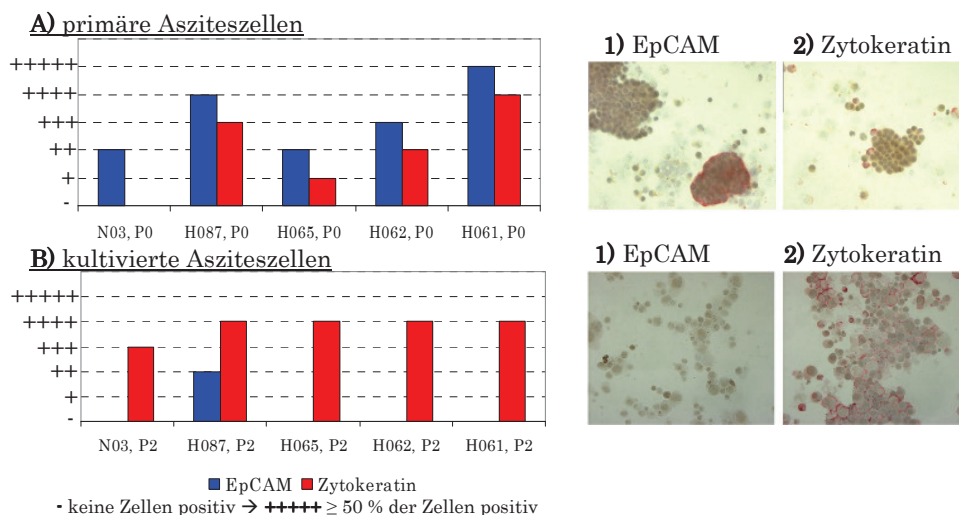


**Abbildung 4.6: Relative Anzahl der EpCAM, Zytokeratin, EMA, CD45 und Calretinin exprimierenden Asziteszellen.** Es wurden Zellen von zehn Patientinnen aus Aszitesflüssigkeit isoliert und bezüglich der Protein-Expression verschiedener Antigene analysiert. Die Häufigkeit von positiv gefärbten Zellen sind graphisch dargestellt (-: keine Zelle positiv; +: 1 Zelle bis 5 % positiv; ++: 5% bis 10 % positiv; +++: 10 % bis 30 % positiv, ++++: 30 % bis 50 % positiv; +++++: ≥ 50 % bis 100 % positiv).

Es zeigte sich, dass die Zellen der Aszitespräparate sehr heterogen bezüglich ihrer Protein-Expression waren. Alle primären Aszitespräparate enthielten EpCAM und Zytokeratin (CK 7/18) exprimierende Zellen. Die Anzahl der Asziteszellen, welche die verschiedenen Antigene exprimierten, variierte zwischen den verschiedenen Aszitesproben erheblich. Auch die relative Anzahl der Zellen einer Aszitesprobe, die die epithelialen Marker EpCAM, Zytokeratin (CK 7/18) und EMA exprimierten, unterschieden sich. In sechs der zehn Aszitesproben war die Anzahl EpCAM positiver

Zellen höher, als die Anzahl Zytokeratin positiver Zellen. In drei Proben (H078, H073, H072) war die Anzahl EpCAM und Zytokeratin positiver Zellen etwa gleich und in einer Probe (H086) wurden mehr Zytokeratin positive Zellen bestimmt. In acht Proben war die Anzahl der Leukozyten höher (CD45 positive Zellen) als die der Tumorzellen. In zwei Proben (H066, H067) konnten dagegen keine Leukozyten detektiert werden. Für den Mesothelmarker Calretinin waren keine oder wenige Zellen positiv. Dieses deutet darauf hin, dass wenige Asziteszellen vom Mesothel des Peritoneums abstammten. Es zeigte sich, dass der Anteil an Zellen, die die Markerproteine exprimierten, sehr variierte. Daher legt es den Schluss nahe, dass einige Asziteszellen nicht alle Markerproteine exprimieren.

Zusätzlich wurde die EpCAM- und Zytokeratin-Expression der Asziteszellen vor und nach der Zellkulturkultivierung nach zwei Passagen untersucht (siehe Kapitel 3.6).



**Abbildung 4.7: Relative Anzahl von EpCAM und Zytokeratin exprimierenden Asziteszellen.** Es wurden Zellen, isoliert aus Aszitesflüssigkeit von fünf Patientinnen, vor und nach Zellkulturkultivierung bezüglich der Protein-Expression von EpCAM und Zytokeratin analysiert und die Häufigkeit von positiv gefärbten Zellen graphisch dargestellt. **A)** primäre Asziteszellen; **B)** kultivierte Asziteszellen (nach zwei Passagen). Exemplarisch sind typische Bilder der Aszites-Färbungen dargestellt. **1)** EpCAM-Färbung; **2)** Zytokeratin-Färbung. Vergrößerung 400 x. (- : keine Zelle positiv; +: 1 Zelle bis 5 % positiv; ++: 5% bis 10 % positiv; +++: 10 % bis 30 % positiv, +++++: 30 % bis 50 % positiv; ++++++: ≥ 50 % bis 100 % positiv).

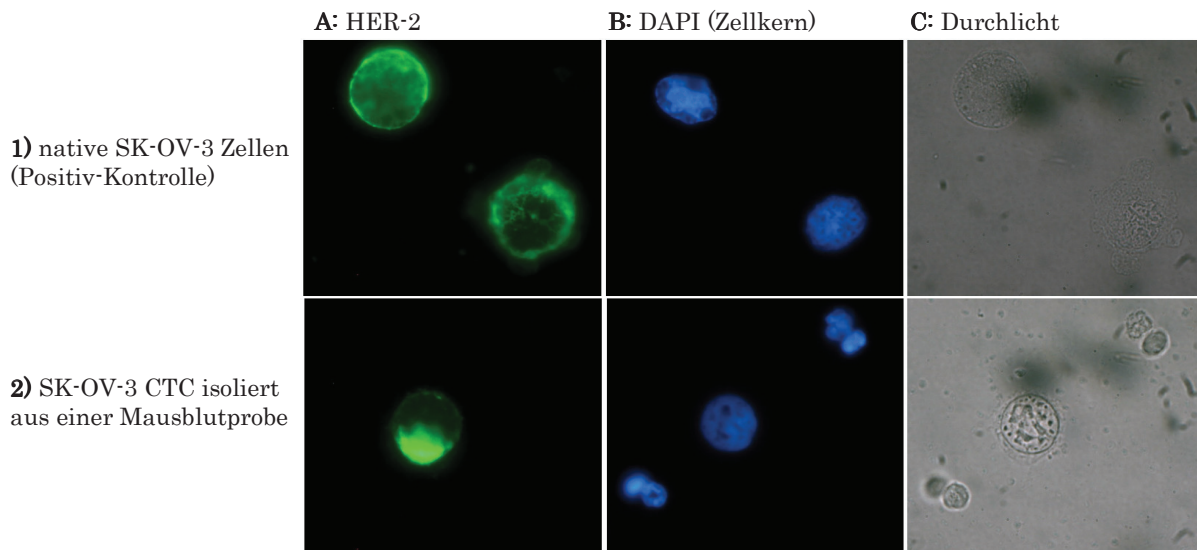
Bei primären Asziteszellen zeigte sich wie schon zuvor, dass der Anteil an EpCAM positiven Zellen im Vergleich zu Zytokeratin (CK 7/18) positiven Zellen höher war. Bemerkenswert war, dass nach der Kultivierung der Asziteszellen in fast allen Proben eine hohe Anzahl an Zellen Zytokeratin positiv waren, während in vier von fünf Proben die Zellen kein EpCAM exprimierten (siehe Abbildung 4.7).

#### ***4.5 Verwendung eines SCID-Maus-Xenograft-Modells zur Untersuchung des Phänotyps der hämatogen disseminierten CTCs beim Ovarialkarzinom***

Anhand eines Mausmodells sollte der Vorgang der hämatogenen Disseminierung beim Ovarialkarzinom näher untersucht und die CTCs genauer charakterisiert werden. Es wurden Zellen der humanen Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 ins Peritoneum von sechs SCID-Mäusen injiziert. Das Vorhandensein von Ovarialkarzinomzellen im Peritoneum ist typisch für die Ausbreitung des Ovarialkarzinoms durch die Aszitesflüssigkeit und ist somit ein ausgezeichnetes Modell zur Erforschung der Erkrankung. Nachdem die SK-OV-3 Zellen im Peritoneum Tumore gebildet hatten, wurde den Mäusen, bevor diese getötet wurden, Blut abgenommen. Die Tierexperimente wurden am Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Schumacher durchgeführt. Von sechs Mäusen wurden Blut und von fünf Mäusen wurden Paraffingewebeschnitte der intraperitonealen Tumore (eine Maus hatte keinen Tumor) freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

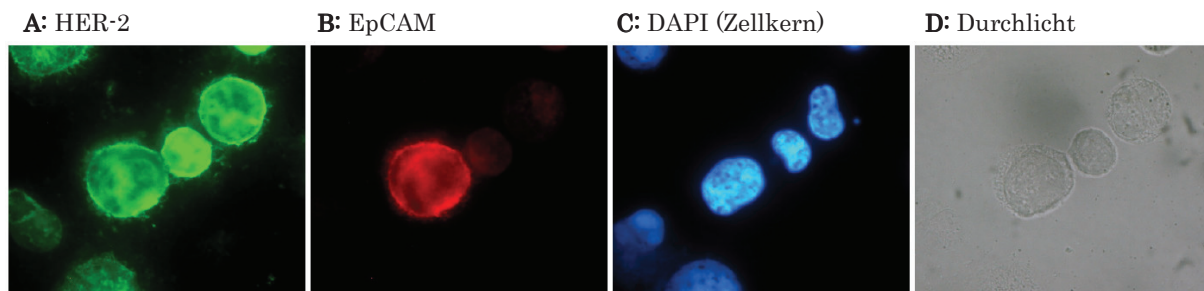
##### **4.5.1 Immunzytochemische Detektion von SK-OV-3 CTCs aus dem Blut von SCID-Xenograft-Mäusen**

Die sechs Blutproben (zwischen 100 µl und 700 µl Blut pro Maus) wurden über Ficoll-Dichtegradienten aufgearbeitet, da diese Methode für Mausblutproben in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich etabliert war (siehe Kapitel 3.1.3). Es ist bekannt, dass SK-OV-3 Zellen den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER-2) im hohen Maße überexprimieren (Hung *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1993). Daher eignet sich dieses Antigen zur Identifizierung der CTCs, die von SK-OV-3 Zellen abstammen. Zur Detektion von SK-OV-3 CTCs aus Mausblutproben wurden somit immunzytochemische Färbungen gegen HER-2 durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.8). In drei Proben wurden insgesamt elf HER-2 positive Zellen detektiert (siehe Abbildung 4.8).



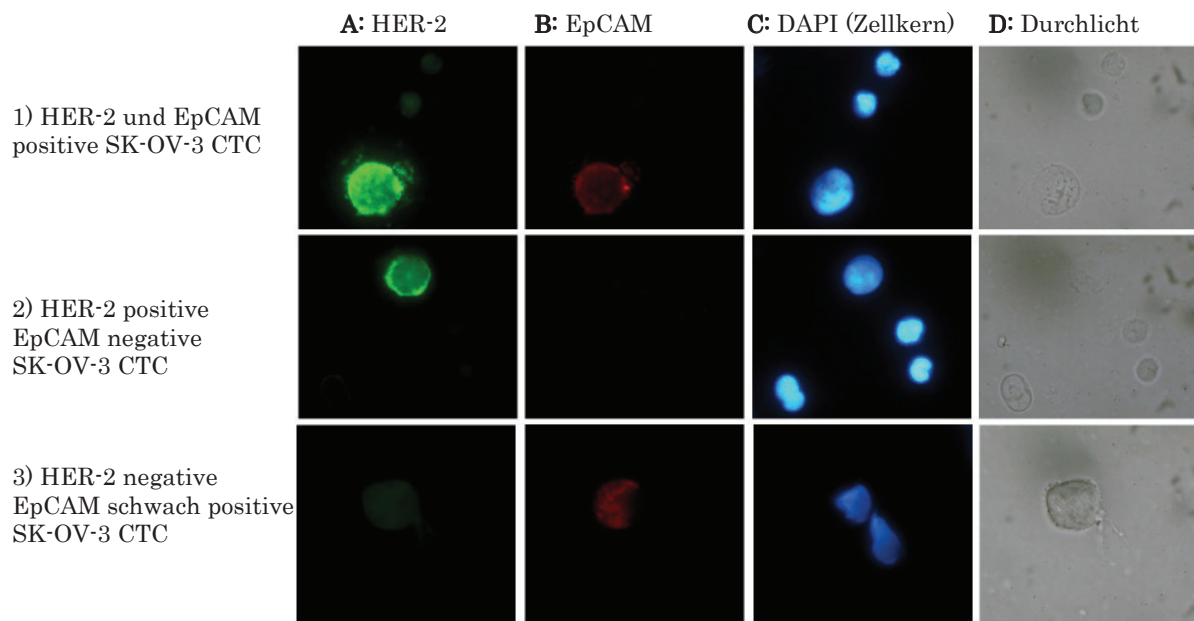
**Abbildung 4.8: HER-2-Färbung zur Detektion von SK-OV-3 CTCs isoliert aus Mausblutproben.** 1: native SK-OV-3 Zellen (Positiv-Kontrolle); 2: SK-OV-3 CTC isoliert aus einer Mausblutprobe; **A:** HER-2-Färbung; **B:** DNA-Färbung durch DAPI; **C:** Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.

Zur weiteren Charakterisierung der SK-OV-3 CTCs wurde eine immunzytochemische Fluoreszenzdoppelfärbung gegen HER-2 und EpCAM etabliert. Native SK-OV-3 Zellen exprimierten EpCAM sehr heterogen. Während einige Zellen (ca. 20 %) stark positiv für EpCAM waren, exprimierten andere Zellen EpCAM nur leicht oder gar nicht (siehe Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9: HER-2/EpCAM-Doppelfärbung von SK-OV-3 Zellen.** **A:** HER-2-Färbung; **B:** EpCAM-Färbung; **C:** DNA-Färbung durch DAPI; **D:** Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.

Exemplarisch konnten aus einer Mausblutprobe unterschiedliche SK-OV-3 CTCs bezüglich der Protein-Expression von HER-2 und EpCAM detektiert werden. Es wurden 125.000 Zellen einer Mausblutprobe analysiert und insgesamt sechs SK-OV-3 CTCs identifiziert.



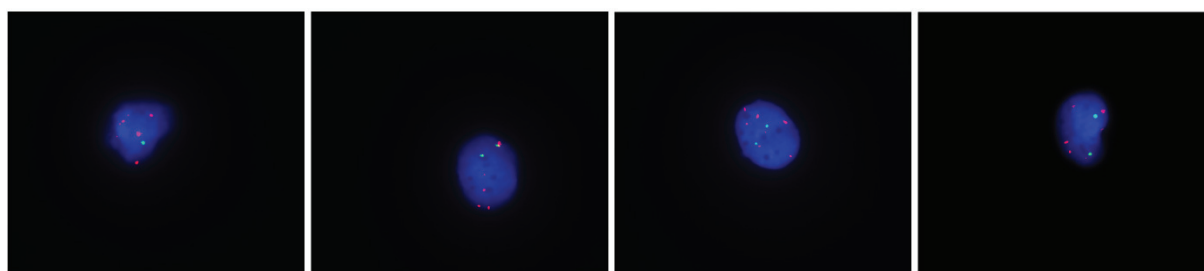
**Abbildung 4.10: HER-2/EpCAM-Doppelfärbung von SK-OV-3 CTCs isoliert aus Mausblutproben. A: HER-2-Färbung; B: EpCAM-Färbung; C: DNA-Färbung durch DAPI; D: Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.**

Von diesen sechs detektierten SK-OV-3 CTCs exprimierten vier Zellen (67 %) nur HER-2 und waren EpCAM negativ (siehe Abbildung 4.10.2). Außerdem wurde eine Zelle (17 %) detektiert, die sowohl HER-2 als auch EpCAM exprimierte (siehe Abbildung 4.10.1). Zusätzlich konnte auch eine Zelle (17 %) detektiert werden, die HER-2 negativ und nur leicht positiv für EpCAM war (siehe Abbildung 4.10.3). Die SK-OV-3 CTCs hatten also genau wie native SK-OV-3 Zellen eine heterogene EpCAM-Expression.

#### 4.5.2 Bestätigung des Nachweises von SK-OV-3 CTCs im Blut der SCID-Xenograft-Mäuse durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-Analysen

Zur Bestätigung des Nachweises der SK-OV-3 CTCs und um diese weiter zu charakterisieren, wurden an den aufgearbeiteten Blutproben Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs-Analysen (FISH-Analysen) für den Chromosomenbereich 3q26 durchgeführt. Dieser Chromosomenbereich eignet sich, da ein chromosomaler Zugewinn in SK-OV-3 Zellen für 3q26 bereits gezeigt wurde (Brooks *et al.*, 1996) und das FISH-Protokoll für diese Sonde gut etabliert war (siehe Kapitel 3.4.3 und Kapitel 4.7.1). Um den chromosomalen Zugewinn des Chromosomenbereiches 3q26 von SK-OV-3 Zellen zu bestimmen, wurde als Positiv-Kontrolle an native SK-OV-3 Zellen eine FISH-Analyse durchgeführt. Als Referenz wurde eine Sonde für den Zentromerbereich des

Chromosom 7 verwendet. Zur Auswertung wurden die Signale von 100 Zellen bestimmt. Die mittlere Anzahl der FISH-Signale für 3q26 lagen bei 4,7 Signalen pro Zelle (Bereich von 2 bis 10 Signale pro Zelle) und für den Referenzbereich Chromosom 7 war die mittlere Anzahl 2,2 Signale pro Zelle (Bereich 1 bis 5 Signale pro Zelle). Das Verhältnis der 3q26 Sonde zur Referenzsonde Zentromer 7 war 2,2 und zeigte somit, wie erwartet, einen chromosomalen Zugewinn des Bereiches 3q26 im Vergleich zur Referenz an (siehe Abbildung 4.11 und Tabelle 4.8).



**Abbildung 4.11: FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an SK-OV-3 Zellen.** SK-OV-3 Zellen mit einem chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26. Rote Signale: Sonde 3q26, grüne Signale: Zentromer 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.

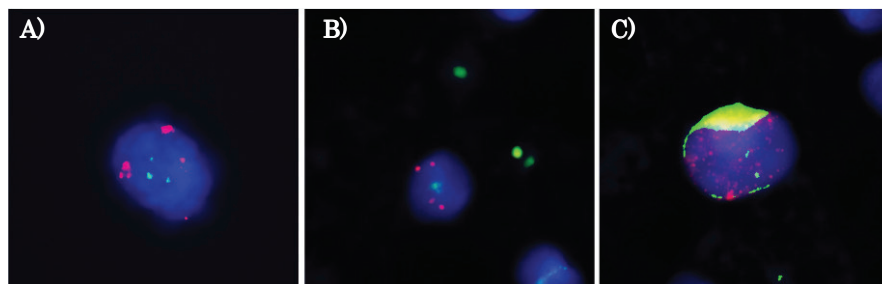
**Tabelle 4.8: Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analyse für die Sonde 3q26 und der Referenzsonde Zentromer 7 an SK-OV-3 Zellen.** Es wurden die Signale der Sonde 3q26 und der Referenzsonde Zentromer 7 von 100 Zellen bestimmt und das Verhältnis 3q26/Zentromer 7 berechnet. (\*: Wenn Zentromer 7 = 0 war konnte das Verhältnis nicht berechnet werden; Zent.: Zentromer)

Sonde	Anzahl der analysierten Zellen	Signale/Zelle Minimum	Signale/Zelle Maximum	Summe der Signale	Mittelwert Signale/Zelle	Standardabweichung
3q26	100	2	10	472	4,72	1,72
Zentromer 7	100	0	5	216	2,16	0,72
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	99	1,0	4,0	217,2	2,2	0,55

An durch Dichtegradienten aufgearbeiteten Blutproben wurde zunächst zur immunzytochemischen Detektion der SK-OV-3 CTCs eine Fluoreszenzfärbung gegen HER-2 durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.8). Anschließend wurde eine FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 durchgeführt. Da es sich sowohl bei der Sonde 3q26 als auch bei der Referenzsonde des Zentromers 7 um Sonden humaner Sequenz handelt, sollten diese ausschließlich an DNA-Bereiche der SK-OV-3 Zellen humanen Ursprungs binden. Die humanen Sonden binden dagegen nicht an DNA-Bereiche der murinen Leukozyten. Es konnten aus zwei Mausblutproben insgesamt zehn Zellen identifiziert werden, die einen chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26 hatten (siehe Abbildung 4.12). Die Anzahl der Signale entsprach denen von nativen SK-OV-3 Zellen. Interessanterweise konnten zusätzlich zu den immunzytochemisch detektierten HER-2

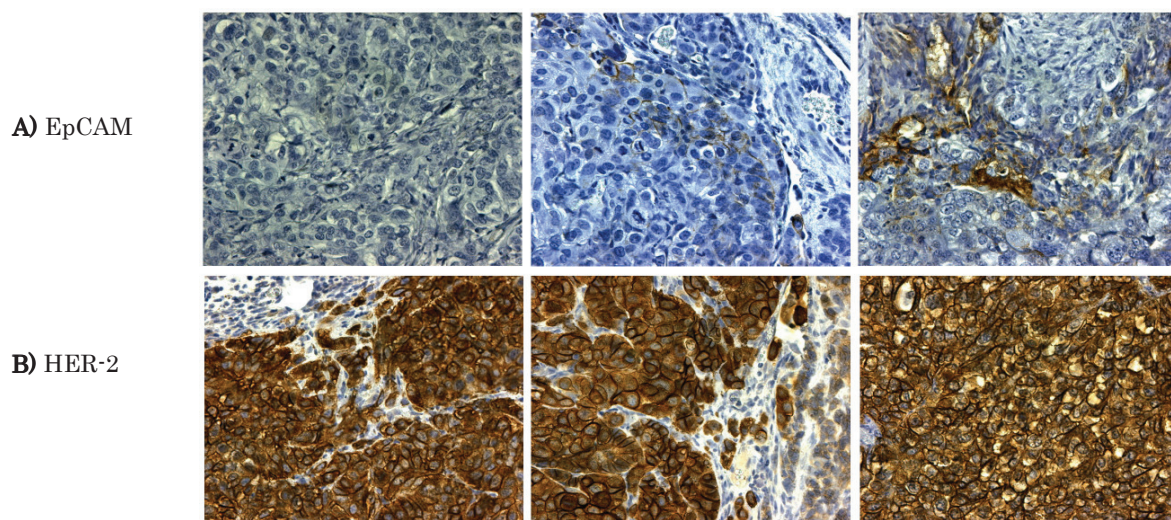


positiven Zellen (siehe Abbildung 4.12 C) auch nicht HER-2 gefärbte Zellen identifiziert werden, die eindeutig FISH-Signale aufwiesen, die denen von nativen SK-OV-3 Zellen entsprachen (siehe Abbildung 4.12 A und B). Es lässt sich nicht mit absoluter Gewissheit sagen, ob die Zellen gänzlich kein HER-2 exprimierten oder ob der Nachweis einer leichten Expression durch die Durchführung der FISH-Analyse aus methodischen Gründen nicht mehr möglich war. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die HER-2 Expression der SK-OV-3 CTCs nicht homogen war. Außerdem konnte durch die FISH-Analysen eindeutig die Detektion von SK-OV-3 CTCs bestätigt werden.



**Abbildung 4.12: FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an SK-OV-3 CTCs isoliert aus Mausblutproben. A und B:** immunzytochemisch HER-2 negative SK-OV-3 CTCs mit einem chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26; **C:** immunzytochemisch HER-2 positive SK-OV-3 CTC mit einem chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26. Rote Signale: Sonde 3q26, grüne Signale: Zentromer Sonde 7 (Referenzbereich), grün: immunzytochemische HER-2-Färbung. Vergrößerung 1000 x.

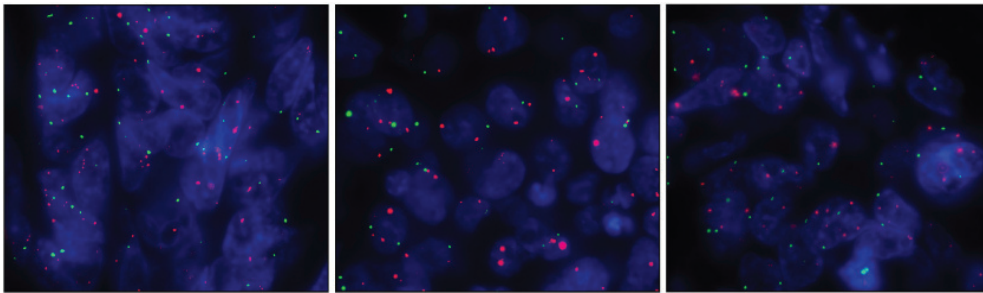
Weiterhin wurde die Expression von EpCAM und HER-2 an Paraffingewebeschnitten von fünf Tumoren untersucht, die durch die Injektion von SK-OV-3 Zellen im Peritoneum von fünf Mäusen entstanden sind (siehe Kapitel 3.3).



**Abbildung 4.13: Immunhistologische EpCAM- und HER-2-Färbung an Paraffingewebeschnitten der intraperitonealen Tumore der SCID-Mäuse. A:** EpCAM-Färbung, **B:** HER-2-Färbung. Vergrößerung 400 x.



Die Tumore waren einheitlich und homogen stark positiv für HER-2 (siehe Abbildung 4.13 B). Dagegen war der Hauptanteil ( $\geq 90\%$ ) der SK-OV-3 Tumore negativ für EpCAM. Nur einige Zellen der Randbereiche der Tumore exprimierten EpCAM (siehe Abbildung 4.13 A). An Paraffingewebeschnitten der fünf SK-OV-3 Tumore wurden zusätzlich FISH-Analysen für den Chromosomenbereich 3q26 durchgeführt (siehe Abbildung 4.14).



**Abbildung 4.14: FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an Paraffingewebeschnitten der intraperitonealen Tumore der SCID-Mäuse.** Von SK-OV-3 Zellen abstammende Maus-Tumore mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 3q26. Rote Signale: Sonde 3q26, grüne Signale: Zentromer Sonde 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.

Pro Gewebe wurden die FISH-Signale von 100 Zellen ausgewertet. Die Mittelwerte der Signale 3q26 pro Zelle hatten einen Wert von 4,5 bis 5,7, die Mittelwerte der Referenzsonde Zentromer 7 einen Wert von 1,9 bis 2,2 (siehe Tabelle 4.9). Das Verhältnis der 3q26 Sonde zu Referenzsonde Zentromer 7 lag zwischen 2,5 bis 2,9 und entsprach somit annähernd dem Wert von nativen SK-OV-3 Zellen (Verhältnis 3q26/Zentromer 7= 2,2) (siehe Tabelle 4.9 und Tabelle 4.8). Somit entsprach der chromosomale Zugewinn der SK-OV-3 Tumore des Chromosomenbereiches 3q26 im Verhältnis zur Referenz annähernd dem von nativen SK-OV-3 Zellen.

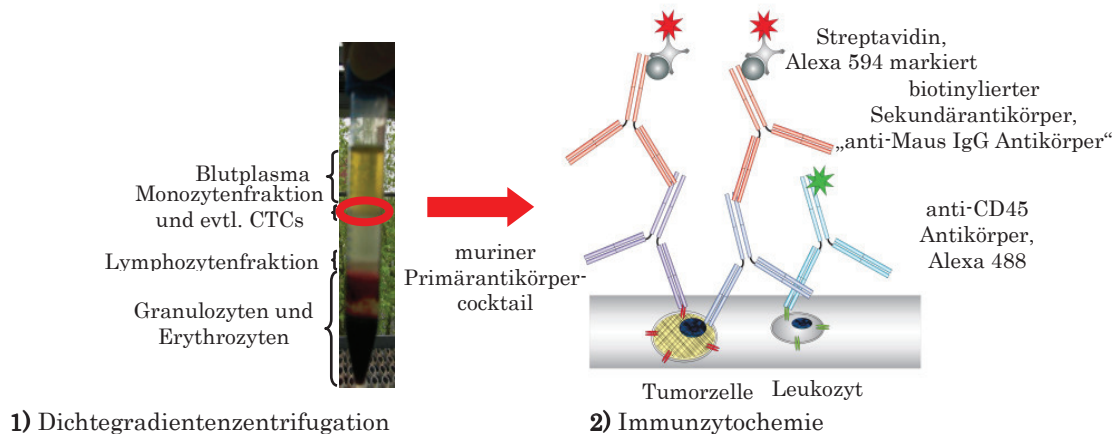
**Tabelle 4.9: Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analysen für die Sonde 3q26 und die Referenzsonde Zentromer 7 an Paraffingewebeschnitten der Tumore der SCID Mäuse 2 bis 6.** Es wurden die Signale der Sonde 3q26 und der Referenzsonde Zentromer 7 von jeweils 100 Zellen bestimmt und das Verhältnis 3q26/Zentromer 7 berechnet. (\*: Wenn Zentromer 7 = 0 war konnte das Verhältnis nicht berechnet werden; Zent: Zentromer)

Sonde	Anzahl der analysierten Zellen	Signale/Zelle Minimum	Signale/Zelle Maximum	Summe der Signale	Mittelwert Signale/Zelle	Standardabweichung
<b>Maus 2</b>						
3q26	100	0	25	449	4,49	3,23
Zentromer 7	100	0	6	186	1,86	1,16
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	92	0,0	10,0	231,2	2,5	1,70
<b>Maus 3</b>						
3q26	100	0	14	531	5,31	2,37
Zentromer 7	100	0	5	216	2,16	0,88
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	99	0,0	9,0	264,7	2,7	1,44
<b>Maus 4</b>						
3q26	100	2	10	496	4,96	1,39
Zentromer 7	100	1	4	211	2,11	0,65
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	100	1,0	7,0	252,3	2,5	1,04
<b>Maus 5</b>						
3q26	100	1	13	516	5,16	2,2
Zentromer 7	100	0	4	187	1,87	0,7
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	97	1,0	6,5	278,7	2,9	1,3
<b>Maus 6</b>						
3q26	100	2	17	574	5,74	2,90
Zentromer 7	100	0	6	221	2,21	1,04
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	97	1,0	8,0	262,9	2,7	1,27

#### ***4.6 Detektion von CTCs in Blutproben der OVCA-Studie von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom durch Verwendung eines modifizierten Detektionsprotokolls***

Aufgrund der niedrigen Detektionsrate von 3,6 % (siehe Kapitel 4.3) CTC positiver Blutproben von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom wurde das bisher verwendete Aufarbeitungsprotokoll zur Detektion von CTCs überdacht und verändert (siehe Abbildung 4.15). Die Ergebnisse der Protein-Expressionsanalyse von Asziteszellen (siehe Kapitel 4.4.) und SK-OV-3 CTCs aus Mausblutproben (siehe Kapitel 4.5) zeigten, dass die Zellen sehr heterogen bezüglich der Protein-Expression der epithelialen Marker Zytokeratin (CK 7/18) und EpCAM sind. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CTCs die Protein-Expression der epithelialen Marker verlieren und somit der Detektion entgehen können. Diese Hypothese wird zusätzlich durch die Ergebnisse von Studien verschiedener Arbeitsgruppen gestützt (Bonnomet *et al.*, 2010; Kallergi *et al.*, 2011; Lecharpentier *et al.*, 2011). Daher wurde das Protokoll zur Detektion von CTCs

angepasst. Im modifizierten Detektionsprotokoll wurde auf die weitere Anreicherung durch immunmagnetische Zellseparation verzichtet, da durch diese Methode nur Zellen angereichert werden, die EpCAM exprimieren. Nach der Anreicherung durch Dichtegradientenzentrifugation wurde zur Detektion der CTCs direkt eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Zur Identifizierung der CTCs wurden jetzt zusätzlich zu den gegen Zytokeratin (CK 5/7/8/18) gerichteten Antikörpern, Antikörper, die EpCAM, HER-2, das epitheliale Membranantigen (EMA) und den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) binden, verwendet. HER-2 und EGFR sind Rezeptortyrosinkinasen, die für die Entstehung von Krebserkrankungen von großer Bedeutung sind. Da diese häufig in Tumoren überexprimiert werden, eignen sich diese als Marker zur Detektion von CTCs. Durch die Verwendung dieses Antikörpercocktails können auch Zellen detektiert werden, die einige Proteinmarker nicht exprimieren und nur für mindestens einen dieser Marker positiv sind.



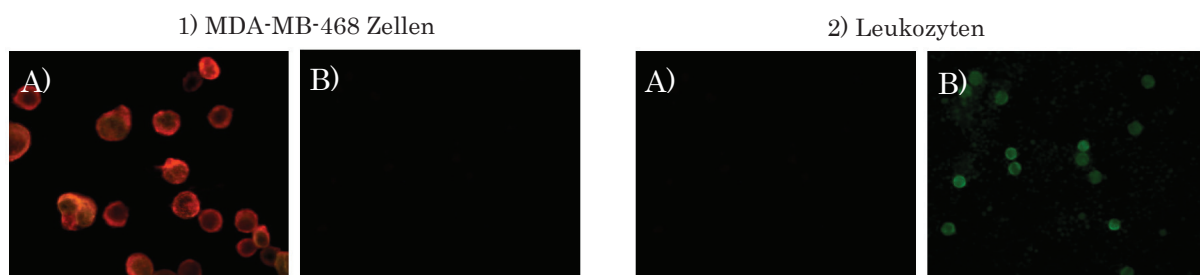
**Abbildung 4.15: Modifizierte Detektionsmethode von CTCs.**

1) Anreicherung der Tumorzellen aus dem Blut durch Dichtegradientenzentrifugation. Die möglichen Tumorzellen befinden sich in der Monozytenphase des Gradienten. Auf die weitere Anreicherung durch eine immunmagnetische Zellseparation wurde verzichtet. 2) Zur Identifizierung der CTCs wurde ein Antikörpercocktail verwendet, der verschiedene Antikörper gegen unterschiedliche Tumorantigene enthielt und zur Detektion von Leukozyten gegen CD45 (Leukozyten-Antigen) gerichtete Antikörper.

#### 4.6.1 Optimierung des Protokolls zur immunzytochemischen Detektion der CTCs durch Verwendung eines Antikörpercocktails

Um einen spezifischen und sensitiven Nachweis der CTCs durch Verwendung des Antikörpercocktails gewährleisten zu können, wurde die Färbung für jeden einzelnen

Antikörper des Antikörpercocktails separat optimiert. Als Positiv-Kontrolle wurden Karzinomzelllinien gewählt, die das jeweilige Antigen exprimierten (MDA-MB-468 Zellen: Zytokeratin, EGFR, EpCAM; SK-OV-3 Zellen: HER-2, Zytokeratin; MCF-7 Zellen: EMA, Zytokeratin, EpCAM). Als Negativ-Kontrollen dienten Leukozyten gesunder Spender, die die Antigene des Antikörpercocktails nicht exprimieren sollten. Das Färbeprotokoll wurde so optimiert, dass die Zellen der Positiv-Kontrolle durch ein intensives Fluoreszenzsignal detektiert, während Leukozyten nicht unspezifisch gefärbt wurden. Nachdem das Färbeprotokoll für jeden einzelnen Antikörper etabliert war, wurde die gesamte Antikörpercocktail-Färbung inklusive Leukozytenfärbung gegen CD45 an jeweils 600.000 Leukozyten von zehn verschiedenen gesunden Spendern durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.7 und Abbildung 4.16.2). Durch diese Negativ-Kontrollen wurde die Spezifität der Färbung überprüft.

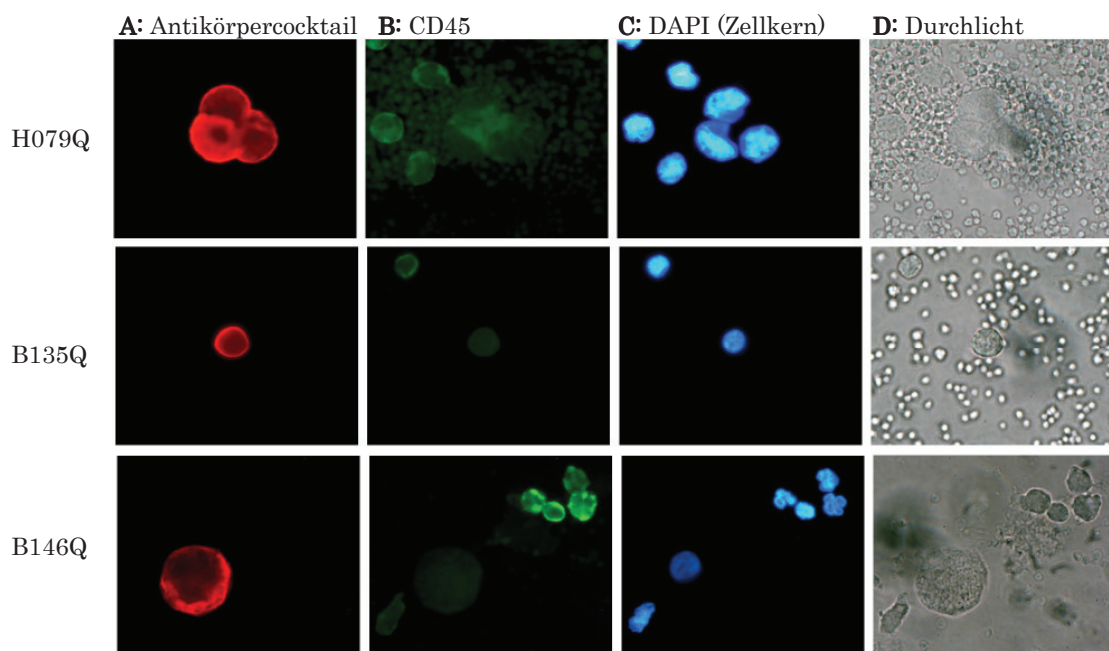


**Abbildung 4.16: Optimierung der immunzytochemischen Antikörpercocktail-CD45-Färbung.** Als Positiv-Kontrolle wurden Zellen der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 und als Negativ-Kontrolle Leukozyten von gesunden Spendern durch die Antikörpercocktail-CD45-Färbung detektiert; **1:** MDA-MB-468; **2:** Leukozyten; **A:** Antikörpercocktail-Färbung; **B:** CD45-Färbung. Vergrößerung 400 x.

Es wurden in den Negativ-Kontrollen keine Antikörpercocktail positiven und CD45 negativen Zellen detektiert. Sehr vereinzelt waren Zellen sowohl für den Antikörpercocktail als auch für CD45 leicht positiv. Im Durchlichtkanal konnte man erkennen, dass alle diese Zellen eine zerstörte Morphologie aufwiesen, was eine unspezifische Färbung erklären könnte. Daher wurden für weitere Analysen morphologisch zerstörte Zellen nicht weiter berücksichtigt, da bei diesen Zellen eine unspezifische Färbung nicht ausgeschlossen werden konnte. Zur Detektion von CTCs erwies sich somit das Antikörpercocktail-Färbeprotokoll an intakten Zellen als eine spezifische und sensitive Methode.

#### 4.6.2 Analyse von Blutproben der OVCAD-Studie unter Verwendung des modifizierten Protokolls

Nach dem beschriebenen modifizierten Protokoll wurden 112 Blutproben der OVCAD-Studie des Zeitpunktes Q (abgenommen zum Zeitpunkt vor der Operation) und 79 Blutproben des Zeitpunktes H (abgenommen sechs Monate nach Therapie) analysiert. Wenn möglich, wurden 600.000 Zellen pro Patientenprobe analysiert (71,4 % der Proben Q und 53,2 % der Proben H). Wenn diese weniger als 600.000 Zellen enthielten, wurde die gesamte Probe analysiert. Die absolute Zellzahl der Proben variierte erheblich zwischen 300.000 bis 16.800.000 Zellen pro 20 ml aufgearbeitetes EDTA-Blut. Dieses kann teilweise mit einer natürlichen Schwankung der Anzahl an Leukozyten der Blutproben erklärt werden, aber zusätzlich scheint es Unterschiede in den Qualitäten der Aufarbeitung gegeben zu haben, die durch die verschiedenen klinischen Zentren der OVCAD-Studie durchgeführt wurden (siehe Kapitel 3.1.1).



**Abbildung 4.17: CTCs isoliert aus dem Blut von Ovarialkarzinompatientinnen (Proben H079Q, B135Q, B146Q).** A: Antikörpercocktail-Färbung der CTCs; B: CD45-Färbung der Leukozyten; C: DNA-Färbung durch DAPI; D: Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.

Durch Verwendung des modifizierten Protokolls wurden in 30 (26,8 %) der 112 Proben des Zeitpunktes Q und in 6 (7,6 %) der 79 Proben des Zeitpunktes H CTCs identifiziert. Unter Verwendung des modifizierten Protokolls konnte die Detektionsrate der Proben des Zeitpunktes Q von 3,6 % (5 von 139 Proben) auf 26,8 % (30 von 112 Proben) erhöht

werden. Auch die Detektionsrate der Proben des Zeitpunktes H erhöhte sich unter Verwendung des modifizierten Protokolls von 0 % (0 von 56 Proben) auf 7,6 % (6 von 79 Proben) (siehe Tabelle 4.10).

**Tabelle 4.10: Übersicht der Detektionsraten von CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom unter Verwendung beider Detektionsprotokolle.** Blutproben des Zeitpunktes Q wurden vor der Operation abgenommen, Blutproben des Zeitpunkte H sechs Monate nach Chemotherapie. Nach dem ursprünglichen Protokoll wurden die CTCs durch Dichtegradientenzentrifugation und immunmagnetische Zellseparation angereichert. Die CTCs wurden durch Antikörper gegen Zytokeratin (CK 7/18) detektiert. Nach dem modifizierten Protokoll wurden die CTCs durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert und durch die Verwendung eines Antikörpercocktails detektiert.

Zeitpunkt	analysiert	negativ	positiv
<b>Ursprüngliches Protokoll</b>			
Zeit Q	139 (100 %)	134 (96,4 %)	5 (3,6 %)
Zeit H	56 (100 %)	56 (100 %)	0 (0,0 %)
<b>Modifiziertes Protokoll</b>			
Zeit Q	112 (100 %)	82 (73,2 %)	30 (26,8 %)
Zeit H	79 (100 %)	73 (92,4 %)	6 (7,6 %)

Nach dem modifizierten Protokoll wurden von 44 Patientinnen die Blutproben beider Zeitpunkte (Zeitpunkt Q und H) aufgearbeitet und analysiert. Es wurde bei einer Patientin (B159) in den Blutproben beider Zeitpunkte CTCs detektiert und bei 38 Patientinnen wurden in beiden Proben keine CTCs nachgewiesen. Bei drei Patientinnen konnten nur in den Proben des Zeitpunktes Q CTCs detektiert werden, während in Blutproben, die nach der Therapie abgenommen wurden (Blutproben H), keine CTCs mehr detektiert werden konnten. Bei zwei Patientinnen wurden in Proben des Zeitpunktes Q keine CTCs im Blut detektiert, während in den Blutproben, die nach der Therapie abgenommen wurden (Zeitpunkt H), CTCs detektiert wurden (siehe Tabelle 4.11).

**Tabelle 4.11: CTC Bewertung nach dem modifizierten Protokoll von Blutproben derselben Patientinnen beider Zeitpunkte Q und H.** (rot: CTC-Status der Proben beider Zeitpunkte stimmt überein)

	Zeitpunkt Q negativ	Zeitpunkt Q positiv
Zeitpunkt H negativ	38 (86,4 %)	3 (6,8 %)
Zeitpunkt H positiv	2 (4,5 %)	1 (2,3 %)

Die Anzahl der detektierten CTCs der Proben des Zeitpunktes Q pro ml Blut lag zwischen < 1 und 187 CTCs (siehe Tabelle 4.12). Die mittlere Anzahl an detektierten CTCs pro Probe war 11 CTCs pro ml Blut und der Median lag bei 2 CTCs pro ml Blut. Die Anzahl der detektierten CTCs der Proben des Zeitpunktes H lag zwischen < 1 und



10 CTCs pro ml Blut (siehe Tabelle 4.13). Der Mittelwert der detektierten CTCs pro Probe lag bei 2,8 CTCs pro ml Blut, der Median lag bei 1 CTC pro ml Blut.

**Tabelle 4.12: Anzahl der detektierten CTCs nach dem modifizierten Protokoll aus Blutproben des Zeitpunktes Q (vor der Operation) von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom.**

Probe	Anzahl der detektierten CTCs/ ml Blut	Probe	Anzahl der detektierten CTCs/ ml Blut	Probe	Anzahl der detektierten CTCs/ ml Blut
B117Q	~ 4	B146Q	~ 3	H079Q	~ 4
B120Q	~ 28	B151Q	~ 20	H081Q	~ 4
B124Q	~ 2	B157Q	~ 4	H082Q	< 1
B126Q	~ 1	B159Q	~ 9	H083Q	~ 1
B129Q	~ 2	B164Q	~ 2	I020Q	< 1
B131Q	~ 2	B168Q	~ 1	L177Q	~ 2
B132Q	~ 11	B175Q	~ 2	L220Q	~ 1
B135Q	~ 12	H071Q	~ 187	V044Q	< 1
B137Q	~ 2	H073Q	~ 1	V046Q	~ 3
B144Q	~ 1	H076Q	~ 5	V047Q	~ 14

**Tabelle 4.13: Anzahl der detektierten CTCs nach dem modifizierten Protokoll aus Blutproben des Zeitpunktes H (sechs Monate nach Therapie abgenommen) von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom.**

Probe	Anzahl der detektierten CTCs/ ml Blut
B159H	~ 10
B171H	~ 3
L083H	~ 1
L141H	< 1
L227H	< 1
V035H	~ 1

#### 4.6.3 Statistische Auswertung des CTC Nachweises unter Verwendung des modifizierten Protokolls in Korrelation mit klinischen Daten und dem Therapieverlauf

Die klinischen Daten des Patientenkollektivs sind in Tabelle 4.14 dargestellt. Die Daten wurden zusätzlich nach CTC-Status unterteilt aufgeführt. In der Tabelle farblich unterlegt sind Häufigkeiten, die sich zwischen den Gruppen CTC negativ und positiv um mehr als 20 % unterscheiden. Farblich gelb wurden hierbei Unterschiede unterlegt, die nicht signifikant waren ( $p\text{-Wert} \geq 0,05$ ). War der Unterschied dagegen signifikant ( $p\text{-Wert} \leq 0,05$ ), wurden die Daten grün unterlegt dargestellt. Die angegebenen Signifikanzwerte wurden durch den Chi<sup>2</sup>-Test bestimmt. Zur Kontrolle wurden die Signifikanzwerte zusätzlich durch den Fisher-Exakt-Test bestimmt, wobei die Ergebnisse der Signifikanzen mit dem des Chi<sup>2</sup>-Tests übereinstimmten.



**Tabelle 4.14: Klinische Daten des analysierten Patientenkollektives der OVCAD-Studie.** Die Daten wurden zusätzlich nach ihrer CTC Bewertung unterteilt aufgeführt. Unterschiedliche Häufigkeiten von mehr als 20 % zwischen den CTC negativen und positiven Gruppen wurde farblich unterlegt (gelb und grün). Der Unterschied bei den grün unterlegten Daten ist signifikant.

	Gesamt Zeit Q	CTC Status negativ	Zeit Q positiv	Gesamt Zeit H	CTC Status negativ	Zeit H positiv
<b>Histologie</b>						
klarzelliger Tumor	2 (1,8 %)	2 (2,5 %)	0 (0,0 %)	1 (1,3 %)	1 (1,4 %)	0 (0,0 %)
endometrioider Tumor	6 (5,4 %)	4 (4,9 %)	2 (6,7 %)	3 (3,8 %)	2 (2,7 %)	1 (16,7 %)
gemischter epithelialer Tumor	3 (2,7 %)	3 (3,7 %)	0 (0,0 %)	1 (1,3 %)	1 (1,4 %)	0 (0,0 %)
muzinöser Tumor	1 (0,9 %)	1 (1,2 %)	0 (0,0 %)	2 (2,5 %)	2 (2,7 %)	0 (0,0 %)
seröser Tumor	93 (83,8 %)	68 (84,0 %)	25 (83,3 %)	72 (91,1 %)	67 (91,9 %)	5 (83,3 %)
undifferenzierter Tumor	6 (5,4 %)	3 (3,7 %)	3 (10,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
fehlende Angabe	1	1	0	0	0	0
<b>FIGO-Stadium</b>						
IIA	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (1,3 %)	1 (1,4 %)	0 (0,0 %)
IIB	3 (2,7 %)	3 (3,7 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
IIC	3 (2,7 %)	2 (2,5 %)	1 (3,3 %)	2 (2,5 %)	2 (2,7 %)	0 (0,0 %)
IIIA	4 (3,6 %)	2 (2,5 %)	2 (6,7 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
IIIB	3 (2,7 %)	3 (3,7 %)	0 (0,0 %)	6 (7,6 %)	6 (8,2 %)	0 (0,0 %)
IIIC	68 (61,3 %)	54 (66,7 %)	14 (46,7 %)	55 (69,6 %)	51 (69,9 %)	4 (66,7 %)
IV	30 (27,0 %)	17 (21,0 %)	13 (43,3 %)	15 (19,0 %)	13 (17,8 %)	2 (33,3 %)
fehlende Angaben	1	1	0	0	0	0
<b>Histopathologisches Grading</b>						
G1	2 (1,8 %)	1 (1,2 %)	1 (3,4 %)	5 (6,3 %)	5 (6,8 %)	0 (0,0 %)
G2	22 (20,0 %)	15 (18,5 %)	7 (24,1 %)	12 (15,2 %)	10 (13,7 %)	2 (33,3 %)
G3	86 (78,2 %)	65 (80,2 %)	21 (72,4 %)	62 (78,5 %)	58 (79,5 %)	4 (66,7 %)
fehlende Angaben	2	1	1	0	0	0
<b>TNM-Klassifikation:</b>						
<b>pT</b>						
1c	2 (1,8 %)	2 (2,5 %)	0 (0,0 %)	1 (1,3 %)	1 (1,4 %)	0 (0,0 %)
2a	1 (0,9 %)	0 (0,0 %)	1 (3,3 %)	1 (1,3 %)	1 (1,4 %)	0 (0,0 %)
2b	5 (4,5 %)	5 (6,2 %)	0 (0,0 %)	1 (1,3 %)	1 (1,4 %)	0 (0,0 %)
2c	4 (3,6 %)	3 (3,7 %)	1 (3,3 %)	1 (1,3 %)	1 (1,4 %)	0 (0,0 %)
3a	6 (5,4 %)	3 (3,7 %)	3 (10,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
3b	9 (8,1 %)	8 (9,9 %)	1 (3,3 %)	7 (8,9 %)	7 (9,6 %)	0 (0,0 %)
3c	84 (75,7 %)	60 (74,1 %)	24 (80,0 %)	68 (86,1 %)	62 (84,9 %)	6 (100 %)
fehlende Angaben	1	1	0	0	0	0
<b>pN</b>						
N0	26 (24,1 %)	18 (22,8 %)	8 (27,6 %)	16 (20,3 %)	16 (21,9 %)	0 (0,0 %)
N1	58 (53,7 %)	42 (53,2 %)	16 (55,2 %)	36 (45,6 %)	33 (45,2 %)	3 (50,0 %)
NX	24 (22,2 %)	19 (24,1 %)	5 (17,2 %)	27 (34,2 %)	24 (32,9 %)	3 (50,0 %)
fehlende Angaben	4	3	1	0	0	0
<b>M</b>						
M0	33 (31,4 %)	30 (38,5 %)	3 (11,1 %)	45 (57,0 %)	42 (57,5 %)	3 (50,0 %)
M1	29 (27,6 %)	16 (20,5 %)	13 (48,1 %)	15 (19,0 %)	13 (17,8 %)	2 (33,3 %)
MX	43 (41,0 %)	32 (41,0 %)	11 (40,7 %)	19 (24,1 %)	18 (24,7 %)	1 (16,7 %)
fehlende Angaben	7	4	3	0	0	0
<b>Resttumor nach der Operation</b>						
kein Resttumor	70 (64,8 %)	49 (62,8 %)	21 (70,0 %)	50 (64,1 %)	48 (66,7 %)	2 (33,3 %)
<= 0.5 cm	6 (5,6 %)	5 (6,4 %)	1 (3,3 %)	5 (6,4 %)	5 (6,9 %)	0 (0,0 %)
0.5 - 1 cm	15 (13,9 %)	11 (14,1 %)	4 (13,3 %)	7 (9,0 %)	5 (6,9 %)	2 (33,3 %)
1 - 2 cm	3 (2,8 %)	2 (2,6 %)	1 (3,3 %)	4 (5,1 %)	3 (4,2 %)	1 (16,7 %)
> 2 cm	14 (13,0 %)	11 (14,1 %)	3 (10,0 %)	12 (15,4 %)	11 (15,3 %)	1 (16,7 %)
fehlende Angaben	4	4	0	1	1	0
<b>Aszites</b>						
vorhanden	81 (72,3 %)	56 (68,3 %)	25 (83,3 %)	62 (78,5 %)	56 (76,7 %)	6 (100 %)
nicht vorhanden	31 (27,7 %)	26 (31,7 %)	5 (16,7 %)	17 (21,5 %)	17 (23,3 %)	0 (0,0 %)
fehlende Angaben	0	0	0	0	0	0

Wie erwartet hatten die meisten Patientinnen einen serösen Tumor (Zeitpunkt Q: 83,8 %, Zeitpunkt H 91,1 %) und das FIGO-Stadium IIC (Zeitpunkt Q: 61,3 %, Zeitpunkt H: 69,6 %). Das Alter der Patientinnen der Proben des Zeitpunktes Q lag zwischen 27 und 85 Jahren (Altersdurchschnitt 60 Jahre) und das Alter der Patientinnen der Proben des Zeitpunktes H zwischen 27 und 79 Jahren (Altersdurchschnitt 57 Jahre). Der Beobachtungszeitraum zur Erfassung der klinischen Daten bezüglich des weiteren Krankheitsverlaufes (*follow-up*-Daten) lag zwischen 1 bis 35 Monaten (Mittelwert 19 Monate) bei den Patientinnen mit Blutentnahme zum Zeitpunkt Q und 5 bis 42 Monaten (Mittelwert 24 Monate) bei Patientinnen mit Blutentnahme zum Zeitpunkt H.

Für die Proben des Zeitpunktes Q unterschieden sich die klinischen Daten der beiden Gruppen, CTC negativ und CTC positiv, beim FIGO-Stadium III und IV um mehr als 20 % (siehe Tabelle 4.14, gelb unterlegt). Die Patientinnen aus der CTC positiven Gruppe hatten häufiger das Krankheitsstadium FIGO IV als die Patientinnen, bei denen keine CTCs detektiert wurden. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant (p-Wert: 0,105). Da FIGO-Stadium IV mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen assoziiert ist, hatten dementsprechend die Patientinnen, bei denen CTCs detektiert wurden, häufiger bereits Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als die Patientinnen aus der CTC negativen Gruppe (siehe Tabelle 4.14, TNM-Klassifikation M0 und M1, grün unterlegt). Die Patientengruppe mit positivem CTC-Status hatte signifikant häufiger Fernmetastasen (p-Wert: 0,006).

Da zum Zeitpunkt H in nur sechs Proben CTCs detektiert wurden, muss die niedrige Detektionsrate bezüglich der statistischen Aussagekraft berücksichtigt werden. Für die Proben des Zeitpunktes H unterschieden sich die klinischen Daten der beiden Gruppen, CTC negativ und CTC positiv, bei der TNM-Klassifikation bei N0 um mehr als 20 %. Die Patientinnen aus der CTC negativen Gruppe hatten häufiger den Lymphknotenstatus N0 als die Patientinnen aus der CTC positiven Gruppe. Das bedeutet, dass die CTC negativ bewerteten Patientinnen seltener einen Tumorbefall der Lymphknoten hatten. Der Unterschied zwischen den Gruppen war jedoch nicht signifikant (p-Wert: 0,403). Außerdem unterschieden sich die beiden Gruppen um mehr als 20 % beim Vorhandensein von Tumorresten nach erfolgter Operation. In der Gruppe der CTC negativen Proben waren nach der Operation mehr Patientinnen tumorfrei als bei der CTC positiv bewerteten Patientengruppe. Diese hatten nach der Operation häufiger noch einen Tumorrest von 0,5-1 cm als die Patientinnen der CTC negativen Gruppe. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (p-Wert: 0,118). Weiterhin hatten

die Patientinnen der Proben H mit dem CTC-Status positiv immer Aszitesbildung, während 23,3 % der CTC negativ bewerteten Gruppe keine Aszitesbildung hatte.

In Tabelle 4.15 ist das Therapieansprechen und der klinische Verlauf der Patientinnen aufgeführt und nach ihrem CTC Status unterteilt dargestellt. Auf die Therapie sprachen 71 % der Patientinnen des Zeitpunktes Q und 77 % der Patientinnen des Zeitpunktes H an (*Responder*). Zum Zeitpunkt H unterschied sich das Therapieansprechen signifikant zwischen den CTC positiv und CTC negativ bewerteten Gruppen (p-Wert: 0,022). Aus der CTC positiven Gruppe sprachen 67 % der Patientinnen nicht auf die Therapie an (*Non-Responder*), während nur 19 % der CTC negativ bewerteten Patientinnen nicht auf die Therapie ansprachen.

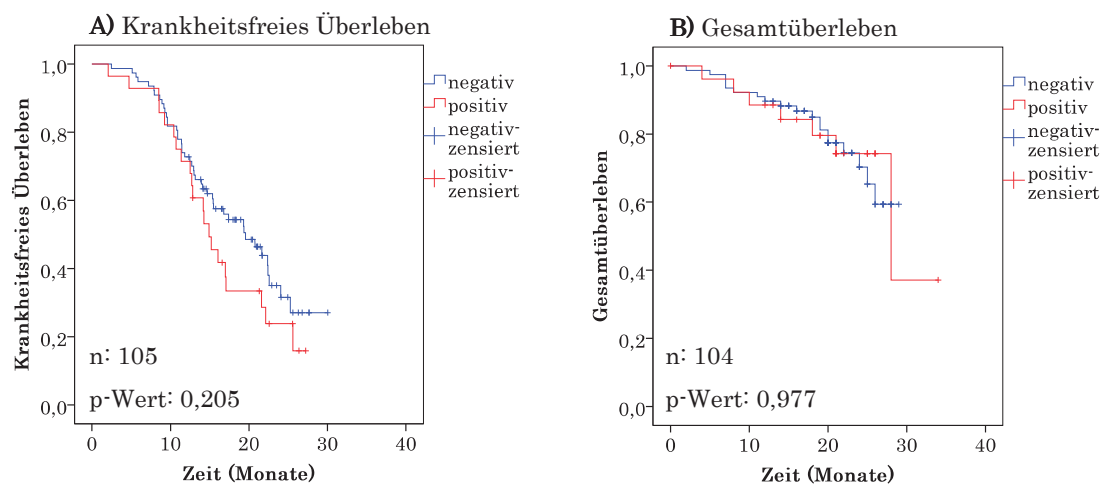
**Tabelle 4.15: Daten zum Therapieansprechen und klinischem Verlauf des analysierten Patientenkollektives der OVCAD-Studie.** Die Daten wurden zusätzlich nach ihrer CTC Bewertung unterteilt aufgeführt. Unterschiedliche Häufigkeiten von mehr als 20 % zwischen den CTC negativen und positiven Gruppen wurden farblich unterlegt (gelb und grün). Der Unterschied bei den grün unterlegten Daten ist signifikant.

	Gesamt Zeit Q	CTC Status Zeit Q		Gesamt Zeit H	CTC Status Zeit H	
		negativ	positiv		negativ	positiv
Therapieansprechen						
<i>Responder</i>	73 (70,9 %)	54 (70,1 %)	19 (73,1 %)	61 (77,2 %)	59 (80,8 %)	2 (33,3 %)
<i>Non-Responder</i>	30 (29,1 %)	23 (29,9 %)	7 (26,9 %)	18 (22,8 %)	14 (19,2 %)	4 (66,7 %)
fehlende Angaben	9	5	4	0	0	0
Rezidiv oder verstorben aufgrund der Erkrankung						
nein	40 (38,1 %)	33 (42,9 %)	7 (25,0 %)	27 (34,2 %)	27 (37,0 %)	0 (0,00 %)
ja	65 (61,9 %)	44 (57,1 %)	21 (75,0 %)	52 (65,8 %)	46 (63,0 %)	6 (100 %)
fehlende Angaben	7	5	2	0	0	0

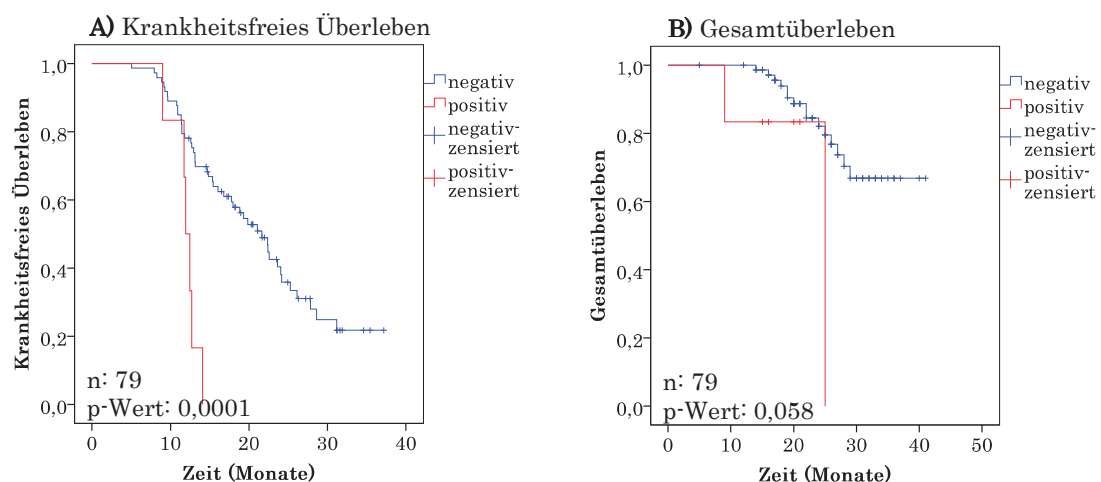
An der Krankheit verstarben oder ein Rezidiv der Erkrankung bekamen 62 % der Patientinnen des Zeitpunktes Q und 66 % der Patientinnen des Zeitpunktes H. Zum Zeitpunkt H gab es auch hier einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen von mehr als 20 %. Alle Patientinnen, bei denen CTCs detektiert wurden, bekamen ein Rezidiv oder verstarben an der Erkrankung, während aus der negativ bewerteten Gruppe 37 % kein Rezidiv bekamen und nicht verstarben. Es zeigte sich hierbei eine klare Tendenz, der Unterschied war aber nicht signifikant (p-Wert: 0,089). In den Analysen für die Blutproben, die vor der Operation abgenommen wurden (Zeitpunkt Q), unterschieden sich das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben bei beiden Gruppen nicht signifikant (p-Wert Gesamtüberleben: 0,977; p-Wert krankheitsfreies Überleben: 0,205). Das krankheitsfreie Überleben betrug bei den Patientinnen, bei denen CTCs zum Zeitpunkt Q detektiert wurden, im Durchschnitt 16,4 Monate, bei den Patientinnen, bei denen keine CTCs detektiert wurden, dagegen 19,3 Monate. Das mittlere Gesamtüberleben betrug 27,3 Monate (CTC-Status negativ: 24,6 Monate und CTC-

Status positiv: 26,4). In den Analysen für die Blutproben, die sechs Monate nach der Chemotherapie abgenommen wurden (Zeitpunkt H), unterschied sich das krankheitsfreie Überleben signifikant (p-Wert: 0,0001). Das krankheitsfreie Überleben betrug bei den Patientinnen, bei denen CTCs zum Zeitpunkt H detektiert wurden, im Durchschnitt 11,9 Monate, bei den Patientinnen, bei denen keine CTCs detektiert wurden, dagegen 21,6 Monate. Beim Gesamtüberleben unterschieden sich die beiden Patientengruppen CTC positiv und CTC negativ nicht signifikant (p-Wert: 0,527). Das mittlere Gesamtüberleben betrug 38,5 Monate (CTC-Status negativ: 38,6 Monate und CTC Status positiv: 30,2).

**1) Proben des Zeitpunktes Q (abgenommen vor der Operation):**



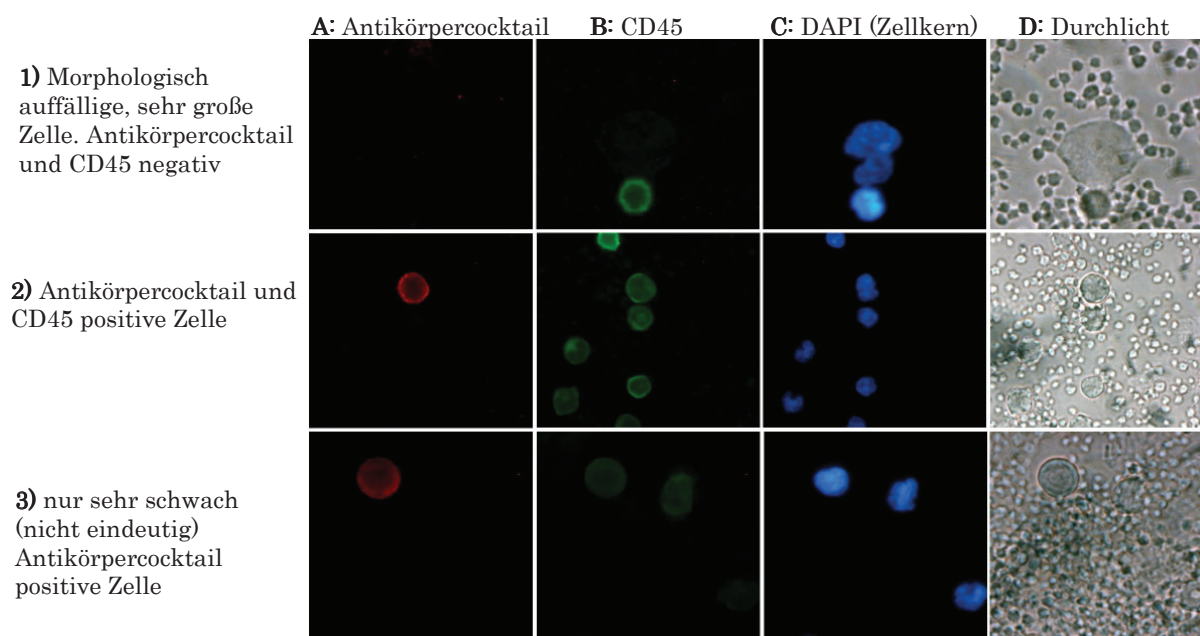
**2) Proben des Zeitpunktes H (abgenommen 6 Monate nach Therapie):**



**Abbildung 4.18: Kaplan-Meier-Überlebensanalysen.** 1: Proben des Zeitpunktes Q (abgenommen vor der Operation); 2: Proben des Zeitpunktes H (abgenommen sechs Monate nach Therapie); A: Krankheitsfreies Überleben; B: Gesamtüberleben.

#### 4.6.4 Detektion von nicht klar einzuordnenden fraglichen Zellen und ihre klinische Bedeutung

In 22 Proben (19,6 %) des Zeitpunktes Q und 18 Proben (22,8 %) des Zeitpunktes H wurden Zellen identifiziert, die nicht alle Kriterien für CTCs erfüllten (siehe Kapitel 3.1.9 und Tabelle 4.16). Die Zellen konnten daher nicht klar als Leukozyten oder CTCs klassifiziert werden und wurden als fragliche Zellen bezeichnet. Als fragliche Zellen wurden entsprechend ihrer Eigenschaften drei Kategorien von Zellen bezeichnet. Als fragliche Zellen wurde zum einen Zellen bezeichnet, die eine atypische Zellmorphologie mit großem Zellkern (typische Kriterien für mögliche CTCs) hatten, aber weder durch den Antikörpercocktail detektiert wurden, noch für CD45 positiv waren (doppelt negative Zellen) (siehe Abbildung 4.19.1). Außerdem wurden Zellen als fraglich klassifiziert, die sowohl für den Antikörpercocktail positiv als auch für CD45 positiv waren (doppelt positive Zellen) (siehe Abbildung 4.19.2). Zusätzlich wurden Zellen, wenn diese nur eine sehr geringe Fluoreszenz für die Antikörpercocktail-Färbung aufwiesen und die Fluoreszenz nicht eindeutig als spezifisch oder als Hintergrundfluoreszenz zugeordnet werden konnte, als fraglich klassifiziert (siehe Abbildung 4.19.3).

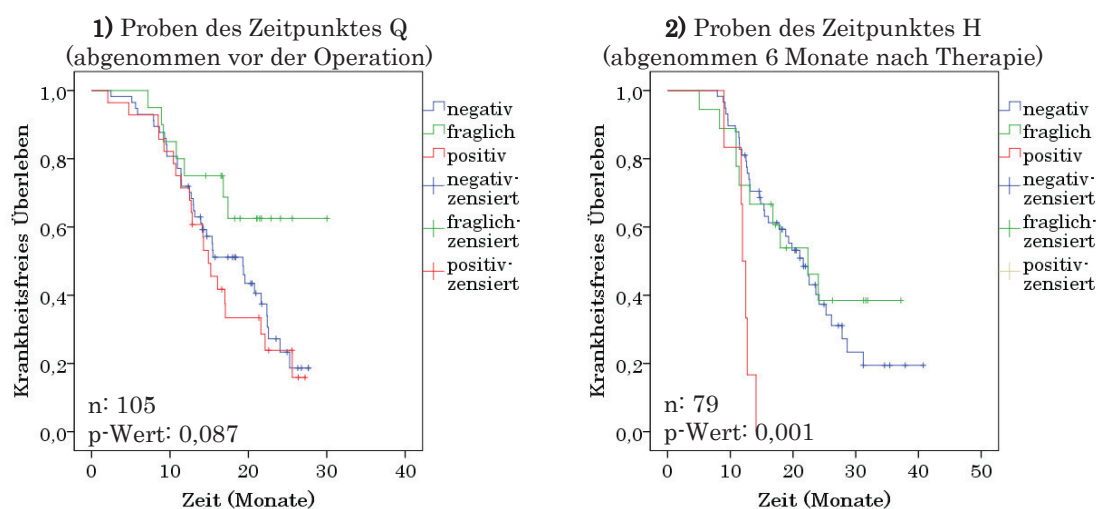


**Abbildung 4.19: Fragliche Zellen isoliert aus dem Blut von Ovarialkarzinompatientinnen (Probe B143Q, B111Q, L180Q).** A: Antikörpercocktail-Färbung der CTCs; B: CD45-Färbung der Leukozyten; C: DNA-Färbung durch DAPI; D: Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.

**Tabelle 4.16: Detektionsrate von negativ, fraglich und positiv bewertetem CTC-Status nach dem modifizierten Protokoll aus Blutproben von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom** Blutproben des Zeitpunktes Q wurden vor der Operation abgenommen, Blutproben des Zeitpunkte H sechs Monate nach Chemotherapie.

Zeitpunkt	analysiert	negativ	fraglich	positiv
Zeit Q	112 (100 %)	60 (53,6 %)	22 (19,6 %)	30 (26,8 %)
Zeit H	79 (100 %)	55 (69,6 %)	18 (22,8 %)	6 (7,6 %)

In den Kaplan-Meier-Analysen stellte sich heraus, dass die Patientinnen, bei denen fragliche Zellen detektiert wurden, im Vergleich zu den anderen Patientinnen einen tendenziell besseren Krankheitsverlauf hatten (siehe Abbildung 4.20). Dieses war vor allem deutlich ersichtlich bei den Proben, die zum Zeitpunktes Q entnommen wurden (siehe Abbildung 4.20.1).



**Abbildung 4.20: Kaplan-Meier-Überlebensanalysen des krankheitsfreien Überleben der CTC negativ, CTC positiv und fragliche bewerteten Patientengruppen. 1:** Proben des Zeitpunktes Q (abgenommen vor der Operation); **2:** Proben des Zeitpunktes H (abgenommen 6 Monate nach Therapie).

Allgemein wird angenommen, dass das Vorhandensein von CTCs mit einem schlechteren Krankheitsverlauf einhergeht. Dies lässt vermuten, dass es sich bei den fraglichen Zellen nicht um CTCs handelt. Daher wurden diese Proben in dieser Arbeit für die CTC Auswertung in Kapitel 4.6.3 als negativ bewertet und nicht getrennt analysiert. Es kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass nicht doch ein Teil der fraglichen Proben CTCs enthalten, die der Detektion durch fehlende Protein-Expression der Antigene des Antikörpercocktails entgehen (doppelt negative Zellen mit atypischer Zellmorphologie). Dieses wird in Kapitel 4.7.4 näher analysiert und beschrieben.



#### 4.7 Nachweis von chromosomalen Zugewinnen in CTCs durch FISH-Analysen

Chromosomale Zugewinne sind tumorzellspezifische Eigenschaften, die in der OVCAD-Studie durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Charles Theillet (*Centre Régional de Lutte contre le Cancer de Montpellier*, Montpellier, Frankreich) durch einen komparativen genomischen Hybridisierungs-Array (*CGH-Array, comparative genomic hybridization*) untersucht wurden. Im *CGH-Array* Ansatz wurde Tumor-DNA von Patientinnen, die auf die Chemotherapie ansprachen, mit der Tumor-DNA von Patientinnen, die nicht von der Therapie profitierten und frühzeitig ein Rezidiv der Erkrankung bekamen, verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumor-DNA von Patientinnen, die nicht auf die Chemotherapie ansprachen, signifikant in 63 % der untersuchten Proben einen chromosomalen Zugewinn im Bereich 3q26 aufwiesen und in 57,8 % der Proben im Bereich 8q24 (siehe Tabelle 4.17).

**Tabelle 4.17: CGH-Array-Daten für die Bereiche 3q26 und 8q24.** Es wurde Tumor-DNA von Ovarialkarzinompatientinnen, die auf die Chemotherapie angesprochen mit der Tumor-DNA von Patientinnen, die nicht von der Therapie profitierten und frühzeitig ein Rezidiv der Erkrankung bekamen, verglichen. Für beide DNA-Bereiche wurde ein signifikanter chromosomaler Zugewinn von Tumor-DNA von Patientinnen, die nicht auf die Therapie ansprachen, gezeigt. Aufgrund dieser Daten wurden für FISH-Analysen der CTCs diese DNA-Bereiche gewählt. (Die Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Charles Theillet, *Centre Régional de Lutte contre le Cancer de Montpellier*, Montpellier, Frankreich).

Region	Region-Länge	Lokalisation	Ereignis	Häufigkeit [%]	Gene
chr3:170,383,323-171,171,352	788029	q26.2	chromosomaler Zugewinn	62,5	EVI1, MDS1, TERC, ARPM1, MYNN, OSZF, LRRC34, SAMD7, SEC62, MECOM
chr8:129,560,905-133,174,636	3613731	q24.21 - q24.22	chromosomaler Zugewinn	57,8	GSDMC, FAM49B, ASAP1, ADCY8, EFR3A, OC90, HHLA1

Aufgrund dieser Daten sind die Bereiche 3q26 und 8q24 für FISH-Analysen der CTCs geeignet, da die Wahrscheinlichkeit eines chromosomalen Zugewinns der CTCs für diesen Bereich hoch ist und ein Zugewinn darüber hinaus von prognostischer Relevanz sein könnte. Zur eindeutigen Identifikation der immunzytochemisch detektierten CTCs wurden deshalb bei einer Subgruppe der Proben zusätzlich FISH-Analysen für die chromosomalen Bereiche 3q26 und 8q24 durchgeführt.



#### 4.7.1 Evaluierung der FISH-Sonden durch Analysen an Leukozyten von gesunden Spendern

Nach Herstellung der FISH-Sonden und Optimierung des Protokolls der FISH-Analysen (siehe Kapitel 3.4) wurde die Präzision der Hybridisierung der Sonden 3q26 und 8q24 überprüft. Hierfür wurden FISH-Analysen an Leukozyten von gesunden Spendern durchgeführt. Die Blutproben wurden dafür genau wie die Patientenproben durch Dichtegradientenzentrifugation aufgearbeitet und vorbehandelt (siehe Kapitel 3.1.1).

In Leukozyten liegen die beiden *Loci* diploid vor und sollten deshalb zwei Signale je Zelle in der FISH-Analyse ergeben. Die Präzision des Verfahrens bestimmt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein chromosomaler Zugewinn in einer einzelnen CTC bestimmt werden kann. Als Referenzsonde für alle Messungen dienten Zentromersonden für das Chromosom 7. Das FISH-Protokoll mit den Sonden des Chromosomenbereichs 3q26 und des Zentromers vom Chromosom 7 wurden an Leukozyten von sieben gesunden Blutspendern durchgeführt und die Anzahl der Signale für jeweils 500 Zellen bestimmt. Somit wurden insgesamt 3500 Leukozyten ausgewertet. Wie erwartet, wiesen die Mehrzahl der Leukozyten für beide Sonden zwei Signale auf (93,5 % der Zellen). Das Verhältnis der Sonde 3q26 zur Referenzsonde 7 war 1,1, was für eine hohe Präzision des Protokolls spricht (siehe Tabelle 4.18). In 1,2 % der Zellen wurde anstatt der erwarteten zwei Signale der 3q26 Sonde nur ein Signal detektiert und in nur 0,06 % drei Signale. Für die Referenzsonde wurde in 5,8 % der Zellen nur ein Signal, seltener in 0,66 % der Zellen kein Signal oder in nur 0,11 % drei Signale detektiert (siehe Tabelle 4.19).

Das FISH-Protokoll mit den Sonden des Chromosomenbereichs 8q24 und des Zentromers vom Chromosom 7 wurde an Leukozyten von drei gesunden Blutspendern durchgeführt und die Anzahl der Signale für jeweils 500 Zellen bestimmt. Es wurden somit 1500 Leukozyten für die Sonde 8q24 ausgewertet. Wie erwartet, wiesen auch für diese Sonde die Mehrzahl der Leukozyten für beide Sonden zwei Signale auf (96,2 % der Zellen). Das Verhältnis der Sonde 8q24 zur Referenzsonde 7 war 1,0, was auch für diese Sonde für eine hohe Präzision des Protokolls spricht (siehe Tabelle 4.18). In 0,73 % der Zellen wurde nur ein Signal und in 0,47 % drei Signale detektiert (siehe Tabelle 4.19).

**Tabelle 4.18: Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analyse für die Sonde 3q26 oder 8q24 und die Referenzsonde Zentromer 7 an Leukozyten von gesunden Spendern.** Für die Sonde 3q26 wurden die Signale von insgesamt 3500 Leukozyten (jeweils 500 Zellen von sieben gesunden Spendern), für die Sonde 8q24 von insgesamt 1500 Leukozyten (jeweils 500 Zellen von drei gesunden Spendern) bestimmt und das Verhältnis 3q26/Zentromer 7 oder 8q24/Zentromer 7 berechnet. (\*: Wenn Zentromer 7 = 0 war konnte das Verhältnis nicht berechnet werden; Zent.: Zentromer).

Sonde	Anzahl der analysierten Zellen	Signale/Zelle Minimum	Signale/Zelle Maximum	Summe der Signale	Mittelwert Signale/Zelle	Standardabweichung
<b>3q26</b>						
3q26	3500	1	3	6960	1,99	0,11
Zentromer 7	3500	0	3	6755	1,93	0,28
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	3477	0,5	2,0	3654,2	1,1	0,24
<b>8q24</b>						
8q24	1500	1	3	2996	2,00	0,11
Zentromer 7	1500	0	3	2977	1,98	0,17
Verhältnis 8q24/Zent. 7*	1499	0,5	2,0	1523,5	1,0	0,15

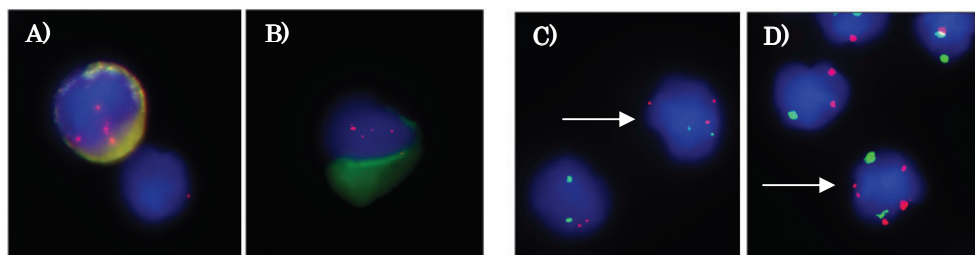
**Tabelle 4.19: Häufigkeitsverteilung der Anzahl der FISH-Signale pro Zelle für die Sonde 3q26 oder 8q24 und der Referenzsonde Zentromer 7 an Leukozyten von gesunden Spendern.** Für die Sonde 3q26 wurden die Signale von insgesamt 3500 Leukozyten (jeweils 500 Zellen von 7 gesunden Spendern) und für die Sonde 8q24 von insgesamt 1500 Leukozyten (jeweils 500 Zellen von 3 gesunden Spendern) bestimmt.

Sonde	Anzahl der analysierten Zellen	0 Signale	1 Signal	2 Signale	3 Signale
<b>3q26</b>					
3q26	3500	0 (0,0 %)	42 (1,2 %)	3456 (98,7 %)	2 (0,1 %)
Zentromer 7	3500	23 (0,7 %)	203 (5,8 %)	3270 (93,4 %)	4 (0,1 %)
<b>8q24</b>					
8q24	1500	0 (0,0 %)	11 (0,7 %)	1482 (98,8 %)	7 (0,5 %)
Zentromer 7	1500	1 (0,1 %)	30 (2,0 %)	1460 (97,3 %)	9 (0,6 %)

Anhand dieser Kontrollen wurde gezeigt, dass sehr selten drei Signale für die Sonden 3q26 und 8q24 detektiert wurden und nie mehr als drei Signale. Dieses Ergebnis wurde bei der Auswertung der FISH-Analysen von Patientenproben berücksichtigt. Um unspezifische Signale zu umgehen, wurden nur Proben mit CTCs mit einem chromosomalen Zugewinn klassifiziert, die entweder eine hohe Anzahl von Zellen mit drei Signalen oder Zellen mit mehr als drei Signalen aufwiesen. Ein DNA Verlust wurde nicht weiter analysiert.

#### 4.7.2 FISH-Analysen an immunzytochemisch durch den Antikörpercocktail detektierten CTC positiven Proben der OVCAD-Studie

Für die FISH-Analysen wurden zehn Proben (neun Proben des Zeitpunktes Q und eine des Zeitpunktes H) ausgewählt, in denen CTCs immunzytochemisch durch Verwendung des Antikörpercocktails eine hohe Anzahl an Zellen nachgewiesen wurden (siehe Kapitel 4.6.2). Es wurden gezielt Proben ausgewählt, in denen durch die immunzytochemischen Analysen eine hohe Anzahl an CTCs nachgewiesen wurde (siehe Tabelle 4.12 und 4.13), da in diesen Proben die mögliche Identifizierung von CTCs in der FISH-Analyse wahrscheinlicher ist. In allen untersuchten Proben wurden Zellen nachgewiesen, die einen chromosomalen Zugewinn im Bereich 3q26 aufwiesen (siehe Abbildung 4.21). Für drei Proben (Zeitpunkt Q) wurden zusätzlich FISH-Analysen für den Bereich 8q24 durchgeführt. In allen drei Proben konnten Zellen mit einem chromosomalen Zugewinn detektiert werden.



**Abbildung 4.21: FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an CTCs.**

**A und B:** immunzytochemisch positive (Antikörpercocktail Färbung) CTCs mit einem chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26. Rote Signale: Sonde 3q26, grün: immunzytochemische Färbung (Antikörpercocktail), **C und D:** immunzytochemisch negative CTCs mit einem chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26 (weiße Pfeile). Rote Signale: Sonde 3q26, grüne Signale: Zentromer Sonde 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.

In Tabelle 4.20 sind die FISH-Ergebnisse zusammengefasst und die klinischen Daten der Patientinnen angegeben. Auffällig ist hierbei, dass fünf der neun Patientinnen (von der Patientin B159 wurden die Proben beider Zeitpunkte H und Q analysiert) bereits Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose hatten.

**Tabelle 4.20: Übersicht der Proben, die durch FISH analysiert wurden und Ergebnisse der Analysen der Detektion von CTCs mit chromosomalen Zugewinnen für die Bereiche 3q26 und 8q24.**

Probe	FISH- Analyse 3q26	FISH-Analyse 8q24	Klinischer Verlauf (Monate nach Therapie)	Metastasen
H071Q	CTCs mit Zugewinn	CTCs mit Zugewinn	Rezidiv (14)	Leber, Milz
B120Q	CTCs mit Zugewinn	---	2 Rezidive (3/11) / verstorben(16)	---
B146Q	CTCs mit Zugewinn	---	---	---
B151Q	CTCs mit Zugewinn	CTCs mit Zugewinn	---	Lunge
B159Q	CTCs mit Zugewinn	---	Rezidiv (8) verstorben	Leber
B164Q	CTCs mit Zugewinn	---	(2 Monate nach der Operation)	---
B175Q	CTCs mit Zugewinn	---	Rezidiv (4)	Pleura
L177Q	CTCs mit Zugewinn	---	Rezidiv (7)	Milz
V047Q	CTCs mit Zugewinn	CTCs mit Zugewinn	Rezidiv (5)	---
B159H	CTCs mit Zugewinn	---	Rezidiv (8)	Leber

Diese FISH-Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der immunzytochemischen Detektion durch den Antikörpercocktail. Interessanterweise konnten auch Zellen identifiziert werden, die nicht immunzytochemisch für den Antikörpercocktail positiv waren, aber einen DNA Zugewinn für den Bereich 3q26 (siehe Abbildung 4.21 C und D) oder 8q24 aufwiesen.

#### **4.7.3 Bestätigung von immunzytochemisch schwach positiv detektierten CTCs aus den Blutproben einer Patientin beider Zeitpunkte Q und H durch FISH-Analysen**

In den Blutproben der Patientin B159 des Zeitpunktes Q sowie des Zeitpunktes H wurde eine hohe Anzahl an Zellen detektiert (Probe Q: ~9 CTCs/ml Blut, siehe Tabelle 4.12 und Probe H: ~10 CTCs/ml Blut, siehe Tabelle 4.13), die die Markerproteine des Antikörpercocktails nur schwach exprimierten (siehe Abbildung 4.22). Allein basierend auf den Ergebnissen der immunzytochemischen Färbungen konnte nicht mit Gewissheit bestimmt werden, ob es sich bei den Zellen um CTCs handelt. Die Patientin hatte das Krankheitsstadium FIGO IV und zum Zeitpunkt der Diagnose eine Lebermetastase (siehe Tabelle 4.21). Außerdem trat bei der Patientin 13 Monate nach Diagnosestellung ein Rezidiv der Erkrankung auf.

Tabelle 4.21: Klinische Daten zur Patientin B159.

Alter zum Zeitpunkt der Diagnose [Jahre]	Histologie	FIGO-Stadium	Grade	pT	pN	M	Metastasen	Zeit bis zum Auftreten des 1. Rezidives nach der Diagnose [Monate]
69	seröser Tumor	IV	G3	3c	N1	M1	Leber	13

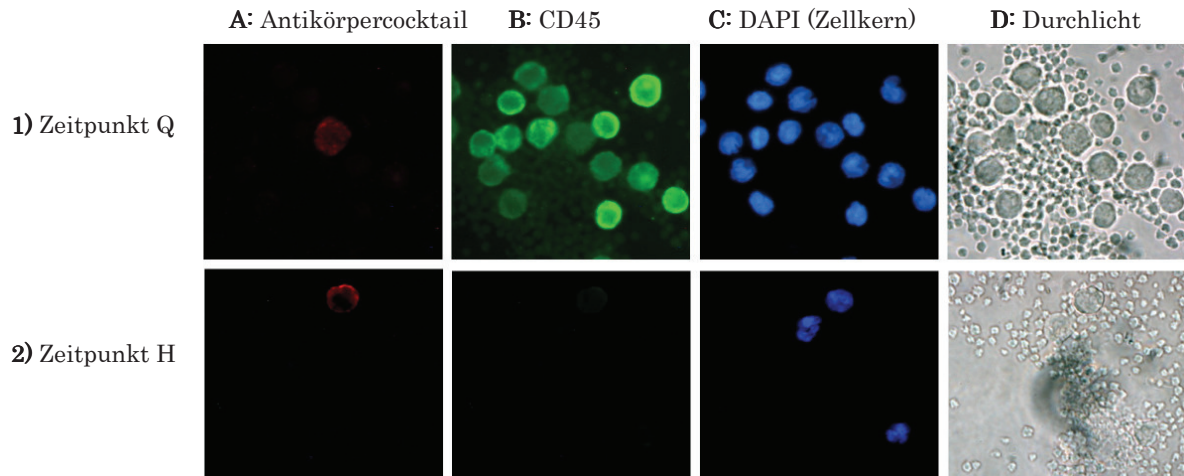


Abbildung 4.22: CTCs isoliert aus Blutproben der Patientin B159, abgenommen zum Zeitpunkt Q (1: nach der Operation) und Zeitpunkt H (2: 6 Monate nach der Therapie) A: Antikörpercocktail-Färbung der CTCs; B: CD45-Färbung der Leukozyten; C: DNA-Färbung durch DAPI; D: Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.

Um die Proben der Patientin B159 der Gruppe CTC positiv oder CTC negativ zuordnen zu können, wurden FISH-Analysen für den Chromosomenbereich 3q26 sowohl an Zellen des Zeitpunktes Q als auch H durchgeführt.

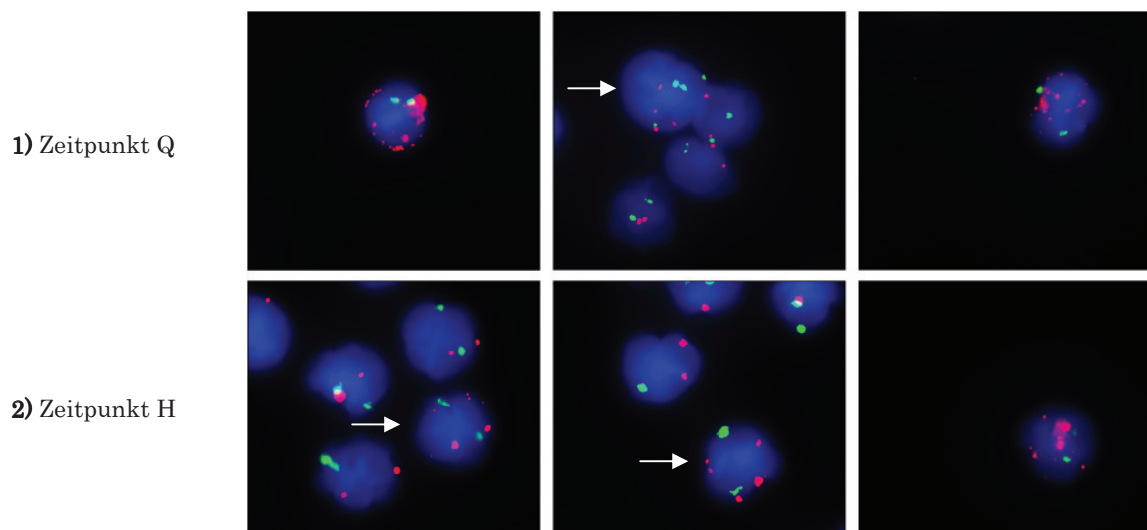
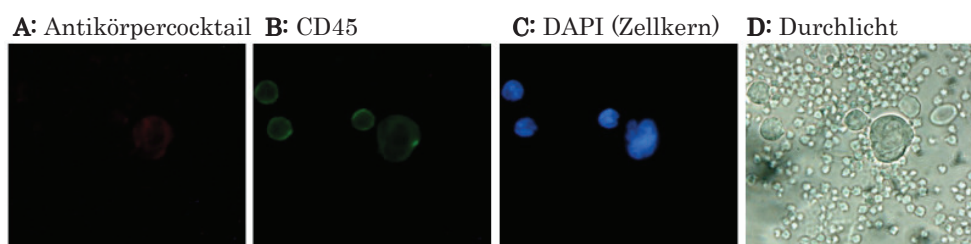


Abbildung 4.23: FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an CTCs, isoliert aus Blutproben der Patientin B159, abgenommen zum Zeitpunkt Q (1: nach der Operation) und Zeitpunkt H (2: 6 Monate nach der Therapie). Rote Signale: Sonde 3q26, grüne Signale: Zentromer Sonde 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.

Es wurden in beiden Proben Zellen identifiziert, die einen chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26 hatten (siehe Abbildung 4.23). Daraufhin wurden die Zellen den CTCs zugeordnet, und die Patientin erhielt den CTC-Status positiv. Durch die FISH-Analysen konnte also die immunzytochemische Detektion durch den Antikörpercocktail von schwach positiv gefärbten Zellen bestätigt werden.

#### 4.7.4 FISH-Analyse einer Probe mit immunzytochemisch als fraglich klassifizierten Zellen

Wie im Kapitel 4.6.4 beschrieben wurde, wurden in Blutproben von 22 Patientinnen (19,6 %) des Zeitpunktes Q und 18 Proben (22,8 %) des Zeitpunktes H fragliche Zellen identifiziert. In der Probe B111Q wurden insbesondere große atypische Zellen mit einem großen Zellkern identifiziert, die aber weder durch den Antikörpercocktail detektiert wurden, noch für CD45 positiv waren (doppelt negative Zellen) (siehe Abbildung 4.24).



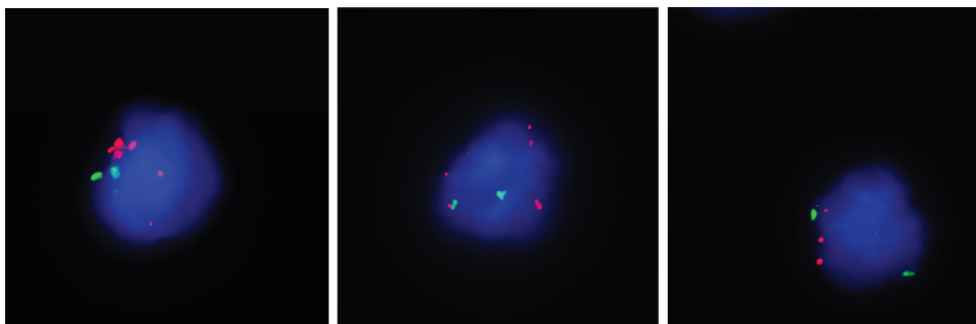
**Abbildung 4.24: Fragliche Zelle isoliert aus der Blutprobe B111Q.** A: Antikörpercocktail-Färbung der CTCs; B: CD45-Färbung der Leukozyten; C: DNA-Färbung durch DAPI; D: Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.

Diese Patientin hatte das Krankheitsstadium IV und einen malignen Pleuraerguss (siehe Tabelle 4.22). Diese als fraglich klassifizierten Zellen der Probe B111Q wurden mit der FISH-Methode für den chromosomalen Bereich 8q24 analysiert, um den malignen Ursprung der Zellen zu prüfen.

**Tabelle 4.22: Klinische Daten zur Patientin B111.**

Alter zum Zeitpunkt der Diagnose [Jahre]	Histologie	FIGO-Stadium	Grade	pT	pN	M	Metastasen	Zeit bis zum Auftreten des 1. Rezidives nach der Diagnose [Monate]
75	seröser Tumor	IV	G3	3c	N1	M1	Pleura	kein Rezidiv

In der Probe B111Q konnten durch die FISH-Analyse Zellen identifiziert werden, die einen chromosomalen Zugewinn für 8q24 aufwiesen (siehe Abbildung 4.25). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei den fraglich bezeichneten Zellen dieser Probe offenbar um CTCs handelte, da normale Blutzellen keine derartigen chromosomalen Veränderungen aufweisen.



**Abbildung 4.25: FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 8q24 an fraglichen Zellen isoliert aus der Blutprobe B111Q.** Rote Signale: Sonde 8q24, grüne Signale: Zentromer Sonde 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.

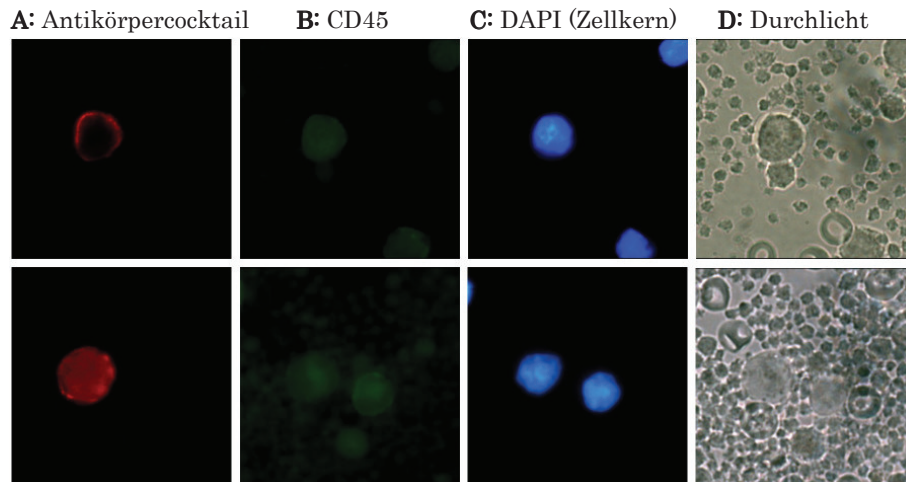
#### *4.8 Analysen der chromosomalen Aberrationen der Bereiche 3q26 und 8q24 der CTCs der Probe B151Q im Vergleich zum Primärtumor*

Exemplarisch wurden die CTCs der Patientin B151 bezüglich der chromosomalen Aberrationen der Bereiche 3q26 und 8q24 vergleichend zum Primärtumor analysiert. In der Blutprobe B151Q wurde eine hohe Anzahl CTCs detektiert (~20 CTCs/ml Blut, siehe Tabelle 4.12 und Abbildung 4.26). Die Patientin B151 hatte das Krankheitsstadium IV und eine Lungenmetastase zum Zeitpunkt der Diagnose (siehe Tabelle 4.23).

**Tabelle 4.23: Klinische Daten zur Patientin B151.**

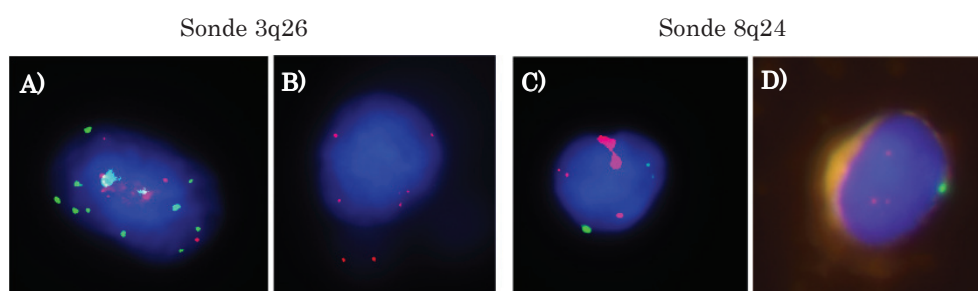
Alter zum Zeitpunkt der Diagnose [Jahre]	Histologie	FIGO-Stadium	Grade	pT	pN	M	Metastasen	Zeit bis zum Auftreten des 1. Rezidives nach der Diagnose [Monate]
68	endometrioider Tumor	IV	G3	3c	N0	M1	Lunge	kein Rezidiv





**Abbildung 4.26: CTCs isoliert aus der Blutprobe B151Q.** **A:** Antikörpercocktail-Färbung der CTCs; **B:** CD45-Färbung der Leukozyten; **C:** DNA-Färbung durch DAPI; **D:** Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.

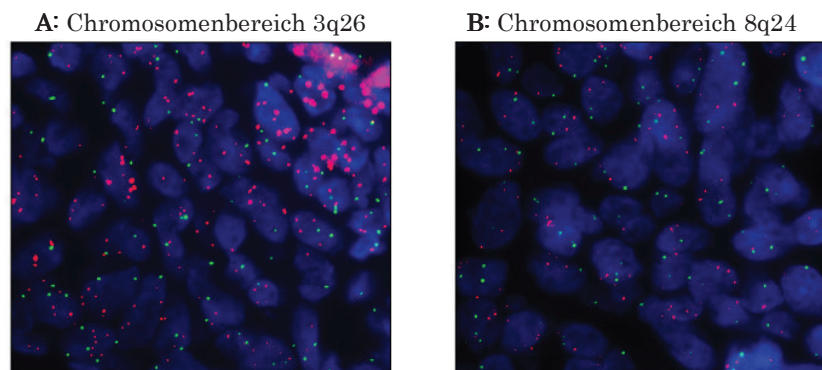
Aufgrund der hohen Anzahl an detektierten CTCs war es möglich, diese mit der FISH-Methode für die Chromosomenbereiche 3q26 und 8q24 zu charakterisieren. Für beide Chromosomenbereiche konnten Zellen identifiziert werden, die einen chromosomalen Zugewinn hatten (siehe Abbildung 4.27). Der Hauptanteil der CTCs der Probe B151Q war immunzytochemisch durch den Antikörpercocktail nicht intensiv gefärbt (siehe Abbildung 4.26). Nach der FISH-Analyse konnte aus methodischen Gründen dieses schwache Signal der Antikörperfärbung nicht mehr detektiert werden. Somit konnten keine Aussagen bezüglich der immunzytochemischen Färbung der Zellen mit einem chromosomalen Zugewinn getroffen werden.



**Abbildung 4.27: FISH-Analyse für die Chromosomenbereiche 3q26 (A und B) und 8q24 (C und D) an CTCs isoliert aus der Blutprobe B151Q.** Rote Signale: Sonde 3q26 (A und B) oder Sonde 8q24 (C und D), grüne Signale: Zentromer Sonde 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.

Vergleichend zu den CTCs wurden auch FISH-Analysen der Bereiche 3q26 und 8q24 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors durchgeführt. Pro Gewebe wurden die FISH-Signale von 100 Zellen ausgewertet (siehe Tabelle 4.24). Das Verhältnis zur Referenzsonde Zentromer 7 der 3q26 Sonde betrug 2,7 und 2,1 der Sonde 8q24. Somit

hatten die Zellen des Primärtumors chromosomale Zugewinne der Bereiche 3q26 und 8q24 im Vergleich zur Referenz (siehe Tabelle 4.24 und Abbildung 4.28).



**Abbildung 4.28:** FISH-Analyse für die Chromosomenbereiche 3q26 (A) und 8q24 (B) an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors der Patientin B151. A: Primärtumor mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 3q26; B: Primärtumor mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 8q24. Rote Signale: Sonde 3q26 oder 8q24, grüne Signale: Zentromer 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.

**Tabelle 4.24:** Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analysen für die Sonden 3q26 oder 8q24 und die Referenzsonde Zentromer 7 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors der Patientin B151. Es wurden die Signale der Sonde 3q26 oder 8q24 und der Referenzsonde Zentromer 7 von jeweils 100 Zellen bestimmt und das Verhältnis 3q26/Zentromer 7 oder 8q24/Zentromer 7 berechnet. (\*: Wenn Zentromer 7 = 0 war konnte das Verhältnis nicht berechnet werden; Zent.: Zentromer).

Sonde	Anzahl der analysierten Zellen	Signale/Zelle Minimum	Signale/Zelle Maximum	Summe der Signale	Mittelwert Signale/Zelle	Standardabweichung
<b>3q26</b>						
3q26	100	2	19	737	7,37	2,49
Zentromer 7	100	1	7	289	2,89	1,05
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	100	0,7	6,0	274,1	2,7	0,94
<b>8q24</b>						
8q24	100	1	9	465	4,65	1,49
Zentromer 7	100	0	5	243	2,43	0,96
Verhältnis 8q24/Zent. 7*	97	0,5	6,0	199,1	2,1	0,96

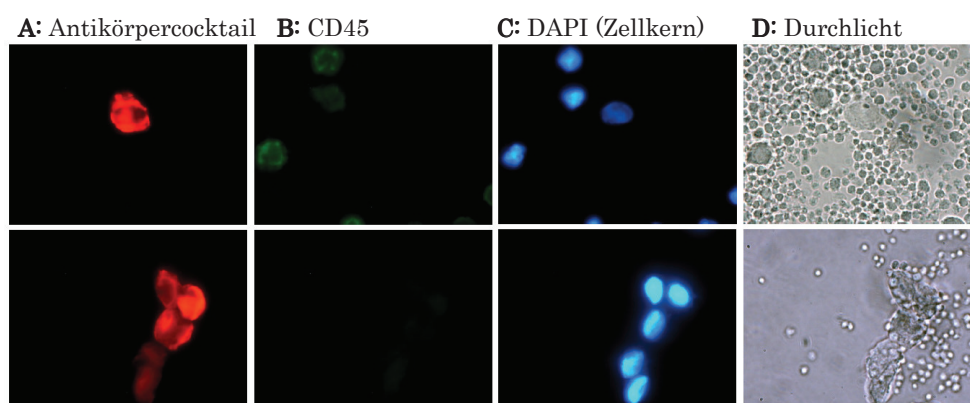
#### ***4.9 Analysen der Antigenexpression und chromosomalen Aberrationen der CTCs der Probe H071Q im Vergleich zum Primärtumor, Metastasen und Asziteszellen***

In der Blutprobe der Patientin H071 konnte eine sehr hohe Anzahl von CTCs (~187 CTCs/ml Blut) detektiert werden (siehe Tabelle 4.12 und Abbildung 4.29). Die Patientin hatte das Krankheitsstadium FIGO IV (siehe Tabelle 4.25). Da sie zum Zeitpunkt der Diagnose Leber- und Milzmetastasen hatte, war es möglich diese, den Primärtumor und Asziteszellen mit den CTCs zu vergleichen. Daher wurden anhand der Patientenproben

H071 Vergleiche bezüglich der Antigenexpression und genetischen Aberrationen zwischen den CTCs mit dem Primärtumor, den Metastasen und Asziteszellen durchgeführt.

**Tabelle 4.25: Klinische Daten zur Patientin H071.**

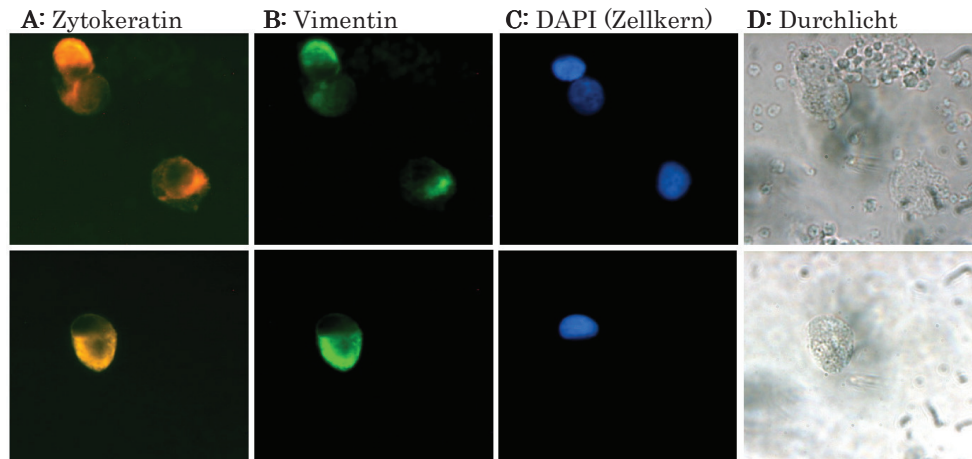
Alter zum Zeitpunkt der Diagnose [Jahre]	Histologie	FIGO-Stadium	Grade	pT	pN	M	Metastasen	Zeit bis zum Auftreten des 1. Rezidives nach der Diagnose [Monate]
69	seröser Tumor	IV	G3	3c	N1	M1	Leber, Milz	17



**Abbildung 4.29: CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q.** A: Antikörpercocktail-Färbung der CTCs; B: CD45-Färbung der Leukozyten; C: DNA-Färbung durch DAPI; D: Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.

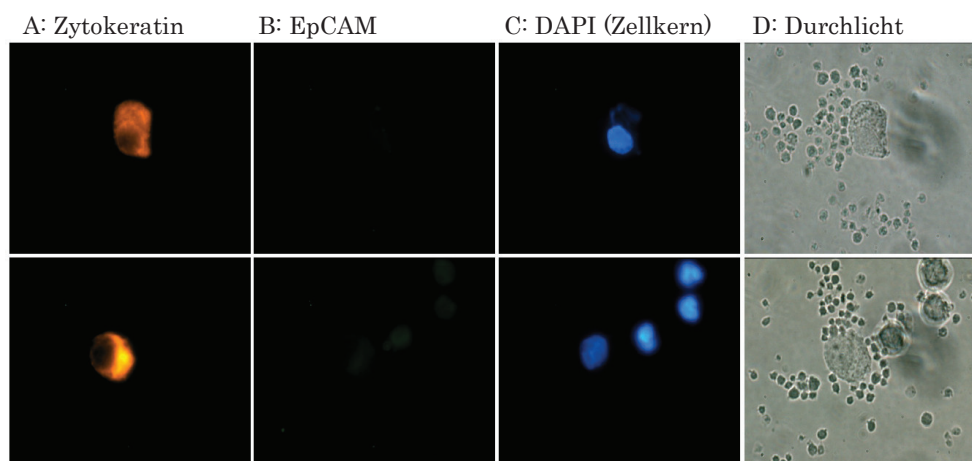
#### 4.9.1 Immunzytochemische Charakterisierung der CTCs

Aufgrund der hohen Anzahl der CTCs war eine weitere immunzytochemische Charakterisierung der CTCs möglich. Es konnte gezeigt werden, dass die CTCs positiv für Zytokeratin (Antikörper: A45-BB3-Cy3; CK 7/18) waren (siehe Abbildung 4.30 und Abbildung 4.31). Zur weiteren immunzytochemischen Charakterisierung wurden Fluoreszenzdoppelfärbungen gegen Zytokeratin und ein weiteres Antigen durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.1). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die CTCs negativ für EGFR und HER-2 waren. Interessanterweise exprimierten die CTCs den mesenchymalen Marker Vimentin (siehe Abbildung 4.30).



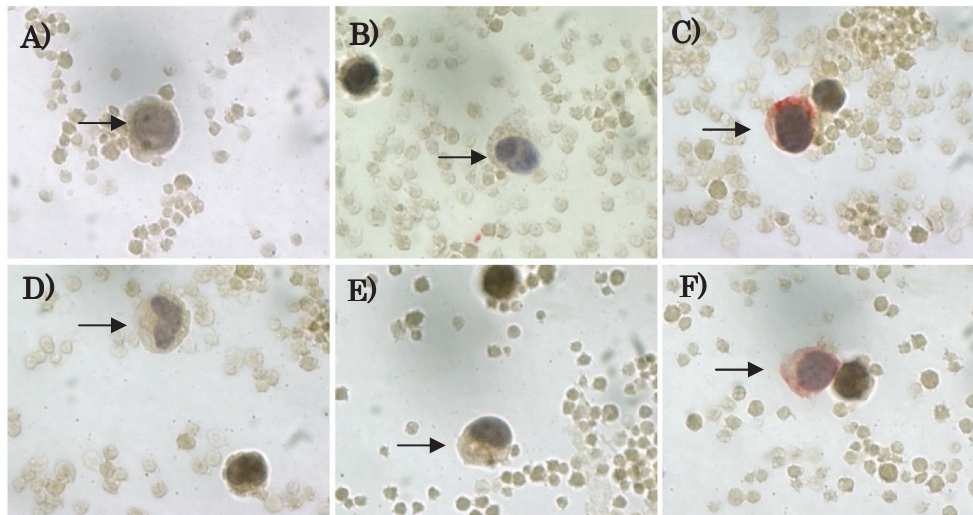
**Abbildung 4.30: Immunzytochemische Charakterisierung der CTCs aus Blutprobe H071Q.** A: Zytokeratin-Färbung der CTCs; B: Vimentin-Färbung der CTCs; C: DNA-Färbung durch DAPI; D: Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.

Die Fluoreszenzdoppelfärbung gegen Zytokeratin (CK 7/18) und EpCAM zeigte, dass die meisten CTCs negativ für EpCAM waren (siehe Abbildung 4.31). Bei wenigen CTCs konnte ein sehr geringes Fluoreszenzsignal für die EpCAM-Färbung identifiziert werden, welches möglicherweise aus dem intensiven Zytokeratin-Signal, welches in den EpCAM-Kanal überstrahlen könnte, resultiert. Daher konnte allein durch die Fluoreszenzdoppelfärbung keine eindeutige Aussage zur EpCAM-Expression der CTCs getroffen werden.



**Abbildung 4.31: Immunzytochemische Charakterisierung der CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q.** A: Zytokeratin-Färbung der CTCs; B: EpCAM-Färbung der CTCs; C: DNA-Färbung durch DAPI; D: Durchlicht. Vergrößerung 1000 x.

Daher wurde zur Verifizierung der EpCAM-Expression der CTCs eine lichtmikroskopische Färbung gegen EpCAM nach der APAAP-Methode durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2).



**Abbildung 4.32: Immunzytochemische EpCAM-Färbung der CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q durch die APAAP-Methode. A, B, D und E:** EpCAM-negative Zellen, die morphologisch den CTCs der Probe H071Q entsprechen (Pfeil); **C und F:** leicht EpCAM-positive CTCs (Pfeil). Vergrößerung 1000 x.

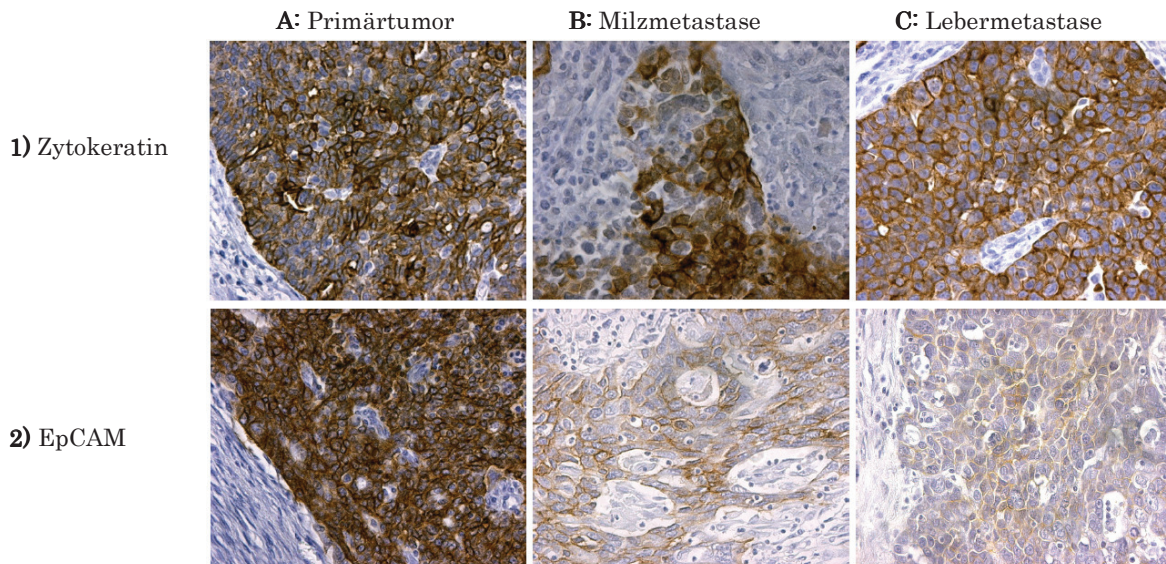
Anhand dieser sehr sensitiven lichtmikroskopischen Färbung konnte bestätigt werden, dass die meisten CTCs (etwa 90 %) negativ für EpCAM waren (siehe Abbildung 4.32. A, B, D, E). Diese Zellen wurden durch ihre typische und auffällige Morphologie identifiziert (siehe Abbildung 4.32, große Zelle mit großem Zellkern). Ein kleiner Teil der CTCs exprimierte noch leicht EpCAM (siehe Abbildung 4.32 C, F). Somit konnte gezeigt werden, dass die CTCs der Probe H071 heterogen bezüglich ihrer EpCAM-Expression waren. Während der größte Anteil der CTCs EpCAM nicht exprimierte, hatten einige wenige CTCs noch eine leichte EpCAM-Expression.

#### **4.9.2 Vergleich der Protein-Expression von EpCAM und Zytokeratin von Primärtumor, Milz- und Lebermetastase**

Da die Patientin H071 zum Zeitpunkt der Diagnose des Ovarialkarzinoms bereits Milz- und Lebermetastasen hatte, war es möglich, die Protein-Expression von Zytokeratin und EpCAM an Paraffingewebeschnitten vergleichend zum Primärtumor zu analysieren. Sowohl der Primärtumor als auch die Metastasen der Milz und der Leber waren stark positiv für Zytokeratin (Antikörper: A45-BB-3, CK 7/18). Außerdem war der



Primärtumor deutlich positiv für EpCAM. Die Milzmetastase und die Lebermetastase zeigten hingegen eine deutlich niedrigere EpCAM Expression im Vergleich zum Primärtumor (siehe Abbildung 4.33).

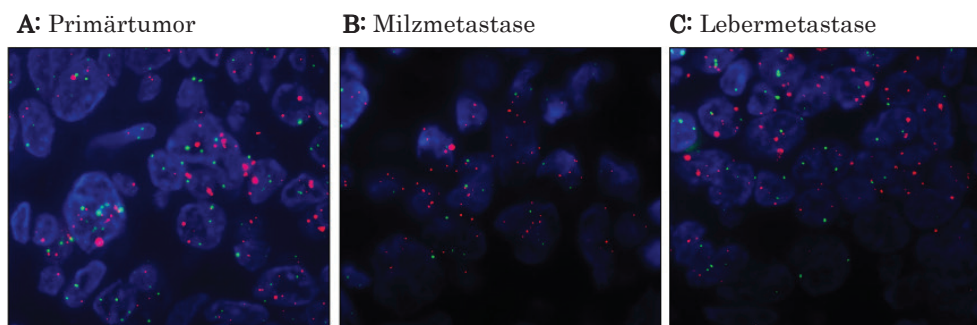


**Abbildung 4.33:** Immunhistologische Zytokeratin- und EpCAM-Färbung an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors (A), der Milz- (B) und Lebermetastase (C) der Patientin H071. 1: Zytokeratin-Färbung; 2: EpCAM-Färbung. Vergrößerung 400 x.

Damit entsprach bei dieser Patientin der Phänotyp der Metastasenzellen mit wenig EpCAM-Expression dem der meisten CTCs mit ebenfalls wenig bis keiner EpCAM-Expression.

#### 4.9.3 Vergleichende FISH-Analysen der Bereiche 3q26 und 8q24 zwischen CTCs, Primärtumor, Milz- und Lebermetastasen und Asziteszellen

Zusätzlich zur Phänotypisierung mit EpCAM- und Zytokeratin-Antikörpern wurden die chromosomalen Bereiche 3q26 und 8q24 zwischen Primärtumor, Milzmetastase, Lebermetastase, Asziteszellen und CTCs mittels FISH-Analysen verglichen. Sowohl der Primärtumor als auch die Milz- und Lebermetastase wiesen einen hohen chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26 auf (siehe Abbildung 4.34). Die mittlere Anzahl der FISH-Signale pro Zelle der Sonde 3q26 des Primärtumors betrug 4,6, der Milzmetastase 8,4 und der Lebermetastase 6,2. Für den Chromosomenbereich 3q26 im Verhältnis zur Referenz hatte der Primärtumor einen chromosomalen Zugewinn von 2,2, die Milzmetastase von 2,7 und die Lebermetastase von 3,4 (siehe Tabelle 4.26).



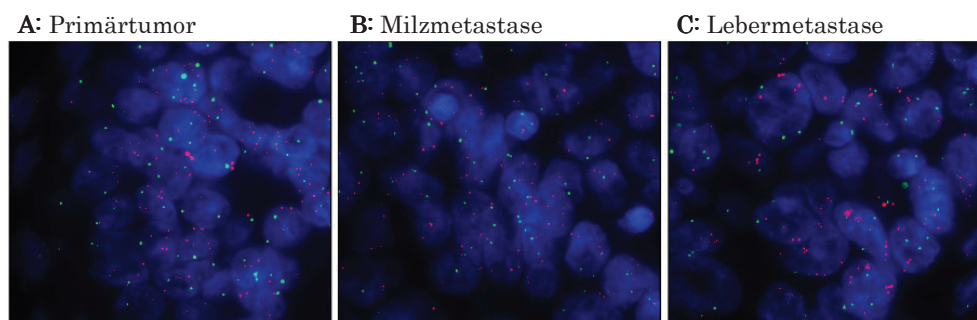
**Abbildung 4.34: FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors, der Milz- und Lebermetastase der Patientin H071. A: Primärtumor mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 3q26; B: Milzmetastase mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 3q26; C: Lebermetastase mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 3q26. Rote Signale: Sonde 3q26, grüne Signale: Zentromer Sonde 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.**

**Tabelle 4.26: Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analyse für die Sonde 3q26 und die Referenzsonde Zentromer 7 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors, der Milz- und Lebermetastase der Patientin H071. Es wurden die Signale der Sonde 3q26 und der Referenzsonde Zentromer 7 von jeweils 100 Zellen bestimmt und das Verhältnis 3q26/Zentromer 7 berechnet. (\*: Wenn Zentromer 7 = 0 war konnte das Verhältnis nicht berechnet werden)(Zent.: Zentromer).**

Sonde	Anzahl der analysierten Zellen	Signale/Zelle Minimum	Signale/Zelle Maximum	Summe der Signale	Mittelwert Signale/Zelle	Standardabweichung
<b>Primärtumor</b>						
3q26	100	1	15	457	4,57	2,03
Zentromer 7	100	1	6	230	2,30	0,88
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	100	0,5	10,0	215,1	2,2	1,16
<b>Milzmetastase</b>						
3q26	100	0	25	824	8,24	3,54
Zentromer 7	100	0	8	328	3,28	1,26
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	98	0,0	8,3	260,0	2,7	1,25
<b>Lebermetastase</b>						
3q26	100	0	13	623	6,23	2,83
Zentromer 7	100	0	4	201	2,01	0,94
Verhältnis 3q26/Zent. 7*	94	0,0	13,0	315,3	3,4	2,28

Auch für den Chromosomenbereich 8q24 zeigten die Zellen des Primärtumors und der Metastasen einen chromosomalen Zugewinn an (siehe Abbildung 4.35). Für die Sonde 8q24 betrug die mittlere Anzahl der FISH-Signale pro Zelle des Primärtumors 5,6, der Milzmetastase 5,4 und der Lebermetastase 5,8. Für den Chromosomenbereich 8q24 im Verhältnis zur Referenz hatte der Primärtumor einen chromosomalen Zugewinn von 2,9, die Milzmetastase von 2,1 und die Lebermetastase von 2,4 (siehe Tabelle 4.27). Somit hatten sowohl die Zellen des Primärtumors als auch der Metastasen chromosomale Zugewinne der Bereiche 3q26 und 8q24 im Vergleich zur Referenz (siehe Tabelle 4.26 und 4.27 sowie Abbildung 4.34 und 4.35).



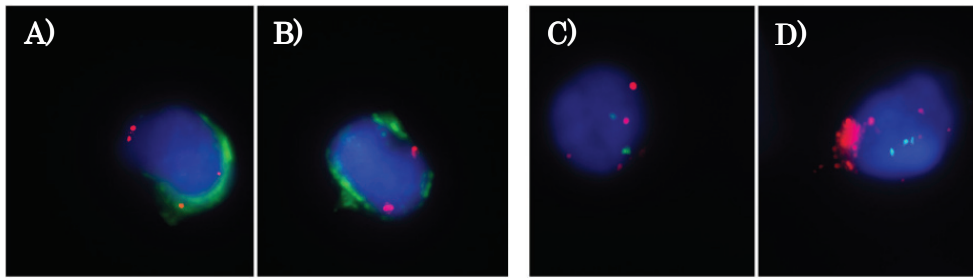


**Abbildung 4.35: FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 8q24 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors, der Milz- und Lebermetastase der Patientin H071. A: Primärtumor mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 8q24; B: Milzmetastase mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 8q24; C: Lebermetastase mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 8q24. Rote Signale: Sonde 8q24, grüne Signale: Zentromer Sonde 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.**

**Tabelle 4.27: Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analyse für die Sonde 8q24 und die Referenzsonde Zentromer 7 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors, der Milz- und Lebermetastase der Patientin H071. Es wurden die Signale der Sonde 8q24 und der Referenzsonde Zentromer 7 von jeweils 100 Zellen bestimmt und das Verhältnis 8q24/Zentromer 7 berechnet. (\*: Wenn Zentromer 7 = 0 war konnte das Verhältnis nicht berechnet werden; Zent.: Zentromer).**

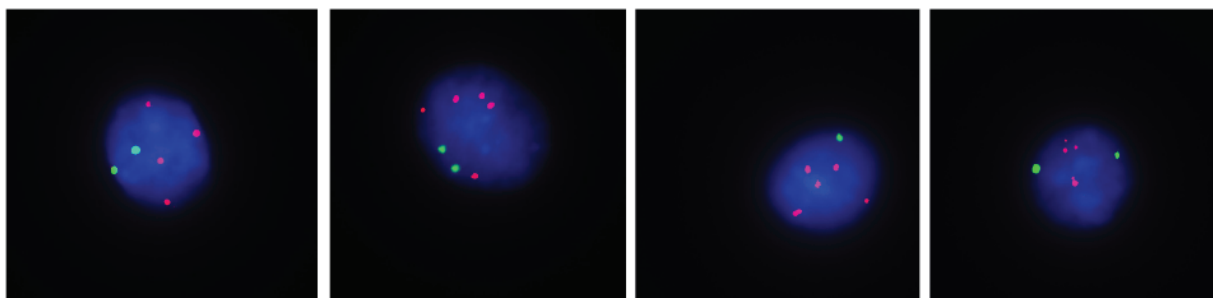
Sonde	Anzahl der analysierten Zellen	Signale/Zelle Minimum	Signale/Zelle Maximum	Summe der Signale	Mittelwert Signale/Zelle	Standardabweichung
<b>Primärtumor</b>						
8q24	100	1	16	558	5,58	2,25
Zentromer 7	100	0	4	206	2,06	0,83
Verhältnis 8q24/Zent. 7*	97	0,3	8,0	278,5	2,9	1,33
<b>Milzmetastase</b>						
8q24	100	1	14	536	5,36	2,34
Zentromer 7	100	0	5	282	2,82	1,28
Verhältnis 8q24/Zent. 7*	93	0,3	9,0	193,1	2,1	1,43
<b>Lebermetastase</b>						
8q24	100	0	13	582	5,82	2,05
Zentromer 7	100	0	4	248	2,48	0,86
Verhältnis 8q24/Zent. 7*	94	0,0	13	234,8	2,4	1,04

Anhand von FISH-Analysen für den Chromosomenbereich 3q26 an CTCs wurde gezeigt, dass der größere Anteil (ca. 75%) der Zytokeratin (CK 7/18) positiven CTCs der Patientin H071 keinen chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26 hatte (siehe Abbildung 4.36 B). Die übrigen Zytokeratin positiven CTCs hatten einen Zugewinn für den Chromosomenbereich 3q26 (siehe Abbildung 4.36 A). Wie bereits in vorherigen Proben, konnten auch in der Blutprobe H071Q zusätzlich Zellen identifiziert werden, die nicht immunzytochemisch positiv waren, aber einen Zugewinn für den Bereich 3q26 hatten (siehe Abbildung 4.36 C und D).



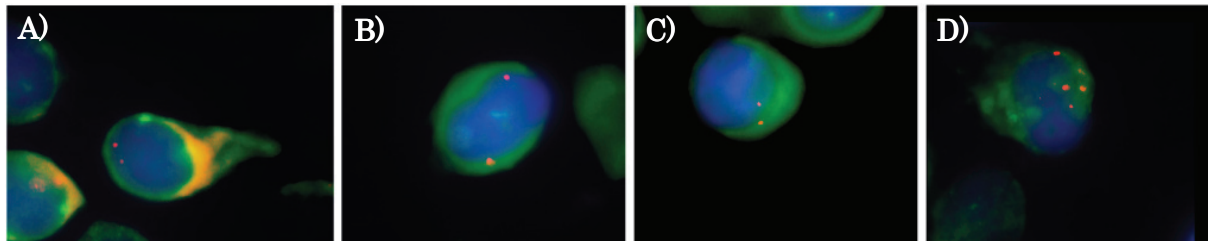
**Abbildung 4.36: FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q. A und B:** Immunzytochemisch positive (Zytokeratin-Färbung) CTC mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 3q26 (**A**) und ohne einen Zugewinn (**B**). Rote Signale: Sonde 3q26, grün: immunzytologische Färbung (Zytokeratin), **C und D:** immunzytochemisch negative (Zytokeratin-Färbung) CTC mit einem Zugewinn für den Bereich 3q26. Rote Signale: Sonde 3q26, grüne Signale: Zentromer Sonde 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.

Weiterhin wurden die CTCs durch FISH-Analysen für den Bereich 8q24 untersucht. Die Auswertung der FISH-Signale der immunzytochemisch durch anti-Zytokeratin Antikörper (CK 7/18) detektierten Zellen war größtenteils (etwa 90 % der positiv gefärbten Zellen) aufgrund der Überlagerung des intensiven Signals nicht möglich. Daher kann für diese Zellen nur bedingt eine Aussage bezüglich des chromosomalen Zugewinns für 8q24 gemacht werden. Die FISH-Analyse der CTCs für den Chromosomenbereich 8q24 zeigte, dass einige der immunzytochemisch durch anti-Zytokeratin Antikörper detektierten CTCs keinen chromosomalen Zugewinn für 8q24 hatten (etwa 50 %). Zusätzlich konnten auch einige (etwa 50 %) immunzytochemisch gefärbte Zellen mit DNA Zugewinn für 8q24 identifiziert werden. Durch die FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 8q24 an CTCs der Probe H071Q wurden auch Zellen mit einem chromosomalen Zugewinn für 8q24 identifiziert, die nicht immunzytochemisch positiv waren (siehe Abbildung 4.37). Somit konnten sowohl für den Chromosomenbereich 3q26 als auch für den Bereich 8q24 Zellen mit einem chromosomalen Zugewinn identifiziert werden, die nicht immunzytochemisch detektiert wurden.



**Abbildung 4.37: FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 8q24 an CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q.** Rote Signale: Sonde 8q24, grüne Signale: Zentromer Sonde 7 (Referenzbereich). Vergrößerung 1000 x.

Es wurde darüber hinaus eine FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an Asziteszellen durchgeführt. Zur Identifizierung der vom Tumor stammenden Zellen wurde vor der FISH-Analyse eine immunzytochemische Färbung gegen Zytokeratin (CK 7/18) durchgeführt. Die Qualität der FISH-Analyse war aufgrund der Eigenfluoreszenz der Asziteszellen nicht optimal, was die Auswertung erschwerte.

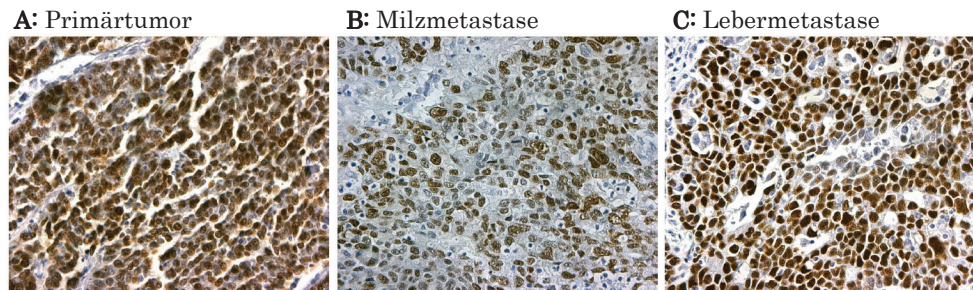


**Abbildung 4.38:** FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an aus Aszites isolierten Zytokeratin exprimierenden Zellen der Patientin H071. **A, B, C:** Zytokeratin positive Zellen ohne chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26; **D:** Zytokeratin positive Zelle mit chromosomalem Zugewinn für den Bereich 3q26. Rote Signale: Sonde 3q26. Vergrößerung 1000 x.

Es konnte aber gezeigt werden, dass auch einige Zytokeratin (CK 7/18) positive Asziteszellen keinen chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26 hatten. Zusätzlich konnten aber auch Zellen identifiziert werden, die einen chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26 hatten (siehe Abbildung 4.38 D).

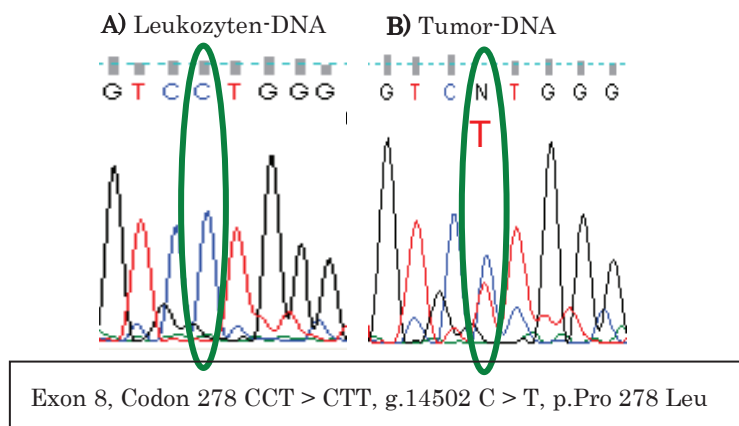
#### 4.9.4 Nachweis einer tumorspezifischen Mutation des *p53*-Gens aus genomischer DNA der Blutprobe H071Q

Etwa 50 % aller Ovarialkarzinome überexprimieren den Tumorsuppressor p53 und ungefähr 45 % der Ovarialkarzinome weisen Mutationen im *p53*-Gen auf (Kmet *et al.*, 2003). Anhand von immunhistochemischen Färbungen für den Tumorsuppressor p53 (siehe Kapitel 3.3.4.4) an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors und der Metastasen der Patientin H071 wurde gezeigt, dass die Tumore stark positiv für p53 sind (siehe Abbildung 4.39).



**Abbildung 4.39:** Immunhistologische p53-Färbung an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors (A), der Milz (B)- und Lebermetastase (C) der Patientin H071. Vergrößerung 400 x.

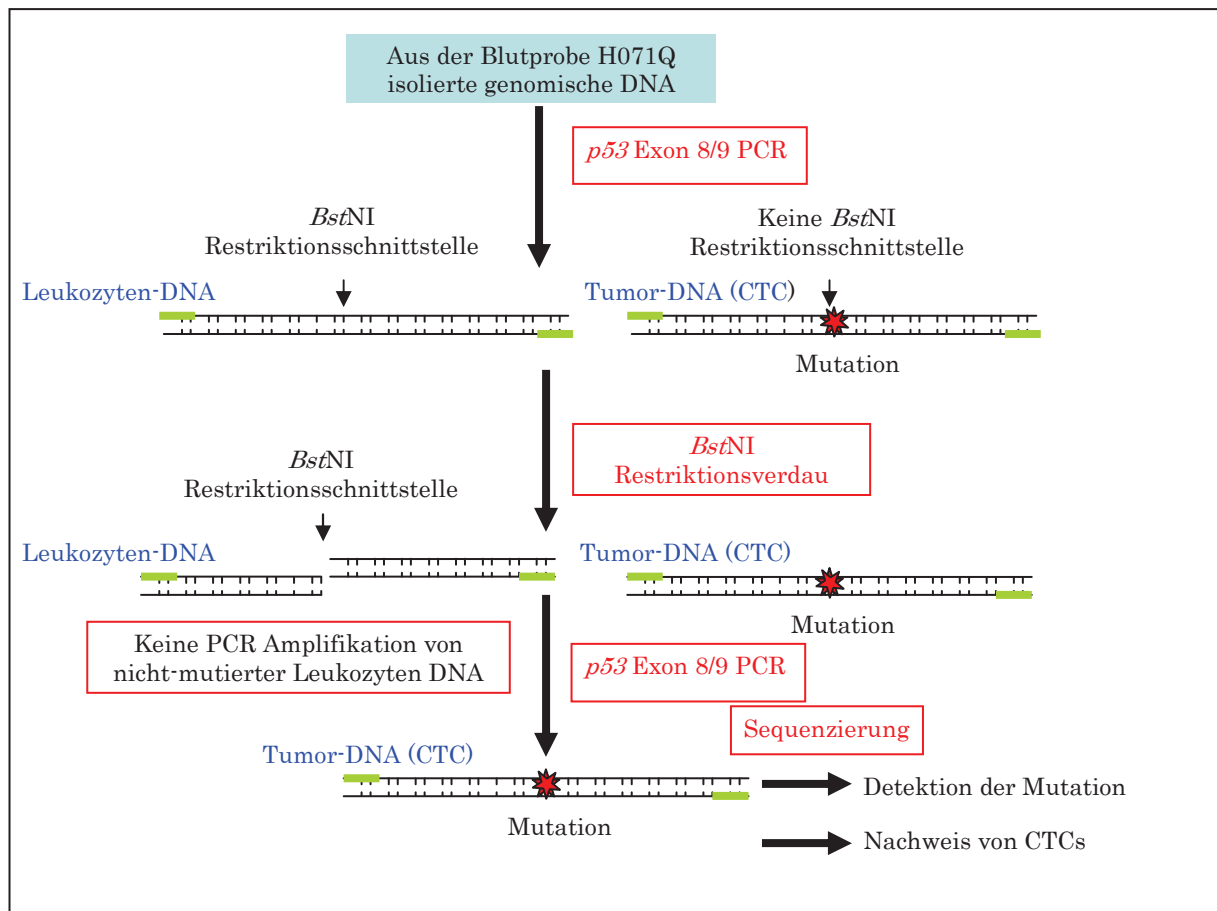
Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das *p53*-Gen mutiert sein könnte, was zu einer Überexpression des Proteins führt. Somit wurde die genomische Tumor-DNA und als Referenz genomische Leukozyten-DNA für Bereiche des *p53*-Gens sequenziert (Exon 5/6, Exon 7, Exon 8/9), welche häufig Mutationen aufweisen. Es konnte eine Mutation im *p53*-Gen im Exon 8 identifiziert werden (siehe Abbildung 4.40). Das Ergebnis der Sequenzierung wurde durch den Projektpartner der OVCAD-Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dan Castillo-Tong (Medizinische Universität Wien, Österreich) bestätigt. Die Mutation ist ein Austausch der Base Cytosin gegen Thymin und führt zum Austausch der Aminosäure Prolin zu Leucin.



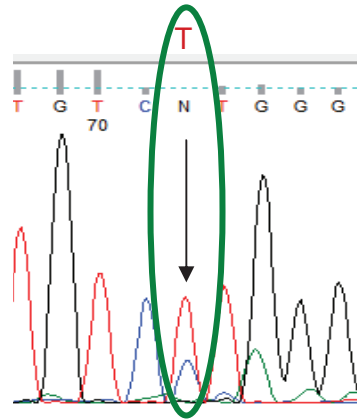
**Abbildung 4.40:** Identifizierung einer Mutation im *p53*-Gen des Exons 8 durch Sequenzierung. A) Sequenzierung der genomischen DNA von Leukozyten (Normal-DNA); B) Sequenzierung der genomischen DNA des Primärtumors. Identifizierung einer Mutation im Exon 8 des *p53*-Gens. Austausch von Cytosin gegen Thymin.

Um einen zusätzlichen Nachweis zu liefern, dass die detektierten CTCs vom Tumor abstammen, wurde eine Strategie entwickelt, diese spezifische Mutation aus genomischer DNA der Blutprobe H071Q nachzuweisen. Dadurch sollte der indirekte Nachweis erbracht werden, dass sich im Blut Zellen befanden, die vom Tumor abstammten und somit CTCs waren. Da in der Blutprobe die Anzahl an Leukozyten

deutlich höher war als die Anzahl an CTCs, musste die mutierte vom Tumor stammende CTC-DNA vor der Sequenzierung angereichert werden. Dieses wurde mit Hilfe einer Restriktionsspaltung durch das Enzym *Bst*NI durchgeführt. Dieses Restriktionsenzym spaltet nicht-mutierte Leukozyten-DNA, während mutierte Tumor-DNA nicht gespalten wird. In Abbildung 4.41 ist eine Übersicht zur Strategie zum Nachweis der tumorspezifischen Mutation des *p53*-Gens aus der Blutprobe H071Q dargestellt.



**Abbildung 4.41: Übersicht der Strategie zum Nachweis einer tumorspezifischen Mutation im *p53*-Gen aus genomischer DNA der Blutprobe H071Q.** Aus der Blutprobe H071Q wurde genomische DNA isoliert und das Exon 8/9 des *p53*-Gens durch PCR amplifiziert. Mittels Restriktionsspaltung durch das Enzym *Bst*NI wurde nicht-mutierte Leukozyten-DNA gespalten, während die mutierte DNA-Sequenz der CTCs nicht gespalten wurde. Die gespaltene nicht-mutierte Leukozyten-DNA konnte in einer folgenden PCR des Exon 8/9 des *p53*-Gens nicht mehr amplifiziert werden. Somit wurde die mutierte *p53*-DNA der CTCs amplifiziert und die Mutation konnte anschließend durch Sequenzierung detektiert werden. Dadurch konnten indirekt CTCs nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.42: Detektion der tumorspezifischen Mutation im *p53*-Gen des Exons 8 aus genomischer DNA der Blutprobe H071Q durch Sequenzierung.** Durch die Identifizierung der tumorspezifischen Mutation (Austausch eines Cytosin gegen Thymin) konnten indirekt CTCs der Blutprobe H071Q nachgewiesen werden.

Es wurde aus der Blutprobe H071Q genomische DNA isoliert (siehe Kapitel 3.5.1) und anschließend durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) das Exon 8/9 des *p53*-Gens amplifiziert (siehe Kapitel 3.5.3). Das Produkt dieser PCR sollte ein Gemisch des Amplifikats vom *p53*-Gen des Exons 8/9 aus nicht-mutierter Leukozyten DNA und mutierter DNA der CTCs sein. Mittels Restriktionsspaltung durch das Enzym *Bst*NI (siehe Kapitel 3.5.5) wurde nun das nicht-mutierte von Leukozyten stammende Amplifikat gespalten, das mutierte Amplifikat, das von den CTCs abstammt, hingegen nicht. Durch eine folgende Amplifikation des *p53*-Gens Exon 8/9 wurde das nicht-mutierte Amplifikat der Leukozyten nicht mehr amplifiziert. Somit erzielte man eine Anreicherung der mutierten Amplifikate der CTCs, die die tumorspezifische Mutation enthalten sollten. Die Detektion der Mutation wurde anschließend durch Sequenzierung bestimmt (siehe Kapitel 3.5.6 und siehe Abbildung 4.42). Durch die Detektion der tumorspezifischen Mutation aus genomischer DNA der Blutprobe der Patientin H071 konnte somit ein zusätzlicher Nachweis erbracht werden, dass sich im Blut Zellen befanden, die vom Tumor abstammten.



## 5 Diskussion

Eierstockkrebs ist die fünft häufigste Krebstodesursache und die häufigste Todesursache bei gynäkologischen Malignomen. Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Ovarialkarzinome erst in späten Krankheitsstadien diagnostiziert werden und mehr als die Hälfte der Erkrankten ein Rezidiv bekommen, liegt die Fünfjahres-Überlebensrate bei lediglich 35 % (Martin und Schilder, 2009). Daher existiert ein großer klinischer Bedarf an neuen therapeutischen Strategien. Die Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) könnte zur Identifikation von therapeutisch relevanten Zielen führen und eine individualisierte Therapie ermöglichen. Traditionell hat man bislang angenommen, dass sich Ovarialkarzinome hauptsächlich durch direkte Ausbreitung in der Bauchhöhle ausbreiten (Naora und Montell, 2005). Dennoch konnten einige Studien das Vorhandensein von CTCs im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen nachweisen (siehe Tabelle 5.1) (Marth *et al.*, 2002; Judson *et al.*, 2003; Wimberger *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008; Ntouroupi *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2009; Wimberger *et al.*, 2009; Aktas *et al.*, 2011; Poveda *et al.*, 2011). Die klinische Relevanz der CTCs ist bis zum heutigen Zeitpunkt bei Ovarialkarzinompatientinnen noch nicht vollständig geklärt. Die wichtigsten Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom sind das FIGO-Stadium der Erkrankung und der postoperative Tumorrest (du Bois *et al.*, 2009). Es existiert bislang dennoch keine Möglichkeit, Patientinnen, die eine besonders aggressive Tumorerkrankung haben und nicht von der Therapie profitieren, zum Zeitpunkt der Diagnose zu identifizieren. Aufgrund dieser Problematik gibt es einen Bedarf an prognostischen Parametern, die Aussagen über die Aggressivität, das Therapieansprechen und das Metastasierungspotential des Ovarialkarzinoms erlauben. Die Detektion und Charakterisierung der CTCs könnte hierbei einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis leisten. Weiterhin könnte der CTC Nachweis das Potential besitzen, als Indikator für minimale residuale Krebserkrankung ein Wiederauftreten der Erkrankung (Rezidiv) frühzeitig zu diagnostizieren, wodurch die Möglichkeit entsteht, zeitig eingreifen zu können, wenn die Standardtherapie versagt. Außerdem könnten durch die Charakterisierung der CTCs prognostische und therapeutisch relevante Eigenschaften identifiziert und das Wissen über die Biologie der Tumorzell-disseminierung beim Ovarialkarzinom erhöht werden.



### ***5.1 Bedeutung der hämatogenen Disseminierung beim Ovarialkarzinom***

Die meisten Ovarialkarzinompatientinnen versterben aufgrund des lokoregionären Tumorwachstums im Peritoneum, während hämatogene Metastasen beim Ovarialkarzinom klinisch selten auftreten. Dennoch wurden in Obduktionsstudien hämatogene Metastasen in einer hohen Frequenz in Organen wie Leber, Lunge und Knochen nachgewiesen (Dauplat *et al.*, 1987; Abdul-Karim *et al.*, 1990; Braun *et al.*, 2001). In der Arbeit von Güth *et al.* wurden 233 Ovarialkarzinompatientinnen *post mortem* obduziert und bei 66,3 % der Patientinnen wurden distante Metastasen außerhalb der Bauchhöhle gefunden (Guth *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine hämatogene Disseminierung beim Ovarialkarzinom häufiger vorkommt, als aus den klinischen Verläufen der Erkrankung geschlossen werden kann. Gegensätzliche Ergebnisse hierzu ergab eine Studie von Tarin *et al.*, in der 15 an Ovarialkarzinom verstorbene Patientinnen auf das Vorhandensein von Fernmetastasen obduziert wurden. Diesen inoperablen Patientinnen wurden zur Erleichterung der Aszitesbeschwerden ein peritoneovenöser *Shunt* gelegt (Tarin *et al.*, 1984). Dabei handelt es sich um eine künstliche Verbindung zwischen der Bauchhöhle (Peritonealhöhle) und dem zentralen Venensystem. Somit gelangten maligne Zellen der Aszitesflüssigkeit direkt ins Blutsystem. Die Obduktionen ergaben, dass überraschenderweise nur sieben dieser Patientinnen Fernmetastasen aufwiesen, welche klinisch sogar asymptomatisch waren (Tarin *et al.*, 1984). Diese Daten legen nahe, dass Tumorzellen in der Blutzirkulation nicht notwendigerweise zur Bildung von Fernmetastasen führen und falls diese vorhanden sind, nicht zwingend von klinischer Relevanz sein müssen. Daher kann vermutet werden, dass die Ovarialkarzinompatientinnen aufgrund des massiven und aggressiven Tumorgeschehens im Peritoneum versterben, bevor Fernmetastasen klinisch auftreten können. Allerdings ist es denkbar, dass zukünftig durch eine verbesserte Chemotherapie, welche die intraperitoneale Progression inhibiert, die Problematik der Fernmetastasierung beim Ovarialkarzinom zunimmt. Weiterhin könnten die Ergebnisse der Studie den Schluss zulassen, dass maligne Zellen des Ovarialkarzinoms in der Zirkulation nicht die Fähigkeit besitzen, Fernmetastasen zu bilden. Somit wären diese Zellen ein Indikator für das Tumorgeschehen, aber keine Vorläufer von Metastasen. Neueste Studien beschreiben bei Krebserkrankungen einen Prozess, der „*tumor self-seeding*“ genannt wird (Leung und Brugge, 2009; Aguirre-Ghiso, 2010). Die Studien zeigten, dass CTCs wieder in den Primärtumor zurück infiltrieren und somit die Tumorprogression fördern können (Kim

*et al.*, 2009). Es wäre denkbar, dass der Prozess des „*tumor self-seeding*“ auch beim Ovarialkarzinom eine bedeutende Rolle spielt.

## **5.2 Diskussion der Methoden zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen**

Aufgrund der geringen Anzahl von CTCs in einem hohen Hintergrund von Blutzellen (etwa 1 CTC auf  $10^7$  Leukozyten) sind die Isolierung und der Nachweis von CTCs eine methodische Herausforderung (Paterlini-Brechot und Benali, 2007). Eine ideale Methode erfordert zum einen eine hohe Sensitivität und sollte daher in der Lage sein, jede einzelne CTC zu erfassen. Weiterhin muss die Methode spezifisch sein und keine falschen positiven Ergebnisse bei gesunden Blutspendern ergeben. Der Detektionsmarker muss also ausschließlich von den CTCs exprimiert werden und nicht von Leukozyten oder anderen zirkulierenden nicht vom Tumor stammenden Zellen (Gerges *et al.*, 2010). Außerdem liefert eine brauchbare Methode reproduzierbare Ergebnisse und ist ökonomisch (Attard und de Bono, 2011). Die Wahl von geeigneten Markern ist für die Nachweismethode der CTCs von entscheidender Bedeutung. Bislang existiert kein allgemeiner tumorzellspezifischer Marker zum *Screening* von CTCs. Aufgrund ihrer Heterogenität und Plastizität ist ein Nachweis von Subpopulationen der CTCs, die ihre epithelialen Eigenschaften verloren haben, problematisch (Riethdorf und Pantel, 2010).

### **5.2.1 Ursprüngliches, zweistufiges Protokoll mit EpCAM und Zytokeratin als Detektionsmarker**

Nach dem ursprünglichen, zweistufigen Protokoll zur Detektion von CTCs wurde das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (*epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM) als Anreicherungsmarker und Zytokeratin (CK 5/7/8/18) als Detektionsmarker verwendet (siehe Kapitel 4.1). EpCAM ist ein häufig verwendeter, gut etablierter Anreicherungsmarker. Es handelt sich hierbei um ein glykosyliertes Membranprotein, welches von den meisten Tumoren epithelialen Ursprungs einschließlich des Ovarialkarzinoms überexprimiert wird (Balzar *et al.*, 1999; Heinzelmann-Schwarz *et al.*, 2004; Spizzo *et al.*, 2006), während die Expression bei Leukozyten fehlt (Maheswaran und Haber, 2010). Zur Detektion von CTCs werden häufig Antikörper, die sich gegen Zytokeratin richten, verwendet. Zytokeratine werden von allen Epithelzellen gebildet

und machen als Intermediärfilamente den größten Teil des Zytoskeletts aus. Es werden zwei Arten von Zytokeratinen unterschieden, der saure Typ I und der basische Typ II, die Heterodimere miteinander bilden (Moll und Franke, 1982). Zytokeratine werden nicht von hämatopoetischen Zellen gebildet und eignen sich daher zum Nachweis von epithelialen Zellen im Blutsystem. Zusätzlich wurden Leukozyten durch Antikörper, die den Leukozytenmarker CD45 (*cluster of differentiation 45*) binden, identifiziert. Die in dieser Arbeit verwendete Dichtegradientenzentrifugation wurde von Griwatz *et al.* entwickelt. Der Gradient trennt die zellulären Bestandteile des Blutes auf, wobei sich die möglicherweise vorhandenen CTCs in der separaten Monozytenphase befinden. Der Gradient erreicht eine 20-fache Anreicherung der CTCs, und die Wiederfindungsrate beträgt zwischen 70-90 % (Griwatz *et al.*, 1995). Nach Etablierung der Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation wurde eine Wiederfindungsrate von etwa 80 % der „gespikten“ Tumorzellen erreicht (siehe Kapitel 4.1.1), welches in etwa der Wiederfindungsrate von Griwatz *et al.* entsprach. Somit zeigte sich, dass diese Dichtegradientenzentrifugation eine geeignete Methode zur Anreicherung von CTCs aus Blutproben darstellt. Zur weiteren Anreicherung wurde eine immunmagnetische Zellseparation mit Hilfe des *CellSearch™ Profile Kits* unter Verwendung des *CellTracks® AutoPrep Systems* durchgeführt. Das Veridex System ist FDA (*Food and Drug Administration*) verifiziert und garantiert durch die weitestgehend automatisierte Aufarbeitung eine standardisierte und optimierte Isolierung von CTCs. In zahlreichen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die CTC Detektion mit Hilfe dieses Systems klinisch hilfreiche Informationen bezüglich der Prognose von Patienten mit metastasiertem Brust-, Dickdarm- und Prostatakrebs liefert (Cristofanilli, 2006; Riethdorf *et al.*, 2007; Pierga *et al.*, 2008). Somit eignet sich dieses System hervorragend zum Nachweis von EpCAM und Zytokeratin exprimierenden Zellen. In dieser Arbeit wurde abweichend das *Profile Kit* verwendet, welches im Gegensatz zum *Epithelial Cell Kit* nicht die immunzytochemische Färbung innerhalb des Systems durchführt. Der Vorteil einer separaten Durchführung der Färbung liegt darin, dass die Zellen für weiterführende Analysen zugänglich sind und die Möglichkeit existiert, die Detektionsfärbung zu variieren. Nachteilig ist, dass durch die separate Färbung ein weiterer Zellverlust nicht ausgeschlossen werden kann. Nach der Durchführung der gesamten Anreicherungs-methode, bestehend aus Dichtegradientenzentrifugation, immunmagnetischer Zellseparation und immunzytochemischer Detektion, konnten etwa 60 % der Karzinomzellen detektiert werden. Durch die Kombination zweier Anreicherungs-methoden ist der Verlust an CTCs zwar größer als in einem einstufigen

Verfahren, die zweistufige Methode erlaubt es aber, ein großes Blutvolumen zu analysieren. Somit zeigte sich, dass diese Methode geeignet ist, seltene EpCAM und Zytokeratin exprimierende Tumorzellen im Blut zu detektieren.

### **5.2.2 Modifiziertes einstufiges Protokoll zur Detektion von CTCs durch Verwendung eines Antikörpercocktails**

Das modifizierte, einstufige Protokoll verzichtete auf eine EpCAM basierte Anreicherung (siehe Kapitel 4.6). Somit konnten durch dieses Protokoll auch Zellen nachgewiesen werden, die EpCAM nicht aufwiesen. So wurden ebenso Zellen detektiert, die mindestens eines der Epitope des verwendeten Antikörpercocktails exprimierten. Zur Identifizierung der CTCs wurde zusätzlich zu den gegen Zytokeratin (CK 5/7/8/18) gerichteten Antikörpern, Antikörper, die EpCAM, den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER-2), das epitheliale Membranantigen (EMA) und den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) binden, verwendet.

HER-2 und EGFR sind Rezeptortyrosinkinasen, die für die Entstehung von Krebserkrankungen von großer Bedeutung sind. Da diese häufig in Tumoren überexprimiert werden, eignen sie sich zur Detektion von CTCs. Bei Brustkrebs ist eine Überexpression von HER-2 mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und schlechter Prognose assoziiert (Slamon *et al.*, 1987), der bei Ovarialkrebs noch nicht eindeutig belegt werden konnte (Lafky *et al.*, 2008). Die publizierten Daten variieren stark bezüglich des Prozentsatzes der HER-2 Expression beim Ovarialkarzinom (0 bis 100 %) (Felip *et al.*, 1995; Lafky *et al.*, 2008). Somit ist es schwer, diesbezüglich eine Aussage zu treffen. Der Mittelwert der Studien deutet allerdings an, dass 40 % aller Ovarialkarzinome HER-2 exprimieren. Auch die Daten verschiedener Arbeiten, die den Prozentsatz von EGFR exprimierenden Ovarialkarzinomen analysierten, variieren stark zwischen 4 und 100 % (Mittelwert aller Studien 48 %) (Lafky *et al.*, 2008). Das epitheliale Membranantigen (EMA) repräsentiert eine Familie hochmolekularer, stark glykosylierter Glykoproteine, die ursprünglich aus Milchfettkugelchenmembranen isoliert wurden. Es ist ein sehr sensibler Marker für die meisten Karzinomarten, inklusive dem Ovarialkarzinom. Da etwa 90 % aller malignen Ovarialtumore positiv für EMA sind (Fujimoto *et al.*, 1990; Feng *et al.*, 2002), eignet sich auch dieser Marker zum Nachweis von CTCs.

Durch die Verwendung mehrerer Antikörper erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit, CTCs nachzuweisen, falls diese einige Marker nicht exprimierten. Allerdings stieg dadurch auch die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Färbeargebnisse und damit falsch positiver Nachweise. Einige Arbeiten zeigten, dass beispielsweise EMA und Zytokeratin exprimierende Zellen auch vereinzelt bei gesunden Spendern nachweisbar sind (Lambrechts *et al.*, 1998; Leong *et al.*, 2003). Beides sind aber gut etablierte Marker und viele klinische Studien zeigten, dass sowohl der Nachweis Zytokeratin als auch EMA positiver Zellen im Blut oder Knochenmark prognostische Relevanz besitzt (Berger *et al.*, 1988; Mansi *et al.*, 1991; Riethdorf *et al.*, 2007). Um einen spezifischen CTC Nachweis erbringen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Spezifität der Antikörpercocktail-Färbung durch Analysen von Blutproben gesunder Spender überprüft. Es zeigte sich, dass das Antikörpercocktail-Färbeprotokoll an intakten Zellen eine sehr spezifische und sensitive Methode darstellt, um CTCs zu detektieren (siehe Kapitel 4.6.1). Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Expression der Markerproteine sowie verschiedene Studien deuten darauf hin, dass CTCs die Protein-Expression verschiedener epithelialer Marker verlieren können (Hou *et al.*, 2011; Lecharpentier *et al.*, 2011). Daher scheint der Nachweis der CTCs durch Antikörper, die verschiedene Epitope unterschiedlicher Proteine binden, sinnvoll und notwendig zu sein.

### ***5.3 Diskussion der Detektionsrate von CTCs im peripheren Blut beim Ovarialkarzinom***

Nach dem ursprünglichen, zweistufigen Detektionsprotokoll wurden in 16,3 % (8 von 49) der Blutproben von Patientinnen mit rezidivierter Erkrankung des Ovarialkarzinoms CTCs nachgewiesen (siehe Kapitel 4.2). Bei den Patientinnen der EU Studie OVCAD (*Ovarian Cancer Diagnosis*) mit primärem Ovarialkarzinom wurden in 3,6 % (5 von 139) der Blutproben, die zum Zeitpunkt der Operation abgenommen wurden (Zeitpunkt Q), CTCs nachgewiesen. In den Blutproben sechs Monate nach Therapie (Zeitpunkt H) konnten dagegen in keiner von 53 Blutproben CTCs detektiert werden (siehe Kapitel 4.3.1). Da bis zum heutigen Zeitpunkt wenige Publikationen zur Detektion von CTCs im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen existieren (Marth *et al.*, 2002; Judson *et al.*, 2003; Wimberger *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008; Ntouroupi *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2009; Wimberger *et al.*, 2009; Aktas *et al.*, 2011; Poveda *et al.*, 2011), konnte die erwartete Detektionsrate nur abgeschätzt werden. Einen Überblick der wichtigsten Studien zur Detektion von CTCs beim Ovarialkarzinom ist in Tabelle 5.1 dargestellt. Zu

berücksichtigen ist, dass die Ergebnisse der Literatur nicht gänzlich vergleichbar sind, da Blutproben von anderen Patientenkollektiven und durch Verwendung verschiedener Methoden analysiert wurden. Poveda *et al.* analysierten von 216 Patientinnen mit rezidivierten Ovarialkarzinom Blutproben (10 ml) unter Verwendung des *CellSearch™* Systems. Als CTCs wurden in dieser Studie EpCAM und Zytokeratin positive sowie CD45 negative Zellen definiert, was den Kriterien für CTCs dieser Arbeit nach der Aufarbeitung des ursprünglichen, zweistufigen Protokolls entspricht. Poveda *et al.* konnten in 14,4 % der Proben zwei oder mehr CTCs nachweisen. Bei rezidivierten Ovarialkarzinom Patientinnen wurden in dieser Arbeit in 16,3 % der Proben CTCs detektiert. Unter Berücksichtigung, dass in dieser Arbeit im Vergleich das durchschnittlich analysierte Blutvolumen von 15-30 ml höher und die Aufarbeitung der Blutproben nicht identisch war, stimmte der Wert der Detektionsrate annähernd überein und bestätigte die Ergebnisse dieser Arbeit.

Aktas *et al.* wiesen die CTCs durch den Adna-Test nach, mittels Nachweis von EpCAM, MUC-1 (Mucin 1, entspricht EMA) und HER-2 Transkripten. In einer weiteren RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) wurde das Transkript von CA 125 (*Cancer-Antigen 125*) bestimmt. In der Studie von Aktas *et al.* wurden sowohl Blutproben, die vor der Operation (86 Proben) als auch nach der Therapie (70 Proben) entnommen wurden, analysiert. Bei 19 % der Blutproben zum Zeitpunkt der Operation konnten CTCs detektiert werden. Davon exprimierten jeweils 31 % EpCAM, 50 % MUC-1, 31 % HER-2 und 50 % CA 125. Nach der Therapie konnten in 27 % der Proben CTCs nachgewiesen werden, wobei 68 % EpCAM, 47 % MUC-1, 21 % HER-2 und 37 % CA 125 exprimierten (Aktas *et al.*, 2011). Diese Daten zeigen, dass die CTCs bezüglich der Expression dieser Marker heterogen sind. Zum Zeitpunkt der Operation exprimierten von den 19 % CTC positiver Proben nur 31 % EpCAM. Wäre nur EpCAM als Detektionsmarker zum Nachweis von CTCs verwendet worden, hätte die Detektionsrate somit nur 6 % betragen. Dieses Resultat passt zu dem Ergebnis, dass durch Verwendung des ursprünglichen Protokolls in dieser Arbeit in nur 3,6 % der Proben CTCs detektiert werden konnten, da nach diesem Protokoll nur Zellen detektiert wurden, die sowohl EpCAM als auch Zytokeratin (CK 5/7/8/18) exprimierten. Diese Ergebnisse stützen die Notwendigkeit der Verwendung von weiteren Markern zum CTC Nachweis beim Ovarialkarzinom.

Nach dem modifizierten, einstufigen Protokoll erhöhte sich die Detektionsrate der Proben des Zeitpunktes Q auf 26,3 % (30 von 112 Proben) und der Proben des Zeitpunktes H auf 7,6 % (6 von 79 Proben) (siehe Kapitel 4.6.2). Wie in Tabelle 5.1



dargestellt, variieren die Literaturangaben hinsichtlich der CTC positiver Detektionsraten zwischen 7 bis 100 % (Marth *et al.*, 2002; Judson *et al.*, 2003; Wimberger *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008; Ntouroupi *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2009; Wimberger *et al.*, 2009; Aktas *et al.*, 2011; Poveda *et al.*, 2011). Die große Variation der Ergebnisse lässt sich anhand unterschiedlicher Methoden und verschiedener Patientenkollektiven erklären. Die in dieser Arbeit nach dem modifizierten, einstufigen Protokoll erreichten Detektionsraten von 26,3 % (Zeitpunkt Q) und 7,6 % (Zeitpunkt H) liegen im Bereich der erwarteten Werte, verglichen mit Arbeiten von Judson *et al.* und Wimberger *et al.*, die ähnliche Nachweismethoden anwandten (Judson *et al.*, 2003; Wimberger *et al.*, 2007). Wimberger *et al.* detektierten CTCs in 21 % von 57 vor Chemotherapie entnommenen Blutproben sowie in 7 % von 45 nach Chemotherapie entnommenen Blutproben. Die CTCs wurden durch *LymphoPrep<sup>TM</sup>* angereichert und mittels anti-Zytokeratin Antikörper (A45-BB-3, CK 7/18) detektiert (Wimberger *et al.*, 2007). Judson *et al.* analysierten Blut von 91 Ovarialkarzinompatientinnen durch die Verwendung eines immunzytochemischen Anreicherungs-*Assays*. Sie detektierten durch anti-Zytokeratin und anti-EGFR Antikörper in 19 % der Proben CTCs (Judson *et al.*, 2003).

**Tabelle 5.1: Überblick der wichtigsten Arbeiten zum Nachweis von CTCs beim Ovarialkarzinom.**  
(CK: Zytokeratin, ICC: Immunzytochemie, RT-PCR: Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion)

Literatur	Methode	Marker	analysiertes Blutvolumen [ml]	Detektionsrate
(Marth <i>et al.</i> , 2002)	ICC	EpCAM	40 (nach der Operation entnommen)	11/90 (12 %)
(Judson <i>et al.</i> , 2003)	ICC	CK 8/18 oder EGFR	30 (vor der Operation entnommen)	12/64 (19 %)
(Wimberger <i>et al.</i> , 2007)	ICC	Pan-CK	20-25 (vor der Operation entnommen)	12/57 (21 %)
	ICC	Pan-CK	20-25 (3 Monate nach Chemotherapie entnommen)	3/45 (7 %)
(Ntouroupi <i>et al.</i> , 2008)	ICC	EpCAM oder CK 7/8	4-14 (nach Biopsie und vor Operation entnommen)	4/4 (100 %)
(He <i>et al.</i> , 2008)	Ligand/Rezeptor Bindung	Folatrezeptor	8	18 / 20 (90 %)
(Fan <i>et al.</i> , 2009)	Invasionsassay	EpCAM, ESA, Pan-CK	5-20 (vor der Operation entnommen)	43/71 (61 %)
(Wimberger <i>et al.</i> , 2009)	ICC	Pan-CK	20-25 (vor der Operation entnommen)	8/14 (57 %)
	ICC	Pan-CK	20-25 (2 Monate nach der Therapie)	5 / 12 (42 %)
(Poveda <i>et al.</i> , 2011)	ICC	EpCAM und Pan-CK	10 (rezidierte Patienten)	31/216 (14%)
(Aktas <i>et al.</i> , 2011)	RT-PCR	EpCAM, EMA, HER-2, CA 125	10 (vor der Operation entnommen)	16/86 (19 %)
	RT-PCR	EpCAM, EMA, HER-2, CA 125	10 (4-6 Monate nach der Therapie)	19/70 (27 %)



#### ***5.4 Prognostische Bedeutung von CTCs im peripheren Blut beim Ovarialkarzinom***

In dieser Arbeit wurden nach dem ursprünglichen, zweistufigen Detektionsprotokoll in 3,6 % der Blutproben, die zum Zeitpunkt der Operation entnommen wurden (Zeitpunkt Q), CTCs nachgewiesen, während in den Blutproben sechs Monate nach Therapie (Zeitpunkt H) in keiner Blutprobe CTCs detektiert wurden. Für den Zeitpunkt Q konnten keine signifikanten Unterschiede von klinischen Parametern zwischen dem CTC-Status positiv und negativ bewerteter Patientengruppen festgestellt werden (siehe Tabelle 4.6 und 4.7). Ebenso das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 4.5). Aufgrund der geringen Detektionsraten sind statistische Aussagen diesbezüglich schwer zutreffen. Alle Patientinnen, bei denen CTCs nachgewiesen wurden, hatten einen serösen Tumor und das Tumorstadium pT3c. Das bedeutet, dass bei allen Patientinnen, in deren Blutproben CTCs detektiert wurden, der Tumor weit fortgeschritten war und Peritonealmetastasen jenseits des Beckens vorhanden waren.

Nach dem modifizierten, einstufigen Protokoll erhöhten sich die Detektionsraten der Proben des Zeitpunktes Q auf 26,3 % und der Proben des Zeitpunktes H auf 7,6 %. Die höheren Detektionsraten des modifizierten Protokolls erlauben eher eine statistische Aussage. Die beiden Patientengruppen CTC-Status positiv und negativ wurden bezüglich klinischer Daten und Therapieansprechen verglichen (siehe Tabelle 4.14 und 4.15). Es konnte gezeigt werden, dass die Patientinnen, bei denen zum Zeitpunkt der Operation CTCs nachgewiesen wurden, signifikant (p-Wert: 0,006) häufiger Fernmetastasen bei Diagnosestellung hatten, als die CTC negativ bewertete Patientengruppe. Dieses Ergebnis zeigte, dass das Vorhandensein von CTCs mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen korrelierte und stützt somit die klinische Relevanz der CTCs für die Fernmetastasierung des Ovarialkarzinoms.

Da zum Zeitpunkt H in nur sechs Proben CTCs detektiert wurden, muss die niedrige Detektionsrate bezüglich der statistischen Aussagekraft berücksichtigt werden. Alle sechs Patientinnen in deren Blut sechs Monate nach Therapie CTCs nachgewiesen wurden, bekamen ein Rezidiv oder verstarben an der Erkrankung, während aus der CTC negativ bewerteten Patientengruppe 37 % kein Rezidiv bekamen und nicht verstarben. Es zeigte sich hier eine Tendenz zwischen den beiden Gruppen, der Unterschied war allerdings nicht signifikant (p-Wert: 0,089). Somit zeigte die Detektion von CTCs nach der Therapie an, dass die Erkrankung wieder aufgetreten war. Allerdings bekamen auch 63 % der Patientinnen der CTC negativ bewerteten

Patientengruppe ein Rezidiv oder verstarben an der Erkrankung. Somit hatte der negative CTC-Status keine bedeutende Aussagekraft über den Krankheitsverlauf, während ein positiver CTC-Status in dieser Studie zu 100 % ein Wiederauftreten der Erkrankung anzeigte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei einem großen Anteil der negativ bewerteten Patientengruppe eventuell CTCs vorhanden waren, die allerdings durch diese Methode nicht nachgewiesen werden konnten. Der fehlende Nachweis könnte an einer geringen CTC-Frequenz liegen oder mit einer eventuell fehlenden Expression der Markerproteine der CTCs erklärt werden, wodurch diese nicht detektierbar sind. Weiterhin ist es auch vorstellbar, dass bei dieser Patientengruppe keine hämatogene Disseminierung stattfand und somit auch keine CTCs nachweisbar waren. Der Ursprung für das Wiederauftreten der Erkrankung kann hier postoperativer Tumorrest sein. Für die Proben des Zeitpunktes H korrelierte der CTC-Status signifikant mit dem Therapieansprechen der Patientinnen (p-Wert: 0,022). Aus der CTC positiven Gruppe sprachen 67 % der Patientinnen nicht auf die Therapie an (*Non-Responder*), während nur 19 % der als CTC negativ bewerteten Gruppe nicht auf die Therapie ansprachen. Durch Kaplan-Meier-Analysen wurde gezeigt, dass der CTC-Status zum Zeitpunkt der Operation (Zeitpunkt Q) keine signifikante, prognostische Aussagekraft bezüglich des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens hatte. Zum Zeitpunkt sechs Monate nach Therapie (Zeitpunkt H) unterschied sich das krankheitsfreie Überleben zwischen den beiden Patientengruppen signifikant (p-Wert: 0,0001) (siehe Abbildung 4.18). Das krankheitsfreie Überleben betrug bei den Patientinnen, bei denen CTCs sechs Monate nach der Therapie detektiert wurden im Durchschnitt 11,9 Monate, bei den Patientinnen, bei denen keine CTCs detektiert wurden dagegen 21,6 Monate. Somit hatte der CTC-Status sechs Monate nach Therapie eine signifikante prognostische Aussagekraft bezüglich des krankheitsfreien Überlebens. Das Gesamtüberleben unterschied sich in dieser Arbeit dagegen nicht signifikant, was aufgrund des relativ kurzen Beobachtungszeitraums (*Follow-up Zeit*) von im Durchschnitt 19 Monaten erklärt werden könnte.

Bislang haben wenige Studien die prognostische Relevanz von CTCs beim Ovarialkarzinom untersucht. Die Studien von Marth *et al.*, Judson *et al.* und Wimberger *et al.* konnten keine signifikanten Unterschiede in den Überlebensanalysen zeigen. (Marth *et al.*, 2002; Judson *et al.*, 2003; Wimberger *et al.*, 2007). Fan *et al.* dagegen zeigten, dass der positive CTC-Status der Patientinnen signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert war (Fan *et al.*, 2009). In der Studie von Aktas *et al.* korrelierte der positive CTC-Status der Patientinnen sowohl vor der Operation als

auch nach Chemotherapie signifikant mit einem kürzeren Gesamtüberleben. Allerdings konnte keine Korrelation mit einem krankheitsfreien Überleben gezeigt werden (Aktas *et al.*, 2011). Die Studie von Poveda *et al.* konnte zeigen, dass der positive CTC-Status bei rezidierten Ovarialkarzinompatientinnen signifikant mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben korrelierte (Poveda *et al.*, 2011). Die Unterschiede der verschiedenen Studien zeigen deutlich, dass die prognostische Relevanz von CTCs beim Ovarialkarzinom noch nicht vollständig geklärt ist. Es scheint hierbei bedeutsam zu sein, durch welche Methodik CTCs detektiert wurden. Somit existiert ein Bedarf, eine Methode zu entwickeln, welche in der Lage ist, klinisch relevante CTCs zu identifizieren. Einige Studien deuten allerdings an, dass obwohl klinisch hämatogene Metastasen beim Ovarialkarzinom selten sind, das Vorhandensein von CTCs ein Indikator für besonders aggressive Karzinome zu sein scheint (Fan *et al.*, 2009; Aktas *et al.*, 2011; Poveda *et al.*, 2011).

### ***5.5 Bedeutung der Detektion von nicht klar einzuordnenden fraglichen Zellen***

Nach dem modifizierten, einstufigen Protokoll wurden in 19,6 % der 112 Proben des Zeitpunktes Q und in 22,8 % der 79 Proben des Zeitpunktes H Zellen identifiziert, die nicht alle Kriterien für CTCs erfüllten (siehe Kapitel 4.6.4, Tabelle 4.16). Die Zellen konnten daher nicht eindeutig als Leukozyten oder CTCs klassifiziert werden und wurden als fragliche Zellen bezeichnet. Dazu gehören zum einen Zellen, die eine atypische Zellmorphologie mit großem Zellkern hatten, aber weder durch den Antikörpercocktail noch durch CD45 (Leukozytenantigen) Färbung detektiert wurden (doppelt negative Zellen). Außerdem wurden Zellen als fraglich bezeichnet, die sowohl für den Antikörpercocktail positiv als auch für CD45 positiv waren (doppelt positive Zellen). Weiterhin wurden Zellen, die nur eine sehr geringe Fluoreszenz für die Antikörpercocktail-Färbung aufwiesen und die Fluoreszenz nicht eindeutig als spezifisch oder als Hintergrundfluoreszenz zugeordnet werden konnte, als fraglich klassifiziert (siehe Abbildung 4.19). In den Kaplan-Meier-Analysen stellte sich heraus, dass die Patientinnen, bei denen fragliche Zellen detektiert wurden, im Vergleich zu den übrigen Patientinnen einen tendenziell besseren Krankheitsverlauf hatten (siehe Abbildung 4.20). Dies lässt vermuten, dass es sich bei den fraglichen Zellen nicht um CTCs handelte. Kontrovers hierzu konnte aber in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass in einer immunzytochemisch durch Antikörpercocktail-Färbung als fraglich

klassifizierten Probe durch eine Fluoreszenz *in situ* Hybrisisierungs-Analyse (FISH-Analyse) für 8q24 Zellen identifiziert wurden, die einen chromosomalen Zugewinn für diesen Bereich aufwiesen (siehe Kapitel 4.7.4, Abbildung 4.25). In dieser Probe wurden doppelt negative Zellen mit atypisch großer Morphologie und großen Zellkernen identifiziert (siehe Abbildung 4.24). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die in dieser Probe als fraglich bezeichneten Zellen offenbar CTCs waren, da normale Blutzellen keine derartigen chromosomalen Veränderungen aufweisen. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Gruppe der fraglichen Proben eine heterogene Gruppe war. Ein Teil der Proben dieser Gruppe enthielt anscheinend Zellen malignen Ursprungs. Am wahrscheinlichsten ist dieses für die fraglichen Zellen der Kategorie atypische, doppelt negative Zellen. Auch die FISH-Analysen an immunzytochemisch positiven Proben haben gezeigt, dass zusätzlich zu den immunzytochemisch detektierten Zellen auch nicht gefärbte Zellen mit einem chromosomalen Zugewinn existierten. Somit bestärkte dieses Ergebnis wiederum, dass ein Anteil an CTCs des Ovarialkarzinoms die Markerproteine nicht exprimieren und somit nicht immunzytochemisch detektiert werden können. Dagegen hatten die doppelt positiven fraglichen Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen malignen Ursprung. Es könnte sein, dass hier die Antikörpercocktail-Färbung unspezifisch war oder auch eine Subpopulation von Blutzellen einen der Markerproteine exprimierten. Einige Arbeiten zeigten, dass beispielsweise EMA und Zytokeratin exprimierende Zellen auch sehr vereinzelt bei gesunden Spendern nachweisbar sind (Lambrechts *et al.*, 1998; Leong *et al.*, 2003). Es ist auch denkbar, dass Antigen-präsentierende Immunzellen des Blutes epitheliale Proteinfragmente präsentieren und somit die Blutzellen spezifisch durch die Antikörper des Cocktails detektiert wurden. Basierend auf dieser Annahme sind doppelt positive Zellen ein Indikator für ein aktives Immunsystem. In einer Studie von Brandt *et al.* wurde gezeigt, dass bei Prostatakrebpatienten das Vorhandensein von Zellen, die sowohl positiv für den Monozytenmarker CD14 als auch für das prostataspezifische Antigen (PSA) waren, mit einem geringeren Risiko für hämatogene Metastasenbildung assoziiert war (Brandt *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis stützt die Annahme dieser Arbeit, dass der Großteil der als fraglich klassifizierten Zellen keinen malignen Ursprung hatte und mit einem besseren Krankheitsverlauf assoziiert war.

## 5.6 Phänotypische und genotypische Heterogenität der CTCs beim Ovarialkarzinom

### 5.6.1 Heterogenität der Expression der Markerproteine zur Detektion der CTCs

Zur Detektion von CTCs nach dem ursprünglichen, zweistufigen Protokoll mussten diese sowohl EpCAM als Anreicherungsmarker als auch Zytokeratin (CK 5/7/8/18) als Detektionsmarker exprimieren. Somit wurden nach diesem Protokoll nur Zellen nachgewiesen, die EpCAM und Zytokeratin (CK 5/7/8/18) exprimierten. Die niedrigen Detektionsraten nach diesem Protokoll deuteten darauf hin, dass ein Anteil der CTCs mindestens einen dieser Marker nicht exprimierten und somit durch dieses Protokoll nicht detektierbar war. Das modifizierte, einstufige Protokoll dagegen detektierte CTCs, die mindestens einen der verwendeten Marker EpCAM, Zytokeratin, EMA, HER-2 oder EGFR exprimierten. Die deutliche Erhöhung der Detektionsraten nach dem modifizierten, einstufigen Protokoll bestätigte die Annahme, dass ein Anteil der CTCs EpCAM oder Zytokeratin (CK 5/7/8/18) nicht exprimierten. Das Blut von Lungenkrebspatienten wurde in einer Studie analysiert und es wurde gezeigt, dass Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) bei CTCs zum Fehlen des epithelialen Phänotyps führt (Hou *et al.*, 2011; Lecharpentier *et al.*, 2011). Außerdem zeigten Aktas *et al.* in einer Studie, dass CTCs von metastasierten Brustkrebspatientinnen EMT- und Stammzellcharakteristiken aufwiesen (Aktas *et al.*, 2009). Diese Daten werden von der Arbeit von Armstrong *et al.* gestützt, die zeigen konnten, dass die CTCs bei fortgeschrittenen Brustkrebspatientinnen und bei Prostatakrebspatienten sowohl epitheliale, mesenchymale als auch Stammzellmarker aufwiesen (Armstrong *et al.*, 2011). Dieses könnte auch beim Ovarialkarzinom der Fall sein und somit die niedrigen Detektionsraten nach dem ursprünglichen Protokoll erklären. Da das Ovarialepithel aus dem Mesoderm entstanden ist und aufgrund der natürlichen Fähigkeit, sich mesenchymal differenzieren zu können (Auersperg *et al.*, 2001), scheint der Prozess der EMT infolge der hämatogenen Disseminierung beim Ovarialkarzinom als sehr wahrscheinlich. Hinweise hierzu lieferte die Arbeit von Aktas *et al.*, deren Daten zeigten, dass die CTCs beim Ovarialkarzinom bezüglich der Expression der Marker HER-2, EpCAM, MUC-1 (entspricht EMA) und CA 125 heterogen waren (Aktas *et al.*, 2011). Um mögliche Aussagen hinsichtlich der Stabilität der EpCAM und Zytokeratin Expression von CTCs geben zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit Asziteszellen diesbezüglich untersucht (siehe Kapitel 4.4). Asziteszellen könnten Vorläufer der CTCs sein und somit ein Zwischenstadium zwischen Primärtumor und CTCs darstellen. Die

Charakterisierung der Asziteszellen könnte daher ein Hinweis über die Expression der Markerproteine der CTCs geben. Es muss allerdings bedacht werden, dass die möglichen CTCs nicht zwangsläufig den Asziteszellen entsprechen müssen. Es konnte gezeigt werden, dass die Asziteszellen die epithelialen Marker EpCAM, Zytokeratin (CK 7/18) und EMA heterogen exprimierten (siehe Abbildung 4.6). Aufgrund der Eigenfluoreszenz der Asziteszellen konnte keine Fluoreszenzdoppelfärbung durchgeführt werden, was nur eine Aussage bezüglich des Anteils an Zellen möglich macht, die diese Proteine exprimierten. Die malignen Asziteszellen können nicht eindeutig von Mesothelzellen des Peritoneums unterschieden werden (Drapkin *et al.*, 2004; Murugan *et al.*, 2009). Sie sind Zytokeratin und Calretinin positiv, während sie EpCAM nicht exprimieren. Es ist zwar in seltenen Fällen möglich, dass Ovarialkarzinomzellen auch Calretinin positiv sind, dieser Marker ist aber in Kombination mit EpCAM am besten geeignet, um Ovarialkarzinomzellen (EpCAM positiv und Calretinin negativ) von Mesothelzellen des Peritoneums (EpCAM negativ und Calretinin positiv) zu unterscheiden (Okamoto *et al.*, 2005). Zytokeratin dagegen wird von beiden Zellarten exprimiert. In der Mehrheit der Aszitesproben war die Anzahl an EpCAM positiven Zellen höher als die der Zytokeratin (CK 7/18) positiven Zellen und der Anteil Calretinin exprimierender Zellen gering (siehe Abbildung 4.6). Aufgrund des hohen Anteils EpCAM und des geringen Anteils Calretinin positiver Zellen liegt es nahe, dass der Großteil der detektierten Zellen vom Ovarialkarzinom abstammte. Zusätzlich waren auch in vielen der Aszitesproben Blutzellen vorhanden. Es zeigte sich, dass der Anteil an Zellen, die die Markerproteine exprimierten, sehr variierte (siehe Abbildung 4.6). Daher liegt der Schluss nahe, dass einige Asziteszellen nicht alle Markerproteine exprimierten. Tendenziell zeigte sich, dass mehr Asziteszellen EpCAM exprimierten als Zytokeratin (CK 7/18). Somit schienen einige maligne Asziteszellen nur EpCAM positiv gewesen zu sein, während sie Zytokeratin (CK 7/18) negativ waren. Interessanterweise änderte sich das Expressionsprofil der Asziteszellen, wenn diese über zwei Passagen in der Zellkultur kultiviert wurden. Nach Kultivierung exprimierten die meisten Zellen Zytokeratin (CK 7/18) während sie EpCAM negativ waren (siehe Abbildung 4.7). Es konnte nicht eindeutig bestimmt werden, ob die in der Zellkultur gewachsenen Zellen maligne Asziteszellen darstellten. Wenn angenommen wird, dass es sich hierbei um maligne Asziteszellen handelte, dann kann darauf geschlossen werden, dass die EpCAM Expression der Ovarialkarzinomzellen nicht stabil ist, und die Zellen in der Lage sind, aufgrund von veränderten äußeren Bedingungen, wie es auch im Blutssystem der Fall ist, den Phänotyp zu ändern.



Anhand eines Mausmodells wurde der Vorgang der hämatogenen Disseminierung beim Ovarialkarzinom näher untersucht (siehe Kapitel 4.5). Es wurden Zellen der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 ins Peritoneum von SCID-Mäusen injiziert. Nachdem die SK-OV-3 Zellen im Peritoneum Tumore gebildet hatten, wurde den Mäusen, bevor diese getötet wurden, Blut abgenommen und das Blut auf CTCs hin untersucht. Da SK-OV-3 Zellen HER-2 überexprimieren, wurden durch diesen Marker CTCs detektiert. Es konnte somit gezeigt werden, dass in diesem Mausmodell die Karzinomzellen SK-OV-3 ins Blutsystem disseminierten. Durch immunzytochemische Fluoreszenz-doppelfärbungen gegen HER-2 und EpCAM wurden diese SK-OV-3 CTCs näher bezüglich ihres Phänotyps charakterisiert. Die SK-OV-3 CTCs exprimierten genau wie native SK-OV-3 Zellen EpCAM heterogen. Dieses Ergebnis stützt die These, dass EpCAM von vielen CTCs des Ovarialkarzinoms nicht stabil exprimiert wird. Auch die peritonealen Tumore der Mäuse exprimierten größtenteils kein EpCAM (siehe Abbildung 4.13), was die Ergebnisse der EpCAM Expression der SK-OV-3 CTCs stützt. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass eine proteolytische Spaltung des EpCAM-Moleküls bei verschiedenen Krebsarten zum Verlust der extrazellulären Domäne führt. Die intrazelluläre Domäne schaltet im Zellkern Signalwege an, welche die Zellproliferationen erhöhen (Maetzel *et al.*, 2009; Ralhan *et al.*, 2010; Ralhan *et al.*, 2010). Die in der Diagnostik und auch in dieser Arbeit verwendeten Antikörper richteten sich ausschließlich gegen die extrazelluläre Domäne des EpCAM-Moleküls. Es wäre denkbar, dass eine proteolytische Spaltung des EpCAM-Moleküls auch bei den CTCs des Ovarialkarzinoms stattfindet und sie somit durch einen Antikörper, der die extrazelluläre Domäne erkennt, nicht detektierbar sind.

### 5.6.2 Heterogenität von chromosomalen Zugewinnen in CTCs

Es wurden zehn Proben (neun Proben des Zeitpunktes Q und eine Probe des Zeitpunktes H), in denen CTCs immunzytochemisch durch Verwendung des Antikörpercocktails nachgewiesen wurden, zusätzlich durch FISH-Analysen für die Bereiche 3q26 und drei Proben außerdem für den Bereich 8q24 untersucht (siehe Kapitel 4.6, Tabelle 4.20). In der OVCAD-Studie wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Charles Theillet (Montpellier, Frankreich) die Chromosomenbereiche 3q26 und 8q24 identifiziert, die in therapieresistenten Tumoren signifikant häufiger einen Zugewinn aufweisen, als bei Tumoren von Patientinnen, die von der Therapie



profitieren. Dass für diese Chromosomenbereiche beim Ovarialkarzinom häufig Zugewinne vorliegen, belegen zusätzlich weitere Studien (Gray *et al.*, 2003; Dimova *et al.*, 2009; Osterberg *et al.*, 2009; Osterberg *et al.*, 2009). Die Bereiche 3q26 und 8q24 scheinen für FISH-Analysen der CTCs geeignet zu sein, da die Wahrscheinlichkeit eines chromosomalen Zugewinns der CTCs für diesen Bereich hoch ist, und ein Zugewinn darüber hinaus von prognostischer Relevanz sein könnte.

Die Präzision der Hybridisierung der Sonden 3q26 und 8q24 wurden durch FISH-Analysen an Leukozyten von gesunden Spendern überprüft (siehe Kapitel 4.7.1). Die Präzision des Verfahrens bestimmt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein chromosomaler Zugewinn in einer einzelnen CTC bestimmt werden kann. Es zeigte sich, dass wie erwartet, die Mehrzahl an Leukozyten für beide Sonden zwei Signale aufwies (93,5 % der Zellen für 3q26 und 96,2 % für 8q24). Anhand dieser Kontrollen konnte gezeigt werden, dass sehr selten drei Signale für die Sonden 3q26 und 8q24 detektiert wurden und nie mehr als drei Signale (siehe Tabelle 4.19). Diese Ergebnisse wurden bei der Auswertung der FISH-Analysen von Patientenproben berücksichtigt. Um unspezifische Signale zu umgehen, wurden nur Proben mit CTCs mit einem chromosomalen Zugewinn klassifiziert, die entweder eine hohe Anzahl von Zellen mit drei Signalen oder Zellen mit mehr als drei Signalen aufwies. Ein DNA Verlust wurde nicht weiter analysiert. Somit zeigte sich, dass durch die verwendeten FISH-Analysen mit hoher Präzision chromosomale Zugewinne in CTCs angezeigt werden konnten.

Es wurden in allen untersuchten Proben Zellen nachgewiesen, die einen chromosomalen Zugewinn im Bereich 3q26 oder 8q24 aufwies (siehe Abbildung 4.21), wodurch der maligne Ursprung der immunzytochemisch detektierten CTCs bestätigt wurde. Interessanterweise wurden auch Zellen identifiziert, die nicht immunzytochemisch für den Antikörpercocktail positiv waren, aber einen chromosomalen Zugewinn für den Bereich 3q26 oder 8q24 aufwies. Da diese Zellen chromosomale Veränderungen hatten, was typisch für maligne Zellen ist, waren diese Zellen wahrscheinlich CTCs. Dieses Ergebnis zeigte, dass zusätzlich zu den immunzytochemisch durch die Antikörpercocktail-Färbung nachgewiesenen CTCs die reelle Anzahl an CTCs höher zu sein scheint. Die FISH-Analysen für den chromosomalen Bereich 3q26 an den SK-OV-3 CTCs, die aus dem Blut der Xenograft-SCID-Mäuse isoliert wurden, bestätigten das Ergebnis der FISH-Analysen an humanen Patientenproben. Es konnten ebenso hier zusätzlich zu den immunzytochemisch detektierten HER-2 positiven SK-OV-3 CTCs auch nicht HER-2 gefärbte Zellen identifiziert werden, die eindeutig FISH-Signale aufwies (siehe Abbildung 4.12).

### ***5.7 Diskussion des Fallbeispiels H071 zur Untersuchung der hämatogenen Disseminierung des Ovarialkarzinoms***

Bei der Patientin H071 konnte zum Zeitpunkt der Operation eine sehr hohe Anzahl von etwa 187 CTCs/ml Blut detektiert werden (siehe Kapitel 4.9). Diese Patientin hatte zu diesem Zeitpunkt Fernmetastasen in der Leber und Milz, was Ausdruck einer hämatogenen Metastasierung ist. Es wurde unterschiedliches Probenmaterial (Blut, Aszitesflüssigkeit, Primärtumor sowie Milz- und Lebermetastase) vergleichend untersucht, um Hinweise über den Metastasierungsweg aufzuzeigen. Tumorzellen des Primärtumors können entweder direkt oder über die Aszitesflüssigkeit ins Blutsystem gelangen. Asziteszellen könnten also möglicherweise eine Zwischenstufe zwischen Primärtumor und CTCs darstellen. Die Metastasen wiederum sind aus CTCs entstanden, wobei nicht klar ist, welche CTCs in der Lage sind, Metastasen zu bilden. Es ist auch denkbar, dass die detektierten Zellen von den Metastasen ausgehend ins Blutsystem gelangt sind oder zumindest eine Subpopulation der CTCs darstellen.

Aufgrund der hohen Anzahl der CTCs war es möglich, diese Zellen immunzytochemisch bezüglich der Expression der Markerproteine zu charakterisieren. Durch immunzytochemische Fluoreszenzdoppelfärbungen konnte gezeigt werden, dass die CTCs Zytokeratin (CK 7/18) und Vimentin exprimierten (siehe Abbildung 4.30), während sie negativ für HER-2 und EGFR waren. Das Fehlen der HER-2 und EGFR Expression könnte ein Hinweis dafür sein, dass CTCs des Ovarialkarzinoms nicht alle Markerproteine exprimieren und somit die Detektion mit Hilfe eines Antikörpercocktails, der verschiedene Markerproteine nachweist, sinnvoll ist. Zytokeratin ist ein typischer Epithelmarker und Vimentin ein Mesenchymmarker. Dass diese CTCs beide Proteine exprimierten, macht den mesothelialen Ursprung des Ovarialkarzinoms deutlich (Auersperg *et al.*, 2001). Zusätzlich zeigte eine Fluoreszenzdoppelfärbung für Zytokeratin und EpCAM, dass die Zellen weitestgehend EpCAM negativ waren. Zur Validierung des Ergebnisses zur EpCAM Expression der CTCs wurde zusätzlich die hoch sensitive lichtmikroskopische Färbung nach der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode durchgeführt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass ein kleiner Anteil der CTCs schwach EpCAM exprimierte, während der größere Anteil von mehr als 90 % der CTCs negativ für EpCAM war (siehe Abbildung 4.32). Wenn das Blut dieser Patientin nach dem ursprünglichen, zweistufigen Protokoll aufgearbeitet worden wäre, hätte nur ein kleiner Anteil der CTCs detektiert werden können, da für dieses Protokoll die EpCAM-

Expression essentiell für den CTC Nachweis war. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die EpCAM-Expression der CTCs beim Ovarialkarzinom nicht stabil und somit EpCAM allein kein ausreichender Detektionsmarker ist. Zur Unterstützung dieser These wurde die Expression von EpCAM des Primärtumors und der Metastasen untersucht. Während der Primärtumor deutlich positiv für EpCAM war, exprimierten die Metastasen der Milz und der Leber EpCAM wesentlich schwächer (siehe Abbildung 4.33). Somit bestätigte sich, dass der Phänotyp der Metastasenzellen mit wenig EpCAM-Expression dem der meisten CTCs mit ebenfalls wenig bis keiner EpCAM-Expression entsprach. Zusätzlich wurden FISH-Analysen für den Chromosomenbereich 3q26 und 8q24 am Primärtumor, den Metastasen, Asziteszellen und CTCs durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Sowohl der Primärtumor als auch die Metastasen der Milz und Leber wiesen einen chromosomalen Zugewinn für beide Chromosomenbereiche auf. Für den Chromosomenbereich 3q26 im Verhältnis zur Referenz des Zentromers 7 hatte der Primärtumor einen chromosomalen Zugewinn von 2,2, die Milzmetastase von 2,7 und die Lebermetastase von 3,4 (siehe Tabelle 4.26). Die Metastasen für diesen Bereich hatten folglich einen höheren Zugewinn im Vergleich zum Primärtumor. Für den Chromosomenbereich 8q24 im Verhältnis zur Referenz des Zentromers 7 hatte der Primärtumor einen chromosomalen Zugewinn von 2,9, die Milzmetastase von 2,1 und die Lebermetastase von 2,4 (siehe Tabelle 4.26). Daher hatte für den Bereich 8q24 der Primärtumor einen höheren Zugewinn im Vergleich zu den Metastasen. Die FISH-Analysen an CTCs zeigten, dass die CTCs sehr heterogen waren. Etwa 75 % der durch Zytokeratin Antikörper (A45-BB3-Cy3, CK 7/18) detektierten CTCs hatten keinen chromosomalen Zugewinn für 3q26, während eine Minderheit von etwa 25 % einen Zugewinn hatte. Weiterhin wurden Zellen nachgewiesen, die einen Zugewinn für den chromosomalen Bereich 3q26 aufwiesen, aber nicht immunzytochemisch für Zytokeratin (CK 7/18) positiv waren (siehe Abbildung 4.36). Da diese Zellen chromosomale Veränderungen hatten, scheinen diese Zellen auch CTCs darzustellen. Daher waren die CTCs dieser Patientin sehr heterogen. Obwohl immunzytochemisch durch die Antikörpercocktail-Färbung eine sehr hohe Anzahl an CTCs detektiert wurde, war die reelle Anzahl der CTCs wahrscheinlich noch höher. Da die Metastasen einen hohen Zugewinn für 3q26 aufwiesen, waren vermutlich entweder der kleinere Anteil der immunzytochemisch gefärbten Zellen, die einen Zugewinn aufwiesen oder die immunzytochemisch nicht gefärbten Zellen, die einen Zugewinn hatten, Vorläufer der Metastasen. Die FISH-Analyse an CTCs für den Chromosomenbereich 8q24 zeigte ein ähnliches Bild. Etwa die Hälfte der immunzytochemisch detektierten CTCs hatte einen

Zugewinn für den Bereich 8q24, die andere Hälfte nicht. Zusätzlich wurden auch für diesen Chromosomenbereich Zellen nachgewiesen, die nicht immunzytochemisch detektiert wurden aber einen chromosomalen Zugewinn für 8q24 aufwiesen (siehe Abbildung 4.37). Anhand dieses Beispiels konnte gezeigt werden, dass die CTCs sehr heterogen, sowohl bezüglich der Proteinexpression als auch der chromosomalen Veränderungen waren. Eine Herausforderung stellt es dar herauszufinden, welche Subpopulationen der CTCs klinische Relevanz besitzen und in der Lage sind, Metastasen zu bilden. Die Identifizierung dieser Zellen könnte dabei helfen, Zielstrukturen für eine mögliche weitere Therapie bei Therapieversagen zu finden. Weiterhin könnte der Nachweis dieser „aggressiven“ Subpopulationen von CTCs bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine Aussagekraft über den Krankheitsverlauf und das Therapieversagen geben.

Zusätzlich ist es gelungen, den malignen Ursprung der CTCs eindeutig zu belegen. Der Primärtumor hatte eine Mutation im *p53*-Gen. Es wurde genomische DNA aus der Blutprobe isoliert und durch Sequenzierung diese tumorspezifische Mutation nachgewiesen (siehe Kapitel 4.9.4). Damit liegt ein eindeutiger Beweis dafür vor, dass sich im Blut Zellen befanden, die vom Tumor abstammten.

### ***5.8 Mögliche hämatogene Disseminierungswege beim Ovarialkarzinom***

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise für unterschiedliche hämatogene Metastasierungswege beim Ovarialkarzinom. Das allgemeine Model zur hämatogenen Disseminierung beschreibt zwei Wege der CTCs vom Primärtumor ins Blutsystem zu gelangen (Pantel und Brakenhoff, 2004). Dieses Model wurde anhand von Daten anderer Karzinomentitäten hauptsächlich an Brustkrebs erstellt. Die Zellen können zum einen direkt hämatogen ins Blutsystem disseminieren, wie es wahrscheinlich hauptsächlich bei Brustkrebs der Fall ist. Zum anderen können die Zellen zuerst lymphogen ins Lymphsystem disseminieren, wodurch Lymphknotenmetastasen entstehen. Diese Zellen können wiederum in einem späteren Krankheitsstadium hämatogen ins Blutsystem disseminieren, was bei Kopf-Hals Karzinomen der Fall zu sein scheint, da für diese Karzinomentität das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen mit Fernmetastasierung korreliert (siehe Kapitel 1.3.1) (Pantel und Brakenhoff, 2004). Beim Ovarialkarzinom ist eine weitere Möglichkeit der CTCs ins Blutsystem zu gelangen denkbar. Das Ovarialkarzinom breitet sich hauptsächlich mit der Zirkulation der

Peritonealflüssigkeit aus (Naora und Montell, 2005). Tumorzellen, die sich vom Primärtumor abgelöst haben, streuen somit in den Peritonealraum. Diese peritoneale Streuung ist häufig mit einer Aszitesbildung assoziiert. Maligne Zellen, die sich in der Aszitesflüssigkeit befinden, könnten von hier aus ins Blutsystem gelangen und somit Vorläufer von CTCs und Metastasen darstellen (Shield *et al.*, 2009).

Aufgrund des häufigen Vorhandenseins von Aszitesflüssigkeit und des häufigen Vorkommens von Peritonealkarzinosen scheint der Weg über die Aszitesflüssigkeit beim Ovarialkarzinom als wahrscheinlich. Da bei 65 % der Ovarialkarzinompatientinnen Lymphknotenmetastasen vorhanden sind, ist eine lymphogene Metastasierung relativ häufig. Der Weg der CTCs über das Lymphsystem scheint daher auch wahrscheinlich zu sein. Weiterhin ist zusätzlich eine direkte hämatogene Disseminierung denkbar. Es existieren allerdings nicht genügend Daten für das Ovarialkarzinom, um diese Disseminierungswege zu belegen. Vorstellbar ist auch, dass beim Ovarialkarzinom die CTCs über verschiedene Wege ins Blutsystem gelangen. Es ist sowohl möglich, dass bei einer Patientin mehrere Wege existieren als auch bei unterschiedlichen Patientinnen verschiedene. Wenn die CTCs auf verschiedenen Wegen ins Blutsystem gelangt sind, könnte dieses auch die Heterogenität der CTCs erklären. Dieses ist allerdings sehr spekulativ und müsste durch weiterführende Experimente belegt werden. Einen weiteren Hinweis für unterschiedliche Metastasierungswege zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit. Bei den meisten Patientinnen (83 %), bei denen CTCs detektiert wurden, war Aszitesflüssigkeit vorhanden (siehe Tabelle 4.14). Dieses ist auf der einen Seite recht typisch für einen fortgeschrittenen Krankheitsverlauf, zum anderen könnte es den Weg über die Aszitesflüssigkeit andeuten. Es hatten allerdings sechs Patientinnen (eine nach dem ursprünglichen Protokoll und fünf nach dem modifizierten Protokoll) bei den CTCs detektiert wurden, keine Aszitesbildung (siehe Tabelle 4.14). Folglich scheint der Weg über die Asziteszellen jedenfalls nicht der alleinige zu sein.

### ***5.9 Ausblick***

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die CTCs der Ovarialkarzinompatientinnen sehr heterogen bezüglich ihrer chromosomalen Veränderungen und der Proteinexpression sind. Im Vergleich mit den Zellen des Primärtumors scheinen die epithelialen Marker, insbesondere EpCAM, in CTCs vermindert vorzuliegen. Die

Ergebnisse dieser Arbeit tragen maßgeblich zu einem besseren Verständnis der klinischen Relevanz der CTCs sowie der Disseminierung beim Ovarialkarzinom bei.

Zukünftig stellt es eine Herausforderung dar herauszufinden, welche Subpopulationen der CTCs klinische Relevanz besitzen und in der Lage sind, Metastasen zu bilden. Der Nachweis dieser „aggressiven“ Subpopulationen von CTCs könnte bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine prognostische Aussagekraft über den Krankheitsverlauf und Therapieversagen besitzen. Zusätzlich könnte die Identifizierung dieser Zellen dabei helfen, Zielstrukturen für eine mögliche weitere Therapie bei Therapieversagen zu finden.

In dieser Arbeit konnten CTCs mittels FISH-Analysen aufgrund genetischer Aberrationen nachgewiesen werden, die immunzytochemisch durch die Antikörper des Antikörpercocktails nicht detektiert wurden. Hierdurch wird deutlich, dass weitere geeignete Protein-Marker identifiziert werden müssen, um auch diese CTCs immunzytochemisch nachweisen zu können. Weiterhin machen die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich, dass ein Bedarf an der Etablierung einer standardisierten, EpCAM unabhängigen CTC Nachweismethode besteht.

Die Entwicklung verbesserter Technologien zur genetischen Analyse von Einzelzellen liefert einen vielversprechenden Ansatz, die CTCs weiter molekularbiologisch charakterisieren zu können und somit die Biologie der Disseminierung beim Ovarialkarzinom besser erforschen zu können.



## 6 Literaturverzeichnis

- Abdul-Karim, F. W., M. Kida, W. B. Wentz, J. R. Carter, K. Sorensen, *et al.* (1990). "Bone metastasis from gynecologic carcinomas: a clinicopathologic study." *Gynecol Oncol* **39**(2): 108-14.
- Aguirre-Ghiso, J. A. (2010). "On the theory of tumor self-seeding: implications for metastasis progression in humans." *Breast Cancer Res* **12**(2): 304.
- Ahmad, A. and I. R. Hart (1996). "Biology of tumor micrometastasis." *J Hematother* **5**(5): 525-35.
- Aktas, B., S. Kasimir-Bauer, M. Heubner, R. Kimmig and P. Wimberger (2011). "Molecular profiling and prognostic relevance of circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients at primary diagnosis and after platinum-based chemotherapy." *Int J Gynecol Cancer* **21**(5): 822-30.
- Aktas, B., M. Tewes, T. Fehm, S. Hauch, R. Kimmig, *et al.* (2009). "Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients." *Breast Cancer Res* **11**(4): R46.
- Alix-Panabieres, C., J. P. Vendrell, O. Pelle, X. Rebillard, S. Riethdorf, *et al.* (2007). "Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients." *Clin Chem* **53**(3): 537-9.
- Allard, W. J., J. Matera, M. C. Miller, M. Repollet, M. C. Connelly, *et al.* (2004). "Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases." *Clin Cancer Res* **10**(20): 6897-904.
- Armstrong, A. J., M. S. Marengo, S. Oltean, G. Kemeny, R. L. Bitting, *et al.* (2011). "Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers." *Mol Cancer Res* **9**(8): 997-1007.
- Attard, G. and J. S. de Bono (2011). "Utilizing circulating tumor cells: challenges and pitfalls." *Curr Opin Genet Dev* **21**(1): 50-8.
- Auersperg, N., S. L. Maines-Bandiera and H. G. Dyck (1997). "Ovarian carcinogenesis and the biology of ovarian surface epithelium." *J Cell Physiol* **173**(2): 261-5.
- Auersperg, N., A. S. Wong, K. C. Choi, S. K. Kang and P. C. Leung (2001). "Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology." *Endocr Rev* **22**(2): 255-88.
- Balzar, M., M. J. Winter, C. J. de Boer and S. V. Litvinov (1999). "The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)." *J Mol Med (Berl)* **77**(10): 699-712.
- Bast, R. C., Jr. (2003). "Status of tumor markers in ovarian cancer screening." *J Clin Oncol* **21**(10 Suppl): 200s-205s.
- Berger, U., R. Bettelheim, J. L. Mansi, D. Easton, R. C. Coombes, *et al.* (1988). "The relationship between micrometastases in the bone marrow, histopathologic features of the primary tumor in breast cancer and prognosis." *Am J Clin Pathol* **90**(1): 1-6.
- Bernards, R. and R. A. Weinberg (2002). "A progression puzzle." *Nature* **418**(6900): 823.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Bonnomet, A., A. Brysse, A. Tachsidis, M. Waltham, E. W. Thompson, *et al.* (2010). "Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**(2): 261-73.
- Brandt, B. and C. Griwatz (1996). "Two-layer buoyant density centrifugation gradient for enrichment of prostate-derived cells and cell clusters from peripheral blood." *Clin Chem* **42**(11): 1881-2.
- Brandt, B., C. Griwatz, O. Brinkmann and K. S. Zanker (1997). "Circulating prostate-specific antigen/CD14-double-positive cells: a biomarker indicating low risk for hematogeneous metastasis of prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* **89**(2): 174.
- Braun, S., K. Pantel, P. Muller, W. Janni, F. Hepp, *et al.* (2000). "Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer." *N Engl J Med* **342**(8): 525-33.
- Braun, S., C. Schindlbeck, F. Hepp, W. Janni, C. Kentenich, *et al.* (2001). "Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse." *J Clin Oncol* **19**(2): 368-75.
- Brooks, D. J., S. Woodward, F. H. Thompson, B. Dos Santos, M. Russell, *et al.* (1996). "Expression of the zinc finger gene EVI-1 in ovarian and other cancers." *Br J Cancer* **74**(10): 1518-25.
- Cailleau, R., M. Olive and Q. V. Cruciger (1978). "Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization." *In Vitro* **14**(11): 911-5.
- Carmignani, C. P., T. A. Sugarbaker, C. M. Bromley and P. H. Sugarbaker (2003). "Intraperitoneal cancer dissemination: mechanisms of the patterns of spread." *Cancer Metastasis Rev* **22**(4): 465-72.
- Carnino, F., G. Fuda, G. Ciccone, L. Iskra, E. Guercio, *et al.* (1996). "Significance of lymph node sampling in epithelial carcinoma of the ovary." *Gynecol Oncol* **65**(3): 467-72.
- Chambers, A. F., A. C. Groom and I. C. MacDonald (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." *Nat Rev Cancer* **2**(8): 563-72.

- Cohen, S. J., C. J. Punt, N. Iannotti, B. H. Savidman, K. D. Sabbath, *et al.* (2008). "Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol* **26**(19): 3213-21.
- Cristofanilli, M. (2006). "Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer." *Semin Oncol* **33**(3 Suppl 9): S9-14.
- Cristofanilli, M., D. F. Hayes, G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, *et al.* (2005). "Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* **23**(7): 1420-30.
- Cristofanilli, M. and J. Mendelsohn (2006). "Circulating tumor cells in breast cancer: Advanced tools for "tailored" therapy?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(46): 17073-4.
- Crum, C. P., R. Drapkin, A. Miron, T. A. Ince, M. Muto, *et al.* (2007). "The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis." *Curr Opin Obstet Gynecol* **19**(1): 3-9.
- Dauplat, J., N. F. Hacker, R. K. Nieberg, J. S. Berek, T. P. Rose, *et al.* (1987). "Distant metastases in epithelial ovarian carcinoma." *Cancer* **60**(7): 1561-6.
- de Bono, J. S., H. I. Scher, R. B. Montgomery, C. Parker, M. C. Miller, *et al.* (2008). "Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer." *Clin Cancer Res* **14**(19): 6302-9.
- Diamandis, E. P., K. Pantel, H. I. Scher, L. Terstappen and E. Lianidou (2011). "Circulating cancer cells and their clinical applications." *Clin Chem* **57**(11): 1478-84.
- Dimova, I., B. Orsetti, V. Negre, C. Rouge, L. Ursule, *et al.* (2009). "Genomic markers for ovarian cancer at chromosomes 1, 8 and 17 revealed by array CGH analysis." *Tumori* **95**(3): 357-66.
- Drapkin, R., C. P. Crum and J. L. Hecht (2004). "Expression of candidate tumor markers in ovarian carcinoma and benign ovary: evidence for a link between epithelial phenotype and neoplasia." *Hum Pathol* **35**(8): 1014-21.
- du Bois, A., A. Reuss, E. Pujade-Lauraine, P. Harter, I. Ray-Coquard, *et al.* (2009). "Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO)." *Cancer* **115**(6): 1234-44.
- Dubeau, L. (2008). "The cell of origin of ovarian epithelial tumours." *Lancet Oncol* **9**(12): 1191-7.
- Eliane, J. P., M. Repollet, K. E. Luker, M. Brown, J. M. Rae, *et al.* (2008). "Monitoring serial changes in circulating human breast cancer cells in murine xenograft models." *Cancer Res* **68**(14): 5529-32.
- Engel, H., C. Kleespies, J. Friedrich, M. Breidenbach, A. Kallenborn, *et al.* (1999). "Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics." *Br J Cancer* **81**(7): 1165-73.
- Fan, T., Q. Zhao, J. J. Chen, W. T. Chen and M. L. Pearl (2009). "Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer." *Gynecol Oncol* **112**(1): 185-91.
- Feeley, K. M. and M. Wells (2001). "Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy." *Histopathology* **38**(2): 87-95.
- Fehm, T., O. Hoffmann, B. Aktas, S. Becker, E. F. Solomayer, *et al.* (2009). "Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells." *Breast Cancer Res* **11**(4): R59.
- Feki, A., P. Berardi, G. Bellingan, A. Major, K. H. Krause, *et al.* (2009). "Dissemination of intraperitoneal ovarian cancer: Discussion of mechanisms and demonstration of lymphatic spreading in ovarian cancer model." *Crit Rev Oncol Hematol* **72**(1): 1-9.
- Felip, E., J. M. Del Campo, D. Rubio, M. T. Vidal, R. Colomer, *et al.* (1995). "Overexpression of c-erbB-2 in epithelial ovarian cancer. Prognostic value and relationship with response to chemotherapy." *Cancer* **75**(8): 2147-52.
- Feng, H., M. Ghazizadeh, H. Konishi and T. Araki (2002). "Expression of MUC1 and MUC2 mucin gene products in human ovarian carcinomas." *Jpn J Clin Oncol* **32**(12): 525-9.
- Ferlay, J., D. M. Parkin and E. Steliarova-Foucher (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." *Eur J Cancer* **46**(4): 765-81.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 453-8.
- Fidler, I. J. and M. L. Kripke (1977). "Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor." *Science* **197**(4306): 893-5.
- Flesken-Nikitin, A., K. C. Choi, J. P. Eng, E. N. Shmidt and A. Y. Nikitin (2003). "Induction of carcinogenesis by concurrent inactivation of p53 and Rb1 in the mouse ovarian surface epithelium." *Cancer Res* **63**(13): 3459-63.
- Fogh, J., J. M. Fogh and T. Orfeo (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." *J Natl Cancer Inst* **59**(1): 221-6.
- Fujimoto, I., Y. Hirai, K. Hasumi, K. Masubuchi and Y. Osamura (1990). "The value of epithelial membrane antigen in the diagnosis of ovarian tumors." *Acta Cytol* **34**(4): 549-54.

- Gerges, N., J. Rak and N. Jabado (2010). "New technologies for the detection of circulating tumour cells." Br Med Bull **94**: 49-64.
- Gertler, R., R. Rosenberg, K. Fuehrer, M. Dahm, H. Nekarda, *et al.* (2003). "Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation." Recent Results Cancer Res **162**: 149-55.
- Gray, J. W., S. Suzuki, W. L. Kuo, D. Polikoff, M. Deavers, *et al.* (2003). "Specific keynote: genome copy number abnormalities in ovarian cancer." Gynecol Oncol **88**(1 Pt 2): S16-21; discussion S22-4.
- Griwatz, C., B. Brandt, G. Assmann and K. S. Zanker (1995). "An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood." J Immunol Methods **183**(2): 251-65.
- Guth, U., D. J. Huang, G. Bauer, M. Stieger, E. Wight, *et al.* (2007). "Metastatic patterns at autopsy in patients with ovarian carcinoma." Cancer **110**(6): 1272-80.
- Hayes, D. F., M. Cristofanilli, G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, *et al.* (2006). "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**(14 Pt 1): 4218-24.
- He, W., S. A. Kularatne, K. R. Kalli, F. G. Prendergast, R. J. Amato, *et al.* (2008). "Quantitation of circulating tumor cells in blood samples from ovarian and prostate cancer patients using tumor-specific fluorescent ligands." Int J Cancer **123**(8): 1968-73.
- Heinzelmann-Schwarz, V. A., M. Gardiner-Garden, S. M. Henshall, J. Scurry, R. A. Scolyer, *et al.* (2004). "Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer." Clin Cancer Res **10**(13): 4427-36.
- Hou, J. M., M. Krebs, T. Ward, R. Sloane, L. Priest, *et al.* (2011). "Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer." Am J Pathol **178**(3): 989-96.
- Hung, M. C., X. Zhang, D. H. Yan, H. Z. Zhang, G. P. He, *et al.* (1992). "Aberrant expression of the c-erbB-2/neu protooncogene in ovarian cancer." Cancer Lett **61**(2): 95-103.
- Joyner, A. B. and C. D. Runowicz (2009). "Ovarian cancer screening and early detection." Womens Health (Lond Engl) **5**(6): 693-9.
- Judson, P. L., M. A. Geller, R. L. Bliss, M. P. Boente, L. S. Downs, Jr., *et al.* (2003). "Preoperative detection of peripherally circulating cancer cells and its prognostic significance in ovarian cancer." Gynecol Oncol **91**(2): 389-94.
- Kaku, T., S. Ogawa, Y. Kawano, Y. Ohishi, H. Kobayashi, *et al.* (2003). "Histological classification of ovarian cancer." Med Electron Microsc **36**(1): 9-17.
- Kallergi, G., M. A. Papadaki, E. Politaki, D. Mavroudis, V. Georgoulas, *et al.* (2011). "Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients." Breast Cancer Res **13**(3): R59.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-8.
- Kaufmann, M., S. D. Costa and A. Scharl (2006). Die Gynäkologie. Berlin, Heidelberg, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Kim, M. Y., T. Oskarsson, S. Acharyya, D. X. Nguyen, X. H. Zhang, *et al.* (2009). "Tumor self-seeding by circulating cancer cells." Cell **139**(7): 1315-26.
- Klein, C. A., T. J. Blankenstein, O. Schmidt-Kittler, M. Petronio, B. Polzer, *et al.* (2002). "Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer." Lancet **360**(9334): 683-9.
- Kmet, L. M., L. S. Cook and A. M. Magliocco (2003). "A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors." Cancer **97**(2): 389-404.
- Kurman, R. J., K. Visvanathan, R. Roden, T. C. Wu and M. Shih Ie (2008). "Early detection and treatment of ovarian cancer: shifting from early stage to minimal volume of disease based on a new model of carcinogenesis." Am J Obstet Gynecol **198**(4): 351-6.
- Lafky, J. M., J. A. Wilken, A. T. Baron and N. J. Maimle (2008). "Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer." Biochim Biophys Acta **1785**(2): 232-65.
- Lambrechts, A. C., L. J. van 't Veer and S. Rodenhuis (1998). "The detection of minimal numbers of contaminating epithelial tumor cells in blood or bone marrow: use, limitations and future of RNA-based methods." Ann Oncol **9**(12): 1269-76.
- Lecharpentier, A., P. Vielh, P. Perez-Moreno, D. Planchard, J. C. Soria, *et al.* (2011). "Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer." Br J Cancer.
- Leemans, C. R., R. Tiwari, J. J. Nauta, I. van der Waal and G. B. Snow (1993). "Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma." Cancer **71**(2): 452-6.
- Leong, C. F., O. Raudhawati, S. K. Cheong, K. Sivagengei and H. Noor Hamidah (2003). "Epithelial membrane antigen (EMA) or MUC1 expression in monocytes and monoblasts." Pathology **35**(5): 422-7.

- Leung, C. T. and J. S. Brugge (2009). "Tumor self-seeding: bidirectional flow of tumor cells." *Cell* **139**(7): 1226-8.
- Maestro, L. M., J. Sastre, S. B. Rafael, S. B. Veganzones, M. Vidaurreta, *et al.* (2009). "Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages." *Anticancer Res* **29**(11): 4839-43.
- Maetzel, D., S. Denzel, B. Mack, M. Canis, P. Went, *et al.* (2009). "Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM." *Nat Cell Biol* **11**(2): 162-71.
- Maheswaran, S. and D. A. Haber (2010). "Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis." *Curr Opin Genet Dev* **20**(1): 96-9.
- Mansi, J. L., D. Easton, U. Berger, J. C. Gazet, H. T. Ford, *et al.* (1991). "Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up." *Eur J Cancer* **27**(12): 1552-5.
- Marsden, D. E., M. Friedlander and N. F. Hacker (2000). "Current management of epithelial ovarian carcinoma: a review." *Semin Surg Oncol* **19**(1): 11-9.
- Marth, C., J. Kisic, J. Kaern, C. Trope and O. Fodstad (2002). "Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis." *Cancer* **94**(3): 707-12.
- Martin, L. P. and R. J. Schilder (2009). "Management of recurrent ovarian carcinoma: current status and future directions." *Semin Oncol* **36**(2): 112-25.
- Meerpohl, H.-G. and Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie (1993). *Das Ovariakarzinom*. Berlin u.a., Springer.
- Mehlen, P. and A. Puisieux (2006). "Metastasis: a question of life or death." *Nat Rev Cancer* **6**(6): 449-58.
- Miller, M. C., G. V. Doyle and L. W. Terstappen (2010). "Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Colorectal and Prostate Cancer." *J Oncol* **2010**: 617421.
- Moll, R. and W. W. Franke (1982). "Intermediate filaments and their interaction with membranes. The desmosome-cytokeratin filament complex and epithelial differentiation." *Pathol Res Pract* **175**(2-3): 146-61.
- Morice, P., F. Joulie, S. Camatte, D. Atallah, R. Rouzier, *et al.* (2003). "Lymph node involvement in epithelial ovarian cancer: analysis of 276 pelvic and paraaortic lymphadenectomies and surgical implications." *J Am Coll Surg* **197**(2): 198-205.
- Muller, V., D. F. Hayes and K. Pantel (2006). "Recent translational research: circulating tumor cells in breast cancer patients." *Breast Cancer Res* **8**(5): 110.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, *et al.* (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-73.
- Murugan, P., N. Siddaraju, S. Habeebullah and D. Basu (2009). "Immunohistochemical distinction between mesothelial and adenocarcinoma cells in serous effusions: a combination panel-based approach with a brief review of the literature." *Indian J Pathol Microbiol* **52**(2): 175-81.
- Nagrath, S., L. V. Sequist, S. Maheswaran, D. W. Bell, D. Irimia, *et al.* (2007). "Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology." *Nature* **450**(7173): 1235-9.
- Naora, H. and D. J. Montell (2005). "Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms." *Nat Rev Cancer* **5**(5): 355-66.
- Nossov, V., M. Amneus, F. Su, J. Lang, J. M. Janco, *et al.* (2008). "The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125?" *Am J Obstet Gynecol* **199**(3): 215-23.
- Ntouroupi, T. G., S. Q. Ashraf, S. B. McGregor, B. W. Turney, A. Seppo, *et al.* (2008). "Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope." *Br J Cancer* **99**(5): 789-95.
- Okamoto, S., K. Ito, H. Sasano, T. Moriya, H. Niikura, *et al.* (2005). "Ber-EP4 and anti-calretinin antibodies: a useful combination for differential diagnosis of various histological types of ovarian cancer cells and mesothelial cells." *Tohoku J Exp Med* **206**(1): 31-40.
- Orsulic, S., Y. Li, R. A. Soslow, L. A. Vitale-Cross, J. S. Gutkind, *et al.* (2002). "Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system." *Cancer Cell* **1**(1): 53-62.
- Osterberg, L., K. Levan, K. Partheen, U. Delle, B. Olsson, *et al.* (2009). "Potential predictive markers of chemotherapy resistance in stage III ovarian serous carcinomas." *BMC Cancer* **9**: 368.
- Osterberg, L., K. Levan, K. Partheen, J. Staaf, K. Sundfeldt, *et al.* (2009). "High-resolution genomic profiling of carboplatin resistance in early-stage epithelial ovarian carcinoma." *Cytogenet Genome Res* **125**(1): 8-18.
- Pantel, K., C. Alix-Panabieres and S. Riethdorf (2009). "Cancer micrometastases." *Nat Rev Clin Oncol* **6**(6): 339-51.
- Pantel, K. and R. H. Brakenhoff (2004). "Dissecting the metastatic cascade." *Nat Rev Cancer* **4**(6): 448-56.
- Pantel, K., R. H. Brakenhoff and B. Brandt (2008). "Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells." *Nat Rev Cancer* **8**(5): 329-40.
- Patel, H., N. Le Marer, R. Q. Wharton, Z. A. Khan, R. Araia, *et al.* (2002). "Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer." *Ann Surg* **235**(2): 226-31.



- Paterlini-Brechot, P. and N. L. Benali (2007). "Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions." *Cancer Lett* **253**(2): 180-204.
- Pecorelli, S., J. L. Benedet, W. T. Creasman and J. H. Shepherd (1999). "FIGO staging of gynecologic cancer. 1994-1997 FIGO Committee on Gynecologic Oncology. International Federation of Gynecology and Obstetrics." *Int J Gynaecol Obstet* **65**(3): 243-9.
- Piek, J. M., P. Kenemans and R. H. Verheijen (2004). "Intraperitoneal serous adenocarcinoma: a critical appraisal of three hypotheses on its cause." *Am J Obstet Gynecol* **191**(3): 718-32.
- Pierga, J. Y., F. C. Bidard, C. Mathiot, E. Brain, S. Delaloge, *et al.* (2008). "Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial." *Clin Cancer Res* **14**(21): 7004-10.
- Poveda, A., S. B. Kaye, R. McCormack, S. Wang, T. Parekh, *et al.* (2011). "Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer." *Gynecol Oncol* **122**(3): 567-72.
- Ralhan, R., J. Cao, T. Lim, C. Macmillan, J. L. Freeman, *et al.* (2010). "EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis." *BMC Cancer* **10**: 331.
- Ralhan, R., H. C. He, A. K. So, S. C. Tripathi, M. Kumar, *et al.* (2010). "Nuclear and cytoplasmic accumulation of Ep-ICD is frequently detected in human epithelial cancers." *PLoS One* **5**(11): e14130.
- Riethdorf, S., H. Fritsche, V. Muller, T. Rau, C. Schindlbeck, *et al.* (2007). "Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system." *Clin Cancer Res* **13**(3): 920-8.
- Riethdorf, S. and K. Pantel (2010). "Advancing personalized cancer therapy by detection and characterization of circulating carcinoma cells." *Ann N Y Acad Sci* **1210**: 66-77.
- Robert-Koch-Institut and G. d. E. K. i. Deutschland. (2008). "Krebs in Deutschland ... Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V."
- Rosenberg, R., R. Gertler, J. Friederichs, K. Fuehrer, M. Dahm, *et al.* (2002). "Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood." *Cytometry* **49**(4): 150-8.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Schmidt, H., G. De Angelis, O. Bettendorf, E. Eltze, A. Semjonow, *et al.* (2004). "Frequent detection and immunophenotyping of prostate-derived cell clusters in the peripheral blood of prostate cancer patients." *Int J Biol Markers* **19**(2): 93-9.
- Schmidt, H., G. DeAngelis, E. Eltze, I. Gockel, A. Semjonow, *et al.* (2006). "Asynchronous growth of prostate cancer is reflected by circulating tumor cells delivered from distinct, even small foci, harboring loss of heterozygosity of the PTEN gene." *Cancer Res* **66**(18): 8959-65.
- Scully, R. E. (1975). "World Health Organization classification and nomenclature of ovarian cancer." *Natl Cancer Inst Monogr* **42**: 5-7.
- Seidman, J. D., I. Horkayne-Szakaly, M. Haiba, C. R. Boice, R. J. Kurman, *et al.* (2004). "The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin." *Int J Gynecol Pathol* **23**(1): 41-4.
- Shield, K., M. L. Ackland, N. Ahmed and G. E. Rice (2009). "Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology." *Gynecol Oncol* **113**(1): 143-8.
- Shih Ie, M. and R. J. Kurman (2004). "Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis." *Am J Pathol* **164**(5): 1511-8.
- Shimizu, Y., K. Yasui, T. Kato, Y. Yamamura, T. Hirai, *et al.* (2004). "Implantation metastasis along the percutaneous transhepatic biliary drainage sinus tract." *Hepatogastroenterology* **51**(56): 365-7.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, *et al.* (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." *Science* **235**(4785): 177-82.
- Soslow, R. A. (2008). "Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview." *Int J Gynecol Pathol* **27**(2): 161-74.
- Soule, H. D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert and M. Brennan (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1409-16.
- Spizzo, G., P. Went, S. Dirnhofer, P. Obrist, H. Moch, *et al.* (2006). "Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer." *Gynecol Oncol* **103**(2): 483-8.
- Swennenhuis, J. F., A. G. Tibbe, R. Levink, R. C. Sipkema and L. W. Terstappen (2009). "Characterization of circulating tumor cells by fluorescence in situ hybridization." *Cytometry A* **75**(6): 520-7.
- Tan, D. S., R. Agarwal and S. B. Kaye (2006). "Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer." *Lancet Oncol* **7**(11): 925-34.
- Tarin, D., J. E. Price, M. G. Kettlewell, R. G. Souter, A. C. Vass, *et al.* (1984). "Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts." *Cancer Res* **44**(8): 3584-92.

- Tsuruchi, N., T. Kamura, N. Tsukamoto, K. Akazawa, T. Saito, *et al.* (1993). "Relationship between paraaortic lymph node involvement and intraperitoneal spread in patients with ovarian cancer--a multivariate analysis." Gynecol Oncol **49**(1): 51-5.
- van der Burg, M. E., F. B. Lammes and J. Verweij (1992). "CA 125 in ovarian cancer." Neth J Med **40**(1-2): 36-51.
- Vogel, I., H. Kalthoff, D. Henne-Bruns and B. Kremer (2002). "Detection and prognostic impact of disseminated tumor cells in pancreatic carcinoma." Pancreatology **2**(2): 79-88.
- Wagener, C. and O. Müller (1999). Molekulare Onkologie : Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen. Stuttgart u.a., Thieme.
- Wikman, H., R. Vessella and K. Pantel (2008). "Cancer micrometastasis and tumour dormancy." APMIS **116**(7-8): 754-70.
- Wimberger, P., M. Heubner, H. Lindhofer, M. Jager, R. Kimmig, *et al.* (2009). "Influence of catumaxomab on tumor cells in bone marrow and blood in ovarian cancer." Anticancer Res **29**(5): 1787-91.
- Wimberger, P., M. Heubner, F. Otterbach, T. Fehm, R. Kimmig, *et al.* (2007). "Influence of platinum-based chemotherapy on disseminated tumor cells in blood and bone marrow of patients with ovarian cancer." Gynecol Oncol **107**(2): 331-8.
- Wolfe, U., V. Muller and K. Pantel (2006). "Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance." Future Oncol **2**(4): 553-61.
- Wulfing, P., J. Borchard, H. Buerger, S. Heidl, K. S. Zanker, *et al.* (2006). "HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients." Clin Cancer Res **12**(6): 1715-20.
- Yu, D., J. K. Wolf, M. Scanlon, J. E. Price and M. C. Hung (1993). "Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A." Cancer Res **53**(4): 891-8.
- Zieglschmid, V., C. Hollmann and O. Bocher (2005). "Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood." Crit Rev Clin Lab Sci **42**(2): 155-96.



## 7 *Abbildungsverzeichnis*

<b>Abbildung 1.1:</b> Schematische Darstellung der metastatischen Kaskade.	7
<b>Abbildung 1.2 :</b> Metastatische Streuung des Ovarialkarzinoms.	12
<b>Abbildung 3.1:</b> Auftrennung von Blutproben durch Dichtegradientenzentrifugation.	34
<b>Abbildung 3.2:</b> Auftrennung von Blutproben durch <i>Ficoll-Paque<sup>TM</sup></i> Plus Dichtegradientenzentrifugation	36
<b>Abbildung 3.3:</b> Schematische Darstellung der immunzytochemischen Färbung zur Detektion von CTCs unter Verwendung von anti-Zytokeratin Antikörpern.	39
<b>Abbildung 3.4:</b> Schematische Darstellung der immunzytochemischen Färbung zur Detektion von CTCs unter Verwendung eines Antikörpercocktails.	40
<b>Abbildung 3.5:</b> Schematische Darstellung der immunzytochemischen Färbung zur Detektion von SK-OV-3 CTCs unter Verwendung von HER-2 und EpCAM Antikörpern.	41
<b>Abbildung 3.6:</b> Schematische Darstellung der immunzytochemischen Fluoreszenzdoppelfärbung zur Charakterisierung von CTCs.	44
<b>Abbildung 3.7:</b> Schematische Darstellung der APAAP-Färbung.	45
<b>Abbildung 4.1:</b> Detektionsmethode von CTCs.	69
<b>Abbildung 4.2:</b> Optimierung der immunzytochemischen anti- Zytokeratin- Färbung durch Antigen-demaskierung.	70
<b>Abbildung 4.3:</b> CTC (1) und Zellcluster (2) isoliert aus dem Blut von rezidierten Ovarialkarzinompatientinnen.	71
<b>Abbildung 4.4:</b> CTC (1) und Zellcluster (2) isoliert aus dem Blut von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom (Probe L063Q).	72
<b>Abbildung 4.5:</b> Kaplan-Meier-Überlebensanalysen für die Proben des Zeitpunktes Q (abgenommen vor der Operation).	76
<b>Abbildung 4.6:</b> Relative Anzahl der EpCAM, Zytokeratin, EMA, CD45 und Calretinin exprimierenden Asziteszellen.	77
<b>Abbildung 4.7:</b> Relative Anzahl von EpCAM und Zytokeratin exprimierenden Asziteszellen.	78
<b>Abbildung 4.8:</b> HER-2-Färbung zur Detektion von SK-OV-3 CTCs isoliert aus Mausblutproben.	80
<b>Abbildung 4.9:</b> HER-2/EpCAM-Doppelfärbung von SK-OV-3 Zellen.	80
<b>Abbildung 4.10:</b> HER-2/EpCAM-Doppelfärbung von SK-OV-3 CTCs isoliert aus Mausblutproben.	81
<b>Abbildung 4.11:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an SK-OV-3 Zellen.	82
<b>Abbildung 4.12:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an SK-OV-3 CTCs isoliert aus Mausblutproben. A und B:	83
<b>Abbildung 4.13:</b> Immunhistologische EpCAM- und HER-2-Färbung an Paraffingewebeschnitten der intraperitonealen Tumore der SCID-Mäuse.	83
<b>Abbildung 4.14:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an Paraffingewebeschnitten der intraperitonealen Tumore der SCID-Mäuse.	84
<b>Abbildung 4.15:</b> Modifizierte Detektionsmethode von CTCs.	86
<b>Abbildung 4.16:</b> Optimierung der immunzytochemischen Antikörpercocktail-CD45-Färbung.	87
<b>Abbildung 4.17:</b> CTCs isoliert aus dem Blut von Ovarialkarzinompatientinnen (Proben H079Q, B135Q, B146Q).	88
<b>Abbildung 4.18:</b> Kaplan-Meier-Überlebensanalysen.	94

<b>Abbildung 4.19:</b> Fragliche Zellen isoliert aus dem Blut von Ovarialkarzinompatientinnen (Probe B143Q, B111Q, L180Q).	95
<b>Abbildung 4.20:</b> Kaplan-Meier-Überlebensanalysen des krankheitsfreien Überleben der CTC negativ, CTC positiv und fragliche bewerteten Patientengruppen.	96
<b>Abbildung 4.21:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an CTCs.	100
<b>Abbildung 4.22:</b> CTCs isoliert aus Blutproben der Patientin B159, abgenommen zum Zeitpunkt Q (1: nach der Operation) und Zeitpunkt H (2: 6 Monate nach der Therapie)	102
<b>Abbildung 4.23:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an CTCs, isoliert aus Blutproben der Patientin B159, abgenommen zum Zeitpunkt Q (1: nach der Operation) und Zeitpunkt H (2: 6 Monate nach der Therapie).	102
<b>Abbildung 4.24:</b> Fragliche Zelle isoliert aus der Blutprobe B111Q.	103
<b>Abbildung 4.25:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 8q24 an fraglichen Zellen isoliert aus der Blutprobe B111Q.	104
<b>Abbildung 4.26:</b> CTCs isoliert aus der Blutprobe B151Q.	105
<b>Abbildung 4.27:</b> FISH-Analyse für die Chromosomenbereiche 3q26 (A und B) und 8q24 (C und D) an CTCs isoliert aus der Blutprobe B151Q.	105
<b>Abbildung 4.28:</b> FISH-Analyse für die Chromosomenbereiche 3q26 (A) und 8q24 (B) an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors der Patientin B151.	106
<b>Abbildung 4.29:</b> CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q.	107
<b>Abbildung 4.30:</b> Immunzytochemische Charakterisierung der CTCs aus Blutprobe H071Q.	108
<b>Abbildung 4.31:</b> Immunzytochemische Charakterisierung der CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q.	108
<b>Abbildung 4.32:</b> Immunzytochemische EpCAM-Färbung der CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q durch die APAAP-Methode.	109
<b>Abbildung 4.33:</b> Immunhistologische Zytokeratin- und EpCAM-Färbung an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors (A), der Milz- (B) und Lebermetastase (C) der Patientin H071.	110
<b>Abbildung 4.34:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors, der Milz- und Lebermetastase der Patientin H071.	111
<b>Abbildung 4.35:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 8q24 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors, der Milz- und Lebermetastase der Patientin H071.	112
<b>Abbildung 4.36:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q.	113
<b>Abbildung 4.37:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 8q24 an CTCs isoliert aus der Blutprobe H071Q.	113
<b>Abbildung 4.38:</b> FISH-Analyse für den Chromosomenbereich 3q26 an aus Aszites isolierten Zytokeratin exprimierenden Zellen der Patientin H071.	114
<b>Abbildung 4.39:</b> Immunhistologische p53-Färbung an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors (A), der Milz (B)- und Lebermetastase (C) der Patientin H071.	115
<b>Abbildung 4.40:</b> Identifizierung einer Mutation im <i>p53</i> -Gen des Exons 8 durch Sequenzierung.	115
<b>Abbildung 4.41:</b> Übersicht der Strategie zum Nachweis einer tumorspezifischen Mutation im <i>p53</i> -Gen aus genomischer DNA der Blutprobe H071Q.	116
<b>Abbildung 4.42:</b> Detektion der tumorspezifischen Mutation im <i>p53</i> -Gen des Exons 8 aus genomischer DNA der Blutprobe H071Q durch Sequenzierung.	117

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1:</b> Histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms.	2
<b>Tabelle 1.2:</b> Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms (TNM-Klassifikation und FIGO-Stadium).	3
<b>Tabelle 2.1:</b> Tumormasse der SCID-Xenograft-Mäuse.	18
<b>Tabelle 3.1:</b> Standardansatz zur Fluoreszenzmarkierung der FISH-Sonden.	53
<b>Tabelle 3.2:</b> FISH-Programm.	55
<b>Tabelle 3.3:</b> Standard PCR-Ansatz (20µl).	59
<b>Tabelle 3.4:</b> PCR Programm zur Amplifikation von DNA-Bereiche des <i>p53</i> -Gens.	60
<b>Tabelle 3.5:</b> Restriktionsansatz des Restriktionsenzym <i>Bst</i> NI.	61
<b>Tabelle 3.6:</b> Standard DNA-Sequenzieransatz.	62
<b>Tabelle 3.7:</b> Temperaturprogramm für die Sequenzierung.	62
<b>Tabelle 4.1:</b> Detektionsrate von Karzinomzellen und ihre Verteilung im Dichtegradienten.	68
<b>Tabelle 4.2:</b> Detektionsrate von CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit rezidivierter Ovarialkarzinomerkrankung.	71
<b>Tabelle 4.3:</b> Anzahl der detektierten CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit rezidivierter Ovarialkarzinomerkrankung.	71
<b>Tabelle 4.4:</b> Detektionsrate von CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom.	72
<b>Tabelle 4.5:</b> Anzahl der detektierten CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom und klinische Daten.	73
<b>Tabelle 4.6:</b> Klinische Daten des analysierten Patientenkollektives der OVCAD-Studie.	74
<b>Tabelle 4.7:</b> Klinische Daten zum Therapieansprechen und klinischen Verlauf des analysierten Patientenkollektives der OVCAD-Studie.	75
<b>Tabelle 4.8:</b> Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analyse für die Sonde 3q26 und der Referenzsonde Zentromer 7 an SK-OV-3 Zellen.	82
<b>Tabelle 4.9:</b> Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analysen für die Sonde 3q26 und die Referenzsonde Zentromer 7 an Paraffingewebeschnitten der Tumore der SCID Mäuse 2 bis 6.	85
<b>Tabelle 4.10:</b> Übersicht der Detektionsraten von CTCs aus Blutproben von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom unter Verwendung beider Detektionsprotokolle.	89
<b>Tabelle 4.11:</b> CTC Bewertung nach dem modifizierten Protokoll von Blutproben derselben Patientinnen beider Zeitpunkte Q und H.	89
<b>Tabelle 4.12:</b> Anzahl der detektierten CTCs nach dem modifizierten Protokoll aus Blutproben des Zeitpunktes Q (vor der Operation) von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom.	90
<b>Tabelle 4.13:</b> Anzahl der detektierten CTCs nach dem modifizierten Protokoll aus Blutproben des Zeitpunktes H (sechs Monate nach Therapie abgenommen) von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom.	90
<b>Tabelle 4.14:</b> Klinische Daten des analysierten Patientenkollektives der OVCAD-Studie.	91
<b>Tabelle 4.15:</b> Daten zum Therapieansprechen und klinischem Verlauf des analysierten Patientenkollektives der OVCAD-Studie.	93
<b>Tabelle 4.16:</b> Detektionsrate von negativ, fraglich und positiv bewertetem CTC-Status nach dem modifizierten Protokoll aus Blutproben von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom	96

---

<b>Tabelle 4.17:</b> <i>CGH-Array</i> -Daten für die Bereiche 3q26 und 8q24.	<b>97</b>
<b>Tabelle 4.18:</b> Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analyse für die Sonde 3q26 oder 8q24 und die Referenzsonde Zentromer 7 an Leukozyten von gesunden Spendern.	<b>99</b>
<b>Tabelle 4.19:</b> Häufigkeitsverteilung der Anzahl der FISH-Signale pro Zelle für die Sonde 3q26 oder 8q24 und der Referenzsonde Zentromer 7 an Leukozyten von gesunden Spendern.	<b>99</b>
<b>Tabelle 4.20:</b> Übersicht der Proben, die durch FISH analysiert wurden und Ergebnisse der Analysen der Detektion von CTCs mit chromosomalen Zugewinnen für die Bereiche 3q26 und 8q24.	<b>101</b>
<b>Tabelle 4.21:</b> Klinische Daten zur Patientin B159.	<b>102</b>
<b>Tabelle 4.22:</b> Klinische Daten zur Patientin B111.	<b>103</b>
<b>Tabelle 4.23:</b> Klinische Daten zur Patientin B151.	<b>104</b>
<b>Tabelle 4.24:</b> Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analysen für die Sonden 3q26 oder 8q24 und die Referenzsonde Zentromer 7 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors der Patientin B151.	<b>106</b>
<b>Tabelle 4.25:</b> Klinische Daten zur Patientin H071.	<b>107</b>
<b>Tabelle 4.26:</b> Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analyse für die Sonde 3q26 und die Referenzsonde Zentromer 7 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors, der Milz- und Lebermetastase der Patientin H071.	<b>111</b>
<b>Tabelle 4.27:</b> Übersicht der Ergebnisse der FISH-Analyse für die Sonde 8q24 und die Referenzsonde Zentromer 7 an Paraffingewebeschnitten des Primärtumors, der Milz- und Lebermetastase der Patientin H071.	<b>112</b>
<b>Tabelle 5.1:</b> Überblick der wichtigsten Arbeiten zum Nachweis von CTCs beim Ovarailkarzinom.	<b>125</b>
<b>Tabelle 9.1:</b> Klinische Daten zum Therapieansprechen und klinischen Verlauf des Patientenkollektives der OVCAD-Studie.	<b>150</b>
<b>Tabelle 9.2:</b> Klinische Daten des Patientenkollektives der OVCAD-Studie.	<b>151</b>

## 9 Anhang

### 9.1 p53-Sequenz der PCR-Amplifikate

Unterlegt Bereiche: Primerbindung

Kleinbuchstaben: Intronsequenz

Großbuchstaben: Exonsequenz

#### Exon 5/6 p53 Ampifikat (477 bp)

cacttg**tcctgacttt**aactctgtctccttctcttctacagTACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCA  
 AGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGTTGATCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATC  
 TACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGTGCTCAGATAGCGA  
 TGgtgagcagctggggctggagagacgacagggctggtgcccagggctcccagcctctgattcctcactgattgctcttagGTCTGGC  
 CCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGA  
 CATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCCTGAGGtctggttgcactggggtctctgggaggagg**ggttaaggggtggtgct**  
**agt**

#### Exon 7 p53 Amplifikat (267 bp)

**ctgcttgccacaggtctc**ccaagggcgactggcctcatcttgggctgtgttatctcctagGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCA  
 CTACAACTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACT  
 GGAAGACTCCAGgtcaggagccacttgcaccctgcacactggcctgctgtgccccagcctctgcttgccgctgaccctgggcca**ctt**  
**cttaccgatttctcca**

#### Exon 8/9 p53 Amplifikat (560 bp)

**ttaggctccagaaaggacaag**ggtggttgggagtagatggagcctggttttaaatgggacaggttaggacctgattccttactgcctcttgc  
 ttctctttcctatcctgagtagTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTTGTGCCTGTCTGGGA  
 GAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAG  
 CACTAAGCGAGgtaagcaagcaggacaagaagcgggtggaggagaccaaggggtgcagttatgcctcagattcactttatcacctttcct  
 tgctctttcctagCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATAT  
 TTCACCTTCAGgtactaagtcttggaccttatcaagtggaaagttccagcttaacactcaaatgccgtttcttcttgactgttttac  
 ctgcaattggggcatttgccatcagggggcagtgatgc**ctcaaagacaatggctcctg**

Exon 8 kleines p53 Amplifikat (132 bp)

TgatttccttactgctcttgccttctcttttctatcctgagtagTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTT  
TGTGCCTGTCCTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCG

**9.2 Aligment der Sequenz von Exon 8 des p53-Gens**

fPCR for H071 aus Blut: Sequenz des Exon 8 kleines Amplifikat des *p53-Gens* aus genomischer Leukozyten-DNA der Probe H071. Nachweis der tumorspezifischen Mutation.

Datenbank: Referenz-Sequenz des *p53-Gens* Exon 8 kleines Amplifikat.

↓ : Mutation

```

fPCR_for_H071_aus_Blut_   -----TGAGGT
Datenbank                 TTTCCTATCCTGAGTAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGT
                               *****

fPCR_for_H071_aus_Blut_   GCGTGTTTGTGCCTGTCTTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATC
Datenbank                 GCGTGTTTGTGCCTGTCTTGGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATC
                               *****

fPCR_for_H071_aus_Blut_   TCCGAG-----
Datenbank                 TCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAG
                               ****

```

**9.3 Klinische Daten des Patientenkollektives der OVCAD-Studie**

Tabelle 9.1: Klinische Daten zum Therapieansprechen und klinischen Verlauf des Patientenkollektives der OVCAD-Studie.

	Alle 275 Patientinnen der OVCAD-Studie	Alle analysierten Blutproben	
		Zeitpunkt der Operation Q (251)	Zeitpunkt nach Therapie H (135)
<b>Therapieansprechen</b>			
<i>Responder</i>	205 (74,5 %)	180 (71,7 %)	108 (80,0 %)
<i>Non-Responder</i>	69 (25,1 %)	61 (24,3 %)	27 (20,0 %)
fehlende Angaben	1	10	0
<b>Rezidiv oder verstorben aufgrund der Erkrankung</b>			
nein	195 (70,9 %)	82 (32,7 %)	45 (33,3 %)
ja	80 (29,1 %)	160 (63,7 %)	90 (66,7 %)
fehlende Angaben	0	9	0



Tabelle 9.2: Klinische Daten des Patientenkollektives der OVCAD-Studie.

	Alle 275		Alle analysierten Blutproben	
	Patientinnen der OVCAD-Studie		Zeitpunkt der Operation Q (251)	Zeitpunkt nach Therapie H (135)
<b>Histologie</b>				
klarzelliger Tumor	2 (0,7 %)		3 (1,2 %)	1 (0,7 %)
endometrioider Tumor	13 (4,7 %)		12 (4,8 %)	7 (5,2 %)
gemischter epithelialer Tumor	11 (4,0 %)		12 (4,8 %)	6 (4,4 %)
muzinöser Tumor	3 (1,1 %)		3 (1,2 %)	2 (1,5 %)
seröser Tumor	237 (86,2 %)		212 (84,5 %)	118 (87,4 %)
undifferenzierter Tumor	9 (3,3 %)		8 (3,2 %)	1 (0,7 %)
fehlende Angabe	0		1	0
<b>FIGO-Stadium</b>				
IIA	5 (1,8 %)		3 (1,3 %)	3 (2,2 %)
IIB	5 (1,8 %)		5 (2,0 %)	2 (1,5 %)
IIC	5 (1,8 %)		6 (2,4 %)	3 (2,2 %)
IIIA	5 (1,8 %)		6 (2,4 %)	1 (0,7 %)
IIIB	11 (4,0 %)		7 (2,8 %)	8 (5,9 %)
IIIC	196 (71,3 %)		179 (71,3 %)	98 (72,6 %)
IV	48 (17,5 %)		44 (17,5 %)	20 (14,8 %)
fehlende Angaben	0		1	0
<b>Histopathologisches Grading</b>				
G1	10 (3,6 %)		11 (4,4 %)	6 (4,4 %)
G2	64 (23,3 %)		61 (24,3 %)	28 (20,7 %)
G3	200 (72,7 %)		176 (70,1 %)	101 (74,8 %)
Gx	1 (0,4 %)		1 (0,4 %)	0 (0,0 %)
fehlende Angaben			0	0
<b>TNM-Klassifikation:</b>				
pT	0			
1b	1 (0,4 %)		1 (0,4 %)	1 (0,7 %)
1c	4 (1,5 %)		4 (1,6 %)	2 (1,5 %)
2a	6 (2,2 %)		4 (1,6 %)	3 (2,2 %)
2b	9 (3,3 %)		9 (3,6 %)	5 (3,7 %)
2c	5 (1,8 %)		6 (2,4 %)	1 (0,7 %)
3a	9 (3,3 %)		10 (4,0 %)	2 (1,5 %)
3b	24 (8,7 %)		21 (8,4 %)	12 (8,9 %)
3c	216 (78,6 %)		194 (77,3 %)	109 (80,7 %)
fehlende Angaben	1		2	0
pN				
N0	65 (23,6 %)		60 (23,9 %)	28 (20,7 %)
N1	143 (52,0 %)		135 (53,8 %)	65 (48,1 %)
NX	67 (24,4 %)		52 (20,7 %)	42 (31,1 %)
fehlende Angaben	0		4	0
M				
M0	142 (51,6 %)		118 (47,0 %)	82 (60,7 %)
M1	49 (17,8 %)		45 (17,9 %)	21 (15,6 %)
MX	84 (30,5 %)		81 (32,3 %)	32 (23,7 %)
fehlende Angaben	0		7	0
<b>Resttumor nach der Operation</b>				
kein Resttumor	188 (68,4 %)		165 (65,7 %)	96 (71,1 %)
<= 0.5 cm	25 (9,1 %)		23 (9,2 %)	9 (6,7 %)
0.5 - 1 cm	23 (8,4 %)		25 (10,0 %)	10 (7,4 %)
1 - 2 cm	8 (2,9 %)		8 (3,2 %)	4 (3,0 %)
> 2 cm	30 (10,9 %)		26 (10,4 %)	15 (11,1 %)
fehlende Angaben	1		4	1
<b>Aszites</b>				
vorhanden	209 (76,0 %)		190 (75,7 %)	109 (80,7 %)
nicht vorhanden	66 (24,0 %)		61 (24,3 %)	26 (19,3 %)
fehlende Angaben	0		0	0

## ***10 Danksagung***

Ich bedanke mich bei **allen Patientinnen**, die durch ihr Einverständnis zur Probenentnahme für Forschungszwecke für die OVCAD-Studie diese Arbeit möglich gemacht haben.

Bei Herrn **Prof. Dr. Burkhard Brandt** bedanke ich mich für die Überlassung des Promotionsthemas und die Betreuung der Arbeit auch nach seinem Weggang vom Institut.

Herrn **Prof. Dr. Klaus Pantel** danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchzuführen, besonders auch nach dem Weggang meines Betreuers Prof. Dr. Burkard Brandt. Weiterhin bedanke ich mich für die Begutachtung meiner Dissertation.

Herrn **Prof. Dr. Udo Wienand** danke ich für die Bereitschaft, diese Dissertation als Vertreter des Fachbereichs Biologie zu begutachten.

Ich danke dem **OVCAD-Team** für die gute und produktive Zusammenarbeit sowie der Europäischen Union, die dieses Projekt gefördert hat.

Herrn **Prof. Dr. Udo Schumacher und seiner Arbeitsgruppe** danke ich für die Bereitstellung des Probenmaterials der SCID-Xenograft-Mäuse.

Herrn **Dr. Heinz-Ulrich G. Weier** danke ich für die Bereitstellung der PAC-Klone zur Herstellung der FISH-Sonden.

Ich bedanke mich bei **allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Tumorbiologie** für die nette Arbeitsatmosphäre. Besonders möchte ich mich hier bei **Sandra Schwentesius** bedanken, die mir besonders am Anfang sehr geholfen hat, mich wohl zu fühlen. Bei **Corinna Eichelser, Isabel Stückrath** und **Katharina Möllmann** bedanke ich mich zusätzlich für das Korrekturlesen der Arbeit und bei **Dr. Natalia Bednarz-Knoll** für die Einarbeitung bei der Durchführung der FISH-Analysen.

Für die Unterstützung, Korrekturen und viele aufmunternden Worte bedanke ich mich herzlich bei **Nina Schmalstieg** und **Dr. Susanne Deckers**.

Besonders bedanke ich mich bei **meiner Familie**, die mich immer wieder aufgebaut und unterstützt hat!

**VIELEN DANK!**

## *11 Eidesstattliche Versicherung*

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 22.12.2011

Iris Alpers

(Iris Alpers)