

Aus der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations-, und Kinderchirurgie
(Direktor Prof. Dr. med. Thomas Becker)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Etablierung eines
Immunfluoreszenz-basierten
Nachweisverfahrens für
zirkulierende Tumorzellen bei
Kolorektalkarzinompatienten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Katharina Dall
aus Karlsruhe

Kiel 2022

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Hinz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dirk Bauerschlag

Tag der mündlichen Prüfung 25.02.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel den 10.12.2021

Gez.: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Hinz

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Etablierung eines Immunfluoreszenz-basierten Nachweisverfahrens für zirkulierende Tumorzellen bei Kolorektalkarzinompatienten" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Kiel, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Das kolorektale Karzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Entstehung	1
1.1.3 Diagnostik, Stadieneinteilung und Therapie	2
1.1.4 Nachsorge des kolorektalen Karzinoms.....	6
1.1.5 Metastasierung.....	7
1.2 Zirkulierende Tumorzellen.....	8
1.2.1 Detektionsmethoden zirkulierender Tumorzellen.....	9
1.2.2 Klinische Anwendungsbereiche zirkulierender Tumorzellen	14
1.3 Fragestellung dieser Arbeit	16
1.3.1 Hintergrund.....	16
1.3.2 Ziele der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.2 Puffer, Reagenzien, Medien und Kits	17
2.2.1 Zelllinien.....	18
2.3 Laborgeräte	22
2.4 Zellkultur	22
2.4.1 Zellkulturmedien vorbereiten.....	22
2.4.2 Zellen splitten	22
2.4.3 Auftauen neuer Zellen.....	23
2.5 Herstellung einer Positivkontrolle.....	23
2.6 Detektion zirkulierender Tumorzellen mit dem NYONE®.....	24
2.6.1 Blutentnahme.....	24
2.6.2 Vorbereitung	24
2.6.3 Anreicherung und Waschen der Zellen.....	24
2.6.4 Fixierung der Zellen.....	25
2.6.5 Permeabilisierung der Zellen.....	25
2.6.6 Färbung der Zellen.....	26
2.6.7 Überführung der Zellen in 96-Well-Platten.....	26
2.6.8 Messung im NYONE®-Zellimager und Auswertung	26

2.7	Detektion zirkulierender Tumorzellen mit dem NYONE®-Verfahren – <i>Spiking</i>	27
2.7.1	Zellen ablösen und zählen	27
2.7.2	Blutentnahme.....	27
2.7.3	<i>Spiking</i> , Anreicherung und Waschen der Tumorzellen	27
2.8	Asservierung von klinischen Proben für die Biomaterialbank.....	28
2.8.1	Ficoll-Zentrifugation und Zellisolierung	28
2.8.2	RNA-Isolierung.....	28
2.8.3	cDNA-Synthese.....	28
2.9	CK20-RealTime-qPCR.....	28
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Etablierung der Detektion von CTCs mit dem NYONE® Cellimager.....	30
3.2	Etablierung der Methode anhand von <i>Spiking</i> -Experimenten	32
3.2.1	Effektivität des NYONE® beim Nachweis von CTCs.....	32
3.2.2	Beispielmessungen zweier <i>Spiking</i> -Experimente	33
3.3	Etablierung eines klinischen Kollektivs von Patienten mit kolorektalen Karzinomen.....	34
3.4	Eigenschaften des Patienten- und Gesundspenderkollektivs	35
3.5	Detektion von CTCs in Patientenproben	40
3.5.1	CTCs abhängig vom Tumorstadium (NYONE®-Verfahren).....	40
3.5.2	Gesundspender.....	43
3.5.3	CTCs abhängig vom Tumorstadium (RT-qPCR)	43
3.6	Auswertung der Verlaufskontrollen	46
4	Diskussion.....	52
4.1	CTCs mit dem NYONE® suchen, finden und abbilden – Etablierung der Methode.....	52
4.2	Etablierung der Methode anhand von <i>Spiking</i> -Experimenten	54
4.3	Detektion von CTCs in Patientenproben – auch in frühen Stadien.....	55
4.4	Analyse der Blutproben von Gesundspendern	56
4.5	CK20-RT-qPCR vs. NYONE®	57
4.6	CTCs und CK20-Expression im Verlauf – Individuelle Therapiepläne schränken die Vergleichbarkeit ein	59
5	Zusammenfassung.....	62
6	Anhang.....	64
6.1	Ethikvotum	64
7	Literaturverzeichnis	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz modifiziert nach <i>Vogelstein</i> [7]	2
Abbildung 2: Therapiekonzept Kolorektales Karzinom	6
Abbildung 3: Metastasierungsprozess modifiziert nach <i>Chaffer et al.</i>	8
Abbildung 4: Detektionsmöglichkeiten zirkulierender Tumorzellen aus dem Blut	10
Abbildung 5: Klinische Anwendungsmöglichkeiten von CTCs	14
Abbildung 6: CPT-Röhrchen nach Zentrifugation	24
Abbildung 7: Detektion von CTCs mit dem NYONE®	30
Abbildung 8: Vorgehensweise des NYONE®	31
Abbildung 9: Durch <i>Spiking</i> -Experimente ermittelte Wiederfindungsrate (Ausbeute)	32
Abbildung 10: HT29-Zellen (nach <i>Spiking</i>) im Blut von Gesundspendern (10-fach Objektiv)	33
Abbildung 11: Bilder gespikter HT29-Zellkulturtumorzellen (10-fach Objektiv)	34
Abbildung 12: Bilder von CTCs in Blutproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom	37
Abbildung 13: Bilder von CTCs im Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom	38
Abbildung 14: Falsch positive Events im NYONE® hervorgerufen durch Zelltrümmer oder Fremdpartikel (10-fach Objektiv)	39
Abbildung 15: Stadien abhängige CTC-Zahl zum Operationszeitpunkt	40
Abbildung 16: Stadienabhängige Detektion von CTCs mit dem NYONE®-Verfahren bei Patienten mit kolorektalem Karzinom zum OP-Zeitpunkt	42
Abbildung 17: Relative Genexpression von CK20 abhängig vom Tumorstadium zum OP-Zeitpunkt	44
Abbildung 18: Relative Genexpression von CK20 zum OP-Zeitpunkt und postoperativ nach vier Wochen	45
Abbildung 19: CTC-Zahl fällt mit Beginn der Therapie ab	48
Abbildung 20: CTC Zahl steigt im Verlauf an	49
Abbildung 21: CTC Zahl steigt im Verlauf an	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: UICC-Stadieneinteilung nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation (2017)	3
Tabelle 2: Erläuterungen zur TNM-Klassifikation (8. Auflage, 2017)	4
Tabelle 3: <i>Staging</i> beim Kolorektalen Karzinom [13]	5
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 5: Reagenzien und Medien	17
Tabelle 6: Nährmedien	18
Tabelle 7: Kommerzielle Puffer	19
Tabelle 8: Angesetzte Puffer	19
Tabelle 9: Antikörper und Färbelösungen	20
Tabelle 10: Kits	21
Tabelle 11: Laborgeräte	22
Tabelle 12: Eigenschaften des Patientenkollektivs	35
Tabelle 13: Eigenschaften des Kollektivs der Gesundspender	36
Tabelle 14: "CTC"-Status Gesundspender	43
Tabelle 15: Anzahl an positiven/negativen Patienten mit dem jeweiligen Detektionsverfahren für CTCs (NYONE® oder CK20-qPCR) zum OP-Zeitpunkt	46
Tabelle 16: Übersicht der Patienten der Verlaufsstudie	46
Tabelle 17: Anzahl aller Verlaufspatienten sortiert nach CTC-Zahl und den Zeitpunkten der Probenentnahme	47

Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>Adenomatous-polyposis-coli</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEA	<i>Karziñoembryonales Antigen</i>
CK20	<i>Cytokeratin 20</i>
CRC	<i>Colorectal Cancer</i>
CTC	<i>Circulating Tumour Cells</i>
ctDNA	<i>cell-free tumor DNA</i>
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymale Transition</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
FCS	<i>Fetale calf serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
KM	<i>Knochenmark</i>
k-RAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RCTX	<i>Radiochemotherapie</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
TBST	<i>Tris-buffered Saline with Tween®20</i>
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i>
WBZ	<i>Weisse Blutzelle</i>

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Bei der Frage nach den häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland stehen Herz-Kreislauferkrankungen nach wie vor an erster Stelle. Unmittelbar an zweiter Stelle stehen laut Daten des Statistischen Bundesamtes jedoch mit einem Viertel aller Todesfälle (im Jahr 2018) die Krebserkrankungen [1].

Dabei betrifft ungefähr jeder achte Krebsfall in Deutschland den Darm [2]. Bei circa 66 % davon handelt es sich um Tumore des Dickdarms, genauer des Kolons und des Rektums [2]. Diese werden zusammengefasst oft als kolorektale Karzinome (*colorectal cancer*, CRC) bezeichnet. Darmkrebs ist weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung und eine der häufigsten durch Tumorerkrankungen hervorgerufenen Todesursachen [3]. Im Jahr 2013 erkrankten laut Daten des Robert-Koch-Institutes in Deutschland 62.400 Patienten an Darmkrebs, 45 % davon waren Frauen [4]. Etwa 41 % der Patienten verstarben im selben Jahr an ihrer Erkrankung [4]. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug beim Kolonkarzinom für Frauen 72 Jahre, für Männer 68 Jahre, für das Rektumkarzinom 63 Jahre bei beiden Geschlechtern [5]. Ende 2013 wiesen 210.000 Betroffene eine bis zu fünf Jahre zurückliegende Darmkrebsdiagnose auf. Das relative 10-Jahres-Überleben betrug bei Frauen 60,2 % und bei den Männern 57,1 % [4].

1.1.2 Entstehung

Das kolorektale Karzinom entwickelt sich regelhaft aus Polypen der Darmwand. Der Großteil der Polypen bildet sich spontan zurück. In ca. 10 % kommt es zu einer malignen Entartung und Ausbildung eines Karzinoms, üblicherweise innerhalb von 8-10 Jahren [6]. Bei diesen Polypen handelt es sich zuerst um Adenome oder sogenannte *serrated adenomas*, gebildet von irregulären Epithelzellen der Darmmukosa. Gerät die Zelldifferenzierung und Zellteilung zu weit außer Kontrolle, entwickelt sich der Polyp zu einem Karzinom weiter [6]. Dies kommt durch die Kombination einer mutationsbedingten Aktivierung eines Onkogens mit dem Verlust von verschiedenen Tumorsuppressor-Genen zustande. Das am häufigsten mutierte Onkogen ist k-RAS (*Kirsten rat sarcoma gene*), während APC (*Adenomatous-polyposis-coli*), DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) und p53 häufig betroffene Tumorsuppressor-Gene sind [7]. Das Modell der stufenweisen Entwicklung eines malignen Darmtumors über benigne Vorstufen, bedingt durch genetische Mutationen, nennt sich Adenom-Karzinom-Sequenz nach *Fearon und Vogelstein* (**Abbildung 1**) [8].

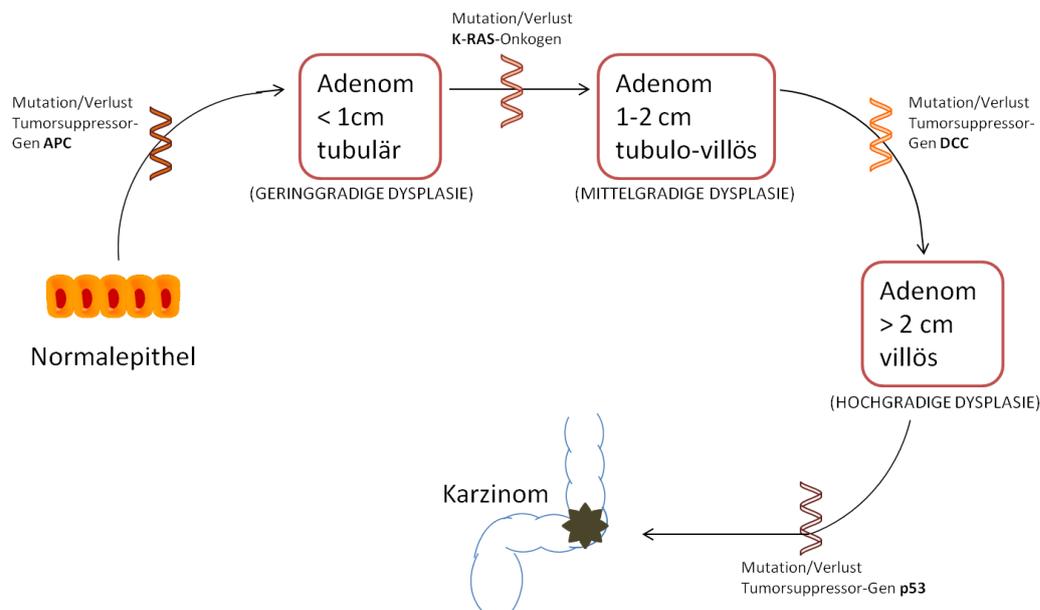


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz modifiziert nach Vogelstein [7]

Durch Mutationen und Verluste von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen kommt es zu einer schrittweisen dysplastischen Veränderung des Gewebes, die letztendlich in der Entstehung eines Karzinoms mündet.

98% aller kolorektalen Karzinome sind Adenokarzinome. Diese bestehen aus abnormem Drüsengewebe, welches die Fähigkeit des infiltrativen Wachstums erlangen kann. Auf diese Weise können die Tumorzellen verschiedene Strukturen (Lymphgefäße, Venen etc.) der Darmwand und angrenzendes Gewebe infiltrieren, was wiederum in anderen Organen oder Lymphknoten zur Ausbildung von Metastasen führen kann.[6]

1.1.3 Diagnostik, Stadieneinteilung und Therapie

Für die Diagnostik von Darmtumoren besitzt die qualitätsgesicherte komplette Koloskopie den größten Stellenwert und ist in Deutschland ab einem Alter von 55 Jahren empfohlene Krankenkassenleistung als Vorsorgeuntersuchung zur Darmkrebsfrüherkennung. Bei einem unauffälligen Erstuntersuchungsbefund wird alle zehn Jahre eine weitere Koloskopie empfohlen. Wird eine Koloskopie abgelehnt, sollten eine Rektoskopie sowie eine jährliche Untersuchung auf okkultes Blut im Stuhl als alternative Screeningmethoden erfolgen [9]. Distale Tumore können auch im Rahmen einer Digitalen-Rektalen-Untersuchung auffallen, die obligat durchzuführen ist. Sollte eine Koloskopie aus bestimmten Gründen nicht adäquat durchführbar sein, kann auch eine Computertomographie (CT) Aufschluss über eventuelle Läsionen geben [9].

Bei circa 70 % aller Patienten liegen bei Diagnosestellung bereits fortgeschrittene Tumorstadien vor [2]. Zu diesem Zeitpunkt weisen bereits 20-25 % aller Patienten mit Kolonkarzinom und 18 %

aller Patienten mit Rektumkarzinom Metastasen auf, die am häufigsten in der Leber und am zweithäufigsten in der Lunge lokalisiert sind [3].

Nach der Diagnosestellung erfolgt das *Staging* des Tumors [9]. Es wird die Ausbreitung der Erkrankung beurteilt und dem entsprechenden Tumorstadium zugeordnet. Die Adenokarzinome von Kolon und Rektum werden nach der TNM-Klassifikation eingeteilt. Das T steht dabei für das Ausmaß der Tiefeninfiltration des Primärtumors, das N für den Befall von regionären Lymphknoten und das M für das Vorhandensein von Fernmetastasen (**Tabelle 2**)[10]. Aus der TNM-Klassifikation wird das UICC-Stadium (UICC-0 bis UICC-IVB) bestimmt (UICC= *Union internationale contre le cancer*), welches als international einheitliches Instrument Auskunft über die systemische und lokale Ausbreitung der Erkrankung gibt (**Tabelle 1**). Die Bestimmung dieser Angaben erfolgt postoperativ anhand der histologischen Untersuchung des Operationsresektats durch die Pathologie. Dabei werden der Tumortyp nach der WHO-Klassifikation, die Tumordinvasionstiefe (pT-Klassifikation), der Status der regionären Lymphknoten (pN-Klassifikation), die Anzahl der untersuchten Lymphknoten (mindestens zwölf), das Vorhandensein oder Fehlen einer Lymphgefäßinvasion (L-Klassifikation), der histologische Differenzierungsgrad (*Grading*) und die Beurteilung der Resektionsränder (R-Klassifikation) beschrieben [9]. Therapie und Prognose der Erkrankung richten sich nach dem vorliegenden UICC-Stadium. Das Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose gilt als der wichtigste prognostische Faktor [11].

Tabelle 1: UICC-Stadieneinteilung nach der 8. Auflage der TNM-Klassifikation (2017) [10]

Das UICC-Stadium der jeweiligen Tumorerkrankung richtet sich nach den Kategorien der TNM-Klassifikation. [12]

UICC-Stadium	T	N	M
0	T _{is}	N0	M0
I	T1/T2	N0	M0
II A	T3	N0	M0
II B	T4a	N0	M0
II C	T4b	N0	M0
III A	T1/T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
III B	T3/T4	N1	M0
	T2/T3	N2a	M0
	T1/T2	N2b	M0
III C	T4a	N2a	M0
	T3/T4a	N2b	
	T4b	N1/N2	

IV A	Jedes T	Jedes N	M1a
IV B	Jedes T	Jedes N	M1b

Tabelle 2: Erläuterungen zur TNM-Klassifikation (8. Auflage, 2017)

[10]

Erklärungen der in der TNM-Klassifikation für Darmkrebs verwendeten Abkürzungen.

Abkürzung	Bedeutung
Tis	intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria (ohne feststellbare Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa)
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in das nicht peritonealisierte perikolische oder perirektale Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
T4a	Tumor perforiert viszerales Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1a	Metastase in 1 regionären Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2a	Metastasen in 4 - 6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten)
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Die Ermittlung des entsprechenden Krankheitsstadiums erfolgt in der Regel durch eine komplette Koloskopie inkl. Biopsie, CT- oder Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchungen von Thorax, Abdomen und Becken, die Bestimmung des CEA-Wertes (*Carcinoembryonic antigen*, CEA) im Blut, eine Abdomensonographie, eine Röntgen-Thorax-Untersuchung und eine starre Rektoskopie oder – beim Rektumkarzinom – rektale Endosonographie (**Tabelle 3**)[13].

Tabelle 3: *Staging* beim Kolorektalen Karzinom [13]

Zum *Staging*, also der Stadienbestimmung eines Tumors, werden verschiedenen Untersuchungen durchgeführt. Neben der Koloskopie können auch andere bildgebende Verfahren wie ein MRT/CT des Beckens, ein Röntgen-Thorax oder eine Abdomensonographie zur Anwendung kommen.

Untersuchung	Kolon-Ca	Rektum-Ca
Komplette Koloskopie	X	X
CEA (<i>Karziñoembryonales Antigen</i>)	X	X
Abdomensonographie	X	X
Röntgen-Thorax	X	X
Starre Rektoskopie		X
MRT (CT) Becken mit Angabe Abstand des Tumors zur mesorektalen Faszie		X
Rektale Endosonographie bei lokal begrenztem Tumor		X

Im Anschluss wird eine Therapieentscheidung getroffen, die sich vom zuvor bestimmten Tumorstadium (UICC, *Union internationale contre le cancer*) ableitet und nach den Therapieempfehlungen der aktuellen S3-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie des Kolorektalen Karzinoms richtet [9]. Eine komplette mesokolische Exzision des Tumors ist der Goldstandard in der Therapie des CRC (**Abbildung 2**) [3]. Bei vollständiger (R0) Resektion werden im UICC Stadium I und II regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen empfohlen. In den Tumorstadien III und IV stellen eine präoperativ durchgeführte neoadjuvante Radiochemotherapie (nur beim Rektumkarzinom) oder die postoperative adjuvante Chemotherapie wichtige zusätzliche Therapieoptionen dar. Im metastasierten UICC-Stadium IV kommt häufig nur noch eine palliative Chemotherapie in Frage [13].

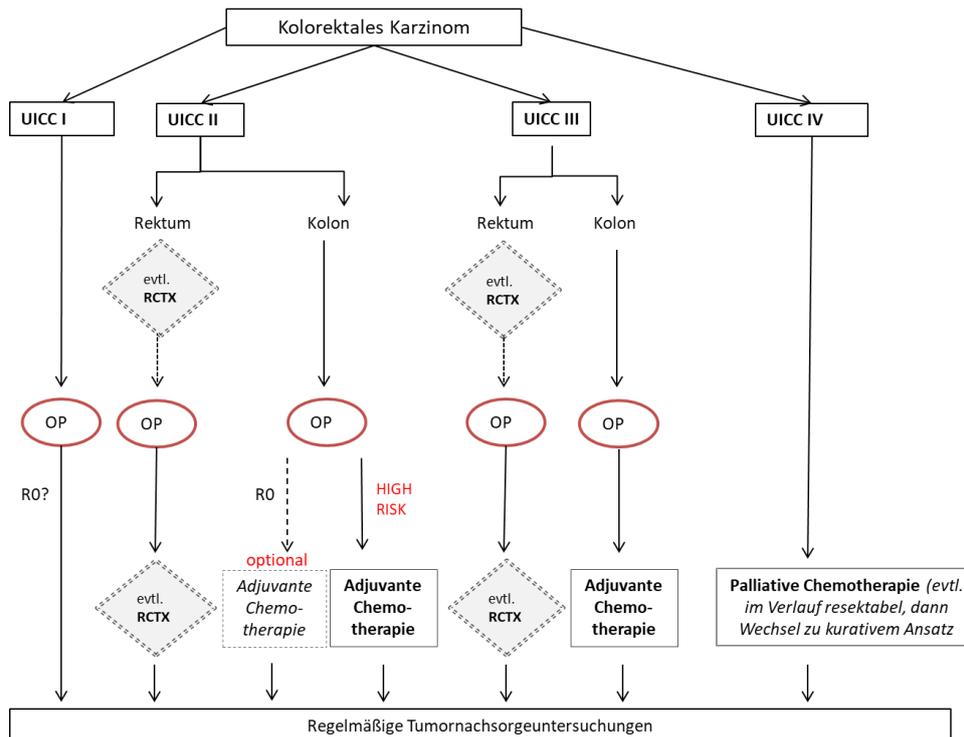


Abbildung 2: Therapiekonzept Kolorektales Karzinom

Die Therapiemöglichkeiten beim kolorektalen Karzinom richten sich nach dem jeweiligen UICC-Stadium der Erkrankung. R0 steht für eine komplette, auch histologisch nachgewiesene Entfernung des Tumors im Gesunden ohne residuellen Tumornachweis im Resektionsrand. RCTX = Radiochemotherapie; OP = Primärresektion des Tumors

1.1.4 Nachsorge des kolorektalen Karzinoms

Nach Abschluss der Behandlung ist eine regelmäßige postoperative Nachsorge indiziert. Hierfür stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, wobei eine symptomorientierte Anamneseerhebung und die körperliche Untersuchung grundsätzlich dazu gehören. Die zentrale Methode zur Erkennung von Lokalrezidiven oder Zweittumoren ist die komplette Koloskopie [9]. Sie sollte präoperativ oder innerhalb von spätestens sechs Monaten postoperativ bei allen Patienten durchgeführt werden, bei denen präoperativ z.B. aufgrund einer Stenose keine komplette Koloskopie möglich gewesen ist. Anschließend sollte nach einem Jahr und bei weiterhin unauffälligen Befunden alle fünf Jahre eine vollständige Koloskopie veranlasst werden. Des Weiteren sollte das karzi-noembryonale Antigen (CEA) alle sechs Monate für mindestens zwei Jahre im Blut kontrolliert werden [13]. Es konnte gezeigt werden, dass sich über den CEA-Wert Vorhersagen über das Auftreten von Rezidiven, die Resektabilität und das Überleben nach Primärresektion des kolorektalen Karzinoms treffen ließen [14]. Zur Detektion von Lebermetastasen, Lokalrezidiven im kleinen Becken oder Lungenmetastasen ist die CT laut Leitlinien zwar „technisch geeignet, aufgrund der Datenlage allerdings nicht für einen routinemäßigen Einsatz vorgesehen“ [13]. Beim Rektumkarzinom

wird bei Patienten in den UICC-Stadien II und III außerdem bis zum fünften Jahr jährlich eine Röntgen-Thorax-Untersuchung durchgeführt. Auch die Endosonographie (EUS), eine Sigmoidoskopie oder alternativ starre Rektoskopie stehen für Verlaufskontrollen zur Verfügung, insbesondere für Patienten, die keine perioperative Radiochemotherapie erhalten haben [13]. Zusammenfassend ist es also Ziel der Nachsorgebehandlung des CRC, neben Lokalrezidiven auch eventuelle Metastasen frühzeitig zu erkennen.

1.1.5 Metastasierung

Betrachtet man den Progress und die Prognose von Krebserkrankungen, steht dabei das Auftreten von Metastasen als negativster prognostischer Marker im Mittelpunkt. Metastasen sind für über 90% aller durch Krebs bedingten Todesfälle verantwortlich [15]. Die Entstehung ist noch nicht abschließend verstanden. Klar ist jedoch, dass es sich hierbei um einen kleinschrittigen Prozess handelt, zu dem nicht jede Tumorzelle des Primärtumors in der Lage ist – man geht sogar von weniger als einem Prozent aus [16][17]. Diese unterschiedliche Kompetenz der Zellen, Metastasen auszubilden, liegt begründet in dem Fakt, dass es sich bei den Zellen eines Primärtumors um genetisch heterogene Subpopulationen handelt [18]. Bei der Metastasierung überleben nur jene Zellen, die jeden einzelnen Metastasierungsschritt erfolgreich bestreiten – Vaskularisierung des Tumors, Gefäßinvasion, Überleben im Blut- oder Lymphstrom, Extravasation, Entrinnen der Immunantwort, Vermehrung und Wachstum in der Mikroumgebung des neuen Organsystems etc. [16]. Schematisch ist die Metastasierungskaskade in **Abbildung 3** dargestellt.

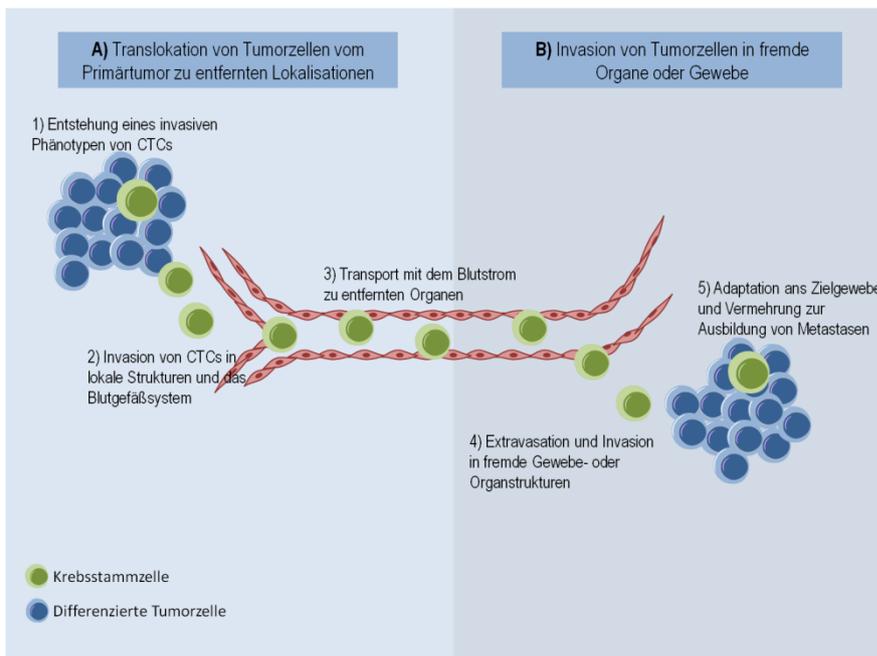


Abbildung 3: Metastasierungsprozess modifiziert nach *Chaffer et al.*

[15]

Veranschaulichung des Metastasierungsprozesses. Krebsstammzellen lösen sich aus dem Zellverbund des Primärtumors und invadieren in die den Tumor versorgenden Blutgefäße. Auf diesem Wege gelangen CTCs in andere Organe, um dort wieder aus dem Gefäßsystem auszutreten. Es kommt zur lokalen Invasion von Zellen in fremdes Gewebe und mit der Zeit zur Ausbildung von Metastasen.

1.2 Zirkulierende Tumorzellen

Die Zellen, die sich vom Primärtumor lösen und im Blutgefäßsystem zirkulieren, werden als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichnet [15]. Sie sind Gegenstand aktueller Forschung, da man sich von ihrer Detektion und Analyse ein besseres Verständnis von Metastasierung, Progress und Prognose verschiedener Krebserkrankungen verspricht [19].

Unter „*liquid biopsies*“ versteht man einen Sammelbegriff für die Detektion oder Analyse unterschiedlichster Marker in einer Blutprobe. Beispielfhaft sind dies z.B. CTCs oder auch zellfreie Tumor-DNA (ctDNA), welche durch Apoptose oder Nekrose von Tumorzellen freigesetzt wird. Des Weiteren können auch Exosomen, Proteine oder RNA zum Nachweis einer residuellen Tumorerkrankung als *liquid biopsy* genutzt werden [20]. Im Gegensatz zu klassischen Nachweismethoden wie der Gewebebiopsie, handelt es sich dabei um eine nicht-invasive Methode, bei der die Patienten sich ausschließlich einer Blutentnahme unterziehen müssen. Welchen Wert die Isolierung und Interpretation von CTCs oder ctDNA abhängig von der jeweiligen Tumorentität besitzt und welches Nachweisverfahren am geeignetsten ist, stellt derzeit eine der zentralen Fragestellungen vieler Arbeitsgruppen dar [20] [21] [22].

Man geht davon aus, dass die CTCs im Blutkreislauf eine Halbwertszeit von ca. 1-2,4 h aufweisen [15]. Teilweise kommt es zur Bildung von Aggregaten mit aktivierten Thrombozyten oder Makrophagen, was den Tumorzellen durch eine erleichterte Anhaftung an das Endothel einen Überlebensvorteil sichert und die Extravasation in sekundäre Organe erleichtern kann [20]. Die meisten Tumorzellen, die primär die Translokation vom Tumor in das Gefäßsystem erreichen, sterben innerhalb von 24 h nach der Extravasation durch Apoptose [15][23].

Aufgrund des epithelialen Ursprungs zirkulierender Tumorzellen werden in den meisten Nachweismethoden in erster Linie etablierte epitheliale Marker wie EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*) oder Cytokeratine zur Isolation verwendet. Jedoch existieren mittlerweile verschiedenste Technologien zur Detektion von CTCs, welche entweder die physikalischen oder biologischen Eigenschaften der zirkulierenden Tumorzellen nutzen, um diese isolieren und gegebenenfalls quantifizieren zu können [20].

1.2.1 Detektionsmethoden zirkulierender Tumorzellen

Die Isolation von CTCs bei Patienten mit soliden Tumorerkrankungen ist aufgrund der geringen Anzahl an Tumorzellen im Vollblut des Patienten technisch anspruchsvoll. Das Vorkommen von einer zirkulierenden Tumorzelle auf ca. zehn Millionen andere weiße Blutzellen in einer Blutprobe mit einem Volumen von 7.5 ml stellt dabei hohe Anforderungen an die Nachweis- und Isolationsverfahren [24]. Die bisher in der Forschung angewandten Detektionsmethoden lassen sich drei Kategorien zuordnen – der negativen Selektion, der positiven Selektion oder Verfahren ohne eine vorherige Selektion der CTCs [24].

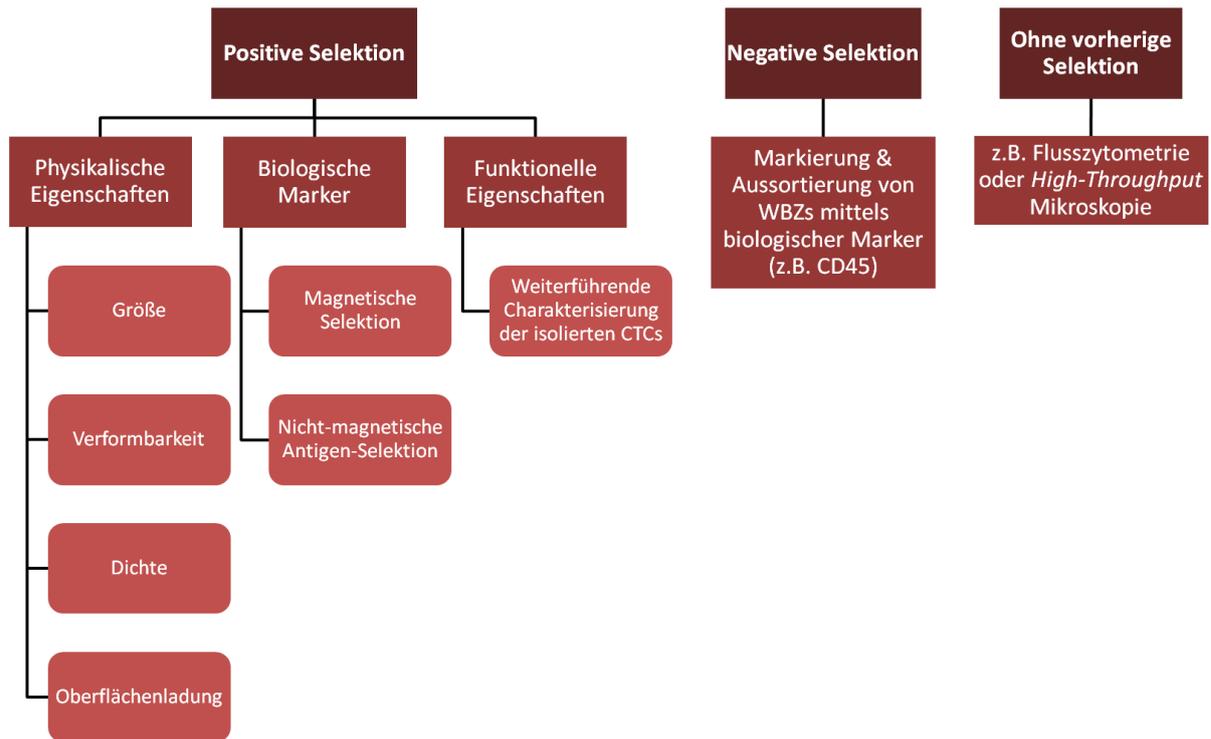


Abbildung 4: Detektionsmöglichkeiten zirkulierender Tumorzellen aus dem Blut

Die verschiedenen Detektionsmöglichkeiten für CTCs wurden in drei Kategorien unterteilt. Bei der positiven Selektion geht es darum, bestimmte Eigenschaften der Zellen, wie beispielsweise ihre Größe oder spezifische Oberflächenmarker, zur Isolierung der CTCs zu nutzen. Die negative Selektion hingegen isoliert die zirkulierenden Tumorzellen über eine Elimination der anderen Zellfraktionen, wie beispielsweise der Leukozyten oder Erythrozyten. Bei der dritten Kategorie handelt es sich um Verfahren, die ohne eine vorherige Selektion der CTCs arbeiten. (WBZ = weiße Blutzellen)

1.2.1.1 Positive Selektion

Unter positiver Selektion versteht man die Isolierung von CTCs unter Zuhilfenahme ihrer spezifischen Eigenschaften (**Abbildung 4**). Eine Möglichkeit stellt dabei die Anreicherung von CTCs anhand ihrer Größe dar, wie es beispielsweise bei den Methoden *ISET*[®] (*isolation by size of epithelial tumor cells*) [25] oder *ScreenCell*[®] [26] umgesetzt wird. Beide Verfahrensweisen nutzen Filter mit Poren definierter Größe, die von allen Blutzellen außer den Tumorzellen passiert werden können, um die CTCs zu isolieren und anzureichern. In beiden Fällen wird die Grundannahme vorausgesetzt, dass epitheliale Tumorzellen einen größeren Durchmesser besitzen als periphere Blutzellen. Diese Daten basieren größtenteils auf der Beobachtung von Zellkultur-Tumorzelllinien, nicht auf humanen zirkulierenden Tumorzellen im Blutstrom. Eine andere Form der Isolierung nutzt neben dem Größenunterschied auch die, im Gegensatz zu normalen weißen und roten Blutzellen, höhere Verformbarkeit der CTCs [27]. Dabei handelt es sich um das automatisierte *Celsee PREP 400 system*[™] (Celsee Diagnostics, Plymouth, MI), welches die physikalischen Eigenschaften der CTCs nutzt, um sie einzeln in kleinen Kammern festzuhalten, die von peripheren Blutzellen über kleine Öffnungen

am Boden wieder verlassen werden können. Ein Vorteil ist, dass im Anschluss jede beliebige Färbung oder weitere Charakterisierung der CTCs möglich ist, da zur reinen Isolierung der Zellen keine Markierung der Tumorzellen vorgenommen werden muss [28]. Auch Methoden, welche die geringere Dichte oder die negative Oberflächenspannung der CTCs ausnutzen, können unter Umständen sehr störungsanfällig sein, da sehr kleine CTCs auch höhere Dichtewerte aufweisen können, die sich so nicht mehr von peripheren Blutzellen unterscheiden ließen. Darüber hinaus gibt es auch bei der Oberflächenspannung Überschneidungen mit weißen Blutzellen, wodurch es leicht zur Verunreinigung der CTCs mit anderen Blutzellen kommen kann [24].

Eine Methode, die häufig angewandt wird, ist eine Methode, die auf der Anreicherung der CTCs mit Hilfe von Oberflächenmarkern und magnetischer Isolation basiert: das *CellSearch*[®] System (Veridex, Warren, NJ, USA) [24]. Dabei werden CTCs aus 7,5 ml Blut isoliert, indem sie zuerst durch Eisenpartikel, die mit anti-EpCAM Antikörpern beschichtet sind, markiert werden und anschließend magnetisch von den übrigen weißen Blutzellen getrennt werden. Diese sind mit Antikörpern gegen den leukozytären Oberflächenmarker CD45 (CD = *cluster of differentiation*) markiert und alle Zellkerne werden mit dem Kernmarker DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) angefärbt. Nach einer ersten magnetischen Anreicherung der CTCs werden diese durch an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper gegen epitheliale Cytokeratine (v.a. CK 8, 18, 19) sichtbar gemacht und zuletzt fixiert. Die Auswertung erfolgt mit einem semiautomatischen Fluoreszenzmikroskop. Dieses Nachweisverfahren ist in den USA zugelassen (FDA Zulassung) zum Nachweis von CTCs in der metastasierten Situation bei Prostata-, Mamma- und Kolonkarzinompatienten. Verschiedene Studien verifizierten die Reliabilität des *CellSearch*[®] Systems und auch die Praktikabilität im klinischen Alltag [29][30].

Der *Adna-Test*[®] stellt eine weitere Detektionsmethode für CTCs dar, der eine immunomagnetische Anreicherung der zirkulierenden Tumorzellen über spezifische Oberflächenantigene mit einer PCR für krankheitsspezifische DNA-Abschnitte kombiniert [24]. Die immunomagnetische Anreicherung funktioniert am Beispiel von Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom z.B. über die Expression von EpCAM-Antigenen auf der Zelloberfläche der CTCs. Im Rahmen der PCR werden Primer für das PSA (Prostata-spezifisches Antigen), das PSMA (Prostata-spezifisches Membranantigen) und den EGFR (epidermal growth factor receptor) eingesetzt [31].

Es gibt aber auch Methoden, die bei der Isolation ohne eine magnetische Komponente auskommen und stattdessen nur die verschiedenen spezifischen Oberflächenmarker der CTCs nutzen. Dabei können epitheliale Marker wie EpCAM, nukleäre Marker mittels DAPI, krankheitsspezifische Marker wie PSA und PSMA oder zur Gegenfärbung Marker mononukleärer weißer Blutzellen, wie CD45 oder CD66, adressiert werden [24]. Ein Beispiel für ein solches Verfahren ist der sogenannte 'CTC-Chip': das Blut der Patientenprobe fließt hindurch, wobei in der Probe enthaltene

EpCAM-positive CTCs an den mit anti-EpCAM-Antikörpern beschichteten Spots innerhalb des Chips haften bleiben [24].

Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde bereits vor längerer Zeit ein Verfahren entwickelt, welches die Expression des Markers Cytokeratin 20 (CK20) zur CTC-Detektion nutzt. Dafür wurde die mononukleäre Zellfraktion aus Blutproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom mittels einer Dichtezentrifugation isoliert und die CK20-mRNA anschließend mittels einer qRT-PCR amplifiziert [32]. *Hinz et al.* untersuchten Blutproben von Rektumkarzinom-Patienten und konnten zeigen, dass Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien, die eine adjuvante Radiochemotherapie (RCTX) erhielten, signifikant mehr CTCs aufwiesen als Patienten in früheren Tumorstadien ohne RCTX [33]. In der Untergruppe der Patienten, die ein gutes Ansprechen auf die RCTX zeigten, wurden vor Beginn der Primäroperation signifikant weniger CTCs nachgewiesen als in der Gruppe der Non-Responder. Allerdings konnte in dieser Studie weder ein Zusammenhang zwischen der CTC-Detektionsrate und dem Tumorstadium noch eine Korrelation zwischen CTC-Zahl und dem Gesamtüberleben der Patienten festgestellt werden. Dies stand im Widerspruch zu vorherigen Studien, die CTCs im Blut von Kolonkarzinom-Patienten untersuchten [33]. *Hendricks et al.* untersuchten Blutproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom mittels einer semiquantitativen RT-PCR auf CK20-mRNA und bestimmten einen *cut-off*-Wert der relativen CK20-mRNA Expression. Patienten mit hohen CK20-Expressionslevels ($\geq 2,77$) zeigten ein signifikant schlechteres Outcome bezüglich der 5-Jahres-Überlebensrate und des krankheitsfreien-Überlebens. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch bei alleiniger Betrachtung aller Patienten in niedrigen Tumorstadien (UICC I+II), sodass es gelang, Risiko-Patienten mit negativer Prognose bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung zu identifizieren [34].

In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich eine Expression von CK20 im Verlauf der gastrointestinalen Tumorerkrankung als negativ prognostischer Faktor erwies [32][35].

1.2.1.2 Negative Selektion

Bei der negativen Selektion wird eine Anreicherung der CTCs über eine Markierung und anschließende Eliminierung der übrigen weißen Blutzellen (WBCs = *white blood cells*) erreicht (**Abbildung 4**). Ein Beispiel für diese Vorgehensweise stellt die Detektion von CTCs mittels des *EasySep Depletion Kits* von *StemCell Technologies* (*Vancouver, Canada*) dar [24]. Bei diesem Verfahren erfolgt zunächst eine Lyse der roten Blutzellen, gefolgt von einer immunomagnetischen Markierung und Elimination der weißen, CD45-positiven, Blutzellen. Zusätzlich finden hierbei auch Antikörper gegen CD13 und CD33 Anwendung. Nach der Eliminierung der übrigen peripheren Blutzellen wurden zur abschließenden Detektion der CTCs zwei verschiedene Verfahren eingesetzt – auf der einen Seite eine immunozytochemische Methode, welche beinhaltet, dass die CTCs mit dem

Kernfarbstoff DAPI und Antikörpern gegen Cytokeratin angefärbt werden, und auf der anderen Seite eine RT-qPCR für die EGFR-mRNA Detektion. Mittels dieser Methoden konnten CTC-Detektionsraten von etwa 83% erreicht werden [36].

1.2.1.3 Methoden ohne vorherige Selektion

Der Vorteil von Methoden, die keine Selektion von Zellen durchführen, ist, dass folglich während dieser sonst üblichen Selektionsschritte auch keine CTCs verloren gehen können [24]. Die Flusszytometrie ist dabei ein Verfahren, welches schon seit langer Zeit zur Anwendung kommt. Schon 1995 beschrieben *Gross et al.* die Detektion von Brustkrebszellen im peripheren Blut durch die Verwendung verschiedener immunfluoreszierender Marker. Durch die Verwendung von vier unterschiedlich farbigen Markern gegen Cytokeratine und anti-CD45/42a/61 und 34 gelang es ihnen, eine Zelle aus 10^7 peripheren Blutzellen zu isolieren [37].

Eine andere Möglichkeit ist die *high-throughput* Mikroskopie [24]. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit einer optischen Darstellung von CTCs mittels immunhistochemischer Anfärbung der Zellen, zum Beispiel mit Hilfe der „*Epic Sciences platform*“. Dabei wurden alle roten Blutzellen lysiert, alle kernhaltigen Zellen mittels Immunfluoreszenz angefärbt und anschließend durch einen speziellen Fluoreszenz-Scanner analysiert [24]. CD45 negative, CK positive und DAPI positive intakte Zellen wurden als CTCs gewertet [38]. Auch bei dieser Methode besteht keine Gefahr, vereinzelte CTCs während vorangehender Selektionsschritte zu verlieren [38].

1.2.2 Klinische Anwendungsbereiche zirkulierender Tumorzellen

Die klinischen Anwendungsmöglichkeiten der Detektion, Analyse und Quantifizierung von CTCs sind vielfältig und könnten den zukünftigen Umgang mit Tumorerkrankungen maßgeblich beeinflussen (**Abbildung 5**).

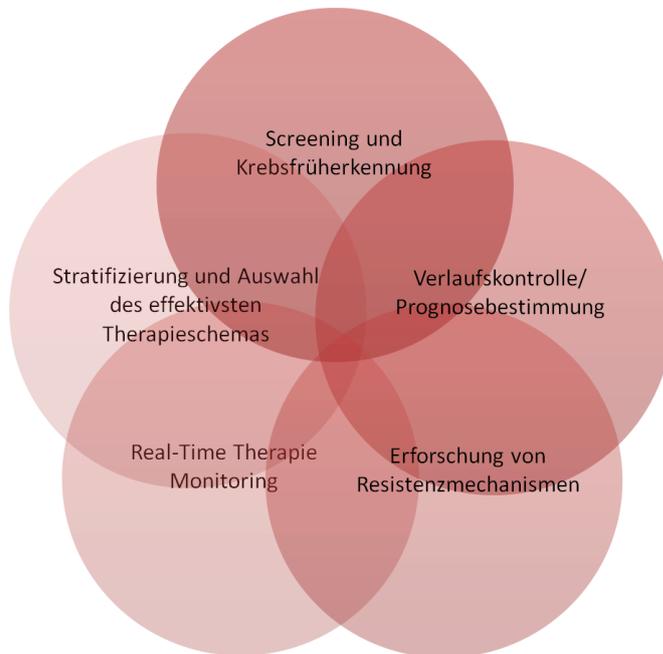


Abbildung 5: Klinische Anwendungsmöglichkeiten von CTCs modifiziert nach *Alix-Panabieres et al.* [20]

Dargestellt sind verschiedene klinische Bereiche, die Gegenstand aktueller Forschung sind und in denen CTCs im klinischen Alltag eine Rolle spielen, bzw. in Zukunft eine Rolle spielen könnten.

Ilie et al. forschten beispielsweise zum Thema „Gebrauch von CTCs als Screeningmethode und zur Krebsfrüherkennung“ und konnten bei Patienten mit COPD CTCs nachweisen, die im Verlauf ein bis vier Jahre später tatsächlich ein Lungenkarzinom im frühen Stadium entwickelten, anders als Patienten, bei denen initial keine CTCs detektiert worden waren [39]. Aber auch bezüglich der prognostischen Einschätzung von Tumorerkrankungen könnten sich CTCs als wertvoll erweisen. In einer großen multizentrischen Studie konnten z.B. *Rack et. al* 2014 zeigen, dass sich der Nachweis von CTCs bei Patienten mit Brustkrebs neben etablierten prognostischen Markern wie der Tumorgroße oder dem Lymphknotenstatus als unabhängiger, negativ prognostischer Marker eignete. Dies zeigte sich auch durch ein signifikant verkürztes krankheitsfreies Überleben der CTC-positiven Patienten. Aber nicht nur als Screeningmethode oder zur Prognoseeinschätzung lassen sich CTCs nutzen, sie könnten auch zur Auswahl individuell effektivster Therapieschemata beitragen oder eine neue Möglichkeit des *real-time* Therapiemonitorings darstellen. Auf RNA, DNA und Proteinebene lassen sich durch die genetische Analyse von CTCs Rückschlüsse auf den Genotypen

des Primärtumors ziehen und so eventuelle Resistenzmechanismen oder therapeutische Angriffspunkte besser detektieren und charakterisieren [20]. Am Beispiel des kolorektalen Karzinoms analysierten *Heitzer et al.* 2013 die Expression von Genen, die mit dem CRC assoziiert sind. CTCs und Primärtumore wurden dabei getrennt betrachtet, wobei für beide Zelltypen eine Vielzahl an treibenden Genmutationen nachgewiesen werden konnte (z.B. APC, KRAS) [40]. Die genetische Charakterisierung von CTCs könnte also zu einem besseren Verständnis von Resistenzmechanismen in Tumoren führen und in Zukunft ein gezielteres therapeutisches Vorgehen ermöglichen. Aber auch während der Therapie ist die Überwachung des Therapieansprechens von großem Interesse, wofür bislang etablierte Tumormarker wie das Prostata-spezifische Antigen (PSA) beim Prostatakarzinom oder das carcinoembryonale Antigen (CEA) beim CRC verwendet werden. In neuen Studienansätzen wird der prognostische Wert von CTCs unter der Therapie im Vergleich zu etablierten Tumormarkern untersucht. *Bidard et al.* wollten die Validität der CTC-Quantifizierung, bezogen auf die prognostische Vorhersagekraft, bei Patienten mit metastasiertem Brustkrebs prüfen, die sich unter chemotherapeutischer Behandlung befanden. Es konnte gezeigt werden, dass die fortlaufende Bestimmung der CTC-Zahl in Zusammenschau mit anderen klinischen und histopathologischen Faktoren, wie dem Tumorstadium oder dem Metastasierungsstatus, mit dem Gesamtüberleben sowie dem progressionsfreien Überleben korrelierte. Die Bestimmung der CTC-Zahl besaß dabei einen höheren Vorhersagewert als klinisch bereits etablierte Tumormarker wie CEA oder CA15-3 (*Cancer Antigen 15-3*) [20].

Auf diese Weise könnten in Zukunft möglicherweise noch früher spezifische Einschätzungen der therapeutischen Wirkung erreicht werden und im Umkehrschluss unwirksame, teure und meist nebenwirkungsreiche Therapien vermieden werden.

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

1.3.1 Hintergrund

Im Verlauf des Metastasierungsprozesses des kolorektalen Karzinoms können sich einzelne Tumorzellen aus dem Primärtumor lösen und in den Blutkreislauf gelangen, was im weiteren Verlauf zur Ausbildung von Metastasen führen kann. Zahlreiche Studien haben bereits gezeigt, dass der Nachweis von CTCs im Blut von Patienten mit CRC mit einer schlechteren Prognose korreliert [34][41][42]. In unserer Arbeitsgruppe wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Tumorforschung in Kiel (IET) bereits ein qPCR-basiertes Nachweisverfahren für CTCs etabliert [32][33][34]. Dabei wurde bislang der epitheliale Marker Cytokeratin-20 (CK20) genutzt, um CTC-positive Patienten mittels einer CK20-RT-qPCR zu ermitteln [32].

1.3.2 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, in Zusammenarbeit mit den Firmen *ORGA Labormanagement GmbH* und *SynenTec*, ein neues Immunfluoreszenz-basiertes Nachweisverfahren für zirkulierende Tumorzellen zu entwickeln, welches die Detektion, Quantifizierung, morphologische Darstellung und – in Folge dessen – bessere Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen ermöglichen sollte. Des Weiteren wollten wir die klinische Bedeutung von CTCs am Beispiel von Patienten mit kolorektalem Karzinom genauer ergründen. Es handelte sich um eine Pilotstudie mit einem Patientenkollektiv von 44 Patienten.

Anhand von Blutproben dieser Patienten sollte das neue Nachweisverfahren auf seine Sensitivität geprüft werden und die Ergebnisse mit der in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten CK20-RT-qPCR [32][33][34] und mit klinischen Parametern (Tumorstadium, Therapieansprechen, Rezidivrate und Tumormarkern) verglichen werden.

Ein weiteres Ziel stellte die Verlaufsbeobachtung der Patienten dar. Durch die Analyse der Blutproben, die postoperativ in Abständen von 1, 3, 6, 9 und 12 Monaten gewonnen wurden, war es möglich, die Dynamik der CTC-Zahl im Blut der Patienten im Verlauf eines Jahres zu beobachten. In der Klinik für Allgemeine Chirurgie wurden zu diesem Zweck Blutproben von 44 Patienten mit kolorektalem Karzinom entnommen. Zum Vergleich werteten wir außerdem die Proben von 12 Gesundspendern, welche aus freiwilligen Probanden unseres Institutes rekrutiert wurden, mit demselben Verfahren aus. Die klinischen Daten aller Patienten wurden in einer zentralen Tumordatenbank hinterlegt und sind dort abrufbar.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
96-well Platten flat bottom	Sarstedt	#83.3924
BD Vacutainer CPT™ Röhrchen	BD	#362782
Safety-Multifly® 21G	Sarstedt	# 85.1638.235
S-Monovetten® 8,2 ml 9NC, 3,2 % Citrat	Sarstedt	#01.1606.001
Eppendorf Tubes 1,5 ml	Sarstedt	#72.690.001
Eppendorf Tubes 2 ml	Sarstedt	#72.691
Falcon 15 ml	Sarstedt	#62.554.502
Falcon 50 ml	Sarstedt	#62.547.254
Zählkammer Neubauer-improved	Marienfeld	#0640030
Spritze 50 ml (BD Plastikpak™)	BD	#300865
2,5 ml Combitips advanced®	Eppendorf	#0030089448
Sterilfilter (Filtropur 0,2 µm)	Sarstedt	#83.1826.001
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt	#86.1172
Zellkulturflaschen T25	Sarstedt	#83.3910.002
96 Fast PCR-Platte Halbrand	Sarstedt	#72.1981.202
Adhäsive qPCR-Folie	Sarstedt	#95.1999

2.2 Puffer, Reagenzien, Medien und Kits

Tabelle 5: Reagenzien und Medien

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
Chloroform	Merck	#1.02445.1000
Isopropanol	Merck	#1.09634.1000
Ethanol	J.T. Baker	#8025
DAPI-Lösung, Stock: 30 mM	Biolegend	#422801

Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking Solution)	Biolegend	#422301/2
Ficoll-Paque™Plus	GE Healthcare	#17-1440-03
Trypan-Blau-Lösung 0,4 %	Gibco	#15250061
Trypsin	Gibco	#15400054

Tabelle 6: Nährmedien

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
Dulbecco´s Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco	#22320-022
Fötales Kälberserum (FCS)	Pan Biotech	#930-1506
GlutaMAX (100x)	Gibco	#35050-061
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Gibco	#52400-025
Pyruvat	Gibco	#10569010
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Medium	Gibco	#52400-025

2.2.1 Zelllinien

2.2.1.1 Zelllinie MCF7

Die MCF7-Zelllinie (Michigan Cancer Foundation-7) wurde im Jahr 1975 aus dem Pleuraerguss einer kaukasischen 69-jährigen Frau isoliert, die unter einem Adenokarzinom der Mamma litt. Die Zellen wurden in DMEM full (bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5%) kultiviert.[43]

2.2.1.2 Zelllinie HT29

Die HT29-Zelllinie wurde im Jahr 1964 von J. Fogh aus dem kolorektalen Adenokarzinom einer 44-jährigen kaukasischen Frau isoliert. Kultiviert wurden sie in RPMI full (1x,+L-Glutamin+25 mM HEPES), supplimentiert mit 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat und 2 mM glutaMAX bei 5 % CO₂ und 37°C.[44]

Tabelle 7: Kommerzielle Puffer

Kommerzielle Puffer	Firma	Inhaltsstoffe	Katalognr.	Lagerung
<i>CTL-Wash</i> TM Puffer (10x)	CTL	Steriles H ₂ O, Aminosäuren, Vitamine, anorganische Salze, gesättigte + ungesättigte Fettsäuren, Insulin, humanes Albumin u.a. [45]	#CTLW-010	4°C
<i>Fixation Buffer</i>	Biologend	1 % Paraformaldehyd [46]	#420801	4°C
PBS ohne Mg, Ca	Gibco/Life-Technologies	Phosphat-gepufferte Salzlösung	#14190-094	RT
<i>Permeabilisation-Wash-Buffer</i> (10x)	Biologend	Saponine-haltige Lösung	#421002	4°C

Tabelle 8: Angesetzte Puffer

Bezeichnung	Vorbereitung	Information	Verwendung
Puffer A (PBS/ 1 % FCS)	45 ml PBS + 450 µl FCS	Verteilung auf 3x 15 ml Falcons, Endkonzentration 1:100; Lagerung bei 4°C über mehrere Wochen möglich	Absättigung unspezifischer Bindungsstellen an der Pipettenwand durch fötales Kälberserum
Puffer B (Waschpuffer 1:10)	2 ml CTL- Wash-Buffer (10x) + 18 ml PBS	Endkonzentration 1:10	Waschen der PBMCs und CTCs in einer nahrhaften, ausgeglichenen Lösung, um die Qualität der Zellen zu erhalten
Puffer C (Fixationspuffer 1:2)	0,6 ml Fixation	Endkonzentration 1:2	Fixierung der Zellen

	Buffer + 0,6 ml PBS		
Puffer D (Waschpuffer)	100 µl Perm- /Washpuffer (10x) + 5 µl FC-Block + 895 µl Aqua dest.		Waschen und Permeabilisierung der Zellen vor der Anfärbung mit immunfluoreszierenden Antikörpern, außerdem Blockierung von Fc- Rezeptoren, um eine falsch-positive Färbung zu verhindern
Puffer E (DAPI-Puffer) (vorverdünnt)	5 µl DAPI- Stock-Lösung (30mM) + 5 ml Aqua dest.	Endkonzentration 1:1000	Vorverdünnung
Puffer F DAPI-Puffer (vorverdünnt) + PBS	40 ml PBS + 400 µl Puffer E	Endkonzentration 1:10000	Färbung der Zellkerne mit DAPI

Tabelle 9: Antikörper und Färbelösungen

Lagerung der Antikörper bei 4°C.

Verwendete Antikörper	Firma	Katalognr.	Konzentration der Ausgangslösung	End- konzentration	Emissions- spektrum [nm]
Alexa Fluor® 488 anti-human CD45 Antibody (Mouse IgG1, κ)	Biolegend	#304017	200 µg/ml	1:5	488 nm
Alexa Fluor® 647 anti-human CD326 (EpCAM) Antibody (Mouse IgG2b, κ)	Biolegend	#324212	50 µg/ml	1:25	647 nm

Alexa Fluor® 647 anti-Cytokeratin (panreactive) Antibody (Mouse IgG1, κ)	Biolegend	#628604	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1:25	647 nm
Alexa Fluor® 647 anti-EGFR- Antibody (sc-120 AF647) (Mouse IgG2a, κ)	SantaCruz	#sc-120	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1:25	647 nm
Alexa Fluor® 647 anti-human CD340 (erbB2/HER-2) Antibody (Mouse IgG1, κ)	Biolegend	#324412	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1:25	647 nm

Tabelle 10: Kits

Kits	Firma	Katalognummer
peqGOLD RNAPure™	VWR	#30-1010
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Scientific™	#K1642
TaqMan® Universal Master Mix II (La- gerung: 2-8°C)	Applied Biosystems	#4440040
TaqMan® Gene Expression Assay – KRT20	Applied Biosystems	#HS0096603_M1
TaqMan® Gene Expression Assay – TBP	Applied Biosystems	#HS00427620_M1

2.3 Laborgeräte

Tabelle 11: Laborgeräte

Laborgeräte	Firma
NYONE [®]	SYNENTEC GmbH
PCR-Cycler StepOnePlus	Applied Biosystems
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Rotina420	Hettich
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge BIOFUGEfresco	Heraeus
Mikroskop Axiovert25	Zeiss
Thermocycler	Biometra

2.4 Zellkultur

2.4.1 Zellkulturmedien vorbereiten

50 ml FCS wurden durch einen 0.22 µm- Sterilfilter filtriert und anschließend zu einer 50 ml Mediumflasche gegeben (Endkonzentration 10 %). Je 5 ml Natriumpyruvat (Endkonzentration 1 mM) und GlutaMAX (Endkonzentration 2 mM) wurden ebenfalls zugegeben. Das supplimierte Medium wurde als DMEM/RPMI full bezeichnet.

2.4.2 Zellen splitten

Das Wachstum, die Konfluenz und die Vitalität der Zelllinien wurden regelmäßig unter dem Mikroskop evaluiert. Bei einer ungefähren Konfluenz von 90% wurden die Zelllinien geteilt (gesplittet). Dafür wurde zunächst das Nährmedium abgenommen, verworfen und mit 3 ml vorgewärmtem (37°C) PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml vorgewärmtem Trypsin beschichtet, die Flasche kurz geschwenkt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde untersucht, ob sich alle Zellen abgelöst haben. Wenn alle Zellen gelöst waren (nach ca. 5 min), wurde der Boden mit 8 ml Standard-Zellkulturmedium (inklusive FCS) gespült, sodass alle Zellen gelöst und vereinzelt wurden und die Enzymreaktion des Trypsins unterbrochen wurde. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und bei 330 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Ein Teil dieser Zellsuspension (1/6 für HT29, 1/5 für MCF7) wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit Medium aufgefüllt.

2.4.3 Auftauen neuer Zellen

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden kurz im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Da die Flüssigkeit Dimethylsulfoxid (DMSO) enthält, welches toxisch für die Zellen ist, muss hierbei zügig gearbeitet werden, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. Das entsprechende Zellkulturmedium wurde aufgewärmt und 9 ml in ein 50 ml Falcon vorgelegt. Die aufgetaute Zellsuspension aus dem Kryobehälter wurde dazu pipettiert. Anschließend wurden die Zellen bei 300 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 8 ml des entsprechenden Zellkulturmediums gelöst und vorsichtig resuspendiert, bis es komplett gelöst war. Schließlich wurde je nach gewünschter Endkonzentration das benötigte Volumen der Zellsuspension in die dafür vorbereiteten Zellkulturflaschen gegeben und mit Medium auf 5 ml aufgefüllt. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht adhärente oder tote Zellen zu entfernen.

2.5 Herstellung einer Positivkontrolle

Die Positivkontrolle bestand aus fixierten HT29-Zellen und wurde bei jeder Färbung mitgeführt. Sie diente später als Kontrolle, ob Färbung und Scan funktionierten.

Die HT29-Zellen wurden mit Accutase abgelöst, abzentrifugiert (330 g, 5 min) und in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden 100 μl der Zellsuspension mit 900 μl Puffer A gemischt. Zur Zellzählung wurden von dieser 1: 10 Verdünnung jeweils 6 x 10 μl in eine 96-Well-Platte pipettiert (6-fach Bestimmung), die bereits je 190 μl 1x Perm/Wash-Puffer + DAPI (1:100 000) enthielten. Die Zellen wurden abzentrifugiert (330 g/3 min). Die 96-Well Platte wurde anschließend im NYONE[®]-Gerät mit folgenden Einstellungen gescannt (Channel 1: Excitation: UV, Emission: Blue; Channel 2: Excitation: BF, Emission: Blue). Anschließend wurde mittels des *Nuclei-Count* Operators der YT-Software die Zellzahl pro Well bestimmt. Anschließend wurde aus dem Mittelwert der 6-fach Zählung die Zellzahl/ μl der Verdünnung berechnet, die entsprechende Zellzahl in einem Endvolumen von 3 ml Puffer A resuspendiert und mit 1 ml unverdünntem Fixationspuffer (Endkonzentration 1% Paraformaldehyd) für 10 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (330 g, 5 min) und anschließend mit Puffer A auf eine Endkonzentration von 100 Zellen/10 μl Zellsuspension eingestellt.

2.6 Detektion zirkulierender Tumorzellen mit dem NYONE®

2.6.1 Blutentnahme

Den Patienten wurden 8,2 ml Blut in Citrat-Monovetten abgenommen. Alle Patienten stimmten der Blutentnahme und Studienteilnahme schriftlich zu, ein positives Ethikvotum liegt vor (AZ: A110/99; s. Anhang 6.1). Bei einer direkten Venenpunktion wurde das erste Röhrchen dabei stets verworfen, um eine mögliche Verunreinigung durch epitheliale Hautzellen bei der Punktion auszuschließen. Wurde das Blut direkt aus einem Zugang oder zentralen Venenkatheter im Rahmen der OP-Einleitung abgenommen, entfiel dieser Schritt. Nach der Entnahme wurde das Röhrchen mehrfach geschwenkt und danach bei Raumtemperatur bewegt gelagert. Das Blut wurde anschließend innerhalb von vier Stunden weiterverarbeitet.

2.6.2 Vorbereitung

Zu Beginn wurde eine Transfer-Pipette mit 5 ml des vorbereiteten Puffer A aufgezogen. Dies diente dem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen, um ein etwaiges Anhaften von Zellen an der Pipettenwand zu verhindern. Die Pipette musste für mindestens 20 bis 30 min mit dem Puffer abgesättigt werden. Der restliche Puffer A wurde in ein neues 15 ml Falcon überführt und für später aufbewahrt. Das leere Röhrchen wird im Folgenden als „Röhrchen A“ bezeichnet. Dieses wurde durch den Puffer A ebenfalls abgesättigt, um ein unspezifisches Anhaften der Zellen an der Röhrchenwand zu minimieren.

2.6.3 Anreicherung und Waschen der Zellen

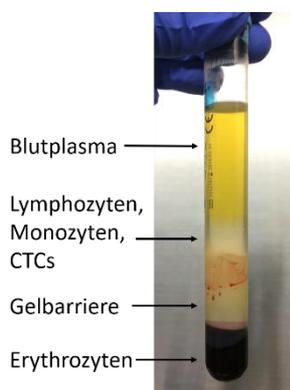


Abbildung 6: CPT-Röhrchen nach Zentrifugation [47]

Die Tumorzellen wurden mit Hilfe von BD Vacutainer® Mononuclear Cell Preparation Tubes (CPT™) angereichert. Diese Röhrchen enthalten Natriumcitrat als Antikoagulanzen und ein kombiniertes Dichtentrennsystem aus einem thixotropen Gel und FICOLL™ [47]. Die Blutabnahme kann theoretisch direkt in diese Röhrchen erfolgen. Da in unserem Krankenhaus die Standardblutentnahme aber mit einem Monovetten-System erfolgt, überführten wir nachträglich 8.2ml Citratblut in die CPT-Röhrchen. Die Röhrchen wurden anschließend fünfmal durch langsames Schwenken gemischt und zentrifugiert (1650 g, 20 min, RT). Dabei wurden die Blutbestandteile nach ihrer Dichte getrennt. Die mononukleären Zellen inklusive der CTCs befanden sich anschließend oberhalb der Gelphase (**Abbildung 6**)[48].

Nach erfolgter Auftrennung der Zellen wurde das CPT-Röhrchen mindestens fünffach gewendet, um die Zellen mit dem Plasma zu mischen und alle Zellen von der Wand des Röhrchens abzulösen. Danach wurde die Zellsuspension aus dem CPT-Röhrchen mittels der abgesättigten Transferpipette in das abgesättigte leere Röhrchen A überführt. Das CPT-Röhrchen wurde anschließend mit Hilfe der Transferpipette drei Mal mit Puffer B (jeweils 2 ml) gespült und alles ebenfalls in Röhrchen A gegeben, um sicherzustellen, dass keine Tumorzellen verloren gehen. Abschließend wurde das Röhrchen A mit Puffer B auf 15 ml aufgefüllt. Die Gelbarriere des CPT-Röhrchens sollte zum Schluss klar sein und keine Zellrückstände mehr enthalten.

Im Anschluss wurde das Röhrchen A zentrifugiert (330 g, 15 min, RT) und der Überstand danach vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer B resuspendiert. Das Falcon wurde danach mit Puffer B auf 10 ml aufgefüllt und abermals zentrifugiert (330 g, 10 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml Puffer B resuspendiert.

2.6.4 Fixierung der Zellen

Zur Fixierung der Zellen wurde der Puffer C verwendet. Er ist gut geeignet, um die Zellen zu fixieren, wenn danach eine Permeabilisierung der Zellen für anschließende Färbungen vorgenommen werden soll [46]. Die Zellsuspension in Röhrchen A wurde vorsichtig gevortext und dabei 1 ml von Puffer C tropfenweise hinzugefügt. Nach 10 min Inkubationszeit auf dem Roller wurde das Röhrchen abschließend, zur Konzentrationsverminderung des Fixierungspuffers, mit 8 ml Puffer A aufgefüllt. Die Zellen waren nun fixiert. Je nach Zeitpunkt des Probeneingangs wurde das Protokoll an dieser Stelle unterbrochen und die Zellen bei 4°C mehrere Tage (maximal vier) gelagert.

2.6.5 Permeabilisierung der Zellen

Das Zellpellet wurde aufgeschüttelt und anschließend 1,1 ml unverdünnter Perm-/Wash-Puffer (10x) dazu pipettiert. Der Puffer permeabilisiert die Zellen. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT

wurde die Zellsuspension zentrifugiert (330 g, 10 min). Das Pellet wurde in 900 μ l des vorbereiteten Puffer D resuspendiert.

Parallel wurde eine Positivkontrolle vorbereitet, um zu kontrollieren, ob Permeabilisierung und Färbung der Zellen funktionierten. Dazu wurden 5 μ l fixierte HT29-Zellen (s. 2.5; 5 μ l \approx 50 Zellen) in ein Eppi pipettiert und dann ebenfalls mit 900 μ l Puffer D aufgefüllt. Sowohl Röhrchen A, als auch die Positivkontrolle mussten anschließend für 15 min inkubieren, um eine gute Permeabilisierung der Zellen vor der anschließenden Färbung zu erreichen. Durch den im Puffer D enthaltenen Fc-Block wurden zudem Fc-Rezeptoren blockiert, um eine falsch-positive Färbung zu verhindern.

2.6.6 Färbung der Zellen

Die Antikörperlösung bestand aus jeweils 34 μ l Puffer D, AF488-markiertem anti-CD-45-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5 (10 μ l), 2 μ l anti-human CD326 (EpCAM) Antikörper (1:25), 2 μ l anti-Cytokeratin (pan reactive) Antikörper (1:25), 2 μ l anti-EGFR-Antikörper (1:25) und 2 μ l anti-human CD340 (HER-2) Antikörper (1:25), alle AF647-markiert (s. **Tabelle 9**). Nach Ablauf der 15-minütigen Inkubation mit Puffer D wurden je 50 μ l der Antikörper-Mischung in Röhrchen A und zur Positivkontrolle gegeben. Die Röhrchen wurden 30 min bewegt im Dunkeln inkubiert.

2.6.7 Überführung der Zellen in 96-Well-Platten

Kurz vor Ablauf der 30 minütigen Inkubationszeit wurde der Puffer F vorbereitet, welcher den Fluoreszenz-Farbstoff DAPI zum Anfärben der Zellkerne enthielt. Die Positivkontrolle wurde bei RT (300 g, 5 min) abzentrifugiert, das Pellet in 400 μ l des Puffer F resuspendiert und je 200 μ l der resuspendierten Positivkontrolle in das jeweils letzte Well (H12) von zwei 96-Well-Platten pipettiert. Im Folgenden wurde das Röhrchen A, das die gefärbten Blut-Zellen enthielt, insgesamt dreimal mit Puffer F bis auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt, die Zellsuspension nach jedem Mal mehrfach geschwenkt und gleichmäßig auf alle noch freien Wells verteilt. Am Ende der Verteilung enthielt jedes Well ein Volumen von 200 μ l Zellsuspension, bzw. Puffer F oder Positivkontrolle. Vor der Messung im NYONE[®] wurden die Platten bei RT zentrifugiert (330 g, 10 min).

2.6.8 Messung im NYONE[®]-Zellimager und Auswertung

Die Platten wurden anschließend im NYONE[®]-Cellimager gemessen. Das Messprotokoll war zuvor an unserem Institut in einer Kooperation mit den Firmen ORGA Labormanagement GmbH und SYNENTEC GmbH und dem Institut für Klinische Chemie des UKSH Kiel entwickelt worden. Zunächst erfolgte ein Vor-Scan im roten Kanal, da die Tumorzellen rot markiert worden waren. Alle roten Events wurden von der zum NYONE[®] gehörigen YT-Software nach definierten

Parametern erkannt und markiert, Automatisiert wurde anschließend eine region of interest (ROI) um diese Events herum in vier Kanälen gescannt (UV/blau, blau/grün, rot/rot, Hellfeld/blau). Anschließend erkannte die Virtual Cytoplasm 2F-Applikation der YT-Software automatisch nach bestimmten Kriterien die Zellkerne (blaue Fluoreszenz) und analysierte, ob in einem definierten Kreis um die Zellkerne eine grüne oder rote Fluoreszenz vorlag. Nur Events, deren DAPI-Signal die Kriterien für Zellkerne erfüllte und deren Fluoreszenzsignale einen gewissen *Threshold* im grünen Kanal unter- bzw. im roten Kanal überschritten, kamen als Tumorzelle in Betracht. Diese Events wurden durch den Anwender in der Software einzeln betrachtet und ihre Morphologie noch einmal visuell überprüft. Nur Events, die eine Zellmorphologie aufwiesen, wurden letztendlich als CTCs gewertet.

2.7 Detektion zirkulierender Tumorzellen mit dem NYONE[®]-Verfahren – *Spiking*

Das *Spiking* diente der Validierung des Nachweisverfahrens mit dem NYONE[®]-*Cellimager*. Ziel war es, eine definierte Anzahl zuvor hinzugefügter HT29- bzw. MCF7-Zellkultur-Tumorzellen in der Blutprobe eines Gesundspenders mit Hilfe der neuen Methode zu detektieren.

2.7.1 Zellen ablösen und zählen

Zu Beginn des *Spiking*-Versuchs mussten die benötigten Tumorzellen abgelöst und gezählt werden. Der Ablauf entsprach der Herstellung der Positivkontrolle, allerdings wurde der letzte Fixierungsschritt ausgelassen, um der Blutprobe vitale Tumorzellen hinzuzufügen.

2.7.2 Blutentnahme

Einem Gesundspender wurden 8,2 ml Citratblut abgenommen. Das Blut wurde anschließend bewegt bei RT gelagert und innerhalb von 4 h weiterverarbeitet.

2.7.3 *Spiking*, Anreicherung und Waschen der Tumorzellen

Für die weitere Verarbeitung wurde das Blut in CPT-Röhrchen überführt (s. 0). Anschließend wurde der Blutprobe das Volumen der HT29 bzw. MCF7-Zellsuspension hinzugefügt, das ca. 100 Tumorzellen enthielt. Nach dem Hinzufügen der Tumorzellen (*Spiking*) wurde das Blut im CPT-Röhrchen zentrifugiert (1650 g, 20 min) und die mononukleären Zellen oberhalb der Gelphase angereichert.

Ab diesem Schritt entsprach das weitere Vorgehen der Verarbeitung der Patientenproben, wie bereits in Abschnitt 2.6 beschrieben. Zudem wurde das gleiche Volumen der Zellsuspension in je sechs Wells einer 96-Well Platte überführt, die bereits je 190 µl 1x Perm/Wash-Puffer + DAPI

(1:100 000) enthielten. Die Zellzahl wurde mittels des *Nuclei-Count* Operators der YT-Software bestimmt wie unter (Positivkontrolle) (s. 2.5) beschrieben. Nach der Messung im NYONE® wurde berechnet, wie viel Prozent der zuvor hinzugefügten Tumorzellen in der Probe detektiert wurden.

2.7.4 Asservierung von klinischen Proben für die Biomaterialbank Ficoll-Zentrifugation und Zellisolierung

Das Blut wurde 1:3 mit RPMI verdünnt. Die Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der mononukleären Zellen wurde mit dem Ficoll-Paque™Plus (*GE Healthcare*) durchgeführt. 15 ml Ficoll wurden in ein 50 ml Falcon gegeben und danach maximal 30 ml Volumen der verdünnten Blutzellen vorsichtig auf ein Ficoll-Kissen geschichtet. Anschließend wurde das Röhrchen 40 min mit reduzierter Beschleunigung zentrifugiert. Die Interphase wurde anschließend abgenommen, sie enthielt alle mononukleären Zellen inklusive eventueller Tumorzellen. Sie wurde in ein steriles 50 ml-Falcon überführt und die Zellen 1:2 mit kaltem PBS verdünnt. Anschließend wurde das Röhrchen abermals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach der Zentrifugation wurde auf Eis weitergearbeitet. In 2 ml kaltem PBS wurde das Pellet resuspendiert, bevor die PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) in einer Neubauer-Zählkammer gezählt wurden.

2.7.5 RNA-Isolierung

2.7.6 Die Isolierung der RNA aus den mittels FICOLL isolierten PBMC's erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers der Lysis-Reagenz (*PeqGOLD RNA-Pure; PEQLAB Biotechnologie, Erlangen*). Die RNA-Extraktion im Anschluss an die Homogenisierung bestand aus vier Schritten, der Phasentrennung, der RNA-Präzipitation, dem Waschen und Lösen der RNA sowie dem Messen der RNA-Konzentration mit dem NanoDrop 2000c Spectrophotometer (VWR Peqlab).cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* der Firma *ThermoScientific™* verwendet und die cDNA entsprechend den Empfehlungen des Herstellers aus jeweils 3 µg RNA synthetisiert. Das Produkt der cDNA-Synthese wurde bei -20°C oder bei längeren Lagerungszeiten bei -70°C gelagert.

2.8 CK20-RealTime-qPCR

Die qPCR wurde mit dem TaqMan Universal Master Mix II (Life Technologies, Darmstadt, Germany) und dem StepOnePlus (Life Technologies) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Für jede Probe wurden 20 μl des Reaktionsmixes vorbereitet, indem 10 μl *TaqMan*[®] *Universal Master Mix II* (2x), 1 μl *TaqMan*[®] *Assay* (20x) und 200 ng *cDNA* in ein steriles 1,5-2 μl Eppi pipettiert und mit RNase-freiem Wasser auf 20 μl Gesamtvolumen aufgefüllt wurden. Die genutzten Primer waren Teil von dem *TaqMan Gene Expression Assay*: KRT20 Hs00966063_m1 (CK20 Primer), TBP Hs00427621_m1 (TBP Primer), EGFR Hs01076078_m1 (EGFR Primer), EpCAM Hs00901885_m1 (EpCAM Primer) (*Life Technologies*). Von jeder Probe wurden drei Zyklen durchgeführt. Der durchschnittliche Schwellenwert aller drei Zyklen wurde als Grundlage der Berechnungen genutzt. Für die C_T -*method*, auch bekannt als $2^{-\Delta\Delta C_T}$ *method* [49], diente das TATA bindende Protein (TBP) als Referenz für das Level der Genexpression.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Detektion von CTCs mit dem NYONE® Cellimager

Zur Detektion der zirkulierenden Tumorzellen nutzten wir die Expression spezifischer epithelialer Antikörper und adressierten diese mittels eines Immunfluoreszenz-basierten Nachweisverfahrens. Die Fraktion der mononukleären Zellen wurde aus dem Patientenblut isoliert, fixiert, permeabilisiert und anschließend mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern angefärbt, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, bevor die Analyse mit dem Cellimager NYONE® erfolgte. Der von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Ablauf der Untersuchung ist in **Abbildung 7** noch einmal zusammenfassend dargestellt.

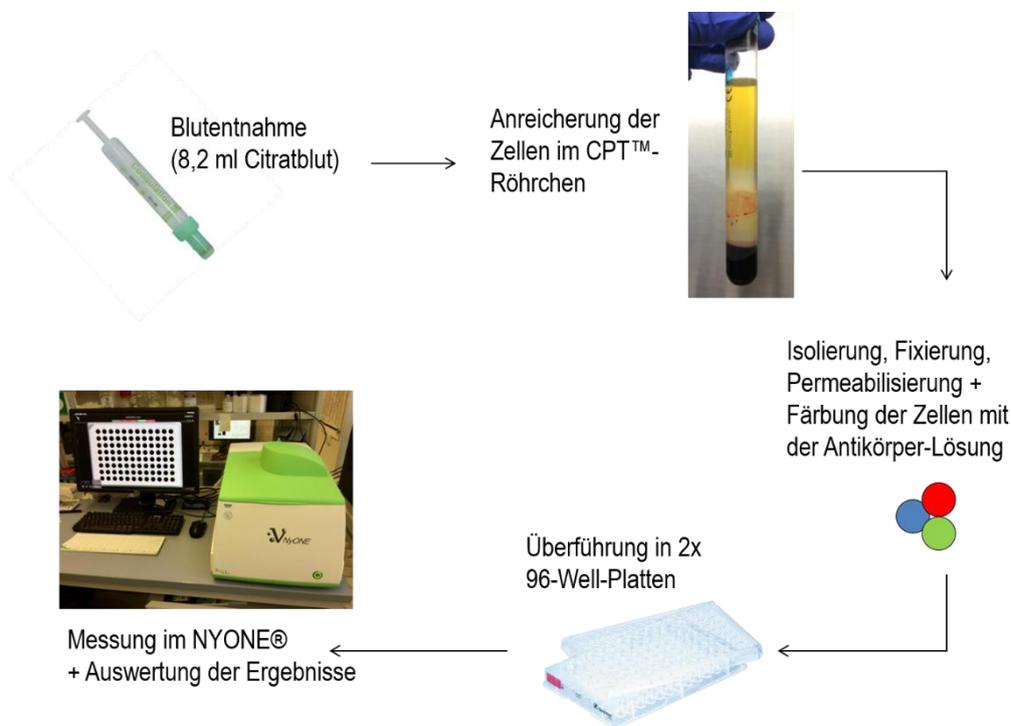


Abbildung 7: Detektion von CTCs mit dem NYONE®

8,2 ml Citratblut wurden aufgereinigt, die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit der Antikörper-Lösung (CD45, EpCAM, Her2, EGFR, CK) sowie DAPI angefärbt. Die Messung erfolgte im automatisierten *Cellimager*, dem NYONE®. Die Ergebnisse wurden vom Anwender anschließend visuell überprüft.

Mit dem NYONE® wurde zunächst ein Vorscan im roten Kanal durchgeführt (**Abbildung 8A**). Automatisch wurde analysiert, in welchen Wells rote Events registriert wurden (**Abbildung 8B**) und in diesen Wells wurde im Bereich des gefundenen Events ein selektiver Nachscan in den anderen Farbkanälen durchgeführt (**Abbildung 8C**). Die zugehörige YT-Software wertete die Bilder automatisch aus (**Abbildung 8D**). Events, die einen Zellkern besaßen (d.h. positiv für DAPI

waren) sowie eine rote, aber keine grüne Fluoreszenz aufwies, konnten anschließend vom Untersucher in der Software noch einmal visuell überprüft werden. Auf diesem Wege wurde jedes positive Ereignis noch einmal überprüft, bevor es als CTC in die Auswertung einging. Falsch positive Ereignisse, im Sinne von Zelltrümmern oder Fibrinfäden, die den roten Fluoreszenzfarbstoff aufnahmen und daher als rotes Event registriert wurden, konnten auf diesem Wege erkannt und eliminiert werden und führten nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse.

Das NYONE[®] war in der Lage, Zellen automatisiert zu erkennen, zu quantifizieren und morphologisch abzubilden. Es war also gelungen, eine zuverlässige und leicht praktikable Methode zur Detektion zirkulierender Tumorzellen zu entwickeln. Die Methode eines Vorscans lediglich im roten Kanal und eines anschließenden Nachscans nur in kleinen Bereichen der positiven Wells erbrachte einen erheblichen Zeitvorteil, da sich die Betrachtung jedes einzelnen Wells unter dem Mikroskop erübrigte.

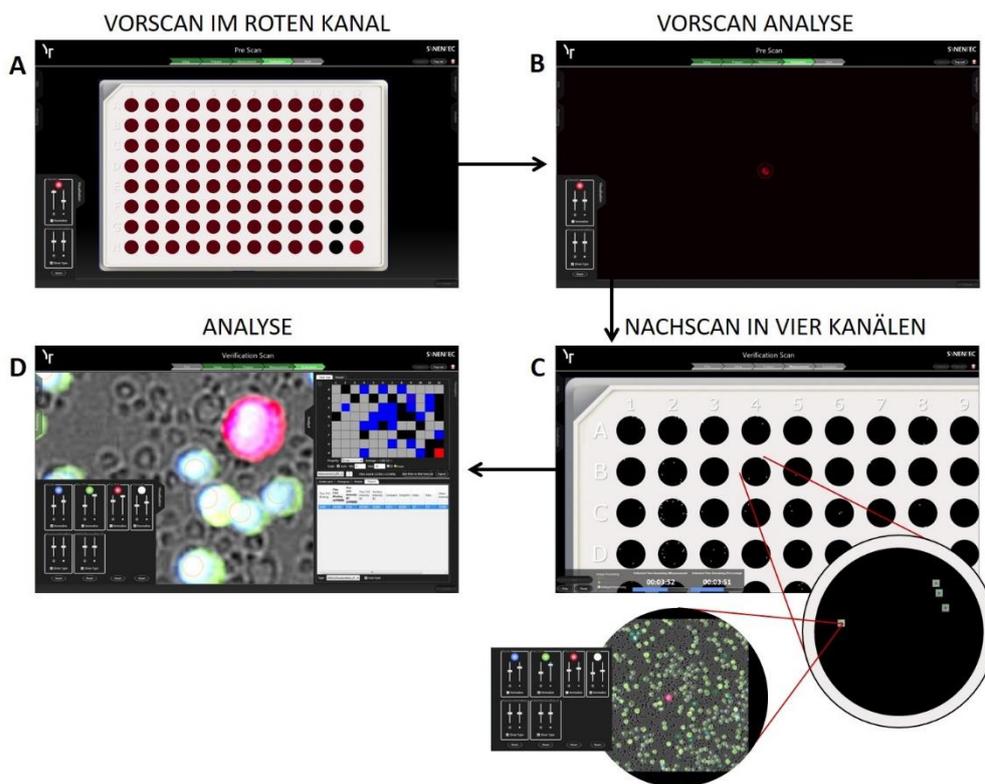


Abbildung 8: Vorgehensweise des NYONE[®]

Das NYONE[®] arbeitete vollständig automatisiert. In einem ersten Schritt wurde ein Vorscan im roten Kanal durchgeführt (A). Zunächst wurden alle roten Ereignisse markiert (B) und nur die Bereiche um diese Ereignisse der entsprechenden Wells anschließend in allen vier Farbkanälen nachgescannt (rot, grün, blau, Hellfeld) (C). Alle Ereignisse, die einen Zellkern aufwiesen und rot aber nicht grün waren (CTCs) wurden grau umkreist, alle Ereignisse mit Zellkern und grüner aber nicht roter Fluoreszenz (Lymphozyten) orange. Die Analyse zeigte anschließend, wie viele rote Zellen gefunden wurden und in welchen Wells (D).

3.2 Etablierung der Methode anhand von *Spiking*-Experimenten

3.2.1 Effektivität des NYONE[®] beim Nachweis von CTCs

Um die Funktionalität und Detektionsrate des neuen Immunfluoreszenz-basierten Nachweisverfahrens zu überprüfen, führten wir mehrere *Spiking*-Experimente durch. Den Blutproben gesunder Probanden wurden zuvor errechnete 100 Tumorzellen aus der Zellkultur hinzugefügt. Die Blutprobe wurde anschließend auf die gleiche Weise aufgereinigt, fixiert und gefärbt (2.7) wie die Proben der Patienten mit kolorektalem Karzinom (2.6). Untersucht werden sollte, welcher Anteil der zuvor ins Blut pipettierten Tumorzellen mit dem NYONE[®]-Verfahren detektiert werden konnte. Als Referenzanzahl der Tumorzellen wurde jeweils die gleiche Menge Zellsuspension, die ins Patientenblut gespikt wurde, in sechs Wells einer 96-Well-Platte pipettiert und gezählt. Der Mittelwert der Zellzählung diente als Kontrollwert (2.7.1). Insgesamt wurde das Experiment siebenmal wiederholt (Abbildung 9).

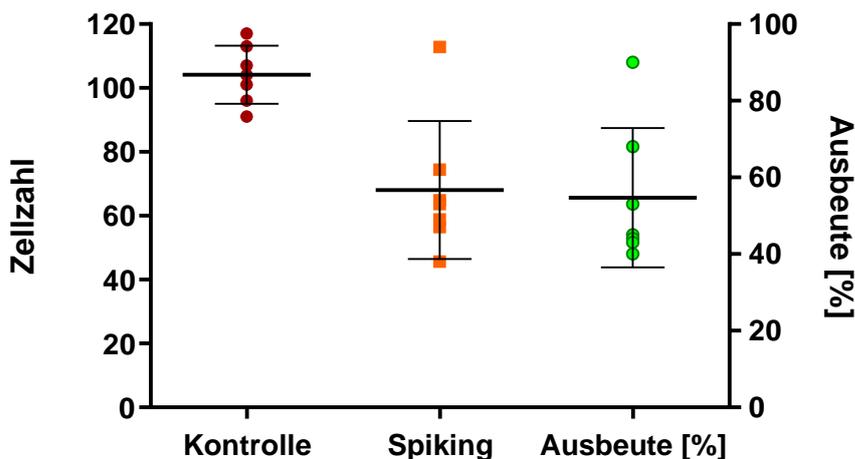


Abbildung 9: Durch *Spiking*-Experimente ermittelte Wiederfindungsrate (Ausbeute) von MCF7 und HT29 Zellkulturzellen

Je 10 μ l Tumorzellsuspension mit ca. 100 Tumorzellen wurden entweder direkt in eine 96-Well-Platte (Kontrolle) oder in 8,2 ml Blut von gesunden Probanden (*Spiking*) pipettiert. Aus der Quantifizierung der Zellen in der Kontroll-Platte mit dem NYONE[®] ergab sich eine Referenzzellzahl. Das Blut wurde mit dem NYONE[®]-Verfahren analysiert und die CTC-Zahl ermittelt. Die Zahl der im Blut detektierten CTCs wurde nach Abschluss der Messung mit der Referenzzellzahl verglichen. Jeder Punkt stellt das Ergebnis eines der insgesamt sieben *Spiking*-Versuche dar. Die Wiederfindungsrate (Ausbeute) ist in Prozent dargestellt und betrug 54,7% (Mittelwert).

Die Wiederfindungsrate mit dem NYONE[®] („Ausbeute“: Anzahl detektierter Tumorzellen im Blut/Messung im Verhältnis zur Referenzzellzahl der Positivkontrolle) gemittelt über alle Experimente betrug dabei 54,7 % (SD 17,99).

3.2.2 Beispielmessungen zweier *Spiking*-Experimente

In **Abbildung 10** sind zwei beispielhafte Auswertungen von *Spiking*-Experimenten mittels des NYONE[®] dargestellt. Pro Spalte ist sechs Mal derselbe Bildausschnitt eines Wells, in dem eine Tumorzelle detektiert wurde, in den verschiedenen Farbkanälen des NYONE[®] abgebildet. In **Abbildung 10.1A** und **Abbildung 10.2A** sind alle mit DAPI blau angefärbten Zellkerne zu sehen. In **Abbildung 10.1B** und **Abbildung 10.2B** folgt der grüne Kanal, der alle Leukozyten zeigt, die sich durch an Alexa488-gekoppelte Anti-CD45-Antikörper grün darstellen. Im roten Kanal

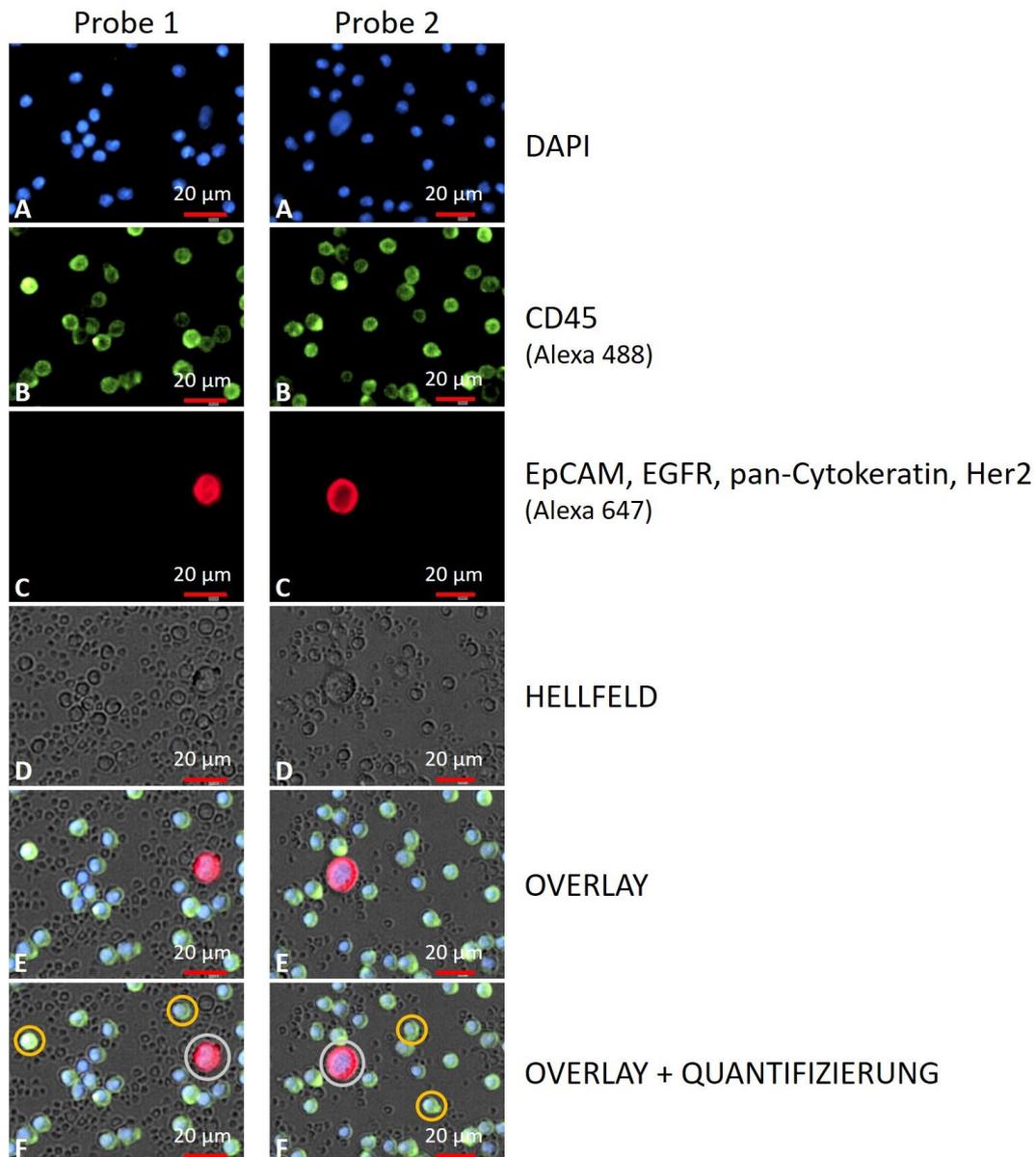


Abbildung 10: HT29-Zellen (nach *Spiking*) im Blut von Gesundspendern (10-fach Objektiv)
Die im *Spiking* hinzugefügten HT29-Zellen wurden fixiert, gefärbt und vom NYONE[®]-Cellimager automatisiert analysiert, quantifiziert und bildlich dargestellt. Die Bilder in den Spalten zeigen jeweils denselben Bildausschnitt in den unterschiedlichen Farbkanälen des NYONE[®] (**A-C**). Im letzten Auswertungsschritt (**F**) des Geräts wurden alle roten Events (CTCs) grau umkreist, alle Leukozyten orange (hier nur zwei exemplarisch umkreist).

(**Abbildung 10.1C** und **Abbildung 10.2C**) ist ausschließlich die rot fluoreszierende Tumorzelle zu sehen. Im Hellfeld-Kanal (**Abbildung 10.1D** und **Abbildung 10.2D**) lässt sich die Morphologie der Zellen erkennen. In den Bildern **Abbildung 10E** und **Abbildung 10F** sind alle vier Farbkanäle übereinander gelegt abgebildet. In den **Abbildung 10.1F** und **2F** ist jeweils die Markierung der Zellen nach erfolgter Quantifizierung zu sehen – die Tumorzellen wurden vom NYONE[®] automatisch mit einem grauen Kreis umrandet, die Leukozyten mit einem orangenen Kreis (nur exemplarisch dargestellt).

In **Abbildung 11** sind exemplarisch einige der mit dem NYONE[®] detektierten Tumorzellen im *Spiking*-Versuch in einem kleineren Bildausschnitt dargestellt. Die Tumorzellen stellten sich deutlich rot fluoreszierend dar, zeigten eine variierende Kern-Plasma-Relation und waren CD45-negativ. Trotz variierender Kern-Plasma-Relationen, war das NYONE[®] in der Lage, die Tumorzellen auch als solche zu erkennen. Der Durchmesser der Zellen betrug zwischen 14-19 μm und unterschied sich somit vom deutlich kleineren Durchmesser der ebenfalls sichtbaren Leukozyten.

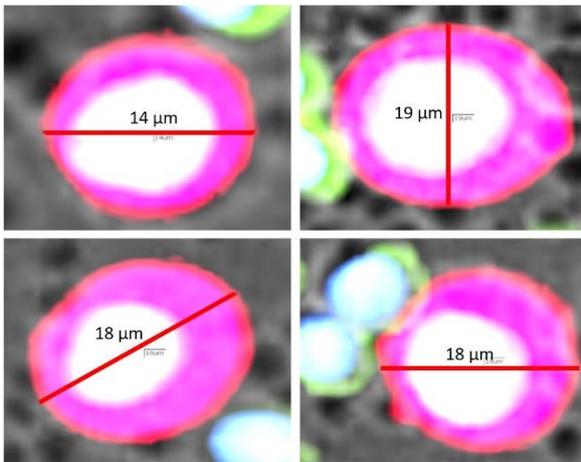


Abbildung 11: Bilder gespikter HT29-Zellkulturtumorzellen (10-fach Objektiv)

Alle Tumorzellen wurden mittels des beschriebenen Antikörper-Cocktails rot angefärbt. Der Durchmesser der Tumorzellen lag zwischen 14-19 μm .

3.3 Etablierung eines klinischen Kollektivs von Patienten mit kolorektalen Karzinomen

Zur klinischen Validierung des NYONE[®]-Nachweisverfahrens für CTCs wurden prospektiv von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom Blutproben gesammelt und mit dem NYONE[®]-Verfahren hinsichtlich des Nachweises für CTCs ausgewertet. Die primäre Fragestellung war hier die mögliche Korrelation zwischen Tumorlast (im Sinne des Stadiums – klassifiziert nach UICC) und der Häufigkeit der CTCs. Des Weiteren wurden alle Behandlungen (neo-/adjuvante (Radio-)

Chemotherapie), welche die Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung erhielten, ebenfalls erfasst, um mögliche Zusammenhänge oder Korrelationen zu erkennen.

Außerdem untersuchten wir die Blutproben mit dem in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten, CK20-RT-qPCR-basierten Verfahren [33][34] (s. Abschnitt 1.3.1), um die Ergebnisse beider Nachweismethoden nach Abschluss der Studie vergleichen zu können.

3.4 Eigenschaften des Patienten- und Gesundspenderkollektivs

Im Rekrutierungszeitraum von 12 Monaten konnten insgesamt 44 Patienten mit einem histologisch gesichertem kolorektalen Karzinom in die Studie eingeschlossen werden (**Tabelle 12**) – 32 (73%) davon mit Kolonkarzinom, 12 (27%) mit Rektumkarzinom. 26/44 (59%) der Patienten/-innen waren Männer, 19/44 (41%) Frauen. Das Durchschnittsalter lag bei 70 Jahren (46-91 Jahre). 17 Patienten (40%) befanden sich im UICC-Stadium III, 12 Patienten (27%) im Stadium I, 9 Patienten (20%) im Stadium II und 5 Patienten (11%) im Stadium IV. 7 Probanden (16%) erhielten vor der Operation bereits eine neoadjuvante Therapie, davon 6 Patienten mit Rektumkarzinom und ein Patient mit Kolonkarzinom, 14 Patienten (32%) postoperativ eine adjuvante Behandlung. Bei einem Patienten konnte nach Durchführung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie kein Primärtumor mehr nachgewiesen werden, weshalb er in **Tabelle 12** als UICC-Stadium 0 aufgeführt wird. Die primäre Blutentnahme erfolgte direkt vor der Tumorresektion. Anschließend erfolgten die weiteren Blutentnahmen nach folgendem Schema: einen, drei, sechs, neun und zwölf Monate postoperativ (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.).

Die Patienten wurden nach der OP im Mittel 4,27 Monate (0-12 Monate) verlaufskontrolliert.

Als Kontrollkollektiv wurde zwölf gesunden Probanden verschiedenen Alters Blut abgenommen.

Die Eigenschaften des Gesundspender-Kollektivs sind in **Tabelle 13** aufgeführt.

Tabelle 12: Eigenschaften des Patientenkollektivs

GESCHLECHT	N (ANZAHL)	ANTEIL (%)
Männer	26	59%
Frauen	18	41%
Total	44	100%
Alter (Jahre)	69,2 (46-91)	
TYP		

Kolon	32	73%
Rechts	15	47%
Links	16	50%
Transversum	1	3%
Rektum	12	27%
STADIUM (UICC)		
0 (nach neoadjuvanter Behandlung)	1	2%
I	12	27%
II	9	20%
III	17	40%
IV	5	11%
NEOADJUVANTE BEHANDLUNG		
Ja	7 (6 Rektum/1 Colon)	16%
Nein	37	84%
ADJUVANTE BEHANDLUNG		
Ja	14	32%
Nein	30	68%

Tabelle 13: Eigenschaften des Kollektivs der Gesundspender

GESCHLECHT	N (ANZAHL)	ANTEIL (%)
Männer	6	50%
Frauen	6	50%
Total	12	100%
Alter (Jahre)	45,5 (27-61)	

Im Vergleich zu **Abbildung 10**, welche die Detektion von Zellkultur-Tumorzellen im Rahmen der *Spiking*-Experimente zeigt, sind in **Abbildung 12** beispielhaft Bilder zweier Analysen von Patientenproben mit dem NYONE[®] zu sehen.

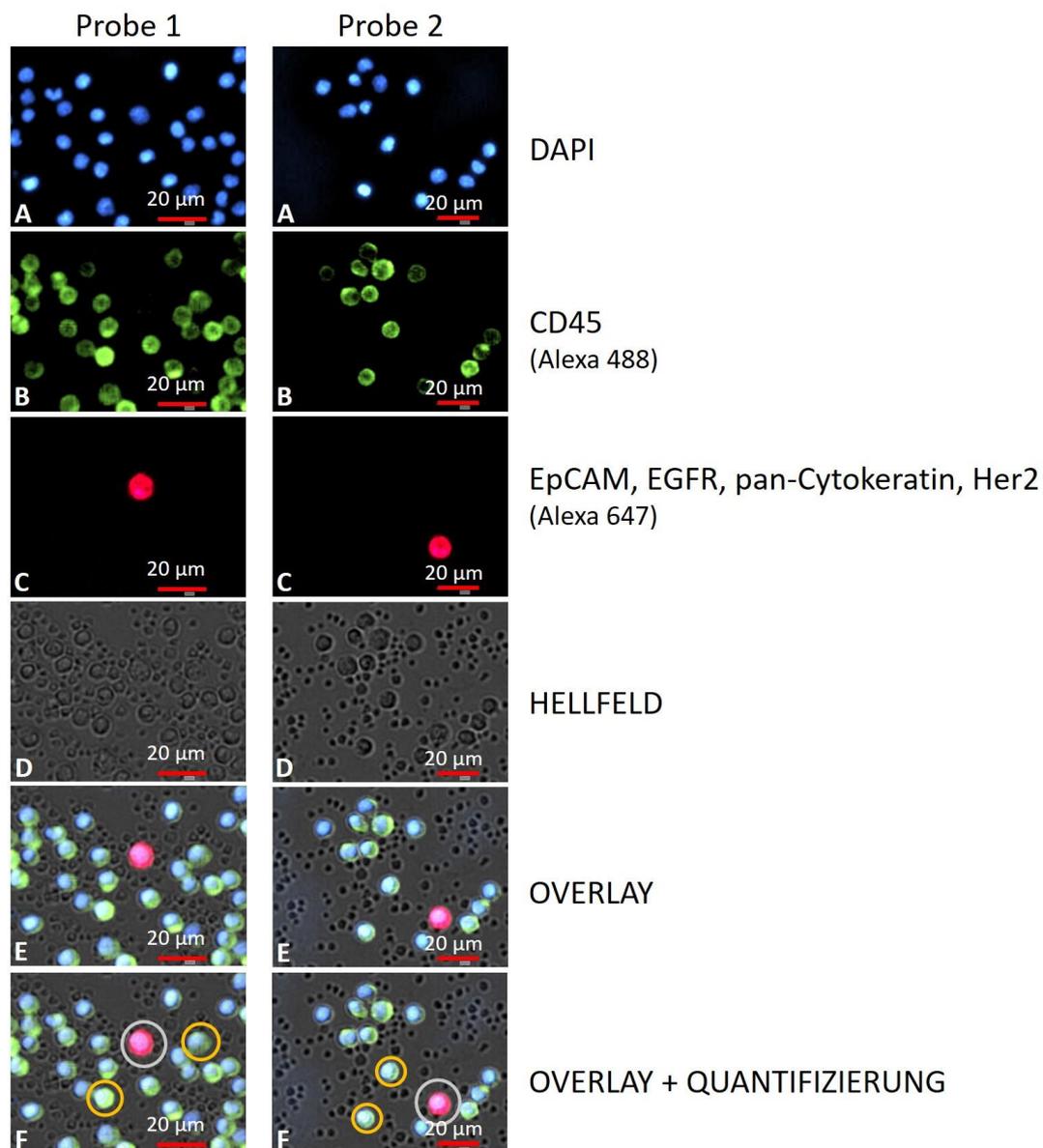


Abbildung 12: Bilder von CTCs in Blutproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom nach der Auswertung mit dem NYONE[®] Cellimager (10-fach Objektiv)

Die Bilder in den Spalten zeigen jeweils denselben Bildausschnitt in den unterschiedlichen Farbkäna len des NYONE[®] (A-C). Im Hellfeld wird die Zellmorphologie erkennbar (D). Im letzten Auswertungsschritt des NYONE[®] wurden alle roten Events mit einem grauen Kreis umrandet, alle grünen Events mit einem orangenen Kreis (F) (hier nur zwei exemplarisch umkreist).

Abbildung 13 zeigt vergrößerte Aufnahmen von CTCs, die aus dem Blut verschiedener Patienten isoliert wurden. Die rot angefärbten CTCs wiesen einen Durchmesser zwischen 9-12 μm auf und waren damit kleiner als die Tumorzellen aus der Zellkultur, die für die *Spiking*-Experimente verwendet wurden (vgl. **Abbildung 11**).

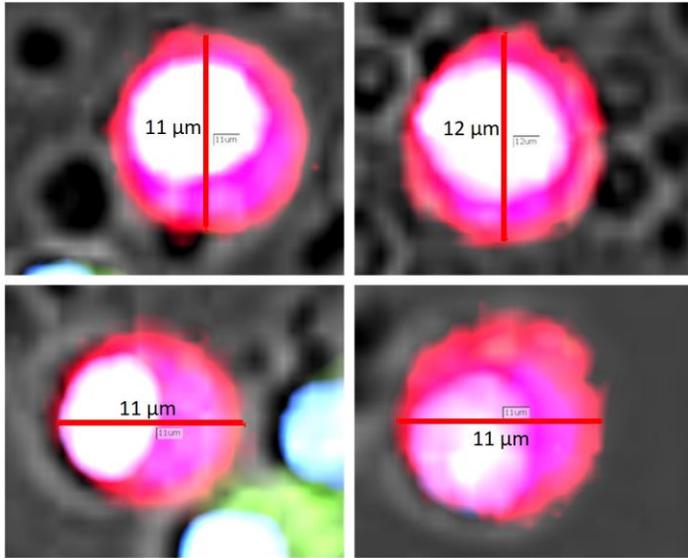


Abbildung 13: Bilder von CTCs im Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom (10-fach Objektiv)

Aus 8,2 ml Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden CTCs mit dem NYONE[®]-Verfahren detektiert, analysiert und quantifiziert. Der Durchmesser der Tumorzellen lag zwischen 9 und 12 µm.

Während der Analyse konnte es zu falsch positiven Ereignissen durch die Anfärbung von Zelltrümmern, -aggregaten oder kleinsten Fremdpartikeln, die während der Aufbereitung der Proben in die Platten geraten konnten, mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff kommen. Mittels manueller Kontrolle jedes vom NYONE[®] als CTC registrierten Ereignisses durch den Untersucher wurden diese unmittelbar erkannt und eliminiert. Die Auswertungsergebnisse wurden auf diese Weise nicht verfälscht und falsch positive Ereignisse frühzeitig aus der Auswertung ausgeschlossen. Beispiele zweier falsch positiver Events sind in **Abbildung 14** dargestellt.

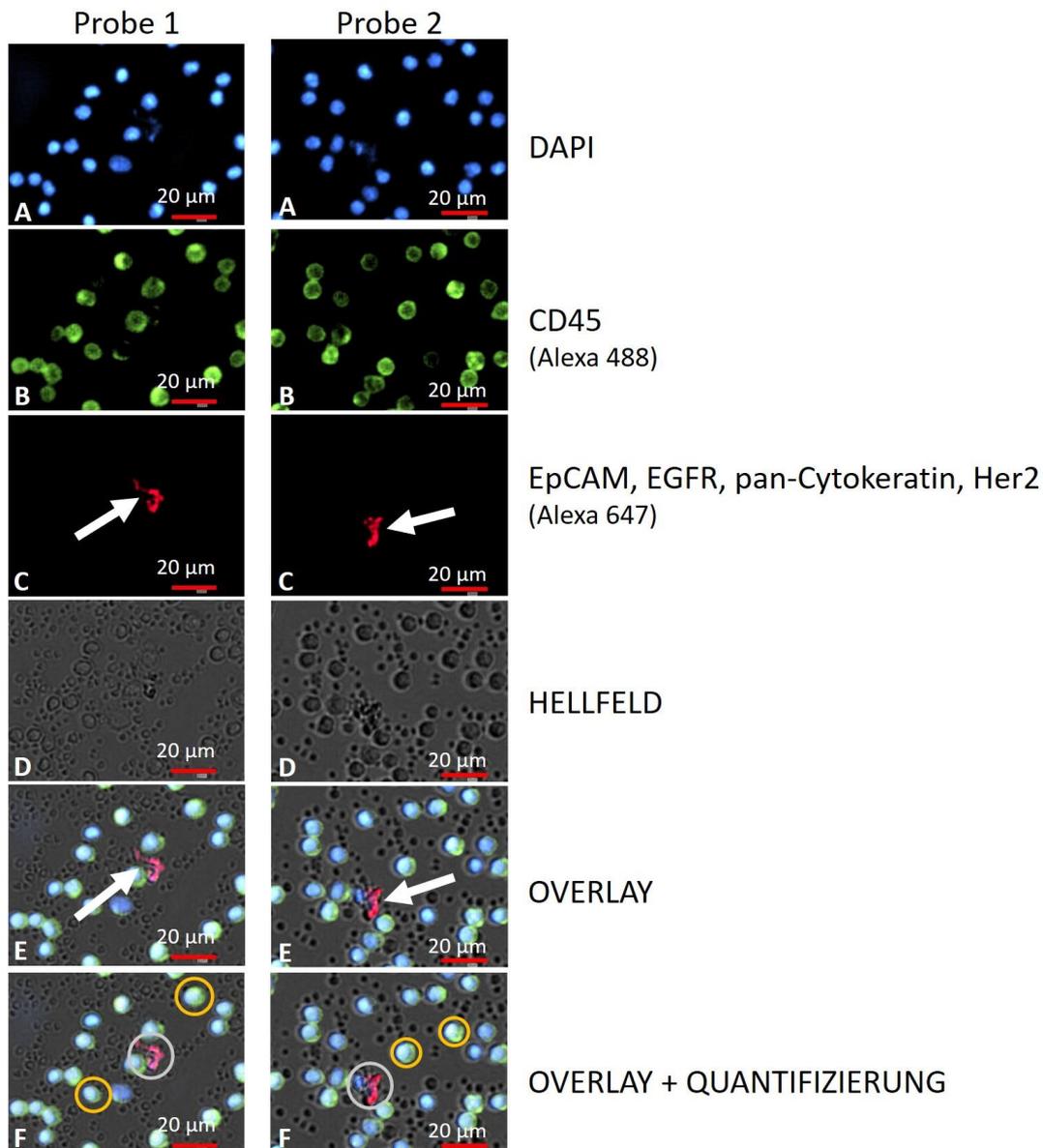


Abbildung 14: Falsch positive Events im NYONE[®] hervorgerufen durch Zelltrümmer oder Fremdpartikel (10-fach Objektiv)

Die Bilder in den Spalten zeigen jeweils denselben Bildausschnitt in den unterschiedlichen Farbkä-
nalen des NYONE[®] (A-C). Im letzten Auswertungsschritt des NYONE[®] wurden alle roten Events
grau umkreist, alle Leukozyten orange (F) (exemplarisch dargestellt).

Zelltrümmer, Zellaggregate, Fibrinfäden oder kleine Fasern (s. weiße Pfeile) konnten „falsch posi-
tive“ rote Signale hervorrufen, die vom NYONE[®] als CTCs gewertet wurden.

Nach der Betrachtung der absoluten CTC-Zahlen/8,2 ml Blut wurde zusätzlich die absolute Anzahl von Tumorpatienten ausgewertet, die zum Zeitpunkt der Operation CTC-positiv oder CTC-negativ getestet wurden (**Abbildung 16A**). Im UICC Stadium I der Erkrankung wurden 72,7 % (8/11) der Patienten negativ auf CTCs getestet. Im UICC Stadium II lag die Detektionsrate von CTCs bei 50 % (4/8 Patienten), im UICC Stadium III lag die Detektionsrate von CTCs bei 35,7 % (5/14). Die Detektionsrate im metastasierten UICC Stadium IV lag bei 50 % (**Abbildung 16B**). Aufgrund der geringen Patientenzahl wurden die UICC Stadien I-III zusammengefasst und dem metastasierten UICC Stadium IV gegenübergestellt. Die Detektionsrate von CTCs mit dem NY-ONE[®]-Verfahren betrug in den UICC Stadien I-III 36,4 % (12/33), wohingegen bei 50 % (2/4) aller Patienten im UICC Stadium IV CTCs nachgewiesen wurden (**Abbildung 16C**). Der Anteil CTC-positiver Patienten war im UICC Stadium IV höher als in den früheren Krankheitsstadien, jedoch nicht signifikant ($p=0,621$, Mann-Whitney-Test).

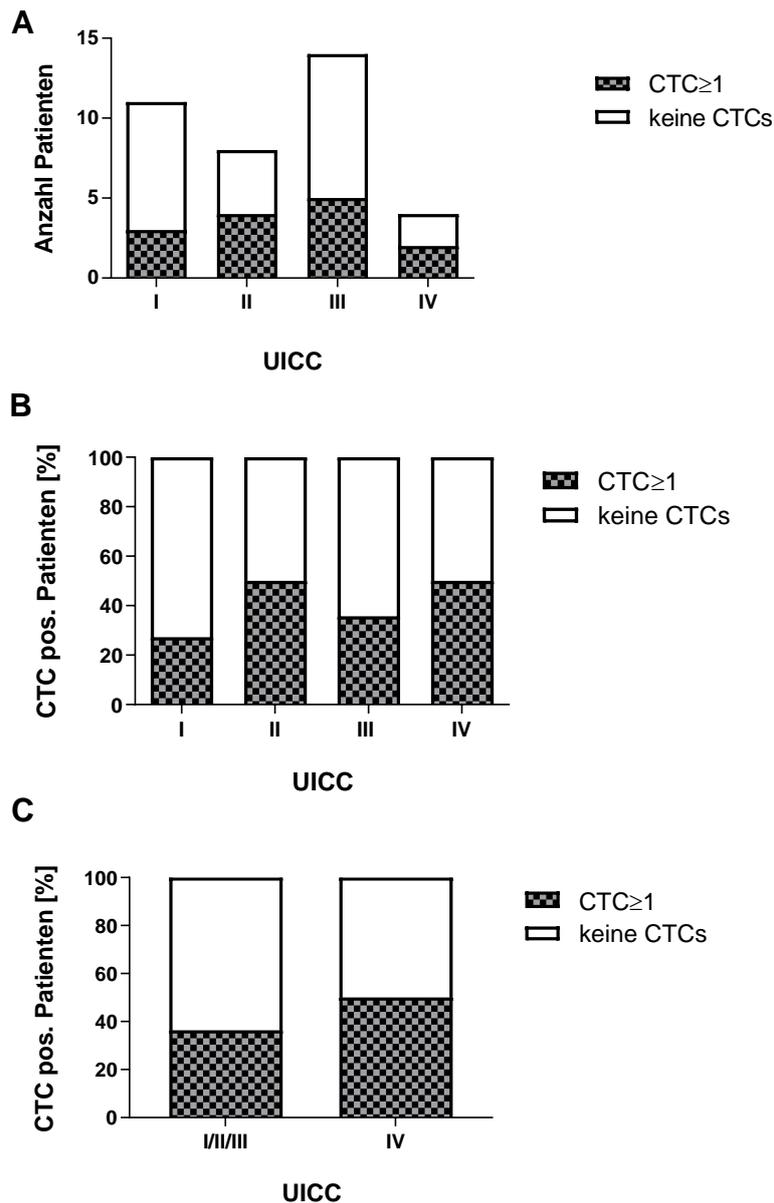


Abbildung 16: Stadienabhängige Detektion von CTCs mit dem NYONE[®]-Verfahren bei Patienten mit kolorektalem Karzinom zum OP-Zeitpunkt

- A) Anzahl CTC-positiver Patienten
- B) CTC-Detektion abhängig vom Tumorstadium in Prozent (UICC I-IV)
- C) CTC-Detektion in Abhängigkeit vom Tumorstadium (UICC I-III vs. UICC IV)

A) Übersicht der absoluten Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten. Die zum OP-Zeitpunkt CTC-positiven Patienten wurden dabei den CTC-negativen Patienten gegenüber gestellt.

B) Übersicht aller CTC-positiver (CTC ≥ 1) oder negativer (CTC=0) Patienten in Prozent nach Tumorstadien.

C) Übersicht aller CTC-positiver (CTC ≥ 1) oder negativer (CTC=0) Patienten in Prozent nach Tumorstadien. Zur besseren Veranschaulichung wurden in Abbildung C die frühen Stadien UICC I-III zusammengefasst und den Patienten im metastasierten Tumorstadium UICC IV gegenüber gestellt (p=0,621).

3.5.2 Gesundspender

Des Weiteren wurden Blutproben von 12 Gesundspendern untersucht. Bei 75% (9/12) der gesunden Probanden konnten keine positiven Ereignisse detektiert werden, in 25% (3/12) der Fälle konnte eine einzelne rot gefärbte mononukleäre Zelle – vom NYONE[®] als CTC gewertet – nachgewiesen werden (**Tabelle 14**).

Tabelle 14: "CTC"-Status Gesundspender

„CTC“-STATUS	ANZAHL (Gesundspender)	ANTEIL (%)
„CTC“_ positiv (≥ 1)	3	25%
„CTC“_ negativ	9	75%

3.5.3 CTCs abhängig vom Tumorstadium (RT-qPCR)

Neben der Bestimmung der CTC mit dem NYONE[®]-Verfahren kam als Referenzsystem eine bereits etablierte RT-qPCR zur Detektion von CK20-positiven CTCs zum Einsatz. Ziel war es, die Detektionsraten beider Nachweisverfahren hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität zu vergleichen. Insgesamt konnten Proben von 35 Patienten ausgewertet werden. Die Detektionsrate von CTCs mittels der CK20-RT-qPCR lag zum OP-Zeitpunkt bei 85,7 % (30/35). Dabei wurden initial alle Patienten als positiv gewertet, deren EU > 0 (*expression units*) war. Der Nachweis von CTCs mittels relativer Genexpression von CK20 zum OP-Zeitpunkt abhängig vom Tumorstadium ist in **Abbildung 17** dargestellt.

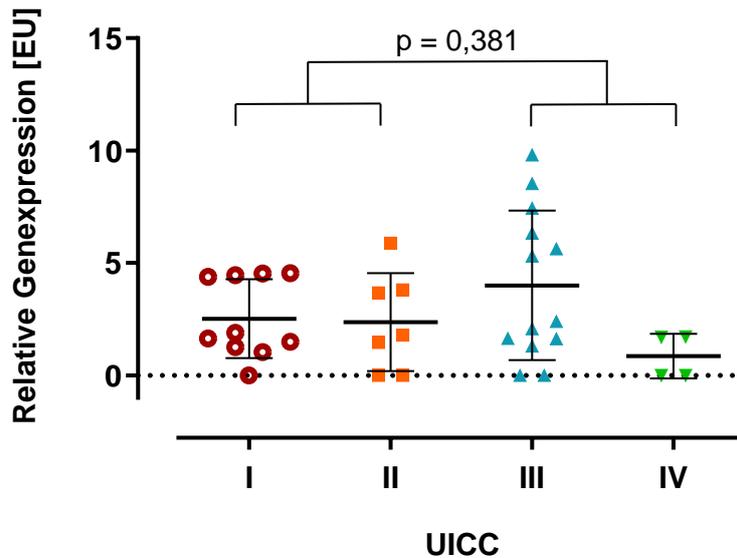


Abbildung 17: Relative Genexpression von CK20 abhängig vom Tumorstadium zum OP-Zeitpunkt

Die relative Genexpression von CK20 wurde anhand von Blutproben von Patienten ($n=35$) mit kolorektalem Karzinom mittels einer RT-qPCR bestimmt. Jeder Punkt stellt den Wert eines spezifischen Patienten der Kohorte dar. Die Werte sind in Bezug auf das jeweilige UICC-Stadium aufgetragen.

Horizontale Linie: Mittelwert; EU: expression units

Im UICC Stadium I der Erkrankung wurden 90,9 % (10/11) der Patienten positiv getestet. Im UICC Stadium II lag die Detektionsrate bei 71,4 % (5/7 Patienten), im UICC Stadium III bei 84,6 % (11/13). Die Detektionsrate im metastasierten UICC Stadium IV lag bei 50 % (2/4). Aufgrund teilweise sehr heterogener Einzelwerte schwankten die Mittelwerte der relativen Genexpression stark, sodass sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CK20-Expression der Tumorstadien I+II und der Stadien III+IV feststellen ließ ($p=0,381$, unpaired t-test). Der Mittelwert der relativen Genexpression der Patienten im UICC-Stadium I lag bei 2,99 EU.

In **Abbildung 18A** ist die CK20 Expression aller Patienten ($n=14$) dargestellt, deren CK20 Expression zum OP Zeitpunkt $EU > 0$ war und bei denen auch eine postoperative CK20 Bestimmung durchgeführt wurde. Dabei ist zu bemerken, dass die relative CK20-Genexpression im postoperativen Verlauf 4 Wochen nach OP deutlich, jedoch nicht signifikant, absinkt ($p=0,84$).

In früheren Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass nur eine initiale CK20 Expression $>2,77$ EU einen prognostisch signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben hat [34]. Daher wurden in **Abbildung 18B** nur die Patienten betrachtet, deren CK20 Expression zum Zeitpunkt der Primäroperation über dem *cut-off* von 2,77 EU lag. Mittels dieser Einteilung konnte gezeigt werden, dass die relative Genexpression von der ersten (t_0 , s. Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden

werden.) zur zweiten Blutentnahme (t1, 4 Wochen post-OP) signifikant abfiel ($p=0.007$, Mann-Whitney-Test).

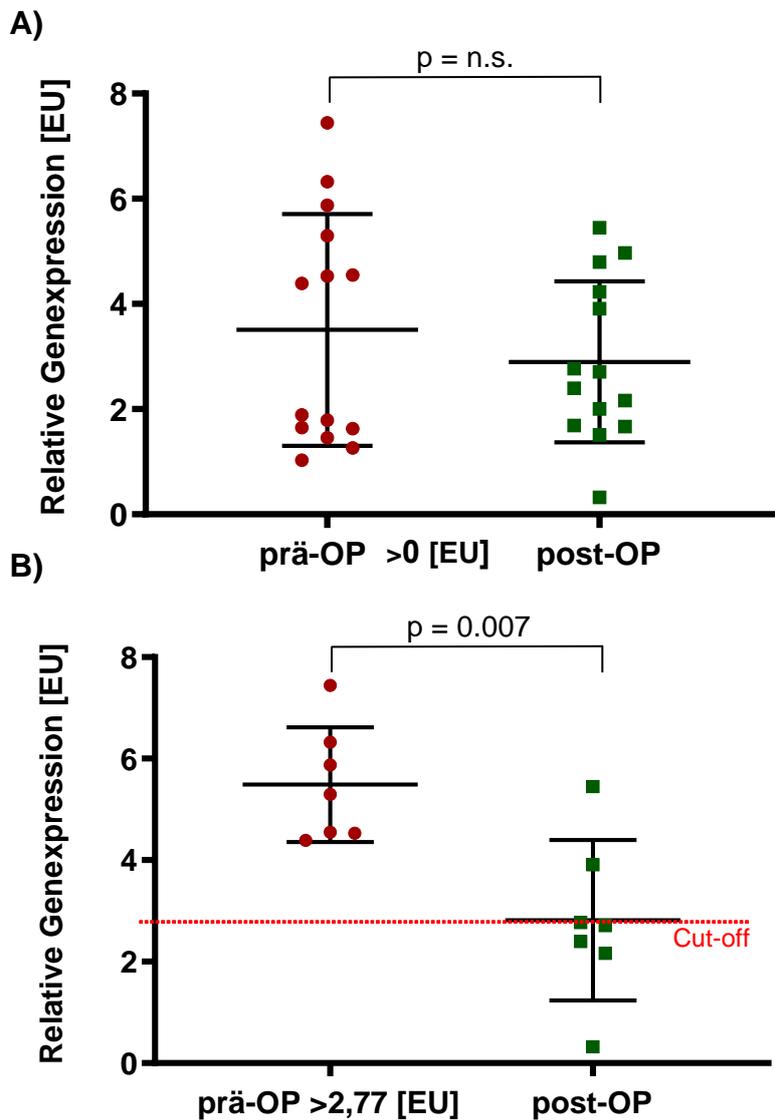


Abbildung 18: Relative Genexpression von CK20 zum OP-Zeitpunkt und postoperativ nach vier Wochen

- A) Alle Patienten ($n=14$), die zum Zeitpunkt der Operation eine relative Genexpression von CK20 > 0 aufwiesen.
- B) Alle Patienten, deren CK20-Expression zum Zeitpunkt der Operation über dem *cut-off* von 2,77 lag.

Horizontale Linie: Mittelwerte plus Standardabweichung; EU: expression units

Zum Vergleich der beiden verschiedenen Detektionsverfahren zum Nachweis von CTCs wurden in **Tabelle 15** in Abhängigkeit der jeweiligen Tumorstadien die übereinstimmenden sowie die unterschiedlichen Ergebnisse dargestellt. Dabei wurde deutlich, dass 18/35 Patienten (51,4 %) mittels der CK20-RT-qPCR positiv getestet wurden, allerdings negativ mit dem NYONE[®]-Verfahren. Bei

14/35 Patienten (40 %) lieferten beide Verfahren übereinstimmende Ergebnisse. Nur drei Patienten wurden mittels des NYONE[®] positiv und mittels der CK20-RT-qPCR negativ getestet.

Tabelle 15: Anzahl an positiven/negativen Patienten mit dem jeweiligen Detektionsverfahren für CTCs (NYONE[®] oder CK20-qPCR) zum OP-Zeitpunkt.

Stadium	Äquivalente Ergebnisse		Unterschiedliche Ergebnisse	
	NYONE + / CK20-PCR +	NYONE - / CK20-PCR -	NYONE - / CK20-PCR +	NYONE + / CK20-PCR -
I	3	1	7	0
II	2	1	3	1
III	4	1	7	1
IV	1	1	1	1
GESAMT	10/35 (28,6%)	4/35 (11,4%)	18/35 (51,4%)	3/35 (8,6%)

3.6 Auswertung der Verlaufskontrollen

Im Anschluss an die Blutentnahmen zum Operationszeitpunkt bestellten wir die Patienten in regelmäßigen Abständen (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, t1-t5) zu Verlaufskontrollen ein. Dadurch war es möglich, die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen vor dem Hintergrund des Krankheitsverlaufs zu beobachten. **Tabelle 16** bietet einen Überblick, wie viele Patienten zum jeweiligen Zeitpunkt an der Studie teilnahmen und sich den Verlaufskontrollen unterzogen. Außerdem ist zu erkennen, in welchem Tumorstadium sich die Patienten befanden. Nach sechs Monaten konnten noch bei 55,8 % der Patienten Blutentnahmen akquiriert werden. Nach einem Jahr postoperativ konnten noch bei acht Patienten (18,6 %) Blutentnahmen durchgeführt werden.

Tabelle 16: Übersicht der Patienten der Verlaufsstudie

Eingetragen ist die jeweilige Anzahl an Patienten (n), die pro UICC-Stadium zu den Zeitpunkten t0 bis t5 an der Studie teilgenommen haben. (Ein Patient, bei dem nach neoadjuvanter Chemotherapie kein Primärtumor mehr nachgewiesen werden konnte, wurde aus der Übersicht ausgeschlossen.)

t0=Zeitpunkt kurz vor der Operation; t1=2-8 Wochen postoperativ; t2=8-15 Wochen postoperativ; t3=22-30 Wochen postoperativ; t4=33-44 Wochen postoperativ; t5=48-58 Wochen postoperativ

Anzahl der Patienten (n)	Zeitintervalle der Probenentnahme					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
<i>UICC-Stadium</i>						

I	12	9	6	6	2	3
II	9	5	5	5	2	1
III	17	6	7	6	6	3
IV	5	3	3	2	1	1
GESAMT	43	23	21	19	12	8

Um einen Überblick über die Gesamtanzahl der detektierten CTCs zu gewinnen, ist in **Tabelle 17** dargestellt, wie viele Patienten pro Zeitpunkt jeweils wie viele CTCs aufwiesen. Bei einem Großteil der Patienten (95,6 % zum Zeitpunkt t1) wurden zwischen null und vier CTCs nachgewiesen. Nur bei einem kleinen Anteil (4,3 % zum Zeitpunkt t1, 9,5 % zum Zeitpunkt t2) der Patienten konnten mehr als fünf CTCs detektiert werden.

Tabelle 17: Anzahl aller Verlaufspatienten sortiert nach CTC-Zahl und den Zeitpunkten der Probenentnahme

(Ein Patient, bei dem nach neoadjuvanter Chemotherapie kein Primärtumor mehr nachgewiesen werden konnte, wurde aus der Übersicht ausgeschlossen.)

t0=Zeitpunkt kurz vor der Operation; t1=2-8 Wochen postoperativ; t2=8-15 Wochen postoperativ; t3=22-30 Wochen postoperativ; t4=33-44 Wochen postoperativ; t5=48-58 Wochen postoperativ

Patienten (n)	<i>Zeitpunkte der Probenentnahme</i>					
	<i>t0</i>	<i>t1</i>	<i>t2</i>	<i>t3</i>	<i>t4</i>	<i>t5</i>
<i>CTCs (n)</i>						
0	27	10	10	10	5	2
≥ 1	14	12	9	8	6	5
≥ 5	2	1	2	1	1	1
GESAMT	43	23	21	19	12	8

Aufgrund variierender Zeitpunkte der Probenentnahmen und individueller Therapiepläne, welche Radio-/Chemotherapien oder Rezidivoperationen beinhalteten, stellten sich die Ergebnisse der Verlaufsstudie als sehr variabel heraus. Aus diesem Grund sind an dieser Stelle beispielhaft CTC-Verläufe einzelner Patienten dargestellt.

In **Abbildung 19** ist der Verlauf der CTC-Zahl und der relativen Genexpression von CK20 (in *expression units* (EU)) bei einem Patienten mit Kolonkarzinom im UICC-Stadium III zu erkennen. In diesem Fall scheint die Dynamik der zirkulierenden Tumorzellen in einem Zusammenhang mit den eingeleiteten Therapieschritten zu stehen. Nach der Primärresektion des Tumors und mit Beginn der adjuvanten Chemotherapie sank die CTC-Zahl im Verlauf ab, wobei erst nach 36 Wochen die CTC Anzahl, die mit dem NYONE[®] detektiert wurde, auf null sank. Im Vergleich dazu lag die relative CK20 Expression schon nach 12 Wochen unterhalb des *cut-off* Wertes von 2,77.

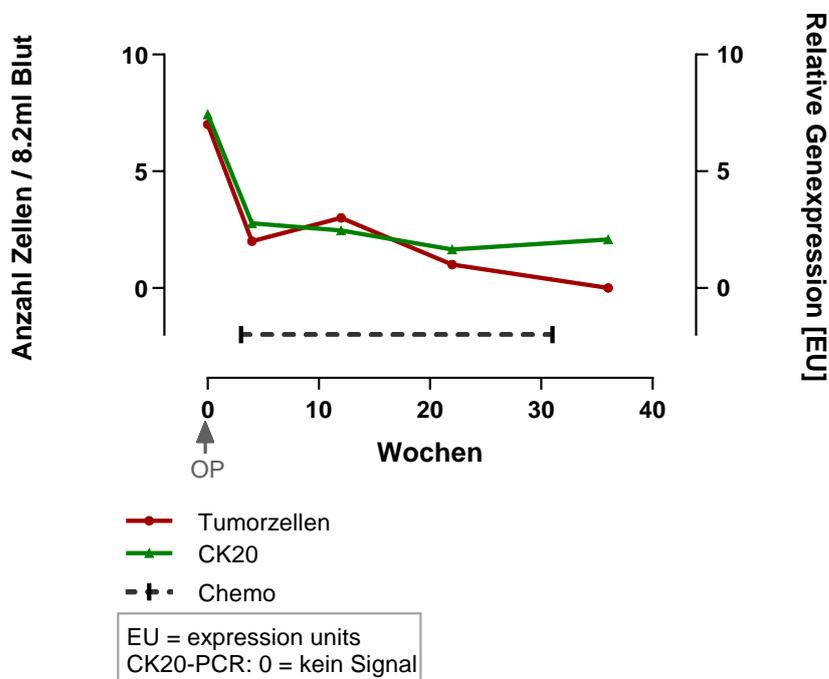


Abbildung 19: CTC-Zahl fällt mit Beginn der Therapie ab Patient mit Kolonkarzinom im UICC-Stadium III. Dargestellt sind die Anzahl der detektierten CTCs pro 8,2 ml Blut und die relative Genexpression von CK20 (EU=*expression units*) im Krankheitsverlauf über der Zeit in Wochen.

In **Abbildung 20** zeigt den Verlauf der CTCs und der relativen Genexpression von CK20 einer Patientin mit einem Sigmakarzinom im UICC-Stadium II. Zum Zeitpunkt der OP und auch in den ersten Monaten konnten im Blut keine CTCs nachgewiesen werden. Circa 35 Wochen postoperativ wurden erste CTCs mit dem NYONE[®] detektiert. 46 Wochen postoperativ wurde dann ein Lokalrezidiv im Bereich der linken Beckenwand im CT nachgewiesen, was als ursächlich für den Anstieg der CTCs zu sehen ist. Die Ergebnisse der CK20-RT-qPCR schwankten im Verlauf der Messungen, präsentierten sich insgesamt aber auch mit steigender Tendenz. 3 der Werte lagen über dem *cut-off* von 2,77.

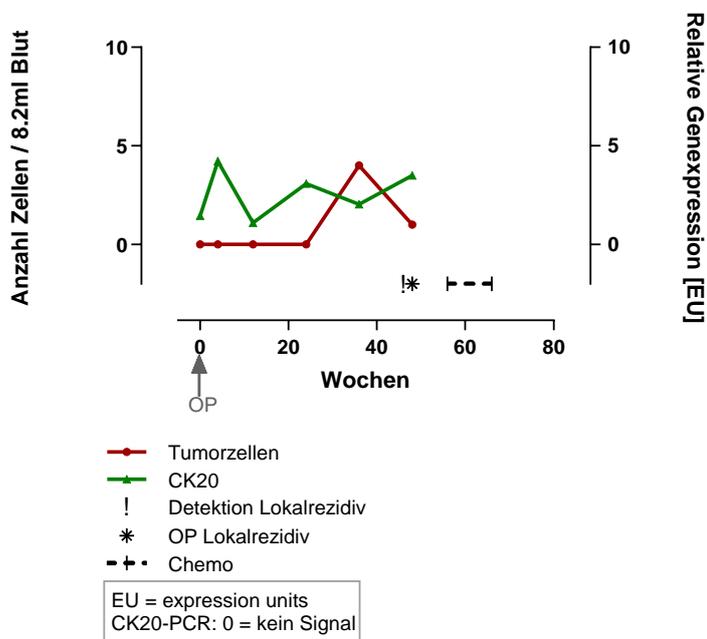


Abbildung 20: CTC Zahl steigt im Verlauf an Patientin mit Sigmakarzinom im UICC-Stadium II. Dargestellt sind die Anzahl der detektierten CTCs pro 8,2 ml Blut und die relative Genexpression von CK20 (EU=*expression units*) im Krankheitsverlauf über der Zeit in Wochen.

Abbildung 21 zeigt die Verlaufsdaten einer Patientin mit Kolonkarzinom, deren Tumorerkrankung zu Therapiebeginn bereits sehr weit fortgeschritten war (UICC IV). Es handelte sich um eine Patientin mit multiplen Fernmetastasen, unter anderem in Leber und Lunge. Neben den CTC-Werten und den CK20-RT-qPCR-Ergebnissen wurden außerdem weitere, den Krankheitsverlauf beeinflussende, Therapieschritte eingetragen. 33 Wochen nach der Primäroperation wurde zur Behandlung der Lebermetastasen bei nicht mehr nachweisbaren Lungenmetastasen eine Hemihepatektomie durchgeführt. 67 Wochen nach Therapiebeginn wurde ein Lokalrezidiv im rechten Tubenwinkel diagnostiziert, welches wenige Wochen später mittels einer Sekundäroperation reseziert wurde. Während sich sowohl die CTC-Anzahl als auch die CK20-Expression zunächst schwankend präsentierten, fielen beide Werte mit Beginn der Chemotherapie ab. Bereits vier Monate vor der Detektion des Lokalrezidivs mittels CT Untersuchung stieg bereits die CK20-Expression an, vor allem jedoch die CTC-Zahl mit einem Maximum von zuletzt 29 CTCs pro 8,2 ml Blut.

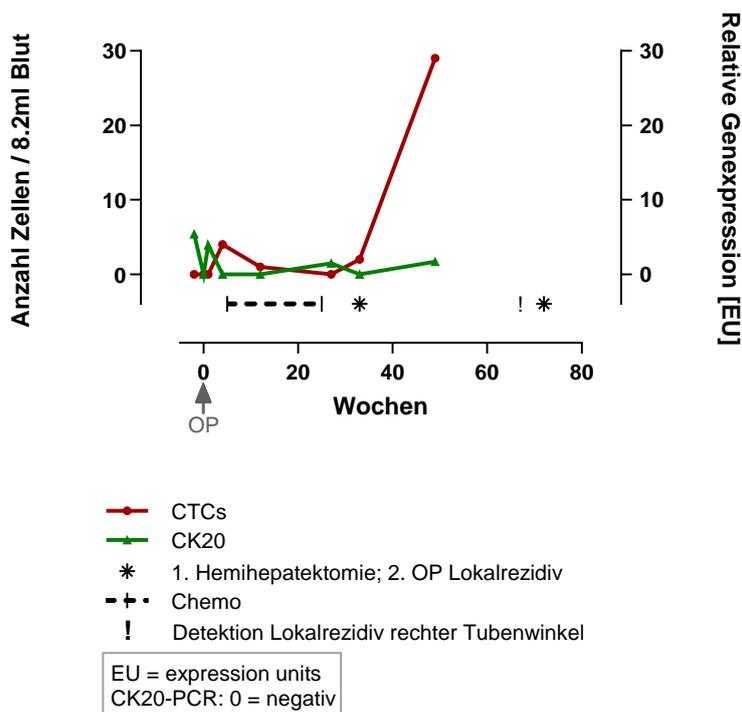


Abbildung 21: CTC Zahl steigt im Verlauf an

Patientin mit fortgeschrittenem Kolonkarzinom im UICC-Stadium IV. Dargestellt sind die Anzahl der detektierten CTCs pro 8,2 ml Blut und die relative Genexpression von CK20 (EU=*expression units*) im Krankheitsverlauf über der Zeit in Wochen.

4 Diskussion

4.1 CTCs mit dem NYONE[®] suchen, finden und abbilden – Etablierung der Methode

In der spezifischen Fragestellung sollte zum einen beantwortet werden, inwieweit es möglich ist, zirkulierende Tumorzellen von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom aus 8,2 ml Blut zu isolieren, zu markieren und anschließend mit Hilfe des NYONE[®]-Verfahrens automatisiert zu quantifizieren und zu visualisieren, denn dieses Verfahren war zuvor noch nicht für den Nachweis zirkulierenden Tumorzellen eingesetzt worden. Die Blutproben wurden im Rahmen dieser Untersuchungen in einem Zeitrahmen von höchstens vier Stunden nach Blutentnahme prozessiert, allerdings war eine längere Unterbrechung der Aufbereitung bis zu vier Tage nach erfolgtem Waschen, der Isolierung und Fixierung der Zellen möglich. Über die Halbwertszeit von CTCs in abgenommenen Blutproben gibt es unterschiedliche Untersuchungen. In einer Publikation über CTCs bei Brustkrebspatienten von *S. Meng et al.* ist von einer Halbwertszeit von höchstens 2,4 Stunden die Rede [50]. Andere Studien, die z.B. mit dem *CellSearch*[®]-System arbeiteten, setzten hingegen ein zeitliches Limit bei 72 Stunden zwischen Blutentnahme und Verarbeitung [30]. Die Möglichkeit, nach dem Schritt der Fixierung den Arbeitsprozess bis zu 4 Tage zu unterbrechen, ist ein Vorteil, wenn z.B. Blutproben dezentral gesammelt und dann zentral weiter verarbeitet werden sollen. Damit könnten auch fixierte Proben per Post an eine zentrale Stelle zur Weiterverarbeitung gesendet werden.

Die Aufbereitung der Blutproben erfolgte nach einem standardisierten Protokoll und war dadurch unkompliziert und leicht reproduzierbar. Ein großer Vorteil des NYONE[®]-Verfahrens ist das automatisierte Scannen und Auswerten der Wells, wodurch das aufwändige, händische Mikroskopieren der Proben überflüssig wird. Dieses führte in der Analyse zu einer deutlichen Zeitersparnis und unterbindet auch eine Untersucherabhängigkeit in der Analyse. Die automatisiert gespeicherten Bildausschnitte, die positive Events enthielten, wurden nach Beendigung der Analyse ausgewertet. Als positive Events wurden alle Zellen gewertet, deren DAPI-Signal die Kriterien für Zellkerne erfüllte und deren Fluoreszenzsignale einen gewissen *Threshold* im grünen Kanal unter- bzw. im roten Kanal überschritten. Die Bilder erlaubten anschließend eine Beurteilung der einzelnen Zellen, wobei in erster Linie begutachtet wurde, ob eine Zellmorphologie mit DAPI-positivem Zellkern vorlag oder es sich um Artefakte handelte. Eine Anfärbung von Zelltrümmern, -aggregaten oder kleinsten Fremdpartikeln führte bei fast jeder Blutprobe zu vereinzelt falsch-positiven roten Fluoreszenzsignalen. Dies stellte eine potentielle Fehlerquelle dar, die allerdings durch die manuelle Kontrolle jedes vom NYONE[®] als CTC registrierten Ereignisses durch den Untersucher

unmittelbar erkannt und eliminiert werden konnte – ein weiterer Vorteil dieser Verfahrensweise. Die Auswertungsergebnisse wurden auf diese Weise nicht verfälscht und falsch-positive Ereignisse nicht in die Auswertung einbezogen. Eine detailliertere morphologische Betrachtung spielte in der Auswertung eine untergeordnete Rolle. Zur Detektion der CTCs wurde ein Antikörpercocktail von insgesamt vier epithelialen Oberflächenmarkern (EpCAM, EGFR, Her2 und pan-Cytokeratin) eingesetzt. Wobei bei der Zählung als CTC nicht differenziert wurde, für welches, und ob die Tumorzelle eventuell auch für mehrere Oberflächenantigene positiv war. Ein Unterschied des eingesetzten Verfahrens war im Gegensatz zu vielen anderen Studien, dass nicht nur ein Marker, wie zum Beispiel EpCAM, EGFR oder CK20 eingesetzt wurde, sondern eine Kombination von vier Oberflächenantigenen [24][31][33]. Mehrere Studien belegten, dass die Expression epithelialer Marker auf der Oberfläche von Tumorzellen nicht immer konstant bleibt. *L.Belov et al.* zeigten beispielsweise, dass die Expression von EpCAM, einem epitheliale Antigen, welches die Zelladhäsion begünstigt [51], in frühen Stadien sehr ausgeprägt ist, mit Tumorprogression und Fortschritt der Erkrankung aber dramatisch abnimmt [52]. Eine Reduktion der Oberflächenexpression scheint sogar mit einer schlechteren Prognose beim Kolorektalen Karzinom assoziiert zu sein [53]. Daher verwendete unsere Arbeitsgruppe neben Anti-EpCAM außerdem Anti-EGFR (*epithelial growth factor receptor*) sowie Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper gegen das Protein Her2/neu als Marker. Her2/neu kodiert für einen Tyrosinkinase-Rezeptor, der wiederum dem EGFR ähnelt [54]. Beide Proteine werden ebenfalls in Adenokarzinomen exprimiert bzw. überexprimiert [54][55]. Auch hier zeigten sich aber Unterschiede im Grad der Expression, da Her2 im Rektumkarzinom stärker exprimiert zu sein scheint als im Kolonkarzinom [56]. Zuletzt setzten wir noch Antikörper gegen pan-Cytokeratin und für die RT-qPCR CK20 als Marker ein, welches ebenfalls nur in epithelialen Zellen und den zugehörigen Malignitäten exprimiert wird und auch in nahezu 100% aller Kolonkarzinome mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden konnte [57]. Nichtsdestotrotz existieren trotz des Einsatzes verschiedener epithelialer Oberflächenantigene immer noch einige potenzielle Fehlerquellen, die schon im Jahr 2003 von *Borgen et al.* beschrieben wurden. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung können durch verschiedene Faktoren negativ beeinflusst werden, wie durch etwaige Expressionsunterschiede der adressierten Antigene auf den Zielzellen, in diesem Fall den CTCs, durch Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit Epitopen auf hämatopoetischen Zellen, durch Interaktionen mit Fc-Rezeptoren auf Leukozyten oder eine falsche Expression epithelialer Oberflächenantigene auf gewöhnlichen Blutzellen [58]. Eine genauere morphologische Betrachtung und Einschätzung der Zellen wäre somit als zusätzlicher Aspekt interessant und könnte in weiteren Studien, beispielsweise durch die Einbeziehung erfahrener Pathologen/-innen in das Projekt, genauere Informationen zum Aussehen und der Struktur der einzelnen CTCs liefern.

Zusammenfassend lässt sich das NYONE[®] als einfaches, leicht reproduzierbares und arbeitserleichterndes Verfahren zum Nachweis von CTCs beschreiben, das jedoch bezüglich seiner Anfälligkeit für falsch-positive Ergebnisse durch die Anfärbung von Zelltrümmern oder -aggregaten noch Schwächen aufweist.

4.2 Etablierung der Methode anhand von *Spiking*-Experimenten

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, führten wir *Spiking*-Experimente zur Validierung des NYONE[®]-Verfahrens durch. Dort erreichten wir maximalen CTC-Detektionsraten von bis zu 90 %, im Durchschnitt allerdings nur von 54,7 %. Andere immunzytochemische Nachweisverfahren sind in der Lage, höhere Detektionsraten zu erzielen. Beispielhaft ist das *CellSearch*[®]-Verfahren zu nennen, das einzige durch die FDA (*food and drug administration*) zugelassene Verfahren zur Detektion von CTCs [29], welches den Oberflächenmarker EpCAM nutzt, um die Tumorzellen magnetisch zu isolieren und mittels fluoreszierender Antikörper gegen epitheliale Oberflächenantigene sichtbar zu machen. Im Rahmen ähnlicher *Spiking*-Experimente konnten dort Detektionsraten von >85 % erreicht werden [59]. Auch andere Detektionsmethoden wie z.B. das *ISET*[®]-Verfahren (*isolation by size of epithelial tumor cells*), welches unter der Annahme, dass CTCs einen größeren Durchmesser aufweisen als periphere Blutzellen, Filter mit definierten Porengrößen zur Isolation verwendet, weisen teilweise bessere Detektionsraten von >80 % im Rahmen von *Spiking*-Experimenten auf [25]. Allerdings wurden ausschließlich Tumorzellen aus Zellkulturen verwendet. Da die ursprüngliche Annahme, Tumorzellen wiesen einen größeren Durchmesser auf als andere Blutzellen, in erster Linie Versuchen mit Zellkultur-Tumorzelllinien entspringt, könnte es bei einer Anwendung des Verfahrens bei Tumorpatienten zu falsch niedrigen CTC-Detektionsraten kommen, da einzelne CTCs aufgrund ihres kleineren Durchmessers nicht als solche erkannt würden [24]. Andere Studien liefern ebenfalls Hinweise dafür, dass insbesondere CTCs in fortgeschrittenen Krankheitsstadien kleinere Durchmesser aufweisen als zuvor angenommen [24][60]. Auch in unserer Arbeit wiesen die Tumorzellen der Zellkulturlinien MCF-7 und HT-29 mit 14 bis 19 µm einen größeren Durchmesser auf als die CTCs, die aus dem Blut der Patienten isoliert wurden. Diese maßen lediglich 9 bis 12 µm, welches die o.g. Annahme unterstützt.

Die Sensitivität der verschiedenen Detektionsverfahren miteinander zu vergleichen, stellt allgemein eine Schwierigkeit dar, weil sich jedes Verfahren andere Eigenschaften der CTCs zunutze macht, wie bereits in Abschnitt 1.2.1 beschrieben. Dadurch, dass jedes Verfahren seine eigenen Kriterien für die Wertung einer Zelle als CTC aufstellt und kein Verfahren alle Kriterien berücksichtigt, kann es dazu kommen, dass einige CTCs nicht als solche erkannt werden. Ein limitierender Faktor des NYONE[®]-Verfahrens ist, dass die Kriterien, nach denen entschieden wird, ob eine Zelle als CTC

gewertet wird oder nicht, ausschließlich auf der Existenz von epithelialen Oberflächenantigenen auf den Tumorzellen basieren, andere Aspekte wie die Größe oder die Oberflächenladung der Zellen aber nicht berücksichtigen. Allerdings arbeitet das von der FDA zugelassene *CellSearch*[®]-Verfahren nach dem gleichen Algorithmus, misst aber nur einen und nicht vier Oberflächenmarker.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Theorie der EMT, der „epithelial-mesenchymalen Transition“ von Tumorzellen, die besagt, dass sich Tumorzellen nicht immer in einem stabilen Zustand mit ausschließlich epithelialen Eigenschaften befinden, sondern in einem mehrstufigen Prozess in der Lage sind, sich in Zellen mit zunehmend mesenchymalen Eigenschaften umzuwandeln [61][62]. *Zhao et al.* gingen soweit, die CTCs in drei Gruppen zu unterteilen – epithelial, mesenchymal und biophänotypisch, mit sowohl epithelialen als auch mesenchymalen Oberflächeneigenschaften. Die epithelialen CTCs machten dabei im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen den kleinsten Anteil aus [63].

Vor diesem Hintergrund wäre es interessant, die in unserem Versuchsaufbau verwendeten epithelialen Marker (EpCAM, pan-Cytokeratin, EGFR und Her2) in weiteren Studien um mesenchymale Marker zu erweitern, um möglichst auch solche Zellen als CTCs identifizieren zu können, die gegebenenfalls schon eine EMT durchlaufen haben.

4.3 Detektion von CTCs in Patientenproben – auch in frühen Stadien

Während der Untersuchung der Blutproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde zunächst die absolute Anzahl zirkulierender Tumorzellen in der Blutprobe zum Zeitpunkt kurz vor der Resektion des Primärtumors untersucht. Zu diesem Zeitpunkt war noch keine Vorbehandlung mit einer Chemotherapie erfolgt. Die absolute Anzahl von CTCs korrelierte nicht signifikant mit dem Tumorstadium der Patienten, es ließ sich jedoch eine steigende Tendenz der CTC-Anzahl mit steigendem Tumorstadium erkennen. Im Mittel enthielten die Blutproben von Patienten in den UICC-Stadien I und II 0-1 CTCs (Mittelwert: 0.68 CTCs, 0-4 CTCs), in den Stadien III und IV 1-2 CTCs (Mittelwert: 1.28 CTCs, 0-7 CTCs). Insgesamt wiesen 37,8% (14/37) aller Patienten ≥ 1 CTC auf. In unseren früheren Analysen zur Detektion von CTCs bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen hatte sich unter Verwendung der CK20-RT-qPCR eine Detektionsrate von 37% gezeigt [33].

In diesem Studienkollektiv lag eine Verschiebung in Richtung auf frühe Tumorstadien vor. Im Studienkollektiv befanden sich 88,6 % (39/44) der Patienten in frühen Krankheitsstadien (UICC I-III) und nur 11,4 % (5/44) in einem Stadium mit bereits bestehender Fernmetastasierung (UICC IV). Höhere Detektionsraten für CTCs wurden aus anderen Arbeitsgruppen berichtet. Beispielsweise wurden in einer großen Multicenter-Studie Blutproben von 413 CRC-Patienten mittels des

CellSearch[®]-Verfahrens auf CTCs untersucht, von denen 47,5 % ≥ 1 CTC aufwiesen, es handelte sich bei den Probanden jedoch ausschließlich um Patienten mit metastasiertem CRC [29], was bei dem Vorhandensein von Organmetastasen auch die höhere Rate an CTCs im Blut erklärt. In unserer Studie befanden sich zum Diagnosezeitpunkt nur 11 % der Probanden in einem metastasierten Tumorstadium. Dennoch wurden auch in den frühen Stadien der Erkrankung I und II 36,8 % der Erkrankten positiv auf CTCs getestet.

Auch in einer anderen Studie von *Coben et al.* wurden 413 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom in 55 verschiedenen klinischen Zentren untersucht, von denen 48 % ≥ 1 CTC aufwiesen [64].

Zur besseren Vergleichbarkeit betrachteten wir in **Abbildung 16C** die Prozentzahl aller CTC-positiven Patienten in den Stadien I-III im Vergleich zu den Patienten im UICC-Stadium IV. Während in Zusammenschau der Stadien I-III nur 36,4 % (12/33) aller Patienten CTCs aufwiesen, konnten bei 50 % (2/4) der Patienten im UICC-Stadium IV zirkulierende Tumorzellen detektiert werden ($p=0,621$, Mann-Whitney-Test). Aufgrund der geringen Fallzahl in dieser Studie konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Tumorstadium und dem Auftreten zirkulierender Tumorzellen getroffen werden, die aber in anderen Studien bereits gezeigt werden konnte [34][63]. Es wird immer wieder diskutiert, welche klinische Relevanz dem Nachweis von CTCs in frühen Tumorstadien (ohne Nachweis von Organ- und Lymphknotenmetastasen) beizumessen ist, gerade wenn im Stadium I+II bei 37 % der Patienten CTCs nachgewiesen werden, diese Patienten aber nur sehr selten im weiteren Verlauf Organmetastasen entwickeln. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass für den Nachweis von CTCs mittels der CK20 RT-qPCR auch in den Stadien I+II ein signifikant schlechteres Überleben nachzuweisen ist, wenn die Detektion von CTCs den *cut-off*-Wert von 2,77 EU überschreitet [34]. Für den Nachweis von CTCs mit dem NYONE[®] in den frühen Stadien sind diese Analysen noch mit keiner ausreichend großen Kohorte durchgeführt worden, sodass hier bislang keine Aussage dazu getroffen werden kann, ob eine Prognoseverschlechterung z.B. auch erst ab dem Nachweis von mehr als 2 oder 3 CTCs zu erwarten ist. Auch hier könnte es sinnvoll sein, im Rahmen weiterer Untersuchungen einen *cut-off*-Wert festzulegen.

4.4 Analyse der Blutproben von Gesundspendern

Auch das Blut von gesunden Probanden wurde auf CTCs untersucht – in 25% (3/12) der Fälle konnte eine einzelne rot gefärbte mononukleäre Zelle – vom NYONE[®] als CTC gewertet – nachgewiesen werden. Zur richtigen Einordnung der Ergebnisse ist es wichtig zu beachten, dass es sich bei unserem Nachweisverfahren nicht um eine Früherkennungs- oder Screeningmethode für Karzinome handelt, sondern um eine Detektionsmethode für CTCs im Blut von Patienten mit bereits

diagnostizierter Tumorerkrankung. Ein positives Event bei gesunden Probanden ist somit nicht gleichzusetzen mit einem positiven Event bei Tumorpatienten [58]. Es ist nicht auszuschließen, dass auch gesunde Probanden einen gewissen niedrigen Grundspiegel an CTCs bzw. CK20 RNA im Blut aufweisen. Daher sollten CTCs analog zu anderen Tumormarkern betrachtet werden. Da auch gesunde Probanden einen Grundspiegel gewisser Tumormarker aufweisen können, geht es vielmehr um die Dynamik im Verlauf der Tumorerkrankung als um die absoluten Werte. Um zu verifizieren, dass es sich bei den CTCs im Blut der Gesundspender wirklich um zirkulierende Tumorzellen handelt, könnte in weiteren Untersuchungen eine Genanalyse durchgeführt werden. Solange kann nicht ausgeschlossen werden, dass es vereinzelt „harmlose“ Zellen im Blut gesunder Probanden gibt, die positiv auf die Marker unserer Detektionsmethoden sind.

Aus diesen Gründen, um klar zwischen gesunden Probanden und Tumorpatienten zu unterscheiden, haben wir die Ergebnisse der Gesundspender einzeln betrachtet und aus der Ergebnisdarstellung des Patientenkollektivs ausgeschlossen.

4.5 CK20-RT-qPCR vs. NYONE®

In der vorliegenden Studie wurden die Blutproben der CRC-Patienten nicht nur mittels des NYONE® untersucht, sondern außerdem mit der in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten CK20-RT-qPCR [33][34][35]. Entsprechend der vorangegangenen Analysen der Proben mit dem NYONE® (s. **Abbildung 15**) wurden hierbei auch mögliche Zusammenhänge zwischen der Ausprägung der relativen CK20-mRNA-Expression und dem Tumorstadium betrachtet. Vergleichbar mit den Ergebnissen von *Hinz et al.* (2015), wo allerdings im Unterschied zum jetzigen Patientenkollektiv ausschließlich venöse Blutproben von Patienten mit Rektumkarzinom untersucht wurden, konnte in der aktuellen Arbeit aufgrund sehr heterogener Einzelwerte keine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der Genexpression von Cytokeratin 20 und dem UICC-Stadium festgestellt werden [33]. Auch mit dem NYONE® konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der CTC-Zahl und dem Tumorstadium festgestellt werden, wobei die hier untersuchte Kohorte sehr klein gewesen ist und in der Mehrzahl Patienten in frühen Tumorstadien untersucht hat. In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe, in der ausschließlich Kolonkarzinompatienten betrachtet wurden, konnte hingegen mittels der CK20-RT-qPCR ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem höheren Tumorstadium (UICC IV) und einem höheren CK20-Expressionslevel nachgewiesen werden [34].

Aufgrund einer heterogenen Studienkohorte, begründet durch individuelle Therapiekonzepte, Blutentnahmezeitpunkte und die geringe Gesamtanzahl an Patienten, fokussierten sich die Analysen in erster Linie auf die Blutproben, die zu einem Zeitpunkt der Erkrankung gewonnen wurden,

zu dem von einer größtmöglichen Gleichheit der Kohorte ausgegangen werden konnte – dem Zeitpunkt kurz vor der Primäroperation. Patienten, die eine neoadjuvante, also präoperative Therapie erhalten hatten, wurden aus diesem Grund aus den Untersuchungen ausgeschlossen. Aus diesem Grund lag der eigentliche Schwerpunkt dieser Arbeit auch nicht auf der Betrachtung des Einflusses verschiedener Therapieansätze auf die CTC-Zahl; jedoch konnte mittels der RT-qPCR ein signifikanter Abfall der CK20-Expression ($p=0,007$) zwischen dem Zeitpunkt kurz vor der Primäroperation und der ersten Kontrolle vier Wochen postoperativ beobachtet werden. Dies galt jedoch nur für die Kohorte der Patienten, die schon zum OP-Zeitpunkt über dem *cut-off* von 2.77 EU lagen. Die Operation als die radikalste Methode einer schnellen Tumormassen-Reduktion schien somit einen Einfluss auf die relative Genexpression von CK20 zu haben.

Ein einzelner Patient befand sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme vier Wochen postoperativ in einem septischen Zustandsbild und präsentierte exorbitante Werte. Die durch das NYONE[®] ermittelte CTC-Zahl betrug 34, die relative CK20-mRNA-Expression 44.56 EU, was zu der Frage führte, ob generalisierte Entzündungen die CTC-Zahl beeinflussen könnten. *Wen et al.* konnten am Beispiel des Nierenzellkarzinoms zeigen, dass Patienten mit erhöhten CRP-Werten gleichzeitig auch höhere CTC-Zahlen aufwiesen [65]. Da ein möglicher Einfluss des Entzündungsprozesses als „*Confounder*“ also nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde dieser Patient nicht in die Auswertungen einbezogen.

Betrachtet man die Ergebnisse beider Analyseverfahren im Vergleich, wie in **Tabelle 15** gegenübergestellt, wird deutlich, dass ein deutlich größerer Anteil an Patienten mit der RT-qPCR-Methode positiv auf CK20-mRNA getestet wurde, hingegen mit dem NYONE[®] negative Ergebnisse lieferte. Anders als bei der neuen NYONE[®]-Methode handelt es sich bei der RT-qPCR um ein semiquantitatives Verfahren, welches nicht in der Lage ist, die exakte Anzahl zirkulierender Tumorzellen zu ermitteln, dafür jedoch durch die Amplifikation der CK20-mRNA in der Lage ist, schon kleinste Mengen des Genproduktes zu detektieren. Nur zwei Patienten wiesen bei der Auswertung mit dem NYONE[®] CTCs auf, nicht jedoch CK20-mRNA in der RT-qPCR. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den detektierten CTCs der beiden Patienten mittels des NYONE[®] entweder um falsch positive zirkulierende Tumorzellen handelt, oder aber die RT-qPCR falsch negativ war.

Die Ergebnisse weisen insgesamt darauf hin, dass es sich bei dem RT-qPCR-basierten Verfahren um eine sensitivere Methode zu handeln scheint, als bei der NYONE[®]-basierten Technik. Durch die Amplifizierung der CK20-mRNA können selbst geringe Mengen des Genproduktes nachgewiesen werden, wohingegen vereinzelte Zellen im Rahmen des NYONE[®]-Verfahrens undetektiert bleiben können. Diese Vermutung wird gestützt durch die Tatsache, dass bei der Verarbeitung der Proben mit dem NYONE[®] nur 37,8 % der Patienten zum OP-Zeitpunkt CTCs aufwiesen, bei der

Analyse mittels der RT-qPCR hingegen >80 % der Patienten CK20-mRNA. Das NYONE[®] weist im Vergleich zwar eine niedrigere Sensitivität, aber eine höhere Spezifität auf, da mehr als nur ein CTC-Kriterium erfüllt werden muss. Es genügt nicht, dass das NYONE[®] spezifische Fluoreszenzsignale, ausgelöst durch verschiedene epitheliale Oberflächenmarker, erkennt, es müssen auch die Kriterien einer passenden Zellmorphologie sowie die Negativität gegenüber CD45, einen lymphozytären Marker, erfüllt sein. Die RT-qPCR scheint im Rahmen der CTC-Detektion besser geeignet als sensitives und qualitatives Verfahren, das NYONE[®] hingegen als spezifisches und quantitatives. Man kann also sagen, dass es sich bei den 14 Patienten, bei denen beide Verfahren äquivalente Ergebnisse lieferten, mit der höchsten Wahrscheinlichkeit um richtig positive beziehungsweise richtig negative Resultate handelte. In Anbetracht dieser Erkenntnisse ergibt sich die Schlussfolgerung, dass es sinnvoll ist, beide Verfahren aufgrund ihrer individuellen Vor- und Nachteile als ergänzende Methoden zu betrachten, um letztendlich möglichst valide Ergebnisse zu generieren.

4.6 CTCs und CK20-Expression im Verlauf – Individuelle Therapiepläne schränken die Vergleichbarkeit ein

Neben der Validierung des neuen Nachweisverfahrens und dem Vergleich der beiden Methoden CK20-RT-qPCR und NYONE[®] bestand der dritte Teil dieser Studie darin, Proben der Patienten im Verlauf der Erkrankung bis zu einem Jahr postoperativ zu sammeln und zu analysieren. Insgesamt wurden 43 Patienten in die Verlaufsbeobachtung aufgenommen, jedoch stiegen aufgrund des logistischen Aufwands für die Patienten, die sich für jede Blutentnahme in der Klinik vorstellen mussten, mehr als 80% der Patienten im Laufe des Jahres aus der Studie aus, 50% bereits innerhalb von sechs Monaten. Nur acht Patienten unterzogen sich dem Großteil der Blutentnahmen, sodass die Verläufe von CTC-Anzahl und CK20-Expression bis zum Abschluss der Studie verfolgt werden konnten.

Aufgrund der großen Individualität der verschiedenen Patienten hinsichtlich des Ausmaßes der Erkrankung, des Therapieregimes und verschiedener Metastasierungslokalisationen, bezogen wir nur vereinzelte beispielhafte Verlaufsdaten in diese Arbeit ein, um eventuelle Zusammenhänge zwischen Therapie und CTC-Verlauf bzw. CK20-Expression bei einzelnen Patienten erkennen zu können. Einflussfaktoren sind zum einen die Unterscheidung zwischen Kolon- und Rektumkarzinom bezüglich des Therapieschemas (neoadjuvant, adjuvant, Radiochemo- oder reine Chemotherapie, Wahl des Chemotherapeutikums), zum anderen die genaue Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors, welche die OP-Radikalität und notwendigen Sicherheitsabstände beeinflusst,

Alter und Komorbiditäten der Patienten, welche postoperative Letalität und Gesamtüberleben beeinflussen, sowie das Vorhandensein, die Anzahl und die Lokalisation eventueller Metastasen [13]. Auch die Blutentnahme-Zeitpunkte variierten teilweise deutlich und wurden daher Zeiträumen zugeordnet, die sich aber jeweils über mehrere Wochen erstreckten. Dies trug zusätzlich zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei. Um die Patienten einzelnen Untergruppen, sortiert nach Abnahme-Zeitpunkten, Therapieregime, Tumorentität, Tumorstadium etc., zuordnen zu können, und so miteinander vergleichbare, signifikante Ergebnisse in ausreichender Anzahl zu generieren, wäre es notwendig, ein deutlich größeres Studienkollektiv zu untersuchen, am besten im Rahmen einer Multi-Center-Studie.

Die zentrale Frage bei der Auswertung der Verlaufsergebnisse war, ob sich ein Zusammenhang zwischen Therapieschritten, Krankheitsprogress und der CTC-Anzahl bzw. CK20-Expression erkennen ließe. In Einzelfällen korrelierten die Kurvenverläufe mit der Krankheitsentwicklung; die CTC-Zahlen bzw. die Expression von CK20 fielen mit dem Beginn einer adjuvanten Chemotherapie ab (s. **Abbildung 19**) oder zeigten in Zusammenhang mit der Detektion eines Lokalrezidivs steigende Tendenzen (s. **Abbildung 20**, **Abbildung 21**). Jedoch ließ sich bei der Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs kein konstanter Zusammenhang zwischen Therapie und Entwicklung der zirkulierenden Tumorzellen bzw. CK20-Expression darstellen. Daher lässt sich zum aktuellen Zeitpunkt keine sichere Aussage über eine tatsächliche Kausalität zwischen OP, ergänzenden Therapieansätzen oder dem Auftreten von Lokalrezidiven oder Metastasen und der Entwicklung der CTCs bzw. CK20-Expression im Blut der Patienten treffen.

Bei zwei Patientinnen wurden im Krankheitsverlauf Lokalrezidive bzw. Metastasen detektiert, die anschließend operativ entfernt wurden. Eine der Patientinnen befand sich im UICC Stadium II (**Abbildung 20**), die andere im UICC Stadium IV (**Abbildung 21**). Diese beiden Einzelfallbetrachtungen zeigen, dass der Nachweis von CTCs mittels CK20 RT-qPCR oder NYONE[®] auch im Rahmen der Tumornachsorge zur ggf. früheren Detektion von Metastasen geeignet ist. Auch ist diese „liquid biopsy“ einfacher durchzuführen als enmaschige CT Untersuchungen.

Generell besteht nach kurativer Therapie für fünf Jahre ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines lokalen oder lokoregionären Rezidivs (3- 24%) sowie von Fernmetastasen (25%) [13]. 70% der Rezidive treten innerhalb der ersten zwei Jahre nach Primäroperation auf [66]. In niedrigen Stadien ist dieses Risiko geringer zu bewerten als in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung.

In den zwei zuvor genannten Fällen wurden die Lokalrezidive nach ca. einem Jahr (nach 46 bzw. 67 Wochen postoperativ) detektiert, sodass die weitere Entwicklung der CTC-Zahl bzw. CK20-Expression nicht mehr in unseren Beobachtungszeitraum fiel. Wollte man zuverlässigere Daten bezüglich des Auftretens von Rezidiven und Metastasen und einer eventuellen Korrelation mit dem

Auftreten von CTCs oder der Expression von CK20 generieren, würde es sich anbieten, den Beobachtungszeitraum in zukünftigen Studiendesigns auf mindestens zwei Jahre auszuweiten.

Außerdem wäre es vor dem Hintergrund der Patientin mit Lokalrezidiv im UICC Stadium II interessant gewesen, zu beleuchten, was die Gründe für die Entwicklung eines Rezidivs, trotz des vergleichsweise geringen Tumorstadiums, gewesen sein könnten. Bisher ist allein eine Detektion von CTCs möglich, aber es gibt noch keine etablierten Möglichkeiten, zu zeigen, ob es sich hierbei um CTCs handelt, die das Potential zur Entwicklung von „Makrometastasen“ haben, oder ob es CTCs sind, die innerhalb der nächsten 48 Stunden durch Apoptose absterben, da sie nicht die Fähigkeit zur Extravasation erworben haben. Daher wird zukünftig nicht nur der Nachweis von CTCs mit unterschiedlichen Methoden im Fokus stehen, sondern die genauere Analyse der einzelnen CTCs, z.B. durch Mutationsanalysen.

5 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund der zentralen Bedeutung von Krebserkrankungen in Deutschland als eine der häufigsten Todesursachen gewinnt auch der Wunsch, einer genaueren Analyse von Krebszellen, der frühzeitigen Detektion etwaiger Metastasen oder Rezidive und der Wunsch, genauere prognostische Aussagen treffen zu können, immer mehr an Bedeutung. Ein Forschungsfeld beschäftigt sich seit langer Zeit mit der Detektion und Analyse zirkulierender Tumorzellen – Zellen, die sich vom Primärtumor abgelöst haben und in den Blutkreislauf der Patienten gelangen. Es wird davon ausgegangen, dass einige dieser Zellen in der Lage sind, Metastasen auszubilden.

Ziel unserer Arbeitsgruppe war es, CTCs im Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs zu isolieren. Zur Detektion standen uns zwei Verfahren zur Verfügung. Die Cytokeratin20-RT-qPCR, die bereits in mehreren Studien unserer Arbeitsgruppe etabliert werden konnte, sowie ein neues, Immunfluoreszenz-basiertes Nachweisverfahren auf der Grundlage immunhistochemischer Anfärbung der CTCs mit fluoreszierenden Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenantikörper (EpCAM, Her2/neu, Cytokeratin, EGFR).

Es sollte untersucht werden, inwiefern sich die Ergebnisse der beiden Verfahren vergleichen ließen und ob es Parallelen zwischen CTC-Status und Krankheitsstadium (UICC), bzw. zwischen CTC-Entwicklung und Krankheitsverlauf geben würde.

Zur Detektion der CTCs wurden Blutproben von 44 Patienten/-innen mit kolorektalem Karzinom zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung untersucht. Die Zellen wurden mittels Vacutainer[®] Röhrchen isoliert, fixiert, permeabilisiert und anschließend mit der Antikörpermischung gefärbt. Die Zellkerne bzw. Leukozyten wurden mittels DAPI bzw. Anti-CD45 angefärbt. Die Auswertung erfolgte anschließend automatisiert mittels des NYONE[®]-Cellimagers. Für die CK20-qPCR wurden die mononukleären Zellen mittels Ficoll isoliert und die RT-qPCR anschließend nach Herstellerangaben durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass das NYONE[®] in der Lage ist, Zellen automatisiert zu erkennen, zu quantifizieren und morphologisch abzubilden. Es ist gelungen, eine zuverlässige Methode zur Detektion zirkulierender Tumorzellen zu entwickeln, welche durch die standardisierte Vorgehensweise des NYONE[®] Untersucher-unabhängige, konstante Auswertungsergebnisse erbringt.

Insgesamt konnte bei 37,8 % (14/37 Patienten) aller in die Studie eingeschlossenen Patienten (abzüglich der neoadjuvant vorbehandelten) ≥ 1 CTC/8,2 ml Blut mit dem NYONE[®] detektiert werden. Anders als in anderen Studien gelang es uns, bereits in frühen Stadien der Erkrankung CTCs nachzuweisen. 36,8 % der Erkrankten mit UICC I+II wurden positiv auf CTCs getestet. Die Detektionsrate einer positiven relativen Genexpression von CK20 mittels der RT-qPCR lag bei

85,7 % (30/35). Zwischen Tumorstadium und CTC-Status konnte mit keinem beider Verfahren ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Wurden allerdings nur die Patienten betrachtet, deren CK20 Expression zum Zeitpunkt der Primäroperation über einem *cut-off* von 2.77 EU lag, konnte gezeigt werden, dass die relative Genexpression von der ersten (t0=OP-Zeitpunkt) zur zweiten Blutentnahme (t1=4 Wochen post-OP) signifikant abfiel ($p=0.007$). Bei einem Vergleich beider Verfahren wurde deutlich, dass 18/35 Patienten (51,4 %) mittels der CK20-qPCR positiv, allerdings mit dem NYONE[®] negativ getestet wurden. Bei 14/35 Patienten (40 %) lieferten beide Verfahren übereinstimmende Ergebnisse. Die Auswertung der Verlaufsbeobachtungen ergab sehr heterogene Ergebnisse, abhängig vom Therapieregime des jeweiligen Patienten, und lieferte daher keine vergleichbaren, signifikanten Erkenntnisse.

Zur Optimierung der Ergebnisse wäre es in Zukunft wünschenswert, neben einer Vergrößerung der Kohorte auch die Auswahl der Oberflächenantikörper zu erweitern, um neben epithelialen CTCs auch Zellen zu detektieren, die eine epithelial-mesenchymale Transition durchlaufen haben. Außerdem wäre es von Vorteil, die CK20-qPCR und das NYONE[®]-basierte Verfahren als sich ergänzende Verfahren zu verwenden. Die qPCR als sensitiveres, das NYONE[®] als spezifischeres Verfahren. Für optimierte Ergebnisse bei der Betrachtung der CTCs im Krankheitsverlauf wäre es anzustreben, den Untersuchungszeitraum auf mindestens zwei Jahre auszudehnen.

6 Anhang

6.1 Ethikvotum

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**



ETHIK-KOMMISSION

Universitäts-Kinderklinik - Schwannenweg 20 - 24105 Kiel

Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens
Direktorin
Institut für Experimentelle Tumorforschung
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 17
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 500-14 191
Telefax 04 31 / 500-14 195
ethikcomm@email.uni-kiel.de

Datum:

18.10.2016

AZ: A 110/99 (bitte stets angeben)
Studienplan: **Aufbau einer Krebsgewebesammlung: Molekularbiologische Charakterisierung von Tumorgenen und Tumormarkern bei soliden Tumoren mit Aufbau einer Gewebekbank – Biobank BMB-CCC**
Kurzdarstellung Biobank inkl. Anlagen 1-6
Patienteninformation und Einwilligungserklärung
Zustimmungen Prof. Dr. Becker, Prof. Dr. Vogel, PD Dr. Ullrich

Ihr Antrag vom: **25. August 2016 (Erweiterung/Nicht-onkologische Patienten, Aktualisierung Patienteninformation und Einwilligungserklärung)**

V o t u m

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem obengenannten Antrag gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein eingereichten Unterlagen beraten. Die Kommission stimmt darin überein, dass gegen die Erweiterung und Fortführung des Projektes keine Bedenken bestehen.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen des Projektes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung verbleibt bei der Projektleitung und den an dem Projekt teilnehmenden Ärzten/Mitarbeitern.


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

Seite 2 zum Az.: A 110/ 99 - Votum vom 18.10.2016

Nachfolgend sind die Mitglieder der Ethik-Kommission aufgeführt, die diesen Antrag im Umlaufverfahren beraten haben:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi (Pharmakologie)
Prof. Dr. med. Kathrin Dellas (Strahlentherapie)
Prof. Dr. jur. Sebastian von Kielmansegg (Rechtswissenschaften)
Prof. Dr. med. Maximilian Mehdorn (Neurochirurgie)
Prof. Dr. med. Heiner Mönig (Innere Medizin)
PD Dr. med. Dietfried Proppe (Innere Medizin und Klinische Pharmakologie)
Dr. phil. Monika Schwinge (Pröpstin i.R.)

7 Literaturverzeichnis

- [1] Zahl der Todesfälle im Jahr 2018 - Statistisches Bundesamt (2018) (Zugriff vom 24.08.2020). <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>
- [2] Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, et al. (2015) Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe, Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin
- [3] De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, Delrio P (2015) Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* 34:1087–1096
- [4] Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, et al. (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg.). Berlin
- [5] American Cancer Society (2017) Colorectal cancer. Facts & figures 2017-2019.
- [6] Nesbakken A (2018) Colon and rectum cancer. *Oncology encyclopedia* (Zugriff vom 30.03.2017). <http://oncolex.org/Colorectal-cancer/Background/Staging>
- [7] Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759–767
- [8] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Smits AMM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525–532
- [9] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft / Deutsche Krebshilfe / AWMF), S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1. AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, 1–328. (2019)
- [10] Wittekind C (2017) TNM Klassifikation maligner Tumoren. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA: Weinheim, 8. Aufl.
- [11] Brenner H, Kloor M, Pox CP (2014) Colorectal cancer. *Lancet* 383:1490–1502
- [12] Gump V, Henß H (2014) Klinisches Krebsregister Kolonkarzinom. Universitätsklinikum Freiburg
- [13] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft / Deutsche Krebshilfe / AWMF), S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzversion 1.1., AWMF-Registernummer: 021/007OL (2014)
- [14] Bhatti I, Patel M, Dennison AR, Thomas MW, Garcea G (2015) Utility of postoperative CEA for surveillance of recurrence after resection of primary colorectal cancer. *Int J Surg* 123–128
- [15] Chaffer CL, Weinberg R (2011) A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331:1559–1564
- [16] Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: The „seed and soil“ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3:453–458
- [17] Fidler IJ (1970) Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45:773–782
- [18] Fidler I, Kripke M (1977) Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* (80-) 197:893–895
- [19] Pantel K, Speicher MR (2015) The biology of circulating tumor cells. *Oncogene* 35:1–9
- [20] Alix-Panabieres C, Pantel K, et al. (2016) Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov* 6:479–491
- [21] Bork U, Rahbari NN, Schölch S, Reissfelder C, Kahlert C, Büchler MW, Weitz J, Koch M (2015) Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *Br J Cancer* 112:1306–1313
- [22] Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, Nolé F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, Grisanti S,

- Generali D, Garcia-Saenz JA, Stebbing J, Caldas C, Gazzaniga P, et al. (2014) Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 15:406–414
- [23] Yadav A, Kumar B, Yu J-G, Old M, Teknos TN, Kumar P (2015) Tumor-associated endothelial cells promote tumor metastasis by chaperoning circulating tumor cells and protecting them from anoikis. *PLoS One* 10:e0141602
- [24] van der Toom EE, Verdone JE, Gorin MA, Pienta KJ, van der Toom EE, Verdone JE, Gorin MA, Pienta KJ (2016) Technical challenges in the isolation and analysis of circulating tumor cells. *Oncotarget* 7:62754–62766
- [25] Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K, Capron F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Bréchet C, et al. (2000) Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 156:57–63
- [26] Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Janne PA, Kuang Y, Yanagita M, Wang L, Berkowitz JA, Distel RJ, Cayre YE (2011) A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res* 31:427–441
- [27] Bagnall JS, Byun S, Begum S, Miyamoto DT, Hecht VC, Maheswaran S, Stott SL, Toner M, Hynes RO, Manalis SR (2015) Deformability of tumor cells versus blood cells. *Scientific Reports*, Bd. 5
- [28] Gogoi P, Sepelhi S, Zhou Y, Gorin MA, Paolillo C, Capoluongo E, Gleason K, Payne A, Boniface B, Cristofanilli M, Morgan TM, Fortina P, et al. (2016) Development of an automated and sensitive microfluidic device for capturing and characterizing circulating tumor cells (CTCs) from clinical blood samples. *PLoS One* 11:e0147400
- [29] Miller MC, Doyle G V, Terstappen LWMM (2010) Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer. *J Oncol* 2010:617421
- [30] Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, et al. (2007) Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 13:920–928
- [31] Todenhofer T, Hennenlotter J, Feyerabend S, Aufderklamm S, Mischinger J, Kuhs U, Gerber V, Fetisch J, Schilling D, Hauch S, Stenzl A, Schwentner C (2012) Preliminary experience on the use of the Adnatest(R) system for detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients. *Anticancer Res* 32:3507–3513
- [32] Soeth E, Röder C, Juhl H, Krüger U, Kremer B, Kalthoff H (1996) The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 69:278–282
- [33] Hinz S, Röder C, Tepel J, Hendricks A, Schafmayer C, Becker T, Kalthoff H (2015) Cytokeratin 20 positive circulating tumor cells are a marker for response after neoadjuvant chemoradiation but not for prognosis in patients with rectal cancer. *BMC Cancer* 15
- [34] Hendricks A, Eggebrecht G-L, Bernsmeier A, Geisen R, Dall K, Trauzold A, Becker T, Kalthoff H, Schafmayer C, Röder C, Hinz S (2018) Identifying patients with an unfavorable prognosis in early stages of colorectal carcinoma. *Oncotarget* 9:27423–27434
- [35] Soeth E, Vogel I, Roder C, Juhl H, Marxsen J, Kruger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H (1997) Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 57:3106–3110
- [36] Yang L, Lang JC, Balasubramanian P, Jatana KR, Schuller D, Agrawal A, Zborowski M, Chalmers JJ (2009) Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells. *Biotechnol Bioeng* 102:521–534

- [37] Gross HJ, Verwer B, Houck D, Hoffman R, Recktenwald D (1995) Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as 10^{-7} . *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:537–541
- [38] Werner SL, Graf RP, Landers M, Valenta DT, Schroeder M, Greene SB, Bales N, Dittamore R, Marrinucci D (2015) Analytical validation and capabilities of the epic CTC platform: enrichment-free circulating tumour cell detection and characterization. *J Circ biomarkers* 4:3
- [39] Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, Selva E, Vignaud JM, Padovani B, Mouroux J, Marquette CH, Hofman P (2014) „Sentinel“ circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 9:e111597
- [40] Heitzer E, Auer M, Gasch C, Pichler M, Ulz P, Hoffmann EM, Lax S, Waldispuehl-Geigl J, Mauermann O, Lackner C, Höfler G, Eisner F, et al. (2013) Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res* 73:2965–2975
- [41] Flatmark K, Borgen E, Nesland JM, Rasmussen H, Johannessen H-O, Bukholm I, Rosales R, Hårklau L, Jacobsen HJ, Sandstad B, Boye K, Fodstad Ø (2011) Disseminated tumour cells as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Br J Cancer* 104:1434–9
- [42] de Wit S, van Dalum G, Terstappen LWMM (2014) Detection of circulating tumor cells. *Scientifica (Cairo)* 2014:819362
- [43] MCF-7 cell information. (Human breast adenocarcinoma cell line). Cell culture protocol and transfection resources. (2020) (Zugriff vom 18.08.2017). <http://www.mcf7.com/>
- [44] ATCC® in partnership with LGC standards. HT-29 (ATCC® HTB-38™) (2016) (Zugriff vom 06.04.2017). https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-38.aspx?geo_country=de#culturemethod
- [45] ImmunoSpot® (2017) © Cellular Technology. Limited CTL-wash™ supplement 10x (Zugriff vom 04.10.2018). <http://www.immunospot.com/serum-free-media/ctl-wash-supplement-10x>
- [46] BioLegend (2015) Fixation Buffer (Zugriff vom 18.08.2017). <https://www.biolegend.com/en-us/products/fixation-buffer-1496>
- [47] Beckton Dickinson (2010) Vacutainer® CPT™
- [48] BD worldwide. BD vacutainer® CPT™ system (cell preparation tube) (2005) (Zugriff vom 17.08.2017). <http://www.bd.com/scripts/de/productsdrilldown.asp?CatID=217&SubID=700&siteID=20077&d=&s=de&sTitle=Deutschland&metaTitle=Spezialsysteme+für+Molekulardiagnostik%2C+Immunologie+und+Proteomics&dc=de&dcTitle=Deutschland>
- [49] Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3:1101–1108
- [50] Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, et al. (2004) Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 10:8152–8162
- [51] Chaudry MA, Sales K, Ruf P, Lindhofer H, Winslet MC (2007) EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges. *Br J Cancer* 96:1013 – 1019
- [52] Belov L, Zhou J, Christopherson RI (2011) Cell surface markers in colorectal cancer prognosis. *Int J Mol Sci* 12:78–113
- [53] Gosens MJEM, Van Kempen LCL, Van De Velde CJH, Van Krieken JHJM, Nagtegaal ID (2007) Loss of membranous EpCAM in budding colorectal carcinoma cells. *Mod Pathol* 20:221–232
- [54] Haier J, Nasralla M, Nicolson GL (2000) Cell surface molecules and their prognostic values in assessing colorectal carcinomas. *Ann Surg* 231:11–24
- [55] Hayashi Y, Widjono YW, Ohta K, Hanioka K, Obayashi C, Itoh K, Imai Y, Itoh H (1994) Expression of EGF, EGF-receptor, p53, v-erb B and ras p21 in colorectal neoplasms by

- immunostaining paraffin-embedded tissues. *Pathol Int* 44:124–130
- [56] Wang G, He Y, Sun Y, Wang W, Qian X, Yu X, Pan Y (2019) Prevalence, prognosis and predictive status of HER2 amplification in anti-EGFR-resistant metastatic colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 22:813–822
- [57] Chu P, Wu E, Weiss LM (2000) Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: A survey of 435 cases. *Mod Pathol* 13:962–972
- [58] Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim G, Beiske K, Fodstad Ø, Diel I, Solomayer E-F, Theoharous P, Coombes RC, Smith BM, Wunder E, et al. (2003) Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. The European ISHAGE working group for standardization of tumor cell detection. *Cytotherapy* 1:377–388
- [59] Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AGJ, Uhr JW, Terstappen LWMM (2004) Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 10:6897–6904
- [60] Chen JF, Ho H, Lichterman J, Lu YT, Zhang Y, Garcia MA, Chen SF, Liang AJ, Hodara E, Zhau HE, Hou S, Ahmed RS, et al. (2015) Subclassification of prostate cancer circulating tumor cells by nuclear size reveals very small nuclear circulating tumor cells in patients with visceral metastases. *Cancer* 121:3240–3251
- [61] Nieto MA, Huang RYYJ, Jackson RAA, Thiery JPP (2016) EMT: 2016. *Cell* 166:21–45
- [62] Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA (2018) EMT in cancer. *Nat Rev Cancer* 18:128–134
- [63] Zhao R, Cai Z, Li S, Cheng Y, Gao H, Liu F, Wu S, Liu S, Dong Y, Zheng L, Zhang W, Wu X, et al. (2017) Expression and clinical relevance of epithelial and mesenchymal markers in circulating tumor cells from colorectal cancer. *Oncotarget* 8:9293–9302
- [64] Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle G V., Tissing H, et al. (2008) Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:3213–3221
- [65] Wen L, Guo L, Zhang W, Li Y, Jiang W, Di X, Ma JH, Feng L, Zhang K, Shou J (2019) Cooperation between the inflammation and coagulation systems promotes the survival of circulating tumor cells in renal cell carcinoma patients. *Front Oncol* 9:Article 504
- [66] Herold G et al. (2018) *Innere Medizin* 2019. (G. Herold, Hrsg.). Köln

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Thomas Becker für die Möglichkeit der Promotion an seiner Klinik und seine Unterstützung.

Herrn PD Dr. med. Sebastian Hinz danke ich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen sowie für die anspruchsvolle und interessante Promotions-Thematik und seine stete Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. Clemens Schafmayer danke ich für seine fortwährende Unterstützung, wertvolle Diskussionsbeiträge und die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Für viele fruchtbare Gespräche und Anregungen sowie spannenden Input im Rahmen des Literaturseminars danke ich sehr Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens, sowie dem ganzen Team des Instituts für Experimentelle Tumorforschung an der CAU Kiel.

Frau Dr. rer. nat. Reinhild Geisen und Herrn Dr. med. Alexander Hendricks danke ich sehr für die Einweisung und Hilfe bei der praktischen Arbeit im Labor sowie dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Diese Gelegenheit möchte ich auch nutzen, Frau Julia Wilking und Frau Bianca Zinke sehr für ihren großen Einsatz bezüglich der Ausweitung der Biomaterialbank und der Durchführung der RT-qPCR danken.

Meiner Arbeitsgruppe und auch den anderen Arbeitsgruppen des Instituts für Experimentelle Tumorforschung möchte ich für die immer angenehme, hilfsbereite und kollegiale Arbeitsatmosphäre danken.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Herrn PD Dr. med. Sebastian Hinz, Herrn Dr. med. Alexander Hendricks sowie Frau Dr. rer. nat. Reinhild Geisen.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern danken, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit und in jeder Hinsicht unterstützten