

Aus der Klinik für Chirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Tobias Keck
Sektion für translationale chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken
Leitung: Prof. Dr. Dr. med. Jens K. Habermann
Der Universität zu Lübeck

Detektion von Aneuploidie als möglicher Weg zur markerunabhängigen Identifikation von
zirkulierenden Tumorzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Vincent Pechmann
aus
Diez an der Lahn

Lübeck 2025

1. Berichterstatter*in: Prof. Jens K. Habermann, M.D., Ph.D.

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter*in: PD Dr. med. Alexander Iwen

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2025

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den 23.04.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Einleitung	9
2.1	Tumorerkrankungen, Metastasierung und ihre Bedeutung für die personalisierte Medizin.	10
2.2	Biomarker und Präzisionsmedizin, Liquid Biopsy	12
2.3	Zirkulierende Tumorzellen	14
2.4	Korrelation zwischen CTC-Anzahl im Blut, Tumorstadium und Überleben	18
2.5	Isolation und Detektion von CTCs	20
2.5.1	Isolation von CTCs	20
2.5.2	Detektion von CTCs	21
2.6	Ploidie als ein Charakteristikum von Tumoren.....	24
2.6.1	Aneuploidie als mögliches Merkmal solider maligner Tumoren.....	24
2.6.2	Aneuploidie als mögliches Merkmal von CTCs.....	25
2.6.3	Detektion von Aneuploidie	26
3	Fragestellung und Zielsetzung.....	28
4	Material und Methoden	29
4.1	Material.....	29
4.2	Methoden.....	29
4.2.1	Kultivierung humaner Tumorzelllinien.....	29
4.2.2	Blutentnahme und PBMC-Isolierung.....	31
4.2.3	Erstellung eines <i>spike in</i> -Modells aus isolierten PBMCs und kultivierten Tumorzellen ..	32
4.2.4	Erstellung von Cytospins	33
4.2.5	Immunfluoreszenz.....	33
4.2.6	Aufnahme und Analyse von Fluoreszenzbildern	34
4.2.7	DNA-Bildzytometrie	35
4.2.8	Kombination von Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie	36
4.2.9	Statistische Auswertung.....	37
5	Ergebnisse	39
5.1	Etablierung einer Immunfluoreszenzfärbung zur gleichzeitigen Detektion von kultivierten Tumorzellen und PBMCs	39
5.2	Kombination von Immunfluoreszenz mit DNA-Bildzytometrie	44
5.2.1	Nachweis von Aneuploidie durch DNA-Bildzytometrie.....	44
5.2.2	Fusion beider Methoden.....	47

5.3	Validierung der etablierten Methode mit definierten Tumorzellzahlen	48
5.4	Optimierung der etablierten Methode	52
5.5	Validierung der etablierten Methode mit 30 Tumorzellen	55
6	Diskussion	60
7	Schlussfolgerung und Ausblick.....	71
8	Zusammenfassung.....	72
9	Literaturverzeichnis.....	73
10	Anhang.....	94
10.1	Abbildungsverzeichnis	94
10.2	Tabellenverzeichnis	95
10.3	Materialliste.....	96
10.3.1	Gerätschaften	96
10.3.2	Verbrauchsmaterialien	97
10.3.3	Chemikalien	98
10.3.4	Antikörper und Kits.....	99
10.3.5	Pufferlösungen für die Feulgen-Reaktion	99
10.3.6	Nährmedien für humane Tumorzelllinien	99
10.3.7	Software	100
10.4	Ethikantrag	101
10.5	Danksagung	102
10.6	Lebenslauf.....	103

1 Abkürzungsverzeichnis

BC	<i>Breast Cancer</i> = Mammakarzinom (Brustkrebs)
BSA	Bovines Serumalbumin
Bspw.	Beispielsweise
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CECs	<i>Circulating Endothelial Cells</i> = Zirkulierende endotheliale Zellen
cfDNA	<i>Cell Free DNA</i> = zellfreie DNA
CIN	<i>Chromosomal Instability</i> = chromosomale Instabilität
CNA	<i>Copy Number Alteration</i> = Veränderung der Kopienanzahl (von Chromosomen)
CK	Cytokeratin
CRC	<i>Colorectal Cancer</i> = kolorektales Karzinom (Darmkrebs)
CTC	<i>Circulating Tumour Cells</i> = zirkulierende Tumorzellen
ctDNA	<i>Circulating Tumour DNA</i> = zirkulierende Tumor-DNA
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
DFS	<i>Disease Free Survival</i> = krankheitsfreies Überleben
DIC	<i>DNA Image Cytometry</i> = DNA-Bildzytometrie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonucleinsäure
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> = Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i> = epithelialer Wachstumsfaktor

EGFR	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i> = epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor
EMT	Epitheliale zu mesenchymaler Transition
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i> = epitheliales Zelladhäsionsmolekül
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> = Fetales Kalbserum
FCM	<i>Flowcytometry based measuring</i> = Durchflusszytometrie
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridisation</i> = Fluoreszenz in situ Hybridisierung
h	<i>Hours</i> = Stunden
Her-2/neu	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/neu</i> = humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2/neu
HIF-1	<i>Hypoxia Inducible Factor 1</i> = Hypoxie induzierter Faktor 1
IF	Immunfluoreszenz
IGF	<i>Insulin like Growth Factor</i> = Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IOD	<i>Intrinsic Optical Density</i> = intrinsische optische Dichte
LB	<i>Liquid Biopsy</i> = Flüssigkeitsprobe
LBB	<i>Liquid Biopsy Blood sample</i> = Blutprobe
LC	<i>Lung Cancer</i> = Lungenkrebs
LSM	<i>Lymphocyte Separation Medium</i>
MET	Mesenchymale zu epithelialer Transition
miRNA	<i>Micro Ribonucleic Acid</i> = Mikroribonukleinsäure
ml	Milliliter
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer = nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
OS	<i>Overall Survival</i> = Gesamtüberleben

PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells = periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	<i>Prostate Cancer</i> = Prostatakarzinom (Prostatakrebs)
pCK	panCytokeratin
PD-L1	<i>Programmed Cell Death 1 Ligand 1</i> = programmierter Zelltod Ligand 1
PFA	Paraformaldehyd
PFS	<i>Progression Free Survival</i> = Progressionsfreies Überleben
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RBC	<i>Red Blood Cells</i> = rote Blutkörperchen
SCLC	Small Cell Lung Cancer = Kleinzelliges Bronchialkarzinom
TEP	<i>Tumour Educated Platelets</i> = Tumor angelernete Blutplättchen
TNM	<i>Tumour Site and Size-, Lymph node and Metastasis spread</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
vs.	<i>versus</i> = gegen(übergestellt)
ZEB	<i>Zinc finger E-box-binding homebox</i> = Zinkfinger E-Box Bindungs-Heimdomäne
μl	Mikroliter

Hinweis: Bei Personenbenennungen, wie Arzt, Patient usw. wird in dieser Arbeit der einfachen Lesbarkeit halber stets die männliche Form verwendet. Selbstverständlich werden damit Frauen wie Männer gleichermaßen angesprochen.

2 Einleitung

Maligne Tumoren und ihre Metastasen stellen weltweit eine der häufigsten Todesursachen dar. Für die Metastasierung solider Malignome sind unter anderem zirkulierende Tumorzellen (*Circulating Tumour Cells*, CTCs) verantwortlich, die vom Primärtumor eine hämatogene Metastasierung initiieren können. Ihre zunehmende Bedeutung in der klinischen Routine in Bezug auf Diagnostik und Prognosestellung wurde bereits durch mehrere Arbeitsgruppen für verschiedene Entitäten herausgestellt. So zeigten zum Beispiel Geng und Kollegen, dass die Anzahl von CTCs in einer Blutprobe als unabhängiger Marker beim Plattenepithelkarzinom der Zunge zur Prognosestellung in Bezug auf das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben nutzbar sind (Geng et al., 2022). CTCs bieten also Informationen, die in der personalisierten Tumorthherapie von großem Nutzen sind.

Die Detektion von CTCs stellt jedoch eines der größten Hindernisse dar, welches eine Nutzung dieser wertvollen Informationen im klinischen Alltag verhindert. Denn aufgrund der genetischen und phänotypischen Heterogenität von Primärtumoren sind CTCs selten identisch in Bezug auf die Expression extra- und intrazellulärer Merkmale, was unter anderem durch Prozesse wie Epithelialer zu Mesenchymaler Transmission (EMT) oder Mesenchymaler zu Epithelialer Transmission (MET) bedingt ist (Thiery, 2002). Darüber hinaus handelt sich bei CTCs um sehr seltene Zelltypen, welche teilweise mit einer Häufigkeit von nur 1 bis 5 Zellen pro 9,5 ml EDTA-Blutprobe zu finden sind (Cristofanilli et al., 2004; 2005). Trotz der bekannten genetischen und phänotypischen Heterogenität von CTCs erfolgt nach aktuellem Stand der Forschung die Detektion dieses Zelltyps nur über ein einziges spezifisches Merkmal. Beispielsweise wird zur Detektion von CTCs epithelialer Tumoren die Identifikation extrazellulärer Marker, wie des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*, EpCAM), empfohlen (Mu et al., 2016); und auch andere Marker wie Cytokeratine (CK) sind von Wichtigkeit (Lin et al., 2021). Markerabhängige Detektionsmethoden haben jedoch den Nachteil, dass sie eine Änderung der Markerexpression nicht erfassen können und somit ein Teil der vorhandenen CTCs mit verändertem Expressionsprofil nicht detektiert wird. Um CTCs in einer Blutprobe und ihren Informationsgehalt vollständig zu nutzen, liegt es nahe, zur Detektion in der klinischen Routine markerunabhängige Methoden zu verwenden, die es ermöglichen, alle CTCs einer Blutprobe nachzuweisen. Ein Beispiel für ein solches markerunabhängiges Kriterium kann Aneuploidie sein. Aneuploidie wurde für die meisten soliden malignen Tumoren bereits in sehr frühen Stadien (Hedley et al., 1993) und gleichfalls in deren CTCs nachgewiesen (Ye et al., 2019). Darüber hinaus kann sie mit einfachen Mitteln wie der DNA-Bildzytometrie detektiert werden. Zusätzlich ist wichtig, dass Aneuploidie eines der wenigen Charakteristika ist, die über die gesamte Karzinogenese hinweg detektierbar sind und nicht Veränderungen wie EMT oder MET unterliegt. Es ist also denkbar, dass Aneuploidie zum Nachweis von CTCs aus *Liquid Biopsies* von Patientenblut geeignet ist und hierbei die aktuellen Einschränkungen der markerabhängigen Detektion überwinden kann.

2.1 Tumorerkrankungen, Metastasierung und ihre Bedeutung für die personalisierte Medizin

Ein Tumor bezeichnet die Zunahme des Gewebevolumens an einer bestimmten Lokalisation (National Cancer Institute, 2021) wobei zwischen benignen und malignen Tumoren unterschieden wird (National Cancer Institute, 2021). Maligne Tumoren weisen Zellen mit Zellkernpolymorphie, Atypien sowie Anaplasie auf und zeigen zudem ein unkontrolliertes, destruierendes Wachstum (Moch et al., 2019).

Im Jahr 2020 verstarben in Deutschland 338.000 Menschen an den Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und 239.600 Menschen an den Folgen eines malignen Tumors (Statistisches Bundesamt, 2022). Maligne Tumoren stellen damit die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar. Die häufigsten bösartigen Neubildungen sind im Bereich der Lunge und der Bronchien (13%), in der Mamma (8%) sowie in der Haut (7%) beschrieben. Weltweit verstarben Menschen ebenfalls am häufigsten an kardiovaskulären Erkrankungen (World Health Organization, 2020). Platz sechs der häufigsten Todesursachen belegten auch im Jahr 2020 im internationalen Vergleich Tumorerkrankungen, dabei mit Abstand am häufigsten waren das Lungen- und Bronchialkarzinom (*Small Cell Lung Cancer, SCLC* und *Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC*) (World Health Organization, 2022).

Bei 90% aller Tumor-assoziierten Todesfälle ist die Todesursache auf Metastasierung des Primärtumors zurückzuführen (Zeeshan und Mutahir, 2017). Im Zusammenhang mit malignen Neoplasien bezeichnet der Begriff der Metastase das gleichzeitige Vorhandensein eines sekundären Krankheitsherdes, der sich aus einem primären Tumor entwickelt hat und nicht mit einem simultanen Karzinom verwechselt werden darf (Moch et al., 2019). Der Ursprung der Metastase liegt beim Primärtumor, was histologisch zu sichern ist. Prinzipiell können Metastasen in jeder Region des Körpers auftreten. Es gibt verschiedene Typen von Metastasen, welche hauptsächlich durch die Klassifizierung der räumlichen Nähe zum Primärtumor definiert sind. Man unterscheidet zwischen lokalen und regionären Metastasen sowie Fernmetastasen (Moch et al., 2019). Der Prozess der Metastasenbildung ist komplex und beginnt mit dem Herauslösen der Tumorzellen aus dem Zellverband und der Invasion in nahegelegene Blut- oder Lymphgefäße (lokale Invasion). Die Zellen können nun mit dem Blut- oder Lymphfluss an jeden Ort im Körper gelangen und aus dem Gefäßsystem heraustreten (Extravasation) (Abbildung 1) (Moch et al., 2019). Wenn an diesem Ort die Bedingungen für Ansiedelung geeignet sind, kommt es zur Bildung von „Tumorzell-Knoten“ und Mikrometastasen (Hanahan und Weinberg, 2011) (Abbildung 1). Je nach Primärtumor und Metastasierungsweg können bevorzugte Organsysteme benannt werden, in welchen eine Metastasierung relativ wahrscheinlich ist (Pfortader-Typ vs. Cava-Typ) (Moch et al., 2019). Aufgrund dieser typischen Metastasierungsmuster bei bestimmten Tumorentitäten werden potenzielle Manifestationsorte im sogenannten *Staging* untersucht. *Staging-*

Untersuchungen dienen der Klassifizierung der Erkrankung und ihrer Ausbreitung im Körper nach dem *Tumour site and size- Lymph node- Metastasis spread* (TNM) -Schema, welches von der *Union for International Cancer Control* (UICC) regelmäßig für jede Tumorentität aktualisiert wird. Ein *Staging* schließt sich in der Regel nach der histologischen Sicherung einer malignen Neoplasie an und umfasst unter anderem bildgebende Verfahren.

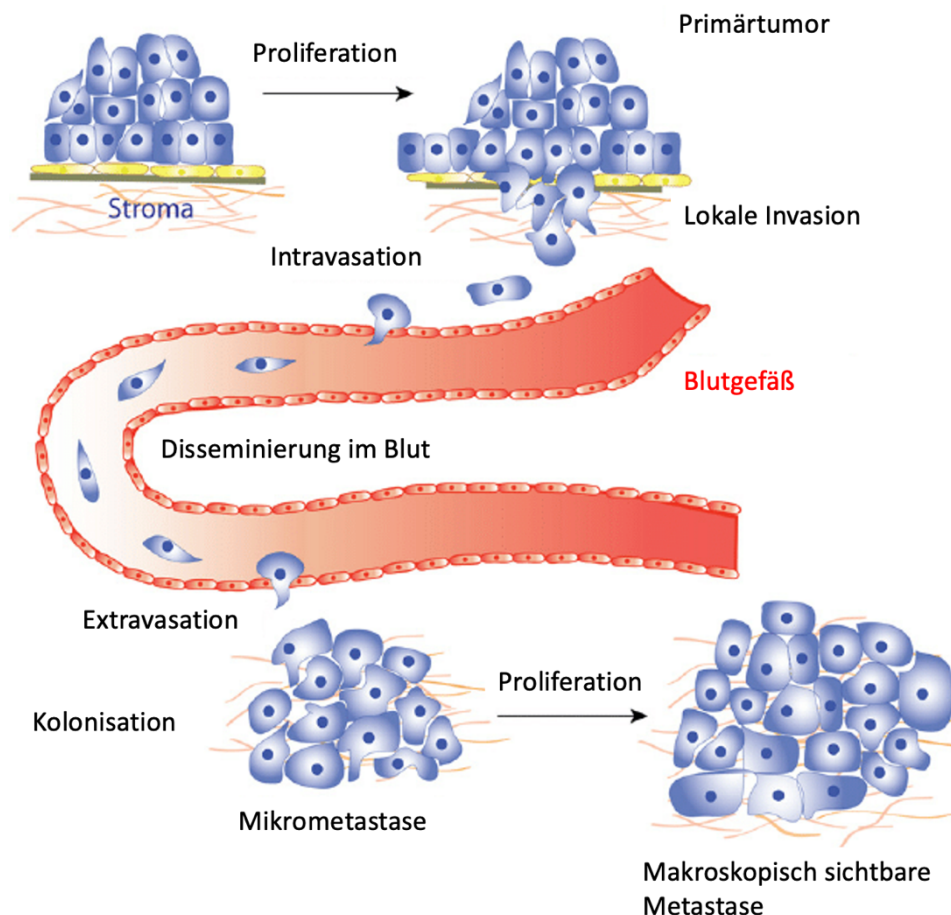


Abbildung 1: Schematische Darstellung der möglichen Metastasenbildung bei malignen Tumoren

Zu Beginn erfolgt ein lokal begrenztes Tumorstadium, wodurch die Tumormasse wächst. Während dieses Prozesses können sich Zellen aus dem Zellverband lösen und lokale Absiedelungen bilden, von denen aus sie weiter in die Blutzirkulation gelangen können. Über den Blutweg können diese Zellen zu allen möglichen Orten im Körper gelangen und bilden an den Orten Metastasen, an denen die für sie besten physischen Bedingungen bestehen. Abbildung modifiziert nach Saxena und Kollegen (Saxena und Christofori, 2013).

Nach heutigen diagnostischen Standards wird die für die Klassifizierung nach TNM notwendige Diagnostik nicht-invasiv anhand bildgebender Verfahren wie beispielsweise Computertomographie oder Sonographie durchgeführt. Jedoch sind diese Methoden in ihrer Aussagekraft besonders in sehr frühen Stadien limitiert und können beispielsweise im Bereich der Leber Metastasen erst ab einer Größe von ≤ 1 cm detektieren (Okasha et al., 2021). Sobald ein Tumor jedoch Metastasen ausgebildet hat,

sinkt die Wirksamkeit standardisierter und individuell entwickelter Therapiekonzepte deutlich. Selbst wenn der Primärtumor sensibel auf ein etabliertes Therapieregime reagiert, kann es durch Metastasenbildung trotzdem zu einem Therapieversagen kommen (Qiu et al., 2016). So konnte bei über 200 antiproliferativen Wirkstoffen gezeigt werden, dass diese ihre Wirkung bei Metastasierung des Primärtumors verlieren (Qian et al., 2017). Aufgrund dieser Tatsache ist es notwendig, Metastasen so früh wie möglich zu erkennen und die Biologie der Metastase in die Entwicklung des Therapieregimes miteinzubeziehen. Am effektivsten scheint es also, Metastasen nicht erst dann zu detektieren, wenn sie manifest geworden sind, sondern bereits die Tendenz des Primärtumors zu kennen, ob Metastasen ausgebildet werden könnten. Bei bestimmten Tumorentitäten kann zu diesem Zweck die Untersuchung einer Blutprobe auf *Tumormarker* sinnvoll sein.

2.2 Biomarker und Präzisionsmedizin, Liquid Biopsy

In der modernen Tumorthherapie wird der Ansatz der personalisierten Medizin verfolgt, um für jeden Patienten ein individuelles Therapieregime zu entwickeln. Eine individuelle Therapieanpassung kann beispielsweise durch die Untersuchung von Mutationen im Bereich des humanen epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, Her-2/neu) bei Brustkrebs (*Breast Cancer*, BC) oder des *Programmed Cell Death 1 Ligand 1* (PD-L 1) - Status bei malignen Neoplasien verschiedener Gewebe erfolgen. Durch molekulargenetische Analysen des Tumors soll eine bessere Anpassung der Therapie erfolgen und dadurch eine Steigerung der Lebensqualität unter Therapie und eine Verlängerung des Gesamtüberlebens erreicht werden (Bundesministerium für Bildung und Forschung, 2022).

Um eine exakte Abschätzung des individuellen Krankheitsverlaufs vornehmen zu können, sind prognostische Biomarker hilfreich. Hierunter versteht man beispielsweise das Prostata-spezifische Antigen (PSA) bei Tumoren der Prostata. Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang der Ausgangswert des Markers und die Dynamik seiner Expression über einen bestimmten Zeitraum. Die Expression solcher Marker kann entweder im Tumorgewebe selbst nachgewiesen werden, wie bei PD-L1 oder Her-2/neu, oder aber im Blut bestimmt werden, wie bei PSA über eine so genannte Flüssigbiopsie (*Liquid Biopsy*, LB). Um Gewebe zu untersuchen, ist die invasive Biopsie am Primärtumor oder der Metastase die Methode der Wahl. Dies ist mit einem operativen bzw. invasiven Eingriff verbunden und somit meist nur einmalig und nicht in allen Situationen möglich.

Alternativ zur Gewebebiopsie kann relevantes Probenmaterial auch durch eine *Liquid Biopsy* gewonnen werden. Eine *Liquid Biopsy* entspricht einer Entnahme von Körperflüssigkeiten wie Blut oder Urin; besonders im Zusammenhang der Tumordiagnostik stellt die *Liquid Biopsy* von Patientenblut eine sichere, minimalinvasive Methode dar, die einfach und schnell durchzuführen ist (Chen et al., 2019).

Liquid Biopsy aus Patientenblut ermöglicht eine Analyse der Tumorbiologie in regelmäßigen Abständen, sowie die Detektion von (neu aufgetretener) Heterogenität im Vergleich zum Primärtumor oder bekannten Metastasen (Abbildung 2) (Rodríguez et al., 2021). Somit kann eine bessere Anpassung des Therapieregimes bei verändertem genetischem Profil der analysierten Zellen erfolgen (Diaz und Bardelli, 2014), was eines der obersten Ziele der personalisierten Medizin in greifbare Nähe bringt: das exakte Monitoring des Krankheitsprogress und die Anpassung der Therapie (Arnedos et al., 2015). Dies kann hingegen mit Biopsien aus einem soliden Tumor weniger verlässlich erreicht werden, da nur eine Aussage zu den Zellen des untersuchten Gewebes gemacht werden kann (Heitzer et al., 2013; Vaidyanathan et al., 2018). Zudem gibt es bei der Entnahme einer Gewebebiopsie auch einen Einfluss durch den Proben entnehmenden Untersucher.

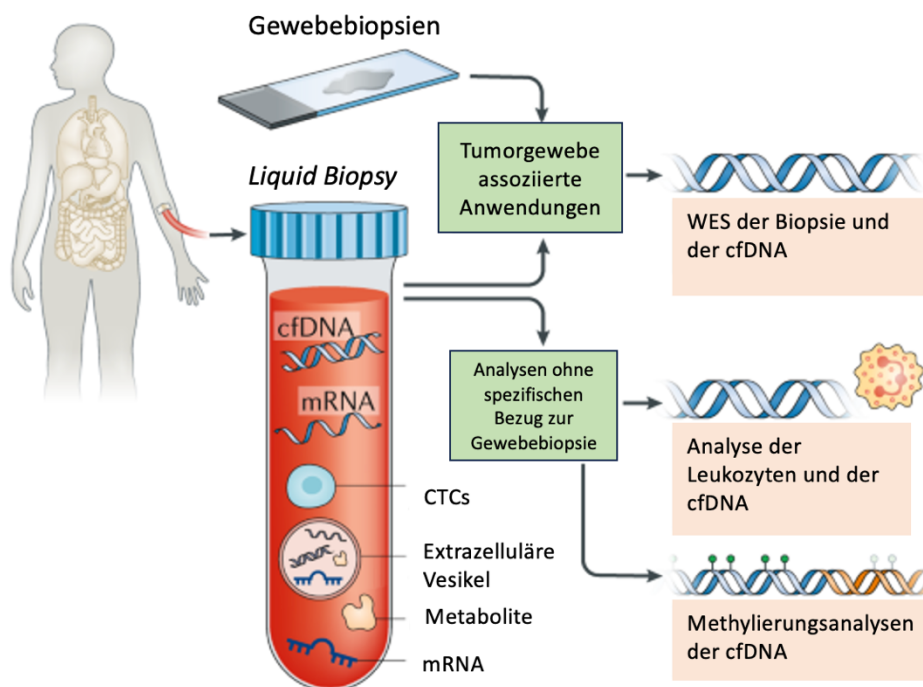


Abbildung 2: Entnahme einer Liquid Biopsy aus Patientenblut und ihre Anwendungsmöglichkeiten

Durch eine *Liquid Biopsy* aus Patientenblut ist es möglich, verschiedene Analyte zu untersuchen, die sich in der Blutprobe befinden. Hierzu gehören CTCs genauso wie cfDNA und mRNA, welche alle weiteren molekulargenetischen Untersuchungen unterzogen werden können. Zusätzlich können beispielsweise CTCs dazu benutzt werden, Zellkulturen zu etablieren oder antiproliferative Tumortheraeutika *in vitro* zu testen. Ebenfalls ist es möglich, die Ergebnisse direkt mit einer Gewebebiopsie des Tumors zu korrelieren oder sie ohne ein entsprechendes Korrelat zu bewerten. Modifiziert nach Rolfo und Kollegen (Rolfo und Russo, 2020).

Ein wichtiger Analyt in der *Liquid Biopsy* aus Patientenblut, mit dem sich unter anderem die Tendenz zur Metastasenbildung bei soliden Tumoren abschätzen lässt, ist der Gehalt an zellfreier DNA (*Cellfree DNA*, cfDNA) bzw. zirkulierender Tumor-DNA (*Circulating Tumour DNA*, ctDNA) im Blut (Bronkhorst,

Ungerer, and Holdenrieder 2019). *cfDNA* beziehungsweise *ctDNA* gelangt unter anderem aufgrund von erhöhten Mitose- und Apoptoseraten der Tumorzellen in die Blutzirkulation (Silvestris et al., 2017). Weitere wichtige Analyte in der *Liquid Biopsy* aus Patientenblut sind mikroRNAs (*microRNA*, miRNA), *Tumour Educated Platelets* (TEP), Exosomen (Poulet et al., 2019) und CTCs (Maheswaran and Haber, 2015). All diese unterschiedlichen Analyte können theoretisch aus einer einzigen Blutprobe gewonnen und analysiert werden (Rodríguez et al., 2021).

2.3 Zirkulierende Tumorzellen

CTCs sind Zellen, welche sich aus dem Verband eines soliden primären Tumors oder dessen Metastase herausgelöst haben und an einem anderen Ort im Körper unter bestimmten Bedingungen Metastasen bilden können (Barriere et al., 2014). Sie haben eine Überlebensdauer von ca. zwei bis drei Stunden in peripherem Blut und eignen sich als Analyt einer *Liquid Biopsy* aus Patientenblut (Lemma et al., 2021).

Die Analyse von CTCs kann nicht nur Informationen bezüglich der Therapieauswahl liefern, sondern auch zum Therapie-Monitoring beitragen (Poulet et al., 2019) und zur *in vitro* Sensitivitätstestung gegenüber antiproliferativer Medikation eingesetzt werden (Hyun et al., 2016). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Anzahl von CTCs in einer Blutprobe nachweislich als unabhängiger prognostischer Parameter bezüglich des krankheitsfreien Überlebens (*Progression Free Survival*, PFS) und des Gesamtüberlebens (*Overall Survival*, OS) bei Tumorkranken dienen kann (Bidard et al., 2014). So waren ein Gehalt von weniger als 5 CTCs pro Blutprobe beim metastasierten Mammakarzinom (Cristofanilli et al., 2005) und ein Gehalt von weniger als 3 CTCs pro Blutprobe nach Therapiebeginn bei metastasiertem Prostatakarzinom (*Prostate Cancer*, PC) mit einer signifikanten Steigerung des Gesamtüberlebens korreliert (de Bono et al., 2008; Goldkorn et al., 2014; Okegawa et al., 2014; Vogelzang et al., 2017).

Die Existenz von CTCs wurde erstmalig in der Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben (Plaks et al., 2013; Lianidou, 2014). Jedoch dauerte es noch bis in die 1970er Jahre, bis molekulare Beobachtungen an diesem Zelltyp durchgeführt wurden, die das metastatische Potential herausstellten (Fidler, 1973; Lione und Bosmann, 1978) und erst mit Beginn des 21. Jahrhunderts konnte das ganze pathogene Potential dieses Tumorzell-Subtyps bewiesen werden.

CTCs kommen meist in sehr niedrigen Konzentrationen im Blut vor (ca. 1 CTC pro 10^6 bis 10^7 periphere Blutmonozyten (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs)) (Alix-Panabières, 2012), besonders bei Patienten ohne manifeste Metastasierung (Rink et al., 2012; Rack et al., 2014), und sind mit dem Vorliegen einer malignen Tumorerkrankung korreliert (Menarini Silicon Biosystems Inc., 2022). In einer Metaanalyse definierten Vasseur und Kollegen, dass bei metastasierten Tumoren ca. 3-5 CTCs/7,5 ml Blut mittels CellSearch® (Menarini Silicon Biosystems Incorporation, Huntington Valley) detektiert

werden können (Vasseur et al., 2021). Darüber hinaus kann, abhängig von der ursprünglichen Tumorbilogie, beobachtet werden, dass CTCs entweder als einzelne Zellen oder in *Clustern* im Blut zirkulieren (Rodríguez et al., 2021).

Viele verschiedene Forschungsgruppen zeigten, dass die Gen- und Proteinexpression von CTCs sehr unterschiedlich zum eigentlichen Ursprungsgewebe sein kann. Diese Veränderung des Phänotyps wird unter anderem durch epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) beziehungsweise mesenchymale-epitheliale Transition (MET) bedingt (Thiery et al., 2009). Diese Prozesse haben einen großen Stellenwert in der physiologischen Zelldifferenzierung (Abbildung 3), aber auch in der Pathogenese von Tumoren (Thiery et al., 2009).

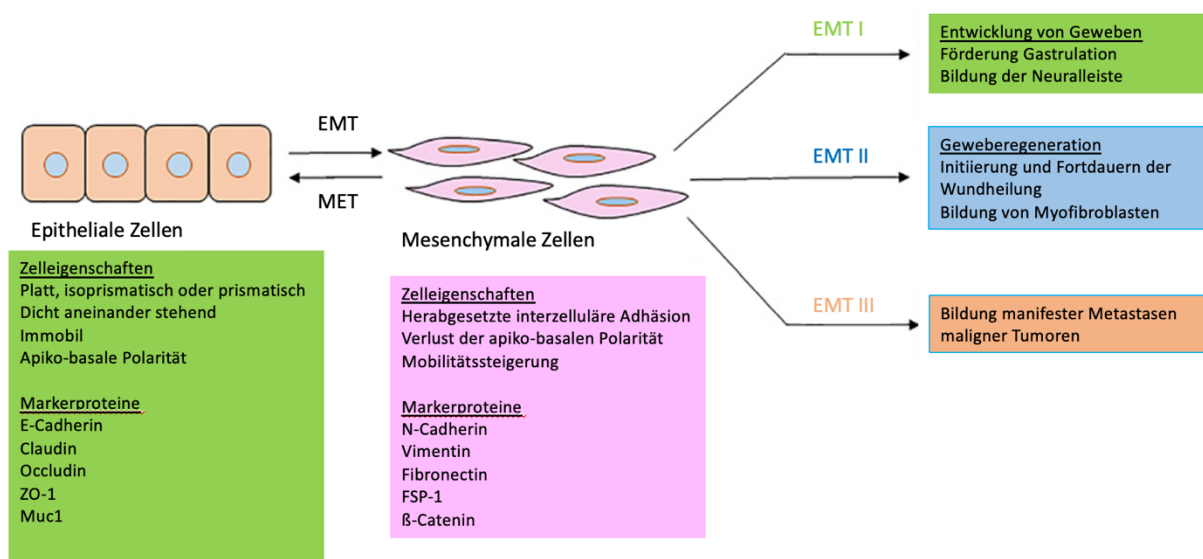


Abbildung 3: Schematische Darstellung von EMT und MET mit zellulären Eigenschaften, Einfluss auf Physiologie und Tumorbilogie sowie typische Markerproteine

EMT kann sowohl im physiologischen, als auch im pathologischen Kontext aktiviert werden. Hierdurch verändern sich Zellmorphologie und Genom, was den Zellen einen Zuwachs an Mobilität ermöglicht und Migration fördert. ZO-1: Zonula Occludens-1. Muc1: Mucin 1. FSP-1: Fibroblasten spezifisches Protein 1 (*fibroblast specific protein 1*). Modifiziert nach Debnath und Kollegen (Debnath et al., 2022).

Im Hinblick auf CTCs sind EMT und MET deshalb von Bedeutung, da durch beide Prozesse der ursprüngliche Phänotyp der Tumorzellen verändert werden kann (Roche 2018). Diese Veränderungen können zu starken Unterschieden in Bezug auf die Tendenz zur Bildung von Metastasen oder invasivem Wachstum im Vergleich zum Primärtumor führen (Valdés et al., 2002; Chaffer und Weinberg, 2011). Durch EMT verlieren epitheliale Zellen Zell-Zell-Kontakte (Pantel et al., 1998), wodurch sich ihre apiko-basale Polarität auflöst (Thiery, 2002) und sie den Zellverband verlassen können (Abbildung 4).

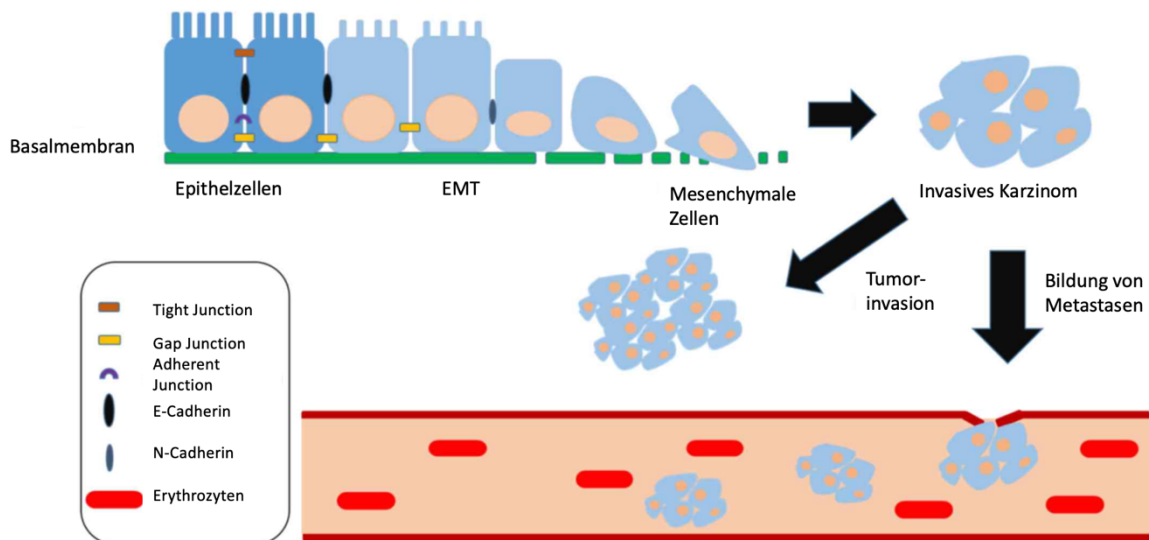


Abbildung 4: Allgemeine Charakteristika von EMT in malignen Tumoren

Der Übergang von epithelialem zu mesenchymalem Phänotyp ist hauptsächlich durch Verlust der Zell-Zell-Kontakte (*Tight junctions* und *Adherent junctions*) und durch Verlust der Zellpolarität gekennzeichnet. Beides wird durch eine spezielle Mikroumgebung des Tumors gefördert. Hierdurch erlangen die Zellen die Fähigkeit, Migration zu betreiben und in andere Gewebe einzudringen. Durch Hochregulierung mesenchymaler Markerproteine wie SNAIL 1/2 oder Twist kommt es zu einem Verlust von E-Cadherin, was in einer verstärkten Expression von N-Cadherin resultiert. Diese ist positiv mit infiltrierendem Verhalten von Tumorzellen und Metastasenbildung korreliert. Modifiziert nach Li und Kollegen (Li et al., 2018).

Auf diese Weise können die Zellen, zum Beispiel mit dem Blutstrom, zu anderen Organsystemen des Körpers gelangen (Joosse et al., 2015), was die initiale Bildung von Metastasen erleichtert (Thiery, 2002). MET ist als umgekehrter Schritt zu EMT zu verstehen und begünstigt die Extravasation von CTCs. Für die Bildung manifester Metastasen sind EMT und MET also von gleichwertiger Bedeutung (Abbildung 5) (Bakir et al., 2020).

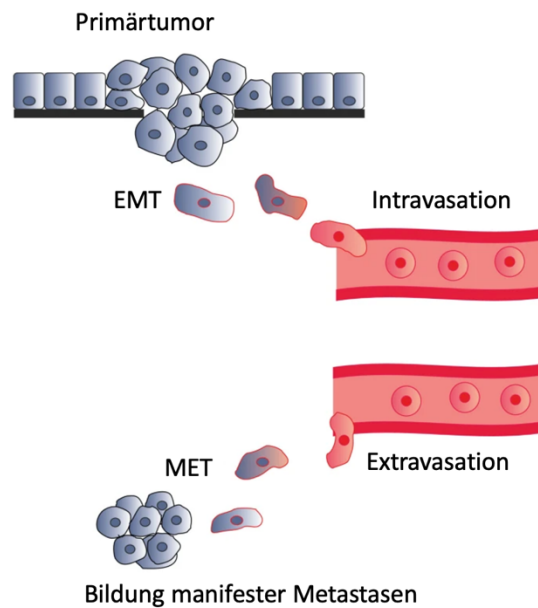


Abbildung 5: MET und EMT in malignen Tumoren

MET ermöglicht die Extravasation der Tumorzellen und dadurch die Bildung manifester Metastasen in einer geeigneten Mikroumgebung. Modifiziert nach Samatov und Kollegen (Samatov et al., 2013).

Sowohl EMT als auch MET können also Einfluss auf die Metastasierung epithelialer Tumoren nehmen. Eine mögliche Ursache für die Aktivierung von EMT kann Hypoxie in der (Mikro-) Umgebung des Primärtumors sein, welche häufig aufgrund der schnellen Tumorzellproliferation ohne ausreichende Nährstoffversorgung entsteht (Nowak und Bednarek, 2021). Hypoxie induziert über den *hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) die Transkription von SNAIL und TWIST, die auch für die Aktivierung von EMT verantwortlich sein können (Moreno-Bueno et al., 2008). Eine andere mögliche Ursache, EMT zu initialisieren, stellt die vermehrte Expression des Epithelialen Wachstumsfaktors (*epithelial growth factor*, EGF) dar. Dies ist im physiologischen Kontext von großer Wichtigkeit, wurde aber genauso bei der Entstehung des Mammakarzinoms beobachtet (Gao et al., 2016).

In Bezug auf die Wirksamkeit antiproliferativer Therapien stellen EMT und MET ebenfalls relevante Einflussfaktoren dar. Zum einen können Veränderungen der Zelleigenschaften durch EMT oder MET den Eintritt der Zelle in Seneszenz oder Apoptose verändern und so die Wirksamkeit der medikamentösen Therapie herabsetzen (Yang et al., 2006). Zum anderen kann es durch EMT zu Veränderungen in wichtigen Onkogenen kommen. Hierzu zählen unter anderem die erhöhte Expression von HER2/neu beim Mammakarzinom (Wan et al., 2013) oder Mutationen im *KRAS*-Gen, wodurch der Signalweg des epithelialen Wachstumsfaktor Rezeptors (*epithelial growth factor receptor*, EGFR) gestört wird und bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (*colorectal cancer*, CRC) Antikörpertherapien unwirksam machen kann; HER2/neu und EGFR sind Hauptziele von aktuell leitliniengerechten Antikörpertherapien des Mammakarzinoms beziehungsweise des kolorektalen

Karzinoms (Wan et al., 2013). Darüber hinaus kann durch die genomische Heterogenität und Instabilität vieler Tumoren ein unterschiedliches genomisches Profil in CTCs und Metastasen zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten der Erkrankung resultieren (Gasch et al., 2013). Im Endeffekt kann dies einen Wirkverlust der Therapie bedingen (Douillard et al., 2013; Peeters et al., 2013). Dadurch lässt sich zeigen, dass ein regelmäßiges Monitoring von CTCs, beispielsweise durch eine *Liquid Biopsy* von Patientenblut sinnvoll sein kann, um eine Anpassung des Therapieregimes vorzunehmen.

2.4 Korrelation zwischen CTC-Anzahl im Blut, Tumorstadium und Überleben

In vielen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass die Anzahl von CTCs in einer Blutprobe nicht bei jeder Tumorentität gleich ist und je nach Tumorstadium schwankt. Bei Tumoren ohne Nachweis einer Metastasierung konnten bei verschiedenen Tumorentitäten selten mehr als 1 CTC/7,5 ml Blut detektiert werden (Vasseur et al., 2021). Bei metastasierten Tumoren wurde jedoch oft eine höhere CTC-Konzentration im Blut gefunden. Bei allen Subtypen des Bronchialkarzinoms wurden häufig mehr als 50 CTCs/7,5 ml Blut gefunden (Hou et al., 2012) und bei metastasiertem Mammakarzinom wurden in einer Arbeit sogar 84 CTCs/7,5 ml Blut detektiert (Allard et al., 2004). Es kann also eine Korrelation zwischen CTC-Gehalt pro Blutprobe und Tumorstadium gezogen werden. Nichtsdestotrotz sollte in diesem Zusammenhang die Entnahmestelle der *Liquid Biopsy* von Patientenblut beachtet werden. Wie bei einer Gewebebiopsie kann die *Liquid Biopsy* von Patientenblut an verschiedenen Gefäßen und in verschiedenen Situationen durchgeführt werden, was Auswirkungen auf das Ergebnis haben kann. So wurde gezeigt, dass bei Patienten mit Bronchialkarzinom in peripherem Blut wenig CTCs zu detektieren sind (1-4 CTCs/7,5 ml Blut), die Anzahl jedoch stark ansteigen kann (1-3093 CTCs/7,5 ml Blut), sobald die *Liquid Biopsy* von Patientenblut aus einer tumornahen Lungenvene durchgeführt wird (Crosbie et al., 2016).

Für die meisten großen Tumorentitäten wurde gezeigt, dass CTCs regelmäßig im Blut zu finden sind. Beispielsweise wurden CTCs beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) in 70-95% aller untersuchten Proben nachgewiesen (Hou et al., 2009; Hou et al., 2011; Hiltermann et al., 2012; Naito et al., 2012; Shi et al., 2013; Huang et al., 2014; Igawa et al., 2014; Normanno et al., 2014; Zhang et al., 2014; Cheng et al., 2016). Dabei wurde gezeigt, dass ein Gehalt von 2 bis 5 CTCs pro 7,5 ml Blutprobe sowohl mit einem verringerten progressionsfreien Überleben, als auch mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert ist. Foy und Kollegen stellten in einer multizentrischen, europaweiten Studie heraus, dass ein prätherapeutisch bestimmter CTC-Gehalt von > 15 Zellen/7,5 ml Vollblut mit einem verringerten progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben einhergeht, was als unabhängiger prognostischer Marker eingesetzt werden kann (Foy et al., 2021). Erwähnenswerter Weise war dieses Ergebnis in allen möglichen Krankheitsstadien zu beobachten.

Ebenfalls für das Mammakarzinom wurde gezeigt, dass bereits im initialen Tumorstadium CTCs vorhanden sein können (Barrière et al., 2012), obwohl klinisch keine Metastase gefunden worden war. Die Detektion mit herkömmlichen bildgebenden Verfahren erfasst Tumoren erst ab einem Zellvolumen von ca. 10^9 Zellen (Alix-Panabières und Pantel, 2014) und der Nachweis von CTCs scheint in einem solchen Fall sehr erstrebenswert, um frühestmögliche Diagnostik und eine zielgerichtete Therapie einzuleiten. They und Kollegen bestätigten dies und zeigten darüber hinaus, dass sowohl bei einem Tumorstadium mit N0 in 21% der Fälle, als auch bei einem Tumorstadium N1 oder größer in 24% der Fälle CTCs nachweisbar waren (They et al., 2019). Dies unterstützt die Annahme, dass ein erhöhter CTC-Gehalt auf einen klinisch inapparenten Tumorprogress hinweisen kann (Lin et al., 2021) und zeigt das große prognostische Potential von CTCs selbst in niedrigen Tumorstadien dieser Entität.

Im Fall des kolorektalen Karzinoms wird Patienten mit höherem Tumorstadium die Anwendung von kombinierter chirurgischer und Chemotherapie empfohlen. Bei Patienten mit dieser Fallkonstellation wurde gezeigt, dass der Nachweis von CTCs nach Abschluss des gesamten Therapieregimes mit einem verringerten krankheitsfreiem Überleben korreliert ist (Lu et al., 2013; Sotelo et al., 2015). Für nicht metastasierte kolorektale Karzinome bestätigten Lu und Kollegen in einer Metaanalyse ein verringertes progressionsfreies Überleben, sobald CTCs im peripheren Blut zu detektieren waren, sowohl vor als auch nach operativer Entfernung des Tumors (Lu et al., 2017). Generell lässt sich sagen, dass mehr als 3 CTCs pro 7,5 ml Vollblut mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, besonders bei metastasiertem kolorektalem Karzinom (Krebs et al., 2015), und eine generell erhöhte Anzahl von CTCs im metastasierten Stadium als unabhängiger prognostischer Faktor für progressionsfreies und Gesamtüberleben gesehen werden kann (Huang et al., 2015). Des weiteren zeigten Krebs und Kollegen, dass in metastasierter Situation mit > 3 CTCs/7,5 ml Vollblut eine intensiviertere adjuvante Therapie durchgeführt werden sollte, da Patienten mit erhöhtem CTC-Gehalt und intensivierter Therapie ein verbessertes progressionsfreies und Gesamtüberleben aufwiesen als Patienten mit < 3 CTCs/7,5 ml Vollblut und ebenfalls intensivierter Therapie (Krebs et al., 2015). In einer klinischen Untersuchung an 17 Patienten mit malignen Neoplasien des Gastrointestinaltrakts wurde infolgedessen gezeigt, dass ein Monitoring des CTC-Gehalts zu Therapiebeginn und am 28. Tag ein verbessertes progressionsfreies und Gesamtüberleben durch frühzeitige Therapieanpassung bedingen kann (Pernot et al., 2017).

Ähnliche Ergebnisse finden sich für das Prostatakarzinom. Es wurde mehrfach gezeigt, dass bei einem erhöhten CTC-Gehalt von > 5 CTCs/7,5 ml Vollblut das Gesamtüberleben vermindert ist. Besonders wurde dies mit ansteigendem Tumorstadium beobachtet (Okegawa et al., 2014; Goldkorn et al., 2014) und es wurde konkret eine positive Korrelation zwischen zunehmender CTC-Anzahl pro Vollblutprobe,

steigendem PSA-Wert und hohem TNM-Stadium gezeigt (Saad und Pantel, 2012; Folkersma et al., 2012).

Es lässt sich also feststellen, dass mit steigender CTC-Anzahl pro Blutprobe auch ein zunehmendes Tumorstadium assoziiert ist. Damit einhergehend ist ein verschlechtertes progressionsfreies Überleben und vermindertes Gesamtüberleben mit steigendem Tumorstadium zu erwarten. Eine CTC-Detektion zu Beginn, während und nach einer antiproliferativen Therapie kann Aufschlüsse über die mögliche Wirkung der Therapie geben und sollte in die Therapieentscheidung miteinbezogen werden, auch wenn hierzu aktuell noch keine Leitlinienempfehlung existiert.

2.5 Isolation und Detektion von CTCs

CTCs unterscheiden sich von anderen Blutzellen zum einen durch ihre biologischen Eigenschaften wie der Expression von Oberflächenproteinen, und zum anderen durch ihre physikalischen Eigenschaften wie Größe, Dichte, elektrischer Ladung und physischer Plastizität (Alix-Panabières und Pantel, 2014).

2.5.1 Isolation von CTCs

Zur Isolierung und Detektion von CTCs können sowohl biologische als auch physikalische Eigenschaften genutzt werden und gegebenenfalls kombiniert zum Einsatz kommen (Yang et al., 2021). Die Isolierung von CTCs durch eine Dichtegradientenzentrifugation nutzt die spezifische Dichte dieses Zellsubtyps. Blut besteht zum einen aus Blutplasma und zum anderen aus festen Blutbestandteilen: Erythrozyten (*Red Blood Cells*, RBCs), Leukozyten und Thrombozyten. Alle Blutzellen entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen, die sich weiter differenzieren; Erythrozyten und Thrombozyten sind in ihrer endgültigen Differenzierung kernlos und wie alle anderen Blutzellen nicht teilungsfähig. Zu den Leukozyten gehören Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (Reynés et al., 2018), mit welchen sich CTCs nach einer Dichtegradientenzentrifugation in einer Phase befinden (Yang et al., 2021). Für die Dichtegradientenzentrifugation wird häufig eine Ficoll-Paque®-Lösung verwendet, um PBMCs von den anderen Blutbestandteilen zu trennen (Weitz et al., 1998). Nach Anreicherung der PBMC-Fraktion durch Zentrifugation schließen sich weitere spezifische Isolierungsschritte an, um die CTCs von den PBMCs zu trennen. Eine häufig verwendete Methode zur CTC-Isolierung, die auf Dichtegradientenzentrifugation beruht, ist das RosetteSep™-System (StemCell™ Technologies, Vancouver, Kanada). Hier wird die Dichtegradienten-Zentrifugation mit einer Antikörperreaktion kombiniert und so PBMCs mit RBCs gemeinsam von CTCs getrennt; die Fraktion der PBMCs und RBCs wird verworfen und übrig bleiben die CTCs (Prinzip der *negativen Selektion*) (He et al., 2008; Wu et al., 2017).

Eine weitere Möglichkeit, CTCs zu isolieren, ist die Größenselektion über Mikrofilter, welche Blutzellen passieren lassen und CTCs zurückhalten. Auch in diesem Fall existieren verschiedene Verfahren, die

eingesetzt werden. ISET® (Rarecells Diagnostics, Paris, Frankreich) und ScreenCell® (ScreenCell, Sarcelles, Frankreich) nutzen eine Filtermembran, um die lebenden CTCs aus einer Probe zu isolieren und für weitere Analysen zu verwenden (Desitter et al., 2011). Das Pasortix®-System (Angle Biosciences, Toronto, Kanada) ist eine weitere Isolationsmethode, die auf Größenselektion basiert, wobei hier ein mikrofluidischer Chip verwendet wird, der neben der Größe auch die plastische Verformbarkeit der Zellen berücksichtigt. Zudem können die isolierten Zellen direkt in dem mikrofluidischen Chip gefärbt werden (Xu et al., 2015; Hvichia et al., 2016; Dabighi und Toghraie, 2020).

Für die häufigen malignen Neoplasien der Mamma, des Kolons und des Bronchialbaumes mit allen Subtypen, sowie für das Ovarialkarzinom (*Ovarial Cancer, OC*) wurden CTCs durch verschiedene Methoden nachgewiesen und es zeigte sich ebenfalls ein prognostischer und teilweise sogar diagnostischer Nutzen (Lu et al., 2016). Die Methoden, die am ausführlichsten betrachtet wurden, sind neben dem markerabhängigen CellSearch®-System (Cristofanilli et al., 2004), Pasortix® (Habli et al., 2020) und ISET® (Farace et al., 2011). Diese wiesen bei allen großen Tumorentitäten eine Sensitivität und Spezifität von 70% und mehr auf. Darüber hinaus existieren noch viele weitere, meist jedoch markerabhängige Systeme, welche zusätzlich oft zu gering spezifisch sind und nicht selten nur an einer Tumorentität getestet wurden. Zusammenfassend ist auffällig, dass die aktuell in der klinisch-theoretischen Praxis angewendeten Methoden markerabhängig sind und eher zur Prognosestellung beitragen als zur Diagnosesicherung (Alimirzaie et al., 2019). Letztere wird noch über herkömmliche Bildgebung in Kombination mit tumorunspezifischen Biomarkern gestellt. Besonders interessant ist die Tatsache, dass unterschiedliche Detektionsmethoden für CTCs eines metastasierten und nicht-metastasierten Subtyps derselben Tumorentität existieren. Dies wurde beispielsweise mehrfach für CellSearch® gezeigt, welches nur für metastasierte Karzinome der Mamma, des Kolons und der Prostata zugelassen ist (Yang et al., 2021).

2.5.2 Detektion von CTCs

Neben der Isolation wird die Bindung von Antikörpern an spezifische CTC-Markerproteine für die Detektion von CTCs genutzt. Das erste System, das diese Vorgehensweise nutzte, um CTCs des metastasierten Mamma-, kolorektalen und Prostatakarzinoms zu detektieren, war das CellSearch®-System (Menarini Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Italien) (Yang et al., 2021). Es galt lange Zeit als der Goldstandard im Bereich der CTC-Detektion, da es das einzige System war, welches von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen worden war und als Referenz für jede neue Methode am Markt herangezogen wurde (Pantel et al., 2009; Hofman et al., 2011; Andreopoulou et al., 2012). CellSearch® isoliert epitheliale CTCs anhand ihrer Expression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls (*Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM)) und nutzt anschließend die Expression von Cytokeratin (CK) 8, 18 und 19, sowie dem PBMC-spezifischen Oberflächenprotein

Cluster of Differentiation 45 (CD45) zur Detektion der CTCs. Die Isolation erfolgt hierbei durch Antikörper, welche an magnetische Partikel gebunden sind (Abbildung 6). Neben der Antikörperfärbung wird zusätzlich eine Kernfärbung mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt (Yang et al., 2021). Als Nachteile des CellSearch®-Systems gilt, dass es abhängig von der EpCAM-Expression der Tumorzellen ist und dass die analysierten Zellen nicht mehr vital sind.

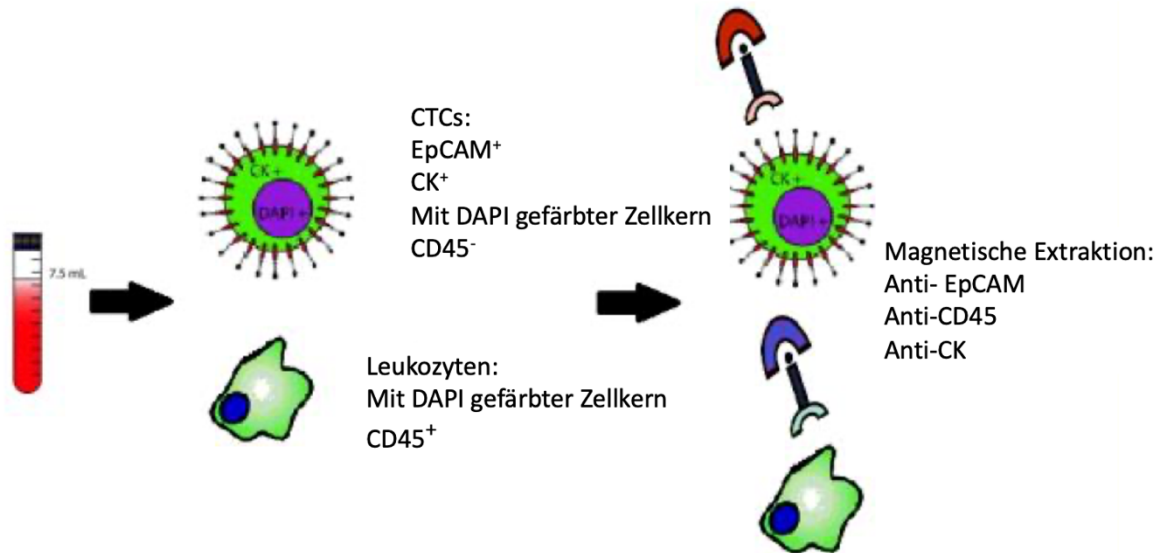


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktionsweise von CellSearch®

Magnetische Selektion von EpCAM⁺/CK⁺ sowie CD45⁻ CTCs. In mehreren Zwischenschritten werden über magnetische Kräfte CD45⁺ Zellen verworfen, sodass am Ende des Prozesses CD45⁻ Zellen übrigbleiben, welche durch EpCAM⁺/CK⁺ am ehesten CTCs entsprechen. Modifiziert nach Miscoci und Kollegen (Miscoci et al., 2018).

Lange Zeit empfahl die FDA für die Detektion von CTCs das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM als Markerprotein (Mu et al., 2016). EpCAM ist ein wichtiges Molekül in der Entstehung von Tumoren und Metastasen, da es maßgeblich für die physische Adhärenz und somit auch für die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen eines Zellverbandes verantwortlich ist (Fagotto, 2020). Besonders hohe Expressionsraten von EpCAM sind in embryonalen Zellen zu finden. Die Expression sinkt, sobald die Zelle in einen entdifferenzierten Zustand eingeht (Trzpis et al., 2007; McDougall et al., 2015). Erhalten Zellen einen Anreiz zur Proliferation, erhöht sich die Expression; dies wurde sowohl in gesunden als auch in neoplastischen Geweben beobachtet (Cirulli et al., 1998; de Boer et al., 1999; Santin et al., 2004). In Bezug auf maligne Neoplasien und CTCs ist die Höhe der EpCAM-Expression davon abhängig, ob die Tumorzellen einen EMT- oder MET-Prozess durchlaufen haben (Thiery et al., 2009). Durch EMT sinkt die Expression von EpCAM und die Zellen lösen sich durch Verlust von Zell-Zell-Verbindungen vermehrt aus ihrem Zellverband, was die Integrität von Geweben schädigt. Zusätzlich verlieren die ehemals epithelialen Zellen ihre apikale Polarität und können in den Blutstrom eintreten; darüber

hinaus ermöglicht der mesenchymale Phänotyp unter anderem die initialen Schritte von Metastasenbildung und hilft Zellen durch veränderte DNA-Reparaturmechanismen, Apoptose zu verhindern (Brabletz et al., 2021). Die CTC-Detektion über epitheliale Marker wird durch den EMT-Prozess also deutlich erschwert. Jedoch muss bedacht werden, dass auch epitheliale Tumoren nicht immer eine hohe EpCAM-Expression haben müssen. Went und Kollegen zeigten, dass von 131 untersuchten Tumorentitäten 98 EpCAM exprimierten, wohingegen bei den übrigen Entitäten keine erhöhte EpCAM-Expression nachzuweisen war (Went et al., 2004). Gleiches wurde ebenfalls für andere epitheliale Marker wie CK demonstriert (Willipinski-Stapelfeldt et al., 2005).

Eine andere Protein-Familie, die typischer Weise in epithelialen Tumorzellen vermehrt exprimiert sein kann und in Blutzellen nicht zu finden ist, sind CK. Sie sind ein Teil des Cytoskletts und dienen der mechanischen Stabilisierung von Epithelien (Moll et al., 2008). Eine erhöhte Expression von CK wurde bei soliden, epithelialen Tumoren wie zum Beispiel beim nicht-kleinzelligen Bronchiakarzinom (Numata et al., 2020), bei verschiedenen Subtypen von Lebertumoren (Takahashi et al., 2021) oder beim metastasierten Mammakarzinom (Joosse et al., 2012) beschrieben.

Besonders die Korrelation zwischen erhöhter Expression von CK und der Tendenz zur Metastasierung machen diesen Marker zur Detektion und Charakterisierung von CTCs interessant. Bei EMT sinkt typischerweise die CK-Expression, was die Migration und Intravasation von Tumorzellen fördert und zur plastischen Diversität von CTCs im Vergleich zu epithelialen Zellen beiträgt (Gradilone et al., 2011; Blick et al., 2010).

Als spezifischer Marker für Blutzellen, speziell für PBMCs, kann das CD45-Antigen zur Anwendung kommen (Loken et al., 1990). Es wird häufig zur Differenzierung zwischen CTCs und Blutzellen bei der *negativen Selektion* verwendet (Castro-Giner und Aceto, 2020). CD45 ist ein membranständiges Protein, dessen intrazellulärer Abschnitt eine Tyrosin-Phosphatase-Aktivität aufweist. Es wird von allen Leukozyten in unterschiedlichem Maße exprimiert, aber nicht von Erythrozyten oder Thrombozyten (Rheinländer et al., 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die phänotypische Diversität von CTCs, welche durch biologische Prozesse wie EMT/MET entsteht und sich auf die Expression wichtiger Markerproteine auswirkt, die Detektion und Charakterisierung von CTCs stark erschwert (Thiery et al., 2009). Aufgrund dieser Einschränkungen ist die Etablierung einer markerunabhängigen Detektionsmethode für CTCs ein wichtiger Schritt, um trotz dieser Diversität so viele Zellen dieses Subtyps in einer Blutprobe wie möglich zu erfassen.

2.6 Ploidie als ein Charakteristikum von Tumoren

2.6.1 Aneuploidie als mögliches Merkmal solider maligner Tumoren

Ein Charakteristikum von Tumorzellen ist Aneuploidie, die numerische Aberrationen ihrer Chromosomen (Hedley et al., 1993). Aneuploide Zellen besitzen somit keinen diploiden Chromosomensatz (2c), sondern ein Vielfaches hiervon und der Nachweis von Aneuploidie gilt als ein Charakteristikum von malignen Neoplasien (Kops et al., 2005; Gordon et al., 2012). In über 90% aller soliden Tumoren und 50% aller hämatologisch-onkologischen Erkrankungen wurde ein aneuploider Chromosomensatz nachgewiesen (Vasudevan et al., 2021). Meist entsteht Aneuploidie durch fehlende Trennung der Chromosomen während der Mitose und tritt bei Tumorzellen häufig zusammen mit chromosomaler Instabilität (*chromosomal instability*, CIN) auf (Bakhoum und Cantley, 2018). CIN beschreibt eine fehlerhafte Aufteilung der Chromosomen während der Mitose und ist häufig ein Grund für Aneuploidie; allerdings kann Aneuploide auch ohne das Auftreten von CIN existieren (McGranahan et al., 2012). Carter und Kollegen beschrieben CIN als eine Vorstufe von Aneuploidie und zeigten, dass CIN mit einem schlechteren klinischen Verlauf bei malignen Neoplasien des Bronchialsystems und der Mamma assoziiert ist (Carter et al., 2006). Darüber hinaus zeigten andere Forschungsgruppen, dass CIN und Aneuploidie mit einem verringerten Gesamtüberleben und verkürztem krankheitsfreien Überleben (*disease free survival*, DFS) sowohl beim Bronchialkarzinom (Choi et al., 2009), als auch beim kolorektalen Karzinom korrelieren (Walther et al., 2008; Gerling et al., 2011). Zusätzlich sind spezifische Aneuploidie-Muster identifiziert worden, welche spezifisch für die Genese und das Wachstum von malignen Tumoren sind (Carter et al., 2012; Zack et al., 2013; Ben-David et al., 2017; Taylor et al., 2018).

In vielen unterschiedlichen Tumorentitäten korreliert Aneuploidie neben einem verringerten krankheitsfreien Überleben und einem verringertem Gesamtüberleben ebenfalls mit einer erhöhten Mortalität (Hedley et al., 1993; Sebo, 1995). In Deutschland wird Aneuploidie besonders zur Differentialdiagnose des Prostatakarzinoms und von gynäkologischen Tumoren (Borderlinetumoren des Ovars, Dysplasien der Zervix uteri, Myelodysplasien) eingesetzt (Auffermann und Böcking, 1985; Biesterfeld et al., 2001a; Biesterfeld et al., 2001b). Zusätzlich ist ein diagnostischer Nutzen für Tumoren des hepatobiliären Systems und maligne Neoplasien der Bronchialschleimhaut nachgewiesen (Krishnamurthy et al., 2001; Osterheld et al., 2005; Biesterfeld und Deacu, 2009). Besonders für das Prostatakarzinom sind nicht nur diagnostische Zwecke (Baretton et al. 1993), sondern auch die Anwendung im Therapiemonitoring beschrieben worden (Böcking, 2005). Für Neoplasien im Bereich der Mundhöhle oder des Gebärmuttermundes konnte sogar eine Früherkennung mittels DNA-Bildzytometrie (*DNA Image Cytometry*, DIC) durchgeführt werden (Grote

et al., 2001; Remmerbach et al., 2001; Remmerbach et al., 2003; Maraki et al., 2004; Maraki et al., 2006).

2.6.2 Aneuploidie als mögliches Merkmal von CTCs

Allerdings muss angemerkt werden, dass aneuploide Zellen regelmäßig auch in gesunden Geweben vorkommen. Es wurde gezeigt, dass zum Beispiel 1-33% aller Neuronen (Rehen et al., 2001; Cai et al., 2014; Knouse et al., 2014; van den Bos et al., 2016; Vitak et al., 2017) oder 1-50% aller Hepatozyten (Duncan et al., 2012; Knouse et al., 2014) aneuploid sind. Jedoch sind diese Werte nur in soliden Geweben gemessen worden; im Blut befinden sich nur im Rahmen einer hämatologischen Grunderkrankung aneuploide Zellen (Weaver und Cleveland, 2006). Auch wenn Aneuploidie in einigen soliden Geweben zumindest teilweise ein normaler Zustand zu sein scheint (Knouse et al., 2014), wurde beispielsweise für Leber und Gehirn gezeigt, dass Erkrankungen und Fehlbildungen existieren, die sicher mit Aneuploidie assoziiert sind (Poduri et al., 2012; Lee et al., 2012). Im Vergleich der oben genannten Organsysteme zu malignen Tumoren mit nachgewiesener Aneuploidie besteht weiterhin der grundlegende Unterschied, dass bei malignen Tumoren deutlich mehr Zellen mit Aneuploidie gefunden wurden. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass in soliden Neoplasien unterschiedlicher Entitäten mehr als 99% aller getesteten Zellen aufgrund von CIN aneuploid waren (Baretton et al., 1993; Böcking, 2005; Weaver und Cleveland, 2006). Aneuploidie ist also besonders bei soliden Tumoren ein wichtiges und wiederkehrendes Merkmal.

Aneuploidie ist nicht nur ein Merkmal von Zellen, die sich im Zellverband solider Neoplasien oder deren Metastasen befinden. Dass Zellen, die sich aus einem aneuploiden malignen Tumor lösen und in die Blutbahn wandern, ebenfalls einen aneuploiden DNA-Gehalt haben, zeigten Lin und Kollegen durch den Nachweis von aneuploiden CTCs und aneuploiden zirkulierenden endothelialen Zellen (*Circulating Endothelial Cells, CECs*) in *Liquid Biopsies* aus peripherem Patientenblut (Lin et al., 2017a). Ye und Kollegen zeigten dies ebenfalls für weitere unterschiedliche maligne Neoplasien wie dem Bronchial- oder Hepatozellulärem Karzinom (Ye et al., 2019). Blutzellen wie Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten sind in der Regel diploid und nur im Falle einer hämatologischen Grunderkrankung ist mit Aneuploidie zu rechnen (Weaver und Cleveland, 2006; Williams und Amon, 2009). Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass in 4-5% aller untersuchten Lymphozyten aus *Liquid Biopsies* aus peripherem Patientenblut älterer, gesunder Probanden auch Hypo- oder Hyperdiploidie vorliegt, ohne dass der Nachweis einer manifesten Tumorerkrankung bestand (Jacobs et al., 1963; Nowinski et al., 1990). William und Kollegen wiesen jedoch nach, dass diese Aneuploidie in Lymphozyten sehr oft die Vorstufe einer malignen Tumorerkrankung darstellt (William et al., 2021) und es ist in diesem Zusammenhang wichtig zu erwähnen, dass aneuploide CTCs im Blut nur in sehr seltenen Fällen hyper- oder hypodiploid sind. Ye und Kollegen zeigten, dass CTCs in 84,6-95,6% aller untersuchten Blutproben verschiedener

Tumorentitäten und -lokalisierung tri-, tetra- oder polyploid sind (Ye et al., 2019). Zusätzlich unterscheiden sich aneuploide Lymphozyten durch die Expression anderer extrazellulärer Markerproteine an ihrer Zelloberfläche von CTCs, beispielsweise durch die Expression von CD3 und CD8 (William et al. 2021) oder CD45 (Loken et al., 1990; Rheinländer et al., 2018). Viele Forschungsgruppen verwendeten aneuploide CTCs bisher für Genomanalysen, um durch besseres Verständnis der individuellen Biologie des Primarius und/oder der Metastase die Wirksamkeit einer antiproliferativen Therapie zu optimieren (Oulhen et al., 2021). Dass bei Ploidieuntersuchungen von CTCs hauptsächlich euploide Zellen detektiert wurden, die ebenfalls extra- oder intrazelluläre Merkmale von CTCs hatten, ist bisher nicht berichtet. Es scheint jedoch nicht von der Hand zu weisen, dass in einer *Liquid Biopsy* aus peripherem Patientenblut nicht nur aneuploide CTCs zu finden sind. So zeigten Ye und Kollegen, dass 10-13% der untersuchten *Liquid Biopsies* aus peripherem Patientenblut zwar CTCs beinhalten, allerdings wiesen diese keinen aneuploiden Phänotyp auf (Ye et al., 2019). Es ist also anzunehmen, dass der Großteil der detektierten CTCs aus peripherem Patientenblut aneuploid ist, aber dennoch Ausnahmen existieren.

In der personalisierten Medizin wird der Nachweis aneuploider CTCs aus einer *Liquid Biopsy* aus Patientenblut allein für prognostische Zwecke bisher nicht genutzt. Der Nachweis aneuploider CTCs aus einer *Liquid Biopsy* aus Patientenblut erfolgt hauptsächlich mit Hilfe von Fluoreszenz in situ Hybridisierung (*Fluorescence in situ Hybridisation, FISH*), die zusätzlich mit Immunfluoreszenz gekoppelt werden kann (iFISH) (Lin, 2018). iFISH verbindet den quantitativen Nachweis von CTCs und charakterisiert sie anhand der Expression ihrer für CTCs spezifischen extrazellulären Oberflächenproteine (Lin, 2018), was Lin und Kollegen bereits mehrfach erfolgreich angewendet haben (Lin et al., 1999; Lin et al., 2009; Ge et al., 2015; Lin, 2015; Lin et al., 2017). Diese Methode ist besonders in Bezug auf die Charakterisierung der Zellen aussagekräftig, jedoch kann die Frage gestellt werden, ob diese Informationen im Falle einer Screeninguntersuchung überhaupt nötig sind. Ein Screening soll sicher eine schnelle Aussage darüber zulassen, ob eine gesuchte Erkrankung vorliegt oder nicht (Morrison, 1993). Aneuploidie in CTCs kann hierzu beitragen und die Detektion von Aneuploidie in CTCs aus einer *Liquid Biopsy* aus Patientenblut kann der passende Schritt hierfür sein.

2.6.3 Detektion von Aneuploidie

Ein oft verwendetes Verfahren, durch welches Aneuploidie auf Einzelzellebene detektiert werden kann, ist DNA-Bildzytometrie. Durch sie kann der DNA-Gehalt einer Zelle densitometrisch mittels Kamera und Mikroskop erfasst werden. Die densitometrische Messung wird durch eine vorherige Feulgen-Reaktion ermöglicht, welche die DNA im Zellkern stöchiometrisch anfärbt (Feulgen und Rossenbeck, 1924). Hierbei werden die Purinbasen Adenin und Guanin durch saure Hydrolyse entfernt und auf diese Weise Aldehydgruppen freigelegt. Durch die anschließende Inkubation mit dem

Schiff'schen Reagenz, welches Fuchsin und Schwefel in einer sauren Verbindung enthält, bindet diese Säure an die frei werdenden Aldehydgruppen und färbt die DNA im Zellkern rötlich bis lila. Im Anschluss erfolgt die Messung der Extinktion des gefärbten Areals, wobei die Gesamtextinktion eines gemessenen Partikels, beziehungsweise einer Zelle, als intrinsische optische Dichte (Intrinsic Optical Density, IOD) bezeichnet wird. Die Bestimmung des DNA-Gehalts der Analysezellen erfolgt anschließend über den Vergleich der gemessenen IOD mit der gemittelten IOD von Referenzzellen mit bekanntem DNA-Gehalt. Als Referenzzellen dienen meist Lymphozyten, da diese nicht mehr teilungsfähig sind und somit einen diploiden Chromosomensatz aufweisen.

Ein weiteres Verfahren, um Aneuploidie auf Einzelzellebene nachzuweisen, ist Durchflusszytometrie (*Flowctometry Based Measuring, FCM*) (Grimwade et al., 2017). Zudem wird FISH häufig zur Detektion von Aneuploidie auf Chromosomenebene angewendet (Danielsen et al., 2016; Lin, 2015).

3 Fragestellung und Zielsetzung

CTCs sind als ursächlich für die Entstehung von Metastasen solider maligner Tumoren anzusehen. Metastasen schränken die Lebensqualität von Patienten stark ein und führen im Endeffekt zum früheren Tod. Ein sicheres Merkmal solider Neoplasien ist Aneuploidie, die durch DNA-Bildzytometrie einfach detektiert werden kann. Allerdings liegt im klinischen Alltag bei (Ausbreitungs-) Diagnostik oder Prognosestellung das Augenmerk nicht auf dem Ploidiestatus. Es wurde bereits gezeigt, dass in einer *Liquid Biopsy* von Patientenblut von Patienten mit metastasierten Tumoren regelmäßig CTCs vorhanden sind und die Anzahl von CTCs pro Blutprobe mit einem früheren Tod korreliert ist. Darüber hinaus weisen CTCs ebenfalls wie der Primarius Aneuploidie auf, weshalb in dieser Arbeit untersucht werden sollte, ob sich der Nachweis von Aneuploidie mittels DNA-Bildzytometrie als neue markerunabhängige Methode zur Detektion von Tumorzellen im Blut nutzen lässt. Nach aktuellem Stand der Forschung wird Aneuploidie nicht zur Detektion von CTCs eingesetzt. CTCs werden bisher hauptsächlich durch die Markierung spezifischer Oberflächenproteine in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Um die Anwendbarkeit dieser Methode in diesem Gebiet erstmalig zu überprüfen, sollte basierend auf *spike in*-Modellen aus kultivierten Tumorzelllinien und isolierten mononukleären Blutzellen ein Protokoll etabliert werden, das eine Kombination aus Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie ermöglicht. Anhand dieses etablierten Protokolls sollte die Anwendbarkeit der Methodik evaluiert und mit der Immunfluoreszenz verglichen werden. Im Detail stellten sich folgende Fragen:

- 1) Kann der Ploidiegehalt als Kriterium zur Detektion von Tumorzellen in einer Blutprobe genutzt werden?
- 2) Wo liegen die Vor- und Nachteile der markerunabhängigen Methode im Vergleich zur aktuell empfohlenen Detektion mittels Immunfluoreszenzmarkierung von Oberflächenproteinen?
- 3) Ist der Ploidiegehalt von Zellen als zuverlässiges alleiniges Kriterium zur Detektion von Tumorzellen nutzbar?
- 4) Gibt es eine numerische Untergrenze von CTCs, die mit Hilfe von Aneuploidie detektiert werden kann?

4 Material und Methoden

4.1 Material

Für eine bessere Übersicht sind alle verwendeten Materialien inklusive der Zusammensetzungen der Kulturmedien tabellarisch im Anhang zu finden. Das Verwenden von humanen Blutproben war durch das Ethikvotum 17-043 der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt worden. Das Ethikvotum ist ebenfalls im Anhang zu finden.

4.2 Methoden

4.2.1 Kultivierung humaner Tumorzelllinien

4.2.1.1 Kultivierung

Zur Kultivierung wurden die adhärent wachsenden Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 der *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA) ausgewählt (Tabelle 1), die allesamt aneuploid sind und von unterschiedlichen Tumorentitäten abstammen. Die Kultivierung erfolgte jeweils in T25-Zellkulturflaschen. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Gelagert wurden die kultivierten Zellen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. Zwei Mal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel. Das Passagieren der Zellen wurde bei einer Konfluenz von circa 75% durchgeführt, was durchschnittlich einer Teilung pro Woche entsprach. Hierzu wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin für 2 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 4 ml fetalem Kalbserum (*Fetal Bovine Serum*, FBS) -haltigem Medium abgestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Aufteilung der Zellen erfolgte angepasst an die Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie im Verhältnis 1:3 bis 1:5.

Tabelle 1: Verwendete Tumorzelllinien

(ATCC-Nummer und offiziell verwendeter Name), TNM-Stadium mit histologischem Status (sofern vorhanden) und deren Kulturbedingungen. ATCC = *American Type Culture Collection*; FBS = *Fetal Bovine Serum*; k. A. = keine Angabe

ATCC-Nummer	Zelllinie	Histologie	Progressionsgrad	Kulturmedium	FBS (%)	CO ₂ (%)
CRL-2338	HCC1954	Duktales Mammakarzinom	TNM IIA, Grad 3	RPMI 1640 + 1% Penicillin/Streptomycin	10	5
CRL-2871	HCC4006	Duktales Adenokarzinom der Lunge; Metastase der Pleura	k. A.	RPMI 1640 + 1% Penicillin/Streptomycin	10	5
HTB-37	CaCo-2	Kolorektales Adenokarzinom	k. A.	EMEM + 1% Penicillin/Streptomycin	20	5
HTB-39	SK-CO-1	Kolorektales Adenokarzinom; Metastase der Aszites	k. A.	EMEM + 1% Penicillin/Streptomycin	10	5

4.2.1.2 Kryokonservierung

Für eventuelle Rekultivierung und um die Anzahl der Passagen über die gesamte Kultivierungsdauer hinweg gering zu halten, erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Kryokonservierung der Zelllinien in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden die Zellen pelletiert, der Überstand mit einer Pipette abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Kryokonservierungsmedium (95% Medium, 5% Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert. Diese Suspension wurde in gekühlte 100 µl Kryokonservierungsröhrchen überführt und anschließend sofort in der Kryokonservierungsbehältereinheit *Mr. Frosty*TM auf -80°C heruntergekühlt. Dies war nötig, um Kristallisationsprozesse während des Einfrierens zu vermeiden, welche die Zellen hätten schädigen können. Durch den Gefrierbehälter wurden die Zellen gleichmäßig um 1°C pro Minute heruntergekühlt und konnten nach 24 bis 48 Stunden aus dem Gefrierbehälter in die Langzeitaufbewahrung in Stickstoff bei <-170°C in Stickstofftanks verbracht werden. Die Rekultivierung der eingefrorenen Zelllinien erfolgte bei Bedarf. Hierzu wurden die Röhrchen aus dem Stickstofftank auf Eis entnommen und bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut. Danach wurden die Zellen in 10 ml warmes Kulturmedium mit einer Pipette aufgenommen, in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in dem entsprechenden Kulturmedium suspendiert und die Zellsuspension in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Am Folgetag erfolgte immer ein Mediumwechsel, um Zelldetritus und verbliebene zytotoxische Zusätze des Kryokonservierungsmediums vollständig zu eliminieren.

4.2.2 Blutentnahme und PBMC-Isolierung

CTCs befinden sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften nach einer Dichtegradientenzentrifugation in der PBMC-Zellfraktion des Blutes. Für diese Arbeit wurden PBMCs aus dem Vollblut von gesunden Probanden isoliert und diese anschließend für *spike in*-Modelle mit kultivierten Tumorzellen verwendet.

4.2.2.1 Blutentnahme an gesunden Probanden

Für die PBMC-Isolierung wurden subjektiv gesunde, freiwillige Probanden gesucht. Nach Aufklärung über allgemeine Risiken einer Blutentnahme wurde jedem Probanden ein EDTA-Blutentnahmeröhrchen (7,5 ml) peripher-venöses Blut aus der *Vena mediana cubiti* beziehungsweise der *Vena cephalica* entnommen. Das Blut wurde daraufhin direkt für die Dichtegradientenzentrifugation und PBMC-Isolierung weiterverwendet.

4.2.2.2 Isolierung von PBMCs

Zur Isolierung von PBMCs kam in dieser Arbeit die Dichtegradientenzentrifugation mittels Lymphozyten Separationsmedium 1077 (*Lymphocyte Separation Medium 1077*, LSM 1077) zum Einsatz. Dieses Medium basiert auf einer so genannten „Ficoll-Lösung“, die aus einem synthetischen, vielverzweigten Saccharose-Polymer besteht und die spezifische Dichte von 1,077 g/ml aufweist. Für die Isolierung wurden 7,5 ml Vollblut mit dem gleichen Volumen PBS in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gemischt und anschließend vorsichtig in ein separates 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Ficoll-Lösung überführt, sodass das Vollblut-PBS-Gemisch die Ficoll-Lösung überschichtete. Dabei durften sich die beiden Phasen nicht miteinander vermischen. Danach wurde eine Zentrifugation bei 800 x g für 15 Minuten unter langsamer Beschleunigung und fehlender Abbremsung durchgeführt. Dies bewirkte eine Auftrennung der unterschiedlichen Blutbestandteile in vier Schichten (Abbildung 7). PBMCs befanden sich in der mittleren Phase zwischen Plasmazellen und LSM-Medium. Die Plasmazellschicht wurde vorsichtig mit einer serologischen Pipette abgenommen und verworfen. Die Interphase mit PBMCs wurde ebenfalls mit einer Pipette abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen. Hierzu wurde die abgenommene Phase mit kaltem PBS aufgefüllt und 5 Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand jeweils vorsichtig mit einer serologischen Pipette abgenommen und verworfen.

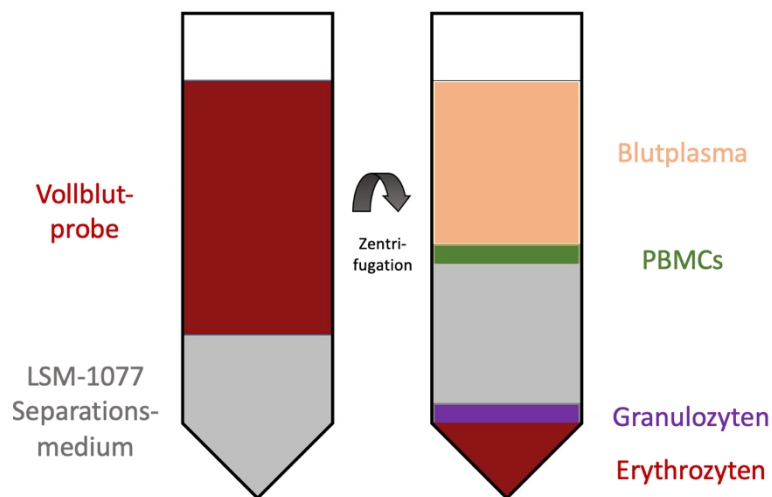


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation mit LSM 1077

Nachdem das Separationsmedium (grau) mit der Vollblutprobe (rot) überschichtet wurde, erfolgt die Zentrifugation bei 800 x g für 15 Minuten unter langsamer Beschleunigung und fehlender Abbremsung. Hiernach entstehen vier Schichten, von oben nach unten betrachtet: Blutplasma mit Blutplättchenfraktion (orange), PBMC- und Blutplättchenfraktion (grün), Separationsmedium (grau) und als unterste Schicht die Fraktion der Erythrozyten und Granulozyten (violett/rot), die teilweise vermischt oder aufgetrennt sein können. Abbildung modifiziert nach KamTek Incorporation (KamTek Incorporation, 2023).

4.2.3 Erstellung eines *spike in*-Modells aus isolierten PBMCs und kultivierten Tumorzellen
 Um die Detektion von CTCs in der PBMC-Fraktion des Bluts nachzubilden, wurde in dieser Arbeit ein *spike in*-Modell aus kultivierten Tumorzellen und isolierten PBMCs verwendet. Hierdurch konnten definierte Mengen an Tumorzellen und PBMCs für die Etablierung der Detektionsmethode eingesetzt werden.

Um ein *spike in*-Modell zu erstellen, wurden Tumorzellen wie in Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden wie beim Passagieren für 2 Minuten bei 37°C mit Trypsin inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe des doppelten Volumens an Zellkulturmedium gestoppt. Nach ausgiebigem Resuspendieren wurde ein Teil der Zellsuspension zur erneuten Aussaat verwendet, der andere Teil wurde in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, zweimal in PBS gewaschen und das Zellpellet in PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen pro Milliliter mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Zählkammer nach Neubauer (Brand, Wertheim, Deutschland) überführt und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach einer Wartezeit von 10 Sekunden, welche die Zellen zum Verteilen benötigten, begann die Auswertung aller vier Quadranten von links oben nach rechts unten jeweils meanderförmig, wobei die Zellen mit Hilfe einer Zähluhr gezählt wurden. Zusätzlich zu den Zellen in den vier Großquadranten, wurden bei der Zählung Zellen berücksichtigt, die an der oberen und linken

Maßlinie an- oder aufliegend waren. Im Anschluss wurde die gewünschte Anzahl an Tumorzellen mit einem definierten Volumen der isolierten PBMCs gemischt (s. Abschnitt 4.2.4).

4.2.4 Erstellung von Cytospins

Unter Cytospins versteht man Objektträger, auf denen Zellen durch Zentrifugation immobilisiert wurden. Die so immobilisierten Zellen lassen sich anschließend direkt für verschiedene Färbungen verwenden. Zur Herstellung eines Cytospins wurde ein beschrifteter Objektträger mit einer Filterkarte belegt und in eine Metallklemme mit Trichter („Schlitten“) eingespannt. Anschließend wurden 100 µl Zellsuspension mit einer Pipette in den Trichter überführt. Die Immobilisierung der Zellen auf dem Objektträger erfolgte durch Zentrifugation des eingesetzten Schlittens für 5 Minuten bei 55 x g. Die Objektträger wurden im Anschluss mindestens 30 Minuten im Dunkeln und bei Raumtemperatur getrocknet.

4.2.5 Immunfluoreszenz

Die Detektion von Tumorzellen und PBMCs über charakteristische zelluläre Marker erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch spezifische Antigen-Antikörper-Färbereaktionen. Diese wurden anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Die Immunfluoreszenz wurde in einem ersten Protokoll an den entsprechenden Tumorzelltypen getestet und anschließend in einem weiterentwickelten und ergänzten Protokoll finalisiert, um Tumorzellen und PBMCs gleichzeitig zu markieren.

4.2.5.1 Immunfluoreszenzmarkierung CK-positiver Tumorzellen („*Single Step Protocol*“)

Um die kultivierten Tumorzellen auf ihre CK-Expression zu testen, wurden alle Tumorzelllinien einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Hierfür wurden Cytospins erstellt und die immobilisierten Zellen für 15 Minuten mit einer Lösung aus 4% PFA inkubiert, um die Tumorzellen zu fixieren. Anschließend wurden die Objektträger drei Mal gewaschen, wobei die Objektträger mit je 200 µl PBS für 3 Minuten inkubiert wurden. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran durch die Inkubation in 0,1% Triton X-100 (gelöst in 1% BSA/PBS) für 10 Minuten. Hiernach wurden die Objektträger erneut gewaschen und im Anschluss für 45 Minuten in 1% BSA/PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach der Inkubation und mehreren Waschschritten in PBS erfolgte die einstündige Inkubation der Objektträger mit 200 µl Primärantikörper. Der verwendete panCytokeratin (pCK)-Antikörper war mit AlexaFluor 488® konjugiert und wurde in einer Verdünnung von 1:100 in 0,01% BSA/PBS eingesetzt. Ab diesem Punkt erfolgten alle Arbeitsschritte im Dunkeln. Alle Objektträger wurden nach der Antikörper-Inkubation zwei Mal in einer Küvette mit PBS gewaschen, einschließlich der Negativkontrolle. Im Anschluss wurde die Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. Hierfür wurden die Objektträger für 2 Minuten in einer Küvette mit DAPI-Lösung

(Verdünnung 1:5000 in PBS) inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger mit Vectamount® Antifade Medium eingedeckt und zum Trocknen im Dunkeln aufbewahrt. Alle aufgelisteten Teilschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der verwendete anti-panCytokeratin Antikörper ist gegen Cytokeratin 1 - 8, 10, 14, 15, 16 und 19 gerichtet.

4.2.5.2 Immunfluoreszenzmarkierung CK-positiver Tumorzellen und CD45-positiver PBMCs („Two Step Protocol“)

Um Tumorzellen und PBMCs in einem *spike in*-Modell zu detektieren, wurde das bestehende *Single Step* Protokoll leicht abgeändert und um das Färbekit *Fix&Perm* der Firma *Nordic-MUBio* ergänzt. Hierbei wurden die Objektträger zuerst mit jeweils 100µl *Component A* für 20 Minuten inkubiert und auf diese Weise fixiert. Anschließend wurden die Objektträger mit 200µl 1% BSA/PBS für drei Minuten inkubiert, um *Component A* vollständig zu entfernen. Danach erfolgte für 30 Minuten die Inkubation der Objektträger in *Staining-Solution*. Diese Lösung bestand aus *Component B* des *Fix&Perm*-Kits, sowie den zwei Fluoreszenz-Antikörpern; PBMCs wurden mittels eines direkt an Alexa Fluor® 594 gekoppelten CD45-Antikörpers und Tumorzellen mit einem direkt an Alexa Fluor® 488 gekoppelten anti-panCytokeratin-Antikörper markiert. Hierfür wurden in 100 µl *Component B* anti-panCytokeratin Antikörper (1:150) und anti-CD45 Antikörper (1:100) gelöst. *Component B* ermöglicht die Permeabilisierung der Zelle und eine gleichzeitige Bindung der Antikörper. Nach der Inkubation wurde die Lösung vorsichtig mit Filterpapier abgesaugt und die Objektträger zwei Mal in 1% BSA/PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation für fünf Minuten in PBS. Abschließend wurden die Objektträger mit einem Tropfen Prolong™Diamond Antifade unter einem Deckgläschen eingedeckt und im Dunkeln für mindestens 12 Stunden getrocknet. Alle Schritte wurden unter Raumtemperatur durchgeführt. Zur Erstellung der Negativkontrollen wurden die Objektträger identisch bearbeitet, außer dass keine Zugabe von Antikörper in die Lösung mit *Component B* erfolgte.

4.2.6 Aufnahme und Analyse von Fluoreszenzbildern

Nachdem die Objektträger vollständig getrocknet waren, wurden sie mit dem Fluoreszenzmikroskop *Keyence BioRevo BZ-9000* ausgewertet. Hierzu wurden die Bilder mittels einer *Charge Coupled Device* (CCD)-Kamera monochromatisch aufgenommen und anschließend durch das *BZ-Viewer*-Programm kanalspezifisch rot, grün oder blau eingefärbt. Im blauen Kanal wurde der Zellkern von Tumorzellen und PBMCs gleichermaßen sichtbar. Jeder Objektträger wurde im Ganzen ausgewertet. Hierzu mussten die Objektträger vollständig vom Mikroskop gescannt werden und die entstandenen Bilder wurden durch sogenanntes *Resizing* in ihrer Datenmenge komprimiert. Dies war nötig, da sonst ein Zusammenfügen der verschiedenen Kanäle aufgrund der hohen Datenmengen pro Bild nicht möglich gewesen wäre. Vor jeder Auswertung wurde immer die Negativkontrolle eingescannt, so konnten Referenzwerte für die Belichtungszeiten in den spezifischen Kanälen festgelegt werden. Dieser

Vorgang wurde für jede Färbeserie mit einer neuen Negativkontrolle wiederholt. Ein Objektträger galt als positiv gefärbt, wenn bei einer bestimmten Belichtungszeit im Rot- und im Grünkanal ein positives Signal im Vergleich zur Negativkontrolle zu erkennen war.

4.2.7 DNA-Bildzytometrie

Körperzellen haben außerhalb der Phase der Zellteilung normalerweise einen diploiden Chromosomensatz (2c). Das Vorliegen von aneuploiden Zellen lässt sich unter anderem durch die Methode der DNA-Bildzytometrie bestimmen. Hierbei wird die DNA im Zellkern durch die sogenannte Feulgen-Reaktion angefärbt und anschließend der DNA-Gehalt jeder Zelle bildzytometrisch bestimmt.

4.2.7.1 Präparatvorbereitung und Feulgen-Färbung

Die luftgetrockneten Cytospins wurden über Nacht lichtgeschützt in 4,5% Formaldehyd fixiert. Danach erfolgte die vollständige Entfernung des Formaldehyds durch Spülung unter fließendem Wasser. Anschließend wurde eine saure Hydrolyse durchgeführt, bei der die Objektträger in 5M HCl für 60 Minuten inkubiert wurden. Durch die Behandlung lösen sich Purinbasen selektiv vom DNA-Strang, wodurch purinfreie Stränge mit freiliegenden Aldehydgruppen gebildet werden. Nach der HCl-Behandlung wurde ein dreimaliges Waschen mit destilliertem H₂O durchgeführt, wonach die Inkubation mit *Schiff'schem Reagenz* bei Raumtemperatur für zwei Stunden im Dunkeln erfolgte. In diesem Schritt bindet das im *Schiff'schen Reagenz* enthaltene Fuchsin an die freien Aldehydgruppen und interkaliert auf diese Weise den DNA-Strang. Diese irreversible und kovalente Fuchsin-DNA-Bindung verändert die elektrische Ladung der DNA und erzeugte so eine rotviolette Färbung. Nach mehreren Waschschritten mit destilliertem Wasser, >99% haltiger Natriumpyrosulfit-Lösung und fließendem Leitungswasser wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe für drei Minuten in 70% Ethanol, anschließend zwei Mal für 3 Minuten in 96% Ethanol, danach für drei Minuten in 100% Ethanol und abschließend für drei Minuten in 100% Analyse-Ethanol dehydriert. Hiernach wurden die Präparate durch kurzes, dreimaliges Eintauchen in reinstem Xylol (< 99,9%) komplett von zurückgebliebenem Wasser gereinigt und mit Entellan eingedeckt. Hiernach wurden die Präparate zum Trocknen über Nacht im Dunkeln aufbewahrt. Alle genannten Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

4.2.7.2 Ploidiemessung

Zur Quantifizierung des DNA-Gehalts der gefärbten Zellen auf den Objektträgern wurde eine Kombination aus einer CCD-Videokamera und einem Zeiss Axiovert-Mikroskop (planes Objektiv, 40:1) genutzt und jeweils der gesamte Objektträger eingescannt. Die Auswertung der digitalisierten Aufnahme erfolgte mit der *Image-Cytometry ICM Software* der Firma Ahrens ICM. Nachdem der gesamte Objektträger im Durchlichtmikroskop gescannt wurde, erfolgte die Sortierung der Analysezellen. Hierfür wurden alle gefundenen Partikel in der Zellgalerie der Software nach aufsteigendem DNA-Gehalt geordnet und die Zellen wurden manuell aussortiert. Wenn Zellen zu dicht

beieinander lagen, konnten diese mittels *Cutting-Tool* innerhalb des Softwareprogramms getrennt werden. Wenn sich die Zellen so überlagerten, dass eine sinnvolle Trennung nicht mehr möglich war, wurden die Zellen von der Messung ausgeschlossen. Allgemein wurden Schmutzpartikel, nicht vollständig erfasste oder unvollständig beziehungsweise ungleichmäßig gefärbte Zellen in die Analyse nicht miteinbezogen (Tabelle 2). Die Berechnung der Ploidie durch die Software erfolgt über die Messung der Menge an absorbiertem Licht pro Partikel (Extinktion), welche proportional zur Menge des aufgenommenen Farbstoffs, und hiermit auch zur vorhandenen DNA-Menge, ist. Um die Extinktion eines Partikels zu bestimmen, werden die Absorptionswerte aller zugehörigen Bildpunkte ermittelt (inklusive Korrektur von Glare-(Streulicht)-Anteilen). Als Partikel wird im Falle dieser Arbeit ein einzelner Zellkern bezeichnet, der aus mehreren einzelnen Bildpunkten besteht. Der gemessene Extinktionswert aller einzelnen Bildpunkte wird als Gesamtextinktion oder IOD bezeichnet und anschließend mit dem Extinktionswert einer diploiden Referenzpopulation verglichen, um den DNA-Gehalt des Partikels zu ermitteln (Gebauer, 2017). Zusätzlich misst die Software die Kernfläche, um diese der IOD in einem Histogramm gegenüberzustellen. Auf diese Weise kann die Ploidie einzelner Zellen miteinander verglichen werden. Als diploide Referenzpopulation dienten in dieser Arbeit frisch isolierte PBMCs von gesunden Spendern, welche sich entweder auf demselben Objektträger befanden wie die Analysezellen oder auf einem externen Objektträger, der in der gleichen Feulgen-Färbeserie wie die Analysezellen inkludiert war.

Tabelle 2: Ausschlusskriterien der Analysezellen für DNA-Bildzytometrie

Formale Kriterien
Sich überlagernde Zellen, die händisch nicht sinnvoll voneinander zu trennen sind
Färbeartefakte im Inneren (Kohlepartikel, Lufteinschlüsse, ungleichmäßige Färbung)
Zelldetritus
Schmutzpartikel

4.2.8 Kombination von Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie

Für das Ziel der Arbeit war es notwendig, dass vor der Identifizierung aneuploider Tumorzellen in der DNA-Bildzytometrie eine Charakterisierung dieser Zellen mittels Immunfluoreszenz erfolgte. Dies ergab sich daraus, dass zu Beginn der Feulgen-Reaktion die Zellmembran der Analysezellen mit Salzsäure lysiert wird, um den Nucleus zugänglich zu machen. Die weitere Analyse von membranständigen Strukturen ist nach diesem Schritt also nicht mehr möglich.

4.2.8.1 Erstellung einer Protokoll-Kombination von Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie

Für die Kombination der beiden Verfahren wurden Cytospins wie in 4.2.4 beschrieben erstellt und anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung und Auswertung nach den in 4.2.5 und 4.2.6 beschriebenen Schritten. Nach der Auswertung der Immunfluoreszenz wurden die Objektträger in einer mit PBS gefüllten Küvette aufrechtstehend und mit Abstand zueinander bei 37°C inkubiert, bis sich alle Deckgläschen von allein abgelöst hatten. Nur so konnte ein Zellverlust durch Traktionskräfte am Deckglas so gering wie möglich gehalten werden. In der Regel waren alle Deckgläschen nach ca. 60 Minuten Inkubation abgelöst. Nachdem alle Deckgläschen abgelöst waren, wurde die Feulgen-Färbung mit anschließender Bildanalyse und Auswertung wie in 4.2.7 beschrieben durchgeführt.

4.2.8.2 Optische Analyse der Cytospins und Synopsis

Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die Objektträger nach der DNA-Bildzytometrie zusätzlich noch im Phasenkontrastmodus des Keyence-Mikroskops eingescannt. Hierbei wurde dieselbe Vergrößerung (20x) wie für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Somit entstanden zwei gleich große Abbildungen der Objektträger, die mit Hilfe des Programms *BZ-Viewer* übereinandergelegt wurden (Overlay-Bild). Auf diese Weise erfolgte ein optischer Abgleich der Zellen und deren Zellkerne, die in der Immunfluoreszenz als panCytokeratin positiv/CD45-negativ (pCK⁺/CD45⁻), und in der DNA-Bildzytometrie als aneuploid identifiziert wurden. Anschließend wurden diese Zellen in der Bildgalerie des Zytometrie-Programms identifiziert, um den DNA-Gehalt der pCK⁺/CD45⁻ Zellen zu bestimmen.

4.2.9 Statistische Auswertung

Um die Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurde jede Färbung in drei Durchgängen für jede Tumorzelllinie an neu erstellten Cytospins wiederholt. Durch die dreimalige Wiederholung war sichergestellt, dass die Ergebnisse sicher und objektivierbar zu reproduzieren waren. Da es sich um Tumorzelllinien aus einer Zellkultur handelte, waren die Wachstumsbedingungen von Zellpassage zu Zellpassage gut vergleichbar. Allerdings war zu beachten, dass auch intrazelluläre Prozesse zu Veränderungen der Expression von Oberflächenproteinen wie EpCAM oder pCK führen können, was vor den jeweiligen Untersuchungen nicht überprüft werden kann, ohne dass die Zellen für die eigentlichen Versuche untauglich werden. Dieser Zustand ist vergleichbar mit der Heterogenität von soliden Tumoren aller bekannten Entitäten. Um nun die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse besser beurteilen zu können wurde die Anzahl der Wiederholungen pro Zelllinie auf drei Wiederholungen festgelegt. Zum einen war durch die Verwendung verschiedener Zelllinien ein Faktor zur objektivierbaren Vergleichbarkeit gegeben. Zum anderen bestand durch die Wiederholungen mit verschiedenen Passagen einer einzelnen Zelllinie ausreichende Variabilität, um zu zeigen, dass die

etablierte Methode auch bei verändertem Expressionsprofil angewendet werden kann. Es wurden jeweils neu erstellte *spike in*-Modelle verwendet, die technisch in gleicher Weise hergestellt und anschließend behandelt wurden. Durch Zellzählung in der Zahlkammer nach Neubauer wurde vor Erstellung der Modelle versucht, eine identische Anzahl von Tumorzellen und PBMCs auf die Objektträger zu bringen. Danach wurden, wie in 1.5. beschrieben, Cytospins hergestellt und die Kombination von Immunfluoreszenz und Feulgen-Färbung kam wie in 4.2.8 beschrieben zur Anwendung. Nach Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie und Ploidiemessung wurde die Anzahl der als Tumorzellen identifizierten Zellen, welche durch beide Methoden identifiziert worden waren, miteinander verglichen. Hierfür wurden nach geltenden mathematischen Grundsätzen, für jeden Objektträger einzeln und für alle Objektträger einer Färbeserie, der Mittelwert \bar{X} und die Standardabweichung σ bestimmt und im Anschluss die relative Detektionsrate der DNA-Bildzytometrie in Prozent ermittelt. Die Eingabe und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm Microsoft Excel, (Microsoft Office 360, Microsoft Corporation) unter Gültigkeit der allgemeinen mathematischen Standards.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung einer Immunfluoreszenzfärbung zur gleichzeitigen Detektion von kultivierten Tumorzellen und PBMCs

Im ersten Schritt dieser Arbeit wurde ein Immunfluoreszenzprotokoll für die Detektion von epithelialen Tumorzellen und PBMCs etabliert. Da Immunfluoreszenz aktuell den Goldstandard für die Detektion von CTCs in peripherem Blut darstellt, war dieser Schritt essenziell, um den Erfolg der hier zu etablierenden Methode beurteilen und vergleichen zu können.

Die Methode der Immunfluoreszenz basiert auf der Markierung von spezifischen zellulären Antigenen durch fluoreszenzmarkierte Antikörper und der anschließenden Visualisierung dieser Fluoreszenz im Mikroskop. Zur Etablierung des Immunfluoreszenzprotokolls wurden Tumorzellen der vier Zelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 *in-vitro* kultiviert. Als spezifischer Immunfluoreszenz-Marker für die Tumorzellen wurde in dieser Arbeit ein AlexaFluor 488® -gekoppelter anti-panCytokeratin Antikörper verwendet, der gegen Cytokeratin 1 - 8, 10, 14, 15, 16 und 19 gerichtet ist. Mit diesem Antikörper wurden in einem ersten Schritt alle vier Zelllinien angefärbt, um deren CK-Expression zu visualisieren und die Eignung des Antikörpers für die Immunfluoreszenz zu testen. Darüber hinaus war dies wichtig, um in späteren Versuchen epitheliale (Tumor-) Zellen von Blutzellen unterscheiden zu können.

Alle vier Zelllinien zeigten ein spezifisches pCK-Signal im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 8). Zwischen den einzelnen Zelllinien war eine unterschiedlich starke Ausprägung der pCK-Expression zu beobachten. Während die pCK-Expression bei der Zelllinie SK-CO-1 am höchsten zu sein schien, zeigte die Zelllinie CaCo-2 das schwächste Signal. Unabhängig von der unterschiedlich starken pCK-Expression zwischen den Zelllinien zeigten die Ergebnisse, dass das hier verwendete Immunfluoreszenzprotokoll für den eindeutigen Nachweis der pCK-Expression in allen Zellliniengut geeignet war.

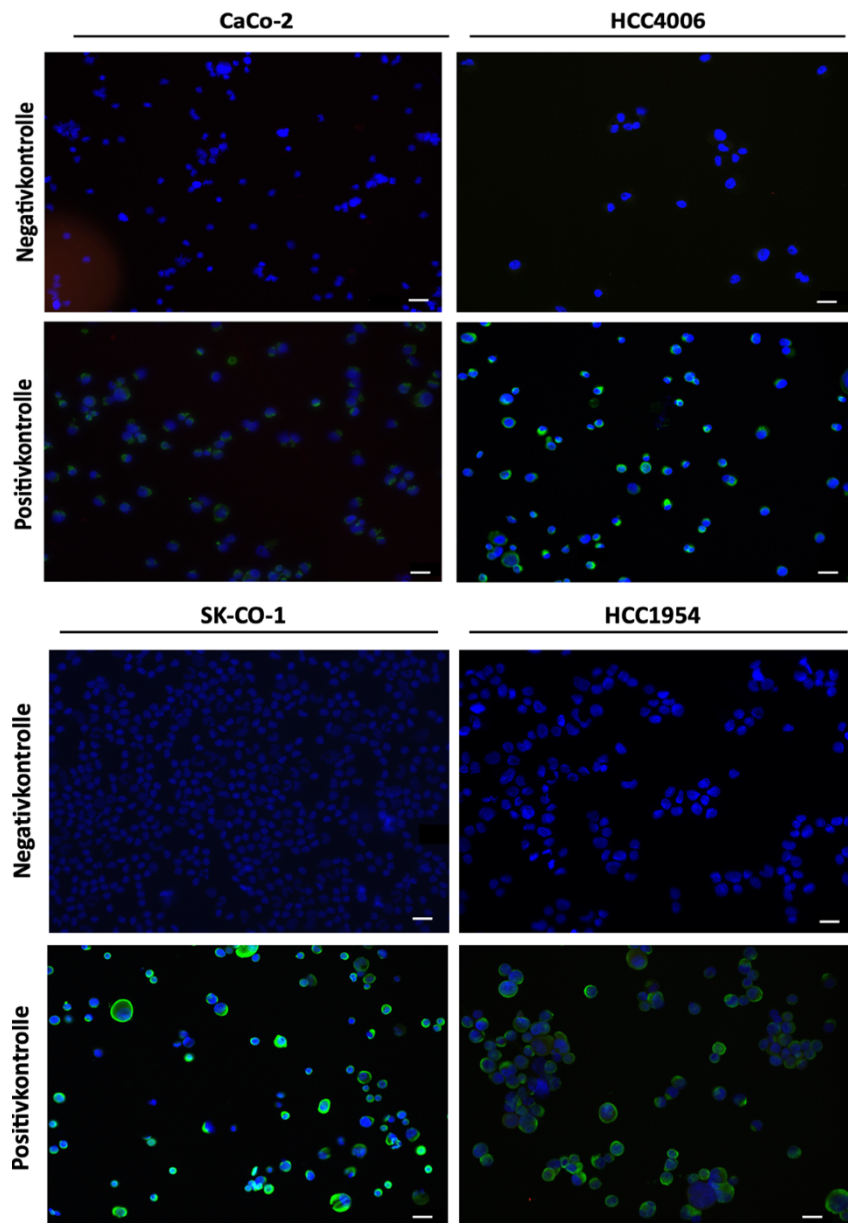


Abbildung 8: Nachweis der Cytokeratin-Expression durch direkte Immunfluoreszenz

Zur Detektion der Cytokeratin-Expression wurden Cytospins der Zelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 mit einem anti-panCytokeratin Alexa Fluor 488®-Antikörper gefärbt (grün). Der Zellkern wurde mittels DAPI markiert (blau). Für die Negativkontrollen wurde kein Antikörper in die Inkubationslösung pipettiert, ansonsten wurden die Zellen identisch behandelt. Vergrößerung 20-fach, Belichtungszeit: blau = 430 ms, grün = 140 ms, rot= 200 ms. Maßstab: 40 µm.

Im nächsten Schritt erfolgte die Etablierung einer kombinierten Immunfluoreszenzfärbung gegen pCK und den PBMC-Marker CD45. Hierfür wurde beispielhaft die Zelllinie CaCo-2 verwendet, die mit isolierten PBMCs eines gesunden Spenders im Verhältnis 1:1 gemischt und auf Objektträgern immobilisiert wurde. Um eine optimale und spezifische Doppelfärbung zu etablieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene Parameter der Färbung variiert und getestet. Unter anderem wurden die verwendeten Permeabilisierungsreagenzien, die Inkubationszeiten mit den Antikörpern, und die

Antikörper selbst variiert. Bezüglich der Antikörper wurde auch eine direkte mit einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung verglichen. Das optimale Färbegergebnis wurde durch direkte Immunfluoreszenz mit einem AlexaFluor 488®-gekoppelten anti-panCytokeratin Antikörper und einem AlexaFluor 594®-gekoppelten anti-CD45 Antikörper erreicht. Des Weiteren stellte sich eine Fixierung der Zellen mit 4% PFA, eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,1% Triton X-100 und eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 1% BSA als optimal heraus. Mit diesem Protokoll präsentierte sich eine spezifische und intensive Färbung beider Zelltypen, wodurch sich die Tumorzellen eindeutig von den PBMCs unterscheiden ließen (Abbildung 9). In der Negativkontrolle war kein Signal bei den spezifischen Anregungswellenlängen zu finden. Da das neu erstellte Protokoll jedoch viele Waschschrte beinhaltet, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diese Zwischenschritte zu minimieren. Durch die vielen Zwischenschritte konnte es zu einem erhöhten Zellverlust kommen, was die Auswertung der Ergebnisse negativ beeinflussen konnte. Zudem waren die Inkubationen und Waschprozeduren zeitaufwendig, was einem Einsatz in der klinischen Routine widersprach.

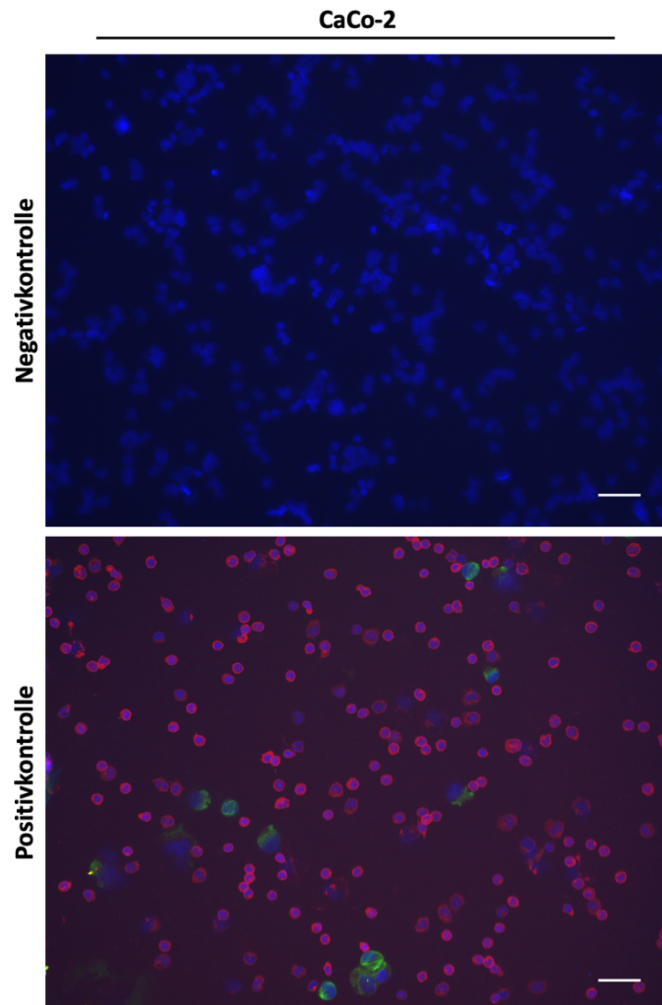


Abbildung 9: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen panCytokeratin und CD45 zur Detektion von CaCo-2 Tumorzellen und PBMCs in einem *in vitro spike in*-Modell

Zur Doppelfärbung wurden kultivierte CaCo2-Tumorzellen und isolierte PBMCs eines gesunden Spenders im Verhältnis 1:1 auf einen Objektträger gebracht und mittels eines anti-panCytokeratin Alexa Fluor® 488-Antikörpers (grün) und eines anti-CD45 Alexa Fluor® 594-Antikörpers (rot) gefärbt. Für die Negativkontrolle wurde kein Antikörper in die Inkubationslösung pipettiert, ansonsten wurden die Zellen identisch behandelt. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert (blau). Vergrößerung: 20-fach. Belichtungszeit: blau = 125 ms, grün = 400 ms, rot = 400 ms. Maßstab: 40 µm.

Um den Zellverlust zu minimieren und das Protokoll später gut in den klinischen Alltag integrieren zu können, wurde das bestehende Protokoll mit dem Färbe-Kit *Fix&Perm* der Firma Nordic MUBio erweitert. Dieses enthält *Component A* und *Component B*, wodurch Fixierung und Permeabilisierung in einem Schritt stattfinden können und somit die Waschschrte minimiert werden. Zur Validierung des ergänzten Protokolls wurden alle oben verwendeten Tumorzelllinien mit PBMCs gemischt, auf Objektträgern immobilisiert und die Färbung entsprechend durchgeführt. Es zeigte sich ein eindeutiger Kontrast zwischen Negativ- und Positivkontrollen ohne Hinweise auf unspezifische Reaktionen der Antikörper (Abbildung 10). Wie vorher bereits beobachtet worden war, zeigten CaCo-2 Zellen eine

geringere pCK-Expression als die anderen drei Zelllinien. Erwartungsgemäß zeigten die Zellen jeder Tumorentität einen größeren Durchmesser als PBMCs.

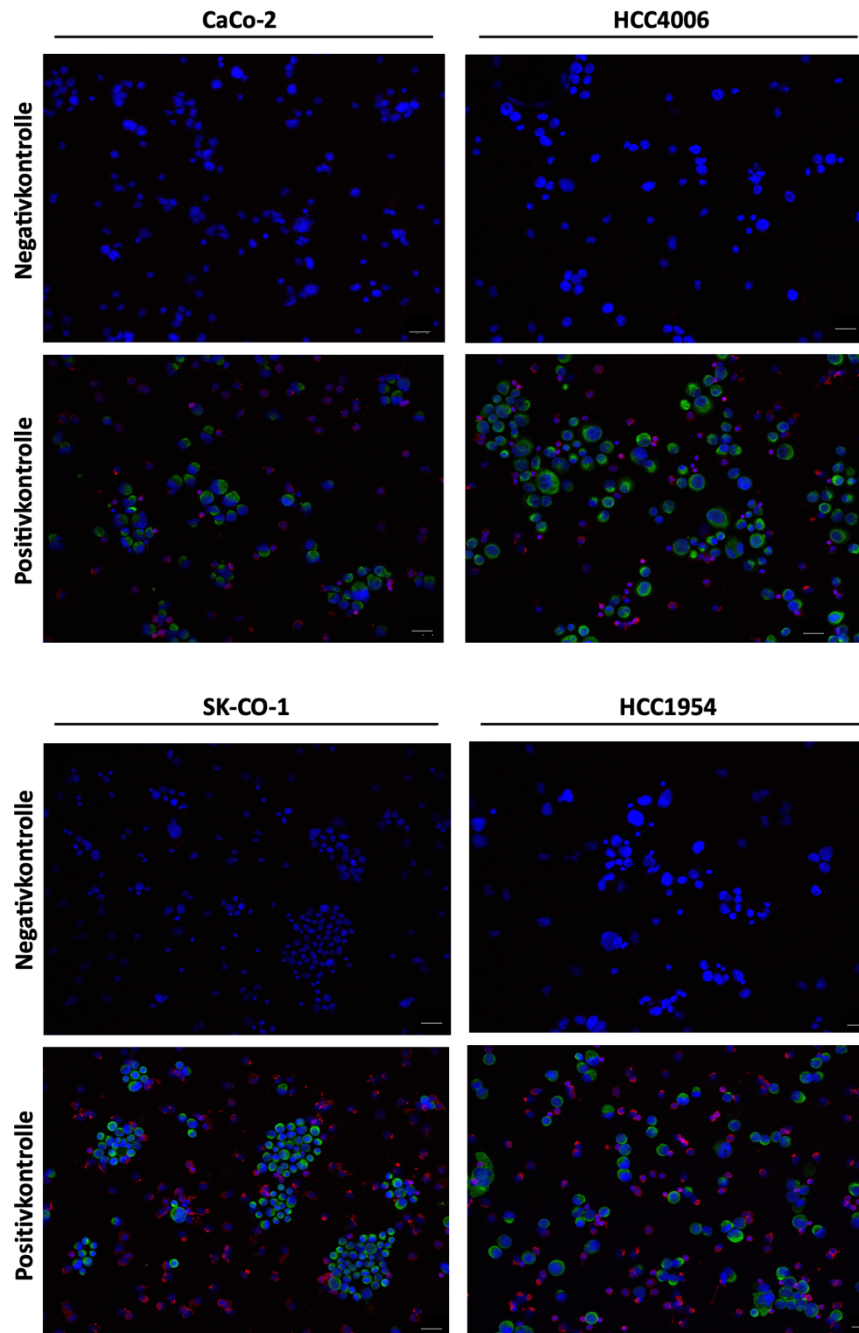


Abbildung 10: Validierung des etablierten Immunfluoreszenzprotokolls an einem *spike in*-Modell mit PBMCs und den Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954

Zur Doppelfärbung wurden kultivierte Tumorzellen und isolierte PBMCs eines gesunden Spenders im Verhältnis 1:1 auf einen Objektträger gebracht und mittels eines anti-panCytokeratin Alexa Fluor® 488-Antikörpers (grün) und mit einem anti-CD45 Alexa Fluor® 594-Antikörper (rot) gefärbt. Für die Negativkontrollen wurde kein Antikörper in die Inkubationslösung pipettiert, ansonsten wurden die Zellen identisch behandelt. Der Zellkern ist mittels DAPI markiert (blau). Vergrößerung 20-fach; Belichtungszeit: blau = 28 ms, grün = 50 ms, rot = 333 ms. Maßstab: 40 µm.

5.2 Kombination von Immunfluoreszenz mit DNA-Bildzytometrie

Im nächsten Schritt dieser Arbeit wurde untersucht, ob die etablierte Immunfluoreszenzfärbung mit DNA-Bildzytometrie kombiniert werden kann, ohne deren Ergebnisse negativ zu beeinflussen. Die in dieser Arbeit verwendete Variante der DNA-Bildzytometrie basiert auf der Feulgen-Reaktion, einer histochemischen Färbung der DNA im Zellkern. Da hierbei durch die Anwendung von Salzsäure die Zellmembran und alle anderen Zellbestandteile bis auf den Nucleus für weitere Analysen unbrauchbar werden, musste die Immunfluoreszenzfärbung und -auswertung vor der DNA-Bildzytometrie erfolgen.

5.2.1 Nachweis von Aneuploidie durch DNA-Bildzytometrie

Bevor die Versuche zur Kombination der Immunfluoreszenz mit der DNA-Bildzytometrie durchgeführt wurden, wurde in einem ersten Schritt die Ploidie der vier ausgewählten Zelllinien mittels DNA-Bildzytometrie bestimmt. Für die Ploidiemessung wurden Cytospins mit jeweils ca. 100.000 Tumorzellen erstellt und diese durch die Feulgen-Reaktion angefärbt. Als diploide Referenzzellen dienten PBMCs auf einem separaten Objektträger, welcher in derselben Färbeserie hergestellt wurde. Die Ergebnisse der anschließenden DNA-Bildzytometrie zeigten, dass alle vier Zelllinien aneuploid waren (Abbildung 11). Die zwei Hauptpeaks der Zellpopulationen waren jeweils bei 4c und 8c, was nicht-teilenden Tumorzellen in der G1-Phase beziehungsweise sich in Teilung befindlichen Zellen in der G2/M-Phase entsprach. Darüber hinaus waren bei allen vier Zelllinien auch einige Zellen mit noch höherer Ploidie (> 8c) zu beobachten. Dies wies darauf hin, dass es sich bei den Zelllinien um genomisch heterogene Zellpopulationen handelte. Die gemessene Ploidie wurde außerdem mit den Angaben von ATCC verglichen und es zeigte sich, dass die in dieser Arbeit gemessene Ploidie mit den zu erwartenden Werten übereinstimmte (Tabelle 3). Jede der verwendeten Tumorzelllinien wies somit einen aneuploiden DNA-Gehalt auf und war deshalb für die nachfolgenden Untersuchungen geeignet.

Tabelle 3: Mittlere gemessene Ploidie der Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 nach eigener DNA-Bildzytometrie im Vergleich zu ATCC-Angaben

Die mittlere Ploidie der Zelllinien wurde nach Kultivierung und Erstellung von Cytospins durch DNA-Bildzytometrie ermittelt und den Angaben der *American Type Culture Collection* (ATCC) gegenübergestellt. Der Ploidie ist als ein Vielfaches des Chromosomensatzes „c“ angegeben.

Zelllinie	Ploidie ATCC	Ploidie Eigenbestimmung [c]
CaCo-2	aneuploid	4,32
HCC4006	aneuploid	4,76
SK-CO-1	aneuploid	4,45
HCC1954	aneuploid	4,98

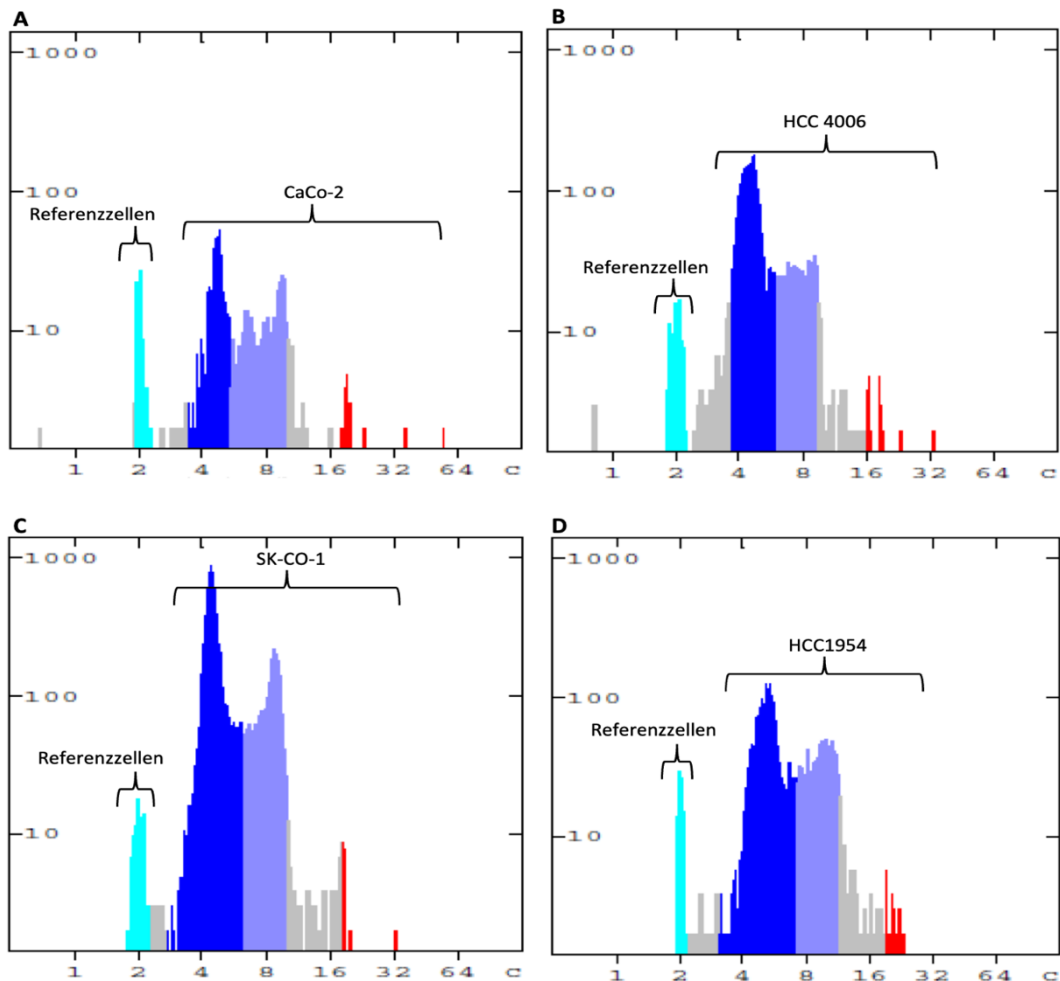


Abbildung 11: DNA-Bildzytometrie der Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 nach Feulgen-Färbung

Der DNA-Gehalt der Tumorzelllinien CaCo-2 (A), HCC4006 (B), SK-CO-1 (C) und HCC1954 (D) wurde durch DNA-Bildzytometrie nach Feulgen-Färbung bestimmt. Als Referenz dienten PBMCs auf einem separaten Objektträger. Die Histogramme zeigen den DNA-Gehalt als ein Vielfaches des Chromosomensatzes „c“ (x-Achse) gegenüber der Anzahl untersuchter Zellen (y-Achse). Die Farbkodierung entspricht dem gemessenen DNA-Gehalt der jeweiligen Zelllinie bezogen auf die Referenzzellen (dunkelblau = Tetraploidie; violett = Hyperaneuploidie >4,4c; rot = höhere Aneuploidie; grau = Zellen oberhalb des G₂/M-Phase Peak). Anzahl der Analysezellen: A = 736, B = 2.858, C = 9.467, D = 2.596. Intrinsic Optical Density (IOD): A = 10,9; B = 9,89; C = 9,61; D = 10,45.

Da alle Zelllinien die Anforderungen erfüllten, sollte im folgenden Schritt untersucht werden, ob PBMCs und Tumorzellen auf einem Objektträger durch DNA-Bildzytometrie eindeutig zu unterscheiden waren. Hierzu wurden kultivierte Tumorzellen der Zelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 jeweils im Verhältnis 1:1 mit frisch isolierten PBMCs gemischt und auf einem Objektträger immobilisiert. Im Anschluss erfolgte die Feulgen-Reaktion mit DNA-Bildzytometrie. Es zeigten sich für jede Zellpopulation in jedem *spike in*-Modell voneinander zu unterscheidende Peaks in den zu erwartenden Bereichen um 2c, 4c und 8c (Abbildung 12). Der Peak bei 2c entsprach sehr wahrscheinlich diploiden PBMCs, die Peaks um 4c und 8c wurden der jeweiligen Tumorzelllinie

zugeordnet. Auch in diesem Versuch zeigten sich vereinzelte Zellen im Bereich $> 8c$. Nicht alle Peaks waren mit einer eindeutigen Zäsur voneinander abgegrenzt, sondern gingen ineinander über. Besonders gut sichtbar war dies bei Zelllinie HCC1954 (Abbildung 12). Die Ploidieprofile der Tumorzellen waren erwartungsgemäß ähnlich zu denen der vorherigen Messung. Eine Trennung der verschiedenen Zellpopulationen auf einem Objektträger war somit prinzipiell möglich, nachfolgende Versuche mussten jedoch genauer eruieren, wie spezifisch und sensitiv die Differenzierung zwischen Tumorzellen und PBMCs in der DNA-Bildzytometrie wirklich ist.

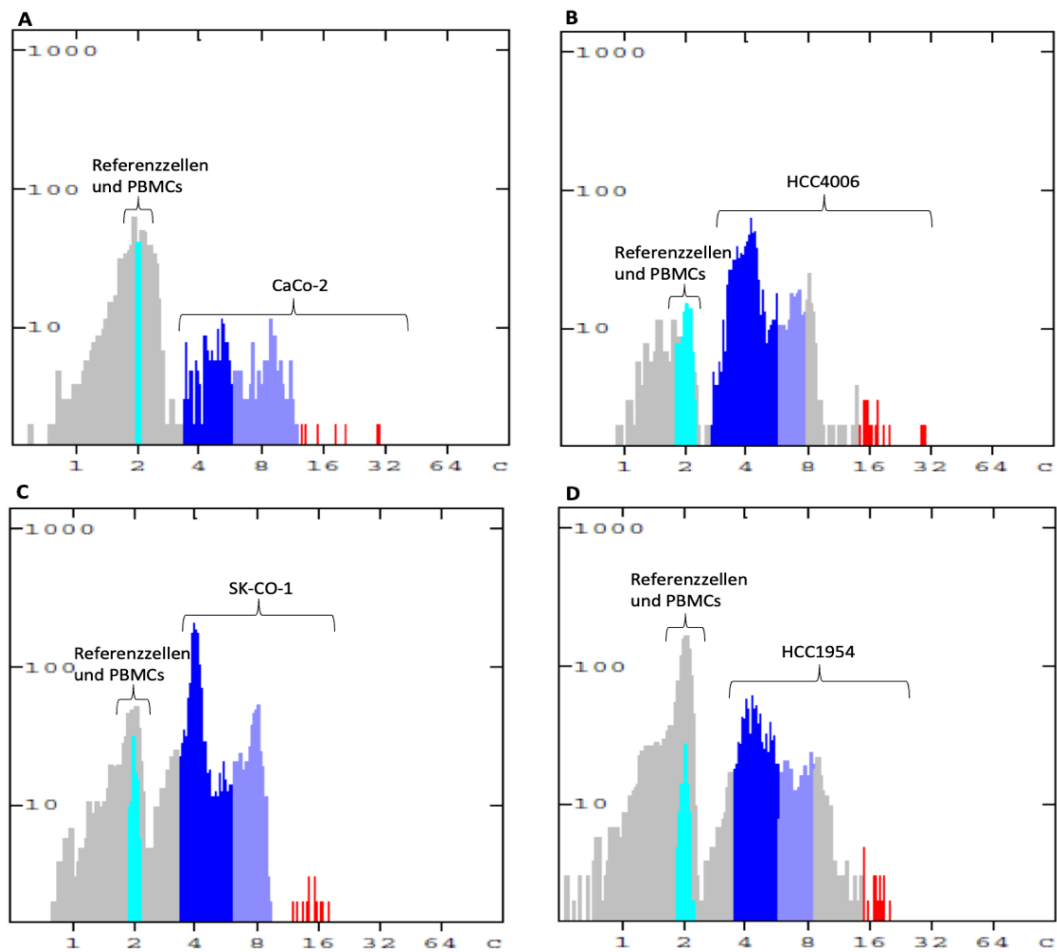


Abbildung 12: DNA-Bildzytometrie der Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 im *spike in*-Modell mit PBMCs nach Feulgen-Färbung

Die Tumorzelllinien CaCo-2 (A), HCC4006 (B), SK-CO-1 (C) und HCC1954 (D) wurden im Verhältnis 1:1 mit isolierten PBMCs gesunder Spender versetzt und der DNA-Gehalt aller Zellen wurde durch DNA-Bildzytometrie nach Feulgen-Färbung bestimmt. Als Referenz dienten PBMCs auf dem selben Objektträger. Die Histogramme zeigen den DNA-Gehalt als ein Vielfaches des Chromosomensatzes „c“ (x-Achse) gegenüber der Anzahl untersuchter Zellen (y-Achse). Die Farbkodierung entspricht dem gemessenen DNA-Gehalt der jeweiligen Zelllinie (dunkelblau \approx Tetraploidie; violett = Hyperaneuploidie $>4,4 c$; rot = höhere Aneuploidie; grau = Zellen oberhalb des G₂/M-Phase Peak). Anzahl der Analysezellen: A = 1.137; B = 1.272; C = 2.836; D = 2.996. Intrinsic Optical Density (IOD): A = 9,38; B = 10,02; C = 10,92; D = 10,76.

5.2.2 Fusion beider Methoden

Durch den anschließenden Versuch sollte untersucht werden, ob Immunfluoreszenzfärbung und DNA-Bildzytometrie ohne Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse miteinander kombiniert werden können. Die Kombination der beiden Verfahren war deshalb wichtig, da nur auf diese Weise gezeigt werden konnte, dass sich mit beiden Methoden dieselben Zellen auf ein und demselben Objektträger identifizieren lassen und jede Methode unabhängig von der anderen gleichermaßen zur Detektion von Tumorzellen verwendet werden kann.

Um den Einfluss der Immunfluoreszenz auf die DNA-Bildzytometrie zu untersuchen, wurden frisch isolierte PBMCs mit Tumorzellen der jeweiligen Zelllinie im Verhältnis 1:1 gemischt, auf Objektträgern immobilisiert und anschließend entweder direkt für die Feulgen-Färbung verwendet oder zuvor mit dem bestehenden Immunfluoreszenzprotokoll gefärbt. In der DNA-Bildzytometrie zeigten sich die Referenzzellen beziehungsweise PBMCs und die Tumorzellen erwartungsgemäß durch drei voneinander zu unterscheidende Peaks um jeweils 2c, 4c und 8c (Abbildung 13), kongruent zu den vorherigen Messungen.

Jedoch war auffällig, dass die Peaks der einzelnen Zellpopulationen bei einer vorher durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung etwas schlechter voneinander zu trennen waren. Es war im Vergleich eine Übereinanderlagerung der Peaks im Bereich um 4c und 8c herum zu erkennen, welche ohne vorherige Immunfluoreszenz weniger stark ausgeprägt war. Darüber hinaus zeigte sich eine etwas niedrigere IOD nach der Kombination beider Methoden. Dies sprach zwar für einen gewissen Einfluss der vorherigen Immunfluoreszenzfärbung auf die Qualität der DNA-Bildzytometrie, jedoch waren Tumorzellen und PBMCs ausreichend gut voneinander zu trennen, um eine Auswertung der Messung zu ermöglichen. Eine Kombination beider Methoden war also möglich, jedoch war ein Effekt der Immunfluoreszenz auf die Qualität der DNA-Bildzytometrie zu beobachten (Abbildung 13).

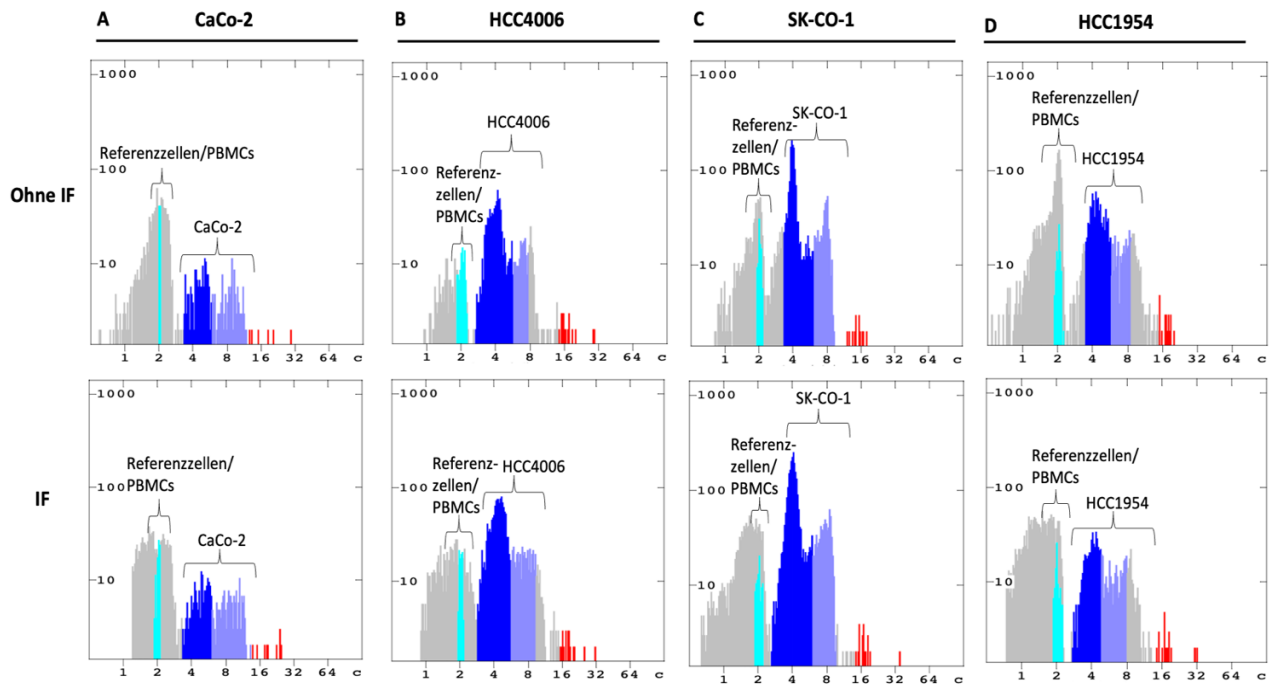


Abbildung 13: Einfluss einer vorherigen Immunfluoreszenzfärbung auf die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie

Die Tumorzelllinien CaCo-2 (A), HCC4006 (B), SK-CO-1 (C) und HCC1954 (D) wurden im Verhältnis 1:1 mit isolierten PBMCs eines gesunden Spenders versetzt, auf Objektträgern immobilisiert und entweder direkt für die Feulgen-Färbung verwendet oder vorher mit dem etablierten Immunfluoreszenzprotokoll (IF) gefärbt. Anschließend wurde der DNA-Gehalt der Zellen durch DNA-Bildzytometrie bestimmt. Die Histogramme zeigen den DNA-Gehalt als ein Vielfaches des Chromosomensatzes „c“ (x-Achse) gegenüber der Anzahl untersuchter Zellen (y-Achse). Die Farbkodierung entspricht dem gemessenen DNA-Gehalt der jeweiligen Zelllinie (dunkelblau \approx Tetraploidie; violett = Hyperaneuploidie $>4,4$ c; rot = höhere Aneuploidie; grau = Zellen oberhalb des G₂/M-Phase Peak). Anzahl der Analysezellen: A ohne IF=1.137; A IF=1.215; B ohne IF=1.272; B IF=2.491; C ohne IF=2.836; C IF=4.631; D ohne IF=2.996; D IF=2.565. Intrinsic optical density (IOD): A ohne IF=9,38; A IF=7,37; B ohne IF=10,02; B IF=7,19; C ohne IF=10,92; C IF=9,61; D ohne IF=10,76; D IF=7,92.

5.3 Validierung der etablierten Methode mit definierten Tumorzellzahlen

Nachdem gezeigt wurde, dass sich Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie kombinieren ließen, sollte im nachfolgenden Versuch die Sensitivität und Spezifität der DNA-Bildzytometrie zum Nachweis von Tumorzellen untersucht werden. Hierfür wurden *spike in*-Modelle mit 100, 50 und 5 Tumorzellen der Zelllinien CaCo-2, HCC4006 und SK-CO-1 erstellt (jeweils in Duplikaten) und mittels Immunfluoreszenz sowie DNA-Bildzytometrie analysiert (Abbildung 14). Die Anzahl der detektierten pCK⁺-Zellen in der Immunfluoreszenz wurde anschließend mit der Anzahl der aneuploiden Zellen aus der DNA-Bildzytometrie verglichen und der eingespikten Zellzahl gegenübergestellt (Tabelle 4). Basierend auf den vorherigen Experimenten, in denen die verwendeten Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006 und SK-CO-1 jeweils eine Ploidie $\geq 4c$ aufwiesen, wurden nur Zellen mit einem DNA-Gehalt $\geq 4c$ als aneuploid gewertet. Bei der quantitativen Auswertung der Immunfluoreszenz zeigte sich, dass

in keinem Modell exakt die Anzahl pCK⁺-Zellen auf den Objektträgern zu finden war, welche in das Modell eingespikt wurde; es wurden immer weniger oder teilweise gar keine pCK⁺-Zellen detektiert. Es war jedoch zu beobachten, dass die Objektträger der Tumorzelllinie HCC4006 in allen Versuchsreihen die Zellzahlen aufwiesen, welche der theoretisch eingespikten Anzahl am nächsten kam.

Der optische Vergleich der Histogramme zeigte, dass die unterschiedlichen Zellpopulationen unscharf voneinander zu trennen waren, wodurch eine eindeutige Zuordnung von einem Peak zu jeder Zelllinie nicht möglich war. Besonders im Bereich der Übergänge der diploiden Zellfraktion zu den aneuploiden Tumorzellen war keine eindeutige Zäsur zu finden. Darüber hinaus waren bei fast allen Tumorzelllinien nur sehr wenige aneuploide Zellen auf den Objektträgern zu finden, was nicht den Erwartungen entsprach (Tabelle 4). Dafür war zu sehen, dass der Bereich um 2c herum sehr viel mehr Zellen präsentierte, als angenommen wurde.

Die Analyse der *spike in*-Modelle gestaltete sich aufgrund eines geringen IOD schwierig. Es wurden hauptsächlich IOD zwischen 3,2 und 9,8 gemessen, nur ein Cytospin der Tumorzelllinie CaCo-2 zeigte eine IOD mit 11,2 (Abbildung 14). Dies sprach für ein unzureichendes Färbeergebnis, welches die Auswertung der Ploidie fragwürdig macht. Bei der Durchsicht aller Cytospins zeigten sich die meisten Zellen pro Objektträger schwach bis sehr schwach gefärbt und es war davon auszugehen, dass durch die ICM-Software ein verfälscht hoher Wert an diploiden Zellen ermittelt worden war. Es stellte sich heraus, dass auch Zellen als diploid gewertet wurden, die vom Zelldurchmesser viel größer waren als diploide PBMCs. Von ihrer Morphologie her sind Tumorzellen typischer Weise größer als PBMCs (Deng et al., 2022), was in vorherigen Färbungen regelmäßig beobachtet worden war (Abbildung 9).

Im Vergleich der Detektionsraten von Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie war zu sehen, dass die Immunfluoreszenz relativ ähnliche Ergebnisse aufwies, wobei die Detektionsrate in der DNA-Bildzytometrie großen Schwankungen unterlegen war. Teilweise war ein Vielfaches mehr an detektierten aneuploiden Zellen zu sehen als in der Immunfluoreszenz, beispielsweise bei Zelllinie HCC4006 im Versuch mit 100 eingespikten Tumorzellen oder bei Zelllinie SK-CO-1 mit fünf eingespikten Tumorzellen. Im letztgenannten Versuch zeigten sich für Zelllinie SK-CO-1 Detektionsraten von 220% beziehungsweise 260%. In den übrigen Versuchen und den anderen Tumorzelllinien war die Detektionsrate der DNA-Bildzytometrie meist niedriger als die Anzahl der eingespikten Tumorzellen und ebenfalls niedriger als die Anzahl der pCK⁺-Zellen (Tabelle 4). Die Detektionsraten der DNA-Bildzytometrie im Mittel zeigten bei 100 eingespikten Tumorzellen $\bar{X} = 38\%$ mit einer Standardabweichung $\sigma = 49,7$, bei 50 eingespikten Tumorzellen $\bar{X} = 13,7\%$ mit einer Standardabweichung $\sigma = 12,2$ und bei 5 eingespikten Tumorzellen betrug der Mittelwert $\bar{X} = 120\%$ mit einer Standardabweichung $\sigma = 100,4$ (Tabelle 4).

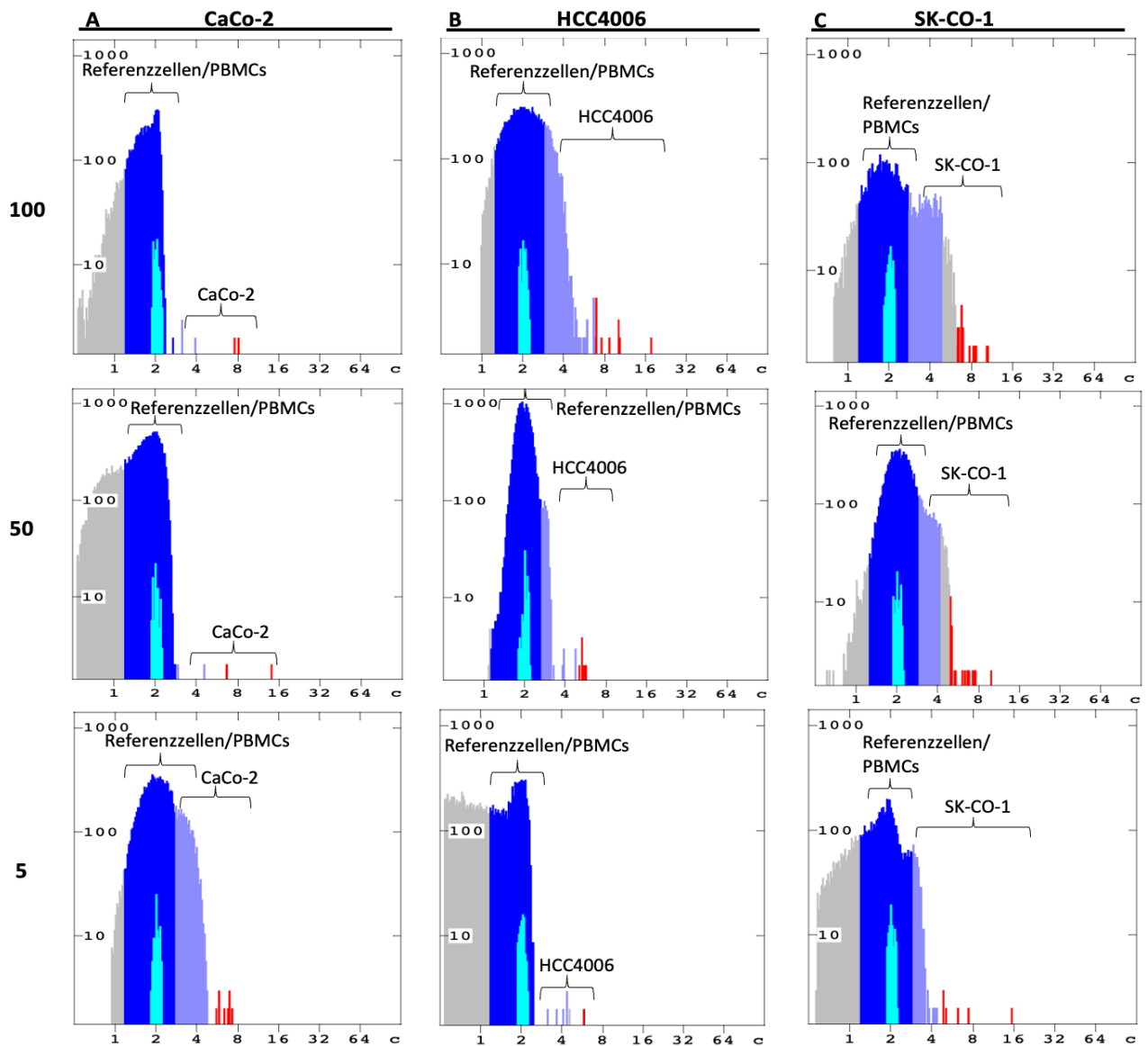


Abbildung 14: Beispielhafte Darstellung der Histogramme der Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006 und SK-CO-1 nach kombinierter Immunfluoreszenzfärbung und Feulgen-Färbung in einem *spike in*-Modell mit jeweils 100, 50 und 5 Tumorzellen

Die Tumorzelllinien CaCo-2 (A), HCC4006 (B) und SK-CO-1 (C) wurden so im entsprechenden Verhältnis mit isolierten PBMCs eines gesunden Spenders versetzt, dass auf Objektträgern jeweils 100, 50 oder 5 kultivierte Tumorzellen immobilisiert waren. Diese Cytospins wurden mit dem etablierten Immunfluoreszenzprotokoll (IF) gefärbt. Anschließend wurde der DNA-Gehalt der Zellen durch DNA-Bildzytometrie bestimmt. Die Histogramme zeigen den DNA-Gehalt als ein Vielfaches des Chromosomensatzes „c“ (x-Achse) gegenüber der Anzahl untersuchter Zellen (y-Achse). Die Farbkodierung entspricht dem gemessenen DNA-Gehalt der jeweiligen Zelllinie (dunkelblau \approx Tetraploidie; violett = Hyperaneuploidie $>4,4$ c; rot = höhere Aneuploidie; grau = Zellen oberhalb des G2-/M-Phase Peak). Anzahl der Analysezellen: A (100) = 6.857; A (50) = 20.130; A (5) = 12.861; B (100) = 13.726; B (50) = 17.609; B (5) = 17.700; C (100) = 4.856; C (50) = 11.119; C (5) = 7.139. Intrinsic Optical Density (IOD): A (100) = 11,2; A (50) = 8,8; A (5) = 4,5; B (100) = 3,72; B (50) = 8,5; B (5) = 9,8; C (100) = 3,2; C (50) = 4,1; C (5) = 6,4.

Tabelle 4: Vergleich zwischen der eingespikten Zellzahl, Anzahl pCK⁺-positiver Tumorzellen in der Immunfluoreszenz und der Anzahl aneuploider Tumorzellen, die auf demselben Objektträger mittels DNA-Bildzytometrie detektiert wurden

Für den Vergleich wurden jeweils 100, 50 und 5 Tumorzellen der Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006 und SK-CO-1 zusammen mit ca. 10.000 isolierten PBMCs eines gesunden Spenders auf einen Objektträger aufgebracht und mit dem etablierten Immunfluoreszenz-Protokoll gefärbt und ausgewertet (IF). Anschließend erfolgte die Feulgen-Färbung und DNA-Bildzytometrie zur Bestimmung der aneuploiden Zellen (> 4c). Pro Zelllinie und Zellzahl wurden jeweils zwei Objektträger ausgewertet.
 σ = Standardabweichung, \bar{X} = Mittelwert.

Zelllinie	Anzahl gespikter Tumorzellen	Objektträger	Anzahl pCK ⁺ /CD45 ⁺ Zellen IF	Detektionsrate Immunfluoreszenz [%]	Anzahl Zellen mit Ploidie >4c	Detektionsrate DNA-Bildzytometrie [%]
CaCo-2	100	1	20	20	7	7
		2	35	35	25	25
HCC4006	100	1	85	85	134	134
		2	95	95	14	14
SK-CO-1	100	1	18	18	47	47
		2	18	18	1	1
		\bar{X}	45,2	45,2	38	38
		σ_{100}	35,4	35,4	49,7	49,7
CaCo-2	50	1	13	26	6	12
		2	9	18	4	8
HCC4006	50	1	23	46	9	18
		2	26	52	18	36
SK-CO-1	50	1	11	22	1	2
		2	8	16	3	6
		\bar{X}	15	30	6,8	13,7
		σ_{50}	7,6	15,2	6,1	12,2
CaCo-2	5	1	0	0	1	20
		2	0	0	5	100
HCC4006	5	1	2	40	5	100
		2	2	40	1	20
SK-CO-1	5	1	0	0	11	220
		2	1	20	13	260
		\bar{X}	0,8	16,7	6	120
		σ_5	1	19,7	5	100,4
		\bar{X}_{gesamt}	20,3	31,2	10	57,2
		σ_{gesamt}	27,4	27	4,2	77

Für alle verwendeten Tumorzelllinien machten die Ergebnisse deutlich, dass weder die eingespikte Anzahl Tumorzellen mit DNA-Bildzytometrie, noch die Anzahl der in der Immunfluoreszenz nachgewiesenen Tumorzellen zuverlässig durch DNA-Bildzytometrie detektiert werden konnten. Die uneindeutige Trennung der Zellpopulationen in den Histogrammen, eine geringe IOD und große Schwankungen in der Detektionsrate der DNA-Bildzytometrie, welche zwischen 1% und 260% lag, bestätigten dies. Selbst bei Duplikaten einer Zelllinie und derselben Anzahl eingespikter Tumorzellen waren Schwankungen von teilweise > 50% festzustellen. Generell schienen die divergierenden Ergebnisse unabhängig von der Gesamtanzahl an Tumorzellen auf einem Objektträger oder der

verwendeten Zelllinie zu sein und spiegelten sich auch in den Histogrammen der DNA-Bildzytometrie wider.

Mit diesen Ergebnissen war es somit nicht möglich, eine abschließende Aussage über die Sensitivität und Spezifität der DNA-Bildzytometrie für die Detektion von Tumorzellen in *spike in*-Modellen zu treffen.

5.4 Optimierung der etablierten Methode

Die großen Unterschiede zwischen der Anzahl detektierter Tumorzellen in der Immunfluoreszenz und der DNA-Bildzytometrie mit einem unrealistisch hohen Anteil als aneuploid identifizierter Zellen (Tabelle 4), die geringe IOD und die schlecht zu differenzierenden Peaks in den Histogrammen (Abbildung 15) zeigten, dass eine weitere Optimierung des kombinierten Protokolls nötig war, um die Qualität der DNA-Bildzytometrie zu verbessern. Da ein starker negativer Einfluss der Immunfluoreszenzfärbung auf die Qualität der DNA-Bildzytometrie durch initiale Versuche (Abbildung 13) bereits größtenteils ausgeschlossen werden konnte, wurde im Folgenden untersucht, ob die zeitliche Abfolge bestimmter Zwischenschritte des kombinierten Protokolls eine wichtige Rolle für die Qualität von Feulgen-Reaktion und DNA-Bildzytometrie spielt. Besonders zwei Protokollschritte wurden in den vorherigen Versuchsreihen nicht immer zeitlich einheitlich durchgeführt, was meist der Anzahl an zu bearbeitenden Proben geschuldet war. Zum einen handelte es sich um die Zeit zwischen der Fertigstellung der Immunfluoreszenz-Objektträger und dem Beginn der Feulgen-Färbung, die aufgrund der manuellen Auswertung und hohen Menge an Objektträgern teilweise bis zu 48 Stunden betrug. Zum anderen betraf es die Inkubationszeit der Immunfluoreszenz-Objektträger in PBS, um die Deckgläser für die Feulgen-Färbung wieder abzulösen.

Um den Einfluss dieser beiden Parameter näher zu untersuchen, wurden *spike in*-Modelle der Tumorzelllinie CaCo-2 erstellt und das etablierte Immunfluoreszenzprotokoll wie folgt modifiziert angewendet: im Anschluss an die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Objektträger entweder direkt oder nach 6 Tagen für die Feulgen-Färbung verwendet und es wurden verschiedene Inkubationszeiten der Objektträger in PBS zum Ablösen der Deckgläser untersucht (4 h vs. 24 h).

Die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie zeigten, dass besonders die Inkubationsdauer der Objektträger in PBS einen großen Einfluss auf die Qualität der Feulgen-Färbung und der DNA-Bildzytometrie hat (Abbildung 15). Je länger die Inkubation in PBS war, desto breitere Peaks, besonders um 2c, 4c, aber auch um 8c, waren in den Histogrammen zu beobachten. Hierdurch konnten die unterschiedlichen Zellpopulationen schlechter voneinander getrennt werden. Besonders durch eine Inkubation in PBS über 24 Stunden waren viele zusätzliche Peaks zwischen 3c und 5c zu beobachten. Der negative Effekt einer längeren Inkubation der Objektträger in PBS war unabhängig davon, ob die Objektträger direkt

gefärbt oder für 6 Tage gelagert wurden. Der IOD-Wert wurde durch eine verlängerte Inkubation in PBS ebenfalls negativ beeinflusst. Während er ohne die Inkubation in PBS beziehungsweise nach Inkubation in PBS nach 4 Stunden nahezu unverändert > 11 lag, verringerte er sich nach einer Inkubation in PBS über 24 Stunden auf 9,55 (Abbildung 15). Dies sprach für ein nicht optimales Färberegebnis mit gegebenenfalls negativem Einfluss auf die Auswertung mittels DNA-Bildzytometrie.

Beim Vergleich der Lagerdauer zwischen direkter Weiterverarbeitung der Objektträger nach der Immunfluoreszenz und Einlagerung der Objektträger über 6 Tage bei Raumtemperatur und Dunkelheit war kein nennenswerter negativer Einfluss auf die Qualität der DNA-Bildzytometrie zu erkennen. Die einzelnen Peaks bei 2c, 4c und 8c waren vergleichbar mit denen der Objektträger, welche direkt weiterverarbeitet worden waren. Die Lagerung der Objektträger über 6 Tage erbrachte darüber hinaus keine Hinweise auf eine negative Veränderung der IOD. Diese blieb unabhängig von der Lagerdauer konstant zwischen 12 und 13.

Anhand des durchgeführten Versuchs wurde gezeigt, dass ein negativer Einfluss der Immunfluoreszenz auf die Qualität der DNA-Bildzytometrie gering war. Jedoch konnte insbesondere eine längere Inkubationszeit der Objektträger in PBS mit einer Verschlechterung der Qualität der DNA-Bildzytometrie assoziiert werden. Aufgrund dessen wurde das bestehende Protokoll angepasst und die Inkubationszeit in PBS auf maximal 4 Stunden reduziert; sobald die Deckgläschen abgelöst waren, wurde die Feulgen-Reaktion angeschlossen.

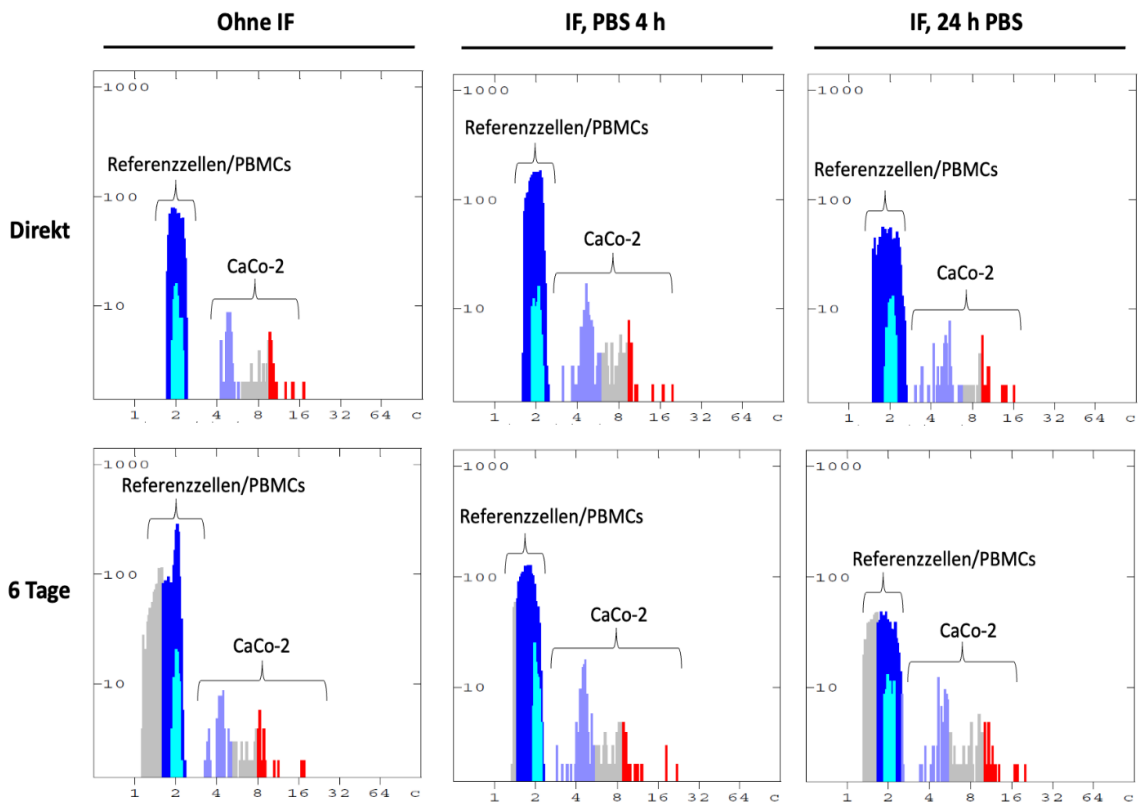


Abbildung 15: Einfluss von PBS-Inkubation und Lagerungszeit der Objektträger auf die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie bei Zelllinie CaCo-2

Die Tumorzelllinie CaCo-2 wurde im Verhältnis 1:1 mit isolierten PBMCs gesunder Spender auf Objektträgern immobilisiert, die Zellen mit dem etablierten Immunfluoreszenzprotokoll (IF) gefärbt und die Objektträger daraufhin eingedeckt. Diese Objektträger wurden ausgewertet und unmittelbar im Anschluss an die Fluoreszenzmikroskopie für die Feulgen-Färbung verwendet, was durchschnittlich 3 Stunden dauerte („direkt“) oder nach Auswertung für 6 Tage trocken und lichtgeschützt gelagert („6 Tage“). Danach wurden die Objektträger zum Ablösen der Deckgläser entweder für 4 Stunden (PBS 4 h) oder 24 Stunden (PBS 24 h) in PBS inkubiert. Anschließend wurden die unterschiedlich behandelten Objektträger durch Feulgen-Färbung und DNA-Bildzytometrie ausgewertet. Die Histogramme zeigen den DNA-Gehalt als ein Vielfaches des Chromosomensatzes „c“ (x-Achse) gegenüber der Anzahl untersuchter Zellen (y-Achse). Als Referenz dienten PBMCs auf demselben Objektträger. Die Farbkodierung entspricht dem gemessenen DNA-Gehalt der jeweiligen Zelllinie (dunkelblau \approx Tetraploidie; violett = Hyperaneuploidie $>4,4$ c; rot = höhere Aneuploidie; grau = Zellen oberhalb des G2-/M-Phase Peak).
 Anzahl der Analysezellen: Ohne IF (direkt) = 1.051; Ohne IF (6 Tage) = 3.189; IF, PBS 4h (direkt) = 2.687; IF, PBS 4h (6 Tage) = 2.211; IF, 24h PBS (direkt) = 1.128; IF, 24h PBS (6 Tage) = 1.225. Intrinsic optical density (IOD): Ohne IF (direkt) = 11,76; Ohne IF (6 Tage) = 13,39; IF, PBS 4h (direkt) = 11,49; IF, PBS 4h (6 Tage) = 12,31; IF, 24h PBS (direkt) = 9,55; IF, 24h PBS (6 Tage) = 9,8.

5.5 Validierung der etablierten Methode mit 30 Tumorzellen

Nachdem die zeitliche Abfolge des Protokolls optimiert worden war, sollte die Sensitivität und Spezifität der Methode erneut validiert werden. Da das Einspiken von 5 Tumorzellen in der vorherigen Versuchsreihe nicht zu einer konsistenten Anzahl von Tumorzellen auf den Objektträgern führte, wurde für diesen Versuch eine Anzahl von 30 Tumorzellen pro Objektträger gewählt. Hierfür wurden frisch isolierte PBMCs eines gesunden Spenders mit rechnerisch 30 Tumorzellen jeweils der Tumorzelllinien CaCo-2, HC4006, SK-CO-1 und HCC1954 gemischt und auf einem Objektträger immobilisiert und für jede Tumorzelllinie wurden Triplikate angefertigt. Anschließend wurde das optimierte Protokoll angewendet und die Anzahl an pCK⁺-Zellen in der Immunfluoreszenz, sowie die Anzahl der aneuploiden Zellen in der DNA-Bildzytometrie quantifiziert. Die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie zeigten eine Verteilung der Peaks um 2c, 4c und 8c, wie von den Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006 und SK-CO-1 zu erwarten war. Zelllinie HCC1954 jedoch zeigte keinen Peak im Bereich um 8c (Abbildung 16A). Die Zellpopulationen der PBMCs sowie der Tumorzelllinien waren in jedem *spike in*-Modell gut voneinander zu unterscheiden. Aufgrund dieser besseren Trennung wurde für die quantitative Auswertung dieses Versuchs ein Cut-off $\geq 3c$ in der DNA-Bildzytometrie gewählt, um Tumorzellen von PBMCs zu differenzieren (Tabelle 5). Bei diesem Cut-off-Wert sollten diploide PBMCs theoretisch nicht quantifiziert werden, während Tumorzellen mit einer Ploidie zwischen 3c und 4c noch berücksichtigt wurden.

Die Quantifizierung der pCK⁺-Zellen in der Immunfluoreszenz ergab eine Anzahl von 4 bis 38 Tumorzellen auf den Objektträgern aller untersuchten Tumorzelllinien (Tabelle 5). Mittels DNA-Bildzytometrie wurden zwischen 2 und 26 Zellen als aneuploid identifiziert. Die Zelllinien CaCo-2, HCC4006 und SK-CO-1 zeigten homogenere Detektionsraten mit geringen Standardabweichungen (Mittelwert $\bar{X}_{\text{CaCo-2}} = 44,4$ und Standardabweichung $\sigma_{\text{CaCo-2}} = 5,1$ bzw. Mittelwert $\bar{X}_{\text{HCC4006}} = 67,8$ und Standardabweichung $\sigma_{\text{HCC4006}} = 18,4$) im Vergleich zum vorherigen Versuch (Tabelle 4). Zelllinie HCC4006 zeigte in der Immunfluoreszenz sogar mehr als die zu erwartende Anzahl von 30 Tumorzellen und es wurden mittels DNA-Bildzytometrie in diesem Versuch die meisten aneuploiden Zellen detektiert. Für Zelllinie HCC1954 hingegen lagen die Detektionsraten in der DNA-Bildzytometrie bei einem Cut-off $\geq 3c$ zwischen 10% und 63,3% und damit am weitesten voneinander entfernt. Hierdurch ergab sich im Mittel für diese Zelllinie die geringste Detektionsrate und die höchste Standardabweichung (Mittelwert $\bar{X}_{\text{HCC1954}} = 30 \%$, Standardabweichung $\sigma_{\text{HCC1954}} = 29$). Für alle Zelllinien betrachtet war eine geringere Standardabweichung ($\sigma_{\text{gesamt}} = 21,8$) als im vorherigen Versuch festzustellen. Generell war nach der Optimierung der etablierten Methode auffällig, dass die Detektionsraten in Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie ähnlicher wurden. Im Mittel wurden ähnlich viele Zellen detektiert und die Standardabweichungen zeigten sich angeglichen.

Neben der Quantifizierung der identifizierten Tumorzellen in der Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie wurden auch die mikroskopischen Aufnahmen der beiden Detektionsmethoden direkt miteinander verglichen (Abbildung 16B). Dieser Vergleich war wichtig, um zu bestätigen, dass beide Methoden exakt dieselben Zellen als aneuploid beziehungsweise pCK⁺ identifizierten. Nur auf diese Weise konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den als aneuploid identifizierten Zellen wirklich um Tumorzellen handelte und nicht um Artefakte, welche während der Färbung entstanden waren. Bei diesem Vergleich konnten für jede Zelllinie in mindestens einem der durchgeführten Durchgänge des Versuchs die aneuploiden Korrelate zu pCK⁺-positiven Zellen an derselben Stelle eines Objektträgers gefunden werden (Abbildung 16B). Dies bestätigte, dass beide Methoden prinzipiell die selben Zellen als Tumorzellen identifizieren. Jedoch war ein vollständiger Vergleich aller Zellen technisch nicht möglich, da die exakte Position der gemessenen Zellen im Analyseprogramm der DNA-Bildzytometrie nicht dokumentiert war und die Orientierung somit nur anhand von optischen Kriterien wie der Position zu anderen Zellen oder auffälliger Anordnung im Zellverband erfolgen konnte. In der Auswertung der Objektträger wurden auch Zellen gefunden, die pCK⁺-positiv waren und eine Ploidie < 4c aufwiesen (Abbildung 16B). Der Anteil der Zellen mit einer Ploidie zwischen 3c und 4c lag für die Tumorzelllinien CaCo-2 und HCC4006 bei über 30% aller aneuploiden Zellen. Es erwies sich also als sinnvoll, den Cut-off zur Differenzierung von diploiden PBMCs und aneuploiden Tumorzellen $\geq 3c$ zu setzen.

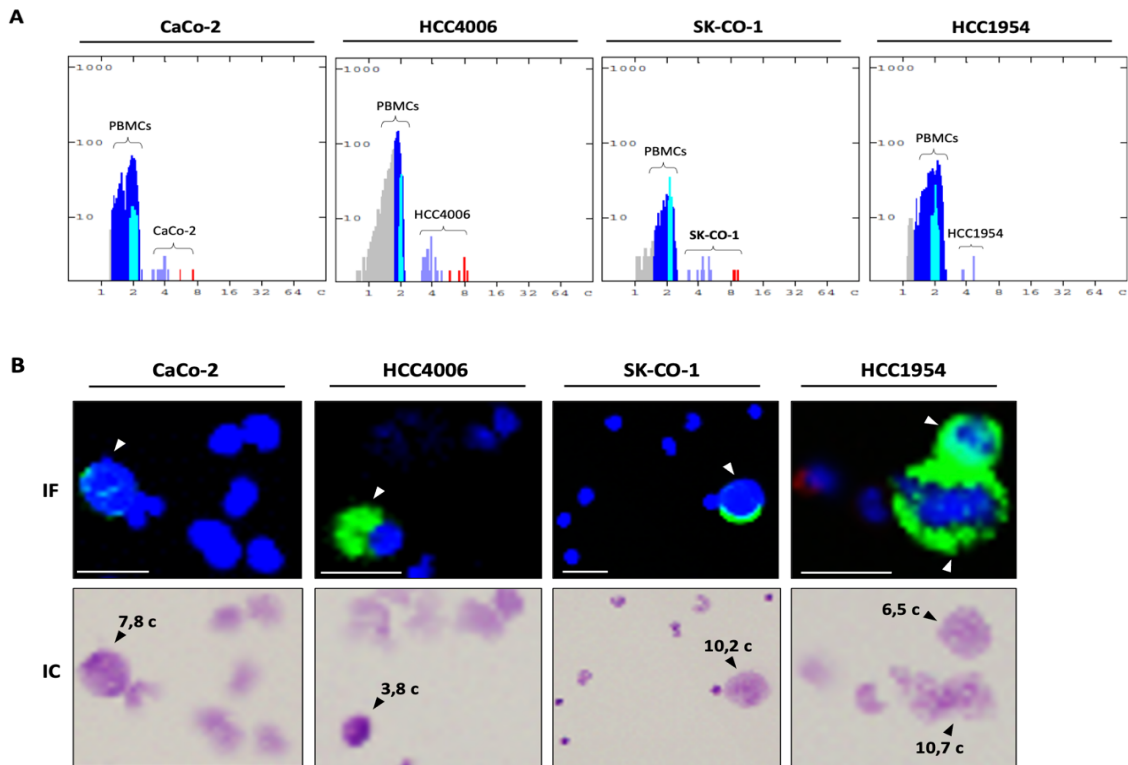


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung zur Validierung des kombinierten Protokolls aus Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie zur Detektion von 30 Tumorzellen in einem *spike in*-Modell

(A) 30 Tumorzellen der Zelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 wurden mit isolierten PBMCs eines gesunden Spenders versetzt, auf einem Objektträger immobilisiert und mit dem etablierten Immunfluoreszenzprotokoll gefärbt. Nach Quantifizierung der pCK⁺-Zellen im Fluoreszenzmikroskop wurden die Objektträger direkt für die Feulgen-Färbung verwendet, wobei die Deckgläser vorher durch Inkubation für 4 Stunden in PBS abgelöst wurden. Anschließend wurde der DNA-Gehalt der Zellen bildzytometrisch bestimmt. Die Histogramme zeigen den DNA-Gehalt als ein Vielfaches des Chromosomensatzes „c“ (x-Achse) gegenüber der Anzahl untersuchter Zellen (y-Achse). Als Referenz dienten PBMCs auf dem selben Objektträger. Die Farbkodierung entspricht dem gemessenen DNA-Gehalt der jeweiligen Zelllinie (dunkelblau ≈ Tetraploidie; violett = Hyperaneuploidie >4,4 c; rot = höhere Aneuploidie; grau = Zellen oberhalb des G2-/M-Phase Peak). Anzahl der Analysezellen: CaCo-2 = 1.726; HCC4006 = 1.260; SK-CO-1 = 709; HCC1954 = 166. Intrinsic Optical Density (IOD): CaCo-2 = 13,07; HCC4006 = 14,14; SK-CO-1 = 10,75; HCC1954 = 10,52.

(B) Vergleich von pCK⁺-Zellen der Zelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 in der Immunfluoreszenz (IF) mit Phasenkontrastaufnahmen derselben Zellen nach Feulgen-Färbung und DNA-Bildzytometrie (IC). Es handelt sich um die selben Objektträger wie in (A). Die Abbildung zeigt die Overlayrekonstruktion einer Immunfluoreszenzaufnahme und eine Aufnahme mittels Phasenkontrastmikroskop nach Feulgen-Färbung und DNA-Bildzytometrie. Die Immunfluoreszenzmarkierung erfolgte durch einen direkten Antikörper (anti-panCytokeratin = grün; anti-CD45 = rot; Zellkern = blau). Die mit den Pfeilen markierten Zellen wurden gleichzeitig als pCK⁺ und aneuploid identifiziert, die Ploidie der jeweiligen Zelle ist als ein Vielfaches des Chromosomensatzes „c“ angegeben. Belichtungszeit: blau = 28 ms, grün = 50 ms, rot = 333 ms. Maßstab: 30 µm.

Tabelle 5: Vergleich der Anzahl pCK⁺-positiver Tumorzellen der Zelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 mit der Anzahl aneuploider Tumorzellen in einem *spike in*-Modell aus PBMCs und 30 Tumorzellen

Für den Vergleich wurden 30 Tumorzellen von CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 zusammen mit ca. 10.000 isolierten PBMCs eines gesunden Spenders auf einen Objektträger aufgebracht und mit dem etablierten Immunfluoreszenz-Protokoll gefärbt und ausgewertet (IF). Anschließend erfolgte die Feulgen-Färbung und DNA-Bildzytometrie zur Bestimmung der aneuploiden Zellen (> 3c und > 4c). Pro Zelllinie und Zellzahl wurden jeweils drei Objektträger ausgewertet. σ = Standardabweichung, \bar{X} = Mittelwert.

Zelllinie	Anzahl gespikter Tumorzellen	Objektträger	Anzahl pCK ⁺ /CD45 ⁻ Zellen	Detektionsrate Immunfluoreszenz [%]	Anzahl Zellen mit Ploidie >3c (davon >4c)	Detektionsrate DNA-Bildzytometrie [%]
CaCo-2	30	1	7	23,3	12 (4)	40
		2	4	13,3	15 (2)	50
		3	8	26,7	13 (4)	43,3
		\bar{X}	6,4	21,1	13,3	44,4
		σ_{CaCo-2}	2,1	7	1,5	5,1
HCC4006	30	1	31	103,3	20 (3)	66,7
		2	38	126,7	26 (9)	86,7
		3	15	50	15 (8)	50
		\bar{X}	28	93,3	20,3	67,8
		$\sigma_{HCC4006}$	11,8	39,3	5,5	18,4
SK-CO-1	30	1	21	70	12 (11)	40
		2	12	40	9 (6)	30
		3	17	56,7	8 (8)	26,7
		\bar{X}	16,7	55,6	9,7	32,2
		$\sigma_{SK-CO-1}$	4,5	15	2,1	6,9
HCC1954	30	1	12	40	5 (3)	16,7
		2	10	33,3	19 (10)	63,3
		3	11	36,7	3 (2)	10
		\bar{X}	11	36,7	9	30
		$\sigma_{HCC1954}$	1	3,4	8,7	29
		\bar{X}_{gesamt}	15,5	51,7	11,9	43,6
		σ_{gesamt}	10,1	33,6	5,4	21,8

Die durchgeführten Versuche bestätigen, dass sich Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie sequenziell miteinander kombinieren lassen. Es zeigten sich zwar leichte qualitative Einbußen in der DNA-Bildzytometrie durch eine vorherige Immunfluoreszenz, diese wurden jedoch mit der Optimierung der zeitlichen Abfolge von Zwischenschritten auf ein Minimum gesenkt. Ein Großteil der pCK⁺-Zellen in der Immunfluoreszenz war auch mittels DNA-Bildzytometrie identifiziert worden, was auch noch bei einer geringen Zellzahl von 10-30 Tumorzellen pro Objektträger möglich war (Abbildung 16). In Stichproben wurde darüber hinaus bestätigt, dass es sich bei den als aneuploid identifizierten Zellen wirklich um pCK⁺- Zellen handelte (Abbildung 16, Tabelle 6). Es war jedoch aus technischen

Gründen nicht möglich, für jede aneuploide Zelle mit dem entsprechenden pCK⁺-Pendant die Ploidie zu bestimmen.

Tabelle 6: Darstellung der identifizierbaren Zellpaare in Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie

Für den Versuch wurden 30 Tumorzellen von CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 zusammen mit ca. 10.000 isolierten PBMCs eines gesunden Spenders auf einen Objektträger aufgebracht und mit dem etablierten Immunfluoreszenz-Protokoll gefärbt und ausgewertet (IF). Anschließend erfolgte die Feulgen-Färbung und DNA-Bildzytometrie zur Bestimmung der aneuploiden Zellen. Pro Zelllinie und Zellzahl wurden jeweils drei Objektträger ausgewertet und anschließend Übersichtsaufnahmen der gesamten Objektträger abgeglichen.

Zelllinie	Anzahl gespikter Tumorzellen	Objektträger	Anzahl gefundener Zell-Paare	Anzahl gefundener Zell-Paare mit Bestimmung der Ploidie
CaCo-2	30	1	5	2
		2	3	1
		3	3	1
HCC 4006	30	1	11	3
		2	20	2
		3	9	1
SK-CO-1	30	1	16	5
		2	7	2
		3	2	1
HCC1954	30	1	7	2
		2	8	1
		3	9	2

6 Diskussion

Bei Diagnostik, Prognosestellung und therapeutischem Monitoring von Tumorerkrankungen kann die Detektion und Quantifizierung von CTCs im Blut wichtige Zusatzinformationen liefern. Die Detektion von CTCs erfolgt bis dato meist durch den Nachweis von epithelialen Markerproteinen wie EpCAM oder CK im Rahmen einer Immunfluoreszenzfärbung (Vasseur et al., 2021). Tumor-spezifische Änderungen in der Proteinexpression, wie zum Beispiel bei EMT, können allerdings dazu führen, dass der Nachweis von CTCs durch Immunfluoreszenz negativ ausfällt (Feng et al., 2022). In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob sich der Nachweis von Aneuploidie mittels DNA-Bildzytometrie als neue alternative, markerunabhängige Methode zur Detektion von Tumorzellen im Blut nutzen lässt. Für die Evaluierung der Methode wurden *spike in*-Modelle aus kultivierten Tumorzelllinien und isolierten mononukleären Blutzellen hergestellt und die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie mit der Immunfluoreszenz verglichen.

Eine geeignete Methode zum Nachweis von CTCs im Patientenblut muss aufgrund der niedrigen CTC-Konzentrationen in der Vollblutprobe (1 CTC pro 10^6 - 10^7 Blutzellen) sehr sensitiv sein. Gleichzeitig sollte sie eine hohe Spezifität besitzen, da Blut- oder Endothelzellen nicht fälschlicherweise als Tumorzellen identifiziert werden dürfen. Häufig wird in der klinischen Routine zum Nachweis von Tumormarkern eine Sensitivität des Markers von >95% als sinnvoll erachtet (Limbach Gruppe, 2017). Als Referenzmethode zur Detektion von Tumorzellen wurde in dieser Arbeit die Immunfluoreszenzfärbung verwendet, welche auch in der Praxis sehr häufig zur CTC-Detektion angewendet wird; besonders eine Markierung von EpCAM und CK an der Zellmembran stellt aktuell die am weitesten verbreitete Methode dar, um CTCs zu detektieren (Lu et al., 2020).

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit war auffällig, dass in den meisten Versuchsdurchläufen weder in der Immunfluoreszenz noch in der DNA-Bildzytometrie die eingespikte Zellzahl detektiert wurde (Tabelle 4 und Tabelle 5). Durch die Erstellung der Verdünnungen und der Cytospins war generell mit leichten Abweichungen von der eingespikten Zellzahl zu rechnen.

Die Ergebnisse können mit zwei verschiedenen Ansätzen interpretiert werden. Lange galt Immunfluoreszenz mit Nachweis von EpCAM und CK als Goldstandard in der Detektion von CTCs und wurde als dieser von der FDA empfohlen (Mu et al., 2016). Wenn Immunfluoreszenzmarkierung die Grundlage zur Detektion von CTCs darstellt, kann angenommen werden, dass die Anzahl der detektierten pCK⁺/CD45⁻ Zellen die tatsächlich vorhandene Anzahl an Tumorzellen auf dem Objektträger korrekt widerspiegelt. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, dass alle Zellen der vier verwendeten Tumorzelllinien in der Immunfluoreszenz pCK⁺ und CD45⁻ waren. Im optischen Vergleich der Tumorzelllinien zeigte die Zelllinie CaCo-2 die geringste CK-Expression. Diese Beobachtung deckt

sich mit den Ergebnissen einer Genanalyse häufig verwendeter Tumorzelllinien von Klijn und Kollegen (Klijn et al., 2015). Diese Arbeitsgruppe zeigte eine vergleichsweise niedrigere Genexpression von *NCAM 1*, sowie *KRT 10*, *18* und *19* in CaCo-2 Zellen. Diese Gene sind unter anderem an der Expression der Cytokeratine CK10 und 19 beteiligt (Rouillard et al., 2016); der in dieser Arbeit verwendete anti-panCK-Antikörper war unter anderem gegen CK10 und 19 gerichtet. Für die drei Tumorzelllinien HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 wurden in dieser Arbeit bei einer theoretischen Zellzahl von 30 Tumorzellen pro Objektträger im Mittel 74,5% der pCK⁺-Zellen auch als aneuploid detektiert. Somit sind, wenn die Immunfluoreszenz als Goldstandard gesehen wird, gegen den die neue Nachweismethode verglichen wird, bei der Auswertung meist mehr pCK⁺ Zellen gefunden worden, als aneuploide Zellen nachzuweisen waren. Im Gegensatz hierzu waren bei Zelllinie CaCo-2 jedoch in allen Replikaten mehr aneuploide als pCK⁺ Zellen zu detektieren; sonst war dies nur in einem Replikat bei Zelllinie HCC1954 zu beobachten.

Der andere Interpretationsansatz stellt die Immunfluoreszenz als Referenz in Frage. Auch wenn sie am häufigsten zur Detektion von CTCs im Blut eingesetzt wird (Weissenstein et al., 2012), können mit dieser Methode trotzdem Zellen übersehen werden. Ein Grund hierfür kann EMT sein, wodurch die Expression von Oberflächenproteinen beeinflusst werden kann (Puisieux et al., 2014; Nieto et al., 2016; Brabletz et al., 2018). Deshalb kann es sinnvoll sein, die eingespikte Anzahl aneuploider Tumorzellen an sich als Referenz zum Vergleich von Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie zu wählen. Allerdings muss mit gewissen Schwankungen gerechnet werden und es ist möglich, dass etwas mehr oder weniger als 30 Zellen auf einem Objektträger immobilisiert werden. Im Fall von 30 eingespikten Tumorzellen wurden weder durch Immunfluoreszenz noch durch Feulgen-Färbung und DNA-Bildzytometrie regelmäßig > 75% der Tumorzellen auf den Cytospins detektiert. Dies ist am ehesten dadurch zu erklären, dass äußere Limitationen die Ergebnisse beeinflusst haben und nie exakt 30 Zellen auf den Objektträgern immobilisiert worden waren. Werden die Detektionsraten pro Cytospin für jede Tumorzelllinie miteinander verglichen, sind die Unterschiede weniger auffällig als beim Vergleich der jeweiligen Mittelwerte \bar{X} und der Standardabweichungen σ . Bei den Zelllinien CaCo-2, HCC4006 und HCC1954 wurden regelmäßig mehr als 50% der eingespikten Tumorzellen entdeckt, bei HCC4006 sogar mehr als 60%. Bei einer Anzahl von 30 Tumorzellen pro Objektträger sollte beachtet werden, dass das Fehlen von bereits wenigen Zellen die Detektionsraten sehr schmälern kann. Betrachtet man die Ergebnisse qualitativ, also ob eine Detektion von Tumorzellen mit den beschriebenen Methoden möglich ist, kann eine positive Bilanz gezogen werden, da auf jedem Cytospin regelmäßig aneuploide Zellen gefunden wurden. Ebenfalls war eine Dynamik der Detektionsrate in der Immunfluoreszenz auch in der DNA-Bildzytometrie zu erkennen: je höher die absolute Detektionsrate in der Immunfluoreszenz war, desto höher war sie auch in der DNA-Bildzytometrie. Dies spricht am ehesten dafür, dass beide Methoden dieselben Zellen detektieren.

In beiden Interpretationsansätzen wird deutlich, dass mit DNA-Bildzytometrie eine sehr geringe Anzahl von CTCs pro Blutprobe detektiert werden kann. In den abschließenden Versuchen dieser Arbeit wurden von den eingespikten Tumorzellen durchschnittlich > 50% detektiert, also ca. 10-15 Zellen. Dies spricht dafür, dass auch eine geringe Anzahl von CTCs, wie sie häufig in *Liquid Biopsies* aus Patientenblut vorkommt, anhand von Aneuploidie detektiert werden kann. Besonders bei seltenen Zellen wie CTCs ist es wichtig, diese bei kleiner Anzahl sicher zu identifizieren.

Als Erklärung für die abweichenden Ergebnisse zwischen Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie in der Detektion von Tumorzellen aller Zelllinien kommen verschiedene Gründe in Frage und sind für beide Interpretationsansätze zulässig.

Ein Grund könnte sein, dass durch mehrmalige Waschschrte während der Feulgen-Färbung Zellen vom Objektträger gespült wurden. Allerdings wurden hierzu Vergleiche zwischen Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt, die bei den meisten Objektträgern keinen Anhalt dafür gaben, dass es aufgrund der Waschschrte zu einem bedeutenden Zellverlust gekommen war. Weder makroskopisch beim Betrachten der gesamten Objektträger noch auf Einzelzellebene schien es große Unterschiede zu geben. Eine wichtige Erkenntnis aus dem Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen war außerdem, dass es sich bei den detektierten aneuploiden Zellen auch wirklich um pCK⁺ Zellen handelte. Dies bestätigte, dass die DNA-Bildzytometrie und die Immunfluoreszenz prinzipiell die selben Zellen detektieren (Abbildung 16). Es muss allerdings in diesem Zuge erwähnt werden, dass die Bestätigung der Übereinstimmung von Aneuploidie und pCK-Positivität auf Einzelzellebene technisch nur für einen Teil der aneuploiden Zellen möglich war. Für fast jede Zelllinie war es möglich, in jedem der durchgeführten Durchgänge auf allen drei Objektträgern das aneuploide Pendant zur pCK⁺-Markierung zu finden (Tabelle 6). Jedoch war es oft nicht möglich, die Zellen im Bildzytometrieprogramm sicher zu identifizieren und die Ploidie entsprechend zuzuordnen. In den meisten Fällen war dies der Tatsache geschuldet, dass die Zellen im Bildzytometrieprogramm nicht durch eindeutige optische Charakteristika oder spezifische Umgebungsformationen zu anderen Zellen abgrenzbar waren.

Ein weiterer Grund für die höhere Anzahl detektierter Tumorzellen durch Immunfluoreszenz als durch DNA-Bildzytometrie kann die Qualität der Feulgen-Färbung sein. Zum einen ist es möglich, dass Zellen nicht ausreichend oder ungleichmäßig gefärbt wurden. Einen Hinweis auf die Qualität der Feulgen-Färbung gibt der IOD-Wert, welcher einen Vergleich zwischen verschiedenen Färbungen zulässt und normalerweise größer 10 sein sollte. Dies war in dieser Arbeit der Fall, allerdings ist der IOD kein Wert für einzelne Zellen, sondern stellt einen Mittelwert dar. Es ist also auch nach der Optimierung der Methodenkombination möglich, dass einzelne Zellen ungleichmäßig angefärbt und hierdurch nicht als aneuploid erkannt wurden. Zum anderen kam es bei allen Zelllinien vor, dass durch verstärkte Bildung

von Zellclustern einzelne Nuclei in der DNA-Bildzytometrie nicht eindeutig voneinander zu trennen waren. Hierdurch kann ein Teil eines benachbarten Partikels fälschlicherweise nicht miterfasst werden. Aufgrund dieser Einschränkungen kann sich die Anzahl der tatsächlich ausgewerteten aneuploiden Zellen verringert haben, obwohl es sich um pCK⁺ Tumorzellen handelte.

Ganz im Gegenteil hierzu wurden im Fall der Tumorzelllinie CaCo-2 im Mittel mehr als doppelt so viele aneuploide Zellen auf den Objektträgern detektiert als pCK⁺ Zellen vorhanden waren. Allerdings waren es immer noch nur annähernd 50% der eingespikten Tumorzellen, wenn Immunfluoreszenz als Goldstandard die tatsächlich vorhandene Anzahl von Tumorzellen auf dem Objektträger darstellt. Auch hierfür können mehrere Ursachen vorliegen.

Zum einen können aufgrund der vergleichsweise niedrigen pCK-Expression bei Zelllinie CaCo-2 nicht alle Tumorzellen in der Immunfluoreszenz identifiziert worden sein. Wie oben bereits beschrieben, fielen CaCo-2 Zellen in der Immunfluoreszenz durch ein deutlich niedrigeres pCK-Signal im Vergleich zu den anderen drei Zelllinien auf. Solange aneuploide Zellen auf dem Objektträger fixiert bleiben, sollten diese trotzdem in der DNA-Bildzytometrie als aneuploid erkannt werden. Folglich handelt es sich bei dem beobachteten Effekt womöglich nicht um falsch-positive Ergebnisse, sondern wirklich um Tumorzellen, die jedoch ausschließlich durch DNA-Bildzytometrie detektiert wurden.

Allerdings gibt es auch Beobachtungen, die darauf hindeuten, dass es sich möglicherweise doch um falsch-positive Ergebnisse handelt. So wies Zelllinie CaCo-2 im Vergleich mit den anderen Zelllinien die niedrigste mittlere Ploidie mit 4,32c auf, was dazu führen könnte, dass eine eindeutige Trennung zwischen diploiden PBMCs und den Tumorzellen hier schwieriger und fehleranfälliger war. Da die Unterschiede jedoch relativ klein waren und die gemessene Ploidie von 4,32c deutlich von 2,0c entfernt ist, scheint dies nicht der Hauptgrund für die Ergebnisse zu sein. Darüber hinaus ist anzumerken, dass die niedrige Gesamtanzahl an CaCo-2 Zellen auf den Objektträgern (6 Zellen in der Immunfluoreszenz beziehungsweise 13 Zellen in DNA-Bildzytometrie im Mittel), dazu führt, dass sich kleine Abweichungen in der Anzahl der detektierten aneuploiden Zellen stark auf die relative Detektionsrate auswirken, während die absoluten Unterschiede in der detektierten Zellzahl im Vergleich zu den anderen Zelllinien nicht so groß waren. In diesem Fall kann es zutreffen, dass trotz größter Sorgfalt beim Pipettieren weniger als 30 Zellen in die Zellsuspension eingespikt und somit tatsächlich der Großteil der Tumorzellen durch DNA-Bildzytometrie detektiert wurde.

Alle gefundenen aneuploiden Zellen in der DNA-Bildzytometrie wurden in dieser Arbeit manuell abgeglichen, d.h. nach dem Scannen des Objektträgers durch einen Untersucher erneut begutachtet. Dieser Schritt war notwendig, um eine zusätzliche Kontrolle der Qualität der Färbung auf Einzelzellebene durchzuführen und gegebenenfalls Artefakte auszuschließen, wie beispielsweise eine

Übereinanderlagerung oder ungleichmäßig gefärbte Nuclei. Zusätzlich ist es sinnvoll, einen Grenzwert zu definieren, der angibt, ab welchem Ploidiewert aneuploide (Tumor-) Zellen detektiert werden. In dieser Arbeit wurde ein Cut-off $\geq 3c$ für die Detektion der verwendeten Tumorzellen festgelegt. Durch diesen Grenzwert sollte bestmöglich zwischen diploiden Referenzzellen und aneuploiden Analysezellen unterschieden werden, wobei gleichzeitig die Anzahl an falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen minimiert werden sollte. Die Versuche in dieser Arbeit haben gezeigt, dass ein Cut-off von $3c$ zu einer guten Trennung zwischen diploiden PBMCs und Tumorzellen führte. Ein höherer Cut-off von $\geq 4c$ schien nicht sinnvoll, da bei den Tumorzelllinien HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 mindestens 50% der Zellen eine Ploidie zwischen $3c$ und $4c$ aufwiesen. Bei der Tumorzelllinie CaCo-2 zeigten sogar mehr als 75% der Zellen eine Ploidie zwischen $3c$ und $4c$. Zusätzlich wurden Tumorzellen als aneuploid und pCK⁺ detektiert, deren Ploidie geringer als $4c$ war (Abbildung 16b); um solche pCK⁺ Zellen auch zu detektieren, sollte der Cut-off also eher etwas niedriger als die zu erwartende Ploidie gesetzt werden. Die Wahl eines niedrigeren Cut-off Wertes von $\geq 2,5c$ birgt die Gefahr, dass diploide PBMCs fälschlicherweise als Tumorzellen klassifiziert werden. Auch wenn diese Zellen theoretisch nicht vorkommen sollen, muss mit leichten Schwankungen und Messungenauigkeiten gerechnet werden, welche eine leicht höhere oder niedrigere Ploidie bedingen können.

Die größte Einschränkung des Cut-off liegt darin, dass bei verschiedenen Tumorzellentitäten, oder auch aufgrund hoher intratumoraler Heterogenität, die individuellen Schwankungen der Ploidie nicht berücksichtigt werden können. In dieser Arbeit wurden käuflich erwerbbar Tumorzelllinien verwendet, die vor Beginn der eigentlichen Versuche bereits genau untersucht worden waren. CTCs im Blut sind selten und variieren durchschnittlich zwischen 1 bis 100 CTCs pro 10^9 Blutzellen (Hou et al., 2013). Darüber hinaus sind sie gegebenenfalls genomisch sehr heterogen (Siu, 2013), was ausführliche Untersuchungen des Primärtumors, einer gegebenenfalls vorhandenen Metastase und von CTCs dieses Primärtumors wünschenswert macht. Allerdings ist es aufgrund ihrer Seltenheit unrealistisch, die genannten Zelltypen in ausreichendem Maß detektieren zu können (Bulfoni et al., 2016). Abgesehen davon scheint es aufgrund der heterogenen Natur von CTCs und malignen Tumoren allgemein nicht sehr sinnvoll, die Ploidie von CTCs anhand von Gewebeproben des Primärtumors oder einer Metastase festzulegen (Burrell et al., 2013). Dies erscheint im klinischen Alltag genauso aufwendig wie wissenschaftlich fraglich (Burrell et al. 2013). Obwohl ein individueller Grenzwert also im Vorhinein nicht bestimmbar zu sein scheint, sollte für die Detektion von CTCs mit DNA-Bildzytometrie ein Cut-off definiert werden. CTCs überschreiten, auch bei manifester Metastasierung nur selten eine Anzahl > 100 Zellen pro 7,5 ml Vollblut (Vasseur et al., 2021) und die manuelle Durchsicht dieser Zellen ist mit vergleichsweise geringem Zeitaufwand möglich; darüber hinaus ist sie als zusätzliche Qualitätskontrolle der Färbung sinnvoll. Allerdings ist die manuelle Durchsicht kein Ersatz des Cut-off. Dieser hilft bei der (schnellen) Objektivierung der Ergebnisse, besonders bei

niedriger Aneuploidie oder grenzwertigen Zellen, setzt eine klare Grenze zwischen diploiden und aneuploiden Zellen und sollte trotz aller genannten Einschränkungen standardmäßig definiert werden.

Die sicherste Methode, um die oben beschriebenen falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse identifizieren und bewerten zu können, wäre der Abgleich jeder einzelnen pCK⁺ Zelle mit ihrem jeweils aneuploiden Pendant in der DNA-Bildzytometrie. In dieser Arbeit war eine exakte Lokalisation der aneuploiden Zellen auf dem Objektträger aufgrund technischer Einschränkungen durch die ICM-Software jedoch nicht möglich und der Abgleich jeder einzelnen Zelle nicht durchführbar. Die Software ermöglichte eine ungefähre Lokalisation der (aneuploiden) Zellen auf dem Objektträger, was sich technisch allerdings nicht direkt mit der Immunfluoreszenzaufnahme korrelieren ließ. Die Zellen konnten nur anhand von charakteristischen Umgebungsformationen als identisch identifiziert werden, weshalb der Abgleich nur für eine kleine Zellzahl möglich war. Für einen Abgleich der Zellen auf dem gesamten Objektträger könnte zukünftig die Entwicklung eines Rasters hilfreich sein. Dieses erleichtert die Suche nach falsch-negativen Zellen in der DNA-Bildzytometrie, da durch ein Raster auf dem Objektträger die Position der pCK⁺ Tumorzelle eingegrenzt werden kann und im Anschluss durch einen Overlay von phasenkontrast- und immunfluoreszenzmikroskopischer Aufnahme die Existenz des Pendants bestätigt oder ausgeschlossen werden könnte. Als Einschränkung ist zu nennen, dass nicht immer ein Pendant existieren muss, da die Zelle unter Umständen nicht mehr auf dem Objektträger fixiert sein kann. Für falsch-positive Zellen in der DNA-Bildzytometrie ist die Identifikation deutlich schwieriger, da die Lokalisation der aneuploiden Zellen auf dem Objektträger über die ICM-Software nicht eindeutig zu bestimmen ist.

Um anhand des Histogramms der DNA-Bildzytometrie eine Aussage über das Vorliegen von Aneuploidie zu treffen, müssen die Peaks der verschiedenen Zelltypen gut voneinander zu trennen sein. Dies wurde durch die Optimierung des etablierten Protokolls erreicht. Nach der Optimierung war auffällig, dass die Standardabweichung σ vom Mittelwert \bar{X} reduziert wurde. Im Versuch mit 30 eingespikten aneuploiden Tumorzellen lag sie in der DNA-Bildzytometrie zwischen 1,5 und 5,5; Zelllinie HCC1954 bildete die Ausnahme. Im Vergleich zur Standardabweichung der DNA-Bildzytometrie war die Standardabweichung der Immunfluoreszenz durchschnittlich um 50% größer, was zeigt, dass mit DNA-Bildzytometrie in den durchgeführten Versuchen ein exakter reproduzierbares Ergebnis erzielt und aneuploide Zellen zuverlässiger detektiert werden konnten. Als Einschränkung bleibt allerdings die geringere Detektionsrate der DNA-Bildzytometrie zu beachten.

Der Einsatz von DNA-Bildzytometrie in der klinischen Praxis soll die Detektion aneuploider Tumorzellen markerunabhängig machen. Jedoch birgt der Nachweis durch Aneuploidie im Allgemeinen gewisse Einschränkungen.

Als grundlegende Voraussetzung muss beim Primarius oder den gegebenenfalls vorliegenden Metastasen Aneuploidie vorliegen. Dies ist zwar für viele solide Tumoren und ihre Tochtergeschwulste nachgewiesen und eines der Hauptmerkmale maligner solider Neoplasien (Vasudevan et al., 2021), jedoch ist dieser Zustand durch intratumorale Mutationen jederzeit veränderbar; der Wechsel von Aneuploidie zu einem euploiden DNA-Gehalt scheint allerdings sehr unwahrscheinlich. Zum anderen müssen sich aus Primarius oder Metastase aneuploide CTCs lösen, im Blut zirkulieren und überleben, bis sie mit einer *Liquid Biopsy* aus Patientenblut gesammelt werden können. Sind auf dem Objektträger nur Zellen mit euploidem DNA-Gehalt nachzuweisen, bietet die Methode keinen Mehrertrag. Zusätzlich muss bedacht werden, dass auch in einem gesunden Organismus aneuploide Zellen detektiert werden können. Beispielweise sind Hepatozyten oder Neuronen ebenfalls oft aneuploid (Rehen et al., 2001; Duncan et al., 2012; Knouse et al., 2014; van den Bos et al., 2016; Vitak et al., 2017). Je nach Punktionsort der *Liquid Biopsy* aus Patientenblut ist es möglich, dass diese Zellen mit in die zu untersuchende Probe aufgenommen werden, was immer in die Betrachtung der Ergebnisse miteinfließen sollte.

Ein weiterer limitierender Faktor liegt also in der Probengewinnung. Je weiter die Entfernung vom Primarius oder der Metastase zur Punktionsstelle der *Liquid Biopsy* aus Patientenblut ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, CTCs in einer Blutprobe zu detektieren (Majidpoor et al., 2021). Dies liegt unter anderem an der Überlebenszeit der CTCs in der Blutzirkulation, welche im Mittel 2-3 Stunden beträgt (Lemma et al., 2021). Es ergibt sich also, dass neben der Entnahmestelle auch der Zeitpunkt der *Liquid Biopsy* von Patientenblut Einfluss auf die CTC-Anzahl haben kann. Zum Beispiel zeigten Graham und Kollegen, dass die hauptsächliche Metastasenbildung in frühen und sehr späten Phasen der Tumorgenese stattfindet (Graham und Shibata, 2020). Bei manchen Tumoren wurde ein zirkadianer Rhythmus festgestellt, durch welchen die Tendenz, Metastasen zu bilden, beeinflusst wird (Diamantopoulou et al., 2022). Durch alle diese nicht beeinflussbaren und teilweise schlecht vorhersagbaren Faktoren lässt sich kein allgemeingültiger optimaler Entnahmezeitpunkt definieren.

Neben diesen allgemeinen Einschränkungen sind auch methodenspezifische Schwachpunkte zu bedenken.

Zwar erlaubt das automatische Scannen des Objektträgers bei der Bildzytometrie eine schnelle Auswertung. Jedoch werden nah beieinander liegende Zellkerne nicht immer sicher als voneinander getrennte Objekte erkannt und können deshalb fälschlicherweise als ein großer Partikel gezählt werden. Ähnliches gilt gleichermaßen für Tumorzellcluster, wie sie in dieser Arbeit besonders ausgeprägt bei Tumorzelllinie SK-CO-1 beobachtet wurden. Durch die hohe optische Dichte solcher Partikel errechnet das Programm einen hohen DNA-Gehalt, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Aufgrund dieser Anfälligkeiten müssen die Messungen immer im Anschluss von einem

Untersucher begutachtet und gegebenenfalls nachbearbeitet werden. Dies kann bei wechselnden Untersuchern zu mangelnder Vergleichbarkeit führen, da zur objektiven Beurteilung bisher noch keine allgemeingültigen Standards existieren. Darüber hinaus ist diese „manuelle“ Auswertung durch einen Untersucher besonders bei einer großen Anzahl aneuploider Zellen zeitaufwändig, wodurch der Zeitgewinn durch das automatisierte Scannen relativiert wird.

Eine weitere Einschränkung liegt beim Ploidie Cut-off-Wert für die Detektion von Tumorzellen in der DNA-Bildzytometrie, der durch intratumorale Heterogenität den gewünschten Ploidie-Bereich unpassend abdecken kann. Allerdings ist davon auszugehen, dass die meisten malignen Tumoren früher oder später Aneuploide aufweisen (Vasudevan et al., 2021); die Veränderung des Genoms zu einem euploiden DNA-Gehalt allerdings ist eher nicht zu erwarten, da Reparaturmechanismen im Bereich der DNA-Replikation und/oder der Zellteilung nicht mehr funktionieren (Rajagopalan und Lengauer, 2004; Strate und Syngal, 2005; Weaver und Cleveland, 2006). Es ist also am ehesten eine Frage der Zeit und des Biopsie-Zeitpunkts, aneuploide CTCs im Blut zu finden und eher weniger die Unsicherheit, ob diese Zellen überhaupt existieren. So zeigten Ye und Kollegen, dass Triploidie, Tetraploidie und Polyploidie auf Chromosom 8 in *Liquid Biopsies* aus Patientenblut bei CTCs vieler häufigen Tumorentitäten zu finden war, unter anderem beim hepatozellulären, Bronchial- und Nierenkarzinom, sowie bei malignen Neoplasien des oberen und unteren Gastrointestinaltrakts, des Pankreas, der Blase und des Ovars; die Entitäten der Neoplasien waren in dieser Untersuchung zum einen unterschiedlich und zum anderen war die Lokalisation der betroffenen Organsysteme ebenfalls nicht identisch (Ye et al., 2019). Es wurden 594 Blutproben von 479 Patienten mit einer malignen Tumorerkrankung mittels *Liquid Biopsy* gewonnen und anhand von FISH analysiert. Es zeigte sich bei jeder untersuchten Entität, dass > 87% der gefundenen CTCs aneuploid waren (Ye et al., 2019). Der prozentuale Anteil der aneuploiden CTCs war positiv mit einem hohen Tumorstadium nach TNM korreliert und zeigte eine maximale Ausprägung in den TNM-Stadien III und IV (Ye et al., 2019). Es kann also davon ausgegangen werden, dass Aneuploidie in CTCs regelmäßig auftritt und nur in seltenen Fällen eine Ausnahme darstellt (Lin et al., 2017). Oulhen und Kollegen zeigten darüber hinaus, dass CIN und CNA in CTCs zur Prognosestellung bezüglich des Therapieerfolgs einer Immuntherapie beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom beachtet werden sollten (Oulhen et al., 2021). Trotz der hohen Wahrscheinlichkeit, dass sich bei (metastasierenden) malignen Neoplasien hauptsächlich aneuploide CTCs im Blut finden, ist es unwahrscheinlich, aber dennoch möglich, dass keine oder euploide CTCs mit einer *Liquid Biopsy* aus Patientenblut gewonnen werden. In Kombination mit einer generell geringen Anzahl von CTCs pro Blutprobe kann diese Möglichkeit natürlich die prognostische Aussage der DNA-Bildzytometrie schmälern und aufgrund dieser Tatsache kann DNA-Bildzytometrie noch nicht alleine zur Detektion aneuploider Tumorzellen verwendet werden. Deswegen scheint aktuell die Verwendung als eine komplementäre Methode zur Immunfluoreszenz gut vorstellbar.

Darüber hinaus ist die etablierte Kombination von Immunfluoreszenz und Feulgen-Färbung in der in dieser Arbeit verwendeten Form zeitlich aufwendig. Im klinischen Alltag müssen aus den Vollblutproben erst PBMCs isoliert werden, die im Anschluss auf Cytospins fixiert und vor weiterer Anwendung mindestens über Nacht getrocknet werden müssen. Zum anderen ist die Auswertung der DNA-Bildzytometrie noch nicht standardisiert genug und verlängert sich vor allem durch die händische Kontrolle der aneuploiden Zellen. Erschwerend kommt hinzu, dass aktuell aufgrund technischer Einschränkungen nicht für alle pCK⁺ Zellen eine exakte Zuordnung zum jeweiligen aneuploiden Pendant möglich ist.

Besonders die PBMC-Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation ist ein fehleranfälliger Schritt. Beim Abpipettieren der PBMCs aus dem Zentrifugenröhrchen können aneuploide Tumorzellen im Röhrchen oder in der Pipettenspitze verbleiben. Zusätzlich kann mit einer Pipette nur ein bestimmtes Volumen aus einer Phase aufgenommen werden und es ist mit einer Pipette nicht möglich, eine spezifische Phase exakt abzapfen zu können, da entweder die angrenzende Schicht mit dazugehörigen Zellen mitgenommen wird oder ein Sicherheitsabstand zur nächsten Phase eingehalten werden muss. Im ersten Fall werden zu viele und gegebenenfalls nicht aneuploide Zellen mit aufgenommen; im zweiten Fall fehlen aneuploide Zellen wohlmöglich, was schwerwiegender ist und bei seltenen Zellen wie CTCs das Ergebnis stark verzerren kann. Die Erstellung der Cytospins aus der isolierten PBMC-Zellfraktion ist ein weiterer Schritt, bei dem ein Verlust von CTCs möglich ist. Die Zellen können hierbei zum Beispiel im Cytospintrichter oder im Filterpapier hängen bleiben. Als letzter kritischer Schritt, bei dem ein Verlust von Zellen möglich ist, ist das Ablösen der Deckgläschen durch Inkubation in PBS zu nennen. Dieser Schritt wird nach der Immunfluoreszenz und vor der Feulgen-Färbung durchgeführt. Er sollte so kurz wie möglich sein, wobei in dieser Arbeit Deckgläschen nach ca. 60 bis 180 Minuten vollständig von allein vom Objektträger gelöst waren. Gleichzeitig kann die Inkubation in PBS die Qualität der DNA-Bildzytometrie beeinflussen (Abbildung 15).

Idealerweise wird die Anzahl an Einzelschritten zur Aufreinigung der Probe oder der Fixierung der Analysezellen auf einem Objektträger also so niedrig wie möglich gehalten, um einen Verlust von potentiell aneuploiden Tumorzellen zu minimieren.

Alternative Isolationsmethoden zur Detektion von Tumorzellen oder CTCs, die sich gut mit der DNA-Bildzytometrie kombinieren lassen, sollten CTCs optimalerweise unabhängig von der Expression epithelialer Markerproteine anreichern können. Außerdem sollte das Volumen der Zellsuspension nach der Isolation relativ gering sein, damit eine einfache Immobilisierung auf Objektträgern möglich ist.

Aktuell existieren nur wenige validierte und käuflich erwerbbar Methoden, die CTCs markerunabhängig isolieren. ISET® und Pasortix™ sind die Systeme, die in der Praxis am häufigsten eingesetzt werden. Beide Systeme isolieren CTCs anhand von Größe und Verformbarkeit. ISET® isoliert CTCs nach Zugabe einer speziellen Pufferlösung zur Vollblutprobe über ein Filtersystem und Pasortix™ gewinnt die Zellen direkt aus einer Vollblutprobe über einen mikrofluidischen Chip.

ISET® und Pasortix™ scheinen unter gewissen Umständen beide geeignet, um vor DNA-Bildzytometrie CTCs aus einer *Liquid Biopsy* von Patientenblut zu isolieren. Es ist jedoch zu bedenken, dass bei beiden Systemen die Zellen erst von der Membran oder dem Filter gelöst und auf einen Cytospin gebracht werden müssen. Es kann in diesem Fall also erneut zu Zellverlust oder Beschädigung der Analysezellen kommen. Als weitere Limitation beider Methoden sind eine Sensitivität und Spezifität von ca. 80% zu nennen, wodurch insbesondere falsch-negative Ergebnisse nicht auszuschließen sind. Nach aktuellem Stand sind die Ergebnisse der Detektion mittels DNA-Bildzytometrie also nur in der Zusammenschau mit anderen bewährten Nachweismethoden zu beurteilen und kritisch zu hinterfragen.

Trotz der genannten Einschränkungen stellt DNA-Bildzytometrie bei Tumoren mit aneuploiden CTCs eine alternative Detektionsmethode dar, die nennenswerte Vorteile bietet.

Zum einen ist die Feulgen-Färbung kostengünstig. Es werden keine Antikörper verwendet, die in ihrer Verfügbarkeit eingeschränkt sein können. Zusätzlich sind die verwendeten Materialien in den meisten Laboratorien bereits vorhanden. Die benötigte Hard- und Software zur Durchführung der DNA-Bildzytometrie wird von mehreren Herstellern angeboten (unter anderem: Ahrens ICM, Bargteheide, Deutschland; Beckman Coulter, Brea, USA; De Novo Software, Pasadena, USA; Leica, Jena, Deutschland) und ist ebenfalls in vielen Laboratorien zumindest teilweise bereits vorhanden. Darüber hinaus handelt es sich um platzsparende Geräte, die keine besonderen Sicherheitsvorkehrungen benötigen und gut in vorhandene Einrichtungen integriert werden können.

Zum anderen ist DNA-Bildzytometrie vielseitig im klinischen Alltag einsetzbar, da sie markerunabhängig aneuploide (Tumor-) Zellen nachweist. Somit müssen EMT- oder MET-Status mit den hieraus resultierenden CTC-Subtypen nur noch bedingt bei der Detektion bedacht werden. Die Subtypen könnten eher später für die Charakterisierung auf molekularer Ebene in den Vordergrund treten und der große Wert von CTCs bezüglich Prognose wäre schneller in der klinischen Routine nutzbar.

Des Weiteren liefert eine Kombination aus Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie zusätzliche Informationen über die Ploidie der gefundenen CTCs. Aneuploidie per se und Aneuploidie in CTCs im Speziellen wurden bereits mit einem hohen Tumorstadium korreliert (Lin et al., 2017; Ye et al., 2019).

Diese Tatsache ermöglicht auf der einen Seite eine präzisere Prognose der vorliegenden Erkrankung und kann auf der anderen Seite beim Therapiemonitoring nützliche Informationen „in Echtzeit“ geben.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass DNA-Bildzytometrie regelmäßig CTCs in kleiner Anzahl nachweisen kann. Hierdurch wird deutlich, dass Aneuploidie gut für die Detektion dieses seltenen Zelltyps geeignet ist, weil CTCs meistens nur in geringer Anzahl pro Blutprobe vorkommen. Besonders für die Prognose bei bereits metastasierten Tumoren kann dies Sicherheit geben, da in den finalen Versuchen dieser Arbeit Tumorzellen in ähnlicher Anzahl pro *spike in*-Modell detektiert wurden, wie CTCs bei metastasierten Tumoren im Blut nachgewiesen wurden.

Als zusätzliches prognostisches Kriterium bei der Analyse von CTCs aus einer *Liquid Biopsy* aus Patientenblut sollte Aneuploidie und deren Detektion mittels DNA-Bildzytometrie in Betracht gezogen werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Anwendung von DNA-Bildzytometrie zur Detektion von Aneuploidie im *in vitro*-Modell erfolgreich und zumindest als neuer ergänzender Nachweis dem aktuellen Goldstandard Immunfluoreszenz gleichwertig ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass DNA-Bildzytometrie besonders in Bezug auf die Exaktheit bessere Ergebnisse liefern kann, was bei raren Zelltypen wie CTCs sehr wichtig ist. Aufgrund der vergleichsweise geringeren Detektionsraten ist DNA-Bildzytometrie aktuell eher als eine sehr gute Ergänzung zur Immunfluoreszenz zu sehen. Bei uneindeutigen Ergebnissen in der Immunfluoreszenz aufgrund schwacher Fluoreszenzsignale kann sie zusätzlichen Anhalt für das Vorliegen aneuploider CTCs geben.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

CTCs sind von großer Bedeutung bei der Entwicklung von Metastasen solider maligner Neoplasien, durch welche die Lebensqualität von Tumorpatienten stark vermindert wird. Deshalb ist in der personalisierten Tumorthherapie die frühzeitige Detektion von Metastasen von größter Wichtigkeit. Der prognostische Nutzen von CTCs hierfür wurde bereits mehrfach nachgewiesen. Allerdings können diese seltenen Zellen aufgrund entdifferenzierter Eigenschaften, wie der veränderten Expression von extra- oder intrazellulären Markerproteinen, bisher nur schwer im klinischen Alltag genutzt werden. Aktuell erfolgt die Detektion von CTCs epithelialer Tumoren hauptsächlich durch die Markierung spezifischer Oberflächenantigene, beispielsweise EpCAM oder CK. Aufgrund molekularer Mechanismen wie EMT und MET kann sich das Expressionsprofil jedoch ändern, wodurch ein Teil der Zellen nicht detektiert wird. Bei soliden malignen Neoplasien wurde als ein regelmäßiges Charakteristikum Aneuploidie nachgewiesen, eine Abweichung vom üblichen Chromosomensatz, was sich auch regelmäßig bei CTCs zeigt. Im Gegensatz zu spezifischen Markerproteinen ist Aneuploidie konstant auftretend und kann über Feulgen-Färbung in Kombination mit DNA-Bildzytometrie erfolgen.

Um die Informationen von CTCs in der klinischen Routine besser und universeller nutzbar zu machen, erfolgte in dieser Arbeit erstmalig der Nachweis von Aneuploidie durch DNA-Bildzytometrie als markerunabhängiger Nachweis von Tumorzellen *in vitro*.

Hierzu wurden *spike in*-Modelle aus den Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 und isolierten PBMCs erstellt. Auf diese Weise wurde eine *Liquid Biopsy* aus Patientenblut imitiert. Durch die Entwicklung eines *Two Step Protocols* war ein Vergleich mit Immunfluoreszenz möglich. Als Referenz galt die theoretisch eingebrachte Anzahl von Tumorzellen und es zeigte sich, dass DNA-Bildzytometrie ähnlich exakt oder besser die eingebrachte Tumorzellzahl detektierte wie der aktuell etablierte Standard Immunfluoreszenz.

Die Ergebnisse der Arbeit legen nahe, dass Aneuploidie zumindest als ergänzende Methode zur Detektion von CTCs in der klinischen Routine bedacht werden sollte. Es wurde gezeigt, dass Aneuploidie besonders bei uneindeutiger Immunfluoreszenz und einer sehr geringen Anzahl von CTCs von Nutzen sein kann.

Um Aneuploidie besser oder sogar als alleiniges Charakteristikum zur Detektion von CTCs im klinischen Alltag nutzen zu können, sind jedoch weitere Versuche notwendig, welche die exakte Sensitivität und Spezifität der Methode mit derer der Immunfluoreszenz vergleichen. Durch diese Arbeit erfolgte der Nachweis, dass Aneuploidie als ergänzender Parameter in der Identifizierung von CTC-Subtypen sinnvoll in der klinischen Routine eingesetzt werden sollte und dadurch den hohen prognostischen Wert dieses Zelltyps besser nutzbar machen kann.

8 Zusammenfassung

Die genetische und phenotypische Heterogenität von zirkulierenden Tumorzellen (Circulating Tumour Cells, CTCs) ist von großer klinischer Relevanz, beeinträchtigt deren eindeutige Detektion in der klinischen Routine allerdings gleichzeitig stark. So wird die aktuell häufig verwendete Methode der Immunfluoreszenzfärbung über das Oberflächenantigen EpCAM oder den zytoskelettalen Marker Cytokeratin durch Prozesse wie der epithelialen-mesenchymalen Transition beeinflusst und kann Einfluss auf die CTC-Detektion haben. Chromosomale Aberrationen während der Zellteilung sind initiale Veränderungen bei der Karzinogenese, welche auch während der Tumorprogression erhalten bleiben. Die Detektion von Aneuploidie auf Einzelzellebene birgt somit das Potential, CTCs unabhängig von klassischen Proteinmarkern nachzuweisen. Aufgrund dessen untersuchten wir, ob die Kombination von Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie zur Detektion aneuploider CTCs führt.

Es wurden *spike in*-Modelle aus mononukleären Zellen und Zellen der aneuploiden Tumorzelllinien CaCo-2, HCC1954, HCC4006 und SK-CO-1 erstellt und anschließend eine sequentielle Methodenkombination aus Immunfluoreszenzfärbung und DNA-Bildzytometrie mit anschließender DNA-Bildzytometrie etabliert. Die Immunfluoreszenz wurde mittels Antikörperfärbung gegen pan-Cytokeratin durchgeführt und die DNA-Bildzytometrie erfolgte nach Feulgen-Färbung der Zellkerne.

Es wurde ein sequentielles Färbeprotokoll aus kombinierter Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie etabliert, mit welchem die Detektionsraten beider Methoden verglichen wurden. Hierzu erfolgte die Erstellung von *spike in*-Modellen aus mononukleären Zellen und jeweils ca. 30 Zellen der aneuploiden Tumorzelllinien CaCo-2, HCC1954, HCC4006 und SK-CO-1 in bereits bekannter Weise und im Anschluss wurde das Protokoll angewendet. Es zeigten sich reproduzierbar pCK⁺ und aneuploide Tumorzellen in den *spike in*-Modellen, teilweise schwankten die Detektionsraten zwischen den einzelnen Zelllinien. Allerdings wurde mittels Bild-Overlay-Technik gezeigt, dass beide Methoden exakt die selben Zellen detektieren. Es bestand eine gute Übereinstimmung zwischen den Detektionsraten beider Methoden ($\bar{X}_{\text{gesamt Immunfluoreszenz}} = 51,7$; $\bar{X}_{\text{gesamt DNA-Bildzytometrie}} = 43,6$; $\sigma_{\text{gesamt Immunfluoreszenz}} = 33,6$; $\sigma_{\text{gesamt DNA-Bildzytometrie}} = 21,8$), wobei auffällig ist, dass DNA-Bildzytometrie eine geringere Streuung der Werte aufweist als der bisher empfohlene Standard Immunfluoreszenz.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass DNA-Bildzytometrie als ein potentiell nützliches Zusatzdiagnostikum zur CTC-Detektion bei aneuploiden Tumoren dienen kann. Allerdings ist der Wert dieser Methode in weiteren Studien noch genauer zu untersuchen.

9 Literaturverzeichnis

- 1) Alimirzaie, Sahar, Maryam Bagherzadeh, and Mohammad R. Akbari. 2019. "Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Comprehensive Review." *Clinical Genetics* 95 (6): 643–60. <https://doi.org/10.1111/cge.13514>.
- 2) Alix-Panabières, Catherine. 2012. "EPISPOT Assay: Detection of Viable DTCs/CTCs in Solid Tumor Patients." In , 69–76. https://doi.org/10.1007/978-3-642-28160-0_6.
- 3) Alix-Panabières, Catherine, and Klaus Pantel. 2014. "Challenges in Circulating Tumour Cell Research." *Nature Reviews Cancer* 14 (9): 623–31. <https://doi.org/10.1038/nrc3820>.
- 4) Allard, W. Jeffrey, Jeri Matera, M. Craig Miller, Madeline Repollet, Mark C. Connelly, Chandra Rao, Arjan G. J. Tibbe, Jonathan W. Uhr, and Leon W. M. M. Terstappen. 2004. "Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but Not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases." *Clinical Cancer Research* 10 (20): 6897–6904. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0378>.
- 5) Arnedos, Monica, Cecile Vicier, Sherene Loi, Celine Lefebvre, Stefan Michiels, Herve Bonnefoi, and Fabrice Andre. 2015. "Precision Medicine for Metastatic Breast Cancer—Limitations and Solutions." *Nature Reviews Clinical Oncology* 12 (12): 693–704. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.123>.
- 6) Auffermann, W, and A Böcking. 1985. "Early Detection of Precancerous Lesions in Dysplasias of the Lung by Rapid DNA Image Cytometry." *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 7 (3): 218–26.
- 7) Bakhoun, Samuel F., and Lewis C. Cantley. 2018. "The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment." *Cell* 174 (6): 1347–60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.027>.
- 8) Bakir, Basil, Anna M. Chiarella, Jason R. Pitarresi, and Anil K. Rustgi. 2020. "EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis." *Trends in Cell Biology* 30 (10): 764–76. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.07.003>.
- 9) Baretton, G, T Vogt, C Valina, K Schneiderbanger, and U Löhrs. 1993. "[Prostate Cancers and Potential Precancerous Conditions: DNA Cytometric Investigations and Interphase Cytogenetics]." *Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Fur Pathologie* 77: 86–92.
- 10) Barriere, Guislaine, Pietro Fici, Giulia Gallerani, Francesco Fabbri, Wainer Zoli, and Michel Rigaud. 2014. "Circulating Tumor Cells and Epithelial, Mesenchymal and Stemness Markers: Characterization of Cell Subpopulations." *Annals of Translational Medicine*. AME Publishing Company. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.04>.

- 11) Barrière, Guislaine, Alain Riouallon, Joël Renaudie, Michel Tartary, and Michel Rigaud. 2012. "Mesenchymal and Stemness Circulating Tumor Cells in Early Breast Cancer Diagnosis." *BMC Cancer* 12 (1): 114. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-114>.
- 12) Ben-David, Uri, Gavin Ha, Yuen-Yi Tseng, Noah F Greenwald, Coyin Oh, Juliann Shih, James M McFarland, Bang Wong, Jesse S Boehm, Rameen Beroukhim and Todd R Golub. 2017. "Patient-Derived Xenografts Undergo Mouse-Specific Tumor Evolution." *Nature Genetics* 49 (11): 1567–75. <https://doi.org/10.1038/ng.3967>.
- 13) Bidard, François-Clément, Dieter J Peeters, Tanja Fehm, Franco Nolé, Rafael Gisbert-Criado, Dimitrios Mavroudis, Salvatore Grisanti, Daniele Generali, Jose A Garcia-Saenz, Justin Stebbing, Carlos Caldas, Paola Gazzaniga, Luis Manso, Rita Zamarchi, Angela Fernandez de Lascoiti, Letitia De Mattos-Arruda, Michail Ignatiadis, Ronald Lebofsky, Stefen J van Laere, Franziska Meier-Stiegen, Meria-Teresa Sandri, Jose Vidal-Martinez, Eleni Politaki, Francesca Consoli, Alberto Bottini, Eduardo Diaz-Rubio, Jonathan Krell, Sarah-Jane Dawson, Cristina Raimondi, Annemie Rutten, Wolfgang Janni, Elisabetta Munzone, Vicente Carañana, Sofia Agelaki, Camillo Almici, Luc Dirix, Erich-Franz Solomayer, Laura Zorzino, Helene Johannes, Jorge Reis-Filho, Klaus Pantel, Jean-Yves Pierga, Stefan Michiels. 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): 406–14. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70069-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70069-5).
- 14) Biesterfeld, S, M Leitloff, W Rath, and W Schröder. 2001a. "DNA Image Cytometry in the Differential Diagnosis of Endometrial Hyperplasia and Adenocarcinoma." *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 23 (2): 123–28.
- 15) Biesterfeld, Stefan, and Liviu Deacu. 2009. "DNA Image Cytometry in the Differential Diagnosis of Benign and Malignant Lesions of the Bile Duct, the Pancreatic Duct and the Papilla of Vater." *Anticancer Research* 29 (5): 1579–84.
- 16) Biesterfeld, Stefan, Kordula Reus, Ehrentraud Bayer-Pietsch, Ana Maria Mihalcea, and Alfred Böcking. 2001b. "DNA Image Cytometry in the Differential Diagnosis of Endocervical Adenocarcinoma." *Cancer* 93 (2): 160–64. <https://doi.org/10.1002/cncr.9023>.
- 17) Blick, Tony, Honor Hugo, Edwin Widodo, Mark Waltham, Cletus Pinto, Sendurai A. Mani, Robert A. Weinberg, Richard M. Neve, Marc E. Lenburg, and Erik W. Thompson. 2010. "Epithelial Mesenchymal Transition Traits in Human Breast Cancer Cell Lines Parallel the CD44^{hi}/CD24^{lo}-Stem Cell Phenotype in Human Breast Cancer." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15 (2): 235–52. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9175-z>.
- 18) Böcking, Alfred. 2005. "DNA-Bildzytometrie - Methode Zur Früherkennung Und Malignitäts-Gradierung Bösartiger Tumoren." *Prognostische Und Therapeutische Bedeutung Der DNA-*

Zytometrie Beim Prostatakarzinom Wissenschaftlicher Bericht Über Das Experten-Symposium an Der Universität Bremen Vom 12.5.05 1 (1): 46–97.

- 19) Boer, Carla J. de, Johan H. J. M. van Krieken, Connie M. Janssen-van Rhijn, and Sergey v. Litvinov. 1999. "Expression of Ep-CAM in Normal, Regenerating, Metaplastic, and Neoplastic Liver." *The Journal of Pathology* 188 (2): 201–6. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199906\)188:2<201::AID-PATH339>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199906)188:2<201::AID-PATH339>3.0.CO;2-8).
- 20) Bono, Johann S. de, Howard I. Scher, R. Bruce Montgomery, Christopher Parker, M. Craig Miller, Henk Tissing, Gerald v. Doyle, Leon W.W.M. Terstappen, Kenneth J. Pienta, and Derek Raghavan. 2008. "Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer." *Clinical Cancer Research* 14 (19): 6302–9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0872>.
- 21) Bos, Hilda van den, Diana C. J. Spierings, Aaron Taudt, Bjorn Bakker, David Porubský, Ester Falconer, Carolina Novoa, Nancy Halsema, Hinke G Kazemier, Karina Hoekstra-Wakker, Victor Guryev, Wilfried F A den Dunnen, Floris Fojier, Maria Colomé-Tatché, Hendrikus W G M Boddeke, Peter M Lansdorp. 2016. "Single-Cell Whole Genome Sequencing Reveals No Evidence for Common Aneuploidy in Normal and Alzheimer's Disease Neurons." *Genome Biology* 17 (1): 116. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0976-2>.
- 22) Brabletz, Simone, Harald Schuhwerk, Thomas Brabletz, and Marc P. Stemmler. 2021. "Dynamic EMT: A Multi-tool for Tumor Progression." *The EMBO Journal* 40 (18). <https://doi.org/10.15252/emj.2021108647>.
- 23) Brabletz, Thomas, Raghu Kalluri, M. Angela Nieto, and Robert A. Weinberg. 2018. "EMT in Cancer." *Nature Reviews Cancer* 18 (2): 128–34. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.118>.
- 24) Bronkhorst, Abel Jacobus, Vida Ungerer, and Stefan Holdenrieder. 2019. "The Emerging Role of Cell-Free DNA as a Molecular Marker for Cancer Management." *Biomolecular Detection and Quantification* 17 (March): 100087. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100087>.
- 25) Bulfoni, Michela, Matteo Turetta, Fabio Del Ben, Carla Di Loreto, Antonio Beltrami, and Daniela Cesselli. 2016. "Dissecting the Heterogeneity of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer: Going Far Beyond the Needle in the Haystack." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (10): 1775. <https://doi.org/10.3390/ijms17101775>.
- 26) Bundesministerium für Bildung und Forschung. 2022. "Personalisierte Medizin." 2022. <https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/personalisierte-medizin-9457.php>. Tag des Zugriffs: 21.06.2023
- 27) Burrell, Rebecca A., Nicholas McGranahan, Jiri Bartek, and Charles Swanton. 2013. "The Causes and Consequences of Genetic Heterogeneity in Cancer Evolution." *Nature* 501 (7467): 338–45. <https://doi.org/10.1038/nature12625>.

- 28) Cai, Xuyu, Gilad D. Evrony, Hillel S. Lehmann, Princess C. Elhosary, Bhaven K. Mehta, Annapurna Poduri, and Christopher A. Walsh. 2014. "Single-Cell, Genome-Wide Sequencing Identifies Clonal Somatic Copy-Number Variation in the Human Brain." *Cell Reports* 8 (5): 1280–89. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.043>.
- 29) Carter, Scott L, Kristian Cibulskis, Elena Helman, Aaron McKenna, Hui Shen, Travis Zack, Peter W Laird, Robert C Onofrio, Wends Winckler, Barbara A Weir, Rameen Beroukhi, David Pellman, Douglas A Levine, Eric S Lander, Matthew Meyerson and Gad Getz. 2012. "Absolute Quantification of Somatic DNA Alterations in Human Cancer." *Nature Biotechnology* 30 (5): 413–21. <https://doi.org/10.1038/nbt.2203>.
- 30) Carter, Scott L, Aron C Eklund, Isaac S Kohane, Lyndsay N Harris, and Zoltan Szallasi. 2006. "A Signature of Chromosomal Instability Inferred from Gene Expression Profiles Predicts Clinical Outcome in Multiple Human Cancers." *Nature Genetics* 38 (9): 1043–48. <https://doi.org/10.1038/ng1861>.
- 31) Castro-Giner, Francesc, and Nicola Aceto. 2020. "Tracking Cancer Progression: From Circulating Tumor Cells to Metastasis." *Genome Medicine*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00728-3>.
- 32) Chaffer, Christine L., and Robert A. Weinberg. 2011. "A Perspective on Cancer Cell Metastasis." *Science* 331 (6024): 1559–64. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>.
- 33) Chen, Qian, Zi Han Zhang, Shu Wang, and Jing He Lang. 2019. "Circulating Cell-Free DNA or Circulating Tumor Dna in the Management of Ovarian and Endometrial Cancer." *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/OTT.S227156>.
- 34) Cheng, Ying, Xiao-Qing Liu, Yun Fan, Yun-Peng Liu, Yi Liu, Ying Liu, Li-Xia Ma, Xian-Hong Liu, Hui Li, Hui-Zheng Bao, Jing-Jing Liu, Shuang Zhang and Chun-Jiao Wu. 2016. "Circulating Tumor Cell Counts/Change for Outcome Prediction in Patients with Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer." *Future Oncology* 12 (6): 789–99. <https://doi.org/10.2217/fon.15.346>.
- 35) Choi, Chang-Min, Kwang Won Seo, Se Jin Jang, Yeon-Mok Oh, Tae-Sun Shim, Woo Sung Kim, Dong-Soon Lee, and Sang-Do Lee. 2009. "Chromosomal Instability Is a Risk Factor for Poor Prognosis of Adenocarcinoma of the Lung: Fluorescence in Situ Hybridization Analysis of Paraffin-Embedded Tissue from Korean Patients." *Lung Cancer* 64 (1): 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.07.016>.
- 36) Cirulli, V., L. Crisa, G.M. Beattie, M.I. Mally, A.D. Lopez, A. Fannon, A. Ptasznik, L. Inverardi, C. Ricordi, T. Deerinck, M. Ellisman, R. A. Reisfeld, A. Hayek. 1998. "KSA Antigen Ep-CAM Mediates Cell–Cell Adhesion of Pancreatic Epithelial Cells: Morphoregulatory Roles in Pancreatic Islet Development." *Journal of Cell Biology* 140 (6): 1519–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.6.1519>.

- 37) Cristofanilli, Massimo, G. Thomas Budd, Matthew J. Ellis, Alison Stopeck, Jeri Matera, M. Craig Miller, James M. Reuben, Gerald V. Doyle, W. Jeffrey Allard, Leon W. M. M. Terstappen, Daniel F. Hayes. 2004. "Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer." *New England Journal of Medicine* 351 (8): 781–91.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa040766>.
- 38) Cristofanilli Massimo, Daniel F. Hayes, G. Thomas Budd, Mathew J. Ellis, Alison Stopeck, James M. Reuben, Gerald V. Doyle, Jeri Matera, W. Jeffrey Allard, M. Craig Miller, Herbert A. Fritsche, Gabriel N. Hortobagyi, Leon W. M. M. Terstappen. 2005. "Circulating Tumor Cells: A Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 23 (7): 1420–30. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.08.140>.
- 39) Crosbie, Phil A.J., Rajesh Shah, Piotr Krysiak, Cong Zhou, Karen Morris, Jonathan Tugwood, Richard Booton, Fiona Blackhall, and Caroline Dive. 2016. "Circulating Tumor Cells Detected in the Tumor-Draining Pulmonary Vein Are Associated with Disease Recurrence after Surgical Resection of NSCLC." *Journal of Thoracic Oncology* 11 (10): 1793–97.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.06.017>.
- 40) Dabighi, Ali, and Davood Toghraie. 2020. "A New Microfluidic Device for Separating Circulating Tumor Cells Based on Their Physical Properties by Using Electrophoresis and Dielectrophoresis Forces within an Electrical Field." *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 185 (March): 105147. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2019.105147>.
- 41) Danielsen, Håvard E., Manohar Pradhan, and Marco Novelli. 2016. "Revisiting Tumour Aneuploidy — the Place of Ploidy Assessment in the Molecular Era." *Nature Reviews Clinical Oncology* 13 (5): 291–304. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.208>.
- 42) Debnath, Pallabi, Rohit Singh Huirem, Paloma Dutta, and Santanu Palchaudhuri. 2022. "Epithelial–Mesenchymal Transition and Its Transcription Factors." *Bioscience Reports* 42 (1).
<https://doi.org/10.1042/BSR20211754>.
- 43) Deng, Zicheng, Shengming Wu, Yilong Wang, and Donglu Shi. 2022. "Circulating Tumor Cell Isolation for Cancer Diagnosis and Prognosis." *EBioMedicine* 83 (September): 104237.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104237>.
- 44) Desitter, Isabelle, Bella S Guerrouahen, Naoual Benali-Furet, Janine Wechsler, Pasi A Jänne, Yanan Kuang, Masahiko Yanagita, Lilin Wang, Jilian A Berkowitz, Robert J Distel, Yvon E Cayre. 2011. "A New Device for Rapid Isolation by Size and Characterization of Rare Circulating Tumor Cells." *Anticancer Research* 31 (2): 427–41. PMID: 21378321.
- 45) Diamantopoulou, Zoi, Francesc Castro-Giner, Fabienne Dominique Schwab, Christiane Foerster, Massimo Saini, Selina Budinjas, Karin Strittmatter, Ilona Krol, Bettina Seifert, Viola Heinzelmann-Schwarz, Christian Kurzeder, Christoph Rochlitz, Marcus Vetter, Walter Paul

- Weber and Nicola Aceto. 2022. "The Metastatic Spread of Breast Cancer Accelerates during Sleep." *Nature* 607 (7917): 156–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04875-y>.
- 46) Diaz, Luis A., and Alberto Bardelli. 2014. "Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA." *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011>.
- 47) Douillard, Jean-Yves, Kelly S. Oliner, Salvatore Siena, Josep Taberero, Ronald Burkes, Mario Barugel, Yves Humblet and Scott D. Patterson. 2013. "Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer." *New England Journal of Medicine* 369 (11): 1023–34. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1305275>.
- 48) Duncan, Andrew W., Amy E. Hanlon Newell, Leslie Smith, Elizabeth M. Wilson, Susan B. Olson, Matthew J. Thayer, Stephen C. Strom, and Markus Grompe. 2012. "Frequent Aneuploidy Among Normal Human Hepatocytes." *Gastroenterology* 142 (1): 25–28. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.029>.
- 49) Fagotto, François. 2020. "EpCAM as Modulator of Tissue Plasticity." *Cells*. NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9092128>.
- 50) Farace, F, C Massard, N Vimond, F Drusch, N Jacques, F Billiot, A Laplanche, A Chauchereau, L Lacroix, D Planchard, S Le Moulec, F André, K Fizazi, J C Soria and P Vielh. 2011. "A Direct Comparison of CellSearch and ISET for Circulating Tumour-Cell Detection in Patients with Metastatic Carcinomas." *British Journal of Cancer* 105 (6): 847–53. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.294>.
- 51) Feng, Zixin, Junyu Wu, Yuanjun Lu, Yau-Tuen Chan, Cheng Zhang, Di Wang, Dan Luo, Yuan Huang, Yibin Feng, and Ning Wang. 2022. "Circulating Tumor Cells in the Early Detection of Human Cancers." *International Journal of Biological Sciences* 18 (8): 3251–65. <https://doi.org/10.7150/ijbs.71768>.
- 52) Feulgen, Robert, and H Rossenbeck. 1924. "Mikroskopisch-Chemischer Nachweis Einer Nucleinsäure Vom Typus Der Thymonucleinsäure Und Die Darauf Beruhende Elektive Färbung von Zellkernen in Mikroskopischen Präparaten." *Physiol. Chem*, no. 135: 203–48.
- 53) Fidler, Isaiah J. 1973. "The Relationship of Embolic Homogeneity, Number, Size and Viability to the Incidence of Experimental Metastasis." *European Journal of Cancer (1965)* 9 (3): 223–27. [https://doi.org/10.1016/S0014-2964\(73\)80022-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2964(73)80022-2).
- 54) Foy, Victoria, Colin R. Lindsay, Alexandra Carmel, Fabiola Fernandez-Gutierrez, Matthew G. Krebs, Lynsey Priest, Mathew Carter. 2021. "EPAC-Lung: European Pooled Analysis of the Prognostic Value of Circulating Tumour Cells in Small Cell Lung Cancer." *Translational Lung Cancer Research* 10 (4): 1653–65. <https://doi.org/10.21037/tlcr-20-1061>.

- 55) Gao, Tong, Jia-zhi Li, Ying Lu, Chun-ying Zhang, Qing Li, Jun Mao, and Lian-hong Li. 2016. "The Mechanism between Epithelial Mesenchymal Transition in Breast Cancer and Hypoxia Microenvironment." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 80 (May): 393–405.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.044>.
- 56) Gasch, Christin, Thomas Bauernhofer, Martin Pichler, Sabine Langer-Freitag, Matthias Reeh, Adrian M Seifert, Oliver Mauermann, Jakob R Izbicki, Klaus Pantel, and Sabine Riethdorf. 2013. "Heterogeneity of Epidermal Growth Factor Receptor Status and Mutations of KRAS/PIK3CA in Circulating Tumor Cells of Patients with Colorectal Cancer." *Clinical Chemistry* 59 (1): 252–60.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.188557>.
- 57) Ge, Feng, Haishi Zhang, Daisy Dandan Wang, Linda Li, and Peter Ping Lin. 2015. "Enhanced Detection and Comprehensive *in Situ* Phenotypic Characterization of Circulating and Disseminated Heteroploid Epithelial and Glioma Tumor Cells." *Oncotarget* 6 (29): 27049–64.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.4819>.
- 58) Gebauer, Ines. 2017. "Zytologische Diagnostik Suspekter Pankreasläsionen: Eine Retrospektive Analyse Des Zeitraums 2005 - 2012 Mit Re-Evaluation Und DNA- Zytometrischer Zusatzuntersuchung." Rostock: Institut für Pathologie, Universität Rostock. Med. Dis. Rostock, 2017
- 59) Geng, Ningbo, Shan Chen, Jiameng Liu, Wei Cao, Dandan Zhang, and Chongjin Feng. 2022. "Circulating Tumor Cells in Blood as a Prognostic Biomarker in Tongue Squamous Cell Carcinoma." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 134 (2): 213–19.
<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2021.12.129>.
- 60) Gerling, Marco, Rainer Glaubien, Jens K. Habermann, Anja A. Köhl, Christoph Loddenkemper, Hans-Anton Lehr, Martin Zeitz, and Britta Siegmund. 2011. "Characterization of Chromosomal Instability in Murine Colitis-Associated Colorectal Cancer." *PLoS ONE* 6 (7): e22114.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022114>.
- 61) Goldkorn, Amir, Benjamin Ely, David I. Quinn, Catherine M. Tangen, Louis M. Fink, Tong Xu, Przemyslaw Twardowski, Peter J. Van Veldhuizen, Neeraj Agarwal, Michael A. Carducci, J. Paul Monk III, Ram H. Datar, Mark Garzotto, Philip C. Mack, Primo Lara Jr, Celestia S. Hignao, Maha Hussain, Ian Murchie Thompson Jr, Richard J. Cote and Nicholas J. Vogelzang. 2014. "Circulating Tumor Cell Counts Are Prognostic of Overall Survival in SWOG S0421: A Phase III Trial of Docetaxel With or Without Atrasentan for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 32 (11): 1136–42. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.51.7417>.
- 62) Gordon, David J., Benjamin Resio, and David Pellman. 2012. "Causes and Consequences of Aneuploidy in Cancer." *Nature Reviews Genetics* 13 (3): 189–203.
<https://doi.org/10.1038/nrg3123>.

- 63) Gradilone, Angela, Cristina Raimondi, Chiara Nicolazzo, Arianna Petracca, Orietta Gandini, Bruno Vincenzi, Giuseppe Naso, Anna Maria Aglianò, Enrico Cortesi, and Paola Gazzaniga. 2011. "Circulating Tumour Cells Lacking Cytokeratin in Breast Cancer: The Importance of Being Mesenchymal." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15 (5): 1066–70. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01285.x>.
- 64) Graham, Trevor A., and Darryl Shibata. 2020. "Navigating the Path to Distant Metastasis." *Nature Genetics* 52 (7): 642–43. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0660-z>.
- 65) Grimwade, Lizz F., Kathryn A. Fuller, and Wendy N. Erber. 2017. "Applications of Imaging Flow Cytometry in the Diagnostic Assessment of Acute Leukaemia." *Methods* 112 (January): 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.06.023>.
- 66) Habli, Zeina, Walid AlChamaa, Raya Saab, Humam Kadara, and Massoud L. Khraiche. 2020. "Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities." *Cancers* 12 (7): 1930. <https://doi.org/10.3390/cancers12071930>.
- 67) Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- 68) He, Wei, Sumith A. Kularatne, Kimberly R. Kalli, Franklyn G. Prendergast, Robert J. Amato, George G. Klee, Lynn C. Hartmann, and Philip S. Low. 2008. "Quantitation of Circulating Tumor Cells in Blood Samples from Ovarian and Prostate Cancer Patients Using Tumor-Specific Fluorescent Ligands." *International Journal of Cancer* 123 (8): 1968–73. <https://doi.org/10.1002/ijc.23717>.
- 69) Hedley, David W., T. Vincent Shankey, and Leon L. Wheeless. 1993. "DNA Cytometry Consensus Conference." *Cytometry* 14 (5). <https://doi.org/10.1002/cyto.990140502>.
- 70) Heitzer, Ellen, Martina Auer, Peter Ulz, Jochen B Geigl, and Michael R Speicher. 2013. "Circulating Tumor Cells and DNA as Liquid Biopsies." *Genome Medicine* 5 (8): 73. <https://doi.org/10.1186/gm477>.
- 71) Hofman, Véronique, Marius I. Ilie, Elodie Long, Eric Selva, Christelle Bonnetaud, Thierry Molina, Nicolas Vénissac, Jérôme Mouroux, Philippe Vielh, and Paul Hofman. 2011. "Detection of Circulating Tumor Cells as a Prognostic Factor in Patients Undergoing Radical Surgery for Non-Small-Cell Lung Carcinoma: Comparison of the Efficacy of the CellSearch Assay™ and the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cell Method." *International Journal of Cancer* 129 (7): 1651–60. <https://doi.org/10.1002/ijc.25819>.
- 72) Hou, Han Wei, Majid Ebrahimi Warkiani, Bee Luan Khoo, Zi Rui Li, Ross A. Soo, Daniel Shao-Weng Tan, Wan-Teck Lim, Jongyoon Han, Ali Asgar S. Bhagat, and Chwee Teck Lim. 2013. "Isolation and Retrieval of Circulating Tumor Cells Using Centrifugal Forces." *Scientific Reports* 3 (1): 1259. <https://doi.org/10.1038/srep01259>.

- 73) Hou, Jian-Mei, Matthew G. Krebs, Lee Lancashire, Robert Sloane, Alison Backen, Rajeeb K. Swain, Lynsey J.C. Priest, Alastair Greystoke, Cong Zhou, Karen Morris, Tim Ward, Fiona H. Blackhall and Carolin Dive. 2012. "Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 30 (5): 525–32. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.3716>.
- 74) Hou, Jian-Mei, Matthew Krebs, Tim Ward, Robert Sloane, Lynsey Priest, Andrew Hughes, Glen Clack, Malcolm Ranson, Fiona Blackhall, and Caroline Dive. 2011. "Circulating Tumor Cells as a Window on Metastasis Biology in Lung Cancer." *The American Journal of Pathology* 178 (3): 989–96. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.003>.
- 75) Hvichia, G.E., Z. Parveen, C. Wagner, M. Janning, J. Quidde, A. Stein, V. Müller, S. Loges, R. P. L. Neves, N. H. Stoecklein, H. Wikman, S. Riethdorf, K. Pantel, T. M. Gorges. 2016. "A Novel Microfluidic Platform for Size and Deformability Based Separation and the Subsequent Molecular Characterization of Viable Circulating Tumor Cells." *International Journal of Cancer* 138 (12): 2894–2904. <https://doi.org/10.1002/ijc.30007>.
- 76) Hyun, Kyung-A, Gi-Bang Koo, Hyunju Han, Joohyuk Sohn, Wonshik Choi, Seung-II Kim, Hyo-II Jung, and You-Sun Kim. 2016. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Leads to Loss of EpCAM and Different Physical Properties in Circulating Tumor Cells from Metastatic Breast Cancer." *Oncotarget*. Vol. 7. www.impactjournals.com/oncotarget/.
- 77) Igawa, Satoshi, Keigo Gohda, Tomoya Fukui, Shinichiro Ryuge, Sakiko Otani, Akinori Masago, Jun Sato, Katsuhiko Murakami, Sachiyo Maki, Ken Katono, Akira Takakura, Jiichiro Sasaki, Yukitshi Satoh, Noriyuki Masuda. 2014. "Circulating Tumor Cells as a Prognostic Factor in Patients with Small Cell Lung Cancer." *Oncology Letters* 7 (5): 1469–73. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.1940>.
- 78) Jacobs, Patricia A., Muriel Brunton, W. M. Court Brown, Richard Doll, and Harvey Goldstein. 1963. "Change of Human Chromosome Count Distributions with Age: Evidence for a Sex Difference." *Nature* 197 (4872): 1080–81. <https://doi.org/10.1038/1971080a0>.
- 79) Joosse, Simon A, Tobias M Gorges, and Klaus Pantel. 2015. "Biology, Detection, and Clinical Implications of Circulating Tumor Cells." *EMBO Molecular Medicine* 7 (1): 1–11. <https://doi.org/10.15252/emmm.201303698>.
- 80) Joosse, Simon A., Juliane Hannemann, Julia Spötter, Andreas Bauche, Antje Andreas, Volkmar Müller, and Klaus Pantel. 2012. "Changes in Keratin Expression during Metastatic Progression of Breast Cancer: Impact on the Detection of Circulating Tumor Cells." *Clinical Cancer Research* 18 (4): 993–1003. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2100>.

- 81) KamTek Incorporation. 2023. "Bio-Specimen Processing." 2023.
<https://www.kamtekinc.com/biotech-operations/biorepository/bio-specimen-processing/>. Tag
des Zugriffs: 01.12.2023
- 82) Klijn, Christiaan, Steffen Durinck, Eric W Stawiski, Peter M Haverty, Zhaoshi Jiang, Hanbin Liu, Jeremiah Degenhardt, Oleg Mayaba, Florian Gnad, Jinfeng Liu, Gregoire Pau, Jens Redder, Yi Cao, Kiran Mukhyala, Suresh K Selvaraj, Mamie Yu, Gregory J Zynda, Matthew J Brauer, Thomas D Wu, Robert C Gentleman, Gerard Manning, Robert L Yauch, Richard Bourgon, David Stokoe, Zora Modusan, Richard M Neve, Frederic J de Sauvage, Jeffrey Settleman, Somasekar Seshagiri, Zemin Zhang. 2015. "A Comprehensive Transcriptional Portrait of Human Cancer Cell Lines." *Nature Biotechnology* 33 (3): 306–12. <https://doi.org/10.1038/nbt.3080>.
- 83) Knouse, Kristin A., Jie Wu, Charles A. Whittaker, and Angelika Amon. 2014. "Single Cell Sequencing Reveals Low Levels of Aneuploidy across Mammalian Tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (37): 13409–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415287111>.
- 84) Kops, Geert J. P. L., Beth A. A. Weaver, and Don W. Cleveland. 2005. "On the Road to Cancer: Aneuploidy and the Mitotic Checkpoint." *Nature Reviews Cancer* 5 (10): 773–85.
<https://doi.org/10.1038/nrc1714>.
- 85) Krebs, Matthew G., Andrew G. Renehan, Alison Backen, Simon Gollins, Ian Chau, Jurjees Hasan, Juan W. Valle, Karen Morris, Janette Beech, Linda Ashcroft, Mark P. Saunders, Caroline Dive. 2015. "Circulating Tumor Cell Enumeration in a Phase II Trial of a Four-Drug Regimen in Advanced Colorectal Cancer." *Clinical Colorectal Cancer* 14 (2): 115-122.e2.
<https://doi.org/10.1016/j.clcc.2014.12.006>.
- 86) Krishnamurthy, Savitri, Ruth L. Katz, Anne Shumate, K. Strohlein, Abha Khanna, Susan L. Tucker, Isaac Raijman, and Sandeep Lahoti. 2001. "DNA Image Analysis Combined with Routine Cytology Improves Diagnostic Sensitivity of Common Bile Duct Brushing." *Cancer* 93 (3): 229–35. <https://doi.org/10.1002/cncr.9034>.
- 87) Lee, Jeong Ho, My Huynh, Jennifer L Silhavy, Sangwoo Kim, Tracy Dixon-Salazar, Andrew Heiberg, Eric Scott, Vineet Bafna, Kiley J Hill, Adrienne Collazo, Vincent Funari, Carsten Russ, Stacey B Gabriel, Gary W Mathern and Joseph G Gleeson. 2012. "De Novo Somatic Mutations in Components of the PI3K-AKT3-MTOR Pathway Cause Hemimegalencephaly." *Nature Genetics* 44 (8): 941–45. <https://doi.org/10.1038/ng.2329>.
- 88) Lemma, Silvia, Anna M Perrone, Pierandrea De Iaco, Giuseppe Gasparre, and Ivana Kurelac. 2021. "Current Methodologies to Detect Circulating Tumor Cells: A Focus on Ovarian Cancer." *Am J Cancer Res*. Vol. 11. www.ajcr.us/.

- 89) Li, Mingzhe, Xin Bu, Bolei Cai, Ping Liang, Kai Li, Xuan Qu, and Liangliang Shen. 2018. "Biological Role of Metabolic Reprogramming of Cancer Cells during Epithelial-mesenchymal Transition (Review)." *Oncology Reports*, November. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6882>.
- 90) Lianidou, Evi S. 2014. "Circulating Tumor Cell Isolation: A Marathon Race Worth Running." *Clinical Chemistry* 60 (2): 287–89. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.216010>.
- 91) Limbach Gruppe. 2017. "Tumormarker- Eine Übersicht." March 2017. https://www.limbachgruppe.com/fileadmin/downloads/Arztinformationen/LaborAktuell/LaborAktuell_Tumormarker.pdf. Tag des Zugriffs: 03.03.2023
- 92) Lin, Danfeng, Lesang Shen, Meng Luo, Kun Zhang, Jinfan Li, Qi Yang, Fangfang Zhu, Dan Zhou, Shu Zheng, Yiding Chen and Jiaojiao Zhou. 2021. "Circulating Tumor Cells: Biology and Clinical Significance." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (1): 404. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00817-8>.
- 93) Lin, Peter. 2018. "Aneuploid CTC and CEC." *Diagnostics* 8 (2): 26. <https://doi.org/10.3390/diagnostics8020026>.
- 94) Lin, Peter Ping. 2015. "Integrated EpCAM-independent Subtraction Enrichment and IFISH Strategies to Detect and Classify Disseminated and Circulating Tumors Cells." *Clinical and Translational Medicine* 4 (1). <https://doi.org/10.1186/s40169-015-0081-2>.
- 95) Lin, Peter Ping, Olivier Gires, Daisy Dandan Wang, Linda Li, and Hongxia Wang. 2017. "Comprehensive in Situ Co-Detection of Aneuploid Circulating Endothelial and Tumor Cells." *Scientific Reports* 7 (1): 9789. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10763-7>.
- 96) Lin, Ping, Thierry Fischer, Christine Lavoie, Haining Huang, and Marilyn Farquhar. 2009. "Calnuc Plays a Role in Dynamic Distribution of Gai but Not Gβ Subunits and Modulates ACTH Secretion in AtT-20 Neuroendocrine Secretory Cells." *Molecular Neurodegeneration* 4 (1): 15. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-15>.
- 97) Lin, Ping, Yong Yao, Robert Hofmeister, Roger Y. Tsien, and Marilyn Gist Farquhar. 1999. "Overexpression of CALNUC (Nucleobindin) Increases Agonist and Thapsigargin Releasable Ca²⁺ Storage in the Golgi." *Journal of Cell Biology* 145 (2): 279–89. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.2.279>.
- 98) Lione, A, and H B Bosmann. 1978. "Quantitative Relationship between Volume of Tumour Cell Units and Their Intravascular Survival." *British Journal of Cancer* 37 (2): 248–53. <https://doi.org/10.1038/bjc.1978.33>.
- 99) Loken, Michael R., Jeanne M. Brosnan, Bruce A. Bach, and Kenneth A. Ault. 1990. "Establishing Optimal Lymphocyte Gates for Immunophenotyping by Flow Cytometry." *Cytometry* 11 (4): 453–59. <https://doi.org/10.1002/cyto.990110402>.

- 100) Lu, Chunyang, Jintao Han, Xiaoyi Sun, and Gen Yang. 2020. "Electrochemical Detection and Point-of-Care Testing for Circulating Tumor Cells: Current Techniques and Future Potentials." *Sensors (Switzerland)*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s20216073>.
- 101) Lu, C-Y, H-L Tsai, Y-H Uen, H-M Hu, C-W Chen, T-L Cheng, S-R Lin, and J-Y Wang. 2013. "Circulating Tumor Cells as a Surrogate Marker for Determining Clinical Outcome to MFOLFOX Chemotherapy in Patients with Stage III Colon Cancer." *British Journal of Cancer* 108 (4): 791–97. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.595>.
- 102) Lu, Si-Hong, Wen-Sy Tsai, Ying-Hsu Chang, Teh-Ying Chou, See-Tong Pang, Po-Hung Lin, Chun-Ming Tsai, and Ying-Chih Chang. 2016. "Identifying Cancer Origin Using Circulating Tumor Cells." *Cancer Biology & Therapy* 17 (4): 430–38. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1141839>.
- 103) Lu, Yan-jun, Peng Wang, Jing Peng, Xiong Wang, Yao-wu Zhu, and Na Shen. 2017. "Meta-Analysis Reveals the Prognostic Value of Circulating Tumour Cells Detected in the Peripheral Blood in Patients with Non-Metastatic Colorectal Cancer." *Scientific Reports* 7 (1): 905. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01066-y>.
- 104) Maheswaran, Shyamala, and Daniel A. Haber. 2015. "Ex Vivo Culture of CTCs: An Emerging Resource to Guide Cancer Therapy." *Cancer Research* 75 (12): 2411–15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0145>.
- 105) Majidpoor, Jamal, and Keywan Mortezaee. 2021. "Steps in Metastasis: An Updated Review." *Medical Oncology* 38 (1): 3. <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01447-w>.
- 106) Maraki, D., J. Becker, and A. Boecking. 2004. "Cytologic and DNA-Cytometric Very Early Diagnosis of Oral Cancer." *Journal of Oral Pathology and Medicine* 33 (7): 398–404. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2004.0235.x>.
- 107) Maraki, D., U. R. Hengge, J. Becker, and A. Boecking. 2006. "Very Early Cytological and DNA-Cytometric Diagnosis of in Situ Carcinoma in an Immunosuppressed Liver Transplant Recipient." *Journal of Oral Pathology and Medicine* 35 (1): 58–60. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2005.00333.x>.
- 108) McDougall, Annie R.A., Mary Tolcos, Stuart B. Hooper, Timothy J. Cole, and Megan J. Wallace. 2015. "Trop2 : From Development to Disease." *Developmental Dynamics* 244 (2): 99–109. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24242>.
- 109) McGranahan, Nicholas, Rebecca A Burrell, David Endesfelder, Marco R Novelli, and Charles Swanton. 2012. "Cancer Chromosomal Instability: Therapeutic and Diagnostic Challenges." *EMBO Reports* 13 (6): 528–38. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.61>.
- 110) Menarini Silicon Biosystems Inc. 2022. "Significance of CTCs.", <https://www.menarini.com/en-us/diagnostics/advanced-diagnostics> Tag des Zugriffs: 21.06.2023

- 111) Miscoci, Alina, Cristian Pirvu, Veronica Calborean, Costin Streba, Otilia Rogoveanu, Vlad Pădureanu, and Cristin Vere. 2018. "The Importance of Circulating Tumor Products as „liquid Biopsies” in Colorectal Cancer." *Journal of Mind and Medical Sciences* 5 (1): 39–45. <https://doi.org/10.22543/7674.51.P3945>.
- 112) Moch, Holger; Höfler, Gerald; Lax, Sigurd; Moll, Roland; Tannapfel, Andrea. 2019. *Lehrbuch Pathologie*. Edited by Gerald Höfler, Holger Moch, and Hans H. Kreipe. 6th ed. München: Urban & Fischer.
- 113) Moll, Roland, Markus Divo, and Lutz Langbein. 2008. "The Human Keratins: Biology and Pathology." *Histochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>.
- 114) Moreno-Bueno, G, F Portillo, and A Cano. 2008. "Transcriptional Regulation of Cell Polarity in EMT and Cancer." *Oncogene* 27 (55): 6958–69. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.346>.
- 115) Morrison, Alan. 1993. "Screening in Chronic Disease." *Cancer Causes and Control* 4 (6): 565–66. <https://doi.org/10.1007/BF00052433>.
- 116) Mu, Zhaomei, Naoual Benali-Furet, Georges Uzan, Anaëlle Znaty, Zhong Ye, Carmela Paolillo, Chun Wang, Laura Austin, Giovanna Rossi, Paolo Fortina, Hushan Yang and Massima Cristofanilli. 2016. "Detection and Characterization of Circulating Tumor Associated Cells in Metastatic Breast Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (10): 1665. <https://doi.org/10.3390/ijms17101665>.
- 117) National Cancer Institute. 2021. "What Is Cancer? Was Originally Published by the National Cancer Institute." October 11, 2021. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Tag des Zugriffs: 21.06.2023
- 118) Nieto, M. Angela, Ruby Yun-Ju Huang, Rebecca A. Jackson, and Jean Paul Thiery. 2016. "EMT: 2016." *Cell* 166 (1): 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>.
- 119) Nowak, Ewa, and Ilona Bednarek. 2021. "Aspects of the Epigenetic Regulation of EMT Related to Cancer Metastasis." *Cells* 10 (12): 3435. <https://doi.org/10.3390/cells10123435>.
- 120) Nowinski, G P, D L Van Dyke, B C Tilley, G Jacobsen, V R Babu, M J Worsham, G N Wilson, and L Weiss. 1990. "The Frequency of Aneuploidy in Cultured Lymphocytes Is Correlated with Age and Gender but Not with Reproductive History." *American Journal of Human Genetics* 46 (6): 1101–11.
- 121) Numata, Takeshi, Takeo Endo, Hidetoshi Yanai, Kyoko Ota, Yusuke Yamamoto, Kei Shimizu, Hideyasu Yamada, Kenji Hayashihara, Shinichiro Okauchi, Hiroaki Satoh, Yutaka Yamada, Tomohiro Tamura, Kazuto Saito, Norihiro Kikuchi, Koichi Kurishima, Hiroichi Ishikawa, Hiroko Watanabe, Toshihiro Shiozawa, Nobuyuki Hizawa Yasunori Funayama Shigen Hayashi, Hiroyuki Nakamura and Takaaki Yamashita. 2020. "Serum CEA and CYFRA Levels in ALK-Rearranged

- NSCLC Patients: Correlation With Distant Metastasis." *In Vivo* 34 (4): 2095–2100.
<https://doi.org/10.21873/invivo.12013>.
- 122) Okasha, Hussein Hassan, Mohamed Naguib Wifi, Abeer Awad, Yasmine Abdelfatah, Dalia Abdelfatah, Shereen Sadik El-Sawy, Ahmed Alzamzamy, Sameh Abou-Elenin, Amr Abou-Elmagd, Ramy ElHusseiny, Mahmoud Wahba, Mohamed A. El-Feki, Katarzyna M. Pawlak. 2021. "Role of EUS in Detection of Liver Metastasis Not Seen by Computed Tomography or Magnetic Resonance Imaging during Staging of Pancreatic, Gastrointestinal, and Thoracic Malignancies." *Endoscopic Ultrasound* 10 (5): 344–54. <https://doi.org/10.4103/EUS-D-20-00178>.
- 123) Okegawa, Takatsugu, Naoshi Itaya, Hidehiko Hara, Mitsuhiro Tambo, and Kikuo Nutahara. 2014. "Circulating Tumor Cells as a Biomarker Predictive of Sensitivity to Docetaxel Chemotherapy in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer." *Anticancer Research* 34 (11): 6705–10.
- 124) Osterheld, M. C., S. Andrejevic Blant, L. Caron, R. Braunschweig, G. Dorta, H. Bouzourene, and A. Mihaescu. 2005. "Digital Image DNA Cytometry: A Useful Tool for the Evaluation of Malignancy in Biliary Strictures." *Analytical Cellular Pathology* 27 (4): 255–60.
<https://doi.org/10.1155/2005/418029>.
- 125) Oulhen, Marianne, Patrycja Pawlikowska, Tala Tayoun, Marianna Garonzi, Genny Buson, Claudio Forcato, Nicolò Manaresi, Agathe Aberlenc, Laura Mezquita, Yann Lecluse Pernelle Lavaud, Charles Naltet, David Planchard, Benjamin Besse and Françoise Farace. 2021. "Circulating Tumor Cell Copy-Number Heterogeneity in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Resistant to ALK Inhibitors." *Npj Precision Oncology* 5 (1): 67.
<https://doi.org/10.1038/s41698-021-00203-1>.
- 126) Pantel, K, B Passlick, J Vogt, P Stosiek, M Angstwurm, R Seen-Hibler, K Häussinger, O Thetter, J R Izbicki, and G Riethmüller. 1998. "Reduced Expression of Plakoglobin Indicates an Unfavorable Prognosis in Subsets of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 16 (4): 1407–13. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.4.1407>.
- 127) Pantel, Klaus, Catherine Alix-Panabières, and Sabine Riethdorf. 2009. "Cancer Micrometastases." *Nature Reviews Clinical Oncology* 6 (6): 339–51.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.44>.
- 128) Peeters, Marc, Jean Yves Douillard, Eric van Cutsem, Salvatore Siena, Kathy Zhang, Richard Williams, and Jeffrey Wiezorek. 2013. "Mutant KRAS Codon 12 and 13 Alleles in Patients with Metastatic Colorectal Cancer: Assessment as Prognostic and Predictive Biomarkers of Response to Panitumumab." *Journal of Clinical Oncology* 31 (6): 759–65.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.1492>.

- 129) Pernot, Simon, Cecile Badoual, Magali Terme, Florence Castan, Aurelie Cazes, Olivier Bouche, Jaafar Bennouna, Eric Francois, Francois Ghiringhelli, Christelle De La Fouchardiere, Emmanuelle Samalin, Jean Baptiste Bachet, Christoph Borg, Michel Ducreux, Elie Marcheteau, Trevor Stanbury, Sophie Gourgou, David Malka, Julien Taieb. 2017. "Dynamic Evaluation of Circulating Tumour Cells in Patients with Advanced Gastric and Oesogastric Junction Adenocarcinoma: Prognostic Value and Early Assessment of Therapeutic Effects." *European Journal of Cancer* 79 (July): 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.03.036>.
- 130) Plaks, Vicki, Charlotte D. Koopman, and Zena Werb. 2013. "Circulating Tumor Cells." *Science* 341 (6151): 1186–88. <https://doi.org/10.1126/science.1235226>.
- 131) Poduri, Annapurna, Gilad D. Evrony, Xuyu Cai, Princess Christina Elhosary, Rameen Beroukhim, Maria K. Lehtinen, L. Benjamin Hills, Erin L. Heinzen, Anthony Hill, R. Sean Hill, Brenda J. Barry, Blaise F. D. Bourgeois, James J. Riviello, A. James Barkovich, Peter M. Black, Keith L. Ligon, Christopher A. Walsh. 2012. "Somatic Activation of AKT3 Causes Hemispheric Developmental Brain Malformations." *Neuron* 74 (1): 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.010>.
- 132) Poulet, Geoffroy, Joséphine Massias, and Valerie Taly. 2019. "Liquid Biopsy: General Concepts." *Acta Cytologica* 63 (6): 449–55. <https://doi.org/10.1159/000499337>.
- 133) Puisieux, Alain, Thomas Brabletz, and Julie Caramel. 2014. "Oncogenic Roles of EMT-Inducing Transcription Factors." *Nature Cell Biology* 16 (6): 488–94. <https://doi.org/10.1038/ncb2976>.
- 134) Qian, Chao Nan, Yan Mei, and Jian Zhang. 2017. "Cancer Metastasis: Issues and Challenges." *Chinese Journal of Cancer*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0206-7>.
- 135) Qiu, Wen Ze, Pei Yu Huang, Jun Li Shi, Hai Qun Xia, Chong Zhao, and Ka Jia Cao. 2016. "Neoadjuvant Chemotherapy plus Intensity-Modulated Radiotherapy versus Concurrent Chemoradiotherapy plus Adjuvant Chemotherapy for the Treatment of Locoregionally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma: A Retrospective Controlled Study." *Chinese Journal of Cancer* 35 (1). <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0076-9>.
- 136) Rack, Brigitte, Christian Schindlbeck, Julia Jückstock, Ulrich Andergassen, Philip Hepp, Thomas Zwingers, Thomas W.P. Friedl, Ralf Lorenz, Hans Tesch, Peter A Fasching, Tanja Fehm, Andreas Schneeweiss, Werner Lichtenegger, Matthias W Beckmann, Klaus Friese, Klaus Pantel, Wolfgang Janni, SUCCESS Study Group. 2014. "Circulating Tumor Cells Predict Survival in Early Average-to-High Risk Breast Cancer Patients." *Journal of the National Cancer Institute* 106 (5). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju066>.
- 137) Rajagopalan, Harith, and Christoph Lengauer. 2004. "CIN-Ful Cancers." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, August. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0889-8>.
- 138) Rehen, Stevens Kastrup, Michael J. McConnell, Dhruv Kaushal, Marcy A. Kingsbury, Amy H. Yang, and Jerold Chun. 2001. "Chromosomal Variation in Neurons of the Developing and Adult

- Mammalian Nervous System." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (23): 13361–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.231487398>.
- 139) Remmerbach, Torsten W., Horst Weidenbach, Alexander Hemprich, and Alfred Böcking. 2003. "Earliest Detection of Oral Cancer Using Non-Invasive Brush Biopsy Including DNA-Image-Cytometry: Report on Four Cases." *Analytical Cellular Pathology* 25 (4): 159–66. <https://doi.org/10.1155/2003/305151>.
- 140) Remmerbach, Torsten W., Horst Weidenbach, Natalja Pomjanski, Kristiane Knops, Stefanie Mathes, Alexander Hemprich, and Alfred Böcking. 2001. "Cytologic and DNA-Cytometric Early Diagnosis of Oral Cancer." *Analytical Cellular Pathology* 22 (4): 211–21. <https://doi.org/10.1155/2001/807358>.
- 141) Resel Folkersma, Luis, Luis San José Manso, Isabel Galante Romo, Jesús Moreno Sierra, and Carlos Olivier Gómez. 2012. "Prognostic Significance of Circulating Tumor Cell Count in Patients With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer." *Urology* 80 (6): 1328–32. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2012.09.001>.
- 142) Reynés, Bàrbara, Teresa Priego, Margalida Cifre, Paula Oliver, and Andreu Palou. 2018. "Peripheral Blood Cells, a Transcriptomic Tool in Nutrigenomic and Obesity Studies: Current State of the Art." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12363>.
- 143) Rheinländer, Andreas, Burkhard Schraven, and Ursula Bommhardt. 2018. "CD45 in Human Physiology and Clinical Medicine." *Immunology Letters* 196 (April): 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>.
- 144) Rink, Michael, Felix K. Chun, Roland Dahlem, Armin Soave, Sarah Minner, Jens Hansen, Malgorzata Stoupiec, Cornelia Coith, Luis A. Kluth, Sascha A Ahyai, Martin G. Friedrich, Shahrokh F. Shariat, Margit Fisch, Klaus Pantel, Sabine Riethdorf. 2012. "Prognostic Role and HER2 Expression of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients Prior to Radical Cystectomy: A Prospective Study." *European Urology* 61 (4): 810–17. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.01.017>.
- 145) Roche, Joëlle. 2018. "The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer." *Cancers* 10 (2): 52. <https://doi.org/10.3390/cancers10020052>.
- 146) Rodríguez, July, Jenny Avila, Christian Rolfo, Alejandro Ruíz-Patiño, Alessandro Russo, Luisa Ricaurte, Camila Ordóñez-Reyes, Oscar Arrieta, Zyanya Lucia Zatarain-Barrón, Gonzalo Recondo and Andrés F. Cardona. 2021. "When Tissue Is an Issue the Liquid Biopsy Is Nonissue: A Review." *Oncology and Therapy* 9 (1): 89–110. <https://doi.org/10.1007/s40487-021-00144-6>.

- 147) Rolfo, Christian, and Alessandro Russo. 2020. "Liquid Biopsy for Early Stage Lung Cancer Moves Ever Closer." *Nature Reviews Clinical Oncology* 17 (9): 523–24.
<https://doi.org/10.1038/s41571-020-0393-z>.
- 148) Rouillard, Andrew D., Gregory W. Gundersen, Nicolas F. Fernandez, Zichen Wang, Caroline D. Monteiro, Michael G. McDermott, and Avi Ma'ayan. 2016. "The Harmonizome: A Collection of Processed Datasets Gathered to Serve and Mine Knowledge about Genes and Proteins." *Database* 2016 (July): baw100. <https://doi.org/10.1093/database/baw100>.
- 149) Saad, Fred, and Klaus Pantel. 2012. "The Current Role of Circulating Tumor Cells in the Diagnosis and Management of Bone Metastases in Advanced Prostate Cancer." *Future Oncology* 8 (3): 321–31. <https://doi.org/10.2217/fon.12.3>.
- 150) Samatov, Timur R, Alexander G Tonevitsky, and Udo Schumacher. 2013. "Epithelial-Mesenchymal Transition: Focus on Metastatic Cascade, Alternative Splicing, Non-Coding RNAs and Modulating Compounds." *Molecular Cancer* 12 (1): 107. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-107>.
- 151) Santin, Alessandro D., Fenghuang Zhan, Stefania Bellone, Michela Palmieri, Stefania Cane, Eliana Bignotti, Simone Anfossi, Murat Gokden, Donna Dunn, Juan J. Ramon, Timothy J. O'Brien, Erming Tian, Martin J. Cannon, John Shaughnessy Jr. Sergio Pecorelli. 2004. "Gene Expression Profiles in Primary Ovarian Serous Papillary Tumors and Normal Ovarian Epithelium: Identification of Candidate Molecular Markers for Ovarian Cancer Diagnosis and Therapy." *International Journal of Cancer* 112 (1): 14–25. <https://doi.org/10.1002/ijc.20408>.
- 152) Saxena, Meera, and Gerhard Christofori. 2013. "Rebuilding Cancer Metastasis in the Mouse." *Molecular Oncology* 7 (2): 283–96. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.009>.
- 153) Sebo, Thomas J. 1995. "Digital Image Analysis." *Mayo Clinic Proceedings* 70 (1): 81–82.
<https://doi.org/10.4065/70.1.81>.
- 154) Shi, Wei-Lin, Jian Li, Yong-Jie Du, Wen-Fang Zhu, Yan Wu, Yi-Ming Hu, and Yong-Chang Chen. 2013. "CK-19 mRNA-Positive Cells in Peripheral Blood Predict Treatment Efficacy and Survival in Small-Cell Lung Cancer Patients." *Medical Oncology* 30 (4): 755.
<https://doi.org/10.1007/s12032-013-0755-9>.
- 155) Silvestris, Nicola, Gennaro Ciliberto, Paolo de Paoli, Giovanni Apolone, Maria Luisa Lavitrano, Marco A. Pierotti, and Giorgio Stanta. 2017. "Liquid Dynamic Medicine and N-of-1 Clinical Trials: A Change of Perspective in Oncology Research." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0598-x>.
- 156) Siu, Lillian L. 2013. "Accounting for Tumor Heterogeneity in the Development of Predictive Biomarkers." *Clinical Advances in Hematology & Oncology : H&O* 11 (5): 312–13.

- 157) Sotelo, M.J., J. Sastre, M.L. Maestro, S. Veganzones, J.M. Viéitez, V. Alonso, C. Grávalos, P. Escudero, R. Vera, E. Aranda, P. García-Alfonso, J. Gallego-Plazas, C. Lopez, C. Pericay, A. Arrivi, P. Vicente, P. Ballesteros, E. Elez, A. López-Ladrón, E. Díaz-Rubio. 2015. "Role of Circulating Tumor Cells as Prognostic Marker in Resected Stage III Colorectal Cancer." *Annals of Oncology* 26 (3): 535–41. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu568>.
- 158) Statistisches Bundesamt. 2022. Pressemitteilung N 005, issued 2022. https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2022/02/PD22_N005_231.html. Tag des Zugriffs: 29.11.2022
- 159) Strate, Lisa L., and Sapna Syngal. 2005. "Hereditary Colorectal Cancer Syndromes." *Cancer Causes & Control* 16 (3): 201–13. <https://doi.org/10.1007/s10552-004-3488-4>.
- 160) Takahashi, Yoshihisa, Erdenetsogt Dungubat, Hiroyuki Kusano, Dariimaa Ganbat, Yasuhiko Tomita, Sarandelger Odgerel, and Toshio Fukusato. 2021. "Application of Immunohistochemistry in the Pathological Diagnosis of Liver Tumors." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 5780. <https://doi.org/10.3390/ijms22115780>.
- 161) Taylor, Alison M., Juliann Shih, Gavin Ha, Galen F. Gao, Xiaoyang Zhang, Ashton C. Berger, Steven E. Schumacher, Chen Wang, Hai Hu, Jianfang Liu, Alexander J. Lazar, The Cancer Genome Atlas Research Network, Andrew D. Cherniack, Rameen Beroukhim, Matthew Meyerson. 2018. "Genomic and Functional Approaches to Understanding Cancer Aneuploidy." *Cancer Cell* 33 (4): 676-689.e3. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.007>.
- 162) Thery, Laura, Alessandra Meddis, Luc Cabel, Charlotte Proudhon, Aurelien Latouche, Jean-Yves Pierga, and Francois-Clement Bidard. 2019. "Circulating Tumor Cells in Early Breast Cancer." *JNCI Cancer Spectrum* 3 (2). <https://doi.org/10.1093/jncics/pkz026>.
- 163) Thiery, Jean Paul. 2002. "Epithelial–Mesenchymal Transitions in Tumour Progression." *Nature Reviews Cancer* 2 (6): 442–54. <https://doi.org/10.1038/nrc822>.
- 164) Thiery, Jean Paul, Hervé Acloque, Ruby Y.J. Huang, and M. Angela Nieto. 2009. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>.
- 165) Trzpis, Monika, Pamela M.J. McLaughlin, Lou M.F.H. de Leij, and Martin C. Harmsen. 2007. "Epithelial Cell Adhesion Molecule." *The American Journal of Pathology* 171 (2): 386–95. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070152>.
- 166) Vaidyanathan, Ramanathan, Ren Hao Soon, Pan Zhang, Kuan Jiang, and Chwee Teck Lim. 2018. "Cancer Diagnosis: From Tumor to Liquid Biopsy and Beyond." *Lab on a Chip*. <https://doi.org/10.1039/C8LC00684A>.
- 167) Valdés, Francisco, Alberto M Alvarez, Annamaria Locascio, Sonia Vega, Blanca Herrera, Margarita Fernández, Manuel Benito, M Angela Nieto, and Isabel Fabregat. 2002. "The

- Epithelial Mesenchymal Transition Confers Resistance to the Apoptotic Effects of Transforming Growth Factor Beta in Fetal Rat Hepatocytes." *Molecular Cancer Research : MCR* 1 (1): 68–78.
- 168) Vasseur, Antoine, Nicolas Kiavue, François-Clément Bidard, Jean-Yves Pierga, and Luc Cabel. 2021. "Clinical Utility of Circulating Tumor Cells: An Update." *Molecular Oncology* 15 (6): 1647–66. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12869>.
- 169) Vasudevan, Anand, Klaske M. Schukken, Erin L. Sausville, Vishruth Girish, Oluwadamilare A. Adebambo, and Jason M. Sheltzer. 2021. "Aneuploidy as a Promoter and Suppressor of Malignant Growth." *Nature Reviews Cancer* 21 (2): 89–103. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00321-1>.
- 170) Vitak, Sarah A, Kristof A Torkenczy, Jimi L Rosenkrantz, Andrew J Fields, Lena Christiansen, Melissa H Wong, Lucia Carbone, Frank J Steemers, and Andrew Adey. 2017. "Sequencing Thousands of Single-Cell Genomes with Combinatorial Indexing." *Nature Methods* 14 (3): 302–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4154>.
- 171) Vogelzang, Nicholas J., Karim Fizazi, John M. Burke, Ronald de Wit, Joaquim Bellmunt, Thomas E. Hutson, Edward Crane, William R. Berry, Kevin Doner, John D. Hainsworth, Pawel J. Wiechno, Kejian Liu, Michelle F. Waldman, Anita Gandhi, Deborah Barton, Ulf Jungnelius, Abderrahim Fandi, Cora N. Sternberg, Daniel P. Petrylak. 2017. "Circulating Tumor Cells in a Phase 3 Study of Docetaxel and Prednisone with or without Lenalidomide in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer." *European Urology* 71 (2): 168–71. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.07.051>.
- 172) Walther, A, R Houlston, and I Tomlinson. 2008. "Association between Chromosomal Instability and Prognosis in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis." *Gut* 57 (7): 941–50. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.135004>.
- 173) Wan, Liling, Klaus Pantel, and Yibin Kang. 2013. "Tumor Metastasis: Moving New Biological Insights into the Clinic." *Nature Medicine* 19 (11): 1450–64. <https://doi.org/10.1038/nm.3391>.
- 174) Weaver, Beth AA, and Don W Cleveland. 2006. "Does Aneuploidy Cause Cancer?" *Current Opinion in Cell Biology* 18 (6): 658–67. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.10.002>.
- 175) Weissenstein, Ulrike, Agnes Schumann, Marcus Reif, Susanne Link, Ulrike D Toffol-Schmidt, and Peter Heusser. 2012. "Detection of Circulating Tumor Cells in Blood of Metastatic Breast Cancer Patients Using a Combination of Cytokeratin and EpCAM Antibodies." *BMC Cancer* 12 (1): 206. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-206>.
- 176) Weitz, J, P Kienle, J Lacroix, F Willeke, A Benner, T Lehnert, C Herfarth, and M von Knebel Doeberitz. 1998. "Dissemination of Tumor Cells in Patients Undergoing Surgery for Colorectal Cancer." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 4 (2): 343–48.

- 177) Went, Philip Th, Alessandro Lugli, Sandra Meier, Marcel Bundi, Martina Mirlacher, Guido Sauter, and Stephan Dirnhofer. 2004. "Frequent EpCam Protein Expression in Human Carcinomas." [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(03\)00502-1](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(03)00502-1).
- 178) William, William N., Xin Zhao, Joy J. Bianchi, Heather Y. Lin, Pan Cheng, J. Jack Lee, Hannah Carter, Ludmil B. Alexandrov, Jim P. Abraham, David B. Spetzler, Steven M. Dubinett, Don W. Cleveland, Webster Cavenee, Teresa Davoli and Scott Lippman. 2021. "Immune Evasion in HPV⁻ Head and Neck Precancer–Cancer Transition Is Driven by an Aneuploid Switch Involving Chromosome 9p Loss." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (19). <https://doi.org/10.1073/pnas.2022655118>.
- 179) Williams, Bret R., and Angelika Amon. 2009. "Aneuploidy: Cancer's Fatal Flaw?" *Cancer Research* 69 (13): 5289–91. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0944>.
- 180) Willipinski-Stapelfeldt, Birthe, Sabine Riethdorf, Volker Assmann, Ute Woelfle, Thomas Rau, Guido Sauter, Jochen Heukeshoven, and Klaus Pantel. 2005. "Changes in Cytoskeletal Protein Composition Indicative of an Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Micrometastatic and Primary Breast Carcinoma Cells." *Clinical Cancer Research* 11 (22): 8006–14. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0632>.
- 181) World Health Organization. 2020. "The Top 10 Causes of Death." December 9, 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Tag des Zugriffs: 29.11.2022
- 182) World Health Organization. 2022. "Fact Sheet Cancer." February 3, 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Tag des Zugriffs: 29.11.2022
- 183) Wu, Fengjie, Jun Zhu, Yongjiang Mao, Xiaomei Li, Baoguang Hu, and Dianliang Zhang. 2017. "Associations between the Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotypes of Circulating Tumor Cells and the Clinicopathological Features of Patients with Colorectal Cancer." *Disease Markers* 2017: 1–6. <https://doi.org/10.1155/2017/9474532>.
- 184) Xu, Lei, Xueying Mao, Ahmet Imrali, Ferriat Syed, Katherine Mutsvangwa, Daniel Berney, Paul Cathcart, John Hines, Jonathan Shamash, and Yong-Jie Lu. 2015. "Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System." *PLOS ONE* 10 (9): e0138032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138032>.
- 185) Yang, Anthony D., Fan Fan, E. Ramsay Camp, George van Buren, Wenbiao Liu, Ray Somcio, Michael J. Gray, Haiyun Cheng, Paulo M. Hoff, and Lee M. Ellis. 2006. "Chronic Oxaliplatin Resistance Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cell Lines." *Clinical Cancer Research* 12 (14): 4147–53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0038>.

- 186) Yang, Yu Ping, Teresa M. Giret, and Richard J. Cote. 2021. "Circulating Tumor Cells from Enumeration to Analysis: Current Challenges and Future Opportunities." *Cancers*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers13112723>.
- 187) Ye, Zhenlong, Yongmei Ding, Zhuo Chen, Zhong Li, Shuo Ma, Zenghui Xu, Liang Cheng, Xinyue Wang, Xiaoxia Zhang, Na Ding, Qian Zhang and Qijun Qian. 2019. "Detecting and Phenotyping of Aneuploid Circulating Tumor Cells in Patients with Various Malignancies." *Cancer Biology & Therapy* 20 (4): 546–51. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1538000>.
- 188) Zack, Travis I, Steven E Schumacher, Scott L Carter, Andrew D Cherniack, Gordon Saksena, Barbara Tabak, Michael S Lawrence, Cheng-Zhong Zhang, Jeremiah Wala, Craig H Mermel, Carrie Sougnez, Stacey B Gabriel, Bryan Hernandez, Huui Shen, Peter W Laird, Gad Getz, Matthew Meyerson and Rameen Beroukhim. 2013. "Pan-Cancer Patterns of Somatic Copy Number Alteration." *Nature Genetics* 45 (10): 1134–40. <https://doi.org/10.1038/ng.2760>.
- 189) Zeeshan, Rabia, and Zeeshan Mutahir. 2017. "Cancer Metastasis - Tricks of the Trade." *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. Association of Basic Medical Sciences of FBiH. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2017.1908>.

10 Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der möglichen Metastasenbildung bei malignen Tumoren .	11
Abbildung 2: Entnahme einer Liquid Biopsy aus Patientenblut und ihre Anwendungsmöglichkeiten	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung von EMT und MET mit zellulären Eigenschaften, Einfluss auf Physiologie und Tumorbiologie sowie typische Markerproteine.....	15
Abbildung 4: Allgemeine Charakteristika von EMT in malignen Tumoren	16
Abbildung 5: MET und EMT in malignen Tumoren.....	17
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktionsweise von CellSearch®	22
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation mit LSM 1077	32
Abbildung 8: Nachweis der Cytokeratin-Expression durch direkte Immunfluoreszenz	40
Abbildung 9: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen panCytokeratin und CD45 zur Detektion von CaCo-2 Tumorzellen und PBMCs in einem <i>in vitro spike in</i> -Modell	42
Abbildung 10:Validierung des etablierten Immunfluoreszenzprotokolls an einem <i>spike in</i> -Modell mit PBMCs und den Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954.....	43
Abbildung 11:DNA-Bildzytometrie der Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 nach Feulgen-Färbung	45
Abbildung 12:DNA-Bildzytometrie der Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 im <i>spike in</i> -Modell mit PBMCs nach Feulgen-Färbung.....	46
Abbildung 13:Einfluss einer vorherigen Immunfluoreszenzfärbung auf die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie	48
Abbildung 14:Beispielhafte Darstellung der Histogramme der Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006 und SK-CO-1 nach kombinierter Immunfluoreszenzfärbung und Feulgen-Färbung in einem <i>spike in</i> -Modell mit jeweils 100, 50 und 5 Tumorzellen.....	50
Abbildung 15:Einfluss von PBS-Inkubation und Lagerungszeit der Objektträger auf die Ergebnisse der DNA-Bildzytometrie bei Zelllinie CaCo-2	54
Abbildung 16:Exemplarische Darstellung zur Validierung des kombinierten Protokolls aus Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie zur Detektion von 30 Tumorzellen in einem <i>spike in</i> -Modell.....	57

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Tumorzelllinien	30
Tabelle 2:	Ausschlusskriterien der Analysezellen für DNA-Bildzytometrie	36
Tabelle 3:	Mittlere gemessene Ploidie der Tumorzelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 nach eigener DNA-Bildzytometrie im Vergleich zu ATCC-Angaben	44
Tabelle 4:	Vergleich zwischen der eingespikten Zellzahl, Anzahl pCK ⁺ -positiver Tumorzellen in der Immunfluoreszenz und der Anzahl aneuploider Tumorzellen, die auf demselben Objektträger mittels DNA-Bildzytometrie detektiert wurden.....	51
Tabelle 5:	Vergleich der Anzahl pCK ⁺ -positiver Tumorzellen der Zelllinien CaCo-2, HCC4006, SK-CO-1 und HCC1954 mit der Anzahl aneuploider Tumorzellen in einem <i>spike in</i> -Modell aus PBMCs und 30 Tumorzellen	58
Tabelle 6:	Darstellung der identifizierbaren Zellpaare in Immunfluoreszenz und DNA-Bildzytometrie	59
Tabelle 7:	Gerätschaften für Immunfluoreszenzfärbung und deren Auswertung, Feulgen-Färbung, DNA-Bildzytometrie sowie Zellkultur	96
Tabelle 8:	Verbrauchsmaterialien für Immunfluoreszenzfärbung, Feulgen-Färbung und Zellkultur	97
Tabelle 9:	Chemikalien und Reagenzien für Immunfluoreszenzfärbung, Feulgen-Färbung und Zellkultur	98
Tabelle 10:	Antikörper und Konjugate für Immunfluoreszenzmarkierung, sowie Färbekit zur Optimierung des etablierten Protokolls.....	99
Tabelle 11:	Für die Feulgen-Färbung verwendete Pufferlösungen und deren Zusammensetzung ..	99
Tabelle 12:	Benötigte Nährmedien für die erworbenen Tumorzelllinien und deren Zusätze	99
Tabelle 13:	Software zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung, Feulgen-Reaktion, DNA-Bildzytometrie und statistische Auswertung.....	100

10.3 Materialliste

10.3.1 Gerätschaften

Tabelle 7: Gerätschaften für Immunfluoreszenzfärbung und deren Auswertung, Feulgen-Färbung, DNA-Bildzytometrie sowie Zellkultur

Gerät	Hersteller
Absaugvorrichtung für Zellkultur Vacuboy	Integra
Autoklav	Steriltechnik AG
Brutschränke	New Brunswick, Thermo Fisher Scientific
Cytospintrichter	Tahmac
Cytospinzentrifuge Cytospin 2	Shandon
Digitaler Labortimer	Dostmann/Wertheim
Eismaschine F80C	Icematic
Feinwaage	Kern
Fluoreszenzmikroskop Biorevo BZ-9000	Keyence
Glaswaren	Schott Duran
Halbautomatische Pipetten	Eppendorf
Klemmen für Cytospins	Thamac
Kryokonservierungsbehältereinheit Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific
Kühlschrank	Kirsch, Privileg
Lichtmikroskop Axiovert 10	Zeiss
Magnetrührer	Heidolph Instruments
pH-Meter HQ11D	Hach
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand
Präzisionswaage Kern SB	Kern
Rüttelplatte	IKA
Sterilwerkbank	Nuaire
Stickstofftanks Arpege 170	Air Liquide
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q	Millipore
Wasserbad	Lauda
Zählkammer nach Neubauer (Hämazytometer)	Brand
Zähluhr, analog	Avantor
Zentrifuge Rotanta 46RS	Hettich

10.3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien für Immunfluoreszenzfärbung, Feulgen-Färbung und Zellkultur

Artikel	Hersteller
Aluminiumfolie	Geyer
Cytospin-Träger	Shandon
Cytospin-Filterkarten	Shandon
DakoPen	Dako
Deckgläschen, diverse Größen	Geyer, Menzel
Einmalhandschuhe Nitril, Größe M	Hartmann, Ansell
Filterpapier 45 x 45 cm	Macherey-Nagel
Kimtech®scienc	Kimberley-Clark Professional
Mediumfilter 0,2 µm 0,25 l	Sarstedt
Parafilm	American National Can
Pasteurpipetten	Assistent
Pipettenspitzen gestopft (10 µL, 200 µL, 1000 µL, 2000 µL)	Sarstedt
Pipettenspitzen ungestopft (10 µL, 200 µL, 1000 µL, 2000 µL)	Sarstedt
S-Monovette EDTA 9 ml	Sarstedt
Safety-Multifly®-Kanüle	Sarstedt
Serologische Pipetten 2 ml	Geyer
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One
Stauschlauch	Sarstedt
Zellkulturflaschen T25	Sarstedt
Zellstofftücher	Kimberley-Clark Professional
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One

10.3.3 Chemikalien

Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien für Immunfluoreszenzfärbung, Feulgen-Färbung und Zellkultur

Gerät	Hersteller
Aktivkohle	Merck
Bovine Serum Albumin Fraction V	Roche
DAPI	Sigma-Aldrich
Entellan	Merck
Ethanol 70%	Apotheke UKSH, Lübeck
Ethanol 96% (v/v)	Fluka
Ethanol 100%	Fluka
Analyse-Ethanol	Apotheke UKSH, Lübeck
FBS	Life Technologies
Ficoll Paque	Sigma-Aldrich
Formaldehyd 4,5 %	Roth
Kaliumpyrosulfit	Sigma-Aldrich
Lymphocyte Separation Medium 1077	Sigma- Aldrich
Natriumpyrosulfit Na ₂ S ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
PBS	Gibco
Pararosanilin/Parafuchsin	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
Prolong™ Diamond Antifade Mountant mit DAPI	Life Technologies
Salzsäure	Merck
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich
Xylol	J. T. Baker

10.3.4 Antikörper und Kits

Tabelle 10: Antikörper und Konjugate für Immunfluoreszenzmarkierung, sowie Färbe-Kit zur Optimierung des etablierten Protokolls

Artikel	Konjugat	Klonalität	Wirt	Hersteller
Alexa Fluor®488 anti-human panCytokeratin; Clone AE1/AE3	Alexa Fluor®488	Monoklonal	Maus	BioLegend
Alexa Fluor®594 anti-human CD45 Clone 2D1	Alexa Fluor®594	Monoklonal	Maus	eBiosciences
Epithelial Antigen Clone Ber-EP4	Unkonjugiert	Monoklonal	Maus	DAKO
Fix&Perm Sample Kit	-	-	-	Nordic MUBio

10.3.5 Pufferlösungen für die Feulgen-Reaktion

Tabelle 11: Für die Feulgen-Färbung verwendete Pufferlösungen und deren Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
Schiff'sches Reagenz	5g basisches Fuchsin in 150 ml 1M HCl 5g Kaliumpyrosulfid + 850 ml MQ hinzu über Nacht bei RT inkubieren. Hinzu 3g Aktivkohle, 10 min rühren, Aktivkohle 2 x abfiltrieren, in einer dunklen Glasflasche bei 4°C lagern.
Sulfidlösung	10 mL Natriumpyrosulfid 10 mL 1M HCl 180 mL MQ

10.3.6 Nährmedien für humane Tumorzelllinien

Tabelle 12: Benötigte Nährmedien für die erworbenen Tumorzelllinien und deren Zusätze

Artikel	Zusatz	Tumorzelllinie	Hersteller
EMEM	Fetal Bovine Serum (FBS) Penicillin/Streptomycin	CaCo-2 SK-CO-1	Sigma Aldrich
RPMI 1640	Fetal Bovine Serum (FBS) Penicillin/Streptomycin	HCC1954 HCC4006	Life Technologies

10.3.7 Software

Tabelle 13: Software zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung, Feulgen-Reaktion, DNA-Bildzytometrie und statistische Auswertung

Artikel	Hersteller
Adobe Reader 2020.009.20067	Adobe Systems Incorporation
Image-Cytometry ICM Software	Ahrens Zytometrie
Keyence BZ Observer & Analyzer	Keyence
Microsoft Office 360	Microsoft Incorporation

10.4 Ethikantrag



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. Dr. Jens Habermann
Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und
Biomaterialbanken
Klinik für Chirurgie

im Hause

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024
ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 17-043
Datum: 10. Februar 2017

Verkürztes Verfahren (Stufe 3 ICB-L)

Erforschung von Lungenkrebs für verbesserte (Früh-)Diagnose, Therapie, Nachsorge und Prognose

Ihr Schreiben vom 24. Januar 2017

Sehr geehrter Herr Prof. Habermann,

mit Ihrem o.g. Schreiben informieren Sie die Ethik-Kommission über ein geplantes Vorhaben, das auf für die ICB-L gewonnenen Biomaterial zurückgreift. .

Vorgelegt wurden das Basisformular vom 24.01.2017 sowie ein Studienprotokoll (undatiert).

Die Ethik-Kommission hat **keine Bedenken** gegen das Studienvorhaben.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

10.5 Danksagung

Mein Dank gilt zuerst meinem Doktorvater und seiner ständigen Vertretung, unter deren Leitung es mir möglich war, in den Räumlichkeiten der Sektion für translationale chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken meine Dissertation durchzuführen und mir dort lange Tage und Nächte um die Ohren schlagen durfte, um das Ziel der Promotion zu erreichen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ganz besonders beim MTA-Team der Sektion für ihre nicht nur technisch-fachliche sondern in genauso großem Maß zwischenmenschliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, der mich in besonderem Maß unterstützt und zum kritischen Nachdenken motiviert hat. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit in diesem Ausmaß nicht zustande gekommen.

Meinen akademischen Betreuern möchte ich dafür danken, dass sie mich mit Rat und Tat im Labor und später am Schreibtisch bestens und unermüdlich unterstützt haben. Ohne ihre umfassende Hilfe und Motivationskraft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt gilt ein sehr großes Dankeschön meinen Eltern die mir durch ihre unermessliche Unterstützung die Möglichkeit gaben, das Studium der Humanmedizin zu beginnen, weiterzuführen und mit dieser Dissertation nun neben dem Examen formal abzuschließen.

10.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Vincent Pechmann
Geburtsdatum: 12.12.1991 in Bad Soden am Taunus

Akademischer Werdegang

04/2011 Sophie Hedwig Gymnasium, Diez an der Lahn
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/2013 – 09/2015 Philipps Universität Marburg – Studium der Humanmedizin

09/2015 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M1)

04/2016- 06/2021 Universität zu Lübeck – Studium der Humanmedizin

06/2021 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (M3)

Seit 10/2021 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel – Studium der Zahnmedizin

Beruflicher Werdegang

11/2015 – 04/2016 Hilfswissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg unter Prof. Dr. R. Kinscherf, Prof. Dr. W. Hildebrandt

09/2015 – 09/2016 Hilfswissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main unter Prof. Dr. R. Kaufmann

Seit 08/2021 Assistenzarzt in Weiterbildung an der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie unter Prof. Dr. Dr. Peter Sieg, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Zeitraum der Dissertation

10/2017 – 12/2018 Experimentelle Arbeit in der Klinik für Chirurgie, Sektion für translationale chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken

10/2017 – 04/2018 Stipendiat des Promotionsstipendienprogramms „Lübecker Exzellenzmedizin“ der Universität zu Lübeck

01/2019-12/2023 Auswertung der Daten und Anfertigung der Promotionsarbeit, sowie Erstellung und Halten von wissenschaftlichen Vorträgen

Publikationen

11/2022

Vortrag auf der 53. Jahrestagung des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer
Arbeitskreises für Tumoren im Kopf- Gesichtsbereichs in Münster

Lübeck, den 23.04.2025