

Universtätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Tumorbiologie

**Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden
Tumorzellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit
Glioblastoma multiforme und die Kultivierung von Tumorzellen**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades *Doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

an der Universität Hamburg

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

im Fachbereich Chemie

von

Carolin Müller

Hamburg, 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Heisig
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Pantel

Eingereicht: 06.05.2013

Datum der Promotion: 05.07.2013

In memoriam Hans-Uwe Fester

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	VI
ABSTRACT	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 KREBSERKRANKUNGEN	1
1.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME	2
1.2.1 GENETISCHE VERÄNDERUNGEN IN GLIOBLASTOMEN	4
1.2.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE MARKER	6
1.2.3 DISSEMINATION IM GEHIRN	7
1.2.4 EXTRANEURALE METASTASIERUNG	9
1.2.5 TUMOR-TRANSMISSION DURCH ORGANSPENDE	10
1.3 METASTASIERUNG	10
1.3.1 METASTATISCHE KASKADE	10
1.3.2 METHODEN ZUR ANREICHERUNG ZIRKULIERENDER TUMORZELLEN	13
1.3.3 METHODEN ZUR DETEKTION VON ZIRKULIERENDEN TUMORZELLEN	15
1.3.4 <i>IN VITRO</i> - EXPANSION VON ANGEREICHERTEN, ZIRKULIERENDEN TUMORZELLEN	15
1.4 EINZELZELLANALYSE	16
1.4.1 DETEKTION VON ZIRKULIERENDEN TUMORZELLEN IM BLUT VON PATIENTEN MIT <i>GLIOBLASTOMA MULTIFORME</i>	17
1.5 FRAGESTELLUNG	19
2 MATERIAL	21
2.1 GERÄTE, CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	21
2.2 PATIENTENMATERIAL	21
2.2.1 BLUT- UND GEWEBEPROBEN VON GLIOMPATIENTEN	21
2.2.2 PATIENTENMATERIAL ZUR TUMORZELLKULTIVIERUNG	21
2.3 VERWENDETE ZELLINIEN	22
3 METHODEN	23
3.1 ZELLKULTURTECHNIKEN	23
3.1.1 ALLGEMEINE ZELLKULTURTECHNIKEN	23
3.1.1.1 Auftauen der Zellen	23

3.1.1.2 Subkultivierung der Zellen	23
3.1.1.3 Einfrieren der Zellen	24
3.1.2 KULTIVIERUNGSTECHNIKEN ZUR PRIMÄRKULTUR VON TUMORZELLEN	24
3.1.2.1 Kultivierung von Primär-Tumorzellen auf Feederlayern	24
3.1.2.2 Isolierung von Zellklonen aus Mischkulturen	24
3.1.3 <i>SOFT-AGAR-ASSAY</i>	25
3.2 ANREICHERUNG VON TUMORZELLEN AUS PATIENTENMATERIAL	25
3.2.1 ANREICHERUNG VON CTCs/DTCs MITTELS <i>FICOLL</i> -DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION	25
3.2.2 ANREICHERUNG VON CTCs MITTELS <i>ROSETTESEP</i> [®] -ANTIKÖRPERCOCKTAIL	26
3.2.3 ANREICHERUNG VON CTCs/DTCs MITTELS MAGNETISCHER ZELLSEPARATION (<i>MAGNETIC CELL SEPARATION = MACS</i> [®])	27
3.2.4 ANREICHERUNG VON CTCs DURCH DAS <i>CELLSEARCH</i> [™] -SYSTEM	29
3.2.5 ANREICHERUNG VON TUMORZELLEN AUS BIOPSIEN VON TUMORPATIENTEN	30
3.2.5.1 Anreicherung von Tumorzellen aus Pleurapunktat	30
3.2.5.2 Isolierung der Tumorzellen aus Knochenmetastasen	30
3.2.6 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL MITTELS NEUBAUER-ZÄHLKAMMER	30
3.2.7 ANFERTIGUNG VON ZYTOSPINPRÄPARATEN	31
3.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION	32
3.3.1 IMMUNFLUORESZENZ-FÄRBUNG AN ZYTOSPINS	33
3.3.2 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG AN ZELLBEWACHSENEN <i>CHAMBER SLIDES</i>	33
3.3.3 FLUORESZENZFÄRBUNG AN LEBENDEN ZELLEN	34
3.3.4 IMMUNENZYMATISCHE DETEKTION MIT APAAP (ALKALISCHE-PHOSPHATASE-ANTI- ALKALISCHE-PHOSPHASE-KOMPLEX)	34
3.3.5 DIAMINO BENZIN (DAB)- IMMUNHISTOCHEMIE	36
3.4 EINZELZELLANALYSE VON CTCs UND ZELLINIENZELLEN	37
3.4.1 ISOLATION VON EINZELZELLEN	37
3.4.2 AMPLIFIKATION GENOMISCHER EINZELZELL-DNA	38
3.5 ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN	39
3.5.1 ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA	39
3.5.1.1 DNA-Isolierung aus Leukozyten	39
3.5.1.2 DNA-Isolierung aus Zelllinienzellen	40
3.5.1.3 DNA-Isolierung aus Primärtumoren	40
3.5.2 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	40
3.5.3 DNA SEQUENZIERUNG/MUTATIONSANALYSEN	40
3.5.4 VERGLEICHENDE GENOMISCHE HYBRIDISIERUNG	41

3.5.5	FLUORESCENZ- <i>IN-SITU</i> -HYBRIDISIERUNG (FISH)	42
3.5.5.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten	44
3.5.5.2	EGFR-FISH mit anschließender GFAP-IF an MNC	45
3.5.6	STATISTISCHE AUSWERTUNGEN	45
4	<u>ERGEBNISSE</u>	46
4.1	DETEKTION UND CHARAKTERISIERUNG VON CTCs AUS DEM BLUT VON GBM-PATIENTEN	46
4.1.1	ETABLIERUNG VON METHODEN ZUR DETEKTION UND CHARAKTERISIERUNG VON CTCs IM PERIPHEREN BLUT VON GLIOMPATIENTEN	46
4.1.1.1	Etablierung einer Anreicherungsmethode für CTCs glialen Ursprungs	46
4.1.1.2	Etablierung einer Detektionsmethode für CTCs glialen Ursprungs	48
4.1.1.3	Molekulare Einzelzellanalyse	51
4.1.1.4	Etablierung einer Analyse der EGFR-Genamplifikation in CTCs glialen Ursprungs	52
4.1.1.5	Mutationsanalyse von Einzelzellen	54
4.1.2	DETEKTION UND CHARAKTERISIERUNG VON CTCs AUS PERIPHEREN BLUT VON GLIOMPATIENTEN	56
4.1.2.1	Fallbericht eines Patienten mit metastasiertem anaplastischen Astrozytom, Grad III (G-10)	57
4.1.3	DETEKTION VON CTCs IM PERIPHEREN BLUT VON GLIOMPATIENTEN	58
4.1.3.1	Detektion von CTCs im peripheren Blut von GBM-Patienten	58
4.1.3.2	Detektion von CTCs im peripheren Blut von Nicht-GBM-Patienten mit Tumoren glialen Ursprungs	59
4.1.4	KORRELATION KLINISCH-PATHOLOGISCHER EIGENSCHAFTEN DER PRIMÄRTUMOREN UND DER PRÄSENZ VON CTCs IM BLUT VON GBM-PATIENTEN	60
4.1.4.1	Kaplan-Meier-Überlebenskurve	60
4.1.4.2	Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von CTCs und klinisch-pathologischen Charakteristika von GBM-Patienten	61
4.1.5	MOLEKULARE EINZELZELLANALYSE AN CTCs AUS DEM BLUT VON GLIOMPATIENTEN	64
4.1.5.1	Identifikation von EGFR-Genamplifikationen in CTCs von GBM-Patienten	65
4.1.5.2	Detektion von chromosomalen Aberrationen durch Array-CGH	70
4.1.5.3	FISH-Analyse zur Detektion eines Chromosom 3-Zugewinns im Primärtumor	72
4.1.5.4	Mutationsanalyse von CTCs	73
4.1.6	ZUSÄTZLICHE CHARAKTERISIERUNG DES PRIMÄRTUMOR- UND METASTASEN-	

GEWEBES DES METASTASIERTEN ASTROZYTOMPATIENTEN (G-10)	76
4.2 KULTIVIERUNG VON CTCs UND DTCs AUS BLUT-/ KNOCHENMARK-PROBEN VON KARZINOMPATIENTEN	79
4.2.1 ETABLIERUNG UND OPTIMIERUNG GEEIGNETER METHODEN ZUR KULTIVIERUNG VON CTCs UND DTCs	80
4.2.1.1 Wahl einer Anreicherungsmethode zur Kultivierung von CTCs und DTCs	80
4.2.1.2 Optimierung der Kulturbedingungen zur Expansion von CTCs und DTCs	81
4.2.2 <i>IN VITRO</i> -EXPANSION VON CTCs UND DTCs	86
4.2.2.1 Kultivierung von CTCs aus dem peripheren Blut von Mammakarzinom-Patientinnen	87
4.2.2.2 In vitro-Proliferation von CTCs/DTCs	87
4.2.3 KULTIVIERUNG VON MNC DES KNOCHENMARKS EINES HARNBLASEN-KARZINOM-PATIENTEN MIT KNOCHENMETASTASEN	89
4.2.3.1 Morphologie der BLC-1-Zellen	90
4.2.3.2 Phänotypische Charakterisierung der BLC-1-Zellen	91
4.2.3.3 Genotypische Charakterisierung der BLC-1-Zellen	93
5 DISKUSSION	97
5.1 DETEKTION UND CHARAKTERISIERUNG VON CTCs IM BLUT VON GBM-PATIENTEN	97
5.1.1 METHODISCHE ASPEKTE DER EINZELZELLANALYSE	98
5.1.2 GENETISCHE ABERRATIONEN IM KORRESPONDIERENDEN TUMORGEWEBE	99
5.1.2.1 EGFR-Genamplifikation	100
5.1.2.2 Verlust von Chromosom 10	103
5.1.2.3 Zugewinn von Chromosom 12	104
5.1.2.4 Mutationen im <i>TP53</i> -Gen	104
5.1.3 HETEROGENITÄT DER GFAP-EXPRESSION IM PRIMÄRTUMOR CTC-POSITIVER PATIENTEN	105
5.1.4 EXTRAKRANIALE METASTASEN	106
5.1.5 FEHLENDER NACHWEIS VON CTCs IM BLUT EINES PATIENTEN MIT METASTASIERTEM ASTROZYTOM	108
5.2 KULTIVIERUNG VON TUMORZELLEN VON KARZINOMPATIENTEN	109
5.2.1 KULTIVIERUNG VON CTCs/DTCs AUS BLUT- UND KNOCHENMARKPROBEN VON KARZINOMPATIENTEN	109
5.2.1.1 Anreicherungsmethode und Anfangszelldichte der zu kultivierenden CTCs	110

5.2.1.2	Charakteristika der CTCs/DTCs	111
5.2.1.3	Optimierung des Kulturmediums und der Kulturbedingungen	113
5.2.2	KULTIVIERUNG VON METASTASIIERTEN TUMORZELLEN	115
6	AUSBLICK	116
<hr/>		
	LITERATURVERZEICHNIS	118
<hr/>		
	ANHANG	A- 1
<hr/>		
I.	PATIENTENKOLLEKTIVE	A- 1
	DETEKTION UND CHARAKTERISIERUNG VON CTCs IM BLUT VON GBM-PATIENTEN	A- 1
	PRIMÄRKULTUR VON TUMORZELLEN	A- 9
II.	ZUSÄTZLICHE ABBILDUNGEN	A-13
III.	MATERIALIEN	A-17
	VERWENDETE PRIMER	A-19
	VERWENDETE ANTIKÖRPER	A-21
	PUFFER UND LÖSUNGEN	A-22
	ALLGEMEINE VERBRAUCHSMATERIALIEN	A-23
	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	A-24
	GERÄTE	A-26
<hr/>		
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	A-28
<hr/>		
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	A-30
<hr/>		
	TABELLENVERZEICHNIS	A-32
<hr/>		
	VERWENDETE GEFAHRENSTOFFE	A-34
<hr/>		
	DANKSAGUNG	A-36
<hr/>		
	WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN	A-37

Zusammenfassung

Das *Glioblastoma multiforme* (GBM) ist der bösartigste hirneigene Tumor im Erwachsenenalter. Trotz seiner ausgeprägten Aggressivität aufgrund eines invasiven und infiltrativen Wachstums disseminierter Tumorzellen innerhalb des Gehirns konnten bisher keine zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) im peripheren Blut von GBM-Patienten detektiert werden. Dennoch werden in seltenen Fällen extrakraniale Metastasen zumeist im Knochen, in den Lymphknoten, der Leber oder der Lunge detektiert. Auch die Transmission des GBM in Folge von Organspenden konnte in Fallbeobachtungen beschrieben werden. Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand darin, die ersten Hinweise auf das Vorliegen von CTCs in Patienten mit histologisch gesichertem GBM zu bestätigen und hierdurch die hämatogene Disseminierung von GBM-Zellen als Ausgangspunkt für die seltene systemische Metastasierung zu belegen. Dafür wurden zunächst Anreicherungs- und Detektionsmethoden für epitheliale CTCs an die Eigenschaften glialer Zellen angepasst bzw. für diese neu etabliert. Als Anreicherungsverfahren wurde die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation gewählt. Zur Detektion der angereicherten CTCs wurde eine Immunfärbung etabliert, die eine Identifikation der CTCs basierend auf ihrer Expression des sauren Gliafaserproteins (*Glial Fibrillary Acid Protein* = GFAP) ermöglicht. Die Spezifität dieser Immunfärbung wurde an angereicherten mononukleären Zellen des Blutes (MNC) aus gesunden Probanden sowie aus Karzinompatienten, bei denen Gehirnmetastasen diagnostiziert wurden, gezeigt. In Blutproben dieser beiden Kontrollgruppen wurden keine GFAP-positiven Zellen detektiert. Zum Nachweis des malignen Ursprungs GFAP-positiver Zellen wurden der Einzelzelltransfer, die sich daran anschließende Vermehrung der DNA über die WGA-Reaktion sowie Mutations-, Amplifikations- und FISH-Analysen an Einzelzellen von GBM-Zelllinien etabliert. Bei 23,7 % (27/114) der untersuchten GBM-Patienten konnten CTCs im Blut detektiert werden. Bei zwei dieser CTC-positiven Patienten wurde die maligne Herkunft dieser Zellen durch CGH-Analysen (*Comparative Genomic Hybridisation* = CGH) bewiesen. Des Weiteren konnten klinisch-pathologische Charakteristika der Primärtumore mit der Präsenz von CTCs im Patienten korreliert werden. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CTC-Detektion und einer heterogenen GFAP-Expression bzw. einer starken EGFR-Amplifikation im Primärtumor. Außerdem konnten CTCs häufiger bei weiblichen als bei männlichen Patienten detektiert werden. Durch CGH-Analysen an durch WGA amplifizierter DNA aus Einzelzellen wurden Verluste auf dem Chromosom 10 sowie Zugewinne auf den Chromosomen 7 und 12 als häufige Aberrationen sowohl in Primärtumoren von CTC-positiven Patienten als auch in den analysierten CTCs selbst identifiziert. Der Nachweis von CTCs im Blut von GBM-Patienten könnte einen Hinweis darauf geben, dass systemische Metastasen

weit häufiger auftreten als bisher vermutet. In der nur kurzen Nachbeobachtungszeit der in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten konnten jedoch keine Fernmetastasierungen diagnostiziert werden. Die Detektion weiterer histopathologischer Parameter der Tumoren, welche die Fähigkeit zur hämatogenen Dissemination begünstigen, könnte zur Identifikation von CTC-positiven GBM-Patienten führen, die als Organdonatoren ausgeschlossen werden können. Dadurch könnten Organe von verstorbenen CTC-negativen GBM-Patienten möglicherweise zur Organtransplantation zugelassen werden, während gleichzeitig das Risiko einer Tumortransmission gesenkt werden würde. Die molekulare Charakterisierung der CTCs könnte darüber hinaus die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien, die sich gezielt gegen die in bzw. auf CTCs identifizierten Zielmoleküle richten, unterstützen (z.B. Anti-EGFR oder Anti-EGFRvIII-Therapie).

Da die molekulare Einzelzellanalyse von CTCs/DTCs bisher auf die genotypische Analyse beschränkt ist, gewinnt die weitere funktionelle Analyse dieser Zellen zunehmend an Bedeutung. Die erfolgreiche Etablierung von Zelllinien aus CTCs/DTCs konnte bisher nur in sehr wenigen Fällen beschrieben werden. Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich daher mit der *in vitro*-Expansion von CTCs/DTCs aus Blut- bzw. Knochenmarkproben zunächst von Karzinompatienten, da die prognostische Bedeutung von DTCs/CTCs in Patienten mit epithelialen malignen Tumoren durch eine Vielzahl von klinischen Studien belegt ist. Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen wurden native Tumorzellen aus Pleurapunktaten von Karzinompatienten isoliert und kultiviert. Hierfür wurden verschiedene Anreicherungsmethoden im Hinblick auf den Vitalitätserhalt dieser Zellen getestet. Da nach der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation gerade bei geringer Tumorzellzahl das beste Wachstum zu beobachten war, wurden CTCs/DTCs aus Patientenproben weiterhin mit dieser Methode angereichert. Des Weiteren wurden für die Kultivierung der Tumorzellen der Einsatz von murinen Fibroblasten als *Feederlayer*-Zellen, von verschiedenen Medienkompositionen und unterschiedlichen CO₂-Konzentrationen getestet. In 4/216 (1,9 %) Patientenproben konnte eine Proliferation von epithelialen Zellen beobachtet werden, die sich allerdings nicht langfristig fortführen ließ. Durch die Optimierung der Wachstumsbedingungen konnte zusätzlich jeweils eine Zelllinie aus Tumorzellen des Pleurapunktates einer Mammakarzinompatientin sowie von Tumorzellen des Knochenmarks eines Harnblasenkarzinompatienten mit diagnostizierten Knochenmetastasen etabliert werden. Die weitere Charakterisierung dieser Zellen, insbesondere im Hinblick auf deren herabregulierte EpCAM-Expression könnte neue Erkenntnisse, z.B. über das Metastasierungspotenzial dieser Zellen liefern. Diese neu etablierten Zelllinien könnten als Ausgangsmaterial für weitere tumorbiologische Untersuchungen sowie für Testungen der Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber verschiedenen Therapeutika eingesetzt werden.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most common and aggressive malignant brain tumours in adults. Although this tumour is associated with a strong dissemination of tumour cells within the brain, circulating tumour cells (CTCs) have not yet been detected in the peripheral blood of patients. However, extracranial metastases have been reported in rare cases, located mainly in bone, lymph, nodes, liver or lung. Moreover, the development of secondary metastases in transplanted organs from donor GBM patients in initially cancer free recipients has been observed. The aim of the present study was therefore to confirm these first hints for a hematopoietic dissemination of GBM cells as point of origin for rare systemic metastases by proofing the presence of CTCs in patients with GBM.

For CTC enrichment and detection in GBM patients, methods previously established for the detection of CTCs derived from malignant epithelial tumours were adapted for the detection of tumour cells of glial origin. Thus, *Ficoll* density gradient centrifugation was used for CTC enrichment. To identify tumour cells within the enriched mononuclear cells (MNC) an immunostaining method was developed based on the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP). The specificity of the staining was verified on MNC enriched from the blood of healthy volunteers and carcinoma patients with brain metastasis. No GFAP-positive cells were detected in the blood samples from either of these control groups. To prove the malignant origin of putative CTCs, the cells were further analysed for genomic changes such as chromosomal aberrations, gene mutations and gene amplifications.

GFAP-positive cells were detected in blood samples from 27/114 (23.7%) patients with GBM. GFAP-positive cells were more frequently detected in patients with EGFR gene amplification and heterogeneous GFAP expression in the corresponding tumour than in patients with no EGFR amplification in the primary. Furthermore, GFAP-positive cells were found more frequently in female than in male patients. A further analysis of individual GFAP-positive cells and DNA isolated from the corresponding primary tumours of two cases by chromosomal and array CGH, revealed shared genomic aberrations such as gains on chromosomes 7 and 12 and losses on chromosome 10.

The presence of CTCs in the blood of GBM patients may indicate that systemic metastasis occur much more frequently in GBM patients than currently assumed. However, due to the short survival time of the patients in the present study no distant metastases were diagnosed. The identification of further histopathological parameters in tumours, favouring hematopoietic dissemination could enable the identification of CTC-positive GBM patients. These patients could then be excluded from becoming organ donors while CTC-negative GBM patients could still act as organ donors because of the lower risk of tumour transmission. In addition the

molecular characterization of single CTCs could support the development of new therapeutic strategies, directed against identified target molecules in/on CTCs (i.e. anti-EGFR or anti-EGFRvIII-therapy).

Up to now the molecular single cell analysis of single CTCs/DTCs has been limited to genotype analysis. Thus, a further functional analysis of these cells, for example through the establishment of cell lines from DTCs/CTCs is of increasing importance. So far, the successful establishment of cell lines from CTCs/DTCs has been reported only very rarely. The second aim of the present study was therefore the *in vitro* expansion of CTCs/DTCs derived from blood or bone marrow samples. Owing to the prognostic relevance of CTCs/DTCs that has been demonstrated in multiple clinical studies of patients with epithelial tumours, samples from carcinoma patients were used for this purpose.

To optimize cell growth conditions, native tumour cells were isolated from pleural effusions from carcinoma patients and cultivated. The performance of different enrichment methods was tested, with regard to maintaining cell viability. Further parameters for the cultivation of tumour cells were also optimized, such as medium compositions, CO₂-concentration and the use of murine fibroblasts as feeder layer cells. The proliferation of epithelial cells was detected in 4/216 patient samples. However, long term culture of these cells was not possible.

By optimizing culture conditions we were able to generate one cell line with tumour cells from pleural effusion of one patient with mammary carcinoma and from MNC from one bladder cancer patient with bone metastasis. Further characterization of these cells, especially with regard to their down regulated EpCAM expression could give i.e. further information of the metastatic potential of these cells. These newly generated cell lines could be used as starting material for further tumour biological studies and to find out the response of these cells to different therapeutic approaches.

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

Krebserkrankungen sind nach Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache in den westlichen Ländern. Der Begriff „Krebs“ wird durch die Weltgesundheitsorganisation (*WHO*) folgendermaßen definiert: „Krebs ist jede Neubildung in Form eines spontanen, autonomen und irreversiblen Überschusswachstums von körpereigenen Gewebe.¹ Es gibt mehr als 100 unterschiedliche Typen von Krebserkrankungen. Voraussetzung für die Entstehung eines Tumors ist die sogenannte Transformation, der Übergang einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle. Da Tumoren durch klonales Wachstum entstehen, muss mindestens eine gesunde Zelle in eine Tumorzelle übergegangen sein.¹ Im Jahr 2000 postulierten Hanahan und Weinberg, dass alle Veränderungen des Genotyps einer Krebszelle in sechs grundlegende Veränderungen der Zellphysiologie eingeordnet werden können, die zusammen das maligne Wachstum bestimmen. Bei diesen sechs Mechanismen handelt es sich um die Erhaltung der proliferativen Signalwege, die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, die Inaktivierung des programmierten Zelltodes (Apoptose), ein unlimitiertes proliferatives Potential, die Initiierung der Neo-Angiogenese und die Fähigkeit der Zellen in Gewebe zu invadieren bzw. zu metastasieren.²

Neue Forschungsergebnisse veranlassten Hanahan und Weinberg 2011 zusätzliche Mechanismen der Tumorpathogenese, wie die Deregulierung von zellulären Metabolismen, die Fähigkeit zur Umgehung der körpereigenen Immunabwehr, die genomische Instabilität und das Auftreten von Mutationen sowie von tumorunterstützenden Entzündungen als weitere Hauptmerkmale der Krebserkrankung aufzunehmen. Durch jede dieser Veränderungen während der Tumorgenese erwirbt die Zelle neue Fähigkeiten, durch die körpereigene Abwehrmechanismen erfolgreich umgangen werden können.^{2,3}

Eine grobe Einteilung verschiedener Tumoren kann nach der Gewebeart, aus der sich die Tumoren entwickelt haben, unternommen werden. Hierzu gehören Karzinome, die von epithelalem Gewebe abstammen, Sarkome, die aus mesenchymalen Zellen (Binde- und Stützgewebe) entstehen sowie Blastome, die ihren Ursprung im embryonalen Gewebe oder Organen haben. Maligne Lymphome gehen vom lymphoretikulären Gewebe aus und Leukämien gehen aus Vorläuferzellen des Blutes hervor. Während Karzinome, Sarkome und Blastome zu den soliden Tumoren gehören, werden maligne Lymphome und Leukämien zu den Systemerkrankungen gezählt.⁴

1.2 Glioblastoma multiforme

Primäre Tumoren glialen Ursprungs des zentralen Nervensystems (ZNS) werden unter dem Begriff „Gliom“ zusammengefasst. Zu den Gliazellen gehören ependymale Zellen, Oligodendrozyten und Astrozyten (Abbildung 1-1). Aus den am häufigsten im ZNS vorkommenden Zellen, den Astrozyten, entwickeln sich Astrozytome. Diese stellen die häufigste Art der ZNS-Neoplasien dar.⁵ Die jährliche Inzidenz von malignen Gliomen liegt bei ca. 5 Fällen pro 100.000 Einwohner. In den USA werden jährlich 14.000 Neuerkrankungen verzeichnet.⁶ In 60-70 % der Fälle wird das Gliom als *Glioblastoma multiforme (GBM)* diagnostiziert. Dies ist der aggressivste, hirneigene Tumor bei Erwachsenen.⁷

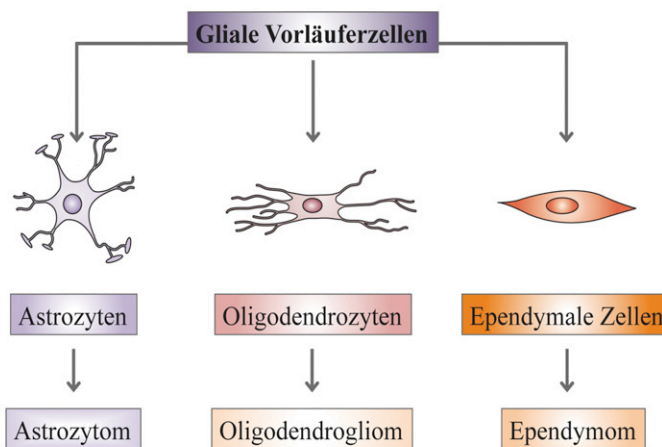


Abbildung 1-1: Gliale Zellen und Gliome. Zu den glialen Zellen gehören verschiedene Zelltypen, die zu bestimmten Tumortypen heranwachsen können. Diese Tumoren werden als Gliome klassifiziert (modifiziert nach Rao *et al.*⁵).

Die Ursachen für die Entstehung eines Glioblastoms sind bis heute nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass Berufsgruppen, die mit bestimmten Chemikalien oder Strahlung in Berührung kommen (Physiker, Chemiker, Textilindustrie, Landwirte), gefährdeter sind, als andere Gruppen. Auch industrialisierte Länder mit einem höheren sozialwirtschaftlichen Status zeigen eine höhere Inzidenz an Neuerkrankungen als bspw. Entwicklungsländer. Des Weiteren stehen bestimmte Ernährungsmuster, Bestrahlung, Radiofrequenzen oder auch Virusinfektionen in Verdacht, eine Tumorentwicklung zu begünstigen. Verschiedene familiäre Krebs syndrome, wie z.B. das Li-Fraumeni-Syndrom oder die Neurofibromatose 1 bzw. 2 sind mit der Entstehung von Tumoren im ZNS eng verbunden.⁸

Zur Behandlung eines GBM wird nach der Diagnose eine maximale operative Resektion des Primärtumors durchgeführt. Im Anschluss folgt eine Radiotherapie mit gleichzeitiger Chemotherapie. Maligne Gliome können allerdings nicht komplett operativ entfernt werden, da

die Tumorzellen typischerweise in das umgebende, gesunde Gewebe infiltrieren. So kehren ca. 90 % der Tumoren an der gleichen Stelle zurück. Die mittlere Überlebenszeit von GBM-Patienten liegt lediglich bei 12 bis 15 Monaten.⁶

Die WHO teilt Astrozytome nach ihren histopathologischen Merkmalen entsprechend ihres malignen Grades in verschiedene Gruppen ein. Das GBM wird hierbei dem schwersten Grad IV zugeordnet. Diese hochmalignen Tumoren entwickeln sich entweder *de novo* (primäres Glioblastom) oder als Ergebnis einer malignen Progression aus einem niedriggradigen Astrozytom (sekundäres Glioblastom) (Abbildung 1-2).⁹

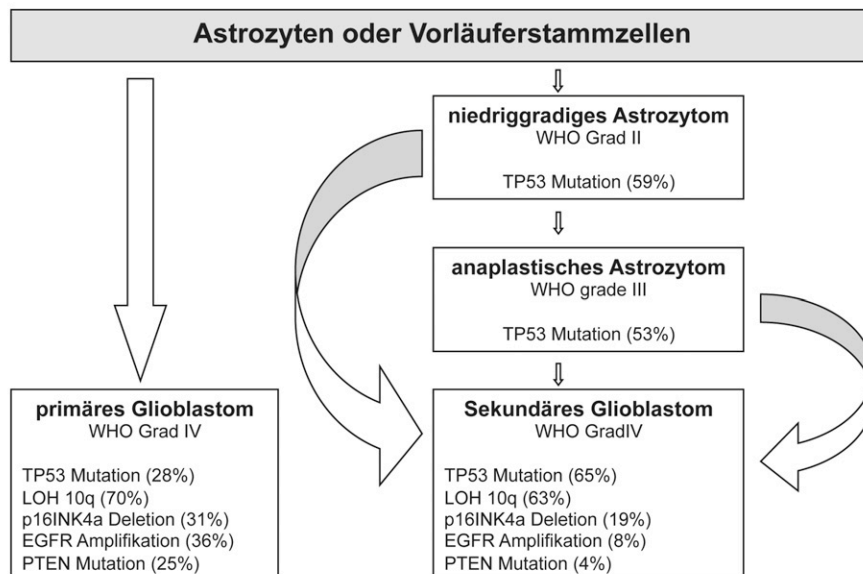


Abbildung 1-2: WHO-Klassifizierung von Astrozytomen (modifiziert nach Ohgaki *et al.*¹⁰).

Das primäre GBM ist häufiger bei Patienten zu finden, die älter als 50 Jahre sind. Typische genetische Veränderungen hierbei sind Verluste der Heterozygotie (*Loss of heterozygosity = LOH*) von Chromosom 10q, *EGFR*-Amplifikationen und -Mutationen, Deletionen des *PTEN* (Phosphatase und Tensin Homologie) -Gens auf Chromosom 10 bzw. *PTEN*-Mutationen sowie *p16*-Deletionen. Das sekundäre GBM manifestiert sich hingegen in jüngeren Patienten zunächst als niedriggradiges oder anaplastisches Astrozytom. Über eine Periode von mehreren Jahren transformiert dieser Tumor zu einem Glioblastom Grad IV. Charakteristisch sind hierbei *TP53*-Mutationen, die sich im Gegensatz zum primären Glioblastom schon früh und zudem sehr häufig in niedrigeren Graden der Tumorprogression erkennen lassen.⁶

1.2.1 Genetische Veränderungen in Glioblastomen

Charakteristische genetische Veränderungen von Glioblastomen sind LOH von 10q, *EGFR*-Amplifikationen/-Mutationen, *PTEN*-Deletionen/-Mutation oder Mutationen im *TP53*-Gen. Das *Cancer genome atlas research* - Netzwerk hat nach der Analyse von verschiedenen Glioblastom-Kohorten drei veränderte Haupt-Signalwege in der Entwicklung des Tumors zusammengefasst, die in Abbildung 1-3 skizziert sind.

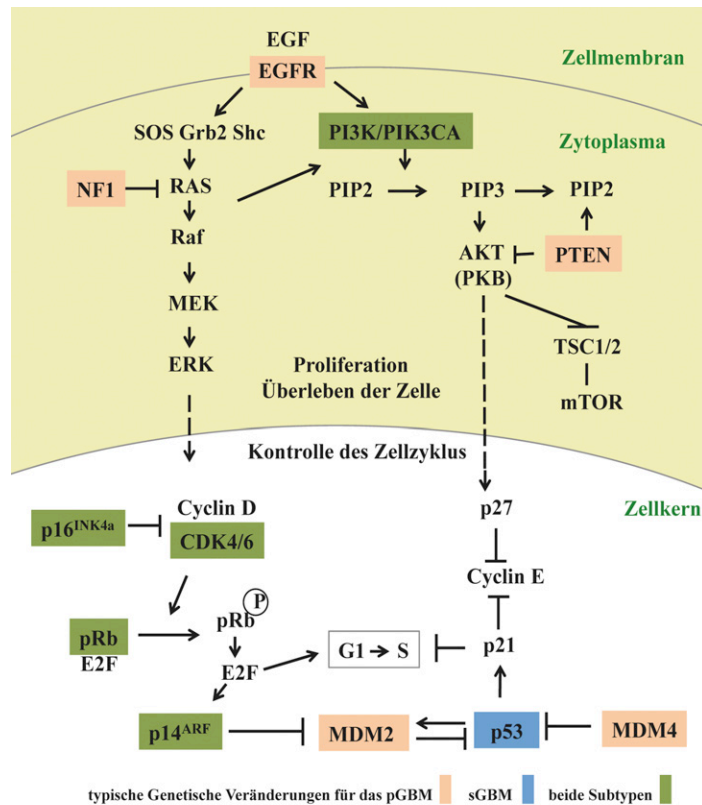


Abbildung 1-3: Signalwege, die hauptsächlich in der Pathogenese von Glioblastomen involviert sind.¹¹

I) TP53/MDM2/MDM4/p14^{ARF} Signalweg

Das *TP53*-Gen codiert ein Protein, welches eine entscheidende Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen spielt. Hierzu zählen die Zellzyklus-Kontrolle, die Reaktionen der Zellen auf DNA-Schäden, der Zelltod sowie die Zelldifferenzierung. Ist die DNA einer Zelle geschädigt, wird MDM2 durch das Wildtyp TP53 induziert. MDM2 bindet jedoch sowohl an die Mutante als auch an den TP53-Wildtyp. Dadurch wird die Aktivierung der Transkription durch Wildtyp TP53 inhibiert. Das Tumorsuppressorprotein p14^{ARF} bindet an MDM2 und

inhibiert den MDM2-vermittelten TP53-Abbau. Auch MDM4 reguliert die TP53-Aktivität und p14^{ARF} wird durch TP53 negativ reguliert.

Mutationen im *TP53*-Gen treten im sekundären GBM häufiger als im primären GBM auf (65 % vs. 28 %). Mutationen im sekundären GBM lassen sich zu 57 % in *Hot-Spot*-Regionen, wie Codon 248 und 273 detektieren. Im primären GBM hingegen sind die Mutationen über das ganze Gen verteilt. Die Methylierung des Promotors von p14^{ARF} wird häufiger in sekundären GBM beobachtet. In primären GBM überwiegt der Verlust der p14^{ARF}-Expression aufgrund einer homozygoten Deletion (50 %). Eine Mutation des MDM2-Gens kommt seltener im GBM vor (<15 %). Mindestens eine dieser Veränderungen dieses Signalweges kann in 50 % der primären und in >70 % der sekundären GBM detektiert werden.¹¹

II) p16^{INK4a}/CDK4/RB1 Signalweg

Das RB1-Protein kontrolliert den Übergang von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus. Der CDK4/Cyclin D1-Komplex phosphoryliert das RB1-Protein. Dadurch werden E2F-Transkriptionsfaktoren freigegeben. Diese aktivieren u. a. Gene, die in den G₁-S Übergang involviert sind. p16^{INK4a} bindet an CDK4 und inhibiert den CDK4/Cyclin D1-Komplex. Dieser hemmt dadurch den G₁-S Übergang. Demnach kann der Verlust einer normalen RB1-Funktion aus veränderten Expression vom *p16^{INK4a}*, *CDK4* oder *RB1*-Gene resultieren. Die homozygote Deletion des *p16^{INK4a}*-Gens, eine *CDK4*-Amplifikation und der Verlust von *RB1* schließen sich gegenseitig aus. Mutationen in diesen Genen sind in 50 % der primären GBM und in ca. 40 % der sekundären GBM zu beobachten.¹¹⁻¹³

III) EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K Signalweg

Wachstumsfaktorrezeptoren, wie z.B. EGFR und PDGFRA werden durch die Bindung ihrer jeweiligen Liganden an ihre extrazelluläre Domain (z.B. EGF, TGF- α , PDGF) aktiviert. Dadurch wird Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) an die Zellmembran rekrutiert. PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), welches wiederum *Downstream*-Effektor-Moleküle, wie AKT (Proteinkinase B) und mTOR aktiviert. Als Folge werden das Überleben der Zelle und deren Proliferation gefördert. *PIK3CA*-Mutationen und -Amplifikationen sind sowohl im primären als auch im sekundären GBM sehr selten (5 % und 13 %).^{1,11} Die Rückreaktion von PIP₃ zu PIP₂ wird durch PTEN katalysiert. PTEN inhibiert also das PIP₃-Signal und somit die Zellproliferation. PTEN ist demnach ein negativer Regulator der Kinase AKT und somit ein Tumorsuppressorprotein. Das *PTEN*-Gen ist zu 15-40 % in den primären GBM mutiert, in

sekundären GBM jedoch nur sehr selten. Das *NFI*-Tumorsupressorgen codiert Neurofibromin, das primär als ein negativer RAS-Regulator fungiert.¹¹

Die Amplifikation des *EGFR*-Gens und die daraus resultierende Überexpression des EGFR-Proteins ist die häufigste genetische Veränderung in primären GBM (40 %).¹⁴ Zeigen GBM eine Überexpression von EGFR, so verfügen von diesen 63-75 % über ein verändertes *EGFR*-Gen. Hierbei werden sowohl das mutierte EGFR-Protein als auch das Wildtyp-Protein gleichzeitig im Tumor exprimiert. Die häufigste Mutation des *EGFR*-Gens im GBM ist *EGFRVIII* (in 20-30 % in allen GBM und in 50-60 % aller *EGFR*-amplifizierten GBM). Bei dieser Mutation handelt es sich um den Verlust von Exon 2 bis 7 des *EGFR*-Gens bzw. um eine *Inframe*-Deletion von 267 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne des Rezeptors. Bisher wurde diese Mutation nicht in gesundem Gewebe gefunden. Auch in sekundären Glioblastomen wird diese Mutation weniger häufig detektiert.^{15, 16} Des Weiteren treten *EGFR*-Gen-Amplifikationen häufig als extrachromosomale Fragmente, *Double Minutes* (dmins), im GBM auf.^{17, 18} Hierbei handelt es sich um eine Ansammlung extrachromosomaler DNA-Moleküle, die vom Chromosom 7 stammen.¹⁹

Ungefähr zwei Drittel aller primären GBM und ein Drittel der sekundären GBM weisen Veränderungen in mindestens einem der folgenden Gene auf: *EGFR*, *PTEN*, oder *PIK3CA* - Gen. Insgesamt zeigten 88 % der GBM Veränderungen im EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K Signalweg.¹¹

1.2.2 Immunhistochemische Marker

Zur Klassifizierung bzw. neuropathologischen Differenzierung von malignen Gliomen sowie zur Abgrenzung zu Tumoren, die ihren Ursprung nicht im ZNS haben, werden immunhistochemische Marker verwendet.¹²

In Tabelle 1-1 ist ein Überblick ausgewählter Marker zur Diagnose von Tumoren des ZNS dargestellt. Bis heute sind allerdings relativ wenig Biomarker zur Diagnose des Glioblastoms etabliert.²⁰ Zurzeit ist GFAP (*Glial fibrillary acidic protein* = saures Gliafaserprotein) der meist verwendete klinische und zugleich spezifischste Marker für Glioblastome. Dieses Protein wird in astrozytischen und pependymalen Tumoren exprimiert. Andere von Glioblastomen exprimierte Proteine sind z.B. S-100 β , MAP-2c und Ki-67. Mehr als die Hälfte dieser Tumoren zeigt eine Überexpression des EGF-Rezeptorproteins (EGFR). In 30-40 % der Fälle verfügen die Zellen über eine nukleäre Immunreaktivität für TP53.^{14, 21}

Tabelle 1-1: Immunhistochemische Marker für die Diagnose von Tumoren des Nervensystems. Nach Schelegel *et al.* ²² und Guide *et al.* ²³.

Antigen­gruppe	Beispiele
neuronale Antigene	neuronenspezifische Enolase, Synaptophysin, Neurofilamentprotein, neurales Zelladhäsionsmolekül (NCAM), β III-Tubulin, MAP2C
gliale Antigene	GFAP, S-100-Protein, MAP2c, A2B5, GD3, Heparin, O4-Antigen, Sox-1, Sox-2, Vimentin
astrozytäre Antigene	Bystin, GFAP, GLT-1, GLAST, Glutamin Synthase (GS), Mab 6.17, Mab J1-31, Nicht-neuronal Enolase (NNE), S100
epitheliale Antigene	Adrenocorticotropin (ACTH), Prolaktin, Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH)
melanozytäre Antigene	Zytokeratine, epitheliales Membranprotein (EMA), karzinoembryonales Antigen (CEA), Steroidhormonrezeptoren, thyreoidaler Transkriptionsfaktor (TTF-1)
mesenchymale Antigene	Melan A, HMB-45, S-100-Protein, CD133
Endothelmarker	Von –Willebrand-Faktor (Faktor VIII), CD31, CD34
keimzellassoziierte Antigene	β -HCG, α —Fetoprotein (AFP), plazentare alkalische Phosphatase (PLAP)
Proliferationsmarker	Ki-67 (MIB-1)

1.2.3 Dissemination im Gehirn

Die niedrige Überlebensrate von GBM-Patienten ist durch die extensive und diffuse Infiltration der Tumorzellen in das gesunde Gehirnparenchym begründet. Dadurch wird eine erfolgreiche operative Resektion des gesamten Tumors verhindert. Diese invadierenden Tumorzellen sind zudem resistent gegenüber Bestrahlungen und Chemotherapie. So entstehen bei 90 % der Patienten nach der Resektion des Primärtumors neue Läsionen. Diese Rezidive können sowohl an der gleichen Stelle als auch an distanten Orten im Gehirn lokalisiert sein. Bis heute gibt es keine anti-invasive Therapie.^{24, 25}

Die invasiven Eigenschaften der Tumorzellen sind sowohl in geringgradigen als auch in Astrozytomen höheren Grades zu beobachten. Demnach erlangen bestimmte Tumorzellen ihren invasiven Phänotyp bereits in der frühen Tumorgenese. Gerade die randständigen Zellen des Tumors regulieren eine Vielzahl von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) (z.B. Hyaluron, Vitronectin, Tenascin-C, Osteopontin, SPARC) herunter, was die Invasion dieser Zellen unterstützt.²⁶ Bevorzugterweise erfolgt die Invasion der Tumorzellen an bestimmten Wegen der sog. weißen Substanz.⁵ Dabei durchqueren viele Zellen den *Corpus callosum*,

indem sie Schmetterlings-Läsionen bilden. Weiterhin wachsen einige Tumorzellen bevorzugt an Neuronen in der grauen Substanz. Sie zeigen dabei ein perivaskuläres Wachstum sowie eine subpiale Streuung. Andere Zellen migrieren nur in der weißen Substanz und stoppen abrupt am Übergang zur grauen Substanz. Gliomzellen haben nicht nur die Möglichkeit zu migrieren, sondern auch die Fähigkeit, den extrazellulären Raum zu modellieren (Abbildung 1-4). Hierfür schütten sie Proteasen (Cysteine, Serine, and Metalloproteinasen) aus, welche die ECM abbauen und die Migration sowie das Tumorzellwachstum unterstützen.²⁷

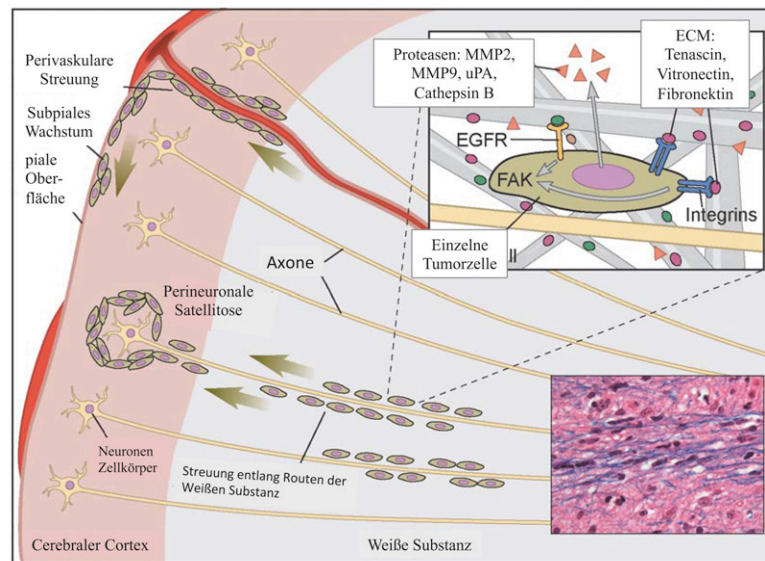


Abbildung 1-4: Dissemination von Gliom-Tumorzellen im Gehirn. Maligne Gliomzellen zeigen eine bevorzugte Invasion in bestimmte Bereiche der weißen Substanz, um Neurone und Blutgefäße und in die subpiale Region. Abbildung rechts unten: Die H&E-Färbung zeigt, dass sich die Tumorzellen an den myelinisierten Axonen orientieren. Bild rechts oben: Molekulare Ereignisse, die an der Invasion der einzelnen Zellen beteiligt sind: Ausschüttung von Proteasen (MMP2 und MMP9, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), Cathepsin B); Expression von Integrinen (Tenascin, Vitronectin, Fibronectin), die mit der ECM interagieren; Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK), die den EGFR- oder Integrin-Signalweg vermittelt.²⁸

Des Weiteren wird die Migration durch die Expression von Integrinrezeptoren und Wachstumsfaktoren unterstützt. Auffällig ist, dass *EGFR*-amplifizierte Zellen sehr heterogen im Tumor verteilt sind.²⁹ Bevorzugt sind diese Zellen an den infiltrativen Flanken des Tumors lokalisiert. Oft befinden sich diese *EGFR*-Amplifikationen auf extrachromosomalen *Double-Minutes*. Das Gen-Expressionprofil des *EGFR*-Signalweges scheint eine entscheidende Rolle bei der Invasion von GBM-Zellen zu spielen. So verursacht die Expression der *EGFRvIII*-Mutante eine Hoch- bzw. Herunterregulierung von verschiedenen Genen, die mit der Tumordinvasion assoziiert werden (z.B. Metalloproteasen MMP1 und MMP13 oder Collagene).³⁰ Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Inhibition des *EGFR*-, aber auch des Integrin-Signalweges zur Invasionsinhibition führen kann.^{28, 31}

1.2.4 Extraneurale Metastasierung

Obwohl bei einer Glioblastomerkrankung eine extensive Infiltration der Tumorzellen in das gesunde Gehirngewebe stattfindet, zeigen GBM-Patienten relativ selten Metastasen außerhalb des Gehirns. Lediglich 0,4 bis 0,5 % der Patienten entwickeln extrakraniale Glioblastom-Metastasen.^{32, 33} Hierbei sind die am häufigsten befallenden Organe Knochen, Lymphknoten, Lunge und Leber.³⁴ Warum Glioblastome so selten metastasieren, konnte bis heute noch nicht herausgefunden werden. In der Literatur werden dazu mehrere Theorien diskutiert. Zum einen könnte die Überlebenszeit der Patienten von durchschnittlich nur 14,6 Monaten für die Entwicklung von Metastasen zu kurz sein.³⁵ Zum anderen könnte die Existenz der Blut-Hirn-Schranke die Bildung von Metastasen verhindern.³⁶ Auch denkbar ist die Unterdrückung des extrakraniellen Wachstums der GBM-Zellen durch das periphere Immunsystem.³³ Ferner könnte die Abwesenheit von lymphatischen Wegen im ZNS den extrakraniellen Transport von GBM-Zellen verhindern.³⁷ Auch die Unfähigkeit der Tumorzellen, durch unzureichendes Kontaktgewebe außerhalb des ZNS zu invadieren, stellt eine mögliche Ursache dar.³⁸

Der Abwesenheit von lymphatischen Gefäßen im ZNS wurde 1983 durch McComb widersprochen. Dieser bewies die Existenz einer lymphatischen Drainage von der zerebrospinalen Flüssigkeit (Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit) in das extrakranielle Gewebe.³⁹ Des Weiteren wurde bewiesen, dass im Tumorgewebe die Blut-Hirn-Schranke oft nicht intakt ist und reduzierte *tight junctions* zwischen den Endothelzellen aufweist.⁴⁰⁻⁴² Extrakranielle Metastasen können zudem weitaus häufiger vorkommen, als Neuro-Onkologen beschreiben, da diese nicht systemisch nach Hinweisen einer Erkrankung suchen.³³ Fonkem und Lun beobachteten von 1940 bis 2009, dass die Beschreibung extrakranieller Metastasen zwischen der Diagnose des GBM-Primärtumors und dem Tod des Patienten zugenommen hat. Dies kann durch hochempfindliche Diagnoseverfahren begründet sein, was zu einer früheren Diagnose von intra- und extrakraniellen GBM führt.³³ Auch führen neue therapeutische Optionen zu einem längeren Überleben der Patienten. Durch die Einführung von Temozolomid als Erstlinientherapie, die zusammen mit Bestrahlung eingesetzt wird, wurde die Überlebenszeit seit 2005 auf mehr als 24 Monate erhöht.⁴³ Damit steigt speziell bei Patienten mit längerer Überlebenszeit die Möglichkeit, an einer extraneuralen Metastase zu erkranken.⁴⁴

Es wurde weiterhin gezeigt, dass GBM-Zellen direkt mit dem peripheren Blut von der hypoxischen zur proliferativen Seite des Tumors über eine durch Angiogenese begründete Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke kommunizieren.^{33, 45} Der korrekte Weg der Metastasierung in GBM-Patienten wurde bisher nicht beschrieben. Obwohl das hohe Vorkommen von Metastasen in den Hals/Ohr-Lymphknoten (*retroauricular*) des Patienten auf den lymphatischen Weg deutet, weist die Diagnose von Lungenmetastasen auf den

hämatogenen Weg der Metastasenbildung hin.⁴⁰ Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass die meisten extraneuralen Metastasen aus der operativen Resektion des Primärtumors durch die Verletzung der Blutgefäße und die damit vorhandene Tumorzellstreuung resultieren.^{32, 46}

1.2.5 Tumor-Transmission durch Organspende

Da die Metastasenbildung in den GBM-Patienten sehr selten ist, wird der Einsatz dieser Patienten als Organspender diskutiert.⁴⁷⁻⁴⁹ Aufgrund veröffentlichter Daten, die eine Transmission des GBM durch eine Organtransplantation beschreiben, wird die Verwendung dieser Organe zur Organtransplantation kritisch betrachtet.^{50, 51} Die letzten Jahres-Reporte der OPTN/UNOS (*Organ Procurement and Transplantation Network/United Network of Organ Sharing*) zeigten eine 0,5 %ige Transmissionsrate von Organen aus GBM-Patienten, wobei drei übertragene GBM von einem Spender ausgingen.⁵¹⁻⁵³ Andererseits ist die Sterberate der Organempfänger auf der Warteliste ansteigend. Deshalb schließt die UNOS die Verwendung von Organen aus GBM-Patienten nicht absolut aus, und es sollte prinzipiell von Fall zu Fall entschieden werden.⁵⁴

1.3 Metastasierung

1.3.1 Metastatische Kaskade

Solide Tumore können ihre Zellen nur bis zu einem Durchmesser von 1 mm durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Um ein weiteres Wachstum zu erreichen, sind Tumoren in der Lage, die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren.¹ Durch die sogenannte Tumorangio-genese gewinnt der Tumor Zugang zum hämatopoetischen bzw. zum lymphatischen System des Patienten. Der Weg der Metastasierung ist dadurch geebnet. Vereinfacht lässt sich der Vorgang der Metastasierung in mehrere Schritte unterteilen. Zunächst erfolgt die lokale Invasion der Tumorzellen in die Umgebung des Primärtumors. Dabei treten auch Tumorzellen in das Blutsystem ein (Intravasation). Das Überleben der Tumorzellen in der Zirkulation des Patienten ist eine wichtige Voraussetzung für die weitere Metastasenprogression. Schließlich folgt der Übergang der Tumorzelle aus der Kapillare in das Parenchym eines Organs (Extravasation).⁵⁵ Werden Tumorzellen im Knochenmark oder peripheren Blut von Krebspatienten detektiert, bezeichnet man diese als disseminierte Tumorzellen (DTC) bzw. zirkulierende Tumorzellen (CTC).⁵⁶

Pantel *et al.*⁵⁷ beschrieben 2004 zwei Wege der Metastasierung für epitheliale maligne Tumoren (Karzinome), die in Abbildung 1-5 skizziert sind. Zunächst lösen sich bereits in

frühen Stadien des Tumorwachstums einige Tumorzellen vom Zellverband des Primärtumors. Hierbei gelangen sie entweder über das Lymphsystem zu den Lymphknoten, wo sie anschließend zu soliden Tumoren proliferieren oder sie disseminieren direkt in die Blutzirkulation des Patienten. Die im hämatopoetischen System befindlichen Tumorzellen gelangen zu entfernten Organen oder verharren in einem Ruhezustand (Dormanz). Zu einem späteren Zeitpunkt disseminieren die Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen wiederum über das hämatopoetische System in entfernte Regionen des Körpers. Dort sind sie nun in der Lage weitere solide Metastasen zu bilden. Es wird vermutet, dass dieses entfernte Wachstum erst durch das vorherige Wachstum im Lymphknoten möglich wird. Die Ausbildung von Metastasen ist also in diesem Weg abhängig von der Präsenz der Lymphknotenmetastasen. Beim zweiten Weg der Metastasierung, bei dem die Tumorzellen ohne den Umweg über die Lymphknoten in das Blut disseminieren, werden direkt Fernmetastasen in anderen Organen gebildet. Auf beiden möglichen Wegen können weitere Metastasen durch eine bereits existierende Metastase entstehen.⁵⁷ Allerdings wird davon ausgegangen, dass lediglich 0,01 % der DTCs/CTCs in der Lage sind, Metastasen zu bilden.⁵⁸ Trotzdem scheinen DTCs/CTCs mit einem sehr aggressiven Phänotyp für die Entstehung von Metastasen verantwortlich zu sein. Diese Zellen sind in der Lage, die sog. Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) zu durchlaufen, was ihnen die Migration aus dem Zellverbund des Primärtumors ermöglicht. Hierbei wechseln die Zellen teilweise oder möglicherweise vollständig ihren epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp. Dies beinhaltet bspw. die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. Twist1 oder Snail1/2), die Expression von bestimmten Zelloberflächenproteinen (z.B. Vimentin) oder auch die Produktion von Enzymen, die die extrazelluläre Matrix degradieren.⁵⁹ Des Weiteren werden Zelladhäsionsmoleküle, wie E-Cadherin herunter reguliert.^{60,61}

Der umkehrte Vorgang heißt Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET) und scheint eine wichtige Rolle bei der Ansiedelung der DTCs/CTCs in entfernten Organen, in denen sie anschließend Mikrometastasen bilden, zu spielen. Diese Zellplastizität beruht auf der Eigenschaft einiger Zellen, meist Stammzellen, charakteristische Eigenschaften anderer Zelltypen des Organismus anzunehmen. Dadurch können sie in einer veränderten Mikroumwelt überleben und weiter proliferieren.⁶² Metastasen sind die Haupttodesursache bei Krebspatienten. Die sog. minimale residuale Krebserkrankung (*Minimal residual disease* =MRD) ist durch die Präsenz von malignen Zellen (CTC/DTC) in entfernten Organen definiert. CTCs und DTCs sind Zellen, die potentiell metastasieren können.⁵⁶ Trotz hochauflösender Bildgebungsverfahren werden diese Zellen routinemäßig jedoch nicht detektiert. So sterben immer noch mehr als 90 % der Patienten mit malignem Tumor an den Folgen der Metastasierung.^{1,63}

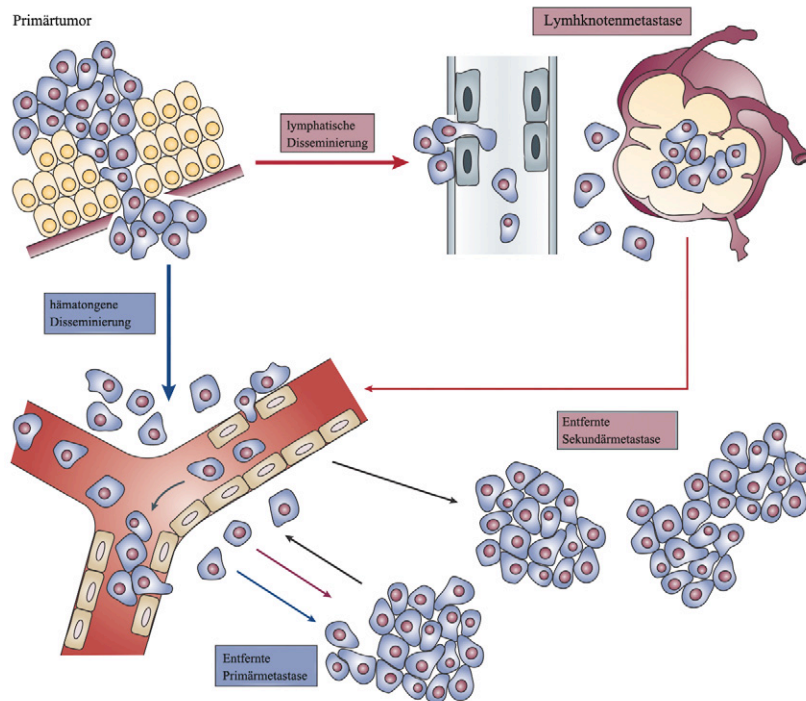


Abbildung 1-5: Die Metastatische Kaskade. Tumorzellen lösen sich vom Zellverband des Primärtumors. Sie gelangen entweder über das Lymphsystem zu den Lymphknoten, wo sie anschließend zu soliden Primärmetastasen proliferieren oder sie disseminieren direkt in die Blutzirkulation des Patienten. Durch das hämatopoetische System gelangen sie zu entfernten Organen und bilden direkt primäre Fernmetastasen oder verharren in einem Ruhezustand (Dormanz). Später disseminieren die Tumorzellen der Lymphknotenmetastasen wiederum über das hämatopoetische System in entfernte Regionen des Körpers. Dort sind sie nun in der Lage, sekundäre solide Metastasen zu bilden. Vermutlich wird dieses entfernte Wachstum erst durch das vorherige Wachstum im Lymphknoten möglich. Auf beiden Wegen können weitere sekundäre Metastasen durch eine bereits existierende Metastase entstehen.⁵⁷

Obwohl die meisten CTCs lediglich 24 Stunden in der Zirkulation überleben,⁵⁸ konnte bei verschiedenen Tumorentitäten die klinische Relevanz dieser Zellen bewiesen werden. Werden bei Brust- und Prostatakrebspatienten in 7,5 mL peripherem Blut mind. 5 CTCs bzw. bei Patienten mit kolorektalem Krebs mind. 3 CTCs detektiert, verfügen diese Patienten über eine ungünstigere Prognose, als jene ohne oder mit geringerer CTC-Zahl.⁶⁴ Die 50 %ige Überlebenschancen war bei Brustkrebspatienten mit einer unvorteilhaften Prognose um 11 Monate, bei Patienten mit kolorektalem oder Prostatakrebs um 10 Monate geringer als bei Patienten mit einer guten Prognose (Abbildung 1-6).

Die Detektion und anschließende Charakterisierung von CTCs und DTCs könnten für eine individuelle Prognose von Tumorpatienten nützlich sein. Die sogenannte flüssige Biopsie kann dem Patienten ohne großen Aufwand entnommen werden. Individuelle Therapien könnten zur Vorbeugung von Metastasierungen entwickelt werden. Die adjuvante (postoperative)

Überwachung der Präsenz von CTCs während der Krebstherapie könnte ein Hinweis auf den Erfolg der Therapien geben.^{65, 66}

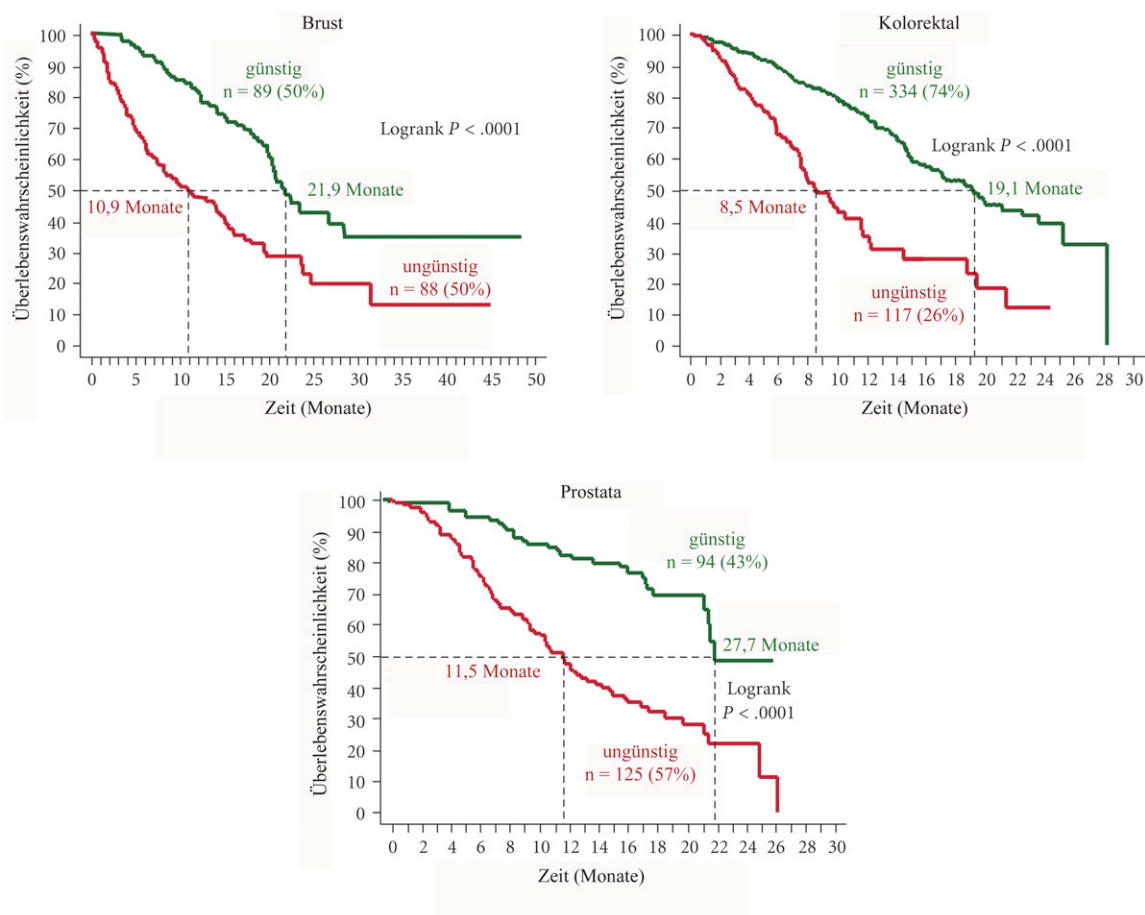


Abbildung 1-6: Vergleichende Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensraten von CTC-positiven und -negativen Krebspatienten. Patienten mit metastasiertem Brustkrebs (a), metastasiertem Kolorektalkrebs (b) und Prostatakrebs (c). Die Patienten wurden in die Gruppe der vorteilhaften und unvorteilhaften Prognose unterteilt. Ein Patient wurde der unvorteilhaften Gruppe zugeordnet, wenn in 7,5 mL peripherem Blut mindestens 5 CTCs (bei Brust- und Prostatakrebspatienten) bzw. mind. 3 CTCs (bei kolorektalem Krebs) detektiert wurden.⁶⁴

1.3.2 Methoden zur Anreicherung zirkulierender Tumorzellen

Um die molekularen Eigenschaften von CTCs genauer untersuchen zu können, ist eine Anreicherung dieser Zellen aus dem peripheren Blut von Krebspatienten nötig. Allerdings stellen CTCs nur einen sehr geringen Anteil der im Patientenblut vorkommenden Zelltypen dar. So findet man pro mL Patientenblut bspw. 5×10^9 rote Blutzellen und $5-10 \times 10^6$ mononukleäre weiße Blutzellen (Leukozyten). Die sehr geringe Anzahl von CTCs zwischen einer sehr hohen Anzahl an mononukleären Zellen (MNC) im Blut erfordert eine hohe Effizienz der jeweiligen Anreicherungsmethode. Ein Methodenüberblick wird in Abbildung 1-

7-1 gegeben. Die einzelnen Methoden lassen sich grob nach zwei Prinzipien einteilen. Zum einen können CTCs aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, wie z.B. ihrer Zellgröße (Zellseparation durch Membranfilter) oder über ihre Zelldichte (*Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation) angereichert werden.

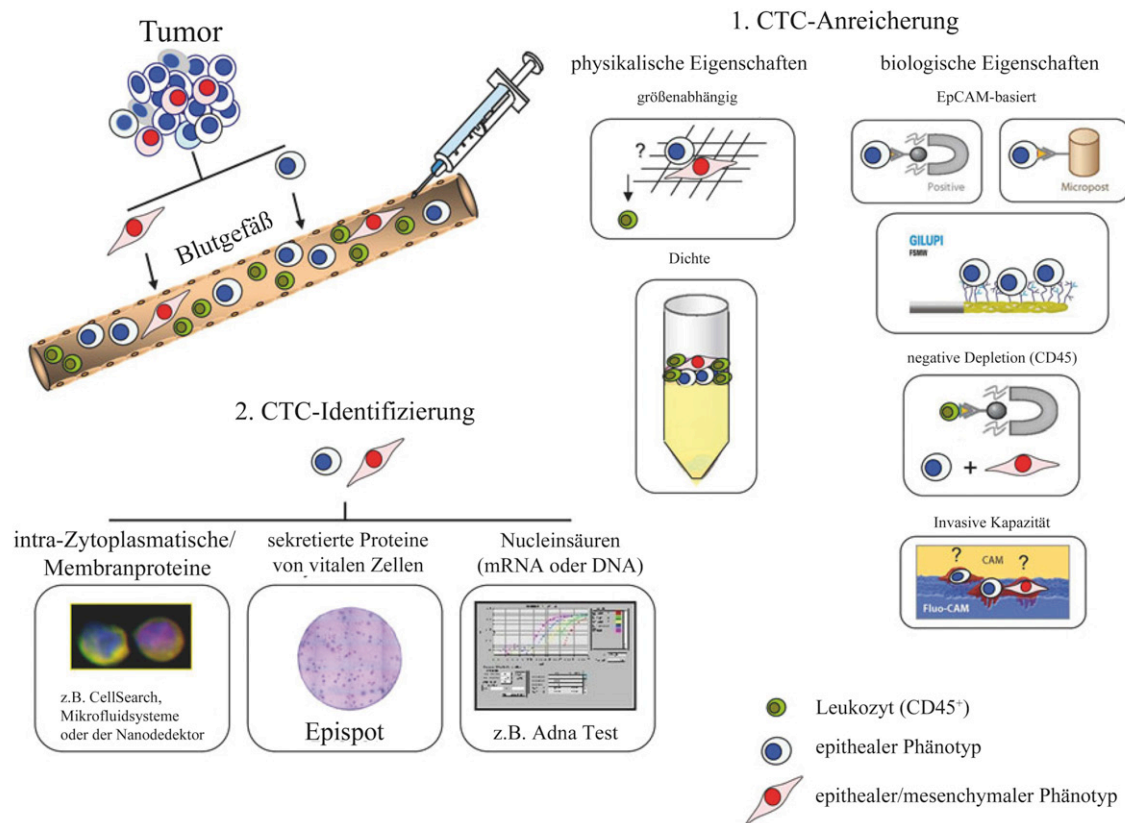


Abbildung 1-7: Anreicherung und Detektion von CTCs aus peripherem Blut von Krebspatienten. 1. Die CTC-Anreicherungsmethoden basieren entweder auf physikalischen oder biologischen Eigenschaften der CTCs. Anreicherungsmethoden basierend auf physikalischen Eigenschaften der CTCs sind größenabhängige Anwendungen (z.B. Zellseparation durch Membranfilter) oder Dichte-zentrifugationen (z.B. *Ficoll*). Für Anreicherungsmethoden basierend auf biologischen Eigenschaften der CTCs werden die Verwendung von Antikörpern gegen Zelloberflächenproteine, wie EpCAM zur positiven Selektion (z.B. *CellSearch*TM, mikrofluide Strömungen oder Nanodetektor) oder CD45 für die negative Depletion verwendet. Des Weiteren können die invasiven Eigenschaften der Tumorzellen ausgenutzt werden (z.B. *Vita Assay*). 2. Die CTC-Detektion kann mittels immunzytochemischer Analysen, durch die Detektion von sekretierten Proteinen (*EPISPOT*) oder durch PCR-Analysen zur Detektion von Tumorzell-spezifischen Nucleinsäuren (z.B. *AdnaTest*) durchgeführt werden.⁶⁷

Werden Zellen aufgrund von tumorassoziierten Antigenen (z.B. EpCAM = epitheliales Adhäsionsmolekül) angereichert, wird von einer positiven Anreicherung gesprochen. Anreicherungsmethoden basierend auf leukozytenassoziierten Antigenen (z.B. CD45) sind der negativen Selektion zuzuordnen. Zurzeit ist die Anreicherung über das tumorassoziierte Antigen EpCAM am besten etabliert. Neue Methoden, wie die auf EpCAM basierende

Mikrochiptechnologie oder der Nanodetektor (GILUPI GmbH), finden bereits in der CTC-Forschung Anwendung.⁶⁸⁻⁷⁰ Des Weiteren können gegen tumorassoziierte Antigene gerichtete Antikörper, die mit magnetischen Nanopartikeln gekoppelt sind, zur Anreicherung von Tumorzellen verwendet werden. Durch ein magnetisches Feld können Zellen, die über den Antigen-Antikörperkomplex an die Nanopartikel gebunden sind, aus dem Blut angereichert werden.⁷¹ Verschiedene magnetische Anreicherungssysteme sind bereits kommerziell verfügbar. Allerdings ist bis heute nur das *Cell SearchTM-System* (Veridex LLC) von der FDA (*US Food and Drug Administration*) geprüft und zugelassen worden.⁷²

1.3.3 Methoden zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen

Da keine der etablierten Anreicherungsverfahren über eine 100 %ige Sensitivität verfügt, bleibt der Nachweis von CTCs in der angereicherten Zellfraktion unerlässlich. In Abbildung 1-7-2 sind die einzelnen Detektionsmethoden dargestellt. Da epitheliale Zellen normalerweise nicht im Blut vorkommen können, CTCs durch Kriterien, wie die Präsenz eines Zellkerns, die Expression von Keratinen (Intermediärfilamente epithelialer Zellen) sowie durch die fehlende Expression von Weißen-Blutzellmarkern, wie CD45, detektiert werden.⁷³ Der *EPISPOT Assay* (*EPithelial Immuno SPOT*) wird zur Detektion von sekretierten Markerproteinen verwendet. Diese können nur durch vitale Krebszellen der angereicherten Zellfraktion exprimiert werden. So lassen sich sekretierte Proteine, wie z.B. CK-19, MUC1, PSA (Prostata-spezifisches Antigen) detektieren.^{67, 74-76} Epitheliale Tumorzellen, die eventuell einem Zelltransformationsprozess (EMT) unterlagen, können allerdings durch den *EPISPOT*-Assay bei Einsatz epithelialer Antikörper nicht identifiziert werden. Eine Alternative zur immunzytochemischen Detektion von Tumorzellen stellt die molekulare Detektion von CTCs durch verschiedene Polymerasekettenreaktion-Assays (*polymerase chain reaction* = PCR) dar. Hierbei können die angereicherten Zellen auf die Präsenz von CTC-assoziierten mRNAs, wie z.B. der Tumormarker EpCAM, MUC1 (Mucin-1) und HER2 (*human epithelial growth factor*) oder der EMT-assoziierte Markern, wie z.B. *Twist1* hin untersucht werden.^{77, 78}

1.3.4 *In vitro* - Expansion von angereicherten, zirkulierenden Tumorzellen

Durch die Vervielfältigung der genomischen Einzelzell-DNA können genotypische Veränderungen, wie Mutationen und Genamplifikationen, detektiert werden. Zusätzliche Analysen hinsichtlich der phänotypischen Charakterisierung, wie z.B. Untersuchungen zur quantitativen Proteinexpression oder zum Proliferationsverhalten dieser Zellen etc., sind jedoch nicht möglich. Eine Expansion von CTCs/DTCs *in vitro* würde das sehr geringe Analysespektrum dieser Zellen um viele Methoden erweitern.

Die Vitalität der CTCs nach ihrer Anreicherung ist stark vom gewählten Anreicherungsverfahren abhängig. Gerade bei biologischen Anreicherungsverfahren (z.B. *CellSearchTM*) sind die Zellen durch Permeabilisierungs- und Färbeschritte nicht mehr lebensfähig. Im Gegensatz dazu wird durch eine physikalische Anreicherung die Vitalität der CTCs nicht eingeschränkt.⁷⁹ Diese Methoden haben jedoch den Nachteil, dass die Effizienz bzw. die Sensitivität der CTC-Anreicherung geringer ist als bei biologischen Anreicherungsverfahren. So befinden sich nach der Anreicherung über die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation lediglich einzelne CTCs unter Millionen mononukleärer Zellen. Pantel *et al.*⁸⁰ etablierten bereits 1995 mikrometastatische Zelllinien aus Knochenmarkaspiraten durch die Immortalisierung mit Hilfe der Mikroinjektion des *Simian Virus 40 (SV40)*.⁸⁰ Die phänotypische Charakterisierung dieser permanenten Zelllinien von 9 Krebspatienten mit Prostatakarzinom (n = 4), Brustkrebs (n = 2), Lungenkrebs (n = 2) und kolorektalem Krebs (n = 1) belegte ihre karzinogene Herkunft.⁸¹ Bis heute konnten allerdings keine weiteren mikrometastatischen Zelllinien aus Knochenmarkaspiraten generiert werden. Die Anreicherung von CTCs über mikromagnetische Mikrofluide bzw. Mikrochips oder Methoden, wie den *VitaAssay* (Vitalex), versprechen die Vitalität der angereicherten Zellen zu erhalten. Die Etablierung von mikrometastatischen Zelllinien aus angereicherten CTCs konnte bisher nur in einer aktuellen Arbeit von Zhang *et al.*⁸² beschrieben werden. Dabei ist es gelungen, EpCAM-negative CTCs aus drei Brustkrebs-Patienten mit Hilfe der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Durchflusszytometrie anzureichern, damit diese charakterisiert und über längere Zeit kultiviert werden konnten.⁸²

Mit Hilfe von permanenten Zelllinien aus CTCs könnten aufschlussreiche Modelle zur Biologie der hämatopoetischen Metastasierung bzw. der Disseminierung von Tumorzellen in das Knochenmark etabliert werden. Des Weiteren können solche Zelllinien potentielle Zielmoleküle zur individuellen Anti-Krebstherapie, die spezifisch gegen MRD gerichtet ist, identifizieren.

1.4 Einzelzellanalyse

Durch die genotypische Charakterisierung von zirkulierenden Einzelzellen können grundlegende Informationen über die Biologie der MRD gewonnen werden. Die Untersuchung von Einzelzellen beschränkt sich aufgrund des sehr limitierten Untersuchungsmaterials aus einer Zelle auf molekularbiologische Methoden. Durch eine Vervielfältigung der gesamten genomischen DNA (*whole genome amplification* - WGA) können Mutationsanalysen sowie Metaphasen- und Array-CGH durchgeführt werden. Weiterhin kann die amplifizierte DNA einer Einzelzelle zur Bestimmung des Heterozygositätsverlustes (*loss of heterozygosity* –

LOH) und der *HER2*- oder *EGFR*-Genamplifikationsrate durch quantitative (*real time*) PCR verwendet werden.⁸³⁻⁸⁵ Aktuell wurden erste Methoden zur RNA-Analyse aus Einzelzellen etabliert.⁸⁶⁻⁸⁸

1.4.1 Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Patienten mit *Glioblastoma multiforme*

Wie bereits beschrieben, zeigen GBM-Zellen ausgeprägte infiltrative Eigenschaften innerhalb des Gehirns. In wenigen Patienten entwickeln sich Metastasen, und auch die Tumortransmission des GBMs durch Organspenden wurde beschrieben. Diese Beschreibungen lassen darauf schließen, dass CTCs im Blut von GBM-Patienten existieren. Wahrscheinlich treten diese häufiger auf, als es die in der Literatur beschriebene Entwicklung von extraneuralen Metastasen vermuten lässt. Trotz des sehr hohen migratorischen Potentials der GBM-Zellen gibt es bisher keine Veröffentlichung zur systematischen Disseminierung von Tumorzellen in das periphere Blut von GBM-Patienten.⁸⁹

Im Rahmen der von Johannes Holtschmidt durchgeführten medizinischen Doktorarbeit am Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums (Hamburg-Eppendorf) wurde das postoperative periphere Blut von 12 Patienten mit diagnostiziertem GBM auf die Präsenz von GFAP-exprimierenden Zellen untersucht. Bei einem Patienten konnte der maligne Ursprung einer im Blut detektierten GFAP-positiven Zelle (Abbildung 1-8 c) durch die Aberrationsanalyse mittels klassischer CGH bewiesen werden. Hierbei wurde die amplifizierte gesamtgenomische DNA der zuvor isolierten Einzelzelle (Abbildung 1-8 d) mit der genomischen DNA des korrespondierenden Primärtumors verglichen. Beide CGH-Profile sind in Abbildung 1-8 a+b dargestellt. Die DNA der Einzelzelle weist Zugewinne der Chromosomen 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 und 12 auf. Des Weiteren sind Verluste auf Chromosom 22 zu erkennen. Die für das Glioblastom typische Amplifikation des *EGFR*-Gens auf dem Chromosom 7p12 kann in dieser Zelle beobachtet werden. Auch die DNA des Primärtumors weist einen deutlichen Zugewinn des *EGFR*-Gens auf. Weitere übereinstimmende Aberrationen der einzelnen DNA-Abschnitte sind auf Chromosom 4, 5, 12 und 22 lokalisiert. Die identifizierten Zugewinne und Verluste der einzelnen chromosomalen Regionen in der Einzelzelle und im Primärtumor ähneln sich deutlich. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass diese einzelne Zelle tatsächlich vom GBM-Primärtumor abstammt und in die hämatopoetische Zirkulation des Patienten gelangt ist.

Die starke *EGFR*-Amplifikation konnte auch durch eine FISH-Analyse am Gewebe des Primärtumors gezeigt werden (Abbildung 1-8 c). Hierbei lassen sich in vielen Zellen sog. Cluster als Signale der *EGFR*-Sonde erkennen.⁹⁰

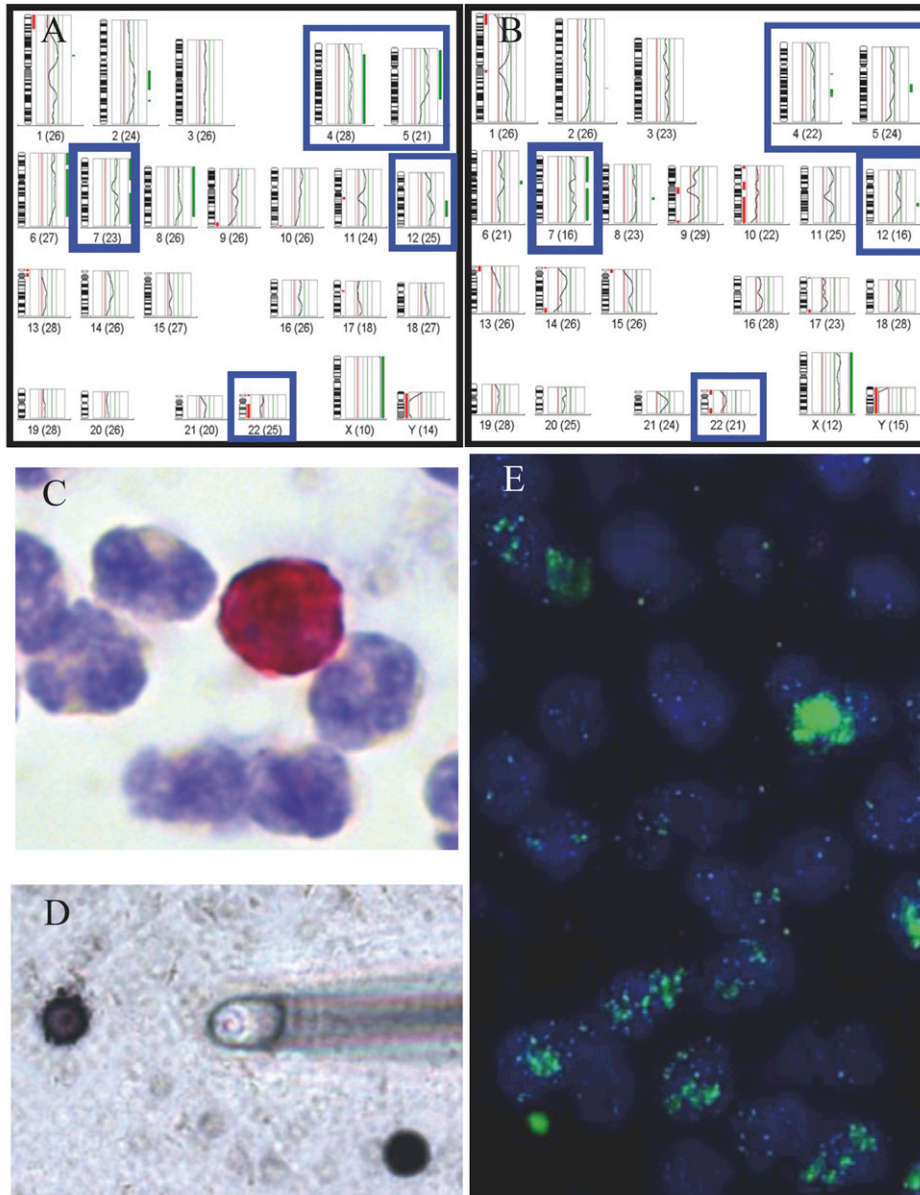


Abbildung 1-8: Vergleichende Analyse der im Blut detektierten GFAP-positiven Einzelzellen mit dem korrespondierenden Primärtumor eines GBM-Patienten (#3). A: mCGH-Profil der postoperativen CTC, B: mCGH-Pofil des Primärtumors. C: GFAP-positive Einzelzelle zwischen aus dem Blut angereicherte MNC. Die Blutprobe wurde dem Patienten postoperativ entnommen. D: Mikromanipulation von GFAP-positiven Zellen. E: EGFR-FISH-Analyse. Tumorzellen wurden mit einer EGFR-Sonde (FITC) inkubiert. Kernfärbung durch *VECTA-SHIELD® HardSet™ Mounting-Medium* mit DAPI (Abbildung modifiziert nach Holtschmidt, 2010).⁹⁰

1.5 Fragestellung

Tumoren des Gehirns, darunter das *Glioblastoma multiforme* (GBM) als aggressivster Tumortyp, gelten bisher als außerordentlich selten in entfernte Organe metastasierende Tumorentitäten. Die wenigen beschriebenen Fälle von Fernmetastasierung sind vorrangig im Skelettsystem sowie in Lunge, Leber und Nieren lokalisiert. Außerdem lassen Fallberichte zur Entstehung extrakranialer Tumoren mit GBM-Charakteristika nach einer Organtransplantation von an GBM verstorbenen Tumorpatienten die Vermutung zu, dass die Entwicklung dieser Tumoren auf hämatogene Tumorzellstreuung zurückzuführen ist. Das Vorhandensein von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) im peripheren Blut, die die Blut-Hirn-Schranke in GBM-Patienten überwunden haben müssen, ist bisher jedoch noch nicht beschrieben worden.

Das Hauptziel der vorliegenden Dissertation bestand deshalb darin, zirkulierende Tumorzellen (CTCs) im Blut von Patienten mit histologisch gesichertem GBM nachzuweisen, um die Hypothese der hämatogenen Disseminierung von GBM-Zellen als Ausgangspunkt für die selten beobachtete extrakraniale Metastasenbildung zu belegen. Dazu sollte das prä- und postoperativ entnommene Blut von mindestens 100 GBM-Patienten auf die Präsenz von CTCs untersucht werden. Da bestehende Verfahren zur CTC-Analyse hauptsächlich für die Untersuchung epithelialer Tumorzellen optimiert wurden, sollte zunächst eine Methode zur Detektion von GBM-Zellen im Blut etabliert werden. Dabei musste besonderes Augenmerk auf eine hohe Sensitivität und Spezifität des Nachweises gerichtet werden. Darüber hinaus sollten immunologische und molekulare Verfahren für die Analyse einzelner detektierter GBM-Zellen entwickelt bzw. getestet werden, die den malignen GBM-Ursprung der detektierten putativen CTCs bestätigen können. Hierzu war es notwendig, auch die korrespondierenden Tumorgewebe, die in Form von Paraffinschnitten vorlagen, auf die Expression bestimmter Proteine bzw. auf molekulare Veränderungen zu untersuchen. Die erhaltenen Ergebnisse sollten dann mit klinisch-pathologischen Parametern der Tumoren verglichen werden, um Tumoren mit der Fähigkeit zur hämatogenen Disseminierung zu identifizieren und um zukünftig möglicherweise CTC-positive Patienten als Organdonatoren ausschließen zu können.

Nach der Detektion und molekularen Einzelzellanalyse disseminierter und zirkulierender Tumorzellen (DTCs, CTCs) aus Blut und Knochenmark gewinnt die weitere funktionelle Analyse dieser Zellen zunehmend an Bedeutung. Ziel dieser Analysen ist es vor allem, aus dem Pool der detektierten DTCs/CTCs diejenigen zu identifizieren, die lebensfähig sind und das Potenzial besitzen, Metastasenwachstum zu initiieren. Obwohl die prognostische Relevanz des Nachweises von einzelnen disseminierten Karzinomzellen im Knochenmark oder CTCs im Blut, die ihren Ursprung in unterschiedlichen epithelialen Geweben haben, durch eine Vielzahl

internationaler Publikationen belegt werden konnte, gibt es bisher nur sehr wenige Berichte über eine erfolgreiche *ex vivo*-Vermehrung und funktionelle Charakterisierung dieser Zellen. Deshalb beschäftigt sich der zweite vorrangig methodisch orientierte Teil der Arbeit mit der Vermehrung zirkulierender bzw. disseminierter Tumorzellen aus Blut- und Knochenmarkproben von Tumorpatienten. Diese Untersuchungen sollten zunächst an DTCs/CTCs aus Knochenmark- und Blutproben von Karzinompatienten durchgeführt werden, für die im Gegensatz zu GBM-Patienten bereits verschiedene, auch standardisierte Verfahren zum Tumorzellnachweis vorhanden sind. Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen wurden native Tumorzellen aus Pleurapunktaten von Karzinompatienten isoliert und kultiviert. Diese Bedingungen sollten dann auf CTCs/DTCs aus Blut- bzw. Knochenmarkproben von Karzinompatienten angewendet und für diese optimiert werden, um eine *in vitro*-Proliferation dieser Zellen zu unterstützen. Die weitere Charakterisierung dieser Zellen könnte Informationen hinsichtlich ihres Metastasierungspotentials liefern, und als Ausgangsmaterial für die Entwicklung neuer Therapieansätze eingesetzt werden.

2 Material

2.1 Geräte, Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien und Reagenzien sind im Anhang unter detaillierter Aufzählung des Herstellers bzw. der Bezugsquelle aufgeführt. Weiterhin werden dort die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle A -XV, Tabelle A -XVI, Tabelle A -XVII), käuflich erworbene Kits (Tabelle A - XIII) sowie selbst hergestellte Puffer und Lösungen (Tabelle A - XX, Tabelle A -XXI) tabellarisch aufgeführt.

2.2 Patientenmaterial

Eine ausführliche Auflistung aller in dieser Arbeit untersuchten Patientenproben unter Angabe der Tumorentität, Probenentnahmezeitpunkt, Patientenalter usw. findet sich im Anhang Tabelle A - I bis XI. Die Untersuchungen wurden entsprechend der Ethikrichtlinien durchgeführt, und das schriftliche Einverständnis der Patienten lag vor.

2.2.1 Blut- und Gewebeproben von Gliompatienten

In dieser Arbeit wurde das periphere Blut (10 mL in 1,6 mg EDTA/mL-Monovetten) von 114 Patienten mit histologisch diagnostiziertem *Glioblastoma multiforme* Grad IV sowie von weiteren 10 Patienten mit Tumoren glialen Ursprungs (Astrozytom, Gliosarkom, Oligodendrogliom III, Meningeom, Meduloblastom) sowie von 5 Tumor-Patienten mit bestätigten Gehirnmetastasen untersucht. Dieses Blut ist den Patienten routinemäßig jeweils prä- und postoperativ an der Klinik für Neurochirurgie (UKE, Hamburg) abgenommen worden. Elf von diesen Patienten wurden von Johannes Holtschmidt im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit am Institut für Tumorbiologie (UKE, Hamburg), auf die Präsenz von CTCs untersucht. Des Weiteren wurde für Kontrollversuche Blut von 10 gesunden Probanden auf gleiche Weise entnommen. Außerdem standen in Paraffin eingebettete Gewebeproben und Frischgewebe von den jeweiligen GBM-Primärtumoren aus dem Institut für Neuropathologie (UKE, Hamburg) zur Verfügung.

2.2.2 Patientenmaterial zur Tumorzellkultivierung

Zur Kultivierung von CTCs wurde von 166 Patienten mit diagnostiziertem Mamma-Karzinom peripheres Blut abgenommen (Institut für Stammzell-Technologie, Heidelberg). Dabei wurden je 10 mL Blut in 1,6 mg EDTA/mL-Monovetten und 8 mL Blut in *CellSave Preservative*

Röhrchen (Veridex, Raritan, NJ, USA) entnommen. Außerdem wurden 6 Knochenmark-aspirate (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) von Mamma-Karzinompatienten kultiviert. Zusätzlich wurden Proben von 34 verstorbenen Karzinompatienten im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin (UKE, Hamburg) bezogen und in Kultur genommen. Von 5 Patienten wurden sowohl Knochenmark- als auch Blutproben kultiviert. Von 22 Patienten wurden nur Knochenmarkaspirate und von 7 Patienten nur Blutproben verwendet. Aus der Klinik für Chirurgie (UKE, Hamburg) wurde das Knochenmark von 6 Karzinompatienten in Kultur genommen. Zur Primärkultur von nativen Tumorzellen wurde Knochenmark aus 9 Patienten mit metastasierten Harnblasenkarzinomen (Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, UKE Hamburg) sowie 7 Pleurapunktate von 7 Karzinompatienten (Klinik und Poliklinik für Gynäkologie, UKE, Hamburg) verwendet.

2.3 Verwendete Zelllinien

Die Tabelle 2-1 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sowie deren Herkunft und die zur Kultur verwendeten Medien. Bei den Zelllinien NIH3T3 und MEF handelt es sich um Fibroblasten muriner Herkunft, bei allen anderen um Zellen aus humanem Tumorgewebe.

Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Tumorart	Ursprungsgewebe	Medium
G-22 ¹⁾	GBM	Primärtumor	C
U373 ¹⁾	GBM	Primärtumor	A
U373-GFP ⁵⁾	GBM	Primärtumor	A
BS-153 ¹⁾	GBM	Primärtumor	A
G 140 ¹⁾	GBM	Primärtumor	A
G 112 ¹⁾	GBM	Primärtumor	A
MCF 7 ²⁾	Duktales Mammakarzinom	Pleuraerguss	A
MDA-MB468 ²⁾	Duktales Mammakarzinom	Pleuraerguss	A
A431 ³⁾	Epidermoidkarzinom	Primärtumor	A
NIH3T3 ²⁾	-	embryonale Fibroblasten	A
MEF ⁴⁾	-	embryonale Fibroblasten	A

¹⁾Erhalten von Dr. Alexander Schulte, Institut für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg; ²⁾ erhalten aus der Zellkulturbank des ICRF Laboratory, St Thomas Hospital, London, UK; ³⁾ erhalten von American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, ATCC CRL-1555; ⁴⁾ erhalten vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie; ⁵⁾ Virustransformation durch Dr. Vida Vafaizadeh, Georg Speyer Haus, Frankfurt

3 Methoden

3.1 Zellkulturtechniken

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden alle zellbiologischen Arbeiten an einer Sterilwerkbank unter Anwendung steriler Arbeitstechniken durchgeführt. Verwendete Zellkulturmaterialien (Zellkulturgefäße, Kulturmedien etc.) wurden vor Gebrauch sterilisiert bzw. lagen vom Hersteller in steriler Form vor. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem, auf die zellspezifischen Wachstumsbedingungen angepassten Brutschrank. Dieser gewährleistete durch eine kontinuierliche Kohlendioxidzufuhr (5 % CO₂ bzw. 10 % CO₂) sowie bei konstanter Luftfeuchtigkeit ein kontrolliertes Klima bei 37 °C. Alle hierfür verwendeten Medien, Lösungen und Materialien sind dem Anhang III zu entnehmen.

3.1.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

3.1.1.1 Auftauen der Zellen

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff in Kryoröhrchen aufbewahrt. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurde die Zellsuspension in 15 mL des Kulturmediums (37 °C) aufgenommen und bei 1200 rpm 3 min zentrifugiert. Nach der Resuspension des entstandenen Zellpellets in 20 mL Kulturmedium wurde die Zellsuspension in einer 25 cm²-Kulturflasche im CO₂-Inkubationsschrank inkubiert.

3.1.1.2 Subkultivierung der Zellen

Zur Subkultivierung adhärenter Zellen müssten diese von ihrer Kulturfläche gelöst werden. Sobald sich in den Kulturgefäßen ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte, wurde dieser zweimal mit PBS⁻ gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin/EDTA auf die Zellschicht gegeben und für 2 min. bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen im jeweiligen Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (1200 rpm, 3 min). Das entstandene Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und mit einer entsprechenden Verdünnung im jeweiligen Wachstumsmedium im CO₂-Inkubator kultiviert. Zum schonenderen Passagieren von Primärkulturen wurde statt Trypsin/EDTA eine Papainlösung (Biochrom, Berlin, D) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Subkultivierung von in Sphären wachsenden Zellen wurde der Inhalt einer Kulturflasche bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde bis auf ein Volumen von ca. 500 µL entfernt. Um die Zellen zu vereinzeln, wurde das Zellpellet mit Hilfe einer 100 µL-Pipette vorsichtig resuspendiert.

Anschließend wurde die Zellsuspension im jeweiligen Kulturmedium verdünnt und weiter kultiviert.

3.1.1.3 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese wie beschrieben kultiviert, wenn nötig von der Kulturfläche gelöst und anschließend zentrifugiert (1200 rpm für 3 min). Der dadurch entstandene Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in Einfriermedium (Tabelle A-XIV) resuspendiert. Anschließend wurden je 1 mL dieser Zellsuspension in vorbereitete Kryoröhrchen aliquotiert und diese für 2 Stunden bei 4 °C gekühlt. Nach 12-stündiger Lagerung bei -20 °C und anschließender 12-stündiger Aufbewahrung bei -80 °C kamen die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff.

3.1.2 Kultivierungstechniken zur Primärkultur von Tumorzellen

3.1.2.1 Kultivierung von Primär-Tumorzellen auf Feederlayern

Als *Feederlayer* wurden embryonale Mausfibroblasten (MEF = *mouse-embryonal fibroblasts*) oder murine NIH3T3-Zellen in einer Kulturschale bis zu einer 80 %igen Konfluenz kultiviert. Zur Inhibierung des Zellwachstums der *Feeder*-Zellen wurden die Zellen nach Erreichen der benötigten Konfluenz mit Mitomycin C behandelt. Hierfür wurden die Zellen für 3 h in Mitomycin-Medium (0,1 mg/mL in RPMI-Medium) im Brutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ wurden die in Primärmedium resuspendierten Zellen auf die inaktivierten Zellen gegeben und im Inkubator kultiviert.

3.1.2.2 Isolierung von Zellklonen aus Mischkulturen

Zur Isolierung von Zellklonen aus einer Mischkultur wurde das betreffende Zellareal an der Unterseite der Kulturschale unter einem inversen Mikroskop (Wilovert S, Hund, Wetzlar, D) markiert. Anschließend wurde das Medium der Kulturschale abgenommen und das Zellareal zweimal mit PBS⁻ gewaschen. Sterile in Papain- oder Trypsin/EDTA-Lösung getränkte Filterpapierstückchen (Carl Roth, Karlsruhe, D) wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette auf dem Zellareal platziert und für 2 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend konnte das Filterpapier mit den isolierten Zellen in eine 96-Loch-Schale, mit Primärmedium überschichtet und im Inkubator platziert werden. Am nächsten Tag fand ein Mediumwechsel statt. Sobald die transferierten Zellen in der Kulturschale angewachsen waren, wurde das Filterpapier entfernt. Alternativ wurden die Fibroblasten von der Kulturoberfläche abgeschabt. Hierfür wurden die Fibroblasten um das markierte Zellareal mit Hilfe eines Zellschabers entfernt. Das Zellareal wurde anschließend zweimal mit Primärmedium gewaschen und in diesem Medium im Brutschrank kultiviert.

3.1.3 *Soft-Agar-Assay*

Mit Hilfe des *Soft-Agar-Assays* kann das maligne Potential von kultivierten Zellen bestimmt werden. Dieses besteht darin, dass Tumorzellen im Gegensatz zu nicht malignen Zellen in einer bindungsunabhängigen Umgebung proliferieren können. So wachsen viele Tumorzellen in Suspensionskulturen oder in semi-festen Medien, wie z.B. Agar.⁹¹

Zunächst wurde eine 5 %ige (w/v) 10 x Agar-StammLösung angesetzt (in ddH₂O), autoklaviert und zusammen mit der benötigten Menge des Wachstumsmediums auf 45 °C temperiert. Zur Herstellung der Boden-Agar-Phase erfolgte die Verdünnung der Agar-StammLösung mit Wachstumsmedium auf eine Konzentration von 0,5 %. Im Anschluss kam die 0,5 %ige Agar/Medium-Lösung in das jeweilige Kulturgefäß (60 mm Kulturschalen = 7 mL Boden-Agar-Phase). Jeder Ansatz wurde hierbei als Triplikat angefertigt. Die zu untersuchenden Zellen wurden zur Herstellung einer Einzelzellsuspension trypsiniert, gezählt, bis zur gewünschten Zellzahl in mehreren Stufen verdünnt und kurz auf eine Temperatur von 40 °C erwärmt. Zusammen mit der 0,5 %igen Agar/Medium-Lösung (1,5 mL für 60 mm Kulturschale, 40 °C) sollte nun die gewünschte Zellzahl (z.B. 5000 Zellen pro Schale) in 0,33 % Agar vorliegen. Die sog. *Top-Phase* wurde vorsichtig auf die ausgehärtete Bodenphase gegeben und im Brutschrank inkubiert. Zweimal wöchentlich wurde frisches Medium zum Ansatz gegeben. Nach einer zweiwöchigen Inkubation erfolgte die Zählung der entstandenen Kolonien der einzelnen Ansätze unter einem inversen Lichtmikroskop. Nicht maligne Zellen formen hierbei keine Zellkolonien, Tumorzellen hingegen können diese schon nach einer Woche bilden.

3.2 **Anreicherung von Tumorzellen aus Patientenmaterial**

3.2.1 Anreicherung von CTCs/DTCs mittels *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation

Mit Hilfe der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation nach Braun et al.^{92, 93} wurden die MNC der jeweiligen Patientenprobe (Zentrifugation auf 20 mL *Ficoll*, bei 1400 rpm für 20 min bei 4°C, ohne Bremse) von den restlichen Blut- oder Knochenmarkbestandteilen separiert. Dieses Anreicherungsprinzip beruht auf den unterschiedlichen Dichten der einzelnen Zelltypen, die in den Blut- bzw. Knochenmarkproben vorhanden sind. Granulozyten und Erythrozyten verfügen über eine höhere Dichte als MNC und sammeln sich deshalb nach der Zentrifugation unter dem *Ficoll*-Gradienten an. Dagegen befinden sich die MNC in der Interphase (Abbildung 3-1). Diese Interphase wurde separiert und mit PBS- für 10 min bei 1400 rpm gewaschen. Gegebenenfalls erfolgte anschließend in Abhängigkeit vom Erythrozytenanteil eine Erythrozyten-Lyse nach Angaben des Herstellers (*Whole Blood Erythrocyte Lysing Kit*, R&D

Systems, Minneapolis). Wurden die Zellen nach der Anreicherung in Kultur genommen, kam die Erythrozyten-Lyse nicht zur Anwendung. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl der mononukleären Zellsuspension mit Hilfe eine Neubauer-Zählkammer (Kapitel 3.2.6).

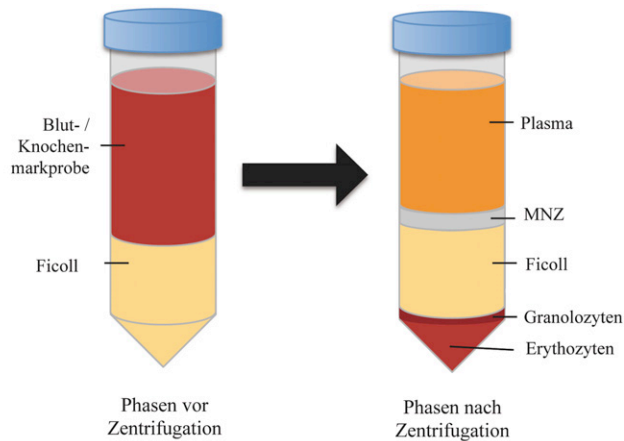


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung von CTCs/DTCs. Einzelne Phasen vor und nach der Zentrifugation.

Jeweils 7×10^5 Zellen wurden für 3 min bei 1200 rpm auf einen Objektträger zentrifugiert (siehe Kapitel 3.2.7) und über Nacht getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Kultivierung der Zellen erfolgte eine direkte Aufnahme der MNC in Wachstumsmedium (Tabelle A-XIV, Medium D) sowie eine anschließende Inkubation dieser Zellen in einer Kulturschale bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $5\text{ }\%$ CO_2 .

3.2.2 Anreicherung von CTCs mittels *RosetteSep*[®]-Antikörpercocktail

Auch bei der Anreicherung von CTCs mit Hilfe des *RosetteSep*[®]-Antikörpercocktails wird das Prinzip der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation angewandt. Der hierbei verwendete Antikörpercocktail enthält verschiedene, gegen hämatopoetische Zellen gerichtete Antikörper (CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD45, CD66b). Diese sind durch einen anti-GlycoproteinA-Antikörper (Protein der Erythrozytenmembran) zu bispezifischen Antikörperkomplexen verknüpft (Abbildung 3-2-I B+C). Diese Komplexe bewirken eine gleichzeitige Bindung von Ery- und Leukozyten in der Blutprobe. Dadurch werden unerwünschte Blutzellen zu sog. Rosetten vernetzt, die so aufgrund ihrer erhöhten Dichte durch die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation von den CTCs getrennt werden können (Abbildung 3-2 I). Zu diesem Zweck wird das EDTA-Blut in ein Falcon-Röhrchen überführt, mit $20\text{ }\mu\text{L}$ des *RosetteSep*[®]-Antikörpercocktails versetzt und für 20 min bei RT auf einem

Rotator inkubiert. Anschließend wird die Probe 1:1 mit PBS / 2 % FCS verdünnt und auf den *Ficoll*-Gradienten geschichtet (Volumina s. Abbildung 3-2-II). Durch die Zentrifugation (20 min, 2500 rpm, ohne Bremse) sammeln sich die Granulozyten zusammen mit den Rosetten aus Ery- und Leukozyten unter dem *Ficoll*-Gradienten an, während sich die CTCs in der Interphase über dem *Ficoll*-Gradienten befinden. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase vorsichtig isoliert und mit PBS/2 % FCS sowie Kulturmedium gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 2500 rpm, RT). Die Zellen wurden für 3 min bei 1200 rpm auf zwei Objektträger zentrifugiert oder direkt in Primärmedium aufgenommen und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

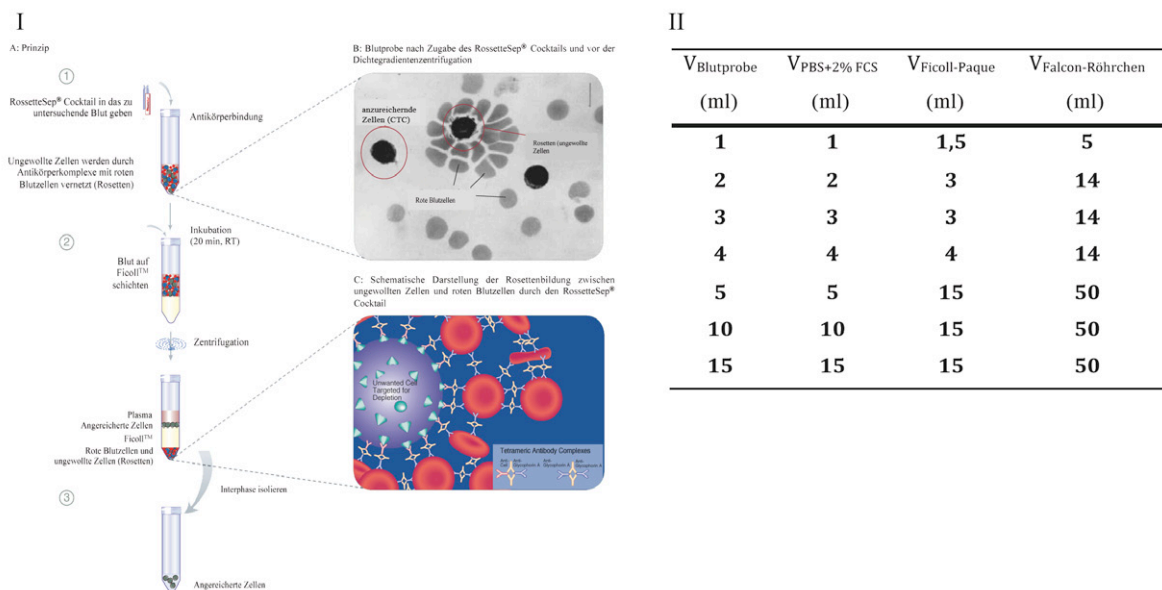


Abbildung 3-2: Anreicherung von CTCs/DTCs mittels RosetteSep®-Antikörpercocktail. I: Schematische Darstellung der Anreicherung von CTCs mit Hilfe des *RosetteSep*®-Antikörpercocktails und anschließender mit der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation. Einzelne Phasen vor und nach der Zentrifugation. II: Die für *RosetteSep*®-Anreicherung von CTCs aus peripheren Blut benötigten Volumina der einzelnen Reagenzien. Das Reagenzien-Volumen ist auf das der Blutprobe abgestimmt.

3.2.3 Anreicherung von CTCs/DTCs mittels magnetischer Zellseparation (*Magnetic cell separation = MACS*®)

Die magnetische Tumorzell-Separation wurde unter Verwendung des *MACS*®-Systems der Firma Miltenyi GmbH durchgeführt. Bei dieser Methode wurden die Tumorzellen mit Hilfe von *MicroBeads* aus dem peripheren Blut oder Knochenmark isoliert. *MicroBeads* sind supramagnetische Nanopartikel, die mit einem hoch spezifischen Antikörper gegen ein korrespondierendes Antigen der Zelloberfläche konjugiert sind. Die *MicroBeads* können durch ihren konjugierten Antikörper direkt (z.B. *EpCAM-MicroBeads*) oder über einen Brückenantikörper indirekt (z.B. *Anti-Mouse IgG1 MicroBeads*) an das Antigen der Zielzelle binden. Die entstehenden Zell-*MicroBead*-Komplexe wurden mit Hilfe eines magnetischen

Feldes (magnetischer Separator) über eine ferromagnetische *MACS*[®]-Säule von den restlichen Bestandteilen der Patientenprobe separiert. Die Zellanreicherung kann dabei in die sog. „Positiv-Anreicherung“ und in die „Negativ-Anreicherung“ differenziert werden. Befinden sich die Zellen im Eluat, so wird von einer Positiv-Anreicherung gesprochen (z.B. Zellanreicherung mit *EpCAM-MicroBeads*). Befinden sich die zu isolierenden Zellen im Durchlauf, spricht man von einer Negativ-Anreicherung (z.B. Zellanreicherung mit *CD45 MicroBeads*) (Abbildung 3-3). MNC aus Knochenmark wurden zuvor mittels *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kapitel 3.2.1) angereichert und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Blutproben wurden vor der CTC-Anreicherung durch das *MACS*[®]-System einer Erythrozyten-Lyse unterzogen. Dafür wurde die Probe in ein 50 mL-Falcon-Röhrchen überführt und mit Lysepuffer (Tabelle A - XX) auf ein Volumen von 45 mL aufgefüllt. Nach einer 30 minütigen Inkubation des Ansatzes auf Eis wurden die verbleibenden Zellen pelletiert (Zentrifugation: 10 min, 700 x g, 4°C).

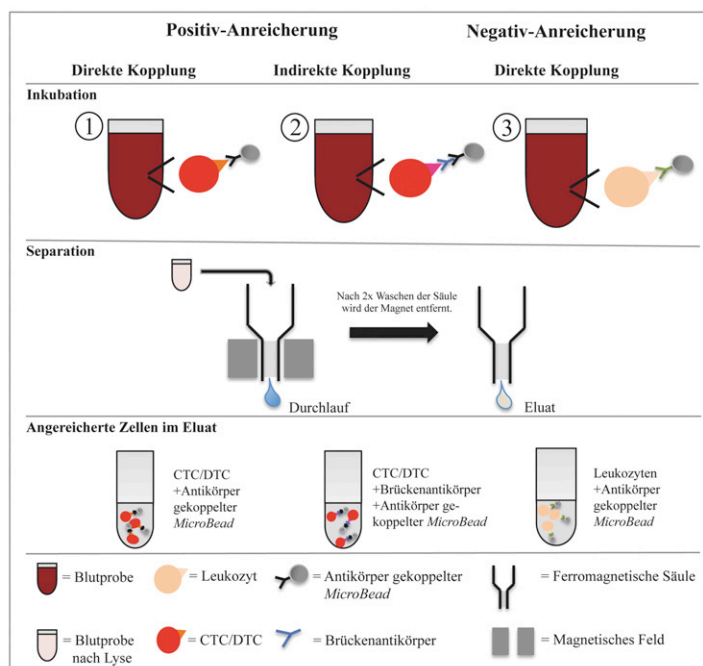


Abbildung 3-3: Anreicherung über das *MACS*[®]-System. Schematische Darstellung des *MACS*[®]-Systems der Firma Miltenyi GmbH zur Anreicherung von CTCs/DTCs.

Das Zellpellet wurde in 300 μ L *Auto MACS*[®]-*Running Buffer* zusammen mit 100 μ L *FCR-Blocking*-Reagenz aufgenommen und mit 100 μ L der jeweiligen *MicroBeads* magnetisch markiert (Inkubation: 30 min, 4 °C). Wurde für die Markierung der Tumorzellen die indirekte Markierung gewählt, wurde die Zellsuspension zusätzlich 30 min bei RT mit dem jeweiligen

Brückenantikörper inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 2 mL *Auto MACS[®]-Running Buffer* (Zentrifugation: 10 min, 300 x g, 4 °C) wurde die mit den magnetischen *MicroBeads* versetzte Zellsuspension nach Herstellerangaben auf eine magnetischen Säule aufgetragen. Während die nicht markierten Zellen die magnetische Säule ungehindert durchlaufen, werden die magnetisch markierten Zellen auf der Säule zurückgehalten. Der Durchfluss wurde dabei als nicht markierte Zellfraktion aufgefangen und später auf Zytospins zentrifugiert bzw. in Kultur genommen. Anschließend wurde die Säule nach dreimaligem Waschen mit *Auto MACS[®]-Running Buffer* aus dem Magneten entfernt und die separierten Zellen, je nach Verwendungszweck in 500 µL PBS⁻ bzw. Kulturmedium eluiert. Das Eluat wurde entweder auf Objektträger zentrifugiert oder in Kultur genommen.

3.2.4 Anreicherung von CTCs durch das *CellSearch[™]*-System

Für die automatisierte und standardisierte Anreicherung von epithelialen CTCs aus Patientenblut fand das *CellSearch[™]-System* mit Hilfe des *Circulating Epithelial Cell Kit* (Veridex, Raritan, NJ, USA) Anwendung. Die zu analysierenden Blutproben wurden dazu in *CellSave Preservative* Röhrchen (Veridex, Raritan, NJ, USA) abgenommen. Anschließend wurden von dieser Probe 7,5 mL in ein Probenröhrchen überführt und mit 6,5 mL Verdünnungspuffer versetzt und zentrifugiert (10 min, 800 rpm, RT, ohne Bremse). Die Anreicherung der CTCs erfolgte im *CellSearch Autoprep* System, welches Tumorzellen mit anti-EpCAM-Antikörper-konjugierten Ferrofluiden immunomagnetisch aus dem Blut anreichert. Zur Detektion der CTCs in der angereicherte Zellfraktion wurde durch das System zusätzlich eine automatisierte Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol), einer Keratinfärbung (CK8, 18 und 19 - Phycoerythrin-markierter Antikörper) sowie, zur Unterscheidung der CTCs von hämatopoetischen Zellen, einer CD45-Färbung (hämatopoetischen Oberflächenmarkers - Allophycocyanin-markiert Antikörper) unterzogen. Nach der Anreicherung lagen die separierten Zellen in einem Volumen von 300 µL in der *CellSearch[®]*-Kartusche vor. Zur visuellen Analyse wurden die anti-EpCAM-Ferrofluid gebundenen Zellen mit Hilfe eines magnetisches Feldes durch das *MagNest[®] cell presentation device* (Veridex, Raritan, NJ, USA) an der Oberfläche der Kartusche angeordnet und durch eine automatisierte Mikroskopeinheit (*CellTracks[®] Analyzer II*, Veridex, Raritan, NJ, USA) nach Keratin-positiven Ereignissen durchsucht. Anschließend folgte die manuelle Auswertung dieser Ereignisse. Zellen wurden als CTCs identifiziert, wenn sie durch eine Keratinexpression, eine Kernfärbung und bei fehlender Expression von CD45 dieser Zelle visualisiert werden konnten.

3.2.5 Anreicherung von Tumorzellen aus Biopsien von Tumorpatienten

3.2.5.1 *Anreicherung von Tumorzellen aus Pleurapunktat*

Tumorpatienten wurde Pleurapunktat mit einem Volumen von 1 mL bis zu 5 L entnommen. Das gesamte Punktat wurde unter sterilen Bedingungen in 50 mL-Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren der Proben bei 1400 rpm für 5 min. Die so entstandenen Zellpellets wurden in 1 mL PBS⁻ resuspendiert, zusammengeführt und ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach zweimaligen Waschen der angereicherten Zellen mit PBS⁻ (Zentrifugation: 1200 rpm, 5 min) erfolgte eine Aufnahme der Zellen in das jeweilige Medium. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen im jeweiligen Kulturschrank unter verschiedenen Kulturbedingungen bei 37 °C inkubiert.

3.2.5.2 *Isolierung der Tumorzellen aus Knochenmetastasen*

Frisch entnommenes, nicht für die Diagnostik benötigtes Gewebe von Knochenmetastasen aus Tumorpatienten wurde in PBS⁻ aufgenommen. Mit Hilfe eines Skalpells (B. Braun, Tuttlingen, D) wurde die Probe in kleinere Stücke geteilt. Die Tumorstücke wurden zur weiteren Analyse in Paraffin eingebettet bzw. direkt in flüssigem Stickstoff zur längerfristigen Lagerung eingefroren. Für die Anfertigung von Zytospins wurde durch mechanische Zerkleinerung soweit wie möglich eine Einzelzellsuspension hergestellt. Weiterhin wurden zur Etablierung einer Zelllinie aus Knochenmark Teile der Einzelzellsuspension in 7 mL Medium gegeben und zur Kultivierung im Brutschrank inkubiert. Um den Zellverbund für die Kultivierung weiter aufzulösen, wurde Collagenase Typ III, CLS III (Biochrom AG, Berlin, Dtl.) mit einer Endkonzentration von 0,1 % (w/v) eingesetzt. Das zu behandelnde Tumorstück wurde mit dem Collagenase-Medium-Gemisch überschichtet und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag folgte das Zentrifugieren dieser Zellsuspension (1200 rpm, 3 min). Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden zur weiteren Kultur im frischen Medium resuspendiert und im Brutschrank inkubiert.

3.2.6 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl eines definierten Volumens kann mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Optik Labor, Fried, D) bestimmt werden. Um apoptotische Zellen zu erkennen, wurden 10 µL der zu zählenden Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau-Lösung vermischt. Dieser anionische Azofarbstoff bindet an Zellproteine, die nicht membranständig sind. So färbt er apoptotische Zellen durch deren Membranintegrität blau an, vitale Zellen bleiben hingegen ungefärbt. Anschließend wurden 10 µL des zu zählenden Proben/Trypanblau-Gemisches an den oberen Rand des

Deckglases auf der Neubauer-Zählkammer gebracht. Mit einer 20 fachen Vergrößerung wurden 4 Quadrate der Zählkammer unter einem Mehrlinsenmikroskop (Zeiss, Jena, D) mit Hilfe eines Handstückzählers ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit Formel 3-1 berechnet.

Formel 3-1: Berechnung der Zellzahl pro mL nach der Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{2} \cdot 10^4 \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right]$$

3.2.7 Anfertigung von Zytospinpräparaten

Sowohl zur Detektion und Charakterisierung von angereicherten Tumorzellen aus Patientenproben als auch zur Analyse von Zellkulturzellen wurden mit diesen nach der Anreicherung (Kapitel 3.2) bzw. nach dem Passagieren (Kapitel 3.1.1.2) Zytospinpräparate angefertigt. Zu diesem Zweck mussten die Zellen in PBS⁻ vorliegen. Nach der Bestimmung der Zellzahl (Kapitel 3.2.6) wurde das benötigte Volumen der Zellsuspension berechnet (Tabelle 3-1), in einen Trichter pipettiert und durch Zentrifugation (1200 rpm, 3 min) auf den darunter eingespannten Objektträger aufgebracht.

Tabelle 3-1: Für die Anfertigung von Zytospins verwendete Zellzahl unterschiedlicher Proben.

Probe	Zellzahl (Zellen pro OT)
Knochenmark/Blut (nach <i>Ficoll</i> -Dichtegradientenzentrifugation)	700.000
Pleurapunktat (nach Anreicherung)	600.000
Blut Heidelberg (nach <i>Ficoll</i> -Dichtegradientenzentrifugation)	600.000
Zelllinienzellen	300.000
vereinzelte Zellen aus Knochenmetastasen	600.000
Kontrollen aus gesunden MNC und Tumor-Zelllinienzellen	700.000

3.3 Immunhistochemische Detektion

Alle zur immunhistochemischen Detektion verwendeten Antikörper sowie deren Gebrauchsverdünnung sind im Anhang unter Tabelle A-XVIII und Tabelle A-XIX aufgelistet. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche immunhistochemische Methoden angewandt (Immunfluoreszenz, immunenzymatische Detektion mit alkalischer Phosphatase und Diaminobenzin-Immunhistochemie). Bei jeder dieser Methoden wurden die Objektträger auf gleiche Weise vorbehandelt (s. Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Schritte für die Vorbehandlung von Zytospins und Paraffinschnitte zur immunhistochemischen Detektion.

Schritt	Zytospin	Paraffinschnitt
Deparaffinisierung	×	1 h bei 60 °C
Paraffinenfernung/ Rehydrierung	×	2 x 15 min Xyol Rehydrierung: 2 x 10 min in 100 % Ethanol 2 x 1 min in 96 % Ethanol 2 x 1 min in 80 % Ethanol 1 x 1 min in 70 % Ethanol 1 x dest. H ₂ O
Vorbehandlung	×	Antikörper abhängig (Tabelle A – XVIII)
Fixierung	Epimet-Solution B Fixierungslösung	×
Waschen	2x 3 min mit 1x TBST	2x 3 min mit 1x PBS
Permeabilisierung	5 min mit 1% Triton X/PBS ⁻ (Tabelle A – XVIII)	×
Protein-Blocking	20 min mit Dako Proteinblocking (für Zelllinienzellen) bzw. A/B- Serum (für Patientenzellen)	20 min mit A/B-Serum
Inkubation mit primären Antikörper (Verdünnung: Tabelle A – XVIII)	45 min in Dako Proteinblocking (für Zelllinienzellen) bzw. A/B Serum (für Patientenzellen)	Dauer: (Tabelle A – XVIII) in A/B-Serum

3.3.1 Immunfluoreszenz-Färbung an Zytospins

Die Immunfluoreszenz-Färbung (IF) basiert auf der Verwendung von Antikörpern (AK), die chemisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Fluorescein Isothiocyanat (FITC) oder Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate (TRITC)) konjugiert sind. Ein Antigen kann entweder direkt, über einen fluoreszenzgekoppelten Primär-AK oder indirekt über einen zusätzlichen fluoreszenzgekoppelten gegen den Primär-AK gerichteten Sekundär-AK mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops visualisiert werden (Abbildung 3-4). Zur Detektion von Antigenen an auf Zytospins fixierten Zellen wurden diese, wie beschrieben vorbereitet (Tabelle 3-2). Bei der indirekten IF folgte außerdem eine 30-minütige Inkubation mit einem gegen den Primär-AK gerichteten fluoreszenzgekoppelten Sekundär-AK. Sollte außerdem ein zweites Antigen visualisiert werden, wurde vor der 2. Primär-AK-Inkubation ein zusätzlicher Proteinblocking-Schritt durchgeführt (Tabelle 3-2). Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Objektträger jeweils 3 Mal für 3 min mit 1x TBST-Puffer gewaschen. Bevor das Zellareal mit *VECTASHIELD® Hard-Set™ Mounting Medium* mit DAPI eingedeckelt wurde, wurden die Objektträger in Aqua dest. geschwenkt. Für die manuelle Auswertung der Färbung kam ein Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, D) zum Einsatz.

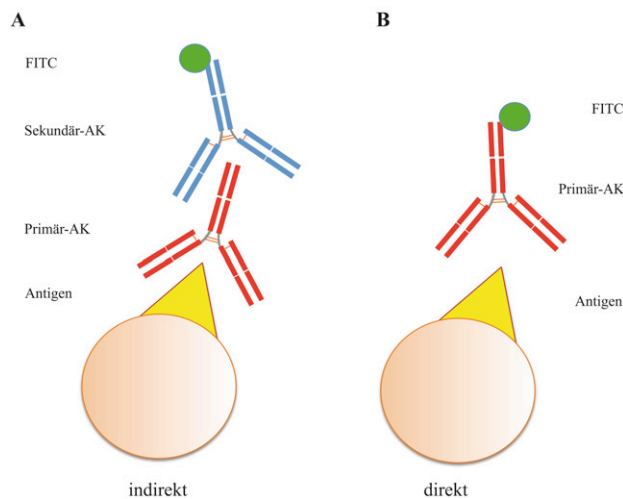


Abbildung 3-4: Schema der direkten (A) und indirekten (B) Immunfluoreszenzfärbung.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbung an zellbewachsenen *Chamber Slides*

Zur Immunfluoreszenzfärbung von zellbewachsenen *Chamber-Slides* wurde bei ausreichender Konfluenz der Zellen das Medium abgenommen und das Zellareal jeweils kurz mit 300 μL PBS^- gewaschen. Anschließend folgte eine 30-minütige Fixierung (RT) der Zellen durch 100 μL 3 % PFA-Lösung. Nach einem weiteren Waschschrift (3 Mal für 5 min mit PBS^-) schloss sich eine Inkubation mit 50 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl) für 30 min an. War eine Permeabilisierung der Zellen nötig (Tabelle A – XVIII), wurde das Zellareal für 4 min 1% Triton X/ PBS^- behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift (3 Mal für 5 min mit PBS^-)

wurde die Färbung, wie unter 3.3.1 beschrieben mit der Primärantikörperinkubation fortgeführt.

3.3.3 Fluoreszenzfärbung an lebenden Zellen

Zur Detektion von Tumorzellen in einem Zellgemisch während der Kultivierung wurde eine Fluoreszenzfärbung an lebenden Zellen durchgeführt. Der Überstand der zu färbenden zellbewachsenen Kulturschale wurde abgenommen. Unspezifische AK-Bindungen wurden durch zweimaliges Waschen des Zellareals mit Depletionsmedium (Tabelle A-XIV) bei 37 °C verhindert. Im Anschluss folgte eine dreistündige Inkubation der Zellen in Depletionsmedium im Brutschrank. Als Primär-AK fand der gegen das Epithel-spezifische Antigen EpCAM gerichtete Antikörper (Tabelle A – XVIII; Verdünnung: 1:75 in Depletionsmedium) Verwendung. Nach einer 20-minütigen Primär-AK-Inkubation der Zellen bei 37 °C folgte ein Waschschriff der Zellen mit PBS⁻ (3 Mal für 5 min). Darauf schloss sich eine 15-minütige Sekundär-AK-Inkubation der Zellen (Alexa FluorTM564 Ziege anti-Maus-IgG; Verdünnung: 1:200 in Depletionsmedium) bei 37 °C im Inkubator an. Anschließend wurde das Zellareal mit PBS⁻ gewaschen (3 Mal für 5 min, 4 °C) und sofort mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Jena, D) analysiert.

3.3.4 Immunozytometrische Detektion mit APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex)

Die enzymatische Detektion mit Alkalischer-Phosphatase-Anti-Alkalischer-Phosphatase (APAAP) ist eine indirekte Nachweismethode, bei der das nachzuweisende Antigen mit einem entsprechenden Primärantikörper (Maus-IgG) inkubiert wird. Die Bindung des APAAP-Komplexes erfolgt anschließend über einen gegen Maus gerichteten Brückenantikörper (Abbildung 3-5). Durch diese Antikörperbindungen wird eine Verstärkung des Signals erreicht, da die Bindungsstellen für den APAAP-Komplex vervielfacht werden. Dadurch können auch geringe Mengen an Antigenen nachgewiesen werden.⁹⁴ Handelt es sich bei dem Primärantikörper um ein Kaninchen-IgG, kann auch ein direkt mit alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-Kaninchen-IgG verwendet werden (Abbildung 3-5-B). Die eigentliche Visualisierung dieser Bindung erfolgt durch die Inkubation mit dem Substrat Neufuchsin. Die im APAAP gebundene alkalische Phosphatase (aus fötalem Kalbsdarm) hydrolysiert den in der Neufuchsin-Lösung enthaltenen Naphthol-Biphosphat-Ester zu phenolischen Verbindungen und Phosphaten. Die Phenole lagern sich zu Diazoniumsalzen (Chromogen) zusammen und produzieren dadurch die unlöslichen Azofarbstoffe, das rotgefärbte Endprodukt.⁹⁵

Zur Färbung von Zytospins oder Paraffinschnitten mittels APAAP-Methode wurden die Objektträger wie beschrieben vorbehandelt (Tabelle 3-2). Nach der Primär-AK-Inkubation schloss sich eine 30-minütige Inkubation der Objektträger mit dem gegen den Primär-AK gerichteten Sekundärantikörper (polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-IgG bzw. polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen-IgG/AP) an. Wurde als Sekundärantikörper der polyklonale Kaninchen-anti-Maus-IgG-AK verwendet, folgte eine 30 minütige Inkubation der Zellen mit dem APAAP-Komplex (Brücken-AK APAAP Maus, monoklonal). Wurde als Sekundär-AK ein polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen-IgG/AP-AK verwendet, war dieser Schritt nicht nötig, da der Sekundär-AK direkt mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt war. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µL Neufuchsin-Substratlösung (Ansatz s. Tabelle 3-3) benetzt und für 20 min inkubiert. Zwischen den Inkubationsschritten wurde jeweils ein Waschschritt mit den Objektträgern durchgeführt (3 Mal 3 min mit 1x PBS). Um die Zellkerne zu visualisieren, wurden die Zellen einer Kernfärbung mittels Hämalaun (20 sec Hämalaun-Lsg. dann mit Aqua dest. spülen) unterzogen. Zum Schluss wurde das Zellareal mit warmen Glycergel eingedeckelt. Die Färbung wurde anschließend an einem Durchlichtmikroskop (Zeiss, Jena, D) ausgewertet.

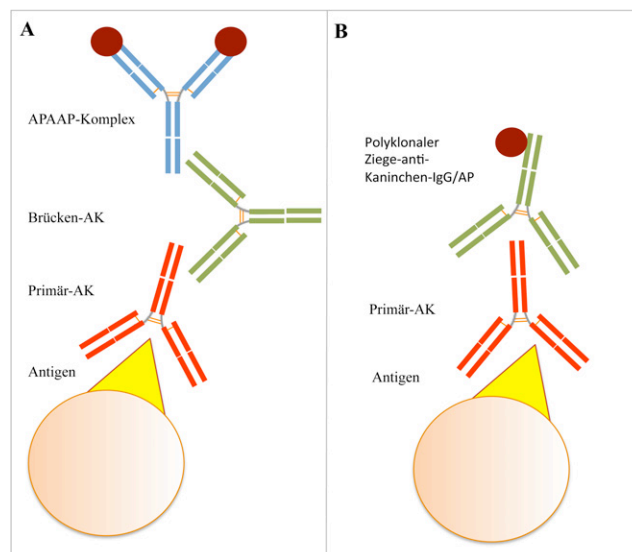


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der immunzytochemischen APAAP- Färbung (Alkalische-Phosphatase- Anti-Alkalische-Phosphatase- Komplex). A = Klassische APAAP-Methode (Einsatz von PAK, Brücken-AK und APAAP- Komplex), B = Einsatz eines AP-ge- koppeltem Anti-Kaninchen-SAK zusammen mit einem Kaninchen-PAK.

Tabelle 3-3: Zusammensetzung der Neufuchsin Substratlösung

Neufuchsin Substratlösung		
A	78,8 mL	entionisiertes H ₂ O
	4,2 mL	1 M Tris Puffer
	200 µL	Levamisol
B	415 µL	NaNO ₂
	166 µL	Neufuchsin
C	42 mg	Naphtol-AS-Biphosphat
	500 µL	Dimethylformamid

3.3.5 Diaminobenzin (DAB)- Immunhistochemie

Die DAB (3,3'-Diaminobenzidin)-Immunhistochemie gehört zu den immunenzymatischen Methoden, bei denen durch eine Enzym-Substrat-Reaktion ein farbloses Chromogen in ein koloriertes Endprodukt umgewandelt wird. Zur Detektion von Proteinen in Zellen auf Zytospins und Paraffinschnitten mit Hilfe der DAB-Färbung kam das *Dako RealTM EnVisionTM Detection Kit* (Dako, Glostrup, DK) zum Einsatz. Das im Kit enthaltene Nachweisreagenz besteht aus Komplexen mit einem Dextran-Strang, an dem Peroxidase-Moleküle (HRP: Horseradish Peroxidase = Peroxidase aus Meerrettich) und sekundäre Antikörper gekoppelt sind (Abbildung 3-6). Der aus der Ziege stammende Sekundärantikörper richtet sich gleichermaßen gegen Immunglobuline aus Kaninchen und Mäusen. Nachdem der Dextran-Strang durch den Sekundärantikörper über den Primärantikörper am Zielprotein gebunden hat, wird zu diesem Ansatz eine Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben. Dieses Wasserstoffperoxid dient der Peroxidase nun als Substrat. Die freiwerdenden Protonen oxidieren das farblose DAB zu einem braunen Endprodukt. Die zu färbenden Zellen wurden wie beschrieben (Tabelle 3-2) vorbereitet.

Bei dieser Methode erfolgte der 5-minütige Blockschrift allerdings mit der im Kit enthaltenen H₂O₂-Block-Lösung. Nach der Primär-AK-Inkubation wurde als Sekundär-AK die im Kit enthaltene *EnvisionTM*-Lösung A eingesetzt. Diese enthält den gegen Maus und Kaninchen gerichteten AK-HRP-Molekül-Komplex. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgte das Waschen der Objektträger (3 Mal 3 min mit 1x TBST-Puffer). Anschließend folgte die Visualisierung der gebundenen Sekundär-AK mit Hilfe einer Substratlösung. Diese Substratlösung war wie folgt zusammengesetzt: 1 Teil Lösung C wurde in 50 Teilen Lösung D verdünnt und zur Inkubation auf das Zellareal gegeben. Sobald ein Farbumschlag (braune Färbung) auf dem Zellareal sichtbar war, kamen die Objektträger zum Waschen in mit 1x PBS⁻ gefüllte Küvetten und wurden anschließend in Aqua dest. gespült. Um die Zellkerne zu

visualisieren, erfolgte eine Behandlung der Zellen mit Hämalaun (20 sec Hämalaun-Lsg., dann mit Aqua dest. spülen). Zur Dehydrierung wurden die Objektträger je zweimal 20 sek in 80 %, 96 % Ethanol, zweimal 2 min 100 % Ethanol und zweimal 2 min Xylol inkubiert. Das Zellareal wurde anschließend mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung der Färbung erfolgte anschließend an einem Durchlichtmikroskop (Zeiss, Jena, D).

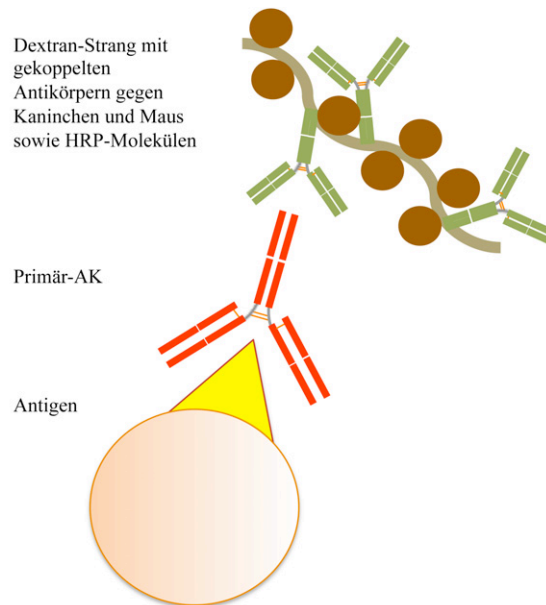


Abbildung 3-6: Schematische Darstellung der Nachweis-Komplexe zur DAB-Färbung.

3.4 Einzelzellanalyse von CTCs und Zelllinienzellen

3.4.1 Isolation von Einzelzellen

Zur Isolation von Einzelzellen wurden die auf Zytospinpräparaten befindlichen Zellen zunächst durch die IF visualisiert. Die Auswertung der einzelnen Objektträger erfolgte manuell mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes. Bestimmte Kriterien, wie ein Fluoreszenzsignal für das jeweilige Markerprotein, ein fehlendes Fluoreszenzsignal für CD45, ein großer Zellkern sowie eine markante Zellmorphologie führten zur Detektion einer CTC. Mittels *England Finder* (Plano GmbH, Wetzlar, D) wurden die Koordinaten der Tumorzellen auf dem Objektträger bestimmt. Nach dieser Prozedur wurde das Deckgläschen vorsichtig vom Zellareal entfernt. Damit die Zellen auf dem Objektträger nicht austrocknen, war während der Isolation zu gewährleisten, dass sich immer eine genügende Menge an PBS⁻ auf dem Zellareal befand. Die Koordinaten der einzelnen Zellen wurden mit Hilfe des *England Finders* an einem inversen Fluoreszenzmikroskop *Axiocvert 200* (Zeiss, Jena, D) relocalisiert. Anschließend wurde die gewünschte Zelle von dem Objektträger mit Hilfe einer speziellen Kapillare (40 µM,

Kapillartyp III, mit Anschliff) aus dem Zellareal isoliert. Die Kapillare war im Mikromanipulator *CellTram*[®] *Vario* befestigt. Mit der Steuereinheit *TransferMan*[®] *NK2* (gesamte Einheit von Eppendorf, Hamburg, D) wurde diese Kapillare bewegt. Die isolierte Zelle wurde in ein mit 2,5 µL nukleasefreies H₂O gefülltes 0,2 mL-PCR-Gefäß überführt. Die Einzelzellen wurden kurz zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Amplifikation genomischer Einzelzell-DNA

Um die isolierten Zellen molekularbiologisch charakterisieren zu können, musste die DNA jeder einzelnen Zelle um ein Vielfaches amplifiziert werden. Dafür wurde das *Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* (GE Healthcare, Chalfont St.Giles, UK) verwendet. Durch die strangverdrängende Eigenschaft der im Kit verwendeten *phi29*-DNA-Polymerase und unter Verwendung von zufällig bindenden Oligohexameren erfolgt die Amplifikation der Einzelzell-DNA. Hierbei werden verschiedene Regionen der unfragmentierten DNA-Stränge parallel in einer isothermalen Reaktion amplifiziert.⁸⁵

Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zu jedem aufgetautem Einzelzellansatz (3.4.1) kamen 9 µL des im Kit enthaltenen *GenomiPhi*-Probenpuffers sowie 1 µL Proteaselösung (107 mAU/mL, Quiagen, Hilden, D). Danach wurden die Reaktionsansätze im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, D), wie folgt inkubiert:

15 min bei 50 °C	proteolyische Zellyse
15 min bei 70 °C	Protease-Inaktivierung
2 min bei 95 °C	DNA-Denaturierung

Sofort nach Beendigung des Inkubationsprogrammes wurden die PCR-Gefäße auf Eis platziert und zu jeder Probe 9 µL des *GenomiPhi-Reaktionpuffers V2* und 1 µL des *GenomiPhi Enzym Mix V2* gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation der Proben im Thermocycler für 2,5 h bei 30 °C zur Vervielfältigung der DNA und anschließend für 10 min bei 65 °C zur Inaktivierung der *phi29*-DNA-Polymerase.

Nach der DNA-Vervielfältigung erfolgte die Aufreinigung des WGA-Produktes mit Hilfe von *NucleoSeq*-Säulen (Macherey-Nagel, Düren, D). Das getrocknete Gel in der Säule wurde zu diesem Zweck mit 600 µL Wasser über Nacht bei 4 °C hydratisiert. Vor Beladung der Säule wurde diese zusätzlich mit 300 µL Wasser gewaschen (Zentrifugation: 2 min bei 750 x g). Die weiteren Schritte der Aufreinigung erfolgten nach Herstellerangaben. Schließlich wurde das aufgereinigte WGA-Produkt mit 20 µL Wasser verdünnt und deren Konzentration mit Hilfe des *NanoDrop ND-100* Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, D, USA) bestimmt.

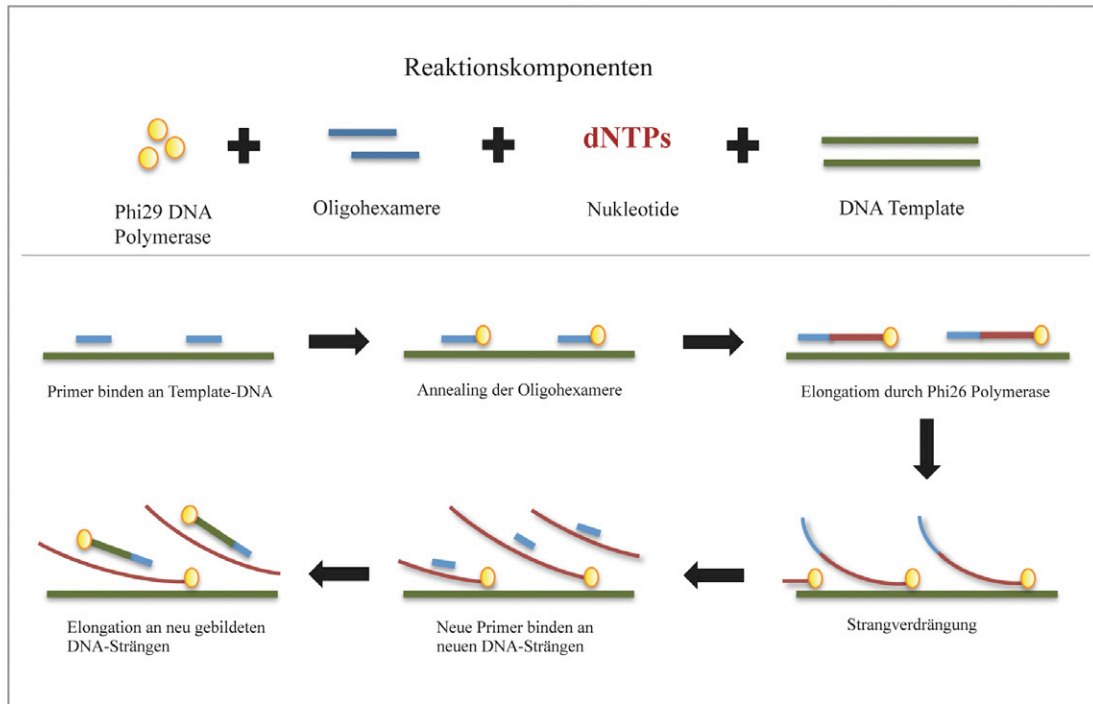


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung der Amplifikation von DNA aus Einzelzellen durch das GenomiPhi V2-WGA-Kit.

3.5 Analyse von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren kam das *NanoDrop ND-100* Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) zum Einsatz.

3.5.1 Isolierung von genomischer DNA

3.5.1.1 DNA-Isolierung aus Leukozyten

Zur Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten wurde gesunden Probanden 7,5 mL venöses Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Anschließend wurde diese Probe einer Erylyse, wie unter Kapitel 3.2.3 beschrieben, unterzogen. Das nach der Lyse entstandene Zellpellet wurde in 200 μ L PBS⁻ resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Zu dieser Zellsuspension wurden 20 μ L Proteinase K (Quiagen, Hilden, D) gegeben. Der Ansatz wurde bei 56 °C über Nacht inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der genomischen DNA wurde nach Herstellerangaben mit dem *QIAmp DNA Micro Kit* ((Quiagen, Hilden, D) *Blood Spin* Protokoll) durchgeführt.

3.5.1.2 DNA-Isolierung aus Zelllinienzellen

Zur Isolierung genomischer DNA aus Zelllinienzellen wurden adhärenente Zellen mittels Zellschaber mit 300 µL *ATL Puffer* (Bestandteil *QIAmp DNA Micro Kit*) von der Wachstumsfläche gelöst und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Dieser Ansatz wurde mit Proteinase K (Quiagen, Hilden, D) versetzt und bei 56 °C über Nacht inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der genomischen DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *QIAmp DNA Micro Kit* (Quiagen, Hilden, D). Die Elution der DNA erfolgte durch zweimaliges Auftragen von 30 µL Wasser verbunden mit einer 5-minütigen Inkubation und anschließender Zentrifugation.

3.5.1.3 DNA-Isolierung aus Primärtumoren

Zur Isolierung genomischer DNA aus frisch eingefrorenem Tumorgewebe wurde das *QIAmp DNA Mini Kit* (Quiagen, Hilden, Dtl.) verwendet. Zunächst wurde das gefrorene Tumorstück in einer zugeschnittenen, zuvor in flüssigem Stickstoff gelagerten Aluminiumfolie mechanisch zerkleinert und anschließend in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 180 µL Proteinase K wurde der Ansatz über Nacht bei 56 °C im Schüttler inkubiert. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte am nächsten Tag nach Herstellerangaben.

3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die im Rahmen der Einzelzellanalyse etablierten PCR-Protokolle (Multiplex PCR, qPCR) wurden wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben, durchgeführt.^{83, 85, 96, 97} Dafür benötigte Primerpaare sind im Anhang (Tabelle A -XV) aufgelistet.

3.5.3 DNA Sequenzierung/Mutationsanalysen

Zur Mutationsanalyse wurden die WGA-Produkte aus Einzelzellen, wie zuvor beschrieben, voramplifiziert.⁹⁷ Die anschließende Mutationsanalyse erfolgte durch eine Sequenzierung basierend auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode.⁹⁸ Hierbei kam das *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zum Einsatz. Dabei wurden pro Sequenzierungsansatz jeweils 50 ng pro 1000 bp Länge des zu analysierenden DNA-Fragments eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung des PCR-Ansatzes befindet sich in Tabelle 3-4-A. Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, D), wie in Tabelle 3-4-B aufgelistet, durchgeführt.

Zur Analyse des Reaktionsproduktes wurde dieses zunächst aufgereinigt. Dies erfolgte mittels Ethanol-Fällung zur Präzipitation des Produktes. Dazu wurde der jeweilige Ansatz mit je 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 2.5 Vol. (50 µL) 100% Ethanol vermischt und 1 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die gefällte DNA pelletiert (Zentrifugation: 20 min, 16000 rpm, 4°C) und einmal mit 50 µL 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 16000 rpm, 4 °C). Das für 15 min bei 37 °C getrocknete Pellet wurde schließlich in 20 µL *Hi-Di* Formamid (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) resuspendiert. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der *BigDye*-markierten DNA-Fragmente erfolgte im *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer*. Die Sequenzauswertung wurde mit der *Sequence Analysis Software V3.07* und *FinchTV V1.4* durchgeführt.

Tabelle 3-4: Angaben zur Sequenzierungs-PCR. A: Zusammensetzung des Ansatzes für die Sequenzierungs-PCR; B: Programm für die Sequenzierungs-PCR (C_{End} = Endkonzentration, V_{End} = Endvolumen, T = Temperatur)

A			B		
Reagenz	C_{End}	V_{End}	Vorgang	T	Zeit (min)
DNA-Template	x	(50 ng/1000 bp) x µL	Initiale Denaturierung	96 °C	4
Sequenzierungspuffer	5 x	3 µL	Denaturierung	96 °C	0:30
Primer	10 µM	1 µL	Annealing	54 °C	0:30
BigDye.Mix	2,5 x	2 µL	Elongation	60 °C	4:00
H ₂ O	-	Ad 20 µL	Kühlung	8 °C	∞

3.5.4 Vergleichende genomische Hybridisierung

Durch die vergleichende genomische Hybridisierung (*Comperative Genomic Hybridisation* = CGH) wird ein Testgenom auf numerische Ausgewogenheit untersucht.⁹⁹ Dazu werden amplifizierte Gesamtgenome aus Ziel- und Kontrollzellen mit unterschiedlichen Markern versehen. Zum Beispiel kann bei einer Direktmarkierung die Markierung über den grünen Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein (FITC) für die Tumor-DNA oder den roten Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin (TRITC) für die Leukozyten-DNA erfolgen. Anschließend werden beide Produkte zu gleichen Teilen gemischt und auf ein bekanntes Target (Metaphasenchromosomen CGH = Metaphasenpräperat, array CGH = DNA-Chip) hybridisiert, wo sie um homologe Bindungsstellen konkurrieren. Ist im Tumor eine DNA-Sequenz überrepräsentiert, bindet diese häufiger an das Target. Dadurch überwiegt der Markierungsfarbstoff der Tumorprobe (z.B. bei FITC-Markierung die grüne Fluoreszenz). Liegt hingegen ein Verlust von DNA-Sequenzen im Tumor vor, so bindet mehr Referenz-DNA an das Target. Dessen Signal (z.B. TRITC-markierte Leukozyten-DNA) ist dann in dieser

chromosomalen Region zu beobachten. Besteht ein Gleichgewicht zwischen Test- und Referenz-Genom, ergibt sich bei simultaner Betrachtung beider Markierungen eine gelbe Mischfarbe. Durch die Analyse von CGH-Profilen erhält man also die Informationen darüber, ob und an welcher Stelle im Genom im Tumor ein DNA-Gewinn oder ein DNA-Verlust vorliegt.⁹⁹ Die Erstellung von CGH-Profilen kann entweder auf der Methode der Metaphasenchromosomen-CGH (mCGH) oder auf der Array-CGH (aCGH) basieren (Abbildung 3-8).

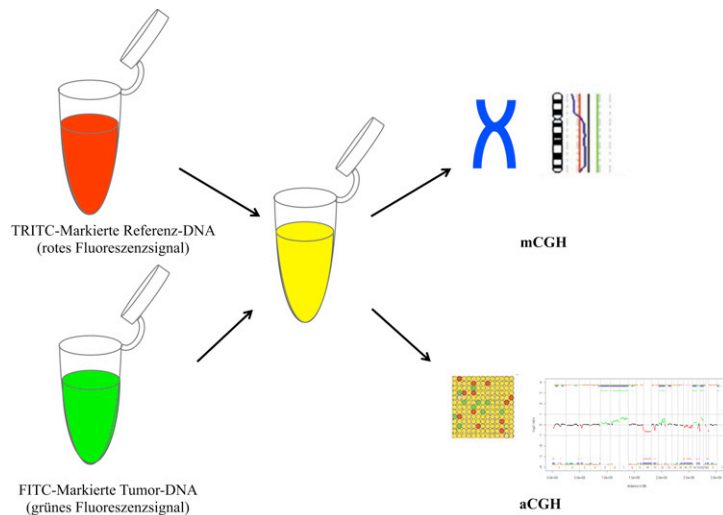


Abbildung 3-8: Schematische Darstellung der verschiedenen Methoden zur vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH).

Bei der mCGH dienen als Target Metaphasechromosomen gesunder männlicher Leukozyten. Das zu untersuchende DNA-Gemisch wird auf diese hybridisiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes ausgewertet. Bei der aCGH.¹⁰⁰ wird das zu untersuchende DNA-Gemisch auf eine Matrix, bestehend aus einem Raster von immobilisierten DNA-Fragmenten (Matrix oder DNA-Chip) hybridisiert und anschließend computerbasiert ausgewertet. Die aCGH wurde am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität in Graz durchgeführt. Hierfür kamen 1,9 µg aufgereinigter GenomiPhi-WGA-Produkte zum Einsatz.¹⁰¹

3.5.5 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Zum Nachweis von Chromosomenaberrationen in Tumorzellen wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Hierbei verwendet man fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden, die spezifisch an bestimmte Regionen auf den Chromosomen binden können. Durch diese Bindung können der Ort sowie die Anzahl der Bindungsstellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes bestimmt werden. Zur Untersuchung der Amplifikation des *EGFR*-Gens in Gewebeschnitten sowie in CTCs wurden Digoxigenin-11-dUTP markierte Klone des

PAC RP5-1091E12 (*P1 derived artificial chromosome*) (NCBI Acc. No. AC006977) verwendet. Dieser Vektor eignet sich zur Klonierung großer DNA-Moleküle und leitet sich von dem Bakteriophagen P1 ab. Weitere verwendete Sonden sind in Tabelle 3-5 aufgelistet.

Der Fluoreszenzfarbstoff war an jeder eingesetzten Sonde direkt gebunden (z.B. durch Digoxigenin, Biotin, etc.), sodass eine Auswertung der Ziel-DNA direkt nach der Hybridisierung erfolgen konnte. Für alle Hybridisierungen musste zunächst der Hybridisierungsansatz (Tabelle 3-6) für die jeweilige Menge an Objektträgern hergestellt werden.

Tabelle 3-5: Für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung verwendete Sonden.

Sonde	Hersteller/Herkunft	Einsatzvolumen pro Objektträger
<i>EGFR</i>	PAC RP5-1091E12 Spectrum Orange [®] or Spectrum Green [®] (Abbott Molecular)	2,5 µL
<i>HER2</i>	ZytoLight SPEC Her2/Cen 17 Dual Color Probe Kit (ZytoVision)	1 µL
Centromer 17		1 µL
Centromer 7	Cep7 Spectrum Green [®] (Abbott Molecular)	1 µL
Chromosom 10q25	RP11-124-B18 10q25.3-26.1 Spectrum Green [®] (Abbott Molecular)	4,5 µL
Chromosom 4q21	RP11-570L13 4q21.23 Spectrum Orange [®]	4,5 µL
Centromer 8	Cep 8 [®] Spectrum Aqua [™] (Vysis)	4,5 µL
Centromer 3	SE3, green (Kreatech Poseidon [™])	2 µL
Centromer 12	Cep12 Spectrum Green [®] (Abbott Molecular)	2 µL

Zu diesem Zweck wurde zunächst die Zielgen-Sonde mit Cot-DNA, HPL-DNA (*human placental DNA*) und Dextranblau vermischt und einer Natriumacetat/Ethanol-Präzipitation (1 h, -80 °C) unterzogen. Nach einem Zentrifugations-schritt (30 min, 13000 U/min, 4 °C) wurde das Pellet getrocknet (3 min, 37 °C) und im Mastermix resuspendiert. Zum Schluss wurde die jeweilige Zentromer-Sonde zum Ansatz gegeben.

Tabelle 3-6: Hybridisierungsansatz für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

	Volumen	Reagenz
Ansatz pro Objektträger	x μL s. Tabelle 3-5	Zielgen-Sonde
	30 μL	Cot-DNA
	1 μL	HPL-DNA
	1 μL	Dextranblau
Fällung	1/7 des Ansatzvolumens	1 M Natriumazetat
	2,5fache Menge des Ansatzvolumens	100 % Ethanol (-20°C)
<i>Fällung für 1 h bei -80 °C, im Anschluss Zentrifugation für 30 min bei 13000 U/min, 4 °C</i>		
	10 μL	Mastermix (37 °C)
	1 μL	Centromer-Sonde

3.5.5.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden zunächst für 2 h bei 60 °C gebacken. Zum Entparaffinieren wurden die Objektträger 2 Mal für 15 min in Xylol und 2 Mal für 5 min in 100 %igem Ethanol geschwenkt. Nachdem die Zellen durch eine 10-minütige Behandlung in 2%-igem Formaldehyd in Methanol (-20 °C) fixiert worden waren, folgte ein 3 maliges Waschen mit PBS⁻ für 3 min. Zur Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurden diese für 10 min in FISH-Vorbehandlungs-Puffer (*Spot-Light Tissue Heat Pretreatment Buffer*, Karlsruhe, D) bei 97°C denaturiert. Nach einer 15 min. Abkühlung folgte ein weiterer Waschschriff bei RT (zweimal 3 min in PBS⁻).

Die denaturierten Zellen wurden im Anschluss mit EnzymLösung (Zytovision, Bremerhaven, D) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger in PBS⁻ folgte eine Dehydrierung der Objektträger mit Hilfe einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (70% 80% 96% und 100% Ethanol) für jeweils 2 min. Anschließend wurde der Objektträger getrocknet und auf jedem 10 μL des Hybridisierungsansatzes (Tabelle 3-6) aufgetragen. Die Zellareale wurden eingedeckelt und Hilfe von Fixogum verschlossen. In einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, D) folgte zunächst eine Denaturierung für 3 min bei 95 °C und anschließend die Hybridisierung über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Gewebeschnitte für 2 min bei 72 °C und sowie 2 Mal für 2 min bei RT in 2xSSC/NP-40 Puffer und für 2 min in PBS⁻. Nach der Dehydrierung mit Ethanol aufsteigender Konzentration (70 %, 80 %, 96 % und 100 % Ethanol) wurden die Paraffinschnitte luftgetrocknet und mit *Vectashield[®] Mounting Medium* (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) mit 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) eingedeckelt. Die Auswertung der

FISH-behandelten Paraffinschnitte geschah mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss, Jena, D).

3.5.5.2 EGFR-FISH mit anschließender GFAP-IF an MNC

Zur Detektion von CTC durch FISH wurden Zytospins mit MNC aus Patientenblut, angereichert durch die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation, verwendet. Hierbei kamen die *EGFR*-Sonde sowie die Zentromer 7-Sonde zum Einsatz. Der Hybridisierungsansatz wurde, wie unter Kapitel 3.5.5 beschrieben, angesetzt. Die Objektträger wurden zunächst für 1 h bei 60 °C gebacken. Im Anschluss folgte eine Inkubation für 2 min bei 120 °C in der *Dako-REAL-Target-Retrival-Lösung* (*Dako, Glostrup, DK*). Nach einmaligem Waschen der Objektträger in Aqua dest. und PBS⁻ folgte die Fixierung der Zellen mit 1 % Formalin/PBS⁻ für 10 min. Zur Dehydrierung der Zellen wurden die Objektträger jeweils 1 min in den einzelnen Ansätzen einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (70% 80% 96% und 100% Ethanol) inkubiert. Nachdem die Objektträger luftgetrocknet waren, wurden diese für 5 min bei 73 °C denaturiert (Denaturierungspuffer: Anhang Tabelle A - XIV). Dann folgte ein weiteres Mal eine Dehydrierung mittels Alkoholreihe (4 °C, jeweils 2 min). Nach der Trocknung der Objektträger wurde der Sondenansatz auf das Zellareal pipettiert, mit Fixogum eingedeckelt und im Termocycler für 7 min bei 75 °C und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein Waschschrift mit 2xSSC/NP-40-Puffer für 2 min bei 73 °C und bei 21 °C. Im Anschluss an die FISH-Prozedur konnte eine zusätzliche GFAP-Immunfluoreszenzfärbung, wie bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben, durchgeführt werden. Zuletzt wurden die Kerne mittels *VECTASHIELD® Hard_Set™ Mounting Medium* mit DAPI gefärbt. Die Zytospins konnten dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss, Jena, Dtl.) ausgewertet werden.

3.5.6 Statistische Auswertungen

Die Analysen wurden mit dem Programm SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) durchgeführt. Um klinische und histopathologische Eigenschaften der GBM-Patienten mit der Präsenz von CTCs korrelieren zu können, wurde zur Bestimmung der Abhängigkeiten der einzelnen Variablen zueinander der *Chi-square* Test sowie der „Exakte Test nach Fischer“ verwendet. Parameter, die sich als statistisch unabhängig voneinander, jedoch abhängig zur Präsenz von CTCs im Blut der Patienten herausstellten, wurden in einem logistischen Regressionsmodell als Indikatorvariable überprüft. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant deklariert.

4 Ergebnisse

4.1 Detektion und Charakterisierung von CTCs aus dem Blut von GBM-Patienten

4.1.1 Etablierung von Methoden zur Detektion und Charakterisierung von CTCs im peripheren Blut von Gliompatienten

Methoden zur Detektion und Charakterisierung von zirkulierenden epithelialen Tumorzellen wurden bereits durch Meyer-Steckling, 2009^{85, 102} und Gasch, 2012^{83, 97} am Institut für Tumorbiologie etabliert. Dies erfolgte sowohl an einzelnen Zellen epithelialer Zelllinien als auch an Blutproben von Karzinompatienten. Für die Detektion und Charakterisierung von glialen CTCs aus dem Blut von GBM-Patienten mussten die bestehenden Methoden zur Einzelzellanalyse zunächst an GBM-Zelllinien getestet und wenn nötig, modifiziert werden.

4.1.1.1 Etablierung einer Anreicherungs-methode für CTCs glialen Ursprungs

Da im Blut von Krebspatienten eine sehr geringe Anzahl an CTCs vorliegt, ist ein sensitives Anreicherungsverfahren Voraussetzung für die Isolierung und weitere Analyse dieser seltenen Zellen (Verhältnis 1 CTC/10⁶ MNC⁶³). Das *CellSearch*TM-System stellt mit einer 82-90 %igen Wiederfindungsrate bereits ein FDA-geprüftes Verfahren zur Anreicherung von zirkulierenden Epithelzellen dar.^{72, 103} Hierbei sind zur CTC-Anreicherung Antikörper gegen epitheliale Markerproteine (EpCAM) etabliert. Diese werden jedoch von Zellen glialen Ursprungs nicht oder nur sehr selten exprimiert. Aus diesem Grund wurden weitere Anreicherungsverfahren, wie die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation, das *MACS*[®]-System und der *RosetteSep*[®]-Antikörpercocktail getestet. Eine definierte Anzahl an Zellen der Glioblastomzelllinie U373-MG oder der EGFR-überexprimierenden Zelllinie A431 wurden in peripheres Blut gesunder Probanden gegeben, durch die einzelnen Methoden angereichert und auf Objektträger zentrifugiert.

Das *MACS*[®]-System bietet die Möglichkeit, verschiedene gegen tumorassoziierte Antigene gerichtete Antikörper, an ferromagnetische *Microbeads* zu koppeln. Dadurch können CTCs aufgrund ihrer exprimierten Oberflächenproteine spezifisch aus dem Blut von GBM-Patienten angereichert werden. Da Proteine wie EGFR, GFAP oder CD147 häufig von Glioblastomzellen exprimiert werden, wurden gegen diese Antigene gerichteten Antikörper einzeln oder als Antikörpergemisch an die jeweiligen *Microbeads* gekoppelt. Auch die Anreicherung durch *Anti-Melanoma-MicroBeads* wurde getestet, da die Expression des

Zelloberflächenproteins MCSP (MSP = Melanoma-assoziiertes Chondroitinsulfat Proteoglycan) durch Gliomzellen bereits beschrieben wurde.¹⁰⁴

4.1.1.1.1 Ermittlung der Sensivität der getesteten Anreicherungsverfahren

Die angereicherten Zellen wurden mittels Fluoreszenzfärbung (U373-MG: PAK = anti human GFAP-AK, A431: PAK = anti human A45/BB3) visualisiert und ausgezählt. Die berechnete Wiederfindungsrate diente als Vergleichsgröße der einzelnen Anreicherungsverfahren. Je höher die Wiederfindungsrate ist, desto höher ist die Effektivität bzw. die Sensivität der Methode. Die Fluoreszenzfärbung der durch den *RosetteSep*[®]-Antikörpercocktail angereicherten Zellen konnte nicht ausgewertet werden, da die im Cocktail enthaltenen Antikörper zusammen mit den gebildeten Rosetten einen zu starken Hintergrund verursachten, sodass die Tumorzellen nicht identifiziert werden konnten (Abbildung 4-1 A). Aus diesem Grund wurden GFP-transformierte U373-MG-Zellen zur Bestimmung der Wiederfindungsrate eingesetzt. Dadurch konnte auf eine anschließende Fluoreszenzfärbung verzichtet werden und eine direkte Auszählung der Tumorzellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes stattfinden (Abbildung 4-1 B).

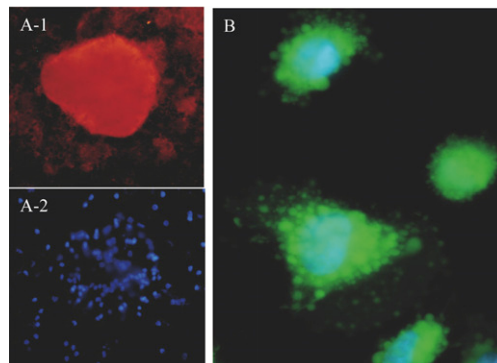


Abbildung 4-1: Aus peripherem Blut durch den *RosetteSep*[®]-Antikörpercocktail angereicherte GBM-Zellen. A: IF (PAK =anti-Kaninchen-anti human GFAP, SAK=anti-Kaninchen-Alexa 546, Kernfärbung durch *VECTA-SHIELD*[®] *Hard_Set*[™] *Mounting*-Medium mit DAPI; A-1: TRIC-Kanal, A-2: Dapi-Kanal. B: GFP-transformierte U373-MB Zellen.

Ein Vergleich der in Tabelle 4-1 aufgelisteten Wiederfindungsraten zeigt, dass die Effektivität der Anreicherung von GBM-Zellen über den *RosetteSep*[®]-Antikörpercocktail am höchsten ist (Wiederfindungsrate: 68-80 %). Die anschließende Fluoreszenzfärbung der angereicherten Zellen war hierbei, wie bereits erwähnt, nicht möglich. Da diese Färbung essentiell für die Detektion von GBM-Zellen zwischen MNC ist, wurde die Anreicherung von CTC aus Patientenproben mit der zweiteffektivsten Methode, der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (Wiederfindungsrate: 60-70 %). Die Anreicherung der CTCs durch die

verschiedenen *MicroBeads* des *MACS*[®]-Systems kam aufgrund der geringen Wiederfindungsraten nicht in Betracht (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Wiederfindungsrate (WFR in %) von GBM-Zellen bzw. EGFR-positiven Karzinomzellen durch die eingesetzten Anreicherungsverfahren. Jeweils 100 Zellen wurden in eine Blutprobe gesunder Probanden gegeben. V_{Blut} = Volumen der Blutprobe.

Anreicherungsverfahren		V_{Blut} (mL)	Zelllinie	WFR (%)
<i>Ficoll</i> -Dichtegradientenzentrifugation		7	U373MG	60-70
<i>RosetteSep</i> [®] -Antikörpercocktails		7	U373MG	9-49
		7	U373MG-GFP	68-80
<i>MACS</i> [®] -Systems				
<i>MicroBeads</i>	Antikörper			
Anti-Maus <i>MicroBeads</i>	EGFR	4	A 431	43-53
Anti-Maus <i>MicroBeads</i>	CD147	4	U373MG	50
Anti-Maus <i>MicroBeads</i>	EGFR/CD147	4	A 431	22
Melanoma <i>MicroBeads</i>	MCSP	4	U373MG	55
Protein G <i>MicroBeads</i>	GFAP	4	U373MG	53

4.1.1.2 Etablierung einer Detektionsmethode für CTCs glialen Ursprungs

Da nach der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation mögliche CTCs einer Patientenblutprobe zusammen mit hämatopoetischen MNC angereichert wurden, musste ein Detektionsverfahren etabliert werden, welches eine spezifische Visualisierung und Identifizierung der CTCs zulässt. Die CTCs sollten hierbei über ihre Expression von GFAP zwischen den angereicherten MNC detektiert werden. Ein automatisiertes Screening bietet hierfür das *ACIS-System* (*Automated Cellular Image System*, ChromaVision Medical Systems, USA). Da dieses System über ein Hellfeld-Durchlichtmikroskop verfügt, wurden die auf Objektträgern fixierten Zellen mittels ICH immungefärbt. Zu diesem Zweck wurde zunächst die GFAP-APPAP-Methode an Zellen der Zelllinie G-22, welche in MNC eingebracht wurden, etabliert. Wie in Abbildung 4-2-A zu sehen, konnte im Gegensatz zu den umgebenden MNC eine spezifische Farbreaktion des Substrates mit dem in den GBM-Zellen lokalisierten GFAP erzielt werden. Wurden allerdings angereicherte MNC von Patienten mit Hilfe dieser APAAP-Methode gefärbt, wiesen diese eine unspezifische Farbreaktion auf, sodass weder eine Detektion von CTCs noch ein automatisches Screening mit Hilfe des *ACIS*-Systems möglich war (Abbildung 4-2-B). Unter Verwendung von in MNC eingebrachte Zellen der Zelllinie U373-MB wurde deshalb alternativ eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung zur Visualisierung von GFAP- bzw. CD45-exprimierenden

Zellen etabliert. Diese bot sowohl eine spezifische GFAP-Detektion der GBM-Zellen (anti-human GFAP Antikörper/ anti-Kaninchen *Alexa FluorTM-564*) als auch eine CD45-Detektion der umgebenden MNC (anti CD45- *Alexa FluorTM-488*). Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Auswertung der Färbung sehr zeitintensiv ist, da die einzelnen Objektträger manuell ausgewertet werden müssen.

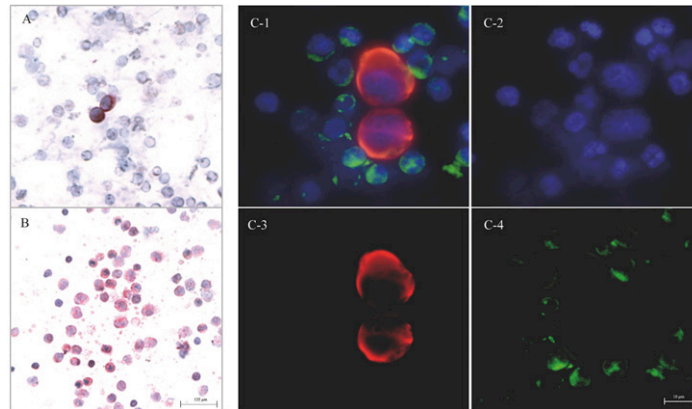


Abbildung 4-2: Etablierung einer Standard-Detektionsmethode von CTCs im peripheren Blut von GBM-Patienten. A und B: GFAP-exprimierende GBM-Zellen wurden durch die APAAP-Methode detektiert (PAK: Kaninchen-anti-GFAP-IgG, SAK: polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen-IgG/AP, Substrat: Neufuchsin, Kernfärbung: Hämalaun-Lsg.). A: Zytospins mit G-22-Zellen und MNC aus peripherem Blut gesunder Probanden. B: Zytospins mit MNC aus peripherem Blut von GBM-Patienten. C: GFAP-exprimierende U373 MB-Zellen wurden durch eine Immunfluoreszenz-Methode detektiert. Zytospins mit U373 MB-Zellen und MNC aus peripherem Blut gesunder Probanden. (PAK: Kaninchen-anti-human-GFAP-IgG; SAK: anti-Kaninchen-IgG *Alexa FluorTM-564*; direkt gekoppelter *Alexa FluorTM-488* anti-human CD45-IgG, *VECTASHIELD[®] Hard_SetTM Mounting-Medium* mit DAPI; C-1: überlagertes Bild, C-2: Kernfärbung durch DAPI, C-3: GFAP-Expression der U373 MB-Zellen, C-4: CD45-Expression der Leukozyten).

4.1.1.2.1 Kontrollversuche zur Spezifität der Fluoreszenz-Methode

Kontrollversuche zur Spezifität der Fluoreszenz-Methode wurden an jeweils $2,1 \times 10^6$ angereicherten MNC von 10 gesunden Probanden sowie an 5 Blutproben von Karzinompatienten mit Gehirnetastasen durchgeführt. In keiner der untersuchten Proben konnte ein GFAP-Signal durch Bindung des GFAP-Antikörpers an den MNC festgestellt werden. Somit wurden CTCs im Blut von GBM-Patienten nach der Anreicherung durch die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe der GFAP/CD45-Immunfluoreszenz-doppelfärbung detektiert.

Eine Zelle wurde als CTC identifiziert, wenn sie eine GFAP-Expression bei fehlender Expression von CD45, eine Kernfärbung sowie eine abweichende Morphologie gegenüber den MNC (größeres Volumen, charakteristische Form) aufweisen konnte (Abbildung 4-2-C).

4.1.1.2.2 Etablierter Arbeitsablauf zur Detektion und molekularen Charakterisierung von CTCs in Gliompatienten

In Abbildung 4-3 ist der etablierte Arbeitsablauf zur Anreicherung, Detektion und Charakterisierung von CTCs aus dem Blut von Gliompatienten schematisch dargestellt.

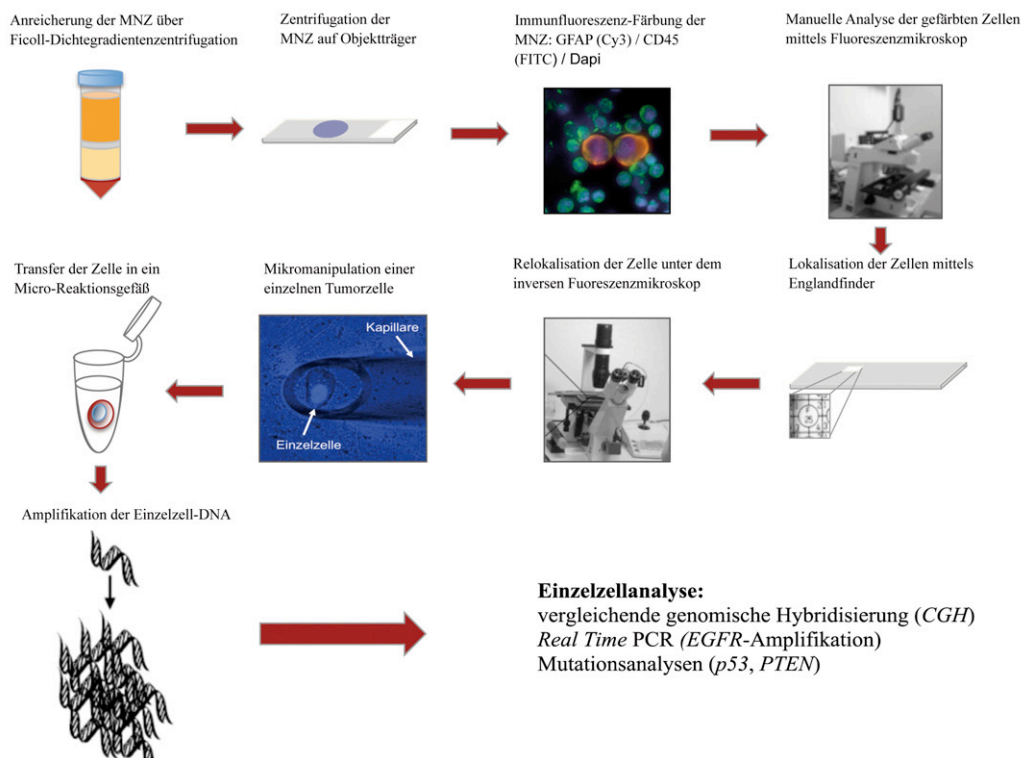


Abbildung 4-3: Schematischer Arbeitsablauf der Einzelzellanalyse zur Anreicherung, Detektion und Charakterisierung von CTCs aus dem Blut von Gliompatienten.

Um die mittels *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation angereicherten und durch die GFAP/CD45-Immunfluoreszenzmethode detektierten CTCs näher charakterisieren zu können, wurden die immungefärbten Zellen zunächst mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes ausgewertet. Sobald eine CTC unter den genannten Kriterien identifiziert werden konnte, wurden die Koordinaten dieser Zelle unter Verwendung eines *England Finders* bestimmt. An einem inversen Fluoreszenzmikroskop konnte diese Zelle im Anschluss relokalisiert und durch die Mikromanipulationseinheit isoliert werden. Die Zelle wurde mit Hilfe einer Kapillare in ein mit 1 μL ddH₂O gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Durch ein kommerziell erwerbliches Kit konnte die DNA dieser einzelnen Zelle (7 pg) vervielfältigt werden. Dieser Schritt stellt die Grundlage aller folgenden molekularbiologischen Charakterisierungen dieser Zelle dar und wird im Folgenden mit WGA abgekürzt (WGA = *Whole Genome Amplification*). Das resultierende WGA-Produkt wurde anschließend aufgereinigt und nach Überprüfung der DNA-Qualität (Messung DNA-Konzentration, Multiplex-PCR) durch verschiedene Methoden, wie CGH, qPCR oder Mutationsanalysen molekularbiologisch charakterisiert.

4.1.1.3 Molekulare Einzelzellanalyse

4.1.1.3.1 Amplifikation der gesamtgenomischen Einzelzell-DNA (WGA)

Zur Vervielfältigung der gesamtgenomischen DNA einzelner Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit das *GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* (GenomiPhi) der Firma GE Healthcare verwendet, da das daraus resultierende WGA-Produkt für alle folgenden molekularbiologischen Charakterisierungsmethoden (CGH, Mutationsanalyse, qPCR) geeignet war.⁹⁷ Meyer-Steckling, 2009 testete mit diesem WGA-Kit den Einfluss verschiedener Färbemethoden auf die Qualität des WGA-Produktes an MDA-MB-468-Einzelzellen. Durch eine Fluoreszenzfärbung mit anschließender DAPI-Kernfärbung konnte die DNA von 80 % isolierter Einzelzellen amplifiziert werden.¹⁰² Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Färbemethode zur Detektion von CTCs im Blut von GBM-Patienten übte demnach keinen Einfluss auf die Qualität des WGA-Produktes aus.

4.1.1.3.2 Qualitätskontrolle des WGA-Produktes durch die Multiplex-PCR

Zur Qualitätskontrolle des WGA-Produktes wurden jeweils zwei Multiplex-PCR-Reaktionen (MTPLX) mit anschließender Visualisierung des gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produktes in einem Agarosegel durchgeführt. Durch die GAPDH-MTPLX wurde das WGA-Produkt auf das Vorhandensein von vier verschiedenen, nicht überlappenden Bereichen des sog. *Houskeeping*-Gens GAPDH untersucht. Die entstandenen PCR-Produkte wiesen Längen von 100 bp, 200 bp, 300 bp und 400 bp auf. Wurde mindestens ein Amplifikat mit ≥ 200 bp visualisiert, konnten an diesem WGA-Produkt weitere Charakterisierungsschritte durch die aCGH-Analyse durchgeführt werden.⁹⁶ Mit Hilfe der 4Chr-MTPLX wurde das WGA-Produkt auf die Präsenz von tumorrelevanten Genen, wie *HER2*, *LGR5*, *EGFR*, *AURKA* im WGA-Produkt untersucht. Ein WGA-Produkt, welches eine Bande für das jeweilige Gen in der 4Chr-MTPLX aufwies, konnte für eine anschließende qPCR-Analyse für Amplifikationsuntersuchungen dieses Gens eingesetzt werden.⁹⁷ Zur Analyse des WGA-Produktes aus GBM-Zellen musste das vorhandene *EGFR*-Primerpaar (Exon7) durch ein neu etabliertes Primerpaar (Exon 28) ersetzt werden, da anderenfalls die für das GBM typische Mutation im *EGFR*-Gen (*EGFRvIII*) durch ihre Deletion der Exons 2-7 ein falsch-negatives Ergebnis in der MTPLX erzielt hätte. Die PCR-Produkte wiesen Längen von 97 bp (*HER2*), 201 bp (*LGR5*), 340 bp (*EGFR*) und 400 bp (*AUKRA*) auf.

In Abbildung 4-4 ist exemplarisch ein MTPLX-Banden-Profil dargestellt. Hierbei wurden Zytospins mit MNC von Patient #63 (v = präoperativ, n = postoperativ) der etablierten GFAP/CD45-Fluoreszenzfärbung unterzogen. GFAP-positive Zellen wurden wie beschrieben isoliert und analysiert. Das Bandenprofil des GAPDH-MTPLX-Produktes belegt eine sehr gute

Qualität der WGA-Produkte der Zellen n1-n3, da hier jeweils 4 Banden vorhanden sind. Die WGA-Produkte von v1 und v3-v5 zeigten zwar eine schlechtere Qualität, dennoch konnten diese aufgrund der vorhandenen 200 bp-Bande für eine anschließende CGH-Analyse verwendet werden. Das WGA-Produkt von Zelle v2 verfügte über keine relevante Bande und wurde nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt. In der 4Chr-MTPLX zeigten die Proben v4+v5 und n1+n2 die höchste Qualität, da hier jeweils 4 Banden zu erkennen waren. Für eine anschließende *EGFR*-qPCR kam zudem das WGA-Produkt von Zelle n2 in Frage, da auch hier eine Bande des *EGFR*-Amplifikates zu erkennen war. Die WGA-Produkte von Zelle v1-v3 sind allerdings aufgrund der fehlenden *EGFR*-Bande nicht für die qPCR verwendet worden. Ein WGA-Produkt mit einer guten DNA-Qualität konnte im hier gezeigten Beispiel mit Patientenzellen bei 87,5 % (*GAPDH*-MTPLX) bzw. 62,5 % (4Chr-MTPLX) erzielt werden.

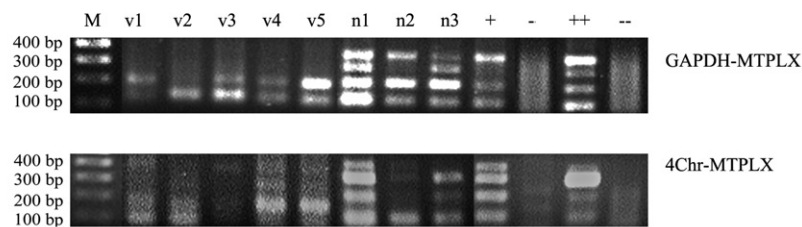


Abbildung 4-4: MTPLX-PCR-Produkte von Patienten-Einzelzellen (Patient #63) nach GenomiPhi-WGA. Zur vor wurden diese Zellen einer Fluoreszenzfärbung unterzogen, anschließend isoliert und in ddH₂O überführt. Probe v1-v5 = amplifizierte Einzelzellen vor OP, Probe n1-n3 = amplifizierte Einzelzellen nach OP, Oben: *GAPDH*-MTPLX.

4.1.1.4 Etablierung einer Analyse der *EGFR*-Genamplifikation in CTCs glialen Ursprungs

4.1.1.4.1 Etablierung einer qPCR zur Analyse der *EGFR*-Genamplifikationsrate in putativen GBM-Einzelzellen

Mit Hilfe des qPCR-Assays kann die *EGFR*-Genamplifikationsrate einer Tumorzelle bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Primerpaar der betreffenden *EGFR*-Zielregion zusammen mit den *Line-1*-Referenzprimern eingesetzt. Die Genamplifikationsrate konnte somit durch den Quotienten der ermittelten DNA-Mengen des Ziel- und Referenzgens berechnet werden (Methode basierend auf Meyer-Steackling, 2009¹⁰²). Aufgrund der im GBM häufig auftretenden *EGFRvIII*-Mutation, die eine Deletion von Exon 2-7 verursacht, wurde in dieser Arbeit das Exon 28 im *EGFR*-Gen untersucht. Die neu etablierten Primerpaare zeigten ähnlich wie die *Line-1*-Referenzprimer eine Primereffizienz von 0,99. In Tabelle 4-2 ist ein Vergleich der *EGFR*-Genamplifikationsraten in Einzelzellen von GBM-Zelllinien mit denen von einzelnen Leukozyten dargestellt. Eine Zelle gilt als genamplifiziert, wenn die ermittelte

EGFR-Genamplifikation größer als 2 ist. Werden die Mittelwerte der untersuchten BS-153- bzw. G22-Zellen sowie der Leukozyten verglichen, zeigen die Leukozyten wie erwartet keine *EGFR*-Genamplifikation. Beide GBM-Zelllinien verfügen hingegen über eine sehr hohe *EGFR*-Genamplifikationsrate. G22-Zellen zeigen hierbei die höchste Amplifikationsrate. Die Einzelzellen innerhalb der jeweiligen Gruppe weisen allerdings sehr heterogene Amplifikationsraten auf, wohingegen die meisten Leukozyten keine Genamplifikation aufweisen. Die Genamplifikation von 2,77 eines Leukozyten ist hierbei als „Ausreißer“ zu werten.

Tabelle 4-2: Durch qPCR ermittelte *EGFR*-Genamplifikationsraten in Einzelzellen der GBM-Zelllinien BS-153 und G-22 sowie MNC.

<i>EGFR</i> -Genamplifikation qPCR			
	BS-153	G-22	MNC
	15,83	4259,84	0,58
	2,9	1263,54	1,62
	35,16	208,54	0,15
	17,12	2580,38	0,51
	3,36	3542,69	2,77
	4,56	93,25	
	27,87	66,04	
	1,01	4054,67	
Median	10,2	1921,16	0,58
Mittelwert	13,48	2008,61	1,13

4.1.1.4.2 Etablierung der *EGFR*-FISH-Analyse an MNC

Auch die FISH kann zur Analyse der *EGFR*-Genamplifikation in Einzelzellen angewandt werden. Hierbei wird die *EGFR*-Sonde zusammen mit einer Cen7-Sonde auf Objektträger mit angereicherten MNC hybridisiert. Diese Sonden wurden bereits an GBM-Gewebeschnitten zur *EGFR*-Genamplifikationsanalyse eingesetzt.¹⁰⁵ Die Etablierung der FISH wurde an in MNC eingebrachte Zellen der Zelllinie BS-153 durchgeführt. Werden die Zellen anschließend einer *EGFR*-Fluoreszenzfärbung unterzogen, ist es möglich, nicht nur die *EGFR*-Genamplifikation, sondern auch die *EGFR*-Expression einer Tumorzelle zu visualisieren.

In Abbildung 4-5 zeigen die Leukozyten zwei Signale (disomie) für die jeweilige Sonde. Die BS153-Zellen hingegen weisen eine sehr starke *EGFR*-Genamplifikation auf. Die Anzahl der

Hybridisierungssignale ist hier nicht mehr zählbar und wird als *Cluster* bezeichnet. Im Gegensatz zu den Leukozyten verfügen die Tumorzellen über ≥ 3 Signale für Zentromer 7, was bedeutet, dass eine Polysomie für Chromosom 7 vorliegt. Abbildung 4-5 zeigt zudem die EGFR-Expression dieser Tumorzellen. Da in den sie umgebenden MNC keine EGFR-Expression detektiert werden kann, ist die Spezifität dieser Methode bewiesen.

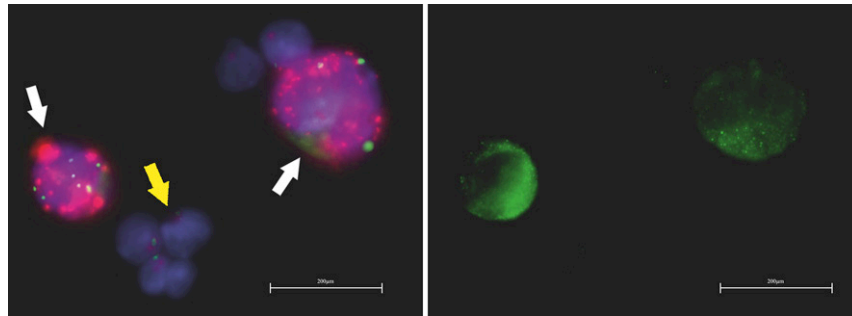


Abbildung 4-5: Visuelle EGFR-Analysen an MNC. Links: FISH an, in MNC eingebrachte, Zellen der Zelllinie BS-153. Die Zellen wurden mit der EGFR-Sonde (TRITC) und der Zentromer 7-Sonde (Aqua-grün) inkubiert. Weiße Pfeile: BS-153-Zellen, gelber Pfeil: MNC; Rechts: Im Anschluss an die FISH durchgeführte EGFR-Fluoreszenzfärbung der MNC.

4.1.1.5 Mutationsanalyse von Einzelzellen

Die Detektion von tumorrelevanten Mutationen in CTCs kann deren maligne Herkunft belegen. Zu den häufigsten genetischen Veränderungen im GBM zählen Mutationen im *TP53*-Gen (primäres GBM: 28%, sekundäres GBM: 65%). Dieses Gen besteht aus 11 Exons, worin häufige Mutationen, in sog. *Hotspot*-Regionen (Exon5: Codon 175 und Exon7: Codon 248/Codon 273) detektiert werden können (Abbildung 4-6-A).

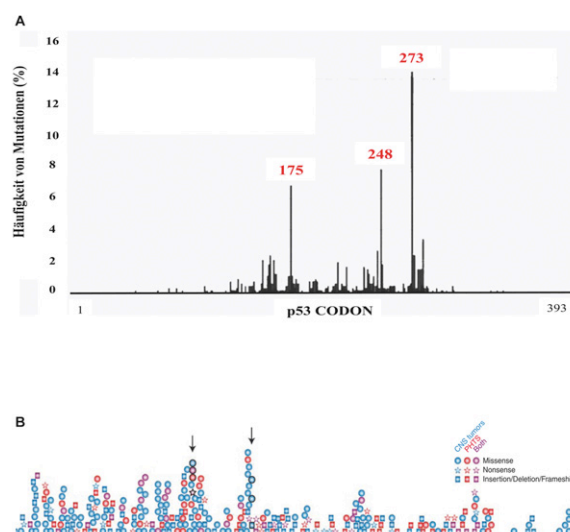


Abbildung 4-6: Häufige Mutationen im GBM. A: Häufigkeit von *TP53*-Mutationen in bestimmten, einzelnen Genregionen (Auswertung von 675 GBM). Abbildung modifiziert nach Hjortsber *et al.*¹⁰⁶. B: Lokalisation von häufig vorkommenden *PTEN*-Mutationen in Tumoren des zentralen Nervensystems.¹⁰⁷

In der vorliegenden Arbeit wurden die Exons 4-9 des *TP53*-Gens der Einzelzellen auf das Vorhandensein von Mutationen untersucht. Eine weitere typische genetische Veränderung bei Glioblastomen ist der Verlust des gesamten Chromosoms 10. Wenn keine Deletionen vorliegen, können bei 25 % der primären GBM Mutationen im Chromosom 10 lokalisierten *PTEN*-Gen detektiert werden.¹⁰⁸ In Abbildung 4-6-B ist das aus 9 Exons bestehende Gen zusammen mit möglichen genetischen Veränderungen bei Tumoren des zentralen Nervensystems skizziert.¹⁰⁷ Da auftretende Mutationen über das gesamte Gen verteilt sein können, wurde in dieser Arbeit die DNA der amplifizierten Einzelzellen auf Mutationen in den Exons 1 bis 9 untersucht.

Zur Mutationsanalyse an GBM-Einzelzellen wurden bereits etablierte⁹⁷ sowie neu entwickelte Primerpaare (Tabelle A -XVI, Tabelle A -XVII) für die Zielregionen im *TP53*- und *PTEN*-Gen an Einzelzellen der GBM-Zelllinie G-22 mittels Sanger-Sequenzierung nach Gasch, 2012⁹⁷ getestet. In Abbildung 4-7 ist exemplarisch eine detektierte Mutation einer G-22-Zelle dargestellt. Diese heterozygote Punktmutation ist in der *Hotspot*-Region, dem Codon 273 im Exon 7 lokalisiert. Hierbei kommt es zu einem Basenaustausch von Arginin zu Glycin. Mit dem zuvor etablierten Arbeitsablauf der Einzelzellanalyse und der sich daran anschließenden Sanger-Sequenzierung ist es demnach möglich, tumorassoziierte Mutationen in einzelnen GBM-Zellen nachzuweisen.

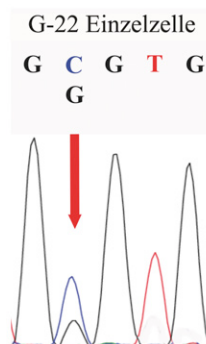


Abbildung 4-7: Mutationsanalyse einer einzelnen Zelle der Zelllinie G-22 mittels Sangerverfahren. Mutation in Exon 7, Codon 273 = HotSpot Region; CGT > GGT Arg > Gly.

4.1.2 Detektion und Charakterisierung von CTCs aus peripheren Blut von Gliompatienten

In der vorliegenden Arbeit wurde das periphere Blut von 114 Patienten mit histologisch diagnostiziertem GBM Grad IV sowie von weiteren 10 Nicht-GBM-Patienten mit Tumoren glialen Ursprungs (Astrozytom, Gliosarkom, Oligodendrogliom III, Meningeom, Meduloblastom) auf das Vorhandensein von CTCs im peripheren Blut untersucht. Um auszuschließen, dass CTCs durch die operative Entfernung des Primärtumors bzw. des Rezidivs in die Zirkulation der Patienten gelangen, wurden diesen Patienten jeweils prä- und postoperativ Blutproben entnommen (Tabelle 4-3, Tabelle 4-4). In einigen Fällen war es allerdings nur möglich, eine Blutprobe während der Resektion zu entnehmen. Ein Patient wurde als CTC-positiv bezeichnet, wenn unter $2,1 \times 10^6$ MNC mind. eine GFAP-exprimierende Zelle detektiert wurde. Eine unspezifische Antikörperbindung wurde ausgeschlossen, wenn in der Kontrollfärbung (Fluoreszenzfärbung von 7×10^5 MNC des gleichen Patienten ohne primären GFAP-Antikörper) keine positive Zelle detektiert werden konnte. Die CTC-positiven Patienten sind noch einmal gesondert im Anhang in Tabelle A -V unter Angabe der Anzahl detektierter CTCs pro $2,1 \times 10^6$ MNC aufgelistet.

Tabelle 4-3: Anzahl der Blutproben von GBM-Patienten, die zu unterschiedlichen Zeiten der Tumorresektion entnommen wurden

Patienten mit <i>Glioblastoma multiforme</i> (Grade IV)		
	erste OP am UKE	zweite OP am UKE (Rezidiv)
prä- und postoperativ	65	1
präoperativ	8	1
postoperativ	12	1
während OP	29	3
Total	114	6

Unter den 114 Patienten wurden 16 mit einem diagnostizierten Rezidiv behandelt. Sechs von diesen Patienten wurde sowohl bei der primären Tumorresektion als auch bei der Resektion des Rezidivs Blut entnommen (Tabelle A -IV). Insgesamt wurden 75, 79 und 32 Blutproben, die vor, nach und während der Tumorresektion entnommen wurden, untersucht (Tabelle 4-3).

In Tabelle 4-4 ist die Anzahl der untersuchten Blutproben der Nicht-GBM-Patienten mit Tumoren glialen Ursprungs (3x Gliosarkom, 3x Oligodendrogliom, 3x Astrozytom und 1 metastasiertes Astrozytom) zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten dargestellt. Hierbei

wurden von 9 Patienten 7 Blutproben prä- und postoperativ sowie 2 Proben während der Tumorresektion entnommen.

Tabelle 4-4: Anzahl der Blutproben von Nicht-GBM-Patienten mit Tumoren glialen Ursprungs, die zu unterschiedlichen Zeiten der Tumorresektion bzw. bei der Diagnose der Metastase entnommen wurden.

	Nicht-GBM-Patienten	
	erste OP am UKE	Metastase
prä- und postoperativ	7	0
während OP	2	0
Diagnose Metastase	0	1
Total	9	1

4.1.2.1 Fallbericht eines Patienten mit metastasiertem anaplastischen Astrozytom,

Grad III (G-10)

Genau wie bei GBM-Patienten ist die extrakranielle Metastasierung von astrozytischen Gehirntumoren sehr selten. Weniger als 20 Fallbeschreibungen wurden in den letzten 30 Jahren zu diesem Thema veröffentlicht.⁴³

Der außergewöhnliche Krankheitsverlauf eines in der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, behandelten 28-jährigen männlichen Patienten (G-10) wird in der Veröffentlichung von Martens *et al.*⁴³ näher beschrieben. Der durch einen generalisierten Anfall detektierte Gehirntumor des Patienten wurde nach der Diagnose operativ entfernt. Durch histopathologische Analysen wurde dieser Tumor als anaplastisches Astrozytom Grad III klassifiziert. Anschließend wurde der Patient durch Bestrahlung behandelt. Nach ca. 12 Monaten konnte zwar im Gehirn des Patienten kein Rezidiv detektiert werden, jedoch wurden Metastasen im Sternum, im Wirbelkörper und im Beckenkamm diagnostiziert. Histologische sowie immunohistochemische Untersuchungen der Läsionen ergaben, dass es sich hierbei um Metastasen des anaplastischen Astrozytoms handelte (Anhang, Abbildung A III). Trotz verabreichter Chemotherapie verstarb der Patient 18 Monate nach der Diagnose an Organversagen.⁴³ Zum Zeitpunkt der Diagnose der Skelettmetastase des anaplastischen Astrozytoms wurde das periphere Blut dieses Patienten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf das Vorhandensein von CTCs untersucht. Da das Astrozytom den Gliomen zugeordnet wird und eine Vorstufe in der malignen Progression des sekundären Glioblastoms darstellt, zeigen die Zellen dieses Tumors ähnliche phänotypische Charakteristika wie die Zellen eines Glioblastoms. Zur Detektion von CTCs im Blut dieses

Patienten wurden demnach die gleichen Methoden wie zur Detektion von CTCs in GBM-Patienten angewandt. Die aus dem Blut angereicherten Zellen zeigten jedoch weder eine GFAP-Expression noch eine Expression von anderen tumorrelevanten Markerproteinen (GFAP, EGFR, p53, CD 147). Weitere Untersuchungen zu diesem Fall sind in Kapitel 4.1.6 beschrieben.

4.1.3 Detektion von CTCs im peripheren Blut von Gliompatienten

4.1.3.1 Detektion von CTCs im peripheren Blut von GBM-Patienten

Unabhängig vom Entnahmezeitpunkt des Blutes konnten insgesamt in 27 GBM-Patienten (23,7 %) CTCs detektiert werden. Eine Übersicht dieser Patienten befindet sich im Anhang, Tabelle A -V. Durch die Immunfluoreszenzanalyse wurden in 12 von 75 präoperativen Proben (16 %) Tumorzellen detektiert. Die Anzahl der detektierten Zellen lag hierbei zwischen 1 und 14 in $2,1 \times 10^6$ MNC (MW: 4; Median:1). In den während der Operation entnommenen und postoperativen Blutproben konnte im Vergleich zu den präoperativen Proben keine signifikant abweichende Anzahl an CTCs detektiert werden ($p = 0,5$). Hierbei wurden in 19 von 79 (24 %) postoperativen Proben CTCs detektiert. Die Anzahl reichte von 1 bis 22 Zellen pro $2,1 \times 10^6$ MNC (MW: 3,4; Median:1). Bei den während der Operation entnommenen Blutproben wurden in 5 von 32 Fällen (15,6 %) CTCs identifiziert. Die Anzahl lag hier zwischen 1 und 4 Zellen pro $2,1 \times 10^6$ MNC (MW: 2,4; Median: 2). Von den 66 Patienten, bei denen Blutproben prä- und postoperativ untersucht werden konnten, wurden in 9 Fällen (14 %) CTCs nachgewiesen. Vier von diesen Patienten wiesen zu beiden Zeitpunkten mehr als eine CTC in $2,1 \times 10^6$ MNC auf (Tabelle A -V).

In der Blutprobe des Patienten #63 konnte eine relativ hohe Anzahl an GFAP-positiven Zellen detektiert werden ($N_{\text{ges}}=36$ Zellen). Bei der manuellen Auswertung von $2,1 \times 10^6$ MNC wurden 14 GFAP-positive Zellen in der präoperativen Probe und 22 GFAP-positive Zellen in der postoperativen Probe gezählt. Keine dieser detektierten GFAP-positiven Zellen zeigte eine Expression von CD45. Außerdem verfügten diese Zellen über eine sehr auffällige Morphologie und über einen, im Vergleich zu den umgebenen MNC, sehr großen Zellkern (Abbildung 4-8). Um die Zellen molekularbiologisch charakterisieren zu können, wurden sie durch Mikromanipulation isoliert. Die Einzelzell-DNA-Amplifikation wurde mittels *WGA* durchgeführt.

Auch die Blutprobe von Patient #53 verfügte über GFAP-positive, aber auch über morphologische auffällige, GFAP-negative Zellen (Anhang, Abbildung A I). Zur weiteren

Analyse wurden diese Zellen isoliert. Die DNA dieser Zellen wurde durch WGA amplifiziert. Alternativ wurde eine *EGFR*-FISH-Analyse an den MNC durchgeführt.

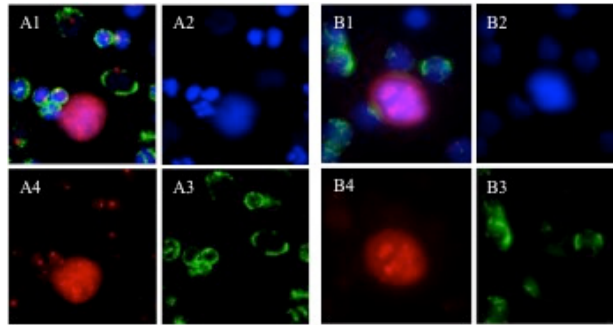


Abbildung 4-8: IF-GFAP-Färbung an MNC von Patient #63. TRITC: PAK: Kaninchen-anti-human-GFAP-IgG; SAK: anti-Kaninchen-IgG *Alexa Fluor*TM-564; FITC: direkt gekoppelter *Alexa Fluor*TM-488 anti-human CD45-IgG; Dapi: *VECTASHIELD*[®] *Hard_Set*TM Mounting-Medium mit DAPI.

4.1.3.2 Detektion von CTCs im peripheren Blut von Nicht-GBM-Patienten mit Tumoren glialen Ursprungs

In 3 (33,3 %) von 9 Nicht-GBM-Patienten mit Tumoren glialen Ursprungs konnten GFAP-positive Zellen detektiert werden. Patient G-1 (Gliosarkom) wies 2 CTCs in der präoperativen Blutprobe und 1 CTC in der postoperativen Probe auf. Außerdem konnten im Blut dieses Patienten präoperativ 3 und postoperativ 2 EGFR-positive Zellen detektiert werden (Abbildung A II). In der Probe „während OP“ von Patienten G-6 (diffuses Astrozytom Grad IV) wurden 2 CTCs detektiert. Die Probe von Patient G-8 (Oligodendrogliom) beinhaltete sowohl zum prä- als auch zum postoperativen Zeitpunkt jeweils 3 GFAP-positive Zellen. Keine dieser detektierten Zellen zeigte eine CD45-Expression. Die angereicherten MNC aus dem peripheren Blut des metastasierten Astrozytom-Patienten G-10 wurden durch verschiedene Färbungen auf das Vorhandensein von CTCs mit Hilfe von verschiedenen Markerproteinen (GFAP, EGFR, p53 und CD 147) untersucht. Die jeweilige Anzahl der untersuchten MNC ist im Anhang, Tabelle A - XI aufgelistet.

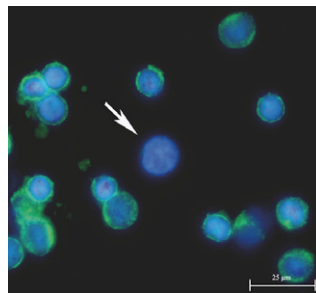


Abbildung 4-9: IF an MNC von Patient G-10. TRITC: PAK: Kaninchen-anti-human-GFAP-IgG; SAK: anti-Kaninchen-IgG *Alexa Fluor*TM-564; FITC: direkt gekoppelter *Alexa Fluor*TM-488 anti-human CD45-IgG; Dapi: *VECTASHIELD*[®] *Hard_Set*TM Mounting-Medium mit DAPI. Weißer Pfeil: ungefärbte Zellen mit auffälliger Kernmorphologie.

Hierbei konnten keine CTCs im Blut dieses Patienten detektiert werden. Lediglich ungefärbte Zellen, die über einen großen Zellkern mit auffälliger Morphologie verfügten, konnten detektiert werden (Abbildung 4-9), von denen 5 Zellen isoliert wurden. Die Analyse mittels MTPLX-PCR zeigte eine unzureichende Qualität der WGA-Produkte für Folgeexperimente, wodurch eine weitere molekularbiologische Analyse dieser Zellen nicht möglich war.

4.1.4 Korrelation klinisch-pathologischer Eigenschaften der Primärtumoren und der Präsenz von CTCs im Blut von GBM-Patienten

Im Folgenden werden die prognostische Relevanz von CTCs im peripheren Blut von GBM-Patienten sowie der Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen Parametern der Patienten und der Präsenz von CTCs statistisch untersucht und ausgewertet.

4.1.4.1 Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Anhand der Überlebenszeit der einzelnen Patienten wurde eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve erstellt (Abbildung 4-10). Die durchschnittliche Überlebenszeit der untersuchten Patienten liegt bei unter einem Jahr (Mittelwert: 0,89 Jahre; Median: 0,74 Jahre). Ein Vergleich der Überlebensraten von CTC-positiven mit der von CTC-negativen Patienten lässt jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennen ($p = 0,137$).

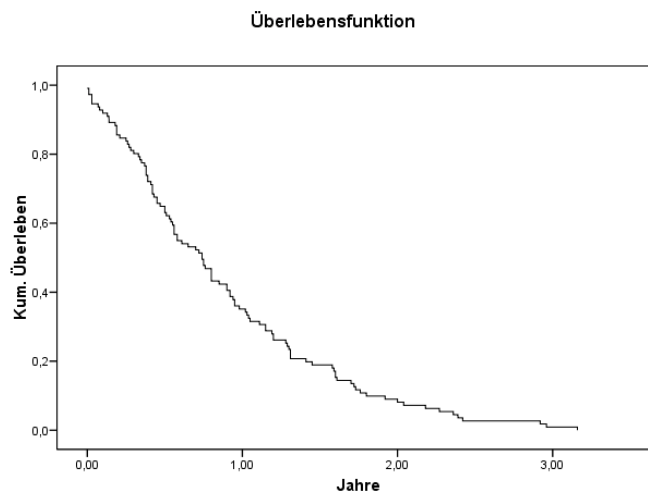


Abbildung 4-10: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion der untersuchten GBM-Patienten (Mittelwert der Überlebenszeit: 0,89 Jahre bzw 10,7 Monate; Median der Überlebenszeit: 0,74 Jahre bzw. 8,9 Monate).

4.1.4.2 Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von CTCs und klinisch-pathologischen Charakteristika von GBM-Patienten

Klinisch-pathologische Charakteristika der GBM-Patienten, wie GFAP-, p53- und Ki67-Expression der Tumorzellen wurden an Paraffinschnitten des Primärtumors durch immunhistologische Färbungen ermittelt und in anonymisierter Form durch das Institut für Neuropathologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Für weitere Korrelationen wurden zudem das Alter sowie das Geschlecht der Patienten einbezogen. Die durch qPCR bestimmten Ergebnisse zur EGFR-Amplifikation der Primärtumoren wurden von Dr. Alexander Schulte (Institut für Neurochirurgie, UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Zellen innerhalb des Glioblastomtumors präsentieren sich gerade in ihrer *EGFR*-Genamplifikation sehr heterogen.¹⁰⁹ Aus diesem Grund wurden zur weiteren Untersuchung der *EGFR*-Genamplifikation die immunhistologische Färbung an Paraffinschnitten der Tumoren aller Patienten sowie die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Paraffinschnitten von Tumoren der CTC-positiven Patienten durchgeführt.

Die *EGFR*-Amplifikation und die Expression von p53, Ki67, GFAP der Tumorzellen, das Alter und das Geschlecht der Patienten wurden für die statistische Analyse in verschiedene Kategorien unterteilt. Mit Hinblick auf das Alter wurden die Patienten in die Gruppe der ≤ 50 jährigen und die Gruppe der > 50 jährigen eingeteilt. Die GFAP-Expression konnte in allen Tumorzellen des jeweiligen Paraffinschnittes detektiert werden. In 6 Fällen wurde allerdings eine heterogene Verteilung von sowohl GFAP-positiven als auch –negativen Tumorzellen im Tumorgewebe beobachtet. Die Patienten wurden deshalb in die Gruppe der homogenen (+) und in die Gruppe der heterogenen (+/-) GFAP-Expression unterteilt. Die genaue Einteilung weiterer Charakteristika (*EGFR*-Genamplifikation, p53- und Ki67-Expression) findet sich in Tabelle 4-5.

Mit Hilfe des „Exakten Testes nach Fisher“ konnte zunächst die Abhängigkeit zwischen der Präsenz von CTCs und den klinisch-pathologischen Eigenschaften untersucht werden. Hieraus ergaben sich signifikante Zusammenhänge zwischen der *EGFR*-Genamplifikation, der GFAP-Expression im Primärtumor und dem Geschlecht der GBM-Patienten. Anschließend wurde die Unabhängigkeit zwischen den einzelnen Eigenschaften belegt (alle p-Werte $> 0,05$), wodurch diese zur weiteren Analyse getrennt voneinander betrachtet werden konnten.

Tabelle 4-5: Kategorische Einteilung klinisch-pathologischer Eigenschaften der GBM-Tumoren.

klinisch- pathologische Eigenschaften	kategorische Einteilung			
	0	1	2	3
<i>EGFR</i> -Genamplifikation (qPCR)	0 bis ≤ 2	>2	-	-
Expression von TP53 (%)	keine Expression	>0 bis ≤ 5	>5 bis ≤ 30	>30
Expression von Ki67 (%)	keine Expression	>0 bis ≤ 10	>10 bis ≤ 30	>30
Alter	≤ 50	> 50	-	-
Geschlecht	männlich	weiblich	-	-

Die voneinander unabhängigen Parameter wurden anschließend in einem logistischen Regressionsmodell ausgewertet. Die berechneten p-Werte sind in Tabelle 4-6 aufgelistet. Die Abhängigkeit zweier Variablen voneinander ist statistisch signifikant, wenn der errechnete p-Wert unter 0,05 liegt.¹¹⁰ Das Alter der Patienten hatte mit einem p-Wert von 0,779 keinen Einfluss auf die Präsenz von CTCs in deren Blut. Die prozentuale Anzahl an Ki-67-exprimierenden Zellen im Tumorgewebe ist bei der Mehrheit der untersuchten GBMs sehr hoch. Die meisten Fälle zeigen zudem Veränderungen im Tumorsuppressorprotein TP53. Dennoch gibt es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Präsenz von CTCs in GBM-Patienten und dem Ki-67- ($p = 0,141$) oder TP53-Status ($p = 0,743$) des dazugehörigen Tumors. Im Vergleich zu Patienten mit einer homogenen GFAP-Expression der Zellen im Tumorgewebe werden CTCs signifikant häufiger in Blutproben von Patienten mit Tumoren detektiert, die eine partielle Herabregulierung (+/-, Tabelle 4-6, $p = 0,011$) der GFAP-Expression aufweisen. Außerdem wurden CTCs häufiger in weiblichen als in männlichen GBM-Patienten detektiert ($p=0,011$).

Tabelle 4-6: Korrelation zwischen der Präsenz von CTCs im Blut und klinisch-pathologischen Parametern des Primärtumors von GBM-Patienten.

Parameter des Tumors	Anzahl der untersuchten Patienten		p-Wert
	CTC-negativ	CTC-positiv	
Total (n=114)	87 (76.3%)	27 (23.7%)	
EGFR qPCR*			
0 (n=57)	48 (84,2%)	9 (15,8%)	<i>p=0,027</i>
1 (n=54)	36 (66.7%)	18 (33,3%)	
Total (n=111)	84 (75,7%)	27 (24,3%)	
TP53			
0 (n=26)	22 (84,6%)	4 (15,4%)	<i>n.s.</i>
1 (n=5)	2 (40%)	3 (60%)	
2 (n=46)	35 (76,1%)	11 (23,9%)	
3 (n=23)	19 (82,6%)	4 (17,4%)	
Total (n=100)	78 (78%)	22 (22%)	
Ki67			
0 (n=1)	1	0	
1 (n=4)	1 (25%)	3 (75%)	<i>n.s.</i>
2 (n=59)	45 (76.3%)	14 (23.7%)	
3 (n=44)	34 (77.2%)	10 (22.8%)	
Total (n=108)	81 (75%)	27 (25%)	
Geschlecht			
m (n=71)	59 (83.1%)	12 (16,9%)	<i>p=0,011</i>
f (n=43)	28 (65.1%)	15 (34,9%)	
Total (n=114)	87 (76.3%)	27 (23.7%)	
Alter			
≤50 (n=24)	19 (79.1%)	5 (20.9%)	<i>n.s.</i>
>50 (n=90)	68 (75.6%)	22 (24.4%)	
Total (n=114)	87 (76.3%)	27 (23.7%)	
GFAP			
+ (n = 106)	83 (78.3%)	23 (21.7%)	
+/- (n = 6)	2 (33.3%)	4 (66.7%)	<i>p= 0,011</i>
Total (n = 112)	85 (75.9%)	27 (24.1%)	

Des Weiteren kann eine starke Assoziation zwischen der Präsenz von CTCs und einer *EGFR*-Genamplifikation im dazugehörigen Tumorgewebe beobachtet werden ($p = 0,027$). Diese Abhängigkeit bleibt auch signifikant, wenn die direkt gemessene Genamplifikation logarithmisch in das logistische Regressionsmodell eingesetzt wird. Hier liegt der p-Wert bei 0,016. Außerdem verfügen 18 von 27 Tumoren der CTC-positiven Patienten über eine *EGFR*-Genamplifikation in der FISH-Analyse und/oder über eine starke EGFR-Expression, ermittelt durch die immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes (Tabelle A -V).

4.1.5 Molekulare Einzelzellanalyse an CTCs aus dem Blut von Gliompatienten

Insgesamt konnten 90 GFAP-positive Zellen von 15 GBM-Patienten isoliert werden. Durch die WGA wurde die Einzelzell-DNA vervielfältigt. Vom Patienten #63 konnten insgesamt 61 Zellen (23 Zellen prä- und 38 Zellen postoperativ) isoliert und analysiert werden (Tabelle 4.7). Mit dem WGA-Produkt wurden weitere Analysen, wie qPCR, CGH und Mutationsanalysen zur Detektion von tumorassoziierten genetischen Veränderungen durchgeführt. Außerdem konnten 3 GFAP-positive Zellen aus der präoperativen Blutprobe des Gliosarkompatienten G-1 isoliert werden. Aus der Blutprobe des metastasierten Astrozytompatienten G-10 wurden 5 Zellen isoliert, die über eine auffällige Zellmorphologie verfügten. Die durch MTPLX-PCR ermittelte unzureichende Qualität der WGA-Produkte ließ jedoch keine weitere molekularbiologische Analyse dieser Zellen zu.

Tabelle 4-7: Anzahl isolierter GFAP-positiver Einzelzellen aus angereicherten MNC

P-Nr.	Zeitpunkt Blutentnahme	Anzahl isolierter Zellen	P-Nr.	Zeitpunkt Blutentnahme	Anzahl isolierter Zellen
12	postoperativ	1	63	präoperativ	23
22	postoperativ	2	63	postoperativ	38
24	postoperativ	2	70	postoperativ	2
24	präoperativ	4	71	während Operation	2
32	präoperativ	1	74	während Operation	1
44	präoperativ	1	78	präoperativ	1
49	präoperativ	1	78	postoperativ	1
49	postoperativ	1	79	postoperativ	2
50	postoperativ	1			
50	präoperativ	3			
53	präoperativ	1			
53	postoperativ	1			
57	präoperativ	1			

4.1.5.1 Identifikation von *EGFR*-Genamplifikationen in CTCs von GBM-Patienten

Die *EGFR*-Amplifikation von Tumorzellen spielt bei der Disseminierung der GBM-Zellen im Gehirn eine große Rolle.²⁸ Wie bereits beschrieben, gab es bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer hohen *EGFR*-Genamplifikation der Zellen im Tumorgewebe und der Präsenz von CTCs im Blut von GBM-Patienten. Zur Analyse der *EGFR*-Genamplifikation von CTCs auf Einzelzellebene wurden mit der amplifizierten Einzelzell-DNA qPCR-Analysen durchgeführt. Außerdem wurden MNC der Patienten #63, #53, #50 und #22 mittels *EGFR*-FISH analysiert. Eine *EGFR*-Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenzfärbung von CTCs wurde an MNC des Patienten #63 durchgeführt.

4.1.5.1.1 Identifikation der *EGFR*-Genamplifikation von CTCs mittels qPCR

Die *EGFR*-Genamplifikationsanalyse an Einzelzell-DNA mittels qPCR basiert auf der Bestimmung des Verhältnisses der ermittelten DNA-Menge eines Kontrollgens (*LINE-1*) zur ermittelten DNA-Menge des Zielgens (*EGFR*-Exon 28). Hierbei kamen lediglich DNA-Proben zur Auswertung, deren *LINE-1*-Konzentration $> 0,1$ ng/ μ L betrug. Dadurch konnte die DNA von 19 der 90 amplifizierten Einzelzellen (20%) ausgewertet werden. Patient #22 zeigte bei einer Zelle der postoperativen Blutprobe eine 28,27 fache *EGFR*-Genamplifikation. Die Zelle der Probe „während OP“ des Patienten #71 wies eine 92,4 fache *EGFR*-Genamplifikation auf.

Von Patient #63 stammen 17 der untersuchten Einzelzellen (17 von 61 WGA-Produkten = 27,9 %). Der Primärtumor dieses Patienten zeigte die höchste, 1167 fache *EGFR*-Genamplifikation. Aus der präoperativen Blutprobe konnten 6, aus der postoperativen Blutprobe 11 WGA-Produkte einzelner Zellen analysiert werden. Die *EGFR*-Genamplifikationsrate dieser WGA-Produkte ist zusammen mit der Amplifikationsrate einzelner Zellen der Zelllinie BS-153 und MNC in Tabelle 4-8 aufgelistet. Unter den CTCs der präoperativen Probe befanden sich von 6 auswertbaren Zellen 2 *EGFR*-genamplifizierte Zellen (33,3 %) mit einer Genamplifikationsrate von 14,96 bzw. 24,61. In der postoperativen Probe wies unter 11 auswertbaren CTCs eine Zelle (9,1 %) eine *EGFR*-Genamplifikation von 4,37 auf. Diese Zelle (CTC 3) erzielte zudem ein aberrantes Profil durch die aCGH-Analyse (Abbildung 4-13).

Tabelle 4-8: *EGFR*-Genamplifikationsrate von Einzelzellen des Patienten #63 im Vergleich zu Einzelzellen der Zelllinie BS-153 und einzelner MNC gesunder Probanden.

<i>EGFR</i>-Genamplifikationsrate				
CTCs Patient #63		BS-153	MNC	
präoperativ	postoperativ			
14,96	0,22	15,83	0,58	
1,45	4,37	2,9	1,62	
2,26	2,62	35,16	0,15	
24,61	1,3	17,12	0,51	
2,57	0,68	3,36	2,77	
1,14	0,43	4,56		
	1,79	27,87		
	1,21	1,01		
	2,36			
	0,59			
	1,59			
Median	2,42	1,30	10,20	0,58
Mittelwert	7,83	1,56	13,48	1,13

4.1.5.1.2 Bestimmung der *EGFR*-Genamplifikation von CTCs mittels FISH

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurde an Paraffinschnitten und an MNCs CTC-positiver Patienten, die über eine hohe Anzahl an detektierten CTCs im peripheren Blut oder über eine sehr hohe *EGFR*-Genamplifikation des Primärtumors verfügten, durchgeführt (Tabelle 4-9).

Während in den Blutproben der Patienten #50 und #22 keine CTCs durch die FISH-Analyse detektiert werden konnten, wurden in den Proben von Patient #63 insgesamt 41 Zellen detektiert, die im Vergleich zu den MNC eine höhere Anzahl an Hybridisierungssignalen sowohl für Zentromer 7 (Cen-7) als auch für das *EGFR*-Gen aufwiesen und über eine für GBM charakteristische Zellmorphologie verfügten. Sowohl in der prä- als auch in der postoperativen Blutprobe von Patient #53 konnte jeweils eine putative CTC detektiert werden.

Tabelle 4-9: Patientenproben, an denen die *EGFR*-FISH-Analyse durchgeführt wurde, da sie über eine hohe Anzahl an detektierten CTCs im peripheren Blut bzw. über eine sehr hohe *EGFR*-Amplifikation des Primärtumors verfügten

Patient	durch qPCR ermittelte <i>EGFR</i> -Genamplifikation im Primärtumor	CTC-Anzahl in $2,1 \times 10^6$ MNC	
		präoperativ	postoperativ
#63	1167	14	22
#53	2,39	6	3
#50	47,73	11	1
#22	488	3	1

In Abbildung 4-11 A-1 ist die CTC der präoperativen Blutprobe von Patient #53 dargestellt. Trotz der aberranten Hybridisierungssignale in den CTCs wiesen diese aufgrund der Polysomie von Chromosom 7 keine *EGFR*-Genamplifikation auf. Ein ähnliches Hybridisierungsmuster ließ sich im korrespondierenden Tumorgewebe (Abbildung 4-11 B-1+2) erkennen.

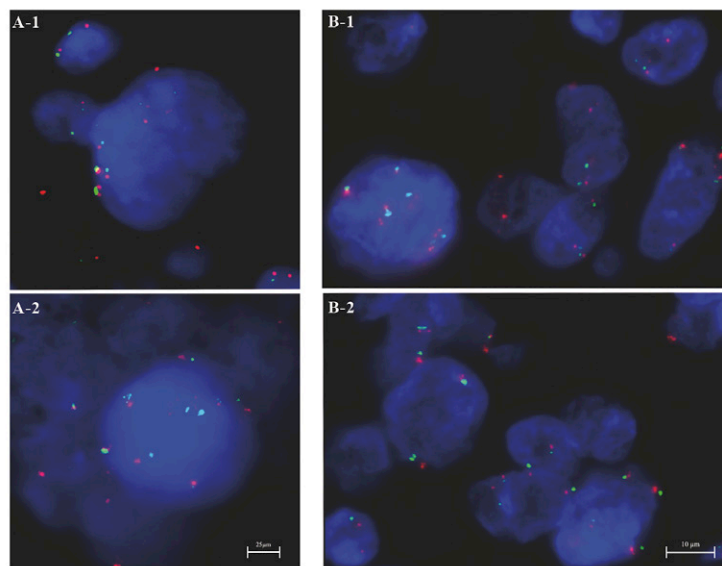


Abbildung 4-11: *EGFR*-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf MNC bzw. Paraffinschnitten des Primärtumors von Patient #53. Die Zellen wurden mit einer *EGFR*-Sonde (TRITC) und einer Cen7-Sonde (Aqua-gelb) inkubiert. A-1: CTC zwischen MNC der präoperativen Blutprobe. A-2: CTC zwischen MNC der postoperativen Blutprobe. B: Primärtumor.

Im Blut des Patient #63 konnten durch die FISH-Analyse 21 putative CTCs prä- und 20 Zellen postoperativ in jeweils $1,4 \times 10^6$ MNC detektiert werden, wobei sich die *EGFR*-Genamplifikation der einzelnen CTCs als sehr heterogen darstellte (Abbildung 4-12 A+B). Die CTCs zeigten trotz eines aberranten Hybridisierungsmusters der *EGFR*-Sonde aufgrund der Polysomie von Chromosom 7 (Chr 7) eine niedrige Amplifikationsrate von 0,5 bis 2,5.

Lediglich in 5 präoperativen Zellen (23,8 %) konnte eine hohe *EGFR*-Genamplifikation (*Cluster*) und in einer postoperativen Zelle (5 %) eine 6-fache *EGFR*-Genamplifikation detektiert werden. Die genaue Signalanzahl beider Sonden sowie der ermittelten *EGFR*-Genamplifikation der untersuchten CTCs ist in Tabelle 4-10 aufgelistet.

Tabelle 4-10: *EGFR*-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung auf MNCs von Patient #63. Die Zellen wurden mit einer *EGFR*-Sonde (TRITC) und einer Zetromer 7-Sonde (Aqua-gelb) inkubiert.

<i>EGFR</i> -Genamplifikation (FISH) in CTCs von Patient #63					
präoperativ			postoperativ		
EGFR	Cen-7	Rate	EGFR	Cen-7	Rate
5	3	1,7	5	2	2,5
9	3	3	12	2	6
2	4	0,5	3	3	1
4	4	1	7	4	1,8
4	4	1	8	4	2
Cluster	4	hohe Amplifikation	8	5	1,6
6	5	1,2	8	5	1,6
9	5	1,8	11	6	1,8
9	5	1,8	7	7	1
11	5	2,2	7	7	1
Cluster	5	hohe Amplifikation	9	7	1,3
4	6	0,7	11	7	1,6
13	6	2,2	13	7	1,9
Cluster	6	hohe Amplifikation	12	9	1,3
10	7	1,4	14	9	1,4
8	8	1	10	10	1
13	8	1,6	12	10	1,2
12	9	1,3	11	11	1
17	12	1,4	16	12	1,3
Cluster	14	hohe Amplifikation	21	13	1,6
Cluster	16	hohe Amplifikation			

Abbildung 4-12 A-1/B-1 zeigt exemplarisch CTCs der prä- (A) und postoperativen (B) Blutprobe mit heterogener *EGFR*-Genamplifikation. Die GFAP-Expression der CTCs wurde durch die sich an die FISH anschließende Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung 4-12 A-2/B-2). Außerdem sind hybridisierte Zellen des Primärtumors von Patient #63 dargestellt (Abbildung 4-12 C). Auch hier zeigen die Zellen untereinander eine sehr heterogene *EGFR*-Genamplifikation. In Abbildung 4-12 D-1 wird eine postoperativ detektierte CTC gezeigt, die sowohl GFAP als auch *EGFR* exprimierte. Durch die anschließende *EGFR*-FISH konnte die Polysomie von Chr7 sowie die *EGFR*-Genamplifikation dieser Zelle visualisiert werden (Abbildung 4-12 D-2).

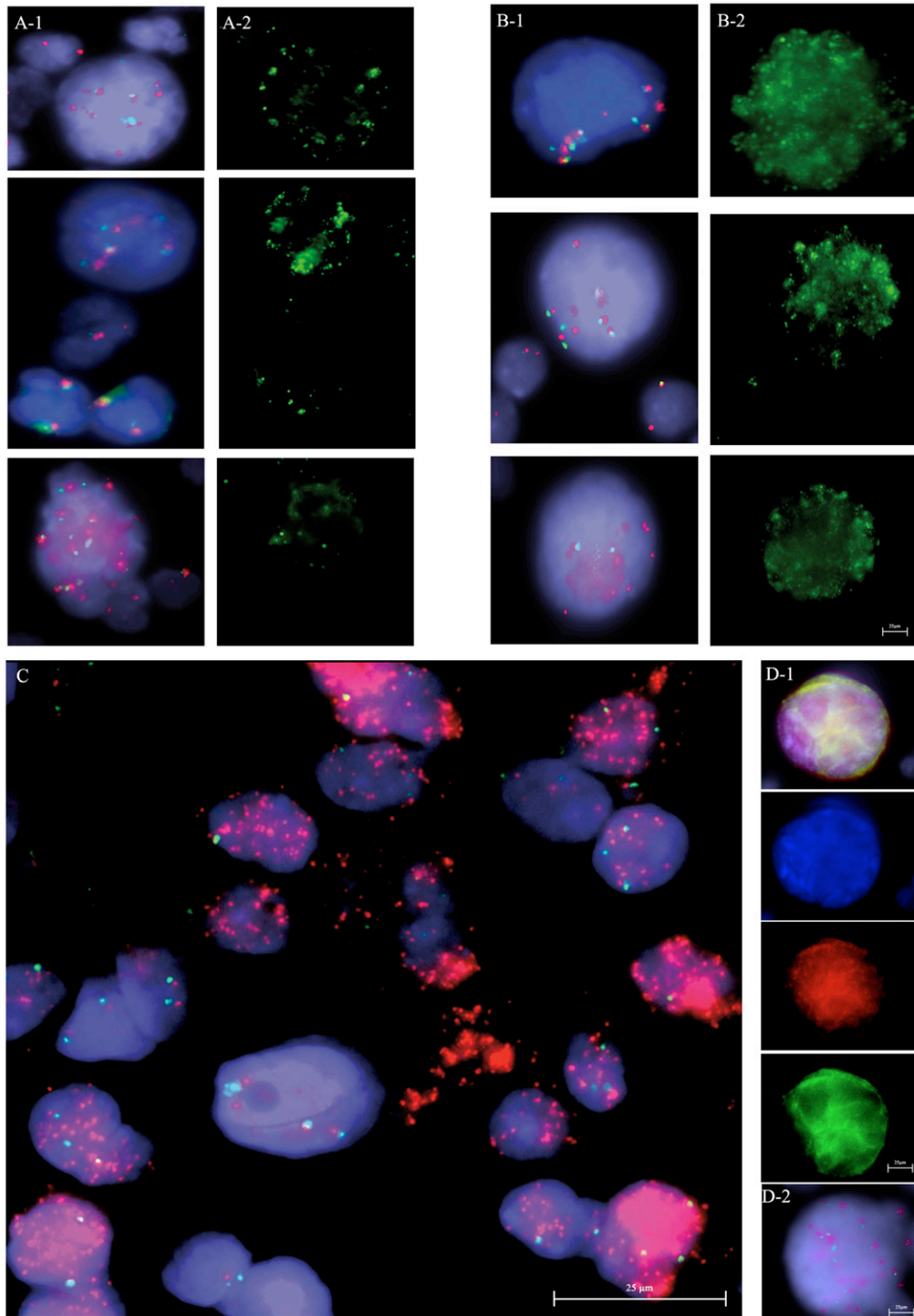


Abbildung 4-12: EGFR-Amplifikation von Tumorzellen des GBM-Patienten #63. A-1, B-1, D-2: FISH auf MNC, A: präoperativ A-1: Die Zellen wurden mit der *EGFR*-Sonde (TRITC) und der Cen7-Sonde (Aqua-gelb) inkubiert. A-2: Im Anschluss an die FISH wurde eine GFAP-Immunfluoreszenzfärbung (FITC) durchgeführt. B: Postoperativ s.o.. D1: IF an MNC. TRITC: PAK: Kaninchen-anti-human-GFAP-IgG; SAK: anti-Kaninchen-IgG *Alexa Fluor*TM-564; FITC: AK: Ziege-anti-human-EGFR-IgG; SAK: anti-Maus-IgG *Alexa Fluor*TM-488; Dapi: *VECTASHIELD*[®] *Hard_Set*TM *Mounting-Medium* mit DAPI.

4.1.5.2 Detektion von chromosomalen Aberrationen durch Array-CGH

Um einen Überblick über chromosomale Aberrationen des gesamten Genoms zu erhalten wurden sowohl an der genomischen DNA des Primärtumors von Patientn #63 als auch am WGA-Produkt der isolierten CTCs des Patienten *Array-CGH*-Analysen im Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität, Graz durchgeführt. Dadurch können chromosomale Verluste und Zugewinne des Primärtumors und der korrespondierenden CTCs dargestellt und verglichen werden. Insgesamt wurden WGA-Produkte von 8 präoperativen und 10 postoperativen CTCs analysiert. Das in Abbildung 4-13 dargestellte CGH-Profil des Primärtumors von Patient #63 lässt für das GBM typische genomische Aberrationen (Zugewinn von Chr 7, Verlust von Chr 10), sowie Zugewinne von 6p, 12q und Chr 20 und Verluste von 6q, Chr 13 und 16q erkennen. Die Gegenüberstellung der aberranten Profile der untersuchten CTCs und des Primärtumors (Abbildung 4-13) zeigte sowohl übereinstimmende (Zugewinne: 7pq, 12q, Verlust von Chr10) als auch voneinander abweichende Aberrationen. Der Zugewinn von 6q im Primärtumor konnte nicht in den CTCs nachgewiesen werden. Der Zugewinn von 3pq in den CTCs konnte wiederum nicht im Primärtumor detektiert werden.

In Abbildung 4-14 sind die CGH-Profile der CTC-positiven Patienten #3, #22, #63 vergleichend dargestellt. In jedem der drei Profile können die für GBM typischen genomischen Aberrationen (Zugewinne von Chr 7 und 12, Verluste von Chr 10) identifiziert werden.

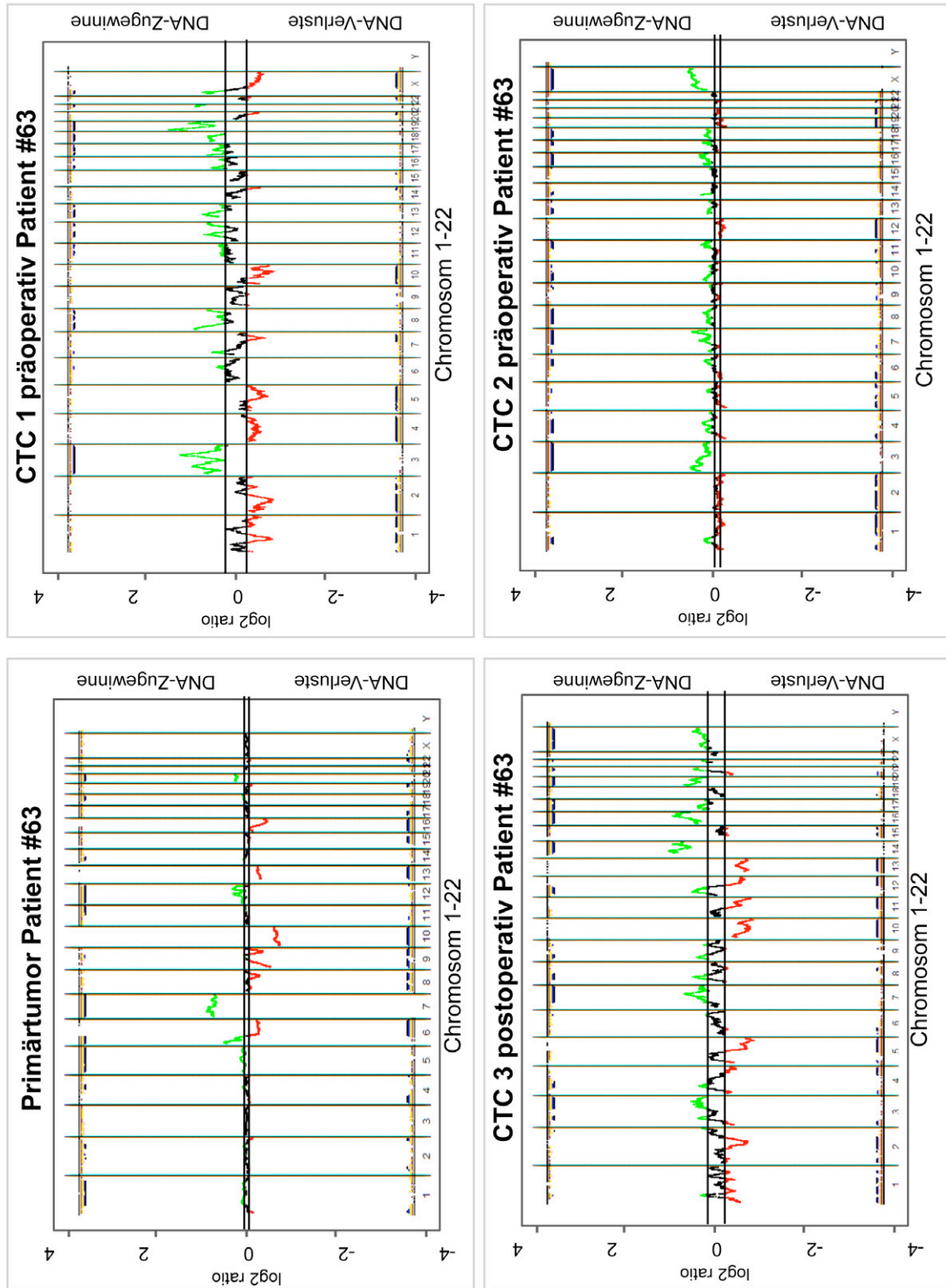


Abbildung 4-13: Array-CGH-Profile des Primärtumors und der CTCs aus der prä- und postoperativen Blutprobe von Patient #63. (zur Verfügung gestellt von Martina Auer, Institut für Humangenetik der medizinischen Universität in Graz).

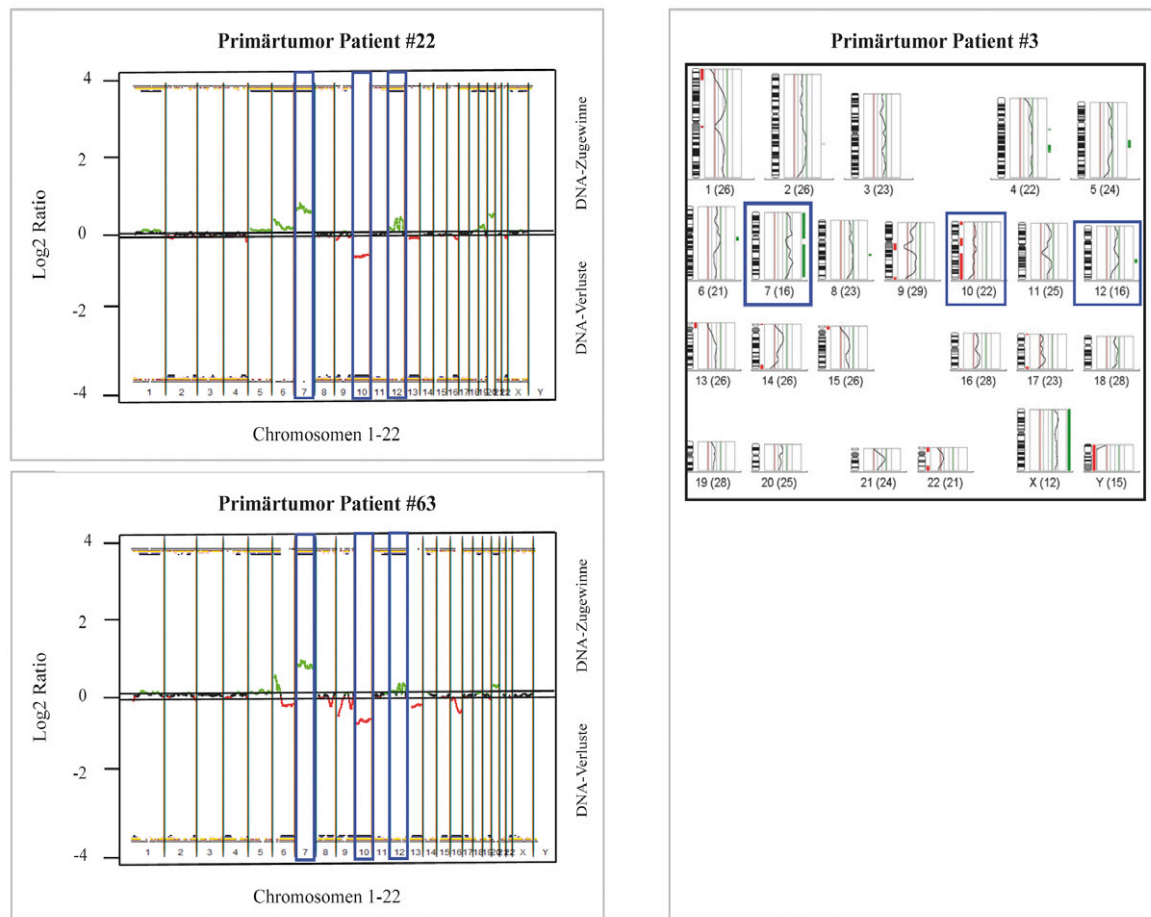


Abbildung 4-14: CGH-Profil von Primärtumoren CTC-positiver Patienten. Links: aCGH-Profile der Patienten #22 und #63 (zur Verfügung gestellt von Martina Auer, Institut für Humangenetik der medizinischen Universität in Graz). Rechts: mCGH-Profil von Patient #3 (zur Verfügung gestellt von Sabine Langer-Freitag, Institut für Humangenetik, Technische Universität in München).

4.1.5.3 FISH-Analyse zur Detektion eines Chromosom 3-Zugewinns im Primärtumor

Da die CGH-Profile der CTCs, insbesondere CTC 1 „präoperativ“, eine Überrepräsentation von Chr 3 aufweisen, diese jedoch nicht im CGH-Profil des Primärtumors zu verzeichnen war, wurden zusätzlich an Paraffinschnitten des Primärtumors FISH-Analysen mit einer Chr 3-spezifischen Zentromersonde sowie einer Chr 15-spezifischen Kontrollsonde durchgeführt.

Insgesamt wurden die Hybridisierungssignale von 60 Zellen aus unterschiedlichen Regionen des Schnittes ausgezählt. Der Amplifikationsrate wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Amplifikation Chr3} = \frac{\text{Anzahl Signale für Chr3 - Sonde}}{\text{Anzahl Signale für Chr15 - Sonde}}$$

Daraus ergab sich eine durchschnittliche Amplifikationsrate von 1,2 des Primärtumors. Die analysierten Zellen des GBMs zeigten in ihrer Gesamtheit keine Überrepräsentation von Chr 3. Dennoch konnten einzelne Zellen detektiert werden, die eine höhere Anzahl an Hybridisierungssignalen für Chr 3 als für Chr 15 aufwiesen (Abbildung 4-3, weißer Pfeil = Chr 3-Überrepräsentation, gelber Pfeil = Chr 15-Überrepräsentation).

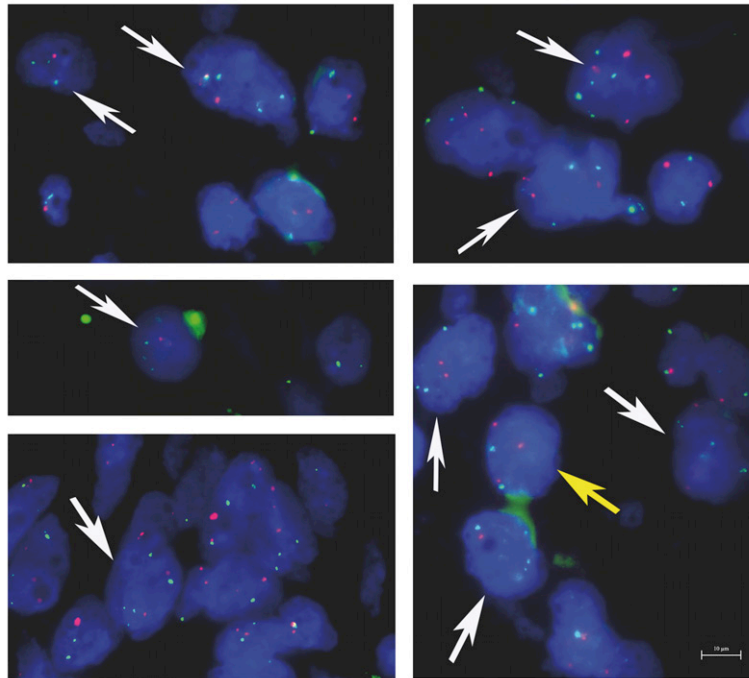


Abbildung 4-15: FISH-Analyse am Paraffinschnitt des Primärtumors #63 mit der Chr 3-spezifischen Cen3-Sonde (Aqua-grün) sowie der Chr15-spezifischen Kontrollsonde Cen15-Sonde (TRITC). Weiße Pfeile: Zellen mit einer Überrepräsentation von Chr 3, Gelber Pfeil: Zelle mit einer Überrepräsentation von Chr 15.

4.1.5.4 Mutationsanalyse von CTCs

Um einzelne isolierte CTCs auf das Vorhandensein von Mutationen im *TP53*-Gen bzw. im *PTEN*-Gen untersuchen zu können, wurden die WGA-Produkte dieser Einzelzellen mittels Sanger-Sequenzierung analysiert.

4.1.5.4.1 Mutationsanalyse im Tumorsuppressorgen *TP53*

Durch die für Folgeexperimente unzureichende Qualität vieler WGA-Produkte, die sich in einer zu geringen Konzentration des PCR-Produktes nach der Voramplifikationsreaktion äußerte, war eine Untersuchung der Zielregionen im *TP53*-Gen aller isolierten Einzelzellen nicht möglich. In Tabelle 4-11 ist die Anzahl der auswertbaren Einzelzell-DNA-Proben für die jeweiligen Abschnitte des *TP53*-Gens aufgelistet.

Tabelle 4-11: Anzahl analysierter WGA-Produkte zur Mutationsanalyse des TP53-Gens.

Gesamtanzahl Zellen (Patienten)	Anzahl der CTCs mit auswertbaren Sequenzierungsprofil			
	Exon 4	Exon 5/6	Exon 7	Exon 8/9
29 (n=14)	3 (10,4%)	2 (6,9%)	9 (31%)	0
61 (Patient #63)	12 (19,7%)	8 (13,1%)	17 (27,87%)	0

In Zelle 1 der postoperativen Blutprobe des GBM-Patienten #22 konnte je eine Mutation im Exon 6/Codon 188: CTG > CCG (Leu > Pro) und im Codon 213: CGA > CCA (Arg > Pro) detektiert werden (Abbildung 4-16).

In der postoperativen Zelle 6 von Patient #63 wurde eine Mutation im Exon 7 des Codons 235: AAC > AGC (Asn > Ser) detektiert (Abbildung 4-16). Es war allerdings nicht möglich, diese Mutationen in den korrespondierenden Primärtumoren zu detektieren.

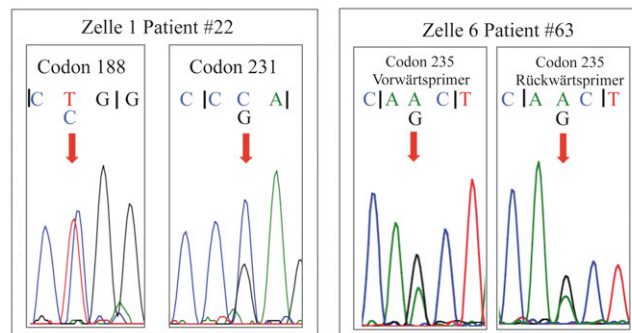


Abbildung 4-16: Detektierte Mutationen in CTCs von GBM-Patienten im TP53-Gen. Links: Mutation in der postoperativen Zelle 1 des Patienten #22: Exon 6, Codon 188: CTG > CCG (Leu > Pro) ; Codon 213: CGA > CCA (Arg > Pro). Rechts: Mutation der präoperativen Zelle 6 des Patienten #63: Exon 7, Codon 235 AAC > AGC (Asn > Ser).

4.1.5.4.2 Mutationsanalyse des PTEN-Gens

Durch aCGH-Analysen konnte der Verlust von Chr 10 im Primärtumor und in den CTCs von Patient #63 gezeigt werden. Mit dem WGA-Produkt dieser CTCs wurde deshalb keine Mutationsanalyse des PTEN-Gens durchgeführt.

Die Sequenzierung der restlichen 29 Zellen weiterer CTC-positiver Patienten lieferte wegen einer unzureichenden DNA-Qualität des WGA-Produktes (s.o.) oder aufgrund des Verlustes von Chr 10 kein Ergebnis.

4.1.5.4.3 *Next generation sequencing* (NGS) von Proben des Patienten #63

Um die Abstammung der detektierten CTCs im peripheren Blut des Patienten #63 vom korrespondierenden Primärtumor zu belegen, wurden mit DNA-Proben des Primärtumors NGS-Analysen am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität in Graz durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Sequenzierung aller Gene, die laut der Datenbank *COSMIC* in Hirntumoren mutiert sein können. Dabei konnten 20 Mutationen detektiert werden, von denen 11 mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt wurden. Die Präsenz dieser Mutationen im CTC-WGA-Produkt (CTCs mit aberrantem CGH-Profil) sowie im Leukozyten-WGA-Produkt (Pool aus amplifizierter Leukozyten-Einzelzell-DNA) dieses Patienten wurde anschließend mittels Sangersequenzierung überprüft. Hierbei konnte eine Mutation im *MECOM*-Gen des Primärtumors in CTC 1 und 2 (präoperativ) detektiert werden. Die im Primärtumor gezeigte Mutation im *MYH11*-Gen konnte in CTC 3 (postoperativ) identifiziert werden. Keine dieser Mutationen wurde in der Leukozyten-DNA nachgewiesen (Abbildung 4-17).

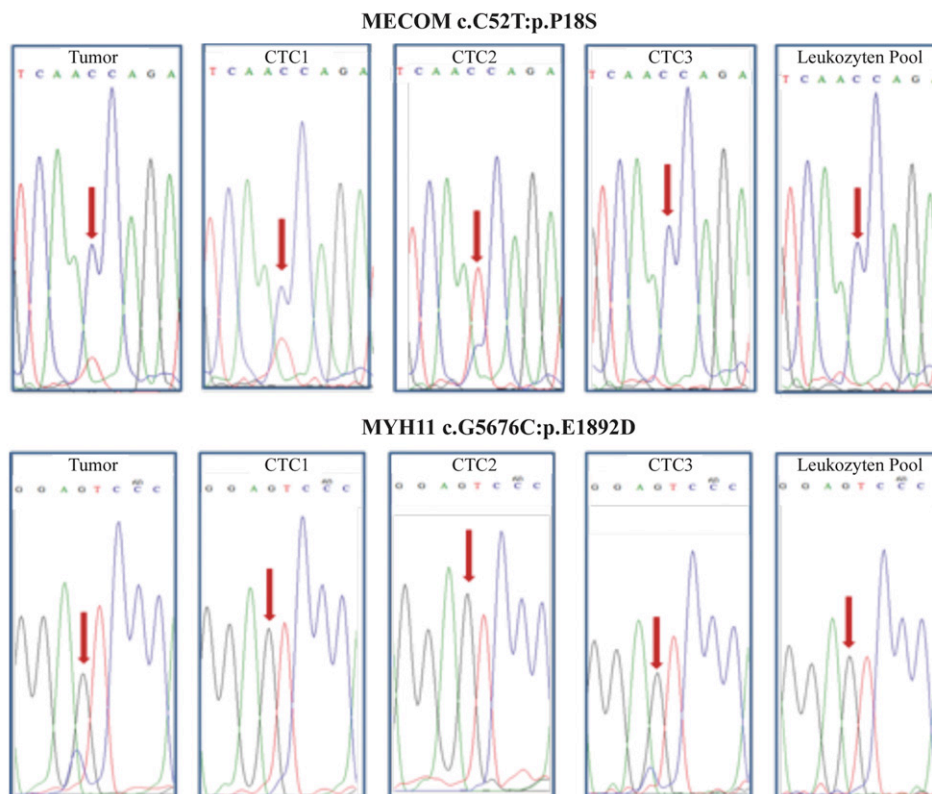


Abbildung 4-17: Mutationen, welche zunächst durch „Next-generation sequencing“ (NGS) im Primärtumor und anschließend mittels Sanger-Sequenzierung in den CTCs des Patienten #63 detektiert wurden. Oben: Mutation im *MECOM*-Gen des Primärtumors und der CTCs 1 und 1A (präoperativ). Unten: Mutation im *MYH11*-Gen konnte im Primärtumor und in CTC 4 (postoperativ) gezeigt werden. Keine dieser Mutationen konnte in Leukozyten-DNA detektiert werden.

4.1.6 Zusätzliche Charakterisierung des Primärtumor- und Metastasen-Gewebes des metastasierten Astrozytompatienten (G-10)

Nach der Diagnose der Metastasen des anaplastischen Astrozytoms im Patient G-10 wurde das periphere Blut im Rahmen dieser Arbeit auf das Vorhandensein von CTCs untersucht (4.1.3.2). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass sowohl die Zellen des Primärtumors als auch der Metastasen die glialen Markerproteine GFAP und MAP2c exprimierten, jedoch keine Expression von epithelialen Markerproteinen (AE 1/3, KL1) oder von Markerproteinen hämatopoetischer Neoplasien (LCA) zeigten.⁴³ In Tabelle 4-12 sind die Ergebnisse der unterschiedlichen immunhistologischen Untersuchungen am Primärtumor und an der Sternummetastase dargestellt. Grau unterlegte Färbungen wurden der Veröffentlichung von Martens *et al.*⁴³ entnommen. Zusätzlich wurde die Expression von EGFR und CD147 im Primärtumor untersucht (Anhang, Abbildung A IV).

Tabelle 4-12: Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen an Gewebeschnitten des Primärtumors und an der Sternum-Metastase des Patienten G-10. Grau unterlegte Farbeergebnisse wurden aus Martens *et al.*⁴³ entnommen.

	GFAP	MAP2c	TP53	Ki67	Synaptophysin	Neurofilament	AE 1/3	KL1	LCA	IDH-1	EGFR	CD 147
Primärtumor	xxx	xxx	> 50%	12 %	-	-	-	-	-	xx	+/-	+++
Metastase	xxx	xxx	90%	32 %	-	-	-	-	-	xx	n.a.	n.a.

Während das in Abbildung 4-18 dargestellte aCGH-Profil deutliche genetische Abberationen aufzeigt (Zugewinne: 3p, 4p, 9q, Verluste: 3q, 4q, 9p, 10q, 14p, Chr 13, Chr 15, Chr 14) lieferte die aCGH-Analyse des Primärtumors lediglich ein balanziertes Profil (erstellt von Paul Eijk, Microarray-Einrichtung, VUMC Amsterdam).

Die in der Metastase detektierten Verluste von Chr 4q und Chr 10q wurden an Paraffinschnitten des Primärtumors durch FISH-Analysen weiter untersucht. Insgesamt wurden die Hybridisierungssignale der Chr 4q-Sonde und Cen 17-Sonde sowie der Chr 10q-Sonde und Cen 8-Sonde von 60 Zellen aus unterschiedlichen Regionen des Schnittes ausgewertet. Ein großer Teil der Tumorzellen zeigte eine Disomie für Chr 4q und Cen 17 bzw. für Chr 10q und Cen 8. Dennoch konnten 4 Zellen detektiert werden, die wie in Abbildung 4-19-A (weißer Pfeil) dargestellt, weniger Hybridisierungssignale für Chr 4q als für Cen 17 sowie zwei Zellen mit einer geringeren Anzahl an Hybridisierungssignalen für Chr 10q als für Cen 8 aufwiesen.

Die Hybridisierungssignale der einzelnen Zellen sind in Tabelle 4-14 aufgelistet. Die Sternum-Metastase könnte aus einer Population der hier abgebildeten Zellen stammen.

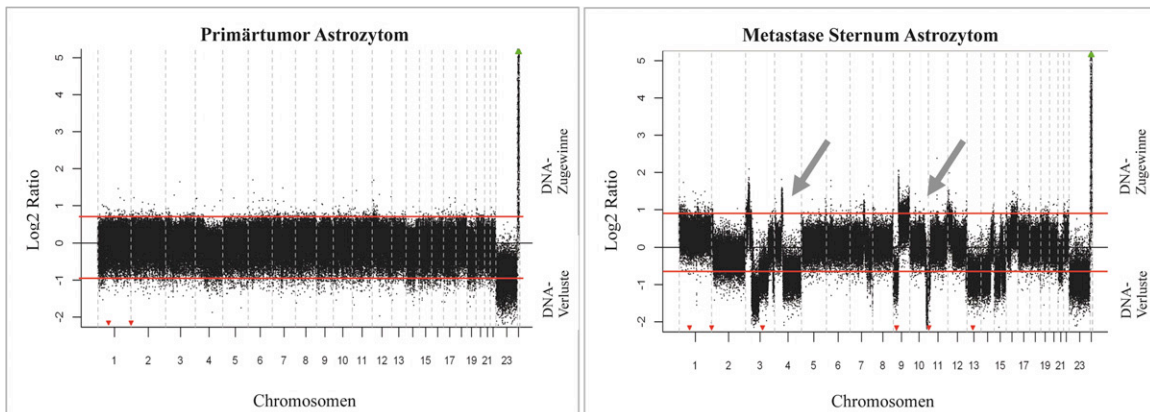


Abbildung 4-18: Vergleichende aCGH-Profile von Tumorproben des Patienten G-10. Links: Profil des Primärtumors; rechts: Profil der Sternum-Metastase des Astrozytompatienten G-10 (zur Verfügung gestellt von: Paul Eijk, Microarray-Einrichtung, VUMC Amsterdam).

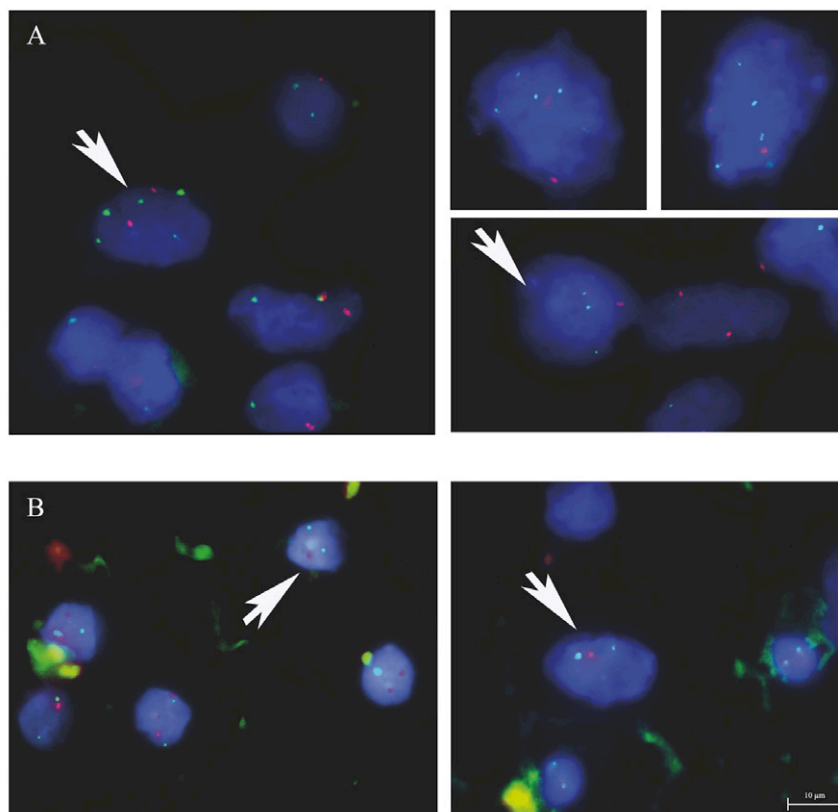


Abbildung 4-19: FISH-Analysen an Paraffinschnitten des Primärtumors von Patient G-10 zu Detektion eines Verlustes von Chr 4q und Chr 10q. A: Hybridisierte Chr 4q-Sonde (TRITC) und Cen17-Sonde (FITC), weiße Pfeile zeigen auf Zellen mit einem chromosomalen Verlust von Chr 4q. B: Hybridisierte Chr 10q-Sonde (TRITC) und Cen 8-Sonde (FITC), weißer Pfeil zeigt auf Zellen mit einem chromosomalen Verlust von Chr10q.

Tabelle 4-13: Auswertung der FISH-Analysen an Zellen des Primärtumors des Patienten G-10 mit metastasiertem Astrozytom. Auflistung der einzelnen Hybridisierungssignale der Sonden Chr 4q/Cen 17 und Chr 10q/Cen 8 und der daraus berechneten Genamplifikationsrate.

Hybridisierungssignale der einzelnen Sonden					
Chr 4q	Cen 17	Genamplifikationsrate	Chr 10q	Cen 8	Genamplifikationsrate
2	5	2,5	1	2	2
2	4	2	1	2	2
1	5	5			
1	3	3			

Die Abstammung der Metastasen vom astrozytären Primärtumor des Patienten G-10 wurde bereits in der Veröffentlichung von Martens *et al.*⁴³ beschrieben und belegt. Auch die zusätzlich durchgeführten aCGH- und FISH-Analysen wiesen auf den Ursprung der Sternummetastase im Primärtumor hin. Obwohl verschiedene tumorassoziierte Markerproteine zur Detektion von Tumorzellen im peripheren Blut des Patienten eingesetzt wurden, konnten zum Zeitpunkt der Metastasendiagnose keine CTCs detektiert werden.

4.2 Kultivierung von CTCs und DTCs aus Blut-/ Knochenmark-proben von Karzinompatienten

Die Kultivierung von Tumorzellen ist eine essentielle Voraussetzung für diagnostisch und therapeutisch relevante experimentelle Untersuchungen in der Krebsforschung. Aufgrund ihrer einfachen Handhabung und ihrer unlimitierten selbstreplizierenden Proliferation werden an ihnen u.a. *in vitro* Untersuchungen z.B. zur Therapiesensitivität oder in Tierversuchen zur Metastasierung oder zur Interaktion von Tumorzellen mit ihrem umliegenden Gewebe durchgeführt.¹¹¹ Die meisten experimentellen Untersuchungen in der Krebsforschung werden an Tumorzelllinien durchgeführt. Zwar sind diese Zellen von Natur aus immortal und wurden während ihrer Etablierung keiner Virustransfektion unterzogen, dennoch ist davon auszugehen, dass sich bei jeder Subkultivierung der Phänotyp dieser Zellen ändert, da schneller profilierende Zellen das Zellgemisch nach kurzer Zeit dominieren.¹¹² Außerdem sind Zelllinien anfällig für geno- und phänotypische Veränderungen während ihrer kontinuierlichen Kultur.¹¹¹,¹¹³ Eine Alternative stellt die primäre Kultur von frisch isolierten Tumorzellen dar. Pantel *et al.*⁸⁰ konnten bereits mikrometastatische, epitheliale Zelllinien aus Knochenmaksaspiraten von Tumorpatienten etablieren. Diese Zellen wurden allerdings mit Hilfe der SV-40- Large T-Antigen-Transformation immortalisiert. Als Medium wurde hierbei *Complete*-Medium verwendet (Tabelle A-XIV, Medium D). Bis heute ist es allerdings nicht gelungen, weitere Zelllinien zu generieren.

Da auch zur Existenz von CTCs/DTCs in GBM-Patienten bisher nichts bekannt war, wurden in der vorliegenden Arbeit zur Etablierung weiterer metastatischer Zelllinien zunächst verschiedene Kulturbedingungen an etablierten epithelialen Tumorzelllinien sowie an primären Tumorzellen aus Pleurapunktaten von Karzinompatienten getestet und schließlich für Blut- und Knochenmarkproben von metastasierten Tumorpatienten angewendet. Hierbei wurde der Einfluss unterschiedlicher CO₂-Konzentrationen, verschiedener Grundmedien, FCS-Konzentration, der Zusatz von Hydrocortison und Cholera-toxin in das Kultumedium sowie der Einsatz von *Feederlayern* auf die Expansion von CTCs/DTCs *in vitro* untersucht.

4.2.1 Etablierung und Optimierung geeigneter Methoden zur Kultivierung von CTCs und DTCs

4.2.1.1 Wahl einer Anreicherungs Methode zur Kultivierung von CTCs und DTCs

Eine Voraussetzung für die Kultivierung von CTCs und DTCs aus dem Blut bzw. Knochenmark von Tumorpatienten ist die Etablierung einer optimalen Anreicherungs Methode unter sterilen Bedingungen. Außerdem muss sichergestellt sein, dass die verwendeten Materialien und Lösungen weder einen toxischen Einfluss haben noch wachstumsinhibierend auf die Zellen wirken. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Anreicherungs Methoden, wie die *Ficoll*-Dichtegradienten-zentrifugation, das *MACS*[®]-System (Anreicherung der Tumorzellen mit Hilfe der *EpCAM-MicroBeads*) und der *RosetteSep*[®]-Antikörpercocktail getestet. Dafür wurden je 1000 Zellen der Zelllinie MDA-MB 468 in 7 mL Blut gesunder Probanden gebracht, mit der jeweiligen Methode angereichert und anschließend in 6-Loch-Platten ausgesät ((Kulturbedingungen: DMEM-Medium (Anhang, Tabelle A-XIV, Medium A)). Bei der Kombination der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation mit dem *MACS*[®]-System wurden die MNC zunächst über den Dichtegradienten angereichert. Zur Isolierung der Tumorzellen aus dem angereicherten Zellgemisch wurden diese mittels *EpCAM-Microbeads* magnetisch isoliert. Nach 48 bzw. 72 h konnten in allen Ansätzen proliferierende Tumorzellen detektiert werden (Abbildung 4-18 A). Das Zellwachstum ist demnach bei allen Anreicherungs Methoden gewährleistet. Wurden jedoch nur 10 MDA-MB 468 Zellen in 7 mL Blut gebracht, konnten lediglich nach der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation Zellkolonien detektiert werden (Abbildung 4-18 B) Das *MACS*[®]-System und die Kombination der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation mit dem *MACS*[®]-System liefert, wie bereits bei der Anreicherung von GBM-Zellen gezeigt, geringere Wiederfindungsraten als die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation. Zur Anreicherung von CTCs/DTCs aus Patientenproben wurde deshalb die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

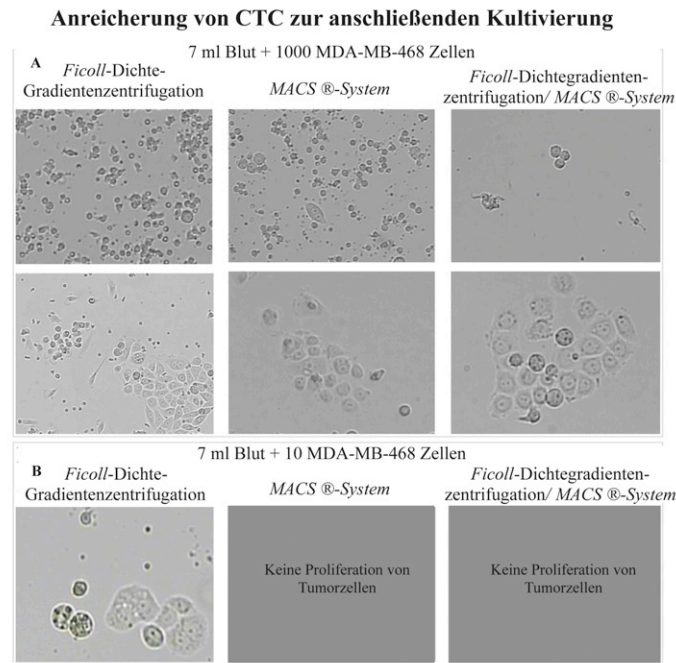


Abbildung 4-20: Vergleich verschiedener Verfahren zur Anreicherung und späteren Kultivierung von CTCs und DTCs. 1000 bzw. 10 MDA-MB 468 Zellen wurden in 7 mL Blut gesunder Probanden gebracht, mit der jeweiligen Methode (*Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation, *MACS*®-System, *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation + *MACS*®-System) angereichert und anschließend in 6-Loch-Platten ausgesät (Kulturbedingungen: DMEM-Medium, 10 % CO₂). A: Kultur von 1000 aus Blut angereicherten MDA-MB 468 Zellen nach ihrer Anreicherung. Obere Reihe: Zellanzahl und -morphologie nach 24 h, untere Reihe: Zellanzahl und -morphologie nach 72 h Inkubation. B: Kultur von 10 aus Blut angereicherten MDA-MB 468 Zellen nach ihrer Anreicherung. Lediglich bei der Anreicherung durch *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation konnten Zellen im Kulturansatz nach 48 h visualisiert werden. X = Die Anreicherung von 10 TC in 7 mL Blut ist durch das *MACS*®-System bzw. *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation + *MACS*®-System nicht möglich.

4.2.1.2 Optimierung der Kulturbedingungen zur Expansion von CTCs und DTCs

Die zur Expansion von CTCs/DTCs etablierten Kulturbedingungen⁸⁰ wurden auch für die Kultivierung von nativen Tumorzellen aus frisch isolierten Pleurapunktaten von metastasierten Karzinompatienten verwendet. Eine solche Biopsie bietet den Vorteil, dass native metastasierte Zellen in ausreichender Anzahl vorhanden sind und im Gegensatz zu Tumorgewebe in Suspension vorliegen, was den physiologischen Eigenschaften von CTCs/DTCs näher kommt. In Tabelle A -VIII sind die insgesamt 7 kultivierten Pleurapunktate aufgelistet. Die Tumorzellen wurden durch Zentrifugation aus den jeweiligen Pleurapunktaten angereichert und unter verschiedenen Bedingungen kultiviert sowie auf Objektträger zentrifugiert. In 6 von 7 Pleurapunktaten konnten mittels APAAP- bzw. DAB-Färbung (A45/BB3) Tumorzellen detektiert werden. In Abbildung 4-19 sind die gefärbten Zellen des jeweiligen Pleurapunktates zusammen mit den kultivierten Zellen dargestellt. Lediglich die Zellen des Pleurapunktates

PP-5 wiesen keine Keratin-Expression auf. Außerdem konnte während der Kultur der angereicherten Zellen von PP-6 und PP-7 kein Tumorzellwachstum beobachtet werden. Pleurapunktat PP-1 beinhaltet die für Mammakarzinome typischen kugeligen Zellverbände, die im Gegensatz zu den restlichen Proben eine nicht adhärente Proliferation aufzeigen.¹¹⁴ Da eine visuelle Identifikation der Tumorzellen am leichtesten bei PP-1 (Suspensionskultur) und PP-4 (adhärente Zellkolonien mit typischer epithelialer Zellmorphologie) möglich war, wurden nur Ergebnisse der Versuchsansätze mit Tumorzellen dieser Pleurapunktate zur Auswertung verwendet.

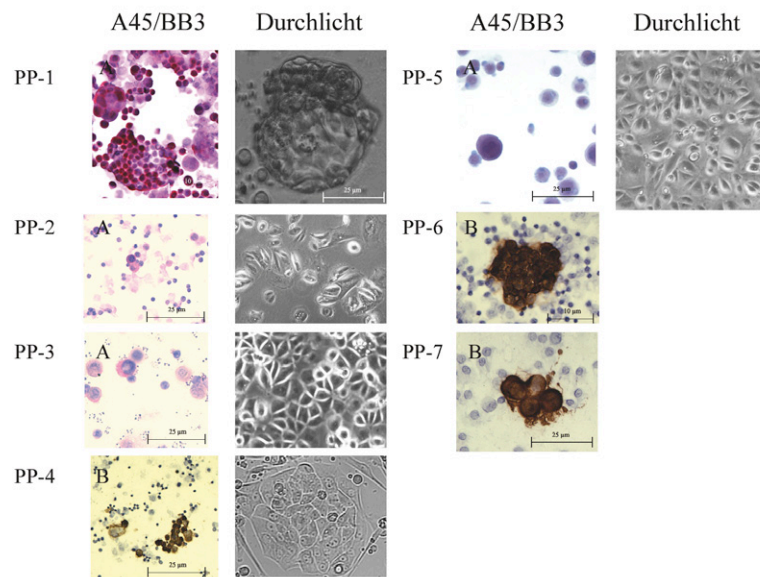


Abbildung 4-21: Zur Optimierung der Kulturbedingungen für die Expansion von CTCs/DTCs untersuchte Pleurapunktate (PP) PP-1 bis -4, -6: Mamma-Karzinom; PP-5: Vulva-Karzinom, PP-7: Ovarial-Karzinom. Zellen wurden visualisiert durch A45/BB3-Färbung - A: APPAP-Färbung, B: DAB-Färbung und Durchlichtaufnahmen nach 72 h Kultivierung, mit Hilfe eines inversen Durchlichtmikroskopes.

4.2.1.2.1 Optimierung des Kulturmediums

Alle experimentellen Untersuchungen zur Optimierung des Kulturmediums wurden an Abbildungen der kultivierten Zellen des Pleurapunktates PP-1 durchgeführt, da die Tumorzellanzahl dieser Ansätze über den Sphärendurchmesser bestimmt werden konnte. Zur Kultivierung wurde die Zusammensetzung des *Complete-Mediums*⁸⁰ (Anhang, Tabelle A-XIV) variiert, um den Einfluss unterschiedlicher Grundmedien (RPMI/DMEM), FCS-Konzentrationen (0, 1, 5, 10 %) sowie CO₂-Konzentrationen (RPMI: 5 %, DMEM: 5 und 10 %) unter Normoxiebedingungen auf das Tumorzellwachstum zu testen. Die Auswertung der einzelnen mittels *Adobe Photoshop* vermessenen Sphärendurchmesser ist in Abbildung 4-22 dargestellt. Der Mittelwert des Sphärendurchmessers nach 96 h ist im Diagramm von

Abbildung 4-22 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die höchste Tumorzellanzahl durch den Einsatz von RPMI-Medium unter der Zugabe von 10 % FCS und einer CO₂-Konzentration von 5 % erreicht wurde. Des Weiteren wurden dem Medium unterschiedliche Konzentrationen von Choleratoxin (0,5; 1; 2 µg/mL) und Hydrochortison (50; 100; 200 ng/µL) zugesetzt. Die höchste Tumorzellanzahl konnte dabei durch den Zusatz von 1 µg/mL Choleratoxin und 100 ng/µL Hydrochortison erreicht werden.

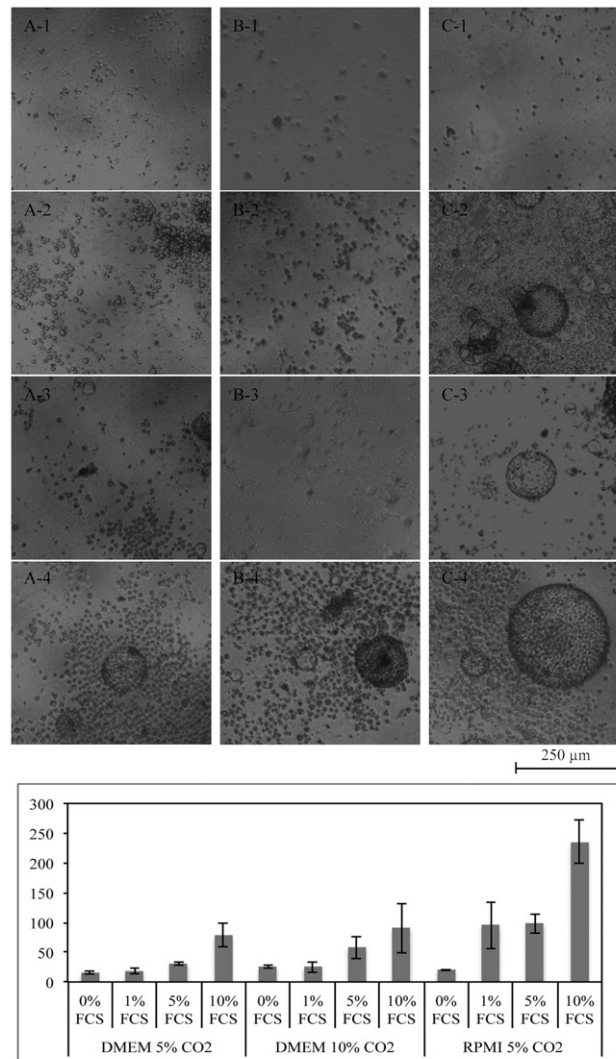


Abbildung 4-22: Tumorzellwachstum PP-1. Oben: Zellwachstum in Tumorsphären des PP-1 unter verschiedenen Kulturbedingungen. Zur Kultivierung wurde die Zusammensetzung des *Complete-Mediums*⁸⁰ variiert: A = DMEM 5% CO₂; B = DMEM 10% CO₂; C = RPMI 5% CO₂; FCS-Konzentration: 1 = 0%, 2 = 1%, 3 = 5%, 4 = 10%. Unten: Durchmesseranalyse nach 96 h Kultivierung.

Um einzelne Subpopulationen des kultivierten Pleurapunktates weiter charakterisieren zu können, wurden EpCAM-exprimierende Zellen der Zellsuspension unter sterilen Bedingungen mittels EpCAM-*MicroBeads* des *MACS*[®]-Systems von den nicht EpCAM-exprimierenden

Tumorzellen isoliert und weiter kultiviert. In Abbildung 4-21 sind A45/BB3- (A) sowie EpCAM-exprimierende (B) Zellen aus Passage 15 dieser Zellpopulation abgebildet. Außerdem zeigen diese Zellen eine sehr heterogene HER2-Expression (C1 = Her2-positiv, C2 = Her2-negativ). Eine heterogene HER2-Genamplifikation wird auch durch die FISH-Analyse deutlich. Hier wurden die Zellen mit der HER2-Sonde zusammen mit der Cen17-Sonde hybridisiert (D). Hierbei lassen sich sowohl Zellen mit Polysomie (D1) als auch Disomie für Chr 17 (D2) detektieren. Der Primärtumor dieser Patientin zeigte keine HER2-Expression.

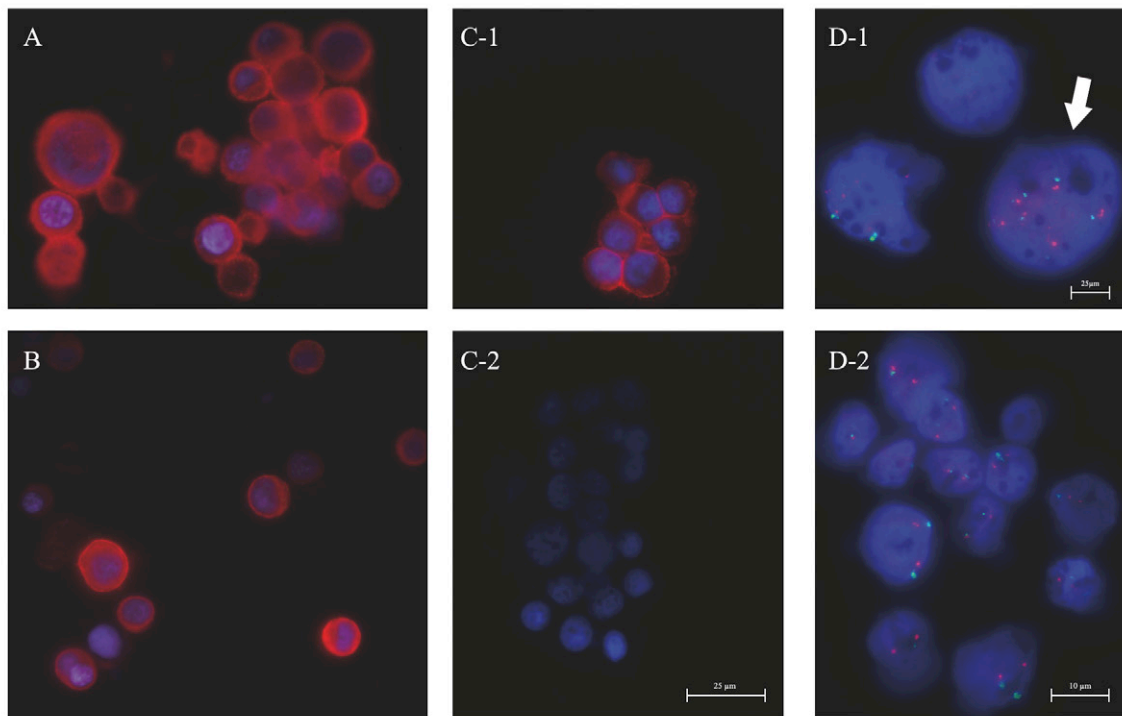


Abbildung 4-23: Charakterisierung der Tumorzellen von PP-1 in Passage 15. A+B+C: Immunfluoreszenz-doppelfärbung A: PAK: Maus-anti-human-A45/BB₃-IgG- *Alexa Fluor*TM-546; B: P-AK: Maus-anti-human-EpCAM, S-AK: anti-Maus-IgG *Alexa Fluor*TM-564; C = P-AK: Maus-anti-human-HER2, S-AK: anti-Maus-IgG *Alexa Fluor*TM-564, C1 = Suppopulation Her2 positive Tumorzellen, C2 = Suppopulation Her2-negative Tumorzellen; D: FISH mit einer HER2-Sonde (TRITC) und einer Cen17-Sonde (FITC); Kernfärbung: *VECTASHIELD*® *Hard Set*TM *Mounting-Medium* mit DAPI. D1 = Tumorzelle mit polysomie for Ch17(weißer Pfeil), D2 = Tumorzellen mit Disomie für Chr17.

4.2.1.2.2 Verwendung von *Feederlayern* zur Kultur von CTCs und DTCs

Ein Problem bei der Primärkultur von DTCs/CTCs ist die außerordentlich geringe Tumorzellzahl in der Patientenprobe und die damit verbundene Vermehrung dieser Zellen. Ursache dafür könnte eine unzureichende Konditionierung der Zellen durch das Medium sein. Es fehlen bestimmte Wachstumsfaktoren, oder es mangelt den Zellen an physischem Kontakt. In diesen Fällen kann der Einsatz von sogenannten *Feederzellen* von Vorteil sein. Diese

können die benötigten Wachstumsfaktoren oder den von den DTCs/CTCs benötigten Zellkontakt bereitstellen und eventuell toxische Zellreste verdauen.¹¹⁵ Zu diesem Zweck wurden embryonale Mausfibroblasten (MEF = *mouse-embryonal fibroblasts*) oder NIH3T3-Zellen bis zu einer 80 %igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde ihr Wachstum mit Mitomycin C (Endkonzentration: 10 µg/mL) inaktiviert, um ein Überwachsen der Tumorzellen durch die Fibroblasten zu verhindern. Werden angereicherte primäre Tumorzellen der Pleurapunktate auf *Feederlayern* kultiviert, so sind die Grenzen der einzelnen Zellpopulationen klarer definiert, während der Übergang zwischen Tumorzellen und Fibroblasten ohne *Feederlayer* fließend ist (Abbildung 4-24). Zusätzlich sollen *Feederlayer* das Anwachsen von den im Knochenmark vorkommenden multipotenten mesenchymalen Stammzellen, die sich in verschiedene Zelltypen des Bindegewebes differenzieren können (z.B. Tenozyten, Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Myoblasten und auch Neuronen),¹¹⁶ verhindern. Unter den hier gewählten Kulturbedingungen nehmen mesenchymale Stammzellen eine fibroblastische Morphologie an. Im Weiteren werden diese Zellen als Fibroblasten bezeichnet. Auf Grund ihrer höheren Proliferationsrate und der höheren Anzahl gegenüber den DTCs haben Fibroblasten einen starken Wachstumsvorteil im Kulturansatz.

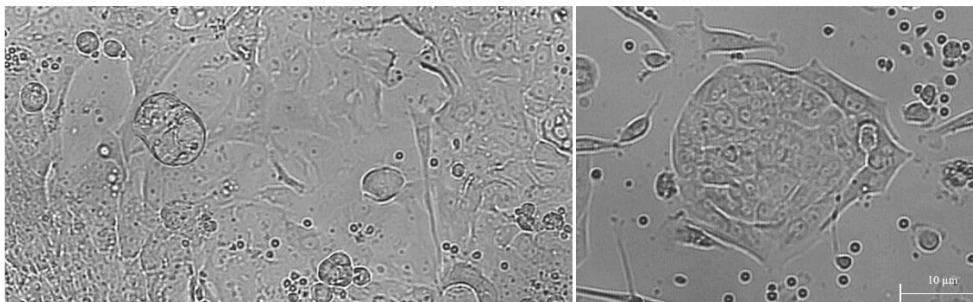


Abbildung 4-24: Kultivierung von PP-4. Links = Zellkultur ohne MEF, Rechts = Zellkultur mit MEF.

Die Identifikation möglicher Tumorzellen auf *Feederlayern* stellte sich aufgrund ihrer geringen Anzahl als sehr schwierig heraus (Abbildung 4-25 A+B). Zu diesem Zweck wurde eine EpCAM-Lebendfärbung an MDA-MB 468 Zellen entwickelt. Diese hat den Vorteil, dass Tumorzellen in der Kulturschale gefärbt, detektiert (Abbildung 4-25 B-2, C1+2) und anschließend weiter kultiviert werden können (Abbildung 4-25 C3).

Der Einsatz der verwendeten *Feeder*-Zellen (MEF/NIH3T3) zur Unterstützung des Tumorzellwachstums konnte sich jedoch nur bei der Kultivierung von Zellen aus Pleurapunktaten bewähren. DTCs/CTCs sind nach ihrer Anreicherung aus Blut- oder Knochenmarkproben nur noch in sehr geringer Anzahl zwischen Millionen von MNC präsent. Aufgrund der langen Adaptionszeit dieser Zellen wuchsen diese nur sehr langsam an. Die

Wachstumshemmung der NIH3T3-Feederzellen durch Mitomycin C hielt jedoch nur ca. 3 Wochen an. Nach dieser Zeit beginnen sich die NIH3T3-Zellen wieder zu teilen. Somit besteht die Gefahr des Überwachsens der einzelnen Tumorzellen durch NIH3T3-Zellen. MEF-Zellen hingegen überleben keine 3-4 Wochen nach ihrer Inaktivierung. Diese Zeit reicht für eine Proliferation der mikrometastatischen Zellen allerdings nicht aus. Für eine Langzeitkultur, die für die Kultivierung von DTCs/CTCs benötigt wird, sind MEF- bzw. NIH3T3-Zellen nicht zur Verwendung als *Feederlayer* geeignet.

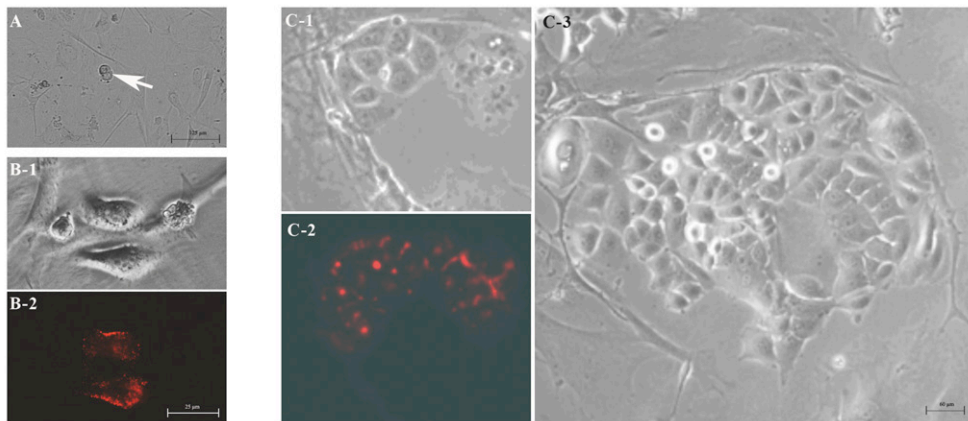


Abbildung 4-25: EpCAM-Lebendfärbung an MDA-MB 468 Zellen zwischen *Feederlayer*-MEF. A = zwischen den MEFs schwer detektierbare TC, B = EpCAM-positiv TC, B-1: Durchlicht, B-2: TRIC-Kanal; C1+2 = EpCAM-positiv TC-Kolonie, C3 = Zellen konnten nach EpCAM-Färbung weiter kultiviert werden (48h nach Färbung).

4.2.2 *In vitro*-Expansion von CTCs und DTCs

Zur *in vitro*-Expansion von DTCs und CTCs wurden MNC von Karzinompatienten über die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation unter sterilen Bedingungen aus Blutproben oder Knochenmarkbiopsien angereichert. Im Anschluss wurden die angereicherten Zellen in Complete-Medium (Tabelle A-XIV, Complete⁺-Medium (E)) mit dem Zusatz von Choleratoxin und Hydrocortison ohne den Einsatz von *Feederlayern* bei einem 5 %igen CO₂-Gehalt inkubiert. Im Anhang (Tabelle A -IX, Tabelle A -X) findet sich eine Auflistung aller in Kultur genommenen Proben aus Karzinompatienten. Insgesamt wurden angereicherte Zellen aus 41 Knochenmarkaspiraten und 175 Blutproben in Kultur genommen.

4.2.2.1 Kultivierung von CTCs aus dem peripheren Blut von Mammakarzinom-Patientinnen

Blutproben von 163 Patientinnen mit diagnostiziertem Mammakarzinom wurden im Rahmen einer Kollaboration vom Institut für Stammzell-Technologie, Heidelberg bezogen. Parallel zur Kultivierung der über die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation angereicherten Zellen, wurden CTCs von 158 dieser Blutproben mittels *CellSearch*TM-System bestimmt. Die kategorisierte CTC-Anzahl dieser Patienten ist in Tabelle 4-14 dargestellt. Lediglich in 6 Fällen konnten mehr als 100 Tumorzellen in 7 mL Blut detektiert werden. Bei der Hälfte der untersuchten Patientinnen wurden keine EpCAM-exprimierenden Tumorzellen nachgewiesen. Weiterhin war zu beachten, dass die CTC-Anreicherung über die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation eine schlechtere Wiederfindungsrate als das *CellSearch*TM-System erzeugte.¹⁰³ Daher war zwar von einer geringeren Anzahl EpCam-positiver CTCs in den Kultivierungsansätzen auszugehen. Allerdings konnten durch die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation zusätzlich CTCs mit einem mesenchymalen Phänotyp unabhängig von ihrer EpCAM-Expression angereichert werden, die durch das *CellSearch*TM-System nicht detektiert werden konnten.

Tabelle 4-14: Die durch das *CellSearch*TM-System detektierte kategorisierte Anzahl von CTCs im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen (Institut für Stammzell-Technologie, Heidelberg).

kategorisierte CTC-Anzahl*	Anzahl Patienten
0	80 (51,6%)
1	28 (18,1%)
2	15 (9,7%)
3	25 (16,1%)
4	6 (4,5%)
Gesamt	155

*Kategorisierung der CTC-Anzahl: 0 = 0 CTC; 1 = 1 bis 2 CTC; 2 = ≥ 3 bis < 10 CTC ;
3 = ≥ 10 bis < 100 CTC ; 4 = ≥ 100 CTC

4.2.2.2 In vitro-Proliferation von CTCs/DTCs

Bei zwei aus Blutproben angereicherten MNC (Erfolgsquote: $2/175 = 1,1\%$) konnte nach 11 (RM-30) bzw. 28 (HD-82) Tagen jeweils eine adhärente Zellkolonie mit epithelialer Morphologie auf der Kulturflaschenoberfläche detektiert werden (Abbildung 4-25 A+B). Beide Blutproben stammten von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Die Probe RM-30 wurde im Rahmen einer Kollaboration mit dem Institut für Rechtsmedizin (UKE, Hamburg) 5 Stunden *post mortem* entnommen. Die Probe HD-82 stammt aus der oben genannten Patientenkohorte des Instituts für Stammzell-Technologie, Heidelberg. In beiden Proben konnten nach Anreicherung keine Keratin- bzw. EpCAM-exprimierenden Zellen

detektiert werden. Eine fortführende Expansion der Zellkolonien war aufgrund von Kontaminationen nicht möglich. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse konnte in beiden Ansätzen die EpCAM- und A45/BB3-Expression bei fehlender CD45-Expression dieser Zellen belegt werden.

Des Weiteren wurden in zwei Kulturansätzen (Erfolgsrate $2/41 = 4,9\%$) mit aus Knochenmark von metastasierten Karzinompatienten angereicherten MNC nach 18- (P-5, Mammakarzinom) bzw. 14- (P-7, Bronchialkarzinom) tägiger Kultivierung EpCAM- bzw. A45/BB3-exprimierende Zellen mittels Fluoreszenzanalyse detektiert. Die möglichen Tumorzellen der KM-Probe P-5 proliferierten, wie in Abbildung 4-25 zu erkennen, zwischen den Fibroblasten des Knochenmarks. Deshalb wurde nach der Detektion der EpCAM-exprimierenden Zellen versucht, diese epithelialen Zellen mittels EpCAM-*MicroBeads* durch das *MACS*[®]-Systems zu isolieren und weiter zu kultivieren. Nach 14 tägiger Inkubation der isolierten Zellen konnten keine expandierten Zellen identifiziert werden. Eine Proliferation dieser Zellen ohne die Fibroblasten war hier nicht möglich. Bei der Knochenmarkprobe P-7 konnten nach 14 Tagen EpCAM- bzw. A45/BB3-exprimierende Zellen detektiert werden. Im Kulturansatz zeigten diese Zellen eine Proliferation in Suspension, wobei Zellklone von 2-3 Zellen im Medium visualisiert werden konnten (Abbildung 4-25 C). Allerdings konnten diese Zellen nach 20 Inkubationstagen nicht mehr detektiert werden. Zur weiteren Einzelzellanalyse wurden gefärbte EpCAM- bzw. A45/BB3-exprimierende Zellen isoliert.

Insgesamt zeigten die expandierten Zellen im Vergleich zu den nativen Tumorzellen aus Pleurapunktaten eine sehr geringe Proliferation. Während bei Pleurazellen bereits am ersten Tag der Kultivierung eine Zellteilung festgestellt werden konnte, wurde eine Proliferation der CTCs/DTCs erst nach 11-28 Tagen detektiert. Die Morphologie der einzelnen Zellpopulationen unterscheidet sich deutlich zwischen den Tumor-Entitäten der Patienten. Die Zellklone der Proben RM-30, HD-82 und P-5 aus Mammakarzinompatientinnen proliferierten in inselartigen Zellpopulationen mit Epithel-ähnlicher Morphologie, wohingegen mögliche DTCs der KM-Probe P-7 eines Bronchialkarzinompatienten als Verbände mit 2-3 Zellen in Suspension wuchsen. Ob es sich bei den expandierten Zellen wirklich um Tumorzellen handelte, konnte nicht eindeutig belegt werden. Aufgrund der zu geringen DNA-Konzentration des WGA-Produktes der isolierten Zellen, war eine zusätzliche molekulare Charakterisierung dieser Zellen nicht möglich. Der epitheliale Ursprung dieser Zellen konnte jedoch durch die EpCAM- und A45/BB3- sowie die fehlende CD45-Expression postuliert werden.

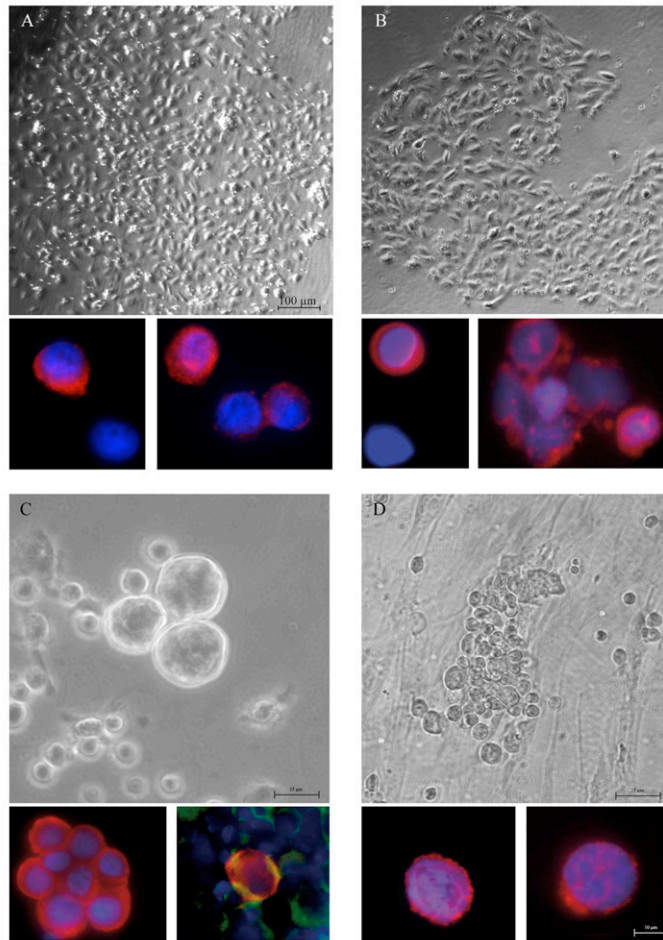


Abbildung 4-26: In-vitro-Expansion von CTCs/DTCs aus metastasierten Karzinompatienten. A: RM-30, oben: proliferierende Zellen mit epithelialer Morphologie, B: HD-82, oben: proliferierende Zellen mit epithelialer Morphologie, C: P-7, oben: in Suspension proliferierende Zellen, D: P-5, oben zwischen Fibroblasten proliferierende Zellen; A-D unten: Immunfluoreszenz-Färbung: TRITC: PAK: Maus-anti-human-A45/BB3 (links); PAK: Maus-anti-human-EpCAM-IgG (rechts), SAK: anti-Maus-IgG *Alexa Fluor*TM-564; FITC: direkt gekoppelter *Alexa Fluor*TM-488 anti-human CD45-IgG; Dapi: *VECTASHIELD*[®] *Hard_Set*TM Mounting-Medium mit DAPI.

4.2.3 Kultivierung von MNC des Knochenmarks eines Harnblasenkarzinom-Patienten mit Knochenmetastasen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten Tumorzellen aus dem Knochenmark eines Harnblasenkarzinompatienten mit diagnostizierten Knochenmetastasen kultiviert werden (Complete⁺-Medium, 5% CO₂, Normoxie). Diese nativen Tumorzellen wurden während der Metastasenresektion vom Ort der Metastase isoliert. Im Folgenden werden Ergebnisse zur phänotypischen- und genotypischen Charakterisierung dieser Zellen aufgeführt. Im weiteren Verlauf wird diese Zelllinie als „BLC-1“ bezeichnet.

4.2.3.1 Morphologie der BLC-1-Zellen

In Abbildung 4-27 sind die kultivierten Zellen jeweils nach einer Woche bzw. nach 3-wöchiger Kultur aufgeführt. Die Heterogenität der frisch kultivierten Zellsuspension ist in der linken Abbildung deutlich zu erkennen. Hier adhären und proliferieren Tumorzellen mit epithelialer Morphologie zusammen mit den Stromazellen des Knochenmarkes. Sobald eine ausreichend große Zellkolonie zu detektieren war, wurden die umliegenden Fibroblasten mittels Zellschaber aus der Kultur entfernt. Die verbleibenden, weiter proliferierenden Zellen behielten dabei eine epitheliale Morphologie (Abbildung 4-27).

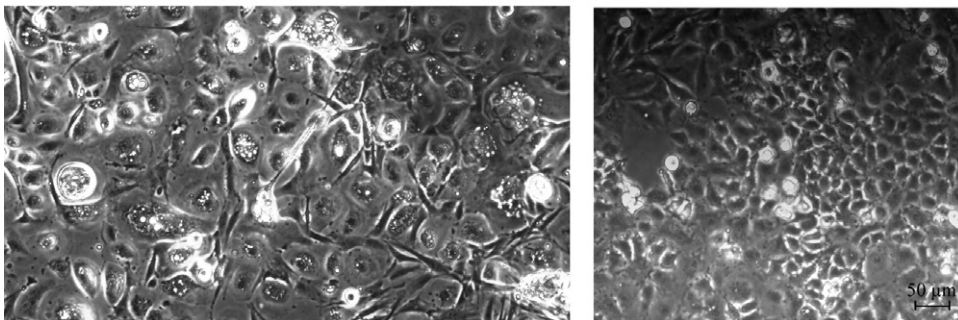


Abbildung 4-27: Kultivierte BLC-1-Zellen. Links: Zellen nach 1 Woche Inkubation, rechts: Zellen nach 3 wöchiger Inkubation. Die Fibroblasten wurden zuvor mittels Zellschaber aus der Kulturschale entfernt.

4.2.3.1.1 Wachstumsunabhängige Proliferation der BLC-1-Zellen

Einzelne Tumorzellen sind in der Lage, in Soft-Agar zu proliferieren und Kolonien zu bilden. Die Kolonieformation von Krebszellen, die aus soliden Tumoren oder malignen Flüssigbiopsien stammen, kann durch den sog. Soft-Agar-Assay *in vitro* beobachtet werden.¹¹⁷ Die im roten Knochenmark vorkommenden humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) verfügen nicht über die Fähigkeit im Soft-Agar zu proliferieren.^{64,116} Um die Proliferationsfähigkeit der kultivierten BLC-1-Zellen untersuchen zu können, wurden jeweils 1000 Zellen im Softagar-Ansatz ausgesät. Hierbei wurden die kultivierten Zellen aus Passage 3 sowie 13 eingesetzt. Als positive Kontrolle dienten MCF-7-Zellen, als negative Kontrolle MNC-Zellen einer DTC- bzw. CTC-negativ Knochenmark- bzw. Blutprobe. In Abbildung 4-27 sind die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes dargestellt. Während die MNC aus den Blut- bzw. Knochenmarkproben im Soft-Agar nicht proliferieren, beinhalten die Ansätze mit den MCF-7 Zellen sowie den kultivierten BLC-1-Zellen beider Passagen mehrere Zellklone. Die Kolonieformationen der MCF-7-Zellen verfügten nach dreiwöchiger Inkubation über den größten durchschnittlichen Durchmesser von 83,5 µm, BLC-1-Kolonien der Passage 13 zeigten einen Durchmesser von 43,48 µm. Die BLC-1-Kolonien der Passage 3 waren mit 61,63 µm kleiner als die Kolonien der MCF-7-Zellen, jedoch größer als die der Tumorzellen aus Passage 13. Die Anzahl der aus 1000 ausgesäten Zellen entstandenen Zellpopulationen ist bei

den Tumorzellen der Passage 3 mit 305 am höchsten (30 %). Weiterhin wurde eine durchschnittliche Kolonieformationen von 200 (20 %) MCF-7-Zellen beobachtet. Passage 13 der kultivierten BLC-1-Zellen bildet mit durchschnittlich 60 Kolonien (6 %) in den einzelnen Ansätzen weniger Zellkolonien als Passage 3 dieser Zellen und als der Ansatz mit den MCF-7-Zellen (Diagramm und Abbildung 4-27).

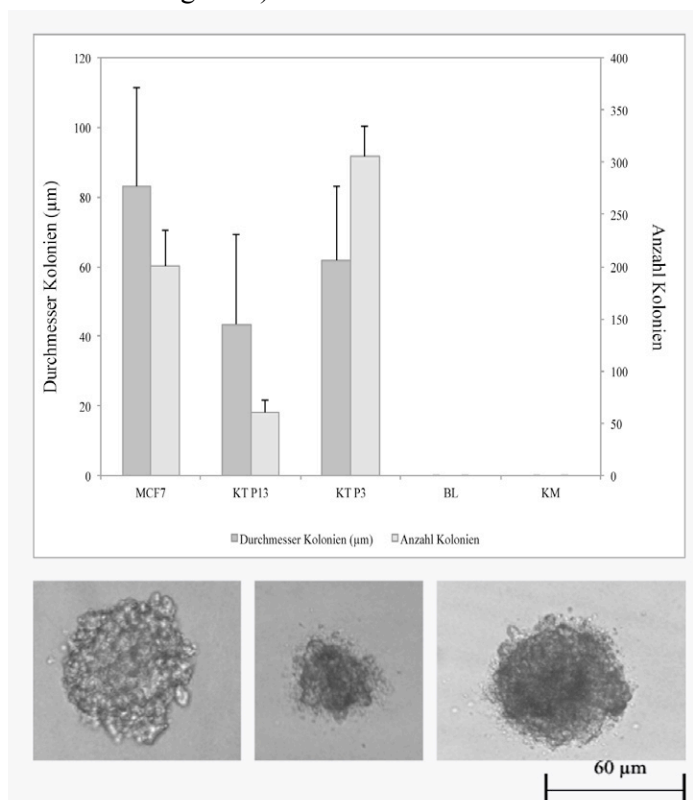


Abbildung 4-28: Auswertung Soft-Agar-Assay BLC-1-Zellen. Kultivierte BLC-1-Zellen aus Passage 3 und 13, Positivkontrolle: MCF-7, negativ Kontrolle: MNC aus Blut/Knochenmark von CTC/DTC-neg. Tumorpatienten. Es wurden jeweils 1000 Zellen (Triplikate) jeder Probe ausgesät. Diagramm: Darstellung der Mittelwerte gezählter Kolonien sowie der durchschnittlichen Koloniegröße der einzelnen Ansätze nach 3 wöchiger Inkubation. Unten: entstandene Zellkolonien, links: MCF-7, kultivierte BLC-1-Zellen Mitte: Passage 13, rechts: Passage 3.

Die Auswertung des Soft-Agar-Assays ergibt, dass sich in der kultivierten Zellpopulation Zellen befinden, deren maligner Ursprung durch die Fähigkeit, anheftungsunabhängig zu proliferieren, gezeigt werden kann. Um diese Zellklone aus dem sehr heterogenen Zellgemisch des Kulturansatzes der Passage 3 weiter untersuchen zu können, wurden sie isoliert und unter den etablierten Kulturbedingungen weiter kultiviert.

4.2.3.2 Phänotypische Charakterisierung der BLC-1-Zellen

Die Zellen der Knochenmarkprobe wurden vor der Inkulturnahme, während der Kultur der Zellsuspension (Passage 2 und 11) sowie nach der Isolierung einzelner Zellklone auf die

Expression von epithelialen und tumorrelevanten Markerproteinen durch immunhistochemische Analyse untersucht (siehe Anhang Abbildung VIII + IX). Das Expressionsprofil der einzelnen Proben ist in Tabelle 4-16 abgebildet.

Tabelle 4-15: Immunzytochemische Untersuchung der BLC-1-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung. (ZS = Zellsuspension)

Antigen	native ZS vor Kultur	ZS während Kultur	ZS während Kultur	Soft-Agar-Assay Klon			
		Passage 2	Passage 11	I	II	III	IV
EpCAM	+/-	+/-	-	-	-	-	-
A45/BB3	+++	+++	-	+++	-	+/-	+++
AE1/AE3	+++	+++	+/-	+++	+	++/-	+++
Zytokeratin 7/13/17	n.a.	n.a.	n.a.	+	-	-	-
C11	n.a.	n.a.	-	++/-	-	+/-	-
HER2	++/-	n.a.	-	+/-	-	-	+
EGFR	+/-	++/-	+/-	+/-	-	-	-
p53	n.a.	++/-	+/-	+/-	-	-	-

+ = schwach positiv; ++ = mäßig exprimierend, +++ = stark exprimierend, +/- = wenige Zellen schwach positiv, - = negativ

Die epitheliale Herkunft der kultivierten Zellen konnte durch die Expression verschiedener Keratine belegt werden. Interessanterweise war nur eine geringe EpCAM-Expression der Zellen zu detektieren. Des Weiteren wird die Heterogenität der kultivierten Zellsuspension deutlich. Während das Expressionsprofil der Zellen aus Passage 2 dem der nativen Tumorzellen des Knochenmarkes ähnelt, nimmt die Expression der epithelialen Markerproteine in Passage 11 deutlich ab. Zellpopulationen mit einem schwachen epithelialen Phänotyp haben demnach in der Kultur einen Wachstumsvorteil und überwachsen die Zellen mit einem epithelialen Phänotyp. Aus diesem Grund wurden Tumorzellklone (I bis IV) aus dem zur Proliferationsanalyse durchgeführten Softagar-Assay (Kapitel 4.2.3.1.1) isoliert und weiter kultiviert. Auch hier zeigte sich eine starke Heterogenität zwischen den einzelnen Zellklonen. Während die Zellpopulation aus Klon I dem Expressionsprofil der nativen Ausgangszellen ähnelt, werden tumorassoziierte Markerproteine bei expandierten Zellen des Zellklons II-IV nicht exprimiert. Zum anderen ist auch die Expression von epithelialen Markerproteinen bei Zellklon II herabreguliert. Diese phänotypische Untersuchung der kultivierten Zellen verdeutlicht die Heterogenität der kultivierten Zellsuspension der Passage 2. Des Weiteren wurden 500 Zellen der kultivierten Zellen (Passage 2) in 7,5 mL peripheres Blut eines gesunden Probanden gegeben und mit Hilfe des CellSearch™ Systems über EpCAM-

gekoppelte ferromagnetische Nanopartikel angereichert. Insgesamt wurden 17 der 500 (3,4 %) Tumorzellen angereichert. In Abbildung 4-28 sind 5 dieser schwach EpCAM-positiven Zellen exemplarisch dargestellt. Gleichzeitig zeigen die angereicherten Zellen eine schwache Zytokeratinexpression (Abbildung 4-28). Zum Vergleich sind einzelne EpCAM-angereicherte stark Zytokeratin-exprimierende MCF-7-Zellen⁸³ abgebildet. Werden beide Zellpopulationen miteinander verglichen, wird die schwache Zytokeratin-Expression der kultivierten Zellen aus der Knochenmetastase deutlich. Keine dieser Zellen zeigte eine CD45-Expression.

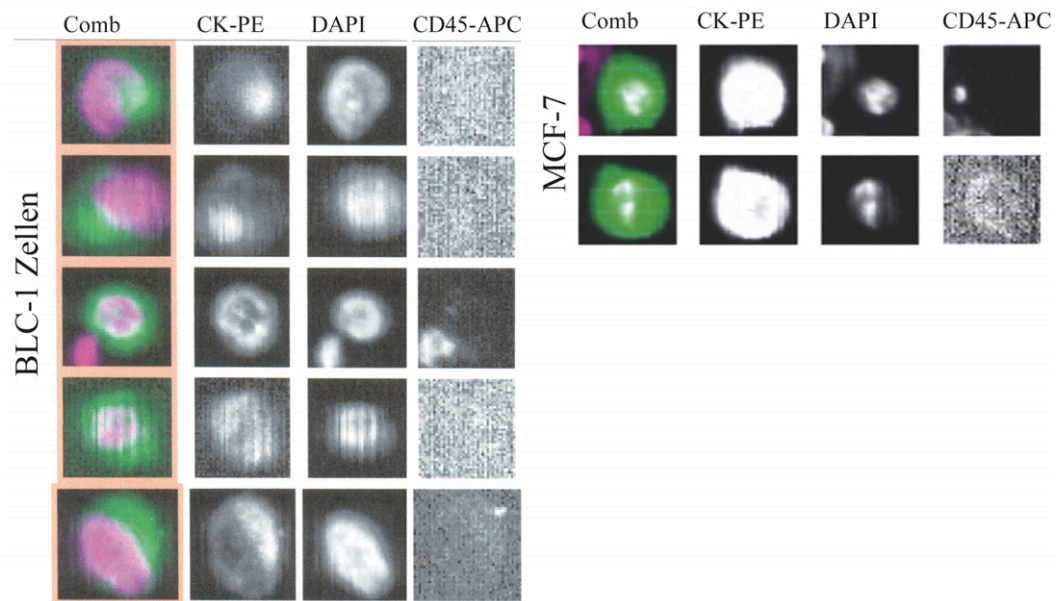


Abbildung 4-29: EpCAM-Expression von BLC-1-Zellen, die über das CellSearch-System angereichert wurden. Oben: BLC-1-Zellen (Passage 2). Unten: MCF-7-Zellen modifiziert nach Gasch *et al.*⁸³. Überlagerte Kanäle = Comp.; CK-PE = Keratin-Phycoerythrin (EpCAM); DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; APC, Allophycocyanin; FITC, Fluorescein isothiocyanate.

4.2.3.3 Genotypische Charakterisierung der BLC-1-Zellen

Die gebräuchlichste Methode, um die Diagnose des Harnblasenkarzinoms zu bestätigen, ist die Urinprobenanalyse des Patienten.¹¹⁸ Dabei können bspw. die im Urin enthaltenen Zellen mittels FISH auf genetische Veränderungen untersucht werden. Ein kommerziell erhältlicher, FDA zugelassener Assay (*UroVysion*, Abbott Laboratories, USA) zur Analyse von Urinproben, beinhaltet DNA-Sonden zur Detektion einer vorherrschenden Aneuploidie der Chromosomen 3, 7 und 17 und des Verlustes von Lokus 9p21 der im Urin enthaltenen Zellen.¹¹⁹ Dabei werden polysome Hybridisierungsmuster mit der Präsenz eines hochgradigen Tumors, der homozygote Verlust von Lokus 9p21 mit einem niedriggradigen Tumor korreliert.¹¹⁹

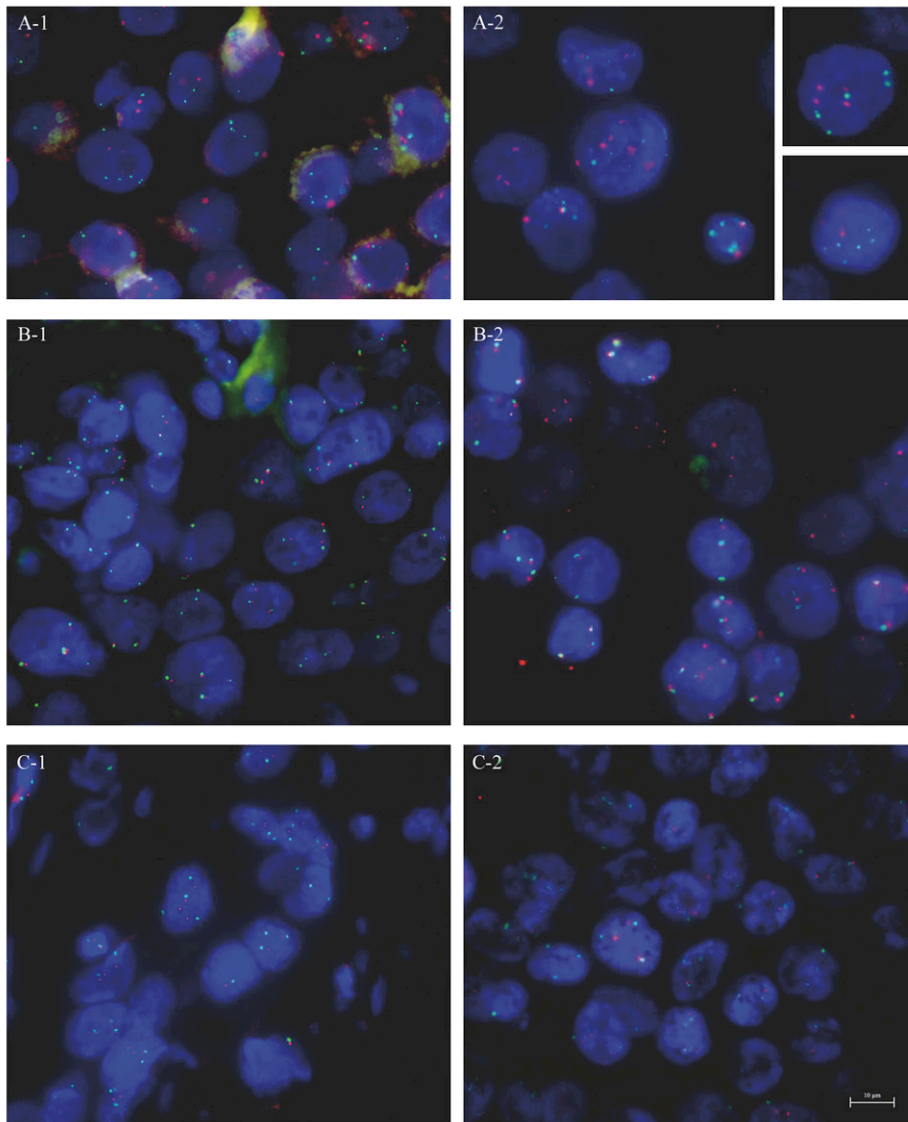


Abbildung 4-30: FISH-Analyse an BLC-1-Zellen. Links: native BLC-1-Zellen vor der Kultur, rechts: BLC-1-Zellen nach der Kultur (Passage 2). A = Cen3 (FITC)/Cen15 (TRIC), B= *EGFR* (TRIC)/Cen7 (FITC); C = *HER2* (TRIC)/Cen17 (FITC), Kernfärbung: *VECTASHIELD® Hard_Set™ Mounting-Medium* mit DAPI.

Um die nativen Tumorzellen des Knochenmarks mit den kultivierten BLC-1-Zellen (Passage 2) zu vergleichen, wurde eine FISH-Analyse mit verschiedenen Sonden-Kombinationen durchgeführt (Cen3/Cen15; *EGFR*/Cen7; *HER2*/Cen17). Wie in Abbildung 4-29 zu erkennen, sind bei allen Sonden-Kombinationen sowohl in der nativen (Abbildung 4-29-A1, B1 und C1) als auch in der kultivierten Zellsuspension (Abbildung 4-29-A2, B2 und C2) Zellen mit vorherrschender Aneuploidie vorhanden. Diese Zellen zeigen Polysomie für Chr 3, Chr 7 und Chr 17.

Um den Genotyp der kultivierten BLC-1-Zellen genauer untersuchen zu können, wurden molekularbiologische Analysen mittels qPCR sowie Mutationsanalysen durchgeführt. Zu

diesem Zweck wurde die genomische DNA aus der nativen sowie der kultivierten Zellsuspension (Passage 3) der BLC-1-Zellen isoliert. Zusätzlich wurden A45-BB3-exprimierende Einzelzellen isoliert und einer WGA unterzogen.

Ermittlung von Gen-Amplifikationsraten verschiedener Zielregionen

In der Pathogenese und Progression des Harnblasenkarzinoms ist sowohl die Amplifikation des *EGFR*- als auch des *AURKA*-Gens involviert.¹²⁰⁻¹²³ Zur Analyse der BLC-1-Proben wurden die Gen-Amplifikationsraten des *EGFR*- und *AURKA*- (20q13) Gens ermittelt. Die gemessenen durch qPCR ermittelten Werte sind in Tabelle 4-16 aufgeführt. Die isolierte genomische DNA zeigt aufgrund des heterogenen Zellgemisches in der nativen Zellsuspension weder eine Gen-Amplifikation von *EGFR* noch von *AURKA*. Während die DNA der kultivierten Zellsuspension eine 7,6 fache Amplifikation des *EGFR*-Gens aufweist, zeigt diese im *AURKA*-Gen keine Amplifikation. WGA-Produkte von Zytokeratin-exprimierenden kultivierten Einzelzellen zeigen eine *EGFR*-Genamplifikation (Zelle 5: 3,31 und Zelle 6: 2,1). Das WGA-Produkt der Zelle 6 zeigt außerdem eine 5,6 fache *AURKA*-Genamplifikation. WGA-Produkte anderer Einzelzellen konnten aufgrund fehlender genspezifischer Banden in der 4Chr-MTPLX nicht mittels qPCR untersucht werden.

Tabelle 4-16: Gen-Amplifikationsrate des *EGFR*- und *AURKA*-Gens in den einzelnen BLC-1-DNA-Proben.

DNA-Probe	Zielregion	<i>EGFR</i>	<i>AURKA</i>
gDNA native Zellsuspension (vor Kultur)		1,42	1,35
gDNA Zellkultur P3		7,66	0,07
WGA-Produkt A45/BB3-positive Einzelzelle 5		3,31	n.a.
WGA-Produkt A45/BB3-positive Einzelzelle 6		2,61	5,56

Mutationsanalyse des Tumorsuppressorgen *TP53*

Die DNA-Proben der BLC-1-Zellen wurden auf Mutationen im *TP53*-Gen untersucht. In DNA-Proben (native Zellpopulation, Zellkultursuspension sowie WGA-Produkt einer A45/BB3-positiven Einzelzelle) konnte dieselbe Punktmutation im Codon 244 des Exons 7 detektiert werden. Hierbei wird die erste Base des Codons Guanin durch Thymin ersetzt (GGC > TGC), wodurch nicht die Aminosäure Glycin, sondern Cystein abgelesen wird. Die in Abbildung 4-30 dargestellten Sequenzen belegen die Heterogenität der unterschiedlichen Zellpopulationen im nativen und kultivierten Suspensionsansatz (Passage 3).

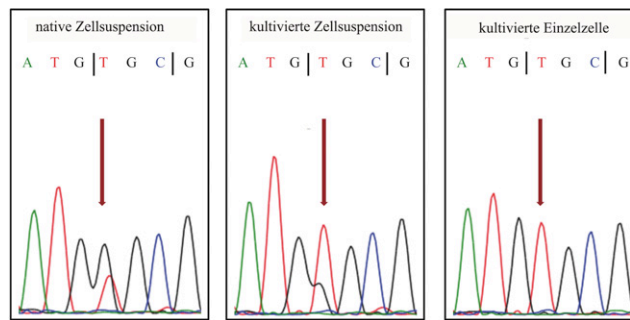


Abbildung 4-31: *TP53*-Mutationsanalyse der BLC-1-Zellen. Punktmutation der ersten Base im Codon 244 des Exon 7: GGC > TGC, wodurch nicht die Aminosäure Glycin, sondern Cystein abgelesen wird.

Die native Zellsuspension beinhaltet sowohl *TP53*-Wildtyp-Zellen als auch Zellen, die die mutierte Sequenz des Codons 244 tragen. Die DNA der kultivierten Zellsuspension beinhaltet zwar auch *TP53*-Wildtyp-Zellen und *TP53*-mutierte Zellen. Die Präsenz der mutierten Zellen hat in dieser Probe bereits deutlich zugenommen. Im WGA-Produkt einer A45/BB3-positiven Einzelzelle ist nur die mutierte Form des *TP53*-Codons 244 zu erkennen. In der *COSMIC*-Datenbank wird diese Mutation mit Harnblasenblasenkarzinomen assoziiert. Weitere Analysen von Einzelzellen müssen durchgeführt werden, um die genotypischen Charakteristiken der einzelnen Zellpopulationen näher untersuchen zu können.

5 Diskussion

5.1 Detektion und Charakterisierung von CTCs im Blut von GBM-Patienten

Eine extrakraniale Metastasierung des GBM, des aggressivsten Tumortyps im zentralen Nervensystem, ist bisher nur sehr selten beschrieben worden. Werden Metastasen im GBM-Patienten diagnostiziert, stellen Knochen, Leber, Lunge oder Lymphknoten bevorzugte Metastasierungsorte dar. Durch mehrere Fallbeschreibungen bezüglich einer durch Organspende induzierten GBM-Transmission wird zudem angenommen, dass bis zu 25 % der Organspender mit GBM den Tumor auf den Organrezipienten übertragen könnten.¹²⁴ Obwohl die Präsenz von CTCs im Blut dieser Patienten bisher noch nicht beschrieben wurde, lassen diese Fälle darauf schließen, dass eine hämatogene Streuung von Tumorzellen im Krankheitsverlauf des GBM-Patienten stattfinden kann. Die einzige Studie zur Detektion von CTCs in GBM-Patienten wurde bereits 2003 von Böhm *et al.*⁸⁹ veröffentlicht. Mittels eines qPCR-Assays wurde das Blut von 20 GBM-Patienten auf die Präsenz von *GFAP*-kodierender mRNA untersucht. Allerdings konnte bei keinem der Patienten zirkulierende *GFAP*-mRNA detektiert werden. Dies könnte durch die geringe Anzahl untersuchter Patienten begründet werden. Zum anderen könnte die Wahl des qPCR-Assay eine nicht ausreichend sensitive Methode zur Analyse des Blutes darstellen und die fehlende Präsenz von Tumorzellen über die Detektion von *GFAP*-mRNA erklären.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde zunächst ein sensitives Nachweisverfahren für CTCs in GBM-Patienten etabliert, mit welchem anschließend das periphere Blut von insgesamt 114 GBM-Patienten analysiert wurde. Um den malignen Ursprung detektierter putativer CTCs bestätigen zu können, wurde darüber hinaus die molekulare Charakterisierung dieser Zellen mittels zuvor etablierter Einzelzellanalysen (Mutationsanalysen, qPCR, FISH, Fluoreszenzfärbungen, CGH-Analysen) durchgeführt. Die daraus gewonnenen Ergebnisse wurden mit klinisch-pathologischen Parametern (EGFR-, Ki67- und TP53-Status) der korrespondierenden Primärtumoren verglichen und korreliert. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen diskutiert. Im Rahmen dieses Projektes wurden in 27 von 114 Patienten CTCs im prä- und/oder postoperativen Blut identifiziert. Von 15 dieser CTC-positiven Patienten war es möglich, durchschnittlich zwei Zellen zu isolieren und der molekularen Einzelzellanalyse zu unterziehen. Von einem dieser Patienten konnten sogar 61 Zellen isoliert und transferiert werden. Mittels CGH, *Next Generation Sequencing*, qPCR und FISH konnte die gliale, maligne Herkunft je einer prä- und einer postoperativ detektierten CTC aus zwei Index-Patienten bewiesen werden.

5.1.1 Methodische Aspekte der Einzelzellanalyse

Da es bisher kein etabliertes Anreicherungsverfahren für CTCs glialen Ursprungs gab, wurden diesbezüglich in der vorliegenden Studie verschiedene Methoden getestet (*MACS*[®]-System, *RosetteSep*[®] Antikörpercocktail, *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation). Der Anspruch an eine geeignete Anreicherungsmethode bestand darin, eine möglichst hohe Wiederfindungsrate zu erzielen. Gleichzeitig sollten störende Einflüsse des jeweiligen Verfahrens auf nachfolgende Analysemethoden zur Charakterisierung der angereicherten putativen CTCs ausgeschlossen werden. Diesen Anforderungen wurde am ehesten die *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation gerecht. Vorteil dieses Verfahrens stellte die von Markerproteinen unabhängige Anreicherung der CTCs dar. Nachteilig war die sehr geringe Konzentration von möglichen CTCs zwischen Millionen von gleichzeitig angereicherten MNC.

Zur Detektion von putativen CTCs zwischen den angereicherten MNC wurde die Expression des glialen Markerproteins GFAP in den angereicherten Zellen untersucht, da dies nicht von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird. Ein zusätzlicher Ausschlussfaktor stellte die Expression von CD45 dar, die mittels Fluoreszenzdoppelfärbung gleichzeitig zur GFAP-Expression an MNC untersucht werden konnte. Da gliale Tumorzellen dieses Protein nicht exprimieren, wurde eine Zelle als mögliche CTC identifiziert, wenn in ihrem Zytoplasma GFAP visualisiert werden konnte, jedoch keine Expression von CD45 vorlag. Die Sensitivität dieser Methode konnte durch die Abwesenheit GFAP-positiver Zellen in Blut gesunder Probanden sowie im Blut von Patienten mit Gehirnmetastasen belegt werden. Insgesamt konnten in 27 von 114 GBM-Patienten putative CTCs identifiziert werden. Der Mittelwert sowie der Median der Anzahl detektierter GFAP-positiver Zellen im jeweiligen Patienten sind in Tabelle 5-1 dargestellt. Wie hoch die GFAP-Konzentration in einer Zelle sein muss, damit sie mit Hilfe der Immunfluoreszenz detektiert werden kann, ist nicht bekannt. Da in einigen GBM-Tumoren eine heterogene GFAP-Expression vorlag, muss davon ausgegangen werden, dass auch CTCs mit schwächerer GFAP-Expression in die Zirkulation gelangen. Die Detektionsrate von CTCs im Blut von GBM-Patienten könnte demnach möglicherweise noch höher sein, als im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit beschrieben, da GFAP schwach exprimierende bzw. GFAP-negative Zellen mit dieser Methode nicht detektiert werden.

Die Voraussetzung aller hier angewandten Methoden zur Einzelzellanalyse ist eine erfolgreiche Amplifikation der gesamten genomischen DNA (WGA) der einzelnen isolierten Zellen. In der vorliegenden Dissertation wurde die Einzelzell-DNA-Amplifikation unter Verwendung des *GenomiPhi-WGA Kits* realisiert. Die DNA-Qualität des Ausgangsmaterials hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität des WGA-Produktes. Die manuelle Detektion und die im Anschluss durchgeführte Isolation der putativen CTCs stellten sich im

Vergleich zu automatisierten Anreicherungs- und Detektionsmethoden als sehr zeitintensiv heraus. Zur Lagerung der angereicherten MNC werden diese auf Objektträgern bei -80 °C aufbewahrt. Dies kann zur Degradation der Einzelzell-DNA führen. Eine Kontamination mit Leukozyten kann einen zusätzlichen Qualitätsverlust des WGA-Produktes bewirken. Für weitere Einzelzellanalysen an CTCs aus dem peripheren Blut von GBM-Patienten müssten in Hinblick auf die etablierte Anreicherungs- und Detektionsmethode weitere Optimierungen durchgeführt werden. So könnten automatisierte Verfahren unter Verwendung zusätzlicher glialer bzw. tumorassoziierter Markerproteine nicht nur die Anzahl an detektierten CTCs in der Blutproben erhöhen, sondern auch eine Steigerung der Qualität des WGA-Produktes durch kürzere Analysezeiten bewirken.

Tabelle 5-1: Mittelwert und Median, errechnet aus der Anzahl detektierter CTCs zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten der untersuchten GBM-Patienten.

Zeitpunkt der Blutentnahme	Anzahl GFAP-positiver Zellen in $2,1 \times 10^6$ MNC		
	Wert	Mittelwert	Median
präoperativ	1 bis 14	4	1
postoperativ	1 bis 22	2,4	2
während der Operation	1 bis 4	3,4	1

5.1.2 Genetische Aberrationen im korrespondierenden Tumorgewebe

Die durch *Next Generation Sequencing* detektierten Mutationen im *MECOM*- und *MYH11*-Gen des Primärtumors von Patient #63 konnten durch Mutationsanalysen mittels Sangerverfahren in der präoperativen CTC 1+2 (*MECOM*-Mutation) bzw. in der postoperativen CTC 3 (*MYH11*-Mutation) bestätigt werden. Gemeinsame aberrante Regionen in den Profilen der CTCs und des Primärtumors von Patient #63 lassen auf den malignen Charakter der analysierten CTCs schließen (Zugewinn von Chr 7, Chr 12; Verlust von Chr 10). Aufgrund der für GBM typischen vorherrschenden Heterogenität der Tumorzellen im Primärtumor ist es durchaus möglich, dass Eigenschaften, die nur wenige Zellen im Tumorgewebe aufweisen (Zugewinn von Chr 3), im CGH-Profil des Primärtumors nicht erkannt werden können, da die DNA-Konzentration dieser Zellen im DNA-Gemisch des Tumorgewebes zu gering ist. Der maligne und gliale Ursprung der detektierten postoperativen CTC des Patienten #3 konnte ebenfalls durch gemeinsame Aberrationen im CGH-Profil des Primärtumors und der CTC bestätigt werden (Zugewinne: Chr 4, Chr 5, Chr 7, Chr 12, Verlust: Chr 22).

Von Patienten #3, #63 sowie dem CTC-positiven Patienten #22 wurden CGH-Profile des Primärtumors erstellt (Abbildung 4-14). In den Primärtumoren konnte durch qPCR eine *EGFR*-Gen-Amplifikation von: Patient #3: 48,51-fach; Patient #22: 488-fach und Patient #63: 1167-fach detektiert werden. Des Weiteren konnte durch CGH-Analysen ein Zugewinn auf Chr 7 in den einzelnen Tumoren verzeichnet werden. Weitere gemeinsame Aberrationen sind Verluste von Chr 10 und Zugewinne von Chr 12. Hierbei handelt es sich um typische genetische Veränderungen in GBM, die mit einer verkürzten Überlebenszeit und einem aggressiveren Tumorzelltyp assoziiert sind.¹²⁵ Im Folgenden werden Einflüsse dieser Aberrationen auf die Disseminierung von GBM-Tumorzellen diskutiert.

5.1.2.1 *EGFR*-Genamplifikation

Eine Amplifikation des *EGFR*-Gens wird in 35-70 % aller GBM detektiert.¹⁸ Diese Tumoren beinhalten zudem in 24-67 % die mutierte Form des *EGFR*-Gens *EGFRvIII*, die durch eine Deletion von Exon 2-7 charakterisiert ist.¹²⁶ In 50 % der Fälle werden die Zugewinne dieses Gens auf extrachromosomalen Fragmenten, den sog. *Double minutes* (Dmin), lokalisiert.¹⁸ Durch experimentelle *in vitro*-Untersuchungen konnten Aberrationen im *EGFR*-Signalweg mit einer gesteigerten Zellteilung sowie einer erhöhten Tumordinvasivität von GBM-Zellen gezeigt werden.¹²⁷ GBM-Zellen mit einer ausgeprägten *EGFR*-Genamplifikation zeigen sich zudem resistent gegen Radio- und Chemotherapie.¹²⁸ Schulte *et al.*¹⁰⁵ konnten belegen, dass aus GBM generierte Zelllinien mit einer hohen *EGFR*-Amplifikation aggressivere Tumoren in Nacktmäusen entwickelten als nicht *EGFR*-genamplifizierte Zelllinien.

Während bei Patienten mit Lungenkarzinom (NSCL = *non small lung cancer*) der Einfluss von *EGFR*-Genamplifikationen auf die Prognose nicht belegt werden konnte,^{129, 130} wurde die *EGFR*-Überexpression im Mammakarzinom im Zusammenhang mit einem aggressiveren Tumortyp beschrieben. Sowohl die *EGFR*-Amplifikation als auch die -Überexpression werden bei dieser Tumorentität mit einer schlechteren Prognose assoziiert.¹²⁵ Die klinische Relevanz einer *EGFR*-Amplifikation oder -Mutation des GBMs ist allerdings unklar. Während einige Studien Aberrationen des *EGFR*-Gens mit einer schlechteren Prognose der Patienten korrelierten,¹³¹ zeigten andere Studien gar keinen oder sogar einen vorteilhaften Einfluss auf den Krankheitsverlauf.¹³² Diese widersprüchlichen Angaben können zum einen in der unterschiedlichen Patientenzahl, zum anderen aber auch durch verschiedene Behandlungsmethoden der einzelnen Studien begründet sein. Zudem wurde der *EGFR*-Status der einzelnen Primärtumoren durch unterschiedliche Methoden, wie *Southern-Blot*, PCR, FISH oder Immunhistochemie bestimmt, wodurch auch die Varianz bezüglich der *EGFR*-Genamplifikation begründet sein könnte.^{18, 133}

Anti-EGFR-Target-Therapien, die erfolgreich in der Behandlung von Mamma-, Lungen- und Prostatakarzinomen eingesetzt werden können, zeigten bei der Behandlung des GBMs nur eine limitierte Effektivität.¹³⁴ Da eine *EGFR*-Genamplifikation verbunden mit der Mutationsvariante *EGFRvIII* einen Angriffspunkt für eine Therapie dieser Tumore bietet, befinden sich zur Zeit diesbezüglich verschiedene Therapien in unterschiedlichen Phasen von klinischen Studien.¹³⁴ Ein Überblick dazu findet sich in Tabelle 5-2.

Tabelle 5-2: Überblick der sich zurzeit in klinischen Studien befindenden *Anti-EGFR-Target-Therapieansätze*.¹³⁴

Therapie	Substanz	Markenname	Target	Firma	Phase der klinischen Studie
monoklonale Antikörper	<i>Cetuximab</i>	Erbitux	<i>EGFR</i>	Merck KGaA	Phase I/II
	<i>Panitumumab</i>	Vectibix	<i>EGFR</i>	Amgen	Phase II
	<i>Nimotuzumab</i>	Theraloc	<i>EGFR</i>	YM BioSciences Inc.	Phase III
	¹²⁵ I-MAb 425		<i>EGFR</i>	Fox Chase Cancer Center	Phase II
	<i>mAb 806</i>	ABT-806	<i>EGFRvIII (schwach EGFR)</i>	Abbott	Phase I
Impfstoff	<i>PEP-3-KLH</i>	CDX-110	<i>EGFRvIII</i>	Celldex Therapeutics	Phase II
Tyrosinkinase-Inhibitoren	<i>Gefitinib</i>	Iressa	<i>EGFR</i>	AstraZeneca Pharmaceuticals	Phase II
	<i>Erlotinib</i>	Tarceva	<i>EGFR/EGFRvIII</i>	Genentech Inc.	Phase II
	<i>Lapatinib</i>	Tykerb	<i>EGFR/HER2</i>	GlaxoSmithKline	Phase I/II

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte eine Assoziation zwischen der Präsenz von CTCs im Blut und einer *EGFR*-Genamplifikation des Primärtumors von GBM-Patienten belegt werden. So konnten CTCs signifikant häufiger in Patienten detektiert werden, die eine *EGFR*-Genamplifikation von >2 im Primärtumor aufwiesen, als in Patienten mit nicht *EGFR*-amplifizierten Tumoren. Die Genamplifikationsrate wurde hierbei mittels qPCR ermittelt. In 18 der 27 Primärtumoren CTC-positiver Patienten konnte zudem die *EGFR*-Amplifikation durch FISH- und/oder immunhistochemische Analysen belegt werden. Interessanterweise wurde im Blut des Patienten #63 mit der höchsten *EGFR*-Genamplifikation des Primärtumors (1167-fache Amplifikation), auch die höchste Anzahl an GFAP-positiven Zellen detektiert. Diese CTCs zeigten allerdings eine sehr heterogene *EGFR*-Amplifikation. Durch qPCR-Analysen konnte in insgesamt 11,8 % der Zellen (2 von 17 Zellen) eine *EGFR*-

Genamplifikation detektiert werden. Durch FISH-Analysen wurden 17,1 % der CTCs als *EGFR*-genamplifiziert gewertet (7 von 41 Zellen). Hierbei zeigte sich außerdem, dass die meisten CTCs eine Polysomie von Chr 7 aufweisen.

Da in der Patientenkohorte der vorliegenden Studie bei keinem Patient systemische Metastasen diagnostiziert wurden, können keine Aussagen zur Relevanz einer *EGFR*-Genamplifikation für die Metastasierung des GBMs getroffen werden. Der untersuchte Primärtumor des Patienten mit metastasierten Astrozytom zeigte eine schwache heterogene *EGFR*-Expression. Aussagen zur *EGFR*-Expression bzw. -Amplifikation des korrespondierenden Metastasengewebes konnten aufgrund des limitierten Untersuchungsmaterials nicht getroffen werden. Das aCGH-Profil der isolierten DNA des Metastasengewebes wies keine Zugewinne auf Chr 7 auf. In den wenigen in der Literatur beschriebenen fernmetastasierten GBM-Fällen wurden nur vereinzelt Untersuchungen zum *EGFR*-Status des Primärtumors oder der korrespondierenden Metastase durchgeführt. In Tabelle 5-3 sind einzelne Literaturangaben zum *EGFR*-Status aufgeführt. Hierbei widersprechen sich die immunhistologischen Ergebnisse bezüglich der *EGFR*-Amplifikation des Primärtumors- und der Metastase. Während Zhen *et al.*¹³⁵ eine Zunahme der *EGFR*-Expression vom Primärtumor zur Metastase beobachteten, verzeichneten Senetta *et al.*¹³⁶ eine Abnahme der *EGFR*-Expression zwischen Primärtumor und Metastase.

Tabelle 5-3: Vergleich zweier Veröffentlichungen zur immunhistochemischen Analyse der *EGFR*-Expression im GBM-Primärtumor und in der korrelierenden Metastase.^{135, 136}

Autor	immunhistologische Analyse der <i>EGFR</i> -Expression		
	Primärtumor	Rezidiv	Metastase
Zhen <i>et al.</i> 2009 ¹³⁵	schwach positiv	positiv	Hals und Lymphknoten stark positiv
Senetta <i>et al.</i> 2009 ¹³⁶	Fall 1: positiv	Fall 1: n.a.	Fall 1: negativ
	Fall 2: positiv	Fall 2: k.A.	Fall2: negativ

Der Zusammenhang zwischen einer *EGFR*-Genamplifikation im GBM und dem Metastasierungspotential bleibt demnach aufgrund fehlender Daten unklar. Bei Mammakarzinompatientinnen konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die *EGFR*-Überexpression in Gehirnmetastasen höher ist als im korrespondierenden Primärtumor. Gaedcke *et al.* 2007¹³⁷ detektierten eine *EGFR*-Überexpression in 15-20 % der Primärtumoren und in 41 % der Gehirnmetastasen.¹³⁷ Wikman *et al.*¹³⁸ konnten durch CGH-Analysen einen Gewinn von Chromosom 7 in 70 % der untersuchten Gehirnmetastasen belegen, während die korrespondierenden Primärtumoren diesen Zugewinn in nur 3-13 % der Fälle aufwiesen.¹³⁸ Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *EGFR*-genamplifizierte bzw. -überexprimierende

Tumorzellen in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu durchbrechen. Bei Brustkrebspatienten können so Hirnmetastasen mit einer EGFR-Überexpression bzw. –Amplifikation detektiert werden. Beim GBM wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer *EGFR*-Genamplifikation des Primärtumors und der Präsenz von CTCs im Blut dieser Patienten ermittelt. Werden neue GBM-Fälle mit systemischer Metastasierung diagnostiziert, sollte eine Untersuchung des Tumorgewebes hinsichtlich des *EGFR*-Status einbezogen werden, um den über CTCs postulierten Zusammenhang zwischen EGFR-Überexpression oder –Genamplifikation und Metastasierung weiter untermauern zu können.

5.1.2.2 Verlust von Chromosom 10

In jedem CGH-Profil der analysierten Primärtumoren CTC-positiver Patienten konnte ein Verlust von Chr 10 beobachtet werden. Bei Patient #63 wurde dieser Verlust auch in den präoperativen sowie postoperativen CTCs detektiert. Der Verlust von Chr 10, auf welchem das Tumorsuppressor-Gen *PTEN* lokalisiert ist, ist die häufigste genetische Veränderung in GBM, deren Auswirkung derzeit noch weitestgehend unklar ist. Der Verlust von *PTEN* resultiert in einer Akkumulation von PIP₃, welches den PI3k/Akt Signalweg aktiviert und dadurch die Tumorgenese durch eine Induktion des Zellzyklus induziert. Zudem werden die Invasion der Zellen in umliegendes Gewebe und der Verlust der Apoptose dieser Zellen unterstützt.¹³⁹

Auch hier gibt es verschiedene Studien, die eine schlechtere Prognose für Patienten mit einem Verlust von Chr 10 belegen.¹⁴⁰ Andere Studien beschreiben hingegen keinen Einfluss auf das Überleben dieser Patienten.¹⁴¹ Weiterhin konnte dieser Verlust eher in älteren Patienten mit einem Alter von über 45 Jahren festgestellt werden,¹⁴² was auch dem Alter der hier untersuchten Patienten entspricht (Patient #3: 64 Jahre, Patient #22: 83 und Patient # 63: 63 Jahre). Neueste Studien zeigen, dass die schlechtere Prognose der Patienten durch eine sensitivere Reaktion der GBM-Zellen mit einem Chr10-Verlust auf eine chemotherapeutische Behandlung mit *Temozolomid* (TMZ) wieder aufgehoben werden kann.¹³⁹ Die Gabe von *Temozolomid*, verbunden mit einer Radiotherapie, stellt derzeit die adjuvante Standardbehandlung des GBMs dar. Hierbei handelt es sich um einen Wirkstoff, der durch Methylierung die Tumorzell-DNA zerstört und somit zum Zelltod führt.³⁵ Yadav *et al.*¹⁴³ postulierte einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Zugewinn des *EGFR*-Gens und dem Verlust von Chr10. Basierend auf integrativen Analysen konnte *Annexin A7* (*ANXA7* auf 10q21.1–q21.2), welches bereits in Mamma- und Prostatakarzinomen als Tumorsuppressor-Kandidat diskutiert wird, detektiert werden. Durch die Abwesenheit von *ANXA7* aufgrund des Verlustes von Chr10 könnte der EGFR-Signalweg positiv reguliert werden.^{143, 144} Dieses

Zusammenspiel könnte zudem die Disseminierung von Tumorzellen und den Transport in den extrakraniellen Bereich des Patienten begünstigen.

5.1.2.3 Zugewinn von Chromosom 12

Auch die Zugewinne auf Chr 12 stellen eine häufige Aberration in GBMs dar.¹⁴⁵ Oft sind diese in Tumoren zu finden, die sich gegen eine Radiotherapie als resistent erweisen.¹⁴⁶ Obwohl die Genamplifikation auf Chr 12q13–15 untersucht wurde, ist sehr wenig über die Amplifikationen speziell im GBM bekannt.¹⁴⁷ Während die Überexpression des auf Chr 12 lokalisierten MDM2 als negativer Regulationsmechanismus der TP53-vermittelten Apoptose bekannt ist, unterstützt Rab1B, welches als positiver Regulator der Angiogenese agiert, eventuell die in Gliomen oft beobachtete Vaskularisierung.¹⁴⁸ Eine Assoziation zwischen einer schlechteren Prognose und dem Zugewinn von Chr 12q konnte bereits bei Patienten mit Fibrosarkomen und Insulinomen gezeigt werden.¹⁴⁷ Da diese Aberration im CGH-Profil der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Primärtumoren identifiziert werden konnte, besteht eine mögliche Assoziation zur Disseminationsfähigkeit der Tumorzellen.

5.1.2.4 Mutationen im TP53-Gen

Mutationen im *TP53*-Gens spielen im primären GBM eine untergeordnete Rolle. Im sekundären GBM treten *TP53*-Mutation allerdings aufgrund der malignen Progression aus einem niedriggradigen Astrozytomen in bis zu 60 % der Fälle auf.¹⁴⁹ Durch PCR-Analysen aus Lysaten von Tumorgewebe wurde gezeigt, dass *EGFR*-Genamplifikationen und *TP53*-Mutationen sich häufig gegenseitig ausschließen.¹⁵⁰ Eine biologische Erklärung dieser Theorie konnte allerdings nicht gegeben werden. In anderen Tumorentitäten wird die aberrante Ko-Expression von TP53 und EGFR mit höhergradigen Tumoren assoziiert.¹⁵¹

In der vorliegenden Arbeit wurden Primärtumor-Paraffinschnitte der untersuchten Patienten mittels Immunhistochemie auf eine aberrante TP53-Expression untersucht. Hierbei konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer erhöhten TP53-Expression, die häufig mit einer *TP53*-Genmutation assoziiert ist, und der Präsenz von CTCs festgestellt werden. Mutationen im *TP53*-Gen konnten in einer postoperativ detektierten CTC von Patient #22 und in einer präoperativ detektierten CTC des Patienten #63 gezeigt werden. Beide Patienten verfügen über die höchsten *EGFR*-Amplifikationsraten in der untersuchten Patientenkohorte. Diese Mutationen liegen zwar nicht in den *HotSpot*-Regionen des *TP53*-Gens, wurden aber bereits in der *COSMIC*-Datenbank mit dem Astrozytomen Grad IV assoziiert (Zelle 1 von Patient #22: Codon 213 G>C, Zelle 6 von Patient #63: Codon 235 A>G).¹⁵² Allerdings konnte in Lysaten

des Primärtumors keine dieser Mutationen detektiert werden. Die fehlende Detektion dieser Mutationen in den korrespondierenden Primärtumoren könnte durch die starke Heterogenität der Primärtumoren und dem damit verbundenen Vorliegen einer Minderheit an *TP53*-mutierten Zellen begründet sein. Weitere Analysen des Primärtumors mittels *Next generation Sequencing* könnten helfen, diese *TP53*-mutierten Zellen aufzuspüren.

5.1.3 Heterogenität der GFAP-Expression im Primärtumor CTC-positiver Patienten

Der Ursprung von GBM-Zellen wird oft als „epithelial“ bezeichnet. Das Nervensystem, aus dem diese Tumoren entstehen, zeigt allerdings keine klassische epitheliale Struktur. Eine genauere Beschreibung lässt der Begriff „neuroepithelial“ zu. Eine Eigenschaft von GBM-Zellen ist die außergewöhnliche Tendenz der Infiltration in das umgebende Parenchym, die durch eine Herabregulation der Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle begünstigt wird.¹⁵³ Hierbei ist der Vorgang einer epidermalen-mesenchymalen Transition denkbar. Die Untersuchung von Zellen in verschiedenen Tumorbereichen zeigte, dass invasive Zellen einen anderen Phänotyp besitzen als Zellen, die sich im Zentrum des Tumors befinden. Außerdem weisen diese unterschiedlich lokalisierten Zellen verschiedene Eigenschaften bezüglich der Migrations- und Proliferationsrate auf. Zellen im Tumorzentrum sind in der Lage schneller zu proliferieren als diejenigen, die sich an der Invasionsfront des Tumors befinden. Invasive Zellen weisen hingegen eine höhere Mobilität auf. Nach dieser Theorie würden sich Zellmigration und –proliferation gegenseitig ausschließen. Ähnlich wie bei der epithelialen-mesenchymalen Transition nehmen die invasiven Tumorzellen einen Stammzellcharakter an. In der hier vorliegenden CTC-Studie konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Herabregulation des glialen Markerproteins GFAP in den Zellen des Primärtumors und der Präsenz von CTCs im Blut von GBM-Patienten festgestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen einer heterogenen GFAP-Expression und der damit verbunden erhöhten Aggressivität von Tumorzellen wurde bereits beschrieben.¹⁵⁴ Dieser Vorgang der Disseminierung von Tumorzellen könnte daher mit einer epidermalen-mesenchymalen Transition assoziiert sein. Genau wie bei der epithelialen-mesenchymalen Transition würden die Tumorzellen epidermale Charakteristika verlieren und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Belege dafür stellt beispielsweise die detektierte Überexpression von YKL-40, TNC, Osteonectin und CD104 in primären Glioblastomen dar. Hierbei handelt es sich um Onkogene, die mit mesenchymalen, jedoch nicht mit neuralen Geweben assoziiert sind. Des Weiteren ist eine Vielzahl von Mesenchym-assoziierten Genen auf Chr 7 lokalisiert. Durch den in GBM häufig verzeichneten Zugewinn von Chr 7 werden diese Gene hochreguliert.¹⁵⁵ Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Detektionsrate von CTCs im Blut von

GBM-Patienten noch höher sein könnte als im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit beschrieben, da sich eine weitaus höhere Anzahl an CTCs im Blut der GBM-Patienten befunden haben könnte, die aufgrund der Wahl des Markerproteins GFAP nicht detektiert werden konnten (siehe Kapitel 5.1.1).

5.1.4 Extrakraniale Metastasen

Trotz der hohen Disseminierungsrate der GBM-Tumorzellen innerhalb des Gehirns⁵ werden systemische Metastasen bei Patienten mit Gliomen relativ selten diagnostiziert. Lediglich in 0,4 bis 0,5 % der GBM-Patienten entwickeln sich extraneurale Metastasen, die vorrangig im Skelettsystem, in Lunge, Leber und Niere lokalisiert sind.³² Das häufige Auftreten von Lungenmetastasen weist dabei auf den hämatopoetischen Weg der Disseminierung hin,⁴⁰ der durch die in der vorliegenden Arbeit detektierten CTCs im Blut von GBM-Patienten bestätigt wird. Ob die detektierten CTCs tatsächlich in der Lage sind, extrakraniale Metastasen zu bilden, bleibt allerdings unklar. Für genauere Analysen müssten molekularbiologische Eigenschaften des Primärtumors und der CTCs mit denen der Metastase verglichen werden, um eventuelle Gemeinsamkeiten aufzeigen zu können. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit in keinem GBM-Patient Metastasen diagnostiziert wurden, konnten derartige Untersuchungen nicht durchgeführt werden.

Die nicht signifikant unterschiedliche CTC-Anzahl im prä- und postoperativen Blut lässt die Schlussfolgerung zu, dass die putativen CTCs nicht durch die chirurgische Manipulation am Tumorgewebe in die Zirkulation gelangt sind. Damit eine systemische Streuung der GBM-Zellen stattfinden kann, müssen diese Tumorzellen in der Lage sein, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Die hohe Aggressivität und Invasivität von *EGFR*-amplifizierten Tumorzellen innerhalb des Gehirns wurde bereits diskutiert. Die Lokalisation *EGFR*-amplifizierter Zellen an der Invasionsfront des Tumors⁵ lässt vermuten, dass diese Zellen einen großen Beitrag bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke leisten. Die Detektion von *EGFR*-überexprimierenden Zellen in Gehirnmetastasen von Mammakarzinompatientinnen¹³⁸ unterstützt diese Theorie. Auch die, in der vorliegenden Arbeit gezeigte, signifikante Korrelation zwischen einer *EGFR*-Genamplifikation des Primärtumors und der Präsenz von CTCs im Blut von GBM-Patienten, weist auf den Einfluss der *EGFR*-Genamplifikation in Tumorzellen zur Fähigkeit der Überwindung der Blut-Hirnschranke hin.

Warum die Metastasierung in GBM-Patienten so selten zu beobachten ist, bleibt unklar. Hierbei könnte die kurze Überlebenszeit der Patienten eine Rolle spielen.⁴⁴ Zum anderen könnte die geringe Metastasierungsrate durch fehlendes Wachstumsvermögen aufgrund eines dafür ungeeigneten Mikromilieus im extrakraniellen Raum des Patienten verursacht werden.

Außerdem könnte die fehlende Metastasierung durch eine Abwehr dieser CTCs durch das Immunsystem des Patienten begründet sein. Ein Indiz dafür stellt die Transmission von GBM-Tumoren infolge von Organtransplantationen von Spenderorganen aus GBM-Patienten dar, da hierbei die Immunabwehr des Empfängers massiv unterdrückt wird. Die CTCs könnten im extrakranialen Bereich des Spenders durch Dormanz überleben und durch die Überführung eines Organs in den Empfängerorganismus eine Proliferation dieser Zellen herbeiführen. In der Organtransplantation ist dieses Thema bereits aktuell. In diesem Zusammenhang wird davon ausgegangen, dass bis zu 25 % der Patienten GBM-Zellen übertragen könnten.¹²⁴ Aus diesem Grund wird von der Verwendung von Organen aus verstorbenen GBM-Patienten als Spenderorgan abgeraten.⁵⁴ In Tabelle 5-4 findet sich ein Überblick der einzelnen Organisationen, die Organspenden koordinieren und den hierbei beobachteten Gehirntumortransmissionen.

Tabelle 5-4: Organtransmissionen bei unterschiedlichen Organisationen, die Organspenden koordinieren.¹⁵⁶

	UNOS	UNOS	Hornik <i>et al.</i> ¹⁵⁷	IPTR	ANZODOR
Jahr	2007	2000	2003	2001	1998
Gesamtanzahl Donatoren	39455	14705	32	17000	1781
Organe von Donatoren mit Hirntumoren	642	188	32	62	96
Tumortransmissionen	3	0	0	14	0
betrachteter Zeitraum	5 Jahre	2 Jahre	14 Jahre	32 Jahre	8 Jahre

UNOS = *United Network of Organ Sharing*

IPTR = *Israel Penn Transplant Tumor Registry*

ANZODOR = *Australia and New Zealand combined Dialysis and Transplant Registry*

Wie in Tabelle 5-4 zu erkennen, gibt es nur wenige Berichte zu GBM-Tumortransmissionen. Deshalb wird die Verwendung von Organen verstorbener GBM-Patienten immer noch kontrovers diskutiert.⁵⁴

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Präsenz von CTCs im Blut von GBM-Patienten bewiesen werden. Die prognostische Relevanz diese Zellen ist zurzeit noch nicht bekannt, da die Patienten nur eine sehr kurze Überlebenszeit aufweisen. Trotzdem schreitet die Entwicklung neuer Therapien weiter voran, sodass bei längerer Überlebenszeit auch die klinische Relevanz von CTCs in GBM-Patienten zunehmen könnte. Durch die Detektion von CTCs könnten zudem Patienten mit einer diagnostizierten, systemischen Streuung identifiziert werden und weiterhin als Organdonatoren ausgeschlossen werden. Dadurch könnten Organe

von verstorbenen GBM-Patienten trotzdem zur Organtransplantation zugelassen werden, während gleichzeitig das Risiko eine Tumortransmission gesenkt werden würde.

5.1.5 Fehlender Nachweis von CTCs im Blut eines Patienten mit metastasiertem Astrozytom

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde das periphere Blut des Patienten G10 mit metastasiertem, anaplastischem Astrozytom Grad III auf die Präsenz von CTCs untersucht. Genau wie bei GBM-Patienten findet eine Metastasierung des Astrozytom Grad 3 sehr selten statt⁴³. Ein Jahr nach der Resektion des Primärtumors wurden bei diesem Patienten Metastasen im Beckenkamm, im Sternum und der Wirbelsäule detektiert. Zur Detektion von CTCs wurde diesem Patienten nach der Diagnose der systemischen Metastasen peripheres Blut entnommen und auf die Präsenz von Zellen, die gliale bzw. tumorassoziierte Markerproteine (GFAP, EGFR, TP53, CD 147) exprimieren, untersucht. Allerdings konnten keine CTCs im Blut des Patienten detektiert werden.

Die Abwesenheit von CTCs im Blut dieses Patienten G10 könnte durch den Abnahmezeitpunkt der Blutprobe begründet sein. Die Resektion des Primärtumors lag hierbei bereits ein Jahr zurück und der Patient wurde in der Zwischenzeit einer Radiotherapie unterzogen. Da in den hier untersuchten GBM-Patienten CTCs sowohl in der prä- als auch in der postoperativen Blutprobe detektiert werden konnten, liegt eine im Krankheitsverlauf sehr früh beginnende Disseminierung der Tumorzellen aus dem Gehirn in die Peripherie des Patienten nahe. Die Existenz von Knochenmarkmetastasen lässt auf eine hämatopoetische Streuung der Tumorzellen schließen.⁴³ Zum Zeitpunkt der Diagnose der Metastasen konnte kein intrakraniales Rezidiv im Patienten detektiert werden. Eine Zirkulation von Tumorzellen des Primärtumors war somit unterbunden. Da die histopathologischen Befunde der einzelnen Biopsien keine signifikanten phänotypischen Unterschiede aufwiesen, muss eine gleichzeitige Entwicklung dieser Metastasen im Patienten vor, bzw. kurz nach der Tumorsektion stattgefunden haben. Die Anzahl der CTCs im Blut des Patienten könnte im weiteren Krankheitsverlauf durch die Resektion des Primärtumors stark abgenommen haben. Zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme wären damit eine sehr geringe Anzahl an CTCs im Blut durch diesen Umstand zu erklären. Sollte eine sekundäre Metastasierung ausgehend von den Knochenmetastasen stattgefunden haben, so wäre eine epidermale-mesenchymale Transition dieser Zellen denkbar. Die hier verwendeten Markerproteine ließen jedoch keine Detektion von CTCs in diesem Patienten zu.

5.2 Kultivierung von Tumorzellen von Karzinompatienten

5.2.1 Kultivierung von CTCs/DTCs aus Blut- und Knochenmarkproben von Karzinompatienten

Nach der Detektion und molekularen Einzelzellanalyse von CTCs/DTCs gewinnt die funktionelle Analyse dieser Zellen immer mehr an Bedeutung. Bisher gibt es nur sehr wenig Berichte zur erfolgreichen *ex vivo*-Vermehrung und funktionellen Charakterisierung dieser Zellen. Eine kurze Zusammenfassung der zur Kultivierung von DTCs/CTCs vorliegenden Veröffentlichungen findet sich in Tabelle 5-5. Pantel *et al.*⁸⁰ gelang die Etablierung mehrerer DTC-Zelllinien. Die Immortalisierung dieser Zelllinien wurde mit Hilfe der SV40-Transformation durchgeführt. Solakoglu *et al.*¹⁵⁸ konnten bei der Kultivierung MNC aus Knochenmarkproben von Karzinompatienten (Mamma-, Prostata-, Kolon- und Nierenkarzinom) unter identischen Wachstumsbedingungen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einer starken *in vitro*-Proliferation Zytokeratin-positiver DTCs mit einer schlechteren Prognose für diese Patienten ermitteln. Zhang *et al.*⁸² etablierte Zelllinien aus CTCs dreier Mammakarzinompatientinnen. Die maligne Abstammung dieser Zellen vom jeweiligen Mammakarzinom konnte bei jeder der drei Zellpopulationen gezeigt werden. Die phänotypischen Eigenschaften dieser kultivierten Zellen sollen im Folgenden Diskussionsgegenstand sein. Pretlow *et al.*¹⁵⁹ und kürzlich Baccelli *et al.*¹⁶⁰ konnten die Metastasen initiiierende Fähigkeit von CTCs beweisen, indem sie angereicherte CTCs aus dem peripheren Blut von Karzinompatienten direkt in die Maus injizierten. Diese wiesen nach 6-12 Monaten Metastasen in Knochen, in der Lunge und in der Leber auf. Baccelli *et al.*¹⁶⁰ bestimmten zusätzlich den Phänotyp dieser metastasierenden Zellen, welche im weiteren Verlauf beschrieben und diskutiert werden. Eine Langzeitkultivierung von CTCs konnte allerdings in keiner der beiden zuletzt genannten Studien gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten weitere Zelllinien ausgehend von DTCs/CTCs aus Blut- bzw. Knochenmarkproben von Karzinompatienten etabliert werden. Hierfür wurden die von Pantel *et al.*⁸⁰ eingesetzten Kultivierungsmethoden modifiziert. Eine Anreicherung der zur Kultivierung vorgesehenen Zellen fand mit Hilfe der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation statt. Insgesamt konnten 217 Blut- bzw. Knochenmarkproben in Kultur genommen und unter verschiedenen Kulturbedingungen verfolgt werden. Hierbei konnte eine Tumorzellproliferation in den Kulturansätzen zweier Blut- sowie zweier Knochenmarkproben verschiedener Patienten beobachtet werden. Allerdings war es aufgrund von Kontaminationen oder durch den Verlust der Proliferation nicht möglich, aus diesen Zellen eine Zelllinie zu generieren. Im folgenden Abschnitt werden unterschiedliche Aspekte zur fehlenden Proliferation der CTCs und DTCs vergleichend mit den aufgeführten veröffentlichten Studien (Tabelle 5-5) diskutiert.

Tabelle 5-5: Übersicht Veröffentlichungen zur Vermehrung von CTCs/DTCs. ^{80, 82, 159, 160}

Veröffentlichung	Pantel <i>et al.</i> ⁸⁰	Zhang <i>et al.</i> ⁸²	Bacelli <i>et al.</i> ¹⁶⁰	Pretlow <i>et al.</i> ¹⁵⁹
Kultivierte Zellen	DTCs	CTCs	CTCs	CTCs
Art der Biopsie	Knochenmark	peripheres Blut	peripheres Blut	peripheres Blut
Anzahl der Patientenproben	152	3	350	14
Tumorentität ($n_{\text{Proliferiert}}/n_{\text{gesamt}}$)	Prostata (22/44) Nieren (7/14) Mamma (3/14) Lungen (3/41) Colorektal (2/39)	Mamma (3/38)	Mamma (4/350)	Prostata (2/11) Colon (1/3)
Anreicherungs- methode	<i>Ficoll</i>	<i>Ficoll</i> +FACS	RosetteSep	Zentrifugation+Ma- trigel
Expansion in	Kulturschale	Kulturschale	Maus	Maus
Phänotyp	CK2 ⁺ A45/BB3 ⁺	ALDH ⁺ , CK5/6/18 ⁺ , EpCAM ⁺ , CD24 ^{schwach} /CD4 4 ⁺ Vimentin ⁺ Twist ⁻	EpCAM ⁺ CD44 ⁺ CD47 ⁺ MET ⁺	k.a.
Besonderheit	Immortalisierung mit SV40	-	-	-
Ausgangszellzahl der kultivierten Zellen	< 10 Tumorzellen in 8x10 ⁵ MNC	k.a.	> 1100 CTCs/10 mL Blut	< 20 Tumorzellen pro Injektion
Subkultivierung	Langzeit- kultivierung (bis zu Passage 80)	Langzeit- kultivierung (>20 Passagen)	-	-

$n_{\text{Proliferiert}}$ = Anzahl der Proben, in den Tumorzellen proliferiert sind; n_{gesamt} = Gesamtanzahl Proben

5.2.1.1 Anreicherungs-methode und Anfangszelldichte der zu kultivierenden CTCs

Die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Kultur von Primärzellen ist eine hohe Anfangszelldichte der zu kultivierenden Zellen.¹⁶¹ Bereits 1974 erschien eine Veröffentlichung von Nirmal *et al.* ¹⁶², in welcher der Einfluss der Zellzahl auf Wachstum und Proliferation von epithelialen Tumorzellen untersucht wurde. Hierbei wurde gezeigt, dass bereits bei einer Zelldichte $\leq 1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ausgesäte Zellen keinen konfluenten *Monolayer* mehr bilden können.¹⁶²

In der vorliegenden Arbeit wurden MNC aus dem Blut bzw. Knochenmark mit Hilfe der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation zur anschließenden Kultivierung angereichert. Parallel zum Kulturansatz wurden CTCs aus den Blutproben von Mammakarzinompatientinnen über das *CellSearch*TM-System isoliert, wodurch die Anzahl der EpCAM-positiven CTCs in der jeweiligen in Kultur genommenen Blutprobe bestimmt werden konnte. Die maximale Tumorzellzahl in den kultivierten Blutproben lag bei 355 Tumorzellen/7,5 mL Blut. Durch die geringere Wiederfindungsrate (70 %) der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation liegt die maximale Tumorzellzahl in den Kulturansätzen lediglich bei etwa 250 Zellen/25cm².

Durch die Verwendung von konfluenten *Feederlayern* in Primärkulturen konnte bereits bei vielen Tumorentitäten ein besseres Wachstum der Tumorzellen erreicht werden.¹⁶³ Begründet durch die sehr geringe Anzahl an Tumorzellen könnte die Abwesenheit von Kontakten zwischen den Zellen für das fehlende Wachstum verantwortlich sein. Bestimmte Wachstumsfaktoren, die eine Anheftung und Proliferation von Tumorzellen unterstützen, könnten im Nährmedium daher fehlen. Deshalb wurde der Einsatz von *Feeder*-Zellen getestet, um den von CTCs/DTCs benötigten Zellkontakt bereitzustellen. Zusätzlich könnten eventuell toxische Zellreste von diesen *Feederlayer*-Zellen verdaut werden.¹⁶⁴ Außerdem sollte durch den Einsatz der *Feederlayer* ein Wachstum der Stromazellen aus der Blut- bzw. Knochenmarkprobe unterbunden werden.¹¹² Die Überlebenszeit bzw. die Inaktivierung der *Feederlayer*-Zellen durch *Mitomycin* reichte jedoch nicht aus, um ein Wachstum der Tumorzellen zu unterstützen. Die wenigen CTCs und DTCs benötigten eventuell eine längere Adaptionszeit an ihre Umgebung.

Die erfolgreiche Proliferation von DTCs/CTCs bei einer sehr geringen Zelldichte von <10-20 Tumorzellen pro Probe durch Pantel *et al.*⁸⁰ und Pretlow *et al.*¹⁵⁹ zeigt, dass die Proliferation einer geringen Anzahl von Tumorzellen generell möglich ist. Viel entscheidender als die Tumorzellzahl scheint die Präsenz von Tumorzellklonen zu sein, welche Eigenschaften besitzen, die sie befähigen sich im Umfeld der mesenchymalen Knochenmarkzellen durchsetzen zu können. Bei Baccelli *et al.*¹⁶⁰ konnte eine erfolgreiche Proliferation von CTCs im Mausmodell erst ab einer Tumorzelldichte von ca. 1000 CTCs/10 mL Blut realisiert werden. Die Autoren postulierten jedoch, dass nur eine kleine Subpopulation dieser CTCs in der Lage ist, Metastasen zu bilden.¹⁶⁰ In der Studie von Zhang *et al.*⁸² werden keine Angaben zur Ausgangszellzahl gemacht. Dadurch, dass CTCs sowohl mit Hilfe der *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation als auch durch das FACS-System angereichert wurden, muss in den Blutproben eine ausreichend hohe Anzahl an proliferationsfähigen CTCs vorgelegen haben. Interessant ist die fehlende EpCAM-Expression der etablierten Zelllinien. So haben vermutlich nicht nur die Ausgangszellzahl der CTCs/DTCs einen Einfluss auf die *in vitro*-Proliferation der Zellen, sondern auch ihre phänotypischen und genotypischen Charakteristika. So scheinen z.B. die Expression von Stammzellmarkern oder eine fehlende Expression von epithelialen Markerproteinen hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese Eigenschaften werden im folgenden Kapitel ausführlicher diskutiert.

5.2.1.2 Charakteristika der CTCs/DTCs

Im letzten Jahrzehnt gewann das Thema der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) in Bezug auf die Metastasierung zunehmend an Bedeutung.^{3,62} Hierbei handelt es sich um einen

biologischen Prozess, welcher die Interaktion einer polarisierten, epithelialen Zelle mit ihrer basalen Wachstumsoberfläche durch verschiedene biochemische Veränderungen einstellt. Dadurch nimmt diese Zelle einen mesenchymalen Phänotyp, verbunden mit stärkeren migratorischen und invasiven Eigenschaften sowie Apoptose-Resistenz, an. Der Vorgang der EMT mündet in der Formation einer Zelle mit mesenchymalen Eigenschaften, welche die Zelle dazu befähigt, aus ihrem epithelialen Ursprungsgewebe zu migrieren.⁵⁹ Neben der sehr geringen Ausgangszellzahl von CTCs/DTCs in der zu kultivierenden Probe sind phänotypische Eigenschaften dieser Tumorzellen in Bezug auf ihr Migrations- und Proliferationspotential von großer Bedeutung. Bisher konnte nicht belegt werden, dass EpCAM exprimierende CTCs in der Lage sind, in entfernten Organen von Patienten Metastasen zu bilden. Es konnte lediglich das Vorhandensein von EpCAM-positiven CTCs im Blut mit einer schlechteren Prognose für den Patienten korreliert werden.⁷² Baccelli *et al.*¹⁶⁰ konnten erstmalig unter EpCAM-positiven CTCs aus Mammakarzinompatientinnen eine Zellsubpopulation identifizieren, die in der Lage ist, nach ihrer Injektion in den Femur der Maus Metastasen in Knochen, der Lunge und der Leber zu bilden. Diese Subpopulation ist durch Stammzeleigenschaften charakterisiert, zu denen die Expression der Stammzellmarker CD44, CD47 und MET gehört. Diese Oberflächenmarker konnten zusätzlich mit einer schlechteren Prognose dieser Patientinnen assoziiert werden. Baccelli *et al.*¹⁶⁰ schließen des Weiteren nicht aus, dass es im Blut von Mammakarzinompatientinnen weitere metastasenbildende Zellklone gibt, die durch das *CellSearch*TM-System aufgrund einer fehlenden EpCAM-Expression nicht identifiziert werden konnten.¹⁶⁰ Auch für die von Zhang *et al.*⁸² aus CTCs etablierten Zelllinien konnten anhand der Expression verschiedener Stammzellmarker ein stammzellartiger Phänotyp (ALDH⁺, CK5/6/18⁺, EpCAM⁻, CD24^{schwach}/CD44⁺, Vimentin⁺) nachgewiesen werden.⁸²

In den Patientenproben, die in der vorliegenden Arbeit kultivierbare, proliferierende Tumorzellen aufwiesen, konnten vor der Kultivierung keine Zellen mit epithelialen Markerproteinen (EpCAM, A45/BB3) identifiziert werden. Während der Kultur dieser Proben konnten jedoch EpCAM- und Keratin-exprimierende Zellen detektiert werden. Diese proliferierenden Zellen könnten vor der Kultur einen mesenchymalen Phänotyp aufgewiesen haben, und dadurch der, auf epithelialen Markern basierenden, Detektion entgangen sein. Während der Kultur unter dem Einfluss von FCS könnten diese Zellen durch MET (mesenchymale-epitheliale Transition) ihren epithelialen Phänotyp wieder erlangt haben. Hierzu wurde beschrieben, dass FCS MET-fördernde Faktoren, wie TGF- β 1 und 2 beinhaltet.¹⁶⁵ Der Grund für die in dieser Arbeit sehr geringe Proliferation von Tumorzellen in den kultivierten Proben (4/217 Blut- bzw. Knochenmarkproben) könnte im überwiegendem mesenchymalen Phänotyp der CTCs/DTCs unter den Kulturbedingungen liegen, welcher u.a. durch eine reduzierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen die Ausbildung von

Zellverbänden verhindert. Evdokimova *et al.* konnte an Mammakarzinomzelllinien zeigen, dass Proteine, die während der EMT hoch reguliert werden, die Zellproliferation inhibieren und die Mobilität und Invasivität der Zellen fördern (z.B. YB-1).¹⁶⁶ Müller *et al.*¹⁶⁷ konnte an CTCs aus dem Blut von Mammakarzinompatientinnen eine fehlende Expression von Ki-67 belegen. Während dieser Proliferationsmarker von den in der G₁-Phase befindlichen Zellen exprimiert wird, kann dessen Expression in der G₀-Phase des Zellzyklus nicht detektiert werden.¹⁶⁷ Demnach sind CTCs mit Stammzeleigenschaften proliferationsinaktiv.

Des Weiteren ist es möglich, dass sich die zu kultivierenden CTCs/DTCs in der sogenannten Dormanz befanden. Hierbei handelt es sich um einen Ruhezustand, in dem diese Zellen über Jahre bis Jahrzehnte im Körper des Patienten überleben können.^{168, 169} Zielorgan für DTCs verschiedener epithelialer Tumorentitäten scheint das Knochenmark zu sein.^{170, 171} Dormante Zellen zeichnen sich durch den Verlust von Proliferation und Apoptose aus, wobei sie sich in der Ruhephase, der G₀-Phase, des Zellzyklus befinden.^{158, 172} Sobald sich das Mikromilieu oder die Genexpression dieser Zellen ändert, beginnt die Tumorzelle zu proliferieren. Dies wird durch wachstumsstimulierende und -inhibierende Faktoren, die durch das Mikromilieu, Immunzellen aber auch durch die Tumorzelle selbst sekretiert werden, stimuliert.^{172, 173} Zur Zeit ist nur sehr wenig über die nötigen Mechanismen und Konditionen bekannt, die einen Wechsel der Zelle von der dormanten in die aktive Phase verursachen und damit die Voraussetzungen für die Metastasierung schaffen.¹⁷⁴ Dennoch wurden Komponenten, wie Fibronectin sowie das extrazelluläre Matrixprotein Collagen Typ I, mit dem Übergang der Tumorzelle aus dem dormanten Zustand zum metastatischen Wachstum in Verbindung gebracht.¹⁷²

5.2.1.3 Optimierung des Kulturmediums und der Kulturbedingungen

Ziel weiterer Kulturoptimierungen sollte es daher sein, dem Kulturmedium transitionsfördernde Substanzen, wie TGF- β 1 und 2, Fibronectin oder Collagen Typ I zuzusetzen, um eine Proliferation der CTCs/DTCs zu begünstigen. Um die Wachstumsbedingungen der CTCs/DTCs zellzyklusabhängig zu optimieren, könnte der Zusatz verschiedener Reagenzien zum Kulturmedium in Betracht gezogen werden. G₁-induzierende Reagenzien könnten eine Transformation der CTCs/DTCs in die proliferative Phase bewirken. So wurde bspw. gezeigt, dass der Eintritt einer Zelle von der G₀- in die G₁-Phase durch eine Kombination von Serotonin und EGF unterstützt werden kann.^{175, 176} Diese Proteine sind in der Lage Zytokine und Wachstumsfaktorrezeptoren zu stimulieren, was in einer Progression des Zellzyklus resultieren kann.¹⁷⁷ In der vorliegenden Arbeit wurde dem Kulturmedium bereits EGF zugesetzt. Weitere Proteine, wie Serotonin aber auch IL-6, könnten den Übergang

dormanter CTCs/DTCs aus der G₀- in die G₁-Phase der dormanten CTCs/DTCs induzieren.^{178,}
179

In den vier Ansätzen, in denen Tumorzellen proliferierten, konnten Unterschiede im Wachstumsverhalten dieser Zellen beobachtet werden. Während CTCs/DTCs von Mammakarzinompatientinnen ein adhärentes Wachstum aufwiesen, proliferierten DTCs aus dem Knochenmark eines Bronchialkarzinompatienten in Suspension. Der Einsatz von tumorspezifischen Kulturmedien könnte helfen, dem Bedarf der Tumorzellen in den einzelnen Proben besser gerecht zu werden. Speziell auf das zu kultivierende Epithel abgestimmte Kulturmedien (z.B. *PneumaCult*TM-ALI für humane bronchiale Epithelzellen, *MammoCult*TM für humane primäre Mamma-Epithelzellen)¹⁸⁰ sind kommerziell erhältlich. Zhang et al.⁸² kultivierten angereicherte CTCs über 5 Tage in Stammzellmedium und anschließend in einem Medium, welches speziell für die Kultur von Mammaepithelzellen entwickelt wurde. Der Einsatz eines Stammzellmediums könnte Zellen, die sich aufgrund von EMT in einem mesenchymalen Stadium befinden, bei der Adaption an die *in vitro* Bedingungen unterstützen. Die anschließende Kultur in Mammaepithel-Medium und der Zusatz von FCS könnten die Induktion der MET bei Tumorzellen bewirken und somit das Anwachsen und eine anschließende Proliferation dieser Zellen unterstützen. In der vorliegenden Arbeit wurden MNCs aus Blut oder Knochenmark unmittelbar nach der Anreicherung in serumhaltiges Medium gegeben. Dies könnte eine fehlende Adaptionsphase der wenigen Tumorzellen bewirkt haben. Zellen, die sich in einer mesenchymalen oder dormanten Phase befunden haben, könnten hierdurch statt in die proliferative Phase in die Apoptose übergegangen sein.

Die in der vorliegenden Arbeit kultivierte Knochenmarkprobe P-5 einer Mammakarzinompatientin zeigte eine Proliferation der Tumorzellen zwischen den MNC des Knochenmarkes. Um diese Zellen weiter zu kultivieren, wurden diese mit Hilfe von *EpCAM-MicroBeads* über das *MACS*[®]-System von den restlichen Zellen getrennt. Nach der Isolation der Tumorzellen zeigte sich jedoch keine weitere Proliferation. Die MNCs des Knochenmarkes scheinen für die Tumorzellen eine Nische gebildet zu haben, welche die DTCs zur Proliferation benötigen. Dieses Mikromilieu, das ein Überleben sowie die Proliferation der DTCs fördert, wird als metastatische Nische bezeichnet. Die Interaktionen der einzelnen Zellen untereinander in dieser Nische sind nach wie vor ungeklärt. Hierfür wurde *in vivo* das Zusammenspiel mehrerer zentralfunktioneller Elemente, wie der perivaskulären Lokalisation, der Modifizierung der extrazellulären Matrix (ECM), des Aufbaus von Blutgefäßen, der Rekrutierung von Stammzellen aus dem Knochenmark, der Hypoxie sowie der Expression von Signalmolekülen postuliert. Auch nicht transformierte Zellen, wie Endothelzellen und Fibroblasten, scheinen beim Metastasenwachstum eine wichtige Rolle zu spielen.¹⁸¹ Im Falle der Patientenprobe P-5 bestand allerdings zusätzlich eine Wachstumskonkurrenz zwischen den

MNCs und den Tumorzellen. Für zukünftige Experimente wäre es denkbar, die MNCs nach der Trennung der Tumorzellen über das *MACS*[®]-System mit Mitomycin C zu behandeln, um diese als *Feederlayer* für die proliferierenden DTCs zu verwenden. Des Weiteren sollten inaktivierte humane Endothel- oder Stammzellen als *Feederlayer* getestet werden, da die von diesen Zellen exprimierten humanen Wachstums- und Proliferationsfaktoren die *in vitro*-Expansion von CTCs/DTCs unterstützen könnte.¹⁸²⁻¹⁸⁴

5.2.2 Kultivierung von metastasierten Tumorzellen

Des Weiteren ist es gelungen, Tumorzellen eines Pleurapunktates, das von einer Mammakarzinompatientin entnommen wurde, sowie Tumorzellen aus dem Knochenmark eines Patienten mit metastasiertem Harnblasenkarzinom zu kultivieren. Hierbei handelt es sich um native Tumorzellen, die bereits am Metastasierungsort proliferiert sind und Metastasen gebildet haben. Zum Zeitpunkt der Inkulturnahme befanden sich die meisten dieser Zellen in einem teilungsfähigen Zustand. Tumorassoziierte Eigenschaften konnten nach der dritten Subkultivierung durch FISH, qPCR, Mutationsanalysen sowie immunhistochemische Färbungen belegt werden.

Interessanterweise ist die EpCAM-Expression sowohl in den nativen Tumorzellen des Knochenmark als auch in den kultivierten Zellen des metastasierten Harnblasenkarzinoms herunterreguliert. Die Mehrheit der Harnblasenkarzinome zeichnet sich durch EpCAM-Expression aus.¹⁸⁵ Diese Expression ist jedoch abhängig vom Tumortyp in 38 % (sarkomatoider Tumor) bis 100 % (invertierendes Papillom) der Fälle nachweisbar. Die Untersuchung des korrespondierenden Primärtumors war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die nur sehr schwache EpCAM-Expression der metastasierten Tumorzellen lässt allerdings darauf schließen, dass möglicherweise nur Zellen mit einem epithelial/mesenchymalen Phänotyp disseminiert sind. Ob die schwächere EpCAM-Expression einiger Zellen bereits im Primärtumor vorlag oder erst durch EMT reguliert wurde, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. In Passage 3 konnten durch immunhistochemische Färbungen und Mutationsanalysen unterschiedliche Zellpopulationen in diesem Ansatz festgestellt werden. In Passage 13 befanden sich fast nur noch Zellen, die sich durch das Fehlen epithelialer Eigenschaften auszeichneten. Da die Tumorzellen insgesamt nur eine schwache EpCAM-Expression aufwiesen oder diese möglicherweise sogar vollständig herabreguliert war, verlieren diese Zellen, unter den in der Arbeit eingesetzten Bedingungen, ihre epithelialen Eigenschaften. Dass es sich hierbei um Tumor- und nicht um Stromazellen handelt, konnte durch die Identifizierung eines polyploiden Chromosomensatzes mit Hilfe von FISH-Analysen belegt werden. Durch die Zugabe von Zellen der generierten Harnblasen-

karzinomzelllinie in das Blut gesunder Probanden konnten ca. 4 % dieser Zellen mit dem *CellSearch*[™]-System detektiert werden. Man könnte zukünftig die Zellen über FACS-Analysen in EpCAM-positive und EpCAM-negative Zellpopulationen sortieren, um festzustellen, welche Zellpopulation stärkere metastasierende Eigenschaften aufweist. Da diese Zellen ursprünglich aus dem Knochenmark stammen, würde sich eine Transplantation der unterschiedlichen Zellpopulationen in den Femur von Mäusen anbieten, um die metastasierenden Eigenschaften dieser Zellen in Abhängigkeit von ihrer EpCAM-Expression verfolgen zu können. Auch die Auswirkungen der EMT/MET-Eigenschaften auf das *in vitro*- und *in vivo*- Verhalten dieser Zellen oder die therapeutische Wirksamkeit bestimmter Medikamente und Resistenzmechanismen könnten mit Hilfe dieser Zellen analysiert werden.

6 Ausblick

In der vorliegenden Dissertation konnten CTCs im Blut von GBM-Patienten nachgewiesen werden. Die Hypothese einer hämatogenen Disseminierung von GBM-Zellen wurde somit bestätigt. Mit Hilfe der hier etablierten Detektionsmethode, bestehend aus *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Immunfluoreszenzfärbung gegen GFAP konnten CTCs bei 23,7 % der untersuchten GBM-Patienten mit einer durchschnittlichen Konzentration von 2,4 - 4 Zellen pro $2,1 \times 10^6$ MNC detektiert werden. Weitere Studien bezüglich der Methodenoptimierung sollten auf die Entwicklung einer noch sensitiveren und spezifischeren Anreicherung dieser CTCs gerichtet sein, um eine geringere MNC-Anzahl in der angereicherten Zellsuspension zu erreichen. Durch die in dieser Arbeit gezeigte Korrelation der Präsenz von CTCs mit einer heterogenen GFAP-Expression und einer erhöhten *EGFR*-Genamplifikation des Primärtumors wäre die Kopplung von glialen (z.B. GFAP, Map2c) und/oder tumorassoziierten Antikörpern (z.B. EGFR), die nicht von hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, an magnetische Nanopartikel denkbar. Eine automatisierte Anreicherungsmethode, z.B. mittels *CellSearch*[™]-System könnte etabliert werden, wodurch der gesamte Detektionsprozess unter standardisierten Bedingungen und mit hohem Durchsatz erfolgen könnte. Auch die Anreicherung der CTCs durch die Negativ-Depletion von Leukozyten mit Hilfe des *RosetteSep*[®]-Antikörpercocktails wäre eine aussichtsreiche Alternative. Hierfür müsste allerdings eine Immunfärbung entwickelt werden, die es zulässt, CTCs nach ihrer Anreicherung auf spezifische Marker zu färben. Um eine bessere Qualität des WGA-Produktes zur molekularen Einzelzellanalyse von CTCs zu erzielen, könnten andere kommerziell erhältliche Kitsysteme auf ihre Effektivität getestet werden.

Durch die sehr kurze Überlebenszeit der GBM-Patienten ist die prognostische Relevanz der CTCs zurzeit noch nicht bekannt. Die Entwicklung neuer Therapien könnte eine längere Überlebenszeit der Patienten und somit eine Zunahme der extrakraniellen Metastasenbildung verursachen. Die molekulare Analyse der systemisch gestreuten Tumorzellen würde dabei die Entwicklung weiterer Therapien unterstützen. Durch die Detektion von CTCs könnten zudem GBM-Patienten mit einer diagnostizierten, systemischen Streuung identifiziert und weiterhin als Organdonatoren ausgeschlossen werden. Hierdurch würden nur Organe von verstorbenen CTC-negativen GBM-Patienten zur Organtransplantation zugelassen werden, während gleichzeitig das Risiko eine Tumortransmission gesenkt werden würde.

Durch die im zweiten Teil dieser Dissertation durchgeführte Optimierung der Kulturbedingungen zur *ex vivo*-Vermehrung von CTCs/DTCs konnte ein Adhärenzen und Proliferieren von Tumorzellen aus vier unterschiedlichen Patientenproben erzeugt werden. Die Zellen konnten jedoch nicht über einen längeren Zeitraum kultiviert werden. Proteine, wie Serotonin oder IL-6, die den Übergang der Zelle in die proliferative Phase begünstigen, sollten dem Kulturmedium zugesetzt werden. Auch der Einsatz von Stammzellmedien während der Adaptionsphase an die *in vitro*-Bedingungen der Tumorzellen und die anschließende Verwendung von organspezifischen Kulturmedien könnten eine langfristige Proliferation der CTCs/DTCs sowie eine spätere funktionelle Analyse dieser Zellen ermöglichen.

Die erfolgreich kultivierten Tumorzellen aus dem Knochenmark eines Patienten mit metastasiertem Harnblasenkarzinom, die sich durch eine schwache bzw. durch fehlende EpCAM-Expression auszeichnen, könnten zunächst über FACS-Analysen in die verschiedenen Zellpopulationen sortiert werden, um anschließend festzustellen, welche Zellpopulation stärkere metastasierende Eigenschaften aufweist. Da diese Zellen relativ schnell ihren Phänotyp ändern können, stellen sie ein ideales Ausgangsmaterial dar, um experimentelle Bedingungen zu definieren, unter denen die Zellen aus den epithelialen in den mesenchymalen Phänotyp überführt werden können und umgekehrt. Da diese Zellen ursprünglich aus dem Knochenmark stammen, würde sich eine Transplantation in den Femur von Mäusen anbieten. Auch die Auswirkungen einer EpCAM-Transformation auf das *in vitro*- und *in vivo*- Verhalten dieser Zellen wäre ein interessanter Untersuchungsansatz. Ergebnisse dieser Analysen könnten Ausgangspunkt für die Austestung neuer Therapieansätze oder für die Untersuchung von Resistenzmechanismen in der Krebstherapie sein.

Literaturverzeichnis

1. Wagener C, and Müller O. *Molekulare Onkologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2010.
2. Hanahan D, and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
3. Hanahan D, and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.
4. Weinberg RA. *The biology of cancer*. New York: Garland Science, 2007.
5. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:489-501.
6. Wen PY, and Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008; 359:492-507.
7. Holland EC. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:6242-6244.
8. Ohgaki H, and Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 2005; 109:93-108.
9. Vescovi AL, Galli R, and Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:425-436.
10. Ohgaki H, and Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007; 170:1445-1453.
11. Ohgaki H, and Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 2009; 100:2235-2241.
12. French LAMGaPJ. *Molecular Subtypes of Gliomas*. New Jersey, USA: Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2011.
13. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; 17:98-110.
14. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007; 21:2683-2710.
15. Gan HK, Kaye AH, and Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 2009; 16:748-754.
16. Gupta P, Han SY, Holgado-Madruga M, et al. Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody. *BMC Biotechnol* 2010; 10:72.
17. Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM, et al. Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res* 2003; 63:413-416.
18. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, et al. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol* 2010; 23:856-865.
19. Vogt N, Lefevre SH, Apiou F, et al. Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:11368-11373.
20. Michel Wager LK-TaC-JL. *Gliomagenesis: Advantages and Limitations of Biomarkers*. New Jersey, USA: Springer Science+Business Media B.V. Heidelberg, London, New York, 2001.
21. Singh R, Singh B, and Malhotra SK. A new "marker" protein for astrocytes. *Biosci Rep* 1986; 6:73-80.
22. Schlegel U, Weller M, and Westphal M. *Neuroonkologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003.
23. Guide ABGSES. In *Glial Cell Markers: Antibody&Beyond*, 2007.

24. Kwiatkowska A, Didier S, Fortin S, et al. The small GTPase RhoG mediates glioblastoma cell invasion. *Mol Cancer* 2012; 11:65.
25. Zhong J, Paul A, Kellie SJ, et al. Mesenchymal migration as a therapeutic target in glioblastoma. *J Oncol* 2010; 2010:430142.
26. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, et al. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:1046-1069.
27. MacDonald TJ, DeClerck YA, and Laug WE. Urokinase induces receptor mediated brain tumor cell migration and invasion. *J Neurooncol* 1998; 40:215-226.
28. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* 2006; 1:97-117.
29. Sauter G, Maeda T, Waldman FM, et al. Patterns of epidermal growth factor receptor amplification in malignant gliomas. *Am J Pathol* 1996; 148:1047-1053.
30. Yanamandra N, Konduri SD, Mohanam S, et al. Downregulation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) induces caspase-mediated cell death in human glioblastoma cells. *Clinical & experimental metastasis* 2000; 18:611-615.
31. Krishnamoorthy B, Darnay B, Aggarwal B, et al. Glioma cells deficient in urokinase plasminogen activator receptor expression are susceptible to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Clin Cancer Res* 2001; 7:4195-4201.
32. Pasquier B, Pasquier D, N'Golet A, et al. Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas: clinicopathological study of two cases and review of literature. *Cancer* 1980; 45:112-125.
33. Fonkem E, Lun M, and Wong ET. Rare phenomenon of extracranial metastasis of glioblastoma. *J Clin Oncol* 2011; 29:4594-4595.
34. Kalokhe G, Grimm SA, Chandler JP, et al. Metastatic glioblastoma: case presentations and a review of the literature. *J Neurooncol* 2012; 107:21-27.
35. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352:987-996.
36. Liwnicz BH, and Rubinstein LJ. The pathways of extraneural spread in metastasizing gliomas: a report of three cases and critical review of the literature. *Hum Pathol* 1979; 10:453-467.
37. Pasquier B, Pasquier D, Lachard A, et al. [Extraneural metastasis of central nervous system tumours (author's transl)]. *Bull Cancer* 1979; 66:25-28.
38. Pansera F, and Pansera E. An explanation for the rarity of extraaxial metastases in brain tumors. *Med Hypotheses* 1992; 39:88-89.
39. McComb JG. Recent research into the nature of cerebrospinal fluid formation and absorption. *J Neurosurg* 1983; 59:369-383.
40. Schweitzer T, Vince GH, Herbold C, et al. Extraneural metastases of primary brain tumors. *J Neurooncol* 2001; 53:107-114.
41. Nir I, Levanon D, and Iosilevsky G. Permeability of blood vessels in experimental gliomas: uptake of ^{99m}Tc-glucoheptonate and alteration in blood-brain barrier as determined by cytochemistry and electron microscopy. *Neurosurgery* 1989; 25:523-531; discussion 531-522.
42. Kohn S, Front D, and Nir I. Blood-brain barrier permeability of human gliomas as determined by quantitation of cytoplasmic vesicles of the capillary endothelium and scintigraphic findings. *Cancer Invest* 1989; 7:313-321.
43. Martens T, Matschke J, Muller C, et al. Skeletal spread of an anaplastic astrocytoma (WHO grade III) and preservation of histopathological properties within metastases. *Clin Neurol Neurosurg* 2013 Mar; 115(3):323-328.
44. Seo YJ, Cho WH, Kang DW, et al. Extraneural metastasis of glioblastoma multiforme presenting as an unusual neck mass. *J Korean Neurosurg Soc* 2012; 51:147-150.

45. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, et al. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65:529-539.
46. Huang P, Allam A, Taghian A, et al. Growth and metastatic behavior of five human glioblastomas compared with nine other histological types of human tumor xenografts in SCID mice. *J Neurosurg* 1995; 83:308-315.
47. Chen F, Karolak W, Cypel M, et al. Intermediate-term outcome in lung transplantation from a donor with glioblastoma multiforme. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28:1116-1118.
48. Nalesnik MA, Woodle ES, Dimaio JM, et al. Donor-transmitted malignancies in organ transplantation: assessment of clinical risk. *Am J Transplant* 2011; 11:1140-1147.
49. Warrens AN. Organ donation and priority points in Israel. *Transplantation* 2012; 94:e42.
50. Chen H, Shah AS, Girgis RE, et al. Transmission of glioblastoma multiforme after bilateral lung transplantation. *J Clin Oncol* 2008; 26:3284-3285.
51. Zhao P, Strohl A, Gonzalez C, et al. Donor transmission of pineoblastoma in a two-yr-old male recipient of a multivisceral transplant: a case report. *Pediatr Transplant* 2012; 16:E110-114.
52. Bechstein WO, Neuhaus P, McMaster P, et al. Tacrolimus (FK 506) therapy is associated with a significant reduction in immunosuppressive treatment failures following primary liver transplantation. *Transplant Proc* 1996; 28:1008-1010.
53. Fatt MA, Horton KM, and Fishman EK. Transmission of metastatic glioblastoma multiforme from donor to lung transplant recipient. *Journal of computer assisted tomography* 2008; 32:407-409.
54. Kauffman HM, Cherikh WS, McBride MA, et al. Deceased donors with a past history of malignancy: an organ procurement and transplantation network/united network for organ sharing update. *Transplantation* 2007; 84:272-274.
55. Nguyen DX, Bos PD, and Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:274-284.
56. Ignartis M, Sotiriou C, and Pantel K. *Minimal Residual Disease and Circulating Tumor Cells in Breast Cancer*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlage Berlin Heidelberg 2012, 2012.
57. Pantel K, and Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:448-456.
58. Patel H, Le Marer N, Wharton RQ, et al. Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. *Ann Surg* 2002; 235:226-231.
59. Kalluri R, and Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420-1428.
60. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 2010; 101:293-299.
61. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, et al. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 2012; 22:725-736.
62. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, and Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31:673-687.
63. Pantel K, Alix-Panabieres C, and Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6:339-351.
64. Miller MC, Doyle GV, and Terstappen LW. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol* 2010; 2010:617421.
65. Hoon DS, Ferris R, Tanaka R, et al. Molecular mechanisms of metastasis. *J Surg Oncol* 2011; 103:508-517.

66. Gorges TM, Riethdorf S, and Pantel K. Zirkulierende Tumorzellen in Krebspatienten als neuer Biomarker. *Journal Onkologie* 2012; 7:184-188.
67. Gorges TM, and Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2013.
68. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; 450:1235-1239.
69. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; 359:366-377.
70. Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:18392-18397.
71. Alix-Panabieres C, and Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013; 59:110-118.
72. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:781-791.
73. Powell AA, Talasz AH, Zhang H, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS One* 2012; 7:e33788.
74. Alix-Panabieres C. EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res* 2012; 195:69-76.
75. Alix-Panabieres C, Rebillard X, Brouillet JP, et al. Detection of circulating prostate-specific antigen-secreting cells in prostate cancer patients. *Clin Chem* 2005; 51:1538-1541.
76. Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Pelle O, et al. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin Chem* 2007; 53:537-539.
77. Pantel K, and Alix-Panabieres C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 2010; 16:398-406.
78. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, et al. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* 2012; 14:R15.
79. Keong CK, Nadarajah VD, and Lee TJ. Development of a Purification Method of Pure Primary Lymphocytes for cell Viability Assays. *Malays J Med Sci* 2007; 14:38-45.
80. Pantel K, Dickmanns A, Zippelius A, et al. Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1162-1168.
81. Putz E, Witter K, Offner S, et al. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* 1999; 59:241-248.
82. Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, et al. The Identification and Characterization of Breast Cancer CTCs Competent for Brain Metastasis. *Sci Transl Med* 2013; 5:180ra148.
83. Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, et al. Heterogeneity of Epidermal Growth Factor Receptor Status and Mutations of KRAS/PIK3CA in Circulating Tumor Cells of Patients with Colorectal Cancer. *Clin Chem* 2013; 59:252-260.
84. Mathiesen RR, Fjellidal R, Liestol K, et al. High-resolution analyses of copy number changes in disseminated tumor cells of patients with breast cancer. *Int J Cancer* 2012; 131:E405-415.
85. Hannemann J, Meyer-Staeckling S, Kemming D, et al. Quantitative high-resolution genomic analysis of single cancer cells. *PLoS One* 2011; 6:e26362.
86. Yu M, Ting DT, Stott SL, et al. RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. *Nature* 2012; 487:510-513.
87. Tang F, Barbacioru C, Nordman E, et al. RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat Protoc* 2010; 5:516-535.

88. Islam S, Kjallquist U, Moliner A, et al. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 2011; 21:1160-1167.
89. Bohm C, Wassmann H, and Paulus W. No evidence of tumour cells in blood of patients with glioma. *Mol Pathol* 2003; 56:187-189.
90. Holtschmidt J. Nachweisverfahren zur Anreicherung und Detektion zirkulierender Tumorzellen aus dem Blut von Patienten mit Glioblastoma Multiforme. In Medizinische Fakultät. Hamburg: Universität Hamburg, 2010, 116.
91. S.J. Morgan DCD. Kultur tierischer Zellen. Spektrum Akademischer Verlag, 1994.
92. Braun S, Pantel K, Muller P, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:525-533.
93. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *Journal of hematotherapy* 1994; 3:165-173.
94. Sternberger LA, Hardy PH, Jr., Cuculis JJ, et al. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18:315-333.
95. G. L. Kumar LR. Immunohistochemical staining methods. In Immunohistochemical staining methods. http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf: Dako, 2009.
96. van Beers EH, Joosse SA, Ligtenberg MJ, et al. A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *Br J Cancer* 2006; 94:333-337.
97. Gasch C. Detektion und molekulare Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom. In Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. Hamburg: Universität Hamburg, 2012, 148.
98. Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74:5463-5467.
99. Lottspeich F. Bioanalytik. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
100. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20:399-407.
101. Geigl JB, Obenauf AC, Waldispuehl-Geigl J, et al. Identification of small gains and losses in single cells after whole genome amplification on tiling oligo arrays. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:e105.
102. Meyer-Staeckling S. Untersuchung zur Struktur eines Amplikons im Intron 1 des humanen epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors: Erstmutation in der Mammakarzinom-Entstehung. In Department Biologie , Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. Hamburg: Universität Hamburg, 2009, 153.
103. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13:920-928.
104. Freytag OU, CH) , Georges GH, DE) , Moessner EK, CH) , et al. ANTI-MCSP ANTIBODIES. In <http://www.freepatentsonline.com/20130078251.pdf>. US20130078251 USA (Ed). USA, 2013.
105. Schulte A, Gunther HS, Martens T, et al. Glioblastoma stem-like cell lines with either maintenance or loss of high-level EGFR amplification, generated via modulation of ligand concentration. *Clin Cancer Res* 2012; 18:1901-1913.
106. Hjortsberg LST. The TP53 Web Site. Thierry Soussi P (Ed). Paris, 2008.
107. Endersby R, and Baker SJ. PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene* 2008; 27:5416-5430.

108. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, et al. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 1998; 16:2259-2264.
109. Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev* 2010; 24:1731-1745.
110. Bailar JC, 3rd, and Mosteller F. Guidelines for statistical reporting in articles for medical journals. Amplifications and explanations. *Ann Intern Med* 1988; 108:266-273.
111. Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, et al. Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res* 2003; 5:89-95.
112. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Wiley-Liss, 2005.
113. Osborne CK, Hobbs K, and Trent JM. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat* 1987; 9:111-121.
114. G. Feichter PD. *Zytopathologie*. Berlin: Springer, 1999.
115. J. DDCaMS. *Animal Cells: Culture and Media: Essential Data Series*. New York, USA: John Wiley and Sons Inc, 1994.
116. Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 2009; 69:5331-5339.
117. Agrez MV, Kovach JS, and Lieber MM. Cell aggregates in the soft agar "human tumour stem-cell assay". *Br J Cancer* 1982; 46:880-887.
118. Black PC, Brown GA, and Dinney CP. Molecular markers of urothelial cancer and their use in the monitoring of superficial urothelial cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:5528-5535.
119. Halling KC, and Kipp BR. Bladder cancer detection using FISH (UroVysion assay). *Advances in anatomic pathology* 2008; 15:279-286.
120. Wang X, Zhang S, MacLennan GT, et al. Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in small cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2007; 13:953-957.
121. Lei Y, Yan S, Ming-De L, et al. Prognostic significance of Aurora-A expression in human bladder cancer. *Acta histochemica* 2011; 113:514-518.
122. Fenner A. Bladder cancer: Aurora kinase inhibitors light up the therapeutic horizon in bladder cancer. *Nature reviews Urology* 2013; 10:184.
123. Lassmann S, Shen Y, Jutting U, et al. Predictive value of Aurora-A/STK15 expression for late stage epithelial ovarian cancer patients treated by adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13:4083-4091.
124. Healey PJ, and Davis CL. Transmission of tumours by transplantation. *Lancet* 1998; 352:2-3.
125. Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, et al. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *The Journal of pathology* 2002; 196:17-25.
126. Heimberger AB, Suki D, Yang D, et al. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med* 2005; 3:38.
127. Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, et al. Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene* 1994; 9:2313-2320.
128. Hobbs J, Nikiforova MN, Fardo DW, et al. Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas. *Am J Surg Pathol* 2012; 36:1186-1193.
129. Dacic S, Flanagan M, Cieply K, et al. Significance of EGFR protein expression and gene amplification in non-small cell lung carcinoma. *American journal of clinical pathology* 2006; 125:860-865.

130. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003; 21:3798-3807.
131. Ruano Y, Ribalta T, de Lope AR, et al. Worse outcome in primary glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and p53 alteration. *American journal of clinical pathology* 2009; 131:257-263.
132. Montano N, Cenci T, Martini M, et al. Expression of EGFRvIII in glioblastoma: prognostic significance revisited. *Neoplasia* 2011; 13:1113-1121.
133. Heimberger AB, Hlatky R, Suki D, et al. Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1462-1466.
134. Taylor TE, Furnari FB, and Cavenee WK. Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. *Current cancer drug targets* 2012; 12:197-209.
135. Zhen L, Yufeng C, Zhenyu S, et al. Multiple extracranial metastases from secondary glioblastoma multiforme: a case report and review of the literature. *J Neurooncol* 2010; 97:451-457.
136. Senetta R, Trevisan E, Ruda R, et al. Skin metastases of glioblastoma in the absence of intracranial progression are associated with a shift towards a mesenchymal immunophenotype: report of two cases. *Acta Neuropathol* 2009; 118:313-316.
137. Gaedcke J, Traub F, Milde S, et al. Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastasis from breast cancer. *Mod Pathol* 2007; 20:864-870.
138. Wikman H, Lamszus K, Detels N, et al. Relevance of PTEN loss in brain metastasis formation in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2012; 14:R49.
139. Carico C, Nuno M, Mukherjee D, et al. Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *PLoS One* 2012; 7:e33684.
140. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2000; 80:65-72.
141. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, et al. Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15:6683-6693.
142. Srividya MR, Thota B, Shailaja BC, et al. Homozygous 10q23/PTEN deletion and its impact on outcome in glioblastoma: a prospective translational study on a uniformly treated cohort of adult patients. *Neuropathology* 2011; 31:376-383.
143. Yadav AK, Renfrow JJ, Scholtens DM, et al. Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas. *JAMA* 2009; 302:276-289.
144. Bredel M, Scholtens DM, Harsh GR, et al. A network model of a cooperative genetic landscape in brain tumors. *JAMA* 2009; 302:261-275.
145. Koschny R, Koschny T, Froster UG, et al. Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 135:147-159.
146. Huhn SL, Mohapatra G, Bollen A, et al. Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme by comparative genomic hybridization: correlation with radiation treatment outcome. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1435-1443.
147. Fischer U, Leidinger P, Keller A, et al. Amplicons on chromosome 12q13-21 in glioblastoma recurrences. *Int J Cancer* 2010; 126:2594-2602.
148. Fischer U, Radermacher J, Mayer J, et al. Tumor hypoxia: Impact on gene amplification in glioblastoma. *International journal of oncology* 2008; 33:509-515.
149. Burger PC, Pearl DK, Aldape K, et al. Small cell architecture--a histological equivalent of EGFR amplification in glioblastoma multiforme? *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60:1099-1104.

150. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, et al. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain pathology* 1996; 6:217-223; discussion 223-214.
151. Zhao J, Liang SX, Savas L, et al. An immunostaining panel for diagnosis of malignancy in mucinous tumors of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125:765-769.
152. Institute S. Catalogue of somatic mutations in cancer. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=11860>: Sanger Institute, 2013.
153. Rodriguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, and Anastasiadis PZ. E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1826:23-31.
154. Andrej Pala GK-M, Richard Eric Kast, Christian Rainer Wirtz , and Halatsch aM-E. Epidermal to Mesenchymal Transition and Failure of EGFR-Targeted Therapy in Glioblastoma. *Cancers* 2012; 2012:523-530.
155. Tso CL, Shintaku P, Chen J, et al. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Molecular cancer research : MCR* 2006; 4:607-619.
156. Rey JW, Heister P, Wirges U, et al. Organ donor with unclear primary brain tumor, a contraindication for transplantation? Case report of a one year old child. *Klin Padiatr* 2009; 221:390-392.
157. Hornik L, Tenderich G, Wlost S, et al. Organs from donors with primary brain malignancy: the fate of cardiac allograft recipients. *Transplant Proc* 2004; 36:3133-3137.
158. Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, et al. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:2246-2251.
159. Pretlow TG, Schwartz S, Giaconia JM, et al. Prostate cancer and other xenografts from cells in peripheral blood of patients. *Cancer Res* 2000; 60:4033-4036.
160. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nature biotechnology* 2013.
161. Langdon SP. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols (Methods in Molecular Medicine)* Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004.
162. Nirmal K. Das HL-H, S. Nandi. Influence of Seeding Density on Multicellular Organization and Nuclear Events in Cultures of Normal and Neoplastic Mouse Mammary Epithelium. *Journal Of The National Cancer Institute* 1974; 52:849-861.
163. Brattain MG, Brattain DE, Sarrif AM, et al. Enhancement of growth of human colon tumor cell lines by feeder layers of murine fibroblasts. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69:767-771.
164. D.C. Darling SJM. *Animal Cells: Culture and Media: Essential Data (Essential Data Series)* Bath, UK, 1994.
165. Li R, Liang J, Ni S, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2010; 7:51-63.
166. Evdokimova V, Tognon C, Ng T, et al. Reduced proliferation and enhanced migration: two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1. *Cell cycle* 2009; 8:2901-2906.
167. Muller V, Stahmann N, Riethdorf S, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 2005; 11:3678-3685.
168. Demicheli R, Abbattista A, Miceli R, et al. Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 41:177-185.
169. Uhr JW, and Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:12396-12400.

170. Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:793-802.
171. Goss PE, and Chambers AF. Does tumour dormancy offer a therapeutic target? *Nat Rev Cancer* 2010; 10:871-877.
172. Aguirre Ghiso JA, Kovalski K, and Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol* 1999; 147:89-104.
173. Ranganathan AC, Zhang L, Adam AP, et al. Functional coupling of p38-induced up-regulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. *Cancer Res* 2006; 66:1702-1711.
174. Marches R, Scheuermann R, and Uhr J. Cancer dormancy: from mice to man. *Cell cycle* 2006; 5:1772-1778.
175. Geissler C, Hambek M, Eckardt A, et al. The role of recombinant epidermal growth factor and serotonin in the stimulation of tumor growth in a SCCHN xenograft model. *Oncology reports* 2012; 28:785-790.
176. Roovers K, and Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2000; 22:818-826.
177. Hambek M, Werner C, Baghi M, et al. Prestimulation of head and neck cancer cells with growth factors enhances treatment efficacy. *Anticancer Res* 2006; 26:1091-1095.
178. Liang J, and Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell cycle* 2003; 2:339-345.
179. Huang LW, Hsieh BS, Cheng HL, et al. Arecoline decreases interleukin-6 production and induces apoptosis and cell cycle arrest in human basal cell carcinoma cells. *Toxicology and applied pharmacology* 2012; 258:199-207.
180. Technologys S. Specialized cell culture & tissue culture media: STEMCELL Technologies, 2013.
181. Sleeman JP. The metastatic niche and stromal progression. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31:429-440.
182. Magin AS, Korfer NR, Partenheimer H, et al. Primary cells as feeder cells for coculture expansion of human hematopoietic stem cells from umbilical cord blood--a comparative study. *Stem Cells Dev* 2009; 18:173-186.
183. Lu R, Bian F, Lin J, et al. Identification of human fibroblast cell lines as a feeder layer for human corneal epithelial regeneration. *PLoS One* 2012; 7:e38825.
184. Richards M, Fong CY, Chan WK, et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 2002; 20:933-936.
185. Went PT, Lugli A, Meier S, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004; 35:122-128.

Anhang

I. Patientenkollektive

Detektion und Charakterisierung von CTCs im Blut von GBM-Patienten

Tabelle A - I: Patienten mit Gehirnmastasen epithelialen Ursprungs (Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Bei der Metastasen-Resektion wurde den Patienten peripheres Blut prä- und postoperativ entnommen. Die durch *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation angereicherten Zellen dieser Patientenkohorte dienen dem Nachweis der Spezifität der etablierten GFAP-Immunfluoreszenz-Methode, da diese MNC keine GFAP-exprimierenden Zellen beinhalten.

P-Nr.	Diagnose	Geschlecht	Alter bei OP (Jahre)
M-1	Metastase Bronchialkarzinom	m	70
M-2	Metastase Bronchialkarzinom	m	76
M-3	Metastase malignes Melanom	w	74
M-4	Metastase neuroendokrines Karzinom	w	59
M-5	Metastase Bronchialkarzinom	m	62
M-6	Metastase Adenokarzinom	w	44
M-7	Metastase Lungenkarzinom	m	61

P-Nr. = Patientenummer

Tabelle A - II: Patienten mit Gliomen (Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Bei der Tumor-Resektion wurde den Patienten peripheres Blut prä- und postoperativ entnommen. Die Probe wurde anschließend auf die Präsenz von GFAP-positiven Zellen untersucht.

P-Nr.	A	G	Diagnose	Anzahl CTC in $2,1 \times 10^6$ MNC			
				prä OP	post OP	während OP	Metastase
G-1	75	w	Gliosarkom	2	1	-	
G-2	75	w	Gliosarkom	n	n	-	
G-3	71	w	Gliosarkom	n	n	-	
G-4	55	w	Oligodendrogliom III	n	n	-	
G-5	53	w	anaplastisches Astrozytom III	n	n	-	
G-6	45	w	diffuses Astrozytom II	-	-	2	
G-7	57	w	Astrozytom III	-	-	n	
G-8	66	m	Oligodendrogliom III	3	3	-	
G-9	59	w	Oligodendrogliom III	n	n	-	
G-10	28	m	Anaplastisches Astrozytom III	-	-	-	n

P-Nr. = Patientenummer; A = Alter; G = Geschlecht

Tabelle A -III: Patienten mit Glioblastoma *multiforme* (Klinik und Polyklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Bei der Tumor-Resektion wurde den Patienten peripheres Blut prä- und postoperativ entnommen. Patienten #1-#11 wurden im Rahmen der med. Doktorarbeit von Johannes Holtschmidt, alle weiteren in Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Präsenz von GFAP-positiven Zellen untersucht (rot = CTC-positiver Patient).

P-Nr. = Patientennummer; A = Alter; G = Geschlecht; PT = Primärtumor; Ü = Überlebenszeit (Jahre); rez. = Rezidiv; sec. = sekundär

P-Nr.	A	G	Diagnose	Ü	Anzahl CTC in $2,1 \times 10^6$ MNC			EGFR Amplifikation PT		Immunhisto PT			
					prä OP	post OP	während OP	qPCR	Histo	GFAP	p53 (%)	MAP2c	Ki67 (%)
1	63	f	GBM IV	2,3	-	2	-	168	+++	+	15	25	k.a.
2	49	m	GBM IV 2. rez	0,2	-	1	-	72,6	+++	+	57	35	k.a.
3	67	f	GBM IV	2,4	-	6	-	48,5	+++	+	5	20	+
4	70	m	giant cell GBM	2	0	0	-	2,04	k.a.	+	90	+++	k.a.
5	64	m	GBM IV	0,4	-	0	-	1	-	+	50	30	k.a.
6	75	f	GBM IV rez	0,8	-	0	-	1,03	-	+	5	30	+
7	49	m	GBM IV rez	n.a.	-	0	-	0,52	k.a.	+	-	10	+
8	70	m	GBM IV	0,8	-	0	-	27	+++	+	-	-	+
9	76	f	GBM IV	0,9	-	0	-	n.a.	+++	+	-	10	+
10	66	m	GBM IV	1	-	0	-	0,92	-	+	+/-	11	+
11	51	m	GBM IV	0,6	-	0	-	0,86	-	+	32	16	+
12	27	m	GBM IV rez	0,8	2	6	-	2,42	-	+/-	>90	75	+
13	69	m	GBM IV rez	0,4	0	0	-	0,49	k.a.	+	10	k.a.	+
14	43	m	sec GBM IV	0,4	0	0	-	1,02	-	+	50	40	+
15	65	m	GBM IV	3,2	0	0	-	60,8	-	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.
16	66	m	GBM IV	3	0	0	-	n.a.	k.a.	+	30	40	+
17	64	f	GBM IV	1	0	0	-	5,41	-	+	5	40	+
18	52	f	GBM IV	0	0	0	-	0,71	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.	k.a.
19	56	m	GBM IV rez	0,1	0	0	-	5,96	k.a.	+	5	30	+
20	53	m	GBM IV	0,7	0	0	-	0,4	k.a.	+	50	34	k.a.
21	25	m	GBM IV	2,9	1	1	-	0,95	-	+/-	>75	+++	+
22	83	m	GBM IV	0,8	3	1	-	488	+++	+	5	23	+
23	67	f	GBM IV	0,9	0	0	-	1,46	-	+	10	40	+
24	75	f	GBM IV	0,2	1	n	-	11,2	+++	+	40	13	+

P-Nr.	A	G	Diagnose	Ü	Anzahl CTC in 2,1 x 10 ⁶ MNC			EGFR Amplifikation PT		Immunhisto PT			
					prä OP	post OP	während OP	qPCR	Histo	GFAP	p53 (%)	MAP2c	Ki67 (%)
25	53	m	GBM IV	1,5	0	0	-	41,2	+++	+	-	+++	+
26	69	m	GBM IV	0,5	0	0	-	0,27	-	+	-	n.a.	+
27	62	f	GBM IV	1,7	0	2	-	32,9	+++	+	20-30	+++	+
28	71	m	GBM IV	0,5	0	-	-	25,5	+++	+	-	+++	+
29	37	f	GBM IV	1,3	0	0	-	0,22	+	+	7	16	+
30	61	f	GBM IV	2,4	0	0	-	354	+++	+	-	30-50	+
31	77	f	GBM IV	0	0	0	-	1,58	-	+/-	10	70	+
32	64	f	GBM IV	2,4	3	0	-	3,11	k.a.	+	-	50	+
33	43	m	GBM IV	1,3	0	0	-	13,8	n.a.	+	20	12	+
34	78	m	GBM IV	0,7	0	0	-	5,82	-	+	10	30	+
35	41	f	GBM IV	0,3	0	0	-	41,6	+++	+	-	30	+
36	73	m	GBM IV	1,1	0	-	-	0,97	+++	+	20	++	+
37	50	f	GBM IV	0,5	0	0	-	40,2	n.a.	+	-	50	+
38	66	m	GBM IV	1,6	0	0	-	41,2	+++	+	-	>25	+/-
39	66	f	GBM IV	1	0	0	-	0,36	+/-	+	-	75	+
40	50	m	GBM IV rez	2,2	0	0	-	0,4	k.a.	+	50	50	+
41	69	m	GBM IV	n.a.	0	0	-	12,9	-	+	50	50	+
42	56	f	GBM IV rez	0,8	0	0	-	0,33	+	+	90	75	+
43	89	m	GBM IV	0,2	0	0	-	13,8	+++heterogen	+	5	30	+
44	67	m	GBM IV	2	0	1	-	36,2	+/-	+	-	5	+/-
45	47	m	GBM IV	1	0	0	-	1,95	+++	+	5	14	+
46	42	f	GBM IV	1,6	0	0	-	40	-	+	>40	13	+/-
47	61	m	GBM IV	1,3	0	-	-	45,8	k.a.	+	k.a.	49	+
48	56	m	GBM IV	1,8	-	-	n	6,74	+++/-	+	-	30	+
49	52	m	GBM IV	1,9	4	6	-	0,7	-	+	-	>25	+

P-Nr.	A	G	Diagnose	Ü	Anzahl CTC in 2,1 x 10 ⁶ MNC			EGFR Amplifikation PT		Immunhisto PT			
					prä OP	post OP	während OP	qPCR	Histo	GFAP	p53 (%)	MAP2c	Ki67 (%)
50	71	f	GBM IV	0,4	11	1	-	47,7	+++	+	20	50	+
51	70	f	GBM IV rez	0,3		1	-	56,8	+++	+	-	34	+
52	65	f	GBM IV	0,3	n	1	-	27	+++	+	<5	30	+
53	61	m	GBM IV	0,6	6	3	-	2,39	-	+	30	18	+/-
54	47	f	GBM IV rez	1			0	0,21	+++	+	10	10	+
55	52	m	GBM IV	0,4	n	0	-	13,3	-	+	-	30	+
56	47	m	GBM IV	1,6	-	-	0	29,3	n.a	+/-	90	60	+/-
57	59	f	GBM IV	1,8	1	0	-	376	+++	+	+/-	13,5	+
58	38	m	GBM IV	1,7	n	0	-	1,32	+/-	+	5	24	+
59	75	m	GBM IV	1,7	n	0	-	21,3	n.a	+	+/-	49	+
60	42	m	GBM IV	0,9	n	-	-	0,76	-/++	+	30	25	+
61	50	f	GBM IV	1,6	1	1	-	4,51	+(Rand)/-	+	<1	25	+
62	71	f	GBM IV	1,4	n	-	-	1,3	++	+	90-100	11	+
63	55	m	GBM IV	0,6	14	22	-	1167	+++	+/-	+/-	16	+
64	70	m	GBM IV	1,3	n	0	-	44,9	n.a.	+	-	29	+
65	69	m	GBM IV	0,4	-	-	0	93,3	+++	+	-	13	+
66	61	m	GBM IV	0,3	n	0	-	20,1	n.a.	+	20-30	26	+
67	66	f	GBM IV	1,6	-	-	0	173	+++	+	-	13	+
68	45	m	GBM IV rez	0,4	-	-	0	1,78	+++	+	5	35	+
69	78	f	GBM IV	0,5	n	-	-	3,78	+++	+	90	75	+
70	63	m	GBM IV	0,5	n	2	-	2	+++	+/-	10	35-50	+/-
71	77	m	GBM IV	0,1	-	-	3	51,2	+++	+	10	30	+
72	73	m	GBM IV	1,2	-	-	2	122	+++	+	+/-	20	+
73	63	m	GBM IV rez	1,2	-	-	0	0,89	+/-	+	+/-	+/-	+
74	53	f	sec GBM IV	1,3	-	-	2	1,03	+/-	+	+/-	6,4	+/-

P-Nr.	A	G	Diagnose	Ü	Anzahl CTC in 2,1 x 10 ⁶ MNC			EGFR Amplifikation PT		Immunhisto PT			
					prä OP	post OP	während OP	qPCR	Histo	GFAP	p53 (%)	MAP2c	Ki67 (%)
75	64	m	GBM IV	1,3	0	0	-	21	+++	+	10	39	+
76	67	m	GBM IV	1,2	-	-	0	0,69	n.a.	+	50	75	+
77	51	m	GBM IV	1,2	0	0	-	0,8	-	+	+/-	17	+/-
78	57	f	GBM IV	1,2	1	2	-	0,78	+++	+	<5	9	+
79	49	m	GBM IV	0,7	0	4	-	0,47	+/-	+	30	30	+
80	63	m	GBM IV	1,1	-	-	0	1,2	+++/- heterogen	+	10	25	+
81	51	f	GBM IV rez	0,9	0	1	-	1,43	+++	+	10	50	+
82	44	m	GBM IV	1	0	0	-	1,92	-	+	100	30	+
83	60	m	GBM IV	0,9	0	0	-	1,21	n.a.	+	80	30	+
84	55	m	GBM IV	n.a.	0	0	-	38,7	-/+++ heterogen	+	-	20-30	+
85	83	m	GBM IV	0,1	-	-	0	14,7	+++	+	5	15	+
86	73	f	GBM IV	0	0	-	-	1,98	-	+	30	15	+
87	46	f	GBM IV	0,9	0	0	-	2,42	-	+	12	15	+
88	58	m	GBM IV	0,7	0	0	-	0,42	+++	+	1	40	+
89	60	m	GBM IV	0,8	-	-	0	2,42	n.a.	+	3	3	+
90	76	m	GBM IV	0,6	-	0	-	2	n.a.	+	-	50	+
91	58	m	GBM IV	0,8	-	-	0	27,8	+++	+	5	30	+
92	64	m	GBM IV	0,7	-	-	0	1	-	+	+/-	11	+/-
93	73	f	GBM IV	0,6	0	0	-	1,45	-/+++	+	80	++	+
94	73	m	GBM IV	0,5	-	-	0	1,36	-	+	-	40-50	+
95	72	f	GBM IV	0,6	0	0	-	1,05	-/+++	+	-	19	+
96	70	f	GBM IV	0,4	0	0	-	7,9	+++	+	-	14	+
97	67	f	GBM IV	0,6	-	-	0	0,77	-	+	50	30-40	+
98	41	m	GBM IV	0,5	-	-	0	0,47	n.a.	+	20	50	+
99	61	m	GBM IV	0,5	0	0	-	0,52	++ bis +++	+	-	20	+
100	63	f	GBM IV	0,4	-	-	0	0,71	-	+	50	50	+

P-Nr.	A	G	Diagnose	Ü	Anzahl CTC in 2,1 x 10 ⁶ MNC			EGFR Amplifikation PT		Immunhisto PT			
					prä OP	post OP	während OP	qPCR	Histo	GFAP	p53 (%)	MAP2c	Ki67 (%)
101	53	f	GBM IV	0,4	-	-	0	0,69	+++ bis ++++	+	+/-	33	+
102	50	m	GBM IV	0,4	0	0	-	1,97	+++	+	10	26	+
103	62	f	GBM IV	0,4	-	-	4	0,28	+++	+	10	52	+
104	66	m	GBM IV	0,3	-	-	0	1,85	+++	+	20	30	+
105	57	m	GBM IV	0,3	-	-	0	20,9	+++	+	5	35	+
106	69	f	GBM IV	0,3	-	-	0	1,05	-/+++	+	5	32	+
107	78	m	GBM IV	0,1	0	0	-	n.a.	n.a.	+	90	50-75	+
109	60	m	GBM IV	0,2	-	-	0	0,8	-/+++	+	10	30	+
110	54	f	GBM IV	0	0	0	-	1,24	+++	+	10	15	+
111	53	f	GBM IV rez	0	-	-	0	0,53	+++	+	10	10	+
112	61	m	GBM IV	0,1	0	0	-	35,5	+++	+	10	35	+
113	68	m	GBM IV	0,1	0	-	-	91,3	+++	+	10	+++	+
114	55	f	GBM IV	0	-	-	1	1	++	+	-	20	+

Tabelle A -IV: Patienten mit *Glioblastoma multiforme*-Rezidiv (Klinik und Polyklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Bei der Tumor-Resektion wurde den Patienten peripheres Blut prä- und postoperativ entnommen und auf die Präsenz von GFAP-positiven Zellen untersucht. (a = Probe bei Rezidivbehandlung)

P-Nr. = Patientennummer; A = Alter; G = Geschlecht; PT = Primärtumor; Ü = Überlebenszeit (Jahre); rez. = Rezidiv; sec. = sekundär

P-Nr.	A	G	Diagnose	Ü	Anzahl CTC in $2,1 \times 10^6$ MNC			EGFR Amplifikation PT			Immunhisto PT			
					prä OP	post OP	während OP	qPCR	FISH	Histo	GFAP	p53 (%)	MAP2c	Ki67 (%)
25	53	m	GBM IV	1,5	0	0	-	41,2	k.a.	+++	+	-	+	+++
25a	53	m	GBM IV rez zu 25	1,2	0	-	-	462	k.a.	k.a.	+	10	+	25%
29	37	f	GBM IV	1,3	0	0	-	0,22	k.a.	+	+	7	+	16%
29 a	38	f	GBM IV rez zu 29	0,7	-	-	0	9,31	k.a.	+++	+	10	+	30%
42	56	f	GBM IV rez	0,8	0	0	-	0,33	k.a.	+	+	90	+	75%
42a	56	f	GBM IV2. rez zu 42	0,2	0	0	-	0,54	k.a.	k.a.	+	-	+	20-30%
57	59	f	GBM IV	1,9	p	0	-	376	Cluster	+++	+	+/-	+	13,50%
57a	59	f	GBM IV rez zu 57	1,4	-	0	-	5,29	k.a.	k.a.	+	-	+	5%
77	51	m	GBM IV	1,4	0	0	-	0,8	k.a.	-	+	+/-	+/-	17%
77a	52	m	GBM IV rez zu 77	0,6	-	-	0	0,88	k.a.	k.a.	+	+/-	+	32%
79	49	m	GBM IV	0,7	0	p	-	0,47	Cluster/14 cells 1,24	+/-	+	30	+	30%
79 a	49	m	GBM IV rez zu 79	0,6	-	-	p	0,03	2,24	+	+	>75	+	+++

Tabelle A -V: Zusammenfassung von CTC-positiven GBM-Patienten.

P-Nr. = Patientennummer; A = Alter; G = Geschlecht; PT = Primärtumor; Ü = Überlebenszeit (Jahre); rez. = Rezidiv; sec. = sekundär

P-Nr.	A	G	Diagnose	Ü	Anzahl CTC in 2,1 x 10 ⁶ MNC			EGFR Amplifikation PT			Immunhisto PT			
					prä OP	post OP	während OP	qPCR	FISH	Histo	GFAP p53 (%)	MAP2c	Ki67 (%)	
1	63	w	GBM	2,3	-	2	-	168	11,1	+++	+	15	n.a.	25
2	49	m	GBM 2. rez	0,2	-	1	-	72,6	n.a.	+	+	57	n.a.	35
3	67	w	GBM	2,4	-	6	-	48,5	Cluster	+++	+	5	+	20
12	27	m	Rez. GBM IV	0,8	2	6	-	2,42	1	-	+/-	>90	+	75
21	25	m	GBM IV	3,1	1	1	-	0,95	1	-	+/-	>75	+	+++
22	83	m	GBM IV	0,8	3	1	-	488	Cluster/17 Zellen: 1,06	+++	+	5	+	23
24	75	w	GBM IV	0,2	1	n.a.	-	11,2	Cluster	+++	+	40	+	13
27	62	w	GBM IV	1,7	n.a.	2	-	32,9	Cluster	+++	+	20-30	+	+++
32	64	w	GBM IV	2,5	3	0	-	3,11	n.a.	n.a.	+	-	+	50
44	67	m	GBM IV	2	0	1	-	36,2	Cluster/7Zellen:1,4	+/-	+	-	+/-	5
49	52	m	GBM IV	2,1	4	6	-	0,7	1	-	+	-	+	>25
50	71	w	GBM IV	0,4	11	1	-	47,7	Cluster/13 Zellen: 1,32	+++	+	20	+	50
51	70	w	rez. GBM IV	0,3	-	1	-	56,8	Cluster	+++	+	-	+	34
52	65	w	GBM IV	0,3	n.a.	1	-	27	Cluster	+++	+	<5	+	30
53	61	m	GBM IV	0,6	6	3	-	2,39	1	-	+	30	+/-	18
57	59	w	GBM IV	1,9	1	n	-	376	Cluster	+++	+	+/-	+	13,5
61	50	w	GBM IV	1,6	1	1	-	4,51	neg/Rand Cluster	+(Rand)/-	+	<1	+	25
63	55	m	GBM IV	0,6	14	22	-	1167	Cluster	+++	+/-	+/-	+	16
70	63	m	GBM IV	0,5	n.a.	2	-	2	Cluster	+++	+/-	10	+/-	35-50
71	77	m	GBM IV	0,1	-	-	3	51,2	Cluster	+++	+	10	+	30
72	73	m	GBM IV	1,2	-	-	2	122	Cluster	+++	+	+/-	+	20
74	53	w	sec GBM IV	1,5	-	-	2	1,03	1	+/-	+	+/-	+/-	6,4
78	57	w	GBM IV	1,4	1	2	-	0,78	Cluster	+++	+	<5	+	9
79	49	m	GBM IV	0,7	0	4	-	0,47	Cluster/14 Zellen: 1,24	+/-	+	30	+	30
81	51	w	rez. GBM IV	0,9	n.a.	1	-	1,43	2,24	+++	+	10	+	50
103	62	w	GBM	0,6	-	-	4	0,28	0,92	+++	+	10	+	52
114	55	w	GBM	0,3	-	-	1	1	1,3	++	+	-	+	20

Primärkultur von Tumorzellen

Tabelle A -VI: Patientinnen mit Mammakarzinom (Institut für Stammzell-Technologie und experimentelle Medizin GmbH). Dieses Blut wurde zum einen auf die Präsenz von CTCs durch das *CellSearch*TM-System untersucht (CTC Nr.). Zum anderen wurden MNC über *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation angereichert und in Kultur genommen.

P-Nr.	CTC Nr.	P-Nr.	CTC NR	P-Nr.	CTC Nr	P-Nr.	CTC Nr.
HD-1	19	HD-43	0	HD-82	0	HD-124	1
HD-2	24	HD-44	0	HD-83	0	HD-125	2
HD-3	1	HD-45	6	HD-84	2	HD-126	0
HD-4	35	HD-43	7	HD-85	0	HD-127	17
HD-5	1	HD-44	26	HD-86	n.a.	HD-128	65
HD-6	4	HD-45	0	HD-87	81	HD-129	1
HD-7	3	HD-46	127	HD-88	13	HD-130	3
HD-8	n.a.	HD-47	24	HD-89	56	HD-131	4
HD-9	0	HD-48	0	HD-90	0	HD-132	13
HD-10	1	HD-49	3	HD-91	0	HD-133	0
HD-11	2	HD-50	0	HD-92	1	HD-134	0
HD-12	0	HD-51	0	HD-93	0	HD-135	0
HD-13	n.a.	HD-52	3	HD-94	12	HD-136	0
HD-14	0	HD-53	44	HD-95	6	HD-137	2
HD-15	0	HD-54	2	HD-96	4	HD-138	0
HD-16	2	HD-55	0	HD-97	0	HD-139	19
HD-17	29	HD-56	3	HD-98	0	HD-140	0
HD-18	112	HD-57	0	HD-99	0	HD-141	0
HD-19	0	HD-58	0	HD-100	1	HD-142	0
HD-20	0	HD-59	12	HD-101	0	HD-143	0
HD-21	13	HD-60	1	HD-102	1	HD-144	1
HD-22	2	HD-61	2	HD-103	12	HD-145	44
HD-23	19	HD-62	0	HD-104	0	HD-146	0
HD-24	0	HD-63	0	HD-105	2	HD-147	4
HD-25	0	HD-64	0	HD-106	0	HD-148	0
HD-26	0	HD-65	0	HD-107	0	HD-149	0
HD-27	7	HD-66	4	HD-108	0	HD-150	0
HD-28	0	HD-67	0	HD-109	46	HD-151	0
HD-29	0	HD-68	0	HD-110	0	HD-152	0
HD-30	15	HD-69	0	HD-111	10	HD-153	1
HD-31	0	HD-70	0	HD-112	0	HD-154	1
HD-32	0	HD-71	0	HD-113	52	HD-155	0
HD-33	0	HD-72	0	HD-114	16	HD-156	0

Anhang

P-Nr.	CTC Nr.	P-Nr.	CTC NR.	P-Nr.	CTC Nr.	P-Nr.	CTC Nr.
HD-34	0	HD-73	1	HD-115	1	HD-157	2
HD-35	54	HD-74	0	HD-116	0	HD-158	0
HD-36	0	HD-75	4	HD-117	184	HD-159	0
HD-37	39	HD-76	0	HD-118	1	HD-160	0
HD-38	1	HD-77	1	HD-119	0	HD-161	0
HD-39	3	HD-78	0	HD-120	0	HD-162	138
HD-40	n.a.	HD-79	12	HD-121	104	HD-163	0
HD-41	n.a.	HD-80	0	HD-122	1		
HD-42	335	HD-81	2	HD-123	0		

P-Nr. = Patientennummer; CTC-Nr. = Anzahl detektierter CTCs in 7,5 mL Blut durch CellSearch™-System

Tabelle A -VII: Patientinnen mit Mammakarzinom (Institut für Stammzell-Technologie und experimentelle Medizin GmbH). Den Patientinnen wurde eine Knochenmarkprobe entnommen. MNC wurden über *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation angereichert und auf Objektträger zentrifugiert sowie in Kultur genommen. Auf Grundlage der APAAP-Färbung (PAK: A45/BB3) von $2,1 \times 10^6$ MNC pro Patient wurde eine Diagnose zur Präsenz von DTCs erstellt.

P-Nr.	Anzahl DTC in $2,1 \times 10^6$ MNC
HD-KM 1	8 defekt
HD-KM 2	6
HD-KM 3	17
HD-KM 4	0
HD-KM 5	10
HD-KM 6	0

P-Nr. = Patientennummer

Tabelle A -VIII: Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen für primäre Tumorzellen verwendete Pleurapunktate von Karzinompatienten (Klinik und Poliklinik für Gynäkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

P-Nr.	Information	Diagnose
PL-1	HER2 neg/ ER pos	Mammakarzinom
PL-2	HER2 neg/ ER pos	Mammakarzinom
PL-3	HER2 neg/ ER neg	Mammakarzinom
PL-4	HER2 neg/ ER pos	Mammakarzinom
PL-5	n.a.	Vulvakarzinom
PL-6	HER2 neg/ER neg	Mammakarzinom
PL-7	n.a.	Ovarialkarzinom

P-Nr. = Patientennummer

Tabelle A -IX: Zur Kultivierung von DTCs verwendete Knochenmarkaspirate von Karzinompatienten (Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Anhang

P-Nr.	G	A	Karzinom
P-1	m	73	metastatisches Kolonkarzinom
P-4	w	63	Mammakarzinom
P-5	w	38	Mammakarzinom
P-7	w	n.a.	Bronchialkarzinom
P-8	m	36	Dünndarm-Leberkarzinom
P-9	w	57	Mammakarzinom
P-10	m	29	Magenkarzinom
P-11	w	71	Pankreaskarzinom

Anhang

Tabelle A -X: Zur Kultivierung von CTCs/DTCs verwendete Blutproben und Knochenmarkaspirate von verstorbenen Karzinompatienten (Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

P-Nr.	Probe	G	A	hpm	Karzinom	Anzahl CTCs/DTCs in $2,1 \times 10^6$ MNC
RM-1	KM	w	77	6,5	Ovarialkarzinom	0
RM-2	KM	m	89	4	Prostatakarzinom	0
RM-3	KM	w	84	3,5	Karzinom unbekannter Herkunft	0
RM-4	KM	m	67	7	Urothel/Prostatakarzinom	20
RM-5	KM	m	69	4	Bronchialkarzinom	0
RM-6	KM	m	68	12,5	nicht kleinzelliges-Bronchialkarzinom	0
RM-7	KM	m	83	12	Lungenkarzinom	0
RM-8	KM	w	71	12	Ösophagus-Barrettkarzinom	0
RM-9	KM	w	60	3	Mundbodenkarzinom	0
RM-10	KM	m	67	6	Bronchialkarzinom	0
RM-11	KM	w	70	7	Cholanis-zelluläres Karzinom	0
RM-12	KM	w	48	7	Mammakarzinom	0
RM-13	KM	m	61	22	Bronchialkarzinom	10
RM-14	BL	w	81	21	Adenokarzinom	0
RM-15	BL	w	44	17,5	Karzinom unbekannter Herkunft	>100
RM-16	KM	m	70	9	großzelliges Bronchialkarzinom	0
RM-17	BL	m	66	14	Kolonkarzinom	0
RM-18	KM	w	63	28	Analkarzinom	0
	BL					>2500
RM-19	KM	m	68	14	Nierenzellkarzinom	>100
RM-20	KM	w	66	7,5	Bronchialkarzinom	0
RM-21	KM	w	53	6	kleinzelliges Bronchialkarzinom	>100
RM-22	BL	w	58		Bronchialkarzinom	20 defekte CTCs
RM-23	KM	m	74	6,5	metastatisches Pankreaskarzinom	0
	BL					0
RM-24	KM	w	85		Lungenkarzinom	0
RM-25	KM	m	78		Mundbodenkarzinom	0
	BL					0
RM-26	KM	w	64	4	nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom	0
RM-27	KM	m	84	8,5	Prostatakarzinom	0
	BL					>100
RM-28	KM	w	62	10	Mammakarzinom mit Metastasen	0
RM-29	KM	m	63	14	metastatisches Ösophaguskarzinom	>50
RM-30	KM	w	36	5	Mammakarzinom mit Hirnmetastasen	0
	BL	w	36	5		0
RM-31	BL	m	71	28	metastatisches Bronchialkarzinom	k.a.

P-Nr.	Probe	G	A	hpm	Karzinom	Anzahl CTC/DTC in $2,1 \times 10^6$ MNC
RM-32	KM	m	70	5	Pankreaskarzinom	<i>k.a.</i>
RM-33	BL	m	79	5	Prostatakarzinom	<i>k.a.</i>
RM-34	BL	m	72	5	Ösophaguskarzinom	<i>k.a.</i>

P-Nr. = Patientennummer, G = Geschlecht, KM = Knochenmark, BL = Blut; A = Alter; hpm = Stunden *post mortem*

II. Zusätzliche Abbildungen

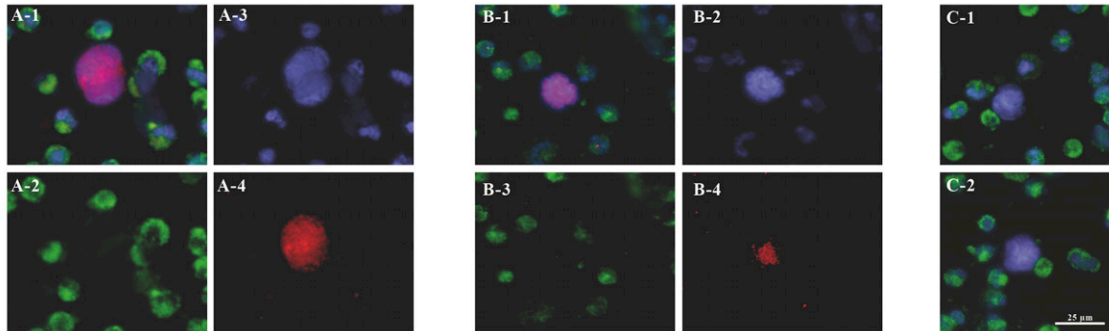


Abbildung A I: IF GFAP-Färbung der MNC von Patient #53. TRITC: PAK: Kaninchen-anti-human-GFAP-IgG; SAK: anti-Kaninchen-IgG *Alexa Fluor*TM-564; FITC: direkt gekoppelter *Alexa Fluor*TM-488 anti-human CD45-IgG; Dapi: *VECTASHIELD*[®] *Hard-Set*TM *Mounting-Medium* mit DAPI. A = CTC vor OP; B = CTC nach OP; C = GFAP-negative, morphologisch auffällige Zellen (1 = präoperativ, 2 = postoperativ).

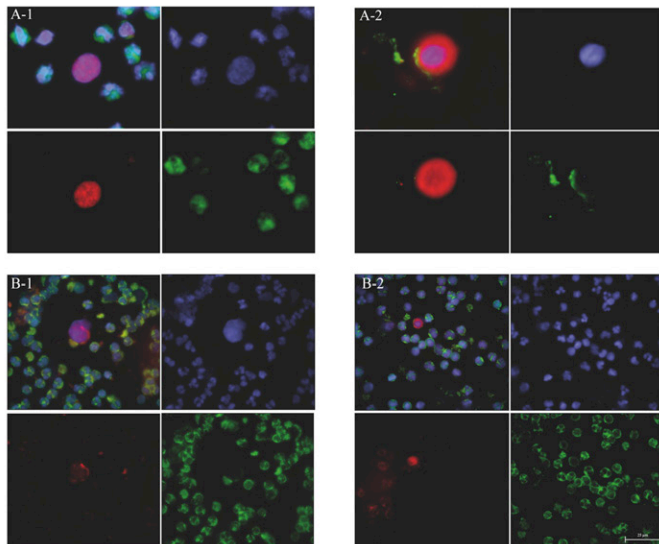


Abbildung A II: IF MNC von Patient G-1. TRITC: PAK: A: Kaninchen-anti-human-GFAP-IgG/ B: Maus-anti human EGFR-IgG; SAK: anti-Kaninchen-IgG *Alexa Fluor*TM-564/ anti-Maus-IgG *Alexa Fluor*TM-546; FITC: direkt gekoppelter *Alexa Fluor*TM-488 anti-human CD45-IgG; Dapi: *VECTASHIELD*[®] *Hard-Set*TM *Mounting-Medium* mit DAPI. 1 = CTC präoperativ; 2 = CTC postoperativ.

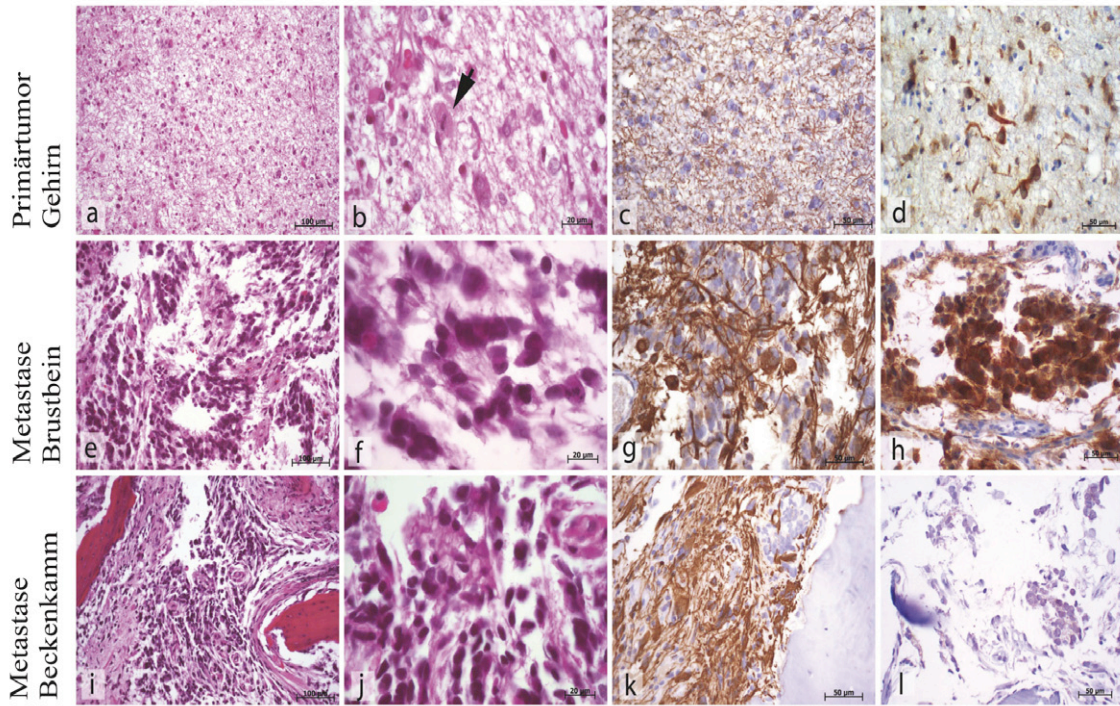


Abbildung A III: Histopathologische und immunohistochemische Charakterisierung des Primärtumors und der Skelettmastasen des Astrozytompatienten G-10 entnommen aus Mertens *et al.*⁴³. Obere Reihe (a, b, c, d): Cerebraler Tumor mit diffus-infiltrierenden astrozytischen Tumorzellen in einem fibrillaren Hintergrund (a) zeigt beträchtliche Hyperchromasien und atypische Zellkerne (b) mit vereinzelt mitotischen Bereichen (b, Pfeil) und ist immunohistochemisch positiv für GFAP (c) und IDH1 (d). Mittlere Reihe (e, f, g, h): Tumor im Sternum mit pleomorphologischen Gliazellen in einem Mucin-reichen Hintergrund (e) mit hyperchromatischen atypischen Zellkernen (f) und einer starken Immunreaktion für GFAP und IDH1 (g, h). Untere Reihe (i, j, k, l): Tumor des Beckenkamms zeigt Gliazellen in einem Mucin-reichen Hintergrund (i) mit hyperchromatischen Zellkernen (j) und einer starken Immunreaktion für GFAP (k) und einer schwachen Positivität für IDH1 (l).⁴³

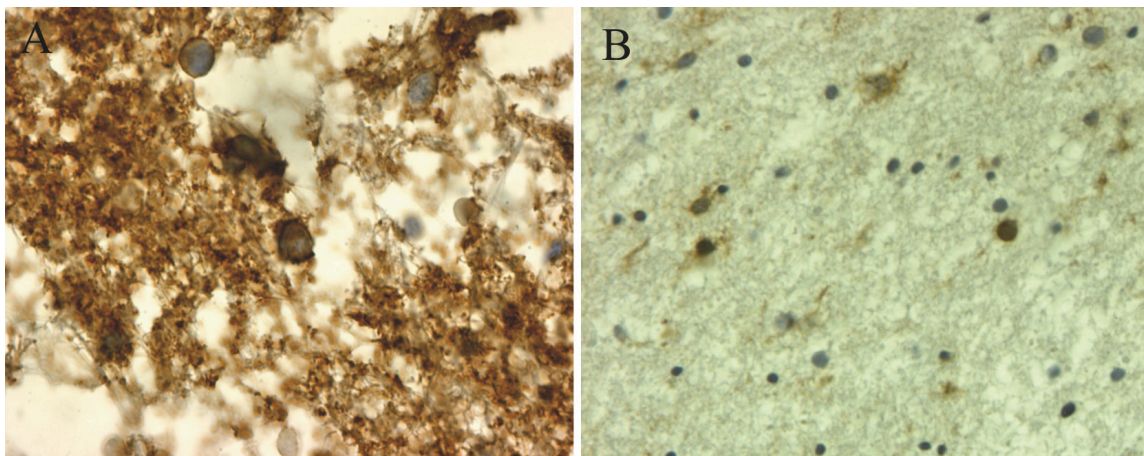


Abbildung A IV: DAB-Färbung von Gewebeschnitten des Primärtumors von Astrozytom-Patient G-10. A= PAK: Maus-anti human Emmpin-IgG, B = PAK: Maus-anti human EGFR-IgG, Kernfärbung mit Hamalaun (1:10).

Tabelle A - XI: Anzahl analysierter MNC von Patient G-10, die mittels immunhistochemischer Untersuchungen auf eine Expression von glialen bzw. tumorassoziierten Proteinen untersucht wurden.

Antigen	Anzahl untersuchter MNCx10 ⁵ Patient G-10		Anzahl detektierter CTCs
	Positivfärbung	Negativfärbung	
Immunfluoreszenzfärbung			
GFAP	35	14	0
EGFR	7	7	0
TP53	7	7	0
CD 174	7	7	0
Färbung mittels APAAP-Methode			
GFAP	14	7	0
TP53	14	7	0
EGFR	7	7	0

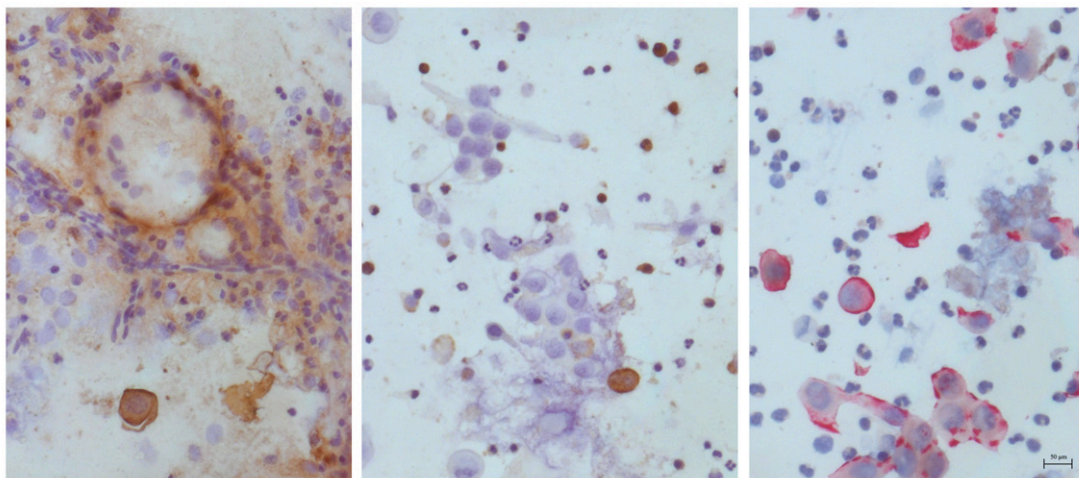


Abbildung A V: Färbung der BLC-1-Tumorzellen aus dem Knochenmark vor Kultivierung. PAK: Links = Maus-anti human AE1/AE3-IgG, DAB-Färbung; Mitte = Maus-anti human EGFR-IgG, DAB-Färbung; Rechts = Maus-anti human A45/BB3-IgG, APAAP-Färbung; Kernfärbung mit Hamalaun (1:10).

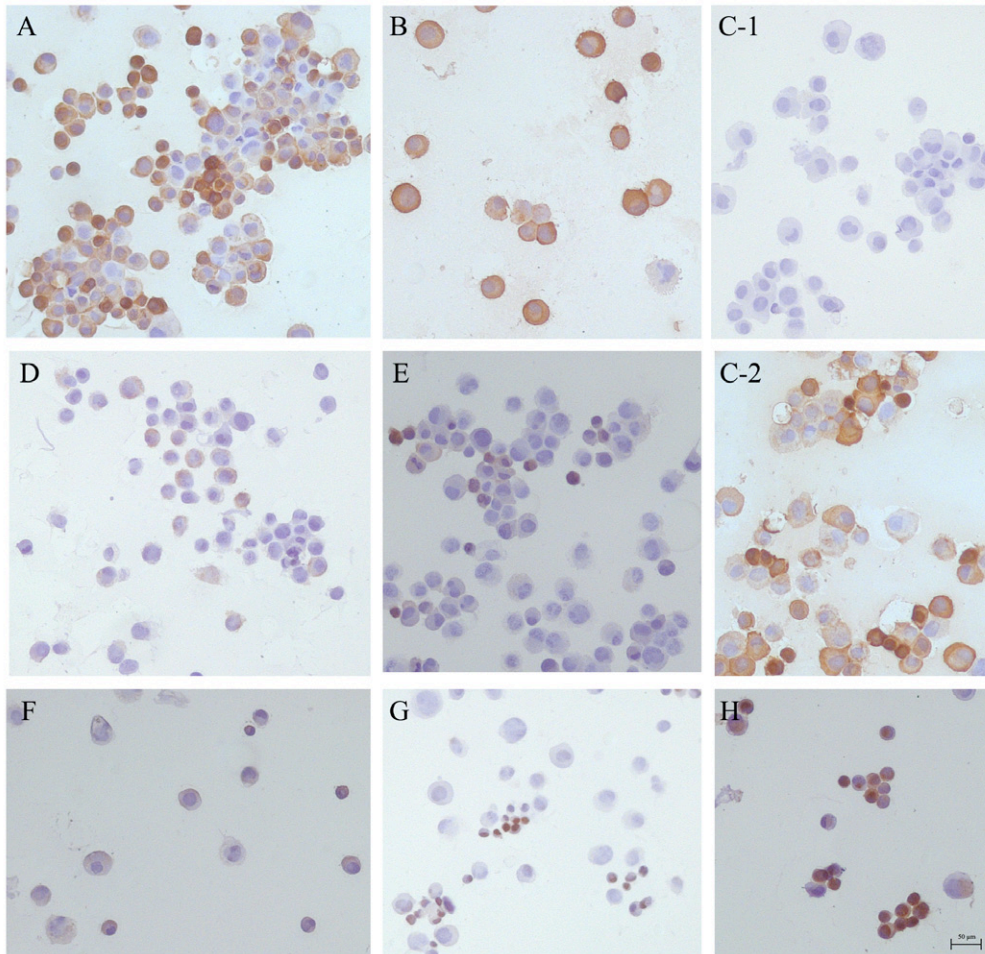


Abbildung A VI: DAB-Färbung von kultivierten BLC-1-Tumorzellen, Passage 3. PAK: A = Maus-anti human A45/BB3-IgG, B = Maus-anti human AE1/AE3-IgG, C = Maus-anti human EpCAM-IgG, D = Maus-anti human HER2-IgG; E = Maus-anti human Zytokeratin 7/13/17-IgG, F = Maus-anti human EGFR-IgG, G = Maus-anti human p53-IgG, H = Maus-anti human C11-IgG; Kernfärbung mit Hamalaun (1:10).

III. Materialien

Tabelle A - XII: Analysesoftware und Datenbanken

Bezeichnung	Verwendung	Quelle
<i>Realplex Software V2.02</i>	Steuerung und Auswertung der Realtime-PCR	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Sequence Analysis Tool</i>	Visualisierung/Auswertung von DNA-Sequenzierungen	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>FinchTV</i>	Visualisierung/Auswertung von DNA-Sequenzierungen	www.geospiza.com/finchtv/
<i>Sequence Manipulation Suite</i>	Analyse von DNA Sequenzen	www.bioinformatics.org/sms2/
<i>NCBI</i>	Datenbank (DNA, RNA, Proteine, Literatur etc.)	www.ncbi.nlm.nih.gov
<i>UCSC</i>	Datenbank (DNA, RNA, Proteine etc.)	http://genome.ucsc.edu/
<i>IBM SPSS Statistics V19</i>	statistische Auswertung	IBM Corporation N.Y. USA
<i>Adobe Photoshop CS5</i>	Auswertung Zellwachstum	Adobe Systems

Tabelle A - XIII: Verwendete Kitsysteme

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
<i>BigDye(R) Terminator v. 1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit</i>	Sequenzierung	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>Genomiphi V2 DNA Amplification Kit</i>	Ganz-genomische DNA Amplifikation	GE Healthcare, München
<i>NucleoSEQ Colums</i>	Aufreinigung WGA-Produkt	Macherey –Nagel, Düren
<i>QIAmp(R) DNA Micro Kit</i>	DNA Isolation	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick(R) Gel Extraction Kit</i>	DNA Isolation	Qiagen, Hilden
<i>peqGOLD Gel Extrction Kit</i>	DNA Isolation	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen, D
<i>CellSearch Epithelial Cell Kit</i>	CTC-Detection	Veridex LLC, Warren, USA
<i>Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse</i>	Immunfärbung	Dako, Glostrup, DK

Tabelle A - XIV: Für die Zellkultur verwendete Medien

Name	Grundmedium	Zusätze (Endkonzentration)	Code
Tumorzellmedium I (37 °C; 10 % CO ₂)	D-MEM	10 % FCS 2 mM L-Glutamin 200 U/mL Pen/Strep	Medium A
Tumorzellmedium II (37 °C; 5 % CO ₂)	RPMI	10 % FCS 2 mM L-Glutamin 200 U/mL Pen/Strep	Medium B
Neurosphären (37 °C; 5 % CO ₂)	Neurobasal	10 % FCS 2 mM L-Glutamin 200 U/mL Pen/Strep Fungizon B27-Supplement 20 ng/mL FGF-b 5 µL/mL Heparin	Medium C
Primärkultur (37 °C; 5 % CO ₂) "Complete-Medium" 80	RPMI	10 % FCS 2 mM L-Glutamin 200 U/mL Pen/Strep 1fach IST 50 ng/mL EGF 10 ng/mL FGF-b	Medium D
Primärkultur (37 °C; 5 % CO ₂) "Complete-Medium" ⁺	RPMI	10 % FCS 2 mM L-Glutamin 200 U/mL Pen/Strep 1fach IST 50 ng/mL EGF 10 ng/mL FGF-b 1 µg/mL Hydrocortison 100 ng/mL Cholera Toxin	Medium E
Einfriermedium	jeweiliges Grundmedium	90 % Kulturmedium 10 % DMSO	-
Depletionsmedium	RPMI-Medium	RPMI-Medium 2 mM L-Glutamin 0,1 mg/mL BSA	-

Verwendete Primer

Tabelle A -XV: Verwendete Primer für qPCR-Analysen

Primer	Länge (bp)	Sequenz (5'-3')	Temperatur (°C)
qRT <i>EGFR</i> Exon 28	120	GCTCTGTGCAGAATCCTG GGACAGTGTGAGATACTCG	58
qRT <i>LINE 1</i> ¹⁰²	149	AAAGCCGCTCAACTACATGG TGCTTTGAATGCGTCCCAGAG	58
qRT <i>EGFR</i> Exon 8 ¹⁰²	107	CACCGTCATCACCTTCCTTTC TCCTCCATTCATAGCTGTCG	58

Tabelle A -XVI: Verwendete Primer für Mutationsanalysen im *TP53*-Gen

Primer	Länge (bp)	Sequenz (5'-3')	Temperatur (°C)
<i>TP53</i> Exon 4	346	CTGACTGCTCTTTTCACC ATTGAAGTCTCATGGAAGC	58
<i>TP53</i> Exon 5/6 ⁹⁷	477	CACTTGTGCCCTGACTTTC ACTGACAACCACCCTTAACC	58
<i>TP53</i> Exon 7 ⁹⁷	267	CTGCTTGCCACAGGTCTC TGGAAGAAATCGGTAAGAGG	58
<i>TP53</i> Exon 8/9 ⁹⁷	569	TTAGGCTCCAGAAAGGACAAG CAGGAGCCATTGTCTTTGAG	58

Tabelle A -XVII: Verwendete Primer für Mutationsanalysen im *PTEN*-Gen

Primer	Länge (bp)	Sequenz (5'-3')	Temperatur (°C)
<i>PTEN</i> Exon 1	250	TTCCATCCTGCAGAAGAAGC	54
		CCAAACTACGGACATTTTCGC	
<i>PTEN</i> Exon 2	377	TGACCACCTTTTATTACTCCAG	56
		GTCCATTAGGTACGGTAAGC	
<i>PTEN</i> Exon 3	292	GAAGGGGTATTTGTTGGA	50
		CTACCTCACTCTAACAAGC	
<i>PTEN</i> Exon 4	263	CACAGCATAATATGTGTCAC	56
		GTATCTCACTCGATAATCTGG	
<i>PTEN</i> Exon 5	508	GGAAAATAATACCTGGCTTCCT	58
		CAGATCCAGGAAGAGGAAAG	
<i>PTEN</i> Exon 6	257	ACGACCCAGTTACCATAGC	56
		GGAAGGATGAGAATTTCAAGC	
<i>PTEN</i> Exon 7	362	CAGTTTGACAGTTAAAGGC	54
		GCCAGAGTAAGCAAAACA	
<i>PTEN</i> Exon 8.1	327	GCAACAGATAACTCGATTGC	56
		CATTATCTGCACGCTCTATACT	
<i>PTEN</i> Exon 8.2	341	CATTCTTCATACCAGGACCA	56
		TACTGCTACGTAAACACTGC	
<i>PTEN</i> Exon 9	435	GGCCTCTTAAAGATCATGTTTG	56
		CTGACACAATGTCCTATTGC	

Verwendete Antikörper

Tabelle A – XVIII: Verwendete Primär-Antikörper zur Immunhistochemischen Detektion von Tumorzellen. (ZS= Zytospin, PS =Paraffinschnitte; * = Permeabilisierung; ü.N. = über Nacht)

Antikörper	Hersteller	Verdünnung		Vorbehandlung
		ZS	PS (Inkubationszeit, Temperatur)	
Polyklonaler Kaninchen-anti-GFAP-IgG	Dako Glostrup, DK	1:100	-	-
Alexa Fluor™ 488 Maus-anti-human CD45-IgG (Klon H130)	Biologend, Biozol, Eching, D	1:150	-	-
PAN Zytokeratine (CK 7/18) A45/BB3-Cy3	Micromet, München, D	1:300	-	-
P AN Zytokeratine (CK 7/18) A45/BB3 monoklonaler Mausantikörper	Micromet, München, D	1:100	1:200 (ü.N., 4 °C)	5 min 125 °C Citratpuffer (BioGenex)
Maus-IgG1 Purified Immunglobulin (MOPC-21)	Sigma,	1:500	-	-
Maus-anti-NCL-ESA –Antikörper (EpCAM) (Klon VU1D9)	Calbiochem, Darmstadt, D	1:100*	-	-
Maus-anti-human CD147 (Klon HIM-6)	Fitzgerald	1:300	1:1000 (30 min, RT)	20 min 100 °C Citratpuffer (Dako)
Maus-anti-human-p53 IgG2ak (Klon DO-1)	Calbiochem, Darmstadt, D	1:100*	1:2000 (30 min, RT)	20 min 100 °C TEC-Puffer
Maus-anti-human Epidermal Growth Factor Receptor	Dako Glostrup, DK	1:50	1:100 (ü.N., 4 °C)	6 min Proteinase-K (Dako) (1:2 mit Aqua
Maus-anti-human Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-IgG (Klon AB-10)	Neo Markers, Fremont, USA	1:1000	-	-
NCL-L-ER (Östrogenrezeptor) (Klon 6F11)	Novocastra, Berlin, D	1:40*	-	5 min 125 °C Citratpuffer (BioGenex)
Pan Zytokeratine (CK 5/7/19) (Klon AE1/AE3)	Millipore, Billerica, USA	1:200	1:1000 (ü.N., 4 °C)	5 min 125 °C Citratpuffer (BioGenex)
Monoklonaler Maus-anti- human-CB11 IgG (HER2)	Novocastra, Berlin, D	1:50	1:80 (ü.N., 4 °C)	5 min 125 °C Citratpuffer (BioGenex)
Monoklonaler Maus-anti-human- Ki-67 Antigen (Klon MIB-1)	Dako Glostrup, DK	1:50	-	-
Monoklonaler Maus-anti-human- Zytokeratin 7/13/17 IgG	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, D	1:50	-	-
Monoklonaler Maus-anti-human- C11 Ms mAB (CK 4/5/6/8/10/13/18)-IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:250	1:500 (ü.N., 4 °C)	5 min 125 °C Citratpuffer (BioGenex)

Tabelle A - XIX: Verwendete Sekundär-Antikörper zur Immunhistochemischen Detektion von Tumorzellen

Antikörper	Firma	Verdünnung
Alexa Fluor™ 488 Esel anti-Maus-IgG	Invitrogen, Karlsruhe, D	1:200
Alexa Fluor™ 564 Ziege anti-Kaninchen-IgG	Invitrogen, Karlsruhe, D	1:200
Alexa Fluor™ 564 Ziege anti-Maus-IgG	Invitrogen, Karlsruhe, D	1:200
polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen-IgG/AP	Dako Glostrup, DK	1:40
Polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-IgG	Dako Glostrup, DK	1:20
APAAP Maus, monoKlonal	Dako Glostrup, DK	1:100

Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Tabelle A - XX: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer für <i>MACS</i> -Anreicherung pH 7,4	155 mM NH_4Cl (8,3 g/l), 10 nM KHCO_3 (1 g/l), 1 mM EDTA (2 mL StammLösung EDTA auf 1 l) StammLösung EDTA: 0,5 M EDTA (146,12 g/l; pH 8)
10x PBS (1l) pH 7,4	90 g NaCl, 14,33 $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2,67 g KH_2PO_4
10x TBST (1l) pH 7,6	60,5 g Trizma base (0,5 M), 87,7 g NaCl (1,5 M), 5 mL Tween- 20 (0,5 %),
50 x TE	242 g Tris in 500 mL H_2O , 100 mL 0,5 M Na_2EDTA (pH 8,0)

Tabelle A -XXI: Puffer und Lösungen speziell für die FISH-Analyse

Puffer	Zusammensetzung
20 x SSC-Puffer (1l) pH 7,0	175,3 g Natriumchlorid (NaCl) (3 M), 88,2 g Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O (0,3 M)
2 x SSC-0,3 % NP-40-Puffer (1l) pH 7,0	100 mL 20 x SSC-Puffer, 3 mL Nonidet P-40
Proteinase-K. Puffer	1 mL TBS (pH 7,4), 100 µL CaCl ₂ (1M), auf 50 mL Aq.dest → auf 37 °C erwärmen + 5 µL Proteinase-K 1 mg/mL
Denaturierungslösung pH 7,4	35 mL Formamid und 1,5 mL 20 x SSC auf 400 mL mit Aq.dest auffüllen
2xSSC/ 50% Formamid pH 7,2	200 mL Formamid und 40 mL 20xSSC auf 400 mL mit Aq.dest. auffüllen

Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Dako Pen	Dako, Glostrup, DK
Fixogum Rubber Cement	Promega GmbH, Madison, USA
Objekträger Super Frost / Plus	Assistent Glasfabrik Karl Hecht, Sondheim, D
Zellkulturflaschen/ -schalen	Biochrom AG, Berlin, D
<i>Sterile Syringe</i> Filter 0,2 µm PES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Neubauer Zählkammer	Menzel Gläser, Braunschweig, D
<i>England finder</i>	Plano GmbH, Wetzlar, D
MACS [®] LC-Säule	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Glatbach, D

Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Firma
AB-Serum	Biotest AG, Dreieich, D
Aceton	J.T. Baker, Deventer, NL
<i>Auto MACS[®]-Running Buffer</i>	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Glatbach, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
BSA (Bovines Serum Albumin)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Cholera Toxin	Enzo Life Science, Lörrach, D
<i>Dako Protein Blocking</i>	Dako, Glostrup DK
<i>Dako REAL[™] Antibody Diluent</i>	Dako, Glostrup DK
<i>Dako REAL[™] Peroxidase-Blocking Solution</i>	Dako, Glostrup DK
Desoxynucleoside Triphosphate Set (dNTPs)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Dextranblau	Roche, Penzberg, D
<i>Difco Agar Noble</i>	Becton Drive, Franklin Lakes, Nj USA
DMEM High Glucose-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva, Heidelberg, D
<i>DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder)</i>	Roche Applied Science, Penzberg, D
<i>Dulbeccos Phosphate bufferet saline ohne Ca⁺, Mg 2⁺ und NaH₂CO₃ (PBS-)</i>	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, D
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<i>Epimet Solution B (37 % Formaldehyd)</i>	Micromet, München, D
Erythrolysepuffer	Biochrom, Berlin, D
Essigsäure 96 %	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ethanol (Molekularbiologie abs.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ethanol 99 %	Walter-CMP GmbH, Kiel, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg, D
<i>FcR Blocking Reagent</i>	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Glatbach, D
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
<i>Ficoll-Paque Plus[™]</i>	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt, D
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<i>Glycergel Mounting Medium</i>	Dako, Glostrup, DK
Hank's Solution ohne Ca ⁺ , Mg 2 ⁺ und Phenolrot	Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, S

Chemikalie/Reagenz	Firma
Heat Pretreatment-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Mannheim, D
Humane Cot-1 DNA	Merck, Darmstadt, D
HPL-DNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Insulin-Transferin-Selenium-A	Gibco, Paisley, U.K.
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	Fermentas/ Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Methanol	J.T. Baker, Deventer NL
Meyers-Mämalau	Merck, Darmstadt, D
<i>MicroBeads</i>	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Glatbach, D
Mitomycin C from <i>Streptomyces caespitosus</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
N,N Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, D
Naphtol-AS-Biphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumbisulfit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Neufuchsin	Serva, Heidelberg, D
Neurobasal Medium	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, D
Nonidet P-40	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Hilden, D
Papain Solution	Biochrom AG, Berlin, D
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, D
Pepsin-Lösung	Cytovision, Nussloch, D
Protease (7.5 AU)	Quiagen, Hilden, D
Proteinase K	Marabuwerke, Tamm, D
RosetteSep human circulating epithelial tumor cell enrichment Cocktail	StemCell Technologies, Grenoble, F
RPMI 1640-Medium (Roswell Park Memorial Institute)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Salzsäure 1 N (HCl)	Merck, Darmstadt, D

Chemikalie/Reagenz	Firma
Seakem LE Agarose	Lonza, Rockland USA
TMAC (Tetraethylammoniumchlorid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Trizma base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Trypan Blue Solution (0,4%)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Trypsin-EDTA 10 x konzentriert	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, D
Tween-20	Merck, Darmstadt, D
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylene (Xylol)	J.T. Baker, Deventer NL
Xyol	Merck, Darmstadt, D

Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage CPA224S-OCE	Sartorius AG, Göttingen, D
Analysenwaage Satorius CP2245	MS Laborgeräte, Heidelberg, D
<i>Axiovert 200 inverted microscope</i>	Carl Zeiss AG, Jena, D
Biofuge pico Heraeus	Heraeus Kendro, Langenselbold, D
Durchlichtmikroskop (Zellkultur)	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D
Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenzkanal und Kamerasystem	Leica Mikroskopie GmbH, Wetzlar, D
Durchlichtmikroskop, Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D
Electrophoresis Power Supply P53002	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
England Finder	Plano GmbH, Wetzlar, D
Fluoreszenzmikroskop <i>Axioplan 2</i> Imaging, MetaSystem	Carl Zeiss AG, Jena, D
Geldokumentations-System GeneGenius 2	Syngene, Cambridge, UK
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, California, CA, USA
Heraeus Multifuge 3SR	Heraeus Kendro, Langenselbold, D
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mastercycler ep gradient	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mikroinjektor Cell Tram vario	Eppendorf AG, Hamburg, D
Nanodrop ND100 Spectrometer	PeqLab, Erlangen, D

Gerät	Hersteller
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen, D
<i>Realplex⁴ Mastercycler epgradient S</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
Rollmischer Stuart SRT1	Bibby Sterilin, Staffordshire, UK
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, D
Sterilbank Herasafe HS12	Heraeus Kendro, Langselbold, D
Thermomixer „kompakt“	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tischzentrifuge Rotofix 32	Hettich, Tutlingen, D
TransferMan NK2, Mikromanipulator	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, NY, USA
Wasserbad GFL-1002/03	GmbH für Labortechnik, Burgwedel, D
Zellkulturinkubator Hera cell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zytozentrifuge	Hettich, Tutlingen, D

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Alter
AK	Antikörper
BL	Blut
CD	Unterscheidungsgruppen (<i>Cluster of Differentiation</i>)
Chr	Chromosom
CGH	komparative genomische (<i>Comparative Genomic Hybridisation</i>)
aCGH	Array-CGH
mCGH	Methaphasen-CGH
CK	Zytokeratin (<i>cytokeratin</i>)
CTC	zirkulierende Tumorzellen (<i>CTC = Circulating Tumor Cells</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTC	disseminierte Tumorzellen (<i>DTC = Disseminating Tumor Cells</i>)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül (<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
G	Geschlecht
GBM	<i>Glioblastoma multiforme</i>
GFAP	saures Gliafaserprotein (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IST	Insulin-Transferrin-Selenium
k.a.	keine Angaben
KM	Knochenmark
KT	Knochtumor
m	männlich
MEF	embryonale Maus-Fibroblasten (<i>Embryonal Mouse Fibroblast</i>)
P-AK	Primärantikörper

Abkürzung	Bedeutung
PAK	primärer Antikörper
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
P-Nr.	Patientennummer (<i>Patient Identification number</i>)
PP	Pleurapunktat
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds Per Minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Medium
RT	Raumtemperatur
S-AK	Sekundärantikörper
SAK	sekundärer Antikörper
sog.	sogenannte
TC	Tumorzellen (<i>Tumor Cells</i>)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Ü	Überleben
w	weiblich
WGA	Gesamt-DNA Amplifikation (<i>Whole Genome Amplification</i>)
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	<i>Gliale Zellen und Gliome.</i>	2
Abbildung 1-2:	<i>WHO-Klassifizierung von Astrozytomen.</i>	3
Abbildung 1-3:	<i>Signalwege, die hauptsächlich in der Pathogenese von Glioblastomen involviert sind.</i>	4
Abbildung 1-4:	<i>Dissemination von Gliom-Tumorzellen im Gehirn.</i>	8
Abbildung 1-5:	<i>Die Metastatische Kaskade.</i>	12
Abbildung 1-6:	<i>Vergleichende Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensraten von CTC-positiven und -negativen Krebspatienten.</i>	13
Abbildung 1-7:	<i>Anreicherung und Detektion von CTCs aus peripherem Blut von Krebspatienten.</i>	14
Abbildung 1-8:	<i>Vergleichende Analyse der im Blut detektierten GFAP-positiven Einzelzellen mit dem korrespondierenden Primärtumor eines GBM-Patienten (#3).</i>	18
Abbildung 3-1:	<i>Schematische Darstellung der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.</i>	26
Abbildung 3-2:	<i>Anreicherung von CTCs/DTCs mittels RosetteSep[®]-Antikörpercocktail.</i>	27
Abbildung 3-3:	<i>Anreicherung über das MACS[®]-System.</i>	28
Abbildung 3-4:	<i>Schema der direkten (A) und indirekten (B) Immunfluoreszenzfärbung.</i>	33
Abbildung 3-5:	<i>Schematische Darstellung der immunzytochemischen APPAP- Färbung.</i>	35
Abbildung 3-6:	<i>Schematische Darstellung der Nachweis-Komplexe zur DAB-Färbung.</i>	37
Abbildung 3-7:	<i>Schematische Darstellung der Amplifikation von DNA aus Einzelzellen durch das GenomiPhi V2-WGA-Kit.</i>	39
Abbildung 3-8:	<i>Schematische Darstellung der verschiedenen Methoden zur vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH).</i>	42
Abbildung 4-1:	<i>Aus peripherem Blut durch den RosetteSep[®]-Antikörpercocktail angereicherte GBM-Zellen.</i>	47
Abbildung 4-2:	<i>Etablierung einer Standard-Detektionsmethode von CTCs im peripheren Blut von GBM-Patienten.</i>	49
Abbildung 4-3:	<i>Schematischer Arbeitsablauf der Einzelzellanalyse zur Anreicherung, Detektion und Charakterisierung von CTCs aus dem Blut von Gliompatienten.</i>	50
Abbildung 4-4:	<i>MTPLX-PCR-Produkte von Patienten-Einzelzellen (Patient #63).</i>	52
Abbildung 4-5:	<i>Visuelle EGFR-Analysen an MNC.</i>	54
Abbildung 4-6:	<i>Häufige Mutationen im GBM.</i>	54
Abbildung 4-7:	<i>Mutationsanalyse einer einzelnen Zelle der Zelllinie G-22 mittels Sangerverfahren.</i>	55
Abbildung 4-8:	<i>IF-GFAP-Färbung an MNC von Patient #63.</i>	59
Abbildung 4-9:	<i>IF an MNC von Patient G-10.</i>	59
Abbildung 4-10:	<i>Kaplan-Meier-Überlebensfunktion der untersuchten GBM-Patienten.</i>	60
Abbildung 4-11:	<i>EGFR-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf MNC bzw. Paraffinschnitten des Primärtumors von Patient #53.</i>	67
Abbildung 4-12:	<i>EGFR-Amplifikation von Tumorzellen des GBM-Patienten #63.</i>	69

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 4-13: Array-CGH-Profile des Primärtumors und der CTCs aus der prä- und postoperativen Blutprobe von Patient #63.</i>	71
<i>Abbildung 4-14: CGH-Profile von Primärtumoren CTC-positiver Patienten. Links: aCGH-Profile der Patienten #22 und #63.</i>	72
<i>Abbildung 4-15: FISH-Analyse am Paraffinschnitt des Primärtumors #63.</i>	73
<i>Abbildung 4-16: Detektierte Mutationen in CTCs von GBM-Patienten im TP53-Gen.</i>	74
<i>Abbildung 4-17: Mutationen, welche zunächst durch „Next-generation sequencing“ (NGS) im Primärtumor und anschließend mittels Sanger-Sequenzierung in den CTCs des Patienten #63 detektiert wurden.</i>	75
<i>Abbildung 4-18: Vergleichende aCGH-Profile von Tumorproben des Patienten G-10.</i>	77
<i>Abbildung 4-19: FISH-Analysen an Paraffinschnitten des Primärtumors von Patient G-10 zu Detektion eines Verlustes von Chr 4q und Chr 10q.</i>	77
<i>Abbildung 4-20: Vergleich verschiedener Verfahren zur Anreicherung und späteren Kultivierung von CTCs und DTCs.</i>	81
<i>Abbildung 4-21: Zur Optimierung der Kulturbedingungen für die Expansion von CTCs/DTCs untersucht Pleurapunktate (PP).</i>	82
<i>Abbildung 4-22: Tumorzellwachstum PP-1.</i>	83
<i>Abbildung 4-23: Charakterisierung der Tumorzellen von PP-1 in Passage 15.</i>	84
<i>Abbildung 4-24: Kultivierung von PP-4.</i>	85
<i>Abbildung 4-25: EpCAM-Lebendfärbung an MDA-MB 468 Zellen zwischen Feederlayer-MEF.</i>	86
<i>Abbildung 4-26: In-vitro-Expansion von CTCs/DTCs aus metastasierten Karzinompatienten.</i>	89
<i>Abbildung 4-27: Kultivierte BLC-1-Zellen.</i>	90
<i>Abbildung 4-28: Auswertung Soft-Agar-Assay BLC-1-Zellen.</i>	91
<i>Abbildung 4-29: EpCAM-Expression von BLC-1-Zellen, die über das CellCearch-System angereichert wurden.</i>	93
<i>Abbildung 4-30: FISH-Analyse an BLC-1-Zellen.</i>	94
<i>Abbildung 4-31: TP53-Mutationsanalyse der BLC-1-Zellen.</i>	96
<i>Abbildung A I: IF GFAP-Färbung der MNC von Patient #53.</i>	A-13
<i>Abbildung A II: IF MNC von Patient G-1.</i>	A-13
<i>Abbildung A III: Histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung des Primärtumors und der Skelettmetastasen des Astrozytompatienten G-10.</i>	A-14
<i>Abbildung A IV: DAB-Färbung von Gewebeschnitten des Primärtumors von Astrozytom-Patient G-10.</i>	A-14
<i>Abbildung A V: Färbung der BLC-1-Tumorzellen aus dem Knochenmark vor Kultivierung.</i>	A-15
<i>Abbildung A VI: DAB-Färbung von kultivierten BLC-1-Tumorzellen.</i>	A-16
<i>Abbildung A VII: GHS-Gefahrenpiktogramme.</i>	A-34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	<i>Immunhistochemische Marker für die Diagnose von Tumoren des Nervensystems.</i>	7
Tabelle 2-1:	<i>Verwendete Zelllinien.</i>	22
Tabelle 3-1:	<i>Für die Anfertigung von Zytospins verwendete Zellzahl unterschiedlicher Proben.</i>	31
Tabelle 3-2:	<i>Schritte für die Vorbehandlung von Zytospins und Paraffinschnitte zur immun-histochemischen Detektion.</i>	32
Tabelle 3-3:	<i>Zusammensetzung der Neufuchsin Substratlösung.</i>	36
Tabelle 3-4:	<i>Angaben zur Sequenzierungs-PCR.</i>	41
Tabelle 3-5:	<i>Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendete Sonden.</i>	43
Tabelle 3-6:	<i>Hybridisierungsansatz für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</i>	44
Tabelle 4-1:	<i>Wiederfindungsrate (WFR in %) von GBM-Zellen bzw. EGFR-positiven Karzinomzellen durch die eingesetzten Anreicherungsverfahren.</i>	48
Tabelle 4-2:	<i>Durch qPCR ermittelte EGFR-Genamplifikationsraten in Einzelzellen der GBM-Zelllinien BS-153 und G-22 sowie MNC.</i>	53
Tabelle 4-3:	<i>Anzahl der Blutproben von GBM-Patienten, die zu unterschiedlichen Zeiten der Tumorresektion entnommen wurden</i>	56
Tabelle 4-4:	<i>Anzahl der Blutproben von Nicht-GBM-Patienten mit Tumoren glialen Ursprungs, die zu unterschiedlichen Zeiten der Tumorresektion bzw. bei der Diagnose der Metastase entnommen wurden.</i>	57
Tabelle 4-5:	<i>Kategorische Einteilung klinisch-pathologischer Eigenschaften der GBM-Tumoren.</i>	62
Tabelle 4-6:	<i>Korrelation zwischen der Präsenz von CTCs im Blut und klinisch-pathologischen Parametern des Primärtumors von GBM-Patienten.</i>	63
Tabelle 4-7:	<i>Anzahl isolierter GFAP-positiver Einzelzellen aus angereicherten MNC.</i>	64
Tabelle 4-8:	<i>EGFR-Genamplifikationsrate von Einzelzellen des Patienten #63 im Vergleich zu Einzelzellen der Zelllinie BS-153 und einzelner MNC gesunder Probanden.</i>	66
Tabelle 4-9:	<i>Patientenproben, an denen die EGFR-FISH-Analyse durchgeführt wurden.</i>	67
Tabelle 4-10:	<i>EGFR-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf MNCs von Patient #63.</i>	68
Tabelle 4-11:	<i>Anzahl analysierter WGA-Produkte zur Mutationsanalyse des TP53-Gens.</i>	74
Tabelle 4-12:	<i>Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen an Gewebeschnitten des Primärtumors und an der Sternum-Metastase des Patienten G-10.</i>	76
Tabelle 4-13:	<i>Auswertung der FISH-Analysen an Zellen des Primärtumors des Patienten G-10 mit metastasiertem Astrozytom.</i>	78
Tabelle 4-14:	<i>Die durch das CellSearchTM-System detektierte kategorisierte Anzahl von CTCs im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen.</i>	87
Tabelle 4-15:	<i>Immunzytochemische Untersuchung der BLC-1-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung.</i>	92
Tabelle 4-16:	<i>Gen-Amplifikationsrate des EGFR- und AUKRA-Gens in den BLC-1-DNA-Proben.</i>	95

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 5-1:</i>	<i>Mittelwert und Median, errechnet aus der Anzahl detektierter CTCs zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten der untersuchten GBM-Patienten.</i>	99
<i>Tabelle 5-2:</i>	<i>Überblick der sich zurzeit in klinischen Studien befindenden Anti-EGFR-Target-Therapieansätze.</i>	101
<i>Tabelle 5-3:</i>	<i>Vergleich zweier Veröffentlichungen zur immunhistochemischen Analyse der EGFR-Expression im GBM-Primärtumor und in der korrelierenden Metastase.</i>	102
<i>Tabelle 5-4:</i>	<i>Organtransmissionen bei Organisationen, die Organspenden koordinieren.</i>	107
<i>Tabelle 5-5:</i>	<i>Übersicht Veröffentlichungen zur Vermehrung von CTCs/DTCs.</i>	110
<i>Tabelle A - I:</i>	<i>Patienten mit Gehirnmastasen epithelialen Ursprungs</i>	A-1
<i>Tabelle A - II:</i>	<i>Patienten mit Gliomen.</i>	A-1
<i>Tabelle A -III:</i>	<i>Patienten mit Glioblastoma multiforme.</i>	A-2
<i>Tabelle A -IV:</i>	<i>Patienten mit Glioblastoma multiforme-Rezidiv</i>	A-7
<i>Tabelle A -V:</i>	<i>Zusammenfassung von CTC-positiven GBM-Patienten.</i>	A-8
<i>Tabelle A -VI:</i>	<i>Patientinnen mit Mammakarzinom. Dieses Blut wurde zum einen auf die Präsenz von CTCs durch das CellSearch™-System untersucht (CTC Nr.).</i>	A-9
<i>Tabelle A -VII:</i>	<i>Patientinnen mit Mammakarzinom.</i>	A-10
<i>Tabelle A -VIII:</i>	<i>Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen für primäre Tumorzellen verwendete Pleurapunktate von Karzinompatienten.</i>	A-10
<i>Tabelle A -IX:</i>	<i>Zur Kultivierung von DTCs verwendete Knochenmarkaspirate von Karzinompatienten.</i>	A-10
<i>Tabelle A -X:</i>	<i>Zur Kultivierung von CTCs/DTCs verwendete Blutproben und Knochenmarkaspirate von verstorbenen Karzinompatienten.</i>	A-12
<i>Tabelle A - XI:</i>	<i>Anzahl analysierter MNC von Patient G-10.</i>	A-15
<i>Tabelle A - XII:</i>	<i>Analysesoftware und Datenbanken.</i>	A-17
<i>Tabelle A - XIII:</i>	<i>Verwendete Kitsysteme.</i>	A-17
<i>Tabelle A - XIV:</i>	<i>Für die Zellkultur verwendete Medien.</i>	A-18
<i>Tabelle A -XV:</i>	<i>Verwendete Primer für qPCR-Analysen.</i>	A-19
<i>Tabelle A -XVI:</i>	<i>Verwendete Primer für Mutationsanalysen im TP53-Gen.</i>	A-19
<i>Tabelle A -XVII:</i>	<i>Verwendete Primer für Mutationsanalysen im PTEN-Gen.</i>	A-20
<i>Tabelle A - XVIII:</i>	<i>Verwendete Primär-Antikörper zur Immunhistochemischen Detektion von Tumorzellen.</i>	A-21
<i>Tabelle A - XIX:</i>	<i>Verwendete Sekundär-Antikörper zur Immunhistochemischen Detektion von Tumorzellen.</i>	A-22
<i>Tabelle A - XX:</i>	<i>Verwendete Puffer.</i>	A-22
<i>Tabelle A -XXI:</i>	<i>Puffer und Lösungen speziell für die FISH-Analyse.</i>	A-23
<i>Tabelle A - XXII:</i>	<i>Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten KMR-Stoffe der Kategorie I und II.</i>	A-34

Verwendete Gefahrenstoffe

In Tabelle A-XXII sind die im Verlauf dieser Dissertation verwendeten Gefahrstoffe aufgelistet. Jede Substanz ist nach dem „Global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien“ (*GHS, Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals*), mit den GHS-Gefahrenpiktogrammen sowie den H-Sätzen (*Hazard Statements*) und P-Sätzen (*Precautionary Statements*) beschrieben.



GHS01 GHS02 GHS03 GHS04 GHS05 GHS06 GHS07 GHS08 GHS09

Abbildung A VII: GHS-Gefahrenpiktogramme

Tabelle A - XXII: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten KMR-Stoffe der Kategorie I und II.

Substanz	GHS-Kodierung	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	GHS02/07	H225, 319, 336	P210, 261, 305+351+338
EDTA	GHS07	H319	P264, 280, 305+351+338, 337+313
Ethanol	GHS02	H225	P210, 240, 243, 280, 303+361+353
Ethidiumbromid	GHS06/08	H341, 330, 302	P281, 304+P340
Formaldehyd	GHS05/06/08	H330, 301+311, 314, 317, 335, 351, 370	P280, 301+330+331,302+352, 304+340, 305+351+338
Formamid	GHS08	H360D	P201- 308+313
Hydrocortison	GHS08	H361	P281
Isopropanol	GHS02/07	H225, 319, 336	P210, 233, 305+351+338
Methanol	GHS02/06/08	H225, 301, 311, 331, 370	P243, 280, 301+310, 302+350, 304+340, 307+311
Mitomycin C	GHS06/08	H300-351	P264- 281- 301+310

Verwendete Gefahrenstoffe

Substanz	GHS-Kodierung	H-Sätze	P-Sätze
N,N Dimethylformamid	GHS02/07/08	H360D-226-332-312-319	P201- 302+352- 305+351+338-308+313
Nonidet P-40	GHS05/07/09	H302-318-411	P273- 280- 305+351+338
Paraformaldehyd (PFA)	GHS02/07/08	H228, 302, 315, 317, 319, 332, 335, 351	P202, 280, 302+352, 305+351+338, 308+313, 362
Salzsäure	GHS05/07	H314, 335, 290	P280, 301+330+331, 305+351+338
Triton X-100	GHS05/07	H302, 318	P280, 305+351+338
Trypan Blue Solution (0,4%)	GHS08	H350	P201- 308+313
GXylene (Xylol)	GHS02/07	H302+352	P210

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei allen Patienten, durch deren Einverständnis zur Probenahme diese Arbeit erst möglich wurde.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel für das interessante Thema sowie für die Unterstützung bei der Veröffentlichung meiner Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau PD Dr. Sabine Riethdorf für die kompetente und herzliche Betreuung meiner Arbeit und ihre unermüdliche Unterstützung, gerade in der Endphase bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Heisig danke ich für die Übernahme des Gutachtens als Vertreter des Fachbereichs Chemie.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Michael Speicher und Martina Auer danke ich für die Durchführung und Auswertung der aCGH- und NGS-Analysen. Bei den Mitarbeitern vom Institut für Neurochirurgie, vor allem bei Prof. Dr. Manfred Westphal, Frau Prof. Dr. Katrin Lamszus, Svenja Zapf und ganz besonders bei Herrn Dr. Alexander Schulte, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, bedanke ich mich für die Unterstützung meiner Arbeiten zum Glioblastom.

Für die Bereitstellung des Patientenmaterials danke ich Herrn Dr. Jakob Matschke sowie den Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin; der Klinik für Chirurgie; der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie; der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf und des Instituts für Stammzell-Technologie, Heidelberg.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Arbeitsgruppe für die tolle Unterstützung während der gesamten Arbeit. Hierbei möchte ich mich vor allem bei Frau Dr. Christin Gasch für ihre freundschaftliche und kompetente Hilfe, riesige Unterstützung und unermüdliche Motivation in allen Lebenslagen danken. Natürlich danke ich Malgorzata Stoupiec für die tollen Färbungen und die Unterstützung in der ZK, Cornelia Coith für ihr außerordentliches Organisationstalent und Antje Andreas für ihre tatkräftige Unterstützung in allen Laborangelegenheiten. Vor allem aber danke ich Euch, meinen HDK, für die tolle persönliche Unterstützung über die gesamte Zeit. Dazu gehört natürlich auch Oliver Mauermann, der mir zuletzt in Sachen Statistik sehr geholfen hat. Einen großen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit trugen auch Susanne Hoppe und Sandra Schwentesius mit ihrer zuverlässigen Unterstützung und guten Stimmung im Eingangslabor bei.

Lea Kling danke ich ganz herzlich, nicht nur für das Korrekturlesen, sondern auch für ihre tolle Motivation und stetige Unterstützung. Sanna Luikenga, Sabrina Frey und Corinna Eichelser danke ich für die netten Gespräche und die Motivation in fachlichen und persönlichen Dingen.

Mein aller größter Dank geht an meine Familie und meine Freunde. Dabei danke ich meinem Opa für das Korrekturlesen und das stetige Interesse an meiner Arbeit, meiner Mutter und meinen Großeltern, die mir durch ihre liebevolle Unterstützung Kraft gegeben haben sowie Torsten, Ela, und Manfred für die tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen. Ihr seid toll!

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Max, der mir, wo er nur konnte, bei allen Problemen unterstützend zur Seite stand. Danke Max, ich weiß, was ich an Dir habe!

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Martens T, Matschke J, **Muller C**, et al. Skeletal spread of an anaplastic astrocytoma (WHO grade III) and preservation of histopathological properties within metastases. Clin Neurol Neurosurg 2013 Mar; 115(3):323-328.

Müller C^{*}, Holtschmidt J^{*}, Auer M, Heitzer E, Lamszus K, Schulte A, Matschke J, Langer-Freitag S, Gasch C, Stoupiec M, Mauermann O, Glatzel M, Speicher M, Geigl. J, Westphal M, Pantel K, Riethdorf S. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *submitted*

^{*} gleicher Beitrag (contributed equally)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel habe ich kenntlich gemacht und im beigefügten Verzeichnis angegeben. Ich versichere außerdem, dass dies mein erster Promotionsversuch ist und ich diese Dissertation bisher weder an dieser noch an einer anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Hamburg, 06.05.2013

Carolin Müller