

*Aus dem Institut für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Tanja Fehm*

Workflow zur Anreicherung und Isolierung einzelner zirkulierender
Tumorzellen (CTC) von Mammakarzinom-Patientinnen
zur immunzytochemischen Charakterisierung und Amplifikation ihrer
genomischen DNA

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Yvonne Link (geb. Decker)

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Für meine Eltern: Silvia und Detlev Decker

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

*Neumann Martin Horst Dieter, Schneck Helen, Decker Yvonne, Schömer Susanne, Franken André, Endris Volker, Pfarr Nicole, Weichert Wilko, Niederacher Dieter, Fehm Tanja, Neubauer Hans et al. **Isolation and characterization of circulating tumor cells using a novel workflow combining the CellSearch® system and the CellCelector™**. Biotechnol Prog. 2017;33(1):125-32.*

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist bekannt für seine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung, sodass schon bei der Erstdiagnose möglicherweise eine systemische Erkrankung vorliegen kann und zirkulierende Tumorzellen (CTCs) im peripheren Blut nachweisbar sind. Cristofanilli *et al.* (2004) erläuterten im Rahmen einer prospektiven Studie, dass bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs ein Nachweis von mehr als 5 CTC in 7,5 ml Blut mit einem signifikant kürzeren Überleben korreliert (1). Diese Tumorzellen sind eine sehr heterogene Population von Tumorzellen und weisen unterschiedlichste Eigenschaften auf. Ein besseres Verständnis dieser heterogenen CTC-Biologie ermöglicht die Entwicklung prognostischer und prädiktiver Marker, die Auswahl der optimalen individuellen Therapie und somit auch die Prognose von Mammakarzinom-Patientinnen zu verbessern (2, 3).

Durch die Kombination der Vorteile des CellSearch®-Systems, des VyCap- und ISET-Filters und des CellCelector-Systems konnte ein Verfahrensprotokoll entwickelt werden, welches die Detektion, Isolierung und Charakterisierung EpCAM-positiver und -negativer CTCs als Einzelzellen bei Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen ermöglicht.

Insgesamt konnten mit dem neu entwickelten Arbeitsweg zur Einzelzellisolierung bei 32 Patientinnen 1038 CTCs detektiert und 893 dieser nach dem Transfer der Probe durch den CellCelector wiedergefunden werden. Dies entspricht einer Transfer- und Detektionseffizienz von 86 %. Anschließend konnten 98 %, also 872 CTCs, in *PCR Tubes* oder auf Objektträger als Einzelzellen abgelegt werden. Zur immunzytochemischen Charakterisierung der CTCs auf das, mit einer Zellinvasivität in Verbindung stehende, Protein CapG wurden aus 16 Cartridges des CellSearch-Systems 167 CTCs als Einzelzellen auf Objektträger isoliert und anschließend für den Marker CapG gefärbt. Bei 143 CTCs, 86 % der gesamten CTCs, konnte eine CapG-Expression durch die Antikörperfärbung nachgewiesen werden. 24 CTCs zeigten keine immunzytochemisch nachweisbare Expression von CapG.

Zum Beweis der guten DNA-Qualität der Einzelzellproben für eine mögliche genomische Analyse der CTCs wurden aus 32 Cartridges des CellSearch-Systems 95 CTCs in *PCR Tubes* abgelegt und eine „*Whole genome amplification*“ durchgeführt. In der Qualitätskontrolle des Ampli1-WGA-Kit (silicon biosystems) hatten 24 % der WGA-Produkte eine gute DNA-Qualität mit > 3 Banden und 76 % hatten < 3 Banden. Die entwickelte Technologie für die Einzelzellisolierung von CTCs in der Kombination des CellSearch®-Systems, VyCap- und ISET-Filter und des CellCelector-Systems bietet einen Grundstein für die Verbesserung der Charakterisierung von EpCAM-positiven und -negativen CTCs aus Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen.

Summary

Breast cancer is known for its early lymphogenic and hematogenic metastasis, so that systemic disease may already be present at initial diagnosis and circulating tumor cells (CTCs) are detectable in the peripheral blood. Cristofanilli et al (2004) explained in a prospective study that in patients with metastatic breast cancer, detection of more than 5 CTCs in 7,5 ml blood correlates with significantly shorter survival (1). These tumor cells are a very heterogeneous population of tumor cells and exhibit a wide variety of characteristics. Understanding this heterogeneous CTC biology will enable the development of new prognostic and predictive markers, the selection of optimal individualized therapy, and thus improve the prognosis of breast cancer patients (2, 3).

By combining the advantages of the CellSearch-system, the VyCap- and ISET-filter, and the CellCelector-system, a procedural protocol has been developed that enables the detection, isolation, and characterization of EpCAM-positive and -negative CTCs as single cells in blood samples from breast cancer patients.

In total, 1038 CTCs were detected from 32 patients using the newly developed workflow for single cell isolation and 893 of these were recovered after transfer of the sample through the CellCelector. This corresponds to a transfer and detection efficiency of 86 %. Subsequently, 98 %, i.e. 872 CTCs, could be deposited in PCR tubes or on slides as single cells. For immunocytochemical characterization of CTCs for the protein CapG, which is associated with cell invasiveness, 167 CTCs were isolated from 16 cartridges of the CellSearch system as single cells on slides and subsequently stained for the marker CapG. CapG expression was detected in 143 CTCs, 86 % of the total CTCs, by antibody staining. 24 CTCs showed no immunocytochemically detectable expression of CapG.

To prove the good DNA-quality of the single cell samples for a possible genomic analysis of the CTCs, 95 CTCs were deposited into PCR tubes from 32 cartridges of the CellSearch-system and a whole genome amplification was performed. In the quality control of Ampli1-WGA-kit (silicon biosystems), 24 % of WGA-products had good DNA-quality with > 3 bands and 76 % had < 3 bands. The developed technology for single cell isolation of CTCs in the combination of the CellSearch® System, VyCap- and ISET-filter and the CellCelector™ - System provides a cornerstone for improving the characterization of EpCAM-positive and -negative CTCs from blood samples of breast cancer patients.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
aCGH	<i>Array based- comparative genomic hybridization</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BF	<i>Bright Field</i>
BRCA1/2	<i>Breast Cancer 1/2</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
ca.	circa
C11	pan-Cytokeratin Antikörper
CA15-3	<i>Cancer-Antigen 15-3</i>
CapG	<i>Macrophage Capping Protein</i>
CD45	<i>cluster of differentiation 45</i>
CDH1	E-Cadherin-Gen
cDNA	<i>Complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cfDNA	Zirkulierende freie Desoxyribonukleinsäure
CK	Zytokeratin
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
CTC	Zirkulierende Tumorzelle (<i>circulating tumor cell</i>)
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4',6 Diamidin-2 phenylindol
DCC-Net	<i>Disseminated Cancer Cell</i> Netzwerk
DCIS	Duktales Karzinom in situ
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DLA	Diagnostische Leukapherese
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTC	<i>Disseminated tumor cells</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EpCAM	Epitheliales Zell-Adhäsions-Molekül (<i>epithelial cell adhesion molecule</i>)

ER	Östrogenrezeptor
FACS	<i>Fluorescence - Activated Cell Sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
G-CSF	Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
gDNA	Genomic Desoxyribonukleinsäure
H₂O	Wasser
HER-2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2 (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
ISET	<i>Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells</i>
IVFC	<i>In-vivo-flow-Zytometrie</i>
Ki67	Ki-Kiel 67
LCIS	Lobuläres Karzinom in situ
LN	Lobuläre Neoplasie
M	Metastasen
MagNest	Magnetadapter des CellSearch Systems
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
MRD	<i>Minimal Residual Disease</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
neg	negativ
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NSCLC	<i>nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom</i>
NST	invasives Mammakarzinom vom nicht speziellen Typ
OS	<i>Overall Survival</i>
PALB2	<i>Partner and Localizer of BRCA2</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	Phycoerythrin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraform-Aldehyd
PFS	<i>Progression free Survival</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-3-Kinase katalytische Untereinheit alpha

pos	positiv
PR	Progesteronrezeptor
QC	<i>Quality Control</i>
rpm	Revolution per Minute
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
rVAR2	Recombinant malaria protein VAR2CSA
SABCS	<i>San Antonio Breast Cancer Symposium</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TP53	Tumorsuppressor-Gen p53
TRITC	Tetramethylrhodamine
v.	von
vs.	versus
WBC	Leukozyt (<i>white blood cell</i>)
WGA	<i>Whole Genome Amplification</i>
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>
z.B.	zum Beispiel

SI-Einheiten

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.2	Diagnostik bei dem Verdacht eines Mammakarzinoms	1
1.3	Das invasive Mammakarzinom	2
1.4	Das metastasierte Mammakarzinom	3
1.5	Behandlung des Mammakarzinoms	3
1.6	Die Tumorzell dissemination	3
1.7	Die zirkulierenden Tumorzellen (CTC)	5
1.8	Gewinnung der CTCs aus dem peripheren venösen Patientenblut	6
1.8.1	Gewinnung der CTCs durch immunomagnetische Anreicherung	7
1.8.2	Gewinnung der CTCs durch morphologische Zelleigenschaften	8
1.8.3	Gewinnung der CTCs durch Kombinationsverfahren	9
1.9	CTCs als Prognosefaktor beim metastasierten Mammakarzinom	10
1.10	Einzelzellisolierung der CTCs	10
1.11	Limitationen der aktuellen CTC Analyse	11
1.12	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Patientenproben	14
2.1.2	Blutproben	14
2.1.3	Zelllinien und Zellkulturen	14
2.1.4	Antikörper	16
2.1.5	Labormaterialien	17
2.1.6	Chemikalien/Reagenzien/Kits	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Bestimmung der Zellzahl	20
2.2.2	Lymphozytenisolierung	20
2.2.3	Anreicherung und Detektion EpCAM-positiver CTCs	21
2.2.4	Einzelzellisolierung EpCAM-positiver und -negativer CTCs	22
2.2.5	Arbeitsablauf für die Einzelzellisolierung des CellCelectors	24
2.2.6	Herstellung von Cytospins	25
2.2.7	Immunfluoreszenzfärbungen	27
2.2.8	Whole Genome Amplification (WGA) - Ampli1™ WGA-Kit	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Methodenentwicklung zur Einzelzellisolierung in Suspension	31
3.1.1	Einzelzellisolierung EpCAM-positiver Zellen des CellSearch-Systems	31
3.1.2	Einstellung der optischen Einheit des CellCelectors	31
3.1.3	Detektionsrate von Zellen im CellSearch und CellCelector	35

3.2	<i>Optimierung des Verfahrens zur Einzelzellisolierung</i>	37
3.2.1	Optimierung des Arbeitsablaufs zur Einzelzellisolierung	37
3.2.2	Einstellung der Parameter zur Einzelzellisolierung	42
3.2.3	Etablierung des <i>Workflows</i> zur Einzelzellisolierung	46
3.2.4	Optimierung der CD45-APC-Immunfluoreszenzfärbung	51
3.3	<i>Methodenentwicklung zur Einzelzellisolierung von Oberflächen</i>	56
3.3.1	Einzelzellisolierung des VyCap-Filters	56
3.3.2	Einzelzellisolierung des ISET-Filters	59
3.4	<i>Charakterisierung der Einzelzellen</i>	61
3.4.1	Immunzytochemische Charakterisierung von CapG	61
3.4.2	Molekulargenetische Charakterisierung von Einzelzellen	63
3.5	<i>Anwendung der Verfahrensprotokolle an Patientenproben in Suspension</i>	65
3.5.1	Einzelzellisolierung EpCAM-positiver CTCs des CellSearch-Systems	65
3.5.2	Einzelzellisolierung von CTCs aus Patientenproben	69
3.5.3	Einzelzellisolierung von CTCs aus Apheresatproben	71
3.5.4	CD45-immunzytochemische Färbung von Patientenproben	71
3.6	<i>Anwendung der Verfahrensprotokolle an Patientenproben v. Oberflächen</i>	74
3.6.1	Einzelzellisolierung EpCAM-negativer CTCs des VyCap-Filters	74
3.6.2	Einzelzellisolierung von CTCs des ISET-Filters	77
3.7	<i>Charakterisierung der CTCs als Einzelzellen</i>	81
3.7.1	Immunzytochemische Charakterisierung von CapG	81
3.7.2	Molekulare Downstream-Analyse der CTCs	84
4	Diskussion	87
4.1	<i>Vorbemerkung</i>	87
4.2	<i>EpCAM-abhängige Einzelzellisolierung von CTCs</i>	88
4.2.1	Detektionsrate von CTCs	89
4.2.2	Einzelzellisolierung von CTCs	90
4.2.3	Herausforderung an die Methodenentwicklung	93
4.3	<i>EpCAM-unabhängige Einzelzellisolierung von CTCs</i>	94
4.4	<i>Immunzytochemische Charakterisierung von CapG</i>	98
4.5	<i>Molekulare Downstream-Analyse von CTCs als Einzelzellen</i>	99
4.6	<i>Wissenschaftlicher Mehrwert der etablierten Methode</i>	102
4.6.1	Zusammenfassung	102
4.6.2	Aktuelle Anwendung der etablierten Methode zur Einzelzellisolierung	103
4.7	<i>Schlussbetrachtung: Die Bedeutung der CTC-Einzelzellanalyse</i>	104
5	Literaturverzeichnis	106

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom stellt eine bedeutende Krebserkrankung dar und ist mit 30,5 % die häufigste maligne Erkrankung der Frau in der industrialisierten Welt. In den letzten Jahren wurde ein drastischer Anstieg der Fallzahlen verzeichnet. Im Jahr 2019 veröffentlichte das Robert Koch-Institut Daten, die zeigten, dass 71.375 Neuerkrankungen in Deutschland diagnostiziert und 18.570 Sterbefälle registriert wurden (4). Die relative 5 Jahres-Überlebensrate betrug 87 %. Zusätzlich treten durchschnittlich pro Jahr 6.500 Brustkrebs-Vorstufen auf, sogenannte *in situ* Karzinome (*ductal carcinoma in situ* – DCIS). In den Jahren 2005-2009 wurde deshalb ein flächendeckendes Mammographie-Screening-Programm, als Vorsorgeuntersuchung für Frauen in einem Alter von 50-69 Jahren, eingeführt. In diesen Jahren stieg die Zahl an diagnostizierten Mammakarzinomen rasant an und sank dann bis zum Jahre 2019 fast wieder bis zum Ausgangsniveau. Durch diese Einführung konnte die Rate an fortgeschrittenen Tumoren und auch zugleich die Sterberate, bei gleichzeitig steigenden Neuerkrankungen, gesenkt werden (5). Eine Zunahme der Fallzahlen von diagnostizierten präinvasiven Mammakarzinomen ist weiterhin zu erwarten. Bis zum Ende des Jahres 2022 wird weiterhin ein Rückgang der insgesamten Neuerkrankungsrate zum Ausgangsniveau prognostiziert (4). Zudem gab es einige Fortschritte neuer Therapiestrategien des Mammakarzinoms, die natürlich zusätzlich zur Senkung der Sterberate beigetragen haben. Wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, an einem Mammakarzinom zu erkranken, ist durch verschiedene unterschiedliche Risikofaktoren beeinflusst. Bis heute geht man von einem multifaktoriellen Geschehen aus, mit einer Kombination aus dem Lebensalter, der hormonelle Situation, dem Lebensstil, einigen Umweltfaktoren und zusätzlich genetischen Faktoren der Frau (6). Durch die optimierte Früherkennung, die Entwicklung von neuen, zielgerichteten Therapieregimen und die Festlegung von individuellen Behandlungsstrategien einer erweiterten interdisziplinären Zusammenarbeit in zertifizierten Tumorzentren, konnte die Heilungsrate in den letzten Jahren deutlich verbessert werden (7).

1.2 Diagnostik bei dem Verdacht eines Mammakarzinoms

Zu der Diagnostik bei einem Brustkrebsverdacht gehört neben der Tastuntersuchung, die Ultraschalldiagnostik, die Mammographie und gegebenenfalls ergänzend die Magnetresonanztomographie mit Kontrastmittel. Bei einem auffälligen radiologischen Befund wird der Verdacht durch eine Gewebe-Entnahme mittels Stanzbiopsie oder Vakuumbiopsie verifiziert. Wenn invasive Karzinomzellen nachgewiesen werden, erfolgt die Bestimmung

prädiktiver Faktoren zur Vorhersage eines Therapieeffektes und prognostischer Faktoren zur Darstellung der Aggressivität des Tumors. Zur Analyse einer möglichen endokrinen Therapieoption werden der ER- und PR-Status am Tumor bestimmt. Zudem wird das Vorliegen einer HER2/neu-Überexpression, ein epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, untersucht. Ein wichtiges körpereigenes Eiweiß in der Krebsdiagnostik ist zudem das Ki67. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine vermehrte Zellteilung der Tumorzellen mit der vermehrten Synthese von Ki67 korreliert und gleichzeitig zellteilungshemmende Faktoren ihre Funktionen verlieren (8). Der Nachweis von Ki67 spiegelt indirekt die Proliferationsrate und damit auch die Aggressivität einer Zellpopulation wider (9). Die Tumormarker des Mammakarzinoms (CA 15-3 und CEA), die in Blutproben der erkrankten Frauen nachgewiesen werden könnten, haben keinen besonderen Stellenwert zum Nachweis einer bereits erfolgten Metastasierung und zur Beurteilung der Prognose der Patientin. Es besteht eine hohe Varianz der Mammakarzinome im Hinblick auf das Proliferations- und Ausbreitungsprofil. Die histologische Klassifikation richtet sich nach dem Ursprungsgewebe. Daher resultiert die Einteilung in eine duktale, von dem Milchgangsepithel ausgehende, und eine lobuläre, von den Milchdrüsenläppchen ausgehende Neoplasie. Ca. 75 % der Mammakarzinome werden dem „invasiven Karzinom ohne speziellen Typ“ (*Invasive carcinoma of no special type*, NST) zugeordnet. Histologisch präsentieren sich die Tumorzellen als zusammenhängende Zellverbände mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad. In der immunhistologischen Färbung sind diese Zellverbände daher E-Cadherin-positiv, da dieses Haft-Protein die Epithelzellen in Zellverbänden zusammenhält. Die restlichen 25 % der Mammakarzinome gehören zu dem „invasiven Karzinom mit speziellem Typ“. Diese treten oft multizentrisch oder bilateral auf. Das „invasiv-lobuläre Karzinom“ stellt den größten Anteil der speziellen Mammakarzinom-Subtypen dar. Diese Karzinomzellen ordnen sich histologisch kettenförmig an und wachsen nicht-kohäsiv. Zudem unterscheiden sich die Tumorzellen durch ein bestimmtes Genexpressionsmuster. Es hat Einfluss auf die Zellproliferation, die Tumorerkrankung und die Hormon- und HER2/neu-Rezeptoraktivität. Diese werden zur Bestimmung der Prognose, Prädiktion, des Rezidivrisikos und Therapieentscheidung herangezogen (10).

1.3 Das invasive Mammakarzinom

Die Vorstufe des invasiven Mammakarzinoms wird als *in situ*-Karzinom bezeichnet (DCIS, LCIS), solange die entarteten Zellen die Basalmembran noch nicht durchbrochen haben. Durchbrechen sie diese und wachsen in das umliegende Gewebe, werden sie als invasiv bezeichnet. Die meisten Karzinome entstehen im oberen äußeren Quadranten der Brust (55 %), während das Vorkommen in den anderen Quadranten zwischen 5-15 % und 5-25 %

im Bereich der Mamille beträgt. Es werden zwei Tumorentitäten (duktal und lobulär), je nach Entartungsursprung, unterschieden. Das Mammakarzinom wird zusätzlich in vier behandlungsrelevante Subtypen, je nach Expressionsprofil und der Proliferationsrate, eingeteilt: Luminal-A-like Typ, Luminal-B-like Typ, HER2/neu-Typ non-Luminal und Basal-like Typ (11). Die Veränderung der Tumorzellen von der Ursprungszelle, mit Hinblick auf das Proliferationsverhalten und dem Aussehen der Karzinomzellen, wird als Grading bezeichnet. Das Tumorgewebe kann je nach Differenzierungsgrad in drei Grading-Klassen eingeteilt werden (G1= gut differenziert, geringer Malignitätsgrad; G2= mäßig differenziert, mäßiger Malignitätsgrad; G3= schlecht differenziert, hoher Malignitätsgrad). Diese Einteilung bestimmt die Prognose des Tumors, hat gleichzeitig Einfluss auf des Behandlungsregime und die Empfehlung einer neoadjuvanten Therapie (12).

1.4 Das metastasierte Mammakarzinom

Das Mammakarzinom metastasiert früh lymphogen und hämatogen. Die Metastasen lösen sich von dem ursprünglichen Tumorgewebe ab und kommen über die Lymph- oder Blutbahn in andere Organsysteme. Eine lymphogene Metastasierung kann regional in die axillären oder entlang der A. mammaria interna befindlichen ipsilateralen Lymphknoten erfolgen. Zudem ist aber auch eine Fernmetastasierung in zervikale oder in die kontralateralen regionalen Lymphknoten möglich. Die hämatologische Streuung erfolgt vor allem in die Knochen mit osteolytischen Metastasen, die Lunge und Pleura, das Gehirn, die Leber, selten das Ovar und die Milz. Bei Vorliegen eines regionalen Lymphknotenbefalls ist eine bereits hämatogene Streuung wahrscheinlich.

1.5 Behandlung des Mammakarzinoms

Standardtherapie des Mammakarzinoms ist die operative Therapie. Dabei wird vor allem eine brusterhaltende Operation angestrebt. Je nach Stadium erfolgt zusätzlich eine neoadjuvante oder adjuvante Strahlen- und/oder systemische Therapie (Antihormon-, Antikörper-Chemotherapie). Die Therapieentscheidung ist abhängig von der Tumorbiologie und der medizinischen Patientenverfassung (12).

1.6 Die Tumorzell dissemination

Das Mammakarzinom wird häufig in einem Stadium ohne Metastasierung diagnostiziert. Durch das eingeführte Vorsorgeprogramm und die neuen Therapieregime wird eine hohe Heilungsrate erreicht. Im Jahre 2017/2018 konnte eine relative 10-Jahres-Überlebensrate von 83 % erreicht werden (4). Eine große Herausforderung stellt das häufige Rezidivrisiko dar.

Tumorzellen haben die Eigenschaft des unkontrollierten Wachstums und die Fähigkeit zur Migration und Invasion. Diese Fähigkeiten führen zur Metastasierung, sodass schon bei der Erstdiagnose des Mammakarzinoms dieses möglicherweise bereits als eine systemische Erkrankung vorliegen. Es ist also möglich, dass es schon früh im Krankheitsverlauf zu einer hämatogenen Streuung von Tumorzellen kommt. Die Metastasierung hat eine sehr hohe klinische Relevanz, da sie trotz „*Targeted Therapie*“ für 90 % der Tumor-assoziierten Todesfälle verantwortlich ist (13). Viele Tumorpatienten bekommen im M0-Stadium eine adjuvante Chemotherapie, um gegebenenfalls existierende Mikrometastasen zu behandeln (14). Da bildgebende Verfahren und Serummarker nur bedingt fähig sind, eine beginnende Metastasierung und das Patienten-*Outcome* nachzuweisen, ist es notwendig, neue Verfahren zur Detektion einer Tumorzeldissemination und zum Monitoring einer laufenden Tumorthherapie zu etablieren (15). Einige Studien konnten bereits eine Aussagekraft der CTCs als neuen Biomarker beim Mammakarzinom belegen. Die zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) lösen sich vom Primärtumor, gelangen durch Gewebedegeneration in die Blutbahn zur anschließenden Extravasation und Proliferation.

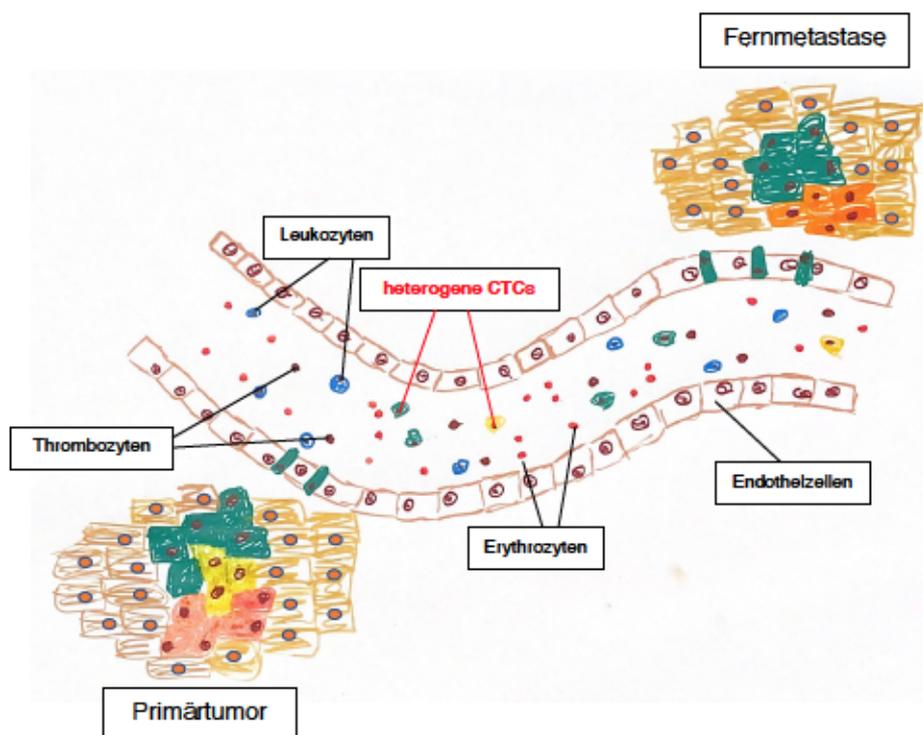


Abb. 1: Schematische Darstellung der Tumorzeldissemination und Metastasierung durch CTCs. Einige Tumorzellen lösen sich vom Primärtumor in die Blutbahn zu den anderen Blutzellen. Ein Teil der CTCs geht in die Apoptose und eine heterogene CTC-Population infiltriert in das umliegende extravasale Gewebe und bildet dort Fernmetastasen. Quelle: eigene Zeichnung in Anlehnung an Neumann MH et al., 2017 (16). CTC: zirkulierende Tumorzelle

Diese Zellvermehrung führt zur Ausbildung von Metastasen an einem neuen Zielort. Bei Gesunden oder Patienten mit benignen Erkrankungen konnten deshalb bisher keine zirkulierenden Tumorzellen nachgewiesen werden (17). Die Mehrzahl der CTCs werden in diesem Vorgang zerstört und gehen in die Apoptose, einige strömen über die Blutbahn in das distale Gewebe und einige gehen in einen Ruhezustand. Der geringe Anteil von ca. 0,01 % Zellen im distalen Gewebe oder Knochenmark wird als disseminierte Tumorzellen bezeichnet (DTC) und kann proliferieren und Metastasen bilden (18).

Es gibt unterschiedliche Theorien für den Nutzen des Ruhezustands dieser Zellen. Auf der einen Seite wird vermutet, dass die Zellen sich in einem Überlebenskampf befinden und zum Schutz aus dem eigentlichen Zellzyklus entfliehen und mit einer nur noch geringen Proliferationsrate wachsen. Auf der anderen Seite gehen einige Forscher auf Grund der langen Überlebenszeit und der erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika von stammzellähnlichen Eigenschaften der Tumorzellen aus (19). Dieser Prozess könnte den langen klinisch tumorfreien Zeitraum zwischen einer ausgeheilten Mammakarzinom-Erkrankung und dessen Tumorrezidiv nach einigen Jahrzehnten erklären (20). Man geht davon aus, dass die Tumorzell-dissemination kein unidirektionaler Prozess ist. Es ist möglich, dass aggressive CTCs auch den Ort des Primärtumors nach erfolgter Tumorentfernung erneut besiedeln können und dort ein Rezidiv bilden („*Self-Seeding*“) (21). Tumorzellen im Knochenmark können nur durch eine Knochenuntersuchung nachgewiesen werden. Sobald disseminierte Tumorzellen im Knochenmark aufzufinden sind, spricht man von einer MRD (*minimal residual disease*). Der Nachweis von Mikrometastasen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Diagnose von Brustkrebs korreliert mit einer schlechten Prognose im Krankheitsverlauf (22). Auf Grund des klinischen Aufwands einer Knochenmarkspunktion und der niedrigen Detektionsrate bei der Gewinnung von DTCs, wurde im Verlauf der Zeit den CTCs mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Die Gewinnung der CTCs lässt sich wesentlich einfacher durchführen und ist durch eine Venenpunktion aus peripheren Blut möglich (23).

1.7 Die zirkulierenden Tumorzellen (CTC)

Bereits im 19. Jahrhundert wurden zirkulierende Tumorzellen (engl. *Circulating Tumor Cells*, CTCs) bei einem verstorbenen Krebspatienten im metastasierten Stadium mikroskopisch von T. Ashworth, einem Pathologen, beschrieben. Anhand der Zellmorphologie und dem Vergleich zum Primärtumor konnte schon damals eine Zirkulation von Tumorzellen nachgewiesen werden (24). In dieser Zeit fehlte es aber an nutzbaren Analysemethoden, sodass die Bedeutung dieser Tumorzell-dissemination im Zusammenhang mit der Metastasierung erst viele Jahr später nachgewiesen werden konnte (25). Die Detektion dieser Zellen bringt einige Probleme mit sich. Die zirkulierenden Tumorzellen sind heterogen und zumeist nur in geringer

Zahl (1-10 CTC/7,5 ml Vollblut) im peripheren Blut nachweisbar. Die Mehrzahl der CTCs konnten in einer Studie bei der zytogenetischen Untersuchung eine Aneusomie aufweisen und als maligne bezeichnet werden (26). Zwischen den festen Blutbestandteilen, wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten machen die CTCs nur einen geringen Anteil im Blut aus, was deren Nachweis erheblich erschwert (27). Sie können sich in ihrer Größe unterscheiden (5-50 µm) und verschiedene Oberflächenmarker exprimieren (*Epithelial Cellular Adhesion Molecule - EpCAM* oder *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 - HER2/neu*). Eine entscheidende Rolle bei der Detektion spielt der gemeinsame epitheliale Ursprung dieser Zellen. Das Phänomen der „*Epithelial-Mesenchymal Transition*“ (EMT) von zirkulierenden Tumorzellen ist ein wichtiger Prozess in der Metastasierung. Dies bedeutet, dass die Zellen im Rahmen des Metastasierungsprozesses von einem epithelialen Phänotypen in einen mesenchymalen Phänotypen übergehen. Folglich werden epitheliale Markerproteine (z.B. EpCAM, E-Cadherin, Cytokeratin) runterreguliert und mesenchymale Marker (z.B. Vimentin) hochreguliert. Durch diese Transition bekommt die Zelle ihre Invasivität (28). Zusätzlich zu diesem Phänomen gibt es Hinweise auf eine Stammzell-Subpopulation. Die CD44pos/CD24neg Population hat ein höheres Potential, Metastasen zu bilden als andere Brustkrebszellen (19). Auf Grund der vermuteten tumorbiologischen und klinischen Bedeutung der CTCs wurden in den letzten Jahren viele Studien zur Methodik ihrer Detektion und der möglichen klinischen Relevanz veröffentlicht (17). Eine Voraussetzung für die reproduzierbare Detektion ist eine genaue Definition dieser Zellpopulation und die Verwendung einer Methodik mit hoher Sensitivität und Spezifität (15).

1.8 Gewinnung der CTCs aus dem peripheren venösen Patientenblut

Es gibt zwei unterschiedliche Ansätze für die Verfahren zur Gewinnung der zirkulierenden Tumorzellen aus dem Vollblut. Einige Verfahren nutzen die morphologischen Eigenschaften, wie die Zellgröße, um diese von den anderen Blutzellen zu isolieren. Andere Verfahren isolieren die Tumorzellen mit Hilfe der spezifischen Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen. Je nach Fragestellungen und Forschungsansatz bietet jede Methodik ihre Vor- und Nachteile. Eine Detektion der CTCs über ihre Zellgröße mittels Filtration und Filter definierter Porengröße ermöglicht einen Oberflächenmarker-unabhängigen Nachweis von CTCs (z.B. EpCAM). Ein Nachteil ist der Verlust von kleineren CTCs durch die hohe Größenvarianz der CTCs und die unspezifische Anreicherung von Blutzellen eines ähnlichen Zelldurchmessers. Die Detektion der Tumorzellen über die tumorspezifische Expression eines Oberflächenmarkers zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und gekoppelt mit einer immunmagnetischen Zellisolierung durch eine hohe Sensitivität aus.

1.8.1 Gewinnung der CTCs durch immunomagnetische Anreicherung

Die immunomagnetische Anreicherung von CTCs ist die am weitesten verbreitete Isolierungstechnik. Durch die spezifische Expression eines Oberflächen-Markerproteins auf den zirkulierenden Tumorzellen, welches von den Blutzellen nicht exprimiert wird, ist es möglich die CTCs selektiv zu gewinnen. Diese Verfahren verfügen daher über eine hohe Spezifität. Als Beispiel kann das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM), als Marker für die epithelial abstammenden Tumorzellen eines Karzinoms, benutzt werden (29). Außerdem können weitere Markerproteine der zirkulierenden Tumorzellen, wie z.B. Zytokeratin (30), zur Identifikation der CTCs genutzt werden.

1.8.1.1 Das CellSearch®-System

Die amerikanische Kontrollbehörde FDA hat das CellSearch®-System der Firma Menarini Silicon Biosystems (Bologna, Italien) als einzige Methode zum automatisierten CTC-Nachweis bei metastasiertem Brustkrebs, sowie bei metastasiertem Darm- und Prostatakrebs zugelassen. Das System bietet die Möglichkeit des Nachweises von CTCs in der klinischen Praxis ebenso wie in einem *Multicenter-Setting* einer klinischen Studie (31). Zahlreiche Studien konnten die hohe Sensitivität und Spezifität dieses Systems nachweisen (17). Riethdorf et al. beschrieben, dass durch die CellSearch-Methode bei etwa 70 % der Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs CTCs detektiert wurden (31). In einer Meilensteinstudie von Cristofanilli *et al.* korrelierten die Detektion von > 5 CTCs in 7,5 ml Blut der Patientin mit einem kürzeren medianen progressionsfreien Überleben (2,7 Monate vs. 7,0 Monate, $P < 0,001$) und einem kürzeren Gesamtüberleben (10,1 Monate vs. > 18 Monate, $P < 0,001$) (1). Die genaue Methodik wird im „Material & Methoden“ Teil ausführlich erläutert. Mit der CellSearch-Technologie werden die EpCAM-positiven CTCs durch Ferro-Nanopartikel, die an EpCAM-Antikörper gekoppelt sind, immunomagnetisch aus einer 7,5 ml Blutprobe separiert. Die angereicherten Zellen der Probe werden mit einem Antikörper-Mix gegen die Zytokeratine CK8, CK18, CK19, den Leukozytenmarker CD45 sowie mit dem DNA-Färbereagenz DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) gefärbt. Nach der zytologischen Färbung der angereicherten Zellen erfolgt die Detektion mit dem CellTracksAnalyzer II, ein semiautomatisches 4-Kanal-Fluoreszenzmikroskop auf der Basis eines definierten CTC-Markerprofils (32): Expression des epithelialen Zell-Adhäsionsmoleküls (EpCAM), Expression der Zytokeratine (CK) 8, 18 und/oder 19, Positivität für DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), keine Expression von CD 45 (Leukozytenmarker), Zellgröße zwischen 5-50 µm und dem Kern-/Zytoplasma-Verhältnis (50 % des Zytoplasmas sollte aus dem Zellkern bestehen, runde bis ovale Zellform).

Trotz der klinischen Einsatzmöglichkeit ist die CellSearch-Methode mit hohen Kosten verbunden und setzt eine gute Schulung des Personals bei der subjektiven Charakterisierung und Zählung der CTCs im CellTracks Analyzer II voraus.

1.8.1.2 Der AdnaTest

Dieser Test besteht aus zwei Prozessen, die aus einer Kombination von immunomagnetischer Zellseparation, durch die Konjugation von definierten Antikörpern gegen epitheliale und tumorassoziierte Antigene an magnetische *Beads*, und einer qRT-PCR bestehen. Die isolierte mRNA wird in cDNA transkribiert und mittels einer Multiplex-PCR amplifiziert (33).

1.8.1.3 Der GILUPI® Nano-detektor (CellCollector)

Dieser Nano-Detektor (*Functionalized Structured Medical Wire-FSMW®*) ist ein mit Goldpartikeln und anti-EpCAM-Antikörpern beschichteter medizinischer Seldinger-Führungsdraht zum *in vivo* Nachweis von CTCs in größeren Blutvolumina. Für die Anreicherung der EpCAM-positiven Tumorzellen wird der Draht in die periphere Armvene eingeführt. Im Anschluss können die isolierten Tumorzellen abgelöst und weiter immunzytochemisch oder molekularbiologisch untersucht werden. Um die klinische Aussagekraft dieser neuen Methode zu analysieren und gleichzeitig eine Vergleichbarkeit zum CellSearch®-System herzustellen, wurde der Nano-Detektor in 188 Fällen bei Blut von Patienten mit Prostatakrebs, unabhängig des Metastasierungsstatus, eingesetzt. In der Studie wurden mit dieser Isolierungstechnologie in 65,7 % der Fälle CTCs bei den Patienten nachgewiesen. Im Vergleich konnten CTCs in 44,4 % der Fälle mit dem CellSearch-System nachgewiesen werden (34).

1.8.2 Gewinnung der CTCs durch morphologische Zelleigenschaften

Es gibt einige Methoden, die die bestimmte Größe (5-50 µm) oder Dichte der zirkulierenden Tumorzellen nutzen um diese aus dem Vollblut der Patientenprobe zu isolieren. Ein Vorteil ist, dass mit dieser Verfahrensart die CTCs unabhängig von exprimierten Oberflächenmarkern, wie EpCAM, gewonnen werden können. Auf Grund des Phänomens der EMT können auch zirkulierende Zellen mit hohem Metastasierungspotential erfasst werden. Durch das größenbasierte Isolierungsverfahren ist es möglich die Sensitivität der Erfassung zu steigern, da weitere Zellpopulationen, z.B. ohne Expression oder mit herunterregulierter Expression von EpCAM, zusätzlich isoliert werden können (28).

1.8.2.1 Der ISET-Filter

Der ISET-Filter (*isolation by size of epithelial tumor cells*) filtert und isoliert Zellen auf der Grundlage des Größenunterschiedes von CTCs zu anderen Blutzellen (32). Das Filtrationsmodul besitzt Poren mit einem Durchmesser von 8 μm und insgesamt 10 Wells. Verdünnte Blutproben werden mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch die Membran gefiltert. Danach kann zur mikroskopischen Detektion der Zellen eine Immunfluoreszenzfärbung des Filters erfolgen (35). Anschließend können die filtrierte Zellen immunzytochemisch weiter charakterisiert werden. Vorteile sind die Detektion von CTCs unabhängig ihrer Oberflächenmarker. Ein Nachteil ist, dass CTCs mit einer Größe $< 8 \mu\text{m}$ durch die Filtration nicht detektiert werden.

1.8.3 Gewinnung der CTCs durch Kombinationsverfahren

1.8.3.1 Die diagnostische Leukapherese

Um die geringe CTC-Nachweisraten zu optimieren, wurde die diagnostische Leukapherese (DLA) entwickelt. Die Anwendung der Leukapherese zum CTC-Nachweis wurde durch das Düsseldorfer Forschungsnetzwerk „DCC-Net“ (*Disseminated Cancer Cell Net*) etabliert (36). Mit diesem Verfahren kann eine extrakorporale Separierung von Zellen mit einer Dichte zwischen 1,05 und 1,088 g/l (CTCs und weiße Blutkörperchen) erfolgen. Die Tumorzellen können anschließend aus dem Apheresat durch die Verwendung des CellSearch®-Systems angereichert und nachgewiesen werden. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, dass größere Blutvolumina verwendet werden können um auch bei Patienten mit sehr geringer CTC-Zahl Tumorzellen nachweisen zu können. In zwei unabhängigen Studien konnte herausgefunden werden, dass CTCs bei mehr als 90 % der Patientinnen mit nicht metastasiertem Brustkrebs nachgewiesen werden können. Bei dem Vergleich einer 7,5 ml Blutprobe zu einer Leukaphereseprobe einer Patientin mit anschließender Anreicherung und Detektion im CellSearch®-System, ergab sich eine deutlich signifikant höhere CTC-Häufigkeit (37).

1.8.3.2 Der CTC-Chip

Die Blutprobe wird durch Antikörper-beschichtete Mikropfosten in einem Chip gepumpt. Durch einen stabilen laminaren Fluss in der mikrofluidischen Plattform können die CTCs anhaften. In den Forschungsstudien zeigte sich, dass zu 99 % zirkulierende Tumorzellen, in einer Bandbreite von 5-1.281 CTCs pro ml im peripheren Blut, von Patienten mit metastasierendem Lungen-, Prostata-, Bauchspeicheldrüsen-, Brust- und Darmkrebs, durch diese Methodik nachweisbar waren (38).

1.9 CTCs als Prognosefaktor beim metastasierten Mammakarzinom

Seit einiger Zeit beschäftigen sich Forscher/Forscherinnen mit der Suche nach geeigneten Biomarkern für die Prognose einer Metastasierung beim Mammakarzinom. Die bisherigen Verfahren haben ihre Grenzen und alleine durch die klinische Untersuchung, die radiologischen Verlaufskontrollen und die Bestimmung der Tumormarker im Serum ist eine frühe Erkennung von Metastasen schwer (15). Nach der Etablierung geeigneter und klinisch anwendbarer Verfahren zur Detektion von CTCs wurden verschiedene Studien durchgeführt, die den Nutzen und die Aussagekraft des CTC-Nachweises für die Diagnostik und die Behandlung von Tumorpatientinnen unterstreichen.

Es zeigte sich, dass der CTC-Nachweis bei metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen mit einer schlechteren Prognose im Krankheitsverlauf assoziiert ist (1). Cristofanilli *et al.* (2004) erläuterten im Rahmen einer prospektiven Studie mit dem CellSearch-Assay, dass bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs ein Nachweis von mehr als 5 CTC/ 7,5 ml Blut mit einem signifikant kürzeren Überleben korreliert. Außerdem ist dieser Nachweis mit einer schnelleren Entwicklung von viszeralen Metastasen im Verlauf der Erkrankung assoziiert. Dies bedeutet, dass sich das Mammakarzinom zu einer systemischen Erkrankung entwickelt und das Gesamtüberleben negativ beeinflusst (39). Es ist also möglich die „*Minimal residual disease*“ (MRD) mit Hilfe der CTC im Blut zu beschreiben und somit das Gesamtüberleben (*overall survival, OS*) unabhängig von der erfolgten Therapie zu bestimmen. Zusätzlich kann der Therapieerfolg durch den CTC-Nachweis als „*liquid biopsy*“ neben herkömmlichen bildgebenden Verfahren beobachtet und eine Aussage über das progressionsfreie Überleben (*progression free survival, PFS*) getroffen werden. Die zirkulierenden Tumorzellen können als Prädiktor für das Metastasierungspotential benutzt werden (39). Somit deutet ein Fortbestehen der zirkulierenden Zellen nach den ersten Therapiezyklen bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom auf ein Nicht-Ansprechen der Therapie hin (36). Insgesamt bietet die „*liquid biopsy*“ eine weniger invasive Möglichkeit zur Prognose und des Therapiemonitorings als die gewöhnlichen Gewebepiospien (40).

1.10 Einzelzellisolierung der CTCs

Die CTCs sind eine sehr heterogene Zellpopulation und daher muss weiter erforscht werden, welche Eigenschaften der CTCs für die Aggressivität, Invasion und letztendlich die Metastasenbildung verantwortlich sind. Zur weiteren molekularen Charakterisierung der CTCs ist es daher notwendig diese als Einzelzellen zu isolieren, was aufgrund der sehr geringen Zellzahl der CTCs im Vergleich zu den übrigen Zellbestandteilen des Blutes eine große experimentelle Herausforderung darstellt.

1.10.1.1 Die DEPArray™-Technologie

Fabbri *et al.* veröffentlichten in einer Arbeit, dass CTCs mit der DEPArray™-Technologie, einer auf Dielektrophorese basierenden Plattform, erkannt und sortiert werden können. Durch die Methode werden mit einem ungleichmäßigen elektrischen Feld, Kräfte auf neutrale, suspensierte und polarisierbare Partikel (Zellen) in einer Flüssigkeit, ausgeübt. Zusammen mit der DEPArray™-PLUS-Plattform der Firma *Menarini Silicon Biosystems* können bestimmte Zellen durch eine bildbasierte Zellauswahl eines Fünf- oder Neun-Kanal-Fluoreszenzmikroskops identifiziert und isoliert dargestellt werden (41).

1.10.1.2 Die Durchflusszytometrie (FACS)

Durch die FACS (= fluorescence - activated cell sorting) werden fluoreszenzmarkierte Zellen anhand ihres Färbemusters sortiert. Die Zellen fließen mit einer hohen Geschwindigkeit an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbei und die optischen Signale oder Immunfluoreszenzfärbungen dieser Zellen werden emittiert.

2004 wurde die *In-vivo-flow-Zytometrie* erfunden, mit der es möglich ist CTCs in vivo überwachen zu können. Die konventionelle Durchflusszytometrie wird mit einem konfokalen Mikroskop kombiniert (42). Dies ermöglicht eine nicht invasive Erkennung von CTCs.

1.11 Limitationen der aktuellen CTC Analyse

Die CTCs sind eine sehr heterogene Zellpopulation und unterscheiden sich in der Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle (z.B. EpCAM und HER2/neu) und ihrer Größe. Es existieren Technologien, die über die immunomagnetische Bindung eines Oberflächenmoleküls (z.B. EpCAM) oder über eine Größenselektion mittels Filtersystem diese raren Tumorzellen im peripheren Blut von Mammakarzinom-Patientinnen nachweisen. Es wird also, je nach Anreicherungsverfahren, nur eine Subpopulation der CTCs nachgewiesen und abgebildet. Das CellSearch®-System, als ein standardisiertes und größtenteils automatisches Verfahren, ist bisher die einzige von der FDA zugelassene Methode zum Nachweis von CTCs bei Mammakarzinom-Patientinnen. Limitierend bei dieser Methode ist die geringe Sensitivität und der Nachweis der CTCs über die Expression von Zytokeratin. Die adjuvante Therapie bei bestehender minimalen Tumorerkrankung richtet sich als medikamentöser Ansatz aktuell noch gegen die prädiktiven Marker (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, HER2/neu Status) des Primärtumors, sodass im Verlauf einiger Jahre, Metastasen oder Rezidive auftreten. Durch die erweiterte Bestimmung der Tumorbiologie von CTCs ließe sich das Versagen einer hormonellen und antikörperbasierten Tumorbekämpfung erklären und es könnten neue Therapieansätze entstehen. Bisher werden nur diese prädiktiven Marker in dem

CellSearch®-System bestimmt. Das Potential der CTCs zur Entwicklung von Metastasen, durch die Darstellung eines erweiterten Expressionsprofils, wird nicht abgebildet. Mit der CTC-Analyse auf der Einzelzellebene können Expressionsprofile oder Mutationen nachgewiesen werden, die für das invasive Potential verantwortlich sind und eine therapierelevante Phänotypisierung erfolgen. Dadurch kann ein neuer Angriffspunkt für die Krebstherapie erforscht werden und eine spezifische medikamentöse Therapie gegen genau diese aggressiven CTCs erfolgen. Die Entwicklung von methodischen Verfahren ist zur Zeit noch nicht an den klinischen Anspruch angepasst. Auf Grund der geringen Anzahl der zu detektierenden CTCs in einer Blutprobe von Mammakarzinom-Patientinnen stellt die Charakterisierung der Tumorzellen mit validen Ergebnissen eine große Herausforderung dar. Ziel ist es im klinischen Setting eine individualisierte Krebstherapie anbieten zu können und gefährdete Krebspatientinnen zu identifizieren, die von einer speziellen Krebstherapie profitieren würden, um das Metastasierungsrisiko und Rezidivrisiko weiter zu senken. Somit kann das Gesamtüberleben, das Rezidiv-freie Überleben, und das Progressions-freie Überleben verlängert werden. Die personalisierte Krebstherapie stellt, auf Grund der vielen methodischen Problematiken in der Entwicklung eines klinisch verwendbaren Verfahrens zur molekularbiologischen Charakterisierung der zirkulierenden Tumorzelle als Einzelzelle, eine sehr schwierig zu realisierende Zukunftsperspektive in der Krebsforschung dar.

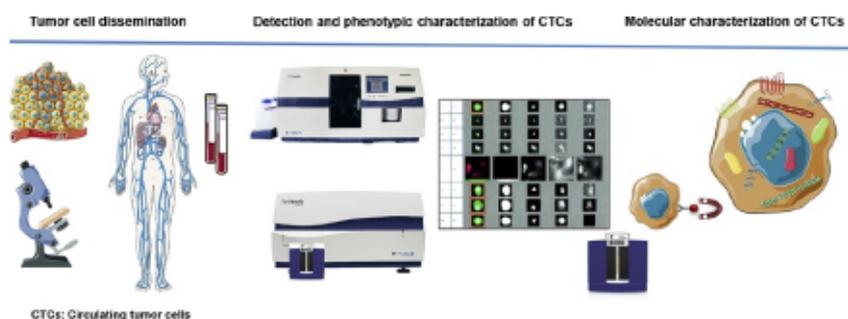


Abb. 2: Der Nachweis von CTCs durch das CellSearch®-System erfolgt standardisiert. 7,5 ml Blut der Patientin werden in CellSave-Tubes überführt. Die EpCAM-positiven CTCs werden immunomagnetisch separiert und Immunfluoreszenz-gefärbt. Die Suspension wird in eine Cartridge überführt und in dem Fluoreszenzmikroskop (CellTracks-Analyser) gescannt. Durch eine anschließende Charakterisierung der CTCs aus der Suspension können Expressionsprofile für die Fähigkeit der Zeldissemination und Resistenzmechanismen gegen Tumortherapien dargestellt werden (43).

CTC: zirkulierende Tumorzelle

1.12 Zielsetzung

Die CTCs haben einen bedeutenden Stellenwert bei der Ausbreitung einer Primärerkrankung des Mammakarzinom zu einer Systemerkrankung (18). Die aktuellen Verfahren zum Nachweis von CTCs in Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen bieten aktuell keine Möglichkeit der weiteren Charakterisierung der CTCs. Zur Analyse der Eigenschaften von CTCs für das Verständnis der Zelldissemination und Metastasenbildung, im Vergleich zu den Zellen des Primärtumors, sind Verfahren zur weiteren Isolierung von CTCs als Einzelzellen notwendig.

Die Promotionsarbeit verfolgt folgende Ziele:

- 1) Etablierung eines geeigneten Verfahrensprotokolls zur sensitiven und spezifischen Anreicherung, Detektion, Isolierung und Charakterisierung der CTCs als Einzelzellen aus venösem Vollblut mit der Verwendung eines bereits etablierten Systems zur Anreicherung von CTCs und dem Mikromanipulator CellCelector. Zur Anreicherung EpCAM-positiver CTCs wird das CellSearch®-System und zur Anreicherung EpCAM-negativer CTCs der ISET- und VyCAP-Filter verwendet.
- 2) Anwendung des Protokolls zur immunzytochemischen Bestimmung der Expression des Cytoskelett-Modulators *macrophage capping protein* (CapG), die mit der Invasivität von Tumorzellen korreliert (44), auf vereinzelt CTCs.
- 3) Nachweis der Eignung des Verfahrens zur DNA-Analyse einzelner CTCs. Qualitätskontrolle der DNA-Integrität durch ein PCR-basiertes Verfahren.
- 4) Anwendung der entwickelten Isolierungs- und Analyseverfahren an Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen.

Durch die Etablierung eines neuen Verfahrens zur Einzelzellisolierung EpCAM-positiver und -negativer CTCs ist es möglich die Tumorbiologie besser abzubilden und den aktuellen klinischen Forderungen der individualisierten Tumortherapie mit neuen Therapieoptionen gerecht zu werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Die hauptsächlichlichen Patientenproben wurden im Rahmen der laufenden *DETECT-III*-Studie (NCT01619111) von Patientinnen mit primär HER2/neu-negativem metastasierendem Brustkrebs genutzt. Außerdem wurden einige Proben aus der laufenden *AUGUSTA*-Studie verwendet. Die personenbezogenen Daten wurde anonymisiert und die Patientenproben unter Berücksichtigung der erteilten Einverständniserklärung für weitere Analysen genutzt. Die Genehmigung der lokalen Ethikkommission mit entsprechenden Ethikvoten lag vor (*DETECT*: Studiennummer MC 531/2010-024238-46), *AUGUSTA*: Studiennummer 3430, Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Düsseldorf).

2.1.2 Blutproben

Zur Teilnahme der Patientin an der *DETECT*- oder *AUGUSTA*-Studie wurde ihr 7,5 ml Vollblut mittels einer aseptischen Venenpunktion abgenommen. Zur Vermeidung einer Kontamination mit Epithelzellen der Haut wurden die ersten Milliliter der Abnahme verworfen. Das Vollblut der *DETECT*-Studie wurde zum Transport in das Labor in ein Vakuumröhrchen mit einem speziell abgestimmten Zellkonservierungsmittel (*CellSave Preservative Tube*, 300 µl) vermischt. Die Patientenproben wurden bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 72 h im CellSearch-Gerät verarbeitet. Das Vollblut der *AUGUSTA* Studie wurde in einem EDTA-Blutröhrchen transportiert. Die Proben wurden vor Probenaufarbeitung zur CellSearch-Analyse in die Vakuum *CellSave Tubes* pipettiert.

2.1.3 Zelllinien und Zellkulturen

2.1.3.1 Zellkultur

Insgesamt wurden Kulturflaschen (Firma TPP) mit unterschiedlichen Volumina (75 ml, 250 ml, 550 ml) verwendet. Die Kultivierung der unten aufgelisteten Zelllinien erfolgte mit *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), 10 % hitze-inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wuchsen in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Um die durch die Zellkontakthemmung erzeugte Verlangsamung der Zellteilungsrate zu vermeiden wurden die Zellkulturen regelmäßig alle 2-3 Tage passagiert. Dafür wurde zuerst das Medium in der Kulturflasche entfernt, die Zellkultur mit PBS gewaschen und diese mit einer 0,5 % Trypsin-Lösung gelöst. Nach einer

Inkubationszeit von 5 Minuten bei 37°C wurde erneut Medium zur Kulturflasche hinzugefügt, um den Trypsin-Verdau zu stoppen. Die Tumorzellen wurden im Verhältnis 1:10 passagiert. Medien, FCS, Trypsin und Antibiotika wurden von der Firma Gibco, Deutschland, genutzt.

2.1.3.2 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien standen im Forschungslabor der Frauenklinik als kryo-konservierte Zellsuspensionen zur Verfügung, die ursprünglich aus niedrigen Passagen der jeweiligen, im Original von der ATCC-Zelllinienbank bezogenen Zelllinie angelegt wurden.

Zelllinie	Ursprung	Geschlecht (Patient)	Alter In Jahren (Patient)	Phänotyp	ATCC Nummer/Hersteller
MCF7	Adenokarzinom met. Mammakarzinom (Pleuraerguss)	weiblich	69	epithelial	ATCC® HTB-22™
SK-BR-3	Adenokarzinom met. Mammakarzinom (Pleuraerguss)	weiblich	43	epithelial	ATCC® HTB-22™
BT-20	Duktales Mammakarzinom	weiblich	74	epithelial	ATCC® HTB-19™
MDA-MB-231	Adenokarzinom met. Mammakarzinom (Pleuraerguss)	weiblich	51	epithelial	ATCC® HTB-26™
T47D	Adenokarzinom met. Mammakarzinom (Pleuraerguss)	weiblich	54	epithelial	ATCC® HTB-133™
SW620	Adenokarzinom Kolorektales Karzinom (Lymphknoten)	männlich	51	epithelial	ATCC® CCL-227™

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zelllinien

2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Konjugation	Einsatz	Hersteller/Information
Anti-Pan Cytokeratin (C11)	Maus	FITC	1:300	GeneTex, GTX11212, Klon C-11
Anti-EpCAM (E144)	Kaninchen		1:50	GeneTex, GTX-61060, Klon E144
Anti-CD49f	Ratte		1:100	Invitrogen, 12-0495-82
Anti-CD45 (MEM-28)	Maus		1:100 1:200	Exbio Praha, 11-222-C025
Anti-CD45 (KC56)	Maus	PC5	1:50 1:25	Beckman Coulter, Klon KC56 (T-200)
Anti-CD45 (35-Z6)	Maus	Alexa Fluor® 647	1:20	Santa Cruz, sc-1178-AF, Klon 35-Z6
Anti-CD45	Maus	APC	1:825	CellSearch® CTC Control Kit (Janssen Diagnostics, LLC, USA)
Anti-CapG	Hase		1:300	Forschungslabor der Frauenklinik, Dr. Dieter Niederacher, gegen Aminosäuresequenz 236-249 von CapG

Tabelle 2: Liste der verwendeten Primärantikörper

Sekundäre Antikörper	Spezies	Konjugation	Einsatz	Hersteller/Information
Anti-Hase	Ziege	Alexa Fluor® 647	1:200	Invitrogen, A-21246
Anti-Hase	Ziege	Alexa Fluor® 594	1:200	Invitrogen, R37117
Anti-Ratte	Ziege	Alexa Fluor® 594	1:100	Invitrogen, A-11007
Anti-Maus		Alexa Fluor® 555		Zenon Antikörper Labeling Kit, Z25205

Tabelle 3: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

2.1.5 Labormaterialien

Material	Hersteller
Objektträger 76mm x 26mm x 1mm (geschliffen)	Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde
HistoBond® Objektträger 76 x 26 x 1mm	Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen
Deckgläser 24x50 cm	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Pipettenspitzen 100µl Bevelled, Filter Tip (Sterile)	TipOne StarLab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen 101-1000µl Extended Length, Filter Tip	TipOne StarLab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen 10µl Graduated, Filter Tip (Sterile)	TipOne StarLab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen 200µl GEL TIP Round	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 100-5000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipetten: Reference® (variabel), 10 - 100 µl Research® (variabel), 10-100 µl Research® (variabel), 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Gilson Pipetten: PIPETMAN P2, 0.2-2 µl PIPETMAN P10, 1-10 µl PIPETMAN P100, 20-100 µl PIPETMAN P200, 50-200 µl PIPETMAN P1000, 200-1000 µl	Gilson Inc., Middleton, WI USA
Costar® Stripetten, sterile: Serological Pipet 5ml Serological Pipet 10ml	Corning Incorporated, Corning, New York
Cap Strips, flat, 10 x 12 Strips	Eppendorf AG, Hamburg
PCR Kombi 8er-Strips 0,1 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Centrifuge Tubes 15ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Safe-Lock Tubes 0,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
SafeSeal Tube 1,5ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
SuperClear® Centrifuge Tubes 50ml	VWR International GmbH, Darmstadt
PCR TW 8er-Tube Strip 0,1 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,1 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Liquid-repellent Slide Marker Pen	Cosmo Bio Co., LTD., Tokyo 135-0016, Japan
MBT PAP PEN mini	Micro Bio-Tec Brand
Neubauer Zählkammer	Scherf-Präzision Europa GmbH, Meiningen
CellStar® Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturschalen 60/15mm, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CellStar® Gewebekulturschalen 35/10mm , steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zyto-Kammer mit Dichtung 1 x 4ml, 12,4/120mm ²	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Filterkarten für 2 x 8ml Zytokammern	MWG-Biotech, Ebersberg
Reaktionsgefäßständer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Magnetadapter	ALS Automated Lab Solutions GmbH, Jena

Tabelle 4: Liste der verwendeten Labormaterialien

2.1.6 Chemikalien/Reagenzien/Kits

Chemikalien, Reagenzien, Kits	Hersteller
CellSearch® Circulating Tumor Cell Kit	CellSearch®, Veridex, Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, NJ 08869 USA
Triton X 100	Merck KGaA, Darmstadt
Tween® 20	CIS Bio International, Saclay
PBS Lösung	Biochrom, Berlin
TBST Puffer	Dako, Deutschland GmbH
Saponin	Sigma-Aldrich, USA
Formaldehyd 1%	
Dako Antibody Diluent	Dako Deutschland GmbH
Dako Protein Block	Dako Deutschland GmbH
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH
Dako Wash Buffer 10x	Dako Deutschland GmbH
Vectashield® Fluorescent Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA USA
Erythrozyten-Lysispuffer (Ammoniumchlorid, Kaliumhydrogencarbonat, EDTA)	
Fötales Kälberserum (FCS)	Biowest, Frankreich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Deutschland

Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco, Deutschland
Methylcellulose 1%	Sigma-Aldrich, USA
Accutase	Innovative Cell Technologies, Inc., USA
Glycerin (99% reinst Ph. Eur. Wasserfrei)	
Agarose 0,07%	AppliChem, Darmstadt
Agarosegel 3%	AppliChem, Darmstadt
Sprühkleber	Hansaplast, Beiersdorf
Ampli1™ WGA Kit	Silicon Biosystems, USA
PicoPLEX™ WGA Kit	NEB/Rubicon, England
Zenon Antikörperlabeling Kit	Invitrogen, USA
DreamTaq Master Mix (2x);	Thermo Scientific™, Deutschland

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien/Reagenzien/Kits

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. 10 µl der verdünnten Zellsuspension wurden auf jede Kammer aufgetragen. Es wurden jeweils 4 große Eckquadrate ausgezählt, diese wurden durch 4 geteilt um den Mittelwert pro Eckquadrat zu erhalten. Dieser Wert wurde mit 10 multipliziert und somit wurde die Anzahl der Zellen je µl berechnet. Die Verdünnung der Zellsuspension wurde im letzten Berechnungsschritt mit berücksichtigt.

2.2.2 Lymphozytenisolierung

Für die Lymphozytenisolierung zur Testung der anti-CD45-Antikörper-Nachfärbungen wurden 3 ml Vollblut oder Apheresat in ein 12 ml Reagenzglas (*Greiner Tube*) pipettiert und mit 9 ml Erythrozyten-*Lysispuffer* aufgefüllt und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis erfolgte eine Zentrifugation der Probe für 15 min bei 1000 rpm und 4°C. Der flüssige Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das zurückgebliebene *Lymphozytenpellet* wurde mit 1 ml PBS durch Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteurpipette resuspendiert und in ein 2

ml großes Mikroreaktionsgefäß überführt. Dieses wurde erneut bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand vom Lymphozytenpellet abpipettiert und verworfen. Die Proben wurden bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.

2.2.3 Anreicherung und Detektion EpCAM-positiver CTCs

Der halbautomatische CellSearch-Assay (Menarini Silicon Biosystems, Bologna, Italien) basiert auf einer immunomagnetischen Anreicherung von Zellen epithelialen Ursprungs, die den Oberflächenmarker EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) exprimieren. Durch die Verknüpfung von Antikörpern gegen humanes EpCAM und Ferrofluidpartikeln ist es möglich die Zellen immunomagnetisch zu selektieren. Am Anfang der Probenaufbereitung wird die im *CellSave*-fixierte 7,5 ml Vollblutprobe zentrifugiert um die festen Blutbestandteile von dem Plasma zu trennen. Die Probe wird in das CELLTRACKS® AUTOPREP® System gegeben. Die CTCs werden mithilfe der Konjugation aus einem Antikörper gegen humanes EpCAM und Ferrofluid-Nanopartikel magnetisch von den anderen Blutzellen durch das Anlegen eines starken Magnetfeldes separiert. Um hierzu eine ausreichende Beladung der Zellen mit Ferropartikeln sicherzustellen, werden an die zellgebundenen Ferropartikel über eine Biotin-Streptavidin-Komplexierung zusätzliche Ferropartikel an die Zellen gebunden. Die isolierten Ferrofluid-Zell-Komplexe werden im Anschluss zur Zell-Typisierung immunzytochemisch gefärbt und charakterisiert.

Durch den mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin gekoppelten monoklonalen Zytokeratin-Antikörper (CK-PE) werden Zellen epithelialen Ursprungs (CTCs) über das charakteristische intrazelluläre Protein Zytokeratin (v.a. Zytokeratin-Typen 8,18 und 19) spezifisch angefärbt. Zur eindeutigen Zellerkennung wird der DNA-Farbstoff DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindol) ebenfalls hinzugefügt, um die Kerne sowohl der CTCs als auch der Leukozyten hervorzuheben. Zur Detektion von unspezifisch angereicherten Leukozyten wird ein Allophycocyanin (APC)-gekoppelte monoklonale CD45-Antikörper verwendet. Nach der automatisierten immunomagnetischen Zellanreicherung und den immunozytochemischen Färbungen werden ungebundene Zellen und Reagenzien entfernt und die Probe in einem Restvolumen von ca. 300 µl in eine *Cartridge* überführt. Anschließend wird die *Cartridge* in einen speziellen Magnetadapter (MagNest) des CellSearch-Systems positioniert. Alle immunomagnetisch angereicherten Zellen werden über das im MagNest bestehende Magnetfeld in einer Fokusebene positioniert. Für diesen Schritt sollte die gefüllte *Cartridge* mindestens 20 min im MagNest im Dunkeln inkubiert werden, bevor sie in das Analyse-System, den CELLTRACKS ANALYZER II® eingesetzt wird. Der CELLTRACKS ANALYZER II®, ein *Fluoreszenz-Scanning*-Mikroskop, scannt automatisch viermal die Oberfläche der *Cartridge* mit wechselnden Fluoreszenz-Filtern. Nach dem Scanvorgang zeigt das System die

Bildaufnahmen mit den möglichen Tumorzellkandidaten an. Zur Beurteilung und abschließenden Überprüfung bestimmter Qualitätskriterien wird dem Bediener jede Zelle mit CK-PE-, DAPI-, und CD45-Fluoreszenz angezeigt. Die endgültige Auswertung erfolgt durch zwei unabhängige und zytologisch erfahrene Personen. Die bereits gescannten *Cartridges* wurden zur weiteren Verarbeitung in einer Kühlkammer dunkel und bei 4°C aufbewahrt. Eine Aufarbeitung erfolgte innerhalb einer Woche. Für den Nachweis einer Tumorzelle müssen bestimmte Kriterien erfüllt sein. Auf der einen Seite sind morphologische Merkmale, wie eine annähernd runde Zellform mit einem deutlich sichtbaren Kern im Zytoplasma bei einer Mindestgröße von 4 µm und auf der anderen Seite der Phänotyp EpCAMpos, CKpos (Zytokeratine 8, 18 und/oder 19), DAPIpos und CD45neg zu beurteilen. Zusätzlich bietet dieses Verfahren eine weitere Phänotypisierung hinsichtlich des HER2/neu-Status. Die Antikörper-Signale in den unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen sollten sich unterscheiden und die nukleare Färbung 50 % der gesamten Zelle einnehmen. Das CellSearch *Circulating Tumor-Cell-Control-Kit* ermöglicht nach jedem Durchlauf eine Kontrolle des gesamten Analysesystems. Ein Beispiel zur Präsentation der möglichen Tumorzellen ist in Abb. 2 dargestellt.

2.2.4 Einzelzellisolierung EpCAM-positiver und -negativer CTCs

Das CellCelector-Robotersystem (automatische Mikromanipulation) bietet die Möglichkeit zur automatischen Erkennung, Bildanalyse und Isolierung von Partikeln bzw. adhärennten Zellkolonien und Einzelzellen. Durch eine Kombination aus einem Mikroskop mit digitaler Kamera, einem motorisierten Kreuztisch und Ablagesystem ist es möglich die EpCAM-positiven CTCs aus den *Cartridges* des CellSearch-Systems und die negativen CTCs von dem ISET- und VyCap-Filter, unter Zuhilfenahme der Bildbearbeitungs- und Analysesoftware, als Einzelzellen zu isolieren. Die Isolierung erfolgt durch Volumen-Aspiration von 5 - 100 nl mittels einer Glaskapillare (d = 30 µm). Die Einzelzelle aus einer Probe kann von unterschiedlichen Medien (z.B. Glasobjektträger, Petrischale) auf ausgewählte Ablagesysteme (z.B. Glasobjektträger, *PCR Tube*, n-Wellplatten) isoliert werden. Die Probe wurde für die Aufarbeitung der CellSearch-*Cartridge* auf den Objektträger in dem speziell konzipierten Magnetadapter pipettiert. Für die Einzelzellisolierung von dem VyCap-Filter wurde dieser in eine Petrischale und der ISET-Filter auf einen Objektträger fixiert. Mit Hilfe der Kombination aus einem Mikroskop mit digitaler Kamera (Olympus CKX 41; Kamerasystem: CCD-Kamera XM10-IR, Olympus, Deutschland; ALS CellCelector-Software 3.0, ALS, Deutschland) und dem motorisierten Kreuztisch ist es dem System möglich die Probe auf dem Objektträger/Petrischale systematisch zu scannen. Es können verschiedene Objektive (10x-/20x- oder 40x-Objektiv), Fluoreszenzkanäle (DAPI, FITC, TRITC, Cy5) und deren

Belichtungszeiten manuell ausgewählt werden. Das System kann durch einen „*High-Sensity-Mode*“ außerdem die Signale der Fluoreszenzkanäle durch die Software technisch verstärken. Durch gezielte Voreinstellungen kann ein optimales Zeit/Auflösungs-Verhältnis erreicht werden. Der gesamte Scan mit allen detektierten Ereignissen durch das System wird gespeichert und im weiteren Schritt können durch benutzerdefinierte Einstellungen bestimmte Zellkandidaten detailliert angezeigt werden. Es ist möglich alle gefundenen Events nach Größe, Signal in den jeweiligen gescannten Fluoreszenzkanälen und deren Intensität zu selektieren. Die Liste der entsprechenden Kandidaten, welche die definierten Qualitätskriterien erfüllen, wird dem Benutzer präsentiert. Die Events sind mit einer bestimmten Lokalisation auf dem Kreuztisch gekoppelt und können anschließend zum Isolierungsvorgang ausgewählt und mit dem Mikroskop wiedergefunden werden. Es ist notwendig die Glaskapillare vor der Aspiration zu kalibrieren. Zudem muss eine Aspirations- und Abgabehöhe definiert werden. Je nach Probenbeschaffenheit und Ablagemedium unterscheiden sich diese. Vor dem Aspirationsvorgang wird in die Kapillare ein PBS-Puffer von 1 µl aufgenommen. Das gewünschte Aufnahmevermögen (5 - 100 nl) kann zudem bei jedem Isolierungsvorgang individuell bestimmt werden. Durch den vorher vorgelegten PBS-Puffer wird das aspirierte Volumen samt Zellmaterial durch die Glaskapillare auf den Ablageort pipettiert.

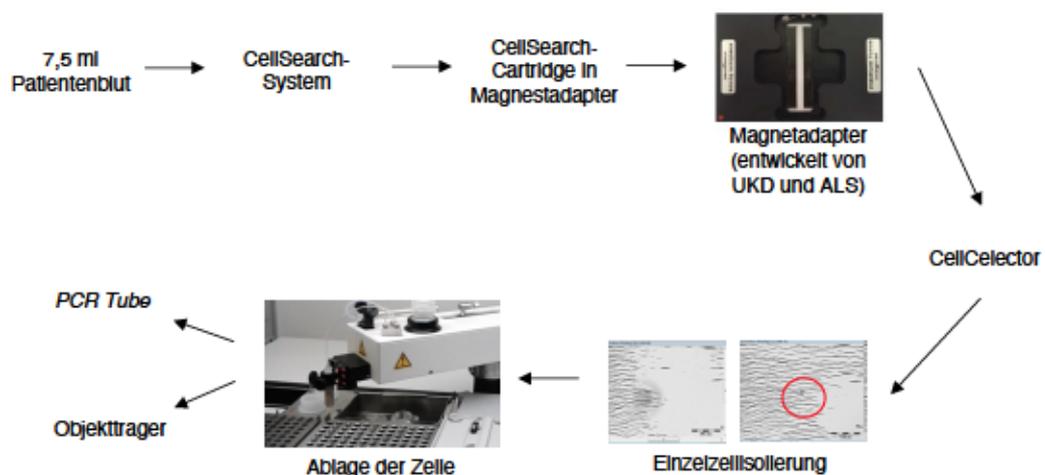


Abb. 3: Der Workflow zur Einzelzellisolierung von EpCAM-positiven CTCs nach der Anreicherung im CellSearch-System mit dem CellCelector. Die Einzelzellen wurden über die Glaskapillare aspiriert und auf das ausgewählte Medium (PCR Tube oder Objekträger) abgelegt. Im Anschluss kann eine immunzytochemische oder genetische Charakterisierung der Einzelzellen erfolgen.

CTC: zirkulierende Tumorzelle; PCR: Polymerase-Kettenreaktion

2.2.5 Arbeitsablauf für die Einzelzellisolierung des CellCelectors

2.2.5.1 Dehydration der Patientenprobe aus der Cartridge

Der Probeninhalt der *Cartridge* mit den immunomagnetisch angereicherten und fluoreszenzmarkierten Zellen des CellSearch-Gerätes wurde aus dem Magnetadapter entfernt. Nach 30 min wurde der Probeninhalt aus der *Cartridge* durch Pipettieren mit einer langen und feinen Pipettenspitze gewonnen und auf den mit dem „*Liquid-repellent Slide Marker Pen*“ markierten Bereich des Glasobjektträgers überführt. Die Probe wurde 30 min im Dunkeln auf dem eingespannten Magnetobjektträger auf den Kreuztisch des CellCelectors inkubiert und es erfolgte die Ausrichtung der Ferrofluidpartikel. Danach wurde ein Teil des Überstandes vorsichtig am Rand der Probe abpipettiert. Der Objektträger wurde dann in den Kreuztisch des CellCelectors zum Scan befestigt.

2.2.5.2 Magnetadapter

Um die immunomagnetische Anreicherung der CTCs mittels CellSearch-System auch für die Mikromanipulation nutzen zu können, wurde ein spezieller Magnetadapter in Kooperation mit der Firma ALS für das CellCelector-System hergestellt. Der konzipierte Adapter kann in den Kreuztisch des Mikromanipulators eingesetzt werden. In dem Magnetadapter ist es möglich einen Objektträger zentral und plan einzuspannen. Die verwendeten zwei Magnete wurden in Anlehnung an die Magnete des MagNest des CellSearch-Gerätes konzipiert und im gleichen Abstand zueinander eingesetzt. Die Magnete wurden so in dem Adapter zueinander ausgerichtet, dass sich die magnetisch angereicherten Zellen in einen bestimmten zentralen Bereich auf dem Objektträger einordnen. Zusätzlich werden die Zellen durch die verwendeten Magnete auf eine Bildebene gezogen und gleichzeitig magnetisch an eine bestimmte Position des Trägers gehalten. Es wurden insgesamt drei Magnetstärken getestet. Die Ausrichtung der Ferrofluidpartikel auf dem Magnetadapter des CellCelectors und in dem Magnetadapter des CellSearch-Systems wurde miteinander verglichen und es zeigte sich eine entsprechend gleiche Ausrichtung mit dem „*medium force*“-Magnetadapter des CellCelectors.

2.2.5.3 VyCAP-Filter

Das VyCap-System stellt ein ergänzendes Verfahren zur Isolierung von Einzelzellen gegenüber dem CellSearch-System dar. Es besteht aus einer Einheit eines Pumpsystems, Einwegfiltration und einer Apparatur zur Zellfärbung. Der Suspensionsüberstand einer Blutprobe nach der Verarbeitung mit dem CellSearch System wurde weiter mit Hilfe des VyCap-Systems verarbeitet. Der Abfallbehälter des CellSearch-Systems kann bis zu 40 ml

Flüssigkeit auffangen. Dies entspricht der maximal zu verarbeitenden Flüssigkeitsmenge für die VyCap-Pumpe. Die Isolierung und Verteilung der Einzelzellen aus der Überstandssuspension erfolgt durch einen Pumpvorgang auf Mikrotiterplatten-Chips. Der Chip (8 x 8 mm) ist in einem Objektträger vormontiert und enthält 6400 Mikrovertiefungen mit 160.000 Poren mit einem Durchmesser von ca. 5 µm. Die Mikrosieb-Chips bestehen aus Siliziumglas, sind starr und flach ohne Autofluoreszenz. Ober- und unterhalb dieses Objektträgers befinden sich zwei Röhrchen. In das obere Röhrchen wurde die zu filtrierende Zellsuspension gegeben. Die Pumpeinheit erzeugt einen Unterdruck und die Zellsuspension wird von dem oberen Röhrchen durch die Mikrotiterplatte in ein unteres Abfallröhrchen filtriert. Dieser Druck ist, je nach Zellbeschaffenheit, variabel einstellbar (0-500 mbar). Bevor das gesamte Blut gefiltert wurde erfolgte ein Waschvorgang mit 5 ml PBS/Tween 0,1 %, um die verbleibenden Blutzellen von dem Filter zu entfernen. Danach wurde der Objektträger mit dem Mikrosiebfiler zur Immunfluoreszenzfärbung und CTC-Auszählung aus dem Pumpsystem entfernt.

2.2.5.4 ISET-Filter

Der ISET-Mikrofilter (*Isolation by Size of Tumor cells*) ist ein diagnostischer Bluttest, der zirkulierende Tumorzellen in einer Blutprobe detektiert. Das *in-vitro*-diagnostische System wurde am INSERM, der Université Paris Descartes und der Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP) entwickelt. Mit dieser Technologie ist es möglich Krebszellen aus dem Blut zu isolieren. Diese Technologie nutzt die Erkenntnis, dass Tumorzellen von soliden Karzinomen in der Regel größer sind als Blutzellen (Leukozyten/Erythrozyten). Um die Eliminierung der Erythrozyten und der meisten Leukozyten aus der Probe zu ermöglichen verwendet der ISET-Test ein speziell entwickeltes Gerät und speziell entwickelte Filter. 10 ml Patientenblut werden in EDTA-Röhrchen abgenommen. Die Probe wird gemischt, mit anwendungsspezifischem Puffer inkubiert, durch das druckgesteuerte Filtrationssystem des ISET®-Gerätes verarbeitet und die Tumorzellen auf dem Filter fixiert. Die überwiegende Mehrheit der weißen Blutkörperchen wird durch das ISET®-Filtrationssystem eliminiert. Insgesamt besteht der Filter aus 10 Spots. Die Blutproben wurden innerhalb von 5 h aufgearbeitet.

2.2.6 Herstellung von Cytospins

Durch die Verwendung dieser Methode ist es möglich gleichgroße Zellspots mit gleichmäßiger Zellverteilung auf HistoBond®-Objektträger aufzutragen. Diese Objektträger binden Zellen elektrostatisch an die positiv geladene Glasoberfläche und auf Grund der adhäsiven Oberflächen wird kein zusätzlicher Klebstoff benötigt. Der Objektträger wurde in eine

Vorrichtung, bestehend aus einem Trichter und einem gelochten Filterpapier, eingespannt. Die vorher festgelegte Menge der Zellsuspension, je nach Anzahl der ausgezählten Zellen, wurde in den Trichter auf den Objektträger pipettiert. Durch die Zentrifugation mit 600-700 g wurden die Zellen auf den Objektträger gehaftet. Die überschüssige Suspensionsflüssigkeit wurde von dem verwendeten Filterpapier aufgenommen. Die hergestellten *Cytospins* wurden über Nacht getrocknet und am Folgetag zur immunzytochemischen Färbung verwendet.

2.2.6.1 CD45-immunocytochemische Färbung von Cytospins

Für die Etablierung der anti-CD45-Antikörper-Nachfärbung wurden Proben von Mammakarzinom-Patientinnen nach der CellSearch-Analyse ohne detektierte CTCs verwendet. Die Proben der Cartridges wurden bei 600-700 g auf Haftobjektträger zentrifugiert. Zur Immunfluoreszenzfärbung erfolgte die Fixierung mit 4 % PFA und nach 10 min wurden die Zellen auf dem Objektträger mit 0,1 % Tween 20/TBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen zur Ermöglichung der Bindung von Antikörpern an intrazelluläre Antigene erfolgte mit 0,1 Triton-X-100/TBS 10 min auf Eis. Danach erfolgte erneut ein Waschschrift. Die Zellen wurden anschließend mit dem *Blockingpuffer* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte, je nach Versuchsprotokoll, in unterschiedlicher Zeit in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschriften mit 0,1 % Tween 20/TBS mit jeweils 10 min wurde der Sekundärantikörper mit der Immunfluoreszenzkonjugation für eine unterschiedliche Zeit, je nach Versuchsprotokoll, inkubiert. Nach erneut drei Waschvorgängen wurden die Objektträger kurz in ddH₂O gewaschen und mit *Mounting-Medium* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) eingedeckelt. Die Objektträger wurden bei 4°C dunkel gelagert. Nach 4 h wurden die Objektträger unter dem CellSelector-Mikroskop angeschaut. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden mit dem *Antibody Diluent* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) vor dem Auftragen verdünnt. Zusätzlich wurde, zum Ausschluss von Autofluoreszenzen, ein *Cytospin* ohne die Verwendung eines Antikörpers und mit der alleinigen Verwendung von DAPI mitgeführt. Zum Ausschluss von falsch-positiven Fluoreszenzfärbungen von CTCs wurde ein *Cytospin* mit ungefärbten MCF-7-Zellen mitgeführt.

2.2.7 Immunfluoreszenzfärbungen

2.2.7.1 CD45-immunocytochemische Färbung in der CellSearch-Cartridge

Die *Cartridges* mit den Patientenproben wurde nach der Analyse im CellTRACKS Analyser bei 4°C gelagert. Der Antikörper, bestehend aus 300 µl *Antibody-Diluent* und 12 µl (1:25) anti-CD45 (35-Z6)-Alexa Fluor® 647, wurde in einem Mikroreaktionsgefäß gemischt. Zur immunomagnetischen Fixierung der Zellen wurden die *Cartridges* für 20 min in den MagNest des CellSearch-Systems inkubiert. Danach wurde der flüssige Überstand vorsichtig entnommen/abpipettiert und die Antikörperlösung in die *Cartridge* pipettiert. Die *Cartridge* wurde dann aus dem MagNest entfernt und die Zellen vorsichtig suspendiert. Die Zellen wurde anschließend 4 h bei 4°C mit der Antikörperlösung auf dem Taumelschüttler inkubiert. Nach erneuter Zellfixierung im MagNest für 20 min. wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 290 µl PBS resuspendiert und auf dem Orbitalschüttler für 10 min gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Am Ende wurde die *Cartridge* mit 300 µl PBS aufgefüllt und die Zellen suspendiert. Die Inkubationsschritte wurden stets im Dunkeln durchgeführt.

2.2.7.2 Immunfluoreszenzfärbung der Zellen des VyCap-Filters

Der Objektträger mit der Filtermembran wurde nach der Filterung in einen „*Cellstainer*“ manuell zur Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung überführt. Durch den Druck auf das Ende des Objektträgers wurden durch den Absorber (Schwamm) die verbliebenen Lösungen entfernt. Zur Permeabilisierung wurde der Filter mit 50 µl PBS/Saponin 0,15 % bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Durch erneuten Druck auf das Ende des Objektträgers erfolgte die Absorption der Lösung. Danach erfolgte das Auftragen der Antikörpermischung, bestehend aus: 50 µl PBS/BSA 1 %/Saponin 0,05 % und Pan Zytokeratin Antikörper (C11)-FITC 1:400 für eine Inkubation von 15 min bei feuchter Raumtemperatur. Danach wurde die Antikörpermischung durch Druck des Objektträgers nach unten auf dem Schwamm entfernt. Der VyCap-Filter wurde danach drei Mal mit 50 µl PBS/BSA 1 % gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 50 µl Formaldehyd 1 % für 10 min. Danach wurde die Fixierlösung durch Druck des VyCap-Filters erneut durch den Schwamm absorbiert und DAPI in der Verdünnung 1:20 für 5 min inkubiert und dann absorbiert. Der Filter wurde danach zwei Mal mit 50 µl PBS/BSA 1 % gewaschen.

2.2.7.3 Immunfluoreszenzfärbung des ISET-Filters

Die Immunfluoreszenzfärbung der gefilterten Zellen auf dem ISET-Filter erfolgte in einer Petrischale. Ohne Fixierung wurde der Filter zwei Mal je 5 min mit 0,1 % Tween 20/TBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit 0,1 Triton-X-100/TBS 10 min auf Eis. Danach erfolgte erneut ein Waschschriff. Die Zellen wurden anschließend mit dem *Blockingpuffer* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers mit dem *Antibody Diluent* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) erfolgte für 45 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschriffen mit 0,1 % Tween 20/TBS mit jeweils 10 min wurde der Sekundärantikörper mit der Immunfluoreszenzkonjugation und dem *Antibody Diluent* für 30 min inkubiert. Abschließend erfolgten erneut drei Waschvorgänge und je nach Versuchsreihe wurden die Filter mit *Mounting-Medium* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) eingedeckelt oder nach der Waschung für die Einzelzellisolierung auf einen Objektträger des CellCelectors gelegt und eingetrocknet. Die Filter wurden bei 4°C dunkel gelagert. Nach 4 h wurden die Objektträger mit den gefärbten Zellen auf dem Filter unter dem Fluoreszenzmikroskop Olympus XIV des CellCelectors oder dem Zeiss Axioplan 2 angeschaut. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden mit dem *Antibody Diluent* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) vor dem Auftragen in unterschiedlicher Konzentration verdünnt.

2.2.7.4 Immunfluoreszenzfärbung der Einzelzellen

Nach der Ablage der Einzelzellen auf die Objektträger durch das CellCelector-System erfolgte eine immunzytochemische Färbung zur Charakterisierung dieser Zellen mit dem Antikörper CapG. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde, je nach Versuchsprotokoll, mit 4 % PFA oder mit dem Reagenz aus den *CellSave Preservative Tubes*, fixiert. Nach einer Inkubation von 10 min wurden die Zellen auf dem Objektträger mit 0,1 % Tween 20/TBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit 0,1 Triton-X-100/TBS 10 min auf Eis. Danach erfolgte erneut ein Waschschriff. Die Zellen wurden anschließend mit dem *Blockingpuffer* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte, je nach Versuchsprotokoll, in unterschiedlicher Zeit in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschriffen mit 0,1 % Tween 20/TBS mit jeweils 10 min wurde der Sekundärantikörper mit der Immunfluoreszenzkonjugation für eine unterschiedliche Zeit inkubiert. Nach erneut drei Waschvorgängen wurden die Objektträger kurz in ddH₂O gespült und mit *Mounting-Medium* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) eingedeckelt. Die Objektträger wurden bei 4°C dunkel gelagert. Nach 4 h wurden die Objektträger mit den gefärbten Zellen unter dem

Fluoreszenzmikroskop Olympus XIV des CellCelectors oder dem Zeiss Axioplan 2 angeschaut. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden mit dem *Antibody Diluent* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) vor dem Auftragen in unterschiedlicher Konzentration verdünnt. Zum Ausschluss von Autofluoreszenzen wurden in Vorversuchen *Cytospins* ohne eine Antikörperfärbung, nur mit dem *Antibody Diluent*, und *Cytospins* nur mit DAPI gefärbt.

2.2.7.5 Antikörperkonjugation von anti-CD45-Antikörpern

Zur Konjugation des anti-CD45-Antikörpers (MEM-28) mit dem Sekundärantikörper anti-Maus Alexa Fluor 555 (Zenon) wurde das „*Zenon mouse IgG labeling Kit*“ verwendet. Hierzu wurde 1 µg vom Antikörper zu einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) und 5 µl Antikörperlösung des Zenon® Maus-IgG-Markierungsreagenzes (Komponente A) hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 5 µl des Zenon®-Blockierreagenz (Komponente B) zur Reaktionsmischung hinzugefügt. Das Gesamtvolumen von 20 µl wurde nicht überschritten. Nach einer erneuten Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde diese Antikörpermischung mit dem *Antibody Diluent* (DAKO, Agilent-Technology Company, USA) vor dem Auftragen in unterschiedlicher Konzentration verdünnt.

2.2.8 Whole Genome Amplification (WGA) - Ampli1™ WGA-Kit

Zur Vervielfältigung des Genoms einer Einzelzelle für weitere molekulargenetische Analysen wurde eine WGA (*whole genome amplification*) mit dem Ampli1™ WGA-Kit (Silicon biosystems, Italien) durchgeführt. Die verwendete DNA kann von fixierten und gefärbten Zellen stammen. Die WGA beinhaltet die folgenden vier Arbeitsschritte: Die Lyse der Zelle, die Fragmentierung der DNA mittels Restriktionsenzymen, die Legierung der Adaptoren an die DNA-Fragmente und die DNA-Amplifikation mittels PCR mit Adapter-spezifischen *Primer*-Sequenzen. Das Ampli1-WGA-Kit wurde nach den Herstellerangaben verwendet.

Durch das QC-Kit Ampli1™ wird die DNA-Integrität durch ein PCR-basiertes Verfahren nachgewiesen und das WGA-Verfahren auf ihre Qualität überprüft.

Zur Qualitätskontrolle erfolgte die Verarbeitung von 1 µl des WGA-Produktes mit dem QC-Kit Ampli1™ (6.5 µl H₂O, 1 µl Puffer, 0.2 µl dNTPs, 1 µl *PrimerMix*, 0.2 µl BSA, 0.1 µl Polymerase) mit 32 Zyklen in dem LightCycler 480 (Roche, Deutschland). 6 µl des Produktes der Qualitätskontrolle wurde in der Gelelektrophorese (3 % Agarose, AppliCem) bei 100 V für 30 min aufgetrennt und die DNA-Qualität beurteilt. Für die Gewährleistung der DNA-Qualität für weitere Analysen sollten bei der Testung ein kurzes und drei lange DNA-Fragmente nachzuweisen sein. Zeigt die QC > 2 Banden können mit einer guten DNA-Qualität NGS-

Analysen durchgeführt werden. Bei < 2 Banden muss von einer schlechten DNA-Qualität ausgegangen werden. Die Aufarbeitung der Einzelzellen wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Für die Positivkontrollen wurden aufgereinigte Zelllinien DNA (1 µl gDNA MCF/T47D (50 ng/µl)) und als Negativkontrolle PCR kompatibles Wasser (1 µl Ampli1™ QC H2O) mitgeführt. Je nach Versuch wurde genomische DNA von Zelllinien (MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 und T47D), als Nachweis des Erfolges der WGA bei isolierten Zellen durch den CellCelector, verwendet. Für die Durchführung der WGA wurden Einzelzellen aus dem Isolierungsvorgang des CellCelectors in *PCR Tubes* mit 1 µl PBS-Puffervolumen verwendet. Von jeder Probe wurden 6 µl auf das Gel pipettiert.

3 Ergebnisse

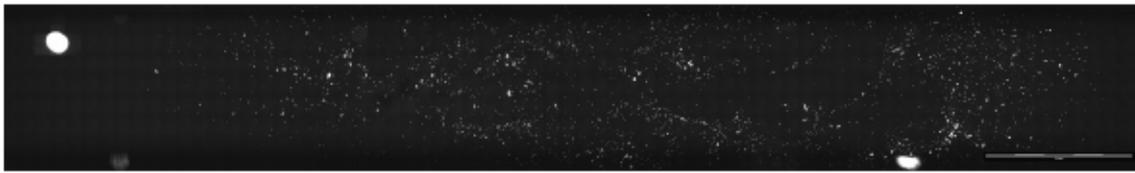
3.1 Methodenentwicklung zur Einzelzellisolierung in Suspension

3.1.1 Einzelzellisolierung EpCAM-positiver Zellen des CellSearch-Systems

Für die Etablierung eines geeigneten Verfahrens zur Isolierung der EpCAM-positiven zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) als Einzelzelle wurden zwei Systeme in einem Verfahren kombiniert. Zur Anreicherung und Detektion der EpCAM-positiven CTCs wurde das bereits etablierte CellSearch-System verwendet, zur anschließenden Einzelzellisolierung das CellCelector-System. Für die optimale Verknüpfung beider Geräte im Hinblick auf die Kompatibilität des Detektionsverfahrens erfolgten einige Testversuche zur Prüfung und Einstellung der optischen Einheit des CellCelectors. Im Weiteren wurden die Parameter des CellCelector-Systems für eine bestmögliche Einzelzellisolierung eingestellt. Die Verfahrensentwicklung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Martin H.D. Neumann (AG Prof. Dr. Hans Neubauer, Forschungslabore der Frauenklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf).

3.1.2 Einstellung der optischen Einheit des CellCelectors

Für die Verfahrensentwicklung wurde vorausgesetzt, dass die angefärbten Zellen mit DAPI (Nucleus= N), PE (Zytokeratin=CK) und APC (CD45=Leukozyten) aus dem CellSearch-System auch mit dem inversen Mikroskop des CellCelectors sichtbar sind. Zur Anpassung der optischen Einstellungen des CellCelectors an den CellTracksAnalyzer II des CellSearch-Systems, wurden Cartridges mit aufgearbeiteten, CTC-positiven Proben von metastasierten Mammakarzinom-Patientinnen im Magnetadapter 30 min inkubiert und anschließend auf den Kreutztisch des CellCelectors gelegt. Die Patientenprobe wurde mit einer Vergrößerung eines 20x-Objektivs und einer Kreutztischgeschwindigkeit von 20 % mit dem Mikroskop und der digitalen Kamera des CellCelectors gescannt. Für die Detektion der CTCs wurden die Proben in den Fluoreszenzkanäle DAPI (Darstellung des Zellkerns), TRITC (Darstellung von PE=CK) und Cy5 (Darstellung von APC=CD45) betrachtet. Zusätzlich wurde der Hellfeld-Bereich (BF-Kanal) zur morphologischen Beurteilung der Zellen mitgescannt. Der Scan erfolgte mit unterschiedlichen Belichtungszeiten in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen. Die Bilder wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungssystems im CellCelector gespeichert und ausgewertet. Es zeigte sich eine optimale Belichtungszeit von 50 ms für DAPI und 300 ms für TRITC und 500 ms für Cy5.



DAPI-positive Signale
detektierter Zellen

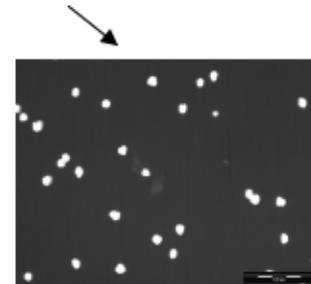


Abb. 4: Die Übersichtsaufnahme zur Darstellung der DAPI-positiven Signale (Zellkern) in der CellSearch-Cartridge durch den Scanvorgang im DAPI-Immunfluoreszenzkanal (Belichtungszeit 50 ms, 20x-Objektiv) im CellSelector. Zusätzliche Illustration des Verhältnisses von CTCs zu anderen Blutzellen (z.B. Leukozyten) in einer aufgearbeiteten Blutprobe durch das CellSearch-System. CTC: zirkulierende Tumorzelle; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; μm : Mikrometer



TRITC-positives Signal
einer detektierten Zelle

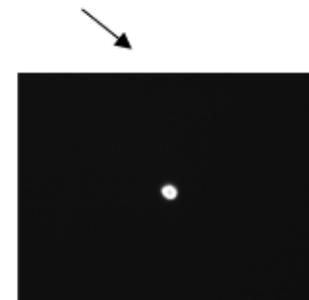


Abb. 5: Die Übersichtsaufnahme zur Darstellung der TRITC-positiven Signale (CK) in der CellSearch-Cartridge durch den Scanvorgang im TRITC-Immunfluoreszenzkanal (Belichtungszeit 300 ms, 20x-Objektiv) im CellSelector. Zusätzliche Illustration der Rarität von CTCs zu anderen Blutzellen (z.B. Leukozyten) in einer aufgearbeiteten Blutprobe durch das CellSearch-System. Auf Grund der wenigen CTCs und der Darstellung als Übersichtsaufnahme sind die detektierten Signale schwer zu erkennen. CTC: zirkulierende Tumorzelle; TRITC: Tetramethylrhodamine; CK: Zytokeratin; μm : Mikrometer

Die CTC-Kandidaten (DAPI- und TRITC-positiv, Cy5-negativ) wurden manuell nach den Auswahlkriterien (z.B. Zelldurchmesser 5-40 μm) sortiert und über hinterlegte Koordinaten auf dem Kreuztisch im Livebild zum Isolierungsvorgang wieder gefunden.

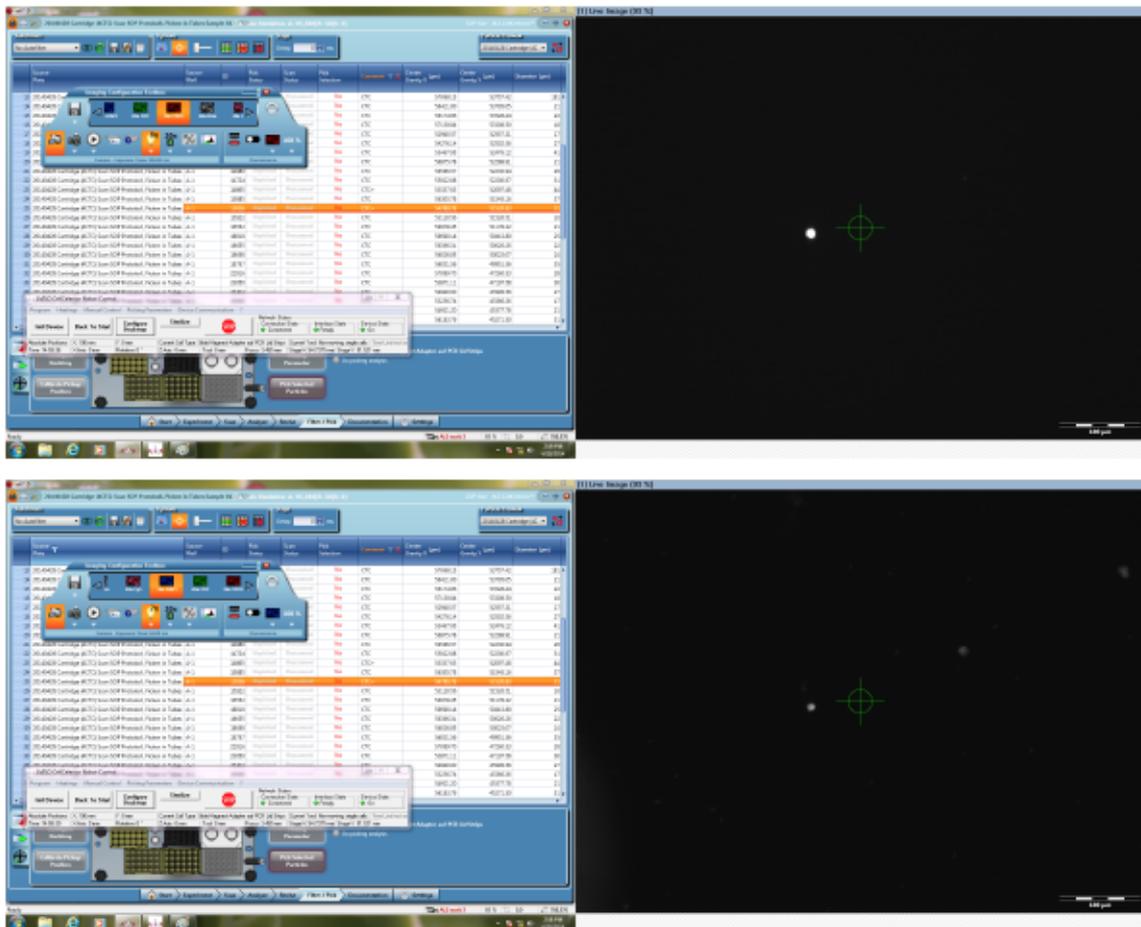


Abb. 6: Das Beispiel des Filter- und Pickmodus nach erfolgtem Scan und dessen Analyse einer CellSearch-Cartridge. Die Zellen konnten, je nach Signalverhalten, in den unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen und dem Zelldurchmesser beurteilt und als CTCs benannt werden (linker Abschnitt). Zusätzlich konnte im Hellfeld-Bereich die Morphologie der Zelle, als weiteres Kriterium für eine mögliche Tumorzelle, betrachtet werden. Die Zellkandidaten wurden manuell nach den Auswahlkriterien sortiert und über hinterlegte Koordinaten auf dem Kreuztisch im Livebild zum Isolierungsvorgang wieder gefunden (rechter Abschnitt). Diese Abb. zeigen die selbe Zelle mit einem positivem Signal im DAPI- (oben) und im TRITC-Immunfluoreszenzkanal (unten) und zeigt einen passenden Zelldurchmesser (30 µm) zur Klassifikation einer CTC. µm: Mikrometer

Zur Eingrenzung der Spezifität zur Identifikation der CTCs nach dem Scanvorgang in den Fluoreszenzkanälen wurden im „Threshold Menü“ die Schwellenwerte der Farbintensitäten definiert. Im Erkennungsprozess minimierte diese Funktion die Hintergrundfluoreszenzen (s. Abb. 7).

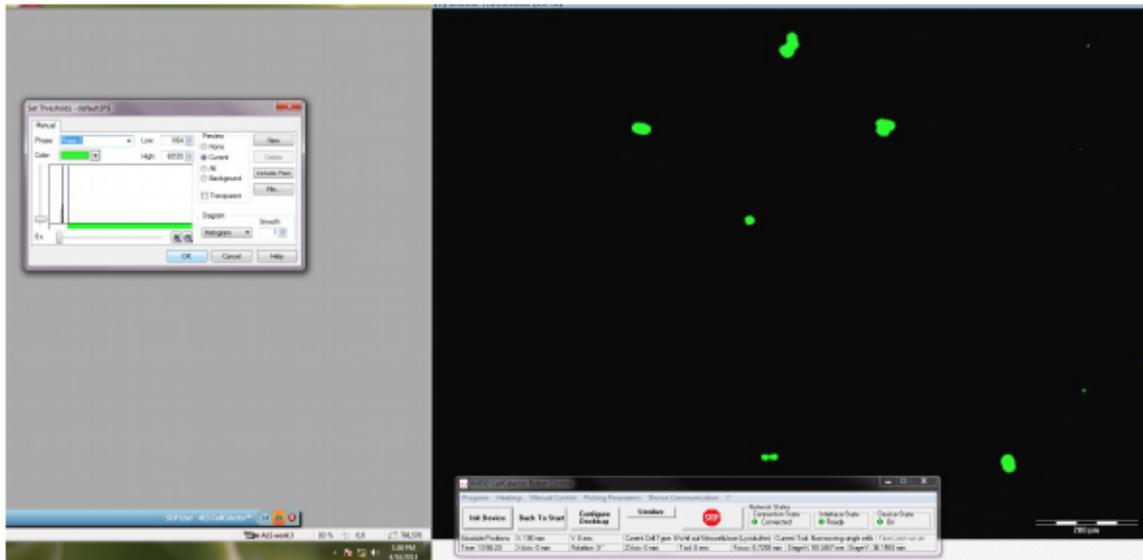


Abb. 7: Die Darstellung des „Threshold Menü“ des CellCelectors zur Definition der Schwellenwerte für die Immunfluoreszenzsignale. Nach dem Scanvorgang der einzelnen Immunfluoreszenzkanäle mit den unterschiedlichen Belichtungszeiten mit dem 20x-Objektiv, konnten mit der Festlegung von Schwellenwerten falsch positive Hintergrundsignale minimiert werden. Als Beispiel wurden in der Abb. die Thresholds für die Immunfluoreszenzfärbung im DAPI-Kanal mit einer Belichtungszeit von 50 ms von SKBR-3-Kontrollzellen nach der Anreicherung im CellSearch-System gesetzt. μm : Mikrometer

Durch die Kombination der Parameter wie der Zelldurchmesser, Formfaktoren und die Definition der Schwellenwerte für die positiven Signale in den Fluoreszenzkanälen konnte die Anzahl der möglichen CTCs im Filtermenü zur manuellen Sortierung eingegrenzt werden und falsch positive Signale (Verunreinigungen und Hintergrundsignale) minimiert werden.

Zur Voruntersuchung des Einflusses des Alters der *Cartridge* und wiederholten Scanvorgänge auf die Detektionsrate von CTCs erfolgten Scanuntersuchungen als *Spiking-Experiment* im CellCelector im DAPI- und TRITC-Kanal. SK-BR-3-Kontrollzellen aus dem *CellSearch® Circulating-Tumor-Cell-Control-Kit* einer *Cartridge* des CellSearch-Systems wurden zu zwei Patientenproben ohne detektierte CTCs in *Cartridges* verdünnt. Beide *Cartridges* wurden im CellTRACKS-Analyzer gescannt und die detektierten Kontrollzellen gezählt. Eine *Cartridge* wurde für eine Woche und die andere *Cartridge* für acht Wochen bei 4°C kühl gelagert. Danach wurden die *Cartridges* auf den Objektträger des etablierten Magnetadapters (siehe Teil Isolierungsverfahren) pipettiert und im CellCelector Mikroskop viermal nacheinander im DAPI- und TRITC-Kanal gescannt. Die detektierten Zellen der *Cartridges* im CellCelector wurden mit der Zellzählung des vorherigen Scanvorgangs des CellCelectors verglichen (s. Abb. 8).

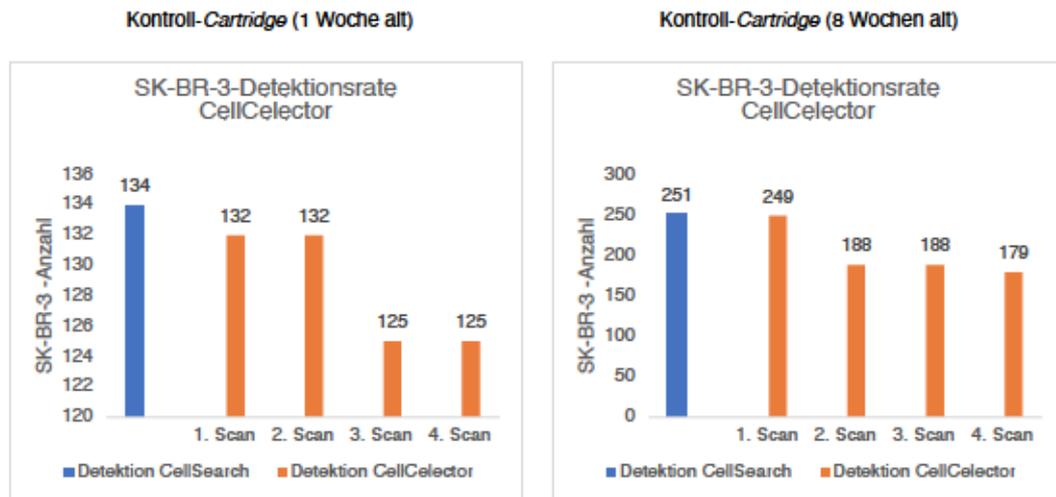


Abb. 8: Die Detektionsrate von SK-BR-3-Zellen in Bezug auf das Alter und der Anzahl an Scanvorgängen einer Cartridge. Die SK-BR-3-Zellen unterschiedlich alter Cartridges mit Kontrollzellen (links: 1 Woche alt, rechts 8 Wochen alt) wurden im CellSearch-System gescannt (blau) und mit den Detektionsraten in weiteren 4 Scans im CellCelector-System verglichen (orange).

Nach vier aufeinanderfolgenden Scanvorgängen in den Fluoreszenzkanäle DAPI und TRITC zeigte sich bei der Detektion der SK-BR-3-Zellen der eine Woche alten Cartridge eine 94 % Wiederfindungsrate der Zellen. Bei der acht Wochen alten Cartridge konnte durchschnittlich nach vier Scanversuchen eine Detektionsrate von 72 % erreicht werden. Es konnte eine Wiederfindungsrate der SK-BR-3-Zellen von 99 % nach der Überführung der Probe aus der Cartridge auf den Objektträger erreicht werden. Ursächlich für die unterschiedlichen Detektionsraten der Proben erschien der Intensitätsverlust der Immunfluoreszenzfärbung der SK-BR-3-Zellen nach mehreren Belichtungen im Scanvorgang.

3.1.3 Detektionsrate von Zellen im CellSearch und CellCelector

Um die Detektionsrate von CTCs in einer aufgearbeiteten Cartridge des CellSearch-Systems und des CellCelector-Systems zu vergleichen, wurden Scanversuche als Spiking-Experiment mit SK-BR-3-Zellen der gleichen Cartridge im Magnetadapter in beiden Systemen durchgeführt. Hierzu wurden SK-BR-3-Kontrollzellen aus dem CellSearch®-Circulating-Tumor Cell-Control-Kit nach erfolgter Anreicherung im CellSearch-System (siehe Material/Methodik) verwendet. Diese angereicherten SK-BR-3-Zellen aus der Cartridge wurden in einer Verdünnungsreihe zu einer bereits aufgearbeiteten Cartridge ohne nachgewiesenen CTCs im CellSearch-System hinzu pipettiert. Die Cartridges mit der unterschiedlichen Anzahl an gespikten SK-BR-3-Zellen wurden in den Magnetadapter (MagNest) für 20 min dunkel inkubiert und dann durch den CellTRACKs-Analyzer gescannt. Danach wurde die Probe in dem Magnetadapter in den Fluoreszenzkanälen DAPI, TRITC und Cy5 mit dem 20x-Objektiv

durch den CellCelector gescannt. Die magnetische Fixierung der CTCs auf eine Fokusebene in dem Magnetadapter funktionierte auch auf dem Kreuztisch des CellCelectors und die Zellen konnten auch nach der Bewegung des Kreuztisches mit der Speicherung der Koordinaten im Bildverarbeitungssystem des CellCelectors an dieser Position wiedergefunden werden. Die Detektionsrate der SK-BR-3-Zellen der beiden Geräte wurde verglichen und zu 95 % konnte der CellCelector die Zellen wiederfinden.

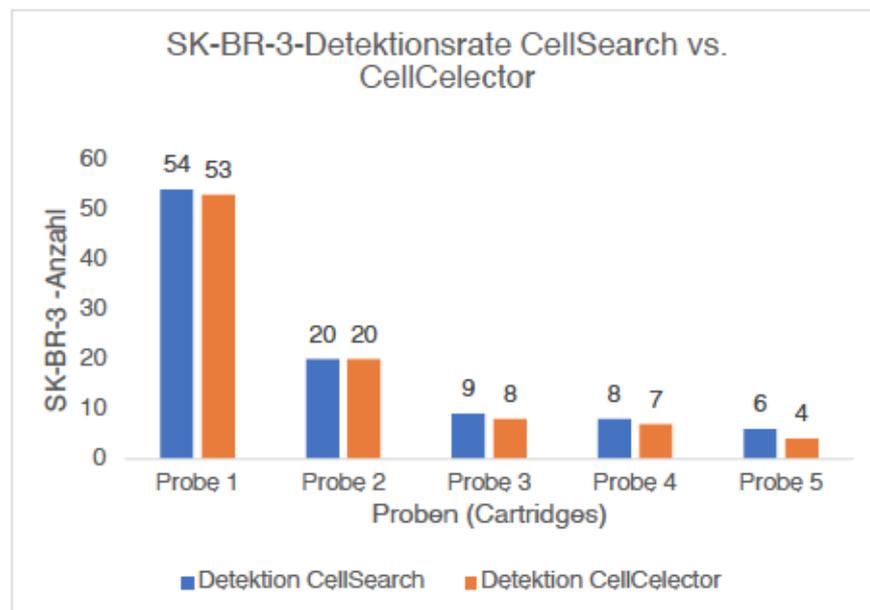


Abb. 9: Vergleichbarkeit der Detektionsrate von SK-BR-3-Zellen des CellSearch-Systems (blau) und des CellCelector-Systems (orange). Bei der Probe 1 konnten 53/54 der detektierten SK-BR-3-Zellen des CellTRACKs-Analyzers im CellCelector wiedergefunden werden. Die Probe 5 verdeutlicht, dass der CellCelector bei einer niedrigen Anzahl an SK-BR-3-Zellen 4/6 Zellen detektieren konnte. Durchschnittlich konnte eine *Wiederfindungsrate der SK-BR-3-Zellen durch den CellCelector von 95 % erreicht werden.*

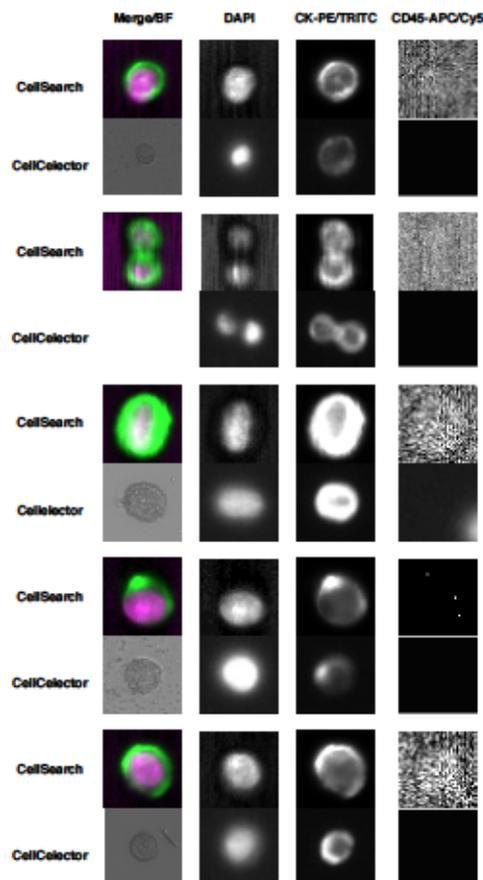


Abb. 10: Der morphologische Vergleich von detektierten SK-BR-3-Zellen im CellSearch- und CellCelector-System. Dieselben 5 detektierten SK-BR-3-Zellen sind im Merge/BF-, DAPI-, CK-PE/TRITC- und CD45/Cy5-Fluoreszenzkanal des CellSearch- und CellCelector-Systems dargestellt. Anhand der Morphologie und der unterschiedlichen Fluoreszenzsignale konnten die Einzelzellen einander zugeordnet werden. BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; CK: Zytokeratin; PE: Phycoerythrin; TRITC: Tetramethylrhodamine; CD45: cluster of differentiation 45; APC: Allophycocyanin; Cy5: Cyanin 5

3.2 Optimierung des Verfahrens zur Einzelzellisolierung

3.2.1 Optimierung des Arbeitsablaufs zur Einzelzellisolierung

Die Vorversuche mit n=5 zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse, dass es möglich ist mit dem CellCelector-System zu 95 % die bereits detektierten CTCs im CellTRACKS-Analyser des CellSearch-Systems auch im CellCelector-System wiederzufinden. Für die anschließende Entwicklung eines Verfahrens zur Einzelzellisolierung dieser detektierten CTCs war es aber notwendig die flüssigen Proben aus der *Cartridge* im Magnetadapter zu entfernen. Zur Etablierung eines Verfahrens zur optimalen Gewinnung der Probe mit Vermeidung eines Zellverlustes der raren CTCs aus der *Cartridge* und Fixierung der Probe auf einem Medium des Kreuztisches wurden einige Testuntersuchungen durchgeführt (s. Abb. 11).

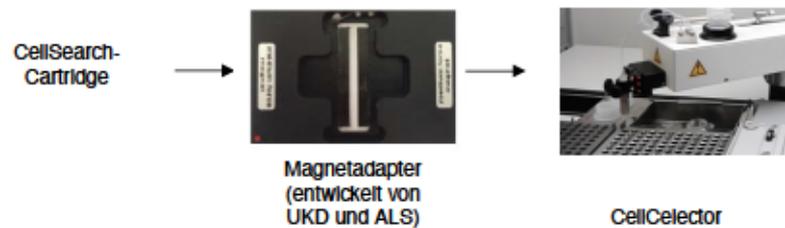


Abb. 11: Der Arbeitsablauf für die Einzelzellisolierung des CellCelectors. Die Probe aus der Cartridge des CellSearch-Systems wurde für den Isolierungsvorgang im CellCelector auf ein neues Medium (ggf. Objektträger) überführt.

Zellen der MCF-7-Zelllinie (EpCAM-positiv) wurden verdünnt in PBS zu einer peripher venös entnommenen Vollblutprobe von 7,5 ml gespiked. Diese veränderte Blutprobe wurde dann mit dem CellSearch-System aufgearbeitet. Im CellTRACKs-Analyser konnten 338 CTC-Ereignisse in der Cartridge nachgewiesen werden. Einige Zellen waren auf Grund der Nähe zueinander in einem Ereignis zusammen dargestellt (s. Abb. 12 B) und nach manueller Sichtung konnte eine Zellzahl von 554 verzeichnet werden. Im nachfolgenden Scan der Cartridge im Magnetadapter durch den CellCelector konnten 336 Ereignisse (DAPIpos,CKpos,CD45neg) und nach manueller Analyse der Bildereignisse insgesamt 559 Zellen detektiert werden. Die Probe wurde wie im Methodenteil „Arbeitsablauf für die Einzelzellisolierung des CellCelectors“ beschrieben auf einen Glasobjektträger pipettiert, der Überstand abpipettiert und die Probe eingetrocknet. Bei dem Scan im CellCelector konnten anschließend 252 Bildereignisse und insgesamt 392 MCF-7-Zellen detektiert werden. Durch diese Methodik zeigte sich ein Zellverlust von ca. 30 %.

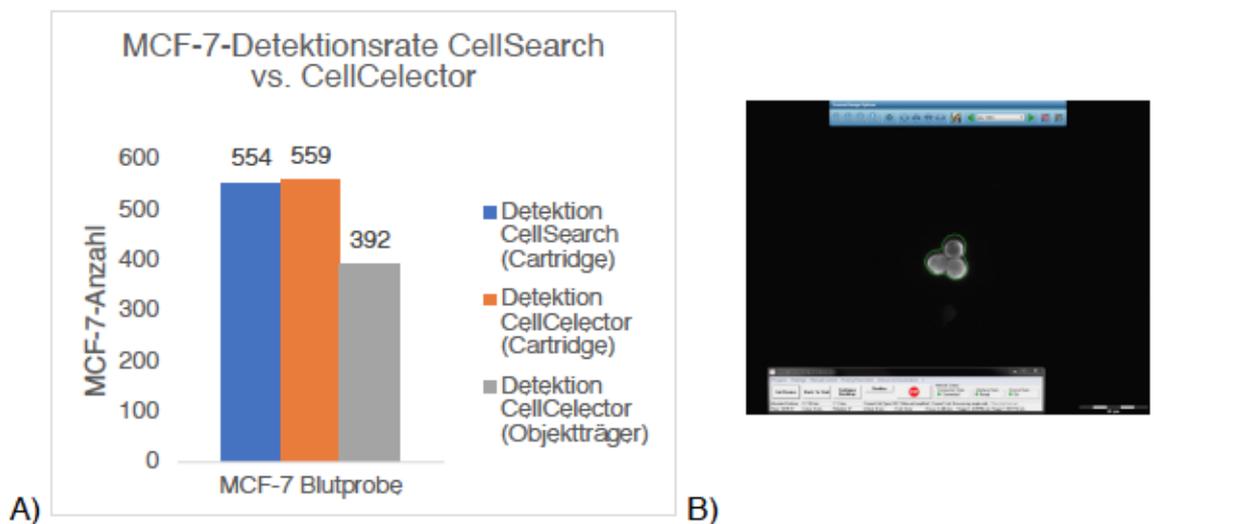


Abb. 12: Die Vergleichbarkeit der Detektionsrate von MCF-7-Zellen im CellSearch- und CellCelector System. A) Bei erfolgreichem Scan der Cartridge im CellCelector konnten 554 MCF-7-Zellen im CellSearch-System (blau) und 559 MCF-7-Zellen im CellCelector-System (orange) nachgewiesen werden. Nach Pipettierung und Eintrocknung der Probe auf dem Glasobjekträger wurden 392 Zellen durch den CellCelector wiedergefunden (grau) und ein Zellverlust von 30 % verzeichnet. **B)** Darstellung von einem Ereignis (DAPIpos,CKpos,CD45neg) mit drei MCF-7-Zellen im TRITC-Fluoreszenzkanal des CellCelectors. μm : Mikrometer; vs.: versus

Bei einem verzeichneten Zellverlust von 30 % durch dieses Verfahren, am ehesten durch die nicht ausreichende magnetische Anziehungskraft der Zellen auf dem Magnetadapter bei der Entfernung des Flüssigkeitsüberstandes der Probe auf dem Objekträger bedingt, konnte diese Methodik nicht als Standard für den Workflow angewandt werden.

Zur optimalen Nutzung der immunomagnetischen Anreicherung der CTCs im CellSearch-System für die Fixierung dieser auf dem Objekträger und zur Herstellung einer konstanten Fokusebene wurde ein spezieller Magnetadapter für das Einspannen von Objekträger in Zusammenarbeit mit der Firma ALS für das CellCelector-System hergestellt. Die Magnete wurden in Anlehnung zu dem MagNest des CellSearch-Systems entwickelt und in analoger Geometrie zueinander verarbeitet (s. Abb. 13).

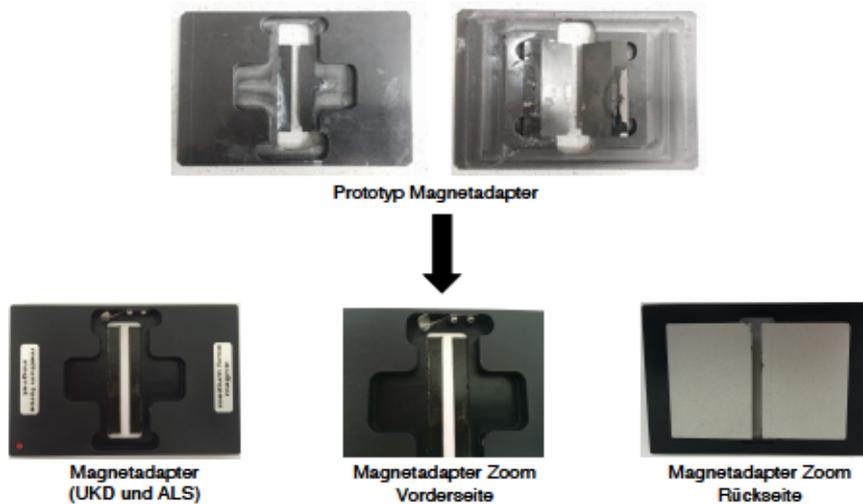


Abb. 13: Die Entwicklung des CellCelector-Magnetadapters. Der Magnetadapter kann in den Kreuztisch des CellCelectors eingesetzt werden. An der Unterseite sind zwei mittelstarke und vergleichbare Magneten zum MagNest des CellSearch Systems angebracht. Der Abstand der Magneten entspricht denen des MagNest. Das magnetische Feld fixiert die Zellen durch die Ausrichtung der Ferrofluide, damit ihre Position während des Screenings, der Detektion und des Isolierungsvorgangs stabil bleibt. In dem CellCelector-Magnetadapter kann ein Objektträger plan eingespannt werden, sodass die flüssige Probe in einer Fokusebene im CellCelector gescannt werden kann. μm : Mikrometer

Zur Testung der magnetischen Kraft des speziell entwickelten Magnetadapters und der Fixierung von CTCs bei der Bewegung des Kreuztisches des CellCelectors wurden SK-BR-3-Kontrollzellen aus einer CellSearch-Cartridge in eine Cartridge ohne detektierte CTCs gespiked. Die Probe wurde nach dem Protokoll im Material/Methoden Abschnitt auf den Glasobjektträger im Magnetadapter überführt.

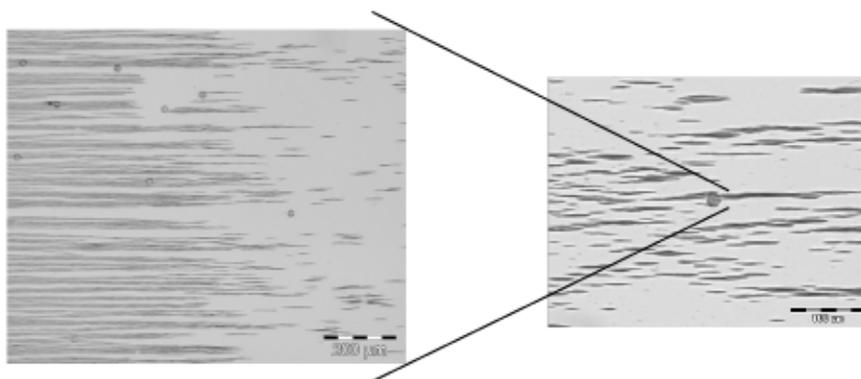


Abb. 14: Die Darstellung von immunmagnetisch angereicherten SK-BR-3-Zellen aus einer Cartridge des CellSearch-Systems auf dem Objektträger des Magnetadapters des CellCelectors. Die Zellen richteten sich im Magnetfeld aus. μm : Mikrometer

Die *Cartridges* mit den gespikten Zellen wurden mit dem CellTRACKS-Analyzer im MagNest gescannt und die detektierten SK-BR-3-Zellen gezählt. Die *Cartridge* wurde dann im MagNest mit dem CellCelector gescannt und die detektierten SK-BR-3-Zellen erneut gezählt. Danach wurde die *Cartridge* aus dem MagNest entnommen und die Probe aus der *Cartridge* auf den Objektträger im Magnetadapter des CellCelectors überführt, und erneut gescannt. Bei dem Vergleich der Detektionsraten von SK-BR-3-Zellen unterschiedlicher Anzahl in den Proben zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse von CellSearch und CellCelector in den *Cartridges*. Das Überführen der Proben war mit einem Zellverlust von ca. 10 % (Probe 1 und 3) bzw. von 50 % (Probe 2) verbunden, was vermutlich auf die Pipettiergenauigkeit zurückzuführen ist (s. Abb. 15).

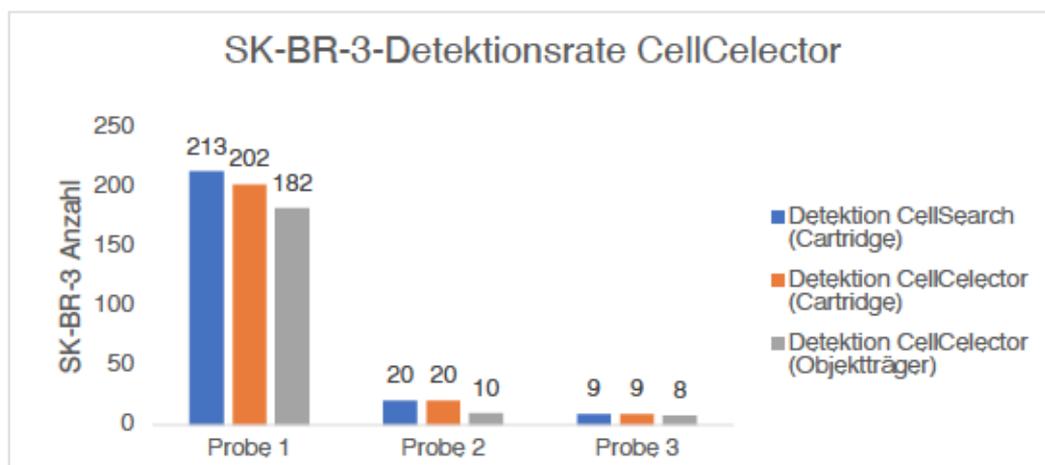


Abb. 15: Die Detektionsrate von SK-BR-3-Zellen in unterschiedlicher Verdünnung durch den CellCelector. In der Probe 1 wurden 213 SK-BR-3-Zellen im CellSearch-System detektiert (blau). Davon konnten in der *Cartridge* 202 Zellen (orange) und 182 Zellen auf dem Objektträger (grau) im CellCelector wiedergefunden werden. Bei der Probe 2 wurden 20/20 Zellen im CellCelector wiedergefunden (orange). Bei der Überführung konnten 10 Zellen detektiert werden (grau). Von 9 Zellen in der Probe 3 wurden 100 % in der *Cartridge* (orange) und anschließend 8/9 Zellen auf dem Objektträger im CellCelector detektiert (grau).

In einem gleichen Versuchsaufbau mit *Cartridges* (n=5) unterschiedlicher SK-BR-3-Zellzahl zeigte sich eine durchschnittliche Detektionsrate nach Überführung der Probe auf den Objektträger des CellCelectors von 86 % (16).

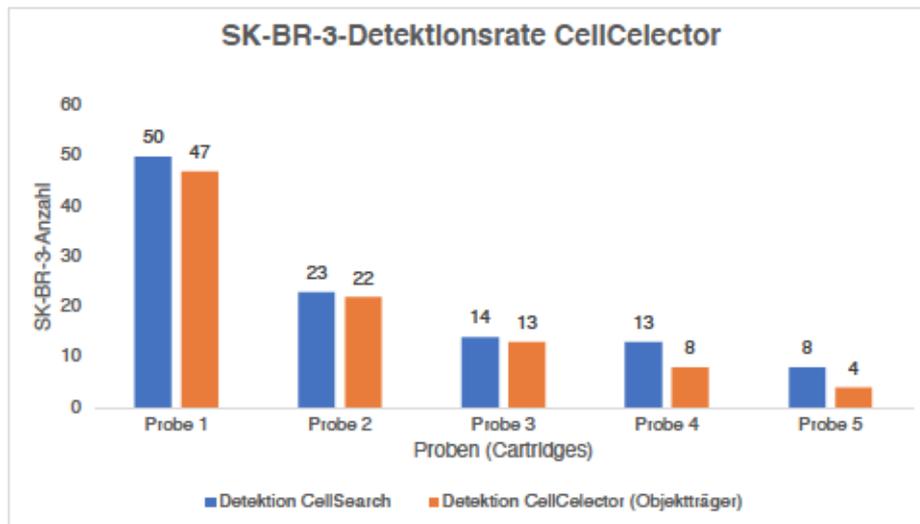


Abb. 16: Die Detektionsrate von SK-BR-3-Zellen im CellCelector. Fünf Proben mit unterschiedlicher Anzahl an detektierten SK-BR-3-Zellen wurden im CellSearch-System (blau) und anschließend, nach der Überführung der Probe auf einen Objektträger, im CellCelector-System gescannt (orange). Die Detektionsrate des CellCelectors aus den fünf Proben betrug durchschnittlich nach dem Pippetiervorgang auf den Objektträger 86 %. Abbildung modifiziert nach (16).

3.2.2 Einstellung der Parameter zur Einzelzellisolierung

Um zielgenau eine CTC aus der Probe auf dem Objektträger in dem Magnetadapter zu aspirieren und eine Kontamination mit anderen Blutzellen zu vermeiden, wurden die Isolierungsparameter wie das „Aspirationsvolumen“, die „Aspirationsgeschwindigkeit“ und die „Aspirationshöhe“ der Glaskapillare des CellCelectors definiert.

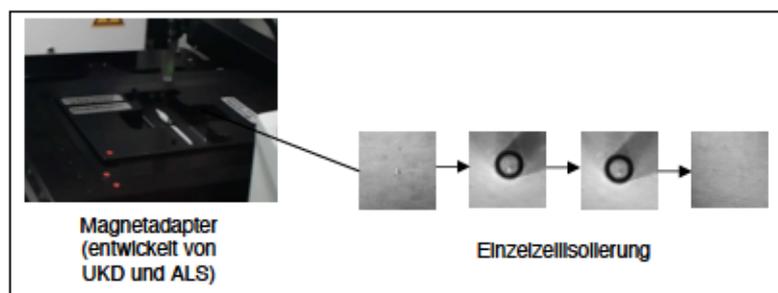


Abb. 17: Optimierung des Isolierungsvorgangs vom Magnetadapter des CellCelectors. Darstellung der Glaskapillare mit einer definierten Aspirationshöhe zum Objektträger (rechter Abschnitt).

3.2.2.1 Aspirationsvolumen

Für das *Spiking-Experiment* wurde der Probeninhalt einer *Cartridge* mit SK-BR-3-Zellen auf den Objektträger im Magnetadapter überführt. In mehreren Isolierungsvorgängen wurden Aspirationsvolumina von 1 μl bis 0,1 μl mit einer Glaskapillare im Durchmesser von 30 μm und einer vorher festgelegten Aspirationsgeschwindigkeit von 20 % getestet. Bei dem definierten „Aspirationsvolumen“ der Glaskapillare von 1 μl konnten die Zellen mit der Glaskapillare, auf Grund der sehr engen Lage zueinander, nicht einzeln isoliert werden. Es wurden gleichzeitig mehrere SK-BR-3-Zellen zusammen aspiriert und eine zu große Fläche auf dem Objektträger abgetragen. Durch die Reduktion des Aspirationsvolumens bis auf 0,5-0,1 μl war es möglich die SK-BR-3-Zellen mit einem durchschnittlichen Abstand von ca. 300-150 μm als Einzelzellen zu aspirieren (s. Abb. 18).

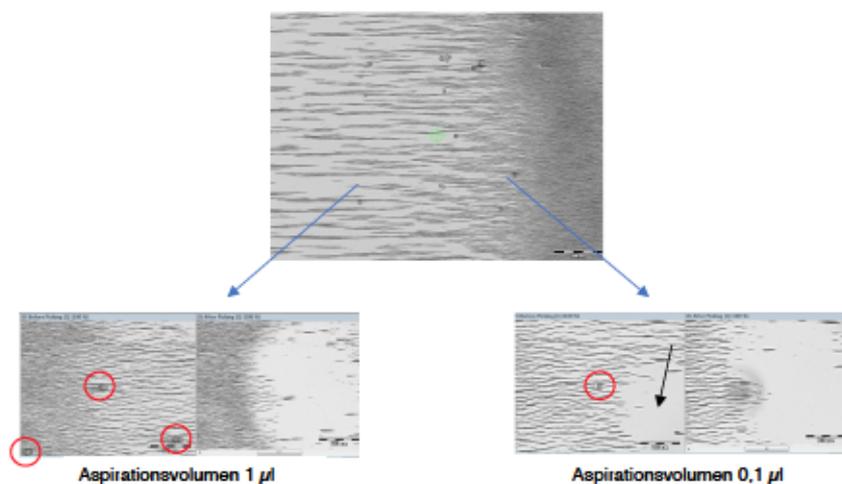


Abb. 18: Die Darstellung einer Probe mit SK-BR-3-Zellen des CellSearch-Systems in der Übersichtsaufnahme des BF-Kanals des CellSelectors (oben). Durch ein Aspirationsvolumen von 1 μl wurden neben der ausgewählten einzelnen SK-BR-3 Zelle zusätzlich vier weitere Zellen zusammen in die Glaskapillare aspiriert (linkes Bild). Durch die Reduktion des Aspirationsvolumens auf 0,1 μl konnten die Zellen mit einem geringen Abstand zueinander als Einzelzellen isoliert werden (rechts Bild). Der Pfeil stellt die bereits erfolgte Aspiration einer Einzelzelle (fehlende Ferrofluide) ohne die gleichzeitige Aspiration der dargestellten SK-BR-3 Zelle dar (roter Kreis). μm : Mikrometer; μl : Mikroliter

3.2.2.2 Aspirationsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der optimalen Aspirationsgeschwindigkeit wurden Geschwindigkeiten von 20 % - 100 % zur voreingestellten Ausgangsgeschwindigkeit des CellSelectors getestet. Es zeigte sich, dass bei Geschwindigkeiten > 20 % die Adhäsion der anderen Blutzellen auf dem Magnetadapter nicht ausreichte und eine größere Fläche mit der Kontamination anderer Zellen, die im nahen Abstand um die CTC lagen, auf dem Objektträger aspiriert wurde.

3.2.2.3 Aspirationsabstand

Zur Festlegung des Aspirationsabstandes der Glaskapillare zum Objektträger bei einem Aspirationsvolumen von 0,1 µl und einer 20%igen Aspirationsgeschwindigkeit wurde diese vor jedem Isolierungsvorgang kalibriert. Nach erfolgten Testuntersuchungen unterschiedlicher Aspirationshöhen konnte durch die Aspirationshöhe von 25 µm eine 98%ige Wahrscheinlichkeit der Einzelzellisolierungen ohne Aspiration von Nachbarzellen erreicht werden (16).

3.2.2.4 Optimierung der Einzelzellisolierung

Die Einstellung der „Ablagehöhe“ und „Ablagegeschwindigkeit“ wurde an das festgelegte Ablagevolumen und an das Ablagemedium angepasst. Bei der Ablage der Einzelzellen in *PCR Tubes* für nachfolgende genetische Analysen wurde ein geringes Probenvolumen (in der Regel 1 µl) benötigt. Die Ablagehöhe musste daher an das geringe Ablagevolumen angepasst werden. War die Ablagehöhe zu hoch, blieb die Probe am Ende der Glaskapillare hängen und wurde durch die Bewegung des Arbeitsarmes verworfen. Die Ablagehöhe musste so eingestellt werden, dass der Proben tropfen das *PCR Tube* nur leicht berührt und durch die Oberflächenspannung auf das *Tube* gezogen wird. Mit der Einstellung einer Ablagehöhe von 12,8 mm zur Neutralposition des Arbeitsarmes zeigte sich eine Ablagerate von 96 % in die *PCR Tubes*. Durch die geringere Volumenaufnahme der Pufferflüssigkeit minimierte sich der Druck bei der Ablage aus der Glaskapillare. Deshalb wurde zusätzlich eine Ablagegeschwindigkeit von 100 % definiert.

Zur Verifizierung der definierten Isolierungsparameter wurde eine Probe mit SK-BR-3-Zellen aus einer *Cartridge* auf den Objektträger in dem Magnetadapter pipettiert. Es erfolgten 30 Isolierungsvorgänge und die Einzelzellaspirationen wurden unter der Mikroskopie verfolgt und bildlich dokumentiert. Bei 87 % der SK-BR-3-Zellen konnte eine erfolgreiche Einzelzellisolierung durchgeführt werden. Bei 10 % kam es zu einer Aspiration von >1 Zelle und bei 3 % missglückte die Isolierung einer Zelle (s. Abb. 19).

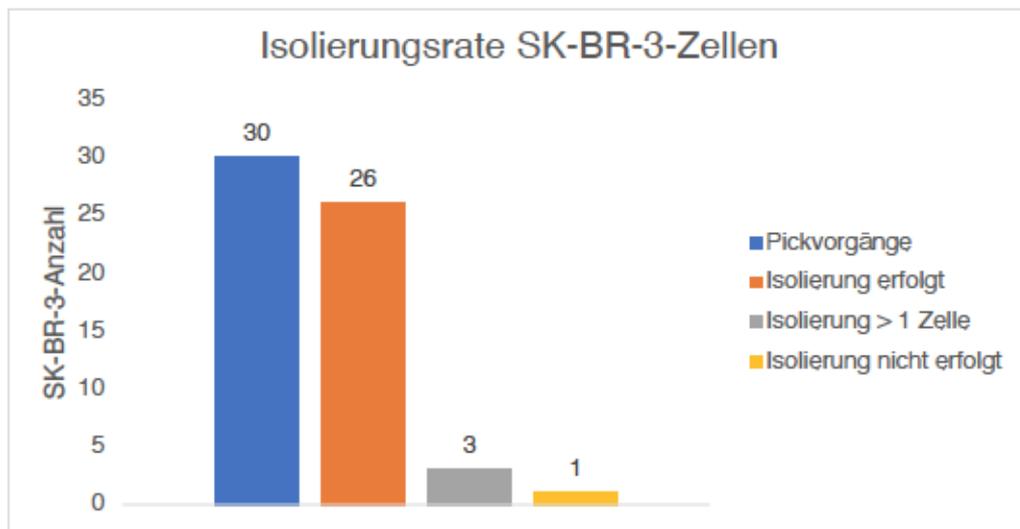


Abb. 19: Die Darstellung der Einzelzellisolierungen von SK-BR-3-Zellen. Von 30 Isolierungsvorgängen (blau) konnten 26 Einzelzellen erfolgreich isoliert werden (orange). Bei drei Vorgängen wurden mehr als eine Zelle aspiriert (grau) und bei einem Vorgang konnte die Zelle nicht isoliert werden (gelb).

Zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit einer Einzelzellisolierung in Abhängigkeit vom Zellabstand erfolgten Isolierungsvorgänge von SK-BR-3-Zellen in unterschiedlichem Abstand (500-0 μm) zueinander.

Zellen mit einem Abstand von $> 100 \mu\text{m}$ zueinander konnten mit den zuvor definierten Isolierungsparametern einzeln isoliert werden. Bei einem geringeren Abstand zweier Zellen $< 100 \mu\text{m}$ zeigte sich eine deutliche Abnahme der Isolierungswahrscheinlichkeit als Einzelzelle. Die SK-BR-3-Zellen im direkten Kontakt zueinander konnten nicht als Einzelzellen isoliert werden (s. Abb. 20).

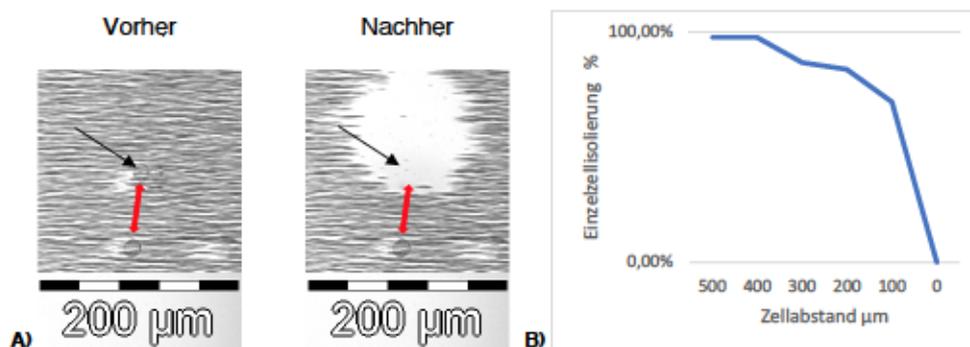


Abb. 20: Der Erfolg der Einzelzellisolierung in Abhängigkeit vom Zellabstand.

A) Darstellung eines Isolierungsvorgangs vor und nach der Aspiration. Eine Einzelzellisolierung mit einem Abstand von $100 \mu\text{m}$ (rote Linie) zweier Zellen war möglich. **B)** Wahrscheinlichkeit des Erfolges der Einzelzellisolierung im Verhältnis zum Zellabstand. μm : Mikrometer; %: Prozent

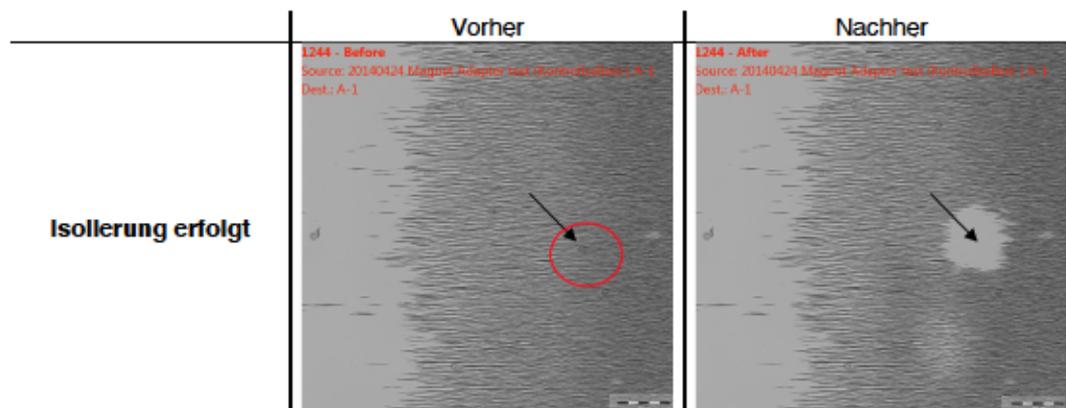


Abb. 21: Darstellung einer erfolgreichen Einzelzellisolierung. μm : Mikrometer

3.2.3 Etablierung des *Workflows* zur Einzelzellisolierung

Zur Etablierung des *Workflows* wurden die Einzelversuche der „Detektion“ und der „Isolierung“ kombiniert. Zur Überprüfung der Detektionsrate und der Einzelzellisolierungsrate von CTCs wurde ein *Spiking*-Experiment durchgeführt.

SK-BR-3-Zellen aus *Cartridges* des CellSearch-Systems wurden in unterschiedlicher Verdünnung zu *Cartridges* mit Patientenproben ohne detektierte CTCs gemischt. Diese *Cartridges* wurden im CellTRACKS-Analyser gescannt und der Probeninhalt der *Cartridges* auf den Objektträger im Magnetadapter des CellCelectors pipettiert. Danach erfolgte die Detektion der SK-BR-3-Zellen durch den CellCelector nach oben etablierten Detektionsparametern (DAPIpos,CKpos,CD45neg). Die identifizierten Zellen wurden als Einzelzellen mit den eingestellten Parametern isoliert und in CupStrips abgelegt.

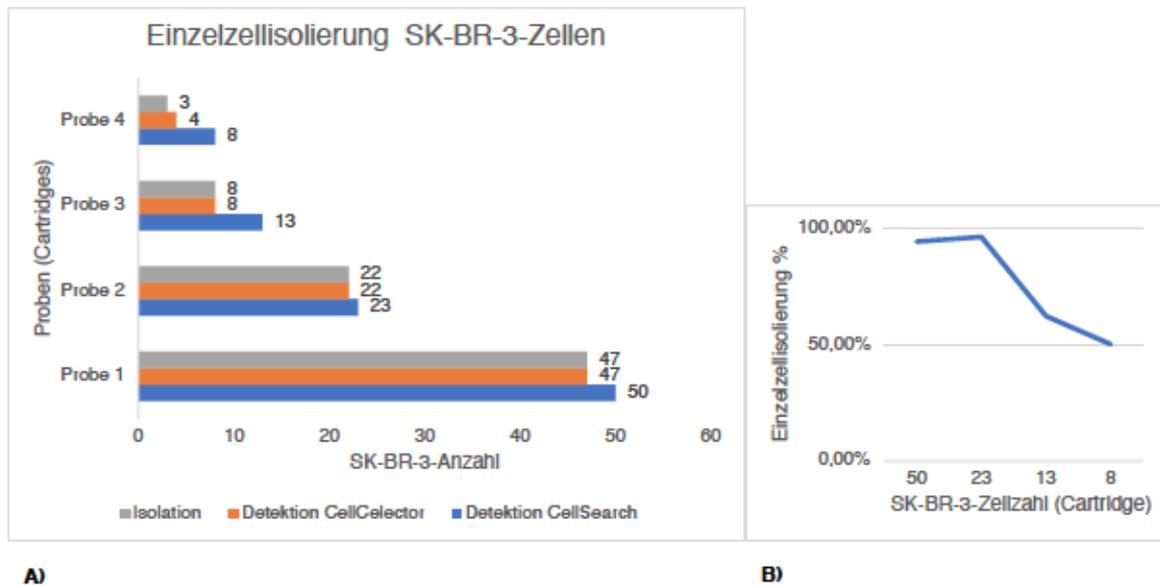


Abb. 22: Die Einzelzellisolierung in Abhängigkeit von der SK-BR-3-Zellzahl in der Cartridge.

A) Illustration der Erfolgsrate der Vereinzelnung von Zellen bei unterschiedlicher SK-BR-3-Zellzahl (grau). Die Detektionsrate von Tumorzellen des CellCelectors nach dem Pipettiervorgang betrug durchschnittlich 86 %. Von diesem Anteil konnten insgesamt 98 % der ausgewählten Zellen isoliert werden. **B)** Die Wahrscheinlichkeit der Einzelzellisolierung hing von der SK-BR-3 Zellzahl in der Cartridge ab. Je geringer die Zellzahl in der Cartridge, desto weniger Zellen konnten detektiert und vereinzelt werden. Abbildung modifiziert nach (16). %: Prozent

Die Wahrscheinlichkeit der Einzelzellisolierung von SK-BR-3-Zellen im Gesamtversuch, von der Überführung der Cartridge bis hin zum Isolierungsvorgang im CellCelector, betrug durchschnittlich 85 %. Die Detektionsrate der SK-BR-3-Zellen nach Überführung der Probe auf den Objektträger des CellCelectors lag im Durchschnitt bei 86 %, die Wahrscheinlichkeit einer darauf folgenden erfolgreichen Einzelzellisolierung bei 98 % (16).

Zur Verifizierung der Ablagewahrscheinlichkeit der SK-BR-3-Einzelzellen nach dem Isolierungsvorgang wurden diese mit den definierten Ablageparametern in CupStrips überführt. Die bildliche Isolierungsdokumentation des Mikroskops wurden den Ablagekoordinaten der einzelnen CupStrips zugeordnet. Die CupStrips wurden danach mikroskopisch mit dem CellCelector in den Fluoreszenzkanälen DAPI und TRITC und im BF-Kanal analysiert und es erfolgte die manuelle Detektion der abgelegten SK-BR-3-Zellen. Die Zahl der isolierten SK-BR-3-Zellen wurde mit der der abgelegten und mikroskopisch wiedergefundenen Zellen verglichen.

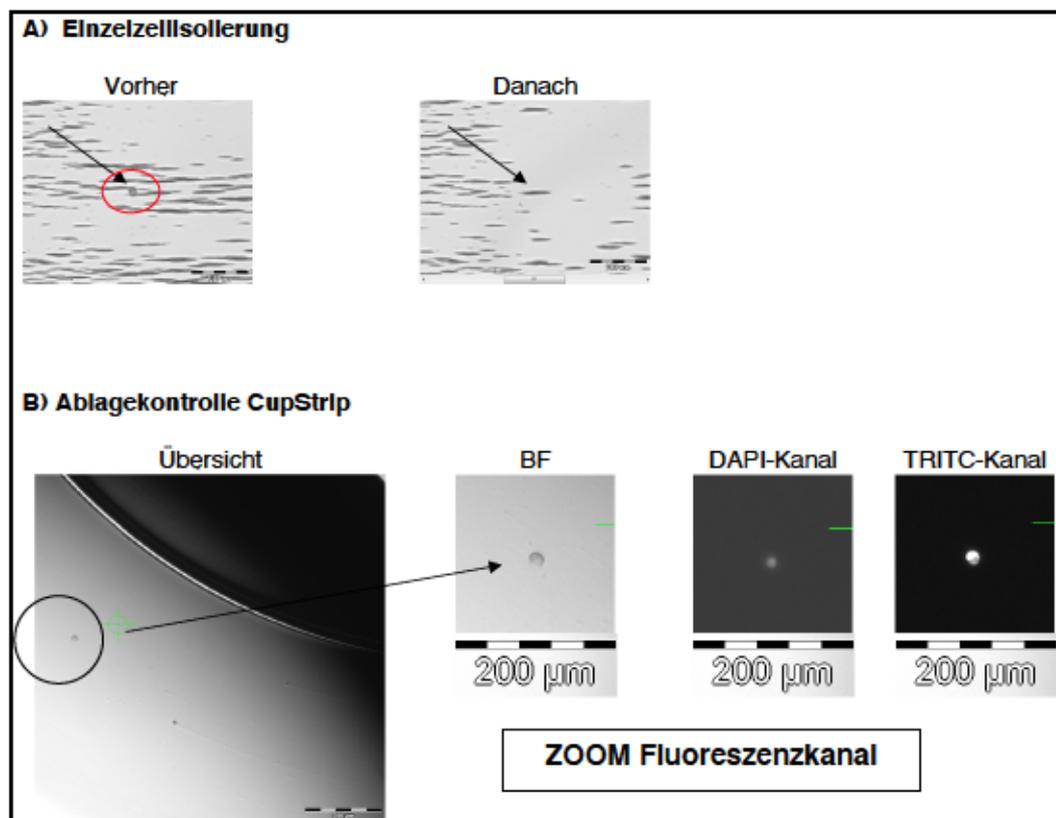


Abb. 23: Die Kontrolle der Zellablage nach der Einzelzellisolierung.

A) Darstellung der Bildkontrolle im CellCelector des Isolierungsvorganges einer SK-BR-3 Zelle im BF-Kanal. Links in der Abbildung ist die SK-BR-3 Zelle vor dem Isolierungsvorgang vergrößert dargestellt und rechts die Bildkontrolle der fehlenden Zelle nach der Aspiration durch die Glaskapillare. **B)** Nach der Aspiration der Zelle wurde diese in ein CupStrip der Coordinate A4 abgelegt. Kontrolle der erfolgten Ablage unter dem CellCelector Mikroskop. Darstellung der SK-BR-3 Zelle im BF und in den Fluoreszenzkanälen DAPI und TRITC. BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; TRITC: Tetramethylrhodamine; μm : Mikrometer

Es wurden 9 SK-BR-3-Zellen der Probe von dem Objektträger im Magnetadapter durch den CellCelector isoliert. Dabei wurden einmal zwei Zellen, direkt aneinander liegend, zusammen aspiriert. Auf der Ablage konnten 7 SK-BR-3-Zellen in den CupStrips und auch die zwei gleichzeitig aspirierten Zellen durch das CellCelector-Mikroskop detektiert werden. Es ergab sich eine Wiederfindungsrate der Zellen in den CupStrips von 78 % (s. Abb. 24).

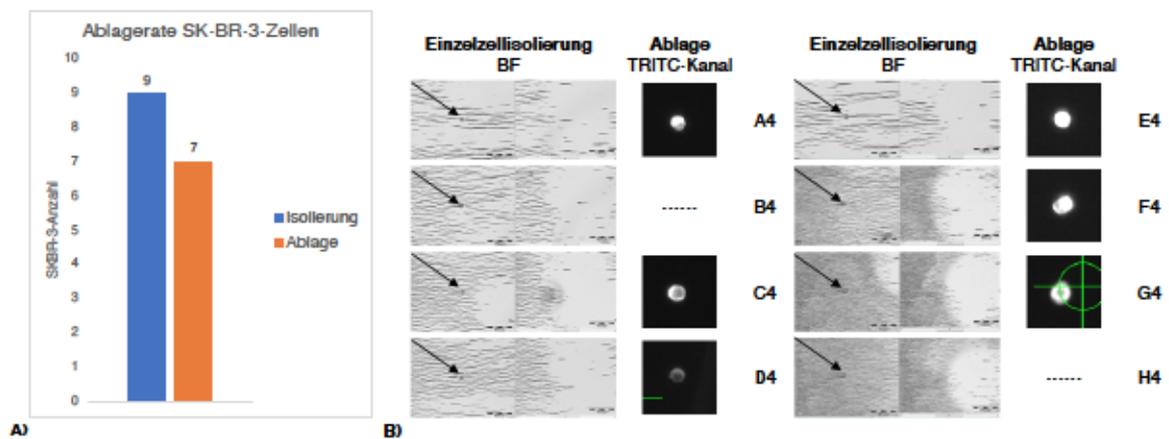


Abb. 24: Die Ablagewahrscheinlichkeit von isolierten SK-BR-3-Zellen durch den CellCelector.

A) Es wurden 9 Zellen durch den Mikromanipulator aspiriert und als Einzelzellen isoliert. Davon konnten 7 Zellen in den CupStrips auf der Ablage wiedergefunden werden. **B)** Die mikroskopiegestützte Ablagekontrolle der Einzelzellen auf den CupStrips im TRITC-Kanal. Es konnten 7 Zellen wiedergefunden werden, wobei bei einem Ereignis (F4) zwei SK-BR-3-Zellen auf Grund der Lage zueinander zusammen aspiriert wurden (rechts). BF: Bright Field; TRITC: Tetramethylrhodamine; μm : Mikrometer

Zur Verifizierung der Ablagewahrscheinlichkeit von SK-BR-3-Einzelzellen in Abhängigkeit des definierten Aspirationsvolumens wurden 29 Isolierungsvorgänge mit dem CellCelector mit einem Aspirationsvolumen von $0,5 \mu\text{l}$ und 104 Isolierungsvorgänge mit einem Aspirationsvolumen von $0,1 \mu\text{l}$ auf einem Objektträger durchgeführt. Anschließend wurden die abgelegten Zellen der einzelnen Koordinaten des Objektträgers unter dem CellCelector-Mikroskop gezählt. Die Ablagewahrscheinlichkeit lag mit einem Aspirationsvolumen von $0,5 \mu\text{l}$ bei 97 % und mit einem Aspirationsvolumen von $0,1 \mu\text{l}$ bei 96 % (s. Abb. 25).

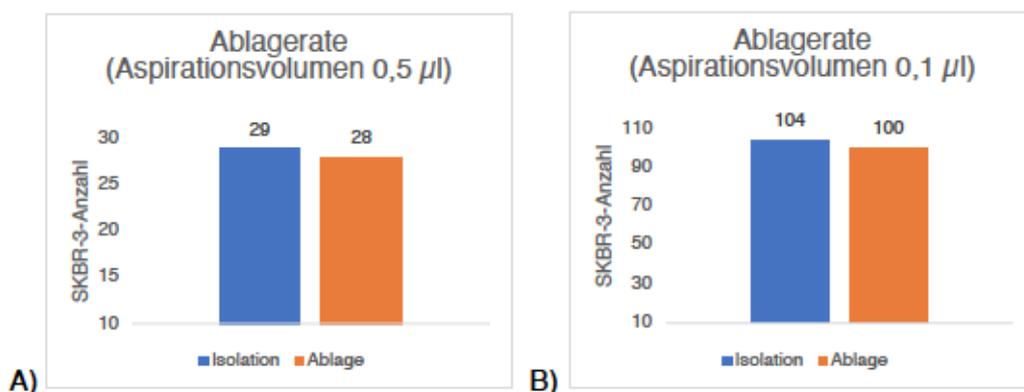


Abb. 25: Die Ablagekontrolle von isolierten SK-BR-3-Zellen auf einem Objektträger.

A) Mit einem Aspirationsvolumen von $0,5 \mu\text{l}$ konnten 97 % SK-BR-3-Zellen auf der Ablage wiedergefunden werden (orange). **B)** Die mikroskopische Ablagekontrolle bestätigte eine Ablagewahrscheinlichkeit von 96 % bei einem Aspirationsvolumen von $0,1 \mu\text{l}$ (orange). μl : Mikroliter

Zur weiteren Verwendung der Einzelzellen mussten diese von den *PCR CupStrips* in die *PCR Tubes* durch Zentrifugation überführt werden. Zur Einsparung dieses Arbeitsschrittes wurde die Ablagewahrscheinlichkeit der Einzelzellen direkt in die 15 mm *PCR Tubes* bestimmt.

8 SK-BR-3 Kontrollzellen wurden mit einer Pufferaufnahme von 1 μl und einem Aspirationsvolumen von 0,1 μl isoliert. Die Ablagehöhe wurde in der ersten Kalibrierung so eingestellt, dass eine Ablage bis in den Konusbereich des *PCR Tubes* erfolgte. 7/8 SK-BR-3-Zellen konnten nach der Isolierung in dem Tube wiedergefunden werden.

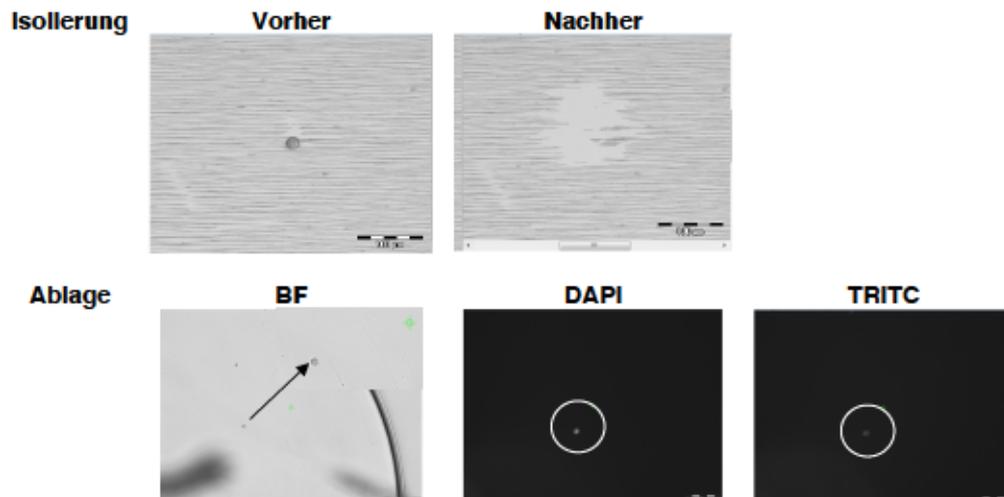


Abb. 26: Der Isolierungsvorgang einer SK-BR-3 Zelle und Ablagekontrolle in 15 mm PCR Tubes. Die obere Abb. stellt den Vorgang der Einzelzellisolierung mit der vorhandenen Einzelzelle vor der Aspiration (linkes Bild) und der fehlenden Einzelzelle nach der Aspiration (rechtes Bild) dar. Die untere Abb. stellt die Zelldetektion derselben aspirierten Einzelzelle auf der Ablage des PCR Tubes im BF-, DAPI- und TRITC-Kanal dar. BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; TRITC: Tetramethylrhodamine; μm : Mikrometer

Für die nachfolgende molekulargenetische Analysen der Einzelzellen ist ein möglichst geringes Probenausgangsvolumen notwendig, deshalb wurde die Isolierungswahrscheinlichkeit und Ablagewahrscheinlichkeit der SK-BR-3-Einzelzellen bei einem reduzierten Aspirationsvolumen von 0,005 μl getestet.

Der Aspirationsvorgang erfolgte mit einem Puffervolumen von 1 μl und einem Aspirationsvolumen von 0,005 μl . Die Ablage wurde als erfolgt verzeichnet, wenn ein Tropfen aus der Glaskapillare sich im Konus des *PCR Tubes* befunden hat. Mit dem minimierten Aspirationsvolumen von 0,005 μl konnte eine Aspirationsrate 33/34 SK-BR-3-Zellen isoliert werden. In keinem Isolierungsvorgang wurden > 1 Zelle aspiriert. Unter den Untersuchungsbedingungen konnten 20/33 Zellen auf der Ablage erfasst werden (s. Abb. 29 A). Am ehesten führte ein minimaler Versatz der Glaskapillare im Verlauf des Versuches

und die nicht komplett planen *PCR Tubes* im Ablagehalter zu der reduzierten Ablagewahrscheinlichkeit.

3.2.4 Optimierung der CD45-APC-Immunfluoreszenzfärbung

Einige Patientenproben zeigten im CellCelector-System im Cy5-Kanal mit einer Belichtungszeit von 500 ms eine nur noch eine schwache bis gar nicht darstellbare CD45-APC-Immunfluoreszenzfärbung. Diese Problematik zeigte sich bei den Cartridges unabhängig ihres Alters. Demnach war es notwendig für diese Cartridges eine CD45-Antikörper-Nachfärbung zu etablieren, mit der es möglich war die CD45-positiven Leukozyten von den epithelialen Zellen im Cy5-Kanal des CellCelector-Mikroskops zu unterscheiden.

Der APC konjugierte CD45-Antikörper sollte trotz der bereits besetzten CD45-Oberflächenrezeptoren durch die in der CellSearch-Analyse erfolgte CD45-Färbung in ausreichendem Maße an die Leukozyten binden. Es konnten zwei Verfahren für die Nachfärbung des CD45-Oberflächenmarkers etabliert werden. Für die auf einem Objektträger abgelegten Einzelzellen konnte die CD45-Nachfärbung auf dem Objektträger erfolgen, für die in einem *PCR Tube* abgelegten Einzelzellen wurde die CD45-Nachfärbung in der *Cartridge* vor der Zellisolierung entwickelt.

3.2.4.1 CD45-immunocytochemische Färbung auf dem Objektträger

Der Probeninhalt von CTC-negativen *Cartridges* wurde mit dem Cytospin-Verfahren auf Haftobjektträger überführt. Die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte nach dem im Methodenabschnitt beschriebenen Verfahren. Die CD45-Antikörper IgG Maus (Phycoerythrin-cyanin-670 nm) von Beckman Coulter und CD45 IgG Maus (Allophycocyanin) aus dem *CellSearchKit* ergaben kein positives Immunfluoreszenzsignal der Leukozyten in dem Cy5-Kanal des CellCelectors.

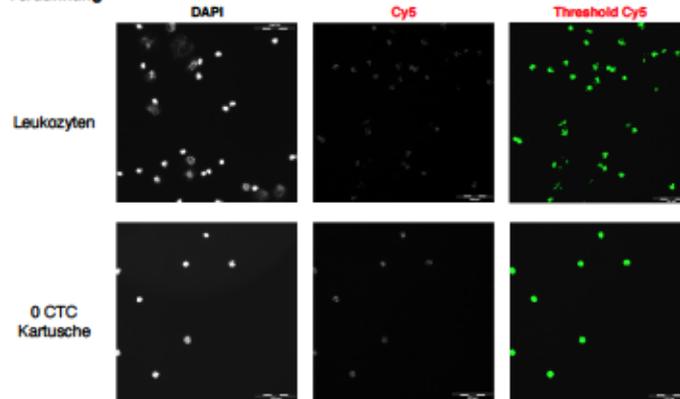
Der Antikörper anti-CD45 vom Klon MEM-28 zeigte mit der Konjugation Alexa Fluor 555 ein störendes Signal im TRITC-Kanal, das mit der anti-CK-Detektion der CTCs interferieren würde. Allein mit dem anti-CD45 (35-Z6) Alexa Fluor® 647-Antikörper zeigte sich ein positives Immunfluoreszenzsignal der Leukozyten im Cy5-Kanal.

Zur Optimierung des Färbeergebnisses wurden unterschiedliche Verdünnungen des anti-CD45 (35-Z6) Alexa Fluor® 647-Antikörpers und unterschiedliche Inkubationszeiten verglichen (s. Abb. 27).

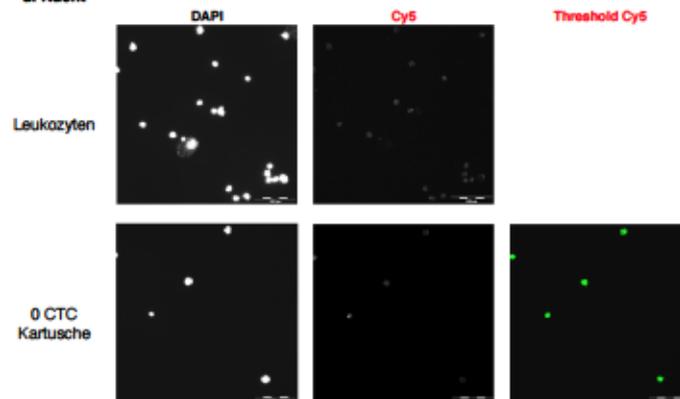
Anti-CD45 (35-Z6) Alexa Fluor® 647 Antikörper

1:10

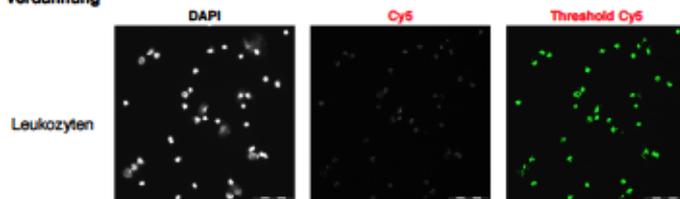
Verdünnung



1:10
Verdünnung
ü. Nacht



1:25
Verdünnung



1:25
Verdünnung
ü. Nacht

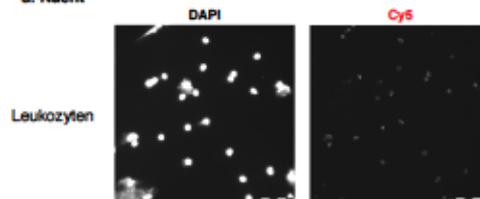


Abb. 27: Die Optimierung der Färbung von Leukozyten durch den anti-CD45 (35-Z6) Alexa Fluor® 647-Antikörper von Patientenproben. Es wurde eine Cartridge mit Leukozyten einer CTC-negativen Apheresatprobe verwendet. Testung der Fluoreszenzintensität im Cy5-Kanal des CellCelectors bei einer Antikörper-Verdünnung von 1:10 und 1:25 mit einer Inkubationszeit von 4 h und über Nacht. Darstellung der Färbintensität und die erfolgreiche Detektion der Leukozyten ohne Hintergrundfluoreszenzen durch manuelles Setzen der Thresholds im Bereich der stärksten Farbintensität im Cy5-Kanal. CTC: zirkulierende Tumorzelle; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; Cy5: Cyanin 5; CD45: cluster of differentiation 45; µm: Mikrometer

Mit einer Verdünnung von 1:10 und 1:25 konnten die Thresholds in dem Kanal so definiert werden, dass die Leukozyten im CellCelector detektiert werden konnten. Die Inkubation des Antikörpers über Nacht bewirkte ein minimal stärkeres Fluoreszenzsignal der Leukozyten. Zusätzlich zum CellCelector wurde die anti-CD45-Immunfluoreszenzfärbung der Leukozyten auch mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan 2 beurteilt. Dort zeigten sich gut darstellbare Signale für DAPI und den anti-CD45-Antikörper (s. Abb. 28).

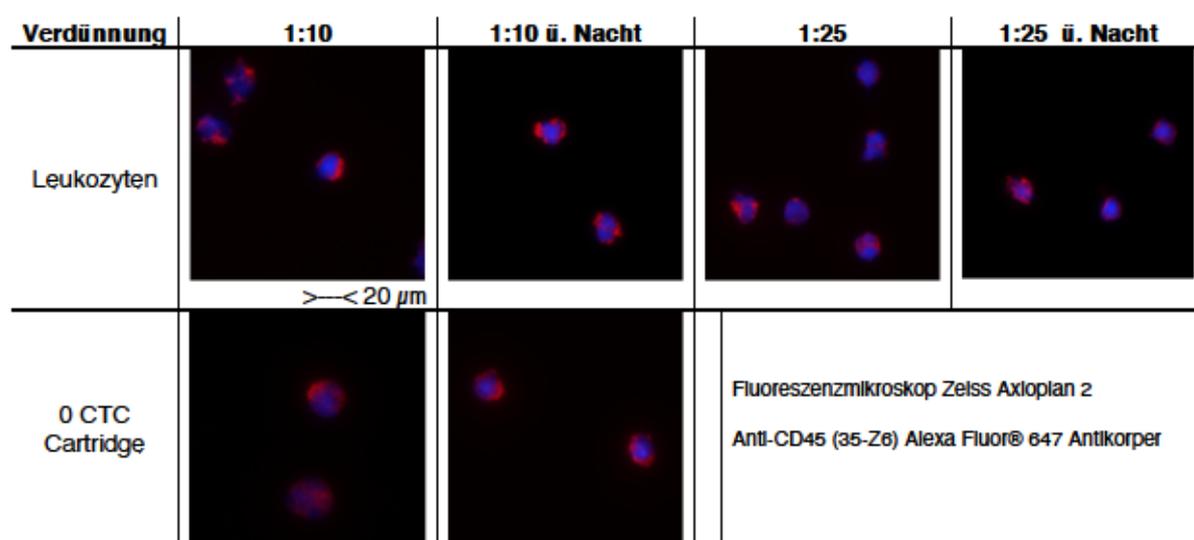


Abb. 28: Immunfluoreszenzfärbungen von Leukozyten mit dem anti-CD45 (35-Z6) Alexa Fluor® 647 Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan 2. Leukozyten aus einer Apheresatprobe wurden angefärbt. Die Bilder zeigen die Immunfluoreszenzfärbung von DAPI (blau) und CD45 (rot) der Leukozyten. CTC: zirkulierende Tumorzelle; CD45: cluster of differentiation 45

3.2.4.2 CD45-immunocytochemische Färbung in der CellSearch-Cartridge

Um bei der immunocytochemischen Färbung der Leukozyten in einer *Cartridge* ein Färbeprotokoll ohne hohen CTC-Verlust zu etablieren wurden SK-BR-3-Zellen des CellSearch- Systems zu Patientenproben von *Cartridges* ohne detektierte CTCs gespiked. Zur anti-CD45 Antikörper Nachfärbung, wurde der anti-CD45 (35-Z6) Alexa Fluor® 647-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20 verwendet.

In nächsten Versuchen wurde der Einfluss des *Blockingpuffers* auf die Adhärenz der Zellen in der *Cartridge* und die Auswirkung der Waschvorgänge in der *Cartridge* auf den Zellverlust getestet. Die *Cartridge* mit den zugesetzten SK-BR-3-Zellen wurden im CellSearch-System gescannt, danach wurde die Färbung durchgeführt und die *Cartridge* erneut im CellSearch-System gescannt. Nach der Überführung der Probe aus der *Cartridge* auf den Magnetobjektträger des CellCelectors, wurde diese dort wiederholt gescannt und danach zusätzlich die leere *Cartridge*. Der Zellverlust wurde nach dem Färbeporgang und nach der

Überführung des Probeninhalts der *Cartridge* auf den Magnetobjektträger festgehalten. Durch die Verwendung eines *Blockingpuffers* entstand ein Zellverlust von 75 %, nach der Durchführung von drei Waschvorgängen zeigte sich eine Verlustrate von 57 % und mit einer „*Quick and Dirty*“ Antikörperfärbung konnte keine Differenzierung der einzelnen Zellen durch einen starken Immunfluoreszenzhintergrund erfolgen.

Die Durchführung eines Waschganges nach der Antikörperinkubation zeigte ein gutes anti-CD45-Antikörper-Färbeergebnis im Immunfluoreszenzkanal mit einer Zellverlustrate von nahezu 0 % und einer Wiederfindungsrate der SK-BR-3-Zellen auf dem Magnetadapter des CellCelectors von 73 % (s. Abb. 29).

0 CTC Cartridge + SK-BR-3 Kontrollzellen	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Färbevariante	Blockingpuffer AK Inkubation ü. Nacht 3x Waschung	AK Inkubation ü. Nacht 3x Waschung	1x Waschung	1x Waschung
SK-BR-3 Zellen	157 Zellen	68 Zellen	120 Zellen	45 Zellen
Beurteilung	Zellverlust an der Cartridgewand	Zellverlust bei der Waschung	DAPI Signal vor der Färbung nicht intakt, kein Verlust von Zellen	
Detektion CellSearch				
Post Färbung	128 Zellen		120 Zellen	
Zellverlust (Färbung)	29 Zellen		0 Zellen	
Detektion CellCelector				
Objektträger	31 Zellen	29 Zellen		33 Zellen
Leere Cartridge	65 Zellen	0 Zellen		
Zellverlust	97 Zellen	0 Zellen		12 Zellen

Abb. 29: Die Darstellung des Zellverlustes bei der anti-CD45 Antikörper Nachfärbung in der Cartridge in Abhängigkeit vom Färbeprotokoll. Bei der Probe 1 wurde ein Blockingpuffer benutzt, der zu einer hohen Adhärenz der Probe an die Cartridge führte. Die Zellverlustrate der adhärenenten SK-BR-3-Zellen betrug 68 %. Bei der Probe 2 wurden drei PBS Waschvorgänge durchgeführt, die zu einer Verlustrate der Zellen im Färbevorgang von 57 % geführt haben. Durch die Durchführung eines Waschvorgangs und der Antikörperfärbung ohne Blockingpuffer konnte nach dem Färbevorgang in der Probe 3 eine Verlustrate von nahezu 0 % verzeichnet werden. Die Durchführung des gesamten etablierten Färbeprotokolls mit der Probe 4 zeigte eine durchschnittliche Zellverlustrate von 26 %. CTC: zirkulierende Tumorzelle; AK: Antikörper; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol

Zur Optimierung des Färbeergebnisses wurden Färbeversuche mit dem etablierten Protokoll mit einer Inkubationszeit von 2 und 4 h und einer Inkubationszeit über Nacht des anti-CD45 (35-Z6) Alexa Fluor® 647-Antikörpers durchgeführt und mit Hilfe des „*Threshold Menü*“ beurteilt. Eine Inkubation von 2 h führte zu keinem ausreichenden Färbeergebnis im Cy5-

Kanal. Die Inkubation des Antikörpers von 4 h zeigte bereits ein ausreichend gut detektierbares Signal im Cy5-Kanal des CellCelectors (s. Abb. 30).

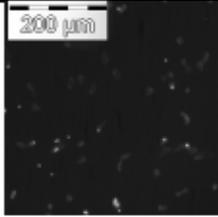
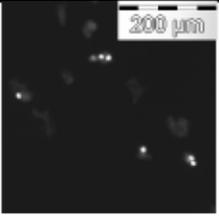
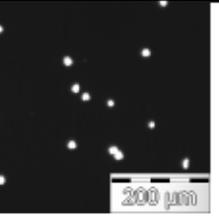
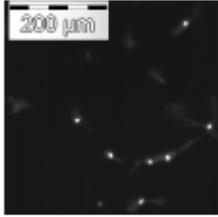
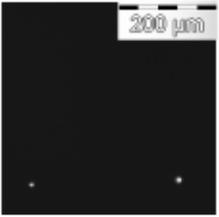
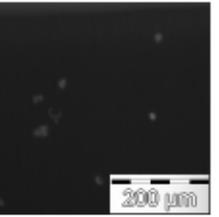
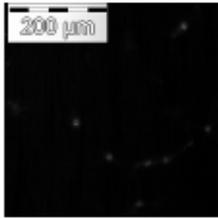
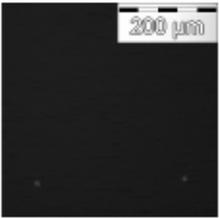
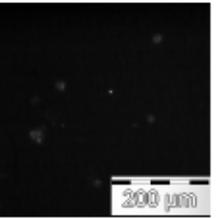
0 CTC Cartridge	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Färbevariante	AK Inkubation 4 h 1x PBS Waschung	AK Inkubation 4h 1x PBS Waschung	AK Inkubation ü. Nacht 1x PBS Waschung
Beurteilung	DAPI Signale bereits vor der Färbung ausgebleichen und nicht intakt	DAPI Signale bereits vor der Färbung ausgebleichen und nicht intakt	DAPI Signal nach der Färbung ausgebleichen
DAPI (prä Färbung)			
DAPI (post Färbung)			
Cy5 (post Färbung)			

Abb. 30: Die Intensität der Immunfluoreszenzsignale in Abhängigkeit von der anti-CD45-Antikörper-Inkubationszeit. Es wurden insgesamt drei Cartridges von Patientenblut ohne detektierte CTCs nach dem Färbeprotokoll mit unterschiedlicher Antikörperinkubation miteinander verglichen. Probe 1 und 2 zeigen das Färbeergebnis der Leukozyten nach einer Inkubationszeit von 4 h des Antikörpers mit einem Waschvorgang. Es zeigte sich ein ausreichend detektierbares Färbeverhalten im Cy5-Kanal. Eine Inkubationszeit des Antikörpers über Nacht der Probe 3 zeigte kein verbessertes Färbeverhalten der Leukozyten. Auffallend waren die unterschiedlichen Probenqualitäten der einzelnen Patientinnen. CTC: zirkulierende Tumorzelle; AK: Antikörper; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; Cy5: Cyanin 5; PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung; µm: Mikrometer

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass das Färbeergebnis, trotz der Anwendung des gleichen Färbeprotokolls, erheblich von der Qualität der Probe vor der Färbung abhing. Bei einigen Cartridges konnten vor dem Färbevorgang bereits nur noch ausgebleichene DAPI-Signale dargestellt werden, andere zeigten den Verdacht auf eine Lyse der Zellen auf Grund der netzartig verzogenen DAPI-Signalen und einige Proben wiesen bereits makroskopisch Ablagerungen der Ferrofluidpartikel an der Cartridgewand auf.

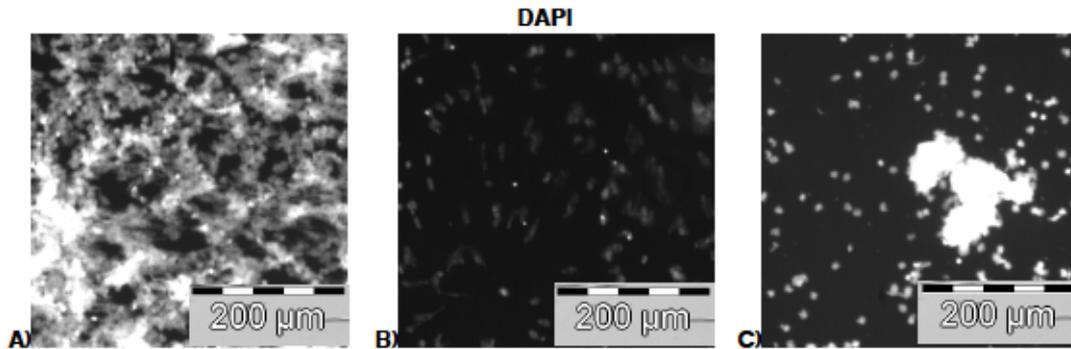


Abb. 31: Die Diversität der Patientenproben in der CellSearch-Cartridge vor dem Färbvorgang im DAPI-Kanal des CellCollectors. A) Patientenprobe mit einer Vernetzung der DAPI Signale. B) Patientenprobe mit einem ausgeblichenen DAPI-Signal. C) Patientenprobe mit Zellkonglomeraten im DAPI-Kanal. DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; µm: Mikrometer

3.3 Methodenentwicklung zur Einzelzellisolierung von Oberflächen

Durch die Aufarbeitung von Patientenproben mit der Anreicherung und Detektion von CTCs durch das CellSearch-System konnten EpCAM-positive CTCs in die Cartridges isoliert werden. Durch die Diversität der CTCs ist bereits bekannt, dass einige CTCs den Oberflächenmarker EpCAM nicht exprimieren. Zur Detektion von CTCs, unabhängig der Expression von Oberflächenmolekülen, aus dem Patientenblut wurden zwei Verfahren (VyCap- und ISET-Filter) zur Filterung der CTCs mittels Größenselektion benutzt. Diese Verfahren wurden für die Einzelzellisolierung mit dem CellCollector-System getestet und Arbeitsprotokolle erstellt.

3.3.1 Einzelzellisolierung des VyCap-Filters

Zur Testung des Workflows wurde die Suspension des *CellSearch Control Kits* des CellSearch Systems mit SK-BR-3-Zellen auf den VyCap-Filter aufgetragen. Diese Zellen sind bereits mit DAPI und CK Immunfluoreszenzfarbstoffen gefärbt und im DAPI- und TRITC-Kanal des CellCollectors detektierbar.

Für die Darstellung der SK-BR-3-Zellen in einer Fokusebene des Mikroskops im CellCollector wurde der VyCap-Filter in eine Petrischale geklebt und mit PBS befeuchtet. Zur Kalibrierung der Isolierungsparameter wurde in ersten Versuchen die Aspirationshöhe und das Aspirationsvolumen der Glaskapillare für eine optimale Einzelzellisolierung definiert. Die Höhe der Glaskapillare bei der Aspiration wurde bei den ersten Testversuchen genau auf die Filtermembran und das Aspirationsvolumen mit 1 µl definiert. Durch die Kalibrierung der Aspirationshöhe der Glaskapillare direkt über der Filtermembran wurde diese bei dem

Isolierungsvorgang durchstoßen. Teilweise wurden die Zellen unter die Filtermembran gedrückt und konnten nicht isoliert werden. Durch den Defekt der Filtermembran gingen Teilbereiche mit anderen SK-BR-3-Zellen für einen weiteren Isolierungsvorgang mit verloren (s. Abb. 32).

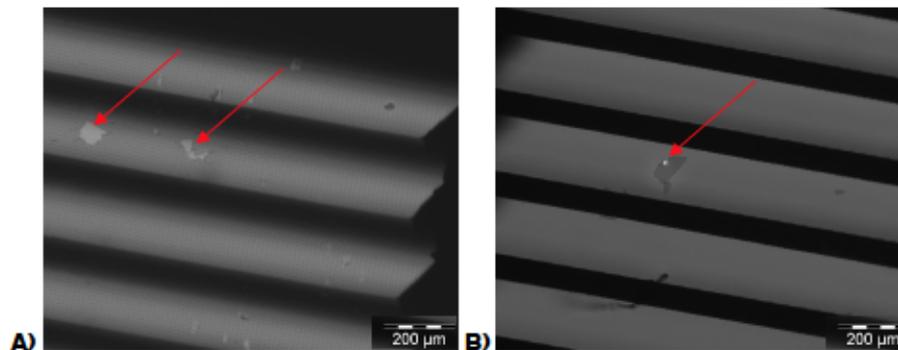


Abb. 32: Der Isolierungsvorgang von SK-BR-3-Kontrollzellen auf dem VyCap-Filter im BF-Kanal des CellCelectors. A) Darstellung der durchstochenen Filtermembran des VyCap-Filters nach der Zellisolierung durch die Glaskapillare des CellCelectors (Pfeile). **B)** SK-BR-3-Zellen nach frustriertem Isolierungsvorgang mit defektem Anteil der Filtermembran in der Fokusebene hinter dem VyCap-Filter (Pfeil). μm : Mikrometer

Durch diese Einstellung konnten 50 % der ausgewählten SK-BR-3-Zellen isoliert und in CupStrips abgelegt werden. Durch die Vergrößerung des Abstandes der Glaskapillare zum VyCap-Filter (0,5 mm über der Membran) in der Phase der Aspiration blieb die Filtermembran intakt, aber es konnten keine/wenige Zellen mit einem Aspirationsvolumen von 1 μl isoliert werden. Um eine Einzelzellisolierung, bei vergrößertem Aspirationsabstand von 0,5 mm zur Membran zu ermöglichen, wurde durch unterschiedliche Methoden versucht die Haftung der SK-BR-3-Zellen an dem VyCap-Filter zu minimieren. Der Filter wurde nacheinander mit PBS, Trypsin/EDTA und Accutase® eine Nacht inkubiert. Die Verwendung von Gemischen mit proteolytischer und kollagenolytischer Enzymaktivität zeigte keine Verbesserung der Isolierungsrate. Zur Testung des Einflusses eines erhöhten Aspirationsvolumen auf die Isolierungswahrscheinlichkeit wurden Einzelzellisolierungen mit unterschiedlichen Aspirationsvolumina 1-4 μl durchgeführt. Ab einem Aspirationsvolumen von 4 μl zeigte sich eine erfolgreiche Einzelzellisolierung der SK-BR-3-Zellen und es konnte auch eine erfolgreiche Ablage in die CupStrips erreicht werden (s. Abb. 33).

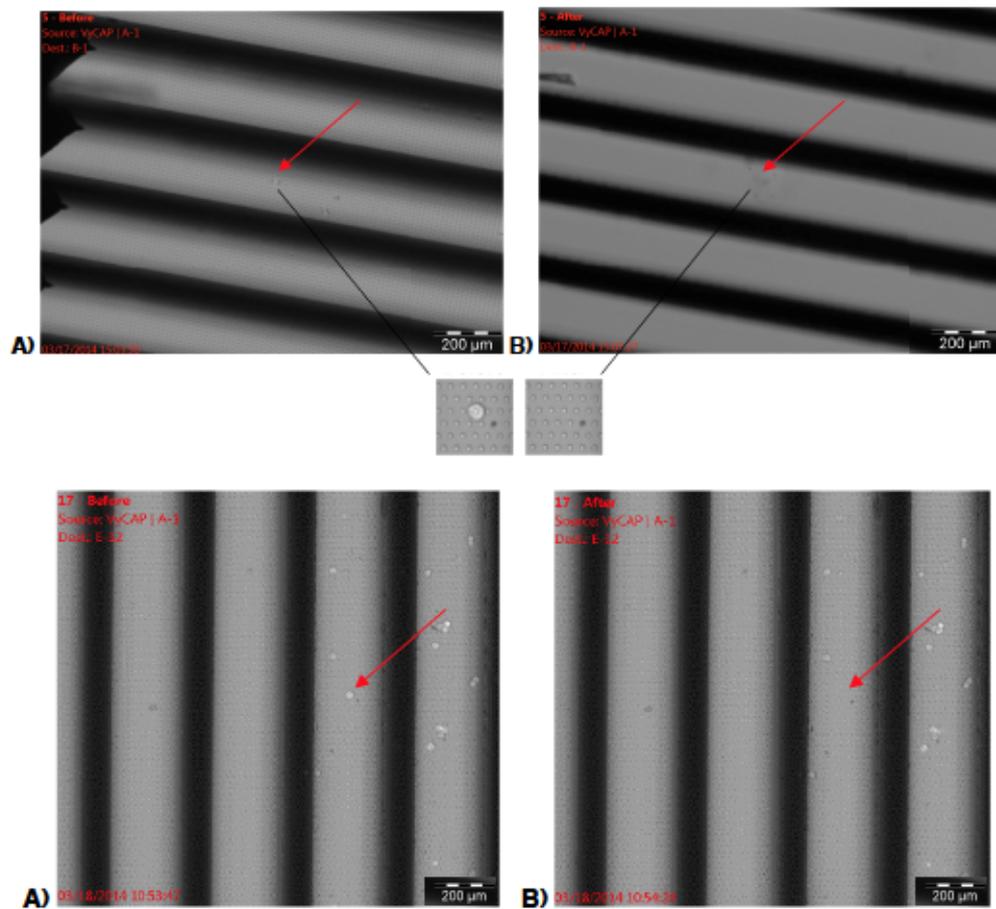


Abb. 33: Der Isolierungsvorgang einer SK-BR-3-Zellen von dem VyCap-Filter im BF-Kanal mit einem Aspirationsvolumen von 4 µl und einem Aspirationsabstand von 0,5 mm der Glaskapillare zu dem Filter. A) SK-BR-3-Zelle vor dem Isolierungsvorgang. B) VyCap-Filter nach der Aspiration der SK-BR-3-Zelle ohne Defekt der Filtermembran. Es zeigt sich ein leichter kurzzeitiger Versatz der Fokusebene der Filtermembran durch den Isolierungsvorgang. µm: Mikrometer

3.3.2 Einzelzellisolierung des ISET-Filters

Die Entwicklung einer Einzelzellisolierung von gefilterten CTCs des ISET-Filters durch den CellCelector erfolgte mit der Zelllinie SW620 eines Adenokarzinoms des Colons. Zur Herstellung einer einheitlichen Fokusebene unter dem Mikroskop des CellCelectors wurden verschiedene Fixiermedien getestet. Durch die Hydratation des ISET-Filters mit PBS und sofortiger Applikation dieses auf den Glasobjektträger zum Eintrocknen, anschließender Hinzugabe von Methylcellulose 1 % und erneuter Rehydratation mit PBS, konnte eine stabile Fokusebene erreicht werden.

Es erfolgte die Einstellung der Isolierungsparameter im CellCelector-System. Eine erfolgreiche Isolierung der haftenden Zellen auf dem ISET-Filter zeigte sich bei einem Aspirationsvolumen von 0,5 µl mit einer zusätzlichen „Scraping“ Einstellung und einer *Scrape-Distanz* von 0,03 µm des CellCelectors.

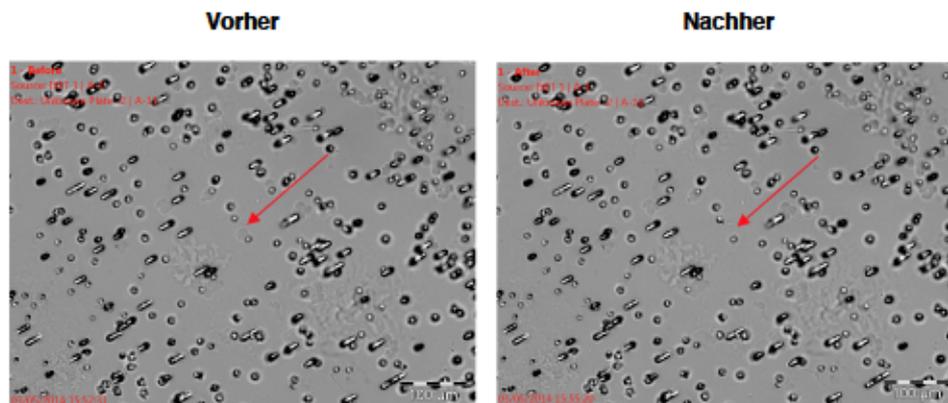


Abb. 34: Die Einzelzellisolierung einer gefilterten Colonzelllinie auf dem ISET-Filter. Die Darstellung einer Zelle vor und nach dem Isolierungsvorgang des CellCelectors im BF-Kanal. µm: Mikrometer

Für die Einzelzellisolierung von CTCs einer Blutprobe von dem ISET-Filter wurden zwei Spots des ISET-Filters mit der Colonzelllinie, nach der beschriebenen Methode im Material/Methoden Abschnitt, mit unterschiedlichen Immunfluoreszenzantikörpern gefärbt. Der Filter 1 wurde mit DAPI, C11-FITC und EpCAM-Alexa Fluor 594 und der Filter 2 mit DAPI, C11-FITC, CD49f-Alexa Fluor 594 gefärbt. Durch die Färbemethodik zeigten sich im Mikroskop des CellCelectors ein gut detektierbares Signal im DAPI-Kanal, aber eine eher schwache Färbung im FITC-Kanal (s. Abb. 35).

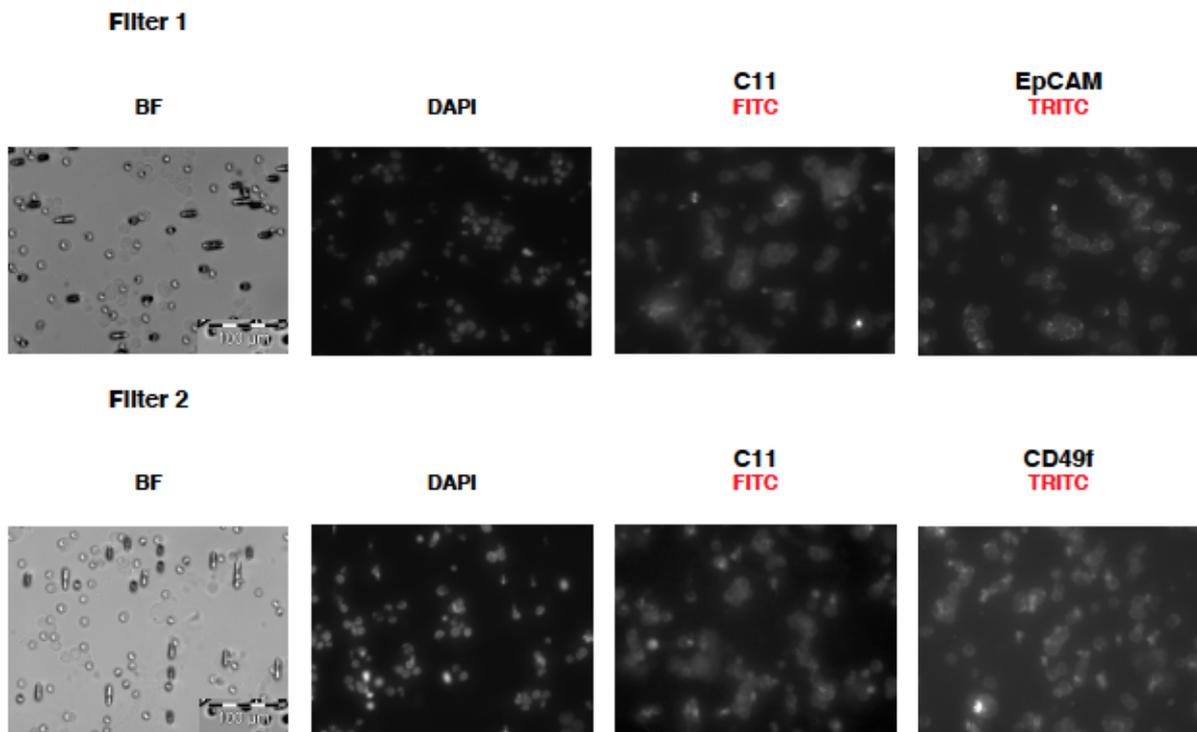


Abb. 35: Die Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung einer gefilterten Colonzelllinie auf dem ISET-Filter. Filter 1 wurde mit DAPI, C11-FITC und EpCAM-Alexa Fluor 594 gefärbt und Filter 2 mit DAPI, C11-FITC, CD49f-Alexa Fluor 594. BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; C11: pan-Cytokeratin Antikörper; FITC: Fluoresceinisothiocyanate; TRITC: Tetramethylrhodamine; CD49f: Integrin α -6; EpCAM: Epitheliales Zell-Adhäsions-Molekül; μ m: Mikrometer

3.4 Charakterisierung der Einzelzellen

Nach der Etablierung der Arbeitsschritte zur Einzelzellisolierung der EpCAM-positiven und -negativen CTCs, wurde die immunzytochemische und die genetische Charakterisierung der Einzelzellen angestrebt.

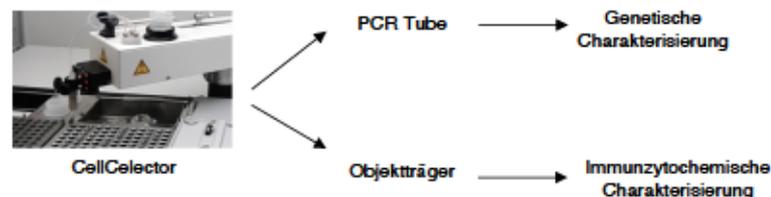


Abb. 36: Der Workflow zur Charakterisierung der Einzelzellen. Nach der Mikromanipulation durch den CellCelector wurden die Einzelzellen in ein PCR Tube zur genetischen oder auf einen Glasobjekträger zur immunzytochemischen Charakterisierung abgelegt.

PCR: Polymerase-Kettenreaktion

3.4.1 Immunzytochemische Charakterisierung von CapG

CapG ist ein Protein, welches mit einer starken Invasivität von Zellen assoziiert ist. Zur Analyse des Expressionsprofils von GapG auf vereinzelt CTCs wurden zunächst Vorversuche mit Zellen der BT-20 Zelllinie auf *Cytospins*, die eine schwache Expression von CapG haben, angefertigt. Die *Cytospins* wurden, wie im Material/Methoden Abschnitt beschrieben, mit dem Antikörper CapG gefärbt. Bei einer Verdünnung von 1:300 des CapG-Antikörpers konnte eine ausreichend intensive Färbung im Fluoreszenzmikroskop des CellCelectors und dem Zeiss Axioplan 2 dargestellt werden.

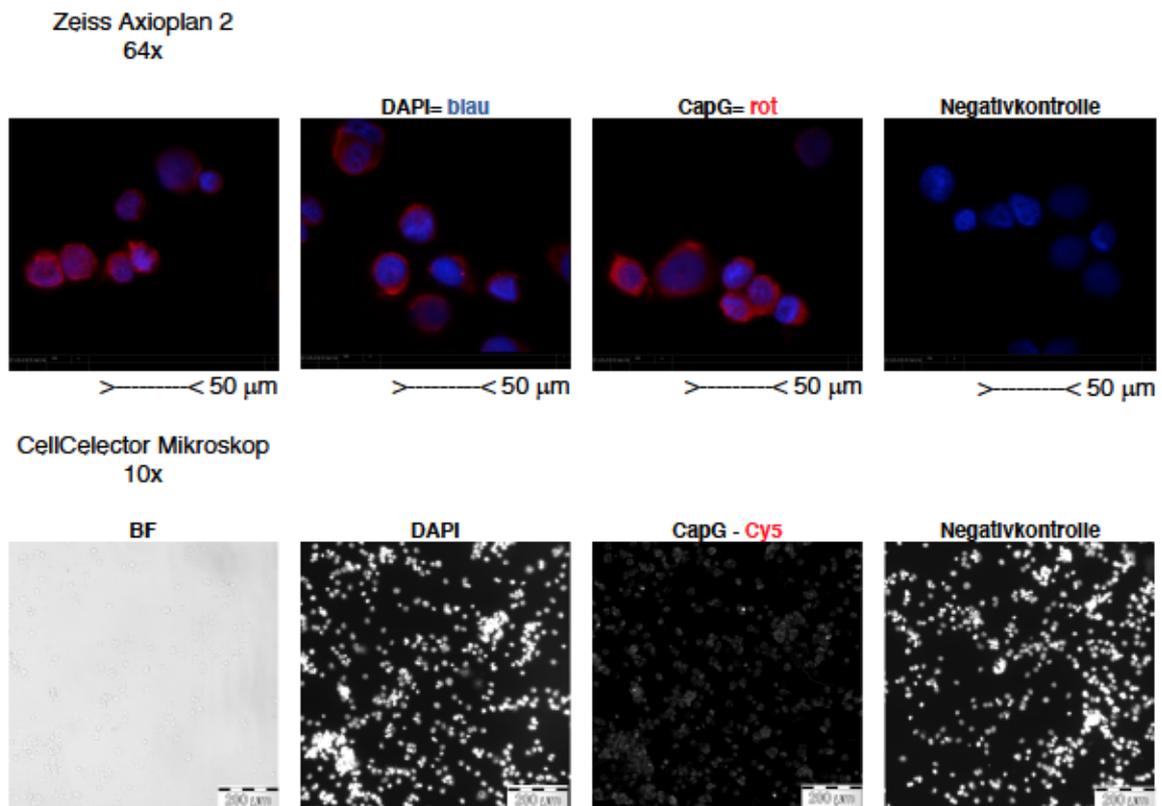


Abb. 37: Die Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von CapG bei BT-20 Zellen. Cytospins der Zelllinie wurde mit DAPI und CapG (1:300)-Alexa Fluor 647 angefärbt. Das Färbeergebnis wurde im Zeiss Axioplan 2 (DAPI=blau, CapG=rot) und im CellCelector Fluoreszenzmikroskop (Cy5-Kanal) betrachtet. In den Negativkontrollen konnte keine Autofluoreszenz dargestellt werden. DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; Cy5: Cyanin 5; CapG: Macrophage Capping Protein; µm: Mikrometer

Zur Bestimmung des Zellverlustes von abgelegten Einzelzellen auf dem Objektträger nach dem Färbevorgang wurden angefärbte SK-BR-3-Zellen mit DAPI (Nucleus= N), PE (Zytokeratin=CK) aus dem CellSearch-System mit dem CellCelector vereinzelt und auf Objektträger abgelegt. Die Zellzahl auf dem Objektträger wurde vor dem Färbevorgang notiert und anschließend mit der detektierten Zellzahl nach dem Färbevorgang verglichen. Vor der Färbung befanden sich 100 abgelegte SK-BR-3-Zellen isoliert auf verschiedenen Ablagekoordinaten von 4 Objektträgern. Nach dem Färbevorgang konnten 93 gefärbte SK-BR-3-Zellen auf den Objektträgern der Ablagekoordinaten erneut detektiert werden. Dies entspricht einer Detektionsrate von 93 % nach der immunzytochemische Färbung (s. Abb. 38).

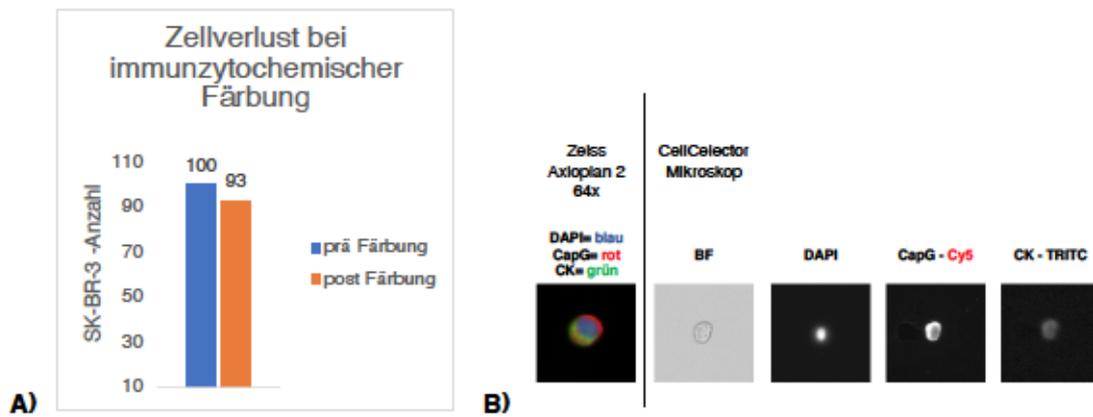


Abb. 38: Der Zellverlust bei der immunzytochemischen Färbung von abgelegten SK-BR-3-Zellen auf Glasobjektträgern mit dem CellCelector. A) Die Zellen wurden mit dem CellCelector vereinzelt und auf bestimmte Koordinaten der Ablage vereinzelt. Die Anzahl der abgelegten Zellen wurde mit der Anzahl der detektierten Zellen nach der Färbemethode verglichen. Es zeigte sich eine Zellverlustrate von 7 %. **B)** Die Darstellung einer gefärbten SK-BR-3-Zelle im Zeiss Axioplan 2 (DAPI=blau, CapG=rot, CK=grün) und CellCelector (BF-, DAPI-, Cy5- und TRITC-Kanal) Mikroskop. BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; Cy5: Cyanin 5; TRITC: Tetramethylrhodamine; CapG: Macrophage Capping Protein; CK: Zytokeratin

3.4.2 Molekulargenetische Charakterisierung von Einzelzellen

Als Downstream-Analyse können die CTCs, in Bezug auf ihr Genom, mit der *Whole Genome Amplification* (WGA) und durch die Sequenzierung charakterisiert werden. Durch Vorversuche mit Zelllinien wurde der Einfluss der Zellfixierung durch das CellSearch-System und die Mikromanipulation durch den CellCelector auf die DNA-Qualität der Einzelzellen getestet. Eine Blutprobe mit gespikten MCF7-Zellen wurde durch das CellSearch-System verarbeitet und danach durch den CellCelector mit einem Puffervolumen von 1 μ l in 15 mm *Tubes* vereinzelt. Mit zwei der vereinzelt MCF7-Einzelzellen wurde die WGA mit dem Ampli1 WGA-Kit (Silicon Biosystems) nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt. Für die Positivkontrollen wurde aufgereinigte Zelllinien-DNA (1 μ l gDNA MCF/T47D (50 ng/ μ l)) und die Negativkontrollen Wasser (1 μ l Ampli1™ QC H₂O) bei allen aufgeführten Versuchen mitgeführt. Außerdem wurde eine Kontrollprobe eines Isolierungsvorgangs ohne aspirierte Zelle mitgeführt, um die Kontamination von freier DNA in dem Zellmedium und in der Pufferlösung auszuschließen.

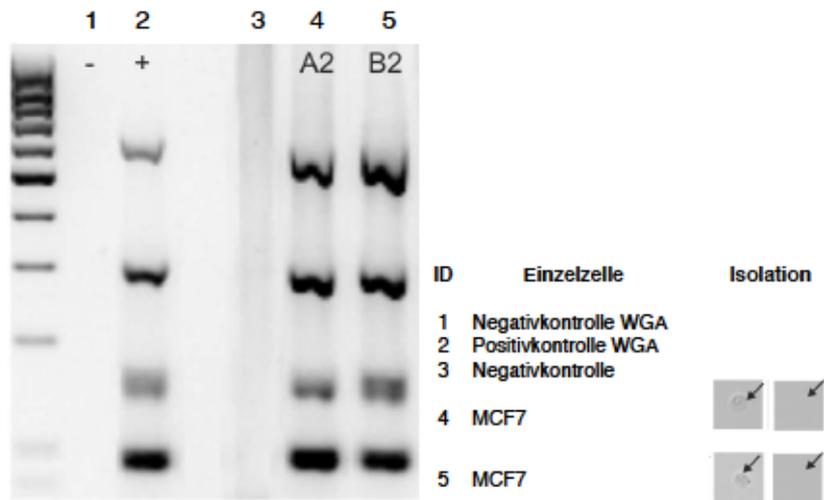


Abb. 39: Die Qualitätskontrolle der Whole Genome Amplification von MCF7-Einzelzellen. Eine maximale Bandenzahl 4/4 spricht für eine gute DNA-Qualität. WGA: Whole Genome Amplification

Diese PCR-basierte Untersuchung der DNA-Integrität bestätigte bei der Amplifikation der DNA einer MCF-7-Zelle das Vorhandensein von kurzen, mittleren und langen DNA-Fragmenten in der WGA-Bibliothek durch die vier Banden (s. Abb. 39).

3.5 Anwendung der Verfahrensprotokolle an Patientenproben in Suspension

3.5.1 Einzelzellisolierung EpCAM-positiver CTCs des CellSearch-Systems

Bereits zu Beginn der ersten Scanvorgänge der Cartridges mit Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen zeigten sich unter dem Mikroskop des CellCelectors eine große Variabilität in der Intensitätsstärke der Immunfluoreszenzfärbung. Anhand der Voruntersuchungen erschien das unterschiedliche Färbeverhalten der CTCs durch das CellSearch-System und die Intensität der Fluoreszenzfärbung im CellCelector-Mikroskop durch die Diversität der Patientenproben bedingt zu sein. Auf Grund der eingeschränkten weiteren Untersuchungsmöglichkeit mit den wertvollen Patientenproben ergaben diese Voruntersuchungen aber bereits ein vielversprechendes Ergebnis.

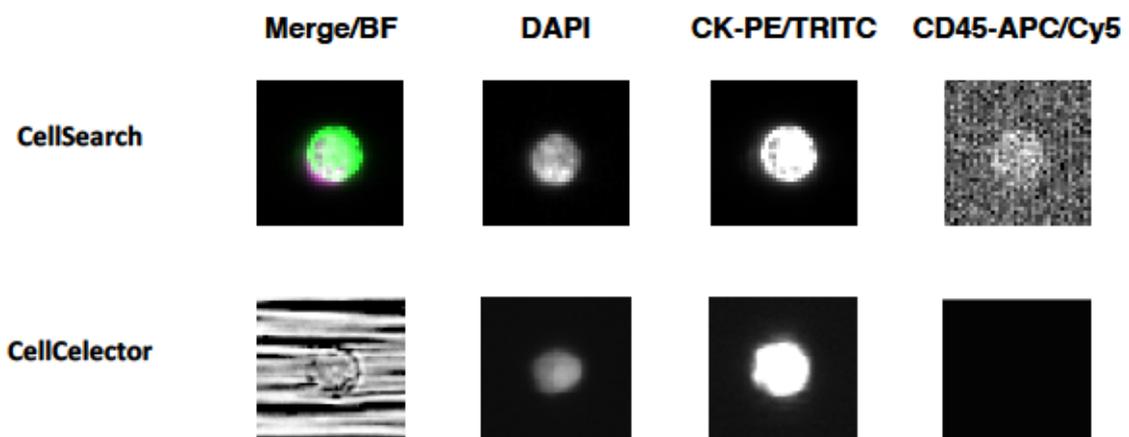


Abb. 40: Vergleichbarkeit der Bildgebung des CellSearch-Systems zum CellCelector-System im Hinblick auf die Morphologie und die Farbintensität der Signale der Einzelzellen in den Fluoreszenzkanälen. Die abgebildete detektierte CTC zeigte im CellSearch-System positive Signale im Merge, DAPI (Zellkern), PE (CK) und ein negatives Signal im APC (CD45)-Immunfluoreszenzkanal (oben). Die positiven Signale konnten im Bright field-, DAPI-, TRITC- und Cy5-Kanal mit dem Mikroskop des CellCelectors reproduziert werden (unten). BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; CK: Zytokeratin; PE: Phycoerythrin; TRITC: Tetramethylrhodamine; CD45: cluster of differentiation 45; APC: Allophycocyanin; Cy5: Cyanin 5

3.5.1.1 Detektionsrate von CTCs im CellSearch und CellCelector

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der Detektionsrate der Spiking-Experimente mit Zelllinien auf CTC-positive Patientenproben, wurden vier Patienten-Cartridges mit einer unterschiedlichen Anzahl von detektierten CTCs im CellTRACKS-Analyser anschließend mit dem CellCelector gescannt. Die positiven Bildereignisse wurden nach den Kriterien für

zirkulierende Tumorzellen (DAPIpos,CKpos,CD45neg) und anhand zusätzlicher Kriterien (Zelldurchmesser, Morphologie, Intensität der Färbung) verglichen und gezählt.

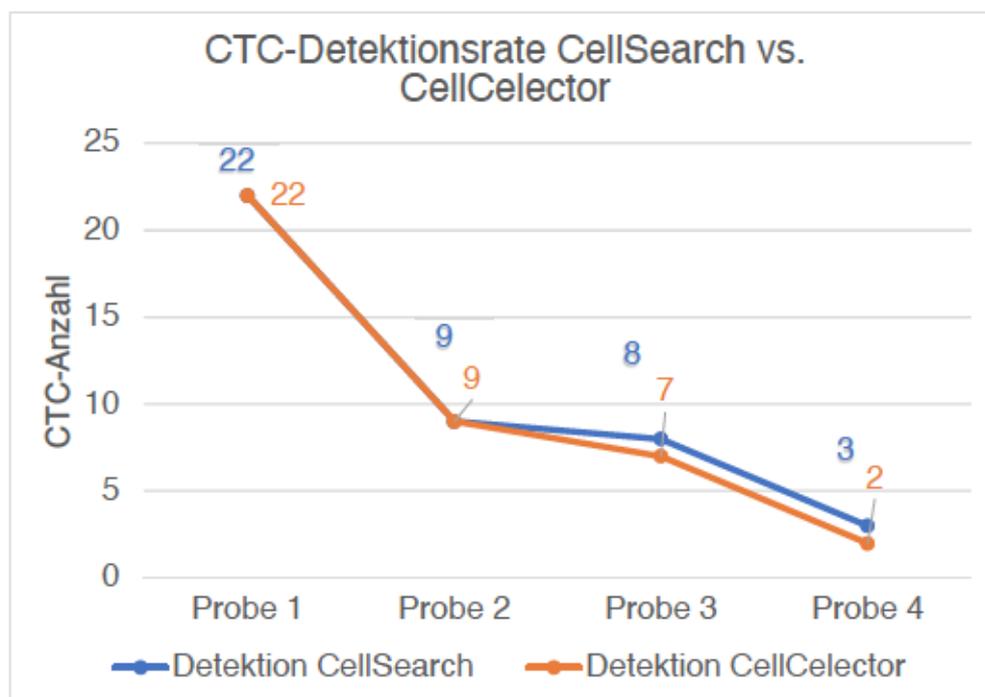


Abb. 41: Die Darstellung der Vergleichbarkeit der Detektionsrate von CTCs aus Patientenproben nach dem Scanvorgang im CellTRACKs-Analyzer (blau) und CellCelector (orange). Es wurden vier Cartridges mit Patientenproben jeweils in beiden Systemen auf die detektierte Anzahl der CTCs nach dem Scanvorgang überprüft. In der Probe 1 konnten alle 22 detektierten CTCs des CellTRACKs-Analyzers anschließend auch im CellCelector detektiert werden. Die Probe 4 verdeutlicht, dass bei einer raren Anzahl von 3 CTCs in einer Cartridge, durch den CellCelector, 2 CTCs detektiert werden konnten. Die Vergleichbarkeit konnte durchschnittlich durch eine 95 % CTC-Detektionsrate mit dem CellCelector dargestellt werden. Abbildung modifiziert nach (16). CTC: zirkulierende Tumorzelle

Die Detektionsrate der CTCs von Cartridges mit Patientenproben durch den CellCelector waren vergleichbar zu der des CellTRACKs-Analyzers. Durch die definierten Detektionsparameter der Fluoreszenzkanäle und die Kriterien zur Zellauswahl im Bildverarbeitungsmodus konnten aus allen Proben 95 % der CTCs in den Patientenproben durch den CellCelector wiedergefunden werden. Auch geringe Anzahlen an CTCs (z.B. 3 CTCs) konnten mit dem CellCelector detektiert werden. Anhand der Morphologie und der individuellen Immunfluoreszenzfärbung konnten die einzelnen Bildaufnahmen spezifischen Zellen in den beiden Scansystemen einander zugeordnet werden (s. Abb. 42) (16).

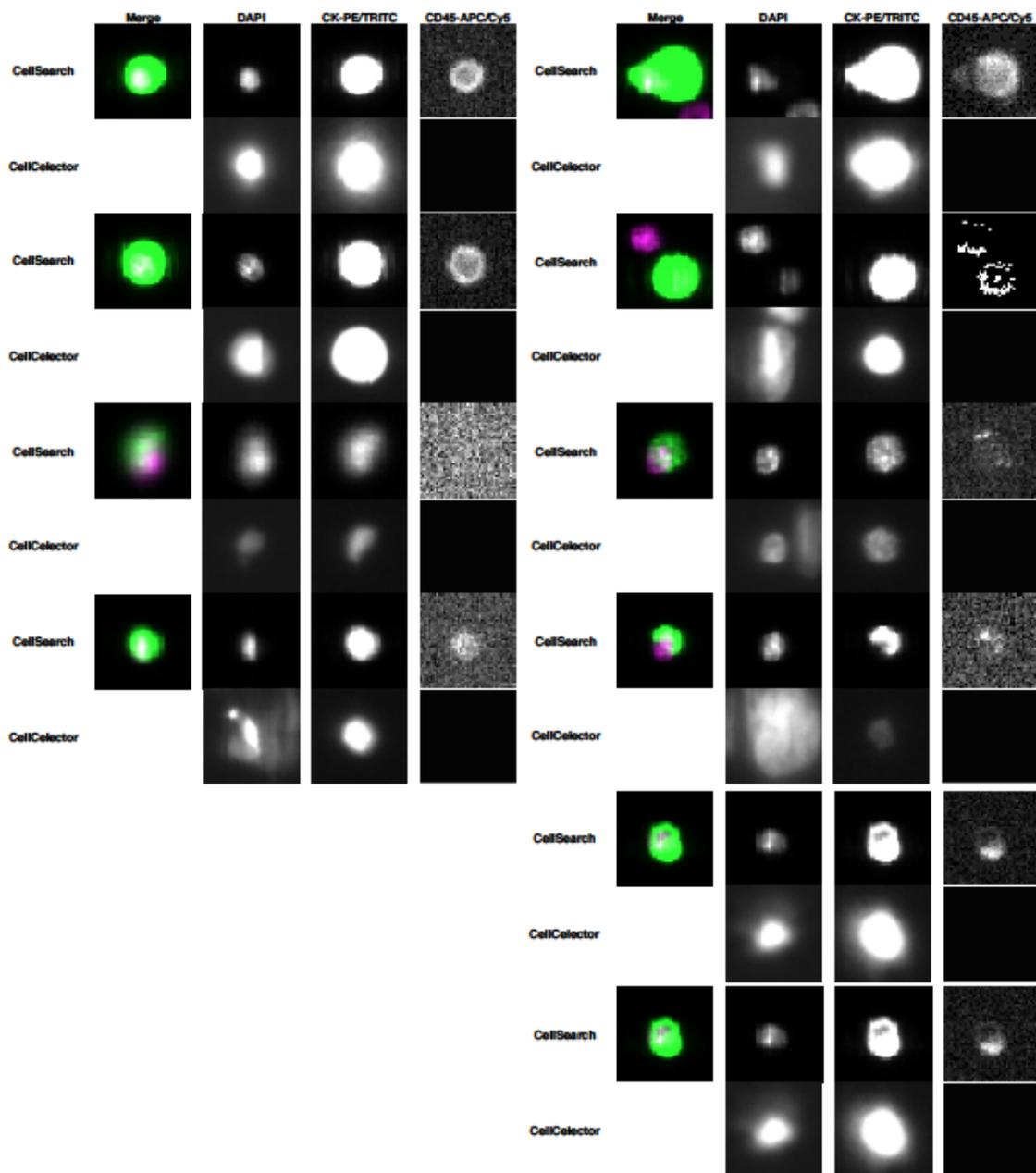


Abb. 42: Die Vergleichbarkeit der CTCs einer Patientenprobe einer Cartridge mit 9 detektierten CTCs im CellSearch-System und auch jeweils 9 detektierten CTCs im CellCelector-System. Darstellung derselben detektierten CTCs im Merge-, DAPI-, CK-PE/TRITC- und CD-45/Cy-5-Kanal jeweils im CellSearch- und CellCelector-System. Anhand der Morphologie und des Immunfluoreszenzmusters der Zelle konnten die CTCs spezifisch einander zugeordnet werden. BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; CK: Zytokeratin; PE: Phycoerythrin; TRITC: Tetramethylrhodamine; CD45: cluster of differentiation 45; APC: Allophycocyanin; Cy5: Cyanin 5

3.5.1.2 Einzelzellisolierung von CTCs durch den CellCelector

Die etablierte Methodik zur Einzelzellisolierung von Zellen wurde anschließend mit einer Patientenprobe mit 43 detektierten CTCs im CellSearch-System durchgeführt. Es wurden 35 CTCs durch den CellCelector nach der Probenüberführung detektiert. 29 CTCs konnten erfolgreich isoliert werden und 28 CTCs in die *PCR Tubes* vereinzelt abgelegt werden (s. Abb. 43 B).

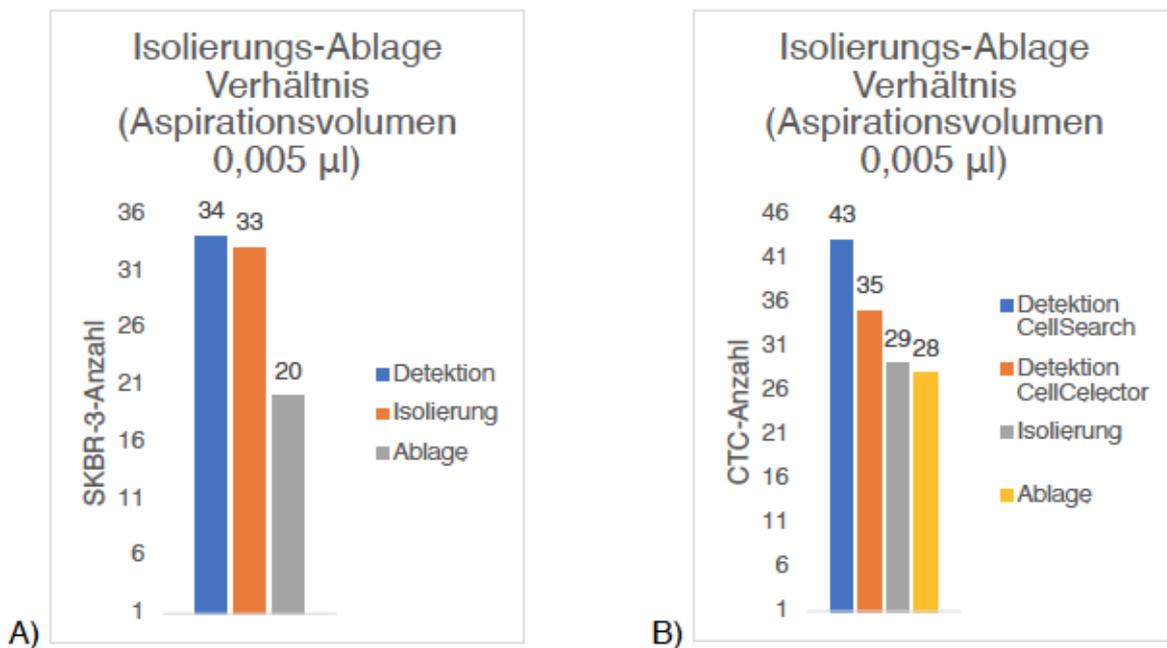


Abb. 43: Die Darstellung des Verhältnisses der isolierten Einzelzellen zur erfolgten Ablage in 15 mm PCR-Tubes mit einem Aspirationsvolumen von 0,005 µl. **A)** Versuchsdurchführung mit SK-BR-3-Kontrollzellen. Von 34 detektierten SK-BR-3-Zellen konnten 33 Zellen isoliert und 20 auf der Ablage wiedergefunden werden. **B)** Einzelzellisolierung von CTCs einer Cartridge mit 43 detektierten CTCs im CellSearch-System. 81 % der CTCs konnten durch den CellCelector nach der Überführung detektiert werden, davon konnten 83 % als Einzelzellen isoliert und 96 % von den Zellen auch in PCR Tubes als Tropfen abgelegt werden. CTC: zirkulierende Tumorzelle; µl: Mikroliter

3.5.2 Einzelzellisolierung von CTCs aus Patientenproben

Insgesamt stand ein Kollektiv von 32 Patientinnen aus der DETECT- und der AUGUSTA-Studie zur Verfügung.

Für alle diese Patientinnen konnten CTCs in jeweils verschiedener Anzahl mittels CellSearch-Analyse nachgewiesen werden. Aus den *Cartridges* der CellSearch-Analysen dieser Patientinnen konnten von 1038 detektierten CTCs im CellSearch-System 872 CTCs erfolgreich in *PCR Tubes* oder auf Objektträgern als Einzelzellen isoliert bzw. abgelegt werden. Die Detektionsrate der CTCs mit dem CellCelector betrug durchschnittlich 84 %, die Isolierungs- bzw. Ablagerate der detektierten Zellen nahezu 98 % (s. Abb. 44).

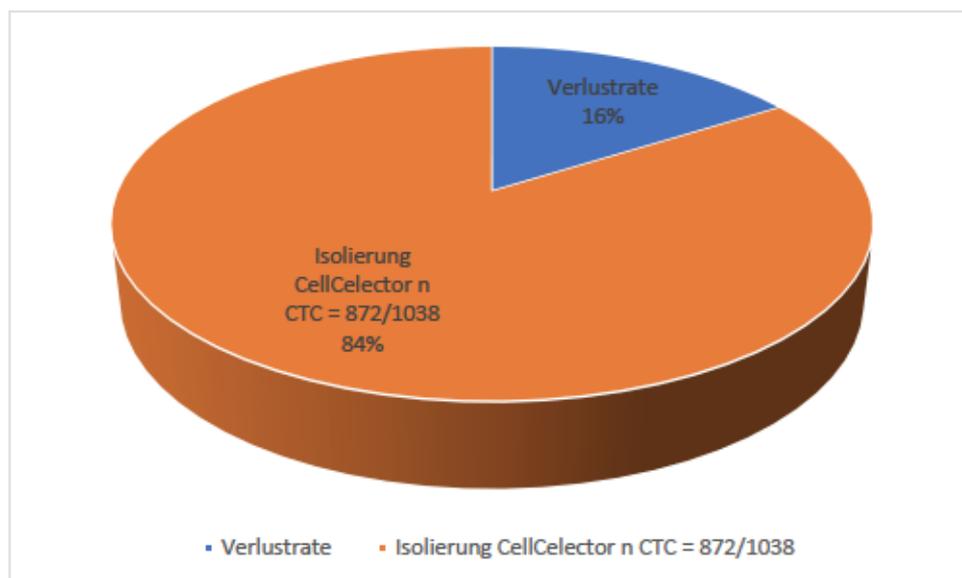


Abb. 44: Die Darstellung der isolierten Einzelzellen aus Patientenproben. Aus 32 Cartridges mit unterschiedlicher Anzahl an CTCs, konnten 1038 CTCs durch das CellSearch-System detektiert werden. Die Detektionswahrscheinlichkeit der CTCs des CellCelectors lag durchschnittlich bei 84 % und es konnten 98 % der detektierten CTCs im CellCelector-System in PCR Tubes oder auf Objektträger vereinzelt werden. Dies entspricht einer Gesamtzahl von 872 CTCs. CTC: zirkulierende Tumorzelle; %: Prozent

Herausforderungen an das Verfahrensprotokoll bei der Aufarbeitung von Patientenproben waren die niedrige CTC-Anzahl von 1-10 und die Variabilität der Probenqualität der Immunfluoreszenzfärbungen und Ferrofluidpartikel.

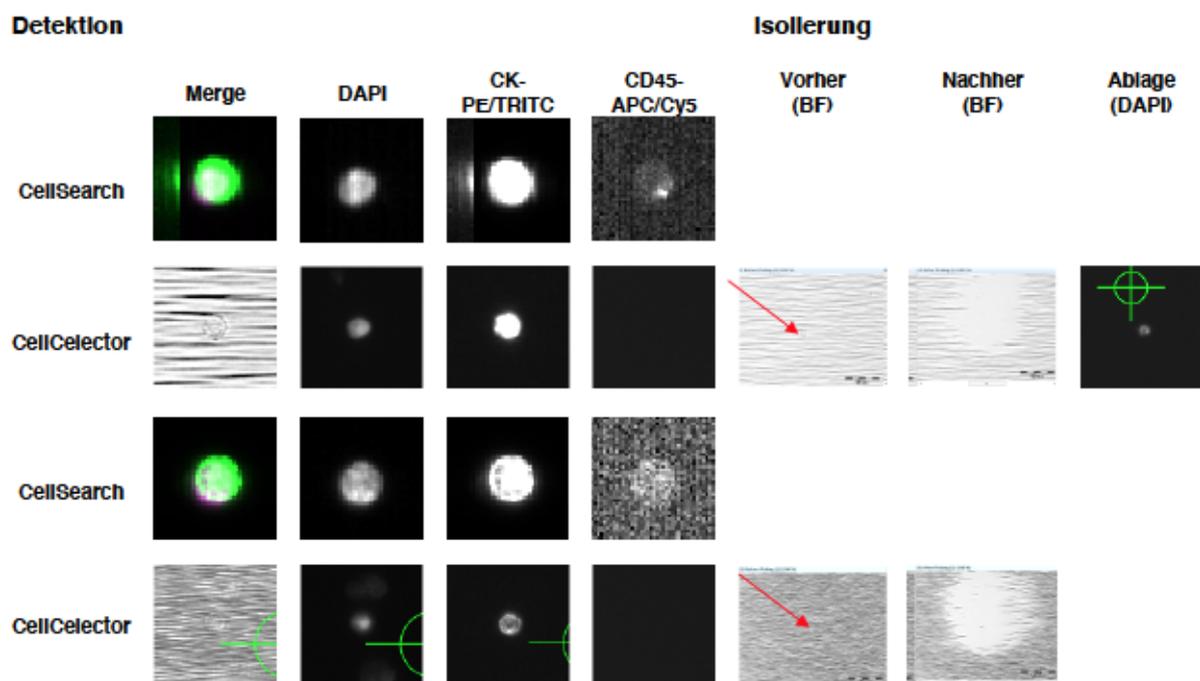


Abb. 45: Die Aufarbeitung einer Cartridge mit Patientenblut und 4 detektierten CTCs durch das CellSearch-System. Mit dem CellCelector-System wurden zwei CTCs wiedergefunden und erfolgreich isoliert (linker Bildabschnitt). Zur Bestätigung der gelungenen Aspiration dieser Einzelzellen (rechter Bildabschnitt) und der erfolgreichen Ablage erfolgte bei der ersten Zellisolierung eine mikroskopische Ablagekontrolle im DAPI-Kanal. BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; CK: Zytokeratin; PE: Phycoerythrin; TRITC: Tetramethylrhodamine; CD45: cluster of differentiation 45; APC: Allophycocyanin; Cy5: Cyanin 5; μm : Mikrometer

3.5.3 Einzelzellisolierung von CTCs aus Apheresatproben

Apheresatproben bieten die Möglichkeit, mit der gleichzeitigen Herausforderung einer zusätzlich hohen Anzahl an Leukozyten, ein höheres Blutvolumen auf zirkulierende Tumorzellen zu untersuchen.

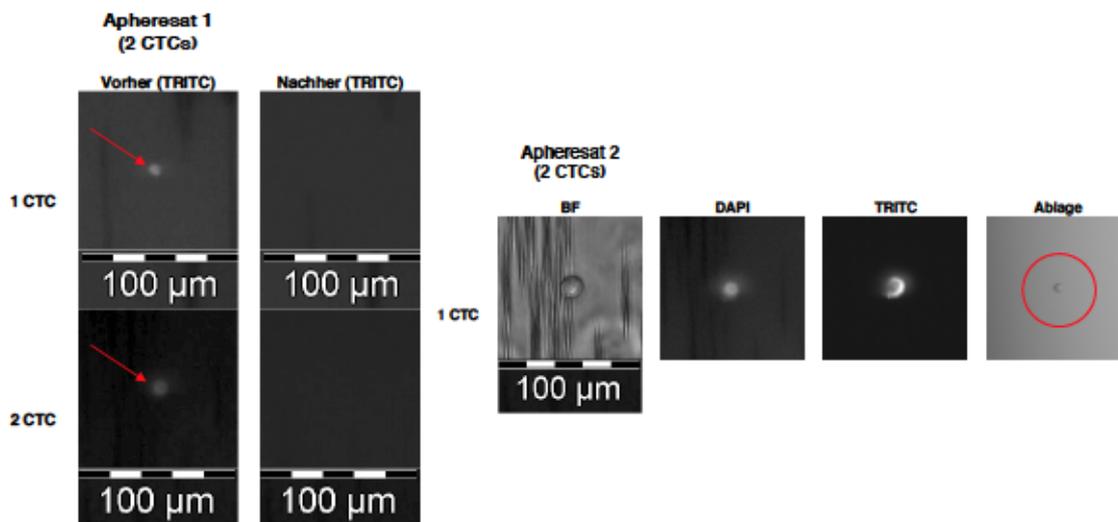


Abb. 46: Die Illustration der Einzelzellisolierung von CTCs aus Apheresatproben des CellSearch-Systems. In der Apheresatprobe 1 konnten 2/2 CTCs und in der Apheresatprobe 2 1/2 CTCs detektiert und isoliert werden. Darstellung der Zellisolierung mit der Bilddokumentation vor und nach der Einzelzellisolierung (Apheresatprobe 1). Darstellung der CTC aus der Apheresatprobe 2 im BF-, DAPI- und TRITC-Kanal. Zusätzliche bildliche Darstellung der mikroskopischen Ablagekontrolle im PCR CupStrip im BF-Kanal. CTC: zirkulierende Tumorzelle; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; TRITC: Tetramethylrhodamine; µm: Mikrometer

3.5.4 CD45-immunocytochemische Färbung von Patientenproben

Bei der Anwendung der etablierten immunocytochemischen Färbung auf Patientenproben wurde eine *Cartridge* mit 37 detektierten CTCs durch das CellSearch-System mit oben genanntem Färbeprotokoll aufgearbeitet. Es konnten 8 CTCs durch das CellCelector-System detektiert und 7 davon isoliert werden. Dies entsprach einem Zellverlust der CTCs durch das Färbeprotokoll von 78 %, einer Detektionsrate von 22 % und einer Isolierungsrate von 88 %. Diese hohe Verlustrate der CTCs nach dem Färbvorgang ist am ehesten durch eine bereits makroskopisch zu erkennende Ablagerung von Ferrofluidpartikeln an der Cartridgeinnenwand mit der Adhäsion von CTCs zu erklären.

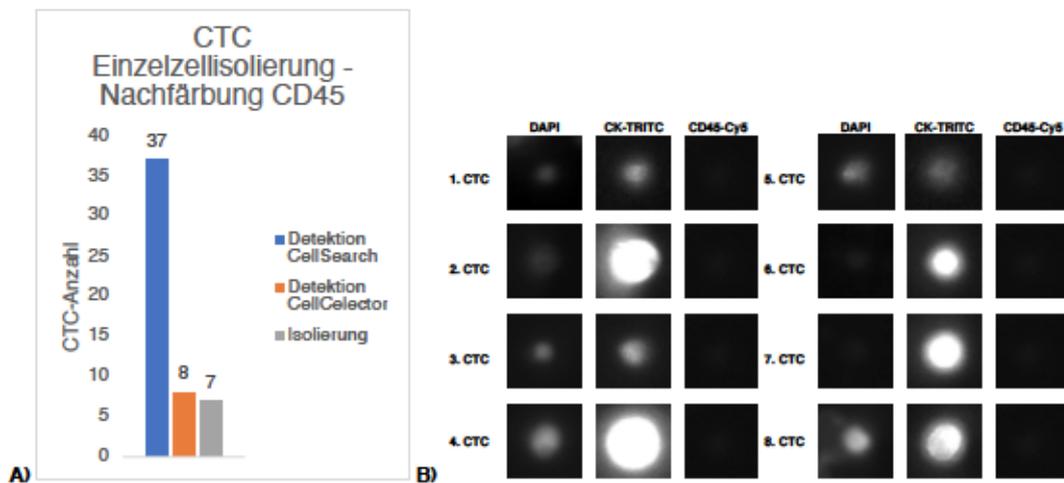


Abb. 47: Die anti-CD45-Antikörper-Färbung einer Cartridge mit 37 CTCs.

A) Durch das CellSearch-System konnten 37 CTCs in der Cartridge detektiert werden. Nach der anti-CD45-Färbung, gemäß dem etablierten Protokoll, konnten 8 CTCs durch den CellSelector detektiert und 7 CTCs isoliert werden. Dies entspricht einer Isolierungsrate von (7/37) 19 %. **B)** Illustration der 8 detektierten CTCs im CellSelector in den Fluoreszenzkanälen DAPI, TRITC und Cy5. Die DAPI-Signale sind in der Bilddokumentation nicht gut darstellbar. CTC: zirkulierende Tumorzelle; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; CK: Zytokeratin; TRITC: Tetramethylrhodamine; CD45: cluster of differentiation 45; Cy5: Cyanin 5

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Detektions- und Isolierungsraten nach dem Färbeprotokoll von CTCs aus einem größeren Patientenkollektiv mit unterschiedlicher Probenqualität wurden 20 Cartridges verwendet. Von 312 detektierten CTCs im CellSearch-System konnten 283 CTCs durch den CellSelector, nach dem Färbevorgang, detektiert werden. Die Detektionswahrscheinlichkeit lag somit bei durchschnittlich 90,7 %. 150 CTCs konnten erfolgreich in *PCR Tubes* oder auf Objektträger als Einzelzellen isoliert werden. Die Isolierungswahrscheinlichkeit der detektierten Zellen lag bei 53 % (s. Abb. 48).

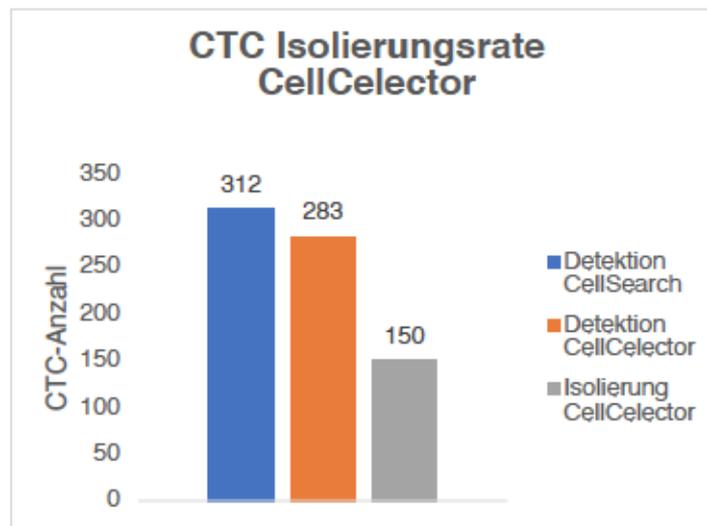


Abb. 48: Die Darstellung der detektierten und isolierten Einzelzellen aus Cartridges mit Patientenproben nach der anti-CD45-Antikörper-Färbung. Aus 20 Cartridges konnten 312 CTCs durch das CellSearch-System detektiert (blau) und 283 CTCs durch das CellCelector-System isoliert (orange) werden. Nach einem Färbe- und Pipettierverlust der CTCs von 9 % konnten 53 % der detektierten CTCs (grau) im CellCelector-System in PCR Tubes oder auf Objektträger vereinzelt werden. Dies entspricht einer Gesamtzahl von 150 CTCs. CTC: zirkulierende Tumorzelle

Grund für die niedrigere Isolierungswahrscheinlichkeit war bei einigen Cartridges die Qualität der Patientenproben. Es zeigten sich bei 6/20 Cartridges bereits makroskopische Ablagerung von Ferrofluidpartikeln an der Cartridgeinnenwand. Am ehesten ist die Adhäsion von CTCs in der Cartridge für die niedrigere Detektionsrate im CellCelector nach dem Pipettiervorgang verantwortlich. In solch einer makroskopisch auffälligen Cartridge konnten von 34 detektierten CTCs im CellSearch-System 16 CTCs durch den CellCelector detektiert werden. Bei einigen Probenaufarbeitungen kam es zu Schwierigkeiten des Bildverarbeitungssystems des CellCelectors, sodass Patientenproben zwei Mal unter dem Mikroskop des CellCelectors gescannt werden mussten. Diese zeitliche Verzögerung von der CTC-Detektion bis zur CTC-Isolierung führte zum Austrocknen der Patientenprobe mit einer verstärkten Adhäsion der Zellen auf dem Objektträger des Magnetadapters im CellCelector. Aus einer Cartridge konnten daher von 73 detektierten CTCs im CellSearch-System, einer anschließenden Detektion von 64 CTCs im CellCelector, nur 10 CTCs isoliert werden.

3.6 Anwendung der Verfahrensprotokolle an Patientenproben v. Oberflächen

3.6.1 Einzelzellisolierung EpCAM-negativer CTCs des VyCap-Filters

Zur Testung der Einstellungsparameter für die Einzelzellisolierung von CTCs aus Patientenproben auf dem VyCap-Filter wurde der Suspensionsüberstand einer aufgearbeiteten Patientenprobe des CellSearch-Systems nach dem beschriebenen Filter- und Färbeprotokoll aufgearbeitet. Die Färbung erfolgte mit DAPI, dem Pan-Zytokeratin-Antikörper (C11)-FITC und anti-CD45-Antikörper-Alexa Fluor 647. Der VyCap-Filter wurde in eine Petrischale geklebt und mit PBS befeuchtet.

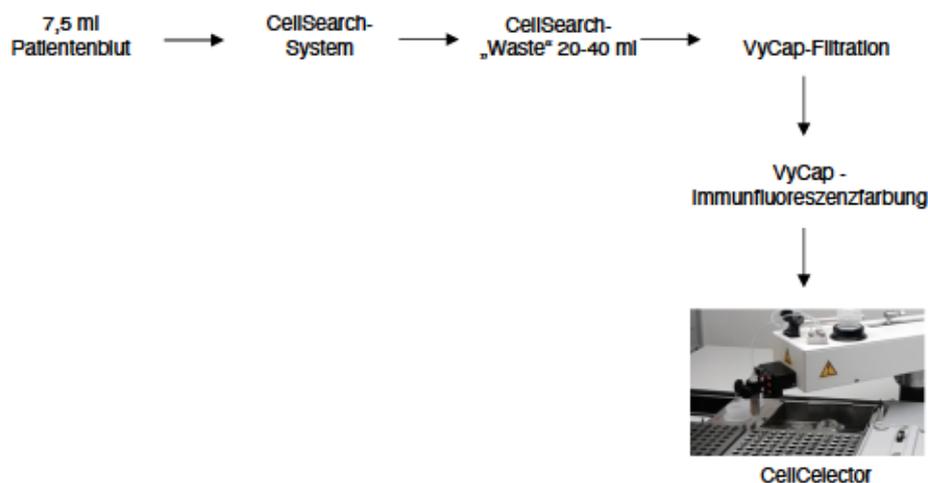


Abb. 49: Der Workflow zur Einzelzellisolierung von EpCAM-negativen CTCs. 7,5 ml Patientenblut wurden über das CellSearch-System verarbeitet. Die Überstandsprobe („Waste“) von ca. 20-40 ml den nicht angereicherten und isolierten Blutzellen wurde im CellSearch-System aufgefangen. Diese Restprobe wurde über den VyCap-Filter filtriert und die isolierten Blutzellen auf dem Filter angefärbt. Nach dem Scan des Filters mit dem Fluoreszenzmikroskop des CellCelectors und der Auswahl der CTCs, erfolgte die Einzelzellisolierung und die Ablage der CTCs in CupStrips oder auf Objektträger.

Bei der ersten Sichtung des Filterergebnisses des VyCap-Filters fiel im DAPI-Kanal eine deutliche Hintergrundfluoreszenzfärbung auf, wodurch eine Detektion von Einzelzellen nicht möglich war. Um den Einfluss mehrerer Waschvorgänge mit PBS auf die Hintergrundfluoreszenz zu testen wurde eine Überstandsprobe einer Apheresatprobe des CellSearch-Systems nach dem Protokoll mit dem VyCap-Filter gefiltert und gefärbt. Der VyCap-Filter wurde zunächst nach der Färbung ohne mehrfache PBS-Waschung unter dem Mikroskop des CellCelectors betrachtet. Im DAPI-Kanal konnte eine deutliche undefinierte Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden. Es erfolgten deshalb weitere Waschvorgänge des VyCap-Filters mit PBS und der Filter wurde in eine Petrischale geklebt. Danach wurde

das Färbeergebnis unter dem Mikroskop ohne und mit der Hinzugabe von PBS auf den Filter beurteilt. Im BF-Kanal konnte der Filter mit dem Gebrauch von PBS klarer im Mikroskop dargestellt werden und im DAPI Fluoreszenzkanal zeigte sich eine abgrenzbarere Immunfluoreszenzfärbung der Zellen (s. Abb. 50).

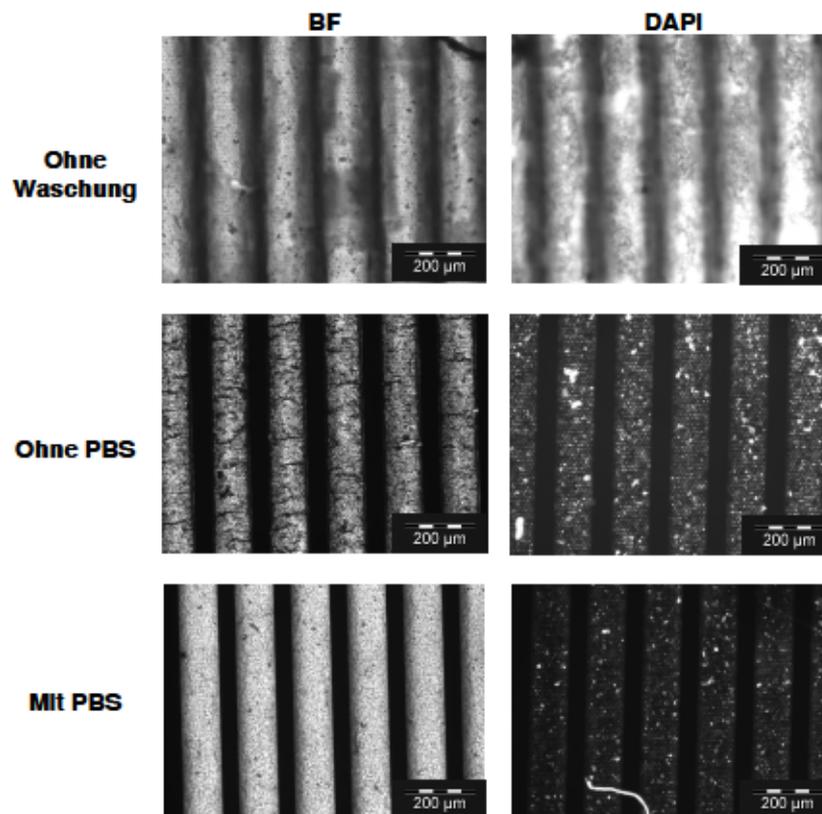


Abb. 50: Der VyCap-Filter mit einer filtrierten Apheresatprobe nach der Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI, anti-C11 und anti-CD45 im BF- und DAPI-Kanal des Mikroskops im CellCelector. Vergleich der Sichtverhältnisse der Immunfluoreszenzfärbung ohne einen Waschvorgang nach der Färbung, mit und ohne der Hinzugabe von PBS in die Petrischale. BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung

Nach dem Scan der filtrierten und angefärbten Überstandssuspension der Apheresatprobe auf dem VyCap-Filter in dem CellCelector konnten 11/11 Zellen mit den erforderlichen CTC-Kriterien (DAPIpos,FITCpos,Cy5neg) durch die bereits etablierten Isolierungsparametern des CellCelectors von dem VyCap-Filter isoliert und auf Objektträger abgelegt werden (s. Abb. 51).

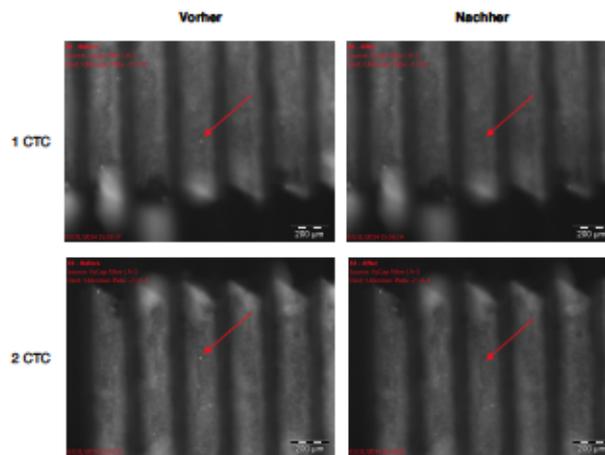


Abb. 51: Bildliche Demonstration der Einzelzellisolierung von 2/11 EpCAM-negativen Zellen mit den Zusatzkriterien DAPIpos, C11pos und CD45neg einer Überstandsprobe des CellSearch-Systems. Filterung und Anreicherung durch den VyCap-Filter. Die Zellisolierung erfolgte im FITC-Kanal des CellCelector-Systems. Insgesamt konnten 11/11 CTCs isoliert werden. CTC: zirkulierende Tumorzelle; µm: Mikrometer

Bei der Ablagekontrolle konnten 9/11 Zellen auf dem Objektträger wiedergefunden werden. Dies entspricht einer Wiederfindungsrate von 82 % (s. Abb. 52).

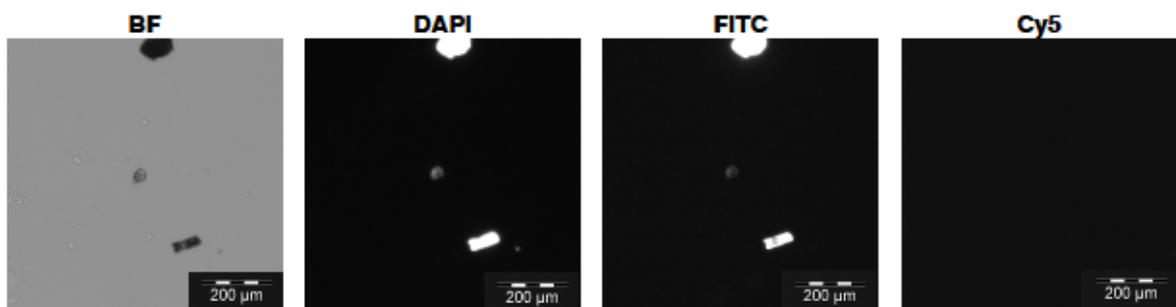


Abb. 52: Beispiel einer Ablagekontrolle der isolierten EpCAM-negativen CTC von dem VyCap-Filter einer Apheresatprobe auf einem Objektträger durch den CellCelector. Die CTC ist im BF-, DAPI- und FITC-Kanal mit einem positivem Signal dargestellt. Im Cy5-Kanal zeigte die Zelle keine Färbung (CD45). BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; FITC: Fluoresceinisothiocyanate; Cy5: Cyanin 5

3.6.2 Einzelzellisolierung von CTCs des ISET-Filters

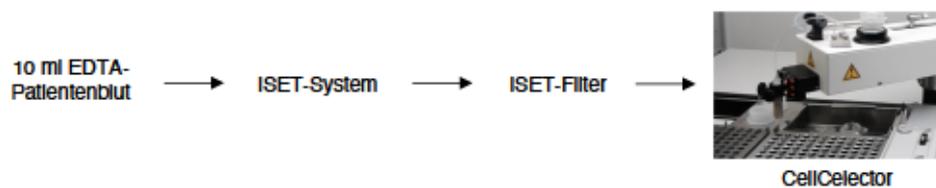


Abb. 53: Der Workflow zur Einzelzellisolierung von gefilterten CTCs auf dem ISET-Filtersystem. 10 ml EDTA Patientenblut wurden mit einer Pufferlösung inkubiert und danach durch das druckgesteuerte Filtrationssystem filtriert. Ein Großteil der Blutkörperchen wurden entfernt und die größeren CTCs auf dem Filter fixiert. Die 10 Spots des Filters wurden getrennt und die gefilterten CTCs durch den CellCelector als Einzelzellen isoliert. EDTA: Ethylendiamintetraacetat

10 ml EDTA-Patientenblut einer Mammakarzinom-Patientin wurden mit dem ISET-Verfahren aufgearbeitet und diese Filtermembran auf einen Objektträger überführt. 13 gefilterte, ungefärbte Zellen wurden im BF-Kanal isoliert und auf Objektträger abgelegt.

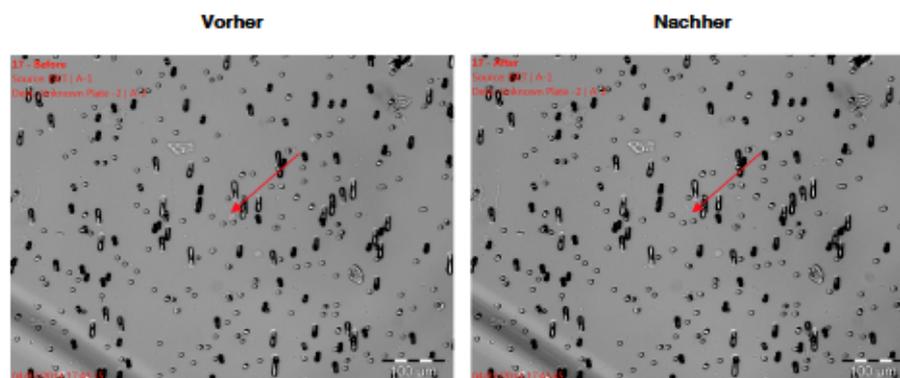


Abb. 54: Die Einzelzellisolierung von möglichen CTCs einer Mammakarzinom-Patientin auf dem ISET-Filter im BF-Kanal des CellCelectors. Die Zelle ist links vor der Isolierung dargestellt und rechts zeigt das Bild die fehlende Zellen nach der Aspiration. μm : Mikrometer

Zur Kontrolle der erfolgreichen Ablage der Einzelzellen auf den Objektträger wurde auf die Ablagekoordinaten der Einzelzellen Vectashield zur Darstellung von DAPI (Zellkern) pipettiert. Danach wurden die Ablagekoordinaten unter dem CellCelector-Mikroskop im DAPI- und BF-Kanal betrachtet (s. Abb. 55).

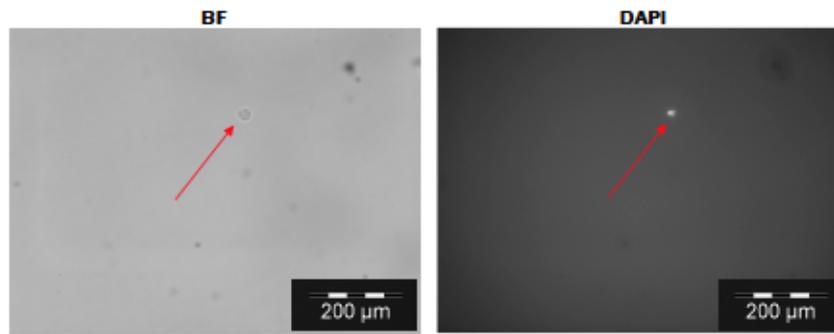


Abb. 55: Die Ablagekontrolle der isolierten Zellen einer gefilterten Blutprobe einer Mammakarzinom-Patientin mit dem ISET-Filter auf dem Objektträger. Nach dem Auftragen von Vectashield mit DAPI konnte der Zellkern der abgelegten Zellen unter dem CellCelector-Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; µm: Mikrometer

Die 13 abgelegten Einzelzellen konnten durch das Anfärben des Zellkerns mit DAPI aus dem Vectashield auf den Ablagekoordinaten des Objektträgers mit dem CellCelector-Mikroskop wiedergefunden werden. Die abgelegten, ungefärbten Zellen auf dem Objektträger wurden im Anschluss immunzytochemisch nach dem Färbeprotokoll mit DAPI, C11-FITC und EpCAM-Alexa Fluor 594 gefärbt. Hierbei zeigten sich 2/13 Zellen EpCAM-negativ und 11/13 Zellen EpCAM-positiv (s. Abb. 50).

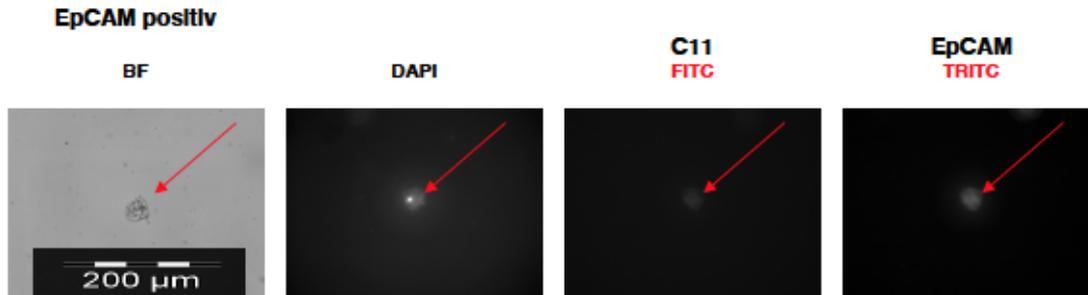


Abb. 56: Beispiel der Ablagekontrolle einer EpCAM-positiven isolierten Zellen des ISET-Filters nach der immunzytochemischen Färbung mit DAPI, C11-FITC und EpCAM-Alexa Fluor 594. EpCAM: Epitheliales Zell-Adhäsions-Molekül; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; C11: pan-Cytokeratin Antikörper; FITC: Fluoresceinisothiocyanate; TRITC: Tetramethylrhodamine; µm: Mikrometer

Zur Testung der Isolierungsrate von CTCs eines Spots des ISET-Filters wurde dieser nach beschriebenen Färbeprotokoll mit DAPI, C11-FITC und EpCAM-Alexa Fluor 594 gefärbt. Bei der Betrachtung des angefärbten Filters unter dem Mikroskop des CellCelectors zeigten einige epitheliale Zellen (FITCpos) sich zusätzlich EpCAM-positiv (TRITCpos) und negativ (TRITCneg).

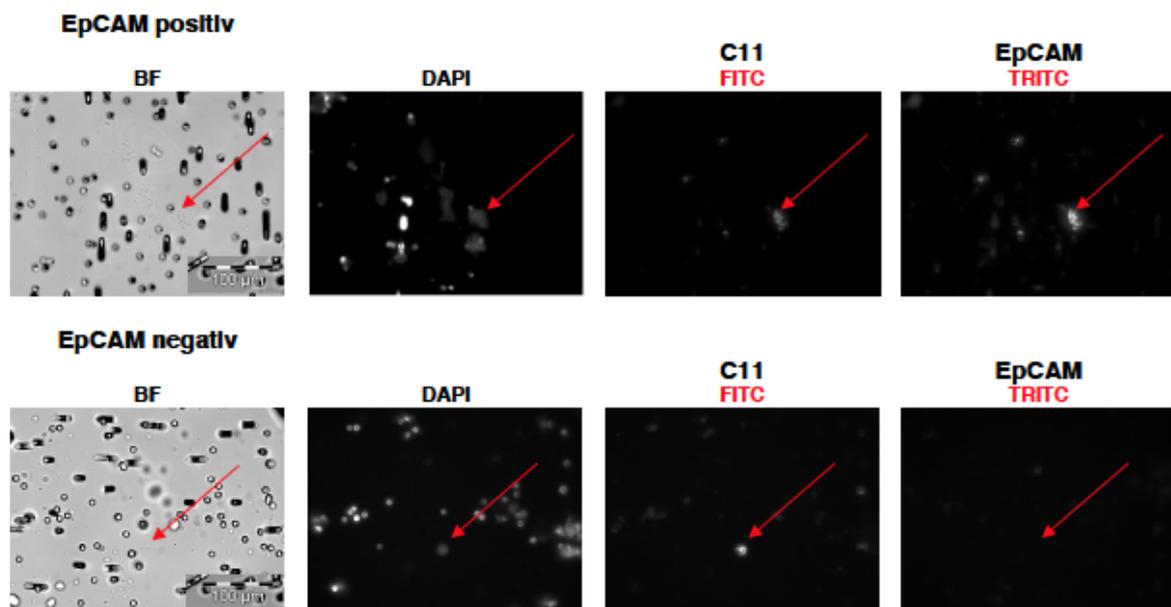


Abb. 57: Die Darstellung von angefärbten Zellen einer gefilterten Blutprobe einer Mammakarzinom-Patientin auf dem ISET-Filter. Es konnten sowohl EpCAM-positive als auch negative CTCs nach der Immunfluoreszenzfärbung im TRITC-Kanal des CellCelectors dargestellt werden. Die Zelle oben zeigt sich für DAPI, C11 und EpCAM positiv und die Zelle unten für DAPI und C11 positiv und EpCAM-negativ. EpCAM: Epitheliales Zell-Adhäsions-Molekül; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; C11: pan-Cytokeratin Antikörper; FITC: Fluoresceinisothiocyanate; TRITC: Tetramethylrhodamine; µm: Mikrometer

Nach der immunzytochemischen Färbung zur Darstellung der epithelialen Tumorzellen wurde die Zellisolierung im CellCelector durchgeführt. Von dem Spot konnten insgesamt 3 EpCAM-positive und 1 EpCAM-negative epitheliale Zelle isoliert und in *Tubes* abgelegt werden.

Bei einem weiteren immunzytochemisch gefärbten Spot des ISET-Filters konnten 12 DAPI- und C11-positive Zellen detektiert werden. Davon zeigten 10 Zellen ein positives EpCAM-Signal. Von den 12 detektierten epithelialen Zellen konnten 10 Zellen mit dem Mikromanipulator isoliert und vereinzelt in *PCR Tubes* abgelegt werden. Bei zwei Zellisolierungen wurden 2 Zellen auf Grund einer engen Lage zueinander zusammen aspiriert (s. Abb. 58). In den *PCR Tubes* der Ablage konnten 9/10, sowie auch die genaue Anzahl der dokumentierten aspirierten Zellen in der Bilddokumentation, wiedergefunden werden.

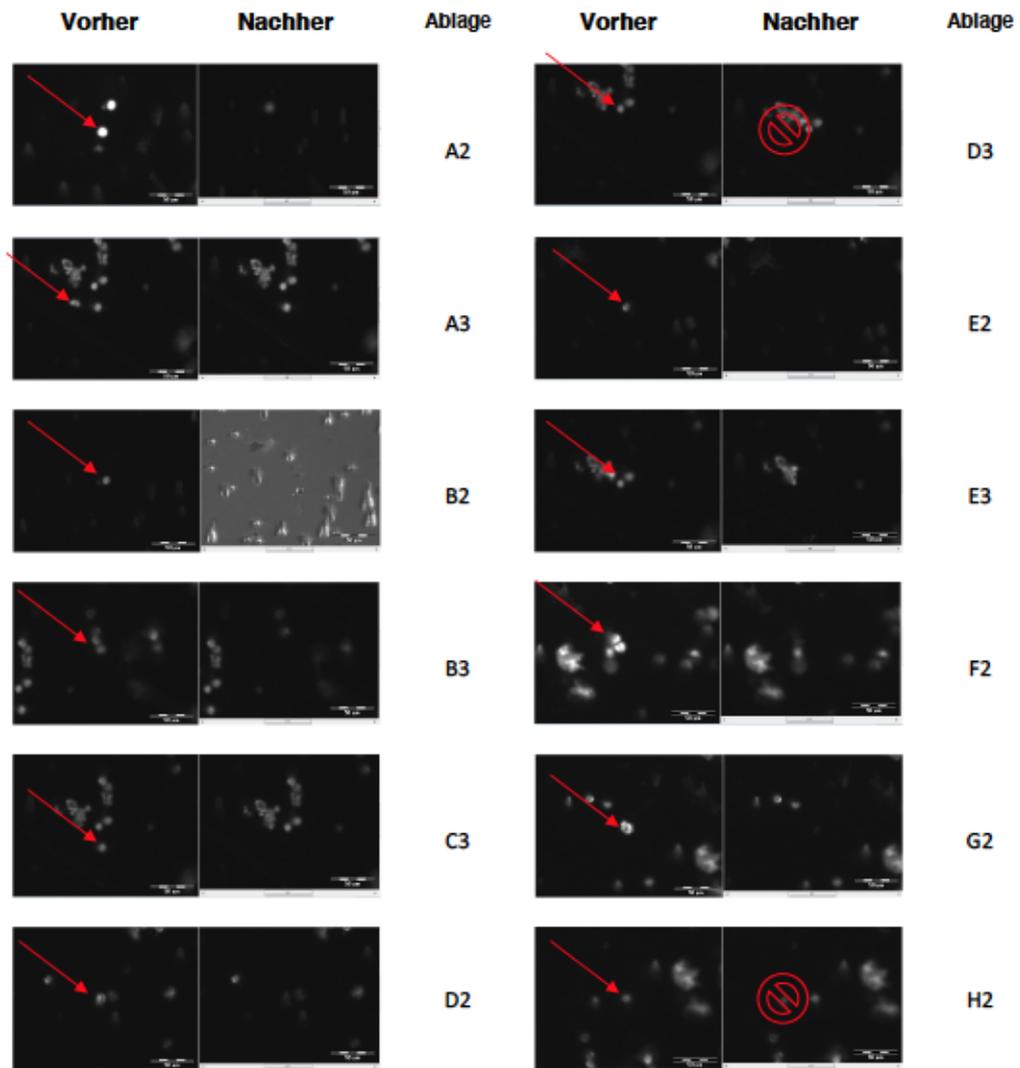


Abb. 58: Die Einzelzellisolierung von epithelialen Zellen einer Blutprobe von einer Mammakarzinom-Patientin. Die gefärbten Einzelzellen wurde durch Filtration des ISET-Filters und Mikromanipulation durch den CellCelector in PCR Tubes isoliert. Es konnten 12 DAPIpos und C11pos Zellen im CellCelector detektiert werden. 10 Zellen konnten erfolgreich unter der Sicht im DAPI-Kanal isoliert werden. Bei zwei Zellisolierungen wurden bei der Aspiration 2 Zellen isoliert (B3, E3). μm : Mikrometer

3.7 Charakterisierung der CTCs als Einzelzellen

3.7.1 Immunzytochemische Charakterisierung von CapG

Zur Darstellung der CapG-Expression von EpCAM-positiven CTCs von Mammakarzinom-Patientinnen wurden 16 Patientenproben aus *Cartridges* des CellSearch-Systems mit dem etablierten *Workflow* der Zelllinie aufgearbeitet.

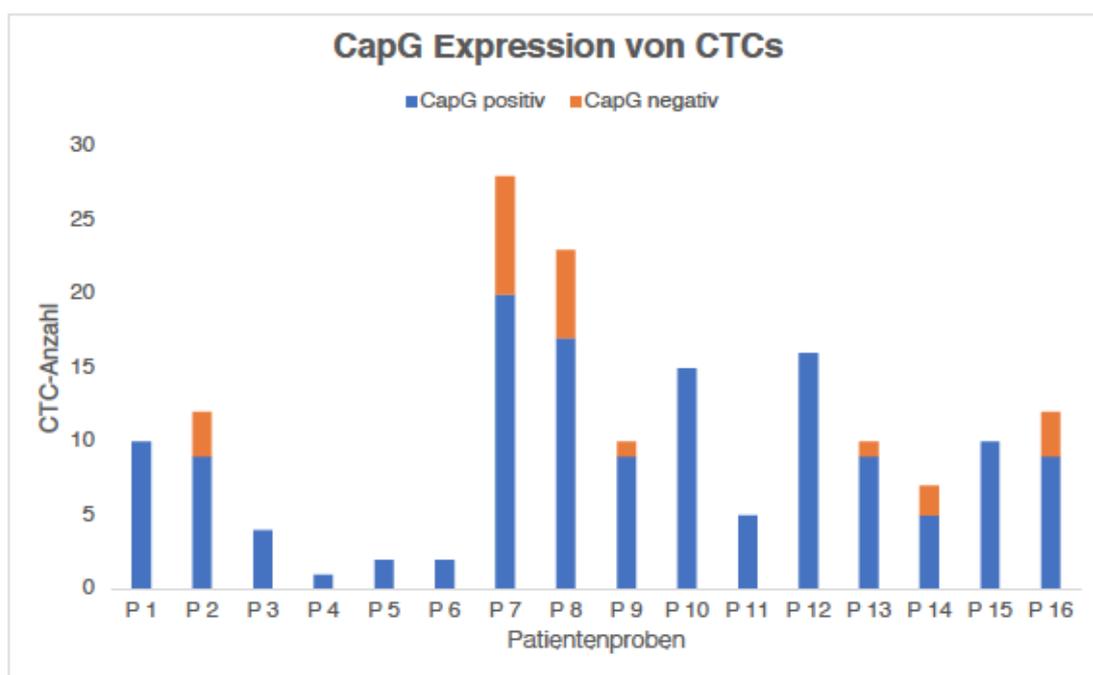
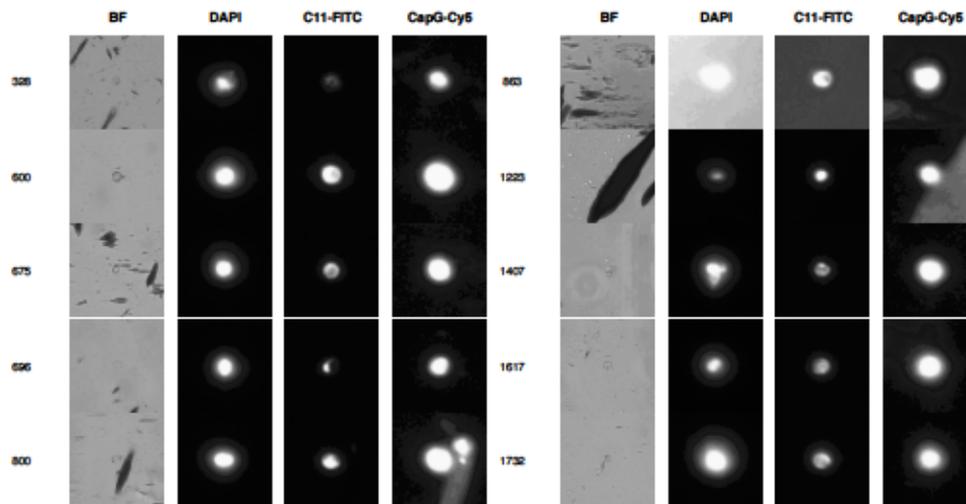


Abb. 59: Die CapG-Expression von isolierten CTCs von Mammakarzinom-Patientinnen. Es konnten 16 Cartridges (P1-16) des CellSearch-Systems mit dem CellCelector aufgearbeitet werden. Die isolierten und abgelegten CTCs als Einzelzellen wurden immunzytochemisch für CapG gefärbt. Bei 86 % der CTCs konnte eine Expression von CapG immunzytochemisch nachgewiesen werden (blau). CTC: zirkulierende Tumorzellen; CapG: Macrophage Capping Protein; P: Patientenprobe

Es wurden insgesamt 167 isolierte CTCs auf abgelegten Glasobjektträgern durch die Mikromanipulation des CellCelectors immunzytochemisch gefärbt. Die gesamte Anzahl an CTCs konnte nach dem Färbevorgang auf dem Glasobjektträger wiedergefunden werden. Bei 143 CTCs konnte eine CapG-Expression durch die Antikörperfärbung nachgewiesen werden. 24 CTCs zeigten keine immunzytochemisch nachweisbare Expression von CapG. 86 % der isolierten CTCs exprimierten in den durchgeführten Versuchen das Protein CapG.

CellCelector Mikroskop



Zeiss Axioplan 2

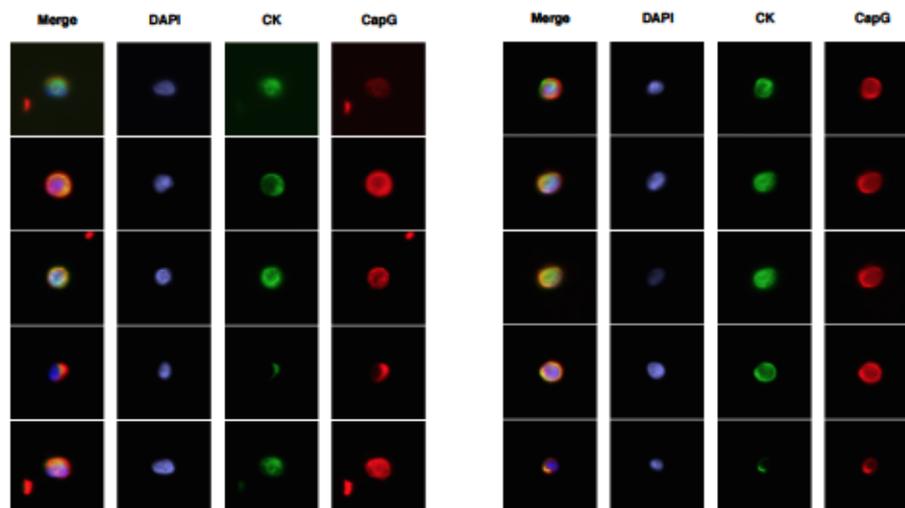


Abb. 60: Die Darstellung von der immunzytochemischen Färbung von CapG bei vereinzelt CTCs (DAPIpos,CKpos). Bei allen 10 isolierten und abgelegten CTCs einer Mammakarzinom-Patientin (P 15) durch den CellCelector auf Objektträger zeigte sich eine detektierbare CapG-Expression (Cy5pos). Illustration der CTCs im Mikroskop des CellCelectors (oben) und im Zeiss Axioplan 2 (unten). BF: Bright Field; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; C11: pan-Cytokeratin Antikörper; FITC: Fluoresceinisothiocyanate; CK: Zytokeratin; CapG: Macrophage Capping Protein; Cy5: Cyanin 5

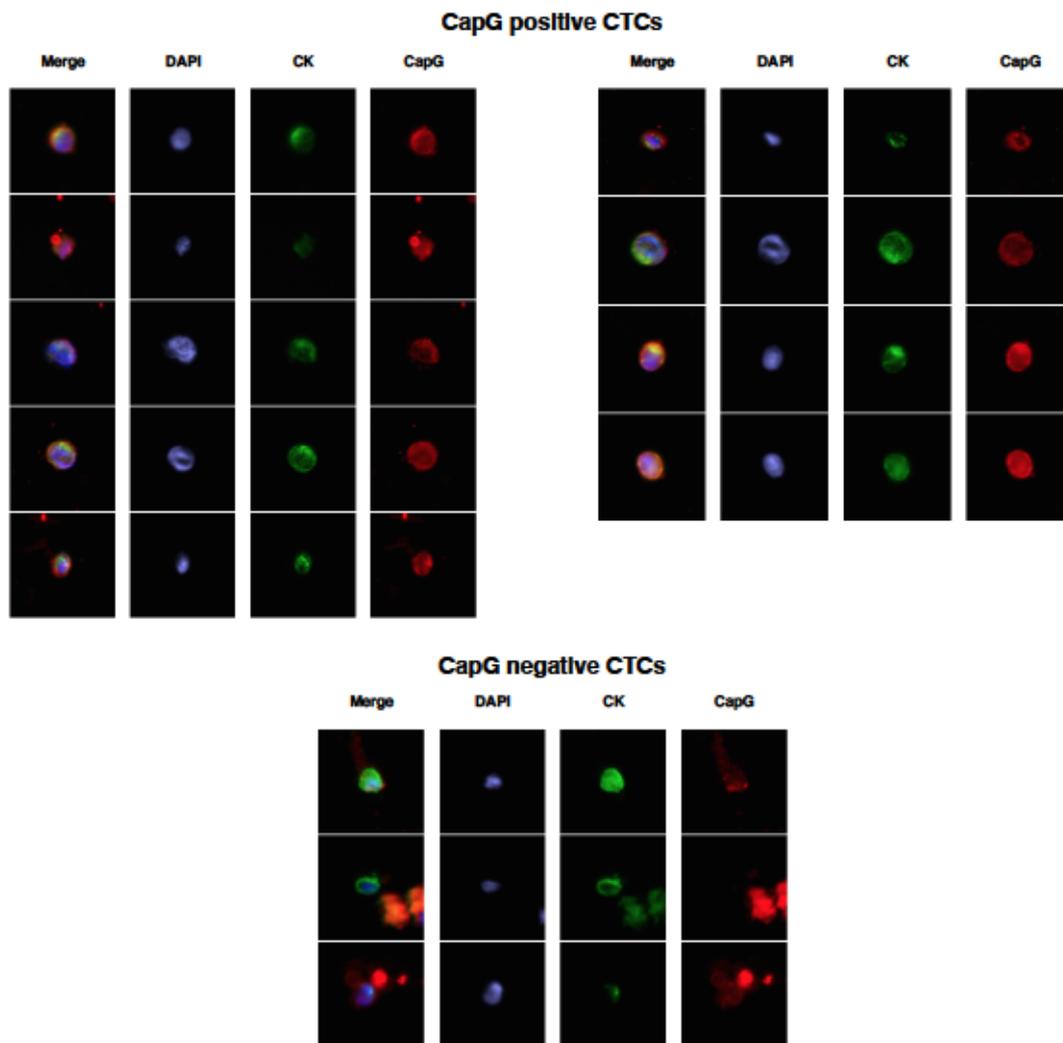


Abb. 61: Die Darstellung der isolierten CapG-positiven und -negativen CTCs (DAPIpos,CKpos) der Patientenprobe P 16 einer Mammakarzinom-Patientin mit dem Zeiss Axioplan 2 (64x). CTC: zirkulierende Tumorzelle; DAPI: 4',6 Diamidin-2 phenylindol; CK: Zytokeratin; CapG: Macrophage Capping Protein

3.7.2 Molekulare Downstream-Analyse der CTCs

Zur Testung der DNA-Qualität von CTCs aus Patientenproben wurden 8 isolierte CTCs einer Patientenprobe verwendet. Die Durchführung der WGA-Qualitätskontrolle der abgelegten CTCs verdeutlichte die Diversität der DNA-Qualität einzelner Zellen. In der WGA-Qualitätskontrolle zeigten 3/8 CTCs > 3 Banden und somit eine gute DNA-Qualität für eine mögliche PCR-basierte Mutationsanalyse oder NGS.

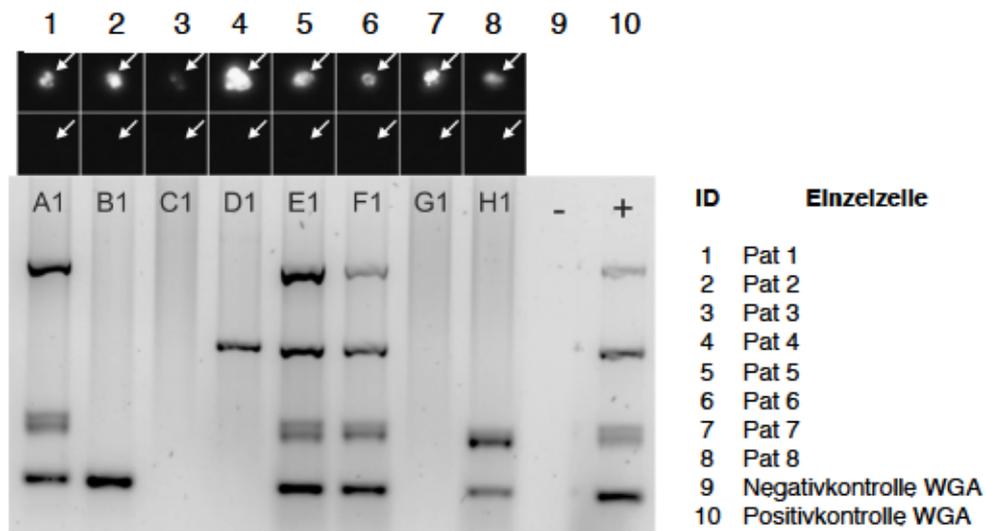


Abb. 62: Die Qualitätskontrolle der Whole Genome Amplification von CTCs. 2 CTCs zeigten in der WGA-Qualitätskontrolle 4 Banden (Pat 5,6), 1 CTC zeigte 3 Banden (Pat 1), 1 CTC zeigte 2 Banden (Pat 8), 2 CTCs zeigten 1 Bande (Pat 2,4) und 2 CTCs zeigten keine Bande (Pat 3, Pat 7) in der Gelelektrophorese. Pat: Patient; WGA: Whole Genome Amplification; ID: Nummer

Zur erneuten Darstellung der DNA-Qualität von CTCs aus Patientenproben der CellSearch-Cartridges wurde eine WGA mit dem Ampli1 WGA-Kit (Silicon Biosystems) nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt.

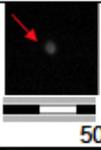
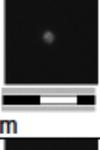
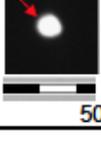
ID	Einzelzelle	Isolierung	Ablage	
1	MCF7		D8	
2	MCF7		E8	
3	T47D		B4	
4	T47D		C4	
5	SK-BR-3		E3	
		Vorher	Nachher	
6	Pat DIII 5			A1
7	Pat DIII 6			B1
8	Pat DIII 7			H3
9	Negativkontrolle WGA			
10	Positivkontrolle WGA			

Abb. 63: Die Einzelzellen der Whole Genome Amplification. Drei Zellisolierungen des CellCelector-Systems sind im DAPI-Kanal dargestellt. Es konnten 2/3 CTCs als Einzelzellen aus Patientenproben des CellSearch-Systems isoliert und in Tubes abgelegt werden. Bei der Probe 7 wurde die Zelle nicht aspiriert und isoliert. Diese Probe wurde als Negativkontrolle mitgeführt. 5 Einzelzellen der Zelllinien MCF7, T47D und SK-BR-3 wurden zur Überprüfung des Workflows mitgeführt. Pat: Patient; WGA: Whole Genome Amplification; μm : Mikrometer

Für das Verfahren der WGA wurden 7 Einzelzellen verwendet, denn bei einer Aspiration war die CTC-Isolierung erfolglos. Es wurden 2 CTCs aus Patientenproben der DETECT-Studie III benutzt und 5 Einzelzellen stammten aus isolierten Zelllinien (MCF7, T47D und SK-BR-3).

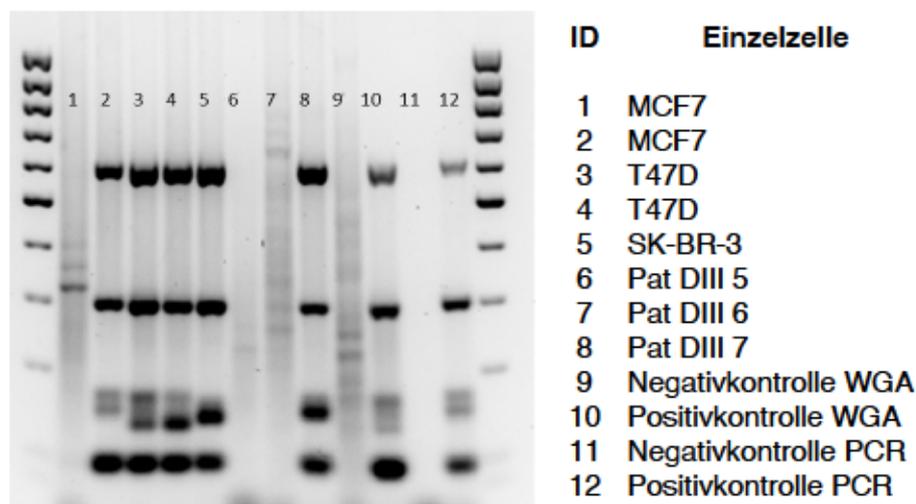


Abb. 64: Die Qualitätskontrolle der Whole Genome Amplification von CTCs. Die Gelelektrophorese zeigte die Qualitätskontrolle nach der WGA der isolierten CTCs aus einer Cartridge mit Patientenblut und den Einzelzellen der Zelllinien durch den CellCelector. 4/5 Zellen der Zelllinien und 1/2 CTCs zeigten eine gute DNA-Qualität und erzeugten > 3 PCR Banden im QC-Test (Pat DIII 7). Pat: Patient; WGA: Whole Genome Amplification; PCR: Polymerase-Kettenreaktion; ID: Nummer

Die PCR-basierte Qualitätsuntersuchung der DNA-Integrität bestätigt das Vorhandensein von kurzen, mittleren und langen DNA-Fragmenten bei 3/4 der Zellen der Zelllinien in der WGA-Bibliothek. Von den 2 isolierten CTCs wurde 1 Zelle mit einer guten DNA-Qualität als Ausgangsmaterial für die WGA verwendet und erzeugte 4 PCR-Banden in dem QC-Test. Das Probenmaterial mit der nicht erfolgten Aspiration einer Einzelzelle zeigte auch keine Banden in dem Qualitätstest. Die WGA-Produkte der Zelllinien hatten bei 4/5 Zellen eine gute Qualität (s. Abb. 62). Eine Patientenprobe (Pat DIII 7) und 4 Einzelzellen der Zelllinien waren für die genomweite Analysen wie NGS oder *Array-CGH* geeignet.

Nach der Anreicherung von Patientenproben mit dem CellSearch-System und der anschließenden Einzelzellisolierung von CTCs durch das CellCelector-System konnten bisher 32 Patientenproben zur genetischen Analyse verwendet werden. 872 CTCs konnten als Einzelzellen auf unterschiedliche Ablagemedien vereinzelt werden und 95 CTCs wurden für die Durchführung der *Whole Genome Amplification* genutzt. Insgesamt zeigten die WGA-Produkte der isolierten CTCs eine hohe Variabilität in ihrer Qualität. In den Qualitätskontrollen mit dem Ampli1-WGA-Kit (silicon biosystems) hatten 24 % der entstandenen Amplifikationen eine sehr gute DNA-Qualität und zeigten > 3 Banden. Mit diesen WGA-Produkten war es möglich ein „*Next-Generation-Sequencing*“ im Anschluss durchzuführen. 76 % der Produkte wiesen eine weniger gute Qualität auf und zeigten < 2 Banden in dem QC-Test. Es war dennoch möglich diese Amplifikationen für die Durchführung von PCR-basierte Mutationsanalysen zu nutzen.

4 Diskussion

4.1 Vorbemerkung

Bis heute konnte der Mechanismus der Metastasenbildung von Primärtumoren nicht vollständig geklärt werden. Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs stellt ein großes Potential zum Verständnis der Tumorbiologie dar. In den letzten Jahren konnte, durch die klinische Anwendung der CTC-Bestimmung, die biologische Bedeutung der CTCs im Hinblick auf ihre prognostische Aussagekraft (45), das therapeutische Ansprechen und der individualisierten Therapie (46), weiter verstanden werden. Nach der Etablierung eines Verfahrens zur Anreicherung und Detektion der CTCs mit dem CellSearch-System der Firma Menarini Silicon Biosystems, wurde die Bedeutung dieser Zellpopulation durch zahlreiche Studien belegt. Bereits ein Nachweis von > 5 CTCs/7,5 ml Blut korreliert mit einem niedrigeren Gesamtüberleben der Patientinnen im metastasierten Status (1). Es konnte gezeigt werden, dass diese nachgewiesenen Tumorzellen im Blut in der Behandlung einer Mammakarzinom-Patientin, als sogenannte „*liquid biopsy*“, genutzt werden und das Therapieansprechen widerspiegeln (36). Bidard FC *et al.* beschrieben auch im nicht metastasierten Setting den Nachweis von CTCs als unabhängigen und quantitativen prognostischen Faktor bei Brustkrebs-Patientinnen im Frühstadium unter der Behandlung einer neoadjuvanten Chemotherapie (47). Neben dem bereits belegten prognostischen Aussagewert der CTCs beim metastasierten und nicht metastasierten Mammakarzinom ist die Frage, ob CTCs auch als prädiktive Marker genutzt werden können. Durch die histologische Sicherung der Metastasen bei Brustkrebspatientinnen ist bekannt, dass sich diese durchaus in ihrem Phänotyp von dem Primärtumor unterscheiden und sich dadurch auch der prädiktive Marker ändert (48). So berichteten Simmons *et al.* bereits auf dem „*San Antonio Breast cancer Symposium*“ (SABCS) im Jahre 2007, dass eine Biopsie der Metastasen bei 20 % der Patientinnen zu einer Änderung des bisherigen Therapieregimes führen kann. Die adjuvante Therapie bei bestehender minimaler Tumorerkrankung richtet sich als medikamentöser Ansatz aber aktuell immer noch gegen die prädiktiven Marker (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, HER2/neu) des Primärtumors, sodass im Verlauf einiger Jahre, Metastasen oder Rezidive auftreten. Durch diese Erkenntnis ließe sich das Versagen einer hormonellen und antikörperbasierten Tumorbekämpfung erklären und es könnten neue Therapieansätze entstehen. Die aktuell laufenden DETECT-Studien (III-V) sind erste Studien, die auf der Grundlage von CTC-Phänotypisierungen neue Therapieoptionen begründen und nutzen.

Durch die genaue Analyse der CTCs kann das Phänomen der Metastasierung von malignen Brusttumoren besser verstanden werden. Die Expressionsprofile, die für die Invasivität der

CTCs verantwortlich sind, können nachgewiesen werden und Angriffspunkt neuer Therapieregime werden. In einer Studie von De Luca *et al.* wurden Blutproben von vier Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs mit dem CellSearch-System angereichert und dem DEPArray vereinzelt. Die einzelnen CTCs wurden, nach der WGA, mittels NGS auf 50 krebsrelevante Gene untersucht und ein Unterschied zwischen dem Mutationsprofil des Primärtumors und der CTCs nachgewiesen (49). Diese Studie verdeutlicht, dass durch die Charakterisierung der CTCs auf der Einzelzellebene die heterogene Zellpopulation analysiert und die Verteilung der Expressionsprofile mit dem Potential der Metastasierung korreliert werden kann. Therapieresistente CTCs können durch die Analyse der Transkriptionsprofile erkannt werden und zielgerichtet, individuell therapiert werden. Die Detektion der CTCs stellt bereits eine große Herausforderung dar. Somit ist die Einzelzellisolierung dieser wenigen Zellen im Patientenblut ein schwierig umzusetzendes Ziel und bis jetzt konnte keine getestete Methodik die Stabilität und Zuverlässigkeit für eine klinische Anwendung erfüllen. Um dem Schritt zur individualisierten Therapie von Mammakarzinom-Patientinnen näher zu kommen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein gesamter diagnostischer Arbeitsablauf von der CTC-Detektion, ihrer Einzelzellisolierung bis hin zur immunzytochemischen und molekularen Charakterisierung etabliert und optimiert (16).

4.2 EpCAM-abhängige Einzelzellisolierung von CTCs

Für das Verständnis der Pathogenese von malignen Tumoren sollte eine Verbesserung der technologischen Mittel zur Einzelzellisolierung von CTCs und der Nutzen ihres vollen Potentials angestrebt werden. Es konnten bereits einige Methoden zur Einzelzellisolierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie und anschließender Einzelzell-Genexpressionsmessung etabliert werden. Die Analyse der Genexpressionsprofile der Einzelzellen bewies eine hohe Zell-zu-Zell-Variabilität (50). Blassl *et al.* entwickelten einen Arbeitsablauf zur Charakterisierung einzelner CTCs des Ovarialkarzinoms, bestehend aus einer Dichtegradienten-abhängigen Anreicherung für kernhaltige Zellen, einer Depletion von CD45-positiven Zellen hämatopoetischen Ursprungs und einer immunfluoreszierenden Markierung mit EpCAM und Muc-1 der CTCs mit anschließender Mikromanipulation und einem *Panel-Genexpressionsprofiling*. Die ausgewerteten Daten deuteten auf eine heterogene Expression von EMT- und Stammzell-assoziierten Transkripten in CTCs des Ovarialkarzinoms hin (51).

4.2.1 Detektionsrate von CTCs

In dieser Arbeit wurde für die Anreicherung der CTCs in Vollblutproben von Mammakarzinom-Patientinnen das FDA geprüfte CellSearch-System verwendet. Der Vorteil des Systems ist die hohe Sensitivität in der Detektion EpCAM-positiver CTCs. Das bedeutet, dass < 5 CTCs aus 7,5 ml Patientenblut in die Cartridges überführt und anschließend detektiert werden können. Das System bietet gleichzeitig, nach der automatischen Fluoreszenzfärbung der Zellen, die Möglichkeit zur Fluoreszenzanalyse der CTCs. In dieser vorliegenden Arbeit konnten beide optischen Einheiten der Systeme so aufeinander abgestimmt werden, dass 95-99 % der vorher durch das CellSearch-System bestimmten CTC-Anzahl durch das CellCelector-System, anhand der definierten Kriterien mit einer stabilen Fluoreszenzfärbung und durch die Optimierung der Scanparameter, detektiert wurden. Im Vergleich dazu kombinieren andere immunomagnetische Verfahren eine Antikörper-basierte magnetische Kopplung der Zellen mit der Durchflusszytometrie (52). Im IsoFlux-System erfolgt, durch die Bindung von Oberflächenmarkern, eine negative Selektion von Blutzellen und die Separation der CTCs. Nachteil dieses Verfahrens ist die Beobachtung von unspezifischen Zellbindungen mit dem Verlust von CTCs und die Verunreinigung der isolierten CTCs durch andere Blutzellen (53). Viele bereits veröffentlichte Verfahren zur Einzelzellisolierung mussten einen hohen Zellverlust bei der Vorbereitung der Proben für die Isolierung der Zellen aus der Suspension verzeichnen. Chen *et al.* entwickelten einen speziellen Draht in Anlehnung an den CellCollector, einem medizinischen Draht der mit Antikörpern gegen EpCAM beschichtet ist. Zu anderen Verfahren der Zellisolierung bietet die Methodik eine höhere Ausbeute an CTCs, auf Grund der größeren zu untersuchenden Volumenmenge. In einem *Spiking*-Experiment wurden *ex-vivo*-isolierte, am Draht gebundene HT-29-Zellen aus peripherem Blut durch eine Fluoreszenzfärbung markiert, unter dem Mikroskop sichtbar gemacht und anschließend durch eine enzymatische Behandlung abgelöst. Dabei konnte eine Ablösungsrate zwischen 50-90 % erreicht werden. Die Wiederfindungsrate der Zellen auf dem Objektträger des Fluoreszenzmikroskops nach dem Ablösungsverfahren lag, in Abhängigkeit von der Zelllinie, nur bei < 10 % bis < 50 %. In der in dieser Arbeit beschriebenen Entwicklung der Einzelzellisolierung aus der Kombination des CellSearch-Systems und dem CellCelector wurde der Zellverlust hauptsächlich durch den Transfer der Patientenprobe aus der *Cartridge* auf den Magnetobjektträger verursacht. Die Transfereffizienz war abhängig von der Anzahl der CTCs in der *Cartridge* und betrug im Mittel 86-99 %. Der Zellverlust war zusätzlich abhängig von der Qualität der *Cartridge* von Patientinnen. Ein altersabhängiger Qualitätsverlust konnte in den durchgeführten Einzelexperimenten nicht dargestellt werden. In manchen *Cartridges* konnten stark adhärenente Ferrofluidpartikel an der Wand beobachtet werden oder bei der Fluoreszenzmikroskopie Zellcluster, welche die Detektion, den Zelltransfer und anschließend die Einzelzellisolierung

der CTCs erschweren. In einigen Patientenproben konnte bereits vor dem ersten Scan im CellCelector eine schwache Immunfluoreszenz festgestellt werden oder das DAPI-Signal (Zellkern) zeigte sich nicht mehr rund und strahlend sondern sternförmig ausgezogen, verwaschen. Durch die Steigerung der Sensitivität der Detektionsparameter im CellCelector, z.B. der Schwellenwerte zur Erkennung der Immunfluoreszenzfärbung (*Thresholds*), konnte die Detektionsrate gesteigert werden. So konnte individuell auf die Gegebenheiten der *Cartridges* eingegangen und das Optimum der Zelldetektion erreicht werden. Die *Recovery Rate* für den hier entwickelten Workflow entspricht etwa der bereits bei anderen Verfahren beschriebenen. Polzer *et al.* beschrieben im Vergleich dazu eine Transfereffizienz von 85 % bei der Überführung der Zell-Suspension aus der CellSearch-*Cartridge* in die DEPArray-Kassette und eine Isolierungseffizienz von 94 % (54).

Der Zellverlust in dieser Arbeit bei der Überführung der Probe aus der CellSearch-*Cartridge* auf den Magnetadapter des CellCelectors war abhängig von der vorher im CellSearch-System detektierten Zahl der CTCs. Im Gegensatz zu einer Effizienz von 94 % bei *Cartridges* mit > 10 CTCs konnte bei der Verarbeitung von CellSearch-*Cartridges* mit < 10 CTCs ein Verlustanteil von 10-50 % festgestellt werden. Im Durchschnitt lag die Detektionsrate der CTCs bei der Aufarbeitung von Patientenproben bei 90,7 %. Für die klinische Anwendung ist bereits bekannt, dass die CTCs in einer *Cartridge* des CellSearch-Systems rar sind und die Anzahl in 63 % < 2 CTCs/*Cartridge* liegt (17).

4.2.2 Einzelzellisolierung von CTCs

Shaw *et al.* veröffentlichten eine Arbeit zur Untersuchung der Mutationsprofile von 50 Genen EpCAM-positiver CTCs als Einzelzelle im Vergleich zur cfDNA bei den gleichen Patientenproben von Mammakarzinom-Patientinnen. Die Einzelzellisolierung erfolgte durch die Anreicherung der Patientenproben mit dem CellSearch-System und anschließender Isolierung EpCAM-positiver CTCs mit Hilfe des DEPArray-Systems. Es wurden Patientenproben mit hoher CTC-Anzahl (> 100 CTCs in 7,5 ml Blut) genutzt (55). Die bereits veröffentlichten Methoden zur Einzelzellisolierung und anschließender Mutationsanalyse erscheinen sehr aufwendig und fordern stabile Arbeitsabläufe. Zudem korreliert die erfolgreiche Einzelzellisolierung mit der steigenden Zahl an CTCs in Patientenproben. Es ist bekannt, dass die CTCs als eine rare Zellpopulation im peripheren Blut von Mammakarzinom-Patientinnen nachzuweisen sind. Die Anwendung dieses veröffentlichten Arbeitsverfahrens von Shaw *et al.* muss daher für eine abschließende Validierung an die Anforderungen des Nachweises von < 100 CTCs getestet werden. Ein Verfahren, welches nur bei einem Nachweis von > 100 CTCs in den Patientenproben verwendet werden kann, hat für den klinischen Alltag bei oft weniger detektierten CTCs, wenig Verwendung. Im Vergleich dazu konnte durch die in

dieser Arbeit durchgeführte Mikromanipulation des CellCelector-Systems auch bei Patientenproben < 5 nachgewiesenen CTCs eine erfolgreiche Einzelzellisolierung erreicht werden. Das etablierte Verfahren kann den Ansprüchen der in Studien nachgewiesenen durchschnittlichen CTC-Zahl in Patientenproben gerecht werden. In der Arbeit von Shaw *et al.* konnten von > 100 detektierten CTCs aus 5 Patientenproben im CellSearch-System im Anschluss mit dem Workflow 2-17 CTCs, abhängig von der Probe, als Einzelzellen isoliert und genetisch analysiert werden. Bei dieser Methode kommt es zu einem hohen Zellverlust bei der Einzelzellisolierung, den auch andere Verfahrensprotokolle verzeichnen (55). Da in 7,5 ml Patientenblut aber häufig < 100 CTCs nachgewiesen werden sollte ein Zellverlust bei der Methode zur Einzelzellisolierung minimiert werden.

Im Gegensatz zu den genannten Methoden der Einzelzellisolierung bietet der in dieser Arbeit verwendete CellCelector die Möglichkeit zur automatischen Erkennung, Bildanalyse und Isolierung von Partikeln bzw. adhärennten Zellkolonien und Einzelzellen. Im Vergleich zu anderen Zellisolierungsmethoden (Durchflusszytometrie) erfolgt die Isolierung der Zellen schonend und unter Sicht. Mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskops des CellCelectors ist es möglich, die Einzelzellen anhand ihrer Immunfluoreszenzfärbung und Morphologie nach dem Scan manuell auszuwählen und so einen Zellverlust bei der Einzelzellisolierung zu vermeiden. Zusätzlich können nicht erfolgreiche Aspirationen von CTCs wiederholt und an unterschiedliche Gegebenheiten (durch Änderung der Aspirationshöhe, Aspirationsvolumen) angepasst werden, um eine maximale Isolierungsrate zu erreichen. In dem Detektions- und Isolierungsschritt konnte die immunomagnetische Anreicherung der CTCs durch die spezielle Entwicklung des Magnetadapters für den CellCelector ausgenutzt werden. Die Ferrofluidpartikel richteten sich in der Mitte des Objektträgers im Magnetfeld aus und dadurch war es möglich die Zellen, trotz der Bewegungen des Kreuztisches, magnetisch für den Scan und die Zellisolierung zu fixieren.

Die Isolierungsparameter konnten so eingestellt werden, dass eine Aspiration mit einem Puffervolumen von 1 µl erreicht wurde. Für weitere Analysen der CTCs, mit der Notwendigkeit eines geringen Probenvolumens, stellte dieses Verfahren sich als günstig dar. Durch die Optimierung der Isolierungsparameter, der Minimierung des Abstandes der Glaskapillare zum Objektträger und der gesenkten Aspirationsgeschwindigkeit, konnte eine Einzelzellisolierung bis zu einem Zellabstand von 100 µm ermöglicht werden. In vielen experimentellen Studien wurde bereits der Nachweis von Tumorzellaggregaten beschrieben. CTC-Cluster scheinen bei der Metastasierung von Brustkrebs einen wegweisenden Einfluss zu haben (56). Um ihre Entstehung, ihr Potenzial der Metastasierung und ihre klinische Relevanz weiter untersuchen zu können, bedarf es Verfahren zur Einzelzellisolierung, die es ermöglichen diese Zellaggregate zu selektieren. Durch die benutzerdefinierte Bestimmung der physikalischen Isolierungsparameter des in dieser Arbeit verwendeten CellCelectors ist es möglich auf

unterschiedliche CTC-Formationen und die Qualitäten der Patientenproben individuell zu reagieren um eine größere Ausbeute an Einzelzellisolierungen zu ermöglichen. Bei der Testung der Isolierungswahrscheinlichkeit von SK-BR-3-Zellen in unterschiedlicher Verdünnung dieser Arbeit zeigte sich bei Cartridges mit < 50 CTCs eine niedrigere Detektionswahrscheinlichkeit bei einer höheren Isolierungswahrscheinlichkeit der Zellen.

In 87 % konnten die ausgewählten Zellen als Einzelzellen durch die Mikromanipulation isoliert werden. In 10 % der Fälle wurde auf Grund der nahen Lage der CTCs zueinander > 1 Zelle aspiriert und bei 2-3 % konnte die Einzelzellisolierung nicht erfolgen. Ursache für die nicht geglückte Einzelzellisolierung war eine verstärkte Adhärenz der CTCs, durch z.B. ein Austrocknen der Probe in einem verlängerten Detektionsvorgang des CellCelectors bei hoher CTC-Anzahl, oder das Vorliegen von CTCs in Ferrofluidclustern. Insgesamt konnten mit dem hier etablierten Workflow aus 32 Cartridges von 1038 im CellSearch-System detektierten CTCs nach dem Transfer der Probe 893 CTCs mit dem CellCelector wiedergefunden und 872 CTCs, also 98 %, isoliert werden. In einem etablierten CellSearch®/DEPArray™-Workflow konnte im Vergleich bei einem *Spiking*-Experiment von einer A549-Zelllinie und peripheren mononukleären Blutzellen in Blutproben von gesunden Probanden ähnliche Isolierungs- bzw. Wiederfindungsraten erreicht werden (57). Bei der automatischen Einzelzellisolierung muss die Reinheit, durch die Bestimmung von Oberflächenmolekülen anderer Blutzellen, der isolierten Zellen anschließend überprüft werden. Die gezielte Isolierung einer bestimmten Zelle unter dem Mikroskop des CellCelectors in der vorliegenden Arbeit stellt einen der Hauptvorteile dieser Technologie dar. Im *Live*-Modus des Mikroskops des CellCelectors ist es möglich den Aspirationsvorgang der Zelle als Benutzer zu verfolgen und die erfolgreiche Isolierung als Bild zu dokumentieren. Die Ablage kann später einer genauen Bilddokumentation zugeordnet werden. Dies ermöglicht eine Absicherung, dass die ausgewählte Zelle tatsächlich durch die Glaskapillare aspiriert wurde und es zu keiner Kontamination durch andere Blutzellen gekommen ist. Gleichzeitig kann die erfolgreiche Ablage der Einzelzellen in die *Tubes* und auf den Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden. Die Bilddokumentationen, zur Beurteilung der Morphologie der CTCs, konnten anschließend mit dem Ergebnis der Zellcharakterisierung verglichen werden. Durch unterschiedliche Möglichkeiten der Ablageoptionen (*Objektträger*, *Tubes* oder *x-Wellplatten*) von Einzelzellen sind die Analysen im Anschluss variabel. In der Testung des Arbeitsablaufes konnte eine Ablagewahrscheinlichkeit der Einzelzellen in dieser Arbeit von 96 % erreicht werden.

Für die Zellsortierung und das damit verbundene Extrahieren von bestimmten Zellpopulationen existieren auch fluoreszenzaktivierte Anreicherungsverfahren (FACS). Nachteil der Zellsortierung durch die fluoreszenzaktiven Antikörper ist die Notwendigkeit von großen Probenvolumina und eine mögliche zelluläre Veränderung durch den

Separationsprozess. Kriterien für die klinische Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten Protokolls an einem größeren Patientenkollektiv ist eine gute Wiederfindungsrate mit geringem Zellverlust der CTCs bei dem Transfer eines Systems bis hin zur Mikromanipulation. Zudem ist der mögliche Durchsatz der Einzelzellisolierung im zeitlichen Aspekt wichtig. Im Vergleich zu anderen Methoden der Einzelzellisolierung ist die Mikromanipulation ein Verfahren mit der eine hohe Rate an Zellisolierungen aus Patientenprobe mit unterschiedlicher Qualität (98 %) erreicht werden kann, aber mit einem erhöhten zeitlichen Aufwand verbunden ist.

In der Gegenüberstellung anderer Technologien zur Einzelzellisolierung stellt dieses Verfahren mit den bisher erhobenen Effizienzdaten eine geeignete Methodik mit großem Potenzial für Verbesserungen dar. Eine Einschränkung des etablierten Workflows stellt die markerabhängige (EpCAM) immunomagnetische Anreicherung der CTCs des CellSearch-Systems, eine eingeschränkte Sensitivität gegenüber CTCs der EMT, dar.

4.2.3 Herausforderung an die Methodenentwicklung

In einem in dieser Arbeit durchgeführten Einzelexperiment einer *Cartridge* mit einer CTC-Zahl von > 100 in einer Patientenprobe kam es innerhalb des Scan- und Auswahlschrittes der CTCs im CellCelector zu einem Austrocknen der Probe auf dem Objektträger im Magnetadapter. Dies erschwerte die Isolierung der Einzelzellen auf Grund der Zunahme der Adhärenz der Zellen auf dem Objektträger. Die erneute Hydratation der Probe führte zu einer Veränderung der gespeicherten Koordinaten der CTCs für den Isolierungsvorgang. Zu prüfen wäre, ob es sich bei der Beobachtung um einen Einzelfall handelte oder grundsätzlich bei einer Zell-Suspension von > 100 detektierten CTCs im CellSearch-System das Detektions- und Isolierungsverfahren im CellCelector in zwei Schritten durchgeführt werden sollte. Bereits in durchgeführten experimentellen Studien wurden CTC-Zahlen mit dem CellSearch-System von 0 bis 2289 mit einem Median von 3 CTCs beschrieben und auch in dieser Arbeit waren *Cartridges* mit einer CTC-Anzahl von > 100 CTCs sehr rar, weshalb diese Fragestellung mit den vorhandenen Patientenproben nicht abschließend geklärt werden konnte.

Ein Vorteil der halbautomatischen Mikromanipulation mit dem CellCelector ist die Anpassung der Parameter zur Einzelzellisolierung auf die Gegebenheiten einer Patientenprobe und die Bilddokumentation der Aspiration mit einer möglichen manuellen Ablagekontrolle der CTC. Für die Anwendung dieses Verfahrens in einem höheren Patientenkollektiv, mit einem erhöhten Durchsatz, ist es notwendig diese Arbeitsschritte weiter zu automatisieren. Die rein manuelle Aufarbeitung einer Patientenprobe zeigt eine hohe Effektivität, ist aber zeitaufwändig. Dabei nimmt der Scan der Patientenprobe in den Fluoreszenzkanälen und die anschließende Auswahl der Zellen mit den erfüllten CTC-Kriterien die meiste Zeit in Anspruch. Da bereits gezeigt wurde, dass *Cartridges* des CellSearch-Systems meist eine CTC Anzahl von < 2 CTCs

beinhalten ist der zeitliche Aspekt bei einigen Patientenproben nahezu vernachlässigbar. Zudem ist auch die mikroskopische Kontrolle der CTCs auf dem Ablagemedium mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden. Es gibt neue Ansätze in denen das Transfervolumen der Glaskapillare bis zum Zielort zusätzlich automatisch beobachtet wird. Es wird bereits an der Verbesserung der Ablageprüfung von Einzelzellen mit neuen Videosystemen und Bildverarbeitungsalgorithmen gearbeitet (58).

Auffallend zeigte sich in der Aufarbeitung von Patientenproben aus den *Cartridges* die hohe Variabilität der Qualität der Fluoreszenzfärbung, der Morphologie der Zellen und der Kontamination mit anderen Blutzellen. Die Qualität beeinflusste in dieser Arbeit die Isolierungswahrscheinlichkeit der CTCs. Daher musste bei einigen *Cartridges* auf Grund der schwach detektierbaren anti-CD45-Färbung des CellSearch-Systems durch das CellCelector-System eine Nachfärbung durchgeführt werden, um die CTCs von den weißen Blutkörperchen zu unterscheiden. Die Nachfärbung konnte in der *Cartridge* erfolgen, führte aber durch den Färbvorgang zu einem vermehrten Zellverlust. Es waren viele Testverfahren bei der Suche des optimalen Antikörpers und zur Minimierung des Zellverlustes bei der Färbemethode notwendig. Bei der notwendigen anti-CD45-Nachfärbung in der *Cartridge* zeigte sich anschließend eine Transfereffizienz von 74-91 %.

4.3 EpCAM-unabhängige Einzelzellisolierung von CTCs

Die meisten entwickelten *Workflows* zur CTC-Einzelzellisolierung beruhen auf der Markierung von Oberflächenmolekülen, wie EpCAM (51). Vielen Studien zufolge ist die EMT für die Gewinnung von stammzellähnlichen Eigenschaften der CTCs verantwortlich und daher durchaus für die Entwicklung von neuen Therapieregimen klinisch relevant (59). Die Erkenntnis, dass genau diese Zellpopulation im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber der Chemo- und Antikörpertherapie steht, beschleunigte die Verfahren zum nicht affinitätsbasierten CTC-Nachweis (60, 61). Unter dem Gesichtspunkt der nachgewiesenen EMT von Tumorzellen können CTCs nicht-epithelialen Ursprungs mit diesen Detektionsprozessen nicht nachgewiesen werden und im Anschluss auch nicht als Einzelzellen isoliert werden (28). Anzustreben ist ein möglicher Vergleich EpCAM-positiver und -negativer CTCs in einer Patientenprobe, da gerade den CTCs mit den phänotypischen Merkmalen der EMT eine bedeutende Rolle in der Metastasierung und der Ausbildung eines Rezidivs in experimentellen Studien zugewiesen wird. Durch die Sortierung der Blutzellen nach ihren morphologischen Eigenschaften, vor allem auf der Grundlage des Größenunterschiedes zu CTCs, ist es möglich durch Filtersysteme auch EpCAM-negative CTCs zu isolieren. Das Verfahren der Einzelzellisolierung muss folglich an diese Marker-unabhängigen Technologien zur Anreicherung und Detektion EpCAM-negativer CTCs

angepasst werden. Viele Arbeitsabläufe sind enorm zeitaufwändig, benötigen hohe Probenvolumina oder verzeichnen eine hohe Zellverlustrate. Eine Herausforderung stellt besonders die Einzelzellisolierung von gefilterten CTCs auf der Filtermembran dar.

Durch die Verwendung der in dieser Arbeit etablierten Protokolle zur Anreicherung von CTCs des ISET- und VyCap-Filters, der Verwendung eines *Lysepuffers* und der anschließenden benutzerdefinierten Mikromanipulation (*Scraping* Funktion) durch den CellCelector zeigt sich eine nahezu 100 % Einzelzellisierungsrate. Im Vergleich zu anderen Methoden ist die erreichte Einzelzellisierungsrate deutlich höher, aber mit einem höheren Zeitaufwand verbunden. Dies ist durch die benutzerdefinierten und angepassten Isolierungsparameter jeder Aspiration einer CTC bedingt. Der ISET-Filter bietet die Möglichkeit von 12 gleichzeitigen Filtrationen auf einem Objektträger. Diese Spots können anschließend getrennt werden und die dort separierten CTCs unterschiedlich aufgearbeitet werden. Die gewonnenen CTCs einer Patientenprobe können demnach, je nach wissenschaftlicher Fragestellung, unterschiedlich analysiert werden. Physikalische Verfahren zur Separation von EpCAM-negativen CTCs haben den Nachteil der Kontamination von anderen Blutbestandteilen mit einer Hintergrundimmunfluoreszenz nach anschließender Immunfluoreszenzfärbung. Kontaminationen von z.B. tumorassoziierten Fibroblasten werden aber durchaus auch bei EpCAM-basierten Nachweisverfahren von CTCs beschrieben. In weiteren Untersuchungen zeigten sich Hinweise auf eine tumorbiologische Aussagekraft dieser Zellpopulation (62). In der vorliegenden Arbeit konnte die Kontamination und Hintergrundimmunfluoreszenz nach den beschriebenen Waschvorgängen auf dem VyCap-Filter deutlich minimiert werden und EpCAM-negative CTCs isoliert werden. Die isolierten Zellen konnten anschließend mikroskopisch auf der Ablage wiedergefunden werden. Durch das Verfahrensprotokoll konnten CTCs der Überstandssuspension des CellSearch-Systems von Mammakarzinom-Patientinnen als Einzelzellen isoliert werden. Beide Verfahren zur Einzelzellisolierung der Filtermembranen sind zeitaufwändig und fordern spezielle Kenntnisse. Die routinemäßige Anwendung der Methodiken in einem größeren Patientenkollektiv ist daher zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung noch nicht möglich.

Problem der größenbasierten Anreicherung von CTCs durch Filtersysteme stellt die Balance zwischen der Adhäsion der Zellen auf der Filtertechnologie und der anschließenden Lösung dieser Zellen für die Einzelzellisolierung dar. Durch die Verwendung des Parsortix™ Systems, zur Marker-unabhängigen Zellisolierung, können Zellen durch ihre Größe und Verformbarkeit angereichert, automatisch gefärbt, detektiert und isoliert werden. Hvizia *et al.* beschrieben bei den Testversuchen von Zelllinien eine Detektionswahrscheinlichkeit der Zellen von 42-70 %. Die Isolierungsrate lag bei 54-59 % mit 99 % vitaler Zellen für die molekulargenetischen Untersuchungen (63). Dieses Verfahren nimmt einen hohen Zellverlust für die Lebensfähigkeit der Zellen und die Reinheit der isolierten Probe, also die Bereinigung von Leukozyten (Proben

n= 6, 200-6000 Leukozyten), in Kauf. In dieser Arbeit wird die hohe Reinheit der Isolierungsprobe des VyCap- und ISET-Filters durch gezielte Aspiration der CTC unter mikroskopischer Sicht des CellCelectors erreicht.

Die ermittelten Zellgrößen von CTCs variieren, sodass bei der Verwendung eines Filtersystems die optimale Porengröße gewählt werden muss um einen Verlust der CTCs und eine niedrige Kontaminationsrate von anderen Blutzellen zu erreichen. Im Vordergrund der physikalisch basierten Isolierungsverfahren steht die Verbesserung ihrer Effizienz. Dazu untersuchte eine Studie die Detektionsrate von Kontrollkrebszellen in gesunden Blutproben des Parsortix™ Systems. Beschrieben wurde eine Erfassungsrate der Zellen von etwas mehr als 50 %. Zum Vergleich dieser Methodik mit dem Isoflux- und CellSearch-System erfolgte anschließend die CTC-Detektion aus Blutproben von Prostatakarzinom-Patienten und es konnten aus 7,5 ml der Blutproben von 10 Prostatakarzinom-Patienten eine vergleichbare Anzahl von CK-positiven CTCs gewonnen werden (Durchschnitt 33,8) (64). In einer weiteren Arbeit wurden EpCAM-positive und -negative CTCs in Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen als Einzelzellen isoliert und analysiert. Das EpCAM-abgereicherte Blut des CellSearch-Systems wurde mit dem Parsortix™-System weiterverarbeitet und die detektierten CTCs anschließend mit dem CellCelector als Einzelzellen isoliert. In einem *Spiking-Experiment* mit der MCF-7-Brustkrebszelllinie konnte eine durchschnittliche Erfassungsrate für MCF-7-Zellen, nach dem Transfer der Probe aus den Parsortix™-Kassetten, von $63 \pm 17,8$ % und eine Rate für die Einzelzellisolierung von $72 \pm 29,6$ % erreicht werden (53). Für den Vergleich der in dieser Arbeit etablierten Methoden zur Einzelzellisolierung von Filtermembranen zu anderen Isolierungsverfahren bedarf es noch weiteren experimentellen Studien. Eine Aussage zur Effizienz kann daher aktuell noch nicht abschließend getroffen werden.

Neben den Verfahren zur EpCAM-unabhängigen Isolierung von CTCs, anhand ihrer morphologischen Eigenschaften, verwenden andere Methoden weitere Krebszellmarker zur Anreicherung dieser Zellpopulation. Schneck *et al.* entwickelten eine EpCAM-unabhängige Anreicherung von CTCs mit immunomagnetischen *Beads* gegen CD49f und Trop2. Die angereicherte und gefärbte Probenfraktion aus dem EpCAM-depletierten Patientenblut von Mammakarzinom-Patientinnen wurde mit dem CellCelector auf CKpos/CD45neg-Ereignisse untersucht und diese als Einzelzellen isoliert (65). In dieser Arbeit wurden anschließend die magnetischen *Beads* von den CTCs abgelöst und eine aCGH der Einzelzellen durchgeführt. Vorteil dieser Methodik ist der im Vergleich zu anderen Verfahren niedrigere Kostenaufwand. Es ist aber bereits bekannt, dass durch die Anwendung von Trypsin in höherer Konzentration die Oberflächenmarker der Zellmembran und eine mögliche Detektion dieser durch die Immunzytochemie nicht mehr möglich ist. Dies kann zu veränderten Ergebnissen in den untersuchten Expressionsprofilen der CTCs führen (66). Weitere Antikörper-basierte CTC-

Isolierungen verwenden das rekombinierte Malariaprotein (rVAR2) zur Anreicherung von CTCs. Das rVAR2 bindet an onkofetales Chondroitinsulfat, welches auf epithelialen und mesenchymalen Krebszellen exprimiert wird und sich in seiner Expression während der EMT nicht ändert (67). In einer Arbeit zur Optimierung der Isolierung von Krebszellen durch rVAR2-beschichtete magnetische *Beads* mittels der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der Zellisolierung maßgeblich von der Art der Anreicherungsmethode, dem Protein-*Bead*-Verhältnis und der Zellsuspension (Puffer oder Blut) abhängt. Die gefärbten Zellen einer Zelllinie wurden vorher unter dem Mikroskop manuell gezählt und anschließend, nach Anreicherung der *Beads*, mit der durch die Durchflusszytometrie ermittelte Zellzahl verglichen. Es konnte durch die Verfahrensoptimierung in den *Spiking*-Experimenten eine Wiederfindungsrate von 98 % der Zellen erreicht werden (68). Diese vielversprechenden Daten müssen in weiteren experimentellen Studien, im Hinblick auf ihre klinische Relevanz, geprüft und optimiert werden. Um die Wiederfindungsrate von CTCs in der vorliegenden Arbeit ermitteln zu können bedarf es weiteren *Spiking*-Experimenten, mit dem Vergleich der Detektionsrate von CTCs in der Suspension vor der Filtration und der Detektionsrate nach der Filtration auf der Filtermembran. Anschließend kann diese Technologie bereits etablierten Isolierungsmethoden gegenübergestellt werden.

Insgesamt zeigte sich, dass der manuelle und serielle Prozess der entwickelten Technologie zur Gewinnung der einzelnen Zellen im Vergleich zur Durchflusszytometrie zu einer Einschränkung des Gesamtdurchsatzes führt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Apheresatproben von Mammakarzinom-Patientinnen höhere Zahlen an CTCs, mit dem Nachteil einer verstärkten Kontamination anderer Blutzellen, detektiert und isoliert werden können. Die Vollblutprobe beinhaltet im Durchschnitt weniger CTCs mit einer geringeren Kontamination von anderen Blutzellen. In zukünftigen Untersuchungen muss daher der Gesamtvorteil einer Probenart für die Filtration herausgefunden werden. Mit der Kombination von Filtersystemen zur Isolierung von CTCs durch die Größenselektion und der Mikromanipulation des CellCelector-Systems war es in Einzelversuchen in dieser Arbeit möglich EpCAM-positive und -negative CTCs als Einzelzellen zu isolieren. Es konnte eine geeignete Verknüpfung der Filtersysteme, der Immunfluoreszenzfärbung und des Isolierungsvorgangs des CellCelectors entwickelt werden, um eine größere Isolierungsrate der CTCs im Vergleich zu anderen Technologien zu erreichen. Limitierend in dieser Arbeit war die eingeschränkte Verfügbarkeit von wertvollen Blutproben von Mammakarzinom-Patientinnen. Für die Reproduzierbarkeit, die Effizienzanalyse der entwickelten Methoden zur Einzelzellisolierung aus *Cartridges* des CellSearch-Systems und der Filterung des Suspensionsüberstands durch den VyCap- und ISET-Filter für eine mögliche klinische Anwendung, ist die Aufarbeitung von höheren Fallzahlen an Patientenproben notwendig.

4.4 Immunzytochemische Charakterisierung von CapG

Es werden immer mehr Verfahren zur Charakterisierung von CTCs als Einzelzellen etabliert. Grund hierfür ist die nachgewiesene Diversität der einzelnen disseminierten Tumorzellen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression des Cytoskelett-Modulators *macrophage capping protein* (CapG) mit der Invasivität von Tumorzellen korrelierte (44). Es wäre also denkbar, dass die Tumorzellen, die in das periphere Blut von Mammakarzinom-Patientinnen disseminieren und nachweisbar sind, auch CapG exprimieren. Durch den CellCelector auf Haftobjektträger abgelegte, vereinzelte CTCs aus Patientenproben des CellSearch-Systems wurden, nach etabliertem Protokoll, immunzytochemisch mit dem Antikörper CapG gefärbt. Durch die Waschvorgänge der Immunfluoreszenzfärbung auf dem Objektträger wurde mit der Fixierung des CellSearch-Systems ein Zellverlust von 7 % verzeichnet. Bei den 124 abgelegten und gefärbten CTCs aus 14 *Cartridges* konnten bei 86 % der Zellen eine CapG-Expression durch die Antikörperfärbung nachgewiesen werden. In 9/16 *Cartridges* von Patientinnen konnten nur CTCs mit einem CapG-positiven Signal dargestellt werden. In 7/16 *Cartridges* von Mammakarzinom-Patientinnen zeigte sich eine Variabilität der CapG-negativen Zellen von 10-40 %. Die Untersuchungen erfolgten bei Proben von Patientinnen mit einer metastasierten Brustkrebserkrankung in denen eine höhere CTC-Ausbeute zu verzeichnen ist. Interessant wäre die vergleichende Analyse der CapG-positiven und -negativen CTCs bei Patientenproben mit einer lokalen Erkrankung. Diese Untersuchung bietet eine vielversprechende Aussicht auf die Variabilität einer CapG-Expression im Hinblick auf das Tumorstadium. Kann ein erhöhtes invasives Potential der CTCs mit der Expression von CapG korreliert werden? Für gezielte Aussagen dieses denkbaren Zusammenhangs sind Untersuchungen an mehreren Patientinnen notwendig, denn diese kleine Stichprobe spiegelt nur einen Teil der CTC-Expressionsprofile wider und könnte verzerrt sein. Klinische Daten der Patientinnen könnten mit dem immunzytochemischen Expressionsprofil und anderen Oberflächenmarkern der vereinzelten CTCs verglichen werden. Kann das Expressionsmerkmal CapG bereits schon früh ein Risiko für eine Metastasierung vorhersagen?

Es konnte bei den meisten CTCs ein vergleichbar starkes Immunfluoreszenzsignal zu der BT-20-Zelllinie dargestellt werden. Nur wenige CTCs zeigten eine schwächere detektierte Immunfluoreszenzfärbung. Kritisch zu bewerten ist die fehlende systematische Unterscheidung der Intensitätsstärken der Fluoreszenzfärbung. Mit einem entwickelten Farbscore könnte in zukünftigen Untersuchungen die Expressionsausprägung von CapG anhand der Intensität der Immunfluoreszenzfärbung analysiert werden. Eine klinische Relevanz dieser Unterscheidung und die Korrelation zum Invasivitätspotential mit der Ausbildung von Metastasen wäre denkbar. Zudem wäre es interessant auch EpCAM-negative

CTCs auf ihre CapG-Expression zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden lediglich EpCAM-positive CTCs aus Patientenproben der *Cartridges* des CellSearch-Systems für den Marker CapG angefärbt. Vielleicht würde sich die CapG-Expression von den EpCAM-negativen CTCs, die im Zusammenhang mit einer Therapieresistenz stehen, von der der EpCAM-positiven CTCs unterscheiden. Durch die immunzytochemische Charakterisierung können EMT- oder CSC-Merkmale von CTCs der Filtersysteme, mit unbekanntem Phänotyp, dargestellt werden. Die Anreicherung dieser Zellpopulation ist jedoch, wie in dieser Arbeit bereits beschrieben, deutlich schwieriger. Die CapG-Expression der CTCs in einer Patientenprobe könnte zudem mit weiteren Expressionsprofilen durch die Immunfluoreszenzfärbung verglichen oder mit einer molekularen Analyse von den CTCs bewertet werden.

4.5 Molekulare Downstream-Analyse von CTCs als Einzelzellen

Stoecklein und Klein *et al.* konnten bereits einen genetischen Unterschied von Primärtumoren, CTCs und Metastasen nachweisen (69). Da die Metastasen für eine Biopsie nicht immer zugänglich sind, könnten die CTCs diese als Flüssigkeitsbiopsie ergänzen. Man geht davon aus, dass sich auch das Expressionsprofil der CTCs von dem des Primärtumors unterscheidet und dadurch neue Angriffspunkte für die Krebstherapie enthüllt werden können. Einige Studien beschrieben die Expression von unterschiedlichen krebsspezifischen Antigenen von CTCs und des Primärtumors (70). Durch die bereits nachgewiesene Heterogenität der CTCs kann vermutet werden, dass sich die CTCs in ihrer Bedeutung für die Metastasierung unterscheiden. Vielleicht sind einige Subpopulationen der CTCs irrelevant für die Entwicklung von Tumorgewebe an anderen Lokalisationen und nur ein bestimmter CTC-Typ hat das Potential Metastasen zu bilden. Wichtig herauszufinden ist, ob die spät vom Primärtumor disseminierenden CTCs, mit einer Ähnlichkeit zum Primärtumor, oder die CTCs mit dem genetischen Unterschied zum Primärtumor für die Metastasenbildung verantwortlich sind. Es existieren bereits klinische Studien basierend auf diesem Ansatzpunkt, z.B. die *DETECT IV*-Studie. Die Studie untersucht die Effektivität einer anti-HER2/neu-zielgerichteten Therapie bei Patientinnen mit HER2/neu-positiven, zirkulierenden Tumorzellen. Für die Zukunft könnten auch genetische Mutationen der CTCs bedeutend für die Therapieentscheidung sein. Für die genomische Analyse der CTCs als Einzelzellen müssen diese zunächst detektiert, isoliert und vereinzelt werden. Anschließend muss die DNA dieser Zellen mit einer hohen Qualität amplifiziert werden können. Es ist wichtig, dass die Qualität der DNA der Zellen erhalten bleibt und diese nicht durch die Zellfixierung und der Immunfluoreszenzfärbung beeinträchtigt wird. Zunächst wurden die WGA isolierter Zellen des CellSearch- und CellCelector-Systems von Zelllinien aus gesundem Patientenproben und hinterher von isolierten CTCs aus Patientenproben von Mammakarzinom-Patientinnen durchgeführt. Es konnte in dieser Arbeit

gezeigt werden, dass es möglich war eine gute und ausreichende Qualität der DNA von isolierten Einzelzellen einer Zelllinie, sowie der CTCs aus Patientenproben zu erreichen. In den durchgeführten Qualitätskontrollen des Ampli1™ WGA-Kits konnten bei den WGA-Produkten in der Gelelektrophorese 4/4 Banden dargestellt werden. Dieses Bandenprofil spricht für eine gute Qualität der DNA der Einzelzellen. Durch die entwickelte Technologie zur Einzelzellisolierung wurde die DNA-Qualität der Einzelzellen nicht beeinflusst. Mit dem Nachweis einer guten Qualität in der QC-Testung ist es möglich ein „*Next-Generation-Sequencing*“ im Anschluss durchzuführen. Polzer *et al.* konnten bei der molekulargenetischen Einzelzellanalyse mit Hilfe des CellSearch-Systems zur Detektion der CTCs, der DEPArray™-Technologie (Silicon Biosystems SpA) zur Einzelzellisolierung und dem Ampli1™ WGA-Kit zur Durchführung der WGA demonstrieren, dass die DNA-Qualität der Einzelzellen variabel war (54). Diese Beobachtung konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden. Durch die bildmorphologische Beurteilung der Zellen vor dem Isolierungsvorgang im CellCelector konnte diese in den Einzelversuchen zu der WGA-Qualität korreliert werden. In den Versuchen dieser Arbeit korrelierte eine gute WGA-Qualität mit einer bildmorphologisch guten Darstellung der CTCs. Eine intensiv immunfluoreszierende, runde, große CTC zeigte in hoher Wahrscheinlichkeit eine gute Qualität im QC-Test nach der WGA (s. Abb. 63/64, Pat DIII 7). Grund für eine erschwerte genomische Analyse von CTCs könnten bereits nachgewiesene DNA-Strangbrüche, ohne den Nachweis eines künstlichen Einflusses, bei apoptotischen CTCs sein (71). Im Vergleich zu anderen Arbeiten fiel auf, dass in manchen Veröffentlichungen der *Cut-Off* der Bandenzahl (2 Banden) für den Ausdruck einer guten WGA-Qualität in der QC-Testung herabgesetzt wurde (54). Eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen zu anderen Publikationen ist daher erschwert. Allgemein schwanken die Daten der Qualitätsangaben für hochwertige WGA-Produkten der CTCs.

Auch in dieser Aufarbeitung von Patientenproben mit dem *Workflow* zur Einzelzellisolierung und anschließender WGA, zeigte sich eine hohe Diversität der DNA-Qualität der Einzelzellen. Bei der Auswertung von 32 Patientenproben, wurde bei 95 CTCs eine WGA durchgeführt. Die Bewertung eines hochwertigen WGA-Produktes wurde in dieser Arbeit bei > 3 Banden in der Gelelektrophorese der Qualitätskontrolle belassen. 24 % der WGA-Produkte der CTCs konnten eine gute Qualität aufweisen und zeigten > 3 Banden in der QC-Testung. Dieses Ergebnis ist vergleichbar oder sogar besser als in bereits beschriebenen Veröffentlichungen. Mit dieser Ausbeute ist die Gewinnung von hochwertigen DNA-Amplifikationen dennoch bei Patientenproben < 5 CTCs erschwert. 76 % der WGA-Produkte zeigten < 3 Banden in der QC-Testung und somit eine niedrigere DNA-Integrität. Es ist aber möglich die WGA-Produkte von CTCs mit niedriger DNA-Qualität für gezielte PCR-basierte Mutationsanalysen zu verwenden. Interessant wäre es, den PIK3CA-Mutations-Status der vereinzelt CTCs und die Mutationsfrequenz von CTCs einer Patientenprobe zu analysieren. Es wurde bereits ein

Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber einer anti-HER2/neu-Therapie und der Mutation im PI3KCA-Gen beschrieben (72) (73). Der Vorteil der Verwendung des Ampli1™ WGA-Kits ist die Möglichkeit der Analyse von Amplifikationen mit geringer DNA-Qualität, die die Hot-Spot-Regionen von PIK3CA Exon 9 und Exon 20 beinhalten.

Durch die molekularbiologische Analyse der CTCs auf der Einzelzellebene können, im Vergleich zu der Amplifikation von CTC-Fraktionen mit dem Hintergrund anderer Blutzellen (38), zelluläre Mutationen gezielt untersucht werden. Auf Grund der kleinen Stichprobengröße sind weitere Downstream-Analysen mit den isolierten Einzelzellen durch das in dieser Arbeit etablierte Verfahren notwendig um die Qualität der DNA-Produkte abschließend mit Ergebnissen anderer Publikationen vergleichen zu können.

4.6 Wissenschaftlicher Mehrwert der etablierten Methode

4.6.1 Zusammenfassung

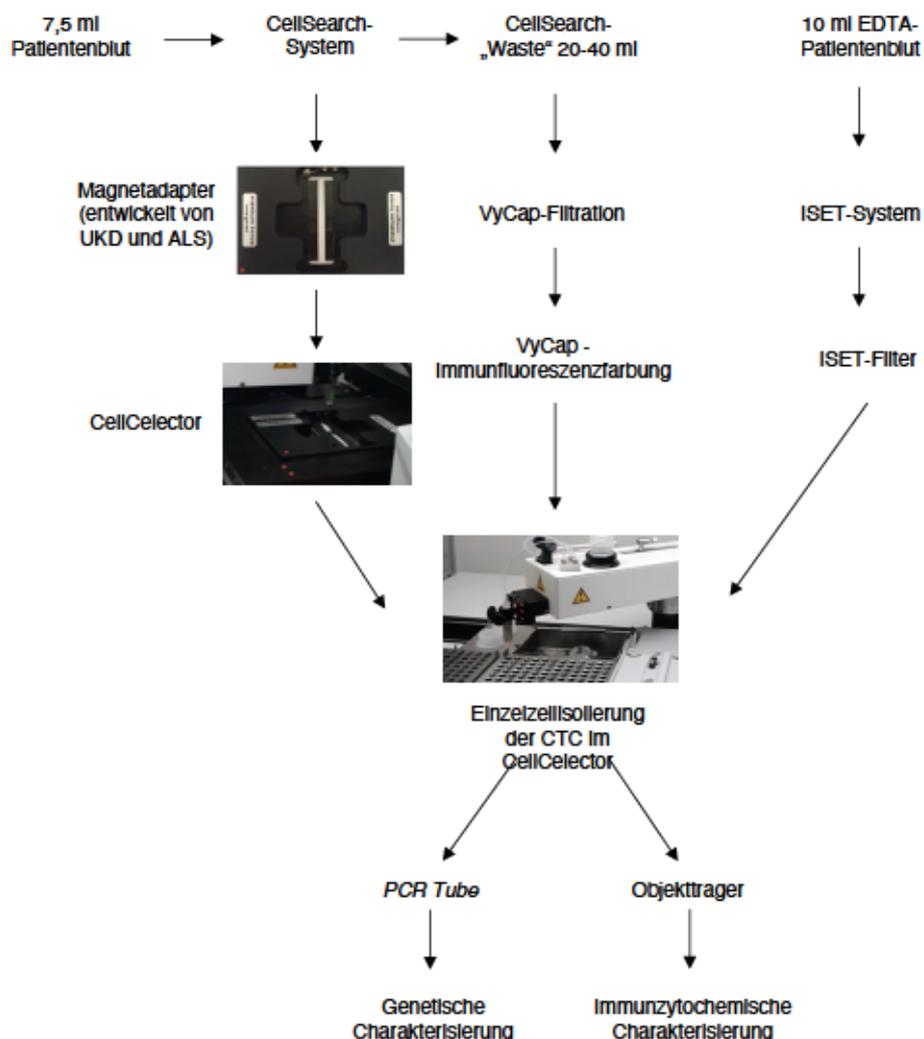


Abb. 65: Schematische Darstellung der Methodenentwicklung zur Einzelzellisolierung EpCAM-positiver CTCs in Suspensionen und/oder negativer CTCs von Oberflächen. CTC: zirkulierende Tumorzelle; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; PCR: Polymerase-Kettenreaktion

Die Protokolle zur Anreicherung, Detektion und Einzelzellisolierung von CTCs haben, je nach wissenschaftlicher Fragestellung, ihre Vor- und Nachteile. Das CellSearch-System ist durch klinische Studien validiert und von der FDA zugelassen, hingegen kann die aggressive mesenchymale CTC-Population nicht detektiert werden. Das VyCap- und ISET-Filtersystem bietet eine hohe Flexibilität gegenüber Studienprotokollen, besitzt aber noch keine Zulassung für klinische Studien auf Grund einer fehlenden Validierung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Methodenentwicklung als Grundlage für weitere Optimierungsarbeiten zur Einzelzellisolierung von CTCs verwendet werden kann.

4.6.2 Aktuelle Anwendung der etablierten Methode zur Einzelzellisolierung

Da die hier vorliegende Arbeit im Jahr 2014 begonnen wurde, ist es möglich ihren technologischen und wissenschaftlichen Mehrwert zu prüfen. Die entwickelte Methode, aus der Kombination des CellSearch- und CellCelector-Systems zur Einzelzellisolierung von EpCAM-positiven CTCs, konnte in einer multiparametrischen Studie zum Nachweis von klinisch relevanten Mutationen der CTCs durch die WES (*Whole Exome Sequencing*) von amplifizierter DNA in einer Arbeit von A. Franken *et al.* Anwendung finden. Es konnten bei allen in der Arbeit eingeschlossenen Patientinnen Mutationen der CTCs detektiert werden, für die bereits eine zielgerichtete Therapieoption besteht und die sich von dem Primärtumor unterscheiden (74).

Die Herausforderung der CTC-Detektion durch den VyCap-Filter, im Vergleich zum CellSearch-System, wurde auch in einer Arbeit von M. Tamminga *et al.* gezeigt. Die Produkte der diagnostischen Leukapherese von NSCLC-Patienten wurden durch die VyCAP-*microsieves* gefiltert und anschließend mit den detektierten CTCs im CellSearch-System verglichen. Die Detektionsrate von CTCs war im CellSearch-System signifikant höher ($P=0,05$). Ähnlich wie in dieser Methodenentwicklung zeigten sich Verunreinigungen und Verstopfungen der Filtermembran, welche die Detektion der CTCs einschränkten (75). Im Gegensatz dazu konnten Kitz *et al.* in ihrer Veröffentlichung eine Überlegenheit der EMT-unabhängigen CTC-Detektion mit dem VyCap-Filter nachweisen. Die Detektionsrate der mesenchymalen und epithelialen CTCs in einem *Spiking-Experiment* von MDA-MB-468-Brustkrebszellen (epithelialer Ursprung) und humane PC-3-Prostatakrebszellen (mesenchymaler Ursprung) in Mäuseblut war mit dem VyCap-Filter im Vergleich zu dem CellSearch-System signifikant höher. Dieses Ergebnis konnte in einem anschließenden präklinischen Mausmodell validiert werden (76).

4.7 Schlussbetrachtung: Die Bedeutung der CTC-Einzelzellanalyse

Die Bedeutung der CTCs für die Tumorbilogie und die Zukunft der personalisierten Therapie spiegelt sich in der Forschung an neuen Technologien zur Einzelzellisolierung und Charakterisierung dieser Tumorzellen wider (77). Die Verfahren müssen im Hinblick auf die geforderten Ansprüche einer hohen Wiederfindungs- und Isolierungsrate, der Reinheit der isolierten Probe und einer ausreichenden Qualität der Einzelzellen für weitere Analyseverfahren entwickelt werden. Mit der Etablierung von neuen Verfahren zur Einzelzellisolierung müssen zukünftig die verschiedenen Isolierungsmethoden, anhand ihrer Sensitivität und Spezifität, miteinander verglichen werden. Im Gegensatz zu der bereits validierten CellSearch-Methode müssen die Arbeitsabläufe der Detektion von CTCs durch die Filtersysteme zukünftig noch weiter optimiert werden. Sie bieten ein hohes Potential für weitere Forschungen durch ihre EMT-unabhängige Isolierung von CTCs und ihrer hohen Flexibilität für molekulare Analysen. Dabei ist es wichtig die Methodik nicht nur mit Zelllinien zu prüfen, denn die Aufarbeitung von Patientenproben kann das Verfahren mit ihrer Variabilität vor neue Problematiken stellen.

Es ist bereits möglich die minimal-invasive „liquid biopsy“, den Nachweis und die Zählung der CTCs einer Mammakarzinom-Patientin, für eine Überwachung des Tumorprogresses zu nutzen (39). Durch die CTC-Bestimmung können Aussagen über eine mögliche Metastasierung, eine Tumorprogression oder das Rezidivrisiko und gleichzeitig das Ansprechen einer Krebstherapie getroffen werden. Die randomisierte, klinische STIC-CTC-Studie untersucht einen möglichen Nutzen zur Festlegung der Erstlinienbehandlung bei Hormonrezeptor-positivem und HER2/neu-negativem metastasiertem Brustkrebs auf der Grundlage des Nachweises von zirkulierenden Tumorzellen im Vergleich zur Therapieentscheidung durch den behandelnden Arzt/Ärztin. Aktuell veröffentlichte Ergebnisse von Bidard *et al.* auf dem Jahrestreffen der „American Society of Clinical Oncology“ (ASCO) 2022 deuten nach einer Nachbeobachtungszeit von fünf Jahren auf ein besseres Gesamtüberleben der Patientinnen durch die Erstlinientherapie, basierend auf dem Nachweis von CTCs, hin. Als Biomarker kann die Bestimmung der CTC-Anzahl die Therapieentscheidung zwischen einer endokrinen Therapie und einer Chemotherapie beeinflussen (3). In Zukunft können die erstellten molekularen Profile der heterogenen Subpopulationen von CTCs durch die Einzelzellisolierung mit der Anzahl der detektierten CTCs in einer Blutprobe verglichen werden und eine noch gezieltere Vorhersage der Tumorprogression getroffen werden. Durch die Erstellung von Genexpressionsprofilen der Einzelzellen können Zellsubtypen (Klone) mit bestimmten Genmutationen erkannt werden, die hauptsächlich für die Invasivität, den Tumorprogress und für eine mögliche Resistenz gegenüber einer Tumorthherapie verantwortlich sind (78). Durch verschiedene neu etablierte

Sequenziermethoden kann das gesamte Genom einer einzigen CTC amplifiziert und analysiert werden (79). Für die Zukunft können mit der Entwicklung der Einzelzellisolierung EpCAM-positiver und -negativer CTCs aus einer Patientenprobe die Subpopulationen gezählt und die Expressionsprofile erforscht und verglichen werden. Das Expressionsprofil der CTCs kann dann mit dem Status der Krebserkrankung und dem Expressionsprofil des Primärtumors korreliert werden. Vielleicht ist es sogar irgendwann möglich, dass die „liquid biopsy“ die Metastasen-Biopsie ersetzt oder als wirkungsvoller eingestuft wird. Denn diese Flüssigkeitsbiopsie ist immer verfügbar und auch bei einer technisch unmöglichen Metastasen-Biopsie durchführbar. Herausfordernd ist die Anpassung der Einzelzelltechnologien an Patientenproben mit einer geringen Anzahl von CTCs und ihre klinische Praktikabilität. Nützlich könnte dieser Fortschritt im klinischen Alltag für eine mögliche „Vorsorgeuntersuchung“ bei Risikopatientinnen sein. Für diese Anwendung muss es durch das Verfahren möglich sein einen hohen Durchsatz von Patientenproben für die Gewinnung von CTCs anreichern, isolieren und analysieren zu können. Vielleicht ist es möglich bereits eine geringe Anzahl an CTCs bei asymptomatischen Patientinnen nachzuweisen und anhand ihrer Einzelzellcharakterisierung ein Tumorgeschehen und das Risiko für einen Progress oder eines Rezidivs der Erkrankung zu beurteilen. Der sensitive Nachweis und die Isolierung von einer sehr geringen Anzahl von CTCs im Patientenblut steht daher im Fokus aktueller Forschung (80).

5 Literaturverzeichnis

1. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781-91.
2. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):404.
3. Bidard FC, Jacot W, Kiavue N, Dureau S, Kadi A, Brain E, et al. Efficacy of Circulating Tumor Cell Count-Driven vs Clinician-Driven First-line Therapy Choice in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2021;7(1):34-41.
4. Robert Koch-Institut. Zentrum für Krebsregisterdaten (Brustkrebs). https://www.krebsdatende.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html. 2019.
5. Katalinic A, Eisemann N, Kraywinkel K, Nofzt MR, Hubner J. Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program. *Int J Cancer*. 2019.
6. Heidelberg DK. Krebsinformationsdienst: Brustkrebs: Informationen für Patientinnen, Angehörige und Interessierte [Available from: <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs>.
7. Empfehlungen A. „Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer“. April 2022.
8. Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, Stangner K, Müller GA, Engeland K. Ki-67 gene expression. *Cell Death Differ*. 2021;28(12):3357-70.
9. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1656-64.
10. Gesundheitswesen IfQuWi. Biomarkerbasierte Tests zur Entscheidung für oder gegen eine adjuvante systemische Chemotherapie beim primären Mammakarzinom, Abschlussbericht D14-01. 2016.
11. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
12. Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (DKG) DGfGuGD. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 06/2021.
13. Statistisches Bundesamt (Destatis) SB. Todesursachenstatistik Deutschland. 12/2022.
14. Guidelines Breast Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.; 2020 [Available from: https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/_leitlinien/kommission_mamma/2020/PDF_DE/2020D%2002_Brustkrebsrisiko%20und%20Praevention.pdf.
15. Sun YF, Yang XR, Zhou J, Qiu SJ, Fan J, Xu Y. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(8):1151-73.
16. Neumann MH, Schneck H, Decker Y, Schömer S, Franken A, Endris V, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells using a novel workflow combining the CellSearch(®) system and the CellCelector(™). *Biotechnol Prog*. 2017;33(1):125-32.
17. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897-904.
18. Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):274-84.
19. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-8.

20. Banys-Paluchowski M, Reinhardt F, Fehm T. Disseminated Tumor Cells and Dormancy in Breast Cancer Progression. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1220:35-43.
21. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell.* 2009;139(7):1315-26.
22. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(8):793-802.
23. Balic M, Williams A, Lin H, Datar R, Cote RJ. Circulating tumor cells: from bench to bedside. *Annu Rev Med.* 2013;64:31-44.
24. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J.* 1869;14:146.
25. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):453-8.
26. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res.* 2002;8(7):2073-84.
27. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood.* 1993;82(9):2605-10.
28. Lin HK, Zheng S, Williams AJ, Balic M, Groshen S, Scher HI, et al. Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2010;16(20):5011-8.
29. Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol.* 2007;171(2):386-95.
30. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(5):329-40.
31. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007;13(3):920-8.
32. Choesmel V, Pierga JY, Nos C, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Thiery JP, et al. Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance. *Breast Cancer Res.* 2004;6(5):R556-70.
33. Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, et al. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res.* 2009;11(4):R59.
34. Theil G, Boehm C, Fischer K, Bialek J, Hoda R, Weber E, et al. In vivo isolation of circulating tumor cells in patients with different stages of prostate cancer. *Oncol Lett.* 2021;21(5):357.
35. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol.* 2000;156(1):57-63.
36. Barradas AM, Terstappen LW. Towards the Biological Understanding of CTC: Capture Technologies, Definitions and Potential to Create Metastasis. *Cancers (Basel).* 2013;5(4):1619-42.
37. Fischer JC, Niederacher D, Topp SA, Honisch E, Schumacher S, Schmitz N, et al. Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(41):16580-5.
38. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Utkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007;450(7173):1235-9.

39. Giuliano M, Giordano A, Jackson S, De Giorgi U, Mego M, Cohen EN, et al. Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination. *Breast Cancer Res.* 2014;16(5):440.
40. Magbanua MJM, Swigart LB, Wu HT, Hirst GL, Yau C, Wolf DM, et al. Circulating tumor DNA in neoadjuvant-treated breast cancer reflects response and survival. *Ann Oncol.* 2021;32(2):229-39.
41. Fabbri F, Carloni S, Zoli W, Ulivi P, Gallerani G, Fici P, et al. Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs. *Cancer Lett.* 2013;335(1):225-31.
42. Novak J, Georgakoudi I, Wei X, Prossin A, Lin CP. In vivo flow cytometer for real-time detection and quantification of circulating cells. *Opt Lett.* 2004;29(1):77-9.
43. Riethdorf S, O'Flaherty L, Hille C, Pantel K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2018;125:102-21.
44. Condeelis J, Singer R, Segall J. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:695–718.
45. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov.* 2016;6(5):479-91.
46. Kujur PK, Flores BCT, Ramalingam N, Chinen LTD, Jeffrey SS. Advances in the Characterization of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer: Single Cell Analyses and Interactions, and Patient-Derived Models for Drug Testing. In: Piñeiro R, editor. *Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Metastatic Disease.* Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 61-80.
47. Bidard FC, Michiels S, Riethdorf S, Mueller V, Esserman LJ, Lucci A, et al. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(6):560-7.
48. Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115(3):581-90.
49. De Luca F, Rotunno G, Salvianti F, Galardi F, Pestrin M, Gabellini S, et al. Mutational analysis of single circulating tumor cells by next generation sequencing in metastatic breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7(18):26107-19.
50. Ståhlberg A, Bengtsson M. Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Methods.* 2010;50(4):282-8.
51. Blassl C, Kuhlmann JD, Webers A, Wimberger P, Fehm T, Neubauer H. Gene expression profiling of single circulating tumor cells in ovarian cancer - Establishment of a multi-marker gene panel. *Mol Oncol.* 2016;10(7):1030-42.
52. Ruiz-Rodríguez AJ, Molina-Vallejo MP, Aznar-Peralta I, González Puga C, Cañas García I, González E, et al. Deep Phenotypic Characterisation of CTCs by Combination of Microfluidic Isolation (IsoFlux) and Imaging Flow Cytometry (ImageStream). *Cancers (Basel).* 2021;13(24).
53. Lampignano R, Yang L, Neumann MHD, Franken A, Fehm T, Niederacher D, et al. A Novel Workflow to Enrich and Isolate Patient-Matched EpCAM(high) and EpCAM(low/negative) CTCs Enables the Comparative Characterization of the PIK3CA Status in Metastatic Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).
54. Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F, Zorzino L, Pestka A, et al. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med.* 2014;6(11):1371-86.
55. Shaw JA, Guttery DS, Hills A, Fernandez-Garcia D, Page K, Rosales BM, et al. Mutation Analysis of Cell-Free DNA and Single Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Patients with High Circulating Tumor Cell Counts. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):88-96.
56. Piñeiro R, Martínez-Pena I, López-López R. Relevance of CTC Clusters in Breast Cancer Metastasis. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1220:93-115.

57. Di Trapani M, Manaresi N, Medoro G. DEPArray™ system: An automatic image-based sorter for isolation of pure circulating tumor cells. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2018;93(12):1260-6.
58. Lu Z, Moraes C, Zhao Y, You L, Simmons CA, Sun Y, editors. A micromanipulation system for single cell deposition. 2010 IEEE International Conference on Robotics and Automation; 2010 3-7 May 2010.
59. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.
60. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R46.
61. Joesse SA, Hannemann J, Spötter J, Bauche A, Andreas A, Müller V, et al. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res*. 2012;18(4):993-1003.
62. Mong J, Tan M-H. Size-Based Enrichment Technologies for Non-cancerous Tumor-Derived Cells in Blood. *Trends Biotechnol*. 2018;36(5):511-22.
63. Hvichia GE, Parveen Z, Wagner C, Janning M, Quidde J, Stein A, et al. A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. *Int J Cancer*. 2016;138(12):2894-904.
64. Xu L, Mao X, Imrali A, Syed F, Mutsvangwa K, Berney D, et al. Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138032.
65. Schneck H, Gierke B, Uppenkamp F, Behrens B, Niederacher D, Stoecklein NH, et al. EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144535.
66. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci*. 2010;17(1):36.
67. Agerbæk MØ, Bang-Christensen SR, Yang M-H, Clausen TM, Pereira MA, Sharma S, et al. The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner. *Nature Communications*. 2018;9(1):3279.
68. Sand NT, Petersen TB, Bang-Christensen SR, Ahrens TD, Løppke C, Jørgensen AM, et al. Optimization of rVAR2-Based Isolation of Cancer Cells in Blood for Building a Robust Assay for Clinical Detection of Circulating Tumor Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2401.
69. Stoecklein NH, Klein CA. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int J Cancer*. 2010;126(3):589-98.
70. Kalinsky K, Mayer JA, Xu X, Pham T, Wong KL, Villarin E, et al. Correlation of hormone receptor status between circulating tumor cells, primary tumor, and metastasis in breast cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(7):539-46.
71. Méhes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *The American journal of pathology*. 2001;159(1):17-20.
72. Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2015;7:111-23.
73. Dirican E, Akkiprik M, Özer A. Mutation distributions and clinical correlations of PIK3CA gene mutations in breast cancer. *Tumour Biol*. 2016;37(6):7033-45.
74. Franken A, Behrens B, Reinhardt F, Yang L, Rivandi M, Marass F, et al. Multiparametric Circulating Tumor Cell Analysis to Select Targeted Therapies for Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2021;13(23).
75. Tamminga M, Oomens L, Hiltermann TJN, Andree KC, Tibbe A, Broekmaat J, et al. Microsieves for the detection of circulating tumor cells in leukapheresis product in non-small cell lung cancer patients. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(4):1093-100.

76. Kitz J, Goodale D, Postenka C, Lowes LE, Allan AL. EMT-independent detection of circulating tumor cells in human blood samples and pre-clinical mouse models of metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2021;38(1):97-108.
77. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*. 2016;10(3):374-94.
78. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013;59(1):110-8.
79. Zahn H, Steif A, Laks E, Eirew P, VanInsberghe M, Shah SP, et al. Scalable whole-genome single-cell library preparation without preamplification. *Nat Methods*. 2017;14(2):167-73.
80. Li X, Zhang P, Dou L, Wang Y, Sun K, Zhang X, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients by Nanopore Sensing with Aptamer-Mediated Amplification. *ACS Sens*. 2020.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen großen Dank an all die Menschen aussprechen, die mich maßgeblich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Ohne den tatkräftigen Beitrag aus dem Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf und der Stärkung durch mein privates Umfeld wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Neubauer, der mir vor allem in den letzten Zügen, hervorragend und entgegenkommend in der fachlichen Ausarbeitung meiner Dissertation beigestanden hat. Ebenso danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Stoecklein, der meine Doktorarbeit als zweiter Gutachter betreut hat. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Niederacher für die wissenschaftliche Betreuung meiner ersten experimentellen Laborerfahrung, für das Vertrauen in mich zur neuen Methodenentwicklung und für die legendären Kicker-Turniere zwischen aufreibenden Labortätigkeiten.

Ich bedanke mich herzlichst bei Herrn Dr. Martin Neumann für die wertvolle Kooperation am CellCelector und für den täglichen wissenschaftlichen Input mit immer freundlichen Hilfestellungen. Es war mir jeden Tag eine Freude im „Aquarium“ über neuen Ideen zu brodeln. Allgemein möchte ich mich bei dem gesamten Team des Forschungslabors für die freundschaftliche Aufnahme, die praktischen Ratschläge und die aufmunternden Worte bei Misserfolgen auf dem gesamten Weg meiner experimentellen Tätigkeiten bedanken.

Der Düsseldorf *School of Oncology* möchte ich für das Stipendium und das spezielle Ausbildungsprogramm für Doktoranden danken. Als wissenschaftlicher Nachwuchs konnte ich mein Wissen im Bereich der Krebsforschung durch die qualitativ hochwertigen Ausbildungsangebote erweitern.

Ein großer Dank gebührt ebenso meinen Eltern, Silvia und Detlev Decker, für ihre Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation und im gesamten Studium. Außerdem möchte ich mich bei meinem Schwiegervater Prof. Dr. Hartmut Link, meinem Schwager Dr. Alexander Link, meiner Schwägerin Marcia Bohn und meinem Bruder Pascal Decker für das engagierte Korrekturlesen bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch die Gelegenheit nutzen meinem Ehemann, Dr. Andreas Link, meine unendliche Dankbarkeit auszudrücken. Durch ständige Ermutigungen und der liebevollen Begleitung, in manchmal nicht ganz einfachen Zeiten, wurde mir die Umsetzung der gesamten Arbeit erleichtert. Danke für diese Geduld und das Verständnis.