



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK  
KLINIK FÜR CHIRURGIE

Aus der Klinik für Chirurgie  
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. T. Keck

Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken

Leitung: Prof. Dr. Dr. med. J. K. Habermann

**Evaluation von Methoden zur Isolierung und Kultivierung nicht-hämatopoetischer Zellen einschließlich Zirkulierender Tumorzellen von Lungenkarzinomen unter Verwendung eines *Spiking*-Modells**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Yannick Maximilian Britt

aus Lübeck

Lübeck, 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. med. Jens K. Habermann

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Noack

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.12.2022

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

*Für meine Eltern, Flocke,  
meine Frau & meine Kinder*

*- in Dankbarkeit -*

# INHALTSVERZEICHNIS

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | ZIRKULIERENDE TUMORZELLEN (CTC) .....   | 2         |
| 1.1.1    | <i>Bedeutung in der Medizin .....</i>   | 2         |
| 1.1.2    | <i>Eigenschaften von CTCs, Fähigkeit zur Epithelial-Mesenchymalen<br/>Transition (EMT) und Tumorstammzellen.....</i>        | 3         |
| 1.1.3    | <i>Detektion und Isolierung von CTCs.....</i>   | 5         |
| 1.1.4    | <i>Charakterisierung von CTCs .....</i>   | 9         |
| 1.1.5    | <i>Kultivierung von CTCs .....</i>  | 10        |
| 1.2      | LUNGENKARZINOM UND KOLOREKTALES KARZINOM .....  | 13        |
| <b>2</b> | <b>FRAGESTELLUNG UND MOTIVATION .....</b>   | <b>16</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>  | <b>18</b> |
| 3.1      | MATERIALIEN .....   | 18        |
| 3.1.1    | <i>Zelllinien .....</i>   | 18        |
| 3.1.2    | <i>Klinische Daten und Probenmaterial der Patienten.....</i>  | 18        |
| 3.2      | METHODEN .....  | 20        |
| 3.2.1    | <i>Kultivierung humaner Zellen .....</i>  | 21        |
| 3.2.2    | <i>Kultivierung von 3T3-J2-Fibroblasten und Herstellung des<br/>Konditionierten Mediums.....</i>                            | 21        |
| 3.2.3    | <i>Auftauen und Kryokonservierung von Zelllinien .....</i>  | 23        |
| 3.2.4    | <i>Spiking-Modell für Zirkulierende Tumorzellen .....</i>   | 23        |
| 3.2.5    | <i>Zellzählung.....</i>   | 24        |
| 3.2.6    | <i>Isolierung von Zirkulierenden Tumorzellen aus Vollblut .....</i>   | 24        |
| 3.2.7    | <i>Quantifizierung der Zellzahl in Abhängigkeit von der<br/>Isolierungsmethode mittels immunzytochemischer Färbung.....</i> | 27        |
| 3.2.8    | <i>Kultivierung von Zirkulierenden Tumorzellen.....</i>   | 29        |
| 3.2.9    | <i>Kultivierung von Zellen aus primärem Lungengewebe .....</i>  | 31        |
| 3.2.10   | <i>Charakterisierung von Tumorzellen .....</i>  | 32        |
| 3.2.11   | <i>Statistik.....</i>   | 35        |
| <b>4</b> | <b>ERGEBNISSE .....</b>   | <b>36</b> |
| 4.1      | ISOLIERUNG, KULTIVIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON<br>TUMORZELLEN MITHILFE EINES SPIKING-MODELLS .....                      | 36        |
| 4.1.1    | <i>Vergleich unterschiedlicher Säulen für das MACS-System.....</i>  | 36        |
| 4.1.2    | <i>Vergleich der Isolierungsmethoden MACS und RosetteSep™.....</i>  | 38        |
| 4.1.3    | <i>Anwendbarkeit von Konditioniertem Medium zur Kultivierung von<br/>Tumorzelllinien .....</i>                              | 43        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 4.1.4     | <i>Kultivierbarkeit der HCC4006-Zellen nach Isolierung mittels MACS-System bzw. RosetteSep™ + SepMate™</i> .....                           | 44         |
| 4.1.5     | <i>Kultivierbarkeit der SW620-Zellen nach Isolierung mittels MACS-System bzw. RosetteSep™ + SepMate™</i> .....                             | 49         |
| 4.2       | ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON ZIRKULIERENDEN TUMORZELLEN AUS KLINISCHEN PROBEN.....  | 51         |
| 4.2.1     | <i>Vergleich von Kulturbedingungen für CTCs aus klinischen Proben</i> .....  | 51         |
| 4.2.2     | <i>Vergleich des Wachstumsverhaltens von CTCs und Zellen des Primärtumors</i> .....  | 52         |
| 4.3       | CHARAKTERISIERUNG VON (ZIRKULIERENDEN) TUMORZELLEN..   | 53         |
| 4.3.1     | <i>Einsatz von Anti-Fibroblasten-Microbeads zur Charakterisierung des Zelltyps von in Konditioniertem Medium kultivierten Zellen</i> ..... | 53         |
| 4.3.2     | <i>Nachweis des epithelialen Charakters der Zellen mittels Immunfluoreszenz</i> .....  | 54         |
| 4.3.3     | <i>Nachweis des epithelialen Charakters der Zellen mittels Immunzytochemie</i> .....   | 60         |
| <b>5</b>  | <b>DISKUSSION</b> .....  | <b>61</b>  |
| 5.1       | ISOLIERUNG VON (ZIRKULIERENDEN) TUMORZELLEN.....   | 61         |
| 5.2       | KULTIVIERUNG VON (ZIRKULIERENDEN) TUMORZELLEN.....   | 66         |
| 5.3       | CHARAKTERISIERUNG VON (ZIRKULIERENDEN) TUMORZELLEN..   | 77         |
| 5.3.1     | <i>Nachweis des epithelialen Charakters mittels Immunfluoreszenz</i> .....   | 77         |
| 5.3.2     | <i>Veränderung der Zellmorphologie durch die Kultivierung</i> .....  | 79         |
| 5.3.3     | <i>Differenzierung der Zelltypen anhand der Immunzytochemie</i> .....  | 81         |
| 5.4       | AUSBLICK .....   | 84         |
| <b>6</b>  | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....   | <b>86</b>  |
| <b>6</b>  | <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>87</b>  |
| <b>7</b>  | <b>LITERATUR</b> .....   | <b>88</b>  |
| <b>8</b>  | <b>ANHANG</b> .....  | <b>97</b>  |
| 8.1       | TABELLENVERZEICHNIS .....  | 97         |
| 8.2       | ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....  | 98         |
| 8.3       | MATERIALIEN UND ERHOBENE DATEN .....   | 100        |
| 8.4       | EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....  | 109        |
| <b>9</b>  | <b>DANKSAGUNG</b> .....  | <b>110</b> |
| <b>10</b> | <b>ABSTRACTS UND KONGRESSBEITRÄGE</b> .....  | <b>111</b> |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                 |  |
|-----------------|--|
| °C              | Grad Celsius   |
| µg              | Mikrogramm   |
| µL              | Mikroliter   |
| µm              | Mikrometer   |
| 3D              | dreidimensional  |
| ACD             | <i>Acid citrate dextrose</i>                                       |
| ALDH            | Aldehyddehydrogenase   |
| ALK             | Anaplastische Lymphomkinase  |
| APAAP           | Alkaline-Phosphatase-Anti-Alkaline-Phosphatase                     |
| APC             | <i>Adenomatous polyposis coli</i>                                  |
| ATCC            | <i>American Type Culture Collection</i>                            |
| ATP             | Adenosin-Triphosphat   |
| BSA             | Bovines Serumalbumin   |
| bzgl.           | bezüglich  |
| bzw.            | beziehungsweise  |
| ca.             | circa  |
| CCD             | <i>Charge-coupled Device</i> (Ladungsgekoppelte Kamera)            |
| CD              | <i>Cluster of Differentiation</i>                                  |
| CEA             | Carcinoembryonales Antigen   |
| CEACAM          | <i>CEA-related cell adhesion molecule</i>                          |
| CK              | Cytokeratin  |
| cm              | Zentimeter   |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid  |
| CSC             | <i>Cancer stem cell</i>  |
| CT              | Computertomographie  |
| CTCs            | Zirkulierende Tumorzellen ( <i>engl. circulating tumor cells</i> ) |
| CXCL            | <i>CXC chemokine ligand</i>  |
| Da              | Dalton   |
| DAPI            | 4',6-Diamidin-2-phenylindol  |
| DMEM            | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>                            |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid   |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl. desoxyribonucleic acid</i> )     |

|               |  |
|---------------|--|
| dt.           | deutsch  |
| EDTA          | Ethylendiamin-Tetraacetat  |
| EGF           | Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>engl. epidermal growth factor</i> )                     |
| EGFR          | <i>Epidermal growth factor receptor</i>  |
| EMT           | Epithelial-Mesenchymale Transition   |
| EpCAM         | Epitheliales Zelladhäsions-Molekül<br>( <i>engl. Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> ) |
| <i>et al.</i> | lateinisch: <i>et alii</i> ; meint: und andere   |
| evtl.         | eventuell  |
| FACS          | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>   |
| FAP           | Familiäre adenomatöse Polyposis  |
| FBS           | Fetales bovines Serum  |
| FcR           | Fc-Rezeptor  |
| FDA           | <i>Food and Drug Administration (USA)</i>  |
| FGFR          | <i>Fibroblast growth factor receptor</i>   |
| FISH          | Fluoreszenz in situ Hybridisierung   |
| g             | Gramm oder Erdbeschleunigung   |
| ggf.          | gegebenenfalls   |
| h             | Stunde   |
| HE            | Hämatoxylin-Eosin  |
| HIF           | Hypoxie-induzierbarer Faktor   |
| HNPCC         | <i>Hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>  |
| hTERT         | <i>human Telomerase reverse transcriptase</i>  |
| ICC           | Immunzytochemie  |
| IF            | Immunfluoreszenz   |
| IGF           | <i>Insulin-like growth factor</i>  |
| IHC           | Immunhistochemie   |
| ISET          | <i>isolation by size of epithelial tumor cells</i>                                       |
| KRAS          | <i>Kirsten RAt Sarcoma</i>   |
| KRK           | Kolorektales Karzinom  |
| L             | Liter  |
| MACS          | <i>Magnetic activated cell sorting</i>   |
| max.          | maximal  |

|                     |  |
|---------------------|--|
| MET                 | Mesenchymal-Epitheliale Transition   |
| mg                  | Milligramm   |
| min.                | Minute oder minimal  |
| mind.               | mindestens   |
| mL                  | Milliliter   |
| mm                  | Millimeter   |
| MQ H <sub>2</sub> O | destilliertes Wasser   |
| mRNA                | <i>messenger ribonucleic acid</i>  |
| MRT                 | Magnetresonanztomographie  |
| MSI                 | Mikrosatelliteninstabilität  |
| NaCl                | Natriumchlorid   |
| NFκB                | <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>                |
| ng                  | Nanogramm  |
| NGS                 | <i>Next Generation Sequencing</i>  |
| NK-Zellen           | Natürliche Killer-Zellen   |
| nm                  | Nanometer  |
| NSCLC               | Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom<br>( <i>engl. non-small cell lung carcinoma</i> ) |
| PBMC                | <i>Peripheral blood mononuclear cell</i>   |
| PBS                 | <i>Phosphate-buffered saline</i>   |
| PCR                 | <i>Polymerase chain reaction</i>   |
| PTPRC               | Rezeptor-Typ Tyrosinphosphatase C  |
| py                  | <i>pack years</i>  |
| Rb                  | Retinoblastom  |
| RNA                 | Ribonukleinsäure ( <i>engl. ribonucleic acid</i> )                                   |
| ROCK                | Rho-assoziierte Proteinkinase  |
| ROS                 | Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>engl. Reactive Oxygen Species</i> )                  |
| rpm                 | Umdrehung pro Minute ( <i>engl. rounds per minute</i> )                              |
| RPMI                | <i>Roswell Park Memorial Institute (Medium)</i>                                      |
| RT                  | Raumtemperatur   |
| SCLC                | Kleinzelliges Lungenkarzinom ( <i>engl. small cell lung carcinoma</i> )              |
| SD                  | Standardabweichung ( <i>engl. standard deviation</i> )                               |
| Sek.                | Sekunde(n)   |

|       |  |
|-------|--|
| sog.  | sogenannte                                   |
| syn.  | synonym                                      |
| TAC   | <i>Tetrameric antibody complex</i>           |
| TGF   | <i>Transforming growth factor</i>            |
| TNF   | Tumornekrosefaktor                           |
| TNM   | <i>Tumor, Node, Metastasis</i>               |
| TPS   | <i>Tissue polypeptide specific antigen</i>   |
| Tris  | Trishydroxymethylaminomethan                 |
| TTF   | <i>Thyroid transcription factor</i>          |
| U     | Unit   |
| u. a. | unter anderem                                |
| UICC  | <i>Union Internationale Contre le Cancer</i> |
| v/v   | Volumen zu Volumen                           |
| vgl.  | vergleiche                                   |
| vs.   | versus                                       |
| w/v   | Gewicht ( <i>engl. weight</i> ) zu Volumen   |
| WHO   | <i>World Health Organisation</i>             |
| z. B. | zum Beispiel                                 |

## 1 EINLEITUNG

In der heutigen Medizin nimmt die Onkologie einen großen Anteil im klinischen sowie forschenden Alltag ein. Krebserkrankungen gehören in Deutschland zu den fünf häufigsten Gründen für eine stationäre Krankenhausbehandlung und belegen den zweiten Platz in der Statistik der Todesursachen [1]. Dabei sind die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten in Abhängigkeit von der Entität, dem Tumorstadium und auch dem Zustand der Patienten oft sehr unterschiedlich. Tumoren, die nur auf ihren Ursprungsort begrenzt sind, lassen sich tendenziell mit einer größeren Chance auf Heilung behandeln als solche, die bereits Absiedlungen, sog. Metastasen, in angrenzenden Lymphknoten oder anderen Organen gebildet haben. Die Entstehung, Progredienz und Therapierbarkeit von Metastasen konnte bis heute noch nicht vollumfänglich entschlüsselt werden und ist Gegenstand intensiver Forschungsstudien. Hierbei sind insbesondere Zirkulierende Tumorzellen (engl.: *Circulating Tumor Cells*, CTCs) in den Fokus gerückt. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit, sich vom Primärtumor abzulösen und Absiedlungen an anderen Lokalisationen zu bilden. Nicht nur die Isolierung und Detektion, sondern insbesondere die Kultivierung von CTCs zur weiteren Charakterisierung und insbesondere individualisierten Therapietestung scheinen von größter klinischer Bedeutung. Durch Anwendung eines *Spiking*-Modells sowie der Verwendung klinischer Proben von Tumorpatienten sollte daher in dieser Arbeit geprüft werden, wie sich perspektivisch die Isolierung dieser Zellen aus dem Blut von Patienten und nachfolgend deren Kultivierung optimieren lässt, um eine ausreichend hohe Zellzahl für weiterführende Untersuchungen zu erhalten. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden dabei einerseits kommerzielle Zelllinien eines Lungen- bzw. Kolorektalen Karzinoms (häufigste Tumorentitäten in Deutschland) verwendet, um frei zirkulierende maligne Zellen in Spenderblutproben nachzubilden, andererseits wurden Blutproben von Patienten mit Lungenkarzinomen genutzt, die mutmaßlich Zirkulierende Tumorzellen enthielten.

Im Folgenden werden zunächst der aktuelle wissenschaftliche Stand zu Zirkulierenden Tumorzellen sowie allgemeine Informationen zu den beiden betrachteten Tumorentitäten erläutert.

## 1.1 ZIRKULIERENDE TUMORZELLEN (CTC)

### 1.1.1 Bedeutung in der Medizin

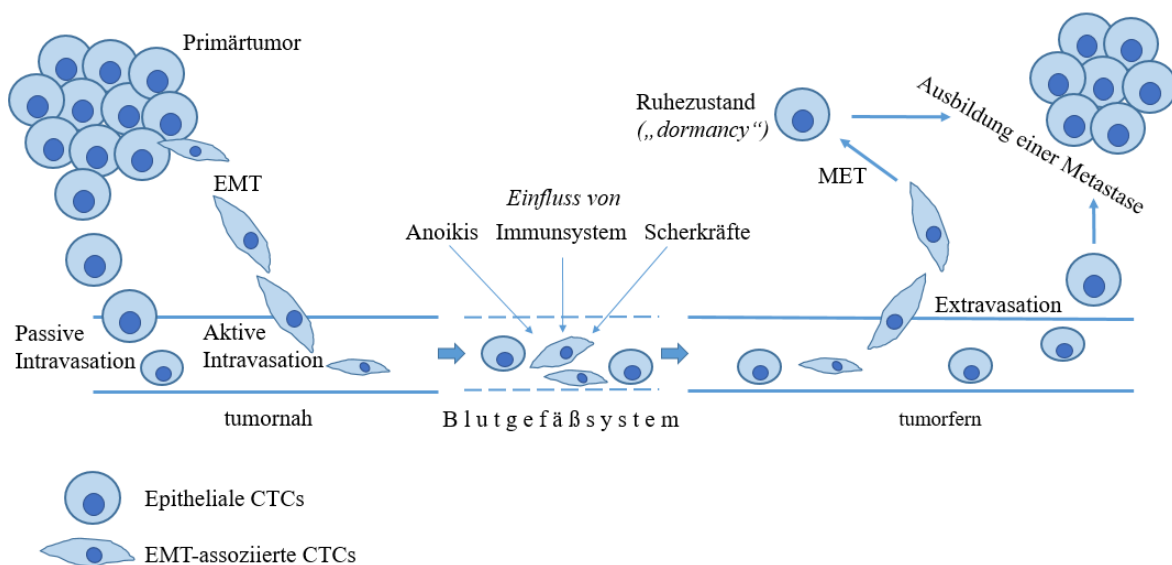
Die Kenntnis über Zirkulierende Tumorzellen (engl.: *Circulating Tumor Cells*, CTCs) erlangt zunehmend klinische Bedeutung. Zirkulierende Tumorzellen wurden bereits 1869 von dem australischen Pathologen T. Ashworth beschrieben, der diese Zellen im Blut eines Patienten mit einem metastasierenden Tumor entdeckte [2]. Diese Zellen werden aufgrund ähnlicher Morphologie und Eigenschaften als Abkömmlinge von Primärtumoren verstanden, die das Potential besitzen, frei im Blut zu zirkulieren, dabei wiederholt ihre Eigenschaften zu verändern, und so im Wesentlichen für die Bildung von Fernmetastasen im Rahmen der hämatogenen Metastasierung verantwortlich zu sein [3]. Ihre Anzahl im Patientenblut korreliert mit dem Ausmaß einer Tumorerkrankung; insbesondere bei Brust-, Prostata-, Kopf/Hals-, Lungen- sowie Kolorektalen Karzinomen [4, 5]. Aus diesem Grund haben mittlerweile Analysemethoden Einzug in die heutige medizinische Diagnostik gefunden, die eine Detektion von CTCs in Blutproben und deren Quantifizierung erlauben [6–8]. Dies soll einerseits der Patientenüberwachung und der Therapieverlaufskontrolle bei metastasiertem Tumorleiden dienen und andererseits eine Abschätzung der Prognose und des Überlebens des Patienten ermöglichen [9–14]. Die Anzahl an CTCs je 7,5 ml Blut korreliert mit der Prognose, wobei je nach Studiendesign ein unterschiedlicher Grenzwert (von 1 bis 5 CTCs) gewählt wurde. Eine Anzahl unter dem Grenzwert ist dabei mit einem besseren Gesamtüberleben und einer längeren progressionsfreien Überlebenszeit assoziiert [15]. Auch Patienten mit einer initial hohen Anzahl über dem Grenzwert, die ein Ansprechen auf die Therapie zeigten und in anschließenden Verlaufskontrollen nur noch wenige CTCs (unterhalb des Grenzwertes) im Blut aufwiesen, überlebten signifikant länger als Patienten, deren Anzahl an CTCs konstant hoch blieb oder sich weiter erhöhte [9]. Weitere Bedeutung erlangen die CTCs im Zusammenhang mit der zunehmenden Etablierung der individualisierten Medizin. Die individualisierte Medizin verfolgt das Ziel, jedem Patienten als einzigartiges Individuum unter Berücksichtigung seines Krankheitsverlaufs, seines Lebensstils, biologischer und weiterer individueller Faktoren maßgeschneiderte effiziente Therapien anbieten zu können [16]. Dazu ist die Entwicklung von Methoden nötig, die es ermöglichen, Eigenschaften einer Erkrankung individuell bestimmen zu können. Am Beispiel der CTCs ließen sich somit unter anderem Oberflächenmarker detektieren [17] oder Genexpressionsprofile analysieren [18], um beispielsweise spezifische Antikörper im Rahmen der Therapie einsetzen zu können.

1.1.2 *Eigenschaften von CTCs, Fähigkeit zur Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) und Tumorstammzellen*

Zirkulierende Tumorzellen scheinen im Prozess der hämatogenen Metastasierung eine entscheidende Rolle zu spielen [3]. Im Detail ist ihre Bedeutung aber bis heute noch nicht verstanden, denn die CTCs lassen sich in verschiedene Subtypen klassifizieren, die wiederum unterschiedliche Eigenschaften besitzen [19].

Zirkulierende Tumorzellen vom epithelialen Charakter fanden in der bisherigen Forschung zu diesem Zelltyp am meisten Beachtung. Für ihre Detektion im Blut von Patienten mit Brust-, Prostata- oder Kolorektalem Karzinom wurde das CellSearch®-System entwickelt, das als einziges von der *Food and Drug Administration* (FDA) anerkanntes System Einzug in die klinische Diagnostik gefunden hat [11]. Epitheliale CTCs exprimieren auf ihrer Oberfläche das *Epithelial Cell Adhesion Molecule*, kurz EpCAM, welches als Zielstruktur in vielen Isolationsmethoden verwendet wird [20]. Dieses wird von Zellen der meisten, jedoch nicht von allen Karzinomen exprimiert [21]. Über weitere Adhäsionsmoleküle wie Cadherine und Integrine wird der Zell-Zell-Kontakt aufrechterhalten und die CTCs behalten ihren epithelialen Charakter [22, 23].

Verlieren die Zellen ihre epithelialen Eigenschaften, können sie sich vom Primärtumor ablösen und frei im Blut zirkulieren. Dieser Mechanismus, der nach heutigem Stand der Forschung als ein Hauptgrund für die Metastasierung von Karzinomen gesehen wird, basiert auf der sogenannten Epithelial-Mesenchymalen Transition von Tumorzellen, kurz EMT (Abbildung 1).



**Abbildung 1 – Epithelial-Mesenchymale Transition im Überblick.** Zur Darstellung kommt hier der Prozess der Metastasierung von Zellen des Primärtumors. EMT = Epithelial-Mesenchymale Transition; MET = Mesenchymal-Epitheliale Transition (angelehnt an Joosse *et al.* [24]).

Allgemein wird unter dem Begriff der EMT ein Prozess verstanden, der es polarisierten epithelialen Zellen ermöglicht, über diverse biochemische Veränderungen einen mesenchymalen Phänotyp anzunehmen. Dadurch erlangen sie die Fähigkeit zur Migration, Invasion, Resistenz gegenüber Apoptose sowie Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix. Zur erneuten Ausbildung eines epithelialen Charakters können Zellen den reversen Prozess der EMT, die Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET) durchlaufen [25].

Um den Prozess der EMT je nach zugrundeliegender Ursache klassifizieren zu können, wurden drei Subtypen beschrieben [25, 26]. Der Typ 1 der EMT nimmt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung ein. Er tritt nur transient auf und vermittelt die Implantation des Embryos, die Embryogenese und die Organentwicklung. Zellen der Keimblätter unterziehen sich diesem Prozess, um mesenchymale Eigenschaften zu erlangen und über den reversen Prozess der EMT, die MET, im Folgenden sekundäre Epithelien ausbilden zu können [25]. Der Typ 2 der EMT ist mit Wundheilung, Geweberegeneration und Organfibrose assoziiert. Hierbei werden (Myo-) Fibroblasten infolge von Trauma oder Inflammation generiert, die durch Produktion von kollagenreicher extrazellulärer Matrix den Wiederaufbau von Gewebe vermitteln. Dieser Prozess kommt zum Erliegen, sobald das Trauma behoben bzw. die Inflammation nicht mehr vorhanden ist. Bei einer persistierenden Inflammation kann die EMT jedoch weiterhin ablaufen, sodass es zur Organfibrose kommen kann [25]. Der Typ 3 der EMT stellt bei Betrachtung von CTCs den entscheidenden Subtyp dar. Der genaue Prozess, wie die EMT induziert wird, konnte bislang noch nicht ausreichend aufgeklärt werden. Es wurden aber zahlreiche Faktoren identifiziert, die dabei eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. So kann das sogenannte *Microenvironment*, das heißt die unmittelbare Umgebung der CTCs, mit seinen gelösten Molekülen (u. a. Chemokine, Entzündungsmediatoren) Signale vermitteln, die unter anderem einen Calcium-abhängigen Signalweg in den Zellen aktivieren [27]. Weiterhin zeigten mehrere Arbeitsgruppen, dass hypoxische Bedingungen die EMT triggern und modulieren sowie das Überleben von CTCs fördern können [28, 29]. Den Erklärungsansätzen gemein ist, dass die Tumorzellen verschiedenen sowohl morphologischen als auch funktionellen Veränderungen unterlegen sind, die die EMT charakterisieren. Über diverse intrazelluläre Signalwege [30], wie zum Beispiel die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges, werden Genexpression und somit für die Detektion wichtige Marker beeinflusst (Tabelle 1).

Die Tumorzellen erlangen durch die EMT die Fähigkeit, Zell-Zell-Kontakte aufzulösen, indem sie beispielsweise E-Cadherin vermindert exprimieren, was dazu führt, dass sie sich als Einzelzellen vom Primärtumor lösen können. Weiterhin soll die Herunterregulation von

EpCAM die Dissoziation von Zellen vom Primarius ermöglichen und die Herunterregulation von zytoplasmatischem Cytokeratin die Zellplastizität und Migration erleichtern [31]. Durch Annahme der Form von Fibroblasten-ähnlichen, mesenchymalen Zellen, die u. a. durch Vimentin vermittelt wird, erhöhen die Zellen ihre Mobilität [19], können in das Gefäßsystem migrieren (Intravasation) und über den Blutstrom in entferntere Gewebe transportiert werden, um dort Mikrometastasen zu bilden. Dieses Streuen von Tumorzellen, das einen Kernpunkt der „*seed and soil*“-Theorie darstellt, wonach bestimmte Tumorzellklone in bestimmte Organe bzw. Gewebe metastasieren [22], kann bereits sehr früh während der Erkrankung erfolgen, aber noch nicht zu einer klinisch diagnostizierbaren Metastase führen, wenn die Zellen in einen Ruhe-Zustand (*Dormancy*) verfallen [32].

Um eine Metastase ausbilden zu können, müssen die Tumorzellen den reversen Prozess der EMT, die MET, durchlaufen, wobei sie durch vermehrte Expression von u. a. Zelladhäsionsproteinen wie E-Cadherin und Cytokeratin wieder einen epithelialen Charakter annehmen und Zellverbände bilden können.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass bei dem Prozess der Metastasierung auch Krebsstammzellen (*Cancer Stem Cells, CSCs*), eine kleine Subpopulation der Tumorzellen, die vermutlich von somatischen Stammzellen oder von differenzierten Vorläuferzellen abstammen [19], eine bedeutende Rolle spielen. Diese Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Initiierung von Tumoren, Selbst-Erneuerung und Differenzierung in verschiedene Krebszellen, wodurch Proliferation, Invasion, Metastasierung und die Entstehung von Rezidiven vermittelt werden [33]. Mani *et al.* [34] zeigten, dass sich Tumorzellen mithilfe der EMT in (auch mesenchymale) CSCs umwandeln können und belegten dies mit dem Nachweis der Stammzellmarker CD44/CD24 auf Zellen, die die EMT durchlaufen haben, sowie von EMT-Markern wie Vimentin und N-Cadherin in Zellen, die bereits Stammzellmarker exprimierten.

Somit scheint die EMT im Prozess der Proliferation, Metastasierung und Rezidivierung von Tumoren eine besonders bedeutsame Rolle zu spielen.

### 1.1.3 Detektion und Isolierung von CTCs

Für die Detektion und Isolierung von Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) wurden in den letzten Jahren diverse Methoden etabliert, die auf einer Analyse der vielfältigen Eigenschaften von CTCs basieren. Ein Hauptproblem für anschließende Analysen der CTCs liegt nach wie vor in der geringen Anzahl an CTCs, die aus dem Blut von Patienten isoliert werden kann. Man geht davon aus, dass pro einer Million Leukozyten nur eine oder weniger CTCs

auftreten [20] und in einer 7,5 mL Blutprobe die Anzahl zwischen 1 und über 400 schwanken kann [35, 36]. Darüber hinaus sind diese wenigen Zellen weder in der Morphologie noch in der Expression von Markern identisch, da CTCs die bereits erwähnte Fähigkeit besitzen, sich in unterschiedliche Subtypen zu transformieren und dabei ihre Eigenschaften zu verändern. Zur umfassenden Betrachtung von CTCs sind somit Detektionsmethoden erforderlich, die auf verschiedene Zielstrukturen in Abhängigkeit vom jeweiligen Subtyp ausgerichtet sind. Für die Quantifizierung von Zellen mit epitheliale Charakter ist CellSearch® (Veridex LLC, Raritan, NJ, USA) das bisher einzige von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene System im Rahmen der CTC-Diagnostik. Sein Einsatz als Diagnostikum ist derzeit jedoch nur für die Verwendung bei Patienten mit Brust-, Prostata- oder Kolorektalem Karzinom zugelassen und erlaubt dabei eine Aussage über die Prognose und die Effektivität der Behandlung. Bei Patienten mit Lungenkarzinom wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, die auch hier einen Einsatz des Systems für sinnvoll erachten [11]. Das halb-automatische CellSearch®-System kann CTCs aus einer 7,5 mL-Vollblutprobe mittels dreier Antikörper gegen *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM), Cytokeratin (CK) sowie CD45 isolieren. Dabei werden die Antikörper-markierten Zellen mittels Immunfluoreszenz gefärbt und über ein starkes magnetisches Feld separiert, sodass man Zellen erhält, die EpCAM-positiv, CK-positiv, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)-positiv sowie CD45-negativ (Negativselektion der Leukozyten) sind und somit als epitheliale Tumorzellen identifiziert werden können. Allerdings erlaubt dieses System keine Detektion von CTCs mit Fibroblasten-ähnlichem Charakter bzw. CTCs, die die EMT durchlaufen oder Stammzell-Eigenschaften aufweisen [11].

Ein ähnliches Prinzip verfolgt das weitreichend etablierte *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS, Miltenyi Biotec). Hierbei wird die Vollblutprobe über eine Dichtegradientenzentrifugation und gegebenenfalls eine Separation der Einzelzellen mittels eines CellStrainers vorbehandelt und die sich dann in Suspension befindlichen Zellen werden mit Microbeads inkubiert. Mithilfe von gebundenen Antikörpern binden die Microbeads an die zu isolierenden Zellen. Daraufhin wird das Gemisch durch eine Säule in einem starken Magnetfeld geleitet, wodurch die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten werden. Nach dem Spülen der Säule und dem Entfernen des Magnetfeldes kann mittels erneutem Spülen die gewünschte Zellpopulation gewonnen werden [37]. Für die Detektion von CTCs werden vornehmlich CD326- (EpCAM)-Beads verwendet, die allerdings nur eine Positivselektion von epithelialen CTCs ermöglicht. Um auch CTCs mit nicht-epitheliale Charakter isolieren zu können, deren Bedeutung in den letzten Jahren starken Zuwachs bekommen hat,

bedient man sich daher zunehmend der Negativselektion / Depletion von nicht erwünschten Zellen beispielsweise über CD45, welches als Oberflächenantigen auf weißen Blutzellen exprimiert wird.

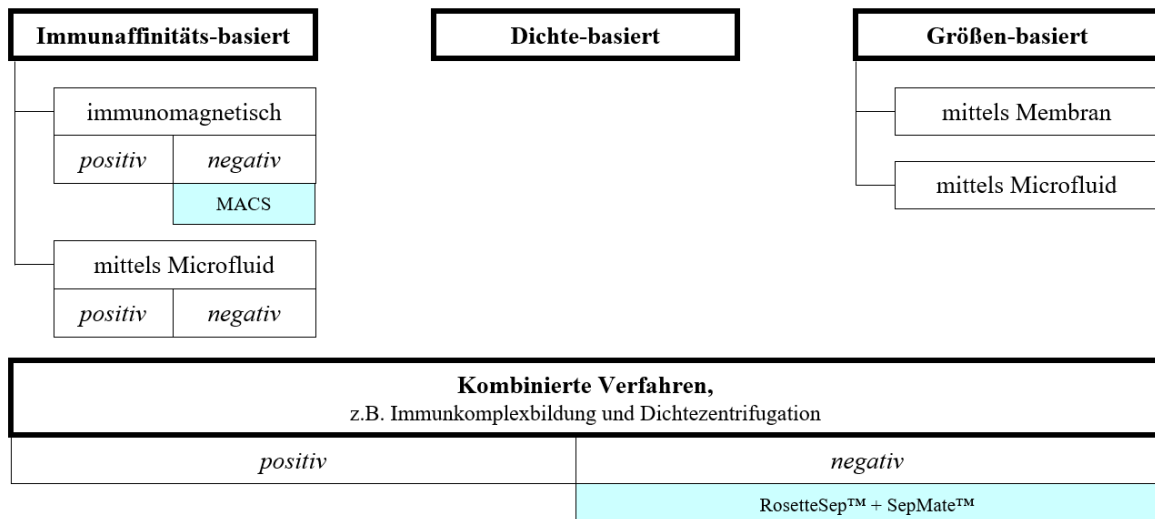
Dem Prinzip der Depletion folgen auch weitere Methoden wie RosetteSep™ (STEMCELL Technologies). Hier wird das zu untersuchende Vollblut mit einem Cocktail verschiedener Anti-CD-Antikörper inkubiert, wodurch unerwünschte Zellen über einen Antikörper-Komplex an rote Blutzellen gebunden werden und sogenannte Immunrosetten bilden [38].

Nach einer folgenden Dichtegradientenzentrifugation können die zu isolierenden Zellen aus dem Röhrchen abpipettiert werden oder mittels eines SepMate™-Röhrchens (STEMCELL Technologies) in ein gewünschtes Behältnis überführt werden. Im Vergleich zum MACS-System erfahren die CTCs hierbei einen geringeren mechanischen Stress, da sie nicht dem Einfluss von starken magnetischen Feldern ausgesetzt sind. Darüber hinaus scheint diese Methode hinsichtlich der Anzahl der detektierten CTCs pro Blutprobe und insbesondere des Nachweises von CTC-Clustern bei einigen Tumorentitäten sogar dem CellSearch®-System überlegen zu sein [39].

Weiterhin werden in der CTC-Forschung auch größenbasierte Isolationsmethoden wie zum Beispiel ScreenCell und ISET eingesetzt [40, 41]. Diese Verfahren bedienen sich eines Filters mit einer definierten Porengröße, der die größeren CTCs zurückhalten und die vergleichsweise kleineren Blutzellen passieren lassen soll. Der Vorteil liegt darin, dass sie ohne Zentrifugation sowie ohne starke Magnete auskommen, was den mechanischen Zellstress deutlich reduzieren soll. Allerdings können von der Größe abweichende Zellen, die zum Beispiel gerade einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen, ebenfalls den Filter passieren und so zu einer geringeren CTC-Ausbeute führen.

Des Weiteren finden sich diverse andere Methoden auf dem Markt, die eine Isolation von CTCs erlauben sollen. Dazu zählen der mit magnetischen Beads arbeitende AdnaTest (AdnaGen), die Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) und Oncoquick (Greiner Bio-One) sowie der hochspezifische CTC-Chip [7, 40].

In Anlehnung an die Übersichtsarbeit von Bankó *et al.* [186] sowie Rushton *et al.* [187] zeigt die Abbildung 2 zusammenfassend eine Übersicht bereits etablierter Isolierungsprinzipien für Tumorzellen bzw. CTCs.



**Abbildung 2 – Übersicht bereits etablierter Isolierungsprinzipien** (angelehnt an Bankó *et al.* [186] sowie Rushton *et al.* [187]). Positiv bedeutet eine Selektion der erwünschten Zellen, negativ bedeutet eine Selektion der unerwünschten Zellen. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden sind in türkis hinterlegt.

In letzter Zeit kamen auch neue Verfahren auf den Markt, die eine vollautomatische Isolierung von CTCs ermöglichen sollen wie zum Beispiel die *LiquidBiopsy Platform* von Thermo Fisher (Produktinformation der Firma Thermo Fisher, Artikelnr. A28188). Unter *Liquid Biopsy* versteht man eine Flüssigbiopsie, also eine Blutprobe eines erkrankten Patienten, die auf Tumorzellen bzw. Tumorzell-DNA untersucht wird, wodurch unter anderem Aussagen zum Mutationsstatus und Primärtumor getroffen werden können, teilweise sogar auch, wenn kein Primärtumor nachgewiesen oder per Gewebebiopsie charakterisiert werden konnte [42, 43]. Dies kann gerade bei den NSCLC (engl.: *non-small-cell lung carcinoma*) von Bedeutung sein, da diese einer chirurgischen Biopsieentnahme oft nicht zugänglich sind [44]. Allerdings weisen *Liquid Biopsies* im Regelfall noch keine ausreichend hohe Sensitivität hinsichtlich pathologischer Fragestellungen auf und haben daher bisher noch keinen Stellenwert als alleiniges diagnostisches Tool erlangt. Sie stellen aber eine vielversprechende Ergänzung zu den aktuell verfügbaren diagnostischen Methoden dar [45–47].

Den beschriebenen Verfahren gemein ist, dass nach der Isolation der gewünschten Zellen eine Charakterisierung durch beispielsweise Immunfluoreszenz- oder Immunhistochemie-Färbung oder mittels weiterer Downstream-Methoden wie PCR oder NGS anzuschließen ist, um die jeweiligen Subtypen von CTCs analysieren zu können.

#### 1.1.4 Charakterisierung von CTCs

Da sich wie bereits beschrieben die Eigenschaften von Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) sowohl zwischen unterschiedlichen Tumorentitäten als auch innerhalb einer Entität, sogar innerhalb eines Individuums, deutlich unterscheiden können, gilt es, die Charakterisierung von CTCs weiter zu optimieren, um somit ein besseres Verständnis hinsichtlich der Metastasierungsprozesse erreichen zu können.

Mikroskopisch könnten die Zellen über ihre Größe und Morphologie beurteilt werden. So sind CTCs je nach Entität mit 8 bis durchschnittlich um ca. 30  $\mu\text{m}$  in der Regel größer als Leukozyten und haben eine größere Kern-Plasma-Relation [48, 49, 186, 188]. Weiterhin ist beschrieben, dass Tumorzellen Cluster bzw. Emboli ausbilden [50] und dadurch den Prozess der Bildung von Metastasen fördern können. So beschrieben mehrere Arbeitsgruppen, dass das Vorliegen von Clustern mit einem 23- bis 50-fach höheren metastatischen Potential, einer größeren Resistenz im Vergleich zu einzelnen CTCs und somit insgesamt mit einem verringerten Gesamtüberleben einhergehen kann [51–54]. Ohne eine weitergehende Analyse ist jedoch keine Differenzierung zu anderen im Blutstrom vorkommenden Zellen möglich und auch die Morphologie allein ist kein zuverlässiger Parameter, zumal EMT-Zellen einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp annehmen können [26].

Häufig werden die isolierten Tumorzellen daher mittels Immunfluoreszenz oder Immunzytochemie über typische Marker für die jeweiligen Phänotypen analysiert. Zwar sind noch keine hochspezifischen universellen Marker für die einzelnen Entitäten im Rahmen der Diagnostik verfügbar, doch mithilfe von Kombinationen verschiedener Markerproteine können oft Rückschlüsse auf die Art des vorliegenden Karzinoms geschlossen werden. Meist werden dabei primär die epithelialen Eigenschaften berücksichtigt. So kommen beim Lungenkarzinom zum Beispiel CK7 und CK19 zum Einsatz [55–58], beim Kolorektalen Karzinom sind es beispielsweise CK20 und CEA (*Carcinoembryonic Antigen*) [59–61].

Bei der Auswahl der verwendeten Antikörper für die Färbungen im Rahmen dieser Arbeit wurde daher darauf geachtet, dass möglichst viele der spezifischen Cytokeratine abgedeckt sind (vgl. Kapitel 8.3.3.5).

Durch Betrachtung der epithelialen Eigenschaften werden jedoch oft solche Zellen übersehen, die die EMT durchlaufen haben und / oder einen Stammzell-ähnlichen Charakter aufweisen. Um auch diese nicht unberücksichtigt zu lassen, bedient man sich zunehmend weiterer Marker (Tabelle 1), die im Zusammenspiel eine relativ spezifische Aussage ermöglichen. Im Rahmen der heutigen Methoden ist weiterhin auch eine Analyse mittels beispielsweise PCR und NGS möglich.

Um die Bedeutung der CTCs noch besser verstehen zu können, ist die fortlaufende Identifizierung von neuen Markern sowie Gen- und Proteinexpressionsprofilen nötig, um neue Therapieansätze gegen spezifische Zielstrukturen entwickeln zu können.

**Tabelle 1 – Auswahl an Markern zur Charakterisierung von Lungenkarzinomen und assoziierten CTCs, ↑ bedeutet hochreguliert, ↓ bedeutet herunterreguliert, aus [17, 19, 26, 62–70]**

| klinisch   | epithelial     | EMT           |        | Stammzellen   |
|------------|----------------|---------------|--------|---------------|
| NSCLC:     | EpCAM/         | Vimentin ↑    | ZO-1 ↓ | CD44 ↑/CD24 ↓ |
| TPS        | CD326+         | N-Cadherin ↑  | GLUT3↑ | ALDH-1        |
| CYFRA 21-1 | panCytokeratin | E-Cadherin ↓  | SNAIL  | (CD 133)      |
| CEA        | CK7+/CK20-     | Fibronectin ↑ | SLUG   |               |
|            | CD45-          | Cytokeratin ↓ | Twist  |               |
|            | E-Cadherin     | EpCAM ↓       | Zeb1   |               |

### 1.1.5 Kultivierung von CTCs

Aufgrund der geringen Anzahl an Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs), die aus dem Blut der Patienten isoliert werden können, sind nur begrenzte Analysen der Zellen möglich. Die *in vitro* Expansion würde umfassende Untersuchungen zur Charakterisierung der CTCs und die Entwicklung neuer Therapieansätze ermöglichen. Bisher wurden in der Forschung verschiedene Ansätze für die Kultivierung getestet [71], jedoch konnten bis auf einige Ausnahmen (Tabelle 2) oft keine über lange Zeiträume proliferierenden Zelllinien etabliert werden. Cayrefourcq *et al.* [72] gelang es, eine CTC-Zelllinie von einem Patienten mit einem Kolonkarzinom, der eine über CellSearch® ermittelte CTC-Zahl von über 300 in 7,5 mL Blut aufwies, zu etablieren. Einen weiteren Erfolg bei der Kultivierung von CTCs eines kolorektalen Karzinoms verzeichneten Eliasova *et al.* [73]. Maheswaran *et al.* [74] bzw. Yu *et al.* [75] beschrieben die erfolgreiche Kultivierung von CTCs von Brustkrebspatientinnen für über ein Jahr. Zhang *et al.* [76] konnten CTCs von Lungenkrebspatienten im Frühstadium erfolgreich über 14 Tage kultivieren und Hamilton *et al.* gelang die Kultivierung von drei CTC-Zelllinien von 3 aus 30 Proben von Patienten mit einem SCLC für über vier Monate [77]. Wang *et al.* konnten darüber hinaus CTCs aus dem Blut eines an einem Adenokarzinom der Lunge erkrankten Patienten isolieren und für über sechs Monate kultivieren [78].

Den erfolgreichen Versuchen gemein ist, dass initial meist Proben von zahlreichen Patienten gesammelt worden waren, wobei nur ein Bruchteil davon in Kultur genommen werden konnte und hiervon wiederum nur ein kleiner Teil an Zellen erfolgreich proliferierte. Auffällig dabei ist, dass in den Fällen, in denen Zelllinien etabliert werden konnten, initial meist eine hohe Zahl an CTCs im Blut der Patienten vorhanden war, die somit möglicherweise einen Vorteil für die Kultivierung der Zellen bedeutet. Weiterhin dauerte die Expansion von Zellen bis zum Erreichen einer hohen Zellzahl meist Wochen bis Monate. Auch die Kulturbedingungen konnten bisher noch nicht optimal definiert werden, um eine, wie sie für diagnostische Zwecke notwendig wäre, schnelle Expansion der Zellen innerhalb von wenigen Tagen erreichen zu können. Die hier genannten Arbeitsgruppen verwendeten unterschiedliche Isolierungsmethoden und Kulturbedingungen (Tabelle 2), doch bisher konnte kein Verfahren etabliert werden, das zuverlässig und universell für alle CTCs eine Kultivierung ermöglicht. Vermutlich sind unterschiedliche Kulturbedingungen für CTCs von verschiedenen Tumorentitäten notwendig. Für eine routinemäßige *in vitro* Kultivierung von CTCs sind daher die Optimierung der Isolierung und die Etablierung geeigneter Kulturbedingungen weiterhin von großem Interesse.

**Tabelle 2 – Übersicht zu den für die erfolgreiche Etablierung von CTC-Zelllinien verwendeten Kultivierungsmethoden verschiedener Arbeitsgruppen in Abhängigkeit von der Tumor-Entität**

| Arbeitsgruppe                     | Entität      | Material/Methode   |
|-----------------------------------|--------------|--|
| Cayrefourcq<br><i>et al.</i> [72] | Kolon        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- initial: Stammzell-Medium (DMEM/F12, Insulin, 1% N2, EGF, L-Glutamin, FGF2, 2% FBS) unter hypoxischen Bedingungen (37°C, 2% O<sub>2</sub>) in nicht-adhärenenten 24-Well-Platten</li> <li>- nach einigen Wochen Wechsel zu: RPMI1640, EGF, FGF2, Insulin-Transferrin-Selen-Supplement, L-Glutamin unter normoxischen Bedingungen (5% CO<sub>2</sub>)</li> </ul> |
| Eliasova <i>et al.</i> [73]       | Kolon        | RPMI1640, 10% FBS, Amphotericin B, Penicillin/Streptomycin (37°C, 5% CO <sub>2</sub> ) unter Standardbedingungen in Kulturplatten  |
| Grillet <i>et al.</i> [79]        | Kolon        | M12-Medium (DMEM/F12, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, N2, EGF, FGF) in <i>Ultralow attachment 24-well plates</i>  |
| Wang <i>et al.</i> [78]           | Lunge        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- initial: RPMI1640, EGF, FGF2, B27-Supplement unter hypoxischen Bedingungen (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) in nicht-adhärenenten 96-Well-Platten</li> <li>- nach Beginn der Proliferation Wechsel zu normoxischen Bedingungen</li> </ul>  |
| Zhang, Z. <i>et al.</i> [76]      | Lunge        | 3D-Co-Kultur mit Mix aus Kollagen, Matrigel, Krebs-assoziierten Fibroblasten eines primären Pankreastumors in RPMI1640, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 7,5% CO <sub>2</sub> auf einem neu etablierten CTC-Chip  |
| Hamilton <i>et al.</i> [77]       | Lunge (SCLC) | Serum-freies RPMI1640, Insulin, IGF-1, Transferrin, Selenit unter Standardbedingungen in 12-Well-Platten   |
| Yu <i>et al.</i> [75]             | Brust        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumor sphere medium (RPMI1640, EGF, FGF, B27-Supplement, Antibiotikum-Antimykotikum) bei 37°C, 4% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> in <i>Ultralow attachment plates</i></li> <li>- erfolglose Versuche mit Konditioniertem Medium + ROCK-Inhibitor Y27632 nach Liu <i>et al.</i> [80]</li> </ul>  |
| Zhang, L. <i>et al.</i> [81]      | Brust        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- erste 7 Tage: Stammzell-Medium (DMEM/F12, Insulin, Hydrocortison, 2% B27, EGF, FGF2)</li> <li>- Tag 8 bis 21: EpiCult-C-Medium, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub></li> <li>- ab Tag 22: DMEM/F12, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin in 24- oder 6-Well-Platten</li> </ul>   |

## 1.2 LUNGENKARZINOM UND KOLOREKTALES KARZINOM

Bei der Auswahl der in dieser Arbeit betrachteten Tumorentitäten war einerseits zu berücksichtigen, dass es sich um häufig in der Bevölkerung vorkommende Krebsarten handelt, so dass a) möglichst viele Patienten von neuen Erkenntnissen zu CTCs profitieren könnten und b) prinzipiell die Möglichkeit zur Erlangung von entsprechenden klinischen Proben vergleichsweise gut sein sollte, auch wenn dabei mehrere (teilweise nicht unmittelbar beeinflussbare) Faktoren eine Rolle spielten. Andererseits wurden mit dem Lungenkarzinom und Kolorektalen Karzinom zwei Entitäten gewählt, bei denen die Therapieregime unterschiedliche Ebenen erreicht haben: eine wesentlich stratifizierte Therapie von molekularen Subtypen beim Lungenkarzinom (siehe nNGM-Netzwerk [82]) gegenüber relativ wenigen Therapie-relevanten Subtypen beim Kolorektalen Karzinom. Wichtig wäre dabei zu charakterisieren, inwieweit CTCs die bisherigen bekannten Subtypen über die verschiedenen Entitäten hinweg erfassen oder abgrenzen könnten.

Das Lungenkarzinom (synonym Bronchialkarzinom) belegt über alle Entitäten weltweit mit 1,6 Millionen Todesfällen pro Jahr und geschätzten 1,8 Millionen jährlichen Neuerkrankungen [83] den ersten Platz in der Statistik der Krebstodesursachen [84]. Es ist die häufigste durch Krebserkrankungen verursachte Todesursache bei Männern sowie die zweithäufigste bei Frauen nach dem Mammakarzinom [1]. Diese Entität wurde auch gewählt, da mit ihr bereits in vielen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gearbeitet, FDA-geprüfte Detektionsverfahren etabliert und erfolgreiche Kultivierungsversuche unternommen wurden (siehe Kapitel 1.1.3 und 1.1.5). Zudem erschien ein besseres Verständnis hinsichtlich Zirkulierender Tumorzellen insbesondere bei den Entitäten wichtig, die eine vergleichsweise schlechte Prognose haben. So liegt das relative 5-Jahres-Überleben bei 15 % für Männer und 21 % für Frauen [85] (bzw. durchschnittliches altersstandardisiertes 5-Jahres-Überleben von 13 % in Europa [83]), was auf eine vergleichsweise späte Detektion der Tumore zurückzuführen ist. Diese begründet sich unter anderem dadurch, dass der Tumor häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium Symptome wie chronischen Husten, Brustschmerzen, Dyspnoe, Heiserkeit, Hämoptysen und Gewichtsabnahme verursacht [86–88]. Bei einer frühen Diagnose im Stadium Ia gemäß UICC (*Union internationale contre le cancer*) liegt das 5-Jahres-Überleben geschlechtsunabhängig zwischen 60 und 80 % [89]. Allerdings werden nur 15 % der Tumoren bei Diagnose als *localized disease* klassifiziert und nur ca. 20 % der Patienten sind operabel [90]. Durch eine frühere Detektion könnte eine Erkrankung vermutlich in einem prognostisch deutlich besseren Stadium identifiziert werden, in dem nicht schon eine Metastasierung in regionäre Lymphknoten und ferne Organe, v. a. Leber, Gehirn, Nebennieren

und Skelettsystem, stattgefunden hat [91]. Als hauptursächlich für die Bildung dieser Metastasen werden nach heutigem Stand der Forschung Zellen angesehen, die sich vom Primarius lösen können und dann als Zirkulierende Tumorzellen über das Gefäßsystem unter Veränderung ihrer Eigenschaften in andere Organe gelangen. Anhand der Anzahl der CTCs im Patientenblut können auch gewisse Rückschlüsse auf den Status der malignen Erkrankung gezogen werden [92, 93]. Die histopathologische Klassifikation der Lungenkarzinome erfolgt nach der im Jahr 2015 aktualisierten WHO-Einteilung. Die häufigsten sind epitheliale Tumore, zu denen die hier betrachteten Plattenepithel- und Adenokarzinome zählen [94] (gemäß früherer WHO-Klassifikation wurden sie unter dem Oberbegriff NSCLC (*Non-small-cell lung carcinoma*) zusammengefasst). Die Beurteilung von Tumoren anhand von Biopsien richtet sich dabei nach der UICC-Klassifikation (UICC = *Union Internationale Contre le Cancer*) und dem TNM-System (TNM = *Tumor, Node, Metastasis*) [90].

Die Entstehung eines Tumors gliedert sich in mehrere Stufen. Die Malignität geht von organspezifischen Stammzellen der zentralen und peripheren Atemwege aus. Das Plattenepithelkarzinom entwickelt sich über eine plattenepitheliale Metaplasie und Plattenepitheldysplasie bis zum *Carcinoma in situ* [90]. Es weist im Vergleich zu anderen Entitäten eine hohe Rate an chromosomalen Veränderungen auf, die sich vermutlich durch Effekte der inhalativen Noxen erklären lassen. Dazu zählen unter anderem Mutationen im *TP53*-Gen und die Amplifikation des Gens *FGFR1*. Das in der Häufigkeit zunehmende und v. a. bei Nicht-Rauchern vorkommende Adenokarzinom entwickelt sich ebenfalls aus Vorstufen wie der atypischen adenomatösen Hyperplasie oder der bronchiolären Zylinderzell-dysplasie, woraus *In-situ*-Karzinome hervorgehen [90]. In Tumoren von Nicht-Rauchern werden vorwiegend *EGFR*-Mutationen und *ALK1*-Translokationen beobachtet, bei Rauchern hingegen Mutationen des *KRAS*-Onkogens sowie des *IGF*-Gens [88, 90]. Zu einigen dieser zahlreichen molekularen Subtypen erfolgen bereits klinische Studien zur Prüfung von Therapieregimen mittels entsprechenden Inhibitoren z. B. gegen *MET*, *KRAS*, *ROS1*, *RET* oder *NTRK* [95]. Gemein ist den Subtypen, dass in den Tumoren fast ausnahmslos Aneuploidien beobachtet werden und Veränderungen auf dem Chromosom 3p sowie Defekte in Tumorsuppressorgenen eine wichtige Rolle spielen [90]. Zudem scheinen Dysfunktionen in Zell-Zell-Adhäsions-Molekülen für die Krankheitsprogression von Bedeutung zu sein [96]. In der pathologischen Diagnostik von Lungenkrebs macht man sich die Beurteilung dieser Mutationen für die Zuordnung zu einer der oben genannten Subtypen zunutze. Weiterhin kommt die PAS-Färbung dafür zum Einsatz und es werden Marker wie beispielsweise Zyto-

keratine, TTF1, Surfactant, Napsin und Pneumozytenmarker immunhistochemisch untersucht [97]. Da 20 % der Lungentumoren Metastasen von Tumoren anderer Organe darstellen, finden noch weitere Marker-Panels Anwendung. Im Blut können weiterhin die Tumormarker CYFRA21-1 [69], TPS und CEA (sowie die assoziierten CEACAMs [98, 99]) bestimmt werden [64, 100], die jedoch bisher in der Diagnostik und Nachsorge keine wesentliche Bedeutung besitzen [94]. Das Repertoire der klinischen Diagnostik für das *Staging* umfasst unter anderem bildgebende Verfahren, die Bronchoskopie mit Lavage und Biopsie, die Mediastinoskopie sowie Blut- und Lungenfunktionstests [88, 101, 102]. Als therapeutische Optionen stehen die primäre chirurgische Resektion bei Operabilität, die neoadjuvante sowie adjuvante Radiotherapie, die Polychemotherapie (zum Beispiel mit Cisplatin) und die Antikörpertherapie (zum Beispiel mit Gefitinib bei positivem *EGF*-Rezeptor) zur Verfügung [88]. Bei inoperablem Befund sowie bei Vorhandensein von Fernmetastasen sind eine palliative Chemotherapie und eine Radiotherapie möglich [88, 102].

Weiterhin sollte in dieser Arbeit auch das Kolorektale Karzinom (KRK) betrachtet werden. Aufgrund im *Spiking*-Modell unzureichender Kultivierungserfolge der entsprechenden kommerziellen Metastasenzelllinie im Konditionierten Medium wurden jedoch keine klinischen Proben untersucht. Daher sei an dieser Stelle nur kurz auf wesentliche Daten zu Kolorektalen Karzinomen eingegangen. Diese Entität wurde wie auch das Lungenkarzinom wegen ihrer hohen Relevanz im Gesundheitssystem gewählt. Das KRK zählt zu den drei häufigsten Krebserkrankungen und nimmt mit 10,8 % geschlechtsunabhängig Platz drei unter den häufigsten Todesfällen durch Krebserkrankungen ein [103]. Die Inzidenz des KRK verdoppelt sich bei über 40-Jährigen alle 10 Jahre [94]. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 62 % [104]. Histologisch handelt es sich um ein Adenokarzinom, das bei fehlenden bzw. unspezifischen Frühsymptomen vorwiegend in Leber und Lunge metastasiert. Auch hier scheint ein besseres Verständnis hinsichtlich CTCs zu einer Detektion des Malignoms in einem früheren und damit prognostisch besseren Stadium beitragen zu können. Die Einteilung des KRK erfolgt gemäß der TNM- bzw. UICC-Klassifikation [105]. Über 80 % der KRK entwickeln sich auf dem Boden eines Adenoms nach der sogenannten Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz, wobei häufig Mutationen in den Genen *APC*, *KRAS*, *DCC/SMAD4* und *TP53* vorliegen [90]. Etwa 20-30 % der KRK resultieren aus einem serrierten Adenom durch Mutation der Protoonkogene *BRAF* und *KRAS*. Die Entwicklung vom Adenom zum Karzinom dauert ca. 10 Jahre in Abhängigkeit von der Anzahl der genetischen Veränderungen [94, 106–108].

## 2 FRAGESTELLUNG UND MOTIVATION

Erkenntnisse zu Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) und ihrer Rolle im Prozess der Metastasierung maligner Tumore erlangen eine immer größere Bedeutung. Um CTCs und damit auch die Prozesse der Metastasierung umfangreich analysieren zu können, ist ausreichend Ausgangsmaterial für die Untersuchungen notwendig. Die erfolgreiche Etablierung von Zellkulturen aus CTCs würde umfassende Analysen und damit die Identifizierung von prognostischen und prädiktiven Biomarkern erlauben. Darüber hinaus wäre eine Therapie-  
testung anhand der Kulturen möglich, von der sich im Sinne der individualisierten Medizin eine Therapieempfehlung ableiten ließe (Abbildung 3).

Da eine direkte Isolierung von CTCs mit nachfolgender Kultivierung aufgrund ihrer Eigenschaften (siehe Kapitel 1.1) bisher nicht effizient möglich schien, wurde in dieser Arbeit zunächst anhand eines *Spiking*-Modells untersucht, ob sich in Spenderblut gespikte Zellen zweier kommerzieller Metastasenzelllinien durch Depletion der hämatopoetischen Zellen wieder aus dem Blut isolieren lassen und ob sie ferner unter Anwendung zweier unterschiedlicher Medien kultivierbar sind. Unter der bisherigen Kenntnis, dass CTCs hinsichtlich ihrer Eigenschaften grundlegend nicht mit hämatopoetischen Zellen verwandt sind und somit während der Isolierung nicht depletiert werden, sollte die bessere Isolierungsmethode anschließend auf klinische Proben von Tumorpatienten angewendet werden, um mutmaßliche CTCs aus dem Vollblut isolieren und im Weiteren expandieren zu können.

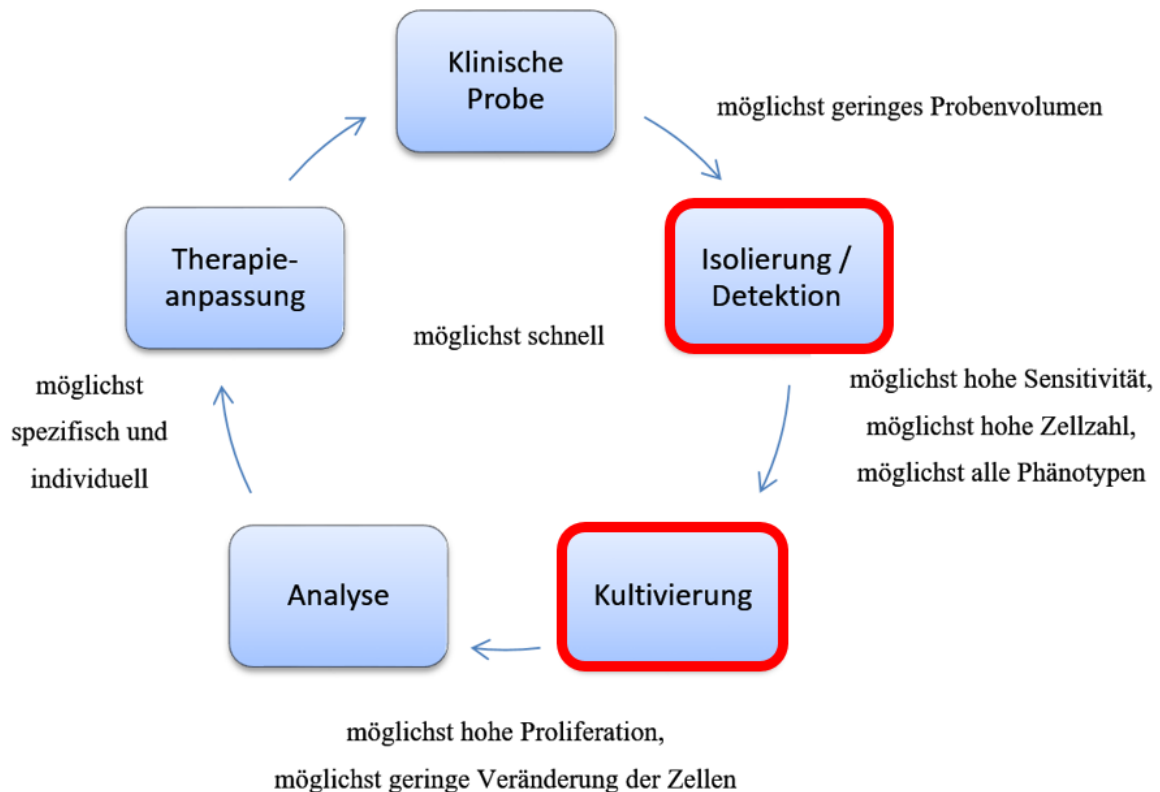
Für die Charakterisierung der Tumorzellen mittels Immunfluoreszenz sollte identifiziert werden, welche Marker eine zuverlässige Detektion epithelialer Tumorzellen ermöglichen.

Im Einzelnen wurde folgenden Fragestellungen nachgegangen:

1. Sind sowohl die Isolierungsmethoden MACS als auch RosetteSep™ + SepMate™ geeignet, um nicht-hämatopoetische Zellen aus einer Vollblutprobe zu isolieren? Zeigt sich auch bei einer geringen Zahl an Versuchswiederholungen eine der Methoden als geeigneter hinsichtlich Anwendung, Zellausbeute und Reinheit?
2. Lassen sich die Zellen nach Anwendung der jeweiligen Isolierungsmethode kultivieren? Kann der Einsatz von Konditioniertem Medium dabei die Erfolgsrate bei der Kultivierung erhöhen?
3. Treten durch den Einsatz Konditionierten Mediums Veränderungen der Zellen auf?
4. Können mutmaßliche CTCs aus klinischen Proben unter diesen Bedingungen kultiviert werden?

5. Können Immunfluoreszenz- und Immunzytochemische Färbungen zur Charakterisierung der isolierten bzw. kultivierten Zellen etabliert werden?

Diese Arbeit sollte perspektivisch einen Beitrag zur Optimierung der diagnostischen Prozesse im klinischen Kontext durch die Optimierung der Isolierung, Detektion und Kultivierung von CTCs leisten.



**Abbildung 3 – Ziele dieser Arbeit im Kontext der klinischen Behandlung.** Ziel dieser Arbeit ist die Optimierung der Isolierung, Detektion und Kultivierung von nicht-hämatopoetischen Zellen und somit auch CTCs von Tumorpatienten. Es steht damit im Kontext des übergeordneten Ziels, anhand von Untersuchungen an CTCs prognostische und prädiktive Biomarker zu identifizieren und eine verbesserte Therapielenkung zu erreichen.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 MATERIALIEN

Die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien sowie Software sind im Anhang (Kapitel 8.3) aufgeführt. An dieser Stelle sei jedoch auf die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sowie auf die Daten zu den klinischen Proben eingegangen.

##### 3.1.1 Zelllinien

Für die in dieser Arbeit angewandten *Spiking*-Modelle wurden die humane Lungen-Metastasenzelllinie HCC4006 (ATCC® CRL-2871™) und die humane kolorektale Metastasenzelllinie SW620 (ATCC® CCL-227™) des Anbieters ATCC verwendet.

Die Zelllinie HCC4006 wurde nach Herstellerempfehlungen in RPMI-1640-Medium mit 10 % FBS und zusätzlich mit 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Sie weist eine erworbene Mutation in der *EGFR*-Tyrosinkinase-Domäne auf.

Die Zelllinie SW620 wurde nach Herstellerangaben in Leibovitz L-15-Medium mit 10 % FBS und zusätzlich mit 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Sie weist eine G > A Mutation im Codon 273 des Gens *TP53* auf.

##### 3.1.2 Klinische Daten und Probenmaterial der Patienten

Um die Erfolgsrate der Methoden aus den *Spiking*-Versuchen mit der Anwendung auf klinische Proben vergleichen zu können, wurde ein Kollektiv aus 10 Patienten zusammengestellt, von dem präoperativ periphere Vollblutproben bzw. Proben des malignen Gewebes bezogen wurden (Tabelle 3). Die Proben wurden durch das Interdisziplinäre Centrum für Biobanking - Lübeck (ICB-L) mit dem Einverständnis der Patienten nach den Richtlinien der lokalen Ethikkommission gesammelt und zur Verfügung gestellt (Ethikvota: 17-043 vom 10.02.2017 und 16-282 vom 25.10.2016). Bei fünf der zehn Patienten wurden CTCs aus jeweils zwei präoperativ abgenommenen EDTA-Vollblutproben (je ca. 7,5 mL) isoliert.

Keiner der Patienten erhielt vor der OP eine neoadjuvante Radio- oder Chemotherapie. Zu den Vollblutprobennummern 3 und 4 lagen zudem korrespondierende Proben des Primärtumorgewebes vor (vgl. Kapitel 4.2.2), bei den Nummern 6-10 ausschließlich Primärgewebe zur Etablierung primärer Zellkulturen (vgl. Kapitel 3.2.9). Letztere sollten perspektivisch den Vergleich der Eigenschaften zwischen Primärgewebezellen sowie den korrespondierenden CTCs ermöglichen.

Hinsichtlich der Quantität der Proben wurde initial eine höhere Anzahl erwartet. Mehrere Faktoren spielten dabei jedoch eine Rolle, dass die Materialverfügbarkeit letztlich vergleichsweise geringer ausfiel. So fanden in der Universitätsklinik, in der die Proben bezogen wurden, zwar zahlreiche thoraxchirurgische Eingriffe statt, jedoch wurden nur in einem Bruchteil primäre Lungenkarzinome reseziert. Zudem war präoperativ eine Aufklärung eines Studienarztes über Forschungszwecke und eine Einwilligung der Patienten zur Spende von mindestens 15 mL Vollblut nötig, wobei einige Patienten aufgrund eines bereits reduzierten Allgemeinzustandes oder aus medizinischen Gründen für eine Probennahme zu Forschungszwecken nicht infrage kamen. Weiterhin wurden die hier verwendeten Proben direkt aus dem Operationssaal in Empfang genommen und mit geringstmöglicher Zeitlatenz weiterverarbeitet. Bereits in der Biobank vorliegende kryokonservierte Zellen der betrachteten Entitäten sollten aus diesem Grund nicht als Alternative verwendet werden. Darüber hinaus ergab sich bei einigen potentiellen Proben entweder intraoperativ oder histologisch kein Karzinomnachweis (bei Nr. 9 und 10 folgte das Ergebnis erst, als diese bereits in Kultur genommen waren), sodass letztlich das hier aufgeführte Kollektiv für weitere Versuche verwendet wurde.

**Tabelle 3 – Klinische Daten des Patientenkollektivs**

| Nr. | m/w | geb. | Klassifikation                                   | Histologie                     |
|-----|-----|------|--|--------------------------------|
| 1   | w   | 1955 | T2b N2 M0, G3, UICC IIIA                         | Adenokarzinom (NSCLC)          |
| 2   | w   | 1957 | T2a N0 M0, G3, UICC IB                           | Neuroendokrines Karzinom       |
| 3   | m   | 1971 | T4 N0 M0, G2, UICC IIIA                          | Plattenepithelkarzinom (NSCLC) |
| 4   | m   | 1936 | T2a N0 M0, G2, UICC IB                           | Adenokarzinom (NSCLC)          |
| 5   | m   | 1941 | T1b N1 M0, G2, UICC IIB                          | Adenokarzinom (NSCLC)          |
| 6   | m   | 1954 | T2a N0 M0, G2, UICC IB                           | Adenokarzinom (NSCLC)          |
| 7   | w   | 1952 | T4 N2 M1, G2, UICC IV                            | Plattenepithelkarzinom (NSCLC) |
| 8   | m   | 1953 | T3 N2 M0, G2, UICC IIIB                          | Adenokarzinom (NSCLC)          |
| 9   | w   | 1948 | postoperativ keine Malignität nachgewiesen       |                                |
| 10  | w   | 1948 | Lungenmetastase eines Karzino-Sarkoms des Uterus |                                |

### 3.2 METHODEN

Zunächst wurden zur Evaluation der zu untersuchenden Isolierungsmethoden kommerzielle Zelllinien für das *Spiking*-Modell kultiviert (Abbildung 4). Nach Einbringen der Zellen in Vollblutproben gesunder Spender wurden die hämatopoetischen Zellen mittels zweier unterschiedlicher Verfahren aus den Blutproben depletiert, sodass die übrig gebliebenen nicht-hämatopoetischen Zellen, zu denen auch die CTCs gezählt wurden, im nächsten Schritt einerseits quantifiziert und andererseits in Kultur gegeben werden konnten. Dabei wurden zwei unterschiedliche Medien verwendet. Sofern eine ausreichende Expansion der Zellen erreicht war, folgte eine Charakterisierung der Zellen.

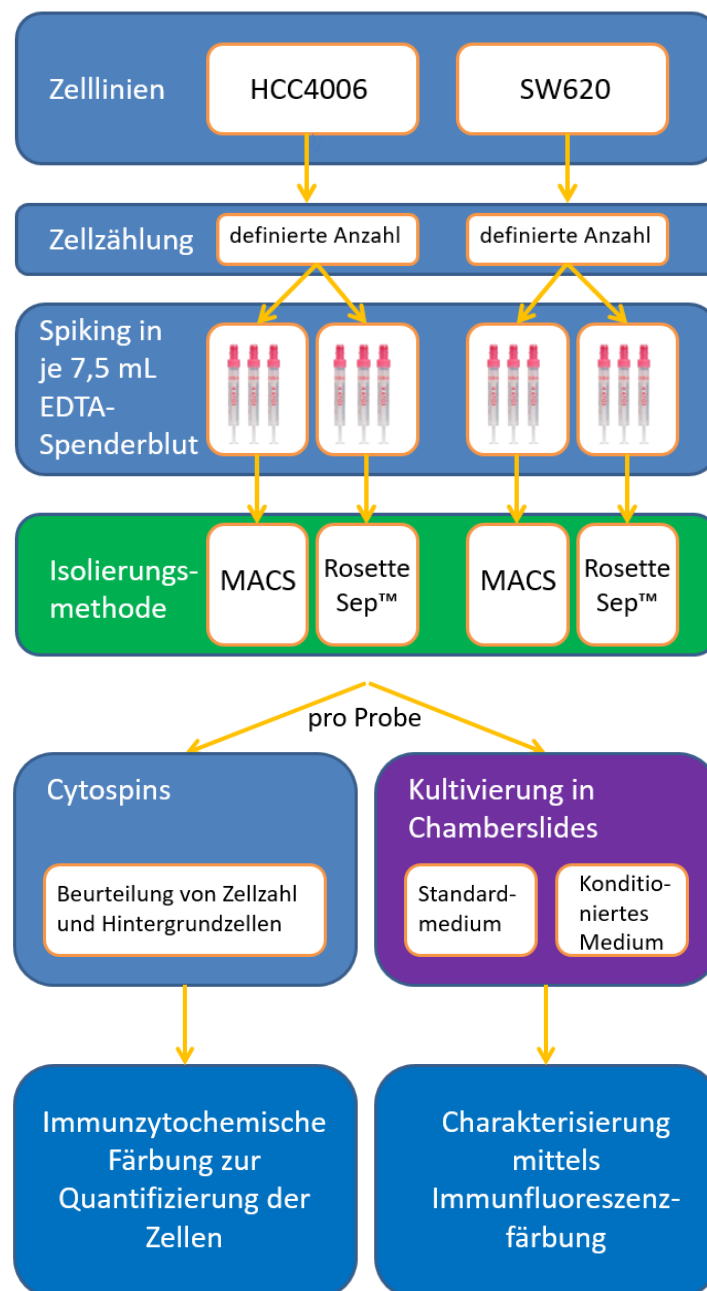


Abbildung 4 – Übersicht der Arbeitsschritte im *Spiking*-Modell.

### 3.2.1 Kultivierung humaner Zellen

Die Kultur humaner Zelllinien wurde grundsätzlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Gewährleistet wurde dies zum einen durch das Arbeiten unter einer Sterilwerkbank und zum anderen durch Verwendung autoklavierter beziehungsweise steril filtrierter Lösungen sowie Nutzung von ausschließlich für das sterile Arbeiten mit Zellkulturen bestimmtem Arbeitsgerät. Kommerzielle adhärent wachsende Metastasenzelllinien wurden für die Verwendung im *Spiking*-Modell kultiviert.

Die SW620-Zelllinie (isoliert aus einer Lymphknotenmetastase eines Adenokarzinoms des Kolons) wurde in Leibovitz's-L15-Medium, 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin im Inkubator bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub> kultiviert und die HCC4006-Zelllinie (isoliert aus einem Pleuraerguss eines Adenokarzinoms der Lunge) in RPMI-1640-Medium (ATCC Modifikation), 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Alle 2 - 3 Tage wurde das Medium abgesaugt und komplettes frisches Medium in die Kulturflaschen gegeben (5 mL für T25-Kulturflasche, 15 - 20 mL für T75-Kulturflasche). Ab einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen im vom Anbieter empfohlenen Verhältnis (1 : 4 bis 1 : 6 für HCC4006, 1 : 2 bis 1 : 10 für SW620) passagiert. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und noch verbleibende Medium-Reste mit 5 mL PBS gespült, um Reste des Serums, welches Trypsin-Inhibitoren enthält, zu beseitigen. Dann wurde Trypsin-EDTA in die Kulturflaschen pipettiert (2 - 3 mL für T25-Kulturflasche, 3 - 4 mL für T75-Kulturflasche) und für ca. 3 min. im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, sodass sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Die Zellablösung wurde durch Klopfen an der Kulturflasche unterstützt und im Anschluss unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Zum Abstoppen der Trypsinaktivität wurde komplettes Medium, welches Proteaseinhibitoren enthält, in der doppelten Menge des eingesetzten Trypsins zugegeben. Für die Weiterkultivierung wurde ein Teil der Zellen in einem Falcon-Röhrchen bei 125 × g (laut ATCC-Empfehlung) für 5 min. sedimentiert (Hettich-Zentrifuge) und anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche eingesät.

### 3.2.2 Kultivierung von 3T3-J2-Fibroblasten und Herstellung des Konditionierten Mediums

Für die Herstellung des Konditionierten Mediums wurden zunächst die kommerziell erworbenen 3T3-J2-Fibroblasten in Kultur genommen. Die in einem Kryoröhrchen vorliegenden Zellen wurden wie unter 3.2.3 beschrieben aufgetaut, in eine T25-Kulturflasche gegeben und

bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach etwa einer Woche konnten die Zellen in einem Verhältnis von 1 : 3 passagiert und in T75-Kulturflaschen umgesetzt werden, nach einer weiteren Woche erfolgte das Überführen in T175-Kulturflaschen. Bei einer ausreichend hohen Konfluenz der Zellschicht wurden die Zellen für die Bestrahlung vorbereitet. Eine Flasche wurde dabei übriggelassen und für die Weiterkultur und übernächste Bestrahlung gesplittet. Zunächst wurden PBS und DMEM-Mix im Wasserbad erwärmt, das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen, das PBS abgesaugt und die Zellen anschließend mit 3 mL Trypsin (Raumtemperatur) für 2 - 3 min. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Mit DMEM-Mix wurde nach Kontrolle unter dem Durchlichtmikroskop die Enzymreaktion gestoppt und die Suspension dann in 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt, wobei der Inhalt mehrerer Flaschen auf möglichst wenige Röhrchen verteilt wurde. Es folgte die Zentrifugation bei  $400 \times g$  und Raumtemperatur für 5 min. Der Überstand wurde daraufhin mit einer Eppendorfpipette vorsichtig abgenommen und verworfen und die Zellpellets in 1 mL DMEM-Mix pro Zentrifugenröhrchen mittels einer Eppendorfpipette resuspendiert.

Die Suspensionen aller Röhrchen wurden dann in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und dieses mit DMEM-Mix auf 20 - 25 mL aufgefüllt. Das Zentrifugenröhrchen wurde für 2 - 3 min. im Brutschrank inkubiert und kältegeschützt zur Klinik für Strahlentherapie transportiert, wo die Bestrahlung mit 30 Gy mittels eines Linearbeschleunigers (Trilogy® System, Varian Medical Systems) erfolgte. Um die Zellen nach der Bestrahlung mit einer Dichte von ca.  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen in neue T175-Kulturflaschen aussäen zu können, wurde eine Zellzählung mittels einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.5).

Die Zellen wurden dann je nach gewünschter Dichte in neue T175-Flaschen eingesät und mit DMEM-Mix aufgefüllt, sodass ein Gesamtvolumen von 30 mL pro T175 resultierte. Es folgte die Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Am darauffolgenden Tag wurde ein neues Medium verwendet. Hierfür wurde das komplette F-Medium in der unter 8.3.3.4 beschriebenen Zusammensetzung hergestellt, im Wasserbad erwärmt und nach Absaugen des alten Mediums jeweils 30 mL in die T175-Flaschen pipettiert. Danach folgte die weitere Inkubation im Brutschrank. Die erste Ernte des Konditionierten Mediums erfolgte ca. 48 Stunden nach Zugabe des kompletten F-Mediums. Dazu wurde der Überstand, also das Konditionierte Medium, in den bestrahlten T175-Flaschen mit einer serologischen Pipette gleichmäßig auf möglichst wenige große Falcon-Tubes verteilt und bei  $1000 \times g$  für 5 min. zentrifugiert. Die Flaschen, aus denen das konditionierte Medium entnommen wurde, wurden nicht verworfen, sondern mit jeweils 30 mL komplettem F-Medium

(für die zweite Ernte) aufgefüllt und zurück in den Brutschrank gelegt. Der Überstand aus den zentrifugierten Röhren wurde dann auf den Filter einer Sterilfiltrationsflasche abgekippt. Dabei konnte pro Filter der Inhalt von ca. zwei großen Zentrifugenröhren filtriert werden, bevor der Filter aufgrund der hohen Viskosität des Konditionierten Mediums seine Filterkapazität verlor und gewechselt werden musste. Das geerntete Medium wurde dann auf 15 mL Zentrifugenröhren verteilt, die Falcons mit Parafilm abgedichtet und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert. Die zweite Ernte des Konditionierten Mediums erfolgte im Zeitfenster von 48 bis 72 Stunden nach der ersten Ernte nach dem gleichen Vorgehen.

### 3.2.3 Auftauen und Kryokonservierung von Zelllinien

Die in einem Kryoröhrchen vorliegenden gefrorenen Zelllinien wurden nach der Entnahme aus der Kühlung zügig innerhalb einer Minute unter lauwarmem fließendem Leitungswasser aufgetaut, das Kryoröhrchen wurde mit Ethanol (70 %) gesäubert und unter der Sterilwerkbank geöffnet. Die Zellsuspension wurde langsam in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 mL Kulturmedium überführt. Nach der Zentrifugation bei  $250 \times g$  für 5 min. wurde der Überstand abgenommen und das Pellet vorsichtig in 5 mL jeweiligem vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und in T25-Kulturflaschen ausgesät.

Sollten in Kultur befindliche Zellen kryokonserviert werden, so wurde das nach Trypsinierung und Zentrifugation resultierende Pellet in 1 mL des den Zelllinien entsprechenden Kryomediums in 2 mL-Kryoröhrchen zunächst bei -80 °C in einer Isopropanolbox eingefroren und meist am darauffolgenden Tag durch Mitarbeiter der zentralen Biobank bei -180 °C in Flüssigstickstoff gelagert.

### 3.2.4 Spiking-Modell für Zirkulierende Tumorzellen

Für das *Spiking*-Modell wurden 7,5 mL venöses EDTA-Vollblut eines gesunden Spenders mit einer definierten Anzahl an Zellen der humanen Zelllinie HCC4006 bzw. SW620 versetzt („gespikt“). Dies soll die im Blut von Tumorpatienten frei zirkulierenden Tumorzellen repräsentieren. Dafür wurden sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindende Zellen geerntet, in Medium aufgenommen und wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben gezählt. Anhand dieses Modells wurden dann zunächst mit 100.000 Zellen die unter 3.2.6 genannten Isolierungsmethoden getestet und die unter 3.2.10 beschriebenen Immunfluoreszenzuntersuchungen sowie die unter 3.2.8 aufgeführten Kulturversuche durchgeführt. In späteren Versuchen wurden lediglich 100 Zellen verwendet.

### 3.2.5 Zellzählung

Nach dem Lösen der Zellen aus der Kulturflasche und Resuspendieren des Pellets im entsprechenden Kulturmedium wurden jeweils 20 µL Trypan-Blau und 20 µL der Zellsuspension blasenfrei in drei *Wells* einer 96-Well-Platte gegeben und durch Auf- und Abpipetieren gut durchmischt. Aus jedem *Well* wurden dann 10 µL der Suspension in jeweils eine der beiden Kammern einer zuvor mit 70 %igem Ethanol gereinigten Neubauer-Zählkammer pipettiert. Daraufhin erfolgte die Zellzählung, wobei nur ungefärbte lebende Zellen in allen acht Großquadraten beider Kammern gezählt wurden. Die Zellzahl wurde über die folgende Formel berechnet.

$$\frac{\text{Mittelwert der Kammern}}{4} \cdot 2 \cdot 10000 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}}$$

4 = Anzahl der Großquadrate pro Kammer; 2 = Verdünnungsfaktor;

10000 = Faktor für Berechnung in mL

### 3.2.6 Isolierung von Zirkulierenden Tumorzellen aus Vollblut

Die Abnahme der klinischen Blutproben erfolgte bei den Patienten über einen venösen Zugang bzw. eine Venenpunktion mit einer 9 mL-EDTA-Monovette (Sarstedt). Die Proben wurden präoperativ genommen und maximal 24 Stunden bei 4 °C bis zur Verarbeitung gelagert. Die Proben der gesunden Spender für das *Spiking*-Modell wurden sofort nach der Blutabnahme verarbeitet. Die Isolierung von Zellen erfolgte über Anwendung des MACS-Systems (Miltenyi Biotec) und des RosetteSep™ Enrichment Cocktails (STEMCELL Technologies).

#### 3.2.6.1 Isolierung von Zirkulierenden Tumorzellen mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)

Das MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*)-System (Miltenyi Biotec) wurde nach dem Protokoll des Herstellers für die Isolierung von Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) verwendet. Es ermöglicht die Isolierung von Zellen aus einem Zellgemisch mithilfe von magnetischen *Microbeads*, an die spezifische Antikörper gekoppelt sind. Diese Isolierung kann über eine Positivselektion erfolgen, indem die gewünschten Zellen an für sie spezifische Antikörper gebunden und in einer in einem Magneten befindlichen Säule zurückgehalten werden.

In dieser Arbeit wurden die gewünschten Zellen jedoch über eine Negativselektion, das heißt durch Depletion unerwünschter Zelltypen, angereichert. Dieser Ansatz erlaubt sowohl die

Anreicherung von epithelialen CTCs als auch von EMT-Zellen, die durch Positivselektion verloren gehen, da sie die dafür verwendeten epithelialen Marker nicht konstant exprimieren. Diese Methode wurde nur für das *Spiking*-Modell angewendet.

Die Vollblutprobe (7,5 mL) wurde zunächst in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und mit 7,5 mL kaltem PBS gemischt. In ein weiteres 50 mL Zentrifugenröhrchen wurde die kalte Lymphoprep™-Lösung vorgelegt und vorsichtig mit der Blut-PBS-Mischung überschichtet, sodass diese sich nicht mit der Lymphoprep™-Phase durchmischte. Es folgte die Auftrennung der Zellsuspension anhand der Dichte mittels Zentrifugation (Hettich-Zentrifuge) mit  $800 \times g$  für 20 min. (ohne Bremse). Die obere das Plasma enthaltende Phase wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Die Interphase mit den PBMCs (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, dt. mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) inklusive der zu isolierenden CTCs wurde großzügig abpipettiert und in ein neues 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde mit kaltem PBS auf ca. 40 mL aufgefüllt, für 5 min. bei  $300 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand vollständig dekantiert.

Mit  $850 \mu\text{L}$  MACS-Puffer und  $250 \mu\text{L}$  FCR-Blocking-Reagenz wurde das Zellpellet resuspendiert und für 10 min. bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Daraufhin wurden  $250 \mu\text{L}$  CD45-Microbeads zugegeben, das Zellpellet erneut resuspendiert und für 15 min. bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Zugabe von 10 mL kaltem MACS-Puffer und Zentrifugation bei  $300 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Im nächsten Schritt wurde die LS-Säule in den QuadroMACS™ Separator eingehängt und darunter zwei 15 mL-Röhrchen pro Probe positioniert. Zunächst wurden 3 mL MACS-Puffer auf die Säule gegeben und im Röhrchen 1 wieder aufgefangen. Nun wurde das Zellpellet in  $500 \mu\text{L}$  MACS-Puffer resuspendiert, auf die Säule gegeben und im Röhrchen 2 wieder aufgefangen. Danach wurde die Säule zweimal mit 3 mL MACS-Puffer gespült. Röhrchen 2 enthielt nun CD45-negative Zellen, zu denen auch die CTCs gehören. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation für 3 min. bei  $300 \times g$  sedimentiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen.

Sollten für spätere Färbe-Versuche CD45-Zellen gewonnen werden, so wurde die Säule aus dem Magneten genommen, in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen gestellt und mit einem Stempel sowie zweimal 3 mL MACS-Puffer entleert.

Sollte anschließend die Anfertigung von Cytospins erfolgen, wurde das Zellpellet in  $400 \mu\text{L}$  MACS-Puffer ( $100 \mu\text{L}$  für jeden der vier Objektträger) resuspendiert. Für den Transfer in Chamberslides zwecks Kultivierung wurden die Zellen in dem jeweils verwendeten Medium resuspendiert.

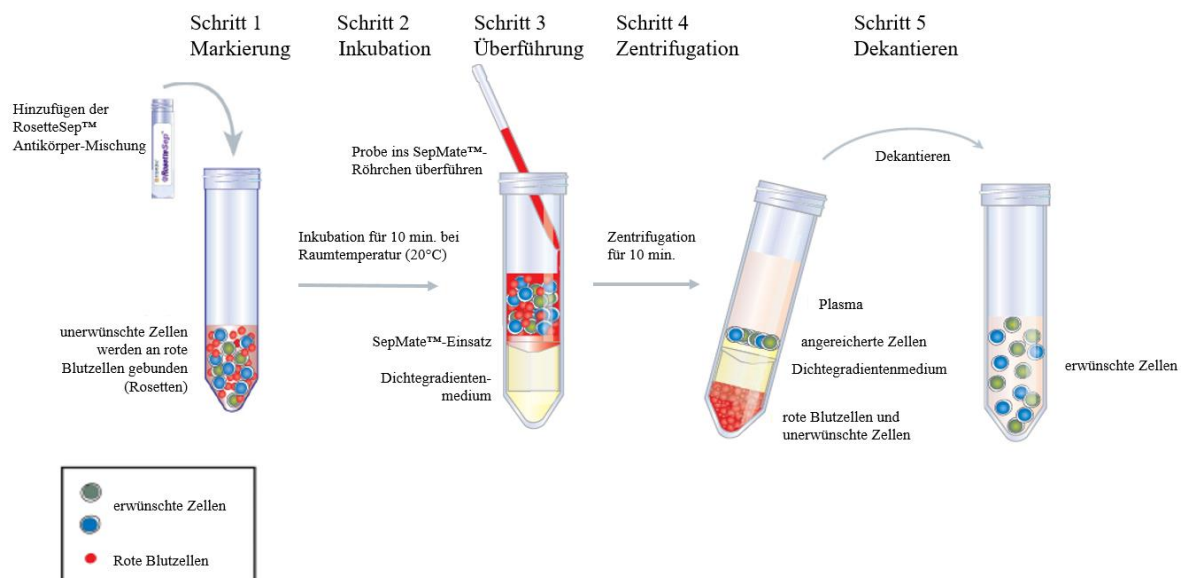
### 3.2.6.2 Isolierung von Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) mittels RosetteSep™ und SepMate™

Der RosetteSep™ CTC Enrichment Cocktail (STEMCELL Technologies) verbindet unerwünschte Zellen in humanen Vollblutproben mit Roten Blutzellen (engl. *red blood cells*, RBCs) unter Ausbildung sogenannter Immunrosetten. Dadurch wird die Dichte der unerwünschten „rosettierten“ Zellen erhöht, sodass diese zusammen mit den freien RBCs während der Zentrifugation entlang eines Dichtegradienten pelletieren. Die anzureichernden Zellen befinden sich nach der Zentrifugation in einer schmalen Schicht zwischen Plasma und Dichtegradientenmedium und können großzügig abpipettiert werden. Der Cocktail enthält eine Kombination von monoklonalen Antikörpern (Maus, Ratte), die in Tetrameren Antikörperkomplexen (engl. *Tetrameric Antibody Complexes*, TACs) gebunden sind, welche gegen Zelloberflächenantigene (CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD45, CD66b) auf humanen hämatopoetischen Zellen sowie gegen Glycophorin A auf RBCs gerichtet sind. Die Isolierung von Zellen mittels RosetteSep™ dauert insgesamt weniger als eine Stunde (Produktinformation der Firma STEMCELL Technologies, Köln).

Die SepMate™-Röhrchen versprechen ebenfalls eine schnelle Isolierung von Tumorzellen (in weniger als einer halben Stunde). Im Rahmen dieser Arbeit wurden SepMate™-Röhrchen in Kombination mit dem Cocktail verwendet. SepMate™-Röhrchen besitzen im unteren Drittel einen trichterförmigen Einsatz (engl. *Insert*) mit einer kleinen Öffnung. Durch diese Öffnung wird zunächst ein Dichtegradientenmedium pipettiert. Anschließend wird die bereits mit dem Cocktail inkubierte Blutprobe in das SepMate™-Röhrchen überführt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation befinden sich die unerwünschten Immunrosetten und das Dichtegradientenmedium unterhalb und die anzureichernden Zellen zusammen mit dem Plasma oberhalb des *Inserts*. Die gewünschten Zellen können nun zusammen mit dem Plasma in ein neues Röhrchen dekantiert werden (Produktinformation der Firma STEMCELL Technologies, Köln).

Zur Isolierung von Zellen aus klinischen Proben wurde eine Variante mit Nutzung von SepMate™-Röhrchen verwendet. Zunächst wurde sichergestellt, dass die Blutprobe, PBS + 2 % FBS, das Dichtegradientenmedium (Lymphoprep™, STEMCELL Technologies) und die Zentrifuge Raumtemperatur (15 - 25 °C) hatten. Das Vollblut (7,5 mL) wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt, mit dem RosetteSep™ Cocktail in einer Konzentration von 50 µL/mL Blut, also 375 µL pro Probe, gut durchmischt und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden 15 mL Dichtegradientenmedium

durch die Öffnung des Einsatzes im 50 mL-SepMate™-Röhrchen pipettiert. Das Vollblut wurde nach Ablauf der 10 min. in das SepMate™-Röhrchen gegeben. Es folgte die Zentrifugation in der Hettich-Zentrifuge mit  $1200 \times g$  für 10 min. (mit Bremse). Anschließend konnten die anzureichernden Zellen zusammen mit dem überständigen Plasma durch saches Abkippen in unter zwei Sekunden in ein neues Röhrchen überführt werden (Abbildung 5). Die Zellen wurden dann zweimal mit je 7,5 mL PBS + 2 % FBS bei  $200 \times g$  und  $20^\circ\text{C}$  für 3 min. gewaschen und je nach Verwendung entweder mit einem geeigneten Volumen an PBS für die Anfertigung von Cytospins aufgefüllt oder für die Kultivierung im jeweiligen Medium resuspendiert. Sollten die isolierten Zellen anschließend in Kultur genommen werden, so wurde die Suspension bereits vor dem ersten Waschen entsprechend der Anzahl der verwendeten Medien auf 15 mL-Röhrchen aufgeteilt und dann nach Protokoll mit einer angepassten Menge an Waschlösung weiter verfahren.



**Abbildung 5 – Ablauf der Zellisolierung bei Verwendung von RosetteSep™ + SepMate™** (modifiziert nach der Produktinformation der Firma STEMCELL Technologies)

### 3.2.7 Quantifizierung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode mittels immunzytochemischer Färbung

Die immunzytochemische Färbung der auf Cytospin-Objektträger aufgebrauchten Zellen erfolgte nach einem bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll. Für jede der zwei getesteten Isolierungsmethoden wurden Cytospins von drei voneinander unabhängigen Isolierungen erstellt (gesamt  $n = 6$  mit jeweils etwa 2150 gespikten Zellen pro Probe). Die Zahl von etwa 2150 gespikten Zellen wurde so gewählt, um eine möglichst hohe repräsentative Zellzahl pro Objektträger zu erhalten, die mit manuellen Methoden noch auswertbar

war. Zunächst wurden die Zellen mittels Aceton für 10 min. bei 4 °C in einer Küvette fixiert und anschließend für 10 min. in einer Küvette mit Tris-Puffer gewaschen. Die folgenden Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer und bei Raumtemperatur. Es wurden 150 µL Blocking-Lösung (5 % Rabbit Normalserum) auf den Objektträger gegeben und für 10 min. inkubiert. Es folgte ein Waschschrift in Tris-Puffer für 5 min. in einer Küvette. Daraufhin wurden 150 µL Primärantikörper-Lösung (panCytokeratin 1 : 200) auf den Objektträger gegeben und für 30 min. inkubiert. Es folgten drei Waschschrift in Tris-Tween-Puffer für jeweils 5 min. in einer Küvette. Anschließend wurden 150 µL Sekundärantikörper-Lösung (Rabbit-anti-Mouse-Antikörper 1 : 25) auf den Objektträger gegeben und für 15 min. inkubiert. Es schlossen sich erneut drei Waschschrift in Tris-Tween-Puffer für jeweils 5 min. in einer Küvette an. Danach wurden 150 µL APAAP-Lösung (1 : 25) auf den Objektträger gegeben und für 15 min. inkubiert. Nach dem Waschen mit Tris-Tween-Puffer für 5 min. folgten zwei Waschschrift mit Tris-Puffer für jeweils 5 min. in einer Küvette.

Daraufhin wurde die Substratlösung angesetzt. Hierfür wurden 3 Tropfen Fuchsin-Chromogen und 3 Tropfen Aktivierungsreagenz in das dafür vorgesehene Röhrchen gegeben und für 1 min. im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgten die Zugabe von Puffer bis zur 2 mL-Marke und die bis zu 30-minütige Inkubation im Dunkeln. Dann wurden die Objektträger aus der Küvette genommen, 150 µL Substratlösung aufpipettiert und für 15 min. im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit Tris-Puffer für 10 min. in einer Küvette wurden die Objektträger in einem Tray für 5 - 7 min. mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nach dem Waschen unter fließendem Leitungswasser für 10 min. wurden die Objektträger mit Aquatex eingedeckelt.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger mit dem *Pannoramic DESK* (3D Histech) ausgewertet. Dabei wurden die Tumorzellen und hintergründigen Leukozyten anhand der unterschiedlichen Färbungen mittels dem Programm *Case Viewer* (3D Histech) per manueller Beurteilung differenziert und quantifiziert. Weitere Hintergrundzellen waren nicht Fokus dieser Arbeit und wurden daher nicht mittels spezifischer Färbung zur Darstellung gebracht. Somit wurden diese teilweise inhomogen gefärbten Zellen, die mutmaßlich bei einer Größe bis ca. 7,5 µm als Erythrozyten zu werten waren, ausschnittsweise quantifiziert. Hierfür wurden die entsprechenden Zellen auf allen Objektträgern jeweils in einem Kreisareal mit einem Durchmesser von 420 µm (Kreisumfang 1300 µm) um das jeweilige Zentrum der Cytospins manuell gezählt (Gesamtdurchmesser Cytospin 5900 µm, Umfang 18 mm). Bei der Quantifizierung der mutmaßlichen Erythrozyten gilt jedoch zu beachten, dass diese bei der Isolierung mittels RosetteSep™ + SepMate™ visuell gut detektierbar waren, bei der

Isolierung mittels MACS jedoch aufgrund einer sehr schwachen Färbung primär über die Größe detektiert werden mussten. Insofern war eine valide Aussage hinsichtlich der Erythrozyten nicht möglich, im Rahmen dieser Arbeit auch nicht für die Fragestellung relevant.

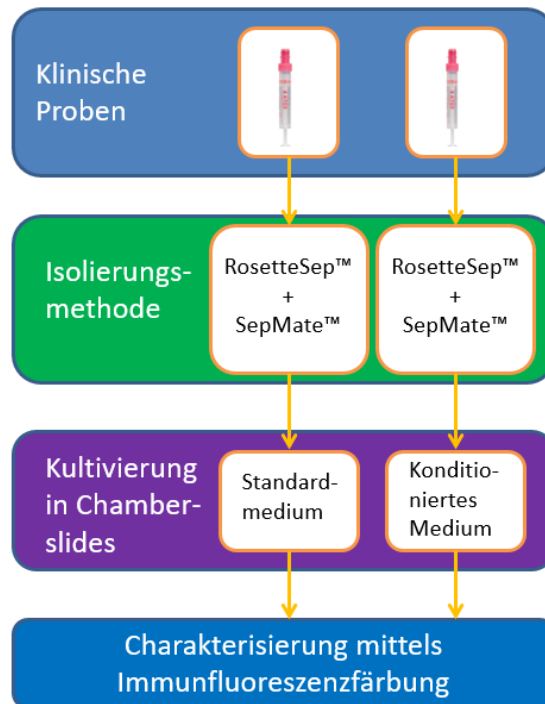
### 3.2.8 Kultivierung von Zirkulierenden Tumorzellen

#### 3.2.8.1 Kultivierung von „gespikten“ Zellen

Nachdem die in Spenderblut „gespikten“ Zellen wieder aus dem Blut isoliert worden waren, wurden sie zur Kultivierung in 4 Kammern eines 8-Kammer-Chamberslides gegeben. Eine Kammer kann ein Volumen von 0,4 mL bei einer Fläche von 0,8 cm<sup>2</sup> aufnehmen. In der ersten Woche nach Einsaat der Zellen erfolgte der Mediumwechsel (300 bis 450 µL pro Kammer) in Abhängigkeit von den hintergründig vorhandenen weißen Blutzellen meist täglich, wodurch apoptotische Zellen zügig entfernt werden sollten. Dabei wurde das verbrauchte Medium nicht mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt, sondern vorsichtig abpipettiert, um schwach anhaftende Zellen nicht zu verlieren. Das abgenommene Medium wurde zunächst in die noch leeren 4 Kammern und danach in die Wells von 24- bzw. 48-Well-Kulturplatten gegeben und auf 800 µL Medium aufgefüllt. Für die Kultivierung wurden zwei unterschiedliche Medien verwendet, deren Effektivität bzgl. des Kulturerfolges es zu vergleichen galt. Zum einen kamen die unter 3.2.1 angewendeten vom Anbieter empfohlenen Medien zum Einsatz, zum anderen ein nach Palechor-Ceron *et al.* [109] konditioniertes Medium (siehe Kapitel 8.3.3.4). Wachstum und Adhärenz der Zellen wurden zu Beginn der Kultur täglich unter dem Lichtmikroskop beurteilt und Fotos mittels einer Digitalkamera angefertigt. Erreichten die Zellen in den Chamberslides eine Konfluenz von 80 - 100 %, so erfolgte das Entfernen der Kammern (bei den unterschiedlichen Medien jeweils zum gleichen Zeitpunkt, um die Wachstumsrate in Abhängigkeit der unterschiedlichen Isolierungsmethoden vergleichen zu können) und die Färbung der Objektträger für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Bei einer hohen Konfluenz der Zellen in den 24- bzw. 48-Well-Kulturplatten erfolgte das Passagieren in T25-Kulturflaschen zur weiteren Kultivierung.

### 3.2.8.2 Kultivierung von Zellen aus klinischen Proben

Nach Testung der Isolierungsmethoden mithilfe des *Spiking*-Modells erfolgte eine Übertragung der Arbeitsschritte auf die Anwendung an klinischen Proben (Abbildung 6).



**Abbildung 6 – Übersicht der Arbeitsschritte bei Verwendung klinischer Proben.**

Für die Kultur von aus klinischen Proben isolierten nicht-hämatopoetischen Zellen einschließlich der CTCs wurden wie im *Spiking*-Modell Chamberslides mit 8 Kammern verwendet. Abweichend zum Vorgehen unter 3.2.8.1 wurden nur 8-Kammer-Chamberslides sowie 48-Well-Kulturplatten für die Kultivierung verwendet.

Da bei klinischen Proben von einer sehr geringen CTC-Zellzahl von etwa 0 bis 78 Zellen (arithmetisches Mittel etwa 20 Zellen) präoperativ pro 7,5 mL Blutprobe ausgegangen werden muss (unveröffentlichte Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe zur Quantifizierung von CTC-Zellzahlen bei 35 Lungenkarzinompatienten), wurden die nach der Isolierung vorliegenden Zellen nur in eine Kammer des Chamberslides gegeben.

Da in den verwendeten Blutproben auch CTCs mit einem mesenchymalen Phänotyp, die möglicherweise nicht oder nur schwach adhären, vorhanden sein konnten, wurde das alte Medium in den Kammern der Chamberslides beim Mediumwechsel nicht verworfen, sondern vorsichtig abpipettiert und in die noch leeren Kammern der Chamberslides bzw. in eine 48-Well-Kulturplatte gegeben.

### 3.2.9 Kultivierung von Zellen aus primärem Lungengewebe

Um die Zellen aus den Gewebeproben zu extrahieren, wurde das *Tumor Dissociation Kit* zusammen mit dem gentleMACS Dissociator (beides Miltenyi Biotec) verwendet. Hierfür wurde zunächst ein Enzym-Mix aus vorgewärmtem DMEM, Enzym H, Enzym R und Enzym A (siehe Kapitel 8.3.3.3) in einem gentleMACS C Röhrchen (Miltenyi Biotec) angesetzt. Das Gewebe wurde in eine Petrischale (8,8 cm<sup>2</sup>) gegeben, in 2 mL vorgewärmtem PBS geschwenkt und der Überstand abgesaugt. Dieser Schritt erfolgte dreimal. Dann wurden 1000 µL des Enzym-Mix auf das Gewebe gegeben und dieses mit zwei gekreuzten Skalpellern in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert. Die Suspension wurde anschließend mit einem Zellschaber vorsichtig in das gentleMACS C Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde dann im gentleMACS Dissociator positioniert (unter Sicherstellung, dass sich das Probenmaterial im Bereich des Rotors befand) und das Programm h\_tumor\_01 gestartet. Es folgte eine Inkubation des Röhrchens für 30 min. bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation.

Anschließend durchlief das Röhrchen das Programm h\_tumor\_02 im gentleMACS Dissociator, wonach erneut eine 30-minütige Inkubation folgte. Daraufhin wurde erneut das Programm h\_tumor\_02 ausgeführt. Die Suspension aus dem gentleMACS C Röhrchen wurde dann durch einen auf einem 50 mL Zentrifugenröhrchen positionierten MACS SmartStrainer (70 µm; Miltenyi Biotec) gegeben und der Strainer mit 20 mL DMEM gespült. Es folgte eine Zentrifugation mit  $300 \times g$  für 7 min. und das Dekantieren des Überstandes. Das Pellet wurde dann in Konditioniertem Medium mit Zusätzen und Amphotericin B (20 µL) resuspendiert und die Suspension in einer T25-Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach einer Woche erfolgte der erste Mediumwechsel.

Im Folgenden erfolgte der Mediumwechsel zweimal pro Woche. Hatten die Zellen eine Konfluenz von über 80 % erreicht, wurden sie passagiert. Hierfür wurden der Zelllayer mit 5 mL vorgewärmtem PBS gewaschen und die Zellen mit 2 mL Trypsin unter leichtem Klopfen aus der Zellkulturflasche gelöst. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 4 mL DMEM-Mix abgestoppt und die Zellsuspension im gewünschten Verhältnis in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation mit  $125 \times g$  für 5 min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde in 5 mL Konditioniertem Medium resuspendiert, in eine neue T25-Zellkulturflasche gegeben und weiterkultiviert.

Sollte ein Teil der aus der Kulturflasche gelösten Zellen kryokonserviert werden, so wurde das Pellet im entsprechenden Kryomedium (siehe Kapitel 8.3.3.4) resuspendiert und in 2 mL Kryokonservierungsröhrchen gegeben.

### 3.2.10 Charakterisierung von Tumorzellen

#### 3.2.10.1 Anfertigung von Cytospins zur Fixierung der Zellen

Zur Beurteilung der Anzahl isolierter Tumorzellen und des Detektionserfolgs von CTCs mittels Immunfluoreszenz wurden für die im *Spiking*-Modell über MACS oder RosetteSep™ isolierten Zellen Cytospins angefertigt. Pro Probe wurden vier Objektträger vorbereitet, zur bedruckten Seite (weißer Ring) mit einer Filterauflage und einem Plastiktrichter ergänzt, unter Sicherstellung der Deckungsgleichheit der Lochöffnungen in eine Metallklemme eingespannt und in die Cytospin-Zentrifuge eingesetzt. Diese Anzahl an Objektträgern pro Probe wurde gewählt, um eine optimale Zelldichte für die anschließende Analyse zu erhalten. War jedoch absehbar, dass ein großes für die Cytospins zu suspendierendes Zellpellet eine zu hohe Zelldichte aufwies, so wurde die Anzahl an Objektträgern dementsprechend angepasst. In jeden der Trichter wurden 100 µL an Zellsuspension mit den darin mutmaßlich enthaltenen CTCs gegeben und die Zellen durch Zentrifugation ( $500 \times g$  für 5 min.) auf den Objektträgern fixiert. Anschließend wurden die Filterauflagen vorsichtig entfernt und die Objektträger bis zur Weiterverarbeitung mindestens 24 Stunden lichtgeschützt getrocknet.

#### 3.2.10.2 Charakterisierung der Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Charakterisierung der nicht-hämatopoetischen Zellen einschließlich der Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) auf den Cytospin-Objektträgern nach der Isolierung sowie auf den Chamberslides nach der Kultivierung (nach Abnahme des Mediums und kurzem Trocknen) wurden diese mit Antikörpern inkubiert und unter dem Immunfluoreszenzmikroskop analysiert. Die Mikroskopie der Slides erfolgte ab einer Stunde nach dem Eindeckeln. Für die Fixierung und Färbung wurde nach einem etablierten Protokoll vorgegangen und dieses optimiert (Tabelle 4). Statt des *Reagent alcohol* wurde zur Fixierung der Zellen Aceton verwendet, da dieses eine kürzere Einwirkzeit benötigt sowie nach Erfahrungsberichten aus der Arbeitsgruppe die Lymphozyten weniger schädigt. Alle Arbeitsschritte erfolgten dabei bei Raumtemperatur, die Inkubationen in einer feuchten Kammer. Die auf die Objektträger aufgebrachten CTCs wurden zunächst für 10 min. in einer Küvette mit Aceton fixiert und danach mit 1x PBS für 5 min. gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen der Antikörper wurde eine Blocking-Lösung (siehe Kapitel 8.3.3.2) für 30 min. hinzugegeben. Es folgten fünf Waschschrte mit je 1x PBS-T für jeweils 2 min. (Tabelle 4).

Tabelle 4 – Vergleich der Immunfluoreszenz-Färbeprotokolle

| Arbeitsschritt             | vorliegendes Protokoll           |            | optimiertes Protokoll                              |            |
|----------------------------|----------------------------------|------------|--|------------|
| <b>Fixierung</b>           | Reagent alcohol                  | 30 min.    | Aceton   | 10 min.    |
| <b>Waschen</b>             | 1x PBS                           | 5 min.     | 1x PBS   | 5 min.     |
| <b>Blocken</b>             | PBS + BSA + FcR-Blocking-Reagenz | 30 min.    | PBS + 5 % Maus Normal Serum + FcR-Blocking-Reagenz | 30 min.    |
| <b>Waschen</b>             | 1x PBS-Tween                     | 5 x 2 min. | 1x PBS-Tween                                       | 5 x 2 min. |
| weitere Schritte identisch |                                  |            |  |            |

Für die folgenden Schritte wurde die feuchte Kammer während der Inkubation mit einem Tuch und die Küvette zum Waschen mit Alufolie abgedeckt, um ein lichtbedingtes Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden. Als Nächstes folgte die getrennte Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern. Zunächst wurden für Cytospins 200 µL bzw. für Chamberslides 80 µL pro Kammerfeld des anti-CD45-Antikörpers (1 : 30 verdünnt in Antibody-Diluent, Dako) aufgetragen und für 45 min. inkubiert. Dieser Antikörper markiert die weißen Blutzellen, denen gemein ist, dass sie CD45 als Oberflächenantigen exprimieren. Nach fünf Waschschritten mit je 1x PBS-T für jeweils 2 min. folgte die Inkubation des anti-panCytokeratin-AE1/AE3-Antikörpers (1 : 200 verdünnt in Antibody-Diluent, Dako) in identischer Menge für weitere 45 min. Dem schlossen sich wieder fünf Waschschrritte mit PBS-T für jeweils 2 min. an. Abschließend wurden die gefärbten Zellen mit Vectamount/DAPI (Vector Laboratories) eingedeckelt und für 30 min. bei -20 °C inkubiert. Danach konnte die Beurteilung mittels Immunfluoreszenzmikroskop erfolgen.

Bei der Immunfluoreszenzmikroskopie macht man sich zunutze, dass unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorophore) durch Bestrahlung mit Licht einer für diesen Farbstoff spezifischen Wellenlänge angeregt werden. Kehrt dieser in seinen energetischen Grundzustand zurück, gibt er die ihm zuvor zugeführte Energie unter Emission von Photonen wieder ab.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das digitale Fluoreszenzmikroskop Biorevo BZ-9000 (Firma Keyence) verwendet, wobei die spezifische Anregung der Fluorophore mittels einer Quecksilberlampe unter Einsatz der in Tabelle 5 aufgeführten Filter erfolgte.

Für die Beurteilung der Präparate wurden die Vergrößerungen 20x und 40x (ohne Immersionsöl) gewählt. Die Dokumentation der Fluoreszenzsignale erfolgte mittels einer CCD-Kamera als monochrome Bilder und die nachträgliche kanalspezifische Einfärbung

nach den vom Nutzer gewählten Einstellungen durch das Programm *BZ Viewer*. Die Bilder wurden anschließend mit dem Programm *BZ Analyzer* bearbeitet.

**Tabelle 5 – Übersicht der verwendeten Filter und Wellenlängen für die Immunfluoreszenzmikroskopie**

| Bezeichnung des Filters                        | Exzitationswellenlänge in nm | Absorptionswellenlänge in nm | Wellenlänge des dichroitischen Spiegels in nm |
|--|------------------------------|------------------------------|---|
| OP 79304 SB-Filter<br>DAPI-BP                  | 377 / 50                     | 447 / 60                     | 409   |
| OP 79301 SB-Filter<br>GFP-BP, AlexaFluor®488   | 472,5 / 30                   | 520 / 35                     | 495   |
| OP 79302 SB-Filter<br>TexasRed, AlexaFluor®594 | 562 / 40                     | 624 / 40                     | 593   |

### 3.2.10.3 Differenzierung zwischen epithelialen Zellen und Fibroblasten

Um zu überprüfen, ob die im Vergleich zur Ursprungszelle veränderte Morphologie der im Konditionierten Medium gewachsenen Zellen durch eine Verunreinigung mit Fibroblasten bedingt war, wurden die Zellsuspension mithilfe der MACS-Methode unter Anwendung von Anti-Fibroblasten-Beads (Miltenyi Biotec) von potentiell vorhandenen Fibroblasten befreit. Das Prinzip der Methode wurde bereits unter Punkt 3.2.6.1 beschrieben.

Nachdem die Zellen aus der Zellkulturflasche gelöst worden waren und nach der Zentrifugation als Pellet vorlagen, wurde dieses in 80 µL MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 20 µL Anti-Fibroblasten-Microbeads pro  $10^7$  Zellen hinzugegeben, die Probe gut durchmischt und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 2 mL Puffer pro  $10^7$  Zellen bei  $300 \times g$  für 10 min. gewaschen und der Überstand vollständig abgenommen. Das Zellpellet wurde dann in 500 µL Puffer resuspendiert. Es folgten das Einhängen der LS-Säule in den QuadroMACS™ Separator (Miltenyi Biotec) sowie das Befeuchten der Säule mit 3 mL Puffer. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben, die Säule zweimal mit je 3 mL Puffer gespült und das Eluat in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Nach der Zentrifugation bei  $200 \times g$  für 4 min. und Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet im vorgewärmten Medium resuspendiert und für die Weiterkultivierung in eine Zellkulturflasche gegeben.

### 3.2.11 Statistik

Die Daten zur Quantifizierung der Zellen mittels Immunzytochemie und Charakterisierung mittels Immunfluoreszenz sowie aus den Zellkulturversuchen wurden mithilfe der Programme *SPSS Statistics* (Version 26) sowie *GraphPad Prism 9* (Version 9.3.1) analysiert und visualisiert.

Zur Beurteilung der Effizienz der einzelnen Isolierungsmethoden wurden die Zellen aus den immunzytochemischen Färbungen zunächst manuell quantifiziert und die Daten mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Anschließend erfolgte die Anwendung des gepaarten t-Tests (siehe Kapitel 4.1.2.1 und Tabelle 6).

Die Zellzahlen während der Kulturversuche wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Medium und der Kultivierungszeit ebenfalls manuell ermittelt und graphisch dargestellt (siehe Kapitel 4.1.4). Zur besseren Visualisierung der Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte zudem die Darstellung der *Area under the curve*. Eine Normalverteilung war bei diesen Daten nicht gegeben, sodass keine parametrischen Tests angewendet werden konnten. Eine Anwendung nicht-parametrischer Tests ergab ebenfalls keine validen Ergebnisse, sodass vornehmlich eine deskriptive Betrachtung der Daten erfolgte.

Darüber hinaus wurden die mittels Immunfluoreszenz analysierten Zellen in Abhängigkeit vom zuvor verwendeten Kulturmedium sowie der Isolierungsmethode manuell vermessen und hinsichtlich ihrer Morphologie und der Anzahl an Zellkernen beurteilt. Hierfür wurden als Parameter der jeweils kleinste sowie größte Zelldurchmesser, die Kerngröße sowie das Vorhandensein zytoplasmatischer Ausläufer ermittelt. Es erfolgte die Bestimmung der arithmetischen Mittelwerte, der Mediane sowie der Minima und Maxima. Die Werte wurden anschließend graphisch als Boxplots bzw. Balkendiagramme dargestellt (siehe Kapitel 4.3.2). Um signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zellmorphologie in Abhängigkeit vom verwendeten Medium und der Isolierungsmethode zu detektieren, wurden die Daten bei fehlendem Vorliegen einer Normalverteilung (Prüfung mittels Anderson-Darling-, D'Agostino & Pearson-, Shapiro-Wilk- sowie Kolmogorov-Smirnov-Test) mittels dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischen Test und dem Dunn's multiple comparisons-Test ausgewertet. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden bei allen Analysen als statistisch signifikant angesehen.

## 4 ERGEBNISSE

Um die Etablierung einer optimalen Diagnostik und im Verlauf auch therapeutischer Optionen für Patienten mit Krebserkrankungen zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit nicht-hämatopoetische Zellen einschließlich Zirkulierender Tumorzellen zunächst aus dem Patientenblut isoliert und im Verlauf in spezielle Nährmedien gegeben, um sie zu vervielfältigen (Kultivierung), sodass eine weiterführende Charakterisierung ermöglicht werden konnte.

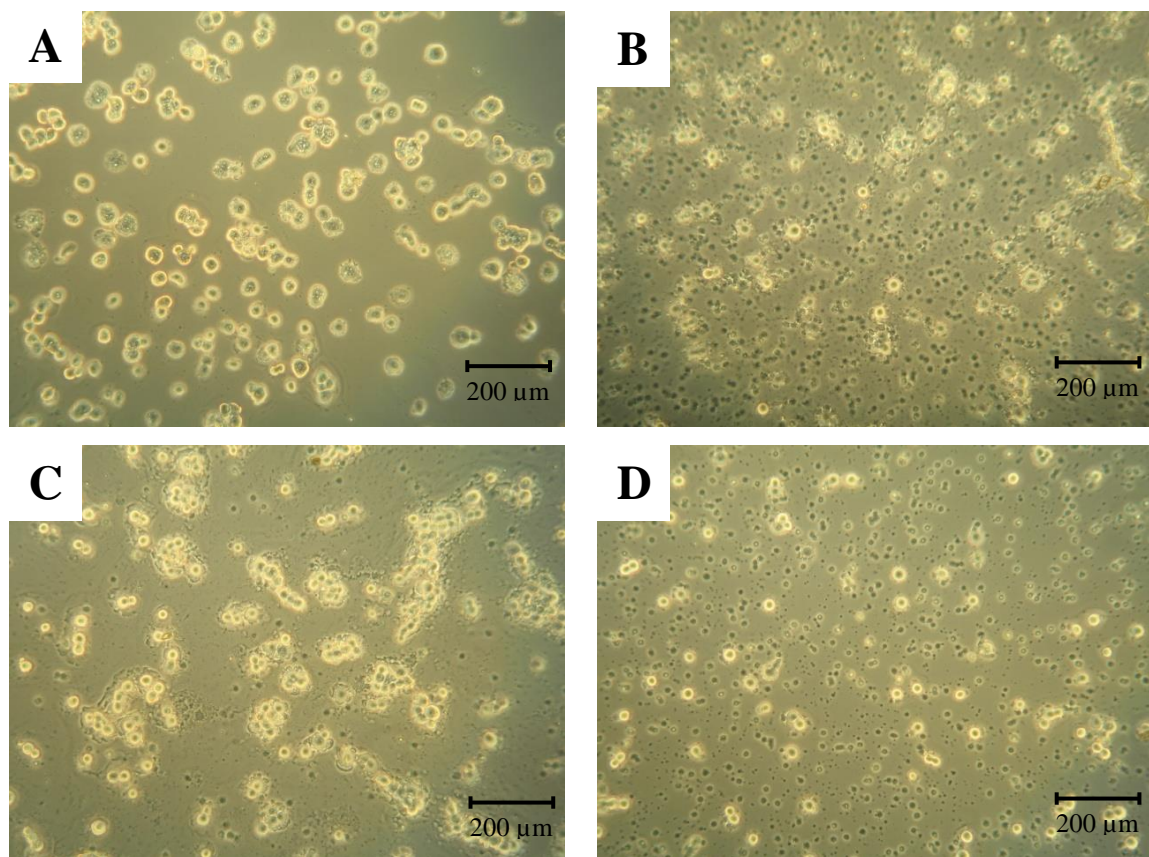
### 4.1 ISOLIERUNG, KULTIVIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON TUMORZELLEN MIT HILFE EINES SPIKING-MODELLS

Um perspektivisch maligne Zellen von Tumorkranken diagnostisch analysieren zu können, sind effektive Methoden zur Isolierung dieser Zellen aus Patientenblut zu identifizieren bzw. etablieren. In dieser Arbeit wurden zwei Methoden verwendet, die die zu detektierenden Zellen durch eine Depletion der unerwünschten Zellen möglichst wenig direkt beeinflussen, um anschließend Versuche zur Kultivierung und Charakterisierung unabhängig von etwaigen Antikörperbindungen als Störfaktor durchführen zu können. Die MACS-Methode war dabei in der Arbeitsgruppe bereits gut etabliert und lieferte verlässliche Ergebnisse. Das RosetteSep™-Verfahren wurde gewählt, da es keine mechanische Beeinflussung und eine noch bessere Reinheit der Zellen sowie eine einfachere Handhabung mit deutlich geringeren *Hands-on-Zeiten* versprach. Um die zwei Methoden zur Isolierung von nicht-hämatopoetischen Zellen einschließlich CTCs quantitativ und qualitativ vergleichen zu können, wurde auf ein sogenanntes *Spiking-Modell* zurückgegriffen. Dazu wurden Vollblutproben von gesunden Spendern mit einer definierten Anzahl an Zellen einer Tumorzelllinie gespikt (engl.: *to spike*) und die Tumorzellen anschließend wieder isoliert. Die isolierten Zellen wurden zur Beurteilung auf Cytospins aufgetragen oder in Kultur genommen und mittels Immunfluoreszenz und Immunzytochemie charakterisiert (vgl. Abbildung 4).

#### 4.1.1 Vergleich unterschiedlicher Säulen für das MACS-System

Da für die Verwendung des MACS-Systems unterschiedliche Säulen durch den Hersteller angeboten werden, wurde zunächst ein Versuch durchgeführt, der den Säulentyp mit der besten Isolierungskapazität sowie mit dem geringsten Hintergrund nach Isolierung identifizieren sollte. Hierfür wurden anhand des *Spiking-Modells* mit HCC4006-Zellen MS-Säulen (Kapazität für markierte Zellen  $1 \times 10^7$ ) einmal bzw. zweimal hintereinander und LS-Säulen (Kapazität für markierte Zellen  $1 \times 10^8$ ) getestet und die Zelldichte sowie der Hintergrund auf den nach der Isolierung angefertigten Cytospin-Objektträger lichtmikroskopisch beurteilt. Hinsichtlich der eingesetzten Konzentrationen zeigte sich, dass eine leichte Erhöhung der

im Herstellerprotokoll angegeben Werte (850  $\mu$ L, 250  $\mu$ L FcR-Blocking-Reagenz und 250  $\mu$ L CD45-Microbeads) bei allen Säulen zu geringerem Hintergrund aus weißen Blutzellen führte. Beim Vergleich der Säulen untereinander wurde der geringste Hintergrund nach Verwendung der LS-Säulen beobachtet. Bezüglich der Zelldichte der zu isolierenden Tumorzellen zeigte sich in der lichtmikroskopischen Auswertung ebenfalls ein Vorteil der LS-Säulen (Abbildung 7). Exemplarisch ergaben sich in der quantitativen Auswertung der zu isolierenden Zellen bzw. hintergründigen Leukozyten 238 bzw. 50 für die LS-Säule, 88 bzw. > 500 für 1x MS-Säule und 80 bzw. > 300 für 2x MS-Säule.

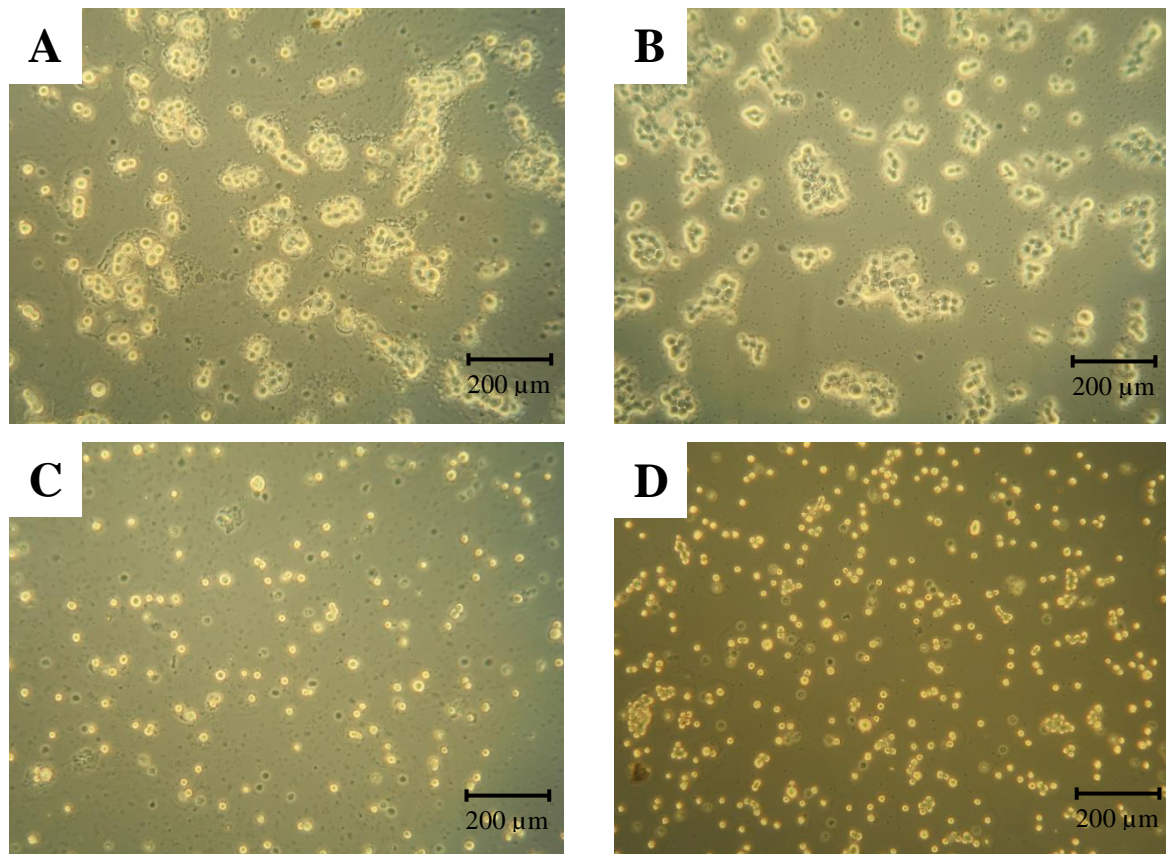


**Abbildung 7 – Lichtmikroskopischer Vergleich von Zelldichte und Zellhintergrund.** Tumorzellen der Zelllinie HCC4006 auf Cytospin-Objektträgern nach Isolierung mittels unterschiedlicher MACS-Säulen. A: Reine Zelllinie (zum Vergleich), B: 1x MS-Säule, C: 1x LS-Säule, D: 2x MS-Säule. Abbildungen zeigen repräsentative Bilder von drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Da die LS-Säulen bei Vorteilen hinsichtlich der Tumorzelldichte zudem die wenigsten weißen Blutzellen im Hintergrund aufwiesen und damit eine möglichst gute Reinheit der Kultur versprachen, wurden die folgenden Versuche ausschließlich mit LS-Säulen durchgeführt.

#### 4.1.2 Vergleich der Isolierungsmethoden MACS und RosetteSep™

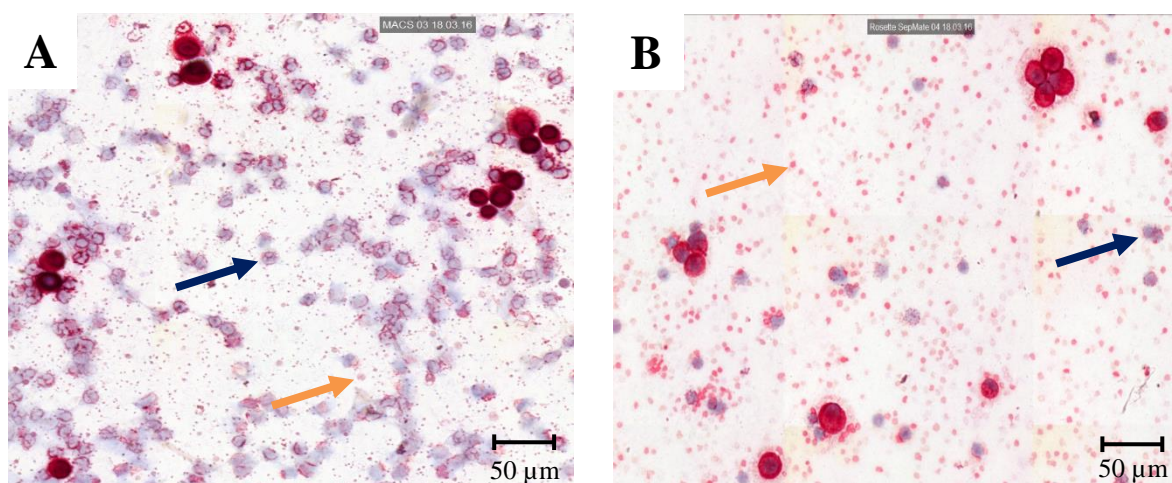
Bei den Versuchen zum Vergleich der Isolierungsmethoden MACS (CD45-Negativselektion; LS-Säulen) und RosetteSep™ wurden ebenfalls HCC4006-Zellen sowie zur Validierung weiterhin SW620-Zellen in Spenderblut gegeben und anschließend wieder isoliert. Die isolierten Zellen wurden auf Cytospin-Objektträger aufgebracht und lichtmikroskopisch beurteilt. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den zwei verschiedenen Isolierungsmethoden. Die Verwendung von RosetteSep™ + SepMate™ resultierte generell in einem sehr geringen Hintergrund anderer hämatopoetischer Zellen (vgl. Quantifizierung in 4.1.2.1). Dabei war lichtmikroskopisch auch eine höhere Zelldichte im Vergleich zur Verwendung der MACS-Methode erkennbar (Abbildung 8).



**Abbildung 8 – Vergleich der Isolierungsmethoden MACS und RosetteSep™ + SepMate™ hinsichtlich Zelldichte und Zellhintergrund.** In Spenderblut eingebrachte Zelllinienzellen wurden mit MACS oder RosetteSep™ + SepMate™ isoliert und mittels Cytospin auf Objektträger aufgebracht. A: HCC4006-Zellen, MACS (1x LS-Säule), B: HCC4006-Zellen, RosetteSep™ + SepMate™, C: SW620-Zellen, MACS (1x LS-Säule), D: SW620-Zellen, RosetteSep™ + SepMate™. Abbildungen zeigen repräsentative Bilder voneinander unabhängiger Versuche.

#### 4.1.2.1 Beurteilung der Effektivität der Isolierungsmethoden mittels Immunzytochemie

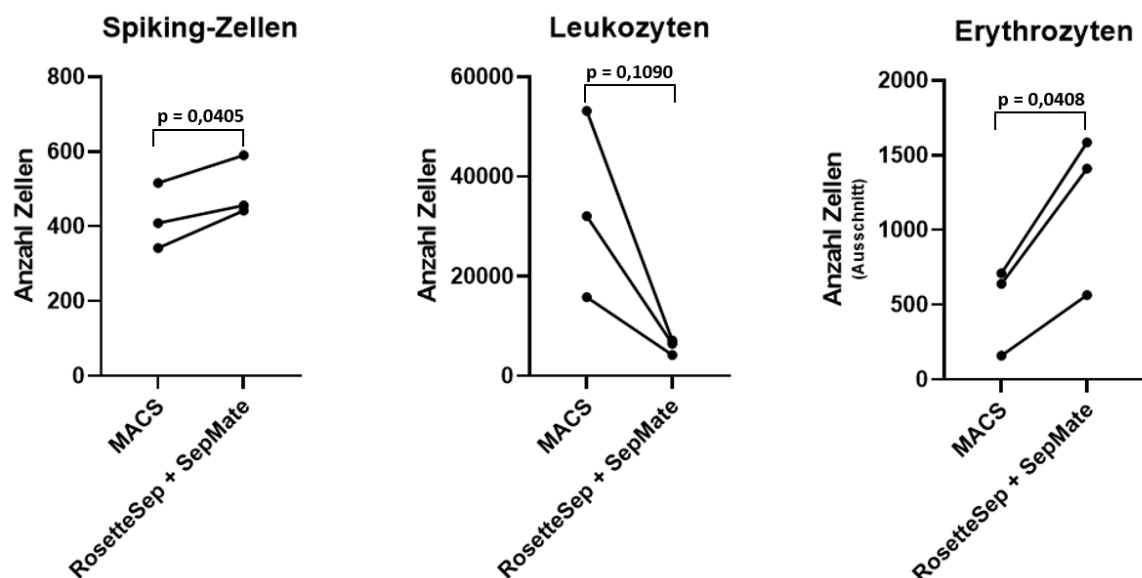
Zur Bestätigung, dass es sich bei den isolierten Zellen um Tumorzellen handelt, wurden ergänzend zur lichtmikroskopischen Auswertung immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Dazu wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchen Zellen der Lungenmetastasen-Zelllinie HCC4006 in Spendervollblut gegeben und unter Anwendung des MACS-Systems bzw. von RosetteSep™ + SepMate™ wieder isoliert. Die isolierten Zellen wurden auf Cytospins aufgebracht und die Tumorzellen mittels eines anti-panCytokeratin-Antikörpers (Klon: AE1/AE3) visualisiert (Abbildung 9). Eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurde zur Darstellung der hintergründigen Blutzellen durchgeführt. Insgesamt wurden somit Zellen auf 24 Cytospin-Objektträgern (aus jeweils 3 Versuchswiederholungen pro Isolierungsmethode) quantifiziert. Wie auf den Abbildungen zu erkennen, sind nach der Isolierung mittels MACS viele hintergründige weiße Blutzellen (violett, beispielhaft mit blauem Pfeil markiert) vorhanden, während diese bei der Isolierung mittels RosetteSep™ + SepMate™ nur vereinzelt zu sehen sind. Mit der Zahl der hintergründigen Erythrozyten verhält es sich umgekehrt, wobei diese für die Auswahl der Isolierungsmethode nicht berücksichtigt wurden, da in der Literatur bisher keine Hinweise dazu vorliegen, dass Erythrozyten eine tumorizide Funktion besitzen. Die Auszählung der panCytokeratin positiven (roten) Zellen ergab, dass im Mittel die meisten Zellen mittels RosetteSep™ + SepMate™ isoliert wurden. Im Vergleich zum MACS-System wurden mittels RosetteSep™ + SepMate™ mehr Zellen isoliert, zudem zeigte sich ein geringerer Hintergrund an Leukozyten. Insgesamt wurde ca. ein Fünftel der „gespikten“ Zellen nach Isolation wieder detektiert (Tabelle 6 und Abbildung 10).



**Abbildung 9 – Immunzytochemische Färbung der isolierten Zellen.** Cytospins wurden mittels eines anti-panCytokeratin-Antikörpers (Klon: AE1/AE3, rot) und Hämatoxylin (violett) gefärbt. A: MACS, B: RosetteSep™ + SepMate™. Blauer Pfeil: Leukozyt; Oranger Pfeil: Erythrozyt.

Tabelle 6 – Effektivität der verwendeten Isolierungsmethoden hinsichtlich der Zellzahl

| Methode                       | Zellzahl Isolierung 1 | Zellzahl Isolierung 2 | Zellzahl Isolierung 3 | Zellzahl Gesamt | Zellzahl Arithmetisches Mittel | Arithmetisches Mittel Anteil an Spiking-Zahl |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|--------------------------------|--|
| <b>MACS</b>                   |                       |                       |                       |                 |                                |  |
| Spiking-Zellen                | 342                   | 409                   | 516                   | 1267            | 422,33                         | 19,6 %                                       |
| Leukozyten                    | 15824                 | 53179                 | 32095                 | 101098          | 33699                          | n.a.   |
| Erythrozyten (Ausschnitt)     | 640                   | 710                   | 160                   | 1510            | 503                            | n.a.   |
| <b>RosetteSep™ + SepMate™</b> |                       |                       |                       |                 |                                |  |
| Spiking-Zellen                | 442                   | 456                   | 590                   | 1488            | 496                            | 23,1 %                                       |
| Leukozyten                    | 4215                  | 7117                  | 6463                  | 17795           | 5932                           | n.a.   |
| Erythrozyten (Ausschnitt)     | 1410                  | 1585                  | 565                   | 3560            | 1187                           | n.a.   |



**Abbildung 10 – Effektivität der verwendeten Isolierungsmethoden im Hinblick auf die Isolierung von Spiking-Zellen und Verunreinigung durch Blutzellen.** HCC4006-Zellen wurden in 7,5 mL Spenderblut gegeben und mittels MACS oder RosetteSep™ + SepMate™ wieder isoliert. Die Anzahl isolierter HCC4006 sowie im Hintergrund befindlicher Leukozyten und Erythrozyten wurden ausgezählt. Dargestellt sind die Werte von n = 3 unabhängigen Versuchen. P-Werte wurden nach Prüfung auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) mittels gepaartem t-Test ermittelt.

Nach Bestätigung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test zeigte sich, dass hinsichtlich der *Spiking*-Zellen mittels RosetteSep™ + SepMate™ (MW = 496,0; SD = 81,71) signifikant mehr Zellen als mittels MACS (MW = 422,3; SD = 87,76) isoliert werden konnten (gepaarter t-Test,  $t(2) = 4,815$ ,  $p = 0,0405$ ).

Weiterhin zeigten sich durch Verwendung von RosetteSep™ + SepMate™ (MW = 1187; SD = 545,4) im Vergleich zur Verwendung von MACS (MW = 503,3; SD = 299,4) signifikant mehr hintergründige Erythrozyten (gepaarter t-Test,  $t(2) = 4,798$ ,  $p = 0,0408$ ).

Hinsichtlich der hintergründigen Leukozyten ergab sich kein signifikanter Unterschied (gepaarter t-Test,  $t(2) = 2,776$ ,  $p = 0,1090$ ) zwischen der Verwendung von RosetteSep™ + SepMate™ (MW = 5932; SD = 1522) und MACS (MW = 33699; SD = 18729), es war jedoch ein Trend bezüglich einer geringeren Anzahl an Leukozyten nach Verwendung von RosetteSep™ + SepMate™ zu beobachten.

#### 4.1.2.2 Übersicht Vor- und Nachteile der verwendeten Isolierungsmethoden

Ein Vergleich der Isolierungsmethoden MACS und RosetteSep™ + SepMate™ mit ihren spezifischen Vor- und Nachteilen ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

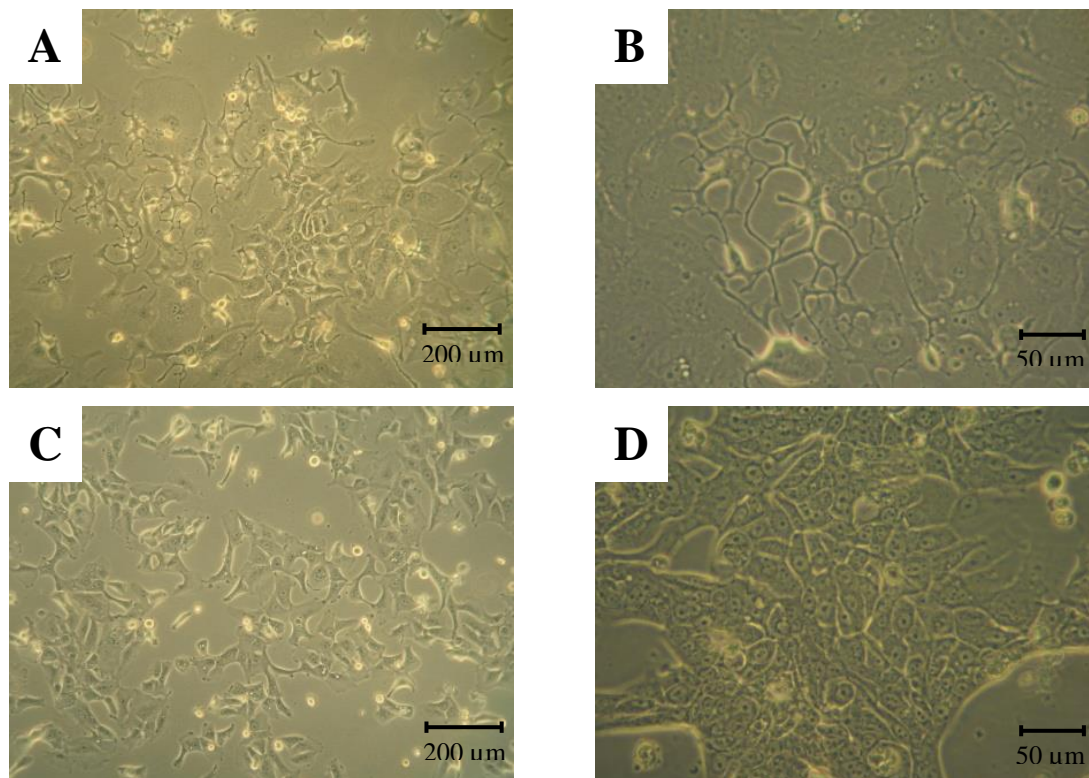
Es zeigte sich insbesondere, dass durch die Anwendung des RosetteSep™-Verfahrens im Vergleich zum MACS weniger als die Hälfte an Zeit bis zum Vorliegen des Zellpellets benötigt wird und bei einfacherer Handhabung sowie geringerem Materialeinsatz eine tendenziell höhere Reinheit (bzgl. der Leukozyten) der isolierten Zellen resultiert.

**Tabelle 7 – Vergleich der Isolierungsmethoden MACS und RosetteSep™ + SepMate™ hinsichtlich der Effizienz**

|   | <b>MACS</b>  | <b>RosetteSep™<br/>+ SepMate™</b>  |
|---|--|--|
| <b>benötigte spezifische Materialien</b>  | Säulen, Microbeads, FcR-Blocking-Reagenz, Magnet, MACS-Puffer  | RosetteSep™-Cocktail, SepMate™-Röhrchen  |
| <b>Hands-on-Zeiten</b>  | ca. 1 h  | ca. 10 min.  |
| <b>Hands-off-Zeiten</b>   | - 20 min. Zentrifugation<br>- 5 min. Zentrifugation<br>- 10 min. Inkubation<br>- 15 min. Inkubation<br>- 5 min. Säulen spülen<br>- 5 min. Waschen<br>= ca. 60 min. | - 10 min. Inkubation<br>- 10 min. Zentrifugation<br>- 10 min. Waschen<br>= ca. 30 min. |
| <b>Gesamtzeit</b><br>(bis Vorliegen des Zellpellets)                                | ca. 2 h  | ca. 40 min.  |
| <b>Kosten pro Probe</b>   | ca. 67 € (ohne Magnet)   | ca. 75 €   |
| <b>Vorteile (+) / Nachteile (-)</b>   |  |  |
| - wenige Pipettierschritte  | nein -   | ja +   |
| - wenig Hintergrund aus unerwünschten Zellen, höhere Reinheit der isolierten Zellen | nein -   | ja +   |
| - mechanische Beeinflussung durch Magnete, Säulen, Filter                           | ja -   | nein +   |
| - Zellaktivierung   | höher -  | geringer +   |
| - Zeitaufwand   | höher -  | geringer +   |
| - Abpipettieren aus Plasma-Interphase nötig (Gefahr von Zellverlust)                | ja -   | nein +   |
| - höhere Vergleichbarkeit unter mehreren Anwendern                                  | nein -   | ja +   |
| - individuelle Antikörper verwendbar  | ja +   | nein -<br>(definierter Cocktail)   |
| - CD45-Zellen können zusätzlich isoliert werden                                     | ja +   | nein -   |

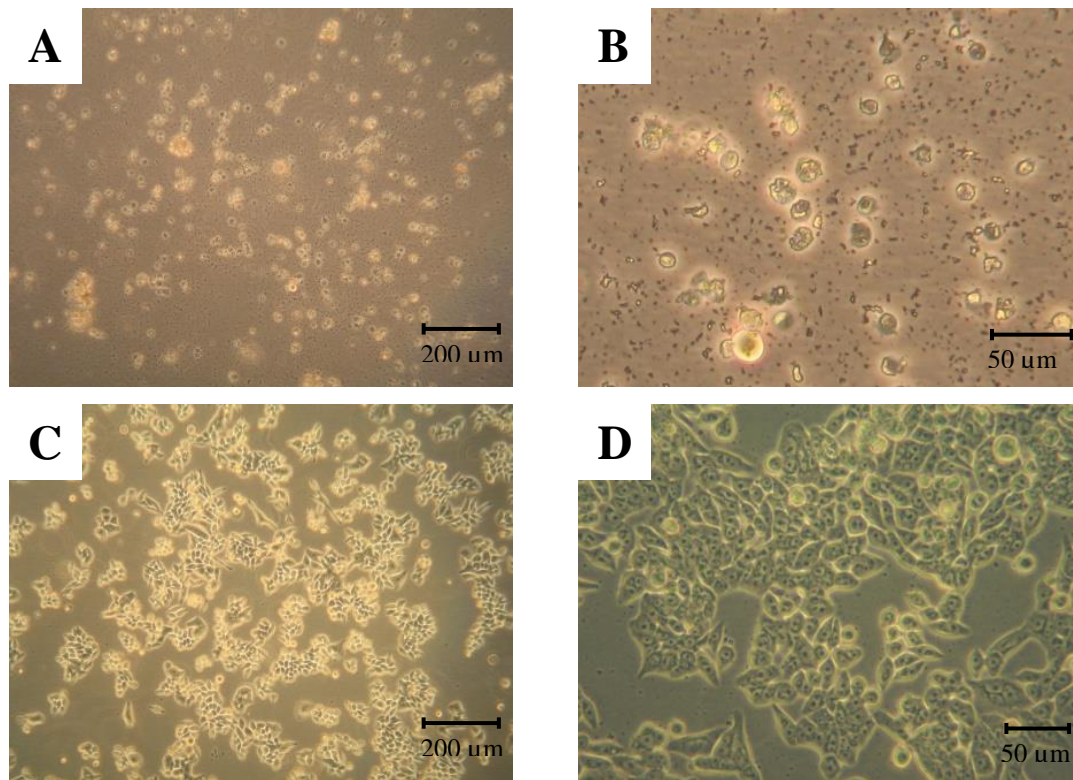
#### 4.1.3 Anwendbarkeit von Konditioniertem Medium zur Kultivierung von Tumorzelllinien

Um das Wachstum der im *Spiking*-Modell genutzten Zelllinien (HCC4006, SW620) in Konditioniertem Medium zu testen, wurden diese parallel in ihrem jeweiligen Standardmedium und in Konditioniertem Medium kultiviert. Hierbei zeigte sich, dass HCC4006-Zellen in Konditioniertem Medium kultivierbar waren und mehrmals passagiert werden konnten (Abbildung 11). Interessanterweise zeigten die HCC4006-Zellen in Konditioniertem Medium eine veränderte Morphologie. Sie bildeten u. a. längere Ausläufer aus.



**Abbildung 11 – Zellmorphologie in Abhängigkeit vom verwendeten Medium bei HCC4006-Zellen.** A und B: Konditioniertes Medium, C und D: Standardmedium.

Aufgrund der erfolgreichen Kultivierbarkeit der HCC4006-Zellen in Konditioniertem Medium wurde zur weiteren Validierung auch die Kultivierbarkeit von SW620-Zellen in Konditioniertem Medium getestet. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen bereits innerhalb der ersten drei Tage nach Zugabe des Mediums begannen, sich vom Boden der Kulturflasche zu lösen und zu fragmentieren (Abbildung 12). Entsprechend konnte keine sinnhafte Quantifizierung dieser Zellen in Kultur erfolgen.

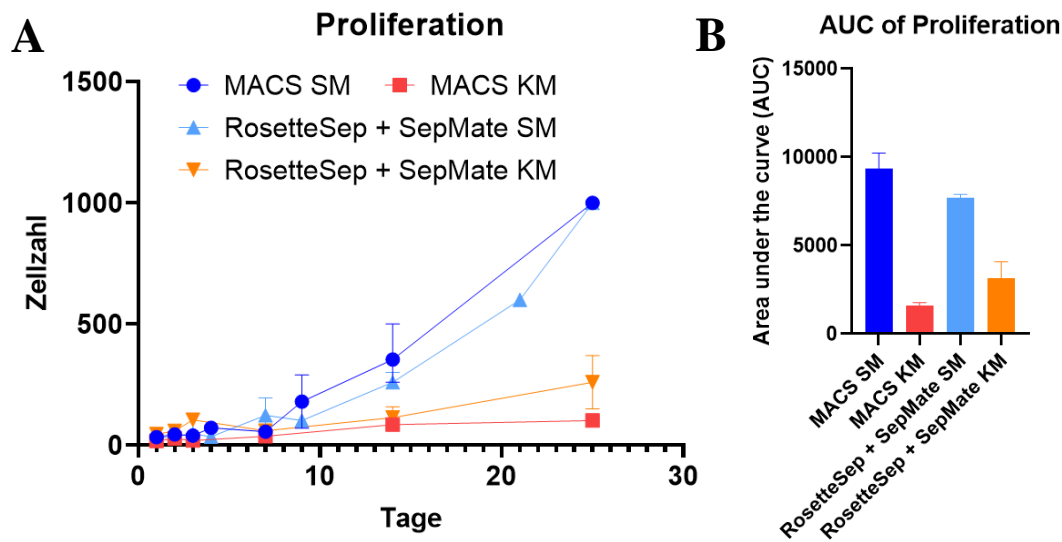


**Abbildung 12 – Zellmorphologie in Abhängigkeit vom verwendeten Medium bei SW620-Zellen.** A und B: Konditioniertes Medium, C und D: Standardmedium.

#### 4.1.4 Kultivierbarkeit der HCC4006-Zellen nach Isolierung mittels MACS-System bzw. RosetteSep™ + SepMate™

Um sicherzustellen, dass die Zellen (HCC4006) nach Anwendung der getesteten Isolierungsmethoden weiterhin proliferationsfähig sind, wurden die isolierten Zellen anschließend sowohl in ihrem Standardmedium als auch in Konditioniertem Medium kultiviert. Darüber hinaus wurden verschiedene Kultureinheiten miteinander verglichen. Pro Medium wurden jeweils drei Blutproben, die initial mit jeweils 100.000 Zelllinien-Zellen gespickt waren, verwendet. Zunächst wurde das Pellet aus isolierten Zellen im jeweiligen Medium resuspendiert und die Suspension dann auf vier Kammern eines 8-Kammer-Chamberslides verteilt. Der Überstand wurde bei den anfänglichen Medienwechseln in die übrigen leeren Kammern der Chamberslides bzw. darauffolgend in die *Wells* einer 24-Well-Platte pipettiert, um eventuell noch nicht adhärenente Zellen nicht durch den Mediumwechsel zu verlieren. Alle Kulturpärchen wurden parallel kultiviert, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Nach Gabe der Zellsuspension in die Chamberslides waren zunächst noch viele weiße und rote Blutzellen hintergründig eingesät. Diese Hintergrundzellen wurden durch die Abnahme der Überstände sowie die Medienwechsel innerhalb der ersten Woche gut ausgewaschen. Im direkten Vergleich fiel auf, dass im Konditionierten Medium durchschnittlich über die ersten 14 Tage mehr Zellen in den Chamberslides mit den mittels RosetteSep™ + SepMate™

isolierten Zellen als bei den entsprechenden MACS-Chamberslides (Abbildung 13 A) vorhanden waren. Dabei waren drei Tage nach Inkulturnahme in den Chamberslides, die die mittels MACS isolierten Zellen enthielten, mehrere größere Tumorzellen vor allem in den Ecken und an den Rändern der Kammern erkennbar. Im Standardmedium zeigte sich jedoch im zeitlichen Verlauf keine eindeutige Überlegenheit eine der beiden Isolierungsmethoden (Abbildung 13).



**Abbildung 13 – Zellproliferation in Abhängigkeit vom verwendeten Medium und der verwendeten Isolierungsmethode.** A: Zeitlicher Verlauf, B: *Area under the curve* zur visuellen Verdeutlichung der Unterschiede. Die Fehlerbalken zeigen den Wertebereich (A) bzw. die Standardabweichung (B) an.

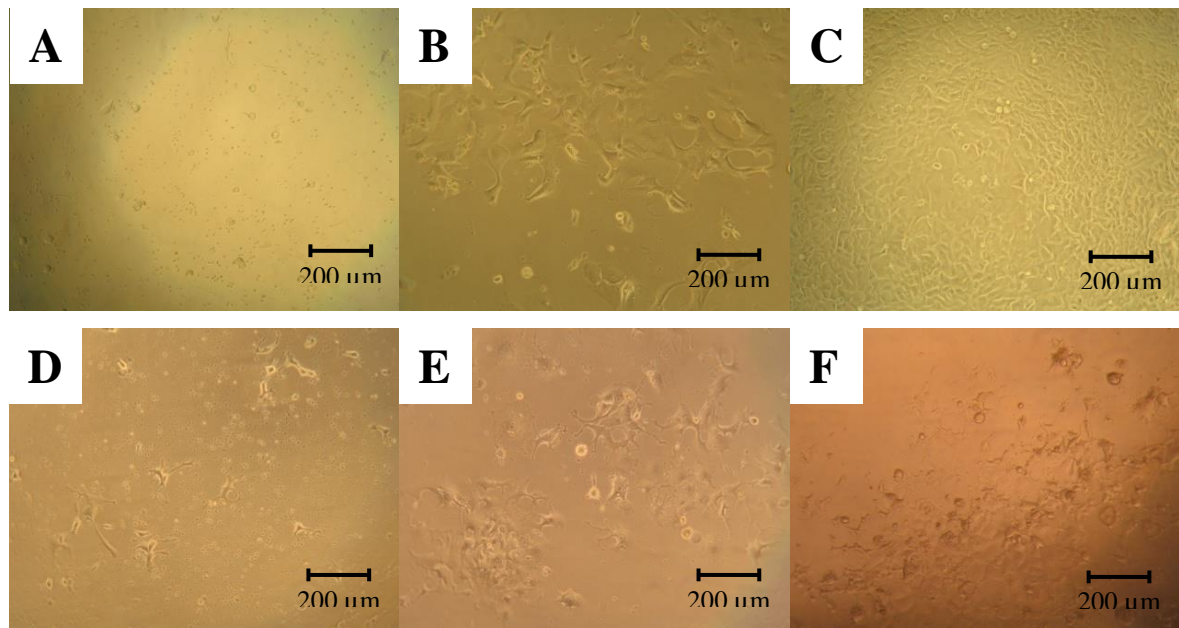
An Tag 4 bildeten sich bereits in beiden Kultureinheiten (Chamberslides und Well-Platten), in denen das Konditionierte Medium verwendet wurde, zum Teil kleinere Zellverbände. Hinsichtlich der Well-Platten ergaben sich im repräsentativen Vergleich von MACS und RosetteSep™ + SepMate™ bei einer Versuchsreihe mit Konditioniertem Medium etwas höhere Zellzahlen nach Verwendung von MACS (Tag 4: 70 vs. 21, Tag 6: 75 vs. 24, Tag 11: 89 vs. 28, Tag 13: 21 vs. 15 Zellen). Beim Standardmedium waren hinsichtlich der Zellzahlen in den Well-Platten keine auffälligen Unterschiede in Abhängigkeit von der Isolierungsmethode nachweisbar. Auch in morphologischer Hinsicht unterschieden sich die Zellen in Abhängigkeit vom jeweiligen Medium. Die Zellen im Standardmedium ähnelten morphologisch denen der ursprünglichen reinen kommerziellen Zelllinie, wohingegen jene im Konditionierten Medium innerhalb der ersten Woche deutliche längliche zytoplasmatische Ausläufer sowie schmale Zellbrücken untereinander bildeten. Im Verlauf der Kultivierung nahm die Zellzahl von den Rändern der Kammer bzw. der *Wells* zur Mitte hin stetig zu.

Während dabei initial die Zellen im Konditionierten Medium nach Isolierung mittels RosetteSep™ + SepMate™ eine höhere Wachstumsrate aufwiesen, kehrte sich dieses Verhältnis zwischen Tag 4 und 7 allmählich zugunsten des Standardmediums um. Nach Isolierung mittels MACS waren bereits von Beginn an etwas höhere Zellzahlen bei Verwendung des Standardmediums nachweisbar. Bei beiden Verfahren wurden jedoch an Tag 14 im Konditionierten Medium vergleichsweise weniger Zellen als im Standardmedium beobachtet.

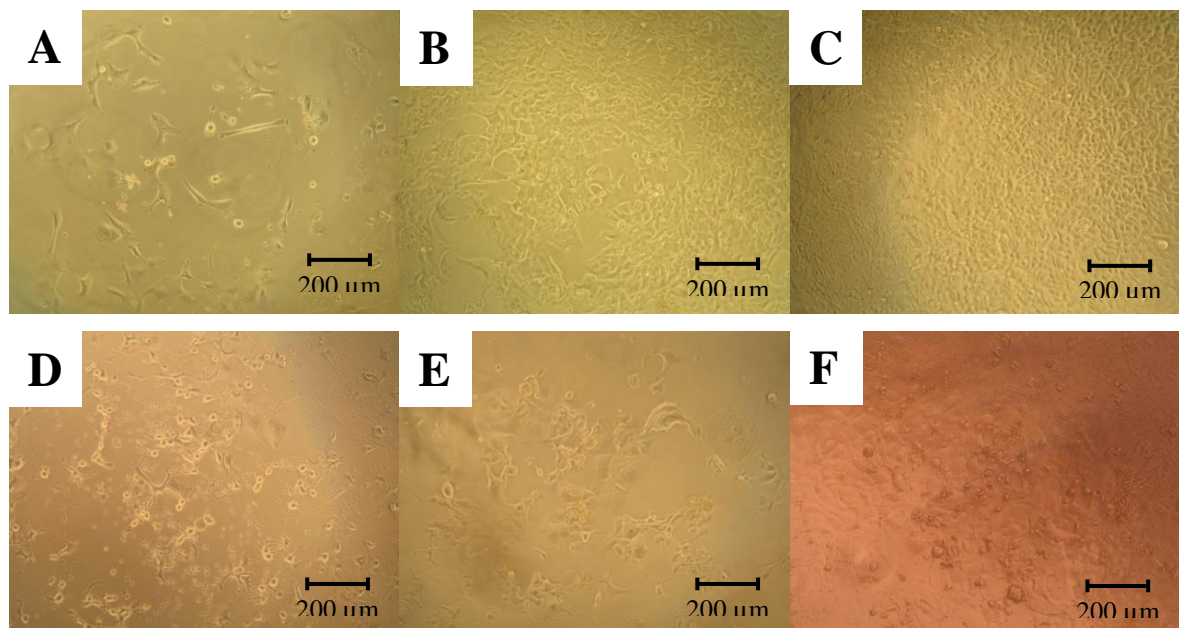
Die Zellen lagen kaum mehr in Zellverbänden vor und begannen, eine blasige Morphologie aufzuweisen und zu fragmentieren. Im Folgenden war die Zellzahl im Konditionierten Medium stark rückläufig und es zeigten sich zunehmend große Mengen an bräunlichen Partikeln. Um zu bestätigen, dass diese keine Artefakte des Konditionierten Mediums darstellten, wurde pures Medium in einem *Well* kultiviert, worin sich jedoch keine bräunlichen Partikel bildeten, sodass diese als Zellfragmente interpretiert wurden. An Tag 30 wiesen die Zellen im Standardmedium zum Teil eine Konfluenz von 100 % auf, wohingegen die Zellen im Konditionierten Medium, die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht aufgrund eines kaum mehr vorhandenen Wachstums bereits verworfen worden waren, allenfalls in den Ecken der Chamberslides sowie in vereinzelt kleineren Zellverbänden etwas dichter zusammenlagen (Abbildung 14 und Abbildung 15). Nach insgesamt 35 Tagen Kultivierung wurden die Chamberslides für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie gefärbt (siehe Kapitel 4.3.2). Die *Well*-Platten mit Standardmedium wurden noch weitere drei Tage kultiviert und dann pro Platte die Zellen mittels Trypsin abgelöst und jeweils in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Darin zeigten die Zellen ein hohes Wachstum mit einer Konfluenz von bis zu 90 % innerhalb von acht Tagen.

Insgesamt zeigten sich vor allem Unterschiede im Einfluss des Mediums auf das Zellwachstum, wobei sich initial das Konditionierte Medium im Vergleich zum Standardmedium ebenfalls positiv auf das Zellwachstum auswirkte. Im Folgenden konnte jedoch nur mithilfe des Standardmediums eine langanhaltende Proliferation erreicht werden (Abbildung 13 A).

Wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, bestätigte sich auch hier, dass die im Konditionierten Medium kultivierten Zellen eine im Vergleich zu Zellen im Standardmedium deutlich andere Morphologie aufwiesen, die den Ursprungszellen kaum noch glich. Beide Isolierungsmethoden zeigten, dass sie sich grundsätzlich für die anschließende Kultivierung der isolierten Zellen eignen.



**Abbildung 14 – Verlauf des Zellwachstums von mittels MACS isolierten Tumorzellen in Chamberslides in Standardmedium (SM) und Konditioniertem Medium (KM).** A: SM Tag 2 nach Inkulturnahme, B: SM Tag 9, C: SM Tag 32, D: KM Tag 2, E: KM Tag 8, F: KM Tag 32.



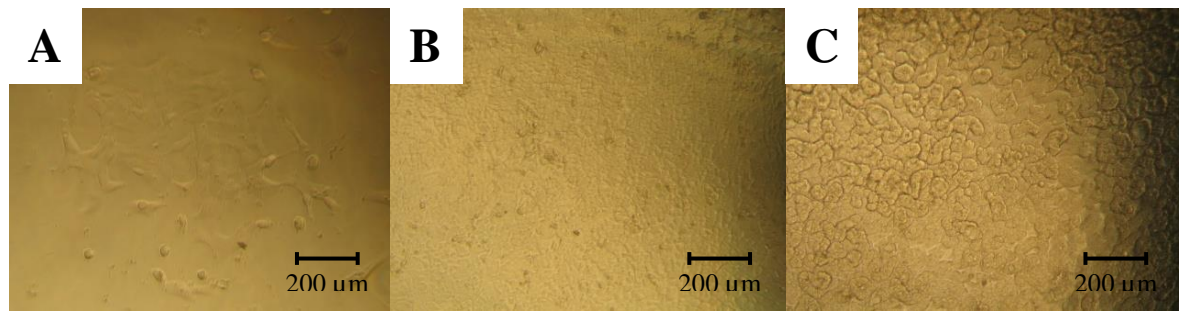
**Abbildung 15 – Verlauf des Zellwachstums von mittels RosetteSep™+SepMate™ isolierten Tumorzellen in Chamberslides in Standardmedium (SM) und Konditioniertem Medium (KM).** A: SM Tag 3, B: SM Tag 14, C: SM Tag 25, D: KM Tag 2, E: KM Tag 14, F: KM Tag 25.

#### 4.1.4.1 Wiederholung der Isolierung und Kultivierung mit einer Zellzahl von 100

##### „gespikten“ Zellen

Da die Isolierungs- und Kultivierungsversuche mit einer hohen Zahl an „gespikten“ Zellen erfolgreich waren, wurden anschließend die Versuche mit einer für Zirkulierende Tumorzellen realistischen Zellzahl von 100 erneut durchgeführt. Dabei wurde jedoch nur Rosette-Sep™ + SepMate™ verwendet. Das vorliegende Pellet wurde im jeweiligen Kulturmedium resuspendiert und die Suspension auf vier Kammern eines 8er-Chamberslides verteilt, um eine möglichst realistische Zellzahl pro Kammer zu repräsentieren.

Die hintergründig vorhandenen Erythrozyten wurden in der ersten Woche größtenteils ausgewaschen. Das abgenommene Medium wurde dabei bei den anfänglichen Medienwechseln in die noch leeren Kammern der Chamberslides sowie in die *Wells* einer 48-Well-Platte gegeben. An Tag 2 nach Inkulturnahme konnten pro Slide vereinzelt zwischen einer und vier Tumorzellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden. In den darauffolgenden Tagen waren in keiner der Kammern Zellen zu sehen, sodass der Mediumwechsel auch nur noch alle drei bis vier Tage erfolgte, um eventuell vorhandenen nur langsam adhärierenden Zellen die Möglichkeit zum Anwachsen zu geben. An Tag 9 und 10 waren in beiden Medien jeweils ein bis vier größere Einzelzellen in einer Kammer erkennbar, die als Tumorzellen interpretiert werden konnten. An Tag 12 zeigte sich dann in einer Kammer mit Standardmedium ein kleiner Zellverband (Abbildung 16). Alle anderen Kultureinheiten (zwei der drei mit Standardmedium und alle drei mit Konditioniertem Medium gefüllten Chamberslides) wurden zu diesem Zeitpunkt verworfen, da keine Zellen nachweisbar waren. Für die Versuche mit 100 Zellen konnte entsprechend keine sinnhafte vergleichende Quantifizierung erfolgen. Im Laufe der folgenden 13 Tage nahm der Zellverband kontinuierlich an Größe zu, sodass nach insgesamt 41 Tagen eine hohe Konfluenz der Zellen (über 70 % der Kammer) vorlag (manuelle Zellzählung an Tag 1: 4 Zellen, Tag 12: 52 Zellen, Tag 25: > 1000 Zellen). Nach insgesamt 72 Tagen in Kultur wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie gefärbt (siehe Kapitel 4.3.2, Abbildung 20, Abbildung 21 und Abbildung 24).

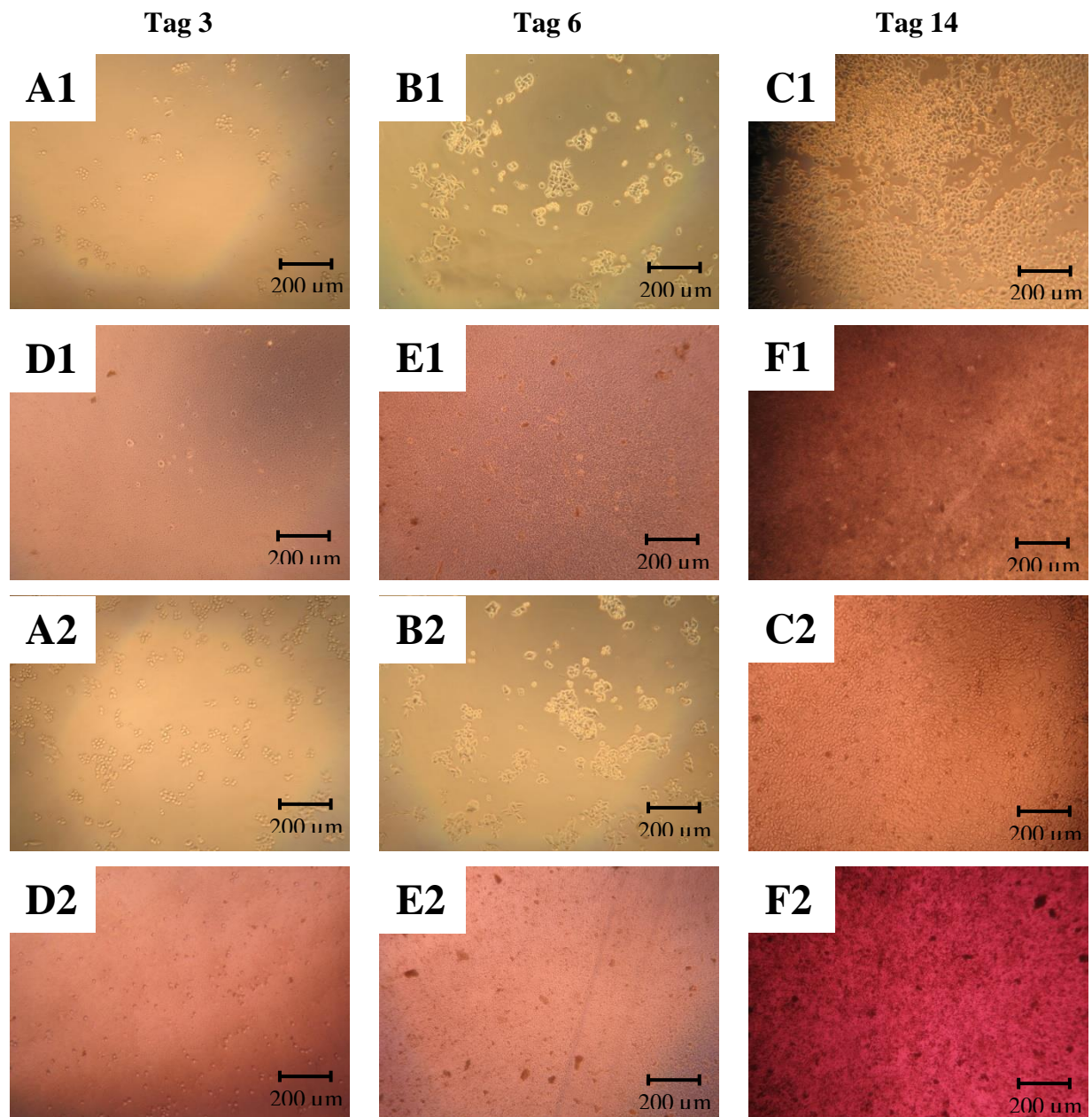


**Abbildung 16 – Verlauf des Zellwachstums von mittels RosetteSep™ + SepMate™ isolierten Tumorzellen (100 Zellen) in Chamberslides in Standardmedium. A: Tag 15, B: Tag 28, C: Tag 38.**

#### 4.1.5 Kultivierbarkeit der SW620-Zellen nach Isolierung mittels MACS-System bzw. RosetteSep™ + SepMate™

Mit den SW620-Zellen wurde prinzipiell wie mit den HCC4006-Zellen verfahren. Die einzigen Unterschiede bestanden in der Verwendung eines anderen zellspezifischen Standardmediums sowie von 48- statt 24-Well-Platten, um eine schnellere Konfluenz erreichen zu können.

Die hintergründigen Blutzellen konnten innerhalb der ersten Woche nach Inkulturnahme gut ausgewaschen werden. Bereits an Tag 3 waren in den Chamberslides mit Standardmedium kleine Zellverbände jeweils über das gesamte Kammerfeld erkennbar. Beim Konditionierten Medium waren hingegen von Beginn an deutlich weniger Zellen lichtmikroskopisch zu sehen, deren Auftreten zumeist auch nur auf die Ecken der Kammern begrenzt war. Zudem wies das Konditionierte Medium viele bräunliche Zellfragmente auf. Im weiteren Verlauf proliferierten die Zellen im Standardmedium weiterhin sehr gut, während im Konditionierten Medium immer weniger Zellen nachweisbar waren. Dies war auch bei den 48-Well-Platten zu beobachten. Hier war seit Beginn kein Wachstum erkennbar, Zellen lagen allenfalls sehr vereinzelt vor und waren von vielen Zellfragmenten umgeben. Die Well-Platten mit dem Konditionierten Medium wurden daher an Tag 10 verworfen. Am selben Tag hatten die Zellen in den Chamberslides zum Teil eine Konfluenz von 70 % erreicht, an Tag 14 von teilweise 100 % (Abbildung 17), sodass die Färbung für die Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte (siehe Kapitel 4.3.2). Die Zellen in den 48-Well-Platten mit dem Standardmedium wurden noch weitere 27 Tage kultiviert, bis auch diese eine Konfluenz von 100 % erreichten. Da in keiner der Kultureinheiten mit Konditioniertem Medium ein für eine Färbung ausreichendes Zellwachstum nachgewiesen werden konnte, konnte keine Immunfluoreszenzfärbung für diese Zellen erfolgen. Da sich zu keiner Zeit visuell signifikante Zellzahlen im Konditionierten Medium zeigten, war entsprechend auch keine vergleichende Quantifizierung während der Kultivierungsversuche möglich.



**Abbildung 17 – Verlauf des Zellwachstums von mittels MACS (A1 – F1) bzw. Rosette-Sep™ + SepMate™ (A2 – F2) isolierten SW620-Zellen in Chamberslides in Standardmedium (A – C) bzw. Konditioniertem Medium (D – F).**

Insgesamt proliferierten die SW620-Zellen im Standardmedium schneller als die HCC4006-Zellen in ihrem Standardmedium. Dieses Verhalten konnte jedoch bereits an den reinen Zelllinien beobachtet werden, war also auch bei den isolierten Zellen zu erwarten. Das Konditionierte Medium führte im Vergleich zum Standardmedium bei den SW620-Zellen zu keinem Zeitpunkt zu einem ausreichenden Wachstum.

## 4.2 ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON ZIRKULIERENDEN TUMORZELLEN AUS KLINISCHEN PROBEN

Da die beiden getesteten Isolierungsmethoden erfolgreich auf das *Spiking*-Modell angewendet werden konnten und auch die Kultivierungsversuche mit beiden verwendeten Medien zur Proliferation von insbesondere HCC4006-Zellen führten, wurden die Methoden anschließend an klinischen Proben getestet (vgl. Abbildung 6). Es sollte insbesondere geprüft werden, ob sich dadurch CTCs aus Blutproben isolieren und anschließend kultivieren lassen, um perspektivisch eine ausreichend hohe Zellzahl für weitere diagnostische Analysen erzielen und somit die Wahl des optimalen Therapieregimes ermöglichen zu können.

### 4.2.1 Vergleich von Kulturbedingungen für CTCs aus klinischen Proben

Nachdem sich in den Versuchen am *Spiking*-Modell herausgestellt hatte, dass die Isolierung mittels RosetteSep™ + SepMate™ der MACS-Methode hinsichtlich Zeitaufwand, Quantität und Reinheit der isolierten Zellen überlegen ist, wurden die Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) aus klinischen Blutproben ebenfalls mit der RosetteSep™ + SepMate™-Methode isoliert. Die Arbeitsschritte erfolgten dabei wie in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben. Um keine der raren Zellen aus den Blutproben zu verlieren, wurden für die jeweilige Probe keine Cytospins angefertigt bzw. auch keine anderen Verfahren angewendet, um die Zellzahl nach der Isolierung zu bestimmen. Stattdessen wurde die bearbeitete Probe makroskopisch betrachtet und auf das Vorliegen eines dünnen Zellpellets am Boden des Zentrifugenröhrchens kontrolliert, um ein Vorhandensein von Zellen zu bestätigen, auch wenn sich dadurch initial noch kein Nachweis liefern ließ, dass sich unter diesen Zellen auch CTCs befanden. Das jeweilige Zellpellet konnte dann problemlos resuspendiert und in die entsprechenden Kultureinheiten gegeben werden.

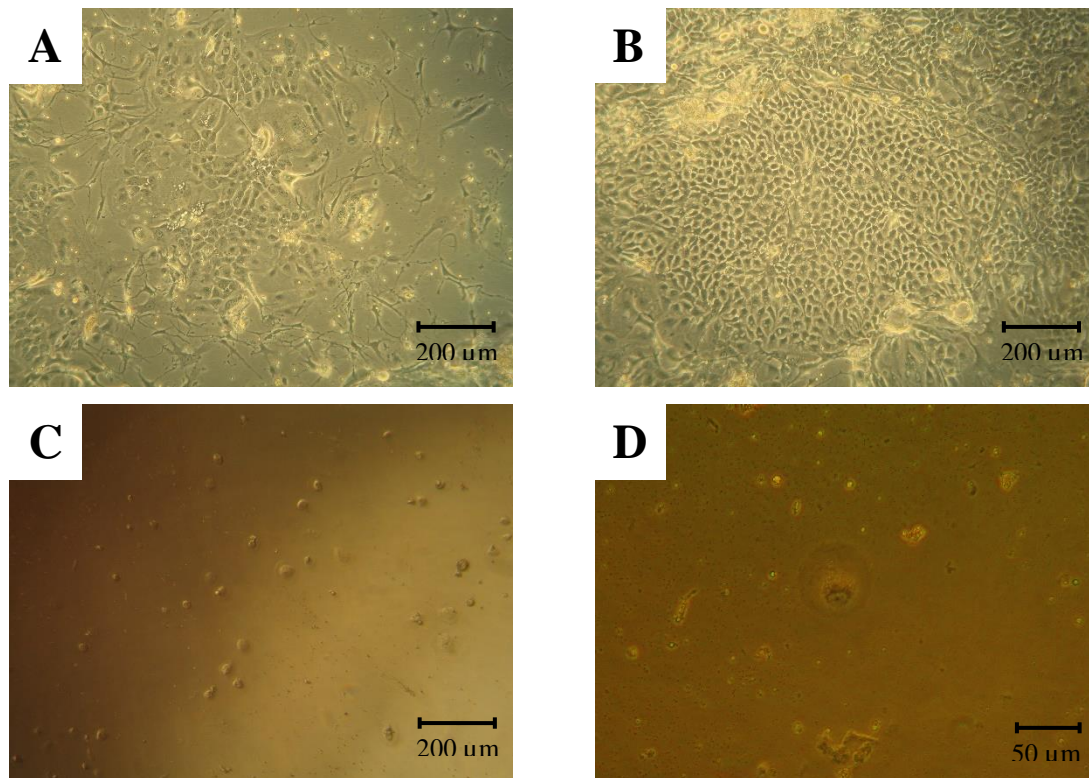
Insgesamt konnten von fünf Patienten mit der Diagnose „Lungenkarzinom“ jeweils zwei 7,5 mL EDTA-Vollblutproben zur Isolierung von Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) gewonnen werden. Zu zwei der Patienten waren außerdem korrespondierende intraoperative Proben des Tumor- und des umgebenden Normalgewebes verfügbar, sodass hiermit auch Vergleiche zwischen dem Wachstumsverhalten von CTCs und Zellen des Primärgewebes eines Individuums angestellt werden konnten.

Hinsichtlich der Kultivierung der CTCs sollte ein Vergleich des Wachstums unter Einsatz von Konditioniertem Medium vs. Standardmedium (RPMI1640-Medium) erfolgen. Es konnten in vier der fünf Kulturpärchen jeweils innerhalb der ersten 14 Tage nach Inkulturnahme einzelne Zellen in den Chamberslides mit RPMI1640-Medium unter dem

Lichtmikroskop nachgewiesen werden. Diese Zellen wiesen eine rundliche Form auf und erschienen relativ homogen. Zudem lagen sie gruppiert beieinander, ohne jedoch eine Konfluenz untereinander zu erreichen. Einige der nachweisbaren Zellen präsentierten sich mit einem etwas breiter ausladenden Zytoplasma. Insgesamt konnten im Standardmedium (RPMI1640-Medium) jeweils in den ersten zwei Wochen nach Inkulturnahme CTC-suspekte Zellen in konstanter oder leicht ansteigender Anzahl gefunden werden. In der manuellen Quantifizierung waren dabei max. 30 Zellen je Kultureinheit nachweisbar. Diese konfluieren jedoch zu keinem Zeitpunkt und nahmen in ihrer Zahl bis zum Ablauf der vierten Woche kontinuierlich wieder ab. Bei den in Konditioniertem Medium kultivierten CTCs waren nur bei einem der Kulturpärchen innerhalb der ersten Tage nach Inkulturnahme fraglich Zellen nachweisbar, die wenig später nicht mehr zu beobachten waren. In den übrigen Kultureinheiten mit Konditioniertem Medium zeigten sich keine CTCs. Das jeweilige Medium unterlag lediglich einer starken Trübung, die sich vermutlich durch die reichlich vorhandenen Zellfragmente erklären lässt. Weiterhin waren in sämtlichen 48-Well-Platten, in die die Überstände aus den Chamberslides bei jedem Mediumwechsel pipettiert wurden, keinerlei Zellen nachweisbar. Auch hier zeigte sich lediglich eine starke Trübung des Kulturmediums.

#### *4.2.2 Vergleich des Wachstumsverhaltens von CTCs und Zellen des Primärtumors*

Hinsichtlich des Primärgewebes konnten aus beiden verfügbaren Probenpärchen Einzelzellen isoliert und in Konditioniertem Medium kultiviert werden. Dabei war bereits nach 13 Tagen nach Inkulturnahme eine Konfluenz von nahezu 100 % zu beobachten, sodass die erste Passagierung erfolgen konnte (Abbildung 18 A und B). Die Zellen aus den Primärgewebeproben waren also im Konditionierten Medium erfolgreich kultivierbar, wohingegen die Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs), die vom selben Primärtumor abstammten, in diesem Medium keine Proliferation zeigten, sondern nur initial im RPMI1640-Medium nachweisbar waren (Abbildung 18 C und D).



**Abbildung 18 – In Konditioniertem Medium kultivierte Zellen des Primärtumors sowie aus Blutproben isolierte in Standardmedium (RPMI1640-Medium) kultivierte Zellen desselben Spenders.** A und B: Zellen aus Tumorgewebe an Tag 13 nach Inkulturnahme, C: CTCs aus Blutproben an Tag 14, D: CTCs aus Blutproben an Tag 20. Keine Aufnahmen zu CTCs in Konditioniertem Medium, da kein Wachstum nachweisbar.

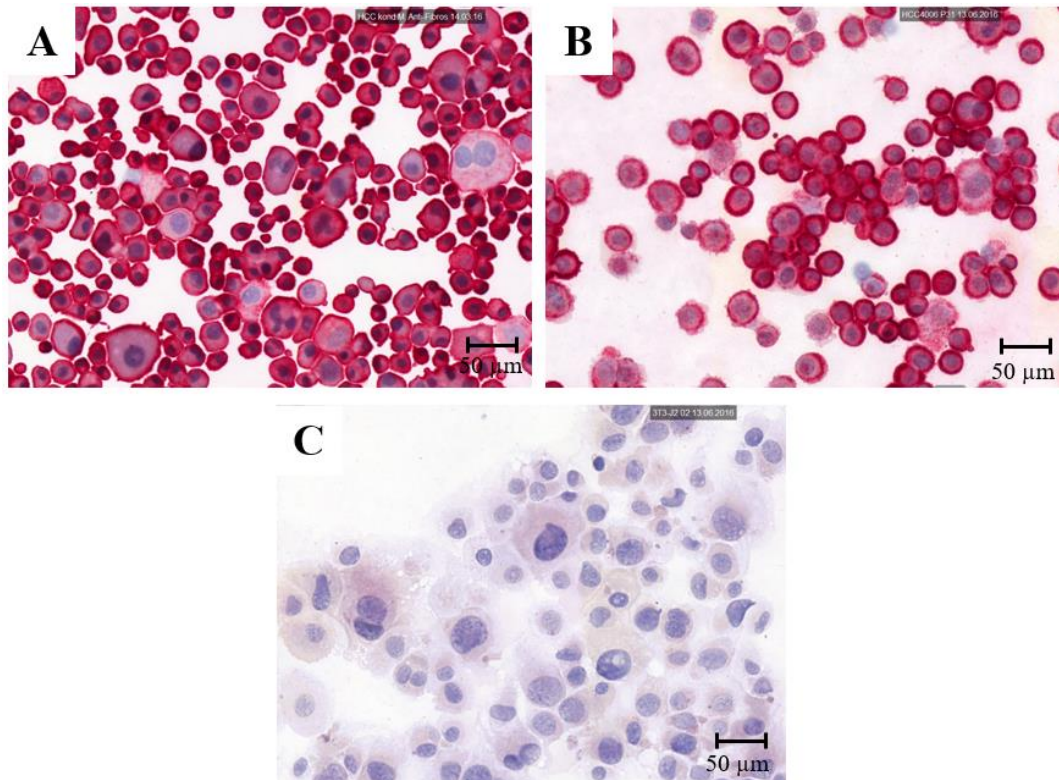
Im Rahmen der Kultivierung der Primärtumorzellen wurde beim *Splitten* versuchsweise auf die dem Konditionierten Medium zur Komplettierung der Gebrauchslösung beizufügenden Zusätze (siehe Kapitel 8.3.3.4) verzichtet. Die Grundlösung enthielt die Zusätze zwar bereits, aber nicht in derselben hohen Menge wie die Gebrauchslösung. Hierbei zeigte sich, dass die Primärtumorzellen auch ohne die Zusätze weiterhin proliferierten.

### 4.3 CHARAKTERISIERUNG VON (ZIRKULIERENDEN) TUMORZELLEN

#### 4.3.1 Einsatz von Anti-Fibroblasten-Microbeads zur Charakterisierung des Zelltyps von in Konditioniertem Medium kultivierten Zellen

Da sich die Morphologie der Zellen unter dem Einfluss des Konditionierten Mediums im Vergleich zur Ursprungszelle deutlich veränderte und eher an ein fibroblastenartiges Wachstum erinnerte, wurden die Zellen aus Passage 15 bei hoher Konfluenz aus der T25-Zellkulturflasche gelöst und wie unter 3.2.10.3 beschrieben mithilfe von Anti-Fibroblast Microbeads (Miltenyi Biotec) isoliert. Anschließend wurden diese mittels anti-panCytokeratin gefärbt (Abbildung 19). Die isolierten Zellen wurden wieder in eine T25-Zellkulturflasche

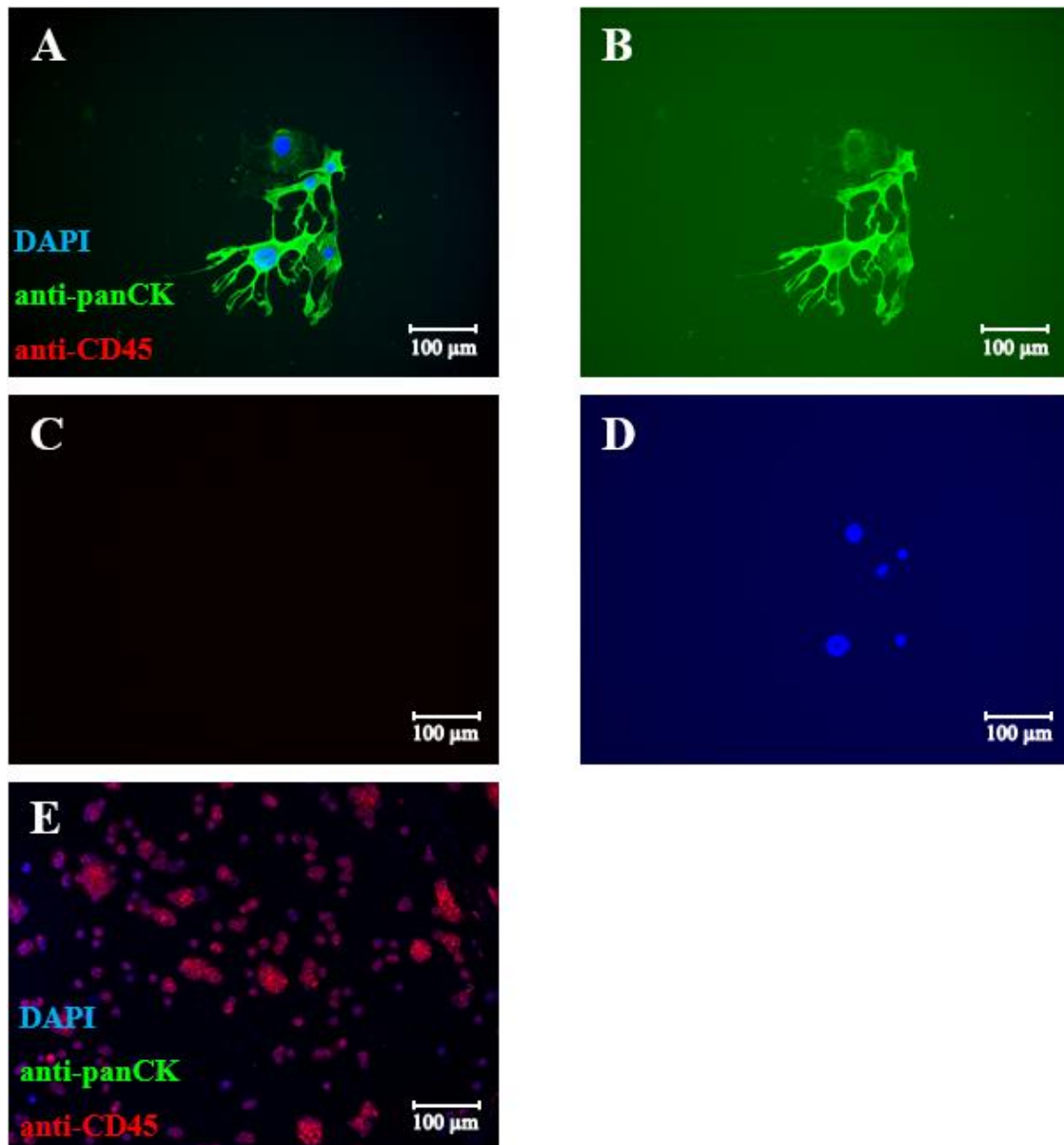
gegeben und bis zur Passage 18 weiterkultiviert, woraufhin dieser Versuch zur Bestätigung der Ergebnisse wiederholt wurde. Hierbei zeigte sich, dass die anwachsenden Zellen bereits nach einem Tag die gleiche Morphologie wie zuvor aufwiesen und somit davon ausgegangen werden kann, dass es sich nicht um Fibroblasten handelte, sondern die Zellen unter dem Einfluss des Konditionierten Mediums ihre Morphologie veränderten. Zudem ließen sich Fibroblasten in einer Kontrollfärbung nicht mittels anti-panCK anfärben.



**Abbildung 19 – Aufnahmen von immunzytochemisch gefärbten HCC4006-Zellen nach Anwendung eines Anti-Fibroblasten-Kits.** A: In Konditioniertem Medium kultivierte HCC4006-Zellen nach Anti-Fibroblasten-Kit, B: In Standardmedium kultivierte reine HCC4006-Zellen, C: 3T3-J2-Fibroblasten als Negativkontrolle. Cytospins wurden mittels anti-panCK-Antikörpers (Klon: AE1/AE3; rot) und Hämatoxylin (violett) gefärbt.

#### 4.3.2 Nachweis des epithelialen Charakters der Zellen mittels Immunfluoreszenz

Zur Charakterisierung der kultivierten Zellen wurden die Zellen mit Immunfluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Hierbei wurden ein grün fluoreszierender (AlexaFluor488) anti-panCytokeratin-Antikörper (Marker für epitheliale Zellen), ein rot fluoreszierender (AlexaFluor594) anti-CD45-Antikörper (Marker für Leukozyten) als Negativkontrolle sowie das blau fluoreszierende DAPI für die Kernfärbung verwendet (Abbildung 20).

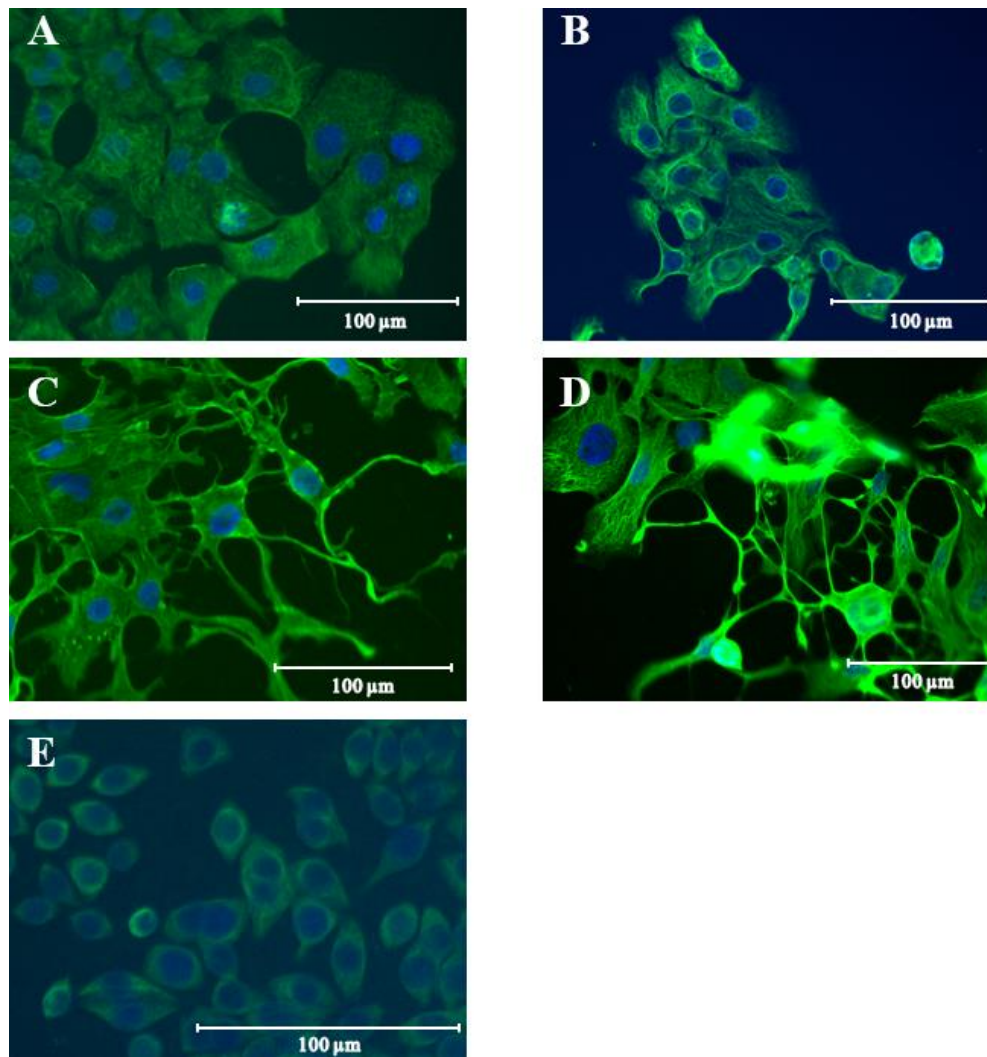


**Abbildung 20 – Immunfluoreszenzaufnahmen von in Konditioniertem Medium kultivierten Zellen.** A: Overlay, B: anti-panCytokeratin (AlexaFluor488), C: anti-CD45 (AlexaFluor594), D: Kernfärbung (DAPI), E: Färbekontrolle an CD45-positiven Blutzellen.

Im Vergleich der Fluoreszenzsignale mit dem anti-panCytokeratin-Antikörper wurden bei den HCC4006-Zellen etwas intensivere Färbungen beobachtet als bei den SW620-Zellen (vgl. Abbildung 21 A und B mit Abbildung 21 E). Auf allen Objektträgern, auf denen lichtmikroskopisch bis zum Tag der Färbung Zellen beobachtet werden konnten, konnten diese auch mittels Immunfluoreszenz wieder detektiert werden.

Bei den in Konditioniertem Medium kultivierten HCC4006-Zellen zeigte sich unter dem Fluoreszenzmikroskop noch deutlicher die von den Ausgangszellen abweichende Morphologie (vgl. Abbildung 21 A und B mit Abbildung 21 C und D).

Neben den lichtmikroskopisch bereits nachgewiesenen länglichen Ausziehungen, die mittels Immunfluoreszenz noch besser dargestellt werden konnten, zeigten viele Zellen ein von der Form her nicht homogenes breites Zytoplasma. Hinsichtlich der zuvor verwendeten Isolierungsmethoden zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Morphologie.

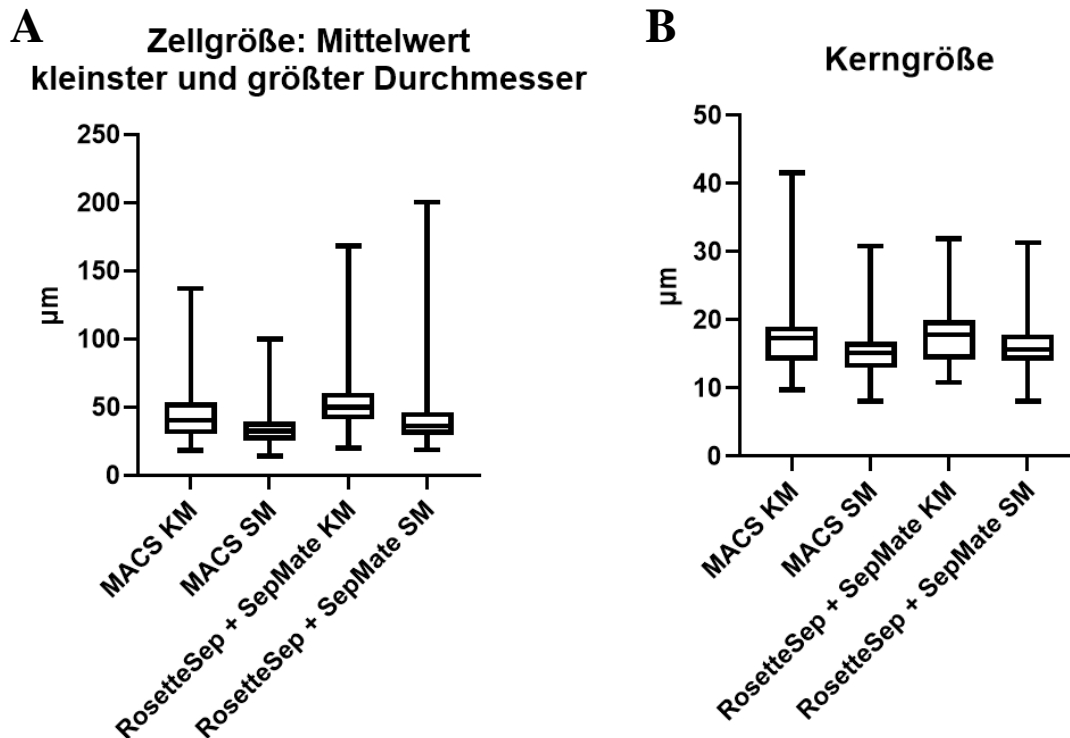


**Abbildung 21 – Immunfluoreszenzaufnahmen der kultivierten Zellen** (grün: anti-panCK, rot: anti-CD45, blau: DAPI). A-D: HCC4006-Zellen. A: MACS Standardmedium, B: RosetteSep™ Standardmedium, C: MACS Konditioniertes Medium, D: RosetteSep™ Konditioniertes Medium, E: SW620-Zellen, RosetteSep™, Standardmedium. Keine Aufnahmen zu SW620-Zellen in Konditioniertem Medium, da kein Wachstum nachweisbar.

Zur Beurteilung der Veränderungen der Zellen in Abhängigkeit vom verwendeten Medium, wurden die Zellmorphologie, Kerndurchmesser, längster bzw. kürzester (durch das Zentrum gemessener) Zelldurchmesser sowie Vorhandensein von zytoplasmatischen Ausläufern beurteilt. Dabei wurden vornehmlich gut erkennbare Einzelzellen bzw. Zellen innerhalb eines Clusters, die als einzelne Zellen abgrenzbar waren, manuell (händisch) analysiert, um

keinen Auswertungsfehler zu generieren (daher erfolgte kein Vermessen von Clustern, bei denen die Zellgrenzen der Einzelzellen nicht erkennbar waren).

Insgesamt konnten unter diesen Voraussetzungen auf 40 Objektträgern 482 Zellen beurteilt werden (309 aus Standardmedium, 173 aus Konditioniertem Medium). Die erhobenen Werte sind detailliert im Anhang (8.3.5) und in der Tabelle 8 sowie in der Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 22 – Vergleich der Zellmorphologie in Abhängigkeit vom verwendeten Medium und der verwendeten Isolierungsmethode.** A: Mittelwerte der kleinsten und größten Zelldurchmesser, B: Kerngröße. Die Fehlerbalken zeigen den Wertebereich an.

Nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Test zeigte sich bei der Methode MACS ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Mittelwerte der Zelldurchmesser ( $p < 0,0001$ ) und der Kerngröße ( $p < 0,0001$ ) zwischen dem Standardmedium und dem Konditionierten Medium zugunsten höhere Messwerte bei letzterem. Bei alleiniger Betrachtung der Methode RosetteSep™ + SepMate™ zeigte sich zwischen den Kulturmedien zwar auch ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zelldurchmesser ( $p < 0,0001$ ) zugunsten des Konditionierten Mediums, jedoch nicht bezüglich der Kerngröße ( $p = 0,0798$ ).

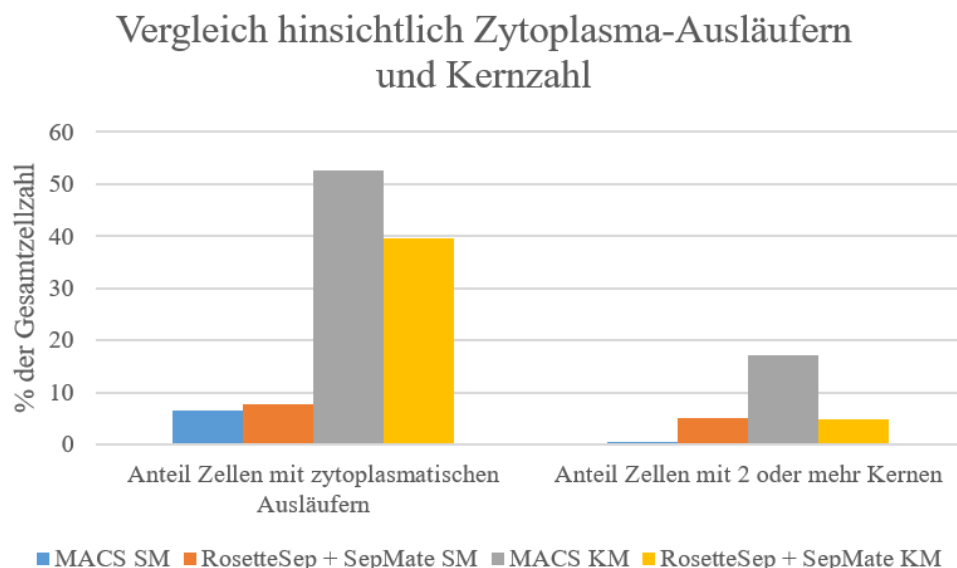
Signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Isolierungsmethoden ergaben sich beim Konditionierten Medium hinsichtlich der Zelldurchmesser ( $p = 0,0003$ ) zugunsten RosetteSep™ + SepMate™, jedoch nicht bezüglich der Kerngröße ( $p > 0,9999$ ). Bei alleiniger

Betrachtung des Standardmediums zeigte sich sowohl beim Mittelwert der Zelldurchmesser ( $p = 0,0088$ ) als auch bei der Kerngröße ( $p = 0,0180$ ) ein signifikanter Unterschied mit höheren Messwerten zugunsten RosetteSep™ + SepMate™.

**Tabelle 8 - Vergleich der Anzahl an Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern sowie Anzahl der Zellkerne in Abhängigkeit von der verwendeten Isolierungsmethode sowie vom verwendeten Medium** (in Klammern: Anteil in % sowie Anzahl absolute Zahlen an Ausläufern bzw. Zellkernen)

|   | MACS (SM)           | MACS (KM)                                  | RosetteSep™ + SepMate™ (SM) | RosetteSep™ + SepMate™ (KM)         |
|---|---------------------|--|-----------------------------|-------------------------------------|
| Anzahl Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern: | 10 (6,5%)<br>(10x1) | 58 (52,7%)<br>(13x1, 23x2, 15x3, 5x4, 2x5) | 12 (7,8%)<br>(12x1)         | 25 (39,7%)<br>(10x2, 7x3, 1x5, 2x6) |
| Anzahl Zellen mit 2 oder mehr Kernen:           | 1 (0,6%)<br>(1x2)   | 19 (17,3%)<br>(10x2, 8x3, 1x > 3)          | 8 (5,2%)<br>(7x2, 1x3)      | 3 (4,8%)<br>(1x2, 2x3)              |

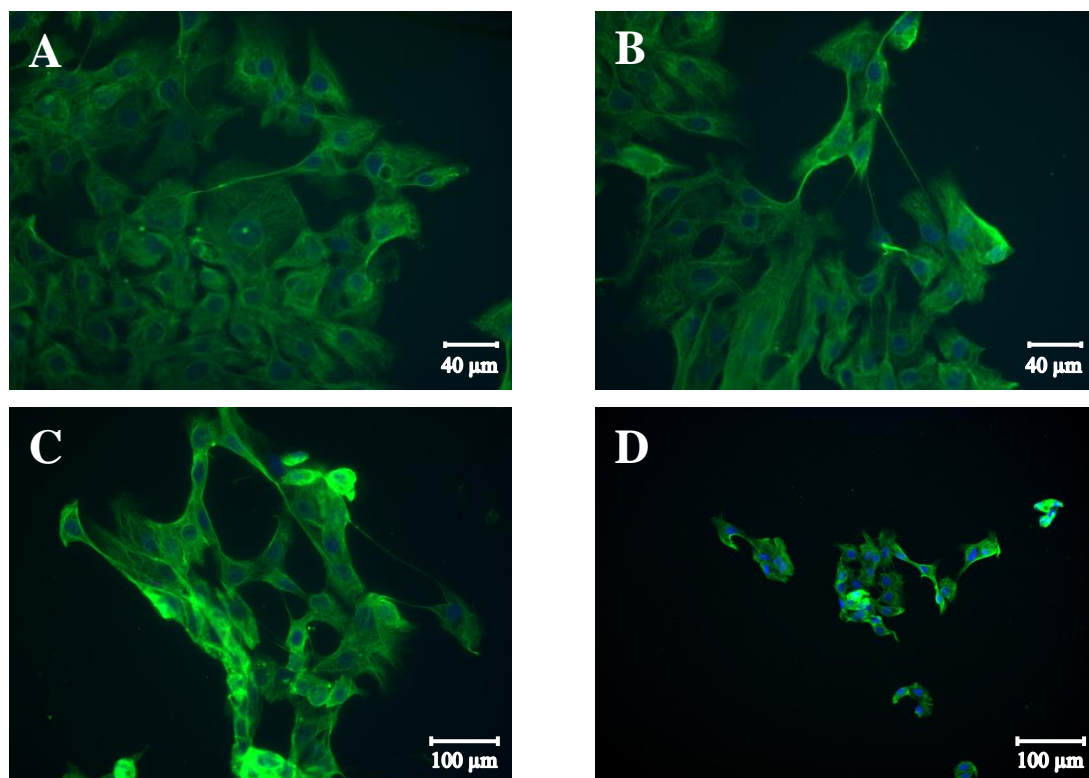
Der Anteil der Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern war bei jenen Zellen deutlich höher, die in konditioniertem Medium kultiviert wurden, unabhängig von der verwendeten Isolierungsmethode. Hinsichtlich der Anzahl an Zellen, die mindestens 2 Zellkerne aufwiesen, zeigte sich nur bei der Methode MACS ein deutlicher Unterschied zwischen den Medien.



**Abbildung 23 – Vergleich der Anzahl an Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern sowie Anzahl der Zellkerne in Abhängigkeit von der verwendeten Isolierungsmethode sowie vom verwendeten Kulturmedium**

Für alle in Konditioniertem Medium kultivierten SW620-Zellen waren weder lichtmikroskopisch noch mithilfe des Immunfluoreszenzmikroskops Zellen nachweisbar.

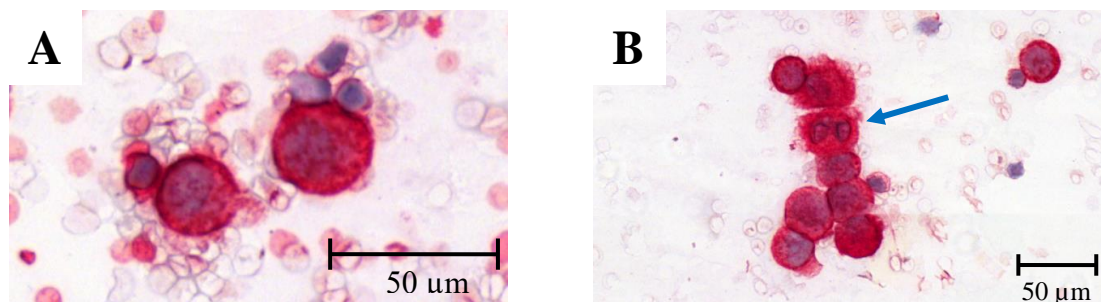
Zum Nachweis, dass die Zellen in Standardmedium auch bei einer initial geringen Ausgangsmenge, sprich weiter auseinander liegenden Einzelzellen, nicht ihre typische Morphologie änderten und nicht den Zellen in Konditioniertem Medium ähnelten, wurden auch für die *Spiking*-Versuche mit 100 Zellen (siehe Kapitel 3.2.4) Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abbildung 24). Diese Zellen zeigten meist eine rundliche bis geringfügig längliche Form mit glatter Begrenzung sowie ein gleichmäßig um den Zellkern konfiguriertes Zytoplasma, ebenso wie es bei den gefärbten Zellen aus den *Spiking*-Versuchen mit 100.000 Zellen der Fall war. Die Ausbildung von interzellulären Brücken war nur in verhältnismäßig geringer Anzahl sichtbar. Insgesamt unterschieden sich auch diese Zellen deutlich von denen, die im Konditionierten Medium kultiviert worden waren.



**Abbildung 24 – Immunfluoreszenzaufnahmen (beispielhaft) nach der Kultivierung von 100 Zellen der Zelllinie HCC4006.** A-D: HCC4006-Zellen (grün: anti-panCK, blau: DAPI).

#### 4.3.3 Nachweis des epithelialen Charakters der Zellen mittels Immunzytochemie

Die primär für die Quantifizierung der Zellen in Abhängigkeit von der gewählten Isolierungsmethode durchgeführte immunzytochemische Färbung (siehe Kapitel 3.2.7) der Zellen aus dem *Spiking*-Modell wurde auch zur Beurteilung der Spezifität der verwendeten Antikörper sowie der Morphologie, Größe, Kern-Plasma-Relation und Clusterbildung der isolierten Zellen herangezogen. Hierbei zeigte sich, dass der gewählte anti-pan-Cytokeratin-Antikörper (Klon AE1/AE3) die isolierten HCC4006-Zellen mit hoher Intensität rot anfärbte (Abbildung 25). Die hintergründigen weißen Blutzellen wiesen dagegen nur eine leicht livide Färbung auf. Um einen Richtwert für die durchschnittliche Zellgröße der immunzytochemisch gefärbten isolierten Zellen der gespikten Zelllinie zu erhalten, wurden exemplarisch 100 Zellen (jeweils 50 pro Isolierungsmethode) manuell ausgemessen. Mit jeweils sowohl einem arithmetischen Mittelwert als auch Median von 27  $\mu\text{m}$  ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Isolierungsmethoden, die Spannweite lag bei 18 bis 52  $\mu\text{m}$ . Zudem fiel auf, dass die Zellen häufig in Clustern aus mindestens zwei Einzelzellen zusammenlagen und dabei vor allem nach Isolierung mittels RosetteSep™ teilweise von kleineren bis etwa 7  $\mu\text{m}$  großen Zellen umlagert waren. Darüber hinaus waren bei einigen Zellen zwei oder mehr Zellkerne sichtbar mit einer bildmorphologisch geschätzten Kern-Plasma-Relation von 1 : 3 bis 1 : 2.



**Abbildung 25 – Repräsentative Aufnahmen der immunzytochemisch gefärbten HCC4006-Zellen nach Isolierung mittels RosetteSep™ + SepMate™ zur Beurteilung der Morphologie und Zellanordnung.** Cytospins wurden mittels eines anti-panCytokeratin-Antikörpers (Klon: AE1/AE3; rot) und Hämatoxylin (violett) gefärbt. Der Pfeil kennzeichnet eine Zelle mit zwei Zellkernen.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 ISOLIERUNG VON (ZIRKULIERENDEN) TUMORZELLEN

Der Vergleich zweier Methoden zur Isolierung von nicht-hämatopoetischen Zellen einschließlich Zirkulierender Tumorzellen (CTCs) hat gezeigt, dass beide Methoden grundsätzlich für die Isolierung und anschließende Kultivierung von Tumorzellen geeignet sind. Die Prozedur der Isolierung scheint den Zellen nicht zu schaden, da sowohl Zellen, die mit dem MACS-System isoliert wurden, als auch Zellen, die das RosetteSep™-Verfahren durchlaufen haben, anschließend gut weiterkultiviert werden konnten. Für das RosetteSep™-Verfahren gibt es darüber hinaus bereits Publikationen von Cayrefourcq *et al.* [72] sowie Grillet *et al.* [79], in denen die erfolgreiche Etablierung von CTC-Zelllinien nach Isolierung mittels RosetteSep™ beschrieben wird.

Neben Vorteilen in Quantität und Reinheit zeigte das RosetteSep™ + SepMate™-Verfahren auch deutliche Vorteile hinsichtlich Handhabung und Zeitaufwand bei annähernd vergleichbaren Kosten (Tabelle 7). Bei den klinischen Proben schwankt die CTC-Zellzahl in 7,5 mL-EDTA-Blutproben abhängig von verschiedenen Faktoren zwischen 1 und über 400 [35, 36] und laut den Ergebnissen einer unveröffentlichten Arbeitsgruppen-internen Untersuchung hinsichtlich Lungenkarzinomen zwischen 0 und 110, wobei etwa 80% der Proben eine Zellzahl von unter 30 aufweisen. Daher war es wichtig, möglichst wenige Zellen zu verlieren und wenig Zeit bis zur Inkulturnahme aufzuwenden, um weder Apoptose oder Nekrose noch aufgrund des Temperaturunterschiedes Veränderungen auf der Genexpressionsebene zu provozieren [110]. Das RosetteSep™-Verfahren genügte diesen Anforderungen, soweit bei geringer Zahl an Versuchswiederholungen beurteilbar, tendenziell besser. Es zeigten sich signifikant höhere Zahlen an *Spiking*-Zellen bei signifikant mehr hintergründigen Erythrozyten. Hinsichtlich der Leukozyten ergab sich zwar statistisch kein signifikanter Unterschied, in absoluten Zahlen zeigte sich jedoch eine fünfmal geringere Zellzahl als beim MACS-Verfahren, sodass die fehlende Signifikanz am ehesten in der Stichprobengröße begründet sein könnte. Die Ausbeute der isolierten Zellen war im Vergleich zu den eingesetzten („gespiketen“) Zellen mit 19,6 % (MACS) und 23,1 % (RosetteSep™ + SepMate™) dennoch relativ gering (Tabelle 6).

Für die hier durchgeführten Versuche wurde aufgrund der technisch vorhandenen Möglichkeiten zum einen das MACS verwendet und aufgrund der Möglichkeit einer Negativselektion mit dem RosetteSep™-Verfahren verglichen. Entscheidend war v.a. die Auswahl von Verfahren, mit denen eine nachfolgende Kultivierung der Zellen noch möglich war.

Wichtig war daher nicht nur eine möglichst ertragreiche Isolierung, sondern insbesondere dass die resultierenden Zellen auch noch geeignet für eine weitere Kultivierung waren. Im Vergleich mit anderen Isolierungsmethoden (vgl. zum Beispiel Bankó *et al.* [186]) zeigte sich in dieser Arbeit dennoch eine vergleichsweise geringere Isolierungsrate der zuvor gespikten Zellen. So führt Bankó *et al.* beispielsweise eine höhere Detektionsrate bei Verwendung eines NP-HBCTC-Chips an [186]. Allerdings beträgt die aufzuwendende Zeit für eine Isolierung dabei bis zu 4 Stunden, sodass eine schnelle Inkulturnahme nach Isolierung nicht durchführbar und aufgrund des Zeitfaktors ohne Kulturmedium ein relativ hoher Zellverlust zu erwarten wäre. Zhang *et al.* erzielten in *Spiking*-Versuchen unter Anwendung eines neu entwickelten Isolierungsverfahrens (ähnlich einem CTC-Chip) Ausbeuten zwischen 60 und annähernd 100 % abhängig von der verwendeten Zelllinie und der initial in Kultur gegebenen Zellzahl [76]. Solche Chip-Methoden lassen eine zeitnahe Kultivierung auf dem Chip selbst zu oder ein Herauslösen der Zellen aus dem Chip, wofür bei Letzterem jedoch wiederum Chemikalien oder mechanische Kräfte eingesetzt werden müssen, was wiederum die Qualität der Einzelzellen beeinflussen könnte.

Ebenso werden bei sehr vielen Verfahren der Positivselektion (i.d.R. über EpCAM) höhere Zellzahlen erreicht, jedoch war auch hier ein Vergleich nicht sinnvoll, da bewusst eine Negativselektion der unerwünschten Zellen verfolgt wurde, um mögliche Phänotypen bzw. Subpopulationen der CTCs, die nicht das verwendete Marker-Epitop tragen, nicht zu verlieren. Sowohl bei den Immunaффinitäts-basierten als auch Größen-basierten Verfahren wurde in den verglichenen Methoden i.d.R. eine Detektion über EpCAM oder auch HER2 und / oder EGFR erzielt. Aussagen zu Subpopulationen der zu untersuchenden Zellen konnten entsprechend nicht getroffen werden. Da teilweise Studien sogar zeigten, dass auch Patientinnen und Patienten mit benignen Organerkrankungen Zellen mit epithelialen Markern wie EpCAM aufweisen können [186], könnte deren Detektion zu einer Überschätzung der eigentlich erwünschten Zellen führen. Es wurden bereits CD45-positive Zellen im Blut von Krebspatienten detektiert, die zusätzlich Cytokeratine oder *EGFR* exprimieren und somit sowohl hämatopoetische als auch epitheliale Marker aufweisen [8]. Unklar bleibt, wie solch eine atypische CD45-positive Zelle entstehen kann und ob es sich um eine Tumorzelle handeln kann. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es zu einer Fusion von hämatopoetischen Zellen und CTCs kommt oder zumindest eine Interaktion zwischen den unterschiedlichen Zelltypen stattfindet, wobei letzteres bereits zum Beispiel bei der Entstehung sogenannter endothelial-epithelialer Fusionscluster vermutet wird [111]. Solche Zellen könnten dann die tatsächliche Zellausbeute bei der Isolierung beeinflussen. Um dieses Problem zu umgehen,

wurden Größen-basierte Methoden etabliert, mit denen die Zellen alleine aufgrund ihrer Größe (oder teilweise in kombinierten Verfahren mit Antikörpermarkierung) isoliert werden können. Dadurch wird versucht, den Verlust von Subpopulationen zu reduzieren, allerdings zeigten einige Arbeiten, dass die Interferenz mit den ebenfalls in einer Vollblutprobe vorhandenen Leukozyten sehr hoch sein kann, was zu einem Verstopfen der verwendeten Filter / Membranen und somit zu einem höheren Hintergrund und einer entsprechend geringeren Reinheit führen kann. Außerdem unterliegt die Größe einiger CTCs einer Spannweite von etwa 9-19  $\mu\text{m}$  [186], wobei sich hier eine Überlappung zu der Größe von Leukozyten zeigt, sodass rare Zellen beim Herausfiltern vermeintlicher Leukozyten verloren gehen könnten. Ein weiteres Problem besteht darin, dass Zellen von Karzinomzelllinien in einigen Fällen größer sind als CTCs, was ein Problem der Vergleichbarkeit bei Isolierungsversuchen darstellt.

Da das Augenmerk in dieser Arbeit auf die Zellzahl, Handhabbarkeit, kurze Isolierungszeit, unmarkierte sowie möglichst durch Chemikalien oder mechanische Einflüsse wenig bis nicht beeinflusste Zellen und Berücksichtigung von Subpopulationen gelegt wurde, wurde schließlich ein Verfahren der Negativselektion, d.h. in diesem Falle RosetteSep™ + Sep-Mate™, als geeignetste Methode für die Isolierungsversuche angesehen. Es erschien damit eine vielfältige Verwendung der isolierten Zellen für eine Quantifizierung und Färbungen möglich (da ungebunden im Medium vorliegend), wobei die Isolierungsdauer aber als nicht zu lang erachtet wurde, um ausreichend vitale Zellen in Kultur nehmen zu können.

Verglichen mit anderen Arbeiten, die RosetteSep™ (teilweise jedoch nicht als Negativselektion) verwendeten, waren dort Detektionsraten von etwa 62,5% zu erzielen (vgl. Rushton *et al.* [187]). Etwa 70 % Ausbeute erzielten Kulasinghe *et al.* mit *Spiking*-Versuchen mittels RosetteSep™ [39]. Allerdings ist anzumerken, dass diese Versuche mit Zelllinien von Kopf-/Hals-Karzinomen, insbesondere auch Plattenepithelkarzinomen, durchgeführt wurden und es sich dabei um nachweislich EpCAM-positive Zellen handelte. Obwohl ein identischer Antikörper-Cocktail verwendet wurde, besteht die Möglichkeit, dass die Antikörper in Abhängigkeit von der Entität unterschiedlich stark an die zu eliminierenden Zellen binden. Auch eine Interaktion zwischen Tumorzellen bzw. CTCs und den zu depletierenden Zellen ist denkbar. Möglicherweise binden CTCs von Lungenkarzinomen stärker an weiße Blutzellen als CTCs von Kopf-/Hals-Tumoren, sodass diese im Rahmen der Depletion unerwünschterweise in einem größeren Ausmaß mit eliminiert werden. Drucker *et al.* verwendeten in einem *Spiking*-Modell mit Brustkrebszellen ebenfalls eine Negativselektion mittels RosetteSep™ und konnten ebenfalls nur vergleichsweise geringe Zellzahlen wiederdetektieren

(34 +/- 15% bei 1000 gespikten Zellen) [189]. Auch andere mit RosetteSep™ arbeitende Arbeitsgruppen erzielten Detektionsraten im Spiking-Modell von 40 bis 64%. Auch in deren Versuchsaufbau erfolgte teilweise ein Aufbringen der Zellen auf Cytospin-Objektträger sowie eine immunzytochemische Färbung. Es kann also auch durchaus in Betracht gezogen werden, dass die eigentliche Detektionsrate prinzipiell höher ist, jedoch durch die Zentrifugation für die Cytospins sowie durch die immunzytochemische Färbung möglicherweise ein gewisser Zellverlust auftritt. Weiterhin spielen sicherlich auch Labor-abhängige technische Parameter eine begleitende Rolle. Betrachtet man nur die Ergebnisse der Detektionsraten mittels RosetteSep™-Verfahren in anderen Arbeitsgruppen, welche teilweise ebenfalls nur Wiederholungen von  $n = 3$  bis 7 durchgeführt haben, ist auch hier keine optimale Vergleichbarkeit der Faktoren Entität der Zelllinie, Versuchsaufbau, labortechnische Bedingungen sowie Quantifizierungsmethode gegeben, weshalb nicht unbedingt davon ausgegangen werden kann, dass die Detektionsrate in dieser Arbeit mutmaßlich geringer ist.

Hinsichtlich der Tatsache, dass andere Arbeitsgruppen bisher teilweise deutlich höhere Zellzahlen bei Isolierungen erreichten (Effizienz von 42-99 %, wobei je nach verwendeten Zelllinien und Verfahren auch teilweise deutlich geringere Werte erzielt wurden), sollte neben den bereits angeführten Punkten (z. B. Entität, Art der Zelllinie, Selektionsart, Versuchsaufbau) auch berücksichtigt werden, dass die genannten Arbeitsgruppen meist primär das Ziel einer optimalen Quantifizierung der Zellen für den klinischen Kontext im Sinne einer weiteren Downstream-Analyse verfolgten. Von Bedeutung war hierbei vor allem, vitale Zellen zu detektieren, die z. B. für Genanalysen oder Färbungen weiter verwendet werden können. Bei vielen der von Bankó *et al.* dargestellten Methoden war entsprechend eine Eignung für eine anschließende Inkulturnahme der detektierten Zellen kaum bis gar nicht gegeben (da Zellen z. B. im Isolierungs-Device gebunden waren, lange Isolierungszeiten bestanden oder die Zellen durch bestimmte Antikörper oder andere Partikel markiert waren) bzw. erst gar nicht überprüft worden.

Weiterhin sollte die Zahl der gespikten Zellen betrachtet werden. In dieser Arbeit wurden für das *Spiking*-Modell etwa 2150 Zellen in 7,5 mL Blut gespikt, wohingegen Kulasinghe *et al.* weniger als 100 Zellen in die gleiche Menge Blut gaben [39]. Daher wäre zu untersuchen, ob sich die Rate der nach der Isolierung detektierten Zellen erhöhen würde, wenn eine kleinere Anzahl an Zellen gespikt würde. Bei der MACS-Methode könnte man mutmaßen, dass zu viele Zellen die verwendete Säule überladen könnten, sodass es zu einem Zellverlust kommt, was allerdings aufgrund des Verhältnisses der Größe von Zellen zu Poren der Säule

als eher unwahrscheinlich erscheint. Bei RosetteSep™ könnte eine höhere Zellzahl bedeuten, dass verhältnismäßig mehr Zellen aufgrund einer insgesamt größeren Masse abzentrifugiert werden, sodass diese beim Verwerfen des Sediments verloren gehen. Im Widerspruch hierzu stehen allerdings die Ergebnisse von Zhang *et al.*, die bei höheren Zellzahlen auch einen besseren Isolierungserfolg erzielen konnten [76]. Möglicherweise hat auch das vergleichsweise größere Probenvolumen (7,5 mL in dieser Arbeit vs. 1 bis 10 mL, meist jedoch < 5 mL in anderen Arbeitsgruppen) einen Einfluss darauf, dass die Einzelzellen in geringerer Dichte vorhanden sind und somit ggf. eher an zu eliminierende Zellen unspezifisch gebunden werden oder bei Zentrifugationsschritten leichter verloren gehen.

Darüber hinaus zeigte sich in dieser Arbeit auch, dass sich bei der Verwendung von RosetteSep™ + SepMate™ einerseits weniger hintergründige weiße Blutzellen befanden, sodass die Möglichkeit besteht, dass antiproliferative Einflüsse, die durch diese vermittelt werden [112, 113], wegfallen, und andererseits mehr kleine bis ca. 7 µm große Zellen, besonders auch unmittelbar an die Tumorzellen angelagert, vorlagen, die als Erythrozyten oder Thrombozyten interpretiert werden könnten (Abbildung 25). Durch diese könnte wiederum eine Freisetzung von Stoffen erfolgen, die einen positiven Einfluss auf die Proliferation haben könnten (siehe Kapitel 5.3.3). Zumindest gibt es in der aktuellen Literatur keinen klaren Nachweis darüber, dass native Erythrozyten einen antiproliferativen Effekt auf Tumorzellen bzw. CTCs haben.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass beide hier angewendeten Methoden für die Isolierung von Tumorzellen, insbesondere auch dann, wenn weniger als 100 Zellen pro 7,5 mL Blutprobe enthalten sind, geeignet sind, wobei das RosetteSep™-Verfahren in den hier betrachteten Punkten tendenziell Vorteile gegenüber dem MACS-System aufweist. Bislang bleibt allerdings auch in der Literatur noch unklar, wie viele Tumorzellen bzw. CTCs ursprünglich in einer Blutprobe vorhanden sein müssen, um noch einen für die nachfolgende Kultivierung notwendigen Mindestanteil davon isolieren zu können. Bisher ist einer ausgiebigen Literaturrecherche zufolge keine Methode verfügbar, mit der spezifisch 100% der zu detektierenden Zellen inkl. der Subpopulationen aus einem möglichst kleinen Probenvolumen isoliert werden können. Vielmehr werden Zellzahlen näherungsweise durch Hochrechnungen bestimmt, wobei jedoch Unterschiede zwischen einzelnen Entitäten bestehen und Subpopulationen, die sich möglicherweise durch Modifikationen dem Isolierungsprozess entziehen, unberücksichtigt bleiben, wodurch eine Abschätzung der Therapiemaßnahmen und Prognose der Patienten im Sinne des übergeordneten Zieles nicht ausreichend zuverlässig wäre.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die aktuell etablierten Isolierungsmethoden aufgrund grundlegend unterschiedlicher Prinzipien, Testung anhand unterschiedlicher kommerzieller Zelllinien und auch Patientenproben, Vorliegen unterschiedlichen Karzinomentitäten und verschiedener Absichten hinsichtlich des Zwecks der Isolierung (meist nicht Kultur, sondern direkte Analyse der Zellen) nicht optimal vergleichbar sind und keines der Verfahren bisher als Standard für die experimentelle Forschung etabliert worden ist.

All diese Aspekte könnten auch erklären, warum die Zellausbeute im Rahmen dieser Arbeit vergleichsweise gering erscheint.

Um insbesondere hinsichtlich der klinischen Proben ein realeres Abbild der tatsächlichen Zellzahl zu erhalten, müssten wiederholt Blutentnahmen an unterschiedlichen Stellen (u. a. um einen Einfluss des Abstandes zwischen Primärtumor bzw. Metastase zur Punktionsstelle bewerten zu können) zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgen, was allerdings vielen Patienten, die im Rahmen ihrer malignen Grunderkrankung ohnehin schon von einer Anämie betroffen sind, nicht zuzumuten wäre. Eine zukunftssträchtige Option, die Isolierungsmethoden zumindest im klinischen Rahmen verzichtbar machen könnte, wäre die Etablierung eines Verfahrens zur Detektion, Quantifizierung und Analyse von CTCs *in vivo* [114–116].

## 5.2 KULTIVIERUNG VON (ZIRKULIERENDEN) TUMORZELLEN

Vergleicht man alle Ergebnisse der *Spiking*-Versuche, so lässt sich zusammenfassen, dass beide Zelltypen in ihrem empfohlenen Standardmedium wie zu erwarten gut kultivierbar sind. Dabei erreichen die SW620-Zellen schneller eine höhere Konfluenz als die HCC4006-Zellen, wobei dies durch ihr natürliches Wachstumsverhalten bedingt ist und nicht auf die Kulturbedingungen zurückgeführt werden kann.

Zur Objektivierung der Proliferationsraten der Zellen in Kultur wurden diese lichtmikroskopisch quantifiziert. Zur optimalen Beurteilung während der Kultivierung wäre prinzipiell ein Verfahren nötig, mit dem die Zellen ohne längere Temperaturschwankungen sowie andere äußere Einflüsse noch im Kulturmedium gezählt und dann umgehend wieder in das neue Kulturmedium gegeben werden können. Nach aktuellem Stand existiert solch ein Verfahren jedoch für ebensolchen Zweck nicht. CTCs sind hinsichtlich ihrer biophysiologicalen Eigenschaften bisher nur teilweise verstanden und unter anderem aufgrund ihrer oft gering nachweisbaren Anzahl und ihrer Fragilität schwierig zu kultivieren (vgl. Kapitel 1.1.5 sowie [190, 191]). Entsprechend sollte die Unterbrechung der optimalen Kulturbedingungen auf ein Minimum reduziert werden. Zur Zellzählung wurde daher die Betrachtung unter dem

Lichtmikroskop als für die Zellen mutmaßlich schonenste Methode gewählt, wobei hierbei berücksichtigt werden sollte, dass z.B. mesenchymale Phänotypen, die nicht adhärent wachsen, nicht unbedingt sichtbar werden. Andere Verfahren wie z.B. das FACS könnten zur Zellquantifizierung zwar angewendet werden, jedoch werden die Zellen sowohl aus der Kultur genommen, mechanischen Einflüssen ausgesetzt als auch mit Markern (z.B. Antikörpern) versehen, sodass eine nachfolgende Weiterführung der Kultivierung nicht mehr möglich wäre. Alternativ bliebe die Möglichkeit, alle Kulturversuche in doppelten Versuchsreihen anzulegen, was jedoch aufgrund der ohnehin schon geringen Verfügbarkeit von nativen (nicht kommerziellen) CTCs aus klinischen Proben kaum realisierbar ist. Entsprechend war in dieser Arbeit zugunsten einer mutmaßlich höheren Erfolgschance bei der Kultivierung eine Quantifizierung der Zellen während der Passagewechsel nur ausschnittsweise in repräsentativen Blickfeldern möglich. Eine vollständige Quantifizierung wäre dann bei erfolgreicher Kultivierung nach Erreichen einer ausreichend hohen Zellzahl im Anschluss möglich.

Bezüglich der zuvor verwendeten Isolierungsmethoden zeigte sich, dass in den Chamberslides mit konditioniertem Medium insbesondere in den ersten Tagen nach Inkulturnahme schneller eine höhere Konfluenz erreicht wurde, wenn die Zellen mit RosetteSep™ + SepMate™ isoliert worden waren. Dies lässt sich sehr wahrscheinlich durch die höhere Reinheit der Zellen sowie die höhere Zellzahl nach Anwendung dieser Methode erklären. Die mittels MACS isolierten Zellen proliferierten in konditioniertem Medium hingegen tendenziell schneller in den Well-Platten, in denen die Überstände kultiviert wurden. Bei der Isolierung mittels MACS werden Zellen mit magnetischen Beads beladen, was die Ausbildung von interzellulären Verbindungen und möglicherweise auch das Anwachsen in den Kultureinheiten aufgrund mechanischer Effekte vermindern könnte, sodass die Zellen vermehrt in Suspension und damit in höherer Zahl in den Überständen vorliegen könnten. In dieser Arbeit wurden jedoch nicht die gewünschten Zellen mit Beads markiert, sondern über eine Negativselektion die CD45-positiven-Zellen, sodass der Effekt eines direkten Einflusses durch die Beads auf die zu isolierenden Zellen möglichst vernachlässigbar sein sollte. Laut Informationen von Miltenyi Biotec erfolge die Bindung der Microbeads nur an sehr wenige Zellepitope (meist nur etwa 1/3 der Epitope, abhängig vom Epitop) und die aus einem Dextran und Eisenmolekülen aufgebauten Viruspartikel-großen (etwa 50 nm) Beads würden nach der Isolierung in Kultur degradieren (die Geschwindigkeit des Abbaus der Microbeads ist dabei abhängig vom Zelltyp und den Kulturbedingungen) und sollten Zell-Zell-Interaktionen somit nicht signifikant beeinflussen (Produktinformation

„MACS® Cell Separation“ der Firma Miltenyi Biotec) [37]. Zudem seien bisher keine Veränderungen auf Transkriptomebene oder zytotoxische Effekte nachweisbar gewesen, selbst wenn die Beads in den Blutkreislauf eines Probanden zurückgegeben worden waren [117–120]. Ließe sich die zufällige Beobachtung in wiederholten Versuchen reproduzieren, bliebe ggf. noch die Erklärung, dass trotz der Waschschriffe eventuell einige Beads-gebundene CD45-Zellen, die nicht von der Säule zurückgehalten wurden, sowie einige ungebundene Beads in der Zellsuspension nach der Isolierung vorlagen. Diese degradierten dann möglicherweise nur langsam und könnten somit initial doch solange einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation der gewünschten Zellen gehabt haben, bis sie vollständig abgebaut waren, was eventuell erst nach Überführung der Zellen aus den Überständen in die *Wells* der Fall war. Dies könnte dann wiederum die bessere Proliferation in den *Wells* erklären. Allerdings gilt zu beachten, dass beim Einsatz des Standardmediums in beiden Zellkultureinheiten keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Zellzahl nachweisbar waren. Es könnte somit sinnvoll erscheinen, in zukünftigen Versuchen mögliche Interaktionen zwischen Bestandteilen des Konditionierten Mediums und den Substraten der Isolierungsmethoden zu prüfen. Weiterhin legt diese Beobachtung nahe, dass vermutlich die Wahl der geeigneteren Isolierungsmethode zwar aufgrund einer höheren Reinheit der gewünschten Zellen bessere Startbedingungen für eine Zellkultur bieten könnte, jedoch letztlich vor allem das passende Medium von größerer Bedeutung ist, um eine effiziente initiale und auch im Verlauf anhaltende Proliferation zu erreichen. Dieser Aspekt wird im Folgenden noch eingehender diskutiert.

Hinsichtlich der eingesetzten Kultureinheiten zeigte sich, dass sowohl die HCC4006-Zellen in einer 24-Well-Platte als auch die von der Größe her kleineren SW620-Zellen in einer 48-Well-Platte innerhalb von 30 bis 40 Tagen eine Konfluenz von 100 % im Standardmedium erreichten. Hierdurch konnte zunächst bestätigt werden, dass die verwendeten Zelllinien prinzipiell in ihrem Standardmedium sowie auf aus Kunststoff bestehenden Flächen wachsen konnten, sodass die verwendeten Kultureinheiten für die weiteren Versuche als geeignet angesehen wurden. Dass die Wahl einer geeigneten Kultureinheit entscheidend sein kann, versuchten auch Arbeitsgruppen, denen die Etablierung einer CTC-Zelllinie gelang, zu berücksichtigen (Tabelle 2). Anhand des Erfolgs einiger dieser Arbeitsgruppen lässt sich vermuten, dass die Anwendung von Well-Platten oder Chamberslides für die Kultivierung von CTCs nicht prinzipiell ungeeignet ist. Dass in dieser Arbeit allerdings im Verlauf kein signifikantes Wachstum der Zellen aus den klinischen Proben zu verzeichnen war, könnte dafür

sprechen, dass die eingesetzten Chamberslides zum Beispiel bezüglich ihrer Größe oder ihres Materials eventuell nicht für die Kultivierung von CTCs optimal sind, insbesondere wenn man die Einflussfaktoren „initiale Zellzahl“ und „Zelldifferenzierung“ berücksichtigt.

In einer 7,5 mL Blutprobe befinden sich meist nur sehr wenige CTCs (siehe Kapitel 1.1.3). Bei den *Spiking*-Versuchen in dieser Arbeit konnten sich bei 100.000 eingesetzten Zellen in den meisten Kultureinheiten große Zellverbände ausbilden, da die Zellen bereits initial in einer höheren Dichte vorlagen und dementsprechend vermutlich besser konfluieren konnten. Nach Reduktion der *Spiking*-Zellzahl auf 100 lagen die Einzelzellen in der gewählten Kultureinheit jedoch eventuell zu weit auseinander, um ausreichend Zell-Zell-Interaktionen einzugehen, was nahelegt, dass die Wahl einer geeigneten Größe für die Kultureinheit in Kombination mit einer möglichst hohen Ausgangszellzahl von Bedeutung ist. Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass bisher nur dann erfolgreich CTC-Zelllinien etabliert werden konnten, wenn die initiale Zellzahl zum Beispiel bei über 80 (Wang *et al.* [78]) oder über 300 (Cayrefourcq *et al.* [72]) lag. Um überhaupt solch eine hohe CTC-Zahl nutzen zu können, mussten teilweise bis zu 70 klinische Proben analysiert werden. Unveröffentlichte Daten einer Verdünnungsreihe aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass auch bei Primärtumorzellen eine Zellzahl von initial mindestens 200 optimal zum Erreichen einer Konfluenz in konditioniertem Medium ist. Zwar konnte in dieser Arbeit im Rahmen des *Spiking*-Modells gezeigt werden, dass auch nur 25 Zellen in einer Kammer durchaus einen großen Zellverband bilden können, doch war dies nur in wenigen Fällen möglich (siehe Kapitel 4.1.4.1). Für die meist erfolglose Kultivierbarkeit von Einzelzellen bzw. nur in geringer Anzahl vorliegenden Zellen scheint auch die Anoikis eine Rolle zu spielen. Darunter versteht man eine Form der Apoptose, die durch einen Verlust von Zell-Matrix-Interaktionen ausgelöst wird und vor allem bei Zellen auftritt, die sich aus ihrem Zellverband gelöst haben, so wie es bei CTCs meist der Fall ist [121, 122]. Optimalerweise hätten von jedem Patienten mehrere Blutproben abgenommen, die CTCs darin quantifiziert werden und anhand ihrer Anzahl über die benötigte Größe der Kultureinheit entschieden werden können. Allerdings wären hier wiederholte Blutentnahmen von ohnehin schon krankheitsbedingt belasteten Patienten nötig gewesen, die wiederum aufgrund der geringen Anzahl an nicht gleichmäßig im Blutstrom verteilten CTCs sehr wahrscheinlich keine identischen Werte geliefert hätten, sodass die Zellzahl in dem Probenröhrchen, das für die Kultur verwendet werden soll, letztlich nicht eindeutig bestimmbar wäre. Alternativ hätte ein Teil der Zellsuspension nach der Isolierung zur Quantifizierung der CTCs entnommen werden können, wobei dies wiederum zu einem Verlust ohnehin schon rarer Zellen geführt hätte und nicht eindeutig wäre, ob die

entnommene Probe repräsentativ für die Gesamtprobe ist. Idealerweise müsste die komplette Zellsuspension nach der Isolierung einer vollautomatischen Zellzählung unterzogen und direkt im Anschluss in Kultur gegeben werden, wie es Zhang, L. *et al.* bei der Isolierung von CTCs bei Brustkrebspatientinnen mittels FACS taten [81]. Da das FACS allerdings aufgrund z. B. des Einflusses von Antikörpern und mechanischen Stresses den hier genannten Ansprüchen nicht gerecht wird, wurde es im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet, sondern die aus den Patientenproben isolierten Zellen direkt in Kultur gegeben.

Betrachtet man weiterhin den Faktor „Zelldifferenzierung“ in Zusammenhang mit der Beschaffenheit der verwendeten Kultureinheiten, so könnte die Verwendung von Well-Platten und Chamberslides insbesondere dann Nachteile mit sich bringen, wenn die zu kultivierenden Zellen eher ein nicht-adhärenthes Wachstum bevorzugen. Bei den *Spiking*-Versuchen mit 100 Zellen waren die Zellen innerhalb der ersten Woche nur intermittierend sichtbar, also bei einigen Medienwechseln auch bei sorgfältiger Betrachtung aller Gesichtsfelder unter dem Lichtmikroskop nicht mehr erkennbar, bildeten aber dennoch nach zwei Wochen Zellverbände aus. Da bei den Medienwechseln jeweils nur ein geringer Teil des verbrauchten Mediums pro Kammer entfernt und dann frisches Medium aufgefüllt wurde, um so einen Zellverlust zu vermindern, wäre es möglich, dass die Zellen initial das Wachstum in Suspension präferierten. Dieser These gehen auch viele Versuche in der heutigen Forschung nach. So versuchten Park *et al.* [123] eine Methode zur Kultivierung von CTCs in Suspension zu etablieren. Bisher konnten zwar noch nicht die für unterschiedliche CTC-Entitäten optimalen Bedingungen für solche Kultivierungsversuche identifiziert werden, doch Triantafyllu *et al.* gelang es nachzuweisen, dass die Kultivierung von Tumorzellen in Suspension zu einer stärkeren Induktion der EMT und unter zusätzlichem Einfluss von Scherkräften auch zu einem vermehrten Auftreten von *Cancer stem cells* (CSCs) führte, verglichen mit Zellen, die adhären wuchsen [124]. Im Umkehrschluss könnte daher auch vermutet werden, dass diese durch einen eher mesenchymalen Phänotyp gekennzeichneten Zellen in Suspension besser proliferieren. Auch Grillet *et al.* zeigten, dass CSCs einen Überlebensvorteil erhalten, wenn die Zellen in Suspension kultiviert werden und Sphäroide ausbilden [79]. Möglicherweise handelte es sich daher in dieser Arbeit bei den Zellen, die erst im Verlauf als adhären identifiziert werden konnten, um EMT-Zellen oder CSCs. Dies lässt vermuten, dass eine Kombination aus Suspension und ggf. Scherkräften, die durch eine kontinuierliche Bewegung des Mediums mit bestimmter Geschwindigkeit künstlich ausgelöst werden könnten, die Bedingungen, denen die CTCs im Blutkreislauf eines Patienten ausgesetzt sind, am treffendsten abbilden könnte.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die in Chamberslides kultivierten Zellen grundsätzlich eine höhere Dichte in den Ecken bzw. an den Wänden der Kultureinheit aufwiesen und die Zellkolonien sich generell von den Seiten her zum Zentrum hin ausbreiteten. Dies legt die Vermutung nahe, dass die in dieser Arbeit betrachteten Zelltypen eine 3D-Umgebung präferieren. Diese Bevorzugung einer 3D-Umgebung vermuteten auch bereits andere Arbeitsgruppen und versuchten, 3D-Kulturmodelle zu etablieren [76, 125]. Darüber hinaus besteht auch die Ansicht, dass vor allem die CTCs, die die Fähigkeit zur Ausbildung von Tumorsphäroiden besitzen, von besonderer Bedeutung für das Verständnis des Metastasierungsprozesses sein können [126]. Bei den hauptsächlich primär in den Ecken angewachsenen Zellen kann es sich also vornehmlich um solche mit epithelialem Charakter gehandelt haben, die ein adhärentes Wachstum bevorzugen. Indem diese Zellen gerade in den Ecken der Chamberslides in nahem Kontakt zu drei Plastikwänden gleichzeitig standen, bot sich ihnen eine größere Adhärenzfläche, als es im Zentrum der Kammer der Fall gewesen wäre, sodass sie dort vermutlich besser proliferieren konnten. Es kann daher vermutet werden, dass nicht-adhären wachsende CTCs schneller in die Seneszenz eintreten und somit schlechter kultivierbar sind [75]. Eine alternative Erklärung könnte jedoch auch die Zirkulation des Mediums sein, wenn die Kultureinheiten zwecks Mediumwechsel aus dem Brutschrank genommen und wieder hineingestellt worden waren. Hierdurch könnte es trotz sacher Handhabung aufgrund der nicht zu vermeidenden Bewegung zur Einwirkung von leichten Zentrifugalkräften auf die Zellen gekommen sein, die dazu führten, dass die Zellen etwas in die Ecken bzw. an die Ränder der Kultureinheit gedrängt wurden. Eine weitere Ursache für dieses Phänomen könnte in einer temperaturbedingten Zirkulation der Zellen liegen. Wenn das Medium im Brutschrank an der Unterfläche und den Seiten der Chamberslides schneller warm wird, steigt es eventuell außen auf und sinkt in der Mitte ab, sodass die Zellen nach außen an den Rand gespült würden.

Vergleicht man nun im Weiteren zunächst die von den Arbeitsgruppen in Tabelle 2 verwendeten Kulturbedingungen mit denen aus dieser Arbeit, lassen sich einige Parallelen aufweisen. So wurde ebenfalls das RPMI1640-Medium (hier als Standardmedium bezeichnet) mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> angewendet. Darunter konnte in dieser Arbeit auch eine Proliferation von einzelnen mutmaßlichen CTCs aus klinischen Proben beobachtet werden, allerdings nur in sehr geringem Ausmaß, wobei die Zellen keine Konfluenz erreichten und nach wenigen Wochen nicht mehr nachweisbar waren (siehe Kapitel 4.2.1). Auf der Suche nach den optimalen Kulturbedingungen stellt sich für die Planung weiterer Versuche daher die Frage, inwieweit die Zugabe häufig verwendeter

Komponenten wie zum Beispiel EGF, FGF, B27 oder Insulin-Transferrin-Selen zur Erhöhung der Erfolgsrate führen kann. Zudem könnte auch die Sauerstoffkonzentration in der Kultureinheit eine Rolle spielen, wobei von den oben genannten Arbeitsgruppen Kulturerfolge sowohl unter stets normoxischen als auch initial hypoxischen Bedingungen erzielt wurden. Hier bleibt noch zu klären, ob und inwieweit unterschiedliche Entitäten, insbesondere für die Initiierung einer hohen Proliferationsrate, von verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen abhängig sind. Obwohl ein unzureichendes Sauerstoffangebot im Allgemeinen zum Zelltod führen kann (siehe auch Kapitel 5.3.2), sollte hinsichtlich des Einflusses von Hypoxie auf Tumorzellen bedacht werden, dass diese auch zur vermehrten Expression von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF) führen kann, wodurch die Proliferation resistenter Tumorzellen gefördert werden kann [127–130]. Bedingt ist dies u.a. durch den Einfluss der HIFs auf diverse intrazelluläre Signalwege [131–133], die Verminderung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und somit die Erhöhung der genetischen Stabilität [134, 135]. Über die HIFs kann jedoch auch ein Caspase-abhängiger nekroseähnlicher Zelltod ausgelöst werden [136, 137]. Während die Hypoxie initial also einen Vorteil darstellt, den sich beispielsweise Cayrefourcq *et al.* bei der Etablierung ihrer CTC-Zelllinie zunutze machten [72], könnte sich ihr dauerhafter Einfluss vermutlich nachteilig auf die Aufrechterhaltung der Proliferationsfähigkeit der Zellen auswirken, weshalb im Verlauf der Kultivierung ein Wechsel zu normoxischen Bedingungen erfolgte. Weiterhin kann Hypoxie-vermittelt die EMT induziert [28, 29, 138] und damit ein Überlebensvorteil erreicht werden (siehe Kapitel 1.1.2), wobei Nurwidya *et al.* zeigen konnten, dass dieser Mechanismus durch eine Inhibition des IGF1-Rezeptors reversibel ist, was im therapeutischen Kontext in Zukunft von Bedeutung sein könnte [139]. Ebenso kann Hypoxie die Lebensdauer von Stammzellen verlängern [134], dementsprechend auch die von *Cancer Stem Cells* (CSCs), was dazu beitragen könnte, dass möglichst wenige der unterschiedlichen Phänotypen von Tumorzellen verloren gehen. Hypoxische Bedingungen scheinen also insbesondere zu Beginn der Zellkultur von Bedeutung zu sein.

Die größten Unterschiede beim Wachstumsverhalten wurden jedoch in Abhängigkeit von den eingesetzten Medien beobachtet. Das hier verwendete Konditionierte Medium in Kombination mit dem Rho-Kinase (ROCK) Inhibitor Y27632 wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen wie beispielsweise Liu *et al.* [80] und Palechor-Ceron *et al.* [109] für die Kultivierung von Zellen aus verschiedensten Körpergeweben bzw. Organen erfolgreich verwendet. Es wird angenommen, dass sich die im Rahmen der Herstellung des Konditioniertem Mediums verwendeten Fibroblasten durch die Bestrahlung (dann als sog. *feeder cells* bezeichnet)

Modifikationen unterziehen, die sie dazu befähigen, einen proliferativen bzw. immortalisierenden Effekt auf primäre Karzinomzellen auszuüben. Welche Vorgänge auf molekularer Ebene dabei genau eine Rolle spielen, ist bislang noch unklar. Es wird unter anderem vermutet, dass es ca. 48h nach der Bestrahlung über die Freisetzung von bislang noch nicht genauer identifizierten löslichen Faktoren [109] durch apoptotische *feeder cells* zu einer Induktion der Telomerase bzw. hTERT kommt [80, 140]. Im Zusammenspiel mit den dem Medium beigefügten Zusätzen wie zum Beispiel Hydrocortison, EGF und im besonderen Maße auch dem ROCK Inhibitor Y27632 (siehe Kapitel 8.3.3.4) kann eine konditionierte Reprogrammierung sowie Immortalisierung ausgelöst und somit die Proliferation von epithelialen Tumorzellen *in vitro* signifikant erhöht werden.

In der eigenen Arbeitsgruppe konnte durch Einsatz des Konditionierten Mediums bereits eine Proliferation von Primärtumorzellen von Lungenkarzinomen beobachtet werden, wohingegen Primärtumorzellen von Kolorektalen Karzinomen nicht wuchsen. Allerdings sind bis heute noch keine erfolgreichen Versuche zur Kultivierung von Zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) jedweden Ursprungs in Konditioniertem Medium publiziert worden. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, das Konditionierte Medium auch bei der Kultur von Zirkulierenden Tumorzellen einzusetzen. So wuchsen die HCC4006-Zellen in den Chamberslides sowohl im Standardmedium (RPMI1640) als auch im Konditionierten Medium und konnten durch die spätere Immunfluoreszenzfärbung wieder als epitheliale Zellen nachgewiesen werden. Dabei war das Konditionierte Medium hinsichtlich der Proliferationsrate dem Standardmedium innerhalb der ersten Tage nach Inkulturnahme der Zellen tendenziell etwas überlegen, wobei sich dieses Verhältnis im Folgenden zugunsten des Standardmediums umkehrte (vgl. Abbildung 13). Möglicherweise hat der Einsatz von Konditioniertem Medium inklusive Y27632, insbesondere unter Verwendung von RosetteSep™ + SepMate™ zur Isolierung der Zellen und somit höherer Reinheit dieser, einen ähnlichen Effekt auf die initiale Proliferationsrate wie die Anwendung von hypoxischen Bedingungen. Dadurch ließe sich eventuell das in der ersten Woche zu verzeichnende bessere Wachstum der Zellen erklären. Dass im Verlauf das Standardmedium geeigneter erschien und auch die Tatsache, dass jene Zellen in den Well-Platten mit Konditioniertem Medium, die zwischenzeitlich zum Teil größere Zellverbände gebildet hatten, nach etwa vier Wochen kein signifikantes Wachstum mehr aufwiesen, könnte dadurch begründet sein, dass das Konditionierte Medium mit zunehmender Kulturdauer den Ansprüchen der Zellen nicht mehr genüge und daher ein Wechsel zu einem anderen Medium hätte in Betracht gezogen werden können.

Der ROCK Inhibitor scheint dabei essentiell für die Initiierung der Zellproliferation zu sein, denn Liu *et al.* [80] konnten zeigen, dass nur die gleichzeitige Verwendung von Konditioniertem Medium zusammen mit dem ROCK Inhibitor bei Kulturversuchen mit Brust- und Prostata-Karzinomzelllinien das Wachstum initial signifikant verbessern konnte. Es wird vermutet, dass nur bei Anwendung bereits bei Inkulturnahme der Zellen dieser wahrscheinlich durch eine Induktion der Telomerase bedingte stimulatorische Effekt auftritt [80, 109]. Es scheint hierfür also eine direkte Interaktion nötig zu sein, denn die untersuchten Zelllinien wuchsen weder unter Anwendung eines für sie geeigneten Standardmediums trotz Zugabe des ROCK Inhibitors noch in alleiniger Anwesenheit des Konditionierten Mediums bzw. von *feeder cells* [80]. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Inhibitor die terminale Differenzierung der Zellen verhindert und zu einer transienten verstärkten Proliferation führt, wobei er aber in seiner Wirkung nicht die Signale von Seneszenz und *Cell Crisis* übergehen kann, weshalb die gleichzeitige Co-Kultur mit dem Konditionierten Medium nötig ist [109]. Die ROCK Inhibition führt dabei unter anderem zu Veränderungen in der Aktin/Myosin-Aktivität und damit zu einem Remodeling des Zytoskeletts [141], das eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation spielt [142, 143]. Zudem wird eine Beeinflussung des p16/Rb-pathways vermutet [144, 145]. Wie sich in dieser Arbeit zeigte, scheinen also besonders Zellen von Lungenkarzinomen auf den soeben genannten Ebenen von einer ROCK Inhibition sowie einer Telomerase-Induktion beeinflussbar zu sein. Darüber hinaus scheint Y27632 einen Einfluss auf die Verformbarkeit von Erythrozyten und damit auf die Freisetzung von ATP insbesondere unter von niedrigem Sauerstoffgehalt geprägten Bedingungen auszuüben [146]. Daher könnte in zukünftigen Versuchen eine Co-Kultur von CTCs und Erythrozyten, die sonst bisher im Regelfall schon primär bei der Isolierung abzentrifugiert oder danach lysiert wurden, unter hypoxischen Bedingungen erwogen werden. Weiterhin konnten auch Zellen, die bereits in eine Seneszenz-Phase eingetreten waren, teilweise durch Überführung in das Konditionierte Medium mit ROCK Inhibitor wieder in einen proliferativen Zustand versetzt werden [80, 109]. Es zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit auch, dass schon seit mehreren Passagen in Konditioniertem Medium kultivierte Primärtumorzellen nach erneutem *Splitten* versuchsweise in Konditioniertem Medium, dem allerdings keine zur Komplettierung der Gebrauchslösung nötigen Zusätze beigefügt worden waren, erfolgreich weiterkultiviert werden konnten. Die Grundlösung beinhaltet im Vergleich zur Gebrauchslösung zwar auch die entsprechenden Zusätze, allerdings nicht in derselben Menge, sodass die Konzentration und der Zeitpunkt der Zugabe von Zusätzen für das initiale Wachstum der Zellen durchaus von Bedeutung sein könnten. Da bisher nur wenige

Publikationen zu dieser Thematik zu finden sind, bleibt auch zu klären, ob die Effektivität des Einsatzes von Konditioniertem Medium und ROCK Inhibitor von der Entität eines Karzinoms abhängig ist. In dieser Arbeit ergaben sich durchaus Hinweise darauf, dass die Entität eine entscheidende Rolle spielen könnte. Während sowohl Zellen des Primärtumors von Lungenkarzinompatienten als auch Zellen der pulmonalen Metastasenzelllinie HCC4006 erfolgreich in Konditioniertem Medium kultiviert werden konnten, gelang dies weder bei Primärtumorzellen von Kolorektalen Karzinomen noch bei Zellen der kolorektalen Metastasenzelllinie SW620, obwohl bei allen betreffenden Versuchen ausreichend Zellen sowie Medium in Kultur gegeben worden waren. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die Zellen von Kolorektalen Karzinomen generell andere Wachstumsbedingungen benötigen als vom Konditionierten Medium vermittelt, oder dass das Verhältnis bzw. die Konzentrationen der verwendeten Zusätze angepasst werden müssen. So scheint das Medium Bestandteile zu enthalten, die bei den HCC4006-Zellen die Proliferation fördern, wohingegen genau diese oder weitere Bestandteile bei den SW620-Zellen nicht als Wachstumsreiz genügen oder die Proliferation sogar verhindern. In diesem Kontext könnte der ROCK Inhibitor Y27632 nicht nur eine Spezifität hinsichtlich der Tumorentität aufweisen, sondern möglicherweise auch abhängig von der Wachstumsrate der betrachteten Zellen sein. Palechor-Ceron *et al.* [109] beschrieben, dass durch das Entfernen des Inhibitors sowie des Konditionierten Mediums die Hemmung der terminalen Differenzierung wieder aufgehoben werden und die kultivierten Zellen bis zur Seneszenz normal differenzieren konnten. Es ließe sich in Betracht ziehen, dass die SW620-Zellen aufgrund einer geringen Zellverdopplungszeit von etwa 26 Stunden (Datenblatt zur Zelllinie SW620-CCL227 der Firma ATCC) und einem somit schnelleren Zellzyklus verhältnismäßig weniger von der vor allem differenzierungshemmenden Wirkung des ROCK Inhibitors beeinflusst werden als die HCC4006-Zellen, die sich nur etwa alle 41 Stunden verdoppeln (Datenblatt zur Zelllinie HCC4006-CRL2871 der Firma ATCC). Dadurch würden die SW620-Zellen zügiger in die Seneszenz und im Verlauf auch schneller in die Apoptose oder auch Nekrose eintreten, was die in dieser Arbeit beobachtete unzureichende Proliferation und den Nachweis von Zellfragmenten erklären könnte. Dieser Effekt würde vermutlich zusätzlich verstärkt, wenn die Menge bzw. Zusammensetzung des Konditionierten Mediums nicht optimal auf die Ansprüche der Zellen abgestimmt ist. Darüber hinaus scheint nicht nur die Art des Karzinoms an sich, sondern auch die Differenzierung innerhalb einer Entität von Bedeutung zu sein. Während die Primärtumorzellen aus den hier verwendeten klinischen Proben zum Teil gut im Konditionierten Medium wuchsen,

kam es bei den vom selben Patienten stammenden mutmaßlichen CTCs zu keiner ausreichenden Proliferation, um eine deutliche Konfluenz erreichen zu können. Kann man unter weiterer Optimierung der Kulturbedingungen, insbesondere auch der Größe der Kultureinheiten, ausschließen, dass das mangelnde Wachstum der Zellen allein durch ihre zu geringe Anzahl in Kultur bedingt ist, so bestätigt diese Beobachtung die in der Literatur vielfach getroffene Aussage, dass CTCs nicht nur als bloße Abkömmlinge der Primärtumorzellen, sondern als eigene Zellentität mit im Vergleich zu ihren Ursprungszellen unterschiedlichen Ansprüchen hinsichtlich der benötigten Nährstoffe und Umgebungsbedingungen anzusehen sind (siehe Kapitel 1.1). Hierfür spricht auch, dass mehrere Arbeitsgruppen bereits nachweisen konnten, dass sich CTCs und die Zellen des Primärtumors auf genetischer Ebene, beispielsweise in Krebs-assoziierten Mutationen, zum Teil deutlich unterscheiden [75, 79]. Sieht man von Unterschieden innerhalb einer Tumorentität ab, so deuten auf die Unterschiedlichkeit von CTCs und Primärtumorzellen auch einige bereits erfolgte Kultivierungsversuche hin, indem Liu *et al.* bei der Etablierung des Konditionierten Mediums dieses erfolgreich auf Brust-Primärtumorzellen anwenden konnten [80], wohingegen Yu *et al.* [75] mit diesem Medium bei CTCs von Brustkrebspatientinnen keine Erfolge erzielen konnten. Insgesamt scheint das Zusammenspiel zwischen den *feeder cells* und den im Kulturmedium befindlichen Zusätzen, insbesondere dem ROCK Inhibitor Y27632, eine Reprogrammierung vor allem primärer Zellen bestimmter Karzinomzelllinien zu vermitteln. Betrachtet man jedoch Versuchsreihen von Arbeitsgruppen, die bereits erfolgreich eine CTC-Zelllinie etablieren konnten, z. B. Cayrefourcq *et al.* [72], so scheinen CTCs hingegen eine besondere Komplexität hinsichtlich der von ihnen beanspruchten Proliferationsbedingungen aufzuweisen (Tabelle 2). Dies legt nahe, dass solch unterschiedliche Bedingungen nicht gleichzeitig allein unter dem Einsatz von Konditioniertem Medium und ROCK Inhibition vereint werden können. Somit stellt das Konditionierte Medium bisher kein Universalmedium zur Verbesserung der Kulturbedingungen aller Entitäten dar, was sich auch anhand der Versuche im Rahmen dieser Arbeit bestätigen lässt.

Für die Etablierung bzw. Optimierung von Kultureinheiten und Kulturmedien scheint im Weiteren auch ein besseres Verständnis der Interaktion zwischen Tumorzellen bzw. CTCs und peripheren Blutzellen (*PBMCs*) von Bedeutung zu sein. In dieser Arbeit zeigten sich nämlich Hinweise für ein unterschiedliches Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen in Abhängigkeit von den hintergründig vorliegenden Zellen. Es bleibt dabei noch unklar, wie die Kulturbedingungen zu optimieren sind, sodass eine proliferationsfördernde Balance zwischen antitumorös wirkenden Zellen (z. B. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) [147])

und solchen, die eine Tumorprogression verstärken (z. B. Neutrophile, die durch Interaktion mit Tumorzellen wachstumsfördernde inflammatorische Mediatoren ausschütten können [148], oder Tumor-assoziierte Makrophagen [149]), erreicht werden kann. Hierbei sollte auch das Expressionsmuster bestimmter Zytokine bedacht werden, das von den Tumorzellen beeinflusst werden und sich auf das Ausmaß der Krankheitsprogression auswirken kann [150]. Nach Analyse der Zelltypen könnten Marker identifiziert werden, gegen die spezifische Antikörper im Rahmen einer Depletion bzw. Selektion gerichtet werden können. Darüber hinaus wäre der Versuch einer Zugabe von bestimmten Tumorprogression-modifizierenden Blutzellen (siehe Kapitel 5.3.3) zur Kultur zu erwägen.

Dass bisher nur wenige Arbeitsgruppen erfolgreich CTC-Zelllinien kultivieren konnten (siehe Kapitel 1.1.5 und Tabelle 2), verdeutlicht die Komplexität des Proliferationsverhaltens dieser Zellen und ihrer Ansprüche an die Inkulturnahme.

### 5.3 CHARAKTERISIERUNG VON (ZIRKULIERENDEN) TUMORZELLEN

#### 5.3.1 *Nachweis des epithelialen Charakters mittels Immunfluoreszenz*

Zur Beurteilung von CTCs wurden bereits zahlreiche Marker beschrieben (Tabelle 1). Der epitheliale Charakter sowohl der HCC4006- als auch der SW620-Zellen nach erfolgter Isolierung und Kultivierung wurde mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung eines gegen Cytokeratine gerichteten Antikörpers [151–153] nachgewiesen und von CD45-positiven Leukozyten abgegrenzt (Abbildung 20 und Abbildung 21). Dies zeigt einerseits, dass die verwendeten Immunfluoreszenz-Färbungen geeignet sind, um epitheliale Tumorzellen nachzuweisen, und andererseits, dass diese Zellen ihren epithelialen Charakter durch Isolierung und Kultivierung in konditioniertem Medium nicht verlieren.

Die etwas schwächere Signalintensität (Grünfärbung) bei den SW620-Zellen kann dadurch bedingt sein, dass der gewählte AE1/AE3-Klon des anti-panCytokeratin-Antikörpers an CK7, 8 und 19 bindet, die für den Nachweis von Lungenkarzinomen etwas spezifischer sind als die übrigen Cytokeratinklassen [55–57], wohingegen das für Kolonkarzinome typischere CK 20 nicht abgedeckt wird.

Durch den Einsatz des anti-CD45-Antikörpers konnte gezeigt werden, dass beide kultivierten Zelltypen kein CD45 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dadurch wird die Abgrenzung zu nicht-epithelialen Zellen ermöglicht. Es gelingt damit auch der Nachweis, dass die Tumorzellen höchstwahrscheinlich nicht die Wirkung dieses Oberflächenproteins und somit eventuell auch nicht die der weißen Blutzellen imitieren. CD45 (auch Rezeptor-Typ

Tyrosinphosphatase C, PTPRC, genannt) hat vielfältige Funktionen [154] und reguliert unter anderem das T- und B-Zell-*Signalling* [155], wodurch es auch zu einer Aktivierung des Immunsystems kommen kann, die vermutlich zu einer Eliminierung von Tumorzellen beitragen würde. Zumindest konnte in einigen Arbeiten nachgewiesen werden, dass sich eine erhöhte Anzahl an CD45-positiven Zellen günstig auf das progressionsfreie Überleben auswirkt [147, 156].

Ein großer Vorteil bei der Verwendung der gewählten Antikörper bestand darin, dass diese sich gegen Oberflächenantigene richten und somit keine Permeabilisierung der Zellen notwendig war. Allerdings konnte dadurch vorrangig auch nur der epitheliale Charakter der Zellen nachgewiesen werden. Um die Zellen, die die EMT oder die MET durchlaufen, und damit auch CTCs mit mesenchymalem Phänotyp darstellen zu können, ist daher noch die Etablierung von weiteren Markern erforderlich. Bei der Auswertung der Färbereien fiel auf, dass einzelne Zellen trotz deutlich im Überschuss hinzugegebener Antikörper eine schwächere Intensität der Färbung aufwiesen. Dies war auch bei den immunzytochemischen Färbungen teilweise zu beobachten. Sieht man von eventuellen technischen Fehlerquellen ab, könnte dies bereits ein kleiner Hinweis darauf sein, dass möglicherweise einige der Zellen bereits die EMT durchlaufen und dementsprechend eine geringere Expression der Oberflächenmarker, gegen die die Antikörper gerichtet sind, aufweisen, was folglich zu einer geringeren Färbungsintensität führt. Dies könnte dann durch eine Etablierung entsprechender Marker getestet werden. Weiterhin wäre die Aussagekraft der Immunfluoreszenzfärbung auch an aus klinischen Proben isolierten CTCs zu prüfen, sobald diese in einer ausreichenden Anzahl kultiviert werden können. Insgesamt stellt die Beurteilung von CTCs mittels Immunfluoreszenz bisher eine zuverlässige Methode zur Charakterisierung dieser Zellen dar. Für eine genauere bzw. weniger aufwendige Analyse der zu untersuchenden Zellen wäre eine automatisierte Beurteilung von CTCs anhand von Immunfluoreszenzfärbungen anzustreben. Ein derartiges Programm wird derzeit im Rahmen des IMI (*Innovations in Medicine Initiative*)-Konsortiums CANCER-ID entwickelt [157].

### 5.3.2 Veränderung der Zellmorphologie durch die Kultivierung

Obwohl durch Immunfluoreszenz-Färbungen der epitheliale Charakter der Zellen auch nach Isolierung und Kultivierung in Konditioniertem Medium bestätigt werden konnte, wurde eine veränderte Morphologie der Zellen in Konditioniertem Medium beobachtet (vgl. Kapitel 4.3.2 sowie Abbildung 21 und Abbildung 23). Hinsichtlich der Zellgrößen von CTCs werden in der Literatur Werte von durchschnittlich 30  $\mu\text{m}$  (mindestens jedoch 8  $\mu\text{m}$ ) beschrieben (vgl. Kapitel 1.1.4 sowie [188]). Vergleicht man die Messwerte aus dieser Arbeit, konnten unter der Berücksichtigung, dass vornehmlich *Spiking*-Zellen einer Metastasenzelllinie betrachtet wurden, annähernd ähnliche Werte aufgezeigt werden (siehe Kapitel 4.3.2 und 4.3.3). Abweichungen zu vergleichsweise höheren Werten könnten beispielsweise durch Einflüsse mechanischer Art beim Färbeprozess bzw. durch die Eigenschaften der verwendeten Zelllinie an sich erklärbar sein. Im Vergleich von Konditioniertem Medium und Standardmedium (siehe Kapitel 4.3.2) war jedoch auffällig, dass bei Ersterem unabhängig von der verwendeten Isolierungsmethode die Zellen hinsichtlich ihres mittleren Diameters signifikant größer waren. Hinsichtlich der Anzahl der Zellkerne zeigte sich nur bei den Zellen, die nach Isolierung mittels MACS in Konditioniertem Medium kultiviert wurden, ein deutlich größerer Anteil im Vergleich zum Standardmedium. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass wegen der Tatsache, dass aufgrund der o.g. Voraussetzungen bei der Analyse der Zellen bei einigen Zellen keine klare Abgrenzung der Zellgrenzen und entsprechend auch nicht der Anzahl der Zellkerne möglich war, hier keine abschließende Aussage zum Einfluss des Konditionierten Mediums auf die Anzahl der Zellkerne getroffen werden kann. Bezüglich der Größe der Zellkerne konnten signifikant höhere Messwerte bei den mittels Konditioniertem Medium kultivierten Zellen detektiert werden, wenn zuvor mittels MACS isoliert wurde. Dass hinsichtlich der Kerngröße keine Signifikanz nach initialer Verwendung von RosetteSep™ + SepMate™ erreicht werden konnte, könnte möglicherweise der Stichprobengröße für die statistische Berechnung geschuldet sein, zumal die absoluten Zahlen (Median und Mittelwert) ebenfalls durchaus zu höheren Messwerten bei dieser Methode tendieren. Zusammenfassend zeigten sich als hauptsächliche Beobachtung je nach paarweiser Betrachtung von Isolierungsmethode und Kulturmedium entweder signifikant oder tendenziell größere Zellen mit größeren (und teilweise auch mehreren) Zellkernen und größerem Anteil an zytoplasmatischen Ausläufern, wenn Konditioniertes Medium verwendet wurde (insgesamt tendenziell begünstigt, wenn mittels RosetteSep™ + SepMate™ isoliert wurde). Diese Beobachtungen lassen mutmaßen, dass das Konditionierte Medium

möglicherweise einen stärkeren Wachstumsreiz auf die Zellen vermittelt als das Standardmedium. Wie in Kapitel 5.3.3 beschrieben, sind maligne Zellen oft durch Veränderungen ihrer Zellkerne bzw. Nukleoli und der Kern-Plasma-Relation gekennzeichnet. Größere Zellkerne bzw. eine höhere Anzahl an Kernen könnte entsprechend Ausdruck eines stärkeren Wachstums sein. Allerdings müsste diese These in zukünftigen Versuchsreihen verifiziert werden, da alternativ, wie auch im nächsten Abschnitt erläutert, die Möglichkeit von entsprechenden Veränderungen im Rahmen von Zelltodprozessen ebenfalls in Betracht käme.

Weiterhin wiesen die Zellen zunehmend längliche Ausziehungen und breit ausladende Zytoplasmata auf, bildeten schmale interzelluläre Brücken und nahmen statt der typischen rundlichen Form ein eher längliches Aussehen an, das morphologisch an Fibroblasten erinnerte. Dies war auch zu beobachten, als die reine kommerzielle Zelllinie HCC4006 in einer T25-Zellkulturflasche mit Konditioniertem Medium kultiviert wurde. In der Literatur werden CTCs bzw. Zellen, die die EMT durchlaufen, als fibroblastenähnlich oder von mesenchymalem Charakter beschrieben (siehe Kapitel 1.1.2). Neben dem Nachweis epithelialer Marker mittels Immunfluoreszenz konnte in dieser Arbeit durch zweimalige Anwendung eines Anti-Fibroblasten-Kits (Miltenyi Biotec) ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Zellen um Fibroblasten handelte (Abbildung 19). Somit konnte auch ausgeschlossen werden, dass im Rahmen der Herstellung des Konditionierten Mediums Fibroblasten (*feeder cells*) im Medium verblieben. Da sowohl die gespikten Zellen im Standardmedium als auch die im Konditioniertem Medium zeitlich und methodisch stets die gleiche Behandlung erfuhren, bedeutet dies, dass die veränderte Morphologie während der Kultivierung im Konditionierten Medium sehr wahrscheinlich aus der Einwirkung bestimmter Bestandteile des verwendeten Mediums resultiert. Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, dass verschiedene Zelllinien im Konditionierten Medium ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigen, während sie in ihrem jeweiligen Standardmedium uneingeschränkt proliferieren. Diesbezüglich kann in zukünftigen Versuchen der Verzicht auf die Zugabe einzelner Zusätze oder eine Veränderung deren Konzentrationen getestet werden. So könnte untersucht werden, ob das Zusammenspiel aus Konditioniertem Medium und ROCK Inhibitor Y27632 über eine Beeinflussung der Zelldifferenzierung (siehe Kapitel 5.2) oder ein Remodeling des Zytoskeletts [141] einen Beitrag zu der im Vergleich zur Ausgangszelle veränderten Morphologie leistet.

Bei vielen HCC4006-Zellen, die im Konditionierten Medium kultiviert worden waren, fiel weiterhin auf, dass diese ein breit ausladendes Zytoplasma aufwiesen. Einerseits könnte

diese Veränderung durch ein erhöhtes Proliferationsbestreben der Zellen erklärbar sein, was prinzipiell positiv für die Kultivierungsabsichten anzusehen wäre. Andererseits wäre jedoch auch eine prämaturne Seneszenz in Betracht zu ziehen [158], getriggert möglicherweise durch reaktive Sauerstoffspezies oder andere DNA-schädigende Einflüsse, die entweder direkt durch bestimmte Inhaltsstoffe des Konditionierten Mediums vermittelt sein könnten, oder dadurch, dass für die Proliferation relevante Stoffe im Medium fehlten. Alternativ könnte eine suboptimale Sauerstoffumgebung während der Kultivierung zur Induktion einer Nekrose geführt oder möglicherweise auch über eine Reduktion der ATP-Konzentration in der Zelle apoptotische in nekrotische Zelltodprogramme überführt haben [159, 160].

Inwieweit die morphologischen Veränderungen der Zellen nach Anwendung des Konditionierten Mediums eventuell einen Selektions- oder Proliferationsvorteil repräsentieren, indem zum Beispiel die länglichen Zellausläufer zu einer besseren Konfluenz der Zellen untereinander bzw. zu verstärkten Zell-Zell-Interaktionen beitragen, war in dieser Arbeit nicht eindeutig zu beurteilen und bleibt Gegenstand möglicher zukünftiger Versuchsreihen.

Hinsichtlich aller analysierten morphologischen Veränderungen gilt zu berücksichtigen, dass es mit der für diese Arbeit zur Verfügung stehenden technischen Ausstattung zwar möglich war, Aufnahmen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zu erstellen, allerdings nicht der gesamte Objektträger automatisiert gescannt werden konnte. Die Morphologie war trotz nicht vollständiger Quantifizierbarkeit der Zellen gut zu beurteilen und die Zellen konnten entsprechend miteinander verglichen werden. Wie bei Zellkulturversuchen generell sollte hierbei jedoch bedacht werden, dass immer kritisch zu hinterfragen ist, inwieweit von den Beobachtungen der Objektträger auf die tatsächlichen Eigenschaften der Zellen in Kultur zu schließen ist. Da dies jedoch ein gängiges Problem bei Zellkulturversuchen ist, wurden die gewählten Methoden in dieser Arbeit als dennoch geeignet für die Analyse der Zellen angesehen.

### *5.3.3 Differenzierung der Zelltypen anhand der Immunzytochemie*

Wie bei der Immunfluoreszenz-Färbung konnte der epitheliale Charakter der im Median 27  $\mu\text{m}$  großen Zellen auch durch immunzytochemische Färbung mit einem anti-pan-Cytokeratin-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 9 und Abbildung 25). Bei den Färbungen waren bei einigen Zellen zudem zwei oder mehr Zellkerne mit einer bildmorphologisch geschätzten Kern-Plasma-Relation von 1 : 3 bis 1 : 2 sichtbar, was zur Bestätigung der Malignität der betreffenden Zellen herangezogen werden kann. Maligne Zellen sind polymorph geformt und weisen häufig eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation

zugunsten der Zellkerne [49] sowie mehrere Nukleoli und als Zeichen einer hohen proliferativen Aktivität zahlreiche Mitosen auf [161]. Die übrigen zwischen 7 und 20  $\mu\text{m}$  großen livide gefärbten Zellen können aufgrund ihrer Größe als weiße Blutzellen interpretiert werden [162]. Wie bereits bei den ungefärbten Cytospins auffällig, zeigten sich auch hier zahlreiche Zellen, die in Clustern aus mindestens zwei Einzelzellen zusammenlagen. Eine solche Clusterbildung konnte ebenfalls bei der Beurteilung von Cytospins, die durch die eigene Arbeitsgruppe im Rahmen der Isolierung von CTCs aus klinischen Proben angefertigt wurden, beobachtet werden. Dabei scheint die Zusammenlagerung der Zellen nicht durch die durchgeführten Arbeitsschritte wie zum Beispiel die Zentrifugation verursacht worden zu sein, da die Cluster zufällig auf den Cytospins angeordnet waren und weder die Mitte noch die Peripherie der Objektträger präferierten. Außerdem findet sich eine unterschiedliche Anzahl von Clustern pro Cytospin und auch nicht auf jedem Cytospin sind diese Zellgruppierungen zu beobachten. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Clusterbildung durch Zell-Zell-Interaktionen vermittelt wird. Hierfür könnte die Expression von Zell-Adhäsions-Proteinen verantwortlich sein. Aceto *et al.* [52] konnten anhand von Untersuchungen an CTCs von Brustkrebspatientinnen feststellen, dass CTC-Cluster im Vergleich zu einzelnen CTCs keine deutlich veränderte Genexpression aufweisen, jedoch durchaus Cluster-assoziierte Gene wie zum Beispiel ein für Plakoglobin kodierendes Gen exprimieren, was zur Zelladhäsion und zur Stabilität der CTC-Cluster führen würde, und häufiger Metastasen ausbilden. Im Kontext der Kultivierung könnte eine Clusterbildung also einen Überlebensvorteil der Zellen darstellen. Da sie, wie auch in dieser Arbeit zu beobachten, allerdings nur einen verhältnismäßig geringen Anteil aller Zellen ausmachen, wäre zu untersuchen, von welchen Faktoren die Clusterbildung abhängig ist, und ggf. die Identifikation bestimmter Zell-Zell-Kontakt-vermittelnder Substanzen (z. B. Heparanase [163]) nötig, die dann im weiteren Kontext Angriffspunkte für eine *targeted therapy* darstellen könnten. Weiterhin war auffällig, dass vor allem nach der Isolierung mittels RosetteSep<sup>TM</sup> + SepMate<sup>TM</sup> viele Tumorzellen von mehreren kleineren etwa 2 bis 7  $\mu\text{m}$  großen Zellen umlagert waren, bei denen es sich um Erythrozyten oder Thrombozyten (evtl. mit Fibrin zwischen den einzelnen Zellen) handeln könnte. Die mögliche Interaktion von Zellen des peripheren Blutsystems mit CTCs könnte für den Prozess der Metastasierung von Bedeutung sein. Die Untersuchungen einzelner Arbeitsgruppen legen nahe, dass Veränderungen von in roten Blutzellen lokalisierten Enzymen eine maligne Transformation der Mukosa bei Kolorektalen Karzinomen begünstigen könnten [164], weshalb eine Modifikation von Erythrozyten, zum Beispiel als

Transportzelle für Chemotherapeutika, für die Therapie von Karzinomen [165, 166] eingesetzt werden könnte. Während man hinsichtlich der Thrombozyten früher eine paraneoplastische Thrombozytose, die mit einem verringerten Überleben einhergeht [167, 168], eher als Folge einer malignen Erkrankung interpretierte, betrachtet man heutzutage die Thrombozyten eher als einen Motor der malignen Progression [169]. Die Thrombozyten können beispielsweise durch eine Interaktion von Tumorzellen mit Monozyten / Makrophagen aktiviert werden und im Verlauf aggregieren sowie inflammatorische Zytokine wie Interleukine und TNF- $\alpha$  induzieren, wodurch es zu einer Schädigung der Endothelzellen der Gefäßinnenwand kommen kann [170, 171]. Durch diesen Vorgang ließen sich nicht nur paraneoplastische Erscheinungen wie Thrombembolien erklären, sondern diesen Mechanismus könnten Tumorzellen auch nutzen, um Gefäße zu invadieren. Darüber hinaus können die Thrombozyten auch eine verstärkte Adhäsion von Tumorzellen am Ort der Metastasenbildung vermitteln [172] sowie mit Neutrophilen [173] und NK-Zellen [174] interagieren, wodurch unter anderem die Zell-vermittelte Elimination von Tumorzellen behindert und die Bildung einer metastatischen Nische begünstigt wird [175]. Weiterhin scheinen Thrombozyten im Zusammenspiel mit Zytokinen pro-angiogene Fähigkeiten zu besitzen, wodurch auch eine Reaktivierung von Tumorzellen aus dem Ruhezustand bewirkt werden könnte [172, 176]. Darüber hinaus scheinen auch Veränderungen auf Ebene der mRNA in Thrombozyten von Karzinompatienten stattzufinden, wodurch es möglich werden könnte, Blutproben bereits früh auf molekulare Spuren von Krebs zu untersuchen, sogar bei verschiedenen Entitäten sowie bei Patienten mit einem nicht metastasierten Karzinom [177]. Berücksichtigt man die Eigenschaften im Hinblick auf Isolierungs- und Kultivierungsmethoden, so kann durch das vermehrte Vorliegen von Thrombozyten bei Verwendung von RosetteSep™ im Vergleich zu MACS möglicherweise auch die höhere Zellzahl und die initial (wenn auch nicht signifikant) bessere Kultivierbarkeit erklärt werden. Für zukünftige Versuche könnte daher erwogen werden, nicht unbedingt eine möglichst hohe Reinheit der gewünschten Zellen erreichen zu wollen, sondern auch den Einfluss hintergründiger Zellen zu beurteilen.

#### 5.4 AUSBLICK

Der Vergleich zweier Methoden zur Isolierung von nicht-hämatopoetischen Zellen einschließlich Zirkulierender Tumorzellen (CTCs) zeigte, dass sowohl mittels eines MACS-basierten Systems als auch mittels RosetteSep™ + SepMate™ vitale Zellen für die anschließende Kultivierung isoliert werden können.

Dennoch war die Ausbeute an Tumorzellen mit etwa einem Fünftel der „gespikten“ Zellen relativ gering. Hier besteht Optimierungspotential: Einerseits könnten *Spiking*-Versuche mit geringeren oder auch höheren Zellzahlen durchgeführt werden, andererseits sollten weitere Methoden, beispielsweise solche, die auf einer Zellgrößenselektion beruhen, in Betracht gezogen werden.

Die Kultivierung von CTCs ist eine wichtige Voraussetzung, um umfangreiche Analysen an diesen Zellen durchführen zu können. In der Literatur sind nur wenige Beispiele für die erfolgreiche Kultivierung von CTCs beschrieben und auch die in dieser Arbeit getesteten Bedingungen in Konditioniertem Medium führten nicht zur gewünschten *in vitro* Expansion der isolierten Zellen. Es sollten daher weitere Kulturbedingungen zur Kultivierung von CTCs untersucht werden. Betrachtet man rückblickend unter anderem die Erfolge in der Anwendung des Konditionierten Mediums, so liegt es nahe, dass CTCs in ihrem Wachstum auch in bedeutendem Maße von sie direkt umgebenden Einflüssen, also vom *Microenvironment*, abhängig sind. In diesem Zusammenhang wäre zum Beispiel die Betrachtung der Wirkung des Chemokins CXCL12 [178–180] sowie des Apoptoseinhibitors Survivin [181, 182] ein Ansatzpunkt für weitere Forschungsbemühungen. Werden Stoffe identifiziert, die einen fördernden oder hemmenden Einfluss auf das CTC-Wachstum haben, dann könnten diese wiederum als Zusätze in Kulturmedien fungieren, um einerseits eine Proliferation von CTCs bzw. EMT-Zellen für deren Analyse zu erreichen bzw. andererseits eine Reduktion der Zellzahl im Rahmen der Etablierung neuer Therapieoptionen zu bewirken. Hinsichtlich der Proliferationsrate könnte zudem verstärkt der Einfluss hypoxischer Kulturbedingungen [28] getestet werden, um die Frage zu klären, ob die Tumorzellen zum Beispiel in weniger gut durchbluteten Endstromgebieten von Körperregionen oder Organen eine Wachstumshemmung erfahren oder ob sie im Gegenteil sogar einen Hypoxie-bedingten Selektionsvorteil im Vergleich zu körpereigenen Immunzellen besitzen und ihren Zellstoffwechsel den Umgebungsbedingungen anpassen können (siehe Kapitel 5.2).

Darüber hinaus bietet auch die Beurteilung der Beeinflussung von CTCs durch Blutzellen, besonders von solchen, die sich um die Tumorzellen lagern (siehe Kapitel 5.3.3), Möglichkeiten für weitere Untersuchungen. Hierbei wäre vor allem der Rolle von Thrombozyten Beachtung zu schenken.

Hinsichtlich der Charakterisierung der Zellen wären weitere spezifische Marker zu etablieren, die eine verbesserte Identifikation von Zellen mit epithelialem Charakter sowie EMT-Zellen und deren Vergleich untereinander ermöglichen. Dieses Markerpanel wiederum könnte dann auf bereits etablierte (auch kommerzielle) Karzinomzelllinien angewendet werden, um zu prüfen, ob diese bereits ohne eine spezifische Veränderung von Kulturbedingungen eine gewisse Anzahl an Zellen enthalten, die die EMT oder auch den reversen Prozess, die MET, durchlaufen. Gleichmaßen interessant wäre die Übertragung dieser Fragestellung auf die Analyse von Blutproben an einem Karzinom erkrankter Patienten. Zwar ist bekannt, dass CTCs mit epithelialem Charakter befähigt sind, Metastasen an tumorfernen Lokalisationen auszubilden, doch scheint noch wenig darüber bekannt zu sein, in welchem Ausmaß zum Beispiel eine Korrelation zwischen der Anzahl an EMT-Zellen und der Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer Metastase besteht. Darüber hinaus ist bisher auch noch nicht klar, ob eine Korrelation zwischen der Anzahl an EMT-Zellen und klinischen Parametern sowie dem Gesundheitszustand eines Patienten besteht.

In diesem Kontext stellt sich auch die Frage, welche noch unbekannt Faktoren Einfluss auf die Initiierung sowohl der EMT als auch des reversen Prozesses, der MET, nehmen und welche Bedingungen darüber entscheiden, ob eine Metastase ausgebildet wird oder nicht. So ist schon lange bekannt, dass viele Karzinomentitäten bestimmte Organe als Metastasierungsorte bevorzugen [183, 184], ohne dass bisher abschließend geklärt werden konnte, welche Bedingungen für diese Präferenzierung vorliegen müssen. Des Weiteren wäre die Etablierung eines zuverlässigen Verfahrens zum Nachweis von nicht fixierten CTCs in Suspension ein weiterer Schritt in Richtung einer Charakterisierung der Zellen in einer realitätsnäheren Umgebung. Hierfür könnte auch zunächst die Identifikation einer geeigneten Größe für die Zellkultureinheiten hilfreich sein.

Auf dem Forschungsgebiet der CTCs stehen also noch Antworten auf zahlreiche Fragen aus. Weitere Erkenntnisse zu den CTCs werden in Zukunft das Verständnis über zahlreiche Karzinomentitäten fördern und zu wichtigen Fortschritten in der Diagnostik und Therapie dieser Erkrankungen führen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Lungenkarzinom und das Kolorektale Karzinom (KRK) belegen in der Statistik der weltweit häufigsten Todesfälle durch Krebserkrankungen den ersten bzw. dritten Platz. Hinsichtlich der Prognose einer Karzinomerkrankung sind insbesondere eine frühe Diagnostik und die Metastasierung des Tumors von Bedeutung. Für die Metastasierung werden dabei vor allem Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) verantwortlich gemacht. Um den Prozess der Metastasierung sowie Eigenschaften der CTCs besser verstehen zu können, sind Fortschritte in der Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von CTCs erforderlich. Daher sollten in dieser Arbeit Isolierungsmethoden und Kultivierungsbedingungen für nicht-hämatopoetische Zellen einschließlich CTCs untersucht werden. Es sollte eine ausreichende Zellzahl für umfangreiche Analysen erzielt werden, um ferner eine genauere diagnostische, prädiktive und prognostische Aussage im Rahmen einer individualisierten Medizin treffen zu können. Hinsichtlich der getesteten Isolierungsmethoden konnten Vorteile bei der Verwendung von RosetteSep™ + SepMate™ gegenüber einem MACS-basierten System in Bezug auf die Handhabbarkeit, Zellausbeute und Reinheit der isolierten Zellen gezeigt werden.

Zur Bestätigung des epithelialen Charakters konnten die Zellen aus dem *Spiking*-Modell mittels Immunzytochemie sowie unter Optimierung eines Immunfluoreszenz-Protokolls erfolgreich gefärbt und nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten die epithelialen Zellen mittels Immunfluoreszenz von CD45-positiven Leukozyten differenziert werden.

Weiterhin wurden *in vitro* Kultivierungsversuche anhand eines *Spiking*-Modells sowie mit CTCs aus Patientenproben unter Anwendung eines Protokolls zur konditionalen Immortalisierung mittels Konditioniertem Medium und Rho-Kinase-Inhibition durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass Zellen einer Lungenmetastasen-Zelllinie in Konditioniertem Medium ihre Morphologie ändern, aber weiter proliferieren und ihren epithelialen Charakter beibehalten. Im Gegensatz dazu proliferierten weder eine Kolonkarzinom-Zelllinie noch CTCs aus Blut von Tumorpatienten in Konditioniertem Medium.

Ein Vergleich zur Kultivierung von CTCs und Zellen des Primärtumors ergab, dass sich die Zellen des Primärtumors kultivieren lassen, während CTCs von denselben Patienten bei gleichen Bedingungen nicht proliferierten. Daraus lässt sich ableiten, dass CTCs im Vergleich zu Zellen des Primärtumors differente Bedingungen für die *in vitro* Kultur benötigen und / oder dass die initiale Anzahl an isolierten CTCs unter Anwendung der bisher zur Verfügung stehenden gängigen Methoden nicht für deren Kultivierung ausreicht.

## 6 ABSTRACT

Among the most common cancer related deaths worldwide lung cancer and colorectal cancer rank first and third, respectively. Concerning the prognosis for cancer patients, early clinical diagnostics and the occurrence of metastases are of particular importance. The ability to form metastases seems to be mediated by circulating tumor cells (CTCs). In order to gain new insights into the characteristics of CTCs and their role in the development of metastases, progress has to be made regarding isolation, cultivation and characterization of CTCs. Therefore, the aim of this work was to assess different isolation techniques as well as conditions for the culture of non-haematopoietic cells including CTCs. The *in vitro* expansion of CTCs should allow comprehensive analyses of CTCs to enable more precise diagnostic, predictive and prognostic insights and hence enable individualized medicine.

The comparison of two isolation methods for CTCs revealed advantages of RosetteSep™ + SepMate™ over a MACS system with respect to handling, cell recovery and purity of the isolated cells.

To prove the epithelial phenotyp, cells from the spiking model could be detected and stained successfully using immunocytochemistry and an optimized immunofluorescence protocol. In addition, epithelial cells could be differentiated from CD45-positive leukocytes by the immunofluorescence.

Furthermore, the *in vitro* culture of tumor cells was assessed using a spiking model and CTCs isolated from blood of cancer patients. Therefore, a protocol for conditional immortalization by conditioned medium and Rho-Kinase inhibition was tested. Under these conditions cells from a lung metastasis cell line showed an altered morphology, but kept proliferating and maintained their epithelial character. In contrast, neither cells derived from a colorectal carcinoma cell line nor CTCs from blood samples from tumor patients grew in conditioned medium.

A comparison between CTCs and cells from the primary tumor showed, that cells from the primary tumor grew fine in conditioned medium, while CTCs from the same patients under identical conditions did not grow. These results suggest that CTCs, compared to cells from the primary tumor, require different conditions for *in vitro* culture and / or that the initial number of isolated CTCs using currently available methods is usually not sufficient for the establishment of a cell culture.

## 7 LITERATUR

1. Statistisches Bundesamt (Destatis) (2022) Häufigste Todesursachen in Deutschland, 2020. [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html), letzter Zugriff am 06.03.2022
2. den Toonder J (2011) Circulating tumor cells: the Grand Challenge. *Lab Chip* 11(3):375–377. DOI 10.1039/c0lc90100h
3. O'Flaherty J D., Gray S, Richard D et al. (2012) Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer. *Lung Cancer* 76(1):19–25. DOI 10.1016/j.lungcan.2011.10.018
4. He S, Li P, Long T, Zhang N, Fang J, Yu Z (2013) Detection of circulating tumour cells with the CellSearch system in patients with advanced-stage head and neck cancer. Preliminary results. *J Laryngol Otol* 127(8):788–793. DOI 10.1017/S0022215113001412
5. Allard W J., Matera J, Miller M C. et al. (2004) Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 10(20):6897–6904. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-04-0378
6. Alix-Panabières C, Pantel K (2014) Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* 14(1):57–62. DOI 10.1039/c3lc50644d
7. Gerges N, Rak J, Jabado N (2010) New technologies for the detection of circulating tumour cells. *Br Med Bull* 94:49–64. DOI 10.1093/bmb/ldq011
8. Lustberg M, Jatana K R., Zborowski M, Chalmers J J. (2012) Emerging technologies for CTC detection based on depletion of normal cells. *Recent Results Cancer Res* 195:97–110. DOI 10.1007/978-3-642-28160-0\_9
9. Alama A, Truini A, Coco S, Genova C, Grossi F (2014) Prognostic and predictive relevance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *Drug Discov Today* 19(10):1671–1676. DOI 10.1016/j.drudis.2014.06.001
10. Tognela A, Spring K J., Becker T et al. (2015) Predictive and prognostic value of circulating tumor cell detection in lung cancer: a clinician's perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 93(2):90–102. DOI 10.1016/j.critrevonc.2014.10.001
11. Truini A, Alama A, Dal Bello M G. et al. (2014) Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients by CellSearch System. *Front Oncol* 4:242. DOI 10.3389/fonc.2014.00242
12. Wang J, Huang J, Wang K, Xu J, Huang J, Zhang T (2013) Prognostic significance of circulating tumor cells in non-small-cell lung cancer patients: a meta-analysis. *PLoS ONE* 8(11):e78070. DOI 10.1371/journal.pone.0078070
13. Romiti A, Raffa S, Di Rocco R et al. (2014) Circulating tumor cells count predicts survival in colorectal cancer patients. *J Gastrointest Liver Dis* 23(3):279–284. DOI 10.15403/jgld.2014.1121.233.arom1
14. Kawahara H, Watanabe K, Toyama Y, Yanagisawa S, Kobayashi S, Yanaga K (2012) Determination of circulating tumor cells for prediction of recurrent colorectal cancer progression. *Hepatogastroenterology* 59(119):2115–2118. DOI 10.5754/hge11970
15. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y et al. (2011) Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci* 102(6):1188–1192. DOI 10.1111/j.1349-7006.2011.01926.x
16. Buil-Bruna N, Sahota T, López-Picazo J-M et al. (2015) Early Prediction of Disease Progression in Small Cell Lung Cancer: Toward Model-Based Personalized Medicine in Oncology. *Cancer Res* 75(12):2416–2425. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-14-2584
17. Cahall C F., Lilly J L., Hirschowitz E A., Berron B J. (2015) A Quantitative Perspective on Surface Marker Selection for the Isolation of Functional Tumor Cells. *Breast Cancer (Auckl)* 9(Suppl 1):1–11. DOI 10.4137/BCBCR.S25461
18. Harouaka R, Kang Z, Zheng S-Y, Cao L (2014) Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther* 141(2):209–221. DOI 10.1016/j.pharmthera.2013.10.004
19. Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Zoli W, Rigaud M (2014) Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. *Ann Transl Med* 2(11):109. DOI 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.04

20. Friedlander T W., Premasekharan G, Paris P L. (2014) Looking back, to the future of circulating tumor cells. *Pharmacol Ther* 142(3):271–280. DOI 10.1016/j.pharmthera.2013.12.011
21. Went P T.H., Lugli A, Meier S et al. (2004) Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Human Pathology* 35(1):122–128. DOI 10.1016/j.humpath.2003.08.026
22. Wagener C, Müller O (2010) *Molekulare Onkologie. Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen, 3., komplett aktualisierte und erweiterte Auflage, S. 293 ff., 360., Thieme, Stuttgart*
23. Okegawa T e. a. (2004) The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochimica Polonica* 51(2):445–457
24. Joosse S A., Gorges T M., Pantel K (2015) Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med* 7(1):1–11. DOI 10.15252/emmm.201303698
25. Kalluri R, Weinberg R A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6):1420–1428. DOI 10.1172/JCI39104
26. Zeisberg M, Neilson E G. (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119(6):1429–1437. DOI 10.1172/JCI36183
27. Davis F M., Azimi I, Faville R A. et al. (2014) Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* 33(18):2307–2316. DOI 10.1038/onc.2013.187
28. Noman M Z., Messai Y, Muret J, Hasmim M, Chouaib S (2014) Crosstalk between CTC, Immune System and Hypoxic Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 7(3):153–160. DOI 10.1007/s12307-014-0157-3
29. Misra A, Pandey C, Sze S K., Thanabalu T (2012) Hypoxia activated EGFR signaling induces epithelial to mesenchymal transition (EMT). *PLoS ONE* 7(11):e49766. DOI 10.1371/journal.pone.0049766
30. Gonzalez D M., Medici D (2014) Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* 7(344):re8. DOI 10.1126/scisignal.2005189
31. Mikolajczyk S D., Millar L S., Tsinberg P et al. (2011) Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood. *J Oncol* 2011:252361. DOI 10.1155/2011/252361
32. Tsai J H., Yang J (2013) Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev* 27(20):2192–2206. DOI 10.1101/gad.225334.113
33. Li S, Li Q (2014) Cancer stem cells and tumor metastasis (Review). *Int J Oncol* 44(6):1806–1812. DOI 10.3892/ijo.2014.2362
34. Mani S A., Guo W, Liao M-J et al. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133(4):704–715. DOI 10.1016/j.cell.2008.03.027
35. Resel Folkersma L, Olivier Gómez C, San José Manso L et al. (2010) Immunomagnetic quantification of circulating tumoral cells in patients with prostate cancer. Clinical and pathological correlation. *Arch Esp Urol* 63(1):23–31
36. Schindlbeck C, Andergassen U, Hofmann S et al. (2013) Comparison of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and disseminated tumor cells in the bone marrow (DTC-BM) of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 139(6):1055–1062. DOI 10.1007/s00432-013-1418-0
37. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*(11):231–238
38. STEMCELL Anwendungsprotokoll RosetteSep CTC-Enrichment Cocktail Containing Anti-CD36 Dokument Nr. 28583, Version 1.2.0, 2016
39. Kulasinghe A, Kenny L, Perry C et al. (2016) Impact of label-free technologies in head and neck cancer circulating tumour cells. *Oncotarget* 7(44):71223–71234. DOI 10.18632/oncotarget.12086
40. Sun Y-F, Yang X-R, Zhou J, Qiu S-J, Fan J, Xu Y (2011) Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* 137(8):1151–1173. DOI 10.1007/s00432-011-0988-y
41. Krebs M G., Hou J-M, Sloane R et al. (2012) Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 7(2):306–315. DOI 10.1097/JTO.0b013e31823c5c16
42. Alix-Panabières C, Pantel K (2016) Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov* 6(5):479–491. DOI 10.1158/2159-8290.CD-15-1483

43. Bardelli A, Pantel K (2017) Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell* 31(2):172–179. DOI 10.1016/j.ccell.2017.01.002
44. Fenizia F, Luca A de, Pasquale R et al. (2015) EGFR mutations in lung cancer. From tissue testing to liquid biopsy. *Future Oncol* 11(11):1611–1623. DOI 10.2217/fon.15.23
45. Sholl L M., Aisner D L., Allen T C. et al. (2016) Liquid Biopsy in Lung Cancer. A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med* 140(8):825–829. DOI 10.5858/arpa.2016-0163-SA
46. Lin C-C, Huang W-L, Wei F, Su W-C, Wong D T. (2015) Emerging platforms using liquid biopsy to detect EGFR mutations in lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 15(11):1427–1440. DOI 10.1586/14737159.2015.1094379
47. Hanssen A, Loges S, Pantel K, Wikman H (2015) Detection of Circulating Tumor Cells in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol* 5:207. DOI 10.3389/fonc.2015.00207
48. Park S, Ang R R., Duffy S P. et al. (2014) Morphological differences between circulating tumor cells from prostate cancer patients and cultured prostate cancer cells. *PLoS ONE* 9(1):e85264. DOI 10.1371/journal.pone.0085264
49. Meng S, Tripathy D, Frenkel E P. et al. (2004) Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 10(24):8152–8162. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-04-1110
50. Bottos A, Hynes N E. (2014) Staying together on the road to metastasis. *Nature*(514):309–310
51. Kulasinghe A, Perry C, Jovanovic L, Nelson C, Punyadeera C (2015) Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers. *Int J Cancer* 136(11):2515–2523. DOI 10.1002/ijc.29108
52. Aceto N, Bardia A, Miyamoto D T. et al. (2014) Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 158(5):1110–1122. DOI 10.1016/j.cell.2014.07.013
53. Hendrix M J. C., SefTOR E A., SefTOR R E. B., Chao J-T, Chien D-S, Chu Y-W (2016) Tumor cell vascular mimicry. Novel targeting opportunity in melanoma. *Pharmacol Ther* 159:83–92. DOI 10.1016/j.pharmthera.2016.01.006
54. Jansson S, Bendahl P-O, Larsson A-M, Aaltonen K E., Rydén L (2016) Prognostic impact of circulating tumor cell apoptosis and clusters in serial blood samples from patients with metastatic breast cancer in a prospective observational cohort. *BMC Cancer* 16:433. DOI 10.1186/s12885-016-2406-y
55. Si L-L, Lv L, Zhou W-H, Hu W-D (2015) Establishment and identification of human primary lung cancer cell culture in vitro. *Int J Clin Exp Pathol* 8(6):6540–6546
56. Man Y, Cao J, Jin S et al. (2014) Newly Identified Biomarkers for Detecting Circulating Tumor Cells in Lung Adenocarcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* 234(1):29–40. DOI 10.1620/tjem.234.29
57. Inoue M, Hiyama K, Nakabayashi K et al. (2012) An accurate and rapid detection of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients based on one-step nucleic acid amplification assay. *Lung Cancer* 78(3):212–218. DOI 10.1016/j.lungcan.2012.08.018
58. Kummer S, Fogarasi M, Canova A, Mota A, Ciesielski T (2002) Cytokeratin 7 and 20 staining for the diagnosis of lung and colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 86(12):1884–1887. DOI 10.1038/sj.bjc.6600326
59. Mohammadi P, Saidijam M, Kaki A, Etemadi K, Shabab N, Yadegarazari R (2016) A Pilot Study of CK19, CK20 and GCC mRNA in the Peripheral Blood as a Colorectal Cancer Biomarker Panel. *Int J Mol Cell Med* 5(1):30–36
60. Vaiopoulos A G., Kostakis I D., Gkioka E et al. (2014) Detection of circulating tumor cells in colorectal and gastric cancer using a multiplex PCR assay. *Anticancer Res* 34(6):3083–3092
61. Aggarwal C, Meropol N J., Punt C J. et al. (2013) Relationship among circulating tumor cells, CEA and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 24(2):420–428. DOI 10.1093/annonc/mds336
62. Voulgari A, Pintzas A (2009) Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 1796(2):75–90. DOI 10.1016/j.bbcan.2009.03.002
63. Wu S, Liu S, Liu Z et al. (2015) Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers. *PLoS ONE* 10(4):e0123976. DOI 10.1371/journal.pone.0123976
64. Mumbarkar P P., Raste A S., Ghadge M S. (2006) Significance of tumor markers in lung cancer. *Indian J Clin Biochem* 21(1):173–176. DOI 10.1007/BF02913090

65. Stieber P e. a. National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Lung Cancer
66. Masin M, Vazquez J, Rossi S et al. (2014) GLUT3 is induced during epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Cancer Metab* 2:11. DOI 10.1186/2049-3002-2-11
67. Sowa T, Menju T, Sonobe M et al. (2015) Association between epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness and their effect on the prognosis of lung adenocarcinoma. *Cancer Med*. DOI 10.1002/cam4.556
68. Chu P, Wu E, Weiss L M. (2000) Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol* 13(9):962–972. DOI 10.1038/modpathol.3880175
69. Chen Q, Ge F, Cui W et al. (2013) Lung cancer circulating tumor cells isolated by the EpCAM-independent enrichment strategy correlate with Cytokeratin 19-derived CYFRA21-1 and pathological staging. *Clin Chim Acta* 419:57–61. DOI 10.1016/j.cca.2013.01.015
70. Lou Z, Wu R-R, Lv L et al. (2014) Prognostic value of CD44 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Int J Clin Exp Pathol*(7):3632–3646
71. Guo T (2016) Culture of Circulating Tumor Cells - Holy Grail and Big Challenge. *Int J Cancer Clin Res* 3(4). DOI 10.23937/2378-3419/3/4/1065
72. Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S et al. (2015) Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res* 75(5):892–901. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-14-2613
73. Eliasova P, Pinkas M, Kolostova K, Gurlich R, Bobek V (2017) Circulating tumor cells in different stages of colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 55(1):1–5. DOI 10.5603/FHC.a2017.0005
74. Maheswaran S, Haber D A. (2015) Ex Vivo Culture of CTCs: An Emerging Resource to Guide Cancer Therapy. *Cancer Res* 75(12):2411–2415. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-15-0145
75. Yu M, Bardia A, Aceto N et al. (2014) Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 345(6193):216–220. DOI 10.1126/science.1253533
76. Zhang Z, Shiratsuchi H, Lin J et al. (2014) Expansion of CTCs from early stage lung cancer patients using a microfluidic co-culture model. *Oncotarget* 5(23):12383–12397. DOI 10.18632/oncotarget.2592
77. Hamilton G, Burghuber O, Zeillinger R (2015) Circulating tumor cells in small cell lung cancer. Ex vivo expansion. *Lung* 193(3):451–452. DOI 10.1007/s00408-015-9725-7
78. Wang Z, Wu W, Wang Z et al. (2016) Ex vivo expansion of circulating lung tumor cells based on one-step microfluidics-based immunomagnetic isolation. *Analyst* 141(12):3621–3625. DOI 10.1039/c5an02554k
79. Grillet F, Bayet E, Villeronce O et al. (2017) Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in ex vivo culture. *Gut* 66(10):1802–1810. DOI 10.1136/gutjnl-2016-311447
80. Liu X, Ory V, Chapman S et al. (2012) ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *Am J Pathol* 180(2):599–607. DOI 10.1016/j.ajpath.2011.10.036
81. Zhang L, Ridgway L D., Wetzel M D. et al. (2013) The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med* 5(180):180ra48. DOI 10.1126/scitranslmed.3005109
82. Nationales Netzwerk Genomische Medizin Lungenkrebs (nNGM) (2021) nNGM-Studienplattform. <https://www.nngm.de/studien/>
83. Aggarwal A, Lewison G, Idir S et al. (2016) The State of Lung Cancer Research. A Global Analysis. *J Thorac Oncol* 11(7):1040–1050. DOI 10.1016/j.jtho.2016.03.010
84. Torre L A., Bray F, Siegel R L., Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65(2):87–108. DOI 10.3322/caac.21262
85. Zentrum für Krebsregisterdaten (2019) Lungenkrebs, 2016. [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Lungenkrebs/lungenkrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Lungenkrebs/lungenkrebs_node.html), letzter Zugriff am 05.01.2020
86. Walter F M., Rubin G, Bankhead C et al. (2015) Symptoms and other factors associated with time to diagnosis and stage of lung cancer: a prospective cohort study. *Br J Cancer* 112 Suppl 1:13. DOI 10.1038/bjc.2015.30

87. Lövgren M, Leveälähti H, Tishelman C, Runesdotter S, Hamberg K (2008) Time spans from first symptom to treatment in patients with lung cancer--the influence of symptoms and demographic characteristics. *Acta Oncol* 47(3):397–405. DOI 10.1080/02841860701592392
88. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0, 2018, AWMF-Registrierungsnummer: 020/007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html>, letzter Zugriff am 16.07.2018
89. Autschbach R, Jacobs M, Neumann U P (Hrsg) (2012) *Chirurgie in 5 Tagen*, 1, S. 35. Springer-Verlag, Heidelberg
90. Böcker W, Denk H, Heitz P U et al. (Hrsg) (2012) *Pathologie. 150 Tabellen ; [+ im Web, mediscript]*, 5. Aufl., S. 613. Urban & Fischer in Elsevier, München
91. Riihimäki M, Hemminki A, Fallah M et al. (2014) Metastatic sites and survival in lung cancer. *Lung Cancer* 86(1):78–84. DOI 10.1016/j.lungcan.2014.07.020
92. Wan J-W, Gao M-Z, Hu R-J et al. (2015) A preliminary study on the relationship between circulating tumor cells count and clinical features in patients with non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med* 3(22):352. DOI 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.11.18
93. Bidard F-C, Peeters D J., Fehm T et al. (2014) Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer. A pooled analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology* 15(4):406–414. DOI 10.1016/S1470-2045(14)70069-5
94. Herold G (2019) *Innere Medizin 2019*, S. 400-406; 490-497. Selbstverl., Köln
95. Britta Janina Wagner, Reinhard Buettner (2020) Immunhistochemische und molekularpathologische Diagnostik von Lungenkarzinomen. *Pathologie* 41(1):3–13. DOI 10.1007/s00292-019-00732-4
96. Kase S, Sugio K, Yamazaki K, Okamoto T, Yano T, Sugimachi K (2000) Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res* 6(12):4789–4796
97. Petersen I (2011) The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch Arztebl Int* 108(31-32):525–531. DOI 10.3238/arztebl.2011.0525
98. Fiori V, Magnani M, Cianfriglia M (2012) The expression and modulation of CEACAM1 and tumor cell transformation. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 48(2):161–171. DOI 10.4415/ANN\_12\_02\_09
99. Beauchemin N, Arabzadeh A (2013) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 32(3-4):643–671. DOI 10.1007/s10555-013-9444-6
100. Grunnet M, Sorensen J B. (2012) Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer* 76(2):138–143. DOI 10.1016/j.lungcan.2011.11.012
101. Syrigos K N, Mutting C M, Roussos C (Hrsg) (2006) *Tumors of the Chest. Biology, Diagnosis and Management*. Springer
102. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M et al. (2010) Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms (Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer). *Pneumologie* 64 Suppl 2:164. DOI 10.1055/s-0029-1243837
103. Peter Kaatschet (2019) *Krebs in Deutschland 2015/2016*, 12. Aufl., S. 17. Robert Koch-Institut, Berlin
104. Zentrum für Krebsregisterdaten (2019) Darmkrebs, 2016. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html), letzter Zugriff am 06.01.2020
105. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.0, 2017, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom>, letzter Zugriff am 16.07.2018
106. Fearon E R. (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 6:479–507. DOI 10.1146/annurev-pathol-011110-130235
107. Vogelstein B, Fearon E R., Hamilton S R. et al. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319(9):525–532. DOI 10.1056/NEJM198809013190901
108. Fearon E R., Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5):759–767

109. Palechor-Ceron N, Supryniewicz F A., Upadhyay G et al. (2013) Radiation induces diffusible feeder cell factor(s) that cooperate with ROCK inhibitor to conditionally reprogram and immortalize epithelial cells. *Am J Pathol* 183(6):1862–1870. DOI 10.1016/j.ajpath.2013.08.009
110. Neutelings T, Lambert C A., Nusgens B V., Colige A C. (2013) Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS ONE* 8(7):e69687. DOI 10.1371/journal.pone.0069687
111. Lin P P., Gires O, Wang D D., Li L, Wang H (2017) Comprehensive in situ co-detection of aneuploid circulating endothelial and tumor cells. *Sci Rep* 7(1):9789. DOI 10.1038/s41598-017-10763-7
112. Leung W (2014) Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. *Clin Cancer Res* 20(13):3390–3400. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-13-1766
113. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari M C., Moretta L (2014) Effect of tumor cells and tumor micro-environment on NK-cell function. *Eur J Immunol* 44(6):1582–1592. DOI 10.1002/eji.201344272
114. Gorges T M., Penkalla N, Schalk T et al. (2016) Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells. *Clin Cancer Res* 22(9):2197–2206. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-15-1416
115. Zhang H, Jia Z, Wu C et al. (2015) In Vivo Capture of Circulating Tumor Cells Based on Transfusion with a Vein Indwelling Needle. *ACS Appl Mater Interfaces* 7(36):20477–20484. DOI 10.1021/acsami.5b06874
116. Juratli M A., Siegel E R., Nedosekin D A. et al. (2015) In Vivo Long-Term Monitoring of Circulating Tumor Cells Fluctuation during Medical Interventions. *PLoS ONE* 10(9):e0137613. DOI 10.1371/journal.pone.0137613
117. Müller P, Gaebel R, Lemcke H et al. (2017) Intramyocardial fate and effect of iron nanoparticles co-injected with MACS® purified stem cell products. *Biomaterials* 135:74–84. DOI 10.1016/j.biomaterials.2017.05.002
118. Lyons P A., Koukoulaki M, Hatton A et al. (2007) Microarray analysis of human leucocyte subsets. The advantages of positive selection and rapid purification. *BMC Genomics* 8:64. DOI 10.1186/1471-2164-8-64
119. Letzkus M, Luesink E, Starck-Schwartz S et al. (2014) Gene expression profiling of immunomagnetically separated cells directly from stabilized whole blood for multicenter clinical trials. *Clin Transl Med* 3:36. DOI 10.1186/s40169-014-0036-z
120. Chakraborty R, Mahendravada A, Perna S K. et al. (2013) Robust and cost effective expansion of human regulatory T cells highly functional in a xenograft model of graft-versus-host disease. *Haematologica* 98(4):533–537. DOI 10.3324/haematol.2012.076430
121. Méhes G, Witt A, Kubista E, Ambros P F. (2001) Circulating Breast Cancer Cells Are Frequently Apoptotic. *Am J Pathol* 159(1):17–20. DOI 10.1016/S0002-9440(10)61667-7
122. Frisch S M., Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124(4):619–626
123. Park J Y., Jeong A L., Joo H J. et al. (2018) Development of suspension cell culture model to mimic circulating tumor cells. *Oncotarget* 9(1):622–640. DOI 10.18632/oncotarget.23079
124. Triantafillu U L., Park S, Klaassen N L., Raddatz A D., Kim Y (2017) Fluid shear stress induces cancer stem cell-like phenotype in MCF7 breast cancer cell line without inducing epithelial to mesenchymal transition. *Int J Oncol* 50(3):993–1001. DOI 10.3892/ijo.2017.3865
125. Song A S., Najjar A M., Diller K R. (2014) Thermally induced apoptosis, necrosis, and heat shock protein expression in 3D culture. *J Biomech Eng* 136(7). DOI 10.1115/1.4027272
126. Pizon M, Zimon D, Carl S, Pachmann U, Pachmann K, Camara O (2013) Heterogeneity of circulating epithelial tumour cells from individual patients with respect to expression profiles and clonal growth (sphere formation) in breast cancer. *Ecancermedicalscience* 7:343. DOI 10.3332/ecancer.2013.343
127. Semenza G L. (2002) HIF-1 and tumor progression. *Pathophysiology and therapeutics. Trends Mol Med* 8(4 Suppl):S62-7
128. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B et al. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 63(5):1138–1143
129. Kaidi A, Williams A C., Paraskeva C (2007) Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol* 9(2):210–217. DOI 10.1038/ncb1534

130. Graeber T G., Osmanian C, Jacks T et al. (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379(6560):88–91. DOI 10.1038/379088a0
131. Liu Y, Yan W, Tohme S et al. (2015) Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9. *J Hepatol* 63(1):114–121. DOI 10.1016/j.jhep.2015.02.009
132. Semenza G L. (2000) HIF-1 and human disease. One highly involved factor. *Genes Dev* 14(16):1983–1991
133. Swinson D E. B., O'Byrne K J. (2006) Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 7(4):250–256. DOI 10.3816/CLC.2006.n.002
134. Kasper C, Egger D (2017) Hypoxie – Wenn weniger (Sauerstoff) mehr (Stammzellen) macht. *Biospektrum* 23(4):404–407. DOI 10.1007/s12268-017-0818-0
135. Estrada J C., Albo C, Benguría A et al. (2012) Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ* 19(5):743–755. DOI 10.1038/cdd.2011.172
136. Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D et al. (2000) BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* 20(15):5454–5468
137. Piret J-P, Mottet D, Raes M, Michiels C (2002) Is HIF-1 $\alpha$  a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 64(5-6):889–892
138. Liu K, Sun B, Zhao X et al. (2015) Hypoxia induced epithelial-mesenchymal transition and vasculogenic mimicry formation by promoting Bcl-2/Twist1 cooperation. *Exp Mol Pathol* 99(2):383–391. DOI 10.1016/j.yexmp.2015.08.009
139. Nurwidya F, Takahashi F, Kobayashi I et al. (2014) Treatment with insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor reverses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 455(3-4):332–338. DOI 10.1016/j.bbrc.2014.11.014
140. Chapman S, Liu X, Meyers C, Schlegel R, McBride A A. (2010) Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *J Clin Invest* 120(7):2619–2626. DOI 10.1172/JCI42297
141. Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K (2010) Rho-kinase/ROCK. A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67(9):545–554. DOI 10.1002/cm.20472
142. Pawlak G, Helfman D M. (2001) Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11(1):41–47
143. Wirth A (2010) Rho kinase and hypertension. *Biochim Biophys Acta* 1802(12):1276–1284. DOI 10.1016/j.bbadis.2010.05.002
144. Dong M, Yan B P., Liao J K., Lam Y-Y, Yip G W. K., Yu C-M (2010) Rho-kinase inhibition. A novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Discov Today* 15(15-16):622–629. DOI 10.1016/j.drudis.2010.06.011
145. Fridman A L., Tainsky M A. (2008) Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. *Oncogene* 27(46):5975–5987. DOI 10.1038/onc.2008.213
146. Thuet K M., Bowles E A., Ellsworth M L., Sprague R S., Stephenson A H. (2011) The Rho kinase inhibitor Y-27632 increases erythrocyte deformability and low oxygen tension-induced ATP release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(5):H1891-6. DOI 10.1152/ajpheart.00603.2011
147. Pernot S, Terme M, Voron T et al. (2014) Colorectal cancer and immunity. What we know and perspectives. *World J Gastroenterol* 20(14):3738–3750. DOI 10.3748/wjg.v20.i14.3738
148. Hattar K, Franz K, Ludwig M et al. (2014) Interactions between neutrophils and non-small cell lung cancer cells: enhancement of tumor proliferation and inflammatory mediator synthesis. *Cancer Immunol Immunother* 63(12):1297–1306. DOI 10.1007/s00262-014-1606-z
149. Hamilton G, Rath B, Klameth L, Hochmair M J. (2016) Small cell lung cancer. Recruitment of macrophages by circulating tumor cells. *Oncoimmunology* 5(3):e1093277. DOI 10.1080/2162402X.2015.1093277
150. Chang D H., Rutledge J R., Patel A A., Heerdt B G., Augenlicht L H., Korst R J. (2013) The effect of lung cancer on cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS ONE* 8(6):e64456. DOI 10.1371/journal.pone.0064456
151. Barak V, Goike H, Panaretakis K W., Einarsson R (2004) Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem* 37(7):529–540. DOI 10.1016/j.clinbiochem.2004.05.009

152. Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T et al. (2010) Significant high expression of cytokeratins 7, 8, 18, 19 in pulmonary large cell neuroendocrine carcinomas, compared to small cell lung carcinomas. *Pathol Int* 60(2):71–77. DOI 10.1111/j.1440-1827.2009.02487.x
153. Nicolini A, Ferrari P, Rossi G (2015) Mucins and Cytokeratins as Serum Tumor Markers in Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol* 867:197–225. DOI 10.1007/978-94-017-7215-0\_13
154. Hermiston M L., Xu Z, Weiss A (2003) CD45. A critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21:107–137. DOI 10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946
155. Saunders A E., Johnson P (2010) Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell Signal* 22(3):339–348. DOI 10.1016/j.cellsig.2009.10.003
156. Pagès F, Berger A, Camus M et al. (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353(25):2654–2666. DOI 10.1056/NEJMoa051424
157. Zeune L, van Dalum G, Decraene C et al. (2017) Quantifying HER-2 expression on circulating tumor cells by ACCEPT. *PLoS ONE* 12(10):e0186562. DOI 10.1371/journal.pone.0186562
158. Magalhães J P. de, Passos J F. (2018) Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev* 170:2–9. DOI 10.1016/j.mad.2017.07.001
159. Skulachev V P. (2006) Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* 11(4):473–485. DOI 10.1007/s10495-006-5881-9
160. Zhang X, Chen L (2016) The recent progress of the mechanism and regulation of tumor necrosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 142(2):453–463. DOI 10.1007/s00432-015-1997-z
161. Krams M, Frahm S O., Kellner U, Mawrin C, Schüller S (2013) *Kurzlehrbuch Pathologie, 2., aktualisierte Aufl. Kurzlehrbuch.* Thieme, Stuttgart
162. Schiebler T H., Korf H-W (2007) *Anatomie. Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie, 10., vollständig überarbeitete Auflage, S. 129-132.* Steinkopff Verlag, Darmstadt
163. Wei R-R, Sun D-N, Yang H et al. (2018) CTC clusters induced by heparanase enhance breast cancer metastasis. *Acta Pharmacol Sin.* DOI 10.1038/aps.2017.189
164. Notarnicola M, Caruso M G., Tutino V, Guerra V, Misciagna G (2011) Low red blood cell levels of deglycating enzymes in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 17(3):329–333. DOI 10.3748/wjg.v17.i3.329
165. Wang C, Sun X, Cheng L et al. (2014) Multifunctional theranostic red blood cells for magnetic-field-enhanced in vivo combination therapy of cancer. *Adv Mater Weinheim* 26(28):4794–4802. DOI 10.1002/adma.201400158
166. Godfrin Y, Horand F, Cremel M (2012) Can red blood cells prove to be a useful tool in tumor immunotherapy? *Immunotherapy* 4(9):871–873. DOI 10.2217/imt.12.88
167. Sharma D, Brummel-Ziedins K E., Bouchard B A., Holmes C E. (2014) Platelets in tumor progression. A host factor that offers multiple potential targets in the treatment of cancer. *J Cell Physiol* 229(8):1005–1015. DOI 10.1002/jcp.24539
168. Stone R L., Nick A M., McNeish I A. et al. (2012) Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med* 366(7):610–618. DOI 10.1056/NEJMoa1110352
169. Franco A T., Corken A, Ware J (2015) Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood* 126(5):582–588. DOI 10.1182/blood-2014-08-531582
170. Li R, Ren M, Chen N et al. (2014) Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis. *BMC Cancer* 14:167. DOI 10.1186/1471-2407-14-167
171. Heine H (2015) *Lehrbuch der biologischen Medizin. Grundregulation und extrazelluläre Matrix, 4., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Haug, Stuttgart
172. Kuznetsov H S., Marsh T, Markens B A. et al. (2012) Identification of luminal breast cancers that establish a tumor-supportive macroenvironment defined by proangiogenic platelets and bone marrow-derived cells. *Cancer Discov* 2(12):1150–1165. DOI 10.1158/2159-8290.CD-12-0216
173. Sreeramkumar V, Adrover J M., Ballesteros I et al. (2014) Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346(6214):1234–1238. DOI 10.1126/science.1256478
174. Palumbo J S., Talmage K E., Massari J V. et al. (2005) Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 105(1):178–185. DOI 10.1182/blood-2004-06-2272

175. Labelle M, Begum S, Hynes R O. (2014) Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(30):E3053-61. DOI 10.1073/pnas.1411082111
176. Jain S, Harris J, Ware J (2010) Platelets. Linking hemostasis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(12):2362–2367. DOI 10.1161/ATVBAHA.110.207514
177. Best M G., Sol N, Kooi I et al. (2015) RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell* 28(5):666–676. DOI 10.1016/j.ccell.2015.09.018
178. Cavallaro S (2013) CXCR4/CXCL12 in non-small-cell lung cancer metastasis to the brain. *Int J Mol Sci* 14(1):1713–1727. DOI 10.3390/ijms14011713
179. Teicher B A., Fricker S P. (2010) CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 16(11):2927–2931. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-2329
180. Wald O, Shapira O M., Izhar U (2013) CXCR4/CXCL12 axis in non small cell lung cancer (NSCLC) pathologic roles and therapeutic potential. *Theranostics* 3(1):26–33. DOI 10.7150/thno.4922
181. Atikcan S, Unsal E, Demirag F, Köksal D, Yilmaz A (2006) Correlation between survivin expression and prognosis in non-small cell lung cancer. *Respir Med* 100(12):2220–2226. DOI 10.1016/j.rmed.2006.02.031
182. Krysan K e. a. (2004) Cyclooxygenase-2-Dependent Expression of Survivin in Non-small Cell Lung Cancer. *CHEST*(125):140
183. Géraud C, Koch P S., Damm F, Schledzewski K, Goerdts S (2014) The metastatic cycle. Metastatic niches and cancer cell dissemination. *J Dtsch Dermatol Ges* 12(11):1012–1019. DOI 10.1111/ddg.12451
184. Liu Y, Cao X (2016) Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell* 30(5):668–681. DOI 10.1016/j.ccell.2016.09.011
185. Yang R-N, Yang S-H, Chang C-C, Chien C-C, Pan S, Huang C-J (2010) Upregulation of fecal cytokeratin 19 is associated with prognosis in older colorectal cancer patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 14(5):703–708. DOI 10.1089/gtmb.2010.0047
186. Bankó et al. (2019) Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *Journal of Hematology & Oncology* 12:48. DOI 10.1186/s13045-019-0735-4
187. Rushton A.J., Nteliopoulos G., Shaw J.A., Coombes R.C. A (2021) Review of Circulating Tumour Cell Enrichment Technologies. *Cancers* 13: 970. DOI 10.3390/cancers13050970
188. Zhou et al. (2019) Isolation of circulating tumor cells in non-small-cell-lung-cancer patients using a multi-flow microfluidic channel. *Microsystems & Nanoengineering* 5:8. DOI 10.1038/s41378-019-0045-6
189. Drucker A, Teh EM, Kostyleva R, Rayson D, Douglas S, Pinto DM (2020) Comparative performance of different methods for circulating tumor cell enrichment in metastatic breast cancer patients. *PLoS ONE* 15(8): e0237308. DOI 10.1371/journal.pone.0237308
190. Sandhya S et al. (2018) Circulating Tumor Cell Isolation, Culture, and Downstream Molecular Analysis. *Biotechnol Adv.* Jul-Aug; 36(4): 1063–1078. DOI 10.1016/j.biotechadv.2018.03.007
191. Guo T, Wang CS, Wang W, Lu Y (2016) Culture of Circulating Tumor Cells - Holy Grail and Big Challenge. *Int J Cancer Clin Res* 3:065. DOI 10.23937/2378-3419/3/4/1065

## 8 ANHANG

### 8.1 TABELLENVERZEICHNIS

|  |     |
|--|-----|
| Tabelle 1 – Auswahl an Markern zur Charakterisierung von Lungenkarzinomen und assoziierten CTCs .....  | 10  |
| Tabelle 2 – Übersicht zu den für die erfolgreiche Etablierung von CTC-Zelllinien verwendeten Kultivierungsmethoden verschiedener Arbeitsgruppen in Abhängigkeit von der Tumor-Entität .....      | 12  |
| Tabelle 3 – Klinische Daten des Patientenkollektivs .....  | 19  |
| Tabelle 4 – Vergleich der Immunfluoreszenz-Färbeprotokolle .....   | 33  |
| Tabelle 5 – Übersicht der verwendeten Filter und Wellenlängen für die Immunfluoreszenzmikroskopie .....  | 34  |
| Tabelle 6 – Effektivität der verwendeten Isolierungsmethoden hinsichtlich der Zellzahl ..  | 40  |
| Tabelle 7 – Vergleich der Isolierungsmethoden MACS und RosetteSep™ + SepMate™ hinsichtlich der Effizienz.....  | 42  |
| Tabelle 8 – Vergleich der Anzahl an Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern sowie Anzahl der Zellkerne in Abhängigkeit von der verwendeten Isolierungsmethode sowie vom verwendeten Medium ..... | 58  |
| Tabelle 9 – Antikörper für die Isolierung mittels MACS.....  | 106 |
| Tabelle 10 – Primärantikörper.....   | 106 |
| Tabelle 11 – Sekundärantikörper.....   | 107 |
| Tabelle 12 – Detaillierte Daten zur Auswertung der Versuche mittels Immunfluoreszenzfärbung.....   | 108 |

## 8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1 – Epithelial-Mesenchymale Transition im Überblick. ....  | 3  |
| Abbildung 2 – Übersicht bereits etablierter Isolierungsprinzipien.....   | 8  |
| Abbildung 3 – Ziele dieser Arbeit im Kontext der klinischen Behandlung .....   | 17 |
| Abbildung 4 – Übersicht der Arbeitsschritte im <i>Spiking</i> -Modell.....   | 20 |
| Abbildung 5 – Ablauf Zellisolierung bei Verwendung von RosetteSep™ + SepMate™... ..  | 27 |
| Abbildung 6 – Übersicht der Arbeitsschritte bei Verwendung klinischer Proben .....   | 30 |
| Abbildung 7 – Lichtmikroskopischer Vergleich von Zelldichte und Zellhintergrund.....   | 37 |
| Abbildung 8 – Vergleich der Isolierungsmethoden MACS und RosetteSep™ + SepMate™<br>hinsichtlich Zelldichte und Zellhintergrund .....   | 38 |
| Abbildung 9 – Immunzytochemische Färbung der isolierten Zellen .....   | 39 |
| Abbildung 10 – Effektivität der verwendeten Isolierungsmethoden im Hinblick auf die<br>Isolierung von <i>Spiking</i> -Zellen und Verunreinigung durch Blutzellen .....                           | 40 |
| Abbildung 11 – Zellmorphologie in Abhängigkeit vom verwendeten Medium bei<br>HCC4006-Zellen. ....  | 43 |
| Abbildung 12 – Zellmorphologie in Abhängigkeit vom verwendeten Medium bei<br>SW620-Zellen.....   | 44 |
| Abbildung 13 – Zellproliferation in Abhängigkeit vom verwendeten Medium und der<br>verwendeten Isolierungsmethode .....  | 45 |
| Abbildung 14 – Verlauf des Zellwachstums von mittels MACS isolierten Tumorzellen in<br>Chamberslides in Standardmedium und Konditioniertem Medium.....   | 47 |
| Abbildung 15 – Verlauf des Zellwachstums von mittels RosetteSep™+SepMate™<br>isolierten Tumorzellen in Chamberslides in Standardmedium und<br>Konditioniertem Medium .....                       | 47 |
| Abbildung 16 – Verlauf Zellwachstum von mittels RosetteSep™ + SepMate™ isolierten<br>Tumorzellen (100 Zellen) in Chamberslides in Standardmedium.....  | 49 |
| Abbildung 17 – Verlauf des Zellwachstums von mittels MACS bzw. RosetteSep™ +<br>SepMate™ isolierten SW620-Zellen in Chamberslides in Standardmedium<br>bzw. Konditioniertem Medium. ....         | 50 |
| Abbildung 18 – In Konditioniertem Medium kultivierte Zellen des Primärtumors sowie aus<br>Blutproben isolierte in Standardmedium (RPMI1640-Medium) kultivierte<br>Zellen desselben Spenders..... | 53 |
| Abbildung 19 – Aufnahmen von immunzytochemisch gefärbten HCC4006-Zellen nach<br>Anwendung eines Anti-Fibroblasten-Kits. ....   | 54 |

---

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 20 – Immunfluoreszenzaufnahmen von in Konditioniertem Medium kultivierten Zellen .....  | 55 |
| Abbildung 21 – Immunfluoreszenzaufnahmen der kultivierten Zellen.....   | 56 |
| Abbildung 22 – Vergleich der Zellmorphologie in Abhängigkeit vom verwendeten Medium und der verwendeten Isolierungsmethode .....  | 57 |
| Abbildung 23 – Vergleich der Anzahl an Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern sowie Anzahl der Zellkerne in Abhängigkeit von der verwendeten Isolierungsmethode sowie vom verwendeten Kulturmedium ..... | 58 |
| Abbildung 24 – Immunfluoreszenzaufnahmen (beispielhaft) nach der Kultivierung von 100 Zellen der Zelllinie HCC4006 .....  | 59 |
| Abbildung 25 – Repräsentative Aufnahmen der immunzytochemisch gefärbten HCC4006-Zellen nach Isolierung mittels RosetteSep™ + SepMate™ zur Beurteilung der Morphologie und Zellanordnung.....              | 60 |

## 8.3 MATERIALIEN UND ERHOBENE DATEN

## 8.3.1 Geräte

| <u>Bezeichnung</u>   | <u>Hersteller</u>                                |
|--|--|
| Absauger für Zellkultur - Vacuboy                                | Integra  |
| Autoklav   | Steriltechnik AG                                 |
| Brutschränke für Zellkultur                                      | Heraeus, Thermo Scientific, Memmert,<br>Shel Lab |
| Cytospins  |  |
| Cytospintrichter   | Tharmac  |
| Cytospinzentrifuge Cytospin 2                                    | Shandon  |
| Cytospin - Klemmen   | Tharmac  |
| Eismaschine F80C   | Icematic   |
| Feinwaage  | ScalTec  |
| Fluoreszenzmikroskop Biorevo BZ-9000                             | Keyence  |
| Gefrierschränke (-18 °C)   | Liebherr   |
| gentleMACS Dissociator   | Miltenyi Biotec                                  |
| Glaswaren  | Schott Duran                                     |
| Halbautomatische Pipetten<br>(0,5-10 µL, 10-200 µL, 100-1000 µL) | Eppendorf  |
| Kühlschrank  | Gorenje, Bosch                                   |
| Kühlzentrifuge   | Hettich (Rotanta 46 RS)                          |
| Lichtmikroskop Axiovert, Axioplan                                | Zeiss  |
| Linearbeschleuniger Trilogy® System                              | Varian Medical Systems                           |
| MACS Multistand  | Miltenyi Biotec                                  |
| Neubauer Zählkammer improved                                     | BlauBrand  |
| OctoMACS™ Separator  | Miltenyi Biotec                                  |
| Pannoramic DESK  | 3D Histech                                       |
| Pipettierhilfe accu-jet® pro                                     | Brand  |
| QuadroMACS™ Separator  | Miltenyi Biotec                                  |
| Schüttler  | IKA Labortechnik                                 |
| Skalpelle  | Feather  |
| Slide Scanner Pannoramic Desk                                    | 3D Histech/ Intas                                |
| Sterilwerkbank   | Köttermann, Nuairé                               |

|                                   |                   |
|-----------------------------------|-------------------|
| Timer, digital                    | Dostmann/Wertheim |
| Tischzentrifuge                   | Eppendorf         |
| Vakuumpumpe für Zellkultur        | KNF Lab Laboport  |
| Waage                             | Kern              |
| Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q | Millipore         |
| Wasserbäder                       | GFL, Lauda        |
| Zellschaber                       | Sarstedt          |

### 8.3.2 Verbrauchsmaterialien

| <u>Bezeichnung</u>   | <u>Hersteller</u>      |
|--|------------------------|
| CellTrics Filter 30 µm grün                                  | Partec                 |
| Chamberslides 8 Well Permanox® Slide                         | Lab-Tek                |
| Cytospin-Objekträger Shandon                                 | Thermo Scientific      |
| DakoPen (Fettstift)  | DAKO                   |
| Deckgläschen, verschiedene                                   | Menzel, Geyer          |
| Einmalhandschuhe, Nitril                                     | Hartmann               |
| Einmalspritze 10 mL, 20 mL                                   | BD                     |
| Filterkarten für Cytospins                                   | Thermo Scientific      |
| gentleMACS C Röhrchen  | Miltenyi Biotec        |
| MACS SmartStrainer   | Miltenyi Biotec        |
| <i>Magnetic Columns</i> (Säulen: LS, MS)                     | Miltenyi Biotec        |
| Parafilm   | American National Can  |
| Pasteurpipetten  | Assistent              |
| Pipettenspitzen gestopft<br>(10 µL, 200 µL, 1000 µL)         | Biozym Scientific GmbH |
| Pipettenspitzen ungestopft<br>(10 µL, 200 µL, 1000 µL)       | Sarstedt               |
| SepMate™ Röhrchen (50 mL)                                    | STEMCELL Technologies  |
| Serologische Pipetten<br>(2,5 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL) | Greiner Bio-One        |
| S-Monovette® EDTA 9 mL                                       | Sarstedt               |
| Sterifix® 0,2 µm Injektionsfilter                            | Braun                  |
| Sterilfiltrationsflasche 0,2 µm 0,25 L                       | Sarstedt               |
| Sterilfiltrationsflasche 0,2 µm 0,5 L                        | Sarstedt               |

|                                   |                             |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Well-Platten, 24 Wells            | Sigma-Aldrich               |
| Well-Platten, 48 Wells            | Sarstedt                    |
| Well-Platten, 96 Wells            | Greiner Bio-One             |
| Zellkulturflaschen T25, T75, T175 | Sarstedt                    |
| Zellstofftücher                   | Kimberly-Clark Professional |
| Zentrifugenröhrchen (15 mL)       | Sarstedt, Greiner Bio-One   |
| Zentrifugenröhrchen (50 mL)       | Sarstedt                    |

### 8.3.3 Chemikalien

#### 8.3.3.1 Reagenzien

| <u>Bezeichnung</u>   | <u>Hersteller</u>      |
|--|------------------------|
| ACD ( <i>Acid-Citrate-Dextrose</i> )                                     | Sigma-Aldrich          |
| Aceton   | Merck                  |
| Adenin   | Sigma-Aldrich          |
| Amphotericin B   | Life Technologies      |
| Antibiotikum Penicillin/Streptomycin 100x                                | Life Technologies      |
| Antibody diluent, background reducing                                    | Dako                   |
| Apo-Transferrin  | Sigma-Aldrich          |
| Aquatex Eindeckmedium  | Merck                  |
| Bovines Serum Albumine Fraction V (BSA)                                  | Roche Diagnostics GmbH |
| Cholera-Toxin  | Sigma-Aldrich          |
| DAPI   | Sigma-Aldrich          |
| DMEM + GlutaMAX™   | Life Technologies      |
| DMSO   | Merck                  |
| Entmineralisiertes Wasser MQ   | Milliporeanlage        |
| epithelialer Wachstumsfaktor<br>( <i>epithelial growth factor</i> , EGF) | Invitrogen             |
| Ethanol 99 % (v/v)   | Fluka                  |
| FcR-Blocking-Reagenz   | Miltenyi Biotec        |
| Fetales Kälberserum (FBS)  | Life Technologies      |
| Ham's F12 + GlutaMAX™  | Life Technologies      |
| Hydrocortison  | Sigma-Aldrich          |
| Insulin  | Sigma-Aldrich          |
| Isopropanol  | Merck                  |

---

|                                    |                          |
|------------------------------------|--------------------------|
| Leibovitz's-L15-Medium             | Life Technologies        |
| Lymphoprep™                        | STEMCELL Technologies    |
| Methanol                           | Merck                    |
| PBS 1x, steril                     | Life Technologies        |
| ROCK-Inhibitor Y27632              | Enzo Life Science        |
| Tissue Storage Solution            | Miltenyi Biotec          |
| Tris Base                          | Sigma-Aldrich            |
| Tris HCl                           | Sigma-Aldrich            |
| Trypan-Blau                        | Life Technologies        |
| Tween 20                           | Merck                    |
| <i>Vectamount Aqueous Mounting</i> | Vector Laboratories Inc. |
| Eindeckmedium                      |                          |

### 8.3.3.2 Puffer und Lösungen

#### **Blocking-Puffer (ICC)**

5 % Rabbit-Normalserum (v/v) in TRIS-Puffer

#### **Blocking-Puffer (IF) - altes Protokoll**

50 ml 1x PBS

1 % (w/v) BSA

10 µL FcR-Blocking-Reagenz pro Objektträger

#### **Blocking-Puffer (IF) - neues Protokoll**

1x PBS

5 % Maus Normal Serum

10 µL FcR-Blocking-Reagenz pro Objektträger

#### **MACS-Puffer**

500 mL 1x PBS

1 % (w/v) BSA

0,4 % (v/v) ACD

#### **PBS-T**

1 L 1x PBS

0,01 % (v/v) Tween 20

**Reagent alcohol**

90 % (v/v) Ethanol  
 5 % (v/v) Methanol  
 5 % (v/v) Isopropanol

**TRIS-Puffer**

17,56 g NaCl  
 1,8 g Tris Base  
 13,7 g Tris HCL  
 ad 2,5 L MQ Wasser (pH 7,4 - 7,6)

**TRIS-Tween-Puffer**

1 L TRIS-Puffer  
 0,05 % (v/v) Tween 20

**Eindeckmedium für IF**

0,0125 µg/µL DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol), Sigma Aldrich (# D9542)  
 in *Vectamount Aqueous Mounting Medium*

**8.3.3.3 Enzyme und gebrauchsfertige Reaktionssysteme (Kits)**

| <u>Bezeichnung</u>  | <u>Hersteller</u>     |
|---|-----------------------|
| Trypsin / EDTA 0,05 %   | Life Technologies     |
| RosetteSep™ CTC Enrichment Cocktail<br>Containing Anti-CD36 (# 15127) | STEMCELL Technologies |
| Pan T Cell Isolation Kit (# 130-096-535)                              | Miltenyi Biotec       |
| Tumor Dissociation Kit (# 130-095-929)                                | Miltenyi Biotec       |
| Enzym-Mix pro 1 Gewebeprobe:  |                       |
| - Enzym H   | 200 µL                |
| - Enzym R   | 100 µL                |
| - Enzym A   | 25 µL                 |
| - DMEM  | 4,7 mL                |

**8.3.3.4 Medien für die Zellkultur****Leibovitz's-Medium**

500 mL Leibovitz's-L15-Medium  
 10 % FBS  
 1 % Penicillin/Streptomycin  
 Sterilfiltration

**RPMI-Medium**

500 mL RPMI-1640-Medium (ATCC modification)

10 % FBS (v/v)

1 % Penicillin/Streptomycin

Sterilfiltration

**Medium für Kryokonservierung der kommerziellen Zelllinien**

95% jeweiliges Kulturmedium

5% DMSO

**Medium für Kryokonservierung von Zellen aus Gewebeproben**

90 % FBS

10 % DMSO

1  $\mu$ L / mL ROCK-Inhibitor Y27632

**Konditioniertes Medium Gebrauchslösung (+ Zusätze; modifiziert nach****Palechor-Ceron *et al.* [109])**

|                        |                |  |
|------------------------|----------------|--|
| Konditioniertes Medium | 750 $\mu$ L/mL |  |
| F-Medium               | 250 $\mu$ L/mL |  |
| ROCK Inhibitor Y27632  | 2 $\mu$ L/mL   |  |
| Hydrocortison          | 0,8 $\mu$ L/mL |  |
| EGF                    | 0,1 $\mu$ L/mL |  |
| Amphotericin B         | 1 $\mu$ L/mL   | (bei Gewebeproben in der ersten Woche) |

**Konditioniertes Medium (F-Medium (200 mL) + Zusätze pro 200 mL)**

|                         |             |
|-------------------------|-------------|
| DMEM                    | 142 mL      |
| Ham's F12               | 48 mL       |
| FBS                     | 10 mL       |
| Adenin                  | 400 $\mu$ L |
| Insulin                 | 100 $\mu$ L |
| Cholera-Toxin           | 17 $\mu$ L  |
| Penicillin/Streptomycin | 2 mL        |
| ROCK Inhibitor Y27632   | 200 $\mu$ L |
| Amphotericin B          | 200 $\mu$ L |
| Hydrocortison           | 160 $\mu$ L |
| EGF                     | 20 $\mu$ L  |

### 8.3.3.5 Antikörper

Es wurden Antikörper gegen Oberflächenmarkerproteine für Separationsverfahren und Detektionsmethoden mittels Immunfluoreszenz und -zytochemie verwendet (Tabellen 9, 10, 11).

**Tabelle 9 – Antikörper für die Isolierung mittels MACS**

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Konjugat</u> | <u>Klonalität</u> | <u>Wirt</u> | <u>Hersteller,<br/>Produktnummer</u> |
|--------------------|-----------------|-------------------|-------------|--------------------------------------|
| anti-CD45          | MACS Microbeads | monoklonal        | Maus        | Miltenyi Biotec,<br># 130-045-801    |
| anti-Fibroblasten  | MACS Microbeads | monoklonal        | Maus        | Miltenyi Biotec,<br># 130-050-601    |

**Tabelle 10 – Primärantikörper**

| <u>Bezeichnung</u>          | <u>Konjugat</u> | <u>Verdünnung</u>      | <u>Klonalität</u> | <u>Wirt</u> | <u>Hersteller,<br/>Produktnummer</u> |
|-----------------------------|-----------------|------------------------|-------------------|-------------|--------------------------------------|
| anti-panCytokeratin AE1/AE3 | Alexa Fluor488  | 1 : 200<br>bis 1 : 400 | monoklonal        | Maus        | eBioscience,<br># 53-9003-82         |
| anti-CD45 RA3-6B2           | Alexa Fluor594  | 1 : 30                 | monoklonal        | Ratte       | BioLegend,<br># 103254               |
| anti-panCytokeratin C-11    | unkonjugiert    | 1 : 200                | monoklonal        | Maus        | abcam,<br># ab7753                   |

Der anti-panCytokeratin-Antikörper-Klon AE1/AE3 wurde gewählt, da dieser auch die Cytokeratine 7 und 19 umfasst, welche zusammen mit den ebenfalls abgedeckten Cytokeratinen 8 und 18 eine höhere Spezifität bei Lungenkarzinomen aufweisen als die übrigen Cytokeratine. Zudem ist das Cytokeratin 19 auch bei Kolonkarzinomen zu finden, wodurch auch hier die Spezifität der Antikörperbindung trotz Fehlen des Antikörpers gegen das für Kolonkarzinome typische Cytokeratin 20 etwas verbessert werden kann [59, 185].

**Tabelle 11 – Sekundärantikörper**

| <u>Bezeichnung</u> | <u>Konjugat</u> | <u>Verdü-</u><br><u>nung</u> | <u>Klonalität</u> | <u>Wirt</u> | <u>Hersteller,</u><br><u>Produktnummer</u> |
|--------------------|-----------------|------------------------------|-------------------|-------------|--|
| Rabbit-Anti-Mouse  | unkonjugiert    | 1 : 25                       | polyklonal        | Kaninchen   | Dako,<br># Z0259                           |

Potenzierung der Färbeintensität

APAAP Dako # D0651 1 : 25

Fuchsin-Substrat-Chromogen-System Dako # K0625

Hämatoxylin

8.3.4 *Software*

| <u>Bezeichnung</u>                  | <u>Hersteller</u>            |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Adobe Reader DC                     | Adobe Systems Inc.           |
| BZ-Viewer & Analyzer                | Keyence                      |
| Case Viewer                         | 3D Histech                   |
| Citavi 5                            | Swiss Academic Software GmbH |
| GIMP Bildbearbeitung Version 2.8.16 | S. Kimball, P. Mattis        |
| GraphPad Prism 9 (Version 9.3.1)    | GraphPad Software, LLC       |
| Microsoft Office 2007 & 2013        | Microsoft                    |
| Pannoramic Scanner & Viewer         | 3D Histech                   |
| SPSS Statistics Version 26          | IBM                          |

## 8.3.5 Erhobene Daten zu Kapitel 4.3.2

**Tabelle 12 – Detaillierte Daten zur Auswertung der Versuche mittels Immunfluoreszenzfärbung: Zellmorphologie in Abhängigkeit von der verwendeten Isolierungsmethode und dem verwendeten Medium**

| <b>MACS (Konditioniertes Medium), n = 110 Zellen</b>                |                   |               |                       |                     |
|---|-------------------|---------------|-----------------------|---------------------|
| <i>Angaben in <math>\mu\text{m}</math></i>                          | <b>Mittelwert</b> | <b>Median</b> | <b>kleinster Wert</b> | <b>größter Wert</b> |
| kleinster Zelldurchmesser   | 35,02             | 30,27         | 11,35                 | 128,10              |
| größter Zelldurchmesser   | 54,91             | 49,19         | 23,24                 | 150,80              |
| max. Kerndurchmesser  | 17,74             | 17,30         | 9,73                  | 41,62               |
| max. Länge der Ausläufer  | 53,79             | 45,94         | 14,05                 | 129,72              |
| <b>MACS (Standardmedium), n = 155 Zellen</b>                        |                   |               |                       |                     |
| <i>Angaben in <math>\mu\text{m}</math></i>                          | <b>Mittelwert</b> | <b>Median</b> | <b>kleinster Wert</b> | <b>größter Wert</b> |
| kleinster Zelldurchmesser   | 27,45             | 24,86         | 12,97                 | 90,80               |
| größter Zelldurchmesser   | 41,80             | 39,19         | 16,76                 | 109,18              |
| max. Kerndurchmesser  | 15,12             | 15,13         | 8,11                  | 30,81               |
| max. Länge der Ausläufer  | 37,24             | 34,59         | 22,70                 | 83,78               |
| <b>RosetteSep™+SepMate™ (Konditioniertes Medium), n = 63 Zellen</b> |                   |               |                       |                     |
| <i>Angaben in <math>\mu\text{m}</math></i>                          | <b>Mittelwert</b> | <b>Median</b> | <b>kleinster Wert</b> | <b>größter Wert</b> |
| kleinster Zelldurchmesser   | 40,29             | 37,84         | 15,13                 | 127,56              |
| größter Zelldurchmesser   | 68,03             | 62,16         | 21,08                 | 209,17              |
| max. Kerndurchmesser  | 17,82             | 17,84         | 10,81                 | 31,89               |
| max. Länge der Ausläufer  | 54,61             | 49,19         | 23,78                 | 94,59               |
| <b>RosetteSep™+SepMate™ (Standardmedium), n = 154 Zellen</b>        |                   |               |                       |                     |
| <i>Angaben in <math>\mu\text{m}</math></i>                          | <b>Mittelwert</b> | <b>Median</b> | <b>kleinster Wert</b> | <b>größter Wert</b> |
| kleinster Zelldurchmesser   | 28,99             | 25,94         | 12,97                 | 163,23              |
| größter Zelldurchmesser   | 50,93             | 45,94         | 19,46                 | 237,82              |
| max. Kerndurchmesser  | 16,37             | 15,67         | 8,11                  | 31,35               |
| max. Länge der Ausläufer  | 36,66             | 34,86         | 24,86                 | 48,65               |

#### 8.4 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere hiermit, dass ich diese Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den 11.06.2022



---

Yannick M. Britt

## 9 DANKSAGUNG

Ich danke dem Direktor der Klinik für Chirurgie, Herrn Prof. Dr. med. Tobias Keck, für die Möglichkeit, in seiner Klinik meine Doktorarbeit absolvieren zu können.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. med. Jens Habermann für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie der Labore und deren Einrichtung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lars Böckmann für seine immer freundliche und tatkräftige Unterstützung. Er stand mir auch über örtliche Grenzen hinweg stets mit Rat und Tat zur Seite und war bei Fragen jederzeit für mich erreichbar.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Timo Gemoll, Frau Emma Neumann und Frau Natalie Doberstein vor allem für die Versuchsanleitungen, Frau Dr. Sandra Freitag-Wolf (Institut für Medizinische Informatik und Statistik, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) für die Supervision der statistischen Analysen sowie im Besonderen auch Frau Katja Klempt-Gießing, die mich in Belangen aller Art immer unterstützt hat.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Sektion und der Biobank für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, Flocke, meiner Frau und meinen Kindern danken, dass sie mir während dieser Arbeit den Rücken freigehalten und mich in allen Höhen und Tiefen unterstützt haben.

## 10 ABSTRACTS UND KONGRESSBEITRÄGE

Y. Britt, L. Boeckmann, K. Klempt-Gießing, T. Gemoll, J.K. Habermann (2016): Isolierung und Kultivierung von humanen zirkulierenden Tumorzellen des Lungen- und Kolonkarzinoms. Viszeralmedizinkongress, 21.-24.09.2016, Hamburg, Deutschland. Publiziert in *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2016; 54 - KV377, DOI: 10.1055/s-0036-1587152.

Y. Britt, L. Boeckmann, K. Klempt-Gießing, T. Gemoll, R. Meyer, J.K. Habermann (2016): Isolation and Characterization of Human Circulating Tumor Cells (CTCs) of Lung and Colon Carcinomas. Chirurgische Forschungstage, 08.-10.09.2016, Köln, Deutschland; „Preisträgersitzung“.

Y. Britt, L. Boeckmann, K. Klempt-Gießing, T. Gemoll, R. Meyer, J.K. Habermann (2016): Optimierung der Isolierung zirkulierender Tumorzellen des Lungen- und Kolonkarzinoms für die *ex vivo* Kultivierung. Wintertagung der Vereinigung Norddeutscher Chirurgen, 24.-26.11.2016, Hamburg, Deutschland; „Preisträgersitzung“.

L. Boeckmann, Y. Britt, K. Klempt-Gießing, T. Gemoll, R. Meyer, J.K. Habermann (2017): Isolation and Characterization of Human Circulating Tumor Cells (CTCs) of Lung and Colon Carcinomas. Tagung: Advances in Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy in Clinical Practice, 04.-07.10.2017, Rhodos, Griechenland.