

**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Institut für Tumorbilogie

Direktor

Prof. Dr. med. Klaus Pantel

**Der Vergleich von Iodixanol-  
Dichtegradientenzentrifugation, dem *MicroBead*-  
basierten System MACS<sup>TM</sup> und *CellSearch*<sup>TM</sup> zur  
Isolierung von Tumorzellen aus peripherem Blut  
beim Mamma- und Ovarialkarzinom**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Olga Lips

aus

Gornoje (Kasachstan)

Hamburg 2015

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 21.10.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Volkmar Müller

**Meinen Eltern gewidmet, in Liebe und Dankbarkeit**

# I. Gliederung

I. Gliederung.....	I
II. Tabellenverzeichnis.....	IV
III. Abkürzungsverzeichnis.....	V
IV. Abbildungsverzeichnis .....	VII
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung .....	3
2.1 Minimale residuale Tumorerkrankungen .....	3
2.1.1 Disseminierte Tumorzellen bei epithelialen Tumoren.....	3
2.1.2 Disseminierte Tumorzellen beim Mamma- und Ovarialkarzinom .....	4
2.2 Das Mammakarzinom .....	7
2.2.1 Epidemiologie.....	7
2.2.2 Etablierte Prognosefaktoren beim Mammakarzinom.....	7
2.2.3 Therapiestrategien.....	8
2.3 Das Ovarialkarzinom.....	9
2.3.1 Epidemiologie.....	9
2.3.2 Etablierte Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom .....	9
2.3.3 Therapiestrategien.....	10
2.4 Oberflächenantigene und Zytokeratine epithelialer Tumorzellen .....	11
2.4.1 Epitheliales Zelladhäsionsmolekül (EpCAM).....	12
2.4.2 Zytokeratine.....	12
2.4.3 CD45-Antigen.....	14
2.5 Zellseparationstechniken .....	15
3. Zielsetzung.....	17
4. Material und Methoden.....	18
4.1 Verwendete Hilfsmittel und Reagenzien.....	18
4.2 Patientenkollektiv .....	23
4.3 Methoden.....	26
4.3.1 Blutproben .....	26
4.3.2 Zellkultur und <i>spiking</i> -Versuche.....	26
4.3.3 Dichtegradientenzentrifugation als erste Stufe der Separation.....	28
4.3.4 <i>Magnet Cell Separation</i> (MACS™) als manuelles Verfahren: optimiertes MACS™- Protokoll für die Anreicherung von Tumorzellen nach Dichtegradientenzentrifugation aus Patientinnenblut.....	30
4.3.5 Protokoll für die immunomagnetische Anreicherung von CTCs mit dem semi- automatisierten <i>CellSearch</i> ™-Verfahren unter Verwendung von des <i>CellSearch</i> ™ <i>Profile</i> <i>Kits</i> .....	36

4.3.6 Immunfluoreszenzfärbungen .....	37
4.3.6.6 Protokoll für die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen .....	40
5. Ergebnisse .....	42
5.1 Validation der Anreicherung von CK(+)- Zellen aus peripherem Blut mit dem Zweistufendichtegradienten, dem MACS <sup>TM</sup> - Verfahren und dem <i>CellSearch</i> <sup>TM</sup> - Verfahren mit Zelllinien mit bekanntem Phänotyp.....	42
5.1.1 Anreicherung von Tumorzellen im EDTA-Blut mit dem Zweistufengradienten .....	43
5.1.2 Anreicherung von MCF 7- und SKOV 3-Zellen im EDTA-Blut mit dem optimierten MACS <sup>TM</sup> - Verfahren.....	48
5.1.3 Wiederfindung von SKOV 3- und MCF 7-Zellen im EDTA-Blut mit dem <i>CellSearch</i> <sup>TM</sup> -Verfahren.....	53
5.2 Validation der Immunfluoreszenzfärbungsprotokolle zum Nachweis von Tumorzellen mittels Antikörper gegen epitheliale Markerproteine.....	56
5.2.1 Validation der Zytokeratinfärbung mit fluorochrom-markierten Antikörpern nach unterschiedlicher Fixierzeit .....	58
5.3 Validation der Anreicherungs- und Färbekontrolle an EDTA- Blutproben von Mamma- und Ovarialkarzinompatientinnen.....	58
5.3.1 Patientenkollektiv.....	58
5.3.2 Nachweis CK(+)- Zellen im Blut der Patientinnen mittels Anreicherung durch den Zweistufengradienten .....	59
5.3.3 Nachweis CK(+)-Zellen im Blut der Patientinnen mittels Anreicherung mit dem MACS <sup>TM</sup> -Verfahren.....	60
5.3.4 Nachweis CK(+)-Zellen im Patientenblut nach Anreicherung mit dem <i>CellSearch</i> <sup>TM</sup> - Verfahren .....	64
5.4 Vergleich der verschiedenen Anreicherungs- und Detektionsverfahren .....	68
6. Diskussion .....	70
6.1 Diskussion der Methoden.....	71
6.1.1 Diskussion der Anreicherung zirkulierender Tumorzellen durch den Zweistufengradienten .....	71
6.1.2 Diskussion der Anreicherung zirkulierender Tumorzellen durch die manuelle immunomagnetische Methode MACS <sup>TM</sup> oder semi-automatisiert unter Verwendung des <i>CellTracks</i> <sup>®</sup> <i>AutoPrep</i> Systems .....	72
6.1.3 Diskussion der Immunfluoreszenzfärbungsprotokolle zum Nachweis von Tumorzellen mittels Antikörper gegen epitheliale Markerproteine.....	74
6.2 Diskussion der Detektionsrate CK(+)-Zellen im peripheren Blut.....	75
6.3 Der Nachweis von Tumorzellen epithelialen Ursprungs im peripheren Blut bei Ovarial- und Mammakarzinom .....	80
6.4 Bewertung der Ergebnisse aus klinischer Sicht.....	82
7. Literaturverzeichnis.....	85
8. Lebenslauf.....	99

---

9. Danksagung .....	100
10. Eidesstattliche Versicherung .....	101

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Disseminierte Tumorzellen im KM von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. ....	6
Tabelle 2: Patientenkollektiv Mammakarzinom .....	24
Tabelle 3: Patientenkollektiv Ovarialkarzinom .....	25
Tabelle 4: Detektion von kultivierten Karzinomzellen und ihre Verteilung im Dichtegradienten.....	43
Tabelle 5: Überblick über einige Arbeiten zum Nachweis von CTCs beim Mammakarzinom.....	79

### III. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AB-Serum	Humanes Serum der Blutgruppe AB
A.dest	Destilliertes Wasser
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase- Anti- Alkalische Phosphatase
BET	Brusterhaltende Therapie
Bidest	Bidestilliert
BRCA1/2	<i>Breast Cancer Gene 1/2</i>
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	circa
CAM	<i>Collagen Adhesion Matrix</i>
CA 125	<i>Cancer Antigen 125</i>
CD45	<i>Cluster of Differentiation</i>
CK	Cytokeratin
CK+/-	Cytokeratin positiv/ negativ
CTC	Circulierende Tumorzelle
DCIS	Ductales Carzinoma in situ
DMF	Dimethylformamid
DTC	Disseminierte Tumorzelle
EDTA	Ethylendiamin- tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ER+/-	Estrogenrezeptor positiv/ negativ
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung
FIGO	Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe
G	<i>Grading</i>
G1	Hoch differenzierter Tumor
G2	Mäßig differenzierter Tumor
G3	Gering beziehungsweise undifferenzierter Tumor
HEA	Humanes Epitheliales Antigen
Her-2/neu	Humaner Epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor
ICC	Immuncytochemie
IF	Intermediärfilamente
Ig	Immunglobulin
ISET- Technik	<i>Isolation by size of epithelial tumor cells</i>
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
M	Metastasenstatus
M	Molar
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
mAK	Monoklonaler Antikörper
Max.	Maximum
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Min.	Minimum
ml	Milliliter
MNZ	Mononukleäre Zellen
MRD	<i>Minimal Residual Disease</i>
N	Nodalstatus

NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OT	Objektträger
PAI- 1	Plasminogen- Aktivator- Inhibitor 1
PB	Peripheres Blut
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PR+/-	Progesteronrezeptor positiv/ negativ
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
RKI	Robert- Koch- Institut
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	Reverse-Transkription- PCR
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
T	TumorgroÙe
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
Tris	<i>Tris Buffered Saline</i>
TSA	Tumorspezifisches Antigen
TZ	Tumorzelle
U	Units
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
uPA- R	<i>Urokinase plasminogen activator receptor</i>
Vgl.	Vergleiche
WF	Wiederfindung

## IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gradient nach Zentrifugation.....	29
Abbildung 2: Übersicht Versuchablauf.....	30
Abbildung 3: Prinzip der positiven Selektion im MACS™.....	32
Abbildung 4: Detektionsmethode der immunomagnetischen Zellseparation.....	42
Abbildung 5: Wiederfindung <i>spiked</i> SKOV 3-Zellen nach dem Zweistufengradienten.....	44
Abbildung 6: Wiederfindung <i>spiked</i> MCF 7-Zellen nach dem Zweistufengradienten.....	45
Abbildung 7: Vergleich der Wiederfindungsraten für SKOV 3-, und MCF 7-Zellen.....	45
Abbildung 8: Verteilung der SKOV 3-Zellen in der Monozyten-, und Lymphozytenphase.....	47
Abbildung 9: Verteilung der MCF 7-Zellen in der Monozyten-, und Lymphozytenphase .....	47
Abbildung 10: Wiederfindung <i>spiked</i> MCF 7-Zellen in der Positiv- und Negativfraktion.....	49
Abbildung 11: Wiederfindung der <i>spiked</i> SKOV 3-Zellen in der Positiv- und Negativfraktion nach Aufarbeitung der fixierten Monozytenphase mit dem <i>Epithelial Cell Detection Kit</i> .....	50
Abbildung 12: Wiederfindung der <i>spiked</i> SKOV 3-Zellen bei Einsatz von $5 \times 10^2$ Zellen (n=4) und $10^3$ Zellen (n=6) nach Aufarbeitung der Monozytenphase mit dem <i>Epithelial Cell Detection Kit</i> .....	51
Abbildung 13: Verteilung der <i>spiked</i> TZ in der Positiv- und Negativfraktion unter Verwendung der anti-A45-B/B3-AK konjugierten <i>Rat anti-Mouse IgG1 MicroBeads</i> .....	52
Abbildung 14: Verteilung <i>spiked</i> TZ unter Verwendung der anti-EpCAM-AK konjugierten <i>Rat anti-Mouse IgG1 MicroBeads</i> in der Positiv- und Negativfraktion .....	52
Abbildung 15: Wiederfindung der <i>spiked</i> MCF 7-Zellen nach Dichtegradientenzentrifugation, Fixierung der Monozytenphase und Anreicherung im <i>CellSearch™</i> -System.....	54
Abbildung 16: Wiederfindung <i>spiked</i> MCF 7- und SKOV 3-Zellen in PBS nach Fixierung unter Verwendung des <i>CellSearch™</i> -Systems .....	55
Abbildung 17: Vergleich der Wiederfindung der <i>spiked</i> TZ im <i>CellSearch™</i> - Verfahren nach Aufnahme der Zellen in PBS-Puffer oder nach Dichtegradientenzentrifugation und isolierter Aufarbeitung der Monozytenphase.....	55
Abbildung 18: Vergleich der Wiederfindung von SKOV 3- und MCF 7-Zellen nach immunzytochemischer Färbung .....	57
Abbildung 19: CTC in der Probe RM04 nach der Dichtezentrifugation.....	60
Abbildung 20: CTC in der Probe RM05 nach dem MACS™- Verfahren .....	61
Abbildung 21: CTC in der Probe RM15 nach dem MACS™-Verfahren .....	62
Abbildung 22: CTC in der Probe R007 nach dem MACS™ –Verfahren .....	63
Abbildung 23: CTC in der Probe R005 nach dem MACS™-Verfahren.....	64
Abbildung 24: CTC in der Probe RM12 nach der Aufarbeitung im <i>CellSaerch™</i> .....	65

---

Abbildung 25: Zellkluster in der Nähe einer einzelnen Zelle in der Probe R002.....	66
Abbildung 26: CTC in der Probe R002 nach der Aufarbeitung mit <i>CellSearch</i> <sup>TM</sup> .....	67

# 1. Zusammenfassung

Trotz verbesserter Therapiemaßnahmen beim Mamma- und Ovarialkarzinom sind die Patienten oft mit einem rezidivierenden Tumor konfrontiert. Als Ursache hierfür wird eine Disseminierung von Tumorzellen bereits in frühen Erkrankungsstadien angenommen. Die Abschätzung einer individuellen Prognose durch die etablierten Prognosefaktoren scheint nicht mehr ausreichend zu sein. Der Nachweis von Tumorzellen (CTCs) im peripheren Blut (PB) ist in vielen Studien mit einer schlechteren Prognose assoziiert gefunden worden. Dieses könnte auf ihr Potenzial als neue Prognoseparameter hinweisen. Ein Hinweis auch auf ein therapieprädiktives Potenzial der CTCs ergibt sich daraus, dass sich der Phänotyp der persistierenden Tumorzellen von dem des Primärtumors unterscheiden kann. Die Etablierung reproduzierbarer und sensativer Methoden für den Nachweis der CTCs ist deshalb von großer Bedeutung für ihre klinische Evaluierung.

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von 16 Patientinnen mit einem Rezidiv des Mammakarzinoms und 21 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinomrezidiv auf CTCs mit Hilfe des epithelialen Markers Zytokeratin (CK) untersucht. Das Blut wurde vor erneuter Therapie aus dem venösen Schenkel des Kreislaufsystems entnommen und noch am gleichen Tag aufgearbeitet. Daneben führten wir zur Validierung der Methode eine Reihe von *spiking*-Versuchen mit etablierten Zelllinien (TZ) aus der Zellkultur durch. Dem ersten Schritt der Tumorzellanreicherung, der Dichte-zentrifugation, folgte eine immunomagnetische Separation mit ebenfalls epithelspezifischen anti-EpCAM Antikörpern, entweder manuell mit den MACS<sup>TM</sup>-Säulen oder semi-automatisiert mit dem *CellSearch*<sup>TM</sup>-Verfahren. Der Nachweis von CK-positiven Zellen erfolgte durch die Immunfluoreszenzfärbung, die an einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurde. Neben dem anti-Zytokeratin Antikörper A45B/B3 wurde ein Antikörper gegen CK 5/8 verwendet. Trotz hintereinander geschalteter Isolationsschritte fanden sich weiße Blutkörperchen auf den Objektträgern (OT). Um diese von der Analyse auszuschließen, wurden diese mit Alexa Fluor<sup>R</sup> 488 CD45 markiert.

Der Anwendung der Verfahren auf Patientenproben ging eine Vielzahl von Proben in Validationsexperimenten mittels *spiking*-Versuchen mit MCF 7- und SKOV 3-Zellen voraus. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den Versuchsreihen die manuelle Methode MACS<sup>TM</sup> die besten Wiederfindungsraten bot. So konnten hier durchschnittlich 76 % der epithelialen TZ wiedergefunden werden (Median 91 %).

Nach dem Zweistufengradienten konnten durchschnittlich 84 % der *spiked* TZ wiedergefunden werden. Dabei war der Unterschied in der Wiederfindung zwischen SKOV 3- und MCF 7-Zellen nicht signifikant. In den *spiking*-Versuchen war die durchschnittliche Wiederfindung mit dem *CellSearch*<sup>TM</sup>-Verfahren 29 % für die MCF 7-Zellen und 21 % für die SKOV 3-Zellen.

Bei den Patientenproben konnten mit dem *CellSearch*<sup>TM</sup>-Verfahren in 57 % der untersuchten Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Mammakarzinoms CK(+)-Zellen detektiert werden. Neben einzelnen CK(+)-Zellen konnten nach der Aufarbeitung der Blutproben der Patientinnen mit einem Rezidiv des Ovarialkarzinoms auch ganze Zellkluster detektiert werden. Insgesamt wurden in 14 % der Fälle bei einem Rezidiv des Ovarialkarzinoms CK(+)-Zellen detektiert.

Im MACS<sup>TM</sup>-Verfahren wurden in 10 % (Rezidive des Ovarialkarzinoms) und in 14 % (Rezidive des Mammakarzinoms) CK(+)-Zellen detektiert.

Zurzeit sind eine ganze Reihe von Separationsverfahren in der Evaluation. Ihre Sensitivität und Spezifität wird in Studien mit großen Fallzahlen untersucht, um eine ausreichende Qualitätseinschätzung für die klinische Anwendung zu haben.

## 2. Einleitung

### 2.1 Minimale residuale Tumorerkrankungen

#### 2.1.1 Disseminierte Tumorzellen bei epithelialen Tumoren

Als minimal residuale Tumorerkrankung (*minimal residual disease*, MRD) wird der Nachweis einzelner maligner Tumorzellen während oder nach erfolgter Primärtherapie bezeichnet. Ursprünglich verwendete man diesen Begriff bei malignen hämatologischen Neoplasien. Heute findet er auch bei epithelialen soliden Tumoren Verwendung.

Nach Ablösung der Tumorzellen aus ihrem Zellverband disseminieren die Zellen in lokale Lymphknoten oder zirkulieren im peripheren Blut. So können sich diese peripheren Tumorzellen in sekundären Organen, bevorzugt im gut durchbluteten Knochenmark, ansiedeln und dort in einer Art „Ruhezustand“ über Jahre verweilen (sog. „*dormant cells*“) (Pantel *et al.*, 1993, M. Röcken, 2010). Diese können zu Rezidiven führen. In der Mehrzahl der Fälle führt eine frühe verborgene Disseminierung von Tumorzellen (TZs) zu einem späteren symptomatischen Krankheitsprogress.

Die Isolierung und Charakterisierung dieser disseminierten Tumorzellen (DTCs) ist erforderlich, um neue und individuelle Therapieansätze zu finden, die an diesen Zellen ansetzen (De Giorgi V *et al.*, 2010, J. Eyles *et al.*, 2010).

Das Blut ist durch Punktion ein leicht zugängliches System. Hier können zirkulierende Tumorzellen (CTCs) identifiziert werden. Von hier aus gelangen die Tumorzellen in das Knochenmarkssystem, wo sie dann als „*dormant cells*“ verweilen. Die Disseminierung ist auch potenziell in jedes andere Organ möglich (S. Kasimir-Bauer, 2009). Einige dieser CTCs verbleiben im Organismus und können im weiteren Verlauf zu Metastasen führen (Janni *et al.*, 2001, Röcken, 2010).

Die Studien arbeiteten mit verschiedenen Methoden der Konzentrierung und Isolierung dieser seltenen Zellen. Fast alle nutzten die Immunocytochemie (ICC), beruhend darauf, dass Zytokeratine (CK) als die besten Marker epithelialer Karzinome gelten. Die Forschung auf dem Gebiet der minimalen residualen Tumorerkrankung begann beim Mammakarzinom. Im Knochenmark von insgesamt 68 Patientinnen mit Brustkrebs fanden Forscher des Londoner *Ludwig Instituts for Cancer Research* in 28 % der Fälle Tumorzellen (Dearnaley *et al.*, 1981; Redding *et al.*, 1983). Der Nachweis erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen das epitheliale Membranantigen (EMA), ein Zelloberflächenmucin. Spätere Studien bewiesen das Vorhandensein peripherer Tumorzellen beim Prostatakarzinom (Griwatz und Brandt *et al.*, 1995) und beim kolorektalen Karzinom (R. Weihrauch *et al.*, 2002; Nischwitz, 2007).

Heute wird der Nachweis disseminierter Tumorzellen bevorzugt durch Zytokeratinepitope erbracht. Zytokeratine sind typische Bestandteile der Stützfilamente epithelialer Zellen (Moll

*et al.*, 1982) und stellen durch relativ konstante Expression in Tumorzellen eine Nachweismethode dar. In mesenchymalen Zellen wurden keine CK gefunden (Pantel *et al.*, 1997; Pantel *et al.*, 1999).

Prinzipiell kann der Nachweis zytokeratinhaltiger Zellen mit unterschiedlichen Methoden erfolgen. Neben der ICC werden molekularbiologische Techniken wie die reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) angewendet (Antolovic *et al.*, 2010). Da sich diese Arbeit mit der Separierung und Färbung von Zellen beschäftigt, die auf immunocytochemischen Prinzipien basieren, wird hierauf im Folgenden näher eingegangen.

Der am häufigsten eingesetzte anti-Zytokeratin Antikörper A45B/B3, ein sogenannter „Panzytokeratinantikörper“, ist Standard. Dieser richtet sich gegen die Zytokeratine 8, 18, 19 und hat eine Nachweisgrenze bei je  $10^5$ - $10^6$  Zellen (Kasper *et al.*, 1987; Braun und Pantel *et al.*, 1998).

Die Färbungen in der ICC basieren auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Zellantigene, u.a. CK, werden mit einem Primärantikörper markiert. Dieser kann schon mit einem Fluorochrom markiert sein oder durch einen anschließend zugegebenen Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden.

Die Detektion von Tumorzellen im Blut ist durch eine geringe Tumorzellzahl gegenüber einer großen Anzahl von Blutzellen limitiert. Erste Studien dazu sind 1993 mit Hilfe der Flowzytometrie durchgeführt worden (Gross *et al.*, 1993). Bald darauf wurden die immunomagnetischen *Beads* zur Isolation eingesetzt (Griwatz und Brandt *et al.*, 1995; Kvalheim, 1998; Sapi *et al.*, 2002).

### **2.1.2 Disseminierte Tumorzellen beim Mamma- und Ovarialkarzinom**

Im Jahre 1977 beschrieb Bernard Fischer Brustkrebs als eine systemische Erkrankung. Seit dem werden die Kriterien für die prognostische Relevanz wie *Grading*, Lymphknotenstatus und Hormonrezeptorstatus als das Subjekt einer aktiven Intervention gesehen.

Mit der Isolierung und Charakterisierung der disseminierten Tumorzellen versuchte man in den letzten Jahrzehnten eine bessere Aussage über die Prognose zu machen und neue Therapiestrategien zu finden. Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der minimalen residualen Tumorerkrankung beim Mammakarzinom. Man weiß, dass zirkulierende Tumorzellen mit dem Tumorwachstum und den erhöhten Serumkonzentrationen des Tumormarkers CA 15-3 korrelieren (Müller *et al.*, 2005). Die Aussagen über die prognostische Relevanz divergieren jedoch sehr.

Die Arbeitsgruppe um Slade isolierte Tumorzellen aus dem Blut und Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom in verschiedenen Krankheitsstadien. In der *low risk-*

Gruppe (T1, N0, L0, n=18) fanden sie in 39 % der Fälle mit Hilfe der ICC und RT-PCR periphere Krebszellen. Bei den Patientinnen mit mehr als drei positiven Lymphknoten (*high risk*-Gruppe, n=33) wurden in bis zu 70 % der Fälle Tumorzellen nachgewiesen. Im *follow-up* zeigte die *high risk*-Gruppe eine schlechtere Prognose. Slade beschrieb so periphere Tumorzellen als einen abhängigen Faktor im Krankheitsverlauf (Slade *et al.*, 2009).

Auf der anderen Seite beschrieb die Arbeitsgruppe um Cristofanalli, dass das Vorhandensein und die Anzahl zirkulierender Tumorzellen im Blut vor und nach erfolgter Primärtherapie ein wichtiger, jedoch unabhängiger Prognosefaktor sei (Cristofanalli *et al.*, 2004). Patientinnen mit > 5 Zellen in 7,5 ml Blut hatten eine insgesamt kürzere mediane progressionsfreie Krankheitsphase und eine kürzere mittlere Überlebenszeit ( $p < 0,001$ ). Einige Patientinnen profitierten von der Chemotherapie und zeigten im *follow-up* eine Zellzahlreduktion. Die mediane Überlebenszeit änderte sich jedoch nicht.

Beim Ovarialkarzinom erfolgt die Metastasierung vor allem per continuitatem in Becken- und Bauchhöhle. Obwohl die hämatogene Ausbreitung eine untergeordnete Rolle spielt, belegen Autopsiestudien eine verborgene hämatogene Metastasierung (Dauplat *et al.*, 1987, Abdul-Karim *et al.*, 1990; Rose *et al.*, 1989). Es gibt nicht viele Untersuchungen auf DTCs beim Ovarialkarzinom. Braun *et al.* konnten in ihrer Studie bei 30% der Patientinnen mit einem malignen Ovarialtumor isolierte TZ im Knochenmark nachweisen. Die Disseminierung trat in allen FIGO-Stadien auf. Zudem korrelierte der Nachweis von TZ im Knochenmark mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit (n= 108, Braun *et al.*, 2001).

Marth *et al.* sahen jedoch keine Korrelation zwischen Tumorzellnachweis im Knochenmark und im peripheren Blut und einer schlechteren Prognose (Marth *et al.*, 2002).

Auch die Arbeitsgruppe um Fehm untersuchte zwischen 2002 und 2006 die prognostische Relevanz vorhandener CK-positiver Zellen im Knochenmark von Ovarial- und Mammakarzinompatientinnen. Zwar war eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen und dem FIGO-Stadium nachweisbar ( $p < 0,05$ ), jedoch korrelierte kein anderer etablierter prognostischer Faktor wie Lymphknotenstatus oder die Differenzierung mit dem Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen (Fehm *et al.*, 2006).

In anderen Arbeiten, in denen andere Antikörper als der etablierte Panzytokeratin-Antikörper A45-B/B3 verwendet wurden, konnten DTCs in 18-47% der Fälle im KM nachgewiesen werden. Eine prognostische Relevanz war bei z.T. kleinen Fallzahlen nicht zu belegen (Roggel, 2003; Gabriel *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 1995; Cain *et al.*, 1990).

Einige Studien zur Tumorzelldisseminierung im KM beim Ovarialkarzinom sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 (Tabelle aus der Dissertation von F. Roggel, 2005, erweitert): Disseminierte Tumorzellen im KM von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. (1) signifikante Korrelation zwischen positivem Knochenmarkstatus und metastasefreiem Überleben als unabhängiger Parameter in multivariater Analyse. (2) Antikörper-Cocktail gegen Ovar- und Drüsenepithelstrukturen.

Marker	Detektionsrate	Prognostische Relevanz	Autor
CK	n= 53; 12/53 (23%)	nicht signifikant	Cain <i>et al.</i> , 1990
TFS-4, OV-632, TFS-2, SB-3 (2)	n= 19; 9/19 (47%)	nicht untersucht	Ross <i>et al.</i> , 1995
CK, CA 125	n= 49; 9/49 (18%)	nicht signifikant	Gabriel <i>et al.</i> , 2000
EPG-2	n= 73; 15/73 (20 %)	nicht signifikant	Marth <i>et al.</i> , 2002
CK 8/18/19	n=60; 18/60 (30 %) n= 108; 32/108 (30 %)	nicht untersucht, metastasefreies Überleben (1)	Roggel, 2003 Braun <i>et al.</i> , 2001
CK 8/18	n= 69; 25/69 (36%)	nicht signifikant	Fehm <i>et al.</i> , 2006

Die Arbeitsgruppe um Sapi beschäftigte sich als erste mit der Isolierung von zirkulierenden Tumorzellen aus dem Blut beim Ovarialkarzinom und erzielte durch eine anschließende Telomeraseaktivitätsmessung gute Anreicherungsresultate. Bis jetzt sind nur wenige Daten zu CTCs im peripheren Blut verfügbar, sodass man noch keine gute Aussage über die prognostische Relevanz treffen kann (Sapi *et al.*, 2002).

## 2.2 Das Mammakarzinom

### 2.2.1 Epidemiologie

In Deutschland erkranken jährlich über 57000 Frauen an Brustkrebs (vergleiche deutsches Krebsregister der Universität Erlangen, Robert-Koch-Institut, 2008). Mit 27,8% der Krebserkrankungsfälle ist das Mammakarzinom die häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren und ist somit sechs Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen. Mit einem Anteil von 17 % ist das Mammakarzinom die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen und bei Frauen zwischen dem 40. und 55. Lebensjahr die häufigste Todesursache überhaupt. 19000 Patientinnen versterben jährlich an diesem Malignom.

Wie beim Ovarialkarzinom sind eine früh einsetzende Regelblutung, Nulliparität sowie eine späte Menopause mit einem erhöhten Risiko für Mammakarzinom assoziiert. Wissenschaftliche Studien zeigten eine Erhöhung des Risikos bei Einnahme östrogenhaltiger Präparate und Kombinationspräparate in der Postmenopause (Sener *et al.*, 2009, Ness *et al.*, 2009).

Auch Zusammenhänge mit dem gehäuften Auftreten von Ovarialkarzinomen in betroffenen Familien werden beobachtet. Bei etwa der Hälfte der hereditären Mammakarzinome liegt eine Mutation in einem der beiden „**Breast-Cancer-Gene**“ (BRCA1, auf Chromosom 17q21 oder BRCA2, 13q12-13) vor. Frauen mit einer solchen Mutation haben ein lebenslang erhöhtes Risiko, an einem Mammakarzinom (Risiko 80-90 %) und an einem Ovarialkarzinom (Risiko 30-60 %) zu erkranken.

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten betragen derzeit über alle Studien betrachtet ca. 81 % (siehe deutsches Krebsregister der Universität Erlangen, RKI, 2008).

### 2.2.2 Etablierte Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Mehr als 70 % der Mammakarzinome werden ertastet. Neben anderen Screeningmethoden wie Mammographie und Mammasonographie ist die Palpation somit eine wichtige Ergänzung der Früherkennung. Der Befall der axillären Lymphknoten ist hierbei der wichtigste Prognosefaktor für eine spätere Fernmetastasierung. Bei nodal negativen Patientinnen beträgt das zu erwartende Rezidivrisiko über 10 Jahre etwa 20-30 %. Bei nodal positiven Patientinnen liegt das Rezidivrisiko bei etwa 75 %, wobei sich die Prognose in Abhängigkeit von der Anzahl befallener Lymphnoten deutlich verschlechtert (Vinh-Hung *et al.*, 2009). Auch das Vorhandensein des Wachstumsfaktorrezeptors HER2/neu zeigt eine ungünstige Prognose (Frogne *et al.*, 2009). Die Invasionsfaktoren uPA-R und PAI-1, die

mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) gemessen werden, weisen auf eine aggressive Erkrankung hin.

Bei 30 % der Patientinnen werden im Krankheitsverlauf Metastasen nachgewiesen, in über der Hälfte der Fälle im Knochen. Ein lokoregionäres Rezidiv liegt bei 5-10 % vor. Dabei stellen die radiologischen Verfahren wie Röntgen und Computertomographie die wichtigsten diagnostischen Maßnahmen dar. Die mittlere Überlebenszeit nach Fernmetastasierung beträgt etwa 2 Jahre.

### **2.2.3 Therapiestrategien**

Die Therapie des primären Mammakarzinoms umfasst sowohl lokale (Operation und ggf. Bestrahlung) als auch systemische Maßnahmen wie Chemotherapie, endokrine Therapie und Therapie mit Antikörpern. Die Operation umfasst die Entfernung des Tumors mit gesundem Randsaum und die Entfernung befallener axillärer Lymphknoten. Als Verfahren kommen die brusterhaltende Therapie (BET) und die modifizierte radikale Mastektomie in Frage. Bei einem soliden Tumor <3 cm und klinisch nicht befallener Axilla kann die „Sentinel-Lymphonodektomie“ angewendet werden (Kidd *et al.*, 2009; Davenport *et al.*, 2009). Langzeitergebnisse dieser Methode fehlen noch. Eine adjuvante Systemtherapie mit Zytostatika (CMF-Chema: Cyclophosphamid, Methothrexat und Fluorouracil) und „Antihormonen“ wie Tamoxifen, GnRH-Analoga und Aromataseinhibitoren reduziert das individuelle Rezidivrisiko um etwa 25 %.

Bei metastasiertem Mammakarzinom erfolgt die Therapie nur noch unter palliativen Gesichtspunkten. Eine in der metastasierten Situation zugelassene Therapie ist die Antikörpertherapie mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab gegen den Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu, welches mit einem Zytostatikum verabreicht wird. Die Ansprechraten liegen bei 50-60 % (bei Kombinationstherapie).

## 2.3 Das Ovarialkarzinom

### 2.3.1 Epidemiologie

Nach den aktuellen Ergebnissen der RKI-Schätzung, basierend auf den Daten des Krebsregisters bis 2004, tritt jährlich bei ca. 9660 Frauen in Deutschland ein Ovarialkarzinom auf. Demnach entfallen 4,6 % aller bösartigen Neubildungen der Frau auf den Eierstockkrebs. Dennoch ist die Sterblichkeit mit beinahe 5500 Fällen pro Jahr (5,6% aller Krebssterbefälle) aufgrund einer schlechteren Prognose höher als bei den anderen Krebserkrankungen der Gebärmutter (vgl. deutsches Krebsregister der Universität Erlangen, RKI 2008). Es steht damit an siebter Stelle der durch Krebs bedingten Todesursachen der Frau und an erster Stelle der Todesursachen bei gynäkologischen Malignomen (Holschneider und Berek, 2000). Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 60 und 70 Jahren.

Das Risiko am epithelialen Ovarialkarzinom zu erkranken scheint mit langjährigen hormonellen Einflüssen im Zusammenhang zu stehen. So begünstigen eine früh einsetzende Menarche, eine späte Menopause und Kinderlosigkeit das epitheliale Ovarialkarzinom. Schwangerschaften und Ovulationshemmer („Pille“) wirken sich dagegen günstig aus. Diese Theorie basiert auf der Verletzung der epithelialen Oberfläche der Ovarien, die bei jeder Ovulation beschädigt wird. Aber auch genetische Prädispositionen werden nachgewiesen, z. B. Mutationen im Gen für BRCA 1, BRCA 2 und p53 (Sood *et al.*, 1999).

Siebzig Prozent der Ovarialkarzinome werden erst in fortgeschrittenen Tumorstadien (FIGO III und IV) entdeckt, da klinische Symptome in den frühen Stadien der Erkrankung fehlen. Dies ist die Hauptursache für die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 47 % (vgl. deutsches Krebsregister der Universität Erlangen, RKI 2008) und das Risiko für Progression oder ein Rezidiv in 60 %.

### 2.3.2 Etablierte Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom

Wichtigster Prognosefaktor ist die Tumorausbreitung bei der Erstdiagnose. Patientinnen im Stadium FIGO I haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 90 %, im Stadium FIGO II bis zu 74%, FIGO III 25-40% und FIGO IV nur noch 11% (Kiechle, Gynäkologie und Geburtshilfe, 2007). Der postoperativ verbliebene Tumorrest gilt als stärkster unabhängiger Prognosefaktor. Patientinnen, die eine R0-Resektion erhalten (R0=kein nachweisbarer Tumorrest im Organismus), leben signifikant länger als Patientinnen, bei denen Tumorreste im Abdomen zurückbleiben (Makar *et al.*, 1995; Brun *et al.*, 2000). Ein weiterer wichtiger

prognostischer Faktor ist das Intervall zwischen Diagnosestellung und Auftreten von Metastasen (Cormio *et al.* 2003).

Der Tumormarker CA 125, welcher in 80 % der Fälle beim serösen Ovarialkarzinom in fortgeschrittenen Stadien erhöht ist, sowie CA 72-4 und CA 19-9 sind aufgrund der niedrigen Sensitivität und Spezifität zum Screening ungeeignet. Sie haben jedoch in der Verlaufskontrolle Bedeutung.

### 2.3.3 Therapiestrategien

Wichtigstes Therapieziel beim Ovarialkarzinom ist es sämtliches Tumorgewebe zu entfernen. Als optimal für den weiteren Verlauf der Erkrankung gilt eine Tumorsektion mit einem zurückbleibendem Tumorrest von < 1 cm.

Das Ovarialkarzinom zählt zu den chemosensiblen Tumoren mit Ansprechraten von etwa 80%. Das FIGO-Stadium I a und I b gilt bei hochdifferenzierten Tumoren und exaktem Staging heute als einzige Tumorentität, die keiner zytostatischen Therapie bedarf, da die Überlebensprognose bei 90- 95% liegt. Unterschiedliche Meinungen bestehen zur Frage des FIGO-Stadiums I c, das nur auf Grund einer intraoperativen Ruptur als I c gewertet werden muss. Im europäischen Raum ist eine alleinige Ruptur nicht immer eine Indikation zur adjuvanten Therapie.

Platin ist die Substanz mit dem besten Ansprechen. Wegen besserer Verträglichkeit wird heute Carboplatin statt Cisplatin verwendet (Appel, 2005). In fortgeschrittenen Stadien wird eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel über 6 Zyklen im Abstand von 3 Wochen verabreicht (Ozols, 2003). Neoadjuvante Chemotherapien verlängern deutlich das Überleben in späten Stadien und bei schlechter Prognose (Ansquer *et al.*, 2001, Kuhn *et al.*, 2001).

## 2.4 Oberflächenantigene und Zytokeratine epithelialer Tumorzellen

Zytokeratine (CK) gehören zur Subfamilie der Intermediärfilamente (Zytoskelettproteine) und sind ein Charakteristikum epithelialer Zellen. Sie sind zytoplasmatisch lokalisiert. Man kennt heute 20 verschiedene Zytokeratine. Entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften werden sie in saure (Typ I, CK 9-20) oder neutral-basische CK (Typ II, CK 1-8), entsprechend ihres Molekulargewichtes in hoch- und niedermolekulare CK, eingeteilt.

Epithelien exprimieren mindestens zwei CK aus beiden Typen („pairs“) (Moll *et al.*, 1982), sodass die Basisstruktur aus einem heterotypischen Tetramerkomplex gebildet wird. Die Anzahl kann jedoch auch höher sein.

Die verschiedenen Epithelien im menschlichen Körper exprimieren CK, die nicht nur für den Epitheltyp charakteristisch sind, sondern die auch eine Korrelation zum Grad der Mutation und der Differenzierung der Zellen zeigen (Moll *et al.*, 1982).

Es gibt eine Reihe von Antikörpern mit einer Spezifität für einzelne CK, mehrere CK oder CK-Gruppen.

Oberflächenantigene von Tumorzellen werden meist durch MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse I und II an der Zellmembran präsentiert. Einige Antigene findet man nur an entarteten und niemals an normalen Zellen. In diesen Fällen heißen sie TSA (*tumor specific antigen*). Im Allgemeinen resultieren sie aus der tumorspezifischen Mutation. Meistens werden solche Antigene jedoch von normalen und entarteten Zellen präsentiert (TAA, *tumor-associated antigen*). Diese können dann von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und zerstört werden.

Die Nutzung der spezifischen Antikörper gegen Zytokeratine und Oberflächenantigene ist bei der Konzentrierung von peripheren TZ weit verbreitet. Die Arbeitsgruppe um Banys verwendete in ihrer Studie den am häufigsten gebrauchten Panzytokeratinantikörper A45B/B3 um Knochenmark von insgesamt 377 Patientinnen mit gynäkologischen Tumorleiden immuncytochemisch aufzuarbeiten. Ein Nachweis von epithelialen Zellen erfolgte dann zytomorphologisch in 19 % der Fälle (Banys *et al.*, 2009).

Neueste Studien zeigen, dass der Nachweis von CK(+)-Zellen durch die ICC von dem benutzen CK-Antikörper abhängt, was auf die komplexe CK-Konstellation in DTC hinweist (Effenberger *et al.*, 2010). So wurden in dieser Studie die Antikörper A45B/B3 und AE1/AE3 (AE) in insgesamt 391 Knochenmarkproben von Patientinnen mit Mammakarzinom miteinander verglichen. Dabei zeigte sich eine Korrelation von immuncytochemischem Nachweis epithelialer Zellen und dem Nodal- und Hormonstatus.

### 2.4.1 Epitheliales Zelladhäsionsmolekül (EpCAM)

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) ist ein Transmembranprotein. Es besteht aus einer Extrazellular-, einer Transmembran-, und einer Intrazellulardomäne. Bei Stimulierung des Rezeptors durch proteolytische Spaltung wird die Signaltransduktion induziert. Durch den Cadherin-Catenin-*Pathway* wird c-myc, ein DNA- Transkriptionsprotein, aktiviert (Denzel *et al.*, 2008) und beeinflusst so die Migration, Invasion und Proliferation der Epithelzellen (Osta *et al.*, 2004).

EpCAM ist ein panepitheliales, tumorassoziiertes Antigen und ist für Zell-zu-Zell Adhäsionen zuständig. Studien zeigten, dass dieses Oberflächenantigen in nahezu allen epithelialen Malignomen überexprimiert wird (Osta *et al.*, 2004). Erste Studien bewiesen die Überexpression beim Kolonkarzinom, Mammakarzinom und Ovarialkarzinom (Connor *et al.*, 2004). Die neuesten Studien zeigten die Überexpression und den Einfluss von EpCAM beim hepatozellulären Karzinom (Yamashita T *et al.*, 2009), dem Magenkarzinom (Wenqi *et al.*, 2009) sowie dem kolorektalen Karzinom (Königsberg *et al.*, 2010).

In mehreren klinischen Studien wurde das EpCAM-Antigen Ziel der Antikörpertherapie.

Walid A. Osta zeigte in seiner Studie, dass das EpCAM-Antigen sowohl beim Primärkarzinom der Mamma als auch in den Metastasen um das 100-1000-fache überexprimiert wird. Mit der Modulation der EpCAM-Expression durch Gentherapie und durch den Einfluss auf die Proliferation, Invasion und Zellmigration ist eine neue Therapiemöglichkeit gegeben.

Auch beim Ovarialkarzinom wurde mittels ICC in 97 % der Fälle (n= 38) die Expression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls bewiesen (Connor *et al.*, 2004).

### 2.4.2 Zytokeratine

Moll untersuchte vor ca. 30 Jahren verschiedene Epithelien und die dazugehörigen Karzinome (auch Lymphknoten und Fernmetastasen) auf deren CK-Expressionsmuster (n=288). Mit Hilfe der Gelelektrophorese, kombiniert mit Immunoblot und Immunhistochemie, zeigte er, dass sich in mehrschichtigen Plattenepithelien vornehmlich die Zytokeratine 1-6 und 9-17 finden lassen, während in einfachen Zylinderepithelien oder pseudomehrschichtigen Epithelien die CK 7,8, und 18-20 exprimiert werden (Moll *et al.* 1982). Nach weiteren Untersuchungen konnte er einfache Plattenepithelien und deren Karzinome in zwei Gruppen einteilen: (1.) Gewebe endodermalen oder ektodermalen Ursprungs (Leber, Pankreas, Magen-Darm-Trakt, Lunge, Brust u.a.) gingen nicht mit einer höheren Co-Expression von Vimentin und CK bei maligner Transformation einher, wobei Gewebe mesodermalen Ursprungs (2.) mit einer ausgeprägten Co-Expression von Vimentin,

CK 7/8 und 18-20 verbunden waren (Niere, Endometrium, Ovar u.a.). Endometrium- und Ovarialkarzinome zeigten auch eine Expression von CK 5, welches untypisch für einfache Epithelien ist.

Bei Beibehalten von einem speziellen CK-Expressionsmuster von maligne entarteten Zellen ist es möglich, diese CK als histologische Differenzierungsmarker zu verwenden, da die CK-Expression in den meisten Fällen stabil zu bleiben scheint (Moll *et al.*, 1982). Eine Steigerung der CK-Expression oder das Auftreten eines neuen Zytokeratins, beides jedoch verbunden mit einem niedrigeren Differenzierungsgrad, wurde ebenfalls beobachtet u.a. bei renalen Tubulus-, Endometrium- und Ovarzellen. In diesen Epithelien zeigte sich eine deutliche Änderung der CK-Expression im Vergleich zum „Normalgewebe“. Beim Mammakarzinom scheint diese Expressionsveränderung mit Tumorprogression verbunden zu sein (Moll *et al.*, 1982). Diese Änderung des Expressionsmusters ist schwer zu erklären. Vermutungen lassen auf eine Regulationsstörung bei der Transkription durch Verlust von Inhibitionsfaktoren schließen. Trotzdem ist es möglich epithelspezifische CK und Intermediärfilamente (IF) zu definieren, da diese trotz Mutation und Tumorprogression oft im Genom stabil verbleiben. Vom histodiagnostischen Standpunkt aus sind Zytokeratine etablierte Marker für undifferenzierte epitheliale Karzinome und zugleich verraten uns die individuellen CK-Polypeptide brauchbare Informationen über die Differenzierung von Epithelien und Karzinomen.

Nichtsdestotrotz ist es falsch an Hand der CK einen Tumor als benigne oder maligne zu klassifizieren, da die Änderung des Proteinexpressionsmusters nicht spezifisch mit Malignität einhergeht.

Das CK 8/18 und 19 ist das am häufigsten detektierte CK (damit verweise ich auf den Moll-Katalog) und stellt zugleich das Antigen für den Standardantikörper A45-B/B3 dar. In der Vergangenheit wurde es u.a. beim Prostatakarzinom (Griwatz und Brandt *et al.*, 1995), Ovarialkarzinom (Braun *et al.*, 2001; Stimpfl *et al.*, 1999), Mammakarzinom (Pantel und Woelfle, 2005), kolorektalen Karzinom (Weihrauch *et al.*, 2002) und Magenkarzinom etabliert.

Dieser monoklonale IgG1-Maus-pan-Antizytokeratin-Antikörper, an ein Fluorochrom konjugiert, wurde in der vorliegenden Arbeit für die immunhistochemische Färbung verwendet, da er zurzeit in vielen Studien erfolgreich eingesetzt wird (Banys *et al.*, 2009, Effenberger *et al.*, 2010, Fehm *et al.*, 2006).

### 2.4.3 CD45-Antigen

Ein anderer Name für das Glycoprotein CD45 (*Cluster of differentiation*) ist `Protein Tyrosin Phosphatase` (PTP) und war früher als `leukocyte common antigen` bekannt.

PTP reguliert verschiedene Zellprozesse einschließlich Zellwachstum, Differenzierung, mitotischem Zyklus und onkogenetischer Transformation.

Das Gen für das Antigen CD45 `PTPRC` (Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ C) wird vor allem in hämatopoetischen Zellen gefunden, in denen es essentielle Regulationen speziell in T- und B- Lymphozyten steuert.

Eine erhöhte Expression wird besonders in B-Zelleukämien, akuten Leukämien und Lymphomen gefunden.

Ein monoklonaler Antikörper gegen CD45 wird heute routinemäßig in der Pathologie verwendet, um zwischen Lymphomen und Karzinomen in histologischen Schnitten zu unterscheiden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Isolierung von peripheren Tumorzellen. Trotz mehrerer hintereinandergeschalteter Selektionsverfahren sind viele Blutzellen neben den Tumorzellen im Präparat zu finden. Um diese voneinander zu unterscheiden, führten wir bei der Immunfluoreszenzdoppelfärbung eine CD45-Antigen-Markierung mit einem Fluorochrom durch.

Die Färbung oder sogar der Versuch der Depletion von Leukozyten bei der Suche nach disseminierten Tumorzellen ist weit verbreitet. Eine dieser Arbeit ähnliche Studie depletierte nach *CellSearch*<sup>TM</sup> Leukozyten aus peripherem Blut beim Mammakarzinomen, die sich in der gleichen Bande wie die Tumorzellen befanden (Siewerts *et al.*, 2008).

## 2.5 Zellseparationstechniken

Die unterschiedlichen Methoden der Tumorzellanreicherung lassen sich in sechs Verfahren einteilen: die selektive Zellkultivierung, die Dichtezentrifugation, die immunomagnetische Zellanreicherung, die dielektrophoretische Zellfraktionierung, die Zellfiltration nach der ISET-Technik (*Isolation by Size of Epithelial tumor cells*) und die durchflusszytometrische Zellsortierung. In dieser Arbeit wurde zur Tumorzellisolierung eine Kombination aus Dichtegradientenzentrifugation und immunomagnetischer Separation angewendet, sodass ich hier nur auf diese zwei Methoden näher eingehe.

Bei der Dichtegradientenzentrifugation wird die zu trennende Blutprobe über entsprechende Trennlösungen geschichtet und anschließend bis zum Erreichen des Sedimentationsgleichgewichts zentrifugiert, sodass sich die unterschiedlichen Zellfraktionen entsprechend ihrer Größe und Dichte auftrennen. Man unterscheidet dabei zwei verschiedene Gradienten. Erstens die kontinuierliche Dichtezentrifugation mit stetig ansteigender Dichte. Zweitens den diskontinuierlichen Dichtegradienten (Griwatz *et al.*, 1995). Diese Methode ist ideal zur Gewinnung von homogenen Zellpopulationen. Zu Beginn der Forschung an disseminierten Tumorzellen beschrieb Durrant jedoch, dass sich die morphologisch unterschiedlichen Tumorzellen mit dieser Methode nur ungenügend in einer Zellfraktion anreichern lassen (Durrant, 1992). Neuere Studien zeigen eine gute Nachweisrate von CTCs nach der Dichtezentrifugation (Ntouroupi *et al.*, 2008); heute wird dieses Verfahren als initialer Schritt bei der Tumorzellkonzentrierung betrachtet, da sich die Anreicherung der seltenen CTCs nach einem zweiten Separationsverfahren signifikant verbessert (Guo *et al.*, 2007).

Bei der immunomagnetischen Zellseparation werden superparamagnetische oder ferrimagnetische *MicroBeads* (Durchmesser ca. 50 nm-3 µm) eingesetzt, die mittels monoklonaler Antikörper (AK) spezifisch an die Zellen binden. Die Bindung kann direkt über *MicroBead-AK-Konjugate* erfolgen oder indirekt über *MicroBead-anti-AK-Konjugate*. Die Separation *MicroBead*-markierter Zellen von unmarkierten Zellen erfolgt in einem starken Permanentmagneten. Wird die Zellsuspension auf die Säule, die eine spezielle Säulenmatrix mit bestimmter Porengröße beinhaltet, gegeben, verbleiben die *MicroBead*-markierten Zellen in der Säulenmatrix, während die unmarkierten Zellen die Säule passieren. Durch Ausspülen der Säule außerhalb des Permanentmagneten lassen sich dann die magnetisch markierten Zellen gewinnen. Das System kann zur Anreicherung (Positivseparation) oder zum Ausschluss einer Zellpopulation eingesetzt werden (Negativseparation). Neben diesem manuellen Verfahren gibt es das semiautomatisierte/automatisierte Verfahren *CellSearch<sup>TM</sup>*. Wie oben beschrieben werden die speziell durch magnetische Partikel markierten Zellen in einem Magnetfeld von anderen Zellen getrennt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt dann wahlweise manuell oder im Gerät. In einer großen Evaluationsstudie wurden 92 Blutproben

von Brustkrebspatientinnen mit Metastasen mit Hilfe des *CellSearch<sup>TM</sup>* untersucht. Die Nachweisrate lag bei 70 % (Riethdorf *et al.*, 2007).

Die immunomagnetische Separation ist heute weit verbreitet. Studien zeigen eine signifikant bessere Nachweisrate von CTCs im Vergleich zu anderen Methoden ( $p < 0.0001$ , Königsberg *et al.*, 2010). Auch die vorangeschaltete Dichtegradientenzentrifugation scheint die Anreicherungsrate signifikant zu verbessern (Guo *et al.*, 2007).

### 3. Zielsetzung

Die phänotypische Heterogenität von Tumorzellen wirkt sich erschwerend auf ihren Nachweis und ihre Therapierbarkeit aus. Insbesondere sind der frühe Nachweis von Metastasen und die darauf gerichtete Therapiekontrolle entscheidend für die Prognose der Patienten. Deshalb sind Verfahren entwickelt worden, die auf den Nachweis der Tumorzellen im Blut der Patienten abzielen. In dieser Arbeit sollten drei Verfahren auf ihre Nachweisempfindlichkeit verglichen werden. Ein Verfahren basierend auf der Zellgröße- und Dichte (Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation) und zwei Verfahren basierend auf Antikörper-gekoppelter Mikropartikel (MACS<sup>TM</sup> und *CellSearch*<sup>TM</sup>) wurden verglichen.

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Zielsetzungen verfolgt:

1. Vergleich der Anreicherungs-effizienz von Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation, der *MicroBead*-basierten Systeme MACS<sup>TM</sup> und *CellSearch*<sup>TM</sup> bei Tumorzelllinien mit bekanntem Phänotyp (SKOV 3 und MCF 7).
2. Validierung der Immunfluoreszenzprotokolle zum Nachweis von Tumorzellen mittels Antikörper gegen epitheliale Markerproteine.
3. Vergleichende Validierung der Anreicherungs-effizienz von Iodixanol-Dichtegradientenzentrifugation, der *MicroBead*-basierten Systeme MACS<sup>TM</sup> und *CellSearch*<sup>TM</sup> an EDTA-Blut von Patientinnen mit einem Rezidiv des Mamma- und Ovarialkarzinoms.

Die Validierungsstudien sollen Basisdaten für die weitere Entwicklung von Protokollen der Tumorzellanreicherung und Charakterisierung aus dem peripheren Blut, insbesondere von Patientinnen mit Ovarialkarzinom, liefern.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Hilfsmittel und Reagenzien

#### Apparative Einrichtungen und Verbrauchsmaterial

Lichtmikroskop Axiostar plus, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Software von *KAPPA Engineering*, Sophia Antipolis, Frankreich

Zentrifuge, Heraeus Multifuge 3S-R, Kendro, Langselbold, Deutschland

Tischzentrifuge Heraeus Kendro, Biofuge fresco, Langselbold, Deutschland

Sterile Werkbank, Herasafe, Heraeus Kendro, Langselbold, Deutschland

Brutschrank, Hera 150, Heraeus Kendro, Langselbold, Deutschland

Zentrifuge Rotofix 32, Hettich, Villingen-Schwenningen, Deutschland

Zytozentrifuge, Hettich, Villingen-Schwenningen, Deutschland

Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenzkanal und Kamera, Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland

Vortex Genie 2, Scientific Industries, U.S.A.

Objektträger 24 x 60 mm, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland

Deckgläschen 24 x 32 mm, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Falconröhrchen steril, 50 ml und 15 ml, Greiner *bio-one*, Frickenhausen, Deutschland

Pipettierhilfe, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland

Pipettierhilfe *Serological Pipet* steril, 5 ml, Falcon, Sarstedt, Deutschland

Eppendorf sterile Pipetten mit Dualfilter 10 µl und 100 µl, Hamburg, Deutschland

Sterile Pipetten mit Dualfilter 1000 µl, Biosphere, Ludwigshafen, Deutschland

Pasteurpipetten Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland

Einwegpipetten steril 2,5 ml, VWM, Darmstadt, Deutschland

pH-Meter, inoLab WTW, Heidelberg, Deutschland

Schüttler, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland

Rollmischer, Stuart SRT1, Bibby Sterilin, Staffordshire, UK

Japan Fettstift, *Dako Pen*, Dänemark

Zellkulturflasche T25, Nunc, Wiesbaden, Deutschland

MACS™ *Separation Columns, MS-Columns und LS-Columns*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

*Veridex LLC CellSearch System*, Warren, Johnson & Johnson company, New York, USA

Kanülen 27G, 23 G, 26 G, B Braun, Sempach, Schweiz

Wasserbad, GFL-1003, GmbH für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland

Gefrierschrank -20 °C Liebherr, Kirchdorf

Automatic-Sarpette® Sarstedt, Nümbrecht

pH-Meter inoLab pH level 1 WTW, Weilheim  
Pipetten (2,5 MI, 10 MI, 200 MI, 1000 MI) Eppendorf AG, Hamburg  
Pipetus Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt  
Zählkammer, Neubauer *improved* Optik Labor, Fried  
Vortex-Genie 2 Scientific Industries, Bohemia USA  
Aluminiumfolie Universal, Bristol England  
Deckgläschen 24 x 32 mm Carl Roth GmbH, Karlsruhe  
Färbekammer Carl Roth GmbH, Karlsruhe  
Handschuhe Nitrile Nitra-Tex Ansell, Brüssel, Belgien  
Handschuhe Peha-soft *satın Powderfree* Hartmann, Heidenheim  
Objektträger SuperFrost/ Plus Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim  
S-Monovette EDTA KE/ 7,5 ml Sarstedt (Nümbrecht)  
Sterillium Bode, Hamburg

### Antikörper

*Mouse monoclonal pan-cytokeratin antibody* A45-B/B3 IgG1 (Konzentration: 1:300), konjugiert mit dem Fluorochrom Cy3- Mono-NHS, Micromet, München, Deutschland  
*Mouse monoclonal IgG1 cytokeratin antibody* CK 5/8, c22 (Konzentration: 1:200), ohne Farbstoff, Progen, Heidelberg, Deutschland; extern konjugiert mit dem Farbstoff Oyster Alexa-Fluor<sup>R</sup> 488 *anti- human CD45, Clone: HI30* (Konzentration: 1:150), BioLegend, Uithoorn, Niederlande  
Alexa- Fluor<sup>R</sup> 488 *goat anti-mouse* IgG1 (Konzentration: 1:200), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, Alexa- Fluor<sup>R</sup> 488 *goat anti- rat* IgG1, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland  
Anti-EpCAM-Antikörper, *monoclonale mouse anti-human antibody, IgG1, Clone VU-1D9*, (Konzentration: 1:50), Visionbiosystems, Novocastra, Newcastle, England  
MOPC 21 (K: 1 mg/ml), Sigma, Deisenhofen, Deutschland  
Alexa 546, *rabbit anti mouse* IgG1(Konzentration: 1:200), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland  
Alexa- Fluor<sup>R</sup> 594 Streptavidin (Konzentration: 1:1000), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland  
Z259 Brückenantikörper, DAKO Hamburg, Deutschland

## Reagenzien

*Rat Anti-Mouse IgG1 MicroBeads*, 2 ml, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland

*Zytokeratin MicroBeads*, konjugiert mit einem monoklonalen anti-Zytokeratin 7/8, 2 ml, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

PBS, Dulbecco's, Gibco™, BRL, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

Triton<sup>R</sup> X- 100, 0,1 % in PBS, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

*PolymorphPrep™*, d= 1,113 g/ml; Osmolalität= 460 mOsm, Axis-Shield, Oslo, Norwegen

Paraformaldehyd, Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland

*Nycodenz<sup>R</sup>*, Dichte: 1.069 g/ml, Osmolalität= 335 mOsm; Axis-Shield, Oslo, Norwegen

*Vectashield<sup>R</sup> Mounting Medium with DAPI*, Vector Laboratories, Burlingame, Kanada

Proteinblock *Serumfree*, DAKO, Hamburg, Deutschland; *Catalog No.:* X0909

*Antibody Diluent with Background*, DAKO, Hamburg, Deutschland; *Catalog No.:* S3022

*Antibody Diluent*, DAKO REAL, Hamburg, Deutschland; *Catalog No.:* S2022

*Fixation Solution B, Epithelial Cell Detection Kit*, Epimet, München, Deutschland

*Perm Solution A, Epithelial Cell Detection Kit*, Epimet, München, Deutschland

*MACS Running Buffer*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

*FcR Blocking Reagent, human*, 0,05% Säure, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

*CellSearch™ Profile Kit*, New York, U.S.A.

*Dulbeccos modified eagle medium (DMEM)*, Gibco™ BRL, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

Fötales Kälberserum (FCS), *PAA Laboratories GmbH*, Pasching, Österreich

L- Glutamin 200 mM, Gibco™ BRL, Life Technologies, Eggstein, Deutschland

*autoMACS™ Running Buffer*, *MACS™*, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

ABM, antibiotisch-antimykotische Lösung, *PAA Laboratories GmbH*, Pasching, Österreich

Accutase 4%, *PAA Laboratories GmbH*, Pasching, Österreich

TrypanBlau-Lösung 0,4 %, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Trypsin-EDTA 25 %, Gibco™ BRL, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO), Serva, Heidelberg, Deutschland

Natriumchlorid, Sigma- Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Natronlauge (NaOH), Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Salzsäure (HCL), Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland

Trizin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

*Dilution Buffer* (Aqua dest. verdünnt), *CellSearch™*, New York, U.S.A.

Ficoll-Plaque, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland  
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan, Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland  
Levamisol, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland  
Formamid, deionisiert, Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland  
*Hanks` salt solution*, Biochrom AG, Berlin, Deutschland  
*Tween 20*, Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland  
Glycerol, Sigma, Deisenhofen, Deutschland  
Neofuchsin 5 %, Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland  
Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>), Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland  
Hämalaun, Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland  
*CellTracker<sup>TM</sup>green* CMFDA (5-Chloromethylfluorescein Diacetat), C7025; Absorption bei 492 nm; < -20°; *Molecular Probes.invitrogen detection technologies* 1,5 µl in 15 ml Medium  
RLT-Puffer, Lyse-Puffer, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland  
Dextran, Sigma- Aldrich, Deisenhofen, Deutschland  
AB-Serum, Biotest AG, Dreieich, Deutschland  
EDTA (Diethylen- diamin- tetraessigsäure), Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland  
BSA (Bovines Serum Albumin), PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich  
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), Carl Roth GmbH, Karlsruhe

### Zelllinien

MCF-7, *human breast adenocarcinoma cell line*, ATCC, Ursprungsgewebe Pleuraerguss  
SKOV3, *ovarian carcinoma cell line*, ATCC, Ursprungsgewebe Aszites

### Puffer und Lösungen

PBS, pH: 7,4: 1,54 M NaCl, 0,08M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

DME- Medium für die Zelllinien: 90% (v/v) DME- Medium, 10% (v/v) FCS, 1% Glutamin, 1% ABM

PABB: 45 ml PBS + 5 ml AB-Serum+ 50 µl BSAc

AB/PBS: 10 % AB-Serum-PBS-Lösung 10 ml AB-Serum ad 100 ml 1 x PBS-Puffer

PBS/FCS: 1 % FCS-PBS-Lösung 1 ml FCS ad 100 ml 1 x PBS-Puffer

TBST: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% *Tween* 20 in Aqua dest.

Paraformaldehyd: 8 % PFA-PBS-Lösung 8 g PFA ad 100 ml 1 x PBS-Puffer pH 7,4 einstellen mit NaOH

Nycodenz: 13 g Nycodenz, 0,58 g NaCl, 0,0896 µl Trizin in 100 ml Aqua bidest; pH: 7.4 (wichtig!), Dichte: 1.069 g/ml (wichtig!), Osmolalität= 335 mOsm

DAPI-Lösung (0,5 Mg/ml) 5 ml DAPI-Stammlösung (100 Mg/ml) ad 1 ml 1 x PBS-Puffer

## 4.2 Patientenkollektiv

Zwischen 2006 und 2008 wurde bei 21 Patientinnen mit einem Ovarialkarzinomrezidiv und 16 Patientinnen mit einem Mammakarzinomrezidiv der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf vor einer weiteren Therapie eine Blutentnahme durchgeführt. Der Altersdurchschnitt lag bei den Patientinnen mit einem serösen Ovarialtumor bei 55 Jahren (Spannweite: 39-66 Jahre) und bei Patientinnen mit Mammakarzinom ebenfalls bei 55 Jahren (Spannweite: 36-75 Jahre). Die Blutentnahme war Teil der klinischen Diagnostik. Alle 38 Patientinnen wurden gründlich aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Komplikationen im Rahmen der Blutentnahme traten bei keiner Patientin auf.

In allen Fällen ist zuvor eine komplette Primärtherapie mit kurativer Zielsetzung durchgeführt worden. Einer operativen Tumorentfernung folgte eine adjuvante Chemotherapie, bzw. eine Radiatio entsprechend der Leitlinien. In einigen Fällen lief auch eine neoadjuvante Chemotherapie. Die klinischen Daten sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst.

Die Blutentnahmen fanden vor jeglicher weiterer Behandlung statt. Eine Ausnahme ist die Probe RM04, die der gleichen Patientin wie RM01 in einem schon weiter fortgeschrittenem Stadium und bei palliativer Behandlung des Tumors erneut entnommen werden konnte.

Die Blutproben wurden noch am gleichen Tag aufgearbeitet.

Bei der Blutprobe R023 wurde bei der histologischen Untersuchung ein Malignom ausgeschlossen. Es handelte sich bei dem Ovarialtumor um ein mucinöses Zystadenom.

Tabelle 2: Patientenkollektiv Mammakarzinom. Die Proben RM01 und RM04 entstammen der gleichen Patientin. Die Probe RM04 wurde bei weiter fortgeschrittener Erkrankung und palliativer Behandlung entnommen. E =Estrogenrezeptor, P=Progesteronrezeptor, Her2=Her2- Rezeptor, +/- =positiv/negativ, x=nicht bekannt, 0=nein, 1=ja

Patient	Alter	Rezidiv	Rezeptoren	G	Staging	Fernmet.	Lokalrez.	Histologie	OP	Chemo	Radiatio	Weitere Behandlung
RM01*	47	1	E-,P-,Her2 +	G3	T+,N+	M1	0	1	1	1	1	Chemotherapie, Herceptin, Radiatio
RM02	52	1	E,P-, HER 2+	G2	pT2b,pN0	M0	1	1	1	1	1	Chemotherapie, Herceptin
RM03	50	1	E+,P+,Her2+	G3	ypT2,pN0	M1	1	1	1	1	1	Chemotherapie, Tamoxifen, Re-OP, Herceptin
RM04*	47	1	E-,P-,Her2+	G3	IV	M1	1	1	1	1	1	Siehe RM01
RM05	56	0	E-,P+,Her2-	Gx	cT3/4,cN+	M1	0	1	0	1	0	Chemotherapie, Avastin
RM06	67	1	Ex,Px,Her2x	G2	pT1c,pN1	M1	1	1	1	1	1	Nicht bekannt
RM07	54	1	E+,P-,Her 2-	G3	pT1c,pN0,L0	M1	1	1	1	1	0	Palliative Chemotherapie
RM08	34	1	E+,P+,Her2+	G3	pTx,pN1,L1	M1	1	1	1	1	1	Chemotherapie, Tamoxifen
RM09	75	1	E+,P+,Her2+	G2	pT4,pN1	M0	1	1	1	1	1	Tamoxifen
RM10	58	1	Ex,Px,Her2+	G2-3	ypT2,ypN2,	M0	1	1	1	1	1	Chemotherapie
RM11	35	1	E-,P-,Her2+	G3	ypT2, pN1	M1	1	1	1	1	1	RE- OP, Tamoxifen, Chemotherapie
RM12	67	1	Ex,Px,Her2x	Gx	pTx,pNx	M1	0	0	1	1	1	Chemotherapie, endokrine Therapie
RM13	64	1	E+,P+,Her2+	G3	pT2,pN1b1	M1	1	1	1	1	1	Radiatio, Chemotherapie, endokrine Therapie
RM14	72	1	E+,P-,Her 2-	G2	pT2,Nx,	M1	0	1	1	0	1	Aromatasehemmer
RM15	36	1	E+,P+,Her2+	G3	pT2,pN1	M1	1	1	1	1	0	Chemotherapie, Herceptin
RM16	52	1	E+,P+,Her2-	Gx	pT1c,pT2pN1	M1	1	1	1	1	1	Chemotherapie, Aromatasehemmer
RM17	60	1	E+,P+,Her2-	G2	pT1c,pN1	M1	1	0	1	1	1	Chemotherapie, Herceptin

Tabelle 3: Patientenkollektiv Ovarialkarzinom. Die Probe R023 entstammt einer Patientin mit einem gutartigen Ovarialtumor (mucinöses Zystadenom), wie die histologische Aufarbeitung postoperativ zeigte. Die Probe R013 entfällt, da es kein Ovarialkarzinom war; x=unbekannt, 0=nein, 1=ja.

Patient	Alter	Figo,initial	G	Staging	Fernmet.	Neoad.	Rezidiv	Histologie	OP	Chemo	Radiatio	Weitere Behandlung
R001	57	x	Gx	pTx,pNx	Mx	x	1	0	1	1	0	Nicht bekannt
R002	68	IIIc	G1	pTx, pN1	M0	1	1	0	1	1	0	Re-OP, Chemo
R003	54	IIb	G2	pTx, pN1	M0	1	1	1	1	1	0	R1-Resektion, Chemo
R004	46	IIIc	G3	pTx, pN1	M0	0	1	1	1	1	0	Re- OP, Chemo
R005	63	IV	Gx	pTx, pN1	M1	1	1	0	1	1	0	Palliativ- OP
R006	50	IIIc	Gx	pTxpNx	Mx	1	1	0	1	1	0	R0- Resektion, Chemo
R007	50	IIb	G2	pTx,pN0	M0	0	1	1	1	1	0	R0- Resektion, Chemo
R008	66	IV	G3	pTx,pN1	Mx	0	1	0	1	1	0	R0- Resektion, Chemo
R009	57	II a	G1	pT2apN0	M0	0	1	1	1	1	0	Chemo
R010	47	IIIC	G2	pT3Nx	Mx	0	1	1	1	1	0	Re- OP, Chemo
R011	49	IIIB	G3	pT3bpN0	M1	0	1	1	1	1	0	Palliativ- OP
R012	65	IIIc	G3	pTx,pN0	M0	0	1	1	1	1	0	R0- Resektion, Chemo
R014	47	x	Gx	pTx,pNx	Mx	x	1	0	1	1	0	Nicht bekannt
R015	65	IIIC	G2	pT3cpNx	M0	0	1	1	1	1	0	Re- OP, Chemo
R016	39	IIIC	G3	pT3c,pN1,L0	M0	0	1	1	1	1	0	Nicht bekannt
R017	50	IIIC	G3	pT3c1pN1	M1	0	1	1	1	1	0	Re- OP, Chemo
R018	53	IV	Gx	pTx,pN1	M1	1	1	1	1	1	0	R1- Resektion, Chemo
R019	59	IIIc	G3	pTx,pN1	Mx	0	1	1	1	1	0	Re- OP
R020	46	IIIC	G2	pT3c,pN0	M0	0	1	0	1	1	0	Re- OP, Chemo
R021	65	IIIC	G2	pT3c,pN1	M1	0	1	1	1	1	0	Nicht bekannt
R022	55	IIb	G2-3	pTx,pN1	M1	0	1	1	1	1	0	Andjuvante Chemo
R023	55	x	Gx	pTx, pNx	Mx	x	x	1	1	0	0	Nicht notwendig

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Blutproben

Alle Patientinnen wurden vor der Blutpunktion ausführlich über das Ziel der Untersuchung aufgeklärt. Nach vorliegender Einverständniserklärung wurden Blutproben entnommen.

Die Punktionen erfolgten vor einer weiteren Therapie oder unmittelbar präoperativ in Intubationsnarkose aus dem venösen Kreislaufsystem in der Klinik für Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Eppendorf bei Prof. Dr. med. F. Jänicke. Nach Desinfektion und Stichinzision der Haut wurden 3-6 7 ml EDTA-Monovetten oder 2-3 5 ml-EDTA-Monovetten mit Blut gefüllt. Diese Monovetten wurden zeitnah in das Institut für Tumorbilogie des Universitätsklinikums Eppendorf gebracht und dort sofort weiter verarbeitet.

### 4.3.2 Zellkultur und *spiking*-Versuche

Um die Dichtegradientenzentrifugation und die manuelle Methode MACS™ zu validieren und zu etablieren, wurde eine Reihe von *spiking*-Versuchen mit MCF 7-Zellen (*human breast adenocarcinoma cell line*, ATCC) und SKOV3-Zellen (*human ovarian carcinoma cell line*, ATCC) aus der Zellkultur durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde in das Blut gesunder Spender eine bestimmte Zahl MCF 7-, oder SKOV 3-Zellen gegeben. Die Zellen wurden zuvor mit DME-Medium (*Dulbeccos modified eagle medium* mit 10 % *Fetal Calf Serum* (FCS), 5 ml L-Glutamine und 5 ml einer antibiotischen-antimykotischen Lösung (ABM) der Firma PAA GmbH) in 25 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen kultiviert und nach 70-80% Konfluenz passagiert.

Sowohl zur Zellernte für die *spiking*-Experimente als auch zur Passagierung wurden die Zellen wie folgt behandelt:

- Überstand der Kulturflaschen verwerfen
- Waschen mit 3-5 ml PBS
- Lösen vom Flaschenboden mit 2 ml Trypsin-Puffer für 2 Minuten oder mit Accutase
- In 5 ml reinem DME-Medium aufnehmen, um Zellschädigungen zu vermeiden
- 3-minütige Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen und Raumtemperatur
- Vorsichtiges Absaugen des Überstandes
- Das Zellpellet in 3 ml DME-Medium resuspendieren und entweder zur weiteren Kultivierung 1 ml in eine neue Kulturflasche mit 6 ml DME-Medium aufnehmen oder zur weiteren Verwendung in der Neubauer-Zählkammer zählen

Zu Beginn der Arbeit wurden die Zellen in der Zellkultur mit dem Farbstoff *CellTracker<sup>TM</sup> green* CMFDA ((5-Chloromethylfluorescein Diacetat) Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) markiert, um sie für die Auswertung sichtbar zu machen. Dabei wurden 10 ml DME-Medium mit 1.5 µl der *Tracker*-Lösung versetzt und damit die Zellkulturflaschen nach dem 1. Waschschrift mit PBS befüllt. Die Zellkulturflaschen wurden für 15 Minuten offen im Brutschrank belassen. Anschließend wurde eine erneute Waschung mit 3-5 ml PBS durchgeführt. Die folgenden Schritte entsprechend dem o.g. Protokoll.

Diese Markierung wurde nur zur Optimierung der Dichtegradientenzentrifugation genutzt, da bei der weiteren Verarbeitung der Proben, z. B. MACS<sup>TM</sup>, die Fluoreszenz verloren ging.

Die Wiederfindungsrate und die Antikörperbindung nach der Behandlung mit Accutase in der Zellkultur waren wesentlich besser, sodass ab August 2006 Trypsin gegen Accutase ersetzt wurde.

Um standardisierte Bedingungen bei der Durchführung der Versuche zu gewährleisten, wurden die Zellen anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Diese wurde mit 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau-Lösung befüllt. Vor Befüllen wurde darauf geachtet, dass „Newtonringe“ nach dem Auflegen des Deckglases auf der Kammer erscheinen. Sie zeigen an, dass die Tiefe der Kammer richtig eingestellt ist (0,1 mm). Anschließend wurden vier der großen Quadrate der Neubauer-Kammer ausgezählt. Die genaue Zellzahl kann dann folgendermaßen berechnet werden:

Zellzahl aller Quadrate / 4 = Mittelwert der Zellzahl / Quadrat

Mittelwert der Zellzahl eines Quadrates x 10<sup>4</sup> = Zellen/ml

Zellen / ml x Gesamtvolumen der Zellsuspension = Gesamtzellzahl

Für die *spiking*-Experimente wurde Blut von gesunden freiwilligen Spendern entnommen und mit den aus der Zellkultur entnommenen MCF7- oder SKOV3-Zellen versetzt. Anschließend wurden die Blutproben nach dem beschriebenen Protokoll in Kap. 4.3.3 weiter aufgearbeitet.

### 4.3.3 Dichtegradientenzentrifugation als erste Stufe der Separation

Der erste Schritt der Separation erfolgte direkt im Anschluss an die Blutentnahmen mit Hilfe eines zweistufigen Dichtegradienten. Diese Zwei-Phasen-Dichtegradientenzentrifugation ermöglicht die isolierte Konzentrierung der Fraktion mononukleärer Zellen (MNZ) (Griwatz *et al.*, 1995).

Sechs 15 ml-polystyrol-Falconröhrchen wurden mit 1% FCS in PBS für ca. zwei Stunden auf einem Mischer gesättigt, um Zellverluste durch Wandadhäsionen zu vermeiden. Anschließend wurde die PBS-FCS-Lösung verworfen und die Röhrchen wurden mit den Medien für die Dichtezentrifugation befüllt. Als erstes wurde 3 ml *PolymorphPrep*<sup>TM</sup> (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) verwirbelungsfrei in die Röhrchen pipettiert. Die nächste Phase bestand aus 3 ml *Nycodenz*<sup>R</sup> (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) mit der Dichte von 1,069 g/ml und dem exakten pH von 7,40, das verwirbelungsfrei auf die *PolymorphPrep*<sup>TM</sup>-Schicht pipettiert wurde. Zum Schluss wurden 5 ml EDTA-Blut langsam auf die zwei Phasen pipettiert, sodass es zu keiner Vermischung kam.

Die Röhrchen wurden verschlossen und exakt für 25 Minuten bei exakt 450 x g und exakt 22°C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde zunächst mit einer Pipette die Plasmaphase entnommen, dann die Monozytenphase, in der man die Tumorzellen erwartet, ohne die Schichten zu verwirbeln (Abb. 1). Zur Kontrolle wurde auch die Lymphozytenphase vorsichtig entnommen. In einem neuen, ebenfalls gesättigten 15 ml-Röhrchen wurden die Monozytenphase und die Lymphozytenphase separat mit der gleichen Menge Paraformaldehyd 8% langsam tropfend und mit einem Vortexmixer vermischt, sodass eine Endkonzentration von 4% entstand. Fixierung 20 Minuten bei exakt 4°C. Anschließend wurde wieder mit 600 x g 10 Minuten und bei 22 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert und erneut bei 600 x g 10 Minuten und 22°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert wurde kam es, je nach Versuch, zu folgenden nächsten Schritten:

Bei den *spiking*-Versuchen zur Wiederfindungsrate des Gradienten wurde das Pellet in einen Cytospintrichter übertragen und durch erneute Zentrifugation (1200 Umdrehungen/Minute, 3 Minuten) auf einen Objektträger (OT) gebracht. Der Überstand wurde mit Schwung verworfen und die OT für einen Tag bei Zimmertemperatur getrocknet.

Bei den *spiking*-Versuchen zur Wiederfindungsrate des MACS<sup>TM</sup> und bei den Blutproben der Patientinnen wurden die Zellsuspension für die immunomagnetischen Säulen und für *CellSearch*<sup>TM</sup> weiter aufgearbeitet. Der Ablauf ist in der Übersicht in Abb. 2 dargestellt.

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden die kultivierten Zellen nach der Gradientenzentrifugation und der Fluoreszenzfärbung gezählt. Zunächst wurden ca. 1000 MCF 7-, oder SKOV3-Zellen in die Blutproben gegeben. Nach Optimierung des Gradienten reduzierte ich die Zahl zugesetzter Zellen auf 500, 100 und zum Schluss auf 10, um die Sensitivität des Dichtegradienten auch bei niedrigen Tumorzellzahlen zu ermitteln.

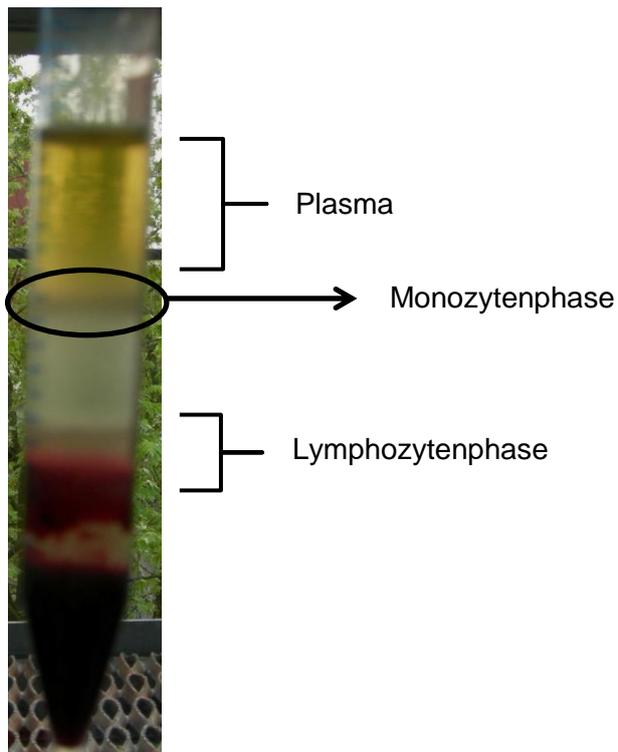


Abbildung1: Gradient nach Zentrifugation: das überstehende Plasma wurde vorsichtig entnommen, die Monozytenphase und die Lymphozytenphase wurdenseparat für die weitere Verarbeitung fixiert.

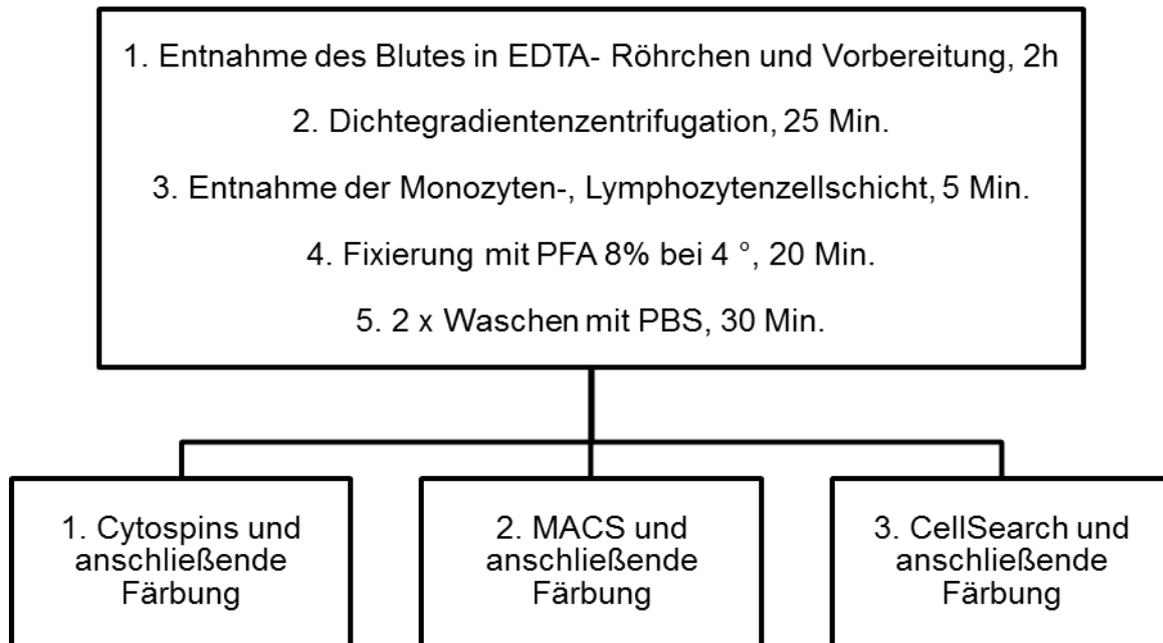


Abbildung 2: Übersicht Versuchsablauf: Vorbereitung, Zentrifugation der Blutproben und Fixierung (Endkonzentration der Fixierung 4%) der Monozyten- und Lymphozytenpase. Die CK(+)-Zellen wurden im Anschluss entweder direkt auf einem Cytospin mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern sichtbar gemacht oder die Proben weiter mit immunomagnetischen Verfahren aufgereinigt.

#### 4.3.4 Magnet Cell Separation (MACS™) als manuelles Verfahren: optimiertes MACS™-Protokoll für die Anreicherung von Tumorzellen nach Dichtegradientenzentrifugation aus Patientinnenblut.

Der zweite Schritt der Zellseparation erfolgte immunomagnetisch zum einen manuell mit MACS™-Säulen, zum anderen mit der semi-automatisierten Methode *CellSearch™*.

Das Prinzip des MACS™-Verfahrens beruht darauf, dass eine Zellsuspension, in der sich eine beliebige Teilmenge von Zellen befindet, die mit supramagnetischen *MicroBeads* über Antikörper markiert sind, über eine Säule gegeben wird. Diese Säule ist mit eisenhaltigen Mikrokügelchen (Matrix) gefüllt und in einem magnetischen Feld plaziert. Die markierten Zellen verbleiben in der Säule, während die unmarkierten Zellen durch die Säule hindurchlaufen. Die markierte Zellfraktion wird aus der Säule nach dem Entfernen des Magnetfeldes herausgespült. Die Matrix der Säulen besteht aus kleinen, ferromagnetischen Kügelchen ummantelt von einem Kunststoff.

Ich arbeitete in dieser Studie mit den *MS-Columns* von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland). Mit diesen Säulen ist eine Selektion bis maximal  $10^7$  mit *MicroBeads* markierter Zellen möglich. Die darüber laufende heterogene Zellsuspension darf bis zu  $2 \times 10^8$  Zellen

enthalten. Diese Säulen sind für die positive Selektion von sehr seltenen Zellen konstruiert (Miltenyi Biotec).

Folgendes Protokoll zur Anreicherung von Tumorzellen aus der über Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Monozytenfraktion wurde für die Vergleichsuntersuchungen der Patientenproben verwendet:

Für die Versuche zur Zellanreicherung mit dem MACS<sup>TM</sup>-Verfahren wurden nach dem Gradienten und nach der Fixierung 20 µl Anti-EpCAM-Antikörper (*monoclonale mouse anti-human antibody*, IgG1) der Zellsuspension zugefügt und 5 Minuten bei 4°C belassen. Anschließend wurde es mit 2 ml *Running-Buffer* gewaschen (MACS<sup>TM</sup> *Running Buffer*, Miltenyi Biotec) und bei 800 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Wiederholung dieses Waschschrittes wurden 160 µl *Running-Buffer* und 40 µl der *MicroBeads* (*rat anti-mouse IgG1 MicroBeads*, Miltenyi Biotec) hinzugefügt und vorsichtig mit dem Vortex-Mischer vermischt. Die Lösung wurde 15 Minuten bei 4°C belassen. Anschließend wurde es mit 2 ml *Running-Buffer* aufgefüllt und dann bei 800 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die Resuspension mit 500 µl *Running-Buffer*.

Die Vorbereitung der MACS<sup>TM</sup>-Säulen wurde wie folgt durchgeführt: Die Säulen wurden in einem Stativ befestigt und damit zwischen die Pole eines Permanentmagneten gebracht, auf den Auslauf der Säule wurde eine Kanüle der Größe 23 G als „*flow resistor*“ angebracht und die Säulen bzw. Matrixoberfläche wurden vor der Zellsuspension mit 500 µl *Running-Buffer* abgesättigt. Der durchgelaufene Puffer wurde verworfen. Dann wurde die Zellsuspension vorsichtig auf die Säule aufgetragen. Die durchlaufende Suspension wurde in einem zuvor gesättigten Röhrchen aufgefangen (Negativkontrolle). Um die Säule zu waschen und falsch adhärenente Zellen loszulösen, wurde sie mit 3 x 500 µl *Running-Buffer* gespült und die Spülflüssigkeit im gleichen Gefäß gesammelt. Diese Negativkontrolle wurde zur Kontrolle gefärbt und ausgewertet. Die Säule wurde im Anschluss aus dem Magneten genommen und es wurden 2 x 500 µl *Running-Buffer* aufgetragen. Die Suspension wurde in einem neuen Röhrchen (Positivkontrolle) aufgefangen. Bei diesem Schritt sollten sich die durch über die supramagnetischen *MicroBeads* adhärenierten Zellen lösen. Um möglichst viele CTC von der Oberfläche zu lösen wurde ein Stempel benutzt: Nachdem wiederholt 500 µl *Running-Buffer* auf die Säule aufgetragen wurden, wurde der Stempel oben aufgesetzt und vorsichtig durchgedrückt. Dies wurde einmal wiederholt.

Die Positiv- und die Negativkontrollen wurden in jeweils einen Cytospintrichter gebracht, bei 1200 Umdrehungen/Minute, 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die OT einen Tag bei Raumtemperatur getrocknet. Das Prinzip ist in der Abbildung 3 wiedergegeben.

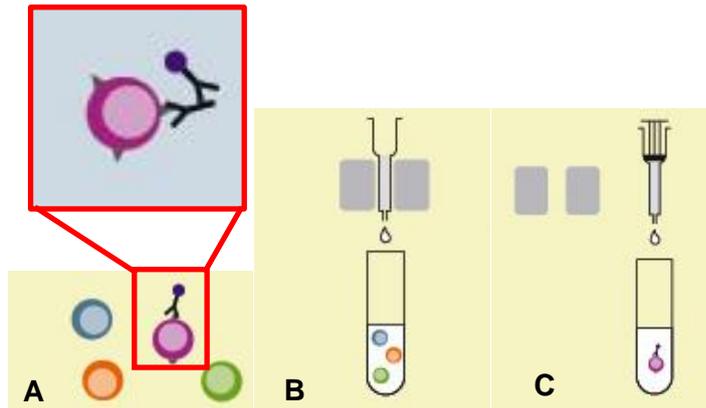


Abbildung 3: Prinzip der positiven Selektion im MACS™ (Graphik von Miltenyi Biotec, *Homepage*). A: Graphik der Zell-Antikörper-*MicroBead*-Kopplung. B: Die mit den *MicroBeads* besetzten Zellen bleiben in der Matrix der Säule durch den Permanentmagneten haften. C: Nach Entfernung des Magnetfeldes können die Zellen aus der Säule gespült werden.

#### 4.3.4.1. MACS™-Protokoll nach Miltenyi Biotec mit dem *Epithelial Cell Detection Kit* für die Anreicherung von Tumorzellen nach Dichtegradientenzentrifugation

Das Protokoll für die MACS™-Zellseparation von Miltenyi Biotec sieht vor, die gewaschene Monozyten- und Lymphozytenphase des Dichtegradienten mit der gleichen Menge PFA (4%) für 2 Stunden zu fixieren. Dann wurde wie folgt vorgegangen:

- Zentrifugation bei exakt 300 x g für 20 Minuten
- Überstand verwerfen
- Resuspendieren in 0.5 ml PBS/FCS (1%)
- Hinzufügen von 3.5 ml *Dilution Buffer*, verdünnt mit Aqua dest. (1:10)
- Hinzufügen von 0.5 ml *Cell Perm Solution* und mischen
- Zentrifugation der Suspension bei 300 x g für 10 Minuten
- Überstand verwerfen
- Hinzufügen von 3 ml der *Cell Stain Solution*, verdünnt mit PBS (1:10) und resuspendieren
- erneute Zentrifugation bei exakt 300 x g für 10 Minuten
- Überstand verwerfen
- Hinzufügen von 600 µl der *Cell Stain Solution* und Resuspension
- Hinzufügen von 200 µl *FCR Blocking Reagent* und mischen
- Hinzufügen von 200 µl MACS Zytokeratin *MicroBeads* und mischen
- Inkubationszeit von 45 Minuten (hin und wieder mischen)
- im Anschluss mit 3 ml PBS/FCS auffüllen und mischen

Säulenprotokoll:

- Säule mit einer Kanüle (24 G) als „flow resistor“ im Magnetfeld aufhängen
- mit 2 ml PABB absättigen, durchlaufen lassen
- Zellsuspension schrittweise auf die Säule geben
- die durchlaufende Suspension als Negativfraktion auffangen
- Säule aus dem Magnetfeld entfernen
- 1 ml PBS/FCS (1%) auf die Säule auftragen und in ein neues, gesättigtes Röhrchenlaufen lassen
- 1 ml PBS/FCS (1%) erneut auftragen, Stempel aufsetzen und durchdrücken
- von der Positiv- und Negativfraktion Cytospins anfertigen
- Cytospins für 24 h trocknen bei Raumluft lassen

#### 4.3.4.2 Option 1: Konjugation der *Rat Anti-Mouse IgG1 MicroBeads* mit dem Anticytokeratin A45-B/B3

Im Folgenden wurden die Zytokeratin-*Beads* aus 4.3.4.1. durch *Rat Anti-Mouse IgG1 MicroBeads* ersetzt. Diese wurden vor der Separation mit dem anti-Zytokeratin Antikörper A45-B/B3 konjugiert. Hierbei wurden auch die *MS-Columns* von Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland) verwendet. Es wurde wie folgt vorgegangen:

- 25  $\mu$ l *Rat Anti-Mouse IgG1 MicroBeads*
- 55  $\mu$ l Antikörperlösung (5  $\mu$ l A45-B/B3 mit 50  $\mu$ l AB/PBS)
- Inkubation 15 Minuten bei 4 °
- Hinzufügen von 80  $\mu$ l PBS (insgesamt 160  $\mu$ l)

Säulenprotokoll:

- 1 ml PBS/FCS auf die Säule auftragen und durchlaufen lassen, Lösung verwerfen
- die Antikörper-*MicroBead*-Lösung (160  $\mu$ l) auf die Säule auftragen und durchlaufen lassen
- 500  $\mu$ l PBS/FCS auftragen und ebenfalls durchlaufen lassen
- die Säule aus dem Permanentmagneten entfernen
- 500  $\mu$ l PBS/FCS auftragen und durchlaufen lassen, wobei ein neues Röhrchen die Lösung auffängt
- wiederholt 500  $\mu$ l PBS/FCS auftragen, Stempel aufsetzen und durchdrücken

Am Ende hatte ich 1000 µl einer Lösung mit konjugierten *Rat Anti-Mouse IgG1 MicroBeads*.

#### **4.3.4.3 Option 2: Konjugation der *Rat Anti-Mouse IgG1 MicroBeads* mit EpCAM Antikörper**

Die *Rat Anti-Mouse IgG1 MicroBeads* aus 4.3.4.2 wurden mit anti-EpCAM Antikörpern konjugiert:

- 25 µl *Rat Anti-Mouse IgG1 Beads*
- 50 µl der Antikörpersuspension (49 µl AB/PBS mit 1 µl anti-EpCAM, *monoclonal mouse anti-human IgG1*, Novocastra, Newcastle, UK)
- Inkubation 15 Minuten bei 4° belassen
- Hinzufügen von 75 µl PBS (insgesamt 150 µl)

Säulenprotokoll:

- 2 ml PBS/FCS auf die Säule (*MS-Columns*) auftragen, durchlaufen lassen und verwerfen
- die *Bead*-Antikörper-Lösung auftragen und durchlaufen lassen
- 500 µl PBS/FCS auftragen und durchlaufen lassen
- Säule aus dem Magneten entfernen
- 400 µl auftragen und durchlaufen lassen, wobei ein neues Röhrchen die Lösung auffängt
- 450 µl PBS/FCS auftragen, Stempel aufsetzen und durchdrücken

Am Ende hatte ich 1000 µl einer Lösung mit konjugierten *Rat Anti-Mouse IgG1 MicroBeads*.

#### **4.3.4.4 Modifiziertes MACS™-Protokoll für die Anreicherung von Tumorzellen nach Dichtegradientenzentrifugation**

Im folgenden Protokoll zur Anreicherung von TZ aus der über Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Monozytenfraktion wurden die antikörpermarkierten *MicroBeads* für die Vergleichsuntersuchungen der *spiking*-Versuche verwendet.

- Die Monozytenphase für 1 Stunde bei 4° C mit PFA (4%) fixieren lassen

- Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 x g
- Überstand verwerfen
- Resuspension in 500 µl PBS
- Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 x g
- Überstand verwerfen
- 500 µl Triton<sup>R</sup> X-100, 0,1 % in PBS
- 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen
- Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 x g
- Überstand verwerfen
- Resuspension in 500 µl AB/PBS
- Hinzufügen von 300 µl der mit A45-B/B3 konjugierten *MicroBeads* oder der mit anti-EpCAM konjugierten *MicroBeads*
- 45 minütige Inkubationszeit auf dem Schüttler
- Zentrifugation (5 Minuten, 1000 x g)
- Überstand verwerfen
- 1 ml PBS/FCS hinzufügen und mischen
- Zentrifugation (5 Minuten/ 1000 x g)
- Überstand verwerfen
- Resuspension in 3 ml PBS/FCS

#### Säulenprotokoll:

- Säule im Permanentmagnet für 2 Stunden mit 2 ml PABB ansättigen
- Säule mit 3-Wege-Hahn und einer 26 G Kanüle versehen
- PABB durchlaufen lassen und verwerfen
- die Zellsuspension auftragen und durchlaufen lassen
- Auffangen der durchlaufenden Lösung (Negativfraktion)
- 1 ml PBS/FCS auftragen und durchlaufen lassen
- Säule aus dem Magnetfeld entfernen und 1 ml PBS/FCS auftragen und in ein neues Röhrchendurchlaufen lassen
- 1 ml PBS/FCS erneut auftragen und durchlaufen lassen
- 1 ml PBS/FCS auftragen, Stempel aufsetzen und durchdrücken
- Cytosins anfertigen (wie in 3.4.3 beschrieben) und für 24 Stunden trocknen lassen (Raumluft)

Das endgültig ausgearbeitete Protokoll (siehe 4.3.4.) erbrachte zufriedenstellende Ergebnisse und wurde sowohl für die Patientenproben als auch für die *spiking*-Versuche angewendet.

#### 4.3.5 Protokoll für die immunomagnetische Anreicherung von CTCs mit dem semi-automatisierten *CellSearch*<sup>TM</sup>-Verfahren unter Verwendung von des *CellSearch*<sup>TM</sup> *Profile Kits*

In neuesten Studien werden mit dem Veridex LLC *CellSearch*<sup>TM</sup> System (Warren, Johnson & Johnson company, New York, USA) gute Resultate der Zellisolierung erzielt. Sieuwerts *et al.* isolierten eine zufriedenstellende Zahl an CTCs im peripheren Blut und konnten diese dann durch RT-PCR weiter analysieren (A. M. Sieuwerts *et al.*, 2009). Eine große unabhängige Studie mit 92 Patientinnen zeigte eine Findungsrate von 70% (Riethdorf *et al.*, 2007).

Im *CellTracks*<sup>R</sup> *AutoPrep* System können parallel bis zu acht Proben aufgearbeitet werden. Das *CellSearch*<sup>TM</sup> *Profile Kit* wurde entwickelt, um, unter Verwendung des *CellTracks*<sup>R</sup> *AutoPrep* Systems, CTCs epithelialen Ursprungs aus Vollblut bei nur niedriger Antigendichte auf der Zelloberfläche anzureichern.

Das *CellTracks*<sup>R</sup> *AutoPrep* System garantiert durch die weitestgehend automatisierte Aufarbeitung eine standardisierte und optimierte Isolierung von CTCs.

Da das System normalerweise mit Vollblut arbeitet, kann es wegen der fehlenden Erythrozyten der Proben zu Fehlermeldungen des Systems kommen. Meine Proben wurden deshalb als Kontrollen gestartet und somit wurde das Problem behoben.

Das *CellSearch*<sup>TM</sup> *Profile Kit* enthält ein *capture*-Reagenz auf Ferrofluidbasis, welches aus Nanopartikeln besteht. Ein magnetischer Kern wurde von einer polymeren Schicht von Antikörpern mit Bindungsspezifität für das EpCAM-Antigen für die Bindung der CTCs umgeben.

Weitestgehend wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Da ich jedoch nicht mit Vollblut arbeitete, musste ich etwas variieren:

Die nach dem Dichtegradienten erhaltene Monozytenphase wurde mit Formalin fixiert und in PBS-Puffer aufgenommen. Es wurde dann bei exakt 450 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 3,5 ml *Dilution Buffer* (*CellSearch*<sup>TM</sup> *Profile Kit*) resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß des *Profile Kits* überführt. Die weitere Bearbeitung lief dann im *CellSearch*<sup>TM</sup> System mit dem *Profile Kit* laut den Handbucharweisungen. Die Probe wurde als „*control run*“ verarbeitet.

Die Reaktionsgefäße mit den angereicherten möglichen CTCs wurden nach abgeschlossener Aufarbeitung im *CellSearch*<sup>TM</sup>-System aus dem Gerät genommen und zur weiteren Anreicherung in einen Magneten gestellt. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten. Zellen, die gekoppelte Antikörper gebunden haben, wurden vom Magneten zurück gehalten, während der Überstand verworfen wurde. Die Zellen wurden in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und die Zellsuspension verteilt auf zwei Objektträger aufgetragen. Die Lösung

wurde über Nacht getrocknet und anschließend wurden die Objektträger entweder immunzytochemisch gefärbt oder in Alufolie luftdicht verpackt und bei -80 °C gelagert.

Zur Kontrolle wurden formalinfixierte TZ (MCF 7 oder SKOV 3) in Puffer (PBS) aufgenommen und mit dem *CellSearch*<sup>TM</sup> System im „control run“ verarbeitet.

#### 4.3.6 Immunfluoreszenzfärbungen

Nach der Anreicherung der TZ durch den Dichtegradienten und der nachfolgenden immunomagnetischen Zellseparation, wurde eine immunzytochemische Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt.

##### 4.3.6.1 Nachweis von Tumorzellen mit dem Standard anti-Zytokeratin Antikörper A45 B/B3-Cy3

Die Zellareale wurden mit einem Fettstift (DAKO *Pen*) umrandet. 135 µl der Fixierlösung B aus dem *Epithelial Cell Detection Kit* von Epimet wurden in 10 ml PBS verdünnt und 400 µl dieser Lösung auf das Zellareal pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 15 Min. Nach Dekantieren der Lösung wurden 100 µl der *Perm Solution A* aus dem *Epithelial Cell Detection Kit* (Epimet) in 10 ml PBS verdünnt und 200 µl dieser Lösung auf das Zellareal aufgetragen. Wieder Inkubation für 5 Min. Der Dekantieren der Lösung folgte eine zweimalige Waschung mit TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 in Aqua dest.) für jeweils 2 Min. Drei bis vier Tropfen Proteinblock *Serumfree* (DAKO, Hamburg, Deutschland) wurden anschließend auf das Zellareal aufgetragen und für 20 Min. belassen. Nach Dekantieren der Proteinblocklösung folgte die Inkubation der Zellen mit dem Antikörper: der anti-Zytokeratin Antikörper A45-B/B3 (*Mouse monoclonal pan-cytokeratin antibody* A45-B/B3 IgG1, konjugiert mit dem Fluorochrom Cy3-Mono-NHS, Micromet, München, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 1: 300 mit *Antibody Diluent* (DAKO REAL, Hamburg, Deutschland) verdünnt. 200 µl dieser Antikörperlösung wurden auf das Zellareal aufgetragen und für 45 Min. belassen. Im Anschluss Dekantieren der Lösung und zweimalige Waschung mit TBST für jeweils 2 Min. 4 µl DAPI (Vectashield<sup>R</sup>, Burlingame, Kanada) wurden in 10 ml PBS verdünnt und davon 400 µl für 1 Min. auf das Zellareal aufgetragen. Anschließend folgte eine einmalige Waschung mit PBS. Nach leichter

Antrocknung Eindeckeln der Cytospins. Das Eindeckeln erfolgte, als das Zellareal noch etwas feucht war, sodass ich keine Lösung dafür verwenden musste.

#### **4.3.6.2 Nachweis von Tumorzellen mit dem Standard anti-Zytokeratin Antikörper A45-B/B3- Cy3 und simultaner Färbung der Leukozyten dem *Common Leucocyte Antigen* (CD45)**

Das Zellareal wurde mit einem Fettstift (DAKO *Pen*) umrandet. 100 µl der *Perm Solution A* aus dem *Epithelial Cell Detection Kit* (Epimet) wurden in 10 ml PBS verdünnt und 200 µl auf das Zellareal aufgetragen und für 10 Min. belassen. Dem Dekantieren der *Perm Solution* folgte eine dreimalige Waschung mit TBST für jeweils 2 Min. Dann Inkubation der Zellen für 20 Min. mit drei bis vier Tropfen Proteinblock *Serumfree* (DAKO, Hamburg, Deutschland). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem AK für 15 Min.: Auftragen von 200 µl A45-B/B3 (*Mouse monoclonal pan-cytokeratin antibody A45-B/B3 IgG1*, konjugiert mit dem Fluorochrom Cy3- Mono-NHS, Micromet, München, Deutschland) in einer Konzentration von 1: 300 mit *Antibody Diluent* (DAKO REAL, Hamburg, Deutschland). Dann folgte erneut eine dreimalige Waschung mit TBST für jeweils 2 Minuten. Drei bis vier Tropfen Proteinblock *Serumfree* (DAKO, Hamburg, Deutschland) wurden erneut für 20 Minuten auf das Zellareal aufgetragen. Nach Dekantieren dieser Lösung erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 45 Min.: Alexa- Fluor<sup>R</sup> 488 *anti-human CD45* in einer Verdünnung von 1: 150 mit dem *Antibody Diluent* (DAKO REAL). Im Anschluss zweimalige Waschung mit TBST (jeweils 2 Min.). 4 µl DAPI (Vectashield<sup>R</sup>, Burlingame, Kanada) wurden in 10 ml PBS verdünnt und davon 400 µl für 2 Minuten auf dem Zellareal belassen. Es folgte eine zweimalige Waschung mit PBS. Leichte Antrocknung und Eindeckeln der OT.

#### **4.3.6.3 Nachweis von Tumorzellen mit dem Standard anti-Zytokeratin Antikörper A45 B/B3-Cy3, dem anti-Zytokeratin 5/8-Oyster und simultaner Färbung der Leukozyten mit dem *Common Leucocyte Antigen* (CD 45)**

Nach ca. 24 Stunden Trocknung des Präparates bei Raumtemperatur wurde das Zellareal auf dem OT mit DAKO *Pen* umrandet. 135 µl der Fixierlösung B aus dem *Epithelial Cell Detection Kit* von Epimet wurden in 10 ml PBS verdünnt und 400 µl dieser Lösung auf das Zellareal pipettiert. Es folgte das Dekantieren der Lösung nach 10 Minuten und einmaliges Waschen mit PBS für 2 Minuten. 100 µl der *Perm Solution A* aus dem *Epithelial Cell*

*Detection Kit* (Epimet) wurden in 10 ml PBS verdünnt und 200 µl auf das Zellareal aufgetragen und für 5 Minuten belassen. Es wurde anschließend dreimal je 2 Minuten mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 3-6 Tropfen Proteinblock *Serumfree* (DAKO, Hamburg, Deutschland) inkubiert.

Danach wurden die Zellen mit Antikörperlösungen behandelt: Der anti-Zytokeratin Antikörper A45-B/B3-Cy3 wurde in einer Verdünnung von 1:300 zusammen mit dem CK 5/8-Oyster-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 und dem Alexa-Fluor<sup>R</sup> 488 *anti-human* CD45 in einer Verdünnung von 1:150 mit dem *Antibody Diluent* (DAKO REAL) für 45 Minuten auf das Zellareal pipettiert. Für die Antikörper-Reaktion wurden die OT in einer Dunkelkammer für die folgenden 45 Minuten belassen (von hier an erfolgt die weitere Bearbeitung der OT nur noch in der Dunkelkammer; schnelles Arbeiten bei Tageslicht). Im Folgenden wurde dreimal für je 2 Minuten mit PBS gewaschen. Nach Dekantieren der Lösung erfolgte eine zweimalige Waschung mit PBS (je 2 Minuten). Dann Inkubation mit einigen Tropfen DAPI (Vectashield<sup>R</sup>, Burlingame, Kanada) in einer Verdünnung von 1:1000 mit PBS für 2 Minuten. Und nun wurde zweimal für je 2 Minuten mit PBS gewaschen und der OT mit einem Deckgläschen bedeckt.

#### **4.3.6.4 Nachweis von MCF 7-Zellen durch das Epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM)**

Umrandet wurde das Zellareal auf dem mit DAKO *Pen.* 135 µl der Fixierlösung B aus dem *Epithelial Cell Detection Kit* (Epimet) wurden in 10 ml PBS verdünnt und 400 µl dieser Lösung für 15 Minuten auf das Zellareal aufgetragen. Dem Dekantieren folgte eine zweimalige Waschung mit TBST für jeweils 3 Minuten. Inkubation mit der *Perm Solution A* aus dem *Epithelial Cell Detection Kit* (Epimet) für 5 Minuten: 100 µl wurden in 10 ml PBS verdünnt und 200 µl der Lösung auf das Zellareal pipettiert. Nach zweimaliger Waschung mit TBST (jeweils 2 Minuten) wurden 3 Tropfen Proteinblock *Serumfree* (DAKO, Hamburg, Deutschland) für 20 Minuten aufgetragen. Dem Dekantieren des Proteinblock *Serumfree* folgte die Inkubation mit dem EpCAM-Antikörper für 45 Min.: 100 µl EpCAM-Antikörper (*monoclonale mouse anti-human antibody*, IgG1, *Clone* VU-1D9, *Visionbiosystems*, Novocastra, Newcastle, England) in einer Verdünnung von 1:50 mit *Antibody Diluent* (DAKO REAL, Hamburg, Deutschland; *Catalog No.:* S2022). Nach zweimaliger Waschung mit TBST für je 2 Minuten Inkubation mit 100 µl Alexa-Fluor<sup>R</sup> 488 (Alexa-Fluor<sup>R</sup>488 *goat anti mouse* IgG1, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:200 mit *Antibody Diluent (Antibody Diluent with Background*, DAKO, Hamburg, Deutschland; *Catalog No.:* S3022) für 45 Minuten. Anschließend erfolgte eine zweimalige Waschung mit TBST (je

2 Minuten). Zum Schluß einmalige Waschung mit PBS und Kernfärbung mit DAPI: 4 µl DAPI (Vectashield<sup>R</sup>, Burlingame, Kanada) wurden in 10 ml PBS verdünnt und davon 400 µl für 2 Min. auf dem Zellareal belassen. Dann einmalige Waschung mit PBS, leichte Antrocknung und Eindeckeln der OTs.

#### 4.3.6.5 Zytokeratinfärbung an Tumorzellen nach unterschiedlicher Fixierzeit

Um die Abhängigkeit der Fluoreszenzfärbung in Bezug auf unterschiedliche Fixierzeiten zu ermitteln, führte ich Versuche mit MCF 7-Zellen durch. Es wurden 7 OTs mit den gewonnenen Zellen hergestellt. Dies erfolgte nach dem beschriebenen Protokoll in 4.3.2. Nach Auszählung in der Neubauer-Zählammer und Verdünnung in PBS (siehe auch 4.3.2) überführte ich ca. 500 MCF 7-Zellen in jeweils ein Cytospintrichter. Diese wurden für 3 Minuten bei 1200 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die OTs für einen Tag bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Fixierung erfolgte mit Fixierlösung B aus dem *Epithelial Cell Detection Kit* von Epimet (135 µl der Fixierlösung in 10 ml PBS verdünnt und 400 µl dieser Lösung auf das Zellareal aufgetragen). Ich ging wie folgt vor:

- 1 OT ohne Fixierung
- 1 OT 5 Minuten fixiert
- 1 OT 10 Minuten fixiert
- 1 OT 20 Minuten fixiert
- 1 OT 30 Minuten fixiert
- 1 OT 1 Stunde fixiert
- 1 OT 2 Stunden fixiert

Dann Dekantieren der Fixierlösung und zweimaliges Waschen mit PBS. Nach Antrocknung erfolgte die Zytokeratinfärbung entsprechend dem Protokoll in 4.3.6.1.

#### 4.3.6.6 Protokoll für die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Die Analyse des Probenmaterials erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops von der Firma Leica. In unserem Labor wurde das Mikroskop Leica DMLB verwendet. Die dazugehörige Software wurde von KAPPA (KAPPA *Engineering*, Sophia Antipolis, Frankreich) bezogen.

In dieser Arbeit wurden die Cytospins bei einer Wellenlänge von 565 nm (Anregungsfilter: BP545/30, Fluorochrom: Cy3) in einer 10-, 20- und 40-fachen Vergrößerung systematisch durchgemustert. Bei dieser Anregung konnten vorhandene CK(+)-Zellen durch ihre helle Fluoreszenz erkannt werden. Bei Zytokeratin-Positivität wurde auf dem zweiten Kanal ein Bild bei einer Anregung mit 510 nm (Anregungsfilter: BP 450-490, Fluorochrom: diverse) erstellt und damit die CD45-Positivität überprüft. Zugleich wurden alle positiven Zellen auch immer im Transmissionsbild und im DAPI-Kanal mit einer Wellenlänge von 400 nm beurteilt (Anregungsfilter: BP 340-380, Fluorochrom: diverse). Dies brachte zusätzlich zur Fluoreszenzfärbung einen morphologischen Informationsgewinn.

Die Beurteilung und Bewertung erfolgte anonymisiert ohne Kenntnis des Patientennamens bzw. des klinischen Verlaufs durch die Verfasserin sowie durch einen weiteren Beobachter (Prof. Dr. B. Brandt oder Dr. I. Alpers). Als Kriterien für die Einstufung als Tumorzelle galten:

1. Die Zelle musste gegenüber dem Hintergrund der anderen Blutzellen ein deutliches Fluoreszenzsignal, das die Zytokeratinpositivität anzeigt, aufweisen.
2. Die betreffende Zelle musste unverletzt sein (keine geplatzen oder zerquetschten Zellen, keine Zelldetritus).
3. Die CK(+)-Zelle sollte keine CD45-Positivität aufweisen, da dies auf einen Leukozyten hindeutet.
4. Die Zellen sollten nicht von anderen Zellen überlagert sein, damit eine Beurteilung der gesamten Zelle und ihrer Zellmembran möglich ist.
5. Im Transmissionsbild wurde noch die zugunsten des Kerns verschobene Kern-Plasma-Relation als Malignitätszeichen bewertet sowie das Größenverhältnis der Tumorzelle gegenüber den meist kleineren Blutzellen.

Als Tumorzelle klassifizierte Zellen wurden als Transmissionsbild und in den drei Kanälen der Immunfluoreszenzfärbung getrennt aufgenommen. Da die Immunfluoreszenzfärbung keine langfristige Aufbewahrung der Präparate ermöglicht, wurde den Cytospins die gleiche Identifikationsnummer wie den Blutproben zugeordnet und die Bilder auf Datenträger gespeichert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Validation der Anreicherung von CK(+)- Zellen aus peripherem Blut mit dem Zweistufendichtegradienten, dem MACS™- Verfahren und dem *CellSearch*™- Verfahren mit Zelllinien mit bekanntem Phänotyp

Die Anzahl zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut ist sehr gering. Zur Anreicherung bedarf es deshalb spezifischer und sensitiver Methoden. Da zudem das Verhältnis von CTCs zu Leukozyten  $1-10^6$  betragen kann, wurde ein kombiniertes Protokoll, bestehend aus Dichtegradientenzentrifugation und immunomagnetischer Zellseparation, etabliert.

Die immunomagnetische Anreicherung erfolgte durch eine EpCAM (epitheliales Zelladhäsionsmolekül) basierte Zellseparation mit Hilfe des MACS™-Verfahrens und *CellSearch*™.

Die Abbildung 2 zeigt das komplette Separationsprozedere, die Abbildung 4 die immunomagnetische Detektionmethode.

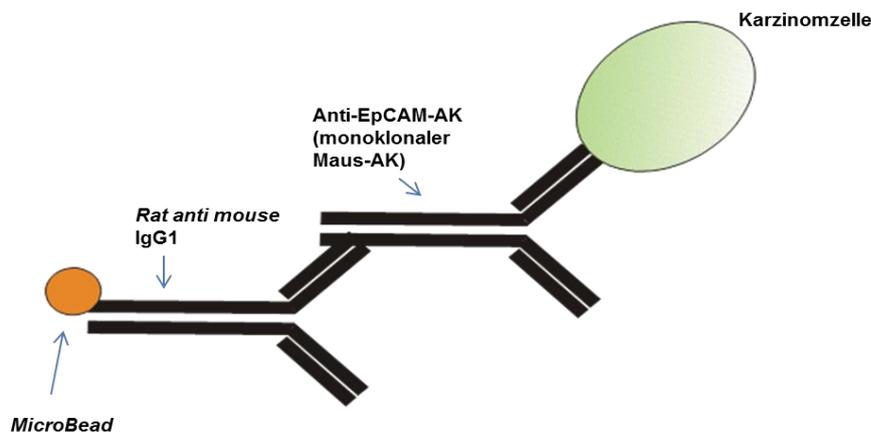


Abbildung 4: Detektionsmethode der immunomagnetischen Zellseparation: Verwendet wurden gegen EpCAM (von Tumorzellen exprimiert) gerichtete Antikörper. Diese waren mit magnetischen Partikeln gekoppelt. Nach Anlage eines Magnetfeldes konnten so EpCAM markierte Zellen angereichert werden.

Der Nachweis der *spiked* TZ erfolgte am Fluoreszenzmikroskop nach Färbung mit dem *CellTracker*™ *green* CMFDA (5-Chloromethylfluorescein Diacetat) oder nach immunzytochemischer Färbung mit fluoreszenzmarkierten, gegen Zytokeratin (CK 7/18)

gerichteten Antikörpern. Zudem wurden die Leukozyten mit fluoreszenzmarkierten, gegen das Leukozytenantigen CD45 (*Cluster of differentiation 45*) gerichteten, Antikörpern markiert.

### 5.1.1 Anreicherung von Tumorzellen im EDTA-Blut mit dem Zweistufengradienten

Schon 1995 entwickelte die Arbeitsgruppe um Griwatz die Dichtegradientenzentrifugation, die die Bestandteile des Blutes aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte in unterschiedliche Fraktionen auftrennt. Die Anreicherung der CTCs betrug das 20-fache und durchschnittlich wurden 70-90 % der Zellen wiedergefunden (Griwatz *et al.*, 1995). Sie konnten auch zeigen, dass sich die TZ in der separaten Monozytenphase wiederfinden ließen.

Zur Etablierung der Dichtegradientenzentrifugation wurden zahlreiche *spiking*-Versuche mit den Karzinomzelllinien MCF 7 und SKOV 3 durchgeführt. Aus der Kultur entnommen wurde eine festgelegte Anzahl (zwischen 1000 und 10<sup>6</sup> TZ) in das Blut gesunder, freiwilliger Spender gegeben. Dabei war die Anreicherung am Effizientesten, wenn das Dichtemedium den genauen pH-Wert von 7,40 aufwies. Gearbeitet wurde bei 22° Celsius, und eine Verwirbelung des Gradienten sollte möglichst vermieden werden (siehe Kapitel 4.3.3).

Nach Etablierung des Dichtegradienten betrug die Wiederfindungsrate durchschnittlich 84 %, was den Wiederfindungsraten von Griwatz *et al.* entspricht. In der Tabelle 4 sind exemplarisch vier *spiking*-Versuche aufgeführt.

Tabelle 4: Detektion von kultivierten Karzinomzellen und ihre Verteilung im Dichtegradienten. Beispiel anhand von vier Versuchen. Die ersten zwei Versuche wurden mit MCF 7-Zellen durchgeführt. Die Versuche 3 und 4 mit SKOV 3-Zellen.

Phase	Versuch 1 mit MCF 7	Versuch 2 mit MCF 7	Versuch 3 mit SKOV 3	Versuch 4 mit SKOV 3
Monozytenphase	86 %	95 %	80 %	73 %
Mittelphase	0 %	3 %	6,6 %	10 %
Lymphozytenphase	13 %	0 %	3,3 %	10 %

Die TZ sammelten sich in der Phase zwischen *Nycodenz*<sup>R</sup> (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) mit der Dichte von 1,069 g/ml und dem exakten pH von 7,40 unter dem thrombozytenreichen Plasma (Abb. 1). Die Abbildungen 5, 6 und 7 zeigen die Ergebnisse der Wiederfindung der *spiked* MCF 7 und SKOV 3-Zellen im Einzelnen nach dem Zweistufengradienten. Die Zählung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica.

Die durchschnittliche Wiederfindung der *spiked* SKOV 3-Zellen lag nach dem Zweistufengradienten bei 42%, im Median bei 31%. Die durchschnittliche Wiederfindung bei  $10^2$  *spiked* SKOV 3-Zellen lag bei 92%. Bei  $10^3$  *spiked* SKOV 3-Zellen betrug die Wiederfindung durchschnittlich 34% (Abb. 5).

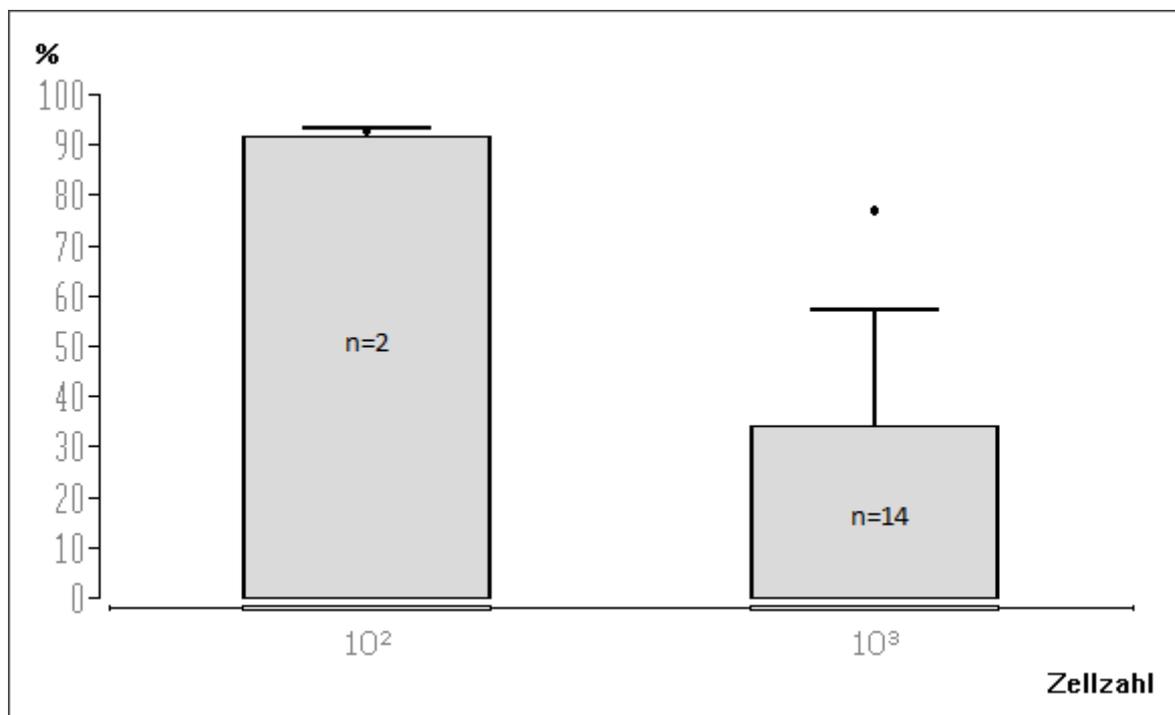


Abbildung 5: Wiederfindung von *spiked* SKOV 3-Zellen nach dem Zweistufengradienten (mit Standardabweichung (SD)). Durchschnittliche Wiederfindung der *spiked* SKOV 3- Zellen betrug 42%. Mittelwert bei  $10^2$  *spiked* Zellen lag bei 92 %, Median 92 %. Der Mittelwert bei  $10^3$  *spiked* Zellen lag bei 34 %, Median 24 %.

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate der *spiked* MCF 7-Zellen nach dem Zweistufendichtegradienten betrug 41% mit einem Median von 30% (Abb. 6).

Der Mittelwert bei  $10^1$  *spiked* MCF 7-Zellen betrug 35 %, Median 35 %. Der Mittelwert bei  $10^2$  *spiked* MCF 7-Zellen lag bei 43 %. Wurden  $10^3$  Zellen in das Blut gespickt, lag die durchschnittliche Wiederfindung bei 30 %, im Median bei 30 %.

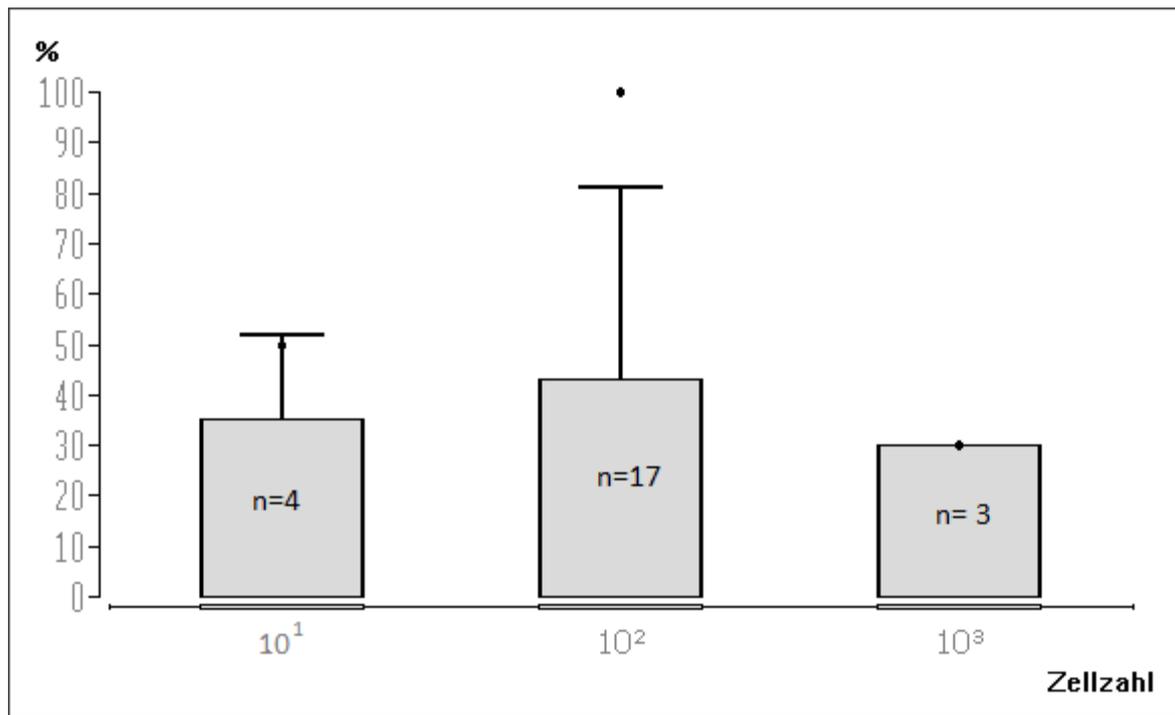


Abbildung 6: Wiederfindung *spiked* MCF 7-Zellen nach dem Zweistufendichtgradienten (mit SD). Der Mittelwert bei  $10^1$  Zellen betrug 35 %, Median 35 %. Der Mittelwert bei  $10^2$  *spiked* Zellen lag bei 43 %, Median 35 %. Bei  $10^3$  *spiked* MCF 7-Zellen lag der Mittelwert bei 30 %, Median 30 %.

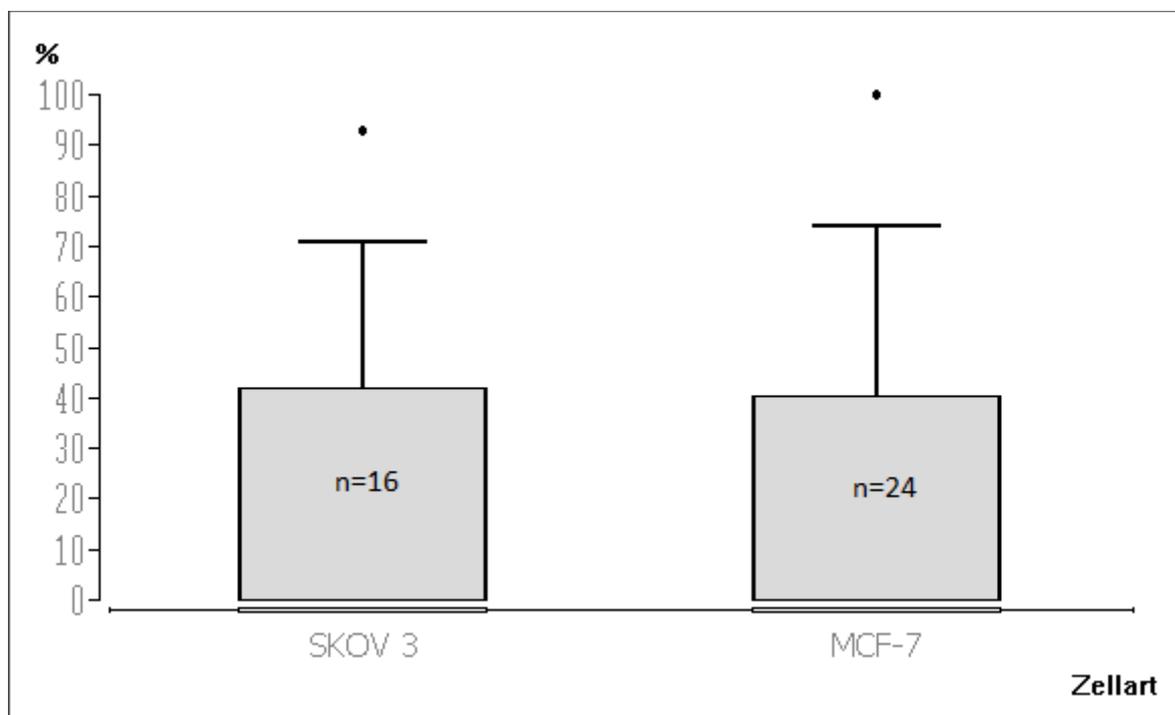


Abbildung 7: Vergleich der Wiederfindungsraten für SKOV 3 und MCF 7-Zellen (mit SD). Die durchschnittliche Wiederfindung von 42 % der SKOV 3-Zellen steht dem Durchschnittswert von 41 % der detektierten MCF 7-Zellen gegenüber.

Im Vergleich wurden für SKOV 3-Zellen größere Wiederfindungsraten erzielt als für die MCF 7-Zellen, der Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant (Abb. 7),  $p=0.90$ .

#### **5.1.1.1 Verteilung der Tumorzellen auf die Monozyten- und Lymphozytenphase des Zweistufengradienten**

Neben der Monozytenphase wurde die Lymphozytenphase auf die Anwesenheit von CK(+)-Zellen untersucht. Gerade zu Beginn wurden auch die Mittelphase und die Plasmaphase in die Beurteilung der Verteilung der Zellen im Dichtegradienten eingeschlossen. Die Ergebnisse sind exemplarisch in der Tabelle 4 sowie in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.

Die durchschnittliche Wiederfindung der *spiked* SKOV 3-Zellen betrug in der Monozytenphase nach dem Zweistufengradient 58 % (Median 67 %) (Abb. 8). In der Lymphozytenphase lag die Wiederfindung durchschnittlich bei 42% (Median 18 %).

Die Verteilung der MCF 7-Zellen auf die Monozyten- und Lymphozytenphase (Abb. 9) nach dem Zweistufendichtegradienten zeigt eine durchschnittliche Wiederfindung der Zellen in der Monozytenphase von 76 %.

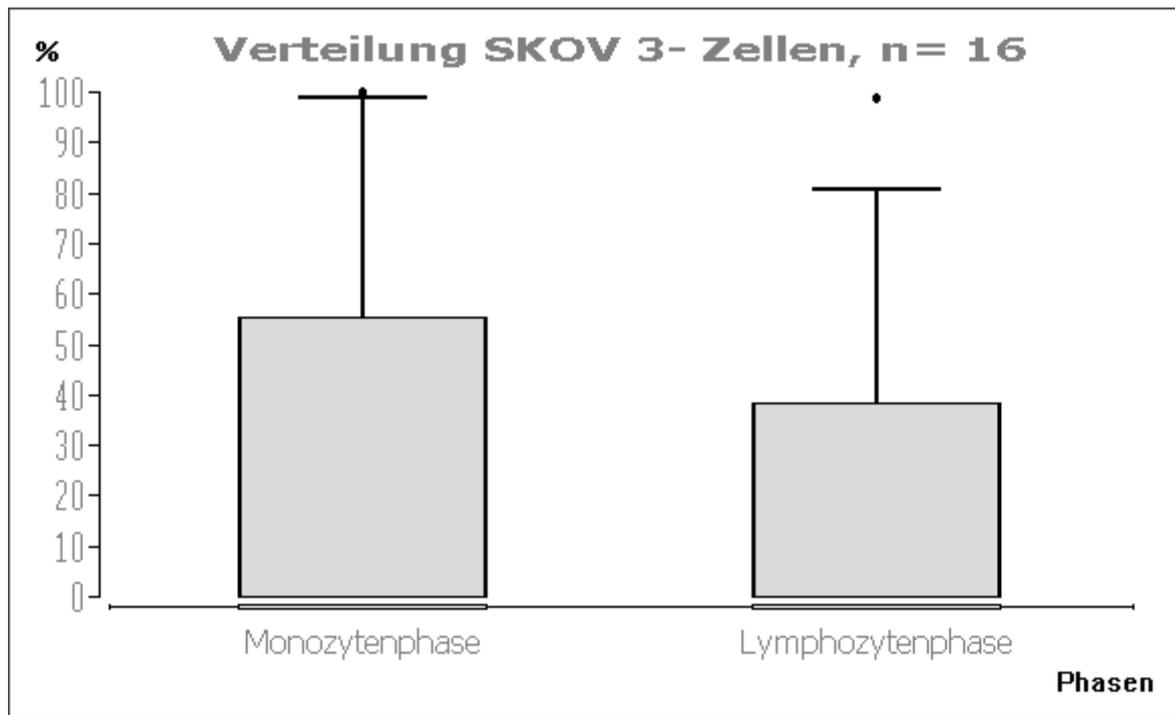


Abbildung 8: Verteilung der SKOV 3-Zellen in der Monozyten- und Lymphozytenphase (mit SD). Die CK(+)-Zellen waren nach dem Zweistufengradienten mit einer größeren Wahrscheinlichkeit (Mittelwert 58%) in der Monozytenphase zu finden.

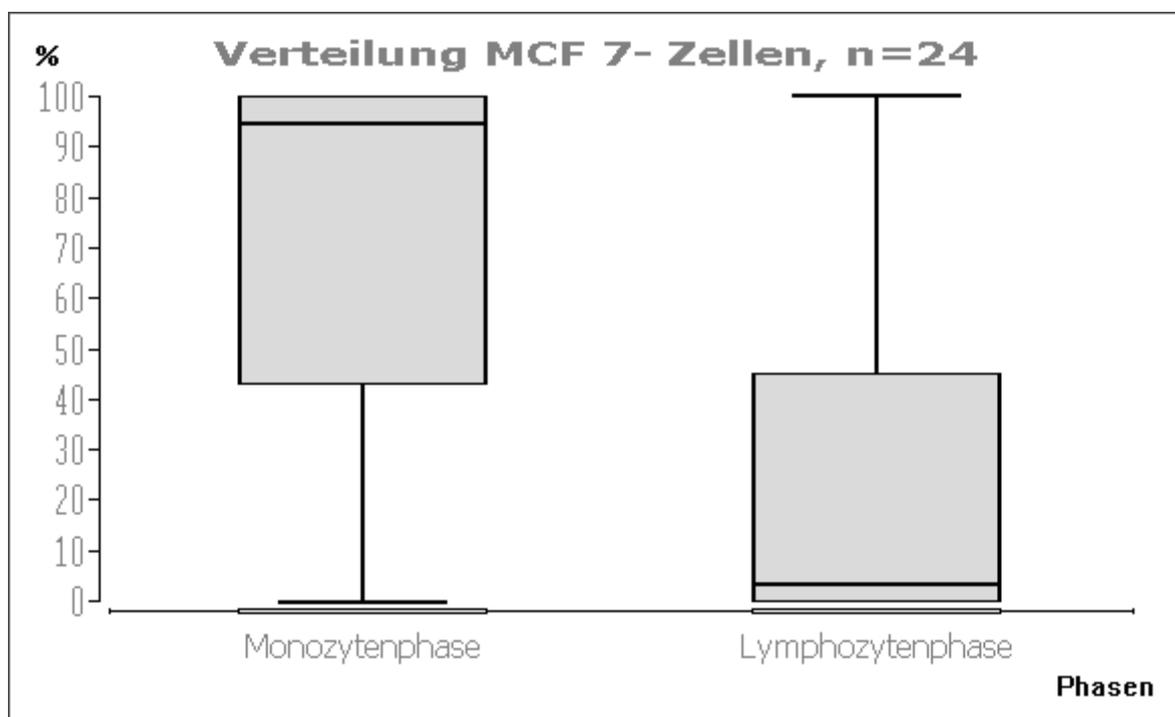


Abbildung 9: Verteilung der MCF 7-Zellen auf die Monozyten- und Lymphozytenphase nach dem Zweistufengradienten (mit 1. Quartil, Median und 3. Quartil). Der Mittelwert der Wiederfindung der *spiked* TZ in der Monozytenphase betrug 76%, Median 95%. Durchschnittliche Wiederfindung in der Lymphozytenphase betrug 24 % (Median 3 %).

In der Plasmaphase konnten keine CK(+)-Zellen detektiert werden. Wenige Karzinomzellen wurden in der der Mittelphase (ca. 5 %) nachgewiesen. Somit zeigte sich auch in meinen Versuchsreihen, dass die Monozytenphase den Hauptanteil der Karzinomzellen enthielt und sich die Methode zur Anreicherung von CTCs eignet.

### **5.1.2 Anreicherung von MCF 7- und SKOV 3-Zellen im EDTA-Blut mit dem optimierten MACS™-Verfahren**

Auch bei der manuellen immunomagnetischen Anreicherungsmethode MACS™ führte ich eine Reihe von *spiking*-Versuchen durch.

Nach Optimierung des Protokolls mischte ich zur Validierung 400-500 MCF 7-Zellen in 5 ml EDTA-Blut gesunder Spender (n=5). Nach Anlegen eines Magnetfeldes reichern sich die EpCAM positiven Zellen in der Säulenmatrix an, während die EpCAM negativen Zellen die Säulenmatrix durchlaufen und in einem separaten Gefäß aufgefangen werden („Negativfraktion“). Nach Entfernen des Magnetfeldes kann man die „Positivfraktion“ gewinnen.

Um die Anreicherungseffizienz des *Magnet Cell Separation* zu ermitteln, zählte ich nach Durchführung des Protokolls aus dem Abschnitt 4.3.4 die Zahl der angereicherten *spiked* TZ. Die Zählung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica.

Die Wiederfindungsrate lag bei den *spiked* MCF 7-Zellen durchschnittlich bei 76 % mit einem Median von 91 %.

Zur Kontrolle wurde auch die „Negativfraktion“ mit Immunfluoreszenzfabstoffen behandelt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Hier sollten sich EpCAM-negative Zellen befinden. Bei dem optimierten MACS™-Protokoll (Abschnitt 4.3.4) lag die Wiederfindung der *spiked* MCF 7-Zellen in der Positivfraktion durchschnittlich bei 99% (Median 100%) (Abb. 10).

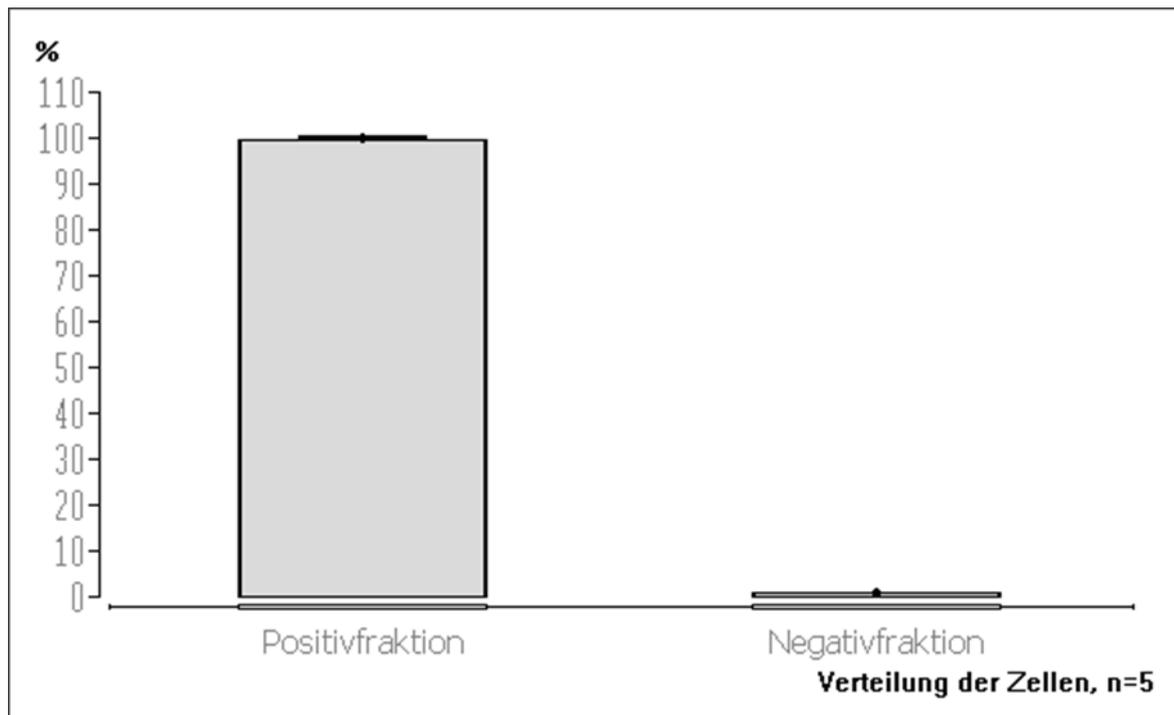


Abbildung 10: Wiederfindung der *spiked* MCF 7-Zellen in der Positiv- und Negativfraktion nach Durchführung des optimierten MACS™-Protokolls. Die TZ binden die anti-EpCAM-Antikörper (monoklonaler Maus-Antikörper), der als Brückenantikörper fungiert. Die Zellen, die keine *Beads* gebunden haben, durchlaufen die Säule und werden aufgefangen („Negativfraktion“). Nach Ausschalten des Magnetfeldes wird die Säule ausgewaschen und die „Positivfraktion“ gewonnen. In der Positivfraktion lag die Wiederfindung im Durchschnitt bei 99 %, Median 100%. In der Negativfraktion lag der Durchschnitt bei 1%, Median 1 %.

Somit zeigte sich, dass sich die *spiked* TZ nach Durchführung des optimierten MACS™-Protokolls am ehesten in der Positivfraktion finden ließen und sich die Methode zur positiven Anreicherung von CTCs eignet. Dieses Protokoll fand dann in der Aufarbeitung der Patientenproben Verwendung.

#### 5.1.2.1 Anreicherung von SKOV 3-Zellen im EDTA-Blut mit dem MACS™-Verfahren unter Verwendung von *Epithelial Cell Detection Kit*

Das in Abschnitt 4.3.4.1 beschriebene Protokoll gibt das MACS™-Verfahren mit dem *Epithelial Cell Detection Kit* wieder.

Dabei gab ich 500 (n=4) oder 1000 (n=6) SKOV 3-Zellen in 5 ml EDTA-Blut gesunder Spender. Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde die Monozytenphase, wie in Abschnitt 4.3.4.1. beschrieben, zwei Stunden mit gleicher Menge PFA (4%) fixiert und mit

dem *Epithelial Cell Detection Kit* (Epimet, München) weiter aufgearbeitet. Dabei lag die Wiederfindung im Durchschnitt bei 30%, im Median bei 34%.

Auch in diesen Versuchsreihen habe ich die „Negativfraktion“ ausgewertet. Die durchschnittliche Wiederfindung der TZ in der Negativfraktion lag bei 66% (Median 86 %) (Abb. 11). In der Positivfraktion wurden durchschnittlich 44 % der *spiked* TZ (Median 28 %) wiedergefunden.

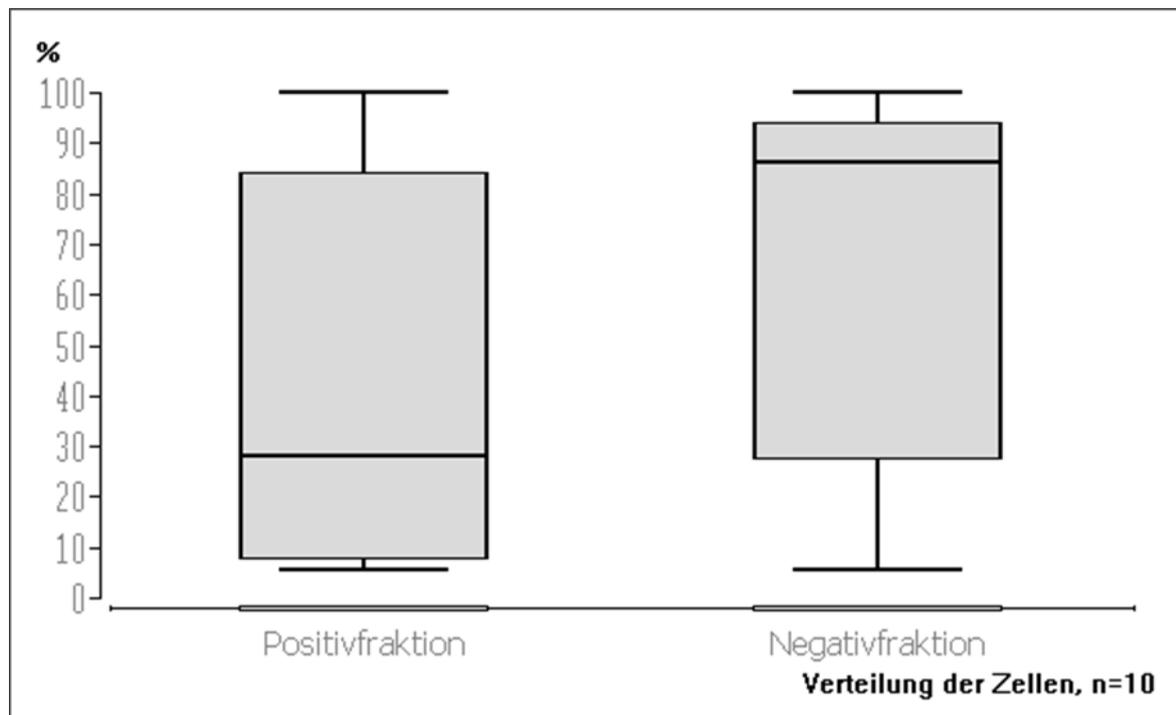


Abbildung 11: Wiederfindung der *spiked* SKOV 3-Zellen in der Positiv- und Negativfraktion nach Aufarbeitung der fixierten Monozytenphase mit dem *Epithelial Cell Detection Kit* (siehe Abschnitt 4.3.4.1). Die durchschnittliche Wiederfindung lag in der Positivfraktion bei 44 % (Median 28 %). Dagegen wurden durchschnittlich 66% der epithelialen Tumorzellen in der Negativfraktion gefunden (Median 86 %).

Die durchschnittliche Wiederfindung bei 1000 *spiked* SKOV 3-Zellen lag bei 31 %. Wurden 500 TZ in das Blut gesunder Spender gespickt, betrug die durchschnittliche Wiederfindung 28 % (Abb. 12).

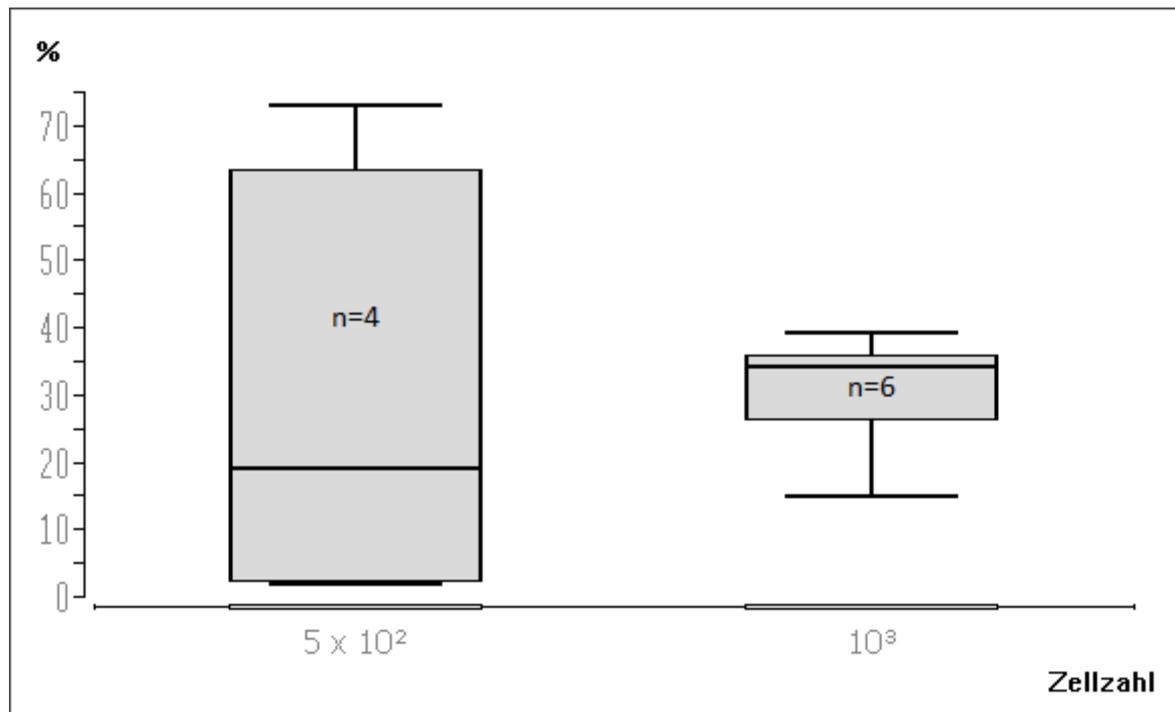


Abbildung 12: Wiederfindung der *spiked* SKOV 3-Zellen bei Einsatz von  $5 \times 10^2$  Zellen (n=4) und  $10^3$  Zellen (n=6) nach Aufarbeitung der Monozytenphase mit dem *Epithelial Cell Detection Kit*.

### 5.1.2.2 Anreicherung von SKOV 3- und MCF 7-Zellen im EDTA-Blut mit dem MACS™-Verfahren unter Verwendung von anti-Zytokeratin-Antikörper oder anti-EpCAM-Antikörper konjugierter *Rat Anti-Mouse IgG1 MicroBeads*

Das modifizierte MACS™-Protokoll in den Abschnitten 4.3.4.2, 4.3.4.3 und 4.2.4.4 beschreibt die Kopplung der *Rat anti-Mouse IgG1 MicroBeads* mit dem anti-Zytokeratin-AK A45-B/B3 und anti-EpCAM-AK vor der eigentlichen MACS™-Separation.

Die Zahl der *spiked* TZ lag für beide Zelllinien zwischen 500-100.000 bei den anti-A45-B/B3 konjugierten *MicroBeads* (n=8) und zwischen 40-10.000 bei den anti-EpCAM konjugierten *MicroBeads* (n=20).

Unter Verwendung der anti-A45-B/B3-AK konjugierten *Rat anti-Mouse IgG1 MicroBeads* lag die durchschnittliche Wiederfindung bei 52%, im Median bei 55 %. Dabei wurden 28 % der *spiked* TZ in der Positivfraktion detektiert. Die durchschnittliche Wiederfindung in der Negativfraktion betrug durchschnittlich 72 % (Abb. 13).

Bei Verwendung der anti-EpCAM-AK konjugierten *MicroBeads* lag die durchschnittliche Wiederfindungsrate bei 12 %, im Median bei 4 %. In der Positivfraktion betrug die Wiederfindung durchschnittlich 71 %. In der Negativfraktion wurden durchschnittlich 19 % der *spiked* TZ wiedergefunden (Abb. 14).

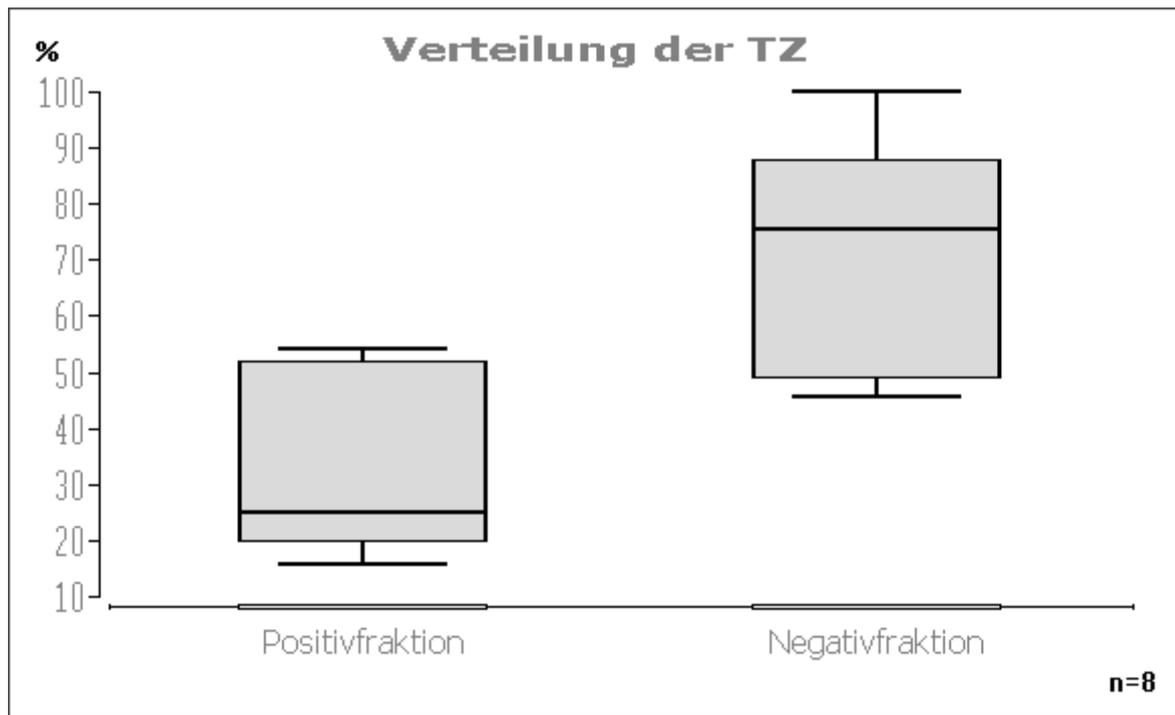


Abbildung 13: Verteilung der *spiked* TZ in der Positiv- und Negativfraktion unter Verwendung der anti-A45-B/B3-AK konjugierten *Rat anti-Mouse IgG1 MicroBeads* (mit 1. Quartil, Median 3. Quartil).

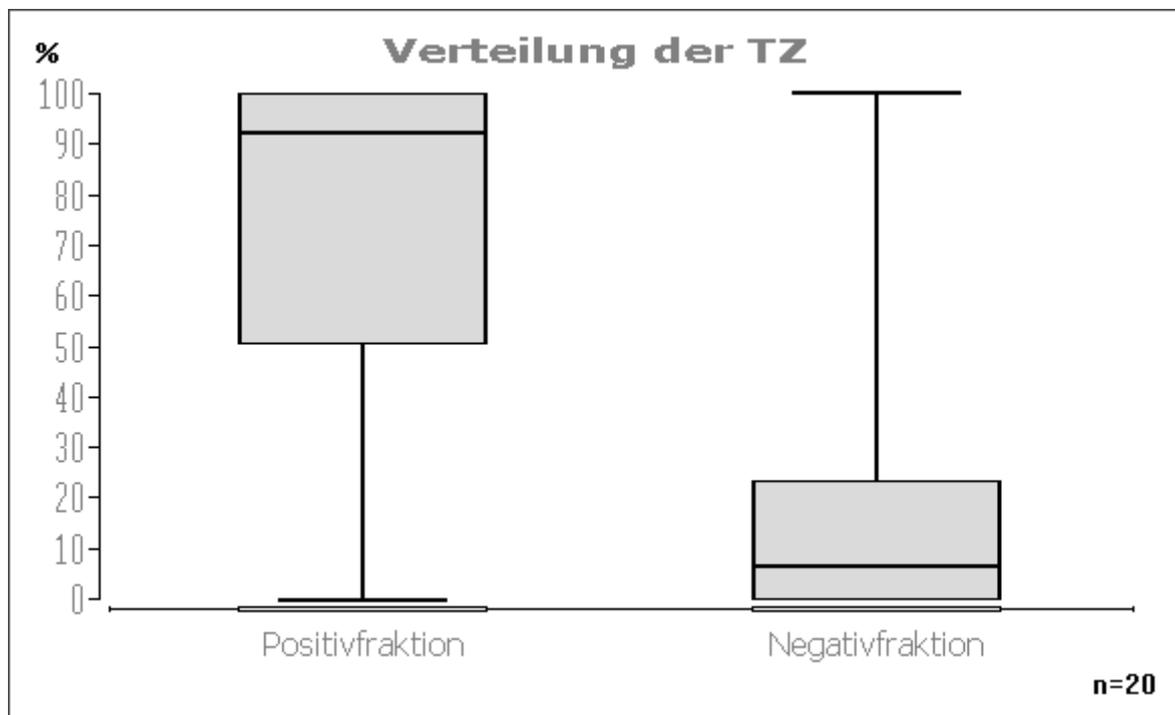


Abbildung 14: Verteilung *spiked* TZ unter Verwendung der anti-EpCAM-AK konjugierten *Rat anti-Mouse IgG1 MicroBeads* in der Positiv- und Negativfraktion mit 1. Quartil, Median, 3. Quartil. Die durchschnittliche Wiederfindung in der Positivfraktion betrug 71 %.

### 5.1.3 Wiederfindung von SKOV 3- und MCF 7-Zellen im EDTA-Blut mit dem *CellSearch*<sup>TM</sup>-Verfahren

Da die Isolierung von CTCs mit dem *CellSearch*<sup>TM</sup>-Verfahren bereits eine etablierte Methode darstellt, wurden nur wenige *spiking*-Versuche durchgeführt. Das *CellTracks*<sup>TM</sup> *AutoPrep* System garantiert eine standardisierte und optimierte Anreicherung von CTCs durch automatisierte Aufarbeitung.

Verwendet wurde das *Profile Kit* (*CellSearch*<sup>TM</sup>), das für die automatische immunomagnetische Anreicherung von Tumorzellen epithelialen Ursprungs aus Vollblut geeignet ist. Aufgrund der fehlenden Erythrozyten kommt es zu Fehlermeldungen des Systems. Deswegen wurde etwas variiert: die nach der Dichtezentrifugation in der Monozytenphase erhaltenen Zellen wurden nach Fixierung in *Dilution Buffer* (*CellSearch*<sup>TM</sup> *Profile Kit*) aufgenommen und im *CellTracks*<sup>TM</sup> *AutoPrep* als Kontrollen gestartet. Damit wurde das Problem umgangen.

Bei den *spiking*-Versuchen gab ich 500 (n=1) oder 1000 MCF 7-Zellen (n=3) in das EDTA-Blut gesunder Spender.

Alternativ wurden 500 MCF 7-Zellen (n=7) oder 500 SKOV 3-Zellen (n=2) nach Fixierung in PBS-Puffer aufgenommen und im Anschluss im „*control run*“ des *CellSearch*<sup>TM</sup>-Systems aufgearbeitet.

Die Abbildungen 15, 16 und 17 zeigen die Wiederfindungsraten der *spiked* Karzinomzellen nach Aufarbeitung im *CellTracks*<sup>TM</sup> *AutoPrep*.

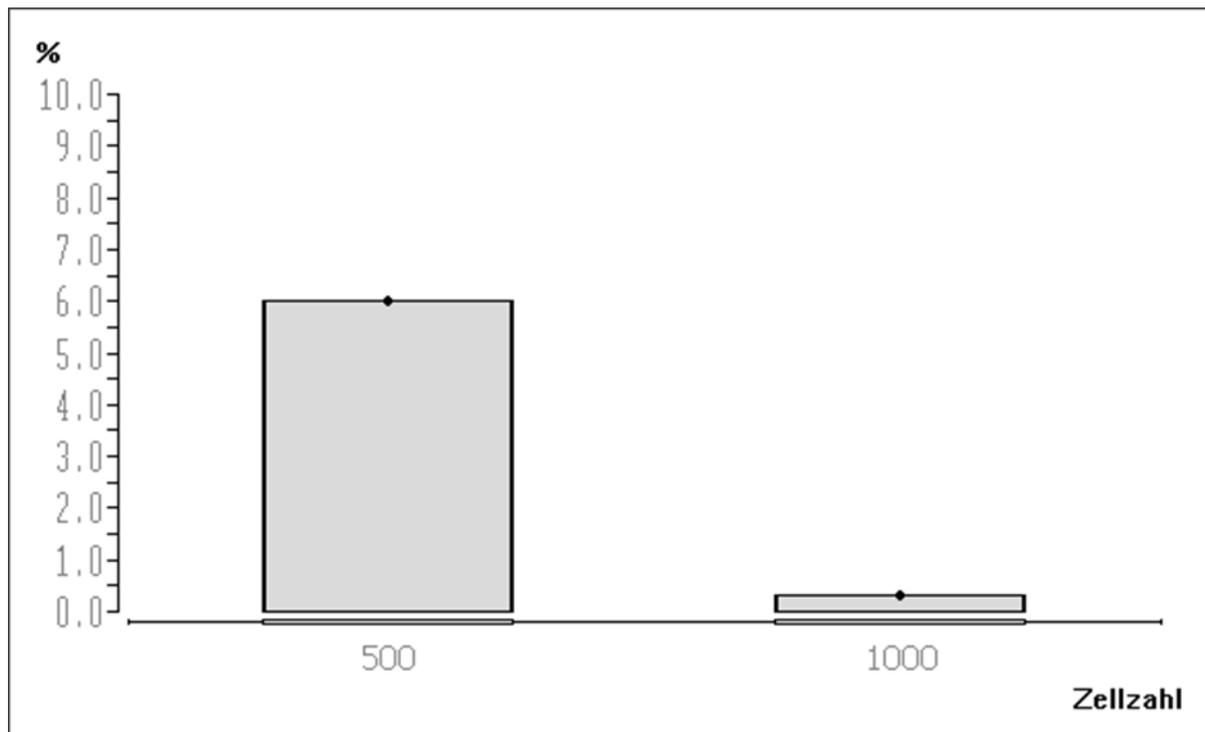


Abbildung 15: Wiederfindung der *spiked* MCF 7-Zellen nach Dichtegradientenzentrifugation, Fixierung der Monozytenphase und Anreicherung im *CellSearch*<sup>TM</sup>-System. Versuch mit 500 gespickten MCF 7-Zellen: n=1, Versuch mit 1000 gespickten MCF 7-Zellen: n=3.

Die durchschnittliche Wiederfindung der *spiked* MCF 7-Zellen nach einer Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Aufarbeitung der Monozytenphase im *CellSearch*<sup>TM</sup>-System betrug 3% (Median 3 %). Bei 500 *spiked* MCF 7-Zellen lag die durchschnittliche Wiederfindung bei 6 % (Median 6 %).

Die Wiederfindungsraten von reinen, fixierten TZ durch das *CellSearch*<sup>TM</sup>-Verfahren betragen durchschnittlich 29 % (MCF 7-Zellen) und 21 % (SKOV 3-Zellen) (Abb. 15 und 16).

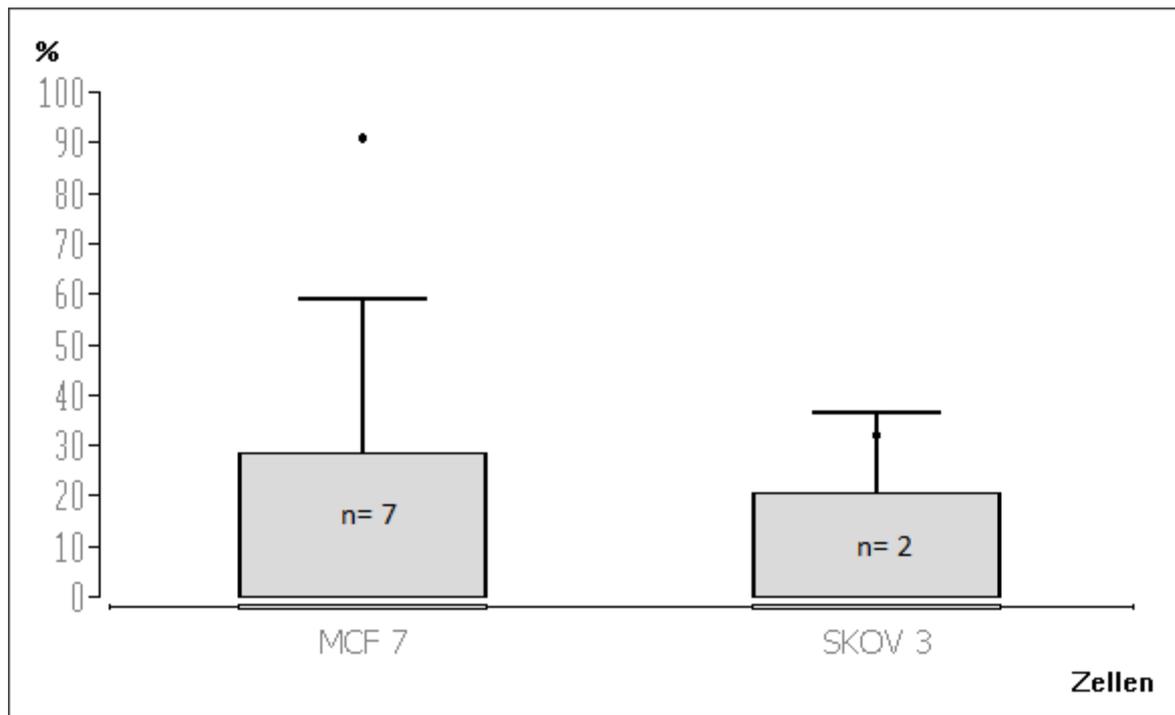


Abbildung 16: Wiederfindung *spiked* MCF 7- und SKOV 3-Zellen in PBS nach Fixierung unter Verwendung des *CellSearch<sup>TM</sup>*-Systems. Die Wiederfindung gespikter MCF 7-Zellen lag durchschnittlich bei 29 %, im Median bei 14 %. Bei SKOV 3-Zellen lag der Durchschnitt bei 21 %, im Median bei 21 %.

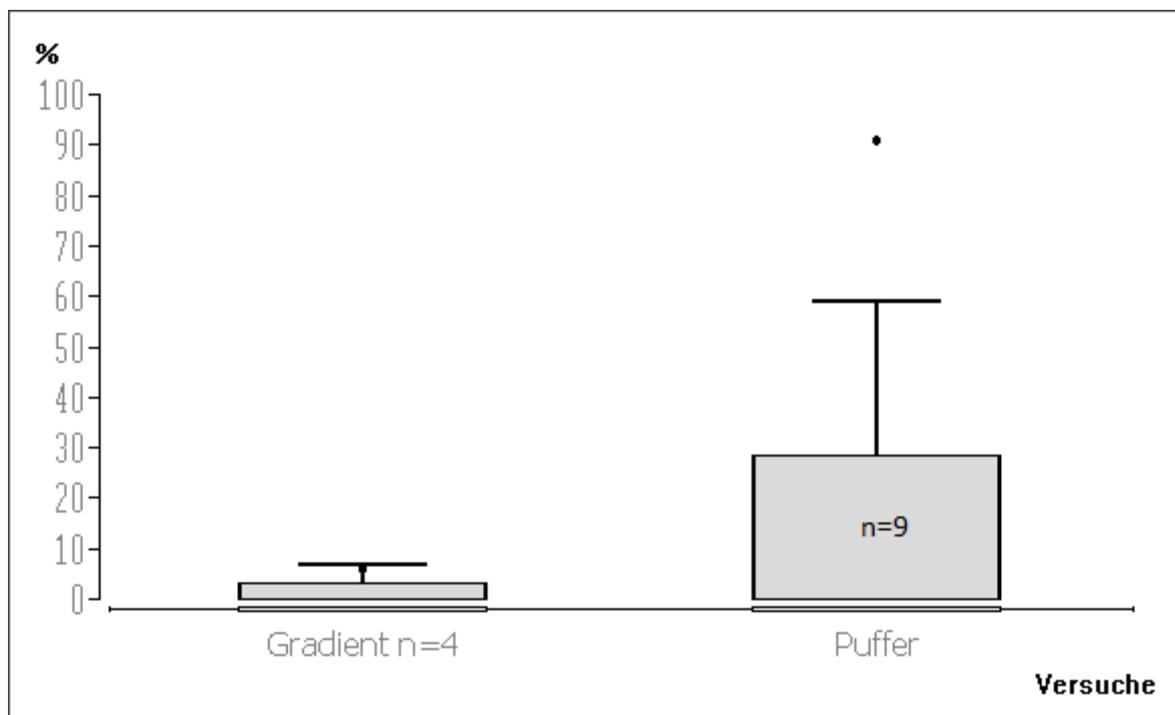


Abbildung 17: Vergleich der Wiederfindung der *spiked* TZ im *CellSearch<sup>TM</sup>*-Verfahren nach Aufnahme der Zellen in PBS-Puffer oder nach Dichtegradientenzentrifugation und isolierter Aufarbeitung der Monozytenphase. Nach der Dichtegradientenzentrifugation lag die durchschnittliche Wiederfindung der TZ bei 3 %. Die in PBS augenommenen TZ ließen sich in durchschnittlich in 25 % wiederfinden.

## 5.2 Validation der Immunfluoreszenzfärbungsprotokolle zum Nachweis von Tumorzellen mittels Antikörper gegen epitheliale Markerproteine

Nach der Anreicherung erfolgte die Identifizierung der CTCs durch eine immunzytochemische Färbung. Verwendet wurden fluoreszenzmarkierte, gegen CK gerichtete AK (siehe Kapitel 4.3.6). Zur Visualisierung der Leukozyten verwendete ich einen fluoreszenzmarkierten, gegen das Leukozytenantigen CD45 gerichteten AK. Ein monoklonaler Antikörper gegen CD45 wird heute routinemäßig in der Pathologie verwendet, um zwischen Lymphomen und Karzinomen in histologischen Schnitten zu unterscheiden.

Das CK 8/18 und 19 ist das am häufigsten exprimierte CK und stellt zugleich das Antigen für den monoklonalen Standardantikörper A45-B/B3 dar. Dieser monoklonale IgG1 Maus pan-antizytokeratin-Antikörper wurde in der vorliegenden Arbeit für die immunhistochemische Färbung benutzt, da er bereits in vielen Studien erfolgreich eingesetzt wurde (Banys *et al.*, 2009, Effenberger *et al.*, 2010, Fehm *et al.*, 2006).

In einer Versuchsreihe verwendete ich zur Visualisierung der CTCs einen fluoreszenzmarkierten AK gegen EpCAM (siehe Kapitel 4.3.6.4). EpCAM ist ein panepitheliales Antigen und ist für Zell-zu-Zell Adhäsionen zuständig. Studien zeigten, dass dieses Oberflächenantigen in nahezu allen epithelialen Malignomen überexprimiert wird (Osta *et al.*, 2004).

Die Protokolle der einzelnen Färbungen sind im Abschnitt 4.3.6 aufgelistet.

Den Großteil der Färbungen führte ich mit dem Standardantikörper A45-B/B3-Cy 3 durch (*mouse monoclonal pan-cytokeratin antibody A45-B/B3 IgG1*, konjugiert mit dem Fluorochrom Cy3-Mono-NHS, Micromet, München, Deutschland) (n=52) (Abbildung 18).

Die OTs wurden bei einer Exzitationswellenlänge von 565 nm in einer 10-, 20- und 40-fachen Vergrößerung systematisch durchgemustert. Bei dieser Anregung konnten vorhandene CK(+)- Zellen durch ihre rote Fluoreszenz erkannt werden. Bei Zytokeratin-Positivität wurde auf dem zweiten Kanal ein Bild bei einer Anregung mit 510 nm erstellt und damit die CD45-Positivität überprüft. Zugleich wurden alle positiven Zellen auch immer im Transmissionsbild und der Zellkern mittels DAPI-Färbung bei einer Wellenlänge von 400 nm beurteilt. Dies brachte zusätzlich zur Fluoreszenzfärbung eine morphologische Information (siehe auch Abschnitt 4.4.1).

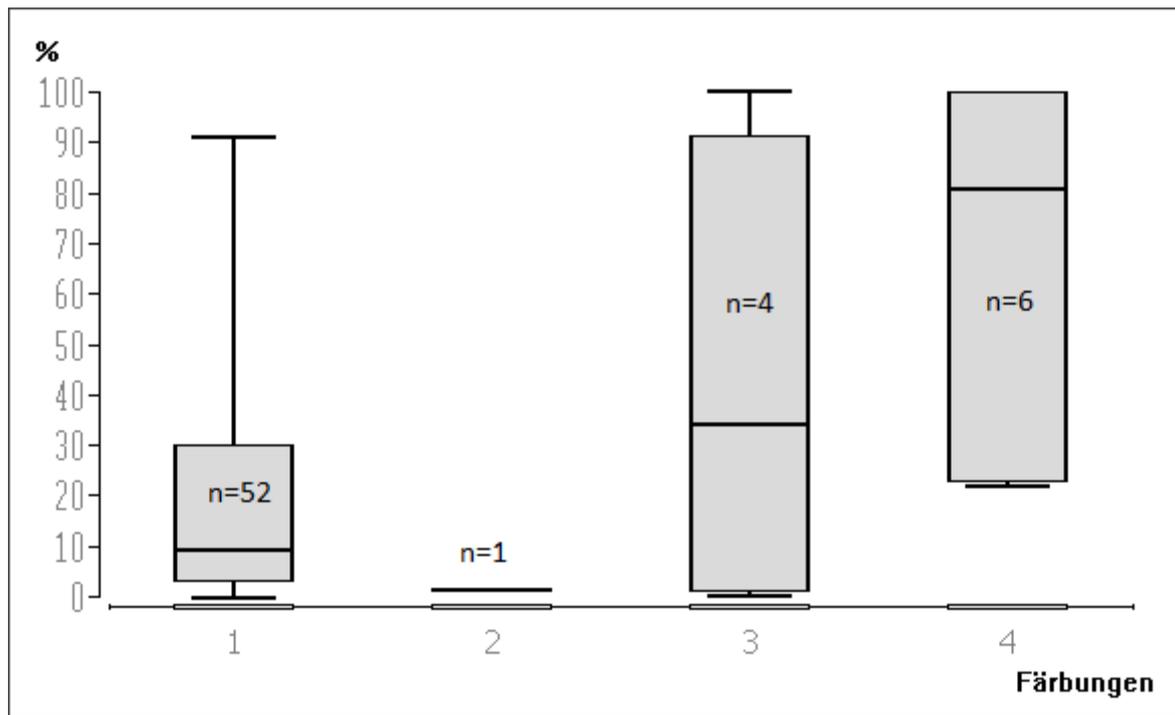


Abbildung 18: Vergleich der Wiederfindung von SKOV 3- und MCF 7-Zellen nach immunzytochemischer Färbung. 1=Färbung mit dem anti-Zytokeratin-Antikörper A45- B/B3-Cy 3, 2=Färbung mit anti-EpCAM-AK mit Alexa- Fluor<sup>R</sup> 488 (*goat anti mouse IgG1*), 3=Zytokeratinfärbung mit dem anti-Zytokeratin-AK A45-B/B3-Cy 3 und mit Alexa-Fluor<sup>R</sup> 488 *anti-human CD45*, 4=Zytokeratinfärbung mit dem anti-Zytokeratin-AK A45-B/B3-Cy 3, mit Alexa-Fluor<sup>R</sup> 488 *anti-human CD45*, monoklonalem Maus IgG1 anti-Zytokeratin AK CK 5/8 und mit Alexa- Fluor<sup>R</sup> 594 Streptavidin.

Die Wiederfindung und die Farbsättigung der TZ bei Verwendung des anti-Zytokeratin Antikörpers A45-B/B3-Cy 3 zusammen mit Alexa-Fluor<sup>R</sup> 488 *anti-human CD45*, dem monoklonalen Maus IgG1 anti-Zytokeratin Antikörper CK 5/8 und Alexa-Fluor<sup>R</sup> 594 Streptavidin (Abb. 18, Säule 4) lag durchschnittlich bei 68 % mit einer Spannweite von 81 %. Das Protokoll ist im Abschnitt 4.3.6.4 beschrieben. Nach der einfachen Standardfärbung mit dem anti-Zytokeratin A45-B/B3-Cy 3 konnten Wiederfindungsraten von durchschnittlich 17 % (Spannweite von 9%) erzielt werden (Abb. 18, Säule 1).

Nach der Färbung mit dem anti-Zytokeratin AK A45-B/B3-Cy 3 mit Alexa-Fluor<sup>R</sup> 488 *anti-human CD45* (Abb. 18, Säule 3) konnten durchschnittlich 42 % der TZ wiedergefunden werden (Median 34%).

Die Wiederfindungsrate nach der Färbung mit dem anti-EpCAM-Antikörper (Abb. 18, Säule 2) betrug durchschnittlich 1%.

### **5.2.1 Validation der Zytokeratinfärbung mit fluorchrom-markierten Antikörpern nach unterschiedlicher Fixierzeit**

Ich konnte nach zwei durchgeführten Versuchsreihen mit stufenweise steigenden Fixierzeiten keinen Unterschied in der Intensität der Färbung feststellen. Ein OT wurde ohne Fixierlösung mit Farbstoffen behandelt. Bei der Beurteilung im Fluoreszenzmikroskop zeigte sich kein Unterschied der Farbsättigung.

## **5.3 Validation der Anreicherungs- und Färbekontrolle an EDTA-Blutproben von Mamma- und Ovarialkarzinompatientinnen**

### **5.3.1 Patientenkollektiv**

Zwischen 2006 und 2008 wurden 38 Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Mamma- und Ovarialkarzinoms auf CK(+)-Zellen untersucht (siehe Tabellen 4.1 und 4.2). Die Rezidive zeigten sich als Peritonealkarzinosen und als Metastasen vor allem in Knochen, im Gehirn und in der Lunge.

Das mediane Alter aller Patientinnen betrug 55 Jahre. Dabei lag das mediane Alter der Mammakarzinompatientinnen mit 55 Jahren (Spannweite: 36-76) bei dem der Ovarialkarzinompatientinnen (medianes Alter: 55 Jahre, Spannweite: 39-66).

Bei Patientinnen mit einem Rezidiv des Ovarialkarzinoms wurden in 11 Fällen Lymphknotenmetastasen festgestellt (52 %). Fünf Patientinnen hatten tumorfreie Lymphknoten (24 %). In fünf Fällen wurde der Nodalstatus nicht erhoben oder ist nicht bekannt (24 %). Fernmetastasen wurden bei sechs Patientinnen festgestellt (29 %). Bei 9 Patientinnen wurden Fernmetastasen ausgeschlossen (43 %) und bei weiteren sechs Patientinnen wurde dieser Status nicht erhoben (29%).

Die weitere Therapie bestand bei dem Großteil der Patientinnen (15 von 21) aus einer Re-Laparotomie mit dem Ziel maximaler Tumorreduktion (Tumorrest < 1 cm oder Tumorfreiheit). Eine adjuvante Chemotherapie wurde angeschlossen. Fünf der 21 Patientinnen erhielten eine palliative Chemotherapie bei ausgedehntem, nicht operablem Tumorwachstum.

Bei Patientinnen mit einem Rezidiv des Mammakarzinoms wurden in 10 Fällen Lymphknotenmetastasen festgestellt (63 %). In drei Fällen wurden keine malignen Zellen in den Lymphknoten gefunden und in weiteren zwei Fällen wurde der Nodalstatus nicht

erhoben oder ist nicht bekannt. In 12 Fällen wurden Fernmetastasen gefunden (75 %). Bei drei Patientinnen stellte sich das Rezidiv nur lokoregionär dar. Einer erneuten Operation im Sinne einer „*wide exzision*“ wurden nur zwei der 16 Patientinnen unterzogen. Die anderen erhielten eine Chemotherapie, in einigen Fällen kombiniert mit einer Bestrahlung. Eine antihormonelle Therapie mit Aromatasehemmern lief ebenfalls parallel zur zytostatischen Therapie entsprechend der Leitlinien.

### **5.3.2 Nachweis CK(+)- Zellen im Blut der Patientinnen mittels Anreicherung durch den Zweistufengradienten**

Die Blutprobe RM04 wurde durch die Dichtegradientenzentrifugation aufgearbeitet. Die Aufarbeitung erfolgte nach dem im Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Protokoll. Diese Blutprobe wurde der Patientin mit Mammakarzinom entnommen, von der die Probe RM01 stammte. Die Probe RM04 wurde jedoch in einem schon weiter fortgeschrittenen Erkrankungsstadium wiederholt abgenommen, sodass die Möglichkeit, eine zirkulierende Tumorzelle im Blut zu finden, deutlich größer war. Bei der Auswertung im Fluoreszenzmikroskop wurde eine CK(+)-Zelle detektiert (Abb. 19).

Die Patientin befand sich zu dem Zeitpunkt im Stadium IV des Mammakarzinoms mit ossären, cerebralen und pulmonalen Metastasen. Die Therapie bestand aus einer palliativen Chemotherapie, antihormonellen Therapie und Radiatio.

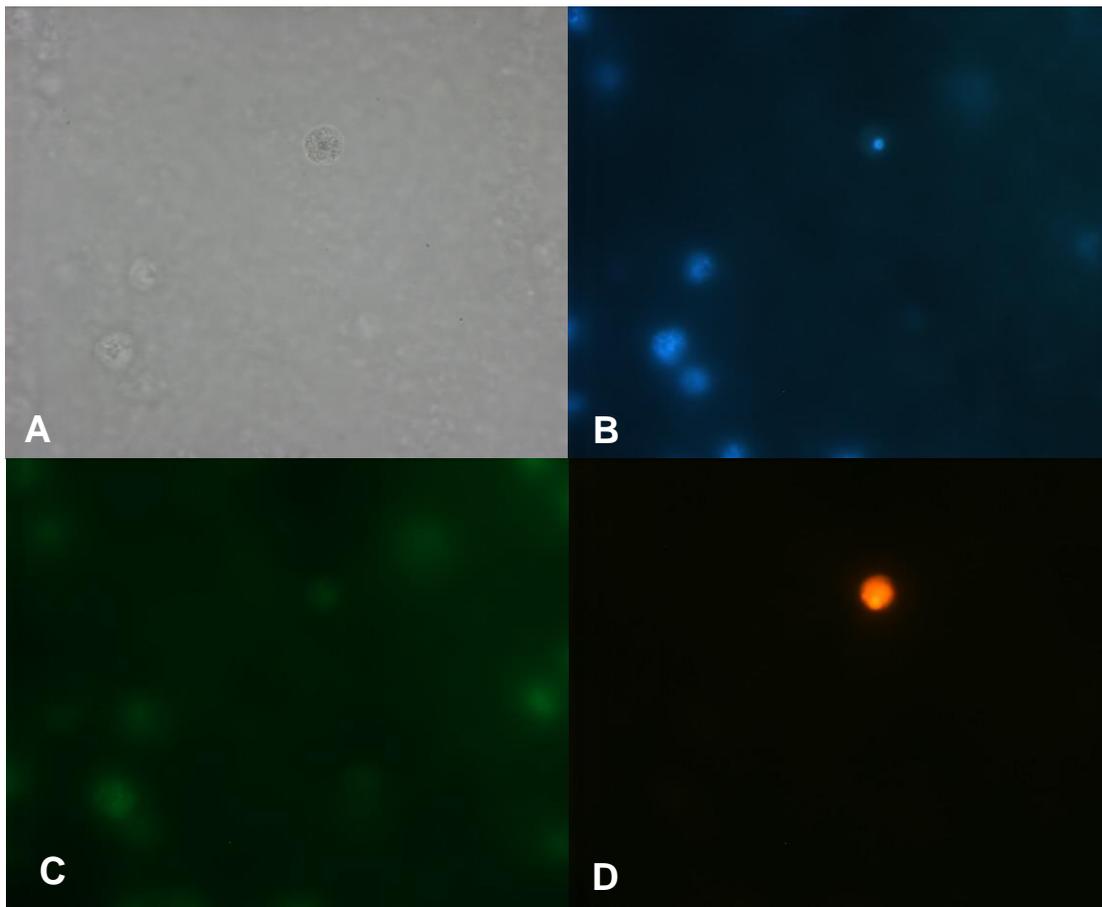


Abbildung 19: CTC in der Probe RM04 nach der Dichtezentrifugation. A: Durchlicht, B: Kernfärbung mit Dapi, C: CD45-Färbung, D: CK-Färbung.

### 5.3.3 Nachweis CK(+)-Zellen im Blut der Patientinnen mittels Anreicherung mit dem MACS™-Verfahren

In der vorliegenden Arbeit wurden 35 Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv durch die manuelle Methode MACS™ aufgearbeitet. Darunter waren 14 Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Mammakarzinoms und 21 Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Ovariakarzinoms. Es wurde nach dem im Abschnitt 4.3.4 beschriebenen Protokoll vorgegangen. Die Zellspots auf dem OT wurden im Anschluss nach dem in Abschnitt 4.3.6.4 beschriebenen Protokoll mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern behandelt.

In den 14 Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden in insgesamt 2 Proben CK(+)-Zellen detektiert. Das entspricht einer relativen Häufigkeit von 14 %. Die CK(+)-Zellen wurden in den Proben RM05 und RM15 detektiert (Tabelle 4.1).

Die Probe RM05 entstammte, wie in der Tabelle 4.1 beschrieben, einer Patientin, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen Tumor des Stadiums cT3/4, cN1, M1 hatte. Die CK(+)-Zelle ist in Abbildung 20 dargestellt.

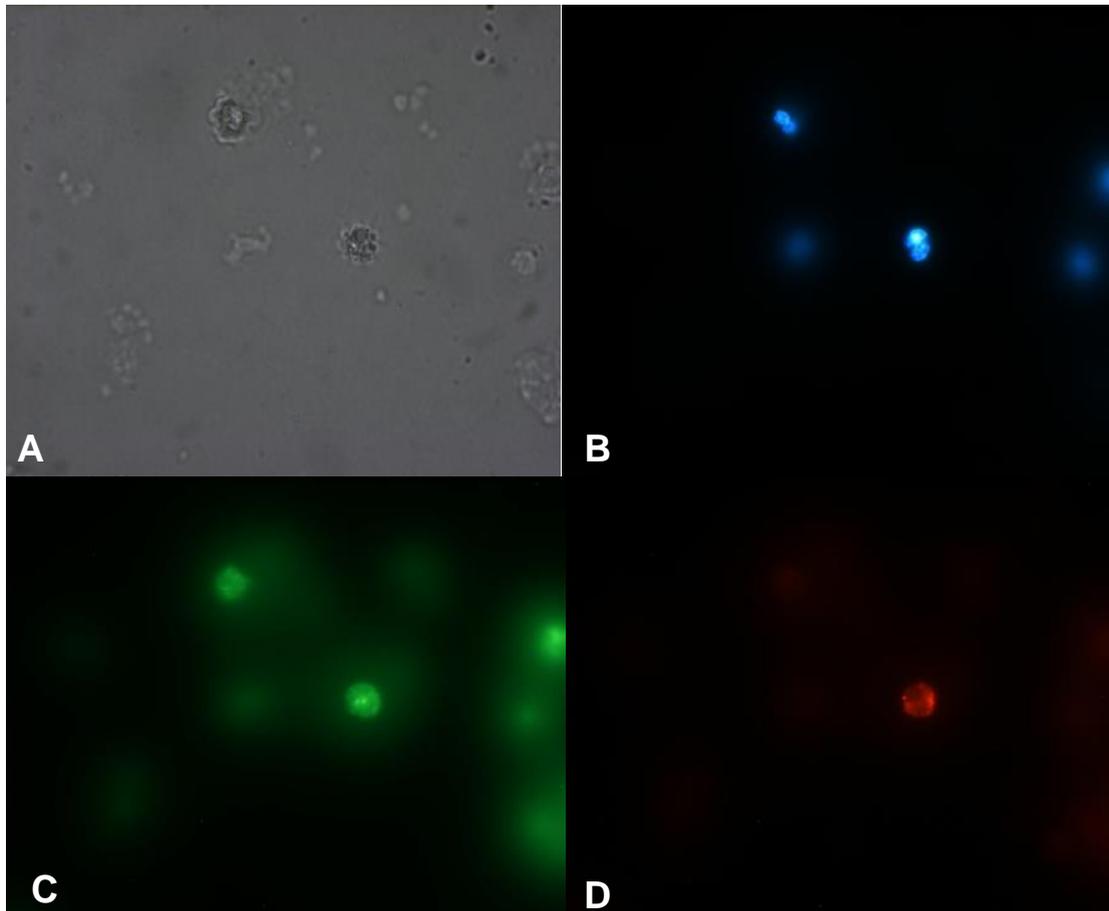


Abbildung 20: CTC in der Probe RM05 nach dem MACS<sup>™</sup>-Verfahren. A: Durchlicht, B: Kernfärbung mit Dapi, C: CD45-Färbung, D: CK-Färbung.

Die Probe RM15 wurde einer Patientin entnommen, die bei der Erstdiagnose einen Tumor mit dem Stadium pT2, pN1, M1, G3 hatte. Die detektierte CK(+)-Zelle ist in Abbildung 21 dargestellt.

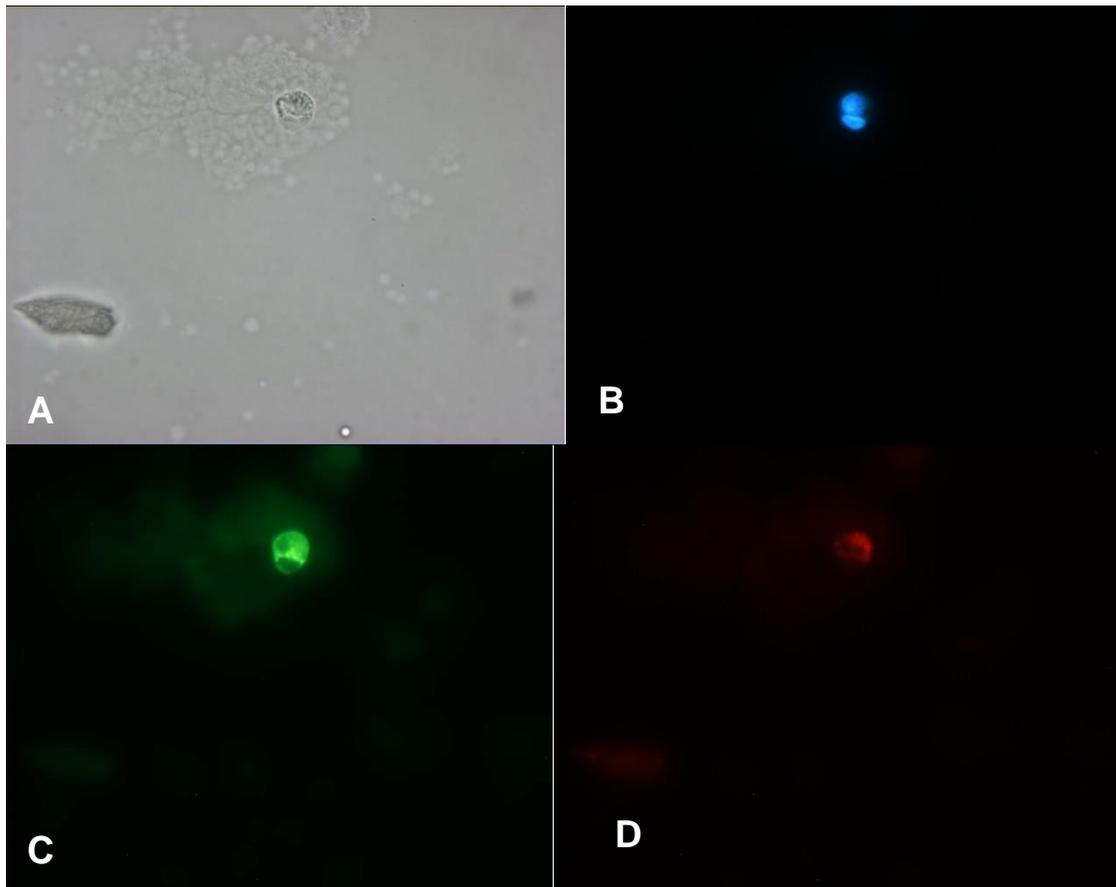


Abbildung 21: CTC in der Probe RM15 nach dem MACS<sup>TM</sup>-Verfahren. A: Durchlicht, B: Kernfärbung mit Dapi, C: CD45-Färbung, D: CK-Färbung.

In den 21 Bluproben von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom wurden in ebenfalls 2 Proben positive Zellen detektiert. Ein Beispiel ist in Abbildung 22 wiedergegeben (Probe R007). Die Patientin zeigte bei Erstdiagnose das Stadium FIGO IIb ohne sichtbare Fernmetastasen (siehe auch Tab. 4.1).

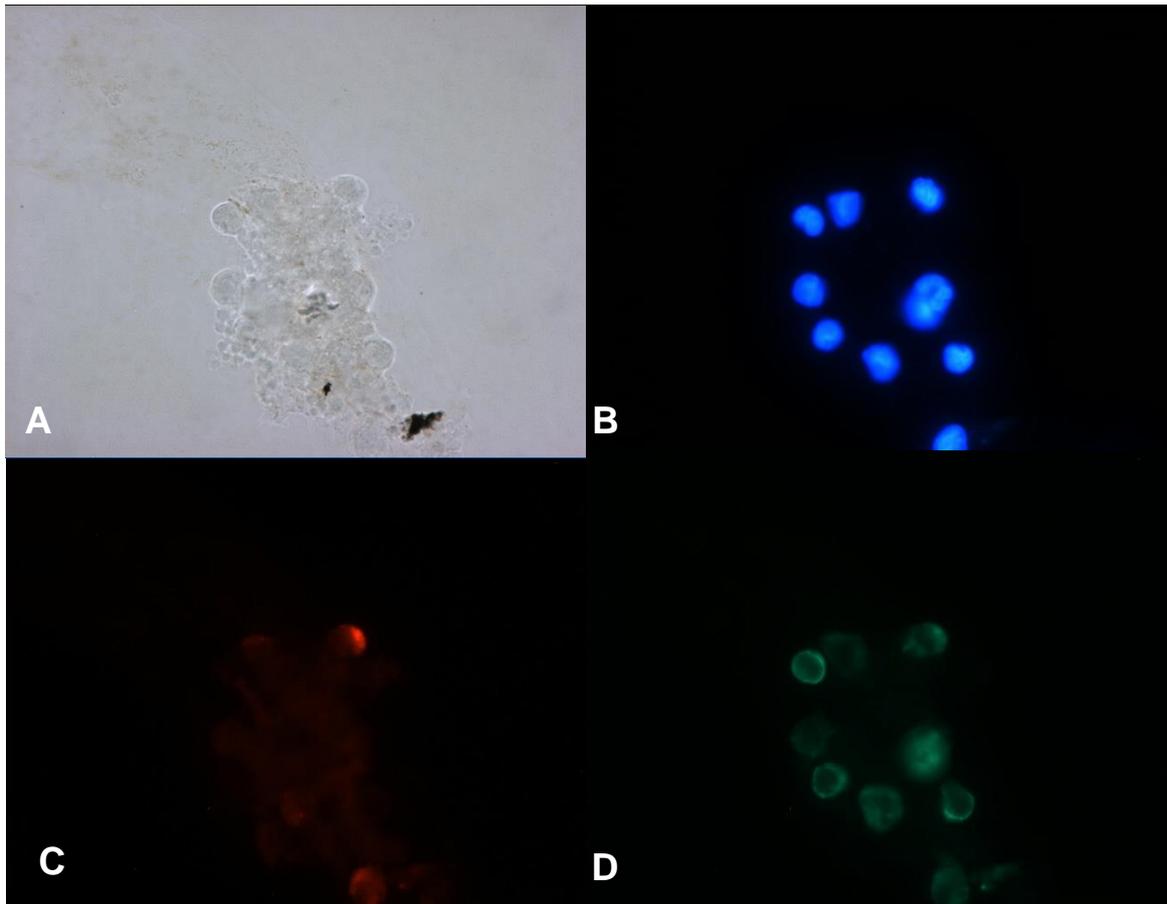


Abbildung 22: CTC in der Probe R007 nach dem MACS<sup>™</sup>-Verfahren. A: Durchlicht, B: Kernfärbung mit Dapi, C: CK-Färbung, D: CD45-Färbung.

Die zweite Blutprobe (R005), in der CK(+)-Zellen detektiert werden konnten, wurde einer Patientin entnommen, die bei Erstdiagnose das FIGO-Stadium IV mit Fernmetastasen zeigte (Abb. 23).

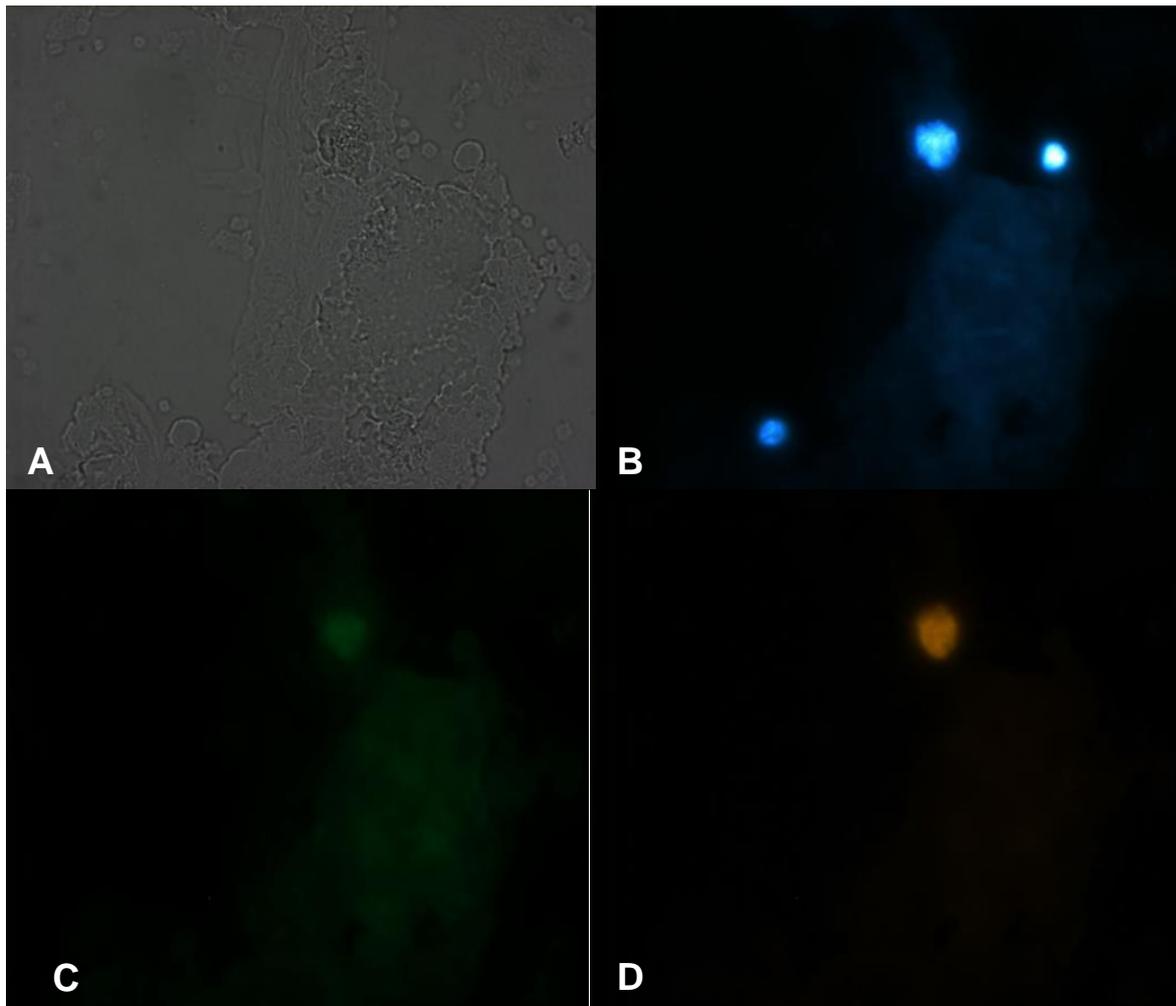


Abbildung 23: CTC in der Probe R005 nach dem MACS<sup>™</sup>-Verfahren: A: Durchlicht, B: Kernfärbung mit Dapi, C: CD45-Färbung. D: CK-Färbung.

Somit liegt die relative Häufigkeit der Detektierung CK(+)-Zellen durch die manuelle Methode MACS<sup>™</sup> im Falle des Ovarialkarzinomrezidivs in meiner Untersuchung bei 10 %.

### 5.3.4 Nachweis CK(+)-Zellen im Patientenblut nach Anreicherung mit dem *CellSearch*<sup>™</sup>-Verfahren

Mit der semi-automatisierten Methode *CellTracks*<sup>™</sup> *AutoPrep* wurden 7 der 16 Blutproben der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Mammakarzinoms und alle 21 Proben der Patientinnen mit einem Rezidiv eines Ovarialkarzinoms auf zirkulierende CK(+)-Zellen untersucht.

Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde die Monozytenphase fixiert und nach dem im Abschnitt 4.3.5 beschriebenen Protokoll aufgearbeitet.

Nach Antrocknung auf dem OT erfolgte die immunzytochemische Färbung. Ausgewertet wurde am Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica.

In 4 der 7 Blutproben der Patientinnen mit einem Rezidiv des Mammakarzinoms ließen sich CK(+)-Zellen detektieren (RM11, RM12, RM15 und RM16). Das entspricht einer relativen Häufigkeit von 57 %.

Diese vier Proben stammen von Patientinnen mit bereits bekannten Fernmetastasen und einem positiven Lymphknotenstatus (Tabelle 4.1).

Als Beispiel ist die positive Zelle der Probe RM12 in der Abbildung 24 dargestellt.

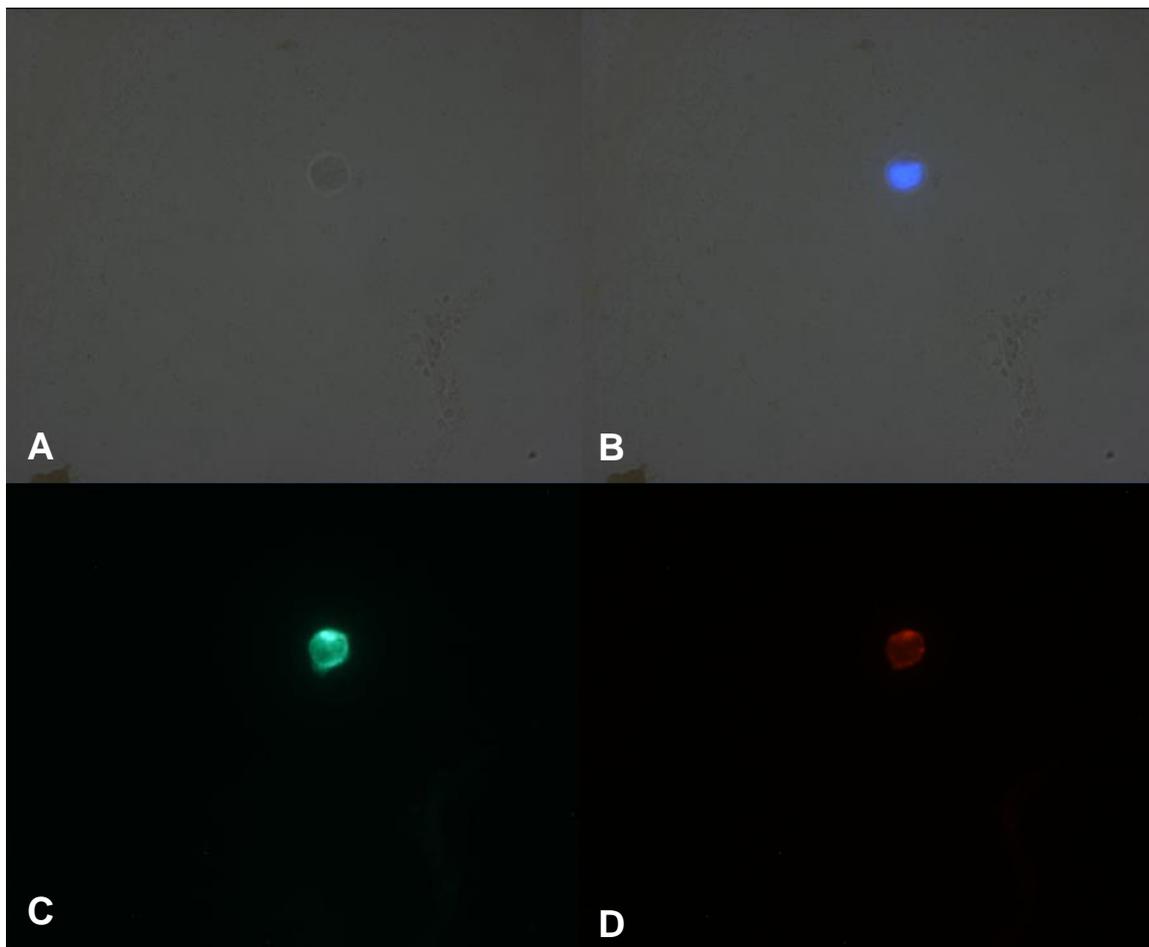


Abbildung 24: CTC in der Probe RM12 nach der Aufarbeitung im *CellSaerch*<sup>TM</sup>. A: Durchlicht, B: Kernfärbung mit Dapi, C: CD45-Färbung. D: CK-Färbung.

Bei den 21 aufgearbeiteten Blutproben der Patientinnen mit einem Rezidiv des Ovarialkarzinoms wurden in 3 Fällen CK(+)-Zellen detektiert (R002, R007, R008). Das entspricht einer relativen Häufigkeit von 14 %.

In der Probe R002 ließ sich neben einer einzelnen CK(+)-Zelle ein Zellcluster detektieren (Abb. 25 und 26).

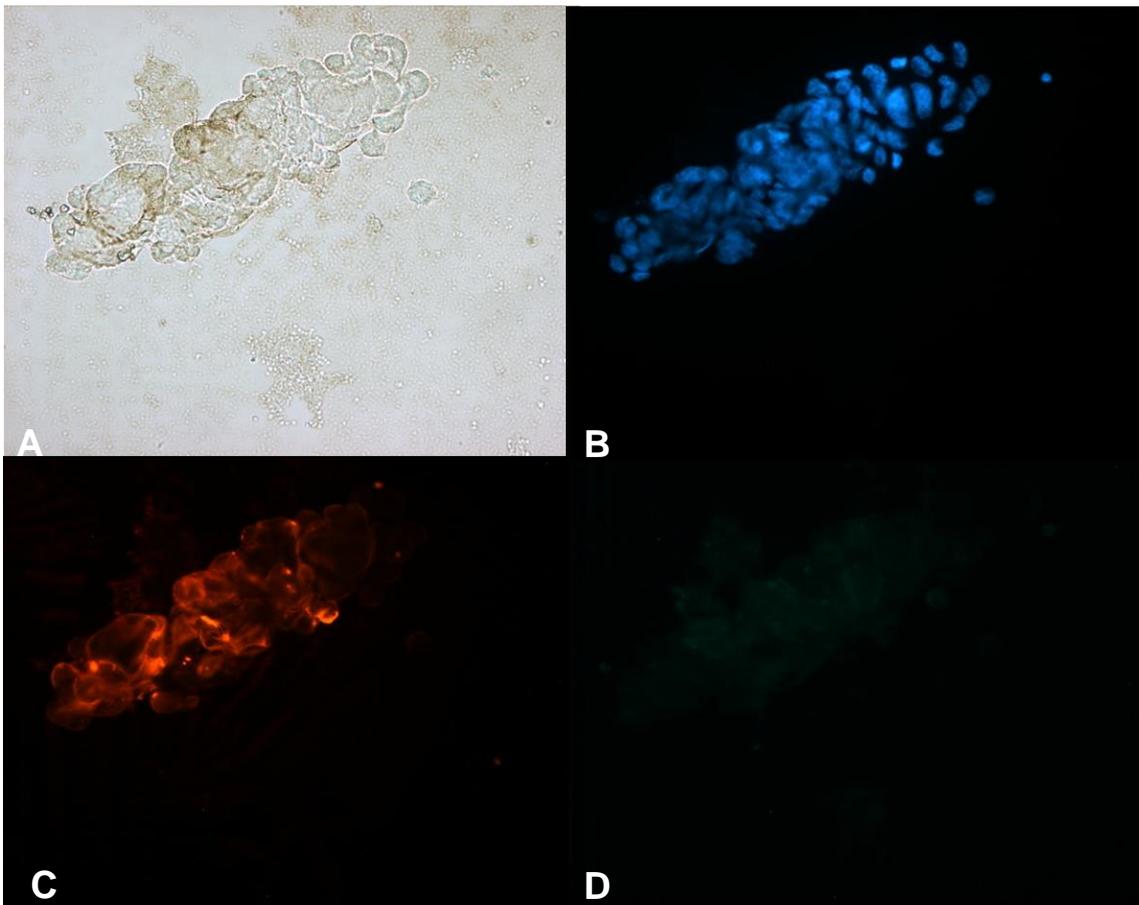


Abbildung 25: Zellcluster in der Nähe einer einzelnen Zelle in der Probe R002. A: Durchlicht, B: Kernfärbung mit Dapi, C: CK-Färbung, D: CD45-Färbung.

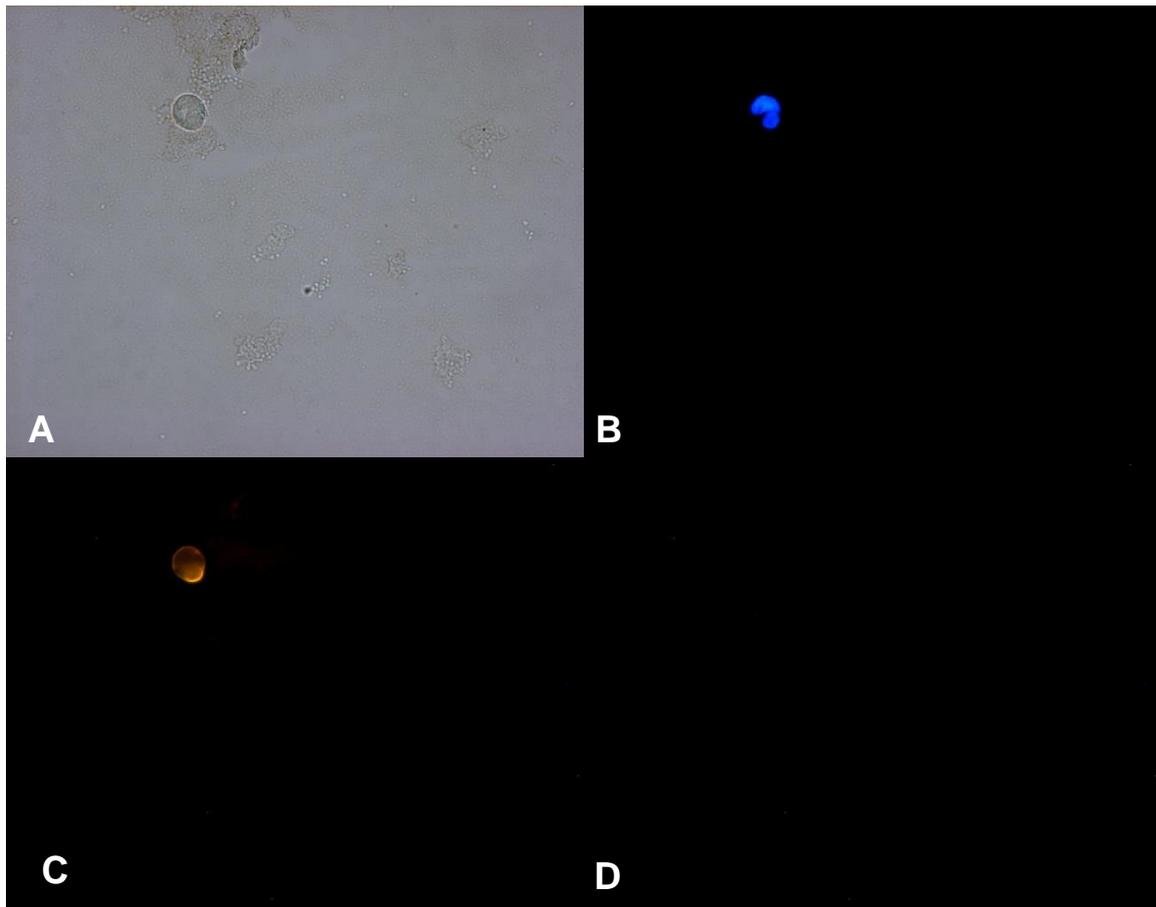


Abbildung 26: CTC in der Probe R002 nach der Aufarbeitung mit *CellSearch*<sup>TM</sup>. A: Durchlicht, B: Kernfärbung mit Dapi, C: CK-Färbung, D: CD45-Färbung.

## 5.4 Vergleich der verschiedenen Anreicherungs- und Detektionsverfahren

Der Aufarbeitung der Patientenproben ging eine Vielzahl von *spiking*-Versuchen mit MCF 7-Zellen und SKOV 3-Zellen voraus. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den Versuchsreihen die manuelle Methode MACS™ die besten Wiederfindungsraten bot. So konnten hier nach dem im Abschnitt 4.3.4 aufgelistetem Protokoll durchschnittlich 76 % der Tumorzellen wiedergefunden werden (Median 91%).

Nach dem Zweistufengradienten konnten durchschnittlich 84 % der *spiked* TZ wiedergefunden werden. Dabei war der Unterschied in der Wiederfindung zwischen MCF 7-Zellen und SKOV 3-Zellen nicht signifikant ( $p=0,90$ ).

In meinen *spiking*-Versuchen hatte das *CellSearch*™-Verfahren eine durchschnittliche Wiederfindung von 3%. Dabei war die Wiederfindung effizienter, wenn die TZ nur in PBS-Puffer aufgenommen wurden (29 % bei MCF 7-Zellen und 21 % bei SKOV 3-Zellen).

Bei den Patientenproben verhielt es sich anders. So konnten mit dem *CellTracks*<sup>R</sup> *AutoPrep* in 4 von 7 untersuchten Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Mammakarzinoms CK(+)-Zellen detektiert werden (57 %). Neben einzelnen CK(+)-Zellen konnten nach der Aufarbeitung der Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Ovarialkarzinoms auch ganze Zellkluster detektiert werden (Abb.25). Insgesamt wurden in 14% CK(+)-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv des Ovarialkarzinoms detektiert.

Im MACS™-Verfahren wurden in 10 % (Rezidive des Ovarialkarzinoms) und in 14 % (Rezidive des Mammakarzinoms) CK(+)-Zellen detektiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in insgesamt 5 der 21 Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Ovarialkarzinoms CK(+)-Zellen nachgewiesen werden konnten. Das entspricht einer relativen Häufigkeit von 24 %.

In den 17 Blutproben der 16 Patientinnen mit einem Rezidiv des Mammakarzinoms konnte ich in 6 Fällen CK(+)-Zellen detektieren. Das entspricht einer relativen Häufigkeit von 35 %.

Die alleinige Dichtegradientenzentrifugation wird heute nicht mehr als Separationsmethode eingesetzt, da eine hohe Aufreinigung der Zellen nicht gewährleistet ist. Dabei sind die Dichte und der pH der Lösungen ausschlaggebend für die Sedimentationsbereitschaft der Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb nur eine Probe einer Patientin in einem weit

fortgeschrittenen Erkrankungsstadium des Mammakarzinoms allein durch den Zweistufengradienten aufgearbeitet (Abb. 19).

Die immunzytochemische Färbung mit dem anti-Zytokeratin AK A45-B/B3 erwies sich auch in dieser Arbeit als zuverlässig. Unter Verwendung des anti-Zytokeratin AKs A45-B/B3-Cy 3 mit Alexa-Fluor<sup>R</sup> 488 *anti-human* CD45, dem monoklonalen Maus IgG1 anti-zytokeratin AK 5/8 und Alexa-Fluor<sup>R</sup> 594 Streptavidin war die Farbsättigung der epithelialen TZ zufriedenstellend und die Wiederfindung betrug durchschnittlich 68 %.

## 6. Diskussion

Das Mammakarzinom ist das häufigste Malignom der Frau und metastasiert vornehmlich in die Knochen, die Lunge, das Gehirn und die Leber. Dabei sind bei Diagnosestellung ein Lymphknotenbefall und die Zahl befallener Lymphknoten prognosebestimmend (Vinh-Hung *et al.*, 2003). Das Rezidivrisiko von 20-30 % bei nodal negativen Patientinnen lässt auf eine frühe Disseminierung schließen, die weder mit konventionellen diagnostischen Verfahren noch mit laborchemischen Parametern festgestellt werden kann. Obwohl es zum Zeitpunkt der Primärdiagnose häufig noch keinen Anhalt für eine Tumorzellstreuung gibt, entwickelt ca. ein Drittel der Patienten ein Lokalrezidiv oder Fernmetastasen, z.T. auch noch lange nach Therapie des Primärtumors. Deshalb wurden in den vergangenen Jahren große Anstrengungen unternommen, geeignete Methoden zum frühzeitigen Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen zu entwickeln, da das Vorhandensein von zirkulierenden Tumorzellen mit einer insgesamt kürzeren Überlebenszeit verbunden ist (Bidard *et al.*, 2008, Munzone *et al.*, 2010; Cristofanilli *et al.*, 2004; Cristofanilli *et al.*, 2007; Criscitiello *et al.*, 2010; Ferro *et al.*, 2010, Jiang *et al.*, 2013, Rack *et al.*, 2014).

Das Ovarialkarzinom ist die dritthäufigste Malignomkrankung der Frau. Die wichtigsten Prognosefaktoren sind das FIGO-Stadium der Erkrankung und der postoperative Tumorrest (du Bois *et al.*, 2009). Dieses epitheliale Karzinom metastasiert typischerweise nicht in das Knochenmark und den Knochen. Die Tatsache, dass zum Zeitpunkt der Diagnose bei nahezu einem Drittel der Patientinnen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark gefunden werden, auch und besonders in frühen Krankheitsstadien, weist auf das frühe Ausbreitungspotenzial des Tumors durch das Blutsystem hin (Braun *et al.*, 2001, Krishnamurthy *et al.*, 2010). Die Tumorausbreitung per continuitatem in Becken- und Bauchhöhle scheint dabei parallel zur systemischen Tumorzellaussaat abzulaufen. Während das lokoregionäre Wachstum durch konventionelle diagnostische Möglichkeiten überprüft werden kann, verläuft die systemische Ausbreitung zunächst unbemerkt (Roggel, 2005).

Deshalb existiert ein großes klinisches Interesse an neuen Strategien, die zirkulierenden Tumorzellen zu detektieren. Die Charakterisierung dieser Tumorzellen könnte zur Identifikation von therapeutisch relevanten Zielen führen und eine individualisierte Therapie ermöglichen. So wird in vielen Studien die Entwicklung neuer sensitiver Methoden der Tumorzellanreicherung aus peripherem Blut aufgegriffen.

Die Immunzytochemie stellt schon länger die Standardmethode zur Detektion epithelialer disseminierter Tumorzellen dar. Um die Sensitivität der ICC weiter zu erhöhen, wird seit einigen Jahren eine vorherige Aufreinigung des peripheren Blutes oder des Knochenmarkes mit Dichtegradientenzentrifugation und antikörpergekoppelten *MicroBeads* durchgeführt. Obwohl die Anreicherungstechniken verfeinert wurden, ist es durch die phänotypische Heterogenität der isolierten Tumorzellen schwierig, einen geeigneten Marker zu finden.

Diese Situation wurde in dieser Arbeit aufgegriffen und verschiedene Separationsverfahren zur Tumorzellanreicherung verglichen. Neben zahlreichen *spiking*-Versuchen wurden zwischen 2006 und 2008 17 Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Mammakarzinoms und 21 Blutproben von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinomrezidiv auf CK-positive Zellen untersucht. Die Anreicherung erfolgte in zwei Schritten. Einer Dichtegradientenzentrifugation folgte eine immunomagnetische Anreicherung, entweder manuell mit den MACS<sup>TM</sup>-Säulen oder semi-automatisiert unter Verwendung des *CellTracks® AutoPrep* Systems. Als Anreicherungsmarker wurde das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM verwendet. Dies ist ein panepitheliales, tumorassoziiertes Antigen und ist für Zell-zu-Zell Adhäsionen zuständig. Die Arbeitsgruppe um Osta zeigte, dass dieses Oberflächenantigen in nahezu allen epithelialen Malignomen überexprimiert wird (Osta *et al.*, 2004). Der Nachweis von CK(+)-Zellen erfolgte durch die Immunfluoreszenzfärbung, die an einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurde. Neben dem anti-Zytokeratin Antikörper A45B/B3 wurde ein Antikörper gegen CK 5 /8 verwendet.

## 6.1 Diskussion der Methoden

Die Isolierung und der Nachweis von CTCs ist aufgrund ihrer sehr geringen Anzahl im peripheren Blut eine methodische Herausforderung (Paterlini-Brechot und Benali, 2007). Die Methode muss sensitiv und spezifisch sein. Auch sollte der Anreicherungsmarker möglichst nur von den CTCs und nicht von anderen zirkulierenden Blutzellen exprimiert werden (Gerges *et al.*, 2010). Ein limitierender Faktor ist die heterogene Expression der Antigene auf isolierten Tumorzellen. Durch den Verlust der epithelialen Eigenschaften und damit verbundenen Heterogenität ist schwierig, die Untergruppen der CTCs nachzuweisen (Riethdorf und Pantel, 2010).

### 6.1.1 Diskussion der Anreicherung zirkulierender Tumorzellen durch den Zweistufengradienten

Der von mir in dieser Arbeit verwendete Dichtegradient wurde von der Arbeitsgruppe um Griwatz entwickelt (Griwatz *et al.*, 1995). Diese Dichtegradientenzentrifugation trennt die zellulären Bestandteile des Blutes auf, wobei sich die potentiell vorhandenen CTCs in der

separaten Monozytenphase befinden. Die Anreicherung der CTCs wurde um das 20-fache erhöht und die Wiederfindungsrate betrug 70-90 %.

Das Prinzip des zweistufigen Gradienten mit *Nycodenz*<sup>R</sup> (Dichte: 1.069 g/ml, Osmolalität= 335 mOsm; Axis-Shield, Oslo, Norwegen) und *PolymorphPrep*<sup>TM</sup> (Dichte=1,113 g/ml; Osmolalität=460 mOsm, Axis-Shield, Oslo, Norwegen) beruht auf der Sedimentationsbereitschaft der epithelialen Zellen durch Dichte und Osmolalität.

Die gesättigten Röhrchen wurden mit den Medien befüllt (siehe Abschnitt 4.3.3) und 25 Minuten bei 450 x g und 22 ° Celsius zentrifugiert. Die Wiederfindungsraten der *spiked* TZ nach Etablierung der Durchführung der Dichtezentrifugation von etwa 84 % entsprechen den Wiederfindungsraten von Griwatz.

Insgesamt wird diese Methode dadurch limitiert, dass zirkulierende Tumorzellen sehr selten sind. Die Wahrscheinlichkeit, eine verdächtige CK(+)-Zelle in einem Blutvolumen von ca. 20-30 ml zu detektieren ist somit gering. Eine Ausnahme stellt möglicherweise die fortgeschrittene Rezidivkrankung dar. Außerdem kann es durch die Trennung der Monozytenfraktion von den Erythrozyten und Granulozyten zu Tumorzellverlusten kommen, abgesehen von den Zellverlusten durch Zelladhäsionen bei den Bearbeitungs- und Zentrifugationsschritten.

### **6.1.2 Diskussion der Anreicherung zirkulierender Tumorzellen durch die manuelle immunomagnetische Methode MACS<sup>TM</sup> oder semi-automatisiert unter Verwendung des *CellTracks*<sup>®</sup> *AutoPrep* Systems**

Der zweite Schritt der Anreicherung erfolgte immunologisch mit supramagnetischen *MicroBeads*, entweder manuell mit den MACS<sup>TM</sup>-Säulen der Firma Miltenyi Biotec oder durch das *CellTracks*<sup>®</sup> *AutoPrep* System. Die *Beads* sind 50 nm große Partikel. Konjugiert an einen Antikörper binden diese spezifisch an ein bestimmtes Antigen der Zielzellen. Die *MicroBeads* aktivieren nicht die Zellen und zerstören nicht die Oberflächenepitope (Miltenyi Biotec). Außerdem sind die *Beads* nicht permanent magnetisiert und stören so nicht die anschließende Färbung und Auswertung.

Der von mir für die Anreicherung verwendete AK gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM wurde bereits in einigen Studien zur Anreicherung epithelialer Zellen eingesetzt (Choesmel *et al.*, 2004; Woelfle *et al.*, 2005; Antolovic *et al.*, 2010). Eine Überexpression von EpCAM beim Mamma- und Ovarialkarzinom wurde bereits durch mehrere Studien bewiesen (Osta *et al.*, 2004; Connor *et al.*, 2004; Spizzo *et al.*, 2006). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse schien EpCAM als Antigen für eine Tumorzellanreicherung sehr gut

geeignet. Viele Daten zur immunomagnetischen Anreicherung mit Hilfe von EpCAM-gekoppelten *MicroBeads* bei Mamma- und Ovariakarzinom gibt es jedoch nicht.

Die *MS*-Säulen der Firma Miltenyi Biotec sind befüllt mit einer Matrix aus eisenhaltigen Mikrokügelchen. Zunächst wurden die Säulen mit *Running Buffer* abgesättigt, um unspezifische Adhäsionen und somit Zellverluste zu vermeiden. Dann wurde die Zellsuspension auf die Säulen, die in einem Permanentmagneten plaziert waren, gegeben. Bei dieser Positivseparation bleiben die magnetisch markierten Zellen in der Säulenmatrix hängen, während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen. Die markierten Zellen werden dann durch Ausspülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewonnen.

Das *CellTrack<sup>R</sup> AutoPrep* System ist ein weitestgehend automatisiertes Verfahren und verspricht durch eine standardisierte und optimierte Aufarbeitung von Vollblut die Isolierung von CTCs.

Das *Profile Kit* wurde entwickelt, um CTCs epithelialen Ursprungs aus Vollblut bei nur niedriger Antigendichte auf der Zelloberfläche anzureichern. Da ich jedoch nicht mit Vollblut arbeitete, wich ich etwas vom Protokoll ab. Es kam wegen der fehlenden Erythrozyten zu Fehlermeldungen. Die in der fixierten Monozytenphase enthaltenen Zellen wurden in *Dilution Buffer (CellSearch<sup>R</sup> Profile Kit)* aufgenommen und im *CellSearch<sup>TM</sup>* als *control run* gestartet. Damit wurde das Problem umgangen.

Viele Studien arbeiteten mit dem *CellSearch<sup>TM</sup>* System und erzielten gute Ergebnisse (Riethdorf *et al.*, 2007, Königsberg *et al.*, 2010, Wallwiener *et al.*, 2012, Tokudome *et al.*, 2011).

Ein großes Problem dieser immunomagnetischen Anreicherungs-methode stellt die heterogene Expression der Oberflächenantigene einiger CTCs dar. Auch für EpCAM gibt es Untersuchungen, die eine variable Expression bestätigen (Went *et al.*, 2004; Mostert *et al.*, 2010). So konnte Went in seiner Arbeit teilweise nur eine schwache EpCAM-Markierung in einigen Mamma- und Ovariakarzinomen darstellen. Mostert beschrieb in seiner Arbeit eine EpCAM-Lücke in acht von neun Tumorzelllinien. In den EpCAM-negativen Zelllinien konnte er erfolgreich einen Antikörper gegen CD146 zur Anreicherung verwenden.

Außerdem sollte diskutiert werden, inwieweit mit dieser Methode CTCs detektiert werden können, abgesehen von den Zellen, die auf Grund mangelnder Antigen-Expression nicht erfasst werden. Hierzu seien die folgenden Punkte genannt:

- Insgesamt sind zirkulierende Tumorzellen rar.
- Bei den Bearbeitungs- und Zentrifugationsschritten kann es durch Zelladhäsionen zu Zellverlusten kommen.
- Wie bereits erwähnt, scheint die Expression der Zielantigene, insbesondere EpCAM, der einzelnen CTC sehr heterogen zu sein.

- Die schnellstmögliche Bearbeitung der Blutproben ist wichtig, damit es nicht zu mechanischen Belastungen oder zum Zelltod kommt.
- In Bezug auf die *spiking*-Versuche mit MCF 7 und SKOV 3 muss geklärt werden, ob die kultivierten Zellen im Laufe der Zeit die Antigenexpression beibehalten oder diese verlieren, was auch zu falschen Rückschlüssen auf die Methodik führen kann. Der Grund scheint in der Passagierungsfrequenz der Zellkultur mit Verlust der Zytokeratineigenschaften zu liegen. Die Änderung der Zytokeratinexpression in der Zellkultur wurde bereits 1988 von Paine bei Pneumozyten Typ II der Lunge gezeigt (Paine *et al.*, 1988).

### **6.1.3 Diskussion der Immunfluoreszenzfärbungsprotokolle zum Nachweis von Tumorzellen mittels Antikörper gegen epitheliale Markerproteine**

Zur Darstellung der CTCs verwendete ich AK gegen Zytokeratine. CK sind Intermediärfilamente und charakterisieren epitheliale Zellen. Die 20 verschiedenen CK werden entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften in saure oder neutral-basische CK, entsprechend ihres Molekulargewichtes in hoch- und niedermolekulare CK, eingeteilt (Moll *et al.*, 1982). Zytokeratine sind spezifisch für einen Epitheltyp und zeigen eine Korrelation zum Grad der Mutation und der Differenzierung der Zellen.

Die Nutzung der spezifischen Antikörper gegen CK ist bei der Anreicherung und Markierung von peripheren TZ weit verbreitet (Braun *et al.*, 2006, Banys *et al.*, 2009).

Ich verwendete zur Markierung den anti-Zytokeratin Antikörper A45-B/B3-Cy3. Dieser monoklonale *mouse*-AK richtet sich gegen die Cytokeratine 8 und 18. Zusätzlich wurde die farbliche Markierung um einen monoklonalen *mouse*-AK gegen CK 5 und 8 (kombiniert mit dem Fluorochrom Oyster) erweitert, da man weiß, dass CK 5 im Ovar epithel exprimiert wird (Moll *et al.*, 1982).

Zur Markierung von Leukozyten verwendete ich Alexa Fluor<sup>R</sup> 488 CD45, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Die CD45-Markierung wurde bereits erfolgreich in anderen Arbeiten durchgeführt (Siewerts *et al.*, 2009).

So konnten nach einer zusätzlichen Kernfärbung CK(-)-Zellen von den CK(+)-Zellen unterschieden werden.

Es fanden sich auf einigen OTs Artefakte, die sich am ehesten auf Zellfragmente zurückführen lassen. Wir vermuten, dass es sich hierbei um tote Zellen aus der Monozytenfraktion handelte, die bei der Anreicherung unspezifisch gebunden und angefärbt wurden. Da tote Zellen bekannterweise wesentlich weniger resistent gegen äußere Einflüsse sind, wurden sie vermutlich bei der Anreicherung zerstört. Das würde das Auftreten von Zelltrümmern erklären.

Die OTs wurden manuell am Fluoreszenzmikroskop durchgesehen und die CK(+)-Zellen gezählt. Fehlerquellen, die zu einem falsch positiven oder negativen Ergebnis führen können, sind:

- Unzureichende Zytokeratinfärbung und damit verbundenes falsch negatives Resultat.
- Subjektivität des Untersuchers.
- Falsch negatives Ergebnis bei „Nichtsehen“ der CK(+)-Zellen durch manuelles Verschieben des Objektträgers.
- Wie bereits erwähnt, scheint die Passagierungsfrequenz in der Zellkultur mit einem Verlust der Zytokeratineigenschaften einherzugehen (Paine *et al.*, 1988), was zu falsch negativen Ergebnissen der *spiking*-Experimente führt.

Um die Fehlerquellen zu reduzieren, arbeiten einige Arbeitsgruppen erfolgreich mit einem automatisierten Scan-Fluoreszenzmikroskop. In seiner Veröffentlichung beschreibt Ntouroupi eine sehr große Sensitivität und Spezifität bei Detektion von disseminierten Tumorzellen mit einem automatisierten Mikroskop (Ntouroupi *et al.*, 2008).

## 6.2 Diskussion der Detektionsrate CK(+)-Zellen im peripheren Blut

In der Mehrzahl der bisherigen Studien zur Detektion von CTCs und DTCs wurde, wie in der vorliegenden Arbeit auch, eine Kombination aus Dichtegradientenzentrifugation und anschließender immunomagnetischer Separation durchgeführt (Griwatz *et al.*, 1995; Weihrauch *et al.*, 2002; Judson *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2004; Roggel, 2005; Stellwagen, 2009, Wülfing *et al.*, 2006). Mit dieser mehrstufigen Methode konnte in dieser Arbeit ein Blutvolumen von 20-30 ml untersucht werden, während mit der ICC nur ein kleiner Anteil der gewonnenen Probe untersucht werden kann, was die Sensitivität erhöht.

Nach Etablierung der Durchführung des Dichtegradienten betrug die Wiederfindungsrate der *spiked* TZ durchschnittlich 84 %, was den Detektionsraten von Griwatz entspricht. Die Wiederfindung (WF) der *spiked* SKOV 3-Zellen lag nach dem Zweistufengradienten durchschnittlich bei 42%, wobei bei  $10^2$  *spiked* SKOV 3-Zellen eine durchschnittliche WF von 92 % erzielt werden konnte. Die WF der *spiked* MCF 7-Zellen nach dem Zweistufendichtegradienten betrug durchschnittlich 41%.

Die zahlreichen *spiking*-Versuche zeigten auch, dass sich die epithelialen Tumorzellen mit einer großen Wahrscheinlichkeit in der Monozytenphase befanden (Abb. 1 und 8). So

wurden durchschnittlich 58 % der *spiked* SKOV 3-Zellen in der Monozytenphase wiedergefunden (Abb. 8). Die durchschnittliche WF der MCF 7-Zellen in der Monozytenphase lag bei 76 % (Abb. 9). Das lässt auf eine relativ zuverlässige Tumorzellverteilung in der Monozytenphase schließen. Somit zeigte sich, dass diese Dichtegradientenzentrifugation eine geeignete Methode zur Anreicherung von CTCs aus Blutproben darstellt.

Der Unterschied in der WF von SKOV 3-Zellen und MCF 7-Zellen war statistisch nicht signifikant (Abb. 6),  $p=0.90$ .

Neben den *spiking*-Versuchen habe ich 38 Blutproben von 37 Patientinnen mit histologisch gesichertem Rezidiv eines Mamma- und Ovarialkarzinoms untersucht. Es wurde jedoch nur eine Probe allein durch die Dichtezentrifugation aufgearbeitet. Die Patientin befand sich bereits in einem weit fortgeschrittenen Erkrankungsstadium des Mammakarzinoms mit Fernmetastasen. Hier wurde eine verdächtige CK(+)-Zelle detektiert (Abb. 19).

Andere Arbeitsgruppen bevorzugen die Dichtezentrifugation mit Ficoll™, die eine Dichte von 1,077 g/ml hat, um CTCs und DTCs anzureichern (Mehrishi *et al.*, 2013). Diese Methode basiert auf der Grundlage, dass die Dichte der sogenannten Ficoll™-Lösung höher ist als die Dichte von Monozyten und Lymphozyten, aber niedriger als die von Erythrozyten und Granulozyten. Nach der Zentrifugation erscheint eine lymphozytenreiche Schicht über der Ficoll™-Schicht, während sich andere Blutzellen unten im Pellet befinden. In der Lymphozytenschicht können sich außerdem noch Monozyten und einige Granulozyten (15-35%) befinden. Die gesamte Bande über der Ficoll™-Lösung wird entnommen. So sind im Vergleich zum Gradienten mit *Nycodenz*<sup>R</sup> zehn mal mehr Leukozyten im Präparat zu finden, da beim *Nycodenz*<sup>R</sup>-Gradienten nur die Monozyten-Bande unter dem thrombozytenreichen Plasma entnommen und weiter aufgearbeitet wird (Griwatz *et al.*, 1995).

Bei dem optimierten MACS™-Protokoll mit den *rat anti-mouse IgG1 MicroBeads* diente EpCAM als Detektionsmarker. Die Wiederfindungsrate lag bei den *spiked* MCF 7-Zellen durchschnittlich bei 76 % (Median 91 %). Die *spiked* TZ waren auch mit einer großen Wahrscheinlichkeit in der Positivfraktion zu finden (durchschnittliche WF 99%) (Abb. 11).

Mit dem optimierten MACS™-Verfahren ergaben sich folgende Detektionsraten CK(+)-Zellen nach Aufarbeitung der Patientenproben: Die relative Häufigkeit der Detektion von CTCs bei einem Rezidiv des Mammakarzinoms lag in meiner Arbeit bei 14 %, im Falle des Ovarialkarzinomrezidivs bei 10 %.

Es gibt Studien zur Tumorzellanreicherung mit EpCAM, die die magnetischen *Beads* direkt auf die nativen Knochenmarks- und Blutproben geben, ohne vorher die Monozytenphase zu isolieren (Choemmel *et al.*, 2004; Raynor *et al.*, 2004; Woelfle *et al.*, 2005). So zeigte die Arbeit von Woelfle, dass die Detektionsrate bei direkter Kopplung und immunomagnetischer Separation bei 35 % lag. Wenn vor der magnetischen Isolierung ein Dichtegradient mit

Ficoll™ durchgeführt wurde lag die Detektionsrate bei 21 %, was auf einen möglichen Tumorzellverlust hindeutet.

Die Wiederfindungsraten der *spiked* MCF 7-Zellen unter Verwendung des *CellSearch*™-Systems und des *Profile Kits* betragen durchschnittlich 3%.

Bei den Patientenproben verhielt es sich jedoch anders. Die relative Häufigkeit für CK(+)-Zellen im Falle des Mammakarzinomrezidivs betrug nach Durchführung des Dichtegradienten und anschließender Bearbeitung der Proben im *CellSearch*™ 57%. Im Falle des Ovarialkarzinomrezidivs wurden mit einer relativen Häufigkeit von 14 % CK(+)-Zellen detektiert.

Die Markierung und damit die WF der *spiked* TZ bei Verwendung des Antikörpercocktails mit dem anti-Zytokeratin Antikörper A45-B/B3-Cy 3, Alexa-Fluor<sup>R</sup> 488 *anti-human* CD45, dem monoklonalen Maus IgG1 anti-Zytokeratin Antikörper CK 5/8 und Alexa-Fluor<sup>R</sup> 594 Streptavidin lag durchschnittlich bei 68 %.

Die Angaben der Detektionsraten bezüglich CTCs bei Mamma- und Ovarialkarzinom in der Literatur variieren zwischen 7 und 100 %. Die große Breite der Ergebnisse ist den unterschiedlichen Methoden und verschiedener Patientenkollektive zuzuschreiben, sodass die Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden können und dürfen.

Es gibt zahlreiche Publikationen über CTCs beim Mammakarzinom. Einige Arbeiten sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Die Arbeitsgruppe um Wallwiener untersuchte Blutproben von insgesamt 468 Patientinnen mit einem Rezidiv des Mammakarzinoms unter Verwendung des *CellSearch*™-Systems. Das Blut wurde vor Beginn einer *new line* Therapie abgenommen und als positiver CTC-Status eine CTC-Zahl von  $\geq 5$  CTCs / 7,5 ml Blut festgelegt. In 205 Fällen (42 %) wurden CTCs detektiert. Gleichzeitig konnte bewiesen werden, dass CTCs einen unabhängigen prognostischen Faktor für kürzeres progressionsfreies Überleben und das durchschnittliche Gesamtüberleben darstellen (Wallwiener *et al.*, 2012).

Liu *et al.* arbeiteten auch mit dem *CellSearch*™-System. Ein Blutvolumen von 7,5 ml von insgesamt 60 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurde aufgearbeitet. In 27 Fällen (45 %) konnten CTCs nachgewiesen werden. Parallel konnte gezeigt werden, dass die Patienten mit positivem CTC-Status eine insgesamt kürzere progressionsfreie Überlebenszeit boten (2,5 versus 7,5 Monate,  $p=0.0125$ ) (Liu *et al.*, 2013). Außerdem zeigte Liu mit Hilfe der Immunhistochemie, dass in 14 der 27 Fälle (52 %) die CTCs negativ für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu waren. Dabei war jedoch der Tumor selbst

als HER2/neu-positiv eingestuft. Eine Therapie mit dem humanisierten Antikörper (Trastuzumab) verbesserte das mediane progressionsfreie Überleben somit nicht relevant (2,5 versus 0,9 Monate,  $p=0.499$ ). Bei positivem HER2/neu-Status verlängerte sich das progressionsfreie Überleben bei Gabe einer anti-HER2-Therapie signifikant.

Die Arbeitsgruppe um Serrano zeigte eine CTC-Detektionsrate von 71 % (17/24). Den Patientinnen, die sich in einem nichtmetastasierten Zustand befanden, wurde vor und nach neoadjuvanter Therapie ein Blutvolumen von 10 ml entnommen. Immunomagnetisch wurden die CK-positiven Zellen isoliert. Die Visualisierung erfolgte mittels ICC (Serrano *et al.*, 2012). Eine Korrelation zwischen positivem CTC-Status, dem Lymphknotenstatus, dem histologischen Typ, dem Tumorstadium und dem Gesamtüberleben konnte nicht gezeigt werden. Nach erfolgter neoadjuvanter Therapie wurden in 13 Fällen CTCs detektiert. Ein Zusammenhang zwischen CTC-positivem Status vor und nach Neoadjuvanz und dem Gesamtüberleben schien statistisch signifikant zu sein.

Tokudome *et al.* analysierten das Blut von 28 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Wie bei Wallwiener *et al.* wurde als CTC-positiver Status eine Zahl von  $\geq 5$  CTCs / 7,5 ml Blut festgesetzt. Mit dem *CellSearch*<sup>TM</sup>-System wurden vor, während und nach systemischer Therapie die CTCs isoliert. Vor begonnener Therapie wurden in 9 Fällen (32 %) CTCs gefunden. Nach abgeschlossener Therapie konnten in 5 Fällen (22 %) CTCs detektiert werden. Ein positiver CTC-Status vor der Therapie zeigte keinen Zusammenhang zum Gesamtüberleben. Nach abgeschlossener Therapie war jedoch eine Korrelation zwischen CTC-positivem Status und dem durchschnittlichen Gesamtüberleben zu erkennen ( $p < 0.001$ ) (Tokudome *et al.*, 2011).

In der Veröffentlichung von van Dalum *et al.* wird eine CTC-Detektionsrate bei neu diagnostiziertem Mammakarzinom von 19 % angegeben (75/403). Ein Blutvolumen von 30 ml wurde vor chirurgischer Therapie abgenommen und mit dem *CellSearch*<sup>TM</sup>-Verfahren aufgearbeitet (van Dalum *et al.*, 2014).

Lu *et al.* detektierten in 28 von 54 Fällen (52 %) CTCs. Die Blutproben stammten von Patientinnen mit einem Malignom der Brust im Tumorstadium I-III (Lu *et al.*, 2010). Zur Zellseparation wurde ein *collagen adhesion matrix* (CAM) assay verwendet. Eine CTC-Zahl von 61 pro 1 ml Blut konnte gezählt werden. Lu *et al.* konnten hier auch eine Korrelation zwischen der Frequenz der CTCs im frühen Tumorstadium und den übrigen Prognosefaktoren wie Lymphknotenstatus und dem Gesamtüberleben belegen.

Tabelle 5: Überblick über einige Arbeiten zum Nachweis von CTCs beim Mammakarzinom. (CK: Zytokeratin, ICC: Immunzytochemie)

Literatur	Methode	Patientenzahl	Detektionsrate	Analysiertes Volumen
<b>Kahn et al., 2004</b>	Filtration ICC	131	Metastasierter Zustand: 36/51 (71%) LK-positiv: 17/36 (47%) LK-negativ: 17/44 (39%)	5 ml
<b>Cristofanilli et al., 2005</b>	Immunomagnetische Separation	83	52 % (43/83)	7,5 ml
<b>Cristofanilli et al., 2007</b>	CellSearch™	151	44 % (66/151)	7,5 ml
<b>Dawood et al., 2008</b>	CellSearch™	185	62 % (114/185) bei < 5 CTCs  38 % (71/185) bei > 5 CTCs	7,5 ml
<b>Lu et al., 2010</b>	collagen adhesion matrix (CAM) assay	54	52 % (28/54)	1 ml
<b>Tokudome et al., 2011</b>	CellSearch™	28	32 % (9/28)	7,5 ml
<b>Serrano et al., 2012</b>	ICC	24	71 % (17/24)	10 ml
<b>Franken et al., 2012</b>	CellSearch™	404	19 % (79/404)	30 ml
<b>Wallwiener et al., 2013</b>	CellSearch™	468	42 % (205/468)	7,5 ml
<b>Lui et al., 2013</b>	CellSearch™	60	45 % (27/60)	7,5 ml
<b>Schindlbeck et al., 2013</b>	CellSearch™	202	20 % (41/202)	7,5 ml
<b>van Dalum et al., 2014</b>	CellSearch™	403	19% (75/403)	30 ml
<b>Rack et al., 2014</b>	CellSearch™	2026 (vor adjuvanter Therapie)  1492 (nach adjuvanter Therapie)	22 % (435/2026)  22 % (299/1492)	30 ml
<b>Bidard et al., 2014</b>	CellSearch™	1944	47 % (911/1944)	7,5 ml

Zurzeit gibt es noch nicht viele Daten über CTCs beim Ovarialkarzinom.

Die Arbeitsgruppe um Judson detektierte CTCs in 19 % der 64 untersuchten Blutproben von Ovarialkarzinompatientinnen (Judson *et al.*, 2003). Als Marker diente ein anti-Zytokeratin und anti-EGFR.

Marth *et al.* wiesen eine Detektionsrate von 12 % auf. Insgesamt wurden 90 Blutproben analysiert. Hier diente EpCAM als Detektionsmarker (Marth *et al.*, 2002).

Wimberger *et al.* reicherten CTCs mittels *LymphoPrep*<sup>TM</sup> an und detektierten diese durch einen anti-Zytokeratin Antikörper (A45-BB-3, CK 7/18) (Wimberger *et al.*, 2007). So konnten in dieser Arbeit in 21 % von 57 vor Chemotherapie entnommenen Blutproben sowie in 7 % von 45 nach Chemotherapie entnommenen Blutproben CTCs detektiert werden.

Poveda *et al.* detektierten in ca. 14 % der Blutproben CTCs. In Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Ovarialkarzinoms wurden in 16 % CTCs gefunden. Insgesamt analysierten Poveda *et al.* 216 Blutproben. Ein Blutvolumen von 10 ml wurde mit dem *CellSearch*<sup>TM</sup> aufgearbeitet und die Detektion mittels EpCAM und anti-Zytokeratin Antikörper gewährleistet. Wie in meiner Arbeit wurden die Proben mit CD45 markiert (Poveda *et al.*, 2011). Die Wiederfindungsrate dieser Arbeit entspricht meinen Ergebnissen.

Höhere Detektionsraten konnten Fan *et al.* und Ntouroupi *et al.* nachweisen. Ntouroupi konnte in einem Blutvolumen von 4-14 ml (nach Biopsie und vor Operation entnommen) in 100 % CTCs detektieren (4/4). Verwendet wurde ebenfalls ein anti-EpCAM Antikörper und ein anti-Zytokeratin Antikörper (CK 7/8) (Ntouroupi *et al.*, 2008).

Die Arbeitsgruppe um Fan erreichte durch Einsatz von Invasionsassy, EpCAM, ESA und einem Pan-anti-Zytokeratin Antikörper eine Detektionsrate von 61 %. Vor der Operation wurde den Patientinnen ein Blutvolumen von 5-20 ml abgenommen. In 43 von 71 Blutproben konnten CTCs nachgewiesen werden (Fan *et al.*, 2009).

### **6.3 Der Nachweis von Tumorzellen epithelialen Ursprungs im peripheren Blut bei Ovarial- und Mammakarzinom**

Obwohl Metastasen der hauptsächliche Grund für tumorbedingten Tod sind, ist immer noch nicht geklärt, warum einige Patienten nach kompletter Resektion des Tumors Metastasen entwickeln. So geht man heute davon aus, dass die Disseminierung von CTCs schon stattfindet, wenn der Tumor klinisch noch okkult ist (Eyles *et al.*, 2010). So fanden Franken *et al.* in 19 % der Blutproben von Patientinnen mit einem ductalen Carzinoma in situ (DCIS) CTCs (Franken *et al.*, 2012).

Die Bedeutung dieser Zellen ist noch nicht ganz geklärt, wobei die Rolle der DTCs im Knochenmark schon Gegenstand mehrerer Forschungen darstellte und viele Diskussionen entfachte.

Banys beschrieb, dass er keinen Zusammenhang zwischen Vorhandensein von CK(+)-Zellen im KM beim primären Ovarialkarzinom und anderen prognostischen Faktoren eruieren konnte. Jedoch sei die krankheitsfreie Überlebenszeit kürzer als bei Patientinnen mit CK(-)-KM-Status (Banys *et al.*, 2009). Dies beschrieb auch Fehm, nachdem sie das KM von 69 Patientinnen mit einem primären Ovarialkarzinom untersuchte. In 25 Fällen (36 %) konnte sie CK(+)-Zellen detektieren und fand eine Korrelation zwischen Vorhandensein von CK(+)-Zellen und der krankheitsfreien Überlebenszeit. Zudem sah sie eine Korrelation zu dem FIGO-Stadium. Einen Zusammenhang zwischen CK(+)-Zellen im KM und dem Lymphknoten- und Hormonstatus konnte sie jedoch nicht feststellen (Fehm *et al.*, 2006). Diese Aussage wird auch durch andere Studien unterstützt (Gabriel *et al.*, 2000, Braun *et al.*, 2001, Wimberger *et al.*, 2010). Marth *et al.* beschrieben das Vorhandensein von CK(+)-Zellen im KM jedoch als einen eigenen, unabhängigen Prognosefaktor ohne Korrelation zum weiteren Krankheitsprozess (Marth *et al.*, 2002).

Es gibt noch sehr wenige Daten zu zirkulieren Tumorzellen im Blut beim Ovarialkarzinom. Neuste Studien wollen eine tumorstadiumabhängige Detektion von CTCs beweisen (Fan *et al.*, 2009). Darüber hinaus fand diese Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen CTCs, der krankheitsfreien Überlebenszeit und dem CA 125-Level. Eine Korrelation zum *Grading* und zur histologischen Beschaffenheit konnte nicht gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe um Judson detektierte in 12 von 64 Blutproben CTCs (19%). Dabei stammten die meisten CTCs von Patientinnen mit einem G III-Tumor. Ein Zusammenhang zwischen Vorhandensein von CTCs und Überlebenszeit konnte jedoch nach mehr als 18 Monaten nicht festgestellt werden (Judson *et al.*, 2003). So kann bislang eine prognostische Relevanz von CTCs noch nicht belegt werden.

Krishnamurthy untersuchte Blut und KM von Patientinnen in einem frühen Stadium des Mammakarzinoms und konnte keine Korrelation zwischen Vorhandensein von DTCs und CTCs mit anderen prognostischen Faktoren wie Tumorstadium, histologischem Differenzierungsgrad, Hormonstatus oder Lymphknotenstatus finden (Krishnamurthy *et al.*, 2010). Auch die Arbeitsgruppe um Riethdorf sah keine Korrelation zwischen positivem CTC-Status, Tumorstadium und *Grading*. Bei einer insgesamt niedrigen Detektionsrate konnte weiterhin kein Zusammenhang von CTC-positivem Status und dem Erfolg der Chemotherapie gezeigt werden (Riethdorf *et al.*, 2010).

Dagegen zeigen andere Studien, dass das Vorhandensein von CTCs einen eigenen unabhängigen Prognosefaktor darstellt. Hu schreibt in seiner Veröffentlichung, dass neben dem Vorhandensein von Metastasen und dem Alter der Patientin bei Erstdiagnose die

Anzahl der CTCs die drei wichtigen Prognosefaktoren seien (Hu *et al.*, 2010). Wallwiener zeigte in seiner großen prospektiven multizentrischen Studie, dass das Vorhandensein von CTCs im metastasierten Zustand einen eigenen, unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben darstellt (Wallwiener *et al.*, 2012). Auch die Arbeitsgruppe um van Dalum sah eine Korrelation zwischen CTC-positivem Status sowohl beim frühen Mammakarzinom als auch im metastasierten Zustand zum progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben (van Dalum *et al.*, 2014). Nolé *et al.* untersuchten Blutproben von 80 Patientinnen mit dem *CellSearch*<sup>TM</sup>-Verfahren. Vor, während und zwei Monate nach einer *second line* Therapie wurde den Patientinnen, die sich in einem fortgeschrittenen Mammakarzinomstadium befanden, Blut abgenommen und auf CTCs analysiert. Prognosebestimmend schien die Zahl der detektierten CTCs vor der systemischen Therapie zu sein (Nolé *et al.*, 2007). Zahlreiche weitere Studien wollen ebenfalls beweisen, dass das Vorhandensein von CTCs insgesamt mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Munzone *et al.*, 2010; Criscitiello *et al.*, 2010; Ferro *et al.*, 2010).

Man weiß heute, dass die biologische Eigenschaft des Tumors die Bereitschaft zur Streuung bestimmt, was neue adjuvante Therapiemethoden notwendig macht (Fehm *et al.*, 2009). Weiterhin wurde mittlerweile bestätigt, dass eine Diskonkordanz bei Primärtumoren der Brust und CTCs in Bezug auf die HER2/neu-Expression in ca. 11-52 % vorliegen kann (Munzone *et al.*, 2010; Punnoose *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2013).

Welche Zellen aus dem Primärtumor disseminiert sind, durch welche Einflüsse und zu welchem Zeitpunkt die Zellteilung wieder aufgenommen wird und eine Expansion stattfindet ist ebenso wenig geklärt wie die Frage, welche der Tumorzellen überhaupt fähig sind, Metastasen zu bilden. Die Phänotypisierung einzelner, disseminierter Tumorzellen mag hier einen Beitrag leisten, um diese Vorgänge besser zu verstehen. Auch können die Bemühungen, geeignetere adjuvante Therapien zu entwickeln, mit weiteren Informationen über mögliche Zielstrukturen weiter vorangebracht werden. Mit derselben Absicht wird inzwischen auch die molekulare Analyse disseminierter Tumorzellen angewendet (Møller *et al.*, 2013 Klein *et al.*, 2002).

## 6.4 Bewertung der Ergebnisse aus klinischer Sicht

In der vorliegenden Arbeit wurden neben zahlreichen *spiking*-Versuchen 38 Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv auf zirkulierende Tumorzellen mit dem Ziel untersucht, eine Bewertung der Methoden zur Anreicherung von CTCs durchzuführen.

Es wurden ein Zweistufengradient-, die manuelle Methode MACS<sup>TM</sup> und die semi-automatisierte Methode *CellSearch*<sup>TM</sup> verglichen. Bei der Aufarbeitung der Patientenproben

erbrachte die letztgenannte Methode die besten Detektionsraten. In 57 % der untersuchten Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Mammakarzinoms konnten CK(+)-Zellen detektiert werden. Neben einzelnen CK(+)-Zellen konnten nach der Aufarbeitung der Blutproben von Patientinnen mit einem Rezidiv des Ovarialkarzinoms auch ganze Zellkluster detektiert werden. Insgesamt wurden in 14 % der Fälle bei einem Rezidiv des Ovarialkarzinoms CK(+)-Zellen detektiert.

Ein allgemeiner Nachteil der in dieser Arbeit angewandten Methode, und auch anderer Anreicherungsmethoden, ist eine momentane unzureichende Standardisierung und methodische Validierung. Dieses Problem muss dringend gelöst werden. Darin sollten Richtlinien in Bezug zu Vorgaben der Qualitätskontrollen, Kriterien zur technischen Untersuchungsdurchführung sowie Raten zu falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen für klinisch anwendbare Untersuchungen enthalten sein, um einen Vergleich zwischen verschiedenen Methoden überhaupt zu ermöglichen.

Ein weiterer Nachteil ist der zeitliche Aufwand beim Durchmustern der Objektträger mit AK-markierten Zellen am Fluoreszenzmikroskop. Ebenso ist darauf hinzuweisen, dass bei fluoreszenzmarkierten Präparaten ein Archivieren des Materials wegen der nachlassenden Fluoreszenz nicht möglich ist. Spätere Überprüfungen können nur anhand der auf Datenträger gespeicherten Bilder stattfinden.

Zurzeit sind mehrere Methoden zur Detektion von CTCs in der Evaluation, mitunter immunozytologische Verfahren oder die Detektion auf molekularer Ebene.

Eine klinische Bewertung und eine Aussage zum Ausblick sind schwierig. Neben der Tatsache, dass eine prognostische Relevanz noch nicht belegt werden kann, muss ein geeignetes Verfahren zunächst eine hohe Sensitivität aufweisen, sodass jede einzelne CTC erfasst wird. Außerdem muss die Methode spezifisch sein damit keine falsch positiven Ergebnisse liefern. Der Detektionsmarker sollte weiterhin ausschließlich von den CTCs exprimiert werden (Gerges *et al.*, 2010). Dies ist wegen der phänotypischen Heterogenität der CTCs problematisch. Das Verfahren muss zudem verifizierbar und ökonomisch sein (Attard und de Bono, 2011).

Die Blutentnahme – das zirkulierende Blut ist durch Punktion ein leicht zugängliches System - ist ohne weiteres ambulant durchführbar, sodass sie unter Studienbedingungen auch im Rahmen der Tumornachsorge bzw. Therapie zum Einsatz kommen könnte. Knochenmarkpunktionen werden von Patientinnen weniger toleriert als Blutentnahmen, sodass es wahrscheinlich unausweichlich ist, die KM-Punktionen durch eine einfache Blutentnahme zu ersetzen. Schindlbeck *et al.* bewiesen in ihrer Studie, dass die Deckungsgleichheit der Detektionsraten von DTCs und CTCs statistisch signifikant seien (Schindlbeck *et al.*, 2013). Die Blutentnahme ist somit ein gutes Verfahren zur Überwachung während laufender systemischer Therapie. Außerdem zeigte Bidard in seiner Studie, dass

die Detektion von CTCs, aber nicht die von DTCs in Tumorstadium IV eine prognostische Relevanz darstellt (Bidard *et al.*, 2008). Eine Aussage über vorhandene CTCs im peripheren Blut vor, während und nach der Therapie könnte für oder gegen das Anschlagen der Therapie sprechen. Die Arbeitsgruppe um García-Sáenz beschrieb das Vorhandensein von CTCs vor neoadjuvanter Chemotherapie als Prädiktor für den Erfolg des Chemotherapeutikums (García-Sáenz *et al.*, 2009). Es wurden vor und nach neoadjuvanter Therapie Blutentnahmen bei 72 Patientinnen mit einem lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom durchgeführt und die Zahl der detektierten CTCs bestimmt.

Da sich das Expressionsniveau von Tumor zu Tumor und auch zwischen Primärtumor und den CTCs ständig zu ändern scheint, wird es schwierig, eine standardisierte Therapie für alle Patientinnen zu etablieren. So ist es trotz der aktuellen Schwierigkeiten notwendig, nicht nur die Detektion sondern auch die Charakterisierung in Bezug auf die Proteinexpression der disseminierten Tumorzellen zu untersuchen, da CTCs und DTCs die Angriffspunkte für neue biologische Tumortherapien darstellen.

## 7. Literaturverzeichnis

Abdul-Karim, F. W., Kida, M., Wentz, W. B., Carter, J. R., Sorensen, K., Macfee, M., Zika, J., Makley, J.T. (1990):

Bone metastasis from gynecologic carcinomas: A clinicopathologic study. *Gynecol. Oncol.*, 39 (2): 108-114

Ansquer, Y., Leblanc, E., Clough, K., Morice, P., Dauplat, J., Mathevet, P., Lhommé, C., Scherer, C., Tigaud, J. D., Benchaib, M., Fourme, E., Castaigne, D., Querleu, D., Dargent, D. (2001):

Neoadjuvant chemotherapy for unresectable ovarian carcinoma: A French multicenter study. *Cancer*, 91 (12): 2329-2334

Antolovic, D., Galindo, L., Carstens, A., Rahbari, N., Büchler, M.W., Weitz, J., Koch, M. (2010):

Heterogeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different EpCAM-specific antibodies. *BMC Biotechnol.* 28;10:35

Appel, T. E. (2005):

Chemotherapie des fortgeschrittenen nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms mit Paclitaxel (Taxol®) und Carboplatin (Carboplat®): Wöchentliche versus 3-wöchentliche Behandlung.

Zwischenauswertung einer randomisierten, prospektiven, multizentrischen Phase-III-Studie. *Med. Dissertation, Universität Halle- Wittenberg.* S.38.

Attard, G. und J. S. de Bono (2011):

"Utilizing circulating tumor cells: challenges and pitfalls." *Curr Opin Genet Dev* 21(1): 50-8.

Banys, M., Solomayer, E.F., Becker, S., Krawczyk, N., Gardanis, K., Staebler, A., Neubauer, H., Wallwiener, D., Fehm, T. (2009):

Disseminated tumor cells in bone marrow may affect prognosis of patients with gynecologic malignancies. *Int. J. Gynecol. Oncol.*, 19(5):948-52

Banys, M., Krawczyk, N., Becker, S., Jakubowska, J., Staebler, A., Wallwiener, D., Fehm, T., Rothmund, R. (2012):

The influence of removal of primary tumor on incidence and phenotype of circulating tumor cells in primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, Feb;132(1):121-9. doi: 10.1007/s10549-011-1569-0. Epub 2011 May 12.

Bidard F., Vincent-Salomon A., Sigal-Zafrani B., Diéras .V, Mathiot C., Mignot L., Thiery JP., Sastre-Garau X., Pierga JY. (2008):

Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol.* 2008 Mar; 19(3):496-500. doi: 10.1093/annonc/mdm507. Epub 2008 Jan. 10.

Bidard, F., Peeters, D.J., Fehm, T., Nolé, F., Gisbert-Criado, R., Mavroudis, D., Grisanti, S., Generali, D., Garcia-Saenz, J.A., Stebbing, J., Caldas, C., Gazzaniga, P., Manso, L., Zamarchi, R., de Lascoiti, A.F., De Mattos-Arruda, L., Ignatiadis, M., Lebofsky, R., van Laere, S.J., Meier-Stiegen, F., Sandri, M.T., Vidal-Martinez, J., Politaki, E., Consoli, F., Bottini, A., Diaz-Rubio, E., Krell, J., Dawson, S.J., Raimondi, C., Rutten, A., Janni, W., Munzone, E., Carañana, V., Agelaki, S., Almici, C., Dirix, L., Solomayer, E.F., Zorzino, L., Johannes, H., Reis-Filho, J.S., Pantel, K., Pierga, J.Y., Michiels, S. (2014):

Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2014 Apr;15(4):406-14. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70069-5. Epub 2014 Mar 11.

Braun, S., Pantel, K. (1998):

Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement. *Breast Cancer Res. Treat.*, 52 (1-3): 201-216

Braun, S., Schindlbeck, C., Hepp, F., Janni, W., Kantenich, C., Riethmüller, G., Pantel, K. (2001):

Occult tumor cells in bone marrow of patients with locoregionally restricted ovarian cancer predict early distant metastatic relapse. *J. Clin. Onco.* Vol. 19 (2): 368-375

Braun, S., Vogl, F.D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M.P., Coombes, R.C., Schlimok, G., Diel, I.J., Gerber, B., Gebauer, G., Pierga, J.Y., Marth, C., Oruzio, D., Wiedswang, G., Solomayer, E.F., Kundt, G., Strobl, B., Fehm, T., Wong, G.Y.C., Bliss, J., Vincent-Solomon, A., Pantel, K. (2006):

A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005 , 353:793-802

Brun, J.L., Feyler, A., Chêne, G., Saure, I.J., Brun, G., Hocké, C. (2000):

Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 78(1):21-7

Cain, J. M., Ellis, G. K., Collins, C., Greer, B. E., Tamimi, H. K., Figge, D. C., Gown, A. M., Livingston, R. B. (1990):

Bone marrow involvement in epithelial ovarian cancer by immunocytochemical assessment. *Gynecol. Oncol.*, 38 (3): 442-445

Choesmel, V., Anract, P., Høifødt, H., Thiery, J.P., Blin, N. (2004):

A relevant immunomagnetic assay to detect and characterize epithelial cell adhesion molecule-positive cells in bone marrow from patients with breast carcinoma: immunomagnetic purification of micrometastases. *Cancer*, 101(4):693-703

- Connor, J.P., Felder, M., Hank, J., Harter, J., Gan, J., Gillies, S.D., Sondel, P. (2004):  
Ex vivo evaluation of anti-EpCAM immunocytokine huKS-IL2 in ovarian cancer. *J. Immunother.*,  
27(3):211-9
- Cormio, G., Rossi, C., Cazzolla, A., Resta, L., Loverro, G., Greco, P., Selvaggi, L. (2003):  
Distant metastases in ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 13(2):125-9
- Criscitiello, C., Sotiriou, C., Ignatiadis, M. (2010):  
Circulating tumor cells and emerging blood biomarkers in breast cancer. *Curr. Opin. Oncol.*,22(6):552-8
- Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle,  
G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W., Hayes, D.F. (2004):  
Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J.  
Med.*, 19;351(8):781-91
- Cristofanilli, M., Hayes, D.F., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Matera,  
J., Allard, W.J., Miller, M.C., Fritsche, H.A., Hortobagyi, G.N., Terstappen, L.W. (2005):  
Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin  
Oncol.* 2005 Mar 1;23(7):1420-30
- Cristofanilli, M., Broglio, K.R., Guarneri, V., Jackson, S., Fritsche, H.A., Islam, R., Dawood, S.,  
Reuben, J.M., Kau, S.W., Lara, J.M., Krishnamurthy, S., Ueno, N.T., Hortobagyi, G.N., Valero, V.  
(2007):  
Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast  
Cancer.* *Clin. Breast Cancer* 2007 Feb;7(6):471-9
- Dauplat, J., Hacker, N. F., Nieberg, R. K., Berek, J. S., Rose, T. P., Sagae, S. (1987):  
Distant metastases in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer*, 60 (7): 1561-1566
- Davenport, E., Fancourt, M.W., Gilkison, W.T., Kyle, S.M., Mosquera, D.A.(2009):  
Sentinel lymph node biopsy experience in Taranaki: a prospective audit in a provincial New Zealand  
hospital. *N Z Med. J.*, 122(1289):45-56
- Dawood, S., Broglio, K., Valero, V., Reuben, J., Handy, B., Islam, R., Jackson, S., Hortobagyi, G.N.,  
Fritsche, H., Cristofanilli, M. (2008):  
Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the  
staging system? *Cancer.* 2008 Nov 1;113(9):2422-30. doi: 10.1002/cncr.23852

Dearnaley, D. P., Sloane, J. P., Ormerod, M. G., Steele, K., Coombes, R. C., Clink, H. M., Powles, T. J., Ford, H. T., Gazet, J. C., Neville, A. M. (1981):

Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br. J. Cancer*, 44 (1): 85-90

du Bois, A., A. Reuss, E. Pujade-Lauraine, P. Harter, I. Ray-Coquard, et al. (2009):

"Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO)." *Cancer* 115(6): 1234-44

De Giorgi, V., Pinzani, P., Salvianti, F., Panelos, J., Paglierani, M., Janowska, A., Grazzini, M., Wechsler, J., Orlando, C., Santucci, M., Lotti, T., Pazzagli, M., Massi, D. (2010):

Application of a Filtration- and Isolation-by-Size Technique for the Detection of Circulating Tumor Cells in Cutaneous Melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 10.1038/jid.2010.141

Denzel, S., Maetzel, D., Mack, B., Eggert, C., Bähr, G., Gires, O.(2009):

Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact.*BMC Cancer*, 19;9:402

Durrant, L.G. (1992):

A rapid method for separating tumour infiltrating cells and tumour cells from colorectal tumours. *J. Immunol. Methods*, 147; 57-64

Effenberger, K.E., Borgen, E., Eulenburg, C.Z., Bartkowiak, K., Grosser, A., Synnestvedt, M., Kaaresen, R., Brandt, B., Nesland, J.M., Pantel, K., Naume, B. (2010):

Detection and clinical relevance of early disseminated breast cancer cells depend on their cytokeratin expression pattern.*Breast Cancer Res Treat.* May 2010

Eyles, J., Puaux, A.L., Wang, X., Toh, B., Prakash, C., Hong, M., Tan, T.G., Zheng, L., Ong, L.C., Jin, Y., Kato, M., Prévost-Blondel, A., Chow, P., Yang, H., Abastado, J.P. (2010):

Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma.*J. Clin. Invest.*,1;120(6):2030-9

Fan, T., Zhao, Q., Chen, J.J., Chen, W.T., Pearl, M.L. (2009):

Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer.*Gynecol. Oncol.*,112(1):185-91

Fehm, T., Becker, S., Bachmann, C., Beck, V., Gebauer, G., Banyas, M., Wallwiener, D., Solomayer, E.F. (2006):

Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynekol Oncol.*, 103(3):942-7

Fehm, T., Hoffmann, O., Aktas, B., Becker, S., Solomayer, E.F., Wallwiener, D., Kimmig, R., Kasimir-Bauer, S. (2009):

Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res.*, 11(4):R59

Ferro, P., Franceschini, M.C., Bacigalupo, B., Dessanti, P., Falco, E., Fontana, V., Gianquinto, D., Pistillo, M.P., Fedeli, F., Roncella, S. (2010):

Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors. *Anticancer Res.*, 30(6):2377-82

Franken, B., de Groot, M.R., Mastboom, W.J., Vermes, I., van der Palen, J., Tibbe, A.G., Terstappen, L.W. (2012): Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012 Oct. 22;14(5): R133. doi: 10.1186/bcr3333

Frogne, T., Laenkholm, A.V., Lyng, M.B., Henriksen, K.L., Lykkesfeldt, A.E. (2009):

Determination of HER2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors. *Breast Cancer Res.*, 11(1):R11

Gabriel, M., Obrebowska, A., Spaczynski, M. (2000):

Nachweis von Epithelzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen unter Anwendung von immunhistochemischen Methoden. *Gynäkol. Geburtshilfliche Rundsch.*, 40 (3-4): 140-144

García-Sáenz, J.A., Martín, M., Maestro, M.L., Vidaurreta, M., VEGANZONES, S., Rafael, S., Casado, A., Bobokova, J., Sastre, J., De la Orden, V., Arroyo, M., Díaz-Rubio, E. (2009):

Circulating tumour cells in locally advanced breast cancer. *Clin. Transl. Oncol.* Aug; 11(8):544-7

Gerges, N., J. Rak and N. Jabado (2010):

New technologies for the detection of circulating tumour cells. *BrMed Bull* 94: 49-64

Griwatz, C., Brandt, B., Assmann, G., Zänker, K.S. (1995):

An immunological enrichment method for epithelial cells from peripheral blood. *J. of immunological Methods.* 183: 251-265

Gross, H.J., Verwer, B., Houck, D. & Recktenwald, D. (1993):

Detection of rare cells at a frequency of one per million by flow cytometry. *Cytometry*, 14:519

- Guo, J., Yao, F., Lou, Y., Xu, C., Xiao, B., Zhou, W., Chen, J., Hu, Y., Liu, Z. (2007):  
Detecting carcinoma cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma by immunomagnetic beads and rt-PCR. *J. Clin. Gastroenterol.*, 41(8):783-8
- He, W., Kularatne, S.A., Kalli, K.R., Prendergast, F.G., Amato, R.J., Klee, G.G., Hartmann, L.C., Low, P.S. (2008):  
Quantitation of circulating tumor cells in blood samples from ovarian and prostate cancer patients using tumor-specific fluorescent ligands. *Int. J. Cancer*, 123(8):1968-73
- Holschneider, C.H., Berek, J.S. (2000):  
Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg. Oncol.*, 19(1):3-10
- Hu, Y., Fan, L., Zheng, J., Cui, R., Liu, W., Li, X., He, Y., Huang, S. (2010):  
Detection of circulating tumor cells in breast cancer patients utilizing multiparameter flow cytometry and assessment of the prognosis of patients in different CTCs levels. *Cytometry Part A*, 2010;77A:213–219
- Hu, L., Mc Arthur, C., Jaffe, R.B. (2010):  
Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumourigenic and chemoresistant. *Br. J. Cancer*, 102(8):1276-83
- Janni, W., Hepp, F., Rjosk, D., Kentenich, C., Strobl, B., Schindlbeck, C., Hantschmann, P., Sommer, H., Pantel, K., Braun, S. (2001):  
The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer*, 92 (1):46-53
- Jiang, Z.F., Cristofanilli, M., Shao, Z.M., Tong, Z.S., Song, E.W., Wang, X.J., Liao, N., Hu, X.C., Liu, Y., Wang, Y., Zeng, L., Zhang, M. (2013):  
Circulating tumor cells predict progression-free and overall survival in Chinese patients with metastatic breast cancer, HER2-positive or triple-negative (CBCSG004): a multicenter, double-blind, prospective trial. *Ann Oncol.* 2013 Nov;24(11):2766-72. doi: 10.1093/annonc/mdt246. Epub 2013 Jul 14.
- Judson, P.L., Geller, M.A., Bliss, R.L., Boente, M.P., Downs, L.S. Jr., Argenta, P.A., Carson, L.F. (2003):  
Preoperative detection of peripherally circulating cancer cells and its prognostic significance in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 91(2):389-94
- Kahn, H.J., Presta, A., Yang, L.Y., Blondal, J., Trudeau, M., Lickley, L., Holloway, C., McCready, D.R., Maclean, D., Marks, A. (2004):  
Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage. *Breast Cancer Res. Treat.* Aug;86(3):237-47

Kasimir-Bauer, S. (2009): Circulating tumor cells as markers for cancer risk assessment and treatment monitoring. *Mol. Diagn. Ther.*, 13(4):209-15

Kasper, M., Stosiek, P., Typlt, H., Karsten, U. (1987):  
Histological evaluation of three new monoclonal anti-cytokeratin antibodies. 1. Normal tissues. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23 (2): 137-147

Ke Lan, Subhash, C. V., Masanao, M., Bharat, B., Robertson, V. S. (2007):  
Isolation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). *Current Protocols in Microbiology*, 10.1002/9780471729259

Kidd, S.A., Keto, J.L., Tran, H., Fitzgerald, T.L. (2009):  
First three sentinel lymph nodes accurately stage the axilla in breast cancer. *Am Surg.*, 75(3):253-6

Kiechle, M. (2007), *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 1. Auflage, Urban und Fischer, Elsevier- Verlag, München, Deutschland, S. 545

Klein, C., Blankenstein, T. J. F., Schmidt- Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N. H., Riethmuller, G. (2002):  
Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *The Lancet*, Vol. 360, No. 9334, S. 638-389

Königsberg, R., Gneist, M., Jahn-Kuch, D., Pfeiler, G., Hager, G., Hudec, M., Dittrich, C., Zeillinger, R. (2010):  
Circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer: efficacy and feasibility of different enrichment methods. *Cancer Lett.*, 293(1):117-23

Krishnamurthy, S., Cristofanilli, M., Singh, B., Reuben, J., Gao, H., Cohen, E.N., Andreopoulou, E., Hall, C.S., Lodhi, A., Jackson, S., Lucci, A. (2010):  
Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. *Cancer*, 2010 May 5.

Kuhn, W., Rutke, S., Späthe, K., Schmalfeldt, B., Florack, G., von Hundelshausen, B., Pachyn, D., Ulm, K., Graeff, H. (2001):  
Neoadjuvant chemotherapy followed by tumor debulking prolongs survival for patients with poor prognosis in International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage IIIC ovarian carcinoma. *Cancer*, 92 (10): 2585-2591

Kvalheim, G. (1998):  
Diagnosis of minimal residual disease in bone marrow and blood in cancer patients. *Acta Oncologica* Vol. 37 (5) pp. 455-462

Liu, Y., Liu, Q., Wang, T., Bian, L., Zhang, S., Hu, H., Li, S., Hu, Z., Wu, S., Liu, B., Jiang, Z. (2013): Circulating tumor cells in HER2-positive metastatic breast cancer patients: a valuable prognostic and predictive biomarker. *BMC Cancer*, 2013 Apr. 23; 13: 202. doi: 10.1186/1471-2407-13-202

Lu, J., Fan, T., Zhao, Q., Zeng, W., Zaslavsky, E., Chen, J.J., Frohman, M.A., Golightly, M.G., Madajewicz, S., Chen, W.T. (2010): Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. *Int. J. Cancer*. 2010 Feb 1; 126(3):669-83. doi: 10.1002/ijc.24814

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., Krepler, R. (1982): The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31 (1): 11-24

Makar, A. P., Baekelandt, M., Tropé, C. G., Kristensen, G. B. (1995): The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 56 (2): 175-180

Marth, C., Kisic, J., Kaern, J., Trope, C., Fodstad, O. (2002): Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis. *Cancer*, 94 (3): 707-712

Mehrishi, J.N., Baracs, T. (2013): A novel method of CD34+ cell separation from umbilical cord blood. *Transfusion*, Feb., 2013 doi: 10.1111/trf.12123.

Miltenyi Biotec GmbH, Homepage: [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)

Mostert, B., Kraan, J., Bolt-de Vries, J., van der Spoel, P., Sieuwerts, A.M., Schutte, M., Timmermans, A.M., Foekens, R., Martens, J.W., Gratama, J.W., Foekens, J.A., Sleijfer, S. (2010): Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146. *Breast Cancer Res Treat.*, April 2010

Møller, Kumar, Voet, Peterson, Van Loo, Mathiesen, Fjellidal, Grundstad, Borgen, Baumbusch, Naume, Børresen-Dale, White, Nord, Kristensen (2013): Next-generation sequencing of disseminated tumor cells. *Front oncol.* 3:320. doi: 10.3389/fonc.2013.00320

Müller, V., Stahmann, N., Riethdorf, S, Rau, T., Zabel, T., Goetz, A., Jänicke, F., Pantel, K. (2005): Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin. Cancer Res.*, 15;11(10):3678-85

Munzone, E., Nolé, F., Goldhirsch, A., Botteri, E., Esposito, A., Zorzino, L., Curigliano, G., Minchella, I., Adamoli, L., Cassatella, M.C., Casadio, C., Sandri, M.T. (2010):

Changes of HER2 status in circulating tumor cells compared with the primary tumor during treatment for advanced breast cancer. *Clin. Breast Cancer*, 10(5): 392

Ness, R.B., Albano, J.D., McTiernan, A., Cauley, J.A. (2009):

Influence of estrogen plus testosterone supplementation on breast cancer. *Arch Intern Med.*, 169(1):41-6

Nischwitz, M. (2007): Nachweis disseminierter Tumorzellen operabler gastrointestinaler Tumoren mittels quantitativer RT-PCR von Melanom Antigen (MAGE)-A-Transkripten. Med. Dissertation, Universität München

Noack, F., Schmitt, M., Bauer, J., Helmecke, D., Krüger, W., Thorban, S., Sandherr, M., Kuhn, W., Graeff, H., Harbeck, N. (2000):

A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: Methodological advances and clinical implications. *Int. J. Biol. Markers*, 15 (1): 100-104

Nolé, F., Munzone, E., Zorzino, L., Minchella, I., Salvatici, M., Botteri, E., Medici, M., Verri, E., Adamoli, L., Rotmensz, N., Goldhirsch, A., Sandri, M.T. (2008):

Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann. Oncol.*, 2008 May; 19(5):891-7. Epub 2007 Dec. 4.

Ntouroupi, T.G., Ashraf, S.Q., Mc Gregor, S.B., Turney, B.W., Seppo, A., Kim, Y., Wang, X., Kilpatrick, M.W., Tsiouras, P., Tafas, T., Bodmer, W.F. (2008):

Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope. *Br. J. Cancer*, 99(5):789-95

Osta, W.A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y.A., Cole, D.J., Gillanders, W.E. (2004):

EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.*, 15;64(16):5818-24

Ozols, R.F. (2003):

Maintenance therapy in advanced ovarian cancer: progression-free survival and clinical benefit. *J. Clin. Oncol.*, 21(13):2451-3

Paine, R., Ben-Ze-ev, A., Farmer, S.R., Brody JS. (Oct. 1988):

The pattern of cytokeratin synthesis is a marker of type 2 cell differentiation in adult and maturing fetal lung alveolar cells. *Dev. Biol.*, 129 (2): 505-15

Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S., Kutter, D., Lindemann, F., Schaller, G., Funke, I., Izbicki, J. R., Riethmüller, G. (1993):

Differential expression of proliferation- associated molecules in individual micrometastasis carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85 (17): 1419-1424

Pantel, K., von Knebel, D. M., Izbicki, J. R., Riethmüller, G. (1997):

Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien. *Chirurg*, 68 (12): 1241-1250

Pantel, K., Cote, R. J., Fodstad, O. (1999):

Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91 (13): 1113-1124

Pantel, K., Woelfle, U. (2005):

Detection and molecular charakterisation of disseminated tumour cells: Implications for anti- cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1756; 53-64

Paterlini-Brechot, P. and N. L. Benali (2007):

"Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions." *Cancer Lett* 253(2): 180-204

Poveda, A., S. B. Kaye, R. McCormack, S. Wang, T. Parekh (2011):

"Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer." *Gynecol Oncol* 122(3): 567-72

Punnoose, E.A., Atwal, S.K., Spoerke, J.M., Savage, H., Pandita, A., Yeh, R.F., Pirzkall, A., Fine, B.M., Amler, L.C., Chen, D.S., Lackner, M.R. (2010):

Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *Plos. One.*, 5(9):e12517

Rack, B., Schindlbeck, C., Jüeckstock, J., Andergassen, U., Hepp, P., Zwingers, T., Friedl, T., Lorenz, R., Tesch, H., Fasching, P. A., Fehm, T., Schneeweiss, A., Lichtenegger, W., Beckmann, M. W., Friese, K., Pantel, K., Janni, W. (2014):

Circulating Tumor Cells Predict Survival in Early Average-to-High Risk Breast Cancer Patients. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2014) 106 (5): dju108 doi:10.1093

Raynor, M., Stephenson, S.A., Walsh, D.C., Pittman, K.B., Dobrovic, A. (2004):

Optimisation of the RT-PCR detection of immunomagnetically enriched carcinoma cells. *BMC Cancer*, 2:14

Redding, W. H., Coombes, R. C., Monaghan, P., Clink, H. M., Imrie, S. F., Dearnaley, D. P., Ormerod, M. G., Sloane, J. P., Gazet, J. C., Powles, T. J. (1983):

Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet*, 2 (8362): 1271-1274

Riethdorf, S., Fritsche, H., Müller, V., Rau, T., Schindlbeck, C., Rack, B., Janni, W., Coith, C., Beck, K., Jänicke, F., Jackson, S., Gornet, T., Cristofanilli, M., Pantel, K. (2007):

Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin. Cancer Res.*, 13(3):920-8

Riethdorf, S., Müller, V., Zhang, L., Rau, T., Loibl, S., Komor, M., Roller, M., Huober, J., Fehm, T., Schrader, I., Hilfrich, J., Holms, F., Tesch, H., Eidtmann, H., Untch, M., von Minckwitz, G., Pantel, K. (2010):

Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin. Cancer Res.*, 16(9):2634-45

Riethdorf, S. and K. Pantel (2010):

"Advancing personalized cancer therapy by detection and characterization of circulating carcinoma cells." *Ann N Y Acad Sci* 1210: 66-77

RKI (2008): Deutsches Krebsregister der Universität Erlangen. <http://www.ekr.med.uni-erlangen.de>

Röcken, M., (2010): Early tumor dissemination, but late metastasis: insights into tumor dormancy, 1. *Journal of Clinical Investigation*, 1;120 (6):1800-3

Roggel, F. (2005): Nachweis und Charakterisierung zytokeratin (CK)-positiver Zellen im Knochenmark von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. *Med. Dissertation, Universität München*. S. 11, 62, 63.

Rose, P. G., Piver, M. S., Tsukada, Y., Lau, T. S. (1989):

Metastatic patterns in histologic variants of ovarian cancer. An autopsy study. *Cancer*, 64 (7): 1508-1513

Ross, A. A., Miller, G. W., Moss, T. J., Kahn, D. G., Warner, N. E., Sweet, D. L., Louie, K. G., Schneidermann, E., Pecora, A. L., Meagher, R. C. (1995):

Immunocytochemical detection of tumor cells in bone marrow and peripheral blood stem cell collections from patients with ovarian cancer. *Bone Marrow Transplant.*, 15 (6): 929-933

Sapi, E., Okpokwasili, N.I., Rutherford, T. (2002):

Detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in ovarian cancer patients. *Cancer Detect Prev.*, 26(2):158-67

Sener, S.F., Winchester, D.J., Winchester, D.P., Du, H., Barrera, E., Bilimoria, M., Krantz, S., Rabbitt, S. (2009):

The effects of hormone replacement therapy on postmenopausal breast cancer biology and survival. *Am. J. Surg.*, 197(3):403-7

Serrano, M.J., Rovira, P.S., Martínez-Zubiaurre, I., Rodriguez, M.D., Fernández, M., Lorente, J.A. (2012): Dynamics of circulating tumor cells in early breast cancer under neoadjuvant therapy. *Exp. Ther. Med.* 2012 Jul;4(1):43-48. Epub 2012 Apr 5.

Schindlbeck, C., Andergassen, U., Hofmann, S., Jückstock, J., Jeschke, U., Sommer, H., Friese, K., Janni, W., Rack, B. (2013):  
Comparison of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and disseminated tumor cells in the bone marrow (DTC-BM) of breast cancer patients. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* Jun;139(6):1055-62. doi: 10.1007/s00432-013-1418-0. Epub 2013 Mar 23.

Schmidt, H., De Angelis, G., Bettendorf, O., Eltze, E., Semjonow, A., Knichwitz, G., Brandt, B. (2004): Frequent detection and immunophenotyping of prostate- derived cell clusters in the peripheral blood of prostate cancer patients. *Int. J. of Biological Markers*, Vol. 19 (2); 93-99

Sieuwerts, A.M., Kraan, J., Bolt-de Vries, J., van der Spoel, P., Mostert, B., Martens, J.W., Gratama, J.W., Sleijfer, S., Foekens, J.A. (2009):  
Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR. *Breast Cancer Res. Treat.*,118(3):455-68

Slade, M.J., Payne, R., Riethdorf, S., Ward, B., Zaidi, S.A., Stebbing, J., Palmieri, C., Sinnott, H.D., Kulinskaya, E., Pitfield, T., McCormack, R.T., Pantel, K., Coombes, R.C. (2009):  
Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. *Br. J. Cancer* 100(1):160-6

Somlo, G., Lau, S.K., Frankel, P., Hsieh, H.B., Liu, X., Yang, L., Krivacic, R., Bruce, R.H. (2011): Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage IV breast cancer, using a novel detection technology. *Breast Cancer Res. Treat.* Jul; 128(1):155-63. doi: 10.1007/s10549-011-1508-0. Epub 2011 Apr 16.

Sood, A.K., Sorosky, J.I., Dolan, M., Anderson, B., Buller, R.E. (1999):  
Distant metastases in ovarian cancer: association with p53 mutations. *Clin. Cancer Res.*, 5(9):2485-90

Spizzo, G., Went, P., Dirnhöfer, S., Obrist, P., Moch, H., Baeuerle, P.A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Gastl, G., Zeimet, A.G. (2006):  
Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 103(2):483-8

Stellwagen, J. (2009):  
Immunomagnetische Anreicherung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und Blut von Patientinnen mit Mammakarzinom. *Med. Dissertation, Universität München.* Ab S. 22.

Stimpfl, M., Schmid, B. C., Schiebel, I., Tong, D., Leodolter, S., Obermair, A., Zeillinger, R. (1999): Expression of mucins and cytokeratins in ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett.* 145; 133-141

Tokudome, N., Ito, Y., Takahashi, S., Kobayashi, K., Taira, S., Tsutsumi, C., Oto, M., Oba, M., Inoue, K., Kuwayama, A., Masumura, K., Nakayama, Y., Watanabe, C., Hatake, K. (2011): Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of heavily treated metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer.*, Jul;18(3):195-202. doi: 10.1007/s12282-011-0259-4. Epub 2011 Apr 5.

van Dalum, G., van der Stam, G.J., Tibbe, A.G., Franken, B., Mastboom, W.J., Vermes, I., de Groot, M.R., Terstappen, L.W. (2014):

Circulating tumor cells before and during follow-up after breast cancer surgery. *Int. J. Oncol.* 2015 Jan; 46(1):407-13. doi: 10.3892/ijo.2014.2694. Epub 2014 Oct 6.

Vinh-Hung, V., Burzykowski, T., Cserni, G., Voordeckers, M., Van DeSteene, J., Storme, G. (2003): Functional form of the effect of the numbers of axillary nodes on survival in early breast cancer. *Int. J. Oncol.*, 22(3):697-704

Vinh-Hung, V., Nguyen, N.P., Cserni, G., Truong, P., Woodward, W., Verkooijen, H.M., Promish, D., Ueno, N.T., Tai, P., Nieto, Y., Joseph, S., Janni, W., Vicini, F., Royce, M., Storme, G., Wallace, A.M., Vlastos, G., Bouchardy, C., Hortobagyi, G.N. (2009):

Prognostic value of nodal ratios in node-positive breast cancer: a compiled update. *Future Oncol.*, 5(10):1585-603

Wallwiener, M., Hartkopf, A.D., Baccelli I., Riethdorf, S., Schott, S., Pantel, K., Marmé, F., Sohn, C., Trumpp, A., Rack, B., Aktas, B., Solomayer, E.F., Müller, V., Janni, W., Schneeweiss, A., Fehm, T.N. (2013):

The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* Jan; 137(2):503-10. doi: 10.1007/s10549-012-2382-0. Epub 2012 Dec. 28.

Weihrauch, M. R., Skibowski, E., Koslowsky, T. C., Voiss, W., Re, D., Kuhn-Regnier, F., Bannwarth, C., Siedek, M., Diehl, V., Bohlen, H. (2002):

Immunomagnetic enrichment and detection of micrometastases in colorectal cancer: correlation with established clinical parameters. *J. Clin. Oncol.*, 1;20 (21):4338-43

Wenqi, D., Li, W., Shanshan, C., Bei, C., Yafei, Z., Feihu, B., Jie, L., Daiming, F. (2009):

EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 135(9):1277-85

Went, P.T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., Dirnhofer, S. (2006).

Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum. Pathol.*, 35(1):122-8

Wimberger, P., Heubner, M., Otterbach, F., Fehm, T., Kimmig, R., Kasimir-Bauer, S. (2007):  
Influence of platinum-based chemotherapy on disseminated tumor cells in blood and bone marrow of patients with ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 107(2):331-8

Wimberger, P., Roth, C., Pantel, K., Kasimir-Bauer, S., Kimmig, R., Schwarzenbach, H. (2010):  
Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *Int. J. Cancer*, 2010 Aug.

Wülfing P., Borchard J., Buerger H., Heidl S., Zänker KS., Kiesel L., Brandt B. (2006):  
HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 15;12 (6):1715-20

Yamashita, T., Ji, J., Budhu, A., Forgues, M., Yang, W., Wang, H.Y., Jia, H., Ye, Q., Qin, L.X., Wauthier, E., Reid, L.M., Minato, H., Honda, M., Kaneko, S., Tang, Z.Y., Wang, X.W. (2009):  
EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*, 136(3):1012-24

## 8. Lebenslauf

### Zur Person

Olga Lips

Geboren am 09.12.1981 in Gornoje (Kasachstan)

ledig, keine Kinder

### Schulische und berufliche Ausbildung

08/1993-07/2002 Martin-Luther-Schule/ Gymnasium, Marburg a.d. Lahn

Allgemeine Hochschulreife 07/2002

10/2002-12/2008 Studium an der Universität Hamburg

Fachrichtung: Humanmedizin

09/2004 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung gem. ÄAppO

10/2008-12/2008 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung gem. ÄAppO

### Praktisches Jahr

08/2007-12/2007: 1. PJ-Tertial: Gynäkologie und Geburtshilfe in der Asklepios Klinik Hamburg Altona, Prof. Dr. Ragosch

12/2007-04/2008 2. PJ-Tertial: Innere Medizin im Krankenhaus Mariahilf, Hamburg, Dr. med. Pelz

04/2008-07/2008 3. PJ-Tertial: Chirurgie und Orthopädie im Spital Frutigen, Schweiz, PD Dr. med. D. Heim

### Beruflicher Werdegang

01/2009-05/2014: Weiterbildungsassistentin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Hospital zum heiligen Geist, Frankfurt a. M., Dr. med. E. Lieb

Seit 06/2014: Oberärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Hospital zum heiligen Geist, Frankfurt a. M., Dr. med. E. Lieb

### Famulaturen

08/2005 Klinik für Herz und thorakale Gefäßchirurgie, Prof. Dr. med. Moosdorf, Klinikum der Philipps-Universität Marburg

09/2005 Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Prof. Dr. med. Wulf, Klinikum der Philipps-Universität Marburg

10/2006-12/2006 Department of Cardiology, Royal Prince Alfred Hospital, University of Sydney, Australien

## 9. Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. B. Brandt für seine Hilfe, methodische Unterstützung und die große Geduld danken, der mir mit seiner großen Erfahrung auf dem Gebiet der disseminierten Tumorzellen stets beratend zur Seite stand.

Danken darf ich auch Dr. Iris Alpers für die unglaublich große Hilfestellung, für ihr Engagement und ihre wertvollen Anregungen bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit. Aus tiefstem Herzen: Danke!!!

Außerdem danke ich Antje Andreas, Cornelia Coith, Dr. K. Effenberger und allen anderen Mitarbeitern des Instituts, die mir mit Tat und Rat zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Frauenklinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf-besonders bei Dr. med. Sven Mahner- für die zuverlässige Bereitstellung der Blutproben.

Auch möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meiner Familie bedanken, die mich stets unterstützt und ermutigt hat und sich oft meine Probleme anhören musste. Danke für alles!

Weiterhin möchte ich mich bei allen meinen Freunden bedanken, die ich in letzter Zeit vernachlässigt habe, um diese Arbeit fertig zu stellen. Alle haben mir viel Mut gegeben.

Besonders möchte ich mich jedoch bei meiner besten Freundin Atine Kuvac bedanken, die mir immer zuhörte und mir ein Ultimatum zur Fertigstellung machte, auch wenn ich das etwas nach hinten schieben durfte. Du bist in vieler Hinsicht mein Vorbild!

Bedanken will ich mich auch bei Nadine Salomon, die mich immer herzlich bei sich aufnahm und ein offenes Ohr für mich hatte. Danke für deine Freundschaft.

Auch gilt ein sehr großer Dank Dr. Natalia Bednarz-Knoll, die mich beständig motivierte und mir das alles mit so einer Besonnenheit und Disziplin vormachte. Du bist die Beste! Und ohne Dich wäre es im Labor sehr langweilig gewesen!

Danken möchte ich auch meinem Freund Tim Kröger. Danke für das Zuhören und die Unterstützung. Deine Stabilität und Freundschaft verleiht mir Flügel. Du bist der beste Partner, den man sich vorstellen kann.

Ein großer Dank gilt zu allerletzt Clemens Krost, der mir sehr geduldig und bereitwillig mit der EDV half und auch meinen netten Korrekturlesern Birgit Glowitz, Dr. Eckehard Rückert und Till-Bastian Fehring.

## 10. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift:.....