

Aus dem Charité Comprehensive Cancer Center
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nachweis zirkulierender Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie
bei Patientinnen mit Karzinom der Cervix uteri

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolin Denk

aus Berlin

Datum der Promotion: 14.09.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	8
Abstract	9
1. Einleitung	11
1.1. Zahlen und Fakten zum Zervixkarzinom	11
1.1.1. Epidemiologie	11
1.1.2. Tumorbilogie und Metastasierung	11
1.1.3. Früherkennung und Prävention	13
1.1.4. Therapie.....	14
1.2. Zirkulierende Tumorzellen	16
1.2.1. Methoden zur Anreicherung und Detektion zirkulierender Tumorzellen.....	17
1.2.1.1. CD45-Depletion.....	19
1.2.1.2. Durchflusszytometrie.....	19
1.2.2. Zirkulierende Tumorzellen beim Zervixkarzinom	21
1.2.3. Potentielle Marker zur CTC-Detektion beim Zervixkarzinom.....	22
1.2.3.1. EpCAM.....	22
1.2.3.2. Zytokeratine	22
1.2.3.3. EGFR	23
1.2.3.4. p16	23
1.2.3.5. Stammzellmarker	23
1.2.3.6. SPARC.....	23
1.2.3.7. EMMPRIN	24
1.2.3.8. TROP2	24
1.3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	24
2. Patienten, Material und Methoden	27
2.1. Material.....	27
2.1.1. Geräte.....	27
2.1.2. Laborzubehör.....	27
2.1.3. Chemikalien/ Verbrauchsmaterialien	28
2.2. Zellkultur.....	29
2.2.1. Zelllinien.....	29

2.2.2. Auftauen von Zellen.....	29
2.2.3. Prozessierung von Zellen	30
2.2.4. Einfrieren von Zellen.....	30
2.3. Patienten	30
2.4. Durchflusszytometrie	30
2.4.1. Probenvorbereitung	31
2.4.1.1. Zellfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern.....	31
2.4.1.2. Konzentrationsoptimierung von Antikörpern	33
2.4.1.3. Isolierung mononukleärer Blutzellen mittels Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation	33
2.4.1.4. CD45-Depletion.....	33
2.4.1.5. Spiking von Zellen einer Tumorzelllinie in Gesundblut	35
2.4.1.6. Vorbereitung von Patientenblutproben.....	36
2.4.2. Messung	36
2.4.2.1. Spannungs- und Verstärkereinstellungen	37
2.4.2.2. Kompensation	37
2.4.3. Auswertung.....	38
2.4.3.1. Konzentrationsoptimierung	39
2.4.3.2. Zelllinien und PBMCs	39
2.4.3.3. Spiking	39
2.4.3.4. Patientenblut	41
2.5. Immunhistochemie	41
2.6. Statistik.....	43
3. Ergebnisse.....	44
3.1. Etablierung eines Marker-Panels zum CTC-Nachweis	44
3.1.1. EpCAM	44
3.1.1.1. Konzentrationsoptimierung	44
3.1.1.2. Bestimmung der Sensitivität an Zelllinien	45
3.1.1.3. Bestimmung der Spezifität an PBMCs	46
3.1.2. Zytokeratine	46
3.1.2.1. Konzentrationsoptimierung	47
3.1.2.2. Bestimmung der Sensitivität an Zelllinien	47
3.1.2.3. Bestimmung der Spezifität an PBMCs	48
3.1.3. EGFR.....	48

3.1.3.1. Konzentrationsoptimierung	48
3.1.3.2. Bestimmung der Sensitivität an Zelllinien	50
3.1.3.3. Bestimmung der Spezifität an PBMCs	50
3.1.4. p16.....	51
3.1.4.1. Konzentrationsoptimierung	51
3.1.4.2. Bestimmung der Sensitivität an Zelllinien	52
3.1.4.3. Bestimmung der Spezifität an PBMCs	52
3.1.5. Weitere	53
3.1.5.1. Stammzellmarker	53
3.1.5.2. SPARC.....	54
3.1.5.3. EMMPRIN	55
3.1.5.4. TROP2	55
3.1.6. Markerpanel zur CTC-Detektion beim Zervixkarzinom.....	56
3.2. Spiking.....	56
3.2.1. Spiking mit SW620	56
3.2.2. Spiking mit SiHa	58
3.3. Patienten	62
3.3.1. Patientencharakteristika	62
3.3.2. CTC-Detektion im Blut.....	63
3.3.3. Gewebeproben	65
4. Diskussion.....	67
4.1. Kritische Überlegungen zur Methode der CTC-Detektion	68
4.1.1. Auswahl der Marker.....	68
4.1.2. Verfahren zur CTC-Anreicherung	70
4.1.3. Verfahren zur CTC-Detektion	71
4.2. Kritische Überlegungen zur klinischen Relevanz von CTCs	73
4.2.1. Zirkulierende Tumorzellen beim Zervixkarzinom	73
4.2.2. Zirkulierende Tumorzellen bei anderen soliden Tumoren	77
4.2.3. Liquid Biopsy	80
4.3. Fazit und Ausblick	81
5. Zusammenfassung	83
6. Literaturverzeichnis.....	85
7. Eidesstattliche Versicherung.....	95
8. Lebenslauf.....	96

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
APC	Allophycocyanin
BRAF	B-raf Protoonkogen (Serin-/Threoninkinase)
CA125	Cancer Antigen 125
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Zyklusabhängige Kinase (cyclin dependant kinase)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cfDNA	Zellfreie DNA (cell free DNA)
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie (cervical intraepithelial neoplasia)
CK	Zytokeratin (Cytokeratin)
CT	Computertomographie
CTC	Zirkulierende Tumorzelle (circulating tumour cell)
ctDNA	Zirkulierende Tumor-DNA (circulating tumour DNA)
CYFRA21-1	Zytokeratinfragment 21-1 (Cytokeratin Fragment 21-1)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
DTC	Disseminierte Tumorzelle (Disseminated Tumour Cell)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer
EpCAM	Epithelial Adhesion Molecule
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FDA	Food and Drug Administration
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HPV	Humanes Papillomvirus
IK	Isotypkontrolle
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LCS	Liquid Cover Slip
Mean	Durchschnitt
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
mTOR	Mechanistic/ Mammalian Target of Rapamycin

NGS	Next Generation Sequencing
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (Non-Small Cell Lung Cancer)
PAP-Test	Zervixabstrich nach Papanicolaou
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PBS	Phosphat Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PECA	Plattenepithelkarzinom
PECy™7	Phycoerythrin-Cyanin-7
PerCPCy™5.5	Peridinin Chlorophyll Protein Complex-Cyanin-5.5
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate-3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PMT	Photomultiplier Tube
pRB	Retinoblastoma Tumour Suppressor Protein
Range	Spannweite (Statistik)
RCT	Radiochemotherapie
rpm	Revolutions per Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
SCC	Squamous Cell Carcinoma Antigen
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side Scatter)
TROP2	Trophoblast Cell Surface Marker
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZeBanC	Zentrale Biomaterialbank der Charité

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ansätze zur gezielten Therapie des Zervixkarzinoms.....	15
Tabelle 2: Verfahren zur CTC-Anreicherung	18
Tabelle 3: Verfahren zur CTC-Detektion.....	19
Tabelle 4: In der Zellkultur eingesetzte Pufferlösungen.....	29
Tabelle 5: Eigenschaften eingesetzter Zelllinien.....	29
Tabelle 6: Bei der Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern eingesetzte Pufferlösungen.....	31
Tabelle 7: Antikörper.....	31
Tabelle 8: Bei der CD45-Depletion eingesetzte Pufferlösungen.....	33
Tabelle 9: In Spiking-Experimenten eingesetzte Pufferlösungen	35
Tabelle 10: Zur immunhistochemischen Färbung eingesetzte Antikörper.....	42
Tabelle 11: Färbeprotokolle des BenchMark ULTRA	43
Tabelle 12: Anti-EpCAM Antikörperspezifikationen	44
Tabelle 13: Anti-CK17 und Anti-CK19 Antikörperspezifikationen	46
Tabelle 14: Anti-CK7/8 Antikörperspezifikationen.....	47
Tabelle 15: Anti-EGFR Antikörperspezifikationen.....	50
Tabelle 16: Anti-p16 Antikörperspezifikationen.....	52
Tabelle 17: Anti-CD44 und Anti-CD133 Antikörperspezifikationen.....	54
Tabelle 18: Anti-SPARC Antikörperspezifikationen	54
Tabelle 19: Anti-EMMPRIN Antikörperspezifikationen.....	55
Tabelle 20: Anti-TROP2 Antikörperspezifikationen.....	55
Tabelle 21: Potentielles Markerpanel zur CTC-Detektion im Blut von Patientinnen mit Zervixkarzinom	56
Tabelle 22: Ergebnisse der Spiking-Experimente mit der Zelllinie SW620.....	58
Tabelle 23: Ergebnisse der Spiking-Experimente mit der Zelllinie SiHa.....	59
Tabelle 24: Patientencharakteristika.....	62

Tabelle 25: Ergebnisse der Analyse von Patientenblut	63
--	----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kompensation	38
Abbildung 2: Färbung von Tumorzelllinien mit dem Antikörper Anti-EpCAM PerCPCy™5.5	45
Abbildung 3: Färbung von Tumorzelllinien mit dem Antikörper Anti-CK7/8 PE	47
Abbildung 4: Konzentrationsoptimierung der Antikörper Anti-EGFR AlexaFluor®488 und Anti-EGFR PECy™7.....	50
Abbildung 5: Färbung von Tumorzelllinien mit Anti-EGFR AlexaFluor®488 und PECy™7	51
Abbildung 6: Konzentrationsoptimierung des Antikörpers Anti-p16 FITC.....	52
Abbildung 7: Färbung von Tumorzelllinien mit Anti-p16 FITC	53
Abbildung 8: Ergebnisse des Spiking-Experiments K5a.....	57
Abbildung 9: Ergebnis des Spiking-Experiments Z1a ohne Anti-EGFR	60
Abbildung 10: Ergebnisse des Spiking-Experiments Z1b mit Anti-EGFR.....	61
Abbildung 11: Ergebnis von Patientin 8.....	64
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von Tumorgewebe der Patientinnen 2 und 3.....	67

Abstract

Einleitung:

Auch nach Einführung nationaler Screeningprogramme bleibt das Zervixkarzinom weltweit die vierthäufigste Tumorerkrankung der Frau. Es besteht dringender Bedarf an wirksamen, vor allem auch gezielten Therapien. Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) gewinnen durch die Entwicklung und Optimierung der Methoden ihrer Isolation und Charakterisierung zunehmend an Bedeutung als „Liquid Biopsy“. Sie bieten eine nicht-invasive Möglichkeit des Beitrags zum individuellen Tumormanagement.

Methoden:

Um den potentiellen Nutzen von CTCs für Patientinnen mit Zervixkarzinom zu evaluieren, wurde anhand der Tumorzelllinien HeLa, SiHa, Caski und SW620, Spiking-Experimenten und Blut- und Gewebeproben von 8 Patientinnen ein Markerpanel zur durchflusszytometrischen CTC-Detektion etabliert. Die CTC-Anreicherung erfolgte mittels immunomagnetischer CD45-Depletion.

Ergebnisse

Zusammenfassend zeigten sich die Zervixkarzinomzelllinien stark positiv für EGFR und CK7/8 und schwach (SiHa, HeLa) bzw. stark positiv für EpCAM (Caski). In Spiking-Experimenten mit der EpCAM-positiven Kolonkarzinomzelllinie SW620 wurden anhand der Marker EpCAM und CK7/8 durchschnittliche Wiederfindungsraten von 50%, bei Spiking-Experimenten mit der EpCAM-schwach-positiven Zervixkarzinomzelllinie SiHa nur von durchschnittlich 20% erreicht. Beim Einsatz der Methode zur Analyse von Patientenblutproben fanden sich CK7/8-positive Zellen bei 6 von 8 Patientinnen. Immunhistochemische Referenzfärbungen von zervikalem Adeno- und Plattenepithelkarzinomgewebe erwiesen sich als gleichermaßen CK7/8- und p16-positiv, jedoch EGFR-negativ.

Diskussion

Das in dieser Arbeit eingesetzte CTC-Detektionsverfahren weist klare technische Limitationen auf, erbringt jedoch den Hinweis, dass der Nachweis von CTCs bei Zervixkarzinompatientinnen anhand ihrer Expression von CK7/8 möglich ist. Eine Aussage über die Rolle der CTCs nicht nur als Tumormarker sondern als Tumormodellsystem kann anhand der vorliegenden Ergebnisse für das Zervixkarzinom nicht getroffen werden.

Introduction

Despite the establishment of national screening programs cervical cancer still remains the fourth most commonly diagnosed cancer in females worldwide. Evidently there is an urgent need of effective, especially targeted therapeutic agents. Due to the development and optimisation of methods for the isolation and characterisation of circulating tumour cells (CTCs) they become of increasing interest as a „Liquid Biopsy“.

Methods

To evaluate the potential benefit of CTCs for cervical cancer patients a marker panel was developed, that allows the flow cytometric detection of circulating tumour cells in cervical cancer patients. A flow cytometric analysis of the cancer cell lines HeLa, SiHa, Caski und SW620, and blood and tissue samples from 8 cervical cancer patients as well as spiking experiments were performed for this purpose. CTCs were enriched by immunomagnetic CD45-Depletion.

Results

Overall, the cervical cancer cell lines showed to be strongly positive for the markers EGFR and CK7/8 as well as weakly (HeLa, SiHa) and strongly (Caski) positive for EpCAM respectively. In spiking experiments using the EpCAM-positive colon carcinoma cell line SW620 and the markers EpCAM and CK7/8 for CTC-Detection average recovery rates of 50% have been reached. Using the weakly EpCAM-positive cervical cancer cell line SiHa the average recovery rate was not higher than 20%. When applying the Method to patient's blood samples CK7/8-positive cells were found in 6 out of 8 patients. Reference staining of cervical squamous cell carcinoma and adenocarcinoma tissue showed to be equally CK7/8- and p16-positive and EGFR-negative.

Discussion

The CTC detection method applied in this thesis shows obvious technical limitations but provides evidence that CTC detection could be feasible in cervical cancer patients using CK7/8. The present results do not allow conclusions about the role of CTCs not only as a tumour marker but as a tumour model system.

1. Einleitung

1.1. Zahlen und Fakten zum Zervixkarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das Zervixkarzinom war noch Anfang der 1970er Jahre sowohl in Deutschland als auch in den USA der zweithäufigste Tumor bei Frauen [1,2]. Durch die Einführung der Krebsfrüherkennungsuntersuchung mittels zytologischem Abstrich im Jahre 1971 konnte die Inzidenz des Zervixkarzinoms deutlich gesenkt werden [2]. In Deutschland erkrankten 2012 noch ca. 4.600 Frauen an einem Zervixkarzinom, das somit auf die zwölfte Stelle der häufigsten Tumorerkrankungen fiel [2].

Weltweit ist das Zervixkarzinom noch heute die vierthäufigste Tumorerkrankung der Frau, wobei eine deutliche Mehrheit der Fälle (ca. 85%) in Entwicklungsländern auftritt [3]. Dort hat das Zervixkarzinom nach wie vor eine hohe Inzidenz und Mortalität. In Entwicklungsländern, v.a. in Afrika, macht das Zervixkarzinom 12% aller Krebserkrankungen bei Frauen aus, in Ost- und Mittelfrika ist das Zervixkarzinom die häufigste Krebserkrankung unter den dort lebenden Frauen [3]. Auch im Hinblick auf die Mortalität besteht mit einer über zehnfach höheren Mortalitätsrate in Entwicklungs- im Vergleich Industrieländern ein signifikanter Unterschied [3].

Das durchschnittliche Erkrankungsalter für das Auftreten invasiver Karzinome beträgt ca. 50-60 Jahre, präinvasive Vorstufen können schon im Alter von 30-40 Jahren auftreten. Demnach sind im Durchschnitt 10-15 Jahre jüngere Patienten betroffen als bei anderen gynäkologischen Tumorerkrankungen [2,4].

Während die 5-Jahresüberlebensrate in frühen Stadien mit lokal begrenzter Ausbreitung noch ca. 92% beträgt, verschlechtert sich die Prognose bei Fernmetastasierung auf eine 5-Jahresüberlebensrate von nur ca. 17% [4].

Anhand dieser Daten wird deutlich, dass das Zervixkarzinom trotz der bestehenden Möglichkeiten der Früherkennung nach wie vor nicht an Relevanz verloren hat.

1.1.2. Tumorbilogie und Metastasierung

Zervixkarzinome entstehen an der Transformationszone, einer bandförmigen Metaplasie- bzw. Ektopiezone, die den Übergang des endozervikalen Drüsenepithels zum ektozervikalen/ vaginalen Plattenepithel markiert und die sich hormonbedingt im Alter zunehmend in den Zervixkanal zurückzieht [5,6]. Bei einem Großteil der invasiven Zervixkarzinome handelt es sich demnach um Plattenepithel- (65,6%) und Adenokarzinome

(28,2%), wobei die Inzidenz des Adenokarzinoms in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zugenommen hat [7,8]. Gleichmaßen [9] gilt die Infektion mit einem Hochrisiko-Subtyp des humanen Papillomvirus (HPV, v.a. 16, 18, aber auch 31, 33, 35, 45, 52, 58) [10] als ursächlich für die maligne Transformation [11]. Bei ca. 99,7% der Zervixkarzinome ist HPV nachweisbar [12], wobei das Plattenepithelkarzinom vorwiegend mit HPV 16 (HPV 16: 59,3%, HPV 18: 13,2%) assoziiert ist, während beim Adenokarzinom häufiger auch HPV 18 (HPV 18: 36,8%, HPV 16: 36,3%) eine Rolle spielt [13]. Das HPV Genom kodiert lediglich für 8 Gene [14], wobei die gleichnamigen Genprodukte der primären viralen Onkogene E6 und E7 die Schlüsselrolle bei der HPV-assoziierten Karzinomentstehung einnehmen [15]. Zentrale Zielstrukturen sind die wirtszellulären Proteine p53 und Retinoblastoma Tumour Suppressor Protein (pRb): E6 bewirkt durch seine Interaktion mit p53 eine Apoptoseinhibition und damit die Immortalisierung der Wirtszelle [16]. E7 bindet pRb, was eine Disinhibition des Transkriptionsfaktors E2F und damit eine Dysregulation des Zellzyklus und unkontrolliertes Wachstum zur Folge hat [17]. Weiterhin führt die Interaktion von E7 mit pRB zu einem paradoxen Anstieg des Tumorsuppressors p16 INK4a. In gesunden Zellen inaktiviert p16 die zyklinabhängigen Kinasen CDK4 und 6, die wiederum den Transkriptionsfaktor E2F durch die Phosphorylierung von pRB disinhibieren und arretiert somit den Zellzyklus in der G1-Phase. Eine pRB-Inaktivierung durch E7 hat eine Überexpression von p16 durch die aufgehobene Feedback-Hemmung zur Folge. Eine hohe p16-Expression wird folglich mit einer HPV-Infektion assoziiert und wird in der Pathologie in der immunhistochemischen Differentialdiagnostik HPV-assoziiierter Tumoren wie z.B. dem Zervixkarzinom oder Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs eingesetzt [18].

Das Zervixkarzinom kann sich lokal in Uteruskörper, Parametrien, Vagina, Bauchhöhle, Harnblase oder Rektum ausdehnen. Eine lymphogene Ausbreitung in pelvine und paraaortale Lymphknoten kann schon in frühen Erkrankungsstadien erfolgen [19]. Ein Befall von paraaortalen Lymphknoten wird als Fernmetastasierung (M1) klassifiziert [19]. Eine hämatogene Fernmetastasierung ist insgesamt selten und meistens Folge einer Rezidivkrankung. Fernmetastasen können v.a. in Lunge, Leber und Knochen auftreten [20].

Die Prognose des Zervixkarzinoms wird durch das FIGO-Stadium, den Lymphknotenstatus, Tumorgöße und -invasionstiefe, dem histologischen Subtyp und dem Vorliegen von Lymphgefäßinvasion bestimmt [19]. Unter den zellulären Biomarkern zeigen vor allem solche eine prognostische Relevanz, die in den Prozess der Angiogenese

(VEGF-C, COX2), die Reaktion auf Hypoxie (HIF1 α , -2 α) oder den EGFR-Signalweg (EGFR, HER2/neu, AKT, mTOR) involviert sind [21,22].

Tumormarker, insbesondere SSC und CYFRA21-1, lassen sich vor allem bei Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom der Zervix nachweisen. Erhöhte Serumspiegel beider Tumormarker sind assoziiert mit ungünstigen Prognosefaktoren wie einem hohen FIGO-Stadium, der Tumorgroße sowie der Invasionstiefe und sind in der Lage einen Lymphknotenbefall vorherzusagen. Insbesondere bei fortgeschrittener Erkrankung kann anhand von Verlaufsbeobachtungen des Serumspiegels der Tumormarker eine Aussage über das Ansprechen auf Bestrahlung und/oder Chemotherapie getroffen werden. Bei bis zu 90% der Patientinnen geht ein Tumormarkeranstieg im Verlauf dem klinischen Nachweis einer Krankheitsprogression um einige Monate voraus [23].

Der ursprünglich beim Ovarialkarzinom nachgewiesene Tumormarker CA-125 lässt sich bei einem Teil der Patientinnen mit Adenokarzinom der Zervix nachweisen und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Der Anstieg des CA-125 Serumspiegels im Verlauf kann ein Rezidiv eines Adenokarzinoms der Zervix anzeigen [23].

1.1.3. Früherkennung und Prävention

Die Erkenntnis, dass eine HPV-Infektion maßgeblich das Risiko für ein Zervixkarzinom definiert, eröffnet mit der Impfung gegen HPV die Möglichkeit der Primärprävention von Krebs [24]. Die beiden HPV-Impfstoffe Cervarix® und Gardasil® basieren auf einem Strukturprotein des Viruskapsids (L1) und richten sich gegen HPV 16 und 18, bzw. Gardasil® zusätzlich gegen HPV 6 und 11, die typischen Erreger von Genitalwarzen [25]. Es wird geschätzt, dass eine weltweite Vakzinierungsrate von 70% einen Rückgang der Zervixkarzinominzidenz um jährlich ca. 65% zur Folge haben wird und jährlich ca. 65% der Todesfälle vermieden werden können [26]. In Australien, wo bereits eine Vakzinierungsrate von über 70% erreicht werden konnte, ist ein Rückgang der Zervixkarzinominzidenz um 38% zu verzeichnen [27].

Durch die Krebsfrüherkennungsrichtlinien des gemeinsamen Bundesausschusses (GBA) ist in Deutschland ein jährliches Gebärmutterhalskrebsscreening ab dem 20. Lebensjahr vorgesehen [28]. Regelhaft wird ein Zervixabstrich nach Papanicolaou (PAP-Test) durchgeführt, bei dem von der Portiooberfläche und aus dem Zervixkanal Proben entnommen und direkt oder in einem Flüssigkeitsmedium (liquid based cytology, Thin-Prep) auf einen Objektträger aufgebracht werden [29]. Die Proben werden nach Papanicolaou gefärbt und Zellbild und -morphologie mikroskopisch beurteilt.

Der PAP-Test hat, bei großer untersucherabhängiger Variabilität, eine Sensitivität von etwa. 50-70% und eine Spezifität von über 95% in der Detektion höhergradiger intraepithelialer Neoplasien (CIN II+) [30].

In den epidemiologischen Daten spiegelt sich wider, dass die Inzidenz des Adenokarzinoms sich weniger durch ein Screeningprogramm beeinflussen lässt als die des Plattenepithelkarzinoms (s. 1.1.1). Die Rate falsch-negativer Testergebnisse ist beim Adenokarzinom signifikant höher. Das Adenokarzinom kann im Zervixkanal auftreten und sich somit einer Detektion durch den PAP-Abstrich entziehen [31].

Die Testung auf Hochrisiko-HPV-Subtypen ist nachweislich sensitiver (80-100%), jedoch in der Detektion hochgradiger intraepithelialer Neoplasien (CINII+) weniger spezifisch (ca.90%) als der PAP-Test [30,32]. Insbesondere bei Frauen unter 30 Jahren ist eine HPV-Infektion häufig transient, sodass bei einer routinemäßigen HPV-Testung die Gefahr der Überdiagnose besteht [33]. Bei Frauen über 30 Jahren kann die HPV-Testung bei auffälliger Zytologie ergänzend eingesetzt werden [34,35]. Insbesondere für jüngere Frauen unter 30 Jahren, bei denen der Nutzen der HPV-Testung begrenzt ist, eignet sich auch eine Färbung der zytologischen Proben mit dem HPV-assoziierten Marker p16 und dem Proliferationsmarker Ki-67, um bei gleichbleibender Spezifität die Sensitivität der Zytologie in der Detektion von höhergradigen intraepithelialen Neoplasien (CINII+) zu erhöhen [36].

Es wird deutlich, dass das herkömmliche zytologische Screening klare Limitationen aufweist, sodass molekulare, biomarkerbasierte Screeningverfahren wie die HPV-Testung oder p16-Färbung zunehmend an Bedeutung gewinnen und neue sensitive und spezifische Biomarker zum Einsatz in der Früherkennung von großem Nutzen sein können.

1.1.4. Therapie

Das Staging des Zervixkarzinoms erfolgt klinisch anhand der Klassifikation der International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) [37].

Beim Frühkarzinom der Stadien IA-IIA steht die Lokaltherapie, insbesondere die Operation, im Vordergrund, während die Pharmakotherapie eine geringe Rolle spielt. In den lokal begrenzten Stadien <IIA soll eine primär operative Therapie durchgeführt werden [38]. In den Stadien IA1 und IA2 sowie IB1 und IIA1 bei einer Tumorgroße <2cm ohne Vorliegen von Risikofaktoren ist die radikale Hysterektomie Therapie der Wahl bei postmenopausalen Frauen oder Patientenwunsch. Eine fertilitätserhaltende Therapie

mittels Trachelektomie kann prämenopausalen Frauen mit Kinderwunsch angeboten werden [39]. Eine neoadjuvante Chemotherapie kann zur Reduktion der Tumorgöße erwogen werden, wenn eine fertilitätserhaltende Therapie angestrebt wird [39].

Tabelle 1: Ansätze zur gezielten Therapie des Zervixkarzinoms

Wirkmechanismus	Zielstruktur	Wirkstoff	Entwicklungsstand
Angiogenesehemmung	VEGF	Bevacizumab	ACC: Zulassung (FDA) LACC: kein Benefit + RCT
	VEGFR, PDGFR, c-Kit	Pazopanib	ACC: Monotherapie wirksam LACC: in Erprobung + RCT
	VEGFR	Cediranib	ACC: Benefit + RCT
	VEGFR, FGFR	Brivanib	ACC: in Erprobung (Monotherapie)
Proliferationshemmung	EGFR	Erlotinib	ACC: kein Benefit (Monotherapie) LACC: Benefit + RCT
	EGFR	Cetuximab	ACC: kein Benefit (Monotherapie, + Cisplatin), mehr UEs (+Cisplatin + Topotecan), in Erprobung (+Carboplatin + Paclitaxel)
	EGFR	Panitumumab	LACC: in Erprobung + RCT
Proliferations- und Angiogenesehemmung	TK-Inhibitor	Imatinib	ACC: Kein Benefit (Monotherapie)
	TK-Inhibitor	Sunitinib	ACC: Kein Benefit, hohe UE-Rate
	TK-Inhibitor	Sorafenib	LACC: Studie vorzeitig beendet [46]
	mTOR	Temsirolimus	ACC: eingeschränkte Verträglichkeit (+ Topotecan), kein Benefit (Monotherapie)
	mTOR	Everolimus	LACC: In Erprobung (+ RCT)
Apoptoseinduktion	PARP	Veliparib	ACC: in Erprobung (+ Paclitaxel), geringer Benefit (+ Topotecan + (peg)G-CSF)
	PARP	Olaparib	ACC: In Erprobung (+ Paclitaxel)
Modulation epigenetischer Mechanismen	DNMT	Decitabine	ACC: moderater Benefit, schwerwiegende Myelosuppression
	DNMT	Hydralazin + Valproat	ACC: Benefit (+Cisplatin + Topotecan) LACC: Benefit (Strahlensensitivierung)
Interaktion mit viraler Ätiologie	HPV E6/ E7	siRNA, Antisense-Oligonukleotide, u.a.	Präklinisch starker antitumorigener Effekt
	HPV	Cidofovir	Präklinisch u.a. Strahlensensitivierung Benefit bei CINII+
Immuntherapie	TRAIL-1	Mapatumumab	LACC: in Erprobung (+ RCT)
	u.a. TLR4-Ligand	Bryostatin-1	ACC: Kein Benefit (Monotherapie, + Cisplatin)
	CTLA-4	Ipilimumab	ACC: In Erprobung (Monotherapie)
	PD-1	Nivolumab	ACC: In Erprobung (Monotherapie)
	Vakzinierung	ADXS11-001 (attenuierte Listeria monocytogenes)	ACC: Benefit (Monotherapie ebenso wirksam wie + Cisplatin)

VEGF(R): Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor), PDGF(R): Platelet-derived Growth Factor (Receptor), FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor, EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, TK: Tyrosinkinase, mTOR: Mammalian/ Mechanistic Target of Rapamycin, PARP: Poly(ADP-ribose)-Polymerase, DNMT: DNA-Methyltransferase, HPV: Humanes Papillomvirus, TRAIL-1: Tumour Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand 1, TLR4: Toll Like Receptor 4, CTLA-1: Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4, PD-1: Programmed Cell Death Protein 1, siRNA: Small interfering RNA, ACC: Fortgeschrittenes Zervixkarzinom (Advanced Cervical Cancer), LACC: Lokal fortgeschrittenes Zervixkarzinom (Locally Advanced Cervical Cancer), RCT: Radiochemotherapie, UE: unerwünschtes Ereignis, (peg) G-CSF: (pegylated) Granulocyte-Colony Stimulating Factor [45].

Zur Risikostratifizierung erfolgt intraoperativ ein Staging mittels pelviner und paraaortaler Lymphonodektomie. Eine adjuvante Chemotherapie ist nur bei Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko indiziert und sollte dann in Form einer kombinierten Radiochemothe-

rapie erfolgen [40,41]. Eine solche trimodale Therapie sollte jedoch aufgrund schwerwiegender Langzeittoxizität durch eine adäquate Patientenselektion möglichst vermieden und eine unimodale Therapie (Operation oder Radiochemotherapie) angestrebt werden [40].

Bei lokal fortgeschrittenen Zervixkarzinomen der Stadien IIB-IVA und in den Stadien IB2 und IIA2 bei Vorliegen von Risikofaktoren wie z.B. dem Befall von Lymphknoten wird die kombinierte Radiochemotherapie mit Cisplatin empfohlen [42]. Im fernmetastasierten Stadium IVB und in der Rezidivsituation wird mit einer palliativen, in der Regel platinhaltigen Chemotherapie behandelt, die das progressionsfreie und Gesamtüberleben in diesem Stadium jedoch nur noch geringfügig beeinflusst [43]. Kürzlich konnte in einer Phase-III-Studie gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von Bevacizumab zu einer Verbesserung des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens führt [44].

Die Entwicklung zielgerichteter Therapien für das Zervixkarzinom ist im Vergleich mit anderen Tumorerkrankungen wenig fortgeschritten [45]. Tabelle 1 bietet eine Übersicht über molekulare Ansatzpunkte und Wirkstoffe, die sich zum Einsatz bei Patientinnen mit Zervixkarzinom in präklinischer und klinischer Testung befinden [45].

Trotz vielversprechender Ergebnisse ist die konventionelle Chemotherapie nach wie vor unverzichtbarer Bestandteil der Pharmakotherapie des fortgeschrittenen Zervixkarzinoms [45].

Sensitive Biomarker und individuelle Mutationsanalysen können einen relevanten Beitrag zur Entwicklung einer effizienten und gleichzeitig gut verträglichen personalisierten Therapie des Zervixkarzinoms leisten.

1.2. Zirkulierende Tumorzellen

Im Zeitalter der personalisierten Medizin sind tumorspezifische Biomarker von essentieller Bedeutung. Die Kenntnis des Proteinexpressionsmusters eines Tumors ist Voraussetzung um Tumortherapeutika gezielt einsetzen zu können. Nach wie vor stellt die Gewebsbiopsie die einzige valide Methode dar eine Tumordiagnose zu sichern und den Tumor molekular zu charakterisieren [47]. Jedoch limitieren zahlreiche Faktoren die Durchführbarkeit und die prädiktive Aussagekraft einer Biopsie hinsichtlich des Ansprechens eines Tumors auf eine zielgerichtete Therapie: Einige Tumoren sind einer Biopsie aufgrund ihrer Lage nicht zugänglich oder die Biopsie ist mit schwerwiegenden Risiken verbunden. Mikrometastasen im Sinne einer minimalen Resterkrankung können nicht durch eine Biopsie erfasst werden [47]. Vor allem aber werden bei der alleinigen

Biopsie des Primärtumors möglicherweise relevante, den Tumorprogress oder die Metastasierung vorantreibende Mutationen und Expressionsmuster nicht entdeckt, denn der Primärtumor kann sich in seinen molekularen Charakteristika signifikant von Metastasen und Rezidiven unterscheiden. Dieses Phänomen der räumlichen oder zeitlichen Intratumorheterogenität schränkt die Effektivität zielgerichteter Therapien signifikant ein [48,49]. Die demnach erforderlichen zusätzlichen Biopsien von Metastasen und Rezidiven sind aufgrund der oben genannten Risiken eines solchen invasiven Eingriffs nicht immer praktikabel und stellen außerdem einen relevanten Kostenfaktor dar [50].

Es zeigt sich demzufolge deutlich die Notwendigkeit einer nichtinvasiven Methode, die ermöglicht, Aussagen über molekulare Eigenschaften eines Tumors zu treffen.

Tumorzellen, die im Rahmen der Metastasierungskaskade bereits in frühen Erkrankungsstadien in die Blutbahn gelangen und dort zirkulieren, gewinnen daher zunehmend an Bedeutung als potentielle nichtinvasive „Liquid Biopsy“ [51].

Solche zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) konnten zwar schon 1869 erstmals im Blut eines Tumorpatienten nachgewiesen werden [52], ihre Konzentration im Blut ist mit ca. einer CTC in 10^6 - 10^7 Leukozyten jedoch gering, sodass erst die Entwicklung effizienter Methoden zur ihrer Anreicherung, Detektion und molekularen Charakterisierung im letzten Jahrzehnt ermöglicht hat, den Nutzen von CTCs als Biomarker zu untersuchen [51]. Insbesondere beim Mammakarzinom ließen sich CTCs bereits als prognostischer Marker etablieren und ihr Nutzen in der Beurteilung von Krankheitsverlauf und Therapieansprechen aufzeigen [53,54]. Auch beim Kolon- [55] und beim Prostatakarzinom [56] ist ihre prognostische Relevanz belegt. Zahlreiche Arbeiten befassen sich mit der Möglichkeit und den Konsequenzen des CTC Nachweises bei diversen Karzinomerkrankungen [57]. Durch Verfahren wie das Next Generation Sequencing (NGS) wird es zunehmend möglich, selbst geringe Konzentrationen von CTCs bis hin zu Einzelzellen molekular zu analysieren [58].

1.2.1. Methoden zur Anreicherung und Detektion zirkulierender Tumorzellen

Tumorzellen unterscheiden sich sowohl aufgrund physikalischer Eigenschaften wie Größe oder Dichte, als auch aufgrund ihres Markerexpressionsprofils von gesunden Zellen des menschlichen Blutes. Diese Eigenschaften machen sich CTC-Anreicherungsverfahren zunutze [51].

Durch Filter oder Dichtegradientenzentrifugation lassen sich CTCs anhand ihrer physikalischen Eigenschaften von Leukozyten separieren. Anreicherungsverfahren, die auf

physikalischen Eigenschaften basieren, ermöglichen die markerunabhängige Separation von CTCs und Leukozyten. Hierdurch wird einem Zellverlust durch heterogene Markerexpression der Tumorzellen entgegengewirkt [51,59].

Markerabhängig können CTCs mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen tumorssoziierte Antigene (positive Selektion) oder gegen das leukozytenspezifische Antigen CD45 (negative Selektion) angereichert werden. CTC-Chips kombinieren markerbasierte und physikalische Anreicherungsverfahren, um CTCs aus kleinsten Probenvolumina anzureichern [51].

Tabelle 2: Verfahren zur CTC-Anreicherung

	Methoden	Assay (Beispiele)	Quelle
Basierend auf physikalischen Eigenschaften	Dichte	• Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll, OncoQuick, Greiner Bio-One)	[51]
	Größe, Verformbarkeit	• Isolation by Size of epithelial Tumour Cells (ISET) • Mikrofluidik (ClearCell FX, Clearbridge, Biometrix)	[51,60]
	Membraneigenschaften	• Continuous flow Dielectrophoretic Field-Flow Fractionation (DEP-FFF, ApoStream, ApoCell)	[60]
Basierend auf biologischen Eigenschaften (markerbasiert)	Negative immunomagnetische Anreicherung	• CD45 (MACS System, Miltenyi Biotec; RosetteSep CTC Enrichment Cocktail, EasySep CD45 Depletion, STEMCELL Technologies) • CD45 Depletion und Kurzzeitkultur (EPISPOT)	[60]
	Positive Immunomagnetische Anreicherung	• EpCAM-basiert (CellSearch®, Janssen Diagnostics) • Basiert auf anderen Oberflächenantigenen (AdnaTest, Adnagen; MagSweeper™, Illumina; MACS system, Miltenyi Biotec) • In vivo (CellCollector, GILUPI)	[60]
Kombination biologischer und physikalischer Verfahren	CTC-Chips	• Mikrofluidik-basierte CTC-Chips mit EpCAM-beschichteten Mikroposten (Ephesia, CTC-iChip ^{pos} , Herringbone chip) • Mikrofluidik-basierte CTC-Chips mit CD45/CD66-beschichteten Mikroposten (CTC-iChip ^{neg})	[51,60]

Zur Detektion angereicherter CTCs stehen Protein- oder mRNA-basierte Verfahren zur Verfügung (s. Tabelle 3) [51].

Das einzige von der US Food and Drug Administration (FDA) zur CTC-Anreicherung und Detektion anerkannte Verfahren, demnach der „Goldstandard“ zur CTC-Detektion, ist das CellSearch®-System (Janssen Diagnostics, LLC, Raritan). CellSearch® kombiniert eine immunomagnetische Anreicherung von Zellen, die das Epithelial Cell Surface Antigen (EpCAM) exprimieren, mit der Detektion durch Färbung von CD45 und Zytokeratin (CK) mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und einer Zellkernfärbung mit 4',6-

Diamidin-2-phenylindol (DAPI) [59,61]. CTCs werden mittels Fluoreszenzmikroskopie als CD45-, CK+, DAPI+ identifiziert [51,62].

Eine Übersicht über aktuell verfügbare Anreicherungs- und Detektionsmethoden bieten die Tabellen 2 und 3. Im Folgenden werden die CD45-Depletion als Verfahren zur CTC-Anreicherung und die Durchflusszytometrie als Verfahren zur CTC-Detektion genauer beschrieben, da diese in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen.

Tabelle 3: Verfahren zur CTC-Detektion

	Methode	Assay (Beispiele)	Quelle
Proteinbasiert	Immunfluoreszenz	<ul style="list-style-type: none"> • CD45-, CK+, DAPI+ (CellSearch®) • Funktionsassay: Sezernierte Marker nach Kurzzeitkultur (EPISPOT) 	[51]
	Durchflusszytometrie	<ul style="list-style-type: none"> • Multiparameter Durchflusszytometrie, z.B. EpCAM+, EGFR+, CD45- • Durchflusszytometrie kombiniert mit Fluoreszenzmikroskopie (ImageStream, Amnis) • Photoakustische Durchflusszytometrie (PAFC) 	[60,63]
mRNA-basiert	RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Z.B. für CK19, MUC1, HER2 • Kommerziell: AdnaTest (AdnaGen) 	[64]

mRNA: messenger Ribonukleinsäure, CD45: Cluster of Differentiation 45, CK: Zytokeratin, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, EpCAM: Epithelial Cell Surface Antigen, EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, MUC1: Mucin 1, HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

1.2.1.1. CD45-Depletion

Das Leucocyte Common Antigen CD45 wird von beinahe allen Leukozyten [65], nicht jedoch von Epithelzellen exprimiert. Die CD45-Depletion ist demnach eine Möglichkeit zur negativen Anreicherung von CTCs und erfolgt durch Markierung CD45-exprimierender Zellen mit einem tetramerschen Antikörper, der einerseits CD45 und andererseits Magnetpartikel erkennt. Die auf diese Weise gekennzeichneten Zellen werden mittels eines Magneten separiert: Die Magnetpartikel, die an die CD45-tragenden Zellen gebunden sind, werden durch den Magneten angezogen, während nicht CD45-tragende (z.B. Tumorzellen) zurückbleiben [59]. Die Methode der CD45-Depletion ist im Labor der AG Keilholz bereits etabliert [66].

1.2.1.2. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie macht sich physikalische Eigenschaften von Licht zunutze, um Einzelzellen oder andere Partikel (z.B. DNA-Präparationen, Mikroorganismen u.a., Partikelgröße 0,2 – 20µm) zu untersuchen und zu charakterisieren [67,68]. Moderne Zytometer sind in der Lage 14 verschiedene Parameter zu differenzieren [69]: Die physikalischen Parameter Zellgröße und -komplexität/ -granularität lassen sich anhand der

Streuung eines auf die Zelle treffenden Lichtstrahls ableiten. Die Färbung von Oberflächen- oder intrazellulär lokalisierten Proteinen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern ermöglicht die Charakterisierung der Zellen anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften [68]. Drei grundsätzliche Systeme gewährleisten die Funktion des Zytometers: Das Flüssigkeitssystem, das optische System und das System der Datenaufnahme und -verarbeitung [70].

Das Flüssigkeitssystem des Zytometers schafft die notwendigen Voraussetzungen für die Einzelzellanalyse, indem es einen laminaren Zellstrom erzeugt [68]: Der Probenstrom wird durch einen Hüllstrom, der ihm in seiner Flussrichtung entgegengerichtet ist, umschlossen, sodass Einzelzellen den Analysepunkt passieren (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung) [68,70].

Mit Hilfe des optischen Systems erfolgt die eigentliche Differenzierung der Zellen anhand ihrer optischen und Fluoreszenzeigenschaften [70].

Als Lichtquelle dienen in der Regel ein oder mehrere Laser. Das am Analysepunkt auf die Zellen treffende Laserlicht wird an der Zelloberfläche gestreut: Parallel zur Einstrahlungsrichtung des Lasers entsteht Vorwärtsstreulicht (Forward scatter, FSC), das die Zellgröße widerspiegelt. Abhängig von der Zellkomplexität/ -granularität wird Licht in 90° zur Einstrahlungsrichtung des Lasers abgelenkt, das als Seitwärtsstreulicht (Side scatter, SSC) bezeichnet wird. Gleichzeitig regt der Laser ein über einen Antikörper an die Zelle gebundenes Fluorochrom zur Fluoreszenz an [68,70]. Indem ein Fluorochrom Lichtenergie in einem spezifischen Wellenlängenbereich absorbiert, wird eines seiner Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Zur Photoemission, der Abgabe von Lichtenergie, kommt es bei der Rückkehr des Elektrons auf sein Ruheniveau. Die Emissionswellenlänge ist ebenfalls fluorochromspezifisch. Der Einsatz von Fluorochromen identischer Exzitations-, aber unterschiedlicher Emissionswellenlängen ermöglicht die simultane Messung verschiedener Zellcharakteristika (Mehrfachfärbung) [68].

Mittels Linsen und Filtern wird das emittierte Licht aufgefangen und entsprechend seiner Wellenlänge auf Detektoren weitergeleitet.

Detektoren dienen der Signalverarbeitung und -umwandlung. Das kräftigere Vorwärtsstreulicht wird von Photodioden aufgenommen, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzlicht liefern schwächere Signale, die von Photomultiplier Tubes (PMTs) detektiert werden. Die Detektoren wandeln die optischen Signale in elektronische um, die computerbasiert digital weiterverarbeitet werden können [70].

1.2.2. Zirkulierende Tumorzellen beim Zervixkarzinom

Karzinome der Cervix uteri metastasieren in erster Linie auf lymphogenem Wege. Um extralymphatische Metastasen zu bilden, ist ein Eintreten von Tumorzellen in die Blutbahn jedoch obligat [71], sodass auch im Blut von Patientinnen mit Zervixkarzinom von einem Vorkommen zirkulierender Tumorzellen ausgegangen werden kann.

Es befassen sich jedoch nur wenige Arbeiten mit CTCs beim Zervixkarzinom. Der in diesen Arbeiten am häufigsten angewandte Ansatz zum Nachweis von CTCs macht sich die HPV-Assoziation des Zervixkarzinoms zunutze. Mittels RT-PCR konnten Tseng et al. bei 18 von 35 und Pao et al. bei 12 von 13 Patientinnen mit HPV-assoziiertem Zervixkarzinom mRNA des HPV-16- oder -18-Onkogens E6 nachweisen und somit Rückschlüsse auf das Vorhandensein zirkulierender Zervixkarzinomzellen ziehen [72,73]. Der Nachweis von HPV mRNA war mit einer schlechteren Prognose assoziiert [72].

Auch CK19-exprimierende Zellen konnten in einer Studie von Yuan et al. im Blut von 18 von 84 Patientinnen mit Zervixkarzinom im Frühstadium (Ib, IIb) nach radikaler Hysterektomie mittels RT-PCR als Hinweis auf eine frühe Tumordisseminierung detektiert werden. Es konnte jedoch keine Aussage über den prognostischen Nutzen getroffen werden [74].

Bei dem Versuch, ein CTC-Detektionspanel für gynäkologische Tumoren zu etablieren, gelang Obermayer et al. der CTC-Nachweis bei 44% der 25 Zervixkarzinompatientinnen im Vergleich zu 28,6% der Patientinnen mit primärem und 80,6% der Patientinnen mit rezidiviertem Mammakarzinom. Es wurde eine RT-PCR für die Gene CCNE2, DKFZp762E1312, EMP2, MAL2, PPIC und SLC6A8 durchgeführt, wobei bei den Patientinnen mit Zervixkarzinom vorwiegend CCNE2 detektiert werden konnte [75].

Die Detektion von mRNA mittels RT-PCR für EGFR gelang Mitsuhashi et al bei 12 von 45 Zervixkarzinompatientinnen [76]. Zhang et al. wiesen in einer Kohorte aus 109 Zervixkarzinompatientinnen, 138 Patientinnen mit CIN und 80 gesunden Probanden mittels RT-PCR signifikant höhere bmi-1-mRNA-Spiegel bei Patientinnen mit Zervixkarzinom als bei gesunden Probanden und Patientinnen mit CINI-III nach [77].

Disseminierte Tumorzellen (DTCs) im Knochenmark konnten durch Fehm et al. und Banys et al. mittels immunhistochemischer Färbung mit dem Pan-Zytokeratin-Antikörper A45B/B3 detektiert werden [78–80]. Fehm et al. fanden DTCs schon in frühen Stadien einer Zervixkarzinomerkrankung [78]. Der Nachweis von DTCs korrelierte

mit Tumorstadium und Lymphknotenmetastasierung, nicht jedoch mit der Prognose [78–80].

1.2.3. Potentielle Marker zur CTC-Detektion beim Zervixkarzinom

1.2.3.1. EpCAM

Das transmembranäre Glykoprotein EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), auch bekannt als ESA oder EGP40, ist ein epithelspezifisches interzelluläres Adhäsionsmolekül, das von zahlreichen Karzinomen, insbesondere z.B. von Adenokarzinomen des Kolons, der Prostata oder des Ovars exprimiert wird [81]. Went et al. konnten den Marker EpCAM in 28 von 42 (67%) Gewebeproben von Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom der Zervix immunhistochemisch mit schwacher (11/28), moderater (9/28) oder starker (8/28) Intensität und 3 von 3 (100%) der Gewebeproben von Patientinnen mit Adenokarzinom der Zervix mit starker Intensität nachweisen [81]. Es konnte schon früh gezeigt werden, dass der Nachweis von EpCAM im zervikalen Plattenepithel mit verstärkter Proliferation assoziiert ist [82].

Als epithelialer Oberflächenmarker ist EpCAM sowohl in der Anreicherung als auch in der Detektion von CTCs etabliert und wird z.B. in dem von der FDA anerkannten Verfahren CellSearch® und zahlreichen weiteren CTC-Assays eingesetzt [60].

1.2.3.2. Zytokeratine

Zytokeratine (CK) sind epithelspezifische Intermediärfilamente und damit Bestandteil des epithelialen Zytoskeletts. Derzeit wurden 20 unterschiedliche Subtypen identifiziert, deren Expressionsmuster sich im Laufe der zellulären Differenzierung, aber auch im Prozess der malignen Entartung deutlich unterscheidet [83,84]. Im Rahmen der CTC-Analyse nehmen Zytokeratine als epitheliale Biomarker eine zentrale Stellung ein und sind unter anderem Bestandteil des CellSearch® Verfahrens [60]. Die Zytokeratinexpression beim Zervixkarzinom wurde umfassend analysiert, wobei insbesondere CK8, CK17 und CK19 mit dem Malignitätsgrad einer zervikalen Läsion korrelierten [84–87]. CK19 mRNA konnte bereits im Blut von Zervixkarzinompatientinnen nachgewiesen werden (s. 1.2.2., [74]). Das CK19-Fragment CYFRA21 wird als Tumormarker unter anderem auch beim Zervixkarzinom als prognostischer Marker untersucht [23]. Es finden sich in der Literatur jedoch auch Hinweise auf eine geringe Spezifität von CK19 als Marker in der CTC-Detektion, bedingt durch eine außerordentliche Transkription von CK19 mRNA durch Leukozyten [76].

1.2.3.3. EGFR

Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ist an der Entstehung zahlreicher Karzinome beteiligt [88]. Gegen EGFR gerichtete gezielte Therapien sind bei vielen Karzinomen etabliert und auch beim Zervixkarzinom sind sie Gegenstand der Forschung (s. 1.1.4., [45]).

Insbesondere zur CTC-Detektion bei Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) ist eine EGFR-basierte Herangehensweise mittels RT-PCR in Erprobung [89]. Wie auch in 1.2.2 beschrieben, ließ sich EGFR-mRNA im Blut von Patientinnen mit Zervixkarzinom nachweisen [76].

1.2.3.4. p16

Der Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 2A (CDK12A), der auch als p16/INK4a bezeichnet wird, wird in seiner Funktion als zellzyklusregulierendes Protein in den meisten Karzinomzellen herunterreguliert. Beim Zervixkarzinom findet sich jedoch, insbesondere bedingt durch den Verlust der Feedback-Regulation durch pRB aufgrund seiner Interaktion mit dem viralen Onkoprotein HPV E7, eine Überexpression von p16, die sich immunhistochemisch in einem Großteil der höhergradigen intraepithelialen Neoplasien (CINII+), Plattenepithelkarzinome und auch Adenokarzinome nachweisen lässt [18]. Die Möglichkeit des Einsatzes von p16 in der Zytologie ist in Kapitel 1.1.3 beschrieben. Ein durchflusszytometrischer Ansatz zum biomarkerbasierten Zervixkarzinomscreening (p16, Mcm5) zeigte eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 93% [90].

1.2.3.5. Stammzellmarker

Tumorstammzellen machen nur einen kleinen Teil der Tumormasse aus. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Self-Renewal) gelten sie jedoch als verantwortlich für Tumorigenese und aufgrund ihrer geringeren Sensitivität gegenüber Chemotherapie auch für Tumorprogress und -rezidiv [91]. CD133 und CD44 wurden in zahlreichen Studien als Marker von Tumorstammzellen identifiziert und es finden sich Hinweise, dass sie auch von Tumorstammzellen des Zervixkarzinoms exprimiert werden [91,92].

1.2.3.6. SPARC

Das kalziumbindende matrizelluläre Glykoprotein SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) oder Osteonectin moduliert Zell-Matrix-Interaktionen sowie das Zellwachstum. Beim Zervixkarzinom ist SPARC über eine Interaktion mit dem p53/p21-Signalweg, den Apoptoseproteinen bcl-2 und bax sowie einer Stimulation der Expressi-

on der Matrixmetalloproteasen (MMP) 2 und 9 an der Proliferation von Zervixkarzinomzellen, der Apoptoseinhibition und der Metastasierung beteiligt. Das Protein wird vor allem von hochinvasiven Krebszellsubklonen exprimiert. Ein Ausschalten von SPARC führt in vitro zu einer Suppression der Proliferation, einer Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose und einer Inhibition von Invasion und Metastasierung [93].

1.2.3.7. EMMPRIN

Das Transmembranprotein EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer), auch CD147, spielt eine signifikante Rolle bei Tumorwachstum, Angiogenese, Invasion und Metastasierung, indem es unter anderem die Produktion von MMP-1, MMP-2, MMP-9 und VEGF stimuliert. Eine Überexpression von EMMPRIN in lokal fortgeschrittenen Zervixkarzinomen ist mit einer Bestrahlungsresistenz assoziiert, ein Phänomen, dass durch eine gleichzeitige Überexpression des Glukosetransporters GLUT1 noch verstärkt wird. Die Suppression von EMMPRIN durch Transfektion hat in vitro einen anti-invasiven Effekt auf Zervixkarzinomzellen [94].

1.2.3.8. TROP2

Der Trophoblast Cell Surface Marker (TROP2) ist ein transmembranäres Glykoprotein, das in diversen Karzinomen und auch dem Zervixkarzinom nachweislich überexprimiert wird. Seine Rolle in der Karzinomentstehung und -progression wird unter anderem seiner Beeinflussung des ERK/MAPK-Signalwegs und seiner Stimulation der Expression von Zyklinen und zyklinabhängigen Kinasen (Zyclin D1, Zyclin E, CDK2, CDK4) zugeschrieben [95]. Als Oberflächenmarker ist TROP2 als Zielstruktur für eine Antikörpertherapie von Interesse. Der Einsatz des gegen TROP2 gerichteten monoklonalen Antikörpers hRS7 zeigte in vitro eine zytotoxische Wirkung bei TROP2-exprimierenden Zelllinien [96].

1.3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

CTCs gewinnen als Biomarker zur Prognoseabschätzung und Beurteilung des Therapieansprechens zunehmend an Bedeutung. Im Zeitalter der personalisierten Tumormedizin bieten CTCs eine vielversprechende Möglichkeit der nichtinvasiven Tumorcharakterisierung, sodass sie zukünftig zur Entwicklung neuer, gezielter und individualisierter Tumorthérapien beitragen können.

Das Zervixkarzinom hat auch nach Einführung nationaler Screeningprogramme nicht an Bedeutung verloren. Das Screening hat die Zervixkarzinominzidenz zwar drastisch re-

duziert, weist jedoch insbesondere bei jüngeren Patientinnen Limitationen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität auf. Es besteht klarer Bedarf der Therapieoptimierung, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien und im Hinblick auf die Entwicklung und Erprobung gezielter Tumorthapeutika. CTCs könnten einen relevanten Beitrag zu einem optimierten individualisierten Tumormanagement beim Zervixkarzinom leisten. Bisher existieren jedoch keine umfassenden Studien zum Nachweis und Nutzen von CTCs bei dieser Tumorerkrankung.

Ziel der Arbeit ist folglich die Entwicklung einer Methode, die den Nachweis zirkulierender Tumorzellen bei Patientinnen mit Zervixkarzinom ermöglicht. Die sensitive und spezifische Isolation von CTCs ist Grundvoraussetzung, um deren Relevanz auch für das Zervixkarzinom weitergehend zu untersuchen. Zu diesem Zweck soll ein Marker-Panel etabliert werden, anhand dessen Zervixkarzinomzellen von Blutzellen differenziert werden können.

Zur Evaluierung potentiell geeigneter Biomarker (s. 1.2.3.) werden Karzinomzelllinien und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt, um sie durchflusszytometrisch auf die Expression dieser Biomarker zu untersuchen. Die Möglichkeit der Charakterisierung von Zellen anhand ihrer Expression intra- und extrazellulärer Marker macht die Durchflusszytometrie zu einer geeigneten Methode zur CTC-Detektion. Die CD45-Depletion ist als Verfahren zur CTC-Anreicherung im Labor der AG Keilholz etabliert und wird daher zu diesem Zweck auch in dieser Arbeit eingesetzt.

In Spiking-Experimenten, in denen eine definierte Zahl von Zellen einer Tumorzelllinie zu einer Blutprobe eines gesunden Spenders hinzugegeben werden, soll eine Testung des zusammengestellten Markerpanels auf seine Sensitivität in der CTC-Detektion und die Optimierung der CD45-Depletion als Protokoll zur Probenvorbereitung und CTC-Anreicherung erfolgen. Zuletzt sollen Patientenproben auf das Vorkommen von CTCs untersucht und mit immunhistochemischen Färbungen von Tumorgewebe-Stichproben verglichen werden.

Die folgenden experimentellen Schritte wurden zur Bearbeitung der Fragestellung durchlaufen:

1. Die Kultur von Tumorzelllinien als Modellsystem.

2. Die Färbung von unterschiedlichen Zelllinien und PBMCs mit Antikörpern, die gegen potentielle Tumorbiomarker gerichtet sind, mit anschließender durchflusszytometrischer Messung.
3. Spiking-Experimente und Bestimmung der Wiederfindungsrate nach CD45-Depletion und Detektion der Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie und des zuvor zusammengestellten Markerpanels.
4. Die Untersuchung von Patientenproben auf das Vorkommen von CTCs mittels des etablierten Nachweisverfahrens.
5. Die Referenzfärbung von Tumorgewebe-Stichproben mit ausgewählten Markern.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Durchflusszytometer BD FACS Canto™ II	BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg
Gefriergerät -80°C	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Inkubator Heraeus B 5060	Heraeus, Hanau
Inkubator mit Rotor	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Inkubator	Heraeus, Hanau
Kühlgeräte -4°C	Liebherr, Ochsenhausen
Mikroskop Invertoskop ID03	Zeiss, Jena
Präzisionswaage KB-802	Kern&Sohn, Balingen
Sicherheitswerkbank Technoflow	Integra Biosciences, Zizers
Sicherheitswerkbank Hera Safe KS9	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Stickstoff-Nachfülltanks	Messer Industriegase, Bad Soden
Stickstofftanks	Messer Industriegase, Bad Soden
Vortexer VF2	IKA-Labortechnik, Staufen
Vortexer Merck Eurolab	Merck, Darmstadt
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Instruments, Schwabach
Vortexer Vortex Genie 2 (Model G560E, 230/240 Volt)	VWR International, Darmstadt
Zentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.2. Laborzubehör

10 ml Heparin Blutentnahmeröhrchen: BD Vacutainer® Blood Collection Tube	BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg
15ml BD Falcon™-Zentrifugenröhrchen	BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg
50ml BD Falcon™-Zentrifugenröhrchen	BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg
BD Vacutainer® One-Use Holder	BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg
Butterflies (Blutentnahme): BD Vacutainer® Safety Lok™	BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg
EasySep™ Magnet	STEMCELL Technologies, Köln
Einfrierbox	Nalgene®, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Elektronische Pipettierhilfe Pipetus® akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Eppendorfgefäße	Sarstedt, Nürnberg
FACS-Röhrchen: BD Falcon™ Round	BD Biosciences (Becton Dickinson),

Bottom Tubes	Heidelberg
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior, Lauda Königshofen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen Filter Tips	Sarstedt, Nürnberg
Serologische Pipetten	BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg
T25 Zellkulturflasche (Wachstumsfläche 25cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
T75 Zellkulturflasche (Wachstumsfläche 75cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Transferpipetten, steril	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber 25cm	Sarstedt, Nürnberg

2.1.3. Chemikalien/ Verbrauchsmaterialien

Durchflusszytometer Hüllflüssigkeit: BD FACST TM Sheath Fluid	BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg
Durchflusszytometer Reinigungsflüssigkeit: BD FACS TM Clean Solution	BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
EasySep TM CD45 Depletion Kit	STEMCELL Technologies, Köln
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 0.5M, pH 8.0)	Ambion®, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Ficoll Paque®	GE Healthcare, München
Formaldehyd 37%	Carl Roth, Karlsruhe
Hank's Salt Solution	Biochrom, Berlin
L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Lysepuffer EasySep TM RBC lysis buffer	STEMCELL Technologies, Köln
MACS® FcR blocking reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phosphat buffered saline (PBS)	Biochrom, Berlin
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Ultra Pure Water	Biochrom, Berlin
Kompensationsstandards: Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Parti-	BD Biosciences (Becton Dickinson), Heidelberg

2.2. Zellkultur

Tabelle 4: In der Zellkultur eingesetzte Pufferlösungen

Lösung	Herstellung
Einfriermedium	50% FCS 42% RPMI 8% DMSO
PBS + FCS	PBS 2% FCS

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank mit Lüftungssystem und Schwebstofffilter und unter Verwendung steriler Materialien.

2.2.1. Zelllinien

Eine Übersicht über die für diese Arbeit eingesetzten Zelllinien zeigt Tabelle 5. Die Zelllinie UD2 wurde freundlicherweise durch die AG Tinhofer-Keilholz zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5: Eigenschaften eingesetzter Zelllinien

	Gewebe	Morphologie	Wachstum	Erkrankung	Kulturmedium	Herkunft
Caski	Zervix: Metastase im Dünndarm HPV+	epithelial	adhärent	Plattenepithelkarzinom, Dünndarmmetastase	DMEM + 10% FCS + 2% L-Glutamin + 1% Penicillin/ Streptomycin	ATCC, Manassas, USA
HeLa	Zervix HPV+	epithelial	adhärent	Adenokarzinom	DMEM + 10% FCS + 2% L-Glutamin + 1% Penicillin/ Streptomycin	ATCC, Manassas, USA
SiHa	Zervix HPV+	epithelial	adhärent	Plattenepithelkarzinom Grad II	DMEM + 10% FCS + 2% L-Glutamin + 1% Penicillin/ Streptomycin	DMSZ, Braunschweig
SW620	Colon: Lymphknotenmetastase	epithelial	adhärent	Adenokarzinom, Duke C	RPMI + 20% FCS + 2* L-Glutamin + 1% Penicillin/ Streptomycin	ATCC, Manassas, USA
UD2	Hypopharynx HPV+	epithelial	adhärent	Plattenepithelkarzinom, Stadium I	DMEM + 10% FCS + 2% L-Glutamin + 1% Penicillin/ Streptomycin	AG Tinhofer- Keilholz

2.2.2. Auftauen von Zellen

Zelllinien wurden in DMSO-haltigem Einfriermedium (s. 2.2.4 und Tabelle 4) bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Die gefrorenen Zellen wurden in vorgewärmtem Kulturmedium (je nach Zelllinie, s. Tabelle 5) resuspendiert. Um das DMSO auszuwa-

schen, wurden die Zellen anschließend bei 1200rpm und 4°C 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen, je nach Größe des Pellets, in einer oder in mehreren Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.3. Prozessierung von Zellen

Die Zellen wurden im CO₂-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Eine Prozessierung erfolgte nach Kontrolle des Wachstums unter dem Mikroskop meist nach 4 Tagen. Die adhärennten Zellen wurden mechanisch mittels eines Zellschabers mobilisiert. Zur weiteren Kultivierung wurden jeweils etwa 20% der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche übertragen.

Für die Durchführung eines Experiments wurden die Zellen nach Mobilisierung in PBS + FCS aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

2.2.4. Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden Zellen bei Erreichen einer Wachstumsdichte von mindestens 90% eingefroren. Nach Ablösen der adhärennten Zellen wurden sie zentrifugiert (1200rpm, 4°C, 5 Minuten), in DMSO-haltigem Einfriermedium (s. Tabelle 4) resuspendiert und als Aliquots eingefroren. Durch den Einsatz einer Isopropanol-enhaltenden Einfrierbox wurde eine langsame, kontrollierte Einfrierrate von 1°C pro Stunde gewährleistet. Die Zellen wurden umgehend bei -80°C, später in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.3. Patienten

Patientinnen mit fortgeschrittenem, metastasiertem oder rezidiviertem Zervixkarzinom wurden 20ml Heparin-Blut entnommen. Seit der letzten Verabreichung einer zytotoxischen Chemotherapie waren mindestens 4 Wochen vergangen.

Gewebeproben wurden über die zentrale Biobank der Charité (ZeBanC) akquiriert.

Alle teilnehmenden Patientinnen haben sich schriftlich mit der Blutentnahme sowie der Entnahme von Gewebe im Rahmen diagnostischer Routineuntersuchungen mit anschließender Archivierung in der ZeBanC einverstanden erklärt. Eine Zustimmung durch die Ethikkommission der Charité liegt vor.

2.4. Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist unter 1.2.1.2 ausführlich dargestellt. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Zytometer des Typs BD FACSCanto II™ (BD Biosciences, Heidelberg) genutzt. Die Ausstattung mit drei Lasern

(405nm, 488nm, 633nm) erlaubte die simultane Messung von bis zu 10 verschiedenen Parametern.

2.4.1. Probenvorbereitung

2.4.1.1. Zellfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Tabelle 6: Bei der Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern eingesetzte Pufferlösungen

Lösung	Herstellung
100x Permeabilisierungslösung	Hank's Salt Solution 10% Saponin 5% NaN ₃
1% Formaldehyd	1:37-Verdünnung von Formaldehyd (37%) in PBS
PBS + FCS	PBS 2% FCS

Tabelle 7: Antikörper

Marker	Label	Isotyp	Firma
CD133 (AC133)	APC	IgG1 (Maus)	Miltenyi Biotec
CD16 (3G8)	PECy™7	IgG1 κ (Maus)	BD Biosciences
CD4 (OKT4)	PECy™5	IgG2b κ (Maus)	BioLegend
CD44 (G44-26)	APC	IgG2b κ (Maus)	BD Biosciences
CD45 (MEM-28)	PacificBlue™	IgG1 (Maus)	Exbio Praha
CD53 (MEM-23)	PacificBlue™	IgG1 (Maus)	Exbio Praha
CD8 (SK1)	APC Cy™7	IgG1 κ (Maus)	BD Biosciences
CK17 (2D4-1G9)	PE	IgG1 (Maus)	Novus Biologicals
CK19 (BA-17)	PE	IgG1 (Maus)	Novus Biologicals
CK7/8 (CAM5.2)	PE	IgG2a κ (Maus)	BD Biosciences
CK7/8 (CAM5.2)	FITC	IgG2a (Maus)	BD Biosciences
EGFR (AY13)	AlexaFluor®488	IgG1 κ (Maus)	BioLegend
EGFR (AY13)	PE/Cy7	IgG1 κ (Maus)	BioLegend
EMMPRIN (8D6)	PE	IgG1 (Maus)	Novus Biologicals
EpCAM (EBA-1)	PerCPCy™5.5	IgG1 λ (Maus)	BD Biosciences
P16 (G175-1239)	FITC	IgG1 κ (Maus)	BD Biosciences
SPARC (122511)	PE	IgG1 (Maus)	R&D Systems
TROP2 (77220)	APC	IgG2a (Maus)	R&D Systems

Für die Zellfärbung wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierte monoklonale Antikörper eingesetzt. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper bietet Tabelle 7. Isotypkontrollen zeigen das Ausmaß an unspezifischer Bindung eines Antikörpers an das untersuchte Material und wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Isotypkontrollen zeichnen sich durch einen mit dem markierenden Antikörper identischen Isotyp, eine identische Wirtsspezies und eine identische Fluoreszenzmarkierung aus, besitzen aber hierbei eine unklare Spezifität.

In zwei FACS-Röhrchen in PBS+FCS suspendierte Einzelzellen wurden gewaschen (1200rpm, 4°C, 5 Minuten), um sie von Aufbewahrungsmedien (z.B. Zellkulturmedien) zu befreien.

Nach jeder Zentrifugation und vor jeder Hinzugabe von Antikörpern oder Puffern wurden die Zellen durch Vortexen wieder in Suspension gebracht.

Für die Färbung von Zelloberflächenproteinen wurden 10µl FcR-Blocking Reagenz hinzugegeben und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung einer Probe mit der gewünschten Konzentration des Antikörpers und der zweiten Probe mit der identischen Konzentration der Isotypkontrolle. Um ein UV-induziertes Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern, wurden die gefärbten Proben stets unter lichtgeschützten Bedingungen gelagert. Nach 15 Minuten Inkubation wurden die Zellen erneut mit PBS + FCS gewaschen (1200rpm, 4°C, 5 Minuten), um ungebundene Antikörper zu entfernen und somit Hintergrundsignale zu reduzieren.

Wenn zusätzlich eine Färbung intrazellulärer Marker durchgeführt wurde, erfolgte diese im Anschluss an die Färbung von Oberflächenantigenen. Für die Färbung intrazellulär lokalisierter Proteine wurden Zellen zunächst in 1% Formaldehyd fixiert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 30 Minuten wurden die Zellen mit PBS gewaschen (1700rpm, 4°C, 5 Minuten). Im Anschluss wurden die Zellen für 8-10 Minuten mit 1ml 1xPermeabilisierungslösung inkubiert und zentrifugiert (1700rpm, 4°C, 5 Minuten). Nach Zugabe der intrazellulären Antikörper und Isotypkontrollen wurde 20 Minuten inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden mit 1xPermeabilisierungslösung ausgewaschen (1700rpm, 4°C, 5 Minuten).

Zur Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen in 100 - 200µl PBS aufgenommen.

2.4.1.2. Konzentrationsoptimierung von Antikörpern

Um beim Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers ein optimales Ergebnis zu erzielen, wurde im ersten Schritt eine sättigende Konzentration des Antikörpers determiniert. Wird die sättigende Konzentration überschritten, besteht das Risiko einer unspezifischen Antikörperbindung. Wird hingegen eine zu niedrige Konzentration eingesetzt, kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Daher erfolgte eine Titrierung der Konzentration neuer, noch nicht etablierter Antikörper und der entsprechenden Isotypkontrolle an der Zervixkarzinomzelllinie SiHa.

Die Titrierung wurde nach dem unter 2.4.1.1 beschriebenen Färbeprotokoll mit jeweils der gleichen Konzentration von markierendem Antikörper und Istotypkontrolle durchgeführt.

2.4.1.3. Isolierung mononukleärer Blutzellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

PBMCs wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierzu wurden 10ml Blut eines gesunden Spenders 1:3 mit PBS verdünnt und in einem 50ml Falcon™-Röhrchen vorsichtig auf 15ml Ficoll-Paque™ aufgeschichtet. Die Probe wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur und 2000rpm mit abgeschalteter Zentrifugenbremse zentrifugiert. Der dabei entstandene Buffy Coat wurde in ein 50ml Falcon™-Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen (1200rpm, 4°C, 5 Minuten).

2.4.1.4. CD45-Depletion

Tabelle 8: Bei der CD45-Depletion eingesetzte Pufferlösungen

Lösung	Herstellung
1x Lysepuffer	1:10-Verdünnung von Lysepuffer (10x) in Ultra Pure Water
Fresh Recommended Buffer (FRB)	PBS 2% FCS 2mM EDTA (0.5M, pH 8.0)
Essigsäure 2%	1:50 Verdünnung von Essigsäure (100%) in PBS

Die CD45-Depletion von Leukozyten aus einer Blutprobe wurde mithilfe des EasySep™ CD45 Depletion Kits (STEMCELL Technologies, Köln) durchgeführt.

Um die Blutprobe von Erythrozyten zu befreien, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Das Blut wurde in einem Verhältnis von 1:5 mit dem 1x Lysepuffer in einem 50ml-Falcon™-Röhrchen 10-15 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Lyse wurde die Probe zentrifugiert (1200rpm, 4°C, 5 Minuten). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Durch vorsichtiges Pipettieren mit einer 1000µl Pipette wurden die Zellen vereinzelt und im

Anschluss mit PBS gewaschen (1200rpm, 4°C, 5 Minuten). Als Depletionsmedium diente eine vom Hersteller empfohlene und in ihrer Zusammensetzung zuvor im Labor der AG Keilholz optimierte Pufferlösung (Fresh Recommended Buffer, FRB; s. Tabelle 8). Das Zellpellet wurde in einer definierten Menge FRB resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Um den Zellverlust beim Transfer zu minimieren, wurde das Falcon™-Röhrchen mit einer wiederum definierten Menge FRB gespült und diese der bereits transferierten Zellsuspension hinzugefügt. Die Zelldichte wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt: Es wurden 20µl der Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:20 mit 2% Essigsäure verdünnt. Mindestens zwei diagonal zueinander liegende Großquadrate der Zählkammer wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die Zelldichte anhand der folgenden Formel bestimmt:

Zelldichte = Volumen der Zellsuspension (in ml) x durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat x Verdünnungsfaktor x 1×10^4 (Kammerfaktor)

Nach Zentrifugation (1200rpm, 4°C, 5 Minuten) wurde das Zellpellet in FRB in einer Zielkonzentration von 1000µl FRB pro 5×10^7 Zellen resuspendiert.

Im nächsten Schritt wurde die Probe zuerst mit dem EasySep™ CD45 Depletion Cocktail (CD45-Depletionscocktail) in einer Konzentration von 50µl/ 1000µl FRB, dann mit EasySep™ Magnetic Particles (magnetischen Nanopartikeln) in einer Konzentration von 100µl/ 1000µl FRB für jeweils 15-20 Minuten bei 4°C inkubiert. Durch zwischenzeitliches Schwenken oder Vortexen wurde eine Sedimentation der Zellen verhindert und somit eine verbesserte Bindung von Depletionscocktail und magnetischen Nanopartikeln ermöglicht.

Die Probe wurde mit FRB auf ein Gesamtvolumen von 3-3,5 ml aufgefüllt und durch Pipettieren sorgfältig durchmischt, um die Magnetfläche des EasySep™-Magneten vollständig zu nutzen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten im Magneten wurde der CD45-depletierte Überstand mit einer sterilen Transferpipette in ein neues FACS-Röhrchen überführt. Die CD45-positive Fraktion wurde ungefärbt zur Einstellung des Zytometers mitgeführt. Die CD45-depletierte Fraktion wurde sorgfältig durch Pipettieren vereinzelt und auf zwei FACS-Röhrchen aufgeteilt. Im Anschluss erfolgte die Färbung eines Ansatzes mit den markierenden Antikörpern und des zweiten Ansatzes mit den entsprechenden Isotypkontrollen (s. 2.4.1.1.).

2.4.1.5. Spiking von Zellen einer Tumorzelllinie in Gesundblut

Tabelle 9: In Spiking-Experimenten eingesetzte Pufferlösungen

Lösung	Herstellung
PBS + FCS	PBS 2% FCS
2% Essigsäure	1:50 Verdünnung von Essigsäure (100%) in PBS
1x Lysepuffer	1:10-Verdünnung von Lysepuffer (10x) in Ultra Pure Water
Fresh Recommended Buffer (FRB) (Immer frisch herstellen)	PBS 2% FCS 2mM EDTA (0.5M, pH 8.0)
1% Formaldehyd	1:37-Verdünnung von Formaldehyd (37%) in PBS
100x Permeabilisierungspuffer	Hank's Salt Solution 10% Saponin 5% NaN ₃

Folgende Schritte sind zur Durchführung eines Spiking-Experiments erforderlich:

1. Blutentnahme:

Für ein Spiking-Experiment wurden 10ml Heparin-Blut eines gesunden, d.h. in erster Linie nicht an einer Tumorerkrankung leidenden Spenders, vorzugsweise eines Nichtraucher, entnommen. Das Blut wurde bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 12 Stunden nach der Blutentnahme verarbeitet.

2. Vorbereitung der Tumorzellen und Lösungen:

Die in Tabelle 9 gezeigten Lösungen wurden zu Beginn des Experiments vorbereitet. Zellen einer Tumorzelllinie (s. Tabelle 5) wurden, wie unter 2.2.3 beschrieben, gewonnen und bis zur Weiterverarbeitung in PBS+FCS auf Eis gelagert. 1ml der Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt. Daraus wurden 10µl für die Zellzählung entnommen und 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Der Farbstoff kann von lebenden Zellen aktiv ausgeschieden werden, während er tote Zellen blau anfärbt. Die Zählung der lebenden Zellen erfolgte unter Verwendung der Neubauer Zählkammer (s. 2.4.1.4). Es wurden stets alle 4 Großquadrate ausgezählt. Die für das Spiking gewünschte Zellzahl der Tumorzelllinie wurde durch Verdünnung erreicht, wobei in jedem Verdünnungsschritt mindestens 80µl der Zellsuspension pipettiert wurden.

3. Spiking:

Das Spenderblut wurde in zwei Ansätze aufgeteilt. Einem der Ansätze wurde die gewünschte Tumorzellzahl hinzugegeben. Der zweite Ansatz diente als tumorzellfreie Kontrolle.

4. CD45-Depletion:

Es erfolgte eine Erythrozytenlyse und anschließende CD45-Depletion wie unter 2.4.1.4 beschrieben.

5. Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern:

Die Proben wurden mit PBS+FCS (1400rpm, 4°C, 5 Minuten) gewaschen und anschließend nach dem unter 2.4.1.1 beschriebenen Protokoll gefärbt. Leukozyten wurden durch eine Färbung der Leukozytenantigene CD45 und CD53 mit PacificBlue™-konjugierten Antikörpern markiert.

Die zum Spiking verwendete Zelllinie durchlief denselben Färbeprozess und diente bei der späteren durchflusszytometrischen Messung als Positivkontrolle.

2.4.1.6. Vorbereitung von Patientenblutproben

Für die CTC-Analyse in Patientenblut wurde den Patienten 20ml Heparin-Blut entnommen. Das Blut wurde im Zeitraum von < 4 Stunden weiterverarbeitet und bis zu Beginn des Experiments in einem Inkubator mit Rotor bei Raumtemperatur gelagert.

Die Patientenblutproben wurden wie die Proben nach Spiking nach dem unter 2.4.1.4 und 2.4.1.5 beschriebenen Protokoll vorbereitet. Wenn die Messung am Durchflusszytometer nicht am selben Tag durchgeführt werden konnte, wurden die Proben mit 1% Formaldehyd fixiert. Alle Messungen erfolgten im Zeitraum von <24 Stunden nach Abschluss der Probenvorbereitung.

2.4.2. Messung

Zur Geräteeinstellung am BD FACSCanto™ II wurde die Software BD FACSDiva™ (BD Biosciences, Heidelberg) eingesetzt.

Vor einer Messreihe am Durchflusszytometer wurden die Empfindlichkeit der Detektoren anhand der angelegten Spannung gesteuert und spektrale Überlappungen mittels Kompensation, einem Prinzip der elektronischen Subtraktion, minimiert.

Ein Schwellenwert von FSC = 10 000 wurde gewählt, um Hintergrundsignale durch kleine, nicht zelluläre Probenbestandteile zu vermeiden.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erreichen, wurden bei der Versuchsreihe mit Patientenblutproben die Einstellungen des Zytometers beibehalten bzw. hinsichtlich der Spannungs-/ Verstärkereinstellungen nur minimal adaptiert.

2.4.2.1. Spannungs- und Verstärkereinstellungen

Indem die Empfindlichkeit der Detektoren anhand der angelegten Spannung adaptiert wird, lassen sich die Messparameter (FSC, SSC, Fluoreszenz) entsprechend der zu messenden Probe einstellen. Die Optimierung der Parameter erfolgte manuell anhand eines ungefärbten Kontrollansatzes der zu messenden Zellart.

Dot Plots stellten die Verteilung eines Parameters sowie das Verhältnis von zwei Messparametern zueinander dar. In einem Dot Plot, der die Zellgröße (FSC) auf der x-Achse gegen die Zellkomplexität (SSC) auf der y-Achse darstellt, wurde die angelegte Spannung für die entsprechenden Parameter (FSC und SSC) so gewählt, dass im Resultat die gesamte Zellpopulation innerhalb der Grenzen des Dot Plots lag.

Die Optimierung der Spannungs- und Verstärkereinstellungen für die Fluoreszenzparameter erfolgte mithilfe von Histogrammen. In Histogrammen kann die Fluoreszenzintensität eines Einzelparameters abgebildet werden. Durch Adaptation der angelegten Spannung wurde das Histogramm, das die ungefärbten Zellen im Sinne einer Negativpopulation darstellt, auf der x-Achse in den Bereich einer niedrigen Fluoreszenzintensität verlagert. Somit wurde eine bessere Differenzierung von negativ und positiv ermöglicht.

2.4.2.2. Kompensation

Beim simultanen Einsatz von mehreren fluoreszenzmarkierten Antikörpern kann es zu spektralen Überlappungen kommen. Mit der Kompensation können spektrale Überlappungen nach dem Prinzip der elektronischen Subtraktion korrigiert werden.

Die Kompensation erfolgte mit Hilfe von Kompensationsstandards (Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set, BD Biosciences, Heidelberg). Diese bestehen aus zwei Arten von Mikropartikeln: Einer Positivkontrolle, die einen spezifischen Rezeptor für alle leichtkettenträgenden Immunglobuline der Antikörper-Wirtspezies besitzt, und einer Negativkontrolle ohne Bindungskapazitäten. Werden die Kompensationsstandards gefärbt, erhält man zwei klar voneinander abgrenzbare Populationen, die eine gefärbt, die andere ungefärbt. Für jedes in einem Experiment eingesetzte Fluorochrom wurde ein Ansatz der Kompensationsstandards mit den entsprechenden Antikörpern in identischer Konzentration gefärbt. In Dot Plots wurden jeweils zwei Fluoreszenzparameter gegeneinander aufgetragen, wobei das Fluorochrom, mit dem gefärbt wurde, auf der x-Achse lag. Wenn die Emissionsspektren der gewählten Fluorochrome überlappen, detektiert jeder Detektor auch Signale des benachbarten

Farbstoffes, sodass im Dot Plot die Population der Positivkontrolle im rechten oberen Quadranten erscheint. In diesem Falle wurde manuell eine Kompensation durchgeführt. Erfolgreich kompensierte Fluoreszenzparameter zeigten sich im entsprechenden Dot Plot mit der Negativpopulation im linken unteren und der Positivpopulation im rechten unteren Quadranten. Die Kompensation wurde auf diese Weise für jede Fluorochrom-Kombination wiederholt.

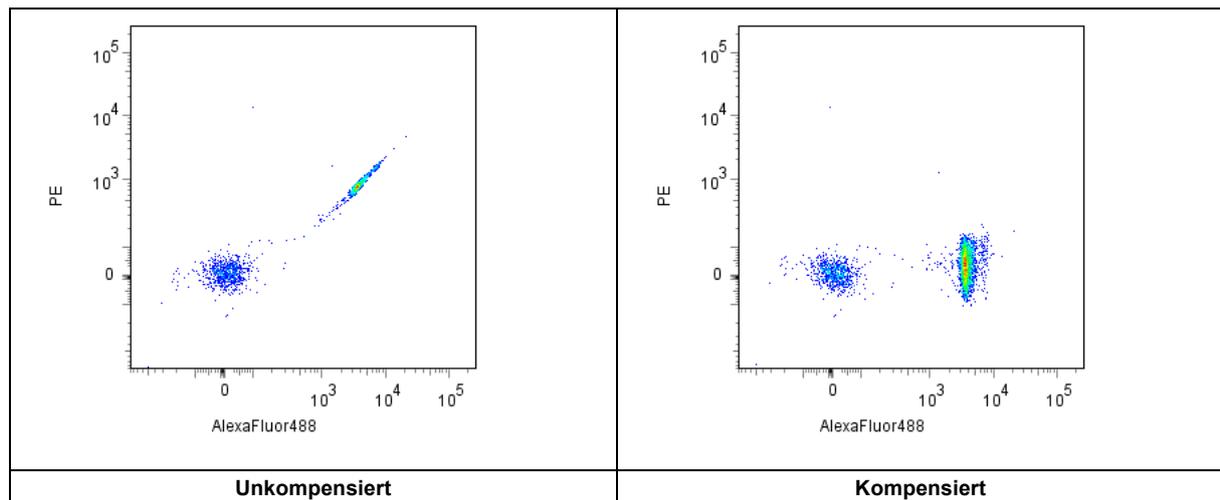


Abbildung 1: Kompensation

Exemplarisch ist eine Färbung von Kompensationsstandards mit dem Antikörper Anti-EGFR AlexaFluor®488 aufgetragen. Gezeigt ist die Überlappung des Fluoreszenzspektrums von AlexaFluor® mit PE. Die auf der x-Achse weiter links liegende Population repräsentiert jeweils die Negativkontrolle, die weiter rechts liegende Population die Positivkontrolle der Kompensationsstandards. Auf der linken Seite ist das Messergebnis vor Kompensation gezeigt: Das Signal des Fluorochroms AlexaFluor®488 wird durch den benachbarten Detektor ebenfalls aufgenommen, sodass die Positivkontrolle als doppelt-positiv für AlexaFluor®488 und PE erscheint. Nach Kompensation durch Subtraktion von 21% des AlexaFluor®488-Signals, das durch den PE-Detektor gemessen wird, erhält man das rechts dargestellte Ergebnis. Die Positivkontrolle wird jetzt lediglich als positiv für AlexaFluor®488, dem Fluorochrom, mit dem sie gefärbt wurde, erkannt.

2.4.3. Auswertung

Die Auswertung der Messergebnisse wurde mit Hilfe der Software FlowJo™ 7.2.2 (FlowJo LLC, Ashland, USA) durchgeführt.

Um Subpopulationen zu analysieren und mehr als zwei Parameter miteinander in Verbindung zu setzen, wurden Gates eingesetzt.

Für jedes Messergebnis wurde in einem Dot Plot (FSC gegen SSC) die Hauptpopulation durch Setzen eines Gates definiert, wobei kleiner Zelldebris ausgeschlossen wurde.

Die in diesem Gate dargestellte Zellpopulation wird nachfolgend als *Hauptpopulation* bezeichnet. Im Folgenden werden stets nur Zellen betrachtet, die innerhalb des Gates *Hauptpopulation* liegen. Die Gates wurden, wenn nicht anders beschrieben, anhand der Isotypkontrolle definiert und für die gefärbten Zellen identisch übernommen.

2.4.3.1. Konzentrationsoptimierung

Die Ergebnisse der in unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen durchgeführten Färbungen der Zelllinie SiHa wurden zur Abbildung der Fluoreszenzintensität in Histogrammen dargestellt. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Die sättigende Konzentration eines Antikörpers wird demnach unterschritten, sobald das Histogramm des markierenden Antikörpers sich auf der horizontalen Achse in der Lage des Histogramms der Isotypkontrolle annähert. Als optimale Konzentration wurde die geringste Konzentration definiert, bei der eine klare Trennung der Signale von Isotypkontrolle und markierendem Antikörper erreicht wurde.

2.4.3.2. Zelllinien und PBMCs

Folgende Messergebnisse lagen zur Auswertung vor:

1. mit Isotypkontrollen gefärbter Ansatz, im Folgenden als *Kontrolle* bezeichnet
2. mit den markierenden Antikörpern gefärbter Ansatz, im Folgenden als *Gefärbt* bezeichnet

Für jedes eingesetzte Fluorchrom wurde ein Dot Plot erstellt, wobei die Fluoreszenzparameter jeweils auf der x-Achse und SSC auf der y-Achse aufgetragen wurden. Die Position der Ergebnisse aus *Kontrolle* im linken Bereich des Dot Plots definiert den negativen Bereich. Das Gate, in dem in dieser Darstellung mit einem markierten Antikörper gefärbte Zellen zu erwarten waren, umschloss demnach den rechten Bereich des Dot Plots (Positivbereich). Die linke Begrenzung des Gates wurde durch die Lage der Zellen aus *Kontrolle* mit einem Zielwert von 1% falsch-positiver Zellen innerhalb des Gates definiert.

Um die Intensität einer Färbung aufzuzeigen, wurden *Gefärbt* und *Kontrolle* außerdem für jedes eingesetzte Fluorchrom in Histogrammen dargestellt.

2.4.3.3. Spiking

Folgende Messergebnisse lagen zur Auswertung vor:

1. Zellen der zum Spiking verwendeten Tumorzelllinie (Referenzfärbung)

- a. mit den Isotypkontrollen der markierenden Antikörper gefärbte Tumorzellen, im Folgenden als *Referenz-Kontrolle* bezeichnet
 - b. mit den markierenden Antikörpern gefärbte Tumorzellen, im Folgenden als *Referenz-Gefärbt* bezeichnet
2. Blutproben
- a. Gesundblut, tumorzellfrei, mit Isotypkontrollen der markierenden Antikörper gefärbt, im Folgenden als *Gesundblut-Kontrolle* bezeichnet
 - b. Gesundblut, tumorzellfrei, mit den markierenden Antikörpern gefärbt, im Folgenden als *Gesundblut-Gefärbt* bezeichnet
 - c. Gesundblut nach Spiking mit Tumorzellen, mit Isotypkontrollen der markierenden Antikörper gefärbt, im Folgenden als *Spiking-Kontrolle* bezeichnet
 - d. Gesundblut nach Spiking mit Tumorzellen, mit markierenden Antikörpern gefärbt, im Folgenden als *Spiking-Gefärbt* bezeichnet

Die Auswertung eines Spiking-Experiments erfolgte in den folgenden Schritten:

1. Definition der CD45/53-negativen Fraktion (potentieller Tumorzellen):
Spiking- und *Gesundblut-Kontrolle* sowie die Referenzfärbung der Tumorzelllinie wurden nicht mit einem Antikörper gegen CD45/53 gefärbt, definieren also die Lage der CD45/53-negativen Population. In einem Dot Plot mit CD45/43 PacificBlue™ auf der x-Achse und SSC auf der y-Achse wurde demnach ein Gate festgelegt, das die Zellpopulation aus *Spiking-* und *Gesundblut-Kontrolle* sowie der Referenzfärbung vollständig einschließt (*CD45-negativ*). Dieses wurde anschließend auf alle übrigen Proben übertragen.
2. Darstellung der Eigenschaften der Tumorzelllinie:
 Die Population *CD45-negativ* der Tumorzelllinie wurde in Dot Plots auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Wurden mehr als zwei Marker analysiert, waren mehrere Dot Plots erforderlich. Das Gate wurde hier anhand der gefärbten Probe (*Referenz-Gefärbt*) determiniert und somit die Lage der Tumorzellpopulation festgelegt (*Tumorzellgate*). In *Referenz-Kontrolle* sollten keine Zellen innerhalb des Tumorzellgates liegen.
3. Übertragen der Gates auf die Blutproben:
 Die in Schritt 2 festgelegten Tumorzellgates wurden zunächst für *Spiking-* und *Gesundblut-Kontrolle* sowie für *Gesundblut-Gefärbt* übernommen und eventuell

angepasst, um die Rate falsch-positiver Ergebnisse zu minimieren. Jede Änderung des Tumorzellgates anhand der Blutproben wurde mit *Referenz-Gefärbt* abgeglichen, um sicherzustellen, dass die Kernpopulation der Tumorzelllinie durch das Gate erfasst war. Nachdem das Tumorzellgate auf diese Weise optimiert wurde, wurde es auf *Spiking-Gefärbt* übertragen. In diesem Gate wurden die dem Blut zugefügten Tumorzellen erwartet, demnach wurden die innerhalb des Tumorzellgates liegenden Zellen ausgezählt und anhand der bekannten Anzahl hinzugegebener Tumorzellen die Wiederfindungsrate prozentual bestimmt.

2.4.3.4. Patientenblut

Folgende Messergebnisse lagen zur Auswertung vor:

1. Patientenblut, mit Isotypkontrollen der markierenden Antikörper gefärbt, im Folgenden als *Patient-Kontrolle* bezeichnet
2. Patientenblut, mit den markierenden Antikörpern gefärbt, im Folgenden als *Patient-Gefärbt* bezeichnet

Das Verfahren zur Auswertung von Patientenproben entspricht im Grundsatz dem eines Spiking-Experiments: Anhand von *Patient-Kontrolle* wurde die CD45-negative Fraktion in einem Gate definiert. Diese wiederum wurde auf ihre Markerexpression untersucht, indem die Fluorochrome der eingesetzten Marker in Dot Plots gegeneinander aufgetragen wurden. Diese Dot Plots wurden durch Gates in 4 Quadranten unterteilt. Die Quadranten wurden durch die Lage der Zellen in *Patient-Kontrolle* definiert: Die Kernpopulation von *Patient-Kontrolle* ist Marker-negativ und sollte im linken unteren Quadranten liegen. Die übrigen drei Quadranten identifizieren Marker-positiv Zellen und sollten in *Patient-Kontrolle* möglichst keine Zellen enthalten.

2.5. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten anhand von Tumorgewebe, das in der zentralen Biomaterialdatenbank der Charité (ZeBanC) archiviert worden war. Das Gewebe lag in Form von Paraffinblöcken vor.

Geeignete Präparate wurden anhand von Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen ausgewählt, die im Rahmen der Routinediagnostik hergestellt worden waren.

Die Paraffinschnitte und die immunhistochemischen Färbungen wurden mit den Geräten und Reagenzien des immunhistochemischen Labors des Instituts für Pathologie am Charité Campus Mitte angefertigt.

Am Mikrotom (pfmmedical, Köln) wurden die Paraffinblöcke in einer Dicke von 2-3µm geschnitten, die Schnitte dann auf einen Objektträger aufgebracht und im Inkubator (Heraeus, Hanau) über Nacht bei <60°C oder für 30 Minuten bei 90°C in aufrechter Position getrocknet. Das auf diese Weise verflüssigte Paraffin konnte somit ablaufen.

Backen, Entparaffinierung, Multiparameter-Zellfärbung, Gegenfärbung und Titrierung erfolgten vollautomatisiert (BenchMark ULTRA, Ventana, Tucson, USA). Die Antikörper wurden in der optimalen Verdünnung manuell aufgetropft.

Tabelle 10: Zur immunhistochemischen Färbung eingesetzte Antikörper

Protokoll	Marker	Klonalität	Verdünnung	Firma
Mild	CK8 (C51)	monoklonal	1:500	BioGenex
Protease	CK7 (OV-TL12/30)	monoklonal	1:1000	Dako
Protease	EGFR (5B7)	monoklonal	Vom Hersteller vorverdünnt	Ventana
Protease	EpCAM (Ber-EP4)	monoklonal	1:200	Dako
Amplifier	P16 (E6H4)	monoklonal	1:2	Ventana

Je nach eingesetztem Antikörper wurden unterschiedliche, im Automaten voreingestellte Protokolle zur Färbung verwendet (s. Tabelle 11).

Allgemein erfolgt nach der Entparaffinierung eine Epitopdemaskierung mittels eines Cell Conditioners (ULTRA Cell Conditioner 1) oder Proteasen. ULTRA CC1 ist ein Tris-basierter Puffer mit leicht basischen pH, der in der Lage ist, bei der Formalinfixierung entstandene kovalente Bindungen zwischen Aldehyd- und Aminogruppen und Methylbrücken zu hydrolysieren und der formalinbedingten Proteindenaturierung entgegenzuwirken. Proteasen spalten Proteine, um Epitope freizulegen. Durch beide Verfahren kann eine signifikant bessere Antikörperbindung erreicht werden.

Auf die manuelle Titration des Primärantikörpers folgt eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin und anschließend mit einem Bluing Reagent. Ein Liquid Cover Slip (LCS) wird eingesetzt, der eine Reaktionskammer auf der Oberfläche des Objektträgers erzeugt, um die Evaporation zu kontrollieren, die Integrität des Gewebes zu schützen und die Menge des verwendeten Reagenz zu minimieren.

Der Antikörper gegen p16 ist ein schwach färbender Mausantikörper, sodass ein Amplifier eingesetzt wurde, um die Signalintensität zu erhöhen.

Nach Abschluss der automatisierten Färbung wurden die Proben in Ethanol (99%) und Xylol, bzw. dem weniger toxischen NeoClear gewaschen und nach Aufbringen des Deckglases im Inkubator bei 60°C getrocknet.

Tabelle 11: Färbeprotokolle des BenchMark ULTRA

	Mild	Protease	Amplifier
Backen	70°C, 8 min	--	70°C, 8 min
Entparaffinierung	Auf mittlere Temperatur erhöhen	Auf mittlere Temperatur erhöhen	Auf mittlere Temperatur erhöhen
Epitopdemaskierung	ULTRA CC1 95°C 8 min – 20 min – 36 min	1 Tropfen Protease 1+LCS 8 min	ULTRA CC1 95°C 8 min – 20 min – 36 min
Titration (Primärantikörper)	Manuell auftragen 32 min	Manuell auftragen 40 min	Manuell auftragen 32 min
Verstärkung	--	--	OptiView Amplification Kit
Gegenfärbung	1 Tropfen Hematoxylin+LCS 8 min 1 Tropfen Bluing Reagent + LCS 4 min	1 Tropfen Hematoxylin+LCS 4 min 1 Tropfen Bluing Reagent + LCS 4 min	1 Tropfen Hematoxylin+LCS 4 min 1 Tropfen Bluing Reagent + LCS 4 min

2.6. Statistik

Für die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Berechnungen wurde die Software Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung eines Marker-Panels zum CTC-Nachweis

Potentiell geeignete Marker wurden mittels Literaturrecherche identifiziert.

Die Konzentration von Antikörpern, die nicht bereits zum durchflusszytometrischen Einsatz optimiert waren, wurden an der Zervixkarzinomzelllinie SiHa titriert (Konzentrationsoptimierung). Anhand dieser Zelllinie wurde determiniert, ob mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen einen neuen Marker der durchflusszytometrische Nachweis von Zervixkarzinomzellen mit ausreichender Sensitivität erfolgen kann. Ein für die CTC-Detektion gut geeigneter Marker sollte von der gesamten Zellpopulation in hohem Ausmaß exprimiert werden und sich durch einen spezifisch gegen ihn gerichteten fluoreszenzmarkierten Antikörper mit hoher Intensität anfärben lassen. Vergleichend erfolgten Färbungen der Zelllinien Caski und HeLa und der Zelllinie UD2, die einem HPV-positiven Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs entstammt. Zur Qualitätskontrolle des Färbeprotokolls erfolgte eine Referenzfärbung der Zelllinie SW620 mit den zur CTC-Detektion im Labor der AG Keilholz bereits etablierten Markern CK7/8 und EpCAM. Die Tumorzelllinien wurden nicht zu einem definierten Zeitpunkt ihres Lebenszyklus untersucht.

Durch die Kontrollfärbung von PBMCs wurde überprüft, ob ein Marker tumorzellspezifisch ist.

3.1.1. EpCAM

3.1.1.1. Konzentrationsoptimierung

Tabelle 12: Anti-EpCAM Antikörperspezifikationen

	Clon	Isotyp (Wirt)	Label	Konzentration (µg/ml)	Einsatzmenge (µl)	Firma
Antikörper	EBA-1	IgG1 λ (Maus)	PerCP Cy™5.5	2	20	BD Biosciences
Isotypkontrolle	X40	IgG1 λ (Maus)	PerCP Cy™5.5	25	1.6	BD Biosciences

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper gegen EpCAM war im Labor der AG Keilholz bereits im durchflusszytometrischen Einsatz etabliert.

Tabelle 12 spezifiziert die für die Verwendung des Antikörpers relevanten Daten.

3.1.1.2. Bestimmung der Sensitivität an Zelllinien

Die Zervixkarzinomzelllinien SiHa, HeLa und Caski, die Kopf-Hals-Tumor-Zelllinie UD2 und die Kolonkarzinom-Zelllinie SW620 wurden mit dem Anti-EpCAM-Antikörper gefärbt.

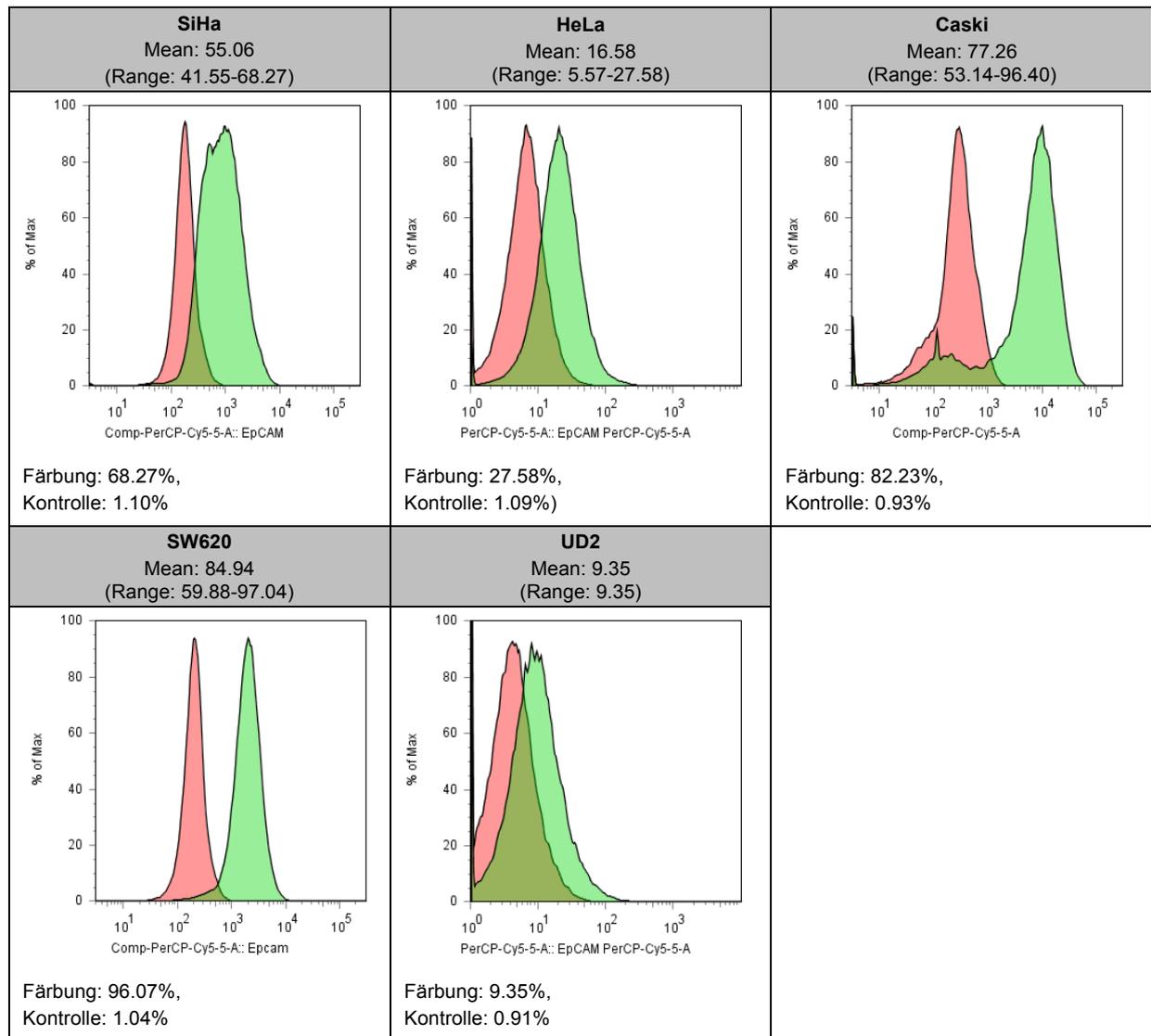


Abbildung 2: Färbung von Tumorzelllinien mit dem Antikörper Anti-EpCAM PerCPCy™5.5

Die Histogrammdarstellungen zeigen die Intensität der Färbung verschiedener Zelllinien mit dem Antikörper Anti-EpCAM PerCPCy™5.5. Es ist jeweils exemplarisch das Ergebnis einer repräsentativen Färbung abgebildet. Angegeben sind der Durchschnitt (Mean) und die Spannweite (Range) im Dot Plot innerhalb des Positivgates liegender Zellen (hier nicht dargestellt) sowie die konkreten Ergebnisse (% Färbung und % Kontrolle) der gezeigten Färbung.

Anzahl durchgeführter Färbungen: SiHa n=8, HeLa n=2, Caski n=3, SW620 n=7, UD2 n=1.

Als Referenz lässt sich die Kolonkarzinomzelllinie SW620 intensiv mit EpCAM anfärben. Auch die Zervixkarzinomzelllinie Caski zeigt eine stark EpCAM-positive, in 2 von 3 Färbungen jedoch auch eine EpCAM-negative Zellpopulation. Die Zervixkarzinomzelllinien SiHa und HeLa sind hingegen nur schwach EpCAM-positiv. Es lassen sich keine unterschiedlichen Populationen voneinander abgrenzen. Die Fluoreszenzintensität ist bei der Färbung von SiHa höher als bei der Färbung von HeLa. Die Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie UD2 lässt sich nicht gegen EpCAM anfärben, es wurde jedoch nur eine Färbung mit EpCAM an dieser Zelllinie durchgeführt. Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der Zelllinienfärbung mit dem Anti-EpCAM-Antikörper.

3.1.1.3. Bestimmung der Spezifität an PBMCs

PBMCs ließen sich nicht mit dem Anti-EpCAM Antikörper anfärben. Dies deutet auf eine ausreichende Spezifität des Antikörpers zum Einsatz in der durchflusszytometrischen Analyse von CTCs beim Zervixkarzinom hin.

3.1.2. Zytokeratine

Es wurden jeweils 3 Färbungen mit PE-konjugierten Antikörpern gegen CK17 und CK19 mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 1 µg/Test durchgeführt (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Anti-CK17 und Anti-CK19 Antikörperspezifikationen

	Clon	Isotyp (Wirt)	Label	Konzentration (mg/ml)	Einsatzmenge (µl)	Firma
CK17	2D4-1G9	IgG1 (Maus)	PE	1	1	Novusbio
CK19	BA-17	IgG1 (Maus)	PE	1	1	Novusbio
Isotypkontrolle	MOPC-31C	IgG1 (Maus)	PE	1	1	Novusbio

Insbesondere der Antikörper gegen CK17 war in der Lage, die Gesamtpopulation der Zelllinie SiHa mit hoher Intensität anzufärben (mittlerer prozentualer Anteil an Zellen im Positivgate: 97,63%). Bei der Färbung mit CK19 lagen nur durchschnittlich 14,24% der Zellen im Positivgate. Jedoch kam es bei beiden Antikörpern auch bei der Färbung von PBMCs zu einem positiven Signal. Es erfolgten demnach keine weiteren Versuche mit diesen Antikörpern.

3.1.2.1. Konzentrationsoptimierung

Ein PE-konjugierter gegen CK7 und CK8 gerichteter Antikörper war im Labor der AG Keilholz bereits im durchflusszytometrischen Einsatz etabliert. Tabelle 14 spezifiziert die für die Verwendung des Antikörpers relevanten Daten.

Tabelle 14: Anti-CK7/8 Antikörperspezifikationen

	Clon	Isotyp (Wirt)	Label	Konzentration (µg/ml)	Einsatzmenge (µl)	Firma
Antikörper	CAM5.2	IgG2a κ (Maus)	PE	6	15	BD Biosciences
Isotypkontrolle	G155-178	IgG2a κ (Maus)	PE	50	1.8	BD Biosciences

3.1.2.2. Bestimmung der Sensitivität an Zelllinien

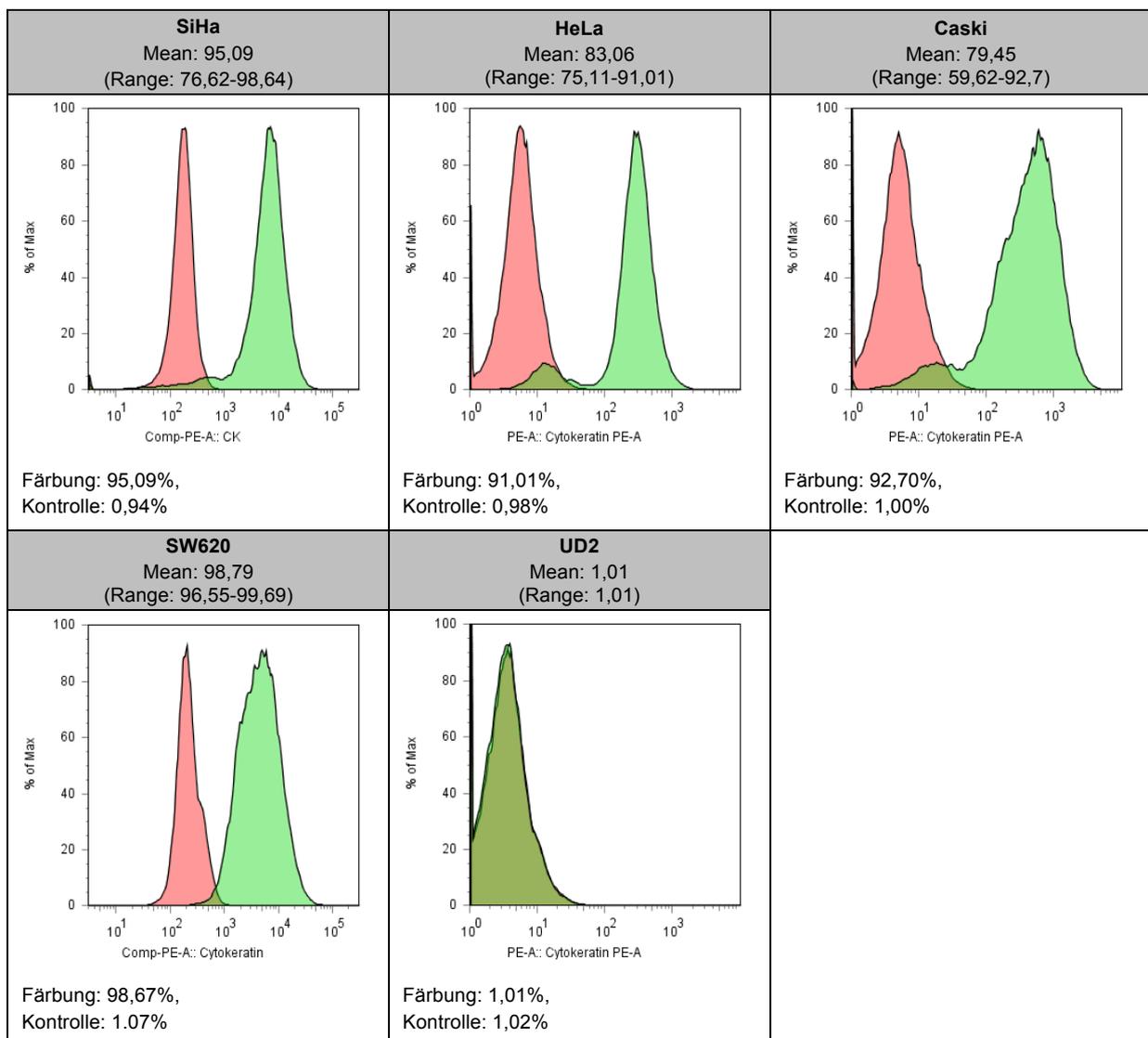


Abbildung 3: Färbung von Tumorzelllinien mit dem Antikörper Anti-CK7/8 PE

Repräsentative Histogrammdarstellungen zeigen die Intensität der Färbung verschiedener Zelllinien mit dem Antikörper Anti-CK7/8 PE. Angegeben sind der Durchschnitt (Mean) und die Spannweite (Range) im Dot Plot innerhalb des Positivgates liegender Zellen (hier nicht dargestellt), sowie die konkreten Ergebnisse (% Färbung und % Kontrolle) der gezeigten Färbung.

Anzahl der Färbungen: SiHa n=12, HeLa n=2, Caski n=3, SW620 n=7, UD2 n=1.

In allen Zervixkarzinomzelllinien sowie der Kolonkarzinomzelllinie SW620 ließen sich durchschnittlich mindestens 91% der Zellen intensiv mit dem Antikörper gegen CK7/8 anfärben. In einer von 2 Färbungen der Zelllinie HeLa, 3 von 3 Färbungen der Zelllinie Caski, 5 von 7 Färbungen der Zelllinie SW620 und 10 von 12 Färbungen der Zelllinie SiHa fand sich eine klar abzugrenzende zweite, CK7/8-negative Population.

Die Kopf-Hals-Karzinomzelllinie UD2 erwies sich als negativ für die CK7/8. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Zelllinienfärbung zeigt Abbildung 3.

3.1.2.3. Bestimmung der Spezifität an PBMCs

PBMCs ließen sich nicht mit dem Antikörper gegen CK7/8 anfärben. Dies deutet auf eine ausreichende Spezifität des Antikörpers zum Einsatz in der durchflusszytometrischen Analyse von CTCs beim Zervixkarzinom hin.

3.1.3. EGFR

3.1.3.1. Konzentrationsoptimierung

Um möglichst viele unterschiedliche Markerkombinationen zu ermöglichen, wurden ein AlexaFluor®488- und ein PE-Cy®7-konjugierter Antikörper gegen EGFR getestet und für den durchflusszytometrischen Einsatz optimiert.

Die Titrierung des AlexaFluor®488-konjugierten Antikörpers erfolgte ausgehend von einer vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 2µg/Test.

Eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität war erst ab einer Konzentration von 0,02µg/Test zu erkennen (s. Abbildung 4). Für alle weiteren Färbungen wurde daher eine Konzentration von 0,08µg/Test festgelegt (s. Abbildung 4 und Tabelle 15).

Der PE-Cy™7-konjugierte Antikörper wurde ausgehend von einer vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,5µg/Test titriert. Es zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 0,05µg/Test eine sehr geringe und bei einer Konzentration von 0,02µg/Test dann eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität (s. Abbildung 4). Eine Konzentration von 0,1µg/Test wurde für die Folgeversuche als Einsatzmenge determiniert (s. Abbildung 4 und Tabelle 15).

Verdünnung	EGFR AlexaFluor®488		EGFR PE-Cy7™7	
	Konzentration/ Test (Einsatzmenge)	Histogrammdarstellung	Konzentration/ Test (Einsatzmenge)	Histogrammdarstellung
Empfohlen	2µg/ Test (AK= 5µl, IK= 10µl)		0,5µg/ Test (AK= 5µl, IK= 2,5µl)	
1:1,67	1,2µg/ Test (AK= 3µl, IK= 6µl)		0,3µg/ Test (AK= 3µl, IK= 1,5µl)	
1:10	0,2µl/ Test (AK= 0,5µl, IK= 1µl)		0,05µg/ Test (AK= 0,5µl, IK= 0,25µl)	
1:100	0,02µl/ Test (AK= 0,05µl, IK=0,1µl)		0,005µg/ Test (AK= 0,05µl, IK= 0,025µl)	
Optimal	0,08µg/ Test (AK= 0,2µl, IK=0,4µl)		0,1µg/ Test (AK=1µl, IK=0,5µl)	

Abbildung 4: Konzentrationsoptimierung der Antikörper Anti-EGFR AlexaFluor®488 und Anti-EGFR PECy™7

Dargestellt ist die Färbeintensität nach Färbung mit den Antikörpern Anti-EGFR AlexaFluor®488 und Anti-EGFR PECy™7 in absteigender Konzentration. Angegeben sind die jeweilige Einsatzmenge von Antikörper (AK) und Isotypkontrolle (IK) und die entsprechende Konzentration pro Test. Die Darstellung der optimalen Konzentration ist grau unterlegt.

Tabelle 15: Anti-EGFR Antikörperspezifikationen

	Clon	Isotyp (Wirt)	Label	Konzentration (µg/ml)	Einsatzmenge (µl)	Firma
Antikörper	AY13	IgG1 κ (Maus)	AlexaFluor® 488	400	0.2	BioLegend
	AY13	IgG1 κ (Maus)	PECy™7	100	1	BioLegend
Isotypkontrolle	MOPC-21	IgG1 κ (Maus)	AlexaFluor® 488	200	0.4	BioLegend
	MOPC-21	IgG1 κ (Maus)	PECy™7	200	0.5	BioLegend

3.1.3.2. Bestimmung der Sensitivität an Zelllinien

Durchschnittlich mindestens 87% der Zellen aller Zervixkarzinomzelllinien und der Kopf-Hals-Karzinomzelllinie UD2 ließen sich intensiv mit den Antikörpern gegen EGFR anfärben (s. Abbildung 5).

5 von 7 Färbungen der Zelllinie SiHa und eine von 2 Färbungen der Zelllinie Caski wurden mit dem AlexaFluor®488-konjugierten Antikörper durchgeführt.

Eine dieser 5 Färbungen der Zelllinie SiHa mit Anti-EGFR AlexaFluor®488 weist eine geringe Fluoreszenzintensität auf und wich damit stark von den übrigen Ergebnissen ab.

Bei 2 von 7 Färbungen der Zelllinie SiHa (Antikörper: Anti-EGFR AlexaFluor®488) fand sich eine kleine, separate, EGFR-negative Population. Bei der Färbung der Zelllinie Caski mit Anti-EGFR AlexaFluor®488 waren eine EGFR-positive und eine EGFR-negative Population zu differenzieren, die jeweils etwa die Hälfte der Gesamtpopulation ausmachten.

3.1.3.3. Bestimmung der Spezifität an PBMCs

PBMCs ließen sich mit keinem der beiden Antikörper gegen EGFR anfärben. Dies deutet auf eine ausreichende Spezifität des Antikörpers zum Einsatz in der durchflusszytometrischen Analyse von CTCs beim Zervixkarzinom hin.

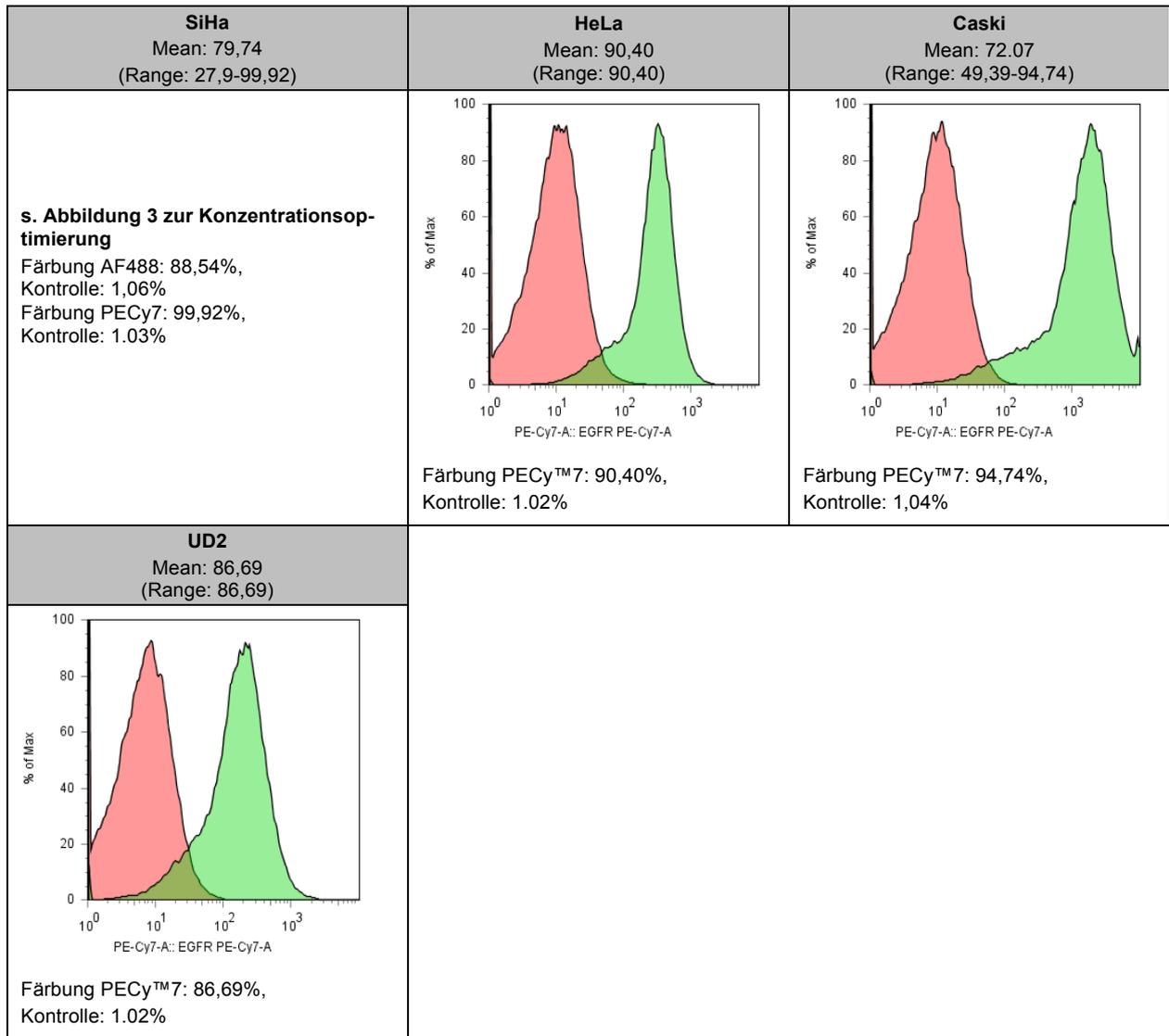


Abbildung 5: Färbung von Tumorzelllinien mit Anti-EGFR AlexaFluor®488 und PECy™7

Die Histogrammdarstellungen zeigen die Intensität der Färbung verschiedener Zelllinien mit spezifischen Antikörpern gegen EGFR. Die Ergebnisse der Färbung der Zelllinie SiHa sind nicht erneut dargestellt. Siehe hierzu die Darstellung der optimalen Konzentration in Abbildung 3. Für die anderen Zelllinien ist jeweils exemplarisch das Ergebnis einer Färbung mit dem Antikörper Anti-EGFR PECy™7 gezeigt. Angegeben sind der Durchschnitt (Mean) und die Spannweite (Range) im Dot Plot innerhalb des Positivgates liegender Zellen (hier nicht dargestellt), sowie die konkreten Ergebnisse (% Färbung und % Kontrolle) der gezeigten Färbung.

Anzahl der Färbungen: SiHa n=7, HeLa n=1, Caski n=2, UD2 n=1.

3.1.4. p16

3.1.4.1. Konzentrationsoptimierung

Bei der Färbung der Zelllinie SiHa mit Anti-p16 FITC konnte selbst mit der empfohlenen Konzentration von 1µg/Test keine ausreichende Färbeintensität erreicht werden.

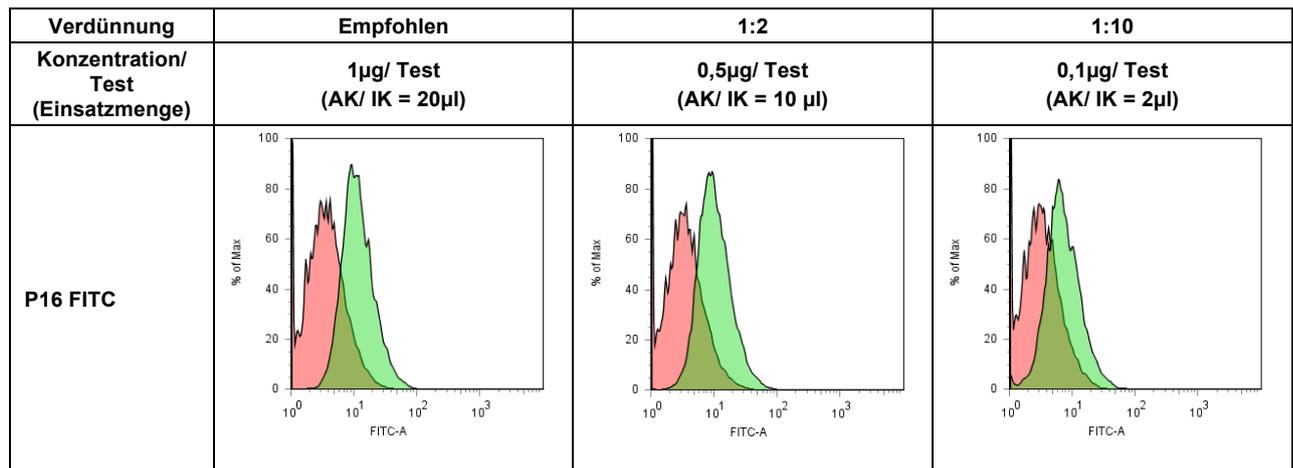


Abbildung 6: Konzentrationsoptimierung des Antikörpers Anti-p16 FITC

Dargestellt ist die Färbeintensität nach Färbung mit dem Antikörper Anti-p16 FITC in absteigender Konzentration. Angegeben sind die jeweilige Einsatzmenge von Antikörper (AK) und Isotypkontrolle (IK) sowie die entsprechende Konzentration pro Test.

Tabelle 16: Anti-p16 Antikörperspezifikationen

	Clon	Isotyp (Wirt)	Label	Konzentration (µg/ml)	Einsatzmenge (µl)	Firma
Antikörper	G175-1239	IgG1 κ (Maus)	FITC	50	20	BD Biosciences
Isotypkontrolle	MOPC-21	IgG1 κ (Maus)	FITC	50	20	BD Biosciences

3.1.4.2. Bestimmung der Sensitivität an Zelllinien

Da aufgrund der unzureichenden Fluoreszenzintensität bei der Färbung von SiHa keine optimale Einsatzmenge definiert werden konnte, wurde für weitere Experimente die vom Hersteller empfohlene Konzentration von 1µg/Test gewählt, die in der Färbung der Zelllinie SiHa das beste Ergebnis lieferte (s. Abbildung 6 und Tabelle 16).

Bei keiner der untersuchten Zelllinien gelang mit dem FITC-konjugierten Antikörper gegen p16 eine Färbung mit ausreichender Fluoreszenzintensität (s. Abbildung 7).

3.1.4.3. Bestimmung der Spezifität an PBMCs

Bei der Färbung von PBMCs mit dem FITC-konjugierten Antikörper gegen p16 fand sich eine kleine, klar abzugrenzende p16-positive Zellpopulation neben der p16-negativen Kernpopulation. Es erfolgten daher Gegenfärbungen mit den Leukozytenmarkern CD4 (Lymphozyten: T-Helfer-Zellen), CD8 (Lymphozyten: zytotoxische T-Zellen) und CD16 (Monozyten). Die p16-positive Zellpopulation erwies sich als CD4-, CD8- und CD16+.

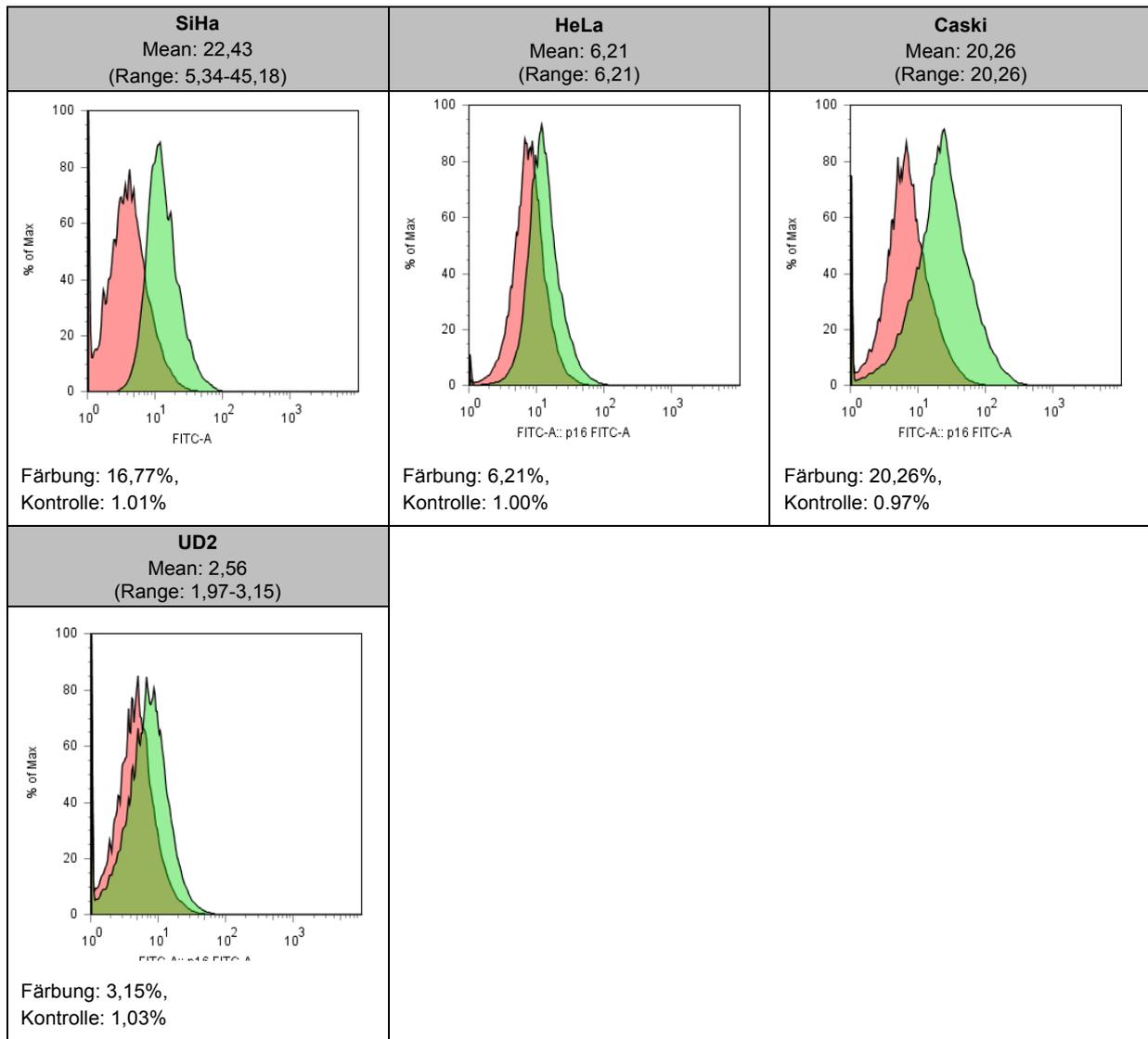


Abbildung 7: Färbung von Tumorzelllinien mit Anti-p16 FITC

Die Histogrammdarstellungen zeigen die Intensität der Färbung verschiedener Zelllinien mit dem Antikörper Anti-p16 FITC. Es ist jeweils exemplarisch das Ergebnis einer repräsentativen Färbung abgebildet. Angegeben sind der Durchschnitt (Mean) und die Spannweite (Range) im Dot Plot innerhalb des Positiv-gates liegender Zellen (hier nicht dargestellt), sowie die konkreten Ergebnisse (% Färbung und % Kontrolle) der gezeigten Färbung.

Anzahl der Färbungen: SiHa n=3, HeLa n=1, Caski n=1, UD2 n=2.

3.1.5. Weitere

3.1.5.1. Stammzellmarker

Für den APC-konjugierten Antikörper gegen CD133 war im Labor der AG Keilholz bereits eine optimale Einsatzmenge von 10µl des Antikörpers und 2,5µl der Isotypkontrolle definiert. Nach Färbung von SiHa und HeLa unter diesen Bedingungen konnte kein Fluoreszenzsignal gemessen werden.

Ein spezifisch gegen CD44 gerichteter, APC-konjugierter Antikörper konnte die Gesamtpopulation der Zelllinie SiHa intensiv anfärben. Die Konzentration wurde auf 0,3µg/Test optimiert. Bei der Färbung von PBMCs mit dieser Antikörperkonzentration resultierte ein deutliches Fluoreszenzsignal.

Tabelle 17: Anti-CD44 und Anti-CD133 Antikörperspezifikationen

		Clon	Isotyp (Wirt)	Label	Konzentration (µg/ml)	Einsatzmenge (µl)	Firma
CD133	Antikörper	AC133	IgG1 (Maus)	APC	2,2	10	Miltenyi Biotec
	Isotypkontrolle	IS5-21F5	IgG1 (Maus)	APC	22	2,5	Miltenyi Biotec
CD44	Antikörper	G44-26	IgG2b κ (Maus)	APC	3	10	BD Biosciences
	Isotypkontrolle	27-35	IgG2b κ (Maus)	APC	6,25	4,8	BD Biosciences

3.1.5.2. SPARC

Tabelle 18: Anti-SPARC Antikörperspezifikationen

	Clon	Isotyp (Wirt)	Label	Konzentration (µg/ml)	Einsatzmenge (µl)	Firma
Antikörper	122511	IgG1 (Maus)	PE	25	10	R&D Systems
Isotypkontrolle	11711	IgG1 (Maus)	PE	25	10	R&D Systems

Als sezerniertes Protein kann SPARC sowohl in intrazellulären Kompartimenten, wie z.B. als Inhalt von Sekretionsgranula, als auch als Oberflächenantigen vorkommen. Es wurden daher Färbungen mit einem PE-konjugierten spezifischen Antikörper gegen SPARC mit der durch den Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,25µg/Test nach dem Protokoll zur Färbung von Oberflächen- und mit dem Protokoll zur Färbung von intrazellulären Markern an der Zelllinie SiHa durchgeführt. Die Zelllinie UD2 wurde als Referenz ebenfalls gegen SPARC angefärbt, da in der Literatur eine SPARC-Überexpression bei Kopf-Hals-Tumoren beschrieben wurde, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert war [97].

Beide Zelllinien ließen sich weder nach dem Protokoll zur intrazellulären noch nach dem zur Färbung von Oberflächenantigenen mit dem Anti-SPARC-Antikörper anfärben. Da sich der Marker damit bereits als ungeeignet erwiesen hatte, wurde keine Kontrollfärbung von PBMCs durchgeführt.

3.1.5.3. EMMPRIN

Tabelle 19: Anti-EMMPRIN Antikörperspezifikationen

	Clon	Isotyp (Wirt)	Label	Konzentration (mg/ml)	Einsatzmenge (µl)	Firma
Antikörper	8D6	IgG1 (Maus)	PE	0,8	1,25	Novusbio
Isotypkontrolle	MOPC-21	IgG1 (Maus)	PE	1	1	Novusbio

Ein PE-konjugierter spezifischer Antikörper gegen EMMPRIN wurde an der Zelllinie SiHa evaluiert. Für die Isotypkontrolle wurde durch den Hersteller eine Konzentration von 1µg/Test vorgeschlagen. Ausgehend von dieser Empfehlung erfolgte die Titrierung des Antikörpers. Erst bei einer Konzentration von 4µg/Test ließ sich die gesamte Zellpopulation intensiv anfärben. Allerdings fand sich bereits bei einer Konzentration von 1µg/Test ein schwaches Signal bei der Färbung von PBMCs. Aufgrund der hierdurch gezeigten unzureichenden Spezifität wurde der Marker nicht für weitere Experimente im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

3.1.5.4. TROP2

Tabelle 20: Anti-TROP2 Antikörperspezifikationen

	Clon	Isotyp (Wirt)	Label	Konzentration (µg/ml)	Einsatzmenge (µl)	Firma
Antikörper	77220	IgG2a (Maus)	APC	10	10	R&D Systems
Isotypkontrolle	MOPC-21	IgG2a (Maus)	APC	10	10	R&D Systems

Mit einem APC-konjugierten spezifischen Antikörper gegen TROP2 ließ sich die Gesamtpopulation der Zelllinie SiHa mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,1µg/Test mit mäßiger Intensität anfärben. Erst eine Erhöhung der Antikörperkonzentration auf 0,15µg/ Test führte zu einem starken Fluoreszenzsignal, das eine klare Differenzierung gefärbter Zellen von der ungefärbten Isotypkontrolle ermöglicht. Bei der Färbung von PBMCs mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration resultierte ein schwaches Fluoreszenzsignal.

Aufgrund der hierdurch gezeigten unzureichenden Sensitivität und Spezifität wurde der Marker nicht für weitere Experimente im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

3.1.6. Markerpanel zur CTC-Detektion beim Zervixkarzinom

Anhand der unter 3.1.1-3.1.5. beschriebenen Ergebnisse wurde das in Tabelle 21 gezeigte Markerpanel zur durchflusszytometrischen Detektion von CTCs beim Zervixkarzinom zusammengestellt.

Tabelle 21: Potentielles Markerpanel zur CTC-Detektion im Blut von Patientinnen mit Zervixkarzinom

Marker	Label	Konzentration ($\mu\text{g}/\text{Test}$)	Firma
CK7/8	PE	0,09	BD Biosciences
EpCAM	PerCPCy™5.5	0,5	BD Biosciences
EGFR	AlexaFluor®488	0,08	BioLegend
CD45	PacificBlue™	4 $\mu\text{l}/\text{Test}$	Exbio
CD53	PacificBlue™	4 $\mu\text{l}/\text{Test}$	Exbio

3.2. Spiking

Die 15 Spiking-Experimente mit der Zelllinie SW620 (K =Kolon) und die 12 Spiking-Experimente mit der Zelllinie SiHa (Z=Zervix) wurden entsprechend der Reihenfolge ihrer Durchführung nummeriert (1-6) um aufzuzeigen, welche Experimente gemeinsam durchgeführt wurden (a-d). Bei gemeinsam durchgeführten Experimenten entstammten die zum Spiking verwendeten Tumorzellen einem gemeinsamen Grundstock der Zelllinie, dem die jeweils gewünschte Zellzahl entnommen wurde und der dann nach Färbung als gemeinsame Referenz diente. Die Spender der Gesundheitsprobe variierten im Verlauf der Versuchsreihe.

Das Tumorzellgate ($CD45-/CK+/EpCAM+$ bzw. $CD45-/CK+/EGFR+$) wurde anhand von *Referenz-Gefärbt* definiert (s. 2.4.3.3.) und an *Spiking-Kontrolle* und *Gesundblut-Gefärbt* angepasst, sodass möglichst viele Zellen der Tumorzelllinie und dabei möglichst wenige unspezifisch gefärbte Zellen durch das Gate erfasst wurden.

3.2.1. Spiking mit SW620

Die Kolonkarzinomzelllinie SW620 zeigte gemäß den Ergebnissen unter 3.1.1.2 und 3.1.2.2 eine starke Expression der Marker EpCAM und CK7/8. Die Zelllinie wurde daher eingesetzt, um die im Rahmen dieser Arbeit praktizierte Methode des Spikings und der durchflusszytometrischen Tumorzelldetektion zu validieren. Es wurden Spiking-Experimente mit unterschiedlichen Zellzahlen durchgeführt. Tabelle 22 zeigt eine Übersicht über Experimente, Anzahl hinzugegebener Tumorzellen, Wiederfindungsraten und Raten falsch-positiver Zellen im Tumorzellgate ($CD45-/CK+/EpCAM+$) in *Gesundblut-Gefärbt*.

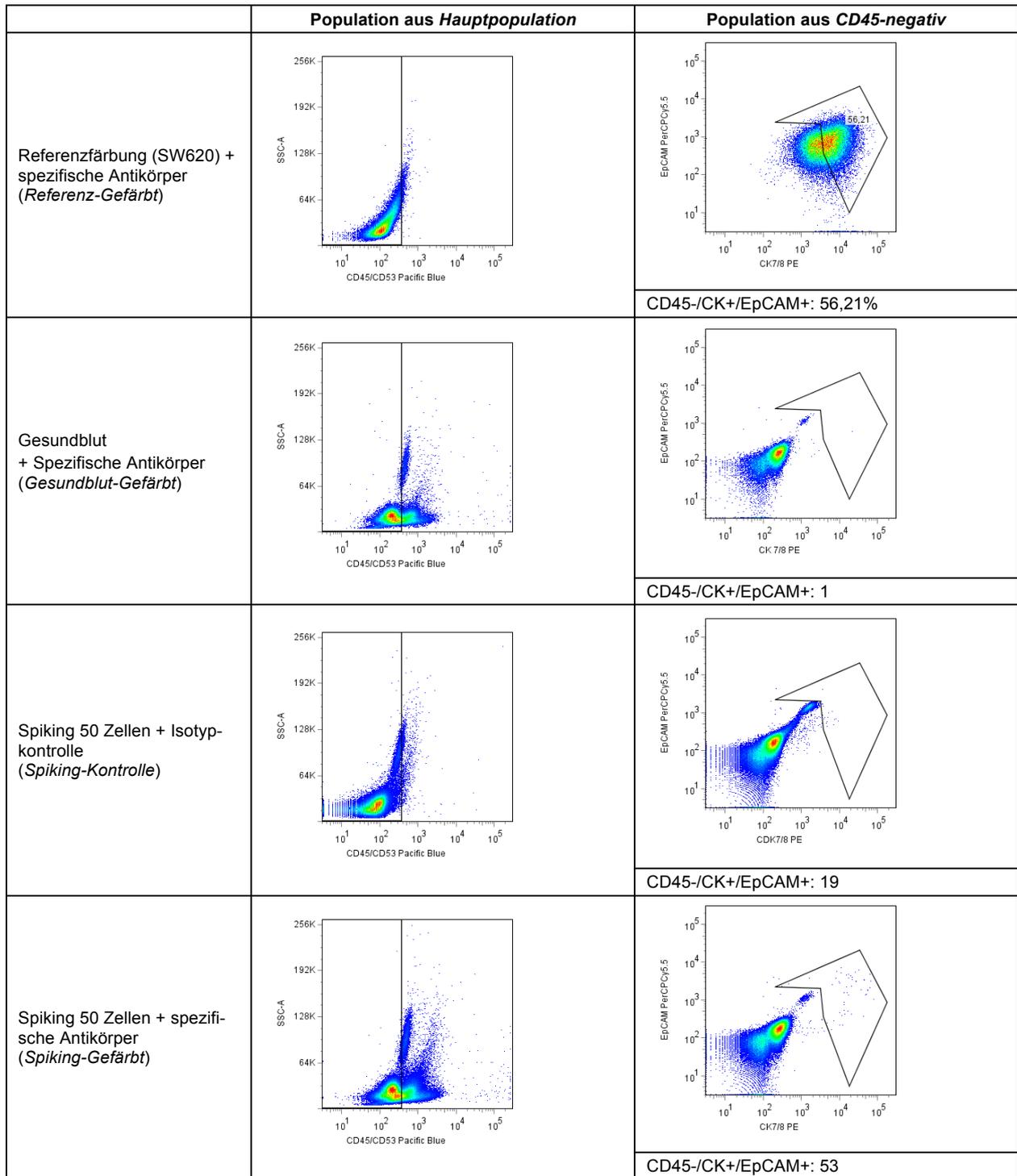


Abbildung 8: Ergebnisse des Spiking-Experiments K5a

50 Zellen der Zelllinie SW620 wurden zu Gesundblut hinzugegeben. Bei diesem Experiment lagen 56,21% der SW620-Zellen in *Referenz-Gefärbt* im Tumorzellgate. In der Negativkontrolle *Gesundblut-Gefärbt* fand sich eine falsch-positive Zelle im Tumorzellgate. Die Isotypkontrolle *Spiking-Kontrolle* zeigte ein mäßiges Hintergrundsignal (n=19 Zellen im Tumorzellgate). Bei 53 Zellen im Tumorzellgate bei *Spiking-Gefärbt* kann von einer Wiederfindungsrate von 106% ausgegangen werden.

Bei Anwendung der unter 2.4.3.3 beschriebenen Gatingstrategie lagen noch durchschnittlich ca. 76% (56,21-92,44%) der SW620-Zellen in *Referenz-Gefärbt* innerhalb des Tumorzellgates.

In *Gesundblut-Gefärbt* konnte die Zahl der innerhalb des Tumorzellgates liegenden Zellen dadurch auf durchschnittlich 7,33 (1-13) Zellen reduziert werden.

Mithilfe der Marker CK7/8 und EpCAM konnte insgesamt eine Wiederfindungsrate von durchschnittlich 50% mit einer hohen Schwankungsbreite von 16-122% erreicht werden. Das Spiking mit 500 Zellen führte durchschnittlich zu einer Wiederfindungsrate von knapp 40%, das Spiking mit 50 Zellen zu einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von ca. 65%. Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Ergebnisse des Spiking-Experiments K5a.

Tabelle 22: Ergebnisse der Spiking-Experimente mit der Zelllinie SW620

	Marker	Zellzahl	Wiederfindungsrate (%)	Falsch-positiv (Zellzahl)
K1a	CK, EpCAM	500	54,8	13
K1b	CK, EpCAM	500	35	13
K1c	CK, EpCAM	500	29,2	13
K2a	CK, EpCAM	500	38,4	1
K2b	CK, EpCAM	500	41,2	1
K2c	CK, EpCAM	500	34,4	1
K3a	CK, EpCAM	200	39,5	6
K3b	CK, EpCAM	100	21	6
K3c	CK, EpCAM	50	58	6
K4a	CK, EpCAM	50	122	11
K4b	CK, EpCAM	50	72	11
K4c	CK, EpCAM	50	28	11
K4d	CK, EpCAM	50	50	11
K5a	CK, EpCAM	50	106	1
K5b	CK, EpCAM	50	16	5
Mittelwert (Range) gesamt			49,7 (16-122)	7,33 (1-13)
Mittelwert (Range) 500 Zellen			38,83 (29,2-54,8)	7 (1-13)
Mittelwert (Range) 50 Zellen			64,57 (16-122)	8 (1-11)

3.2.2. Spiking mit SiHa

Die unter 3.1 beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Marker EGFR und CK7/8 stark und der Marker EpCAM mäßig von Zellen der Zelllinie SiHa exprimiert werden. In Spiking-Experimenten mit der Zelllinie SiHa sollte evaluiert werden, ob das etablierte Markerpanel in der Detektion von Zervixkarzinomzellen im Blut ausreichend sensitiv ist und ob der Einsatz von Anti-EGFR die Wiederfindungsrate beeinflusst. Zur Färbung von EGFR wurde der AlexaFluor™488-konjugierte Antikörper eingesetzt.

Tabelle 23: Ergebnisse der Spiking-Experimente mit der Zelllinie SiHa

	+/- EGFR	Zell zahl	Wieder- findungsrate: CK/EpCAM (%)	Wieder- findungsrate CK/EGFR (%)	Falsch-positiv EpCAM (Zellzahl)	Falsch-positiv EGFR (Zellzahl)
Z1a	-	500	50,4	--	6	--
Z1b	+	500	23,4	24,8	6	6
Z6	+	500	8	8,6	21	26
Z2a	-	200	25	--	1	--
Z2b	+	200	12	9,5	1	0
Z2c	+	100	20	16	1	0
Z4	-	100	28	--	2	--
Z5a	-	100	6	--	14	--
Z5b	-	100	24	--	3	--
Z2d	+	50	20	8	1	0
Z3a	-	50	18	--	4	--
Z3b	-	50	14	--	4	--
Mittelwert (Range) gesamt			20,32 (6-50,4)	13,38 (8-24,8)	5,33 (1-21)	6,4 (0-26)
Mittelwert (Range) 500 Zellen			27,27 (8-50,4)	--	11 (6-21)	--
Mittelwert (Range) 200 Zellen			18,5 (12-25)	--	1	--
Mittelwert (Range) 100 Zellen			19,5 (6-28)	--	5 (1-14)	--
Mittelwert (Range) 50 Zellen			17,33 (14-20)	--	3 (1-4)	--
Experimente, bei denen der Marker EGFR zusätzlich zu der Markerkombination aus EpCAM und CK7/8 eingesetzt wurde, sind grau unterlegt.						

Zur Auswertung dieser Experimente wurden zwei Tumorzellgates definiert:

CD45-/CK+/EpCAM+ bzw. *CD45-/CK+/EGFR+*. Vergleichend wurden Experimente mit der an SW620 erprobten Markerkombination aus CK7/8 und EpCAM durchgeführt. Unterschiedliche Tumorzellzahlen wurden zum Spiking eingesetzt.

Tabelle 23 zeigt eine Übersicht über Experimente, eingesetzte Marker, Anzahl hinzugegebener Tumorzellen, Wiederfindungsraten und Raten falsch-positiver Zellen in *Gesundblut-Gefärbt*. Durchschnittlich ca. 73% (26,95-91,55%) der SiHa-Zellen in *Referenz-Gefärbt* lagen innerhalb des Tumorzellgates *CD45-/CK+/EpCAM+* und ca. 71% (36,11-89,75%) innerhalb des Tumorzellgates *CD45-/CK+/EGFR+*. Die Zellzahl innerhalb der Tumorzellgates in *Gesundblut-Gefärbt* wurde auf diese Weise auf durchschnittlich 5,33 (1-21 in *CD45-/CK+/EpCAM+*) bzw. 6,4 (0-26 in *CD45-/CK+/EGFR+*) gesenkt. Insgesamt wurde mithilfe der Marker EpCAM und CK7/8 eine Wiederfindungsrate von durchschnittlich ca. 20% (6-50,4%) und mithilfe der Marker EGFR und CK7/8 eine Wiederfindungsrate von durchschnittlich 13% (8-24,8%) erreicht.

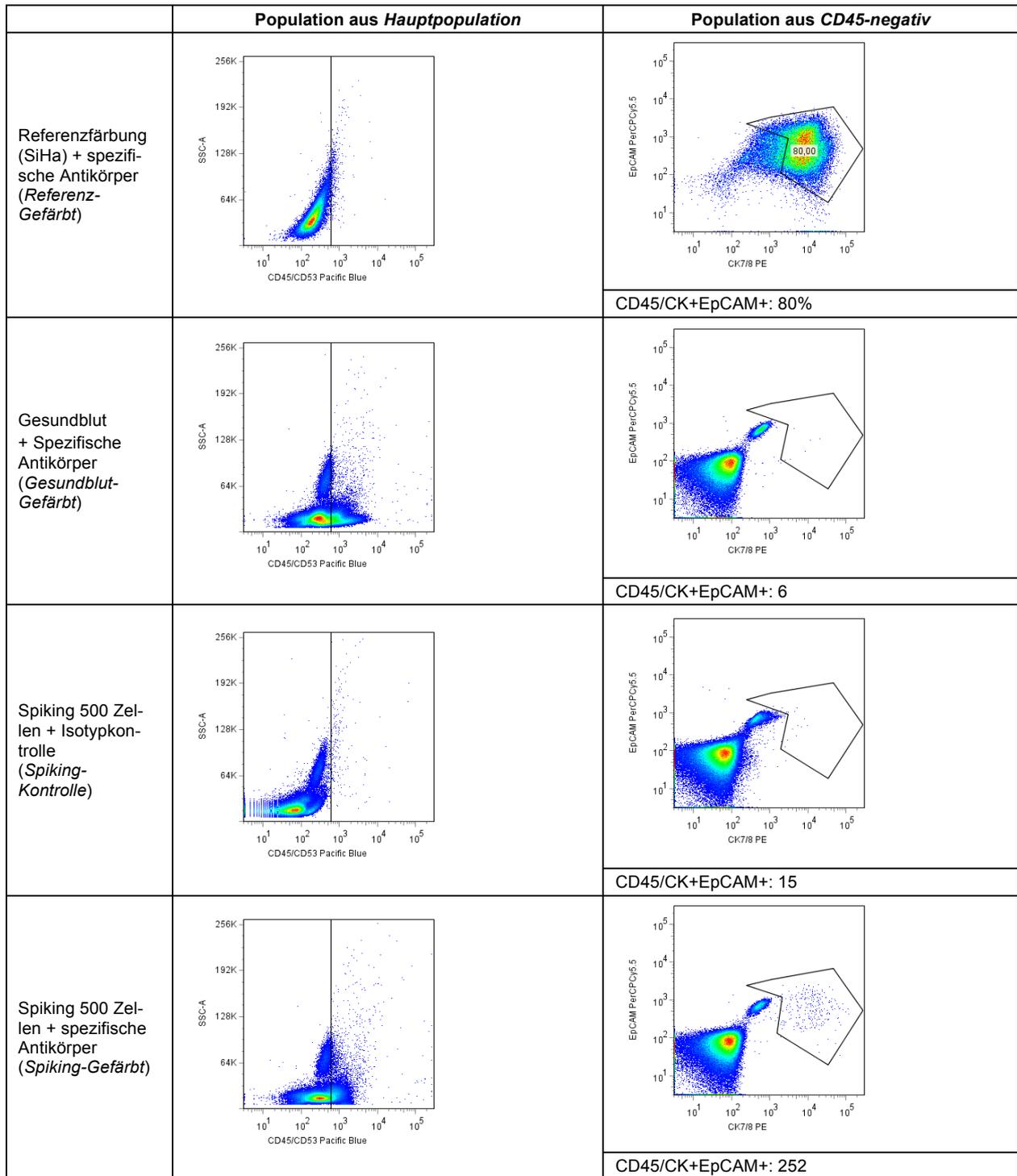


Abbildung 9: Ergebnis des Spiking-Experiments Z1a ohne Anti-EGFR

500 Zellen der Zelllinie SiHa wurden zu Gesundblut hinzugegeben. Bei diesem Experiment lagen 80% der SiHa-Zellen in *Referenz-Gefärbt* im Tumorzellgate. In der Negativkontrolle *Gesundblut-Gefärbt* fanden sich 6 falsch-positive Zellen im Tumorzellgate. Die Isotypkontrolle *Spiking-Kontrolle* zeigte ein mäßiges Hintergrundsignal (n=15 Zellen im Tumorzellgate). Bei 252 Zellen im Tumorzellgate in *Spiking-Gefärbt* kann von einer Wiederfindungsrate von 50,4% ausgegangen werden.

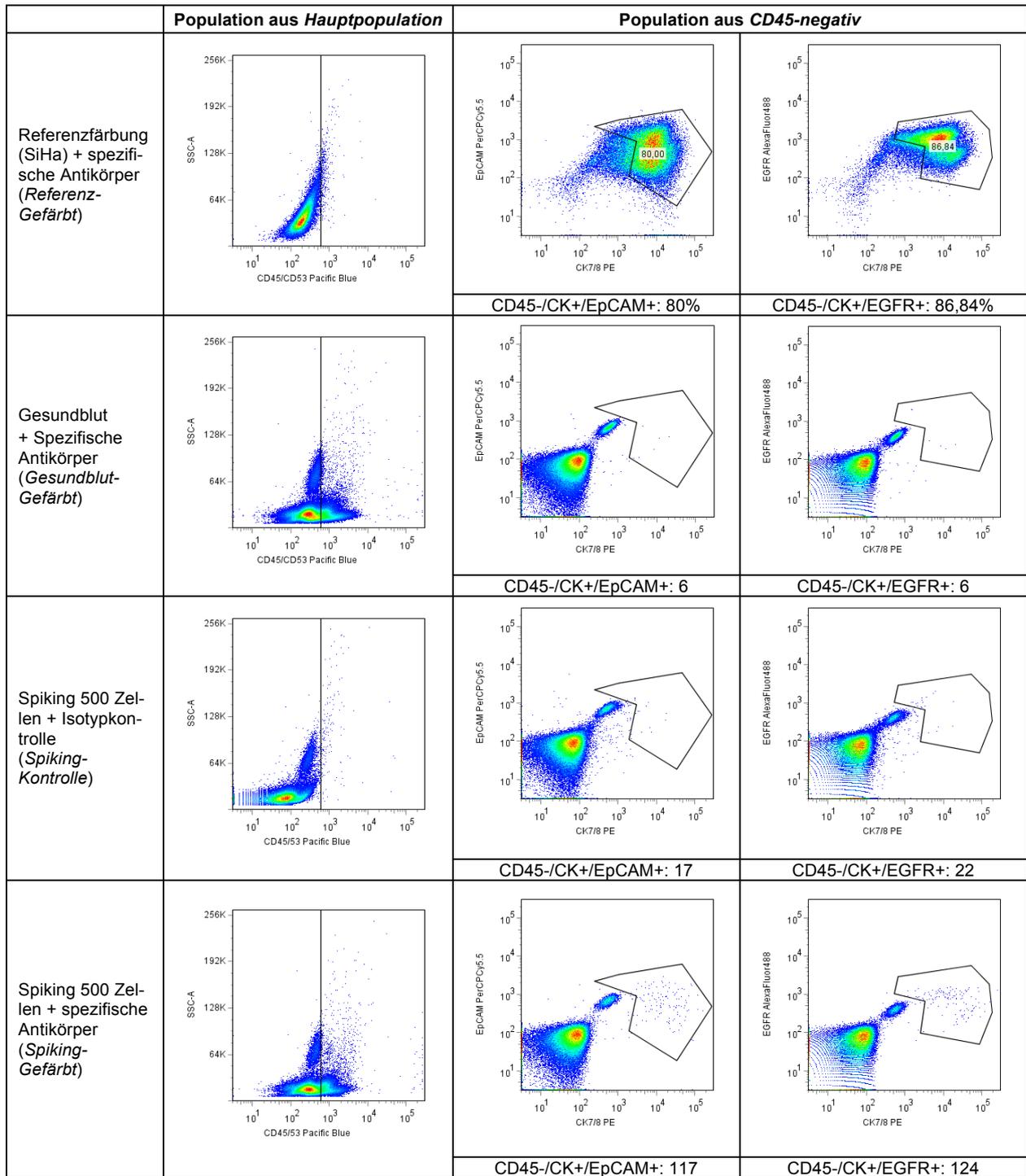


Abbildung 10: Ergebnisse des Spiking-Experiments Z1b mit Anti-EGFR

500 Zellen der Zelllinie SiHa wurden zu Gesundblut hinzugegeben. Bei diesem Experiment lagen 80% der SiHa-Zellen in *Referenz-Gefärbt* im Tumorzellgate *CD45-/CK+/EpCAM+* und 86,84% im Tumorzellgate *CD45-/CK+/EGFR+*. In der Negativkontrolle *Gesundblut-Gefärbt* fanden sich 6 falsch-positive Zellen in beiden Tumorzellgates. Die Isotypkontrolle *Spiking-Kontrolle* zeigte ein mäßiges Hintergrundsignal (n=17 Zellen in *CD45-/CK+/EpCAM+* und n=22 Zellen in *CD45-/CK+/EGFR+*). Bei n=117 Zellen in *CD45-/CK+/EpCAM+* und n= 124 Zellen in *CD45-/CK+/EGFR+* in *Spiking-Gefärbt* kann von einer Wiederfin-

dungsrates von 23,4% mittels EpCAM und CK7/8 bzw. 24,8% mittels EGFR und CK7/8 ausgegangen werden.

In 2 der 5 Experimente, in denen EGFR als zusätzlicher Marker eingesetzt wurde, ließen sich mehr Zellen durch die Markerkombination CK7/8 + EGFR als durch CK7/8 + EpCAM wiederfinden (Z1b: 124/500 vs. 117/500; Z6: 43/500 vs. 40/500). In den übrigen 3 Experimenten war die Wiederfindungsrate durch die Markerkombination CK7/8 + EpCAM höher. Die Ergänzung des Panels durch Anti-EGFR konnte die Wiederfindungsrate dieser Versuchsreihe demnach nicht erhöhen.

Die Wiederfindungsrate lag bei einer Hinzugabe von 500 Tumorzellen durchschnittlich bei 27,27% (8-50,4%) und damit höher als beim Spiking mit 200 (18,5%, Range: 12-25%), 100 (19,5%, Range: 6-28%) und 50 (17,33%, Range: 14-20%) Zellen. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen exemplarisch die Ergebnisse der Spiking-Experimente Z1a und Z1b ohne bzw. mit Einsatz von Anti-EGFR.

3.3. Patienten

3.3.1. Patientencharakteristika

Tabelle 24: Patientencharakteristika

Patient	Tumorstatus	Histologischer Subtyp	FIGO bei ED	Grading	N	Fernmetastasen	Vorthérapien
1	Fortgeschritten	Adenokarzinom (bei Karzinosarkom)	IIIC	III	N1	Peritonealkarzinose	Hysterektomie + LNE, Chemotherapie
2	Fortgeschritten	PECA	IB	II	N0	kutan, hepatisch, pulmonal, ossär	Hysterektomie + LE, Radiatio (WS), Chemotherapie
3	Fortgeschritten	Adenokarzinom	IIB	II	N0	--	Hysterektomie + LNE, Radiatio (Becken), Chemotherapie
4	Lokal Fortgeschritten	PECA	IIIB	I-II	N0	--	Staging-LNE
5	Fortgeschritten	PECA	IIB	III	N1	Paraaortale LK	Staging-LNE, kombinierte RCT, Chemotherapie
6	Fortgeschritten	PECA	IIB	III	N1	LWK	Hysterektomie, kombinierte RCT Radiatio (Becken)
7	Lokal Fortgeschritten	PECA	IB1	III	N1	--	Staging-LNE
8	Fortgeschritten	Adenosquamoses Karzinom	IB	II	N0	--	Hysterektomie + LNE, kombinierte RCT, Radiatio (Becken), Exenteration

Lokal Fortgeschritten: FIGO IIB-IVA oder N1, Fortgeschritten: FIGO IVB (Fernmetastasen) oder Rezidiv

ED: Erstdiagnose; N: Lymphknotenstatus, PECA: Plattenepithelkarzinom; LNE: Lymphonodektomie; LK: Lymphknoten; RCT: Radiochemotherapie; WS: Wirbelsäule; LWK: Lendenwirbelkörper

Nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis wurde von 8 Patientinnen mit Zervixkarzinom 20ml Heparin-Blut entnommen. Alle Patientinnen litten unter einem lokal fortgeschrittenen Zervixkarzinom mit FIGO IIB-IVA bzw. lokoregionärem (pelvinem) Lymphknotenbefall (N1) bei Erstdiagnose oder einem fortgeschrittenen Zervixkarzinom mit FIGO IVB (Fernmetastasierung, auch Befall paraaortaler Lymphknoten) bzw. einem Rezidiv. Der histologische Subtyp des Plattenepithelkarzinoms lag bei 5 von 8 Patientinnen, der des Adenokarzinoms bei 3 von 8 Patientinnen vor. 4 von 8 Patientinnen waren bei Erstdiagnose nodal positiv. 6 von 8 Patientinnen hatten Vortherapien verschiedener Modalitäten erhalten, bei 2 von 8 Patientinnen erfolgte die Blutentnahme kurz nach Diagnosestellung durch operatives Staging und histologische Sicherung.

3.3.2. CTC-Detektion im Blut

Tabelle 25: Ergebnisse der Analyse von Patientenblut

	Zellzahl/ Probe (Ø)	Isotypkontrolle					Färbung				
		CK+	EGFR+	EpCAM+	CK+/ EGFR+	CK+/ EpCAM+	CK+	EGFR+	EpCAM+	CK+/ EGFR+	CK+/ EpCAM+
1	2.135.679	13	10	3	0	1	28	0	2	0	0
2	1.816.658	33	346	8	9	2	29	67	19	23	18
3	1.620.970	45	24	1	0	0	18	40	12	14	11
4	2.171.024	3	129	26	2	0	9	2	0	0	0
5	901.030	4	2	13	0	0	5	5	1	2	1
6	90.699	10	16	3	5	0	25	43	8	25	5
7	243.423	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0
8	529.532	2	0	1	0	0	5	0	0	0	0
Mittelwert gesamt		13,88	65,88	6,88	2	0,38	15,13	19,75	5,25	8	4,38
Mittelwert bei Zellzahl > 1 Mio		23,5	127,25	9,5	2,75	0,75	21	27,25	8,25	9,25	7,25
Mittelwert bei Zellzahl < 1 Mio		4,25	4,5	4,25	1,25	0	9,25	12,25	2,25	6,75	1,5

Die Zellzahl/ Probe ist als Durchschnitt aus der Zellzahl in *Patient-Kontrolle* und der in *Patient-Gefärbt* angegeben.
CK/ EGFR bzw. CK/EpCAM doppelt-positive Zellen sind sowohl in die Zählung der CK-, EGFR- bzw. EpCAM (einfach) positiven als auch in die Zählung der doppelt-positiven Zellen eingegangen. Zum Beispiel fanden sich bei Pat. 2 demnach 29 CK-positive Zellen, von denen 23 Zellen CK/EGFR- und 18 CK/EpCAM-doppelt-positiv waren.

Bei den Patientinnen 1-4 kam es vor dem Hintergrund einer hohen Leukozytenzahl von über 1,5 Millionen Zellen pro Probe zu einer hohen Rate an unspezifischer Antikörperbindung. Es fanden sich demzufolge bei den Patientinnen 1-4 in *Patient-Kontrolle* noch durchschnittlich 23,5 (3-45) unspezifisch CK7/8-positive, 127,25 (10-346) unspezifisch EGFR-positive und 9,5 (1-26) unspezifisch EpCAM-positive Zellen. Unspezifisch doppelt-positiv für CK7/8 und EGFR waren durchschnittlich 2,75 (0-9) Zellen und für CK7/8 und EpCAM durchschnittlich 0,75 (0-2) Zellen. Nach Abzug der unspezifisch positiven

Zellen waren noch bei 2 von 4 Patientinnen (Patientinnen 1 und 4) CK7/8-positive, bei einer von 4 Patientinnen (Patientin 3) EGFR-positive und bei 2 von 4 Patientinnen (Patientin 2 und 3) EpCAM-positive Zellen zu verzeichnen. Bei den Patientinnen 2 und 3 fanden sich sowohl CK/EGFR als auch CK/EpCAM doppelt-positive Zellen.

In den Proben der Patientinnen 5-8 betrug die Zellzahl < 1 Million, hier konnte die Anzahl unspezifisch gefärbter Zellen innerhalb der Tumorzellgates in *Patient-Kontrolle* auf durchschnittlich 4,33 einfach bzw. 0,63 doppelt-positive Zellen gesenkt werden. Folglich wurde jeweils für die Patientinnen 1-4 und die Patientinnen 5-8 eine identische Gatingstrategie angewandt. Abzüglich der unspezifisch positiven Zellen aus *Patient-Kontrolle* fanden sich in *Patient-Gefärbt* CK7/8-positive Zellen bei den Patientinnen 5-8, EGFR-positive Zellen bei den Patientinnen 5-7 und EpCAM-positive Zellen bei Patientin 6. Doppelt-positive Zellen für die Marker CK7/8 und EGFR und für die Marker CK7/8 und EpCAM ließen sich bei den Patientinnen 5 und 6 nachweisen.

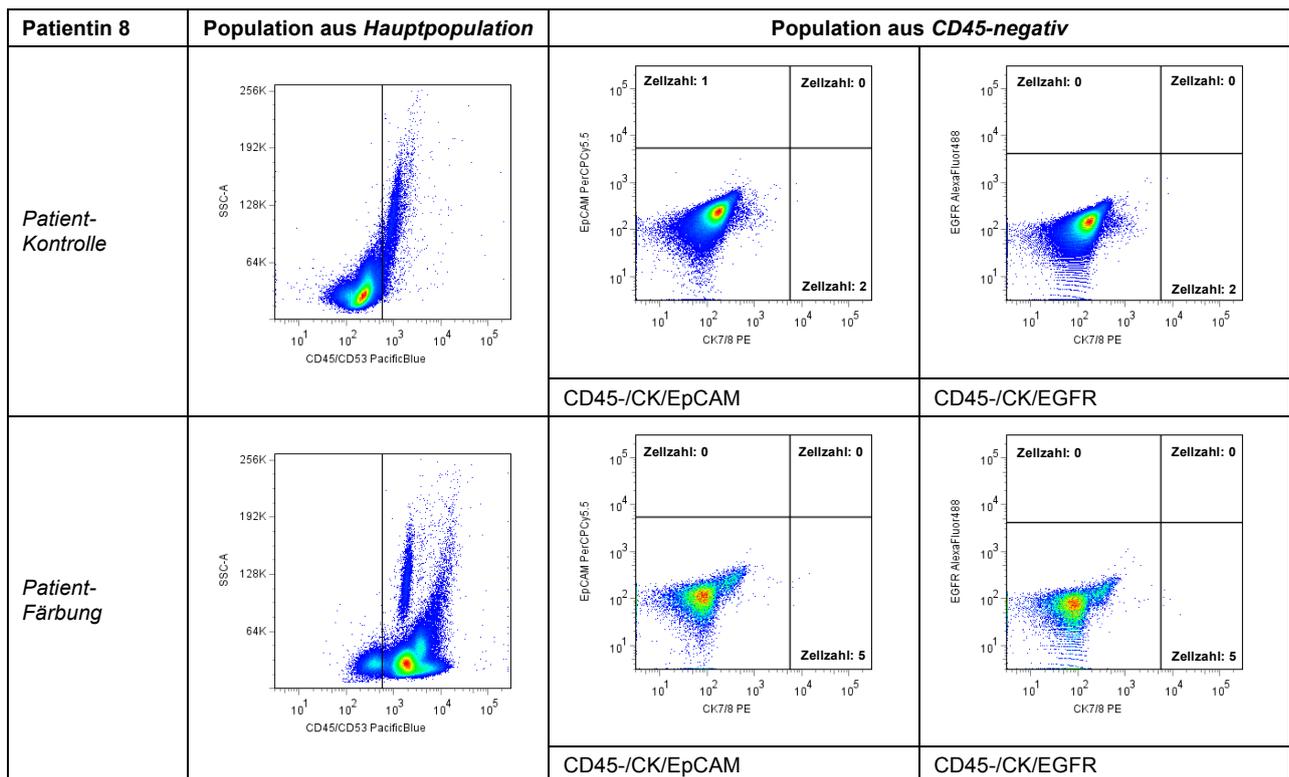


Abbildung 11: Ergebnis von Patientin 8

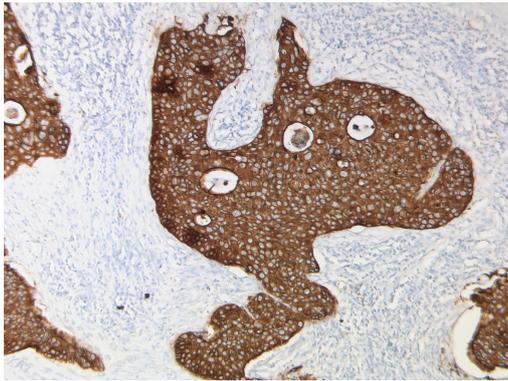
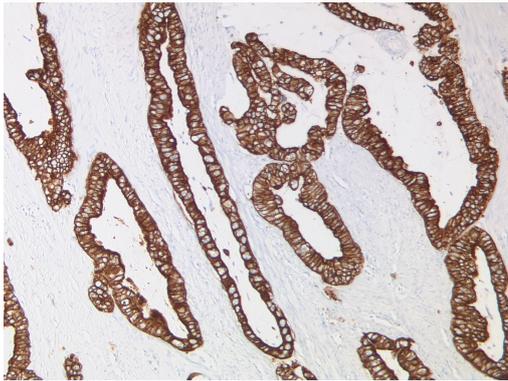
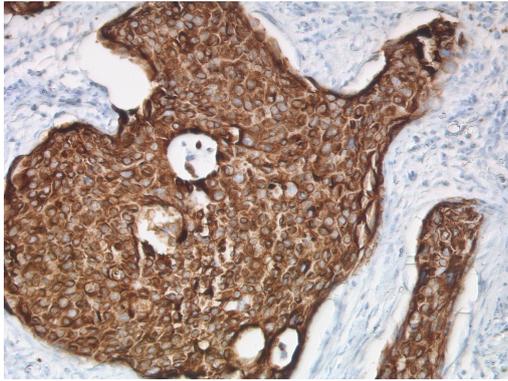
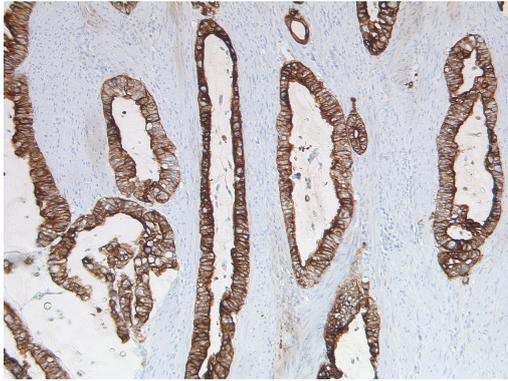
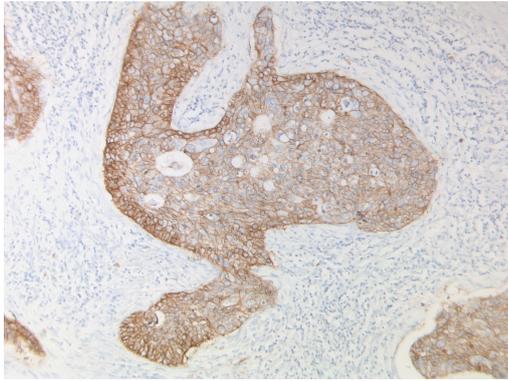
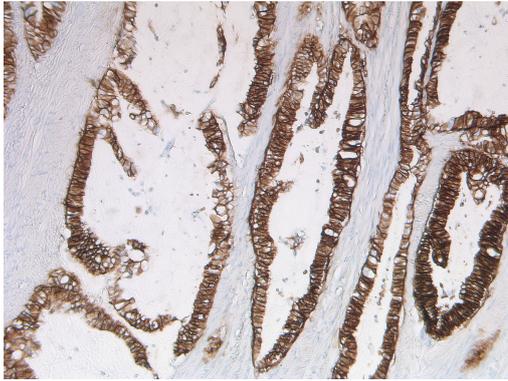
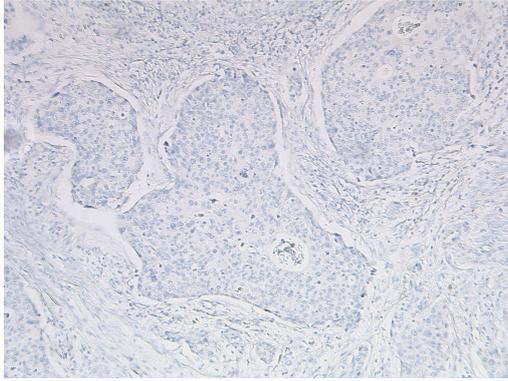
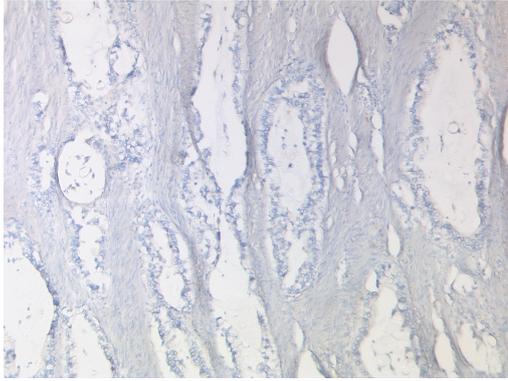
Es finden sich bei dieser Patientin n= 5 CK7/8-positive und n=0 EpCAM-positive, EGFR-positive oder CK/EGFR- bzw CK/EpCAM doppelt-positive Zellen bei geringem Hintergrundsignal (n=2 CK7/8-positive und n=1 EpCAM-positive Zellen in *Patient-Kontrolle*).

Es ist anzumerken, dass die CK 7/8 und EGFR doppelt-positiven Zellen, die auch bei den Patientinnen 2 und 3 vorkamen, eine enorm hohe Fluoreszenzintensität aufwiesen, sodass sie im Dot Plot CK7/8 PE gegen EGFR AlexaFluor®488 in der rechten oberen Ecke erschienen. Zellen gleicher Lage fanden sich in *Patient-Kontrolle* von Patientin 2. Gleiches gilt für EpCAM und CK7/8 doppelt-positiv Zellen, die bei denselben Patientinnen auftraten. Auch die EGFR-positiv Zellfraktion bei Patientin 6 weist ein ähnliches Verteilungsmuster auf, wie die in geringerer Zahl auch in *Patient-Kontrolle* auftretenden unspezifisch EGFR-positiv Zellen. Bei Patientin 5 erwiesen sich abzüglich der unspezifisch positiven Zellen aus *Patient-Kontrolle* 3 Zellen als EGFR-positiv, hiervon eine CK-, EGFR+. Bei Patientin 7 findet sich eine EGFR-positiv und hierbei CK-negative Zelle. Nach Abzug der unspezifisch positiven Zellen aus *Patient-Kontrolle* sind 5 Zellen bei Patientin 6 als EpCAM-positiv zu werten. Insgesamt am häufigsten ließen sich CK7/8-positiv Zellen in geringer Zahl (bei den Patientinnen 5-8 im Mittel 9,25 abzüglich der durchschnittlich 4,25 Zellen in der Isotypkontrolle, demnach 5 Zellen) in Blutproben von Patientinnen mit Zervixkarzinom nachweisen.

3.3.3. Gewebeproben

Exemplarisch wurden Gewebeproben der Patientinnen 2 (Plattenepithelkarzinom, Uterusresektat) und 3 (Adenokarzinom, Infiltration des Colons) auf die Expression der Marker des in 3.3.2 eingesetzten Panels sowie p16 analysiert. Der Marker p16 wird in der Pathologie häufig zur immunhistochemischen Differentialdiagnostik des Zervixkarzinoms eingesetzt. Der in dieser Arbeit getestete Antikörper Anti-p16 FITC erwies sich jedoch als nicht ausreichend sensitiv und spezifisch in der Färbung von Zervixkarzinomzellen (s. 3.1.4).

Es zeigte sich, korrelierend mit den Ergebnissen der Zelllinienfärbungen, eine starke Expression von CK7/8 in beiden Proben. Das Adenokarzinom (Patientin 3) ließ sich kräftig, das Plattenepithelkarzinom (Patientin 2) nur schwach gegen EpCAM anfärben. Im Gegensatz zu den Zervixkarzinomzelllinien sind beide Proben EGFR-negativ, zeigen aber eine starke Expression von p16. Das Institut für Pathologie der Charité hat Referenzfärbungen von einer Gewebeprobe eines Patienten mit Oropharynxkarzinom als Positivkontrolle der EGFR-Färbung zur Verfügung gestellt (hier nicht dargestellt).

	Patientin 2 (Plattenepithelkarzinom)	Patientin 3 (Adenokarzinom)
CK7		
CK8		
EpCAM		
EGFR		

Fortsetzung Abbildung 12

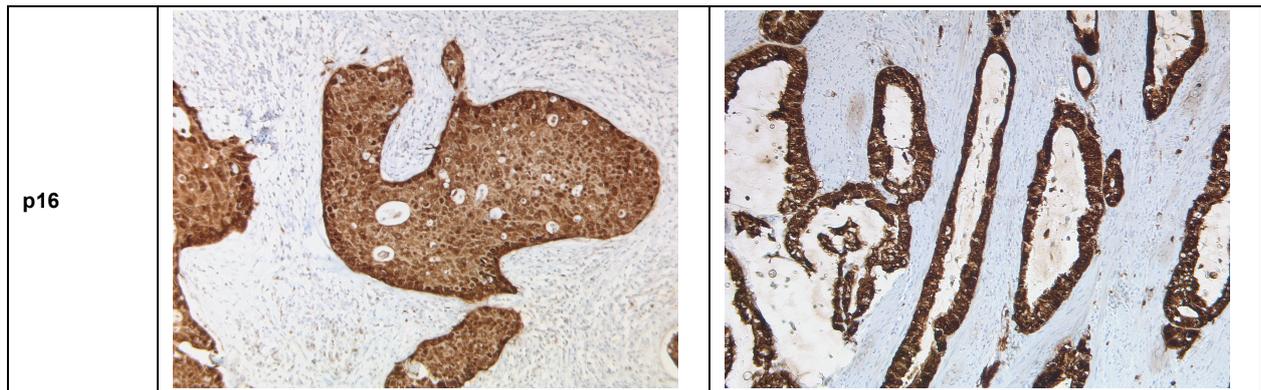


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von Tumorgewebe der Patientinnen 2 und 3

Die Aufnahmen wurden bei 10facher Vergrößerung angefertigt. Zur Interpretation der Ergebnisse der Färbung s. Text.

4. Diskussion

Zusammenfassend haben die Ergebnisse der Färbungen der Zervixkarzinomzelllinien (s. 3.1) gezeigt, dass sich die Marker CK7/8, EpCAM und EGFR zur Detektion von CTCs bei Patientinnen mit Zervixkarzinom eignen könnten. Spiking-Experimente mit der Zelllinie SW620 (s. 3.2.1) haben bestätigt, dass die durchflusszytometrische Detektion von Tumorzellen im Blut anhand der Marker EpCAM und CK7/8 möglich ist. Der Einsatz dieser Marker in Spiking-Experimenten mit der Zelllinie SiHa erreichte jedoch lediglich Wiederfindungsraten von durchschnittlich 20%. Auch die Hinzunahme eines Anti-EGFR-Antikörpers konnte die Wiederfindungsrate nicht verbessern. In 4 der 8 untersuchten Patientenblutproben fanden sich nur wenige unspezifisch gefärbte Zellen, während CK7/8-positive Zellen und in Einzelfällen auch EpCAM- und EGFR-positive Zellen nachgewiesen werden konnten. Exemplarische immunhistochemische Färbungen von Tumorgewebe der Patientinnen 2 (Plattenepithelkarzinom) und 3 (Adenokarzinom) zeigten eine starke Expression von CK7 und CK8 sowie p16, aber keine Expression von EGFR. Das Adenokarzinom der Patientin 3 erwies sich als stark EpCAM-positiv, während das Plattenepithelkarzinom der Patientin 2 sich nur schwach gegen EpCAM anfärben ließ.

4.1. Kritische Überlegungen zur Methode der CTC-Detektion

4.1.1. Auswahl der Marker

EpCAM und Zytokeratin sind etablierte Marker zur CTC-Detektion und werden in zahlreichen CTC-Assays, darunter CellSearch®, eingesetzt [59,60]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine starke Expression von CK7 und CK8 in sowohl Plattenepithel-, als auch Adenokarzinomen der Zervix entstammenden Zelllinien und Gewebeproben, während lediglich die Gewebeprobe eines Adenokarzinoms, nicht jedoch die eines Plattenepithelkarzinoms und keine der untersuchten Zelllinien eine starke EpCAM-Expression aufwiesen. Passend zu diesen Ergebnissen gelang auch Obermayr et al. der CTC-Nachweis bei Patientinnen mit Zervixkarzinom mittels EpCAM nicht [75]. In dieser Arbeit konnten EpCAM-positive Zellen in den Blutproben von 3 der 8 Patientinnen detektiert werden. Dieses Ergebnis kann jedoch bei einem starken Hintergrundsignal auf eine unspezifische Antikörperbindung zurückzuführen sein.

CK7/8 zeigte in dieser Arbeit die besten Ergebnisse in der Zelllinienfärbung. Der Nachweis von CK7/8-negativen Subpopulationen in einigen Zelllinienfärbungen ist am wahrscheinlichsten auf einen variablen Zeitpunkt der Zellernte aus der Kultur zurückzuführen. Mittels Zellzählung standardisierte Passage- und Erntebedingungen könnten zu einer Optimierung der Ergebnisse der Zelllinienfärbung beitragen.

In 6 der 8 Blutproben fanden sich auch abzüglich der unspezifisch gefärbten Zellen aus *Patient-Kontrolle* CK-positive Zellen, wobei wiederum bei den Patientinnen 1-4 aufgrund der hohen Positivitätsrate in *Patient-Kontrolle* eine unspezifische Antikörperbindung nicht ausgeschlossen werden kann. CK7, CK8 und CK19 werden als die in Karzinomen am häufigsten exprimierten Zytokeratine beschrieben [98]. CK19 erhöhte jedoch in den von Liu et al. durchgeführten durchflusszytometrischen Versuchen zur CTC-Detektion das falsch-positive Hintergrundsignal [66], was den diesen Marker betreffenden Ergebnissen dieser Arbeit entspricht.

Als Voraussetzung für die Invasion von CTCs in die Blutbahn gilt der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), bei der die Tumorzelle ihre epithelialen Eigenschaften verliert und Eigenschaften mobiler mesenchymaler Zellen annimmt [99]. Daraus folgt mitunter ein möglicher Verlust von Adhäsionsmolekülen, zu deren Gruppe auch der Marker EpCAM gehört, und eine Reorganisation des Zytoskeletts, sodass das im Netzwerk der Intermediärfilamente im Epithelverband reichlich vorhandene Zytokeratin zunehmend durch Vimentin ersetzt wird [99,100]. Dieser Verlust epithelialer Marker im Rahmen der EMT stellt eine relevante Limitation der Detektion von CTCs mittels

EpCAM und Zytokeratin dar, der durch die Erweiterung der Markerkombination durch einen charakteristischen Marker der EMT begegnet werden sollte.

Es konnte gezeigt werden, dass EGF die EMT in Zervixkarzinomzelllinien induziert und dass EGFR in Lymphknotenmetastasen und Zervixkarzinomrezidiven hochreguliert ist. Eine Hochregulation von EGFR und auch des Intermediärfilaments Vimentin ist demnach assoziiert mit einem Progress einer Zervixkarzinomerkrankung [101]. EGFR ist folglich ein vielversprechender Marker zur Detektion von CTCs nach EMT.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten jedoch keine Verbesserung der Wiederfindungsrate von Zervixkarzinomzellen durch die Hinzunahme des Markers EGFR zusätzlich zu einer Kombination aus EpCAM und CK7/8 nachweisen. EGFR-positive Zellen fanden sich zwar im Blut von 4 der 8 Zervixkarzinompatientinnen, diese Ergebnisse sind jedoch wiederum aufgrund der hohen Rate unspezifisch gefärbter Zellen in *Patient-Kontrolle* kritisch zu betrachten. Darüberhinaus erwiesen sich die zwei exemplarisch untersuchten Gewebeproben in der immunhistochemischen Färbung von EGFR als EGFR-negativ. Dieses Ergebnis ließ sich durch eine immunhistochemische Färbung von Gewebe eines Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom im Sinne einer Positivkontrolle festigen. Aufgrund der Intratumorheterogenität können jedoch anhand der Markerexpression des Primärtumors keine endgültigen Aussagen über die Markerexpression von CTCs und Metastasen getroffen werden [48]. Tatsächlich wurde EGFR1 in einer Studie von Hagemann et al. als eines von 8 Genen identifiziert, die bei etwa der Hälfte der in der Studie untersuchten Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor kontinuierlich hochreguliert waren [102].

Zu einer potentiell verbesserten Identifikation und Klassifikation von CTCs nach EMT kann die Erweiterung des Panels um die EMT-Marker Vimentin und N-Cadherin beitragen [103].

Tumorstammzellen besitzen die notwendige Plastizität, um sich einer EMT zu unterziehen und nach Erreichen des Zielorgans mittels mesenchymal-epithelialer Transition (MET) wieder den zur dortigen Kolonisierung erforderlichen epithelialen Phänotyp anzunehmen [104]. Es ist zunehmend evident, dass zirkulierende Tumorstammzellen in sehr geringer Zahl als CTC-Subpopulation vorkommen. Diese zirkulierenden Tumorstammzellen werden jedoch aufgrund ihrer Eigenschaft der uneingeschränkten Selbsterneuerung als verantwortlich für Metastaseninitiierung, Therapieresistenz und Tumorrezidiv betrachtet, was eine Identifikation dieser CTC-Subgruppe mithilfe von Stammzellmarkern erstrebenswert macht [104]. Keiner der im Rahmen dieser Arbeit

untersuchten Marker zur Detektion und Charakterisierung von Tumorstammzellen erwies sich in Versuchen an Zelllinien und PBMCs von gesunden Spendern als ausreichend sensitiv und spezifisch. Die Expression stammzelltypischer Oberflächenmarker durch zirkulierende Tumorstammzellen kann sich durch Umgebungsbedingungen und als Reaktion auf eine systemische Tumorthherapie stark verändern. Somit stellt die Detektion und klare Identifikation zirkulierender Tumorstammzellen mithilfe der herkömmlichen Stammzellmarker, zu denen neben den in dieser Arbeit untersuchten Markern CD44 und CD133 u.a. auch die Marker CD24, ALDH1 und CD166 zu zählen sind, weiterhin eine Herausforderung dar [104].

4.1.2. Verfahren zur CTC-Anreicherung

Das in dieser Arbeit eingesetzte Verfahren zur negativen Anreicherung von CTCs mittels CD45-Depletion ermöglicht eine unbeeinflusste CTC-Detektion. So können nach CD45-Depletion auch CTCs oder CTC-Subpopulationen nachgewiesen werden, die keine epithelialen Marker, insbesondere nicht den häufig zur markerabhängigen positiven Anreicherung eingesetzten Marker EpCAM exprimieren [59]. Anders als nach einer EpCAM-basierten Anreicherung, die auch Teil des CellSearch®-Verfahrens ist, ist nach negativer Anreicherung folglich auch eine Detektion von CTCs nach EMT sowie von Tumorstammzellen möglich, die insbesondere für Krankheitsprogression und Therapieresistenz verantwortlich sind [104]. In dieser Arbeit haben die Ergebnisse der Färbung von Zelllinien und Gewebeproben einheitlich gezeigt, dass Zervixkarzinomzellen nur eine mäßige Positivität für den Marker EpCAM aufweisen, sodass ein EpCAM-basiertes Anreicherungsverfahren mit großer Wahrscheinlichkeit zu einem Verlust von CTCs im Rahmen der Anreicherung führen würde.

Liu et al. führten einen direkten Vergleich der Verfahren zur negativen sowie positiven immunomagnetischen Anreicherung von CTCs anhand von Spiking-Experimenten durch. Sie erzielten eine Wiederfindungsrate von im Durchschnitt 58% nach negativer Anreicherung mittels CD45-Depletion und von im Durchschnitt 25% nach positiver, EpCAM-basierter Anreicherung [66]. Watanabe et al. erzielten nach CD45-Depletion ebenfalls bessere Wiederfindungsraten EpCAM-negativer Zelllinien mittels eines Chip-basierten durchflusszytometrischen Detektionsverfahrens (FISHMAN-R-System, durchschnittliche Wiederfindungsrate: 78,5%) als mit CellSearch® (durchschnittliche Wiederfindungsrate 1%). CellSearch® war dem FISHMAN-R-System in der Wiederfindung

EpCAM-positiver Zelllinien jedoch klar überlegen (93,5% im Vergleich zu 77,5% durchschnittliche Wiederfindungsrate) [105].

CTCs variieren in ihrer Größe, sodass auch bei größenbasierten Anreicherungsverfahren ein Verlust von CTC-Subpopulationen die Folge sein kann [103].

Nach negativer Anreicherung besteht im Vergleich zur positiven Anreicherung in der Regel eine stärkere Kontamination der Probe durch verbliebene Leukozyten [59]. Dieser Limitation wurde in dieser Arbeit mit der Gegenfärbung mit einem CD45- und CD53-spezifischen Antikörper begegnet. Dennoch zeigen die Ergebnisse der Analyse der Blutproben der Patientinnen 1-4, dass die Spezifität der CTC-Detektion durch ein verstärktes Hintergrundsignal bei hoher Leukozytenzahl enorm eingeschränkt ist.

Jedoch kann es auch im Rahmen der CD45-Depletion zu einem Verlust an Leukozyten gebundener CTCs kommen [61]. Insbesondere allogene Tumorzellen einer Zelllinie werden durch aktivierte NK- und T-Zellen gebunden [63]. So wurden in den durchgeführten Spiking-Experimenten schlechtere Detektionsraten beobachtet, wenn die Zellzahl durch Depletion auf unter 100.000 Zellen reduziert wurde. Hristozova et al. konnten in Spiking-Experimenten die Detektionsrate verbessern, indem sie die CD45-Depletion durch eine Anreicherung mittels eines elektronischen Schwellenwerts für die Fluoreszenzparameter im Rahmen der durchflusszytometrischen Messung ersetzen [63].

4.1.3. Verfahren zur CTC-Detektion

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Analyse von bis zu 8 Oberflächenmarkern anhand von Fluoreszenzmarkierung. Liu et al. erzielten in Spiking-Experimenten mit der Zelllinie SW620 mithilfe der Marker CK7/8 und EpCAM Wiederfindungsraten von durchschnittlich 58% und damit ein mit den Wiederfindungsraten in den im Rahmen dieser Arbeit mit derselben Zelllinie durchgeführten Spiking-Versuchen vergleichbares Ergebnis. Sie konnten CTCs in 47 von 84 Blutproben (56%) von Patienten mit metastasierten Karzinomen, davon auch in 7 von 11 (64%) Proben von 7 Zervixkarzinompatientinnen nachweisen [66]. Hristozova et al. konnten mit den gleichen Markern nach durchflusszytometrischer Analyse sogar eine Wiederfindungsrate von 85% in Spiking-Experimenten erreichen und wiesen bei 11 von 33 (33,3%) Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom CTCs mittels Durchflusszytometrie nach [63].

In Spiking-Experimenten mit der Zelllinie Siha erbrachte das in dieser Arbeit angewandte durchflusszytometrische Verfahren zur CTC-Detektion nur eine durchschnittliche

Wiederfindungsrate von 20%. Weismann et al. konnten hingegen bei einem Spiking von 25 oder mehr SiHa-Zellen nach modifizierter Dichtegradientenzentrifugation und EpCAM-basierter Immunomagnetischer Anreicherung und anschließender Färbung der auf diese Weise gesammelten Zellen mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen EpCAM eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 50% erzielen.

Neben der CTC-Zählung ermöglicht die Durchflusszytometrie die gleichzeitige molekulare Charakterisierung detektierter Zellen mit dem Vorteil, dass neben der qualitativen Expressionsanalyse auch eine Aussage über die Quantität der Expression getroffen werden kann [58]. Auf diese Weise konnte zum Beispiel das Expressionslevel von EGFR und phospho-EGFR [63] und einiger weiterer Marker bestimmt werden [58].

Als einziges von der FDA zugelassenes Verfahren gilt CellSearch® zur Zeit als eine Art Goldstandard zur CTC-Detektion und -Zählung [59]. Das Verfahren ermöglicht eine semiautomatisierte CTC-Analyse [62]. Im Gegensatz dazu erfolgten die Probenvorbereitung und die Konfiguration des Zytometers in dieser Arbeit manuell. Damit ist die Durchflusszytometrie zur CTC-Detektion, so wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde, stark untersucherabhängig. Die Probenvorbereitung dauert selbst bei optimaler Protokolldurchführung mehrere Stunden, sodass es zu einer Abschwächung der Fluoreszenzintensität der Farbstoffe kommen kann. Die Proben wurden daher nach Applikation der fluoreszenzmarkierten Antikörper möglichst lichtgeschützt gelagert. In Spiking-Experimenten kann eine Reaktion des Immunsystems des Gesundheitspenders auf die Fremdzellen ursächlich für einen Zellverlust sein [63].

Die molekulare Analyse von CTCs mittels Durchflusszytometrie ist einfach und technisch nur durch die Verfügbarkeit von Lasern und Fluoreszenzfiltern limitiert, jedoch fehlt die Möglichkeit zur visuellen Kontrolle, ob es sich bei den analysierten Zellen tatsächlich um CTCs und nicht um eine Kontamination durch Leukozyten handelt [58]. Insbesondere bei einem hohen falsch-positiven Hintergrundsignal, wie es im Rahmen der Experimente dieser Arbeit beobachtet wurde, ist der Nachweis einzelner positiver Zellen daher kritisch zu werten und von eingeschränkter Aussagekraft. Vor dem Hintergrund der sehr geringen CTC-Konzentration im Blut stellt dies einen deutlichen limitierenden Faktor des in dieser Arbeit eingesetzten durchflusszytometrischen CTC-Detektionsverfahrens dar.

Herkömmliche Durchflusszytometer wie das in dieser Arbeit eingesetzte BD FACSCanto™II führen lediglich eine Zellzählung durch, erfasste Zellen werden verworfen. Für eine intrazelluläre Zellfärbung ist außerdem eine Fixierung der Zellen in Formaldehyd

erforderlich. Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren eignet sich folglich nicht, um CTCs für weiterführende molekulare Analysen oder Funktionsstudien zu sammeln.

Die Virusassoziation des Zervixkarzinoms ist ein Aspekt, der in der Entwicklung einer Methode zum Nachweis von CTCs bei dieser Karzinomerkrankung bereits Beachtung fand: HPV-assoziiert war der Nachweis von CTCs im Blut von Zervixkarzinompatientinnen mit nachweislich HPV-assoziierten Tumoren möglich [72,73] und mit einer schlechteren Prognose assoziiert [72]. Nachteil einer HPV-assoziierten CTC-Detektion ist jedoch die Beschränkung dieses Verfahrens auf die Anwendung bei Patientinnen mit HPV-assoziierten Zervixkarzinomen. Auch wenn diese den allergrößten Anteil der Zervixkarzinomerkrankungen ausmachen, gibt es doch seltene Formen des Adenokarzinoms (endometroid, serös, klarzellig u.a.), die ebenso HPV-unabhängig auftreten können [106]. Vor dem Hintergrund der Einführung der HPV-Impfung werden diese seltenen histologischen Subtypen des Zervixkarzinoms möglicherweise an Bedeutung gewinnen.

4.2. Kritische Überlegungen zur klinischen Relevanz von CTCs

Die Kenntnis der molekularen Signatur eines Tumors ist essentiell, um eine personalisierte Tumorthherapie zu ermöglichen. Ein Therapieversagen hängt maßgeblich mit Limitationen in der adäquaten Erfassung der Tumorevolution und der daraus folgenden zeitlichen und räumlichen Heterogenität eines Tumors zusammen [48].

CTCs können bei ihrer bloßen Zählung nachweislich die Prognose eines Tumors vorhersagen und bei seriellen Messungen ein Therapieversagen frühzeitig anzeigen. Die molekulare Analyse von CTCs mithilfe moderner Verfahren wie dem NGS eröffnet die Möglichkeit der optimalen Charakterisierung eines Tumors auf Einzelzellebene [60]. Die Gewinnung von CTCs ist wenig invasiv und serielle CTC-Analysen erlauben ein engmaschiges Monitoring von dynamischen Veränderungen der molekularen Tumoreigenschaften beispielsweise unter dem Selektionsdruck einer Therapie [48].

Nach wie vor stellt die CTC-Isolation jedoch eine technische Herausforderung dar. Es bleibt unklar, welches der bis zu 40 Assays, die zur CTC-Anreicherung und -Detektion zur Verfügung stehen, am besten geeignet ist, um die heterogene Population der CTCs möglichst vollständig zu erfassen [59,107].

4.2.1. Zirkulierende Tumorzellen beim Zervixkarzinom

Ein idealer Tumorbiomarker besitzt in der Unterscheidung benigner und maligner Veränderungen eine Sensitivität und Spezifität von 100% und liefert Informationen über

Krankheitslast und -aktivität. Ein solcher Biomarker steht zum aktuellen Zeitpunkt für den Einsatz bei Patientinnen mit Zervixkarzinom nicht zur Verfügung [23].

Ziel dieser Arbeit war es, ein Markerpanel zu etablieren, dass die Detektion zirkulierender Tumorzellen im Blut von Patientinnen mit Zervixkarzinom ermöglicht und damit die Grundlage für die weitergehende Untersuchung der Rolle von CTCs als Biomarker und als Liquid Biopsy bei dieser Tumorentität zu schaffen.

Die insgesamt geringen Wiederfindungsraten von SiHa-Zellen durch das in dieser Arbeit entwickelte Assay sprechen für eine eher geringe Sensitivität desselben. Die Verwendung von Tumorzelllinien als Modellsystem für CTCs steht jedoch in der Kritik: Zellen einer Tumorzelllinie weisen in der Regel eine homogenere Oberflächenmarkerexpression auf und unterscheiden sich in ihren physikalischen Eigenschaften deutlicher von Leukozyten als CTCs, sodass die Funktionsfähigkeit eines Assays überschätzt werden kann [59]. Gleichzeitig muss in Spiking-Experimenten in Betracht gezogen werden, dass das Immunsystem des Gesundblutspenders mit den allogenen Zellen der Tumorzelllinie im Sinne einer Fremderkennung interagiert und es in der Folge zu einem Zellverlust durch Depletion an Leukozyten gebundener Tumorzellen [63] oder durch Apoptose kommen kann.

Vergleichende Studien zwischen unterschiedlichen Laboren, die eine Wiederfindung von Tumorzellen einer Zelllinie nach Spiking mittels RT-PCR nach identischem Protokoll vornahmen, identifizierten die Probenvorbereitung, die durch ihre Umwelt- und Untersucherabhängigkeit einen empfindlichen Arbeitsschritt darstellt, als ursächlich für eine variable Sensitivität [108,109].

CTCs, definiert als CD45-/CK+/EpCAM+ oder CD45-/CK+/EGFR+, ließen sich im Rahmen dieser Arbeit nicht sicher nachweisen. Zwar fanden sich bei 4 von 8 untersuchten Blutproben Zellen mit diesen Eigenschaften, jedoch war stets auch eine ähnliche Zellpopulation in der entsprechenden Negativkontrolle *Patient-Kontrolle* zu finden und eine ungewöhnlich hohe Färbeintensität deutete auf eine unspezifische Antikörperbindung hin. CK7/8-positive Zellen fanden sich hingegen in allen Patientenblutproben, wobei anzumerken ist, dass in 2 von 8 Proben (Patientinnen 2 und 3) die Zahl CK7/8-positiver Zellen in *Patient-Kontrolle* die Zahl CK7/8-positiver Zellen in *Patient-Gefärbt* überstieg. Auch in den Proben der Patientinnen 1 und 4 bedingte eine hohe Gesamtzellzahl von über 1,5 Millionen Zellen eine hohe Zahl unspezifisch gefärbter Zellen. Die Ergebnisinterpretation ist in diesen Proben daher erschwert. In den übrigen 4 Patientenproben mit einer Gesamtzellzahl von unter 1 Millionen Zellen fanden sich 2 (Patientin 7), 5 (Patientin

tin 5), 5 (Patientin 8) und 25 (Patientin 6) CK7/8-positive Zellen. In *Patient-Kontrolle* von Patientin 6, der Patientin, in deren Blutprobe damit am meisten CK7/8-positive Zellen gefunden wurden, ließen sich gleichzeitig auch die meisten (n=10) unspezifisch gegen CK7/8 gefärbten Zellen nachweisen, während bei Patientin 7, der Patientin, in deren Blutprobe sich die wenigsten CK7/8-positiven Zellen detektieren ließen, lediglich eine unspezifisch CK7/8-positive Zelle in *Patient-Kontrolle* auftauchte. Wie bereits unter 4.1 beschrieben, stellt das ausgeprägte falsch-positive Hintergrundsignal eine entscheidende Limitation des in dieser Arbeit eingesetzten Verfahrens dar und beeinträchtigt die Spezifität und Aussagekraft einer CTC-Detektion anhand eines einzelnen Markers, wie in diesem Falle CK7/8. Am ehesten kann anhand der Detektion CK7/8-positiver Zellen im Patientenblut eine qualitative Aussage über das Vorkommen von CTCs getroffen werden, eine genaue CTC-Zählung ist jedoch durch das starke Hintergrundsignal nur eingeschränkt möglich.

Dies legt den Vergleich mit Serum-Tumormarkern nahe. Bei 28-88% (je nach eingesetztem Referenzbereich) der Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom der Zervix lässt sich der Tumormarker SCC und bei 42-63% der Tumormarker CYFRA21-1 nachweisen. Bei 20-75% der Patientinnen mit Adenokarzinom gelingt der Nachweis von CA125 [23] und der Marker CEA lässt sich bei 20-30% der Zervixkarzinompatientinnen ohne Berücksichtigung des histologischen Subtyps detektieren [110,111]. Die genannten Tumormarker sind nicht spezifisch für die Zervix, nicht einmal für eine maligne Erkrankung, sondern treten vielmehr bei einer Vielzahl maligner Tumoren verschiedener Organe und auch im Rahmen nicht-maligner Organschädigung auf [23]. Ähnliches gilt für den Marker Zytokeratin, der als Bestandteil des Zytoskeletts ein Charakteristikum einer Epithelzelle und damit nicht spezifisch das einer Tumorzelle darstellt [51]. Zytokeratin-sezernierende (in diesem Falle CK19) Zellen ließen sich außerdem auch im Blut von Patienten mit gutartigen entzündlichen Erkrankungen des Colons nachweisen [112]. Der Einsatz dieser Form der CTC-Analyse in Screening und Diagnostik ist, wie auch der Einsatz von Tumormarkern zu diesem Zweck, aufgrund unzureichender Sensitivität und Spezifität folglich nicht möglich.

Hohe Spiegel der Marker SCC und/oder CYFRA21-1 bei Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom bzw. des Markers CA125 bei Patientinnen mit Adenokarzinom der Zervix bei Diagnosestellung sind assoziiert mit einer schlechteren Prognose. Die serielle Bestimmung erwies sich als hinweisend auf das Therapieansprechen, einen Krankheitsprogress oder ein Rezidiv [23]. Um mittels des in dieser Arbeit entwickelten Verfah-

rens detektierte CK7/8-positive CTCs als prognostischen Biomarker bei Patientinnen mit Zervixkarzinom einsetzen zu können, sollte die CTC-Zählung insbesondere durch Reduktion des Hintergrundsignals optimiert und eine definierte CTC-Zahl als Grenzwert festgelegt werden, der Patientinnen in prognostische Gruppen unterteilt. Langzeitbeobachtungen einer großen Patientenkohorte sind erforderlich.

Durch die Prognoseabschätzung und selbst durch die frühe Erkennung von Therapieversagen, Krankheitsprogress und Rezidiven mithilfe von Serummarkern konnte jedoch bei Patientinnen mit Zervixkarzinom bisher keine Lebensverlängerung erreicht werden, da keine ausreichend wirksame Therapie für die fortgeschrittene Erkrankung zur Verfügung steht [23,113]. Darüberhinaus ist die Relevanz von CTCs als reine Prognosefaktoren fraglich, insbesondere solange ihre Detektion bei Fehlen eines validierten Verfahrens zeitaufwendig und teuer ist. Die Bestimmung von herkömmlichen Serummarkern ist hingegen kostengünstig und unkompliziert. Bidard et al. führten in einer Studie an Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom einen direkten Vergleich von CTCs nach Detektion mittels CellSearch® und Serummarkern (CEA, CA15-3, CYFRA21-1) durch und fanden eine gleichermaßen signifikante Assoziation mit reduziertem progressionsfreiem Überleben [114]. Ziel ist also vielmehr, CTCs nicht nur zu zählen, sondern molekular zu charakterisieren sowie lebend zu isolieren, um funktionale Analysen zu ermöglichen. Auf diese Weise können CTCs das Verständnis von Metastasierung, Tumorbilogie und Resistenzmechanismen verbessern und durch die Identifizierung von Zielstrukturen und die Möglichkeit von in vitro (Kultur) und in vivo (Xenografts) Testung von Wirkstoffen zur Entwicklung neuer Therapiestrategien beitragen [57,115]. CTCs könnten somit auch beim Zervixkarzinom eine wichtige Rolle auf dem Weg zur personalisierten Tumormedizin einnehmen. Die Detektion EGFR-positiver CTCs beim Zervixkarzinom, wie sie in dieser Arbeit versucht wurde, könnte sich beispielsweise auf die Therapieentscheidung auswirken. Während eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen EGFR (z.B. Cetuximab) oder EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Zervixkarzinom in Phase-II-Studien weder als Monotherapie noch im kombinierten Einsatz mit einer platinbasierten Chemotherapie bisher einen Überlebensvorteil erbrachten [45], bleibt fraglich, ob der Nachweis einer EGFR-überexprimierenden CTC-Subpopulation eine Patientengruppe identifizieren könnte, die von einer gegen EGFR gerichteten gezielten Therapie profitiert. EGFR-positive Zellen fanden sich im Rahmen dieser Arbeit bei 4 der 8 Zervixkarzinompatientinnen. Dabei ist die Detektion einzelner EGFR einfach-positiver Zellen, insbesondere das Ergebnis bei

den Patientinnen 3 und 6 bei starkem falsch-positivem Hintergrundsignal, vor dem Hintergrund der unter 4.1.3 bereits ausführlich beschriebenen Limitationen des eingesetzten CTC-Nachweisverfahrens kritisch zu bewerten.

Die Isolation lebender CTCs ist anhand des in dieser Arbeit etablierten Verfahrens nicht erreichbar (s. 4.1.3). Der Einsatz von CTCs als Liquid Biopsy beim Zervixkarzinom bleibt also eine technische Herausforderung, die weitere Studien zur Optimierung des CTC-Nachweises und zur Entwicklung einer Methode zur Isolierung von Zervixkarzinom-CTCs notwendig macht.

4.2.2. Zirkulierende Tumorzellen bei anderen soliden Tumoren

Der Nachweis von CTCs mittels CellSearch® oder anderer Verfahren ist bei einer Vielzahl solider Tumoren möglich [57].

In großen Studien wurde der prognostische Nutzen des CTC-Nachweises mittels CellSearch® beim metastasierten Mamma- [53], Kolon- [55] und Prostatakarzinom [56] nachgewiesen. Dies führte zur Zulassung von CellSearch® im klinischen Management dieser Tumoren durch die FDA. Auch beim malignen Melanom, dem nicht-kleinzelligen (NSCLC) und kleinzelligen (SCLC) Lungenkarzinom und Kopf-Hals-Karzinomen hat sich gezeigt, dass im metastasierten Stadium der Nachweis von CTCs mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist [57]. Bei Tumorerkrankungen in frühen Stadien ist die Zahl nachweisbarer CTCs geringer, dennoch erwies sich der CTC-Nachweis bei Patienten mit z.B. Mammakarzinom [54], Kolonkarzinom [57] oder NSCLC [116] im Frühstadium als prognostisch ungünstig.

Eine ausreichende klinische Validität, um im Screening oder der Differentialdiagnostik von soliden Tumoren eingesetzt werden zu können, besitzen CTCs mit den aktuell zur Verfügung stehenden Nachweisverfahren nicht [64]. Es finden sich jedoch Hinweise, dass sich CTCs in Hochrisikogruppen als „Sentinel-Marker“ zur Risikostratifizierung eignen könnten, indem erst bei ihrem Nachweis ein engmaschigeres, z.B. bildgebendes Screeningprogramm angeschlossen wird. In einer Studie von Ilie et al. konnten CTCs bei 5 von 168 Patienten mit COPD, einer zigarettenrauchassoziierten Lungenerkrankung mit erhöhtem Risiko zur Entwicklung eines Lungenkarzinoms, bereits 1-4 Jahre vor der Detektion erster Rundherde mittels CT nachgewiesen werden. Eine solche Früherkennung ermöglicht die frühe Therapie im operablen Stadium [117]. Um dieses Ergebnis zu stützen, sind jedoch weitere, größere Studien erforderlich.

In ihrer Funktion als potentiell Metastasen initiiierende Zellen, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, scheint es sinnvoll, CTCs im Staging einer Tumorerkrankung zu berücksichtigen. In die aktuelle TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms der AJCC gehen CTCs sowie DTCs und Mikrometastasen in nicht-lokoregionären Lymphknoten als Stadium M0(i+) ein [54].

Anhand des Verhaltens des CTC-Spiegels im Erkrankungs- bzw. Therapieverlauf lassen sich Krankheitsprogress oder Therapieversagen frühzeitig, nämlich häufig noch bevor sich diesbezüglich Anzeichen in der Bildgebung finden, abschätzen [58,118].

Um den klinischen Nutzen der Risikostratifizierung durch CTCs aufzuzeigen, befassen sich verschiedene Studien mit einer CTC-geleiteten Therapie oder Therapieanpassung bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Die laufende Studie CirCe01 untersucht bei Patientinnen in der 3. Chemotherapielinie einen CTC-abhängigen Therapieabbruch. In der Therapiestudie STIC wird bei Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem metastasierten Mammakarzinom die Entscheidung über Chemo- oder Hormontherapie als Erstlinientherapie abhängig von der CTC-Zahl vor Therapie getroffen. Beide Studien setzen CellSearch® zur CTC-Zählung ein. Die Ergebnisse sind noch ausstehend [54,64].

In der Studie SWOG S0500 erfolgte die Evaluation des Therapieansprechens von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom auf eine Erstlinien-Chemotherapie mittels CTC-Zählung (CellSearch®). Bei fehlendem Abfall der CTC-Zahl unter Therapie wurde eine Chemotherapieumstellung vorgenommen. Obwohl Patientinnen, die bereits vor Therapie keinerlei CTCs im Blut aufwiesen, eine signifikant bessere Prognose zeigten, als Patientinnen mit CTC-Nachweis, konnte durch die Umstellung der Chemotherapie keine Lebensverlängerung erreicht werden [119]. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass das frühe Erkennen eines Therapieversagens oder eines Krankheitsprogresses vor allem dann von klinischer Relevanz ist, wenn auch eine effektive Therapie zur Verfügung steht.

Dies zeigt wiederum, dass über die reine CTC-Zählung und den Einsatz von CTCs als Serum-Tumormarker hinausgehend vor allem die molekulare Charakterisierung von CTCs das Potential birgt, einen wichtigen Beitrag zur individualisierten Tumorthherapie zu leisten.

Der gezielte Nachweis von Mutationen oder Expressionsmustern, die Zielstrukturen gezielter Therapien darstellen oder mit einer Therapieresistenz gegenüber gezielten Therapien assoziiert sind, ist potentiell prädiktiv im Hinblick auf das Therapieanspre-

chen [58]. So wurden beispielsweise die Expression von EGFR, KRAS, BRAF und PIK3CA in CTCs von Patienten mit Kolonkarzinom [120], die Expression von HER2 und PIK3CA in CTCs von Patientinnen mit Mammakarzinom [121] und ALK, sowie ALK-Translokationen in CTCs von Patienten mit NCSLC [122] untersucht. Bedingt durch die Intratumorheterogenität unterscheiden sich CTCs, Metastasen und Primärtumor möglicherweise in der Expression therapierelevanter Biomarker. Ein eindrückliches Beispiel ist die heterogene Expression von HER2 in Primärtumor und CTCs beim Mammakarzinom, die zu der Initiierung des DETECT-Studienprogramms geführt hat, in dem die Relevanz des CTC-Phänotyps für Therapieentscheidung und Evaluierung des Therapieansprechens im metastasierten Stadium untersucht wird: In der Studie DETECTIII werden Patientinnen mit HER2-negativem Primärtumor aber HER2-positiven CTCs durch Randomisierung entweder einer Standardtherapie (Chemotherapie) oder einer Kombination aus Chemotherapie und dem HER2-Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib zugewiesen [123].

Noch gibt es kein standardisiertes Verfahren zur molekularen Charakterisierung von CTCs, vielmehr kommt eine Vielzahl von Methoden zum Einsatz, darunter proteinbasierte Verfahren, wie die immunhistochemische Färbung oder die Durchflusszytometrie und nukleinsäurebasierte Verfahren, wie z.B. FISH, RT-(q)PCR und Sequenzierung [58]. Der Einsatz von Mikromanipulatoren zur Gewinnung einzelner CTCs und die Etablierung des NGS ermöglicht CTCs selbst auf Einzelzellniveau molekular zu charakterisieren. Diese Entwicklungen sind grundlegend für ein bestmögliches Abbilden der Intratumorheterogenität bei gleichzeitiger Reduktion der Kontamination durch Leukozyten [58,60]. Die molekulare Charakterisierung von CTCs zusätzlich zu der des Primärtumors gestattet folglich die Identifikation für Krankheitsprogress und Metastasierung ausschlaggebender Mutationen, die potentiell geeignete Therapieziele darstellen könnten [58]. Darüber hinaus zeigen erste in-vivo- und in-vitro-Funktionsstudien an CTCs ihren Nutzen als Modellsystem für die Testung der Wirksamkeit einer Antitumortherapie [115]. Die Langzeitkultivierung über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten ist aus CTCs von Patienten mit Kolon- [124], Mamma- [125] und Prostatakarzinom [126] gelungen. Die direkte Expansion von CTCs im Mausmodell konnte z.B. mit CTCs von Patienten mit fortgeschrittenem Prostata- [127] bzw. Mammakarzinom [128] oder SCLC [129] und hohen CTC-Zahlen umgesetzt werden. Diese Ergebnisse sind vielversprechend im Hinblick auf den möglichen Nutzen von CTCs als Grundlage eines personali-

sierten Tumormodells, das z.B. zur Testung der Therapiesensitivität eines individuellen Tumors eingesetzt werden könnte [115].

4.2.3. Liquid Biopsy

CTCs sind ein vielversprechender Biomarker, dessen prognostischer Nutzen bei diversen soliden Tumoren in zahlreichen großen Studien nachgewiesen werden konnte [57]. Ob die Charakterisierung ihres Gen- und Proteinexpressionsmusters einen sinnvollen Beitrag zur Therapieentscheidung leisten kann, wird bereits in Therapiestudien untersucht [123]. Die Etablierung von Kulturen und Xenografts aus CTCs wird zunehmend möglich, sodass neue Erkenntnisse über metastaseninitiierende Subpopulationen gewonnen und neue, direkt gegen diese Subpopulationen gerichtete Therapien entwickelt werden können [115]. Insbesondere technische Limitationen schränken die Relevanz von CTCs als Liquid Biopsy im klinischen Alltag jedoch nach wie vor deutlich ein. Für einen Großteil der Tumoren, darunter auch das Zervixkarzinom, fehlt eine validierte, standardisierte Methode zum CTC-Nachweis und das von der FDA zugelassene Verfahren CellSearch® weist aufgrund seiner EpCAM-basierten Anreicherung eine unzureichende Sensitivität in der Detektion von CTCs nach EMT auf [51,103].

Zellfreie zirkulierende DNA (cfDNA) kann im Blut von Tumorpatienten, unter anderem aber auch von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen werden [130]. Zirkulierende DNA, die anhand von tumorspezifischen Mutationen identifiziert wird, wird als zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) betrachtet [130]. Bezüglich des Ursprungs der ctDNA werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert: Einerseits ist es wahrscheinlich, dass ctDNA apoptotischen Tumorzellen entstammt. Zunehmend wird jedoch auch eine Sekretion von ctDNA durch Primärtumor bzw. Metastasen oder durch CTCs in Betracht gezogen [131]. Zirkulierende Tumor-DNA macht nur einen sehr geringen Anteil der im Blut zirkulierenden Wildtyp-DNA aus, sodass auch der Analyse von ctDNA eine Anreicherung vorausgehen muss. Vordergründig werden PCR-basierte Verfahren eingesetzt und ctDNA anhand tumortypischer genomischer Aberrationen detektiert [132]. Die molekulare Analyse der ctDNA mittels Sequenzierung ermöglicht dann z.B. den Nachweis von somatischen Mutationen, Einzelnukleotidpolymorphismen (SNVs), chromosomalen Aberrationen und epigenetischen Veränderungen [132]. Hypermethylierung von CpG-Inseln, z.B. in Tumorsuppressorgenen, könnten auch beim Zervixkarzinom eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese spielen, sodass cfDNA von Patientinnen mit Zervixkarzinom mittels methylierungsspezifischer PCR untersucht wurde. Die Hyperme-

thylierung des Tumorsuppressorgens FHIT und des für das Adhäsionsmolekül E-Cadherin codierenden gleichnamigen Gens konnte in 30,46% bzw. 39,74% der Blutproben von 151 Zervixkarzinompatientinnen nachgewiesen werden und war mit einem höheren Tumorstadium und einem niedrigeren Differenzierungsgrad assoziiert [133]. Die Detektion einer Promotor-Hypermethylierung des Gens MYOD1 erwies sich in einer Analyse von Blutproben von 93 Zervixkarzinompatientinnen als assoziiert mit einer ungünstigeren Prognose [134]. Auch der Nachweis viraler zirkulierender DNA als potentieller Biomarker für virusassoziierte Karzinome wie dem Zervixkarzinom ist möglich [130]. So fand sich ctDNA, die das HPV-Onkogen E6 trägt, in Blutproben von 6 von 50 [135] und anhand einer spezifischen PCR für die viral-zelluläre Integrationssequenz sogar in Blutproben von 11 von 16 Zervixkarzinompatientinnen mit HPV16- oder -18-assoziiertem Tumor [136]. Letztere Studie lieferte auch Hinweise auf einen prognostischen Nutzen insbesondere auch von sequentiellen ctDNA-Analysen unter Therapie [136].

Insbesondere beim Zervixkarzinom, bei dem die CTC-Analyse noch nicht in vollem Umfang umgesetzt werden kann, könnte ctDNA also eine sinnvolle Möglichkeit der Liquid Biopsy darstellen. Die molekulare Charakterisierung von ctDNA ermöglicht die Detektion therapierelevanter Mutationen wie z.B. KRAS oder BRAF [60]. Auch die Analyse von ctDNA wird jedoch durch die erforderlichen, zur Zeit in der Regel markerabhängigen Anreicherungsschritte limitiert [60]. Funktionsstudien wie Xenografts oder CTC-Kulturen sind mittels ctDNA nicht möglich. In der Zusammenfassung besitzt ctDNA jedoch das Potential eines nützlichen ergänzenden Biomarkers in der Umsetzung einer Liquid Biopsy [60].

4.3. Fazit und Ausblick

Die Charakterisierung von CTCs kann anders als jeder bisher eingesetzte Marker zur Verlaufsbeurteilung einer Tumorerkrankung ermöglichen, deren Entwicklung über die Zeit und unter dem Selektionsdruck von Umgebung und Therapie darzustellen und auf diese Weise die Eigenschaften eines Tumors in seiner räumlichen und zeitlichen Heterogenität verbessert zu erfassen. Während CTCs beispielsweise beim Mammakarzinom, bei dessen metastasierter Form CellSearch® als von der FDA validiertes, standardisiertes Verfahren zur CTC-Zählung zur Verfügung steht, zunehmend ihren Nutzen über den eines reinen Prognosemarkers hinaus zeigen, befindet sich die CTC-Forschung im Hinblick auf das Zervixkarzinom noch in ihren Anfängen. Es fehlt eine an

großen Patientenkohorten validierte Methode, die eine standardisierte Detektion, Zählung und im besten Fall sogar Isolierung von CTCs bei Zervixkarzinompatientinnen ermöglicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass sich CTCs über den Nachweis von CK7/8 identifizieren lassen könnten. Die angewandte Methode weist jedoch klare technische Limitationen auf und es wurde nur eine kleine Patientenkohorte untersucht. Um das gesamte Potential von CTCs beim Zervixkarzinom ausschöpfen zu können, ist ein Nachweisverfahren mit höherer Sensitivität und Spezifität notwendig. Eine Reduzierung untersucherabhängiger Schritte bei der Probenvorbereitung durch möglichst umfassende Automatisierung des CTC-Nachweisverfahrens sollte erfolgen, um seine Fehleranfälligkeit möglichst gering zu halten. Sollte eine Liquid Biopsy durch Entwicklung eines validen Verfahrens zur CTC-Detektion im Blut von Patientinnen mit Zervixkarzinom möglich werden, könnten hierdurch nicht nur Prognose und Krankheitsverlauf abgeschätzt, sondern es könnte auch die Entwicklung gezielter Therapien vorangetrieben werden. Anhand der molekularen Analyse von CTCs könnten Zervixkarzinompatientinnen identifiziert werden, die aufgrund des Expressionsprofils ihrer CTCs von einer bestimmten gezielten Therapie profitieren könnten. Auf diese Weise wäre ein wichtiger Schritt getan auf dem Weg zu einem individualisierten Management des Zervixkarzinoms.

5. Zusammenfassung

Auch nach Einführung nationaler Screeningprogramme verliert das Zervixkarzinom nicht an Relevanz und hat insbesondere in Entwicklungsländern noch eine hohe Inzidenz. Die Prognose von Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung ist nach wie vor schlecht und es besteht dringender Bedarf an wirksamen, vor allem auch gezielten Therapien.

Im Zeitalter der personalisierten Tumormedizin gewinnen Biomarker zunehmend an Bedeutung in der Abschätzung der individuellen Prognose eines Patienten, der Beurteilung des Krankheitsverlaufs und des Therapieansprechens. Im Blut zirkulierende Zellen eines soliden Tumors (CTCs) bergen als potentiell metastaseninitiierende Zellen über einen Nutzen als prognostischer und prädiktiver Marker hinaus durch die Möglichkeit ihrer molekularen Charakterisierung das Potential, auf wenig invasive Weise Informationen über eine Tumorerkrankung zu gewinnen. CTCs können somit potentiell einen relevanten Beitrag zur Optimierung der gezielten Tumorthherapie und selbst der Entwicklung neuer Therapiestrategien leisten. Da die Konzentration der CTCs im Blut gering ist, stellt ihre Isolation nach wie vor eine technische Herausforderung dar. Beim Zervixkarzinom ist die CTC-Forschung, insbesondere auch im Vergleich zu anderen Karzinomkrankungen, noch wenig fortgeschritten. Es finden sich nur wenige Arbeiten, die sich mit der CTC-Detektion im Blut von Patientinnen mit Zervixkarzinom befassen. Um auch beim Zervixkarzinom die Grundlage für den Einsatz von CTCs als Liquid Biopsy zu schaffen, war das Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu entwickeln, die den Nachweis von CTCs im Blut von Zervixkarzinompatientinnen ermöglicht.

Zur CTC-Anreicherung wurde das im Labor der AG Keilholz etablierte Verfahren der immunomagnetischen CD45-Depletion eingesetzt. Die CTC-Detektion erfolgte mittels Durchflusszytometrie, die eine simultane Analyse von Oberflächen und intrazellulären Markern ermöglicht. Zu diesem Zwecke wurde anhand der Färbung von Tumorzelllinien und PBMCs ein Markerpanel zusammengestellt, das aus den Markern EpCAM, CK7/8 und EGFR zur CTC-Detektion und CD45 und CD53 zur Identifikation kontaminierender Leukozyten bestand. In Spiking-Experimenten mit der EpCAM-positiven Kolonkarzinomzelllinie SW620 wurden anhand der Marker EpCAM und CK7/8 durchschnittliche Wiederfindungsraten von 50% mit hoher Schwankungsbreite, bei Spiking-Experimenten mit der EpCAM-schwach-positiven Zervixkarzinomzelllinie SiHa sogar nur von durchschnittlich 20% erreicht. Die Wiederfindungsrate von Zellen der Zelllinie SiHa ließ sich

durch die Erweiterung des Markerpanels um den Marker EGFR nicht verbessern. Beim Einsatz der Methode zur Analyse von Patientenblutproben fanden sich CK7/8-positive Zellen bei 6/8 Patientinnen bei teilweise eingeschränkter Aussagekraft aufgrund eines starken Hintergrundsignals. Immunhistochemische Referenzfärbungen von Gewebeproben einer Patientin mit Adenokarzinom und einer Patientin mit Plattenepithelkarzinom der Zervix erwiesen sich als einheitlich CK7/8- und p16-positiv, jedoch EGFR-negativ. EpCAM wurde deutlich stärker durch die Probe des Adenokarzinoms exprimiert.

Das in dieser Arbeit eingesetzte CTC-Detektionsverfahren weist klare technische Limitationen auf, erbringt jedoch den Hinweis, dass der Nachweis von CTCs anhand ihrer Expression von CK7/8 möglich ist. Somit kann eine CTC-Detektion auch beim Zervixkarzinom eine prognostische Relevanz haben, wenn entsprechende Langzeitbeobachtungsstudien anhand von großen Patientenkohorten durchgeführt werden.

Besonders vielversprechend im Hinblick auf die Optimierung des individualisierten Tumormanagements sind jedoch die molekulare Charakterisierung von CTCs und ihre funktionelle Analyse anhand von CTC-Kulturen und Xenografts. Bei einigen Tumorerkrankungen sind solche CTC-basierten Tumormodellsysteme bereits in Erprobung. Um diese Aspekte der Liquid Biopsy auch beim Zervixkarzinom zu ermöglichen, müssen jedoch zuerst die technischen Limitationen hinsichtlich des CTC-Nachweises bei dieser Tumorerkrankung überwunden werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Silverberg E, Holleb AI. Cancer Statistics, 1971. *CA Cancer J Clin.* 1971;21:13–31.
2. Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2015.
3. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127:2893–917.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2015;66:7–30.
5. Critchlow CW, Wölner-Hanssen P, Eschenbach DA, Kiviat NB, Koutsky LA, Stevens CE, Holmes KK. Determinants of cervical ectopia and of cervicitis: Age, oral contraception, specific cervical infection, smoking, and douching. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:534–43.
6. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007;370:890–907.
7. [Http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2016. [Internet]. [cited 2016 Apr 8]. Available from: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2011/
8. Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The Rising Incidence of Adenocarcinoma Relative to Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix in the United States—A 24-Year Population-Based Study. *Gynecol Oncol.* 2000;78:97–105.
9. Berrington de González A, Green J, International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J cancer.* 2007;120:885–91.
10. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin H-R, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A, Suarez GAH, Lombardi LE, Banjo A, Menéndez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SCB, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andújar M, Castellsagué X, Sánchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Muñoz N, Bosch FX. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11:1048–56.
11. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:690–8.
12. Walboomers JM, Jacobs M V, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah K V, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12–9.
13. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide:

- Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J cancer*. 2011;128:927–35.
14. Palefsky JM, Holly EA. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995;4:415–28.
 15. Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 1989;63:4417–21.
 16. Havre PA, Yuan J, Hedrick L, Cho KR, Glazer PM. p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res*. 1995;55:4420–4.
 17. Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001;20:7888–98.
 18. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J cancer*. 2001;92:276–84.
 19. Quinn MA, Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, Heintz APM, Ngan HYS, Pecorelli S. Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006;95 Suppl 1:S43-103.
 20. Fulcher AS, O'Sullivan SG, Segreti EM, Kavanagh BD. Recurrent cervical carcinoma: typical and atypical manifestations. *Radiographics*. 1999;19 Spec No:S103-16-5.
 21. Gadducci A, Guerrieri ME, Greco C. Tissue biomarkers as prognostic variables of cervical cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;86:104–29.
 22. Noordhuis MG, Eijsink JJH, Roossink F, de Graeff P, Pras E, Schuurin E, Wisman GBA, de Bock GH, van der Zee AGJ. Prognostic cell biological markers in cervical cancer patients primarily treated with (chemo)radiation: a systematic review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;79:325–34.
 23. Gadducci A, Tana R, Cosio S, Genazzani AR. The serum assay of tumour markers in the prognostic evaluation, treatment monitoring and follow-up of patients with cervical cancer: a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;66:10–20.
 24. Schiller JT, Lowy DR. Prospects for cervical cancer prevention by human papillomavirus vaccination. *Cancer Res*. 2006;66:10229–32.
 25. Panatto D, Amicizia D, Bragazzi NL, Rizzitelli E, Tramalloni D, Valle I, Gasparini R. Chapter Eight – Human Papillomavirus Vaccine: State of the Art and Future Perspectives. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2015;101:231–322.
 26. Van Krieking G, Castellsagué X, Cibula D, Demarteau N. Estimation of the potential overall impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer cases and deaths. *Vaccine*. 2014;32:733–9.
 27. Brotherton JML, Fridman M, May CL, Chappell G, Saville AM, Gertig DM. Early effect of the HPV vaccination programme on cervical abnormalities in Victoria, Australia: an ecological study. *Lancet*. 2011;377:2085–92.
 28. Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krebserkrankungen (Krebsfrüherkennung-Richtlinien). [Internet]. [cited 2016 Aug 14]. Available from: <https://www.g-ba.de/informationen/richtlinien/17/>
 29. Marchand L, Mundt M, Klein G, Agarwal SC. Optimal collection technique and devices for a quality pap smear. *WMJ*. 2005;104:51–5.

30. Cuzick J, Clavel C, Petry K-U, Meijer CJLM, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*. 2006;119:1095–101.
31. Sasieni P, Castanon A, Cuzick J. Screening and adenocarcinoma of the cervix. *Int J Cancer*. 2009;125:525–9.
32. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Ghiringhello B, Girlando S, Gillio-Tos A, De Marco L, Naldoni C, Pierotti P, Rizzolo R, Schincaglia P, Zorzi M, Zappa M, Segnan N, Cuzick J, New Technologies for Cervical Cancer screening (NTCC) Working Group. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:249–57.
33. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, Solomon D, Burk R, Proyecto Epidemiológico Guanacaste Group. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:513–7.
34. Kjaer S, Høgdall E, Frederiksen K, Munk C, van den Brule A, Svare E, Meijer C, Lorincz A, Iftner T. The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Res*. 2006;66:10630–6.
35. Leinonen M, Nieminen P, Kotaniemi-Talonen L, Malila N, Tarkkanen J, Laurila P, Anttila A. Age-specific evaluation of primary human papillomavirus screening vs conventional cytology in a randomized setting. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:1612–23.
36. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R, PALMS Study Group. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:1550–7.
37. Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;105:107–8.
38. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom, Langversion, 1.0, 2014, AWMF-Registernummer: 032/033OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, [Stand: 14.08.2016].
39. Plante M. Bulky Early-Stage Cervical Cancer (2-4 cm Lesions): Upfront Radical Trachelectomy or Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Fertility-Preserving Surgery: Which Is the Best Option? *Int J Gynecol Cancer*. 2015;25:722–8.
40. Landoni F, Maneo A, Colombo A, Placa F, Milani R, Perego P, Favini G, Ferri L, Mangioni C. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet (London, England)*. 1997;350:535–40.
41. Rotman M, Sedlis A, Piedmonte MR, Bundy B, Lentz SS, Mudderspach LI, Zaino RJ. A phase III randomized trial of postoperative pelvic irradiation in Stage IB cervical carcinoma with poor prognostic features: follow-up of a gynecologic oncology group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;65:169–76.
42. Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008;26:5802–12.

43. Scatchard K, Forrest JL, Flubacher M, Cornes P, Williams C. Chemotherapy for metastatic and recurrent cervical cancer. *Cochrane database Syst Rev*. 2012;10:CD006469.
44. Tewari KS, Sill MW, Long HJ, Penson RT, Huang H, Ramondetta LM, Landrum LM, Oaknin A, Reid TJ, Leitao MM, Michael HE, Monk BJ. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N Engl J Med*. 2014;370:734–43.
45. Serrano-Olvera A, Cetina L, Coronel J, Dueñas-González A. Emerging drugs for the treatment of cervical cancer. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2015 Jun;20(2):165–82.
46. Milosevic MF, Townsley CA, Chaudary N, Clarke B, Pintilie M, Fan S, Glicksman R, Haider M, Kim S, MacKay H, Yeung I, Hill RP, Fyles A, Oza AM. Sorafenib Increases Tumor Hypoxia in Cervical Cancer Patients Treated With Radiation Therapy: Results of a Phase 1 Clinical Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016;94:111–7.
47. Schlange T, Pantel K. Potential of circulating tumor cells as blood-based biomarkers in cancer liquid biopsy. *Pharmacogenomics*. 2016 Feb 22;17(3):183–6.
48. Zhang C, Guan Y, Sun Y, Ai D, Guo Q. Tumor heterogeneity and circulating tumor cells. *Cancer Lett*. 2016;374(2):216–23.
49. Almendro V, Marusyk A, Polyak K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2013 Jan 24;8:277–302.
50. Janku F. Tumor heterogeneity in the clinic: is it a real problem? *Ther Adv Med Oncol*. 2014 Mar;6(2):43–51.
51. Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):110–8.
52. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J*. 1869;14:146–9.
53. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle G V, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche H a, Hortobagyi GN, Terstappen L. Circulating tumor cells: A novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 1;23:1420–30.
54. Bidard F-C, Proudhon C, Pierga J-Y. Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol Oncol*. 2016;10:418–30.
55. Cohen SJ, Punt CJ a, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle G V, Tissing H, Terstappen LWMM, Meropol NJ. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:3213–21.
56. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle G V, Terstappen LWMM, Pienta KJ, Raghavan D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6302–9.
57. Lianidou ES, Markou A, Strati A. The Role of CTCs as Tumor Biomarkers. *Adv Exp Med Biol*. 2015;867:341–67.
58. Lowes LE, Allan AL. Recent advances in the molecular characterization of circulating tumor cells. *Cancers (Basel)*. 2014;6:595–624.
59. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*. 2016;10:374–94.
60. Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer*

- Res. 2015;21:4786–800.
61. Harouaka R, Kang Z, Zheng S-Y, Cao L. Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther.* 2014;141:209–21.
 62. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AGJ, Uhr JW, Terstappen LWMM. 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 Oct 15;10:6897–904.
 63. Hristozova T, Konschak R, Budach V, Tinhofer I. A simple multicolor flow cytometry protocol for detection and molecular characterization of circulating tumor cells in epithelial cancers. *Cytometry A.* 2012 Jun;81(6):489–95.
 64. Paoletti C, Hayes DF. Circulating Tumor Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2016;882:235–58.
 65. Nakano A, Harada T, Morikawa S, Kato Y. Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Pathol Jpn.* 1990;40:107–15.
 66. Liu Z, Fusi A, Klopocki E, Schmittel A, Tinhofer I, Nonnenmacher A, Keilholz U. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. *J Transl Med.* 2011;9:70.
 67. Rothe G. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, editors. *Zelluläre Diagnostik Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.* Basel: Karger Medical and Scientific Publishers; 2007. p. 27–40.
 68. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem.* 2000;46:1221–9.
 69. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clin Chem.* 2002;48:1819–27.
 70. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2016;1–14.
 71. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:563–72.
 72. Tseng CJ, Pao CC, Lin JD, Soong YK, Hong JH, Hsueh S. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis. *J Clin Oncol.* 1999;17:1391–6.
 73. Pao CC, Hor JJ, Yang FP, Lin CY, Tseng CJ. Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. *J Clin Oncol.* 1997;15:1008–12.
 74. Yuan C-C, Wang P-H, Ng H-T, Li Y-F, Huang T-S, Chen C-Y, Tsai L-C, Shyong W-Y. Detecting cytokeratin 19 mRNA in the peripheral blood cells of cervical cancer patients and its clinical-pathological correlation. *Gynecol Oncol.* 2002;85:148–53.
 75. Obermayr E, Sanchez-Cabo F, Tea M-KM, Singer CF, Krainer M, Fischer MB, Sehoul J, Reinthaller A, Horvat R, Heinze G, Tong D, Zeillinger R. Assessment of a six gene panel for the molecular detection of circulating tumor cells in the blood of female cancer patients. *BMC Cancer.* 2010;10:666.
 76. Mitsuhashi A, Tanaka N, Suzuka K, Matsui H, Seki K, Sekiya S. Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2003;89:480–5.

77. Zhang X, Wang C, Wang L, Du L, Wang S, Zheng G, Li W, Zhuang X, Zhang X, Dong Z. Detection of circulating Bmi-1 mRNA in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for uterine cervical cancer. *Int J Cancer*. 2012;131:165–72.
78. Fehm T, Banys M, Rack B, Jäger B, Hartkopf A, Taran F-A, Janni W. Presence of disseminated tumor cells in bone marrow correlates with tumor stage and nodal involvement in cervical cancer patients. *Int J cancer*. 2014;134:925–31.
79. Fehm T, Becker S, Bachmann C, Beck V, Gebauer G, Banys M, Wallwiener D, Solomayer EF. Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers. *Gynecol Oncol*. 2006;103:942–7.
80. Banys M, Solomayer E-F, Becker S, Krawczyk N, Gardanis K, Staebler A, Neubauer H, Wallwiener D, Fehm T. Disseminated tumor cells in bone marrow may affect prognosis of patients with gynecologic malignancies. *Int J Gynecol Cancer*. 2009 Jul;19(5):948–52.
81. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*. 2004;35:122–8.
82. Litvinov S V, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar SO. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol*. 1996;148:865–75.
83. Whittaker JR, Samy AM, Sunter JP, Sinha DP, Monaghan JM. Cytokeratin expression in cervical epithelium: an immunohistological study of normal, wart virus-infected and neoplastic tissue. *Histopathology*. 1989;14:151–60.
84. Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Mitsuya T. Coordinate expression of cytokeratin 8 and cytokeratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis and review of the literature. *Gynecol Oncol*. 2008;108:598–602.
85. Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Link M, Lane B, Leigh I, Schijf C, Vooijs P. Keratin expression in cervical cancer. *Am J Pathol*. 1992;141:497–511.
86. Maddox P, Sasieni P, Szarewski A, Anderson M, Hanby A. Differential expression of keratins 10, 17, and 19 in normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *J Clin Pathol*. 1999;52:41–6.
87. Carrilho C, Alberto M, Buane L, David L. Keratins 8, 10, 13, and 17 are useful markers in the diagnosis of human cervix carcinomas. *Hum Pathol*. 2004;35:546–51.
88. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:341–54.
89. Warawdekar UM, Sirajuddin MM, Pramesh CS, Mistry RC. An approach of selecting appropriate markers from the primary tumor to enable detection of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer. *J BUON*. 2015;20:782–90.
90. Ling J, Wiederkehr U, Cabiness S, Shroyer KR, Robinson JP. Application of flow cytometry for biomarker-based cervical cancer cells detection. *Diagn Cytopathol*. 2008;36:76–84.
91. Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep*. 2009;22:1129–34.
92. Wang K, Zeng J, Luo L, Yang J, Chen J, Li B, Shen K. Identification of a cancer stem cell-like side population in the HeLa human cervical carcinoma cell line.

- Oncol Lett. 2013;6:1673–80.
93. Chen J, Shi D, Liu X, Fang S, Zhang J, Zhao Y. Targeting SPARC by lentivirus-mediated RNA interference inhibits cervical cancer cell growth and metastasis. *BMC Cancer*. 2012;12:464.
 94. Liu D. EMMPRIN in gynecologic cancers: pathologic and therapeutic aspects. *Tumour Biol*. 2015;36:4883–8.
 95. Shvartsur A, Bonavida B. Trop2 and its overexpression in cancers: regulation and clinical/therapeutic implications. *Genes Cancer*. 2015;6:84–105.
 96. Varughese J, Cocco E, Bellone S, Ratner E, Silasi D-A, Azodi M, Schwartz PE, Rutherford TJ, Buza N, Pecorelli S, Santin AD. Cervical carcinomas overexpress human trophoblast cell-surface marker (Trop-2) and are highly sensitive to immunotherapy with hRS7, a humanized monoclonal anti-Trop-2 antibody. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205:567.e1-7.
 97. Chin D, Boyle GM, Williams RM, Ferguson K, Pandeya N, Pedley J, Campbell CM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2005;113:789–97.
 98. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. 2008;129:705–33.
 99. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420–8.
 100. Sun BO, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J. Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomed reports*. 2015;3:603–10.
 101. Lee M-Y, Chou C-Y, Tang M-J, Shen M-R. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4743–50.
 102. Hagemann T, Bozanovic T, Hooper S, Ljubic A, Slettenaar VIF, Wilson JL, Singh N, Gayther SA, Shepherd JH, Van Trappen POA. Molecular profiling of cervical cancer progression. *Br J Cancer*. 2007;96:321–8.
 103. Kölbl AC, Jeschke U, Andergassen U. The Significance of Epithelial-to-Mesenchymal Transition for Circulating Tumor Cells. *Int J Mol Sci*. 2016;17.
 104. Yang M-H, Imrali A, Heeschen C. Circulating cancer stem cells: the importance to select. *Chin J Cancer Res*. 2015;27:437–49.
 105. Watanabe M, Uehara Y, Yamashita N, Fujimura Y, Nishio K, Sawada T, Takeda K, Koizumi F, Koh Y. Multicolor detection of rare tumor cells in blood using a novel flow cytometry-based system. *Cytom Part A*. 2014;85:206–13.
 106. Pirog EC, Lloveras B, Molijn A, Tous S, Guimerà N, Alejo M, Clavero O, Klaustermeier J, Jenkins D, Quint WG, Xavier Bosch F, Alemany L, de Sanjosé S, RIS HPV TT study group. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. *Mod Pathol*. 2014;27:1559–67.
 107. Hofman P, Popper HH. Pathologists and liquid biopsies: to be or not to be? *Virchows Arch*. 2016;1–9.
 108. Vlems F., Ladanyi A, Gertler R, Rosenberg R, Diepstra JH., Röder C, Nekarda H, Molnar B, Tulassay Z, van Muijen GN., Vogel I. Reliability of quantitative reverse-transcriptase-PCR-based detection of tumour cells in the blood between different laboratories using a standardised protocol. *Eur J Cancer*. 2003;39:388–96.
 109. Keilholz U, Willhauck M, Rimoldi D, Brasseur F, Dummer W, Rass K, de Vries T, Blaheta J, Voit C, Lethé B, Burchill S. Reliability of reverse transcription-

- polymerase chain reaction (RT-PCR)-based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality-assurance initiative of the EORTC melanoma cooperative group. Vol. 34, *European Journal of Cancer*. 1998.
110. Molina R, Filella X, Augé JM, Bosch E, Torne A, Pahisa J, Lejarcegui JA, Rovirosa A, Mellado B, Ordi J, Biete A. CYFRA 21.1 in patients with cervical cancer: comparison with SCC and CEA. *Anticancer Res*. 2005;25:1765–71.
 111. Borrás G, Molina R, Xercavins J, Ballesta A, Iglesias J. Tumor antigens CA 19.9, CA 125, and CEA in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 1995;57:205–11.
 112. Pantel K, Denève E, Nocca D, Coffy A, Vendrell J-P, Maudelonde T, Riethdorf S, Alix-Panabières C. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem*. 2012;58:936–40.
 113. Sturgeon CM, Duffy MJ, Hofmann BR, Lamerz R, Fritsche HA, Gaarenstroom K, Bonfrer J, Ecke TH, Grossman HB, Hayes P, Hoffmann R-T, Lerner SP, Löhe F, Louhimo J, Sawczuk I, Taketa K, Diamandis EP, National Academy of Clinical Biochemistry. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in liver, bladder, cervical, and gastric cancers. *Clin Chem*. 2010;56:e1-48.
 114. Bidard F-C, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, Campone M, Cottu P, Beuzeboc P, Rolland E, Mathiot C, Pierga J-Y. Assessment of circulating tumor cells and serum markers for progression-free survival prediction in metastatic breast cancer: A prospective observational study. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R29.
 115. Pantel K, Alix-Panabières C. Functional Studies on Viable Circulating Tumor Cells. *Clin Chem*. 2016 Feb 1;62(2):328–34.
 116. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, Lantuejoul S, Piaton E, Mourad N, Butori C, Selva E, Poudenx M, Sibon S, Kelhef S, Vénissac N, Jais J-P, Mouroux J, Molina TJ, Hofman P. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res*. 2011;17:827–35.
 117. Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, Selva E, Vignaud J-M, Padovani B, Mouroux J, Marquette C-H, Hofman P. “Sentinel” circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2014;9:e111597.
 118. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle G V, Terstappen LWMM. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res*. 2006;12:4218–24.
 119. Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, Tejwani S, Schott AF, O’Rourke MA, Lew DL, Doyle G V, Gralow JR, Livingston RB, Hayes DF. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol*. 2014;32:3483–9.
 120. Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, Langer-Freitag S, Reeh M, Seifert AM, Mauermann O, Izbicki JR, Pantel K, Riethdorf S. Heterogeneity of Epidermal Growth Factor Receptor Status and Mutations of KRAS/PIK3CA in Circulating Tumor Cells of Patients with Colorectal Cancer. *Clin Chem*. 2013;59.
 121. Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F, Zorzino L, Pestka A, Andergassen U, Meier-Stiegen F, Czyz ZT, Alberter B, Treitschke S, Schamberger T, Sergio M, Bregola G, Doffini A, Gianni S, Calanca A, Signorini G, Bolognesi C, Hartmann A,

- Fasching PA, Sandri MT, Rack B, Fehm T, Giorgini G, Manaresi N, Klein CA. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med*. 2014;6:1371–86.
122. Pailler E, Adam J, Barthélémy A, Oulhen M, Auger N, Valent A, Borget I, Planchard D, Taylor M, André F, Soria JC, Vielh P, Besse B, Farace F. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31:2273–81.
 123. Schramm A, Friedl TWP, Schochter F, Scholz C, de Gregorio N, Huober J, Rack B, Trapp E, Alunni-Fabbroni M, Müller V, Schneeweiss A, Pantel K, Meier-Stiegen F, Hartkopf A, Taran F-A, Wallwiener D, Janni W, Fehm T. Therapeutic intervention based on circulating tumor cell phenotype in metastatic breast cancer: concept of the DETECT study program. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293:271–81.
 124. Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, Solassol J, Ramos J, Assenat E, Schumacher U, Costes V, Maudelonde T, Pantel K, Alix-Panabières C. Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res*. 2015;75:892–901.
 125. Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F, Madden MW, Donaldson MC, Desai R, Zhu H, Comaills V, Zheng Z, Wittner BS, Stojanov P, Brachtel E, Sgroi D, Kapur R, Shioda T, Ting DT, Ramaswamy S, Getz G, Iafrate AJ, Benes C, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*. 2014;345:216–20.
 126. Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A, Dowling C, Wanjala JN, Undvall EA, Arora VK, Wongvipat J, Kossai M, Ramazanoglu S, Barboza LP, Di W, Cao Z, Zhang QF, Sirota I, Ran L, MacDonald TY, Beltran H, Mosquera J-M, Touijer KA, Scardino PT, Laudone VP, Curtis KR, Rathkopf DE, Morris MJ, Danila DC, Slovin SF, Solomon SB, Eastham JA, Chi P, Carver B, Rubin MA, Scher HI, Clevers H, Sawyers CL, Chen Y. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*. 2014;159:176–87.
 127. Rossi E, Rugge M, Facchinetti A, Pizzi M, Nardo G, Barbieri V, Manicone M, De Faveri S, Chiara Scaini M, Basso U, Amadori A, Zamarchi R. Retaining the long-survive capacity of Circulating Tumor Cells (CTCs) followed by xenotransplantation: not only from metastatic cancer of the breast but also of prostate cancer patients. *Oncoscience*. 2014;1:49–56.
 128. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, Klein C, Saini M, Bäuerle T, Wallwiener M, Holland-Letz T, Höfner T, Sprick M, Scharpf M, Marmé F, Sinn HP, Pantel K, Weichert W, Trumpp A. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*. 2013;31:539–44.
 129. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, Metcalf RL, Rothwell DG, Trapani F, Polanski R, Burt DJ, Simpson KL, Morris K, Pepper SD, Nonaka D, Greystoke A, Kelly P, Bola B, Krebs MG, Antonello J, Ayub M, Faulkner S, Priest L, Carter L, Tate C, Miller CJ, Blackhall F, Brady G, Dive C. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med*. 2014;20:897–903.
 130. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:426–37.
 131. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*. 2016;
 132. Ignatiadis M, Dawson S-J. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for

- precision medicine: dream or reality? *Ann Oncol.* 2014;25:2304–13.
133. Ren CC, Miao XH, Yang B, Zhao L, Sun R, Song WQ. Methylation status of the fragile histidine triad and E-cadherin genes in plasma of cervical cancer patients. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16:1862–7.
 134. Widschwendter A, Müller HM, Fiegl H, Ivarsson L, Wiedemair A, Müller-Holzner E, Goebel G, Marth C, Widschwendter M. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10:565–71.
 135. Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, Voravud N, Niruthisard S, Mutirangura A. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC Cancer.* 2001;1:2.
 136. Campitelli M, Jeannot E, Peter M, Lappartient E, Saada S, de la Rochefordière A, Fourchette V, Alran S, Petrow P, Cottu P, Pierga J-Y, Lantz O, Couturier J, Sastre-Garau X. Human papillomavirus mutational insertion: specific marker of circulating tumor DNA in cervical cancer patients. *PLoS One.* 2012;7:e43393.

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Carolin Denk, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nachweis zirkulierender Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie bei Patientinnen mit Karzinom der Cervix uteri“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den

Carolin Denk

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. Ulrich Keilholz, der mir die Arbeit an diesem hochaktuellen Thema ermöglicht und die notwendigen Mittel dazu bereitgestellt hat. Von besonderem Nutzen waren mir dabei sein umfassendes Wissen auf dem Gebiet der CTC-Forschung und seine detaillierte Kenntnis der Laborpraxis. Auf diese Weise konnte ich auch über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus viele weiterführende Einblicke und Erfahrungen gewinnen.

Frau Dr. Anne Bartens danke ich für die umfassende Betreuung und die Unterstützung insbesondere bei der Akquirierung der Patientenproben.

Für die geduldige und ausführliche Einweisung in die Laborarbeit und Unterstützung beim Erlernen der experimentellen Grundlagen zur Durchführung der für diese Arbeit erforderlichen Versuche möchte ich Frau Dipl. Ing. Anika Nonnenmacher in besonderer Weise danken. Mein Dank gilt auch den weiteren Mitarbeitern der AG Keilholz, insbesondere Frau Sandra Liebs und Herrn Stefano Meucci für die angenehme Zusammenarbeit und die konstruktive Kritik.

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten im Rahmen der pathologischen Routinediagnostik im immunhistochemischen Labor des Instituts für Pathologie an der Charité Mitte.

In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Korinna Jöhrens und den technischen Mitarbeiterinnen des immunhistochemischen Labors für die unkomplizierte und schnelle Durchführung der Färbungen, die freundliche und ausführliche Einweisung in die technischen Details des Färbeprozesses und die angenehme Zusammenarbeit bei der Ergebnisauswertung.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, dass sie mich mit großer Aufgeschlossenheit begleitet und mir auf meinem Weg auf jede erdenkliche Weise zur Seite steht.