

**Entwicklung und Verbesserung von Methoden zur
Charakterisierung disseminierter Tumorzellen bei soliden Tumoren**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Alexandra Schoberth

aus
Freilassing

Jahr
2004

Aus der Klinik und Polyklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. E. Kastenbauer
jetziger Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus
und
der Klinischen Kooperationsgruppe "Bispezifische Antikörper" der GSF

**Entwicklung und Verbesserung von Methoden zur Charakterisierung
disseminierter Tumorzellen bei soliden Tumoren**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Alexandra Schoberth

aus
Freilassing

Jahr
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. M. Heiss

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. R. Bartl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. H. Lindhofer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2004

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Definition von Krebs.....	1
1.1.1. Unkontrollierte Proliferation.....	1
1.1.2. Verlust der Kontaktinhibition.....	2
1.1.3. Stimulation der Angiogenese.....	2
1.1.4. Unterdrückung der Apoptose.....	3
1.1.5. Gewinn potentieller Unsterblichkeit.....	3
1.1.6. Invasion und Bildung von Metastasen.....	3
1.2. Bedeutung des Nachweises von disseminierten Tumorzellen.....	7
1.3. Adjuvante Therapien von soliden Tumoren.....	9
1.4. Zielsetzung.....	10
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. Isolierung disseminierter Tumorzellen aus Körperflüssigkeiten.....	11
2.1.1. Lyse von Erythrozyten.....	11
2.1.2. Dichtegradientenzentrifugation.....	11
2.1.3. Cytozentrifugation.....	12
2.2. Anreicherung mittels Magnetbeads.....	12
2.2.1. Waschen der Magnetbeads.....	12
2.2.2. Kopplung von Antikörpern an Magnetbeads.....	13
2.2.3. Anreicherung von Tumorzellen aus mononukleärer Zellfraktion (MNC).....	13
2.2.4. Abtrennen der Beads.....	14
2.3. Isolierung von Nukleinsäuren.....	14
2.3.1. Isolierung von DNA aus MNC.....	14
2.3.2. Isolierung von DNA aus Bakterienlysaten.....	14
2.3.3. Isolierung von RNA aus MNC.....	16
2.3.4. Isolierung von mRNA aus angereicherten Zellfraktionen.....	16
2.4. Elimination von Zellen aus Stammzellapheresaten (<i>purging</i>).....	17
2.4.1. Tumorzellanreicherung.....	17
2.4.2. CD3/CD14-Abreicherung.....	18
2.4.3. Eliminierung von Her2/neu- und/oder EpCAM-positiven Zellen mittels trifunktionaler Antikörper.....	18

Inhaltsverzeichnis

2.4.4. FACS-Analyse von trifunktionellen Antikörpern.....	19
2.4.5. <i>Clonogenic Assay</i>	19
2.5. Nachweis disseminierter Tumorzellen	20
2.5.1. Immunzytochemischer Nachweis.....	20
2.5.2. Fluoreszenzfärbung.....	22
2.5.3. Doppel- und Dreifachfärbungen	23
2.5.4. Molekulargenetische Nachweise	24
2.5.5. Multiple Charakterisierung von Tumorzellen mittels PCR	29
2.6. <i>In situ</i> Hybridisierung	29
2.6.1. CISH (Chromogen <i>in situ</i> Hybridisierung)	29
2.6.2. FISH (Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung).....	30
2.6.3. Kombination von APAAP/FISH oder APAAP/CISH.....	30
2.7. Mikroskopische Beurteilung von Tumorzellen.....	31
2.7.1. Manuelle Auswertung.....	31
2.7.2. Auswertung mittels automatisierter Mikroskope	32
2.8. Primer, Antikörper und Lösungen	33
2.9. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	34
2.10. Abkürzungen	35
3. ERGEBNISSE.....	36
3.1. Etablierung einer selektiven Anreicherung von isolierten disseminierten Tumorzellen.....	36
3.2. Optimierung der Tumorzellanreicherung	40
3.3. Tumorzellanreicherung mit trifunktionellen Antikörpern	43
3.4. Verbesserte Charakterisierung von Tumorzellen.....	51
3.4.1. Etablierung einer Doppelfärbung zum Nachweis von Tumorzellen	51
3.4.2. Simultane Dreifachfärbungen von Tumorzellen	59
3.5. mRNA-Nachweis tumorassoziierter Marker mittels RT-PCR.....	60
3.5.1. Qualitativer PCR-Nachweis von Tumormarkern.....	61
3.5.2. Etablierung eines quantitativen PCR-Nachweises von Tumormarkern	64
3.5.3. Etablierung eines quantitativen Standards für die RT-PCR.....	66
3.5.4. Simultaner quantitativer Nachweis von EpCAM und Her2/neu	69
3.5.5. Quantifizierung der EpCAM-Expression in Tumorpatientenproben.....	70
3.5.6. Entwicklung einer Suspensionsfärbung für Tumorzellen.....	73

Inhaltsverzeichnis

3.5.7. Multiple PCR-Charakterisierung von Tumorzellen	75
3.6. Kombination der APAAP-Färbung mit <i>in situ</i> Hybridisierung	77
3.6.1. Kombination von APAAP-Färbung und CISH.....	78
3.6.2. Kombination von APAAP-Färbung und FISH.....	79
3.7. Validierung automatisierter Mikroskope.....	82
4. DISKUSSION	85
4.1. Anreicherung von Tumorzellen.....	85
4.2. <i>Purging</i>	87
4.3. Mehrfachfärbungen	89
4.4. Qualitative <i>nested</i> RT-PCR	90
4.5. Quantitative <i>Real-time</i> RT-PCR.....	91
4.6. Multiple PCR-Charakterisierung Zytokeratin-positiver Zellen	92
4.7. <i>In-situ</i> -Hybridisierung.....	94
4.8. Automatisierte Mikroskope	95
5. ZUSAMMENFASSUNG	97
6. LITERATUR.....	100

1. EINLEITUNG

1.1. Definition von Krebs

Krebs ist ein Sammelbegriff für mehr als hundert verschiedene Formen maligner Erkrankungen. Eine Geschwulst, die durch unkontrollierte Vermehrung von Zellen entstanden ist, bezeichnet man als Tumor. Dabei wird zwischen benignen Tumoren, die umliegendes gesundes Gewebe nur verdrängen, und malignen Tumoren, die aus entarteten Zellen entstehen, unterschieden. Diese werden im Verlauf der Tumorprogression aggressiver und können in entfernten Organsystemen Tochtergeschwülste, so genannte Metastasen, ausbilden. Unkontrollierte Wucherungen der Metastasen in lebenswichtigen Organsystemen führen schließlich zum Tod. In den letzten zwei Dekaden wurden erhebliche Wissensfortschritte über die molekularen Mechanismen der Tumorigenese erzielt. Dies bildet die Grundlage für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden. Eine Zelle unterliegt normalerweise einer streng regulierten Wachstumskontrolle, an der viele Proteine beteiligt sind. Protoonkogene (Krebs-Genvorläufergene) fördern das Zellwachstum, während Tumorsuppressor-Gene dieses unterdrücken. Multiple Mutationen in Genen dieser Wachstumsfaktoren können zum Verlust der Wachstumskontrolle und so zu unkontrollierten Zellwucherungen und Tumoren führen. Die Zellen eines Primärtumors stammen von einer gemeinsamen, entarteten Ursprungszelle ab und verfügen zusätzlich über spezifische Eigenschaften, die ebenfalls zur Tumorenstehung und Progression beitragen. Welchen Anteil diese jeweiligen Eigenschaften letztendlich an der Tumorigenese besitzen, ist im Detail bisher nicht bekannt.

1.1.1. Unkontrollierte Proliferation

Die entscheidende Phase für die Regulation von Proliferation und Differenzierung von Zellen durch externe Faktoren findet in der G1-Phase des Zellzykluses statt. Bei malignen Zellen wird die zelluläre Differenzierung in einem frühen Stadium blockiert und Gene mit proliferierender Signalwirkung werden aktiviert. Dadurch entstehen unausgereifte Tumorumläuferzellen, die diverse Funktionsstörungen aufweisen. So

führen etwa Mutationen oder Störungen der Expression von Protoonkogenen zur Induktion von wachstumsstimulierenden Proteinen wie Cyclin D, Cyclin E oder cyclinabhängigen Kinasen. Diese Wachstumsfaktoren sind für die unkontrollierte Proliferation der Tumorzellen verantwortlich. Auch der Verlust der Funktion von Wachstumsinhibitoren wie den Tumorsuppressorgenen p15, p16, p53 oder pRB hat eine unkontrollierte Proliferation der Tumorzellen zur Folge.

1.1.2. Verlust der Kontaktinhibition

Innerhalb eines Gewebes wird das Wachstum von Zellen durch Zell-Zell-Kontakte reguliert. Dies wird über Rezeptoren in den Zellmembranen vermittelt. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Inhibierung der Proliferation. Maligne Zellen besitzen aufgrund von Mutationen zu wenige oder mutierte Rezeptoren und können daher Signale zur Begrenzung ihrer Teilungsaktivität nicht empfangen. Dies führt ebenfalls zur ungeordneten und ungehemmten Tumorzellproliferation. Weiterhin sind Zelladhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Zellen für die geordnete Zelldifferenzierung und für den Zusammenhalt des Gewebes verantwortlich. Es werden drei große Familien unterschieden. Dies sind die Immunglobulin-Superfamilie, Integrine und Selektine. Einer der wichtigsten Adhäsionskomplexe besteht aus dem Membranprotein E-Cadherin sowie den intrazellulären Cateninen. Störungen in diesem Komplex wie die reduzierte Bildung von E-Cadherin oder der Verlust von α -Catenin führen zu einer erhöhten Invasivität und Progression der Tumorzellen. Der Ausfall von interzellulären Adhäsionsmolekülen wie ICAM1, ICAM2 oder DCC (*Deleted in Colon Cancer*) führt zu einem Verlust des zellulären Zusammenhaltes solider Gewebe und letztendlich zu einer erhöhten Tumorrare.

1.1.3. Stimulation der Angiogenese

Schnell wachsendes Tumorgewebe ist auf eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff angewiesen. Tumorzellen überexprimieren so genannte mitogene Angiogenesefaktoren wie das endotheliale Mitogen VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), die das Wachstum von Blutgefäßen stimulieren. Zusätzlich produzieren Tumorzellen Wachstumsmediatoren wie die Zytokine $\text{TNF}\alpha$, Interleukin 6 und Interleukin 1β , die die zusätzliche Bildung von VEGF induzieren.

Auch proteolytische Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Integrine scheinen an der Förderung der Angiogenese beteiligt zu sein.

1.1.4. Unterdrückung der Apoptose

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist unter anderem für die spezifische Eliminierung beschädigter Zellen verantwortlich. Auslösende Faktoren sind je nach Zellart z.B. DNA-Schädigungen, Induktion durch externe Faktoren wie Fas/CD95-Ligand, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) oder Glucocorticoide. Auch der Verlust der Stimulation durch Vitalitätsfaktoren wie Wachstumsfaktoren (Interleukine) oder Hormone kann zur Induktion der Apoptose führen. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, durch die verschiedene intrazelluläre Proteasen (Caspasen) aktiviert werden. Durch Spaltung verschiedenster Substratproteine kommt es letztendlich zum Untergang der Zellen. Tumorzellen können die Apoptose umgehen, indem sie antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 überexprimieren, die Expression des CD95-Rezeptors unterdrücken oder verschiedenste Mutationen in Genen von Proteinen aufweisen, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind.

1.1.5. Gewinn potentieller Unsterblichkeit

Die Teilungsfähigkeit von gesunden Zellen ist beschränkt. Bei jeder Replikation der DNA gehen Teile der Endstücke der Chromosomen, die Telomere, verloren. Die Telomerase stellt die Telomere, die aus repetitiven Basensequenzen bestehen, nach jeder Zellteilung jedoch nur unvollständig wieder her. Dadurch ist die Teilungsfähigkeit eingeschränkt. Da nach vollständigem Verlust der Telomere kodierende Genregionen betroffen sind, kann dies zum Zelltod führen. Tumorzellen können jedoch anomale Mengen an Telomerase bilden. Dies erlaubt eine unbeschränkte Anzahl von Zellteilungen und somit erlangen die Tumorzellen eine potentielle Unsterblichkeit.

1.1.6. Invasion und Bildung von Metastasen

Unter Metastasierung versteht man die Verschleppung neoplastischer Zellen auf dem Blut- und Lymphweg von dem Ort des Primärtumors in ein anderes Organ und das dortige An- und Weiterwachsen. Von mehreren tausend verschleppten Tumorzellen, die auch disseminierte Tumorzellen genannt werden, metastasieren oft

nur wenige (Cottier, 1987). Treffen einzelne, losgelöste Tumorzellen, oft fälschlicherweise als Micrometastasen bezeichnet, auf ihrer Wanderung durch das Gewebe auf ein Blutgefäß, können sie über die Blutbahn in Sekundärorgane gelangen, um sich dort anzusiedeln und so an weit entfernten Stellen im Körper zu neuen Metastasen auswachsen. Diese beeinträchtigen schließlich lebenswichtige Organsysteme und führen meist unweigerlich zum Tod. Die Mehrzahl der Krebspatienten stirbt somit nicht am Primärtumor selbst, sondern an den Folgen der Metastasenbildung. Daher ist für einen Patienten in der Regel nicht das Wachstum des Primärtumors, sondern vielmehr das Ausmaß der Metastasierung für seine Prognose entscheidend.

Die zu Grunde liegenden Mechanismen der Metastasierung wiederholen sich in unterschiedlichsten Stadien dieses Prozesses. Dies sind das Einwachsen des Primärtumors in ein Blut- oder Lymphgefäß sowie die Ablösung einzelner Tumorzellen, die anschließende Verschleppung und das Anheften der disseminierten Tumorzellen an der Gefäßwand sowie die destruierende Infiltration in neues Gewebe. Disseminierte Tumorzellen breiten sich dabei auf verschiedenen Wegen aus: durch lymphogene Metastasierung (Lymphpe), durch hämatogene Metastasierung (Blut) sowie durch kavitäre und kanalikuläre Metastasierung (Körperhöhlen und präformierte Gänge). Dazu müssen sie Kontrollmechanismen umgehen, welche normale Zellen an ihrem zugewiesenen Platz im Gewebeverband halten. Die Primärtumorzellen benutzen dazu proteolytische Enzyme, wie Plasmin und Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die ihnen den Weg zu Blut- oder Lymphgefäßen freimachen. Plasmin wird durch Aktivierung aus dem Vorläufer Plasminogen gebildet. Die Plasminogen Aktivatoren u-PA und t-PA und die entsprechenden Inhibitoren (α -anti-Plasmin, PAI-1 und PAI-2) bilden hierfür mit Plasminogen einen Komplex. Inaktives Plasminogen wird durch aktivierte u-PA- und t-PA-Rezeptoren in aktives Plasmin umgewandelt. Tumorzellen mit erhöhten u-PA und t-PA-Rezeptoren weisen ein erhöhtes Metastasierungspotential auf (Heiss et al., 2002). MMP spielen normalerweise bei der Embryonalentwicklung, bei Wundheilungs- und Entzündungsprozessen sowie bei der Gewebewiederherstellung eine Rolle. Durch Überexpression von MMP können sich maligne Tumorzellen die für die Loslösung essentiellen Eigenschaften der MMP zu Nutze machen. Neben der proteolytischen Aktivität benötigen Tumorzellen auch autokrine und parakrine Faktoren zur Stimulation der Migration durch die extrazelluläre Matrix. Sowohl AMF

(*Autocrin Motility Factor*) als auch HGF (*Hepatocyt Growth Factor*), IGF (*Insulin like Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) und Interleukin 6 werden von Tumorzellen exprimiert und erhöhen deren Migrationsfähigkeit. Unterstützt wird dieser Prozess von Angiogenesefaktoren, die eine strukturelle Lockerung des zu durchwandernden Endothels bewirken. Um in fremdes Gewebe überzutreten, nutzen disseminierte Tumorzellen die gleichen molekularen Mechanismen wie zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen. Beispiele hierfür sind Chemokine, Proteoglykane, Matrix-Metalloproteasen und Wachstumsfaktoren sowie Integrine und Selektine.

Wie schon erwähnt, stirbt die Mehrzahl der Krebspatienten nicht am Primärtumor, sondern an den Folgen der Metastasenbildung. Bis eine Metastase mit den herkömmlichen bildgebenden Verfahren darstellbar oder gar manuell tastbar wird, befinden sich Patienten in einer Zeit prognostischer Ungewissheit. Mittels immunzytochemischer Verfahren können isolierte disseminierte Tumorzellen aufgespürt und somit potentielle Risikopatienten ermittelt werden. Dadurch werden frühzeitige therapeutische Maßnahmen ermöglicht.

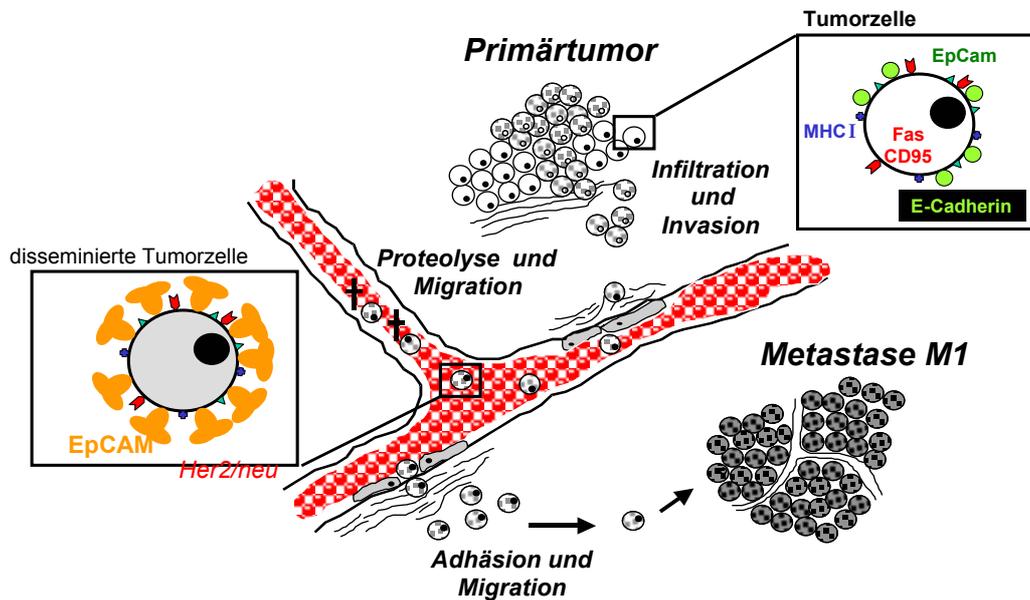


Abb. 1: Schematische Darstellung der Tumorzellmetastasierung.

Einzelne Tumorzellen, die verschiedene Oberflächenmoleküle zur Infiltration und Invasion wie E-Cadherin und tumorspezifische Antigene wie EpCAM und Her2/neu besitzen, lösen sich vom Primärtumor ab. Durch Migration dringen sie in Blut- und Lymphgefäße ein und werden zu disseminierten Tumorzellen. Weiterhin sind disseminierte Tumorzellen in der Lage, durch wiederholte Migration Metastasen an anderen Stellen des Körpers zu bilden. Disseminierte Tumorzellen können durch vorhandene tumorspezifische Marker in Sekundärorganen nachgewiesen werden. Einzelheiten siehe Text.

1.2. Bedeutung des Nachweises von disseminierten Tumorzellen

Die Mehrzahl aller Krebserkrankungen sowie die malignombedingten Todesfälle der westlichen Industrieländer werden durch maligne epitheliale Tumoren verursacht. Bei zunehmenden Resektionsmöglichkeiten wird die Mortalitätsrate immer häufiger durch eine frühzeitige okkulte Tumorzeldissemination bestimmt, die auch *minimal residual disease* (MRD) genannt wird (Izbicki, 2000; Izbicki et al., 1997; Pantel, 1996; Pantel, 1999). Diese einzelnen disseminierten Tumorzellen, die man auch als IDT (isolierte disseminierte Tumorzellen) bezeichnet, können mit konventionellen histopathologischen Stagingmethoden sowie durch bildgebende Verfahren (Schlimok et al., 1987) nicht nachgewiesen werden. Nach heutigem Kenntnisstand sind Sekundärtumore oder so genannte Fernrezidive auf die prä- oder perioperative Disseminierung von Zellen des Primärtumors zurückzuführen. Das Erkennen von disseminierten Tumorzellen erlaubt eine erweiterte Einteilung in verschiedene Tumorstadien (Tumorstaging) und bietet somit eine entscheidende Möglichkeit zur Frühdiagnose von Fernrezidiven. Methoden, die dem Nachweis einer Tumordisseminierung dienen, stehen deshalb im Brennpunkt angewandter Metastasen-Forschung.

Der negative Einfluss isolierter disseminierter Tumorzellen auf die Überlebensrate konnte bei zahlreichen soliden Tumoren wie dem Magenkarzinom (Jauch et al., 1996), dem kolorektalen Karzinom (Lindemann et al., 1992), dem Prostatakarzinom (Weckermann et al., 1999) dem Bronchialkarzinom (Cote et al., 1995) und dem Mammakarzinom (Braun and Pantel, 2000; Diel et al., 1996) demonstriert werden. Dies wird durch Daten zur prognostischen Bedeutung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Primärdiagnose unterstützt (Braun et al., 2000; Cote et al., 1991) (Diel et al., 1996; Ellis et al., 1989; Harbeck et al., 1994; Landys et al., 1998; Mansi et al., 1991; Mansi et al., 1999; Pantel et al., 1997; Schlimok et al., 1987). Bei ca. 20-30% der untersuchten Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten im klinischen Stadium M₀ (kein Nachweis von Fernmetastasen) konnte mit Hilfe von Antikörpern, die an disseminierte Tumorzellen binden, eine minimale Tumorzeldisseminierung im Knochenmark nachgewiesen werden (Izbicki, 2000).

Das Schicksal von disseminierten Tumorzellen während der langen Latenzzeit zwischen Primärdiagnose und Rezidiv ist bisher ungeklärt. Aufgrund der Analyse von Einzelzellen ist anzunehmen, dass die Mehrzahl der isolierten Tumorzellen im Knochenmark nicht proliferiert (G0-Phase), sondern in einer Latenzphase (*dormant state*) verharrt (Pantel and Riethmuller, 1996). Hierin könnte eine Ursache für die beschränkte Wirkung einer antiproliferierenden Chemotherapie von soliden Tumoren liegen. Die Faktoren, die die Dauer der Latenzphase beeinflussen und das Verlassen der G0-Phase der Zellen induzieren sowie die Bildung der makroskopischen Fernmetastasierung verursachen, sind nicht bekannt.

In den letzten Jahren ist der Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen durch die Einführung immunzytochemischer Methoden (ICC) möglich geworden (Izbicki, 2000; Osborne and Rosen, 1994; Pantel, 1999). Diese Methode wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt und in Bezug auf ihre klinische Relevanz validiert (Pantel et al., 1996). Die ICC stellt zum heutigen Zeitpunkt die Goldstandard-Nachweismethode einer okkulten Frühdisseminierung solider Tumorzellen dar. Die Detektion von disseminierten Tumorzellen erfolgt mittels monoklonaler Antikörper, die gegen Markerproteine wie Zytokeratine gerichtet sind. Diese werden über die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Technik mikroskopisch nachgewiesen. Pro Patient werden 2×10^6 mononukleäre Zellen, die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden, auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Nachteile dieser Goldstandardmethode sind die geringe Sensitivität und die schwierige Handhabung beim Screening hoher Zellzahlen. Um potentielle Eigenschaften einer Tumorzelle zu erkennen, müssten mehrere Tumormarker gleichzeitig nachgewiesen werden. Dies wäre für eine spezifische adjuvante Therapieentscheidung sowie die Therapieverfolgung essentiell. Die heutigen Methoden erlauben jedoch nicht die simultane Detektion von mehreren Tumormarkern. Auch die mikroskopische Unterscheidung zwischen disseminierten Tumorzellen und normalen Zellen durch ICC-Färbungen ist bisher mangels standardisierter Kriterien schwierig. Deshalb werden neue Standardmethoden zur eindeutigen Detektion von MRD dringend benötigt.

1.3. Adjuvante Therapien von soliden Tumoren

Für eine differenzierte Indikationsstellung ist der direkte Nachweis einer MRD essentiell (Izbicki, 2000). Neben der Einschätzung des residuellen Rezidivrisikos eines Patienten wäre die immunzytochemische Analyse spezifischer tumorassoziierter Zielantigene bei der Selektion einer individuellen Therapiestrategie von Nutzen. Isolierte disseminierte Tumorzellen sind im Vergleich zu soliden Metastasen wegen ihrer Zugänglichkeit für Makromoleküle und immunkompetente Effektorzellen geeignete Ziele für intravenös applizierte Therapeutika. Therapiestrategien, die auch gegen nicht proliferierende Tumorzellen wirksam sind, scheinen daher insbesondere im adjuvanten Therapieansatz vielversprechend. Ein Beispiel für eine derartige neue Therapiestrategie könnten trifunktionelle Antikörper in der adjuvanten Tumorthherapie darstellen. Diese trifunktionellen Antikörper entfalten ihre zytolytische Aktivität gegen Tumorzellen nicht nur durch die Redirektion von T-Zellen an Tumorzellen, sondern auch durch eine simultane Bindung und Aktivierung von FcγRI- und FcγRIII-positiven akzessorischen Zellen. Durch das Zusammenspiel dieser verschiedenen Immunzelltypen wird eine effektive Tumorzellzerstörung erreicht, die keinerlei Präaktivierung oder Kostimulation voraussetzt. Das Einsatzgebiet dieser Antikörper zeichnet sich zum momentanen Zeitpunkt der Erkrankungsstadien ab, in denen Tumorzellen nach Operation des Primärtumors als minimale residuelle Tumorzellen oder als kleine Tumorzellkonglomerate (maligner Aszites, maligner Pleuraerguß) vorliegen. Im Gegensatz zur klassischen Chemotherapie könnten diese Antikörper Tumorzellen eliminieren, die sich in der G₀-Ruhephase befinden, und somit einen entscheidenden Beitrag zur Behandlung von MRD leisten.

1.4. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Etablierung neuer Nachweisverfahren für disseminierte Tumorzellen, die im Vergleich zur Goldstandardmethode eine höhere Sensitivität und Spezifität aufweisen. Zusätzlich sollten bestehende Methoden verbessert und standardisiert werden, um eine größere Reproduzierbarkeit und einen hohen Probendurchsatz zu gewährleisten. Dabei sollten im einzelnen folgende Aufgaben bearbeitet werden:

- Sensitivitätssteigerung des MRD-Nachweises durch selektive Anreicherung von Tumorzellen
- Tumorzellcharakterisierung durch simultane immunzytochemische Mehrfachfärbungen
- Tumorzellcharakterisierung durch *in situ* Hybridisierungen
- Molekularer qualitativer und quantitativer Tumorzellnachweis mittels *Real-time*-PCR
- Etablierung automatisierter Auswertesysteme zur Detektion von Tumorzellen

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Isolierung disseminierter Tumorzellen aus Körperflüssigkeiten

2.1.1. Lyse von Erythrozyten

Gefrorene Apheresate (50 ml) wurden bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau-Lösung gemischt, in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und ausgezählt. Die blau angefärbten (toten) Zellen sowie beschädigte Zellen wurden in der Zählung nicht berücksichtigt. Es wurden mindestens zwei Großquadrate bestehend aus je 16 Kleinquadraten ausgezählt. Die Zellzahlberechnung wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat} \times 2 \times 10^4$$

Anschließend wurden die Zellen zügig mit PBS gewaschen, zentrifugiert (10 min, 500xg) und das Zellpellet erneut mit 40 ml Erythrozytenlysepuffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 50 ml PBS aufgenommen und wiederum die Zellzahl bestimmt.

2.1.2. Dichtegradientenzentrifugation

Die selektive Präparation von mononukleären Zellen erfolgte mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Amersham, USA). Das Ausgangsmaterial (Knochenmark, Blut, Aszitesflüssigkeit, Stammzellapheresen) musste spezifisch vorbehandelt werden. Knochenmark (3-10 ml) wurde in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt, mit Hanks-Lösung auf 30 ml aufgefüllt, durch Umschütteln gemischt und 10 min bei 540xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 10 ml abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde mit PBS auf 30 ml aufgefüllt. Peripheres Blut, Aszitesflüssigkeit oder Stammzellapheresen wurden direkt in einem 50 ml Röhrchen auf 30 ml mit PBS aufgefüllt. 20 ml Ficoll wurde in ein neues steriles 50 ml Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit dem Proben/PBS-

Gemisch mit Hilfe einer 10 ml Pipette überschichtet und 30 min bei 400xg ohne Bremse und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Zellring und die obere Phase wurden zeitnah, um die Zytotoxizität des Ficolls so gering wie möglich zu halten, in ein leeres 50 ml Röhrchen überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 540xg 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und im Falle einer großen Erythrozytenzahl im Sediment, sichtbar durch eine rötliche Farbe des Zellpellets, wurde dieses mit 20 ml Erythrozytenlysepuffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment je nach Größe in 2-50 ml PBS aufgenommen und gut resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden wie in Kapitel 2.1.1. beschrieben ausgezählt.

2.1.3. Cytozentrifugation

Glas-Objektträger wurden in Cytozentrifugationskammern (Spot mit 18 mm Durchmesser), eingespannt, die Kammer wurde mit 1 ml MNC-Zellsuspension mit der eingestellten Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml gefüllt und 3 min bei 120xg in einer Cytozentrifuge zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig, um die Zellen auf dem Objektträger nicht abziehen, abgenommen und verworfen. Cytozentrifugationspräparate wurden 1-2 h oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Objektträger wurden nach dem Trocknen sofort gefärbt (Kap. 2.5.1.1.) oder bei $\leq -15^\circ\text{C}$ bzw. $\leq -70^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

2.2. Anreicherung mittels Magnetbeads

Alle Arbeitsschritte mit Magnetbeads wurden mit Glasmaterialien durchgeführt, um eine unspezifische Adhäsion der Beads an Plastikmaterialien zu vermeiden.

2.2.1. Waschen der Magnetbeads

Zur Entfernung von Natriumazid, wurden die Magnetbeads (Dynabeads[®]; Dynal, Norwegen) gewaschen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Magnetpartikel zu gewährleisten, wurden diese gemischt und die benötigte Menge in ein passendes Reagenzröhrchen mit Magnethalterung überführt und für 2 min abgetrennt. Die Flüssigkeit wurde komplett entfernt, das Röhrchen aus der Halterung genommen und 1-2 ml Waschpuffer (PBS/0,1% BSA) zugegeben, vorsichtig gemischt und wieder in

die Halterung gestellt. Dieser Wasch- und Trennvorgang wurde 2x wiederholt. Nach dem letzten Waschen wurden die Dynabeads® im Ausgangsvolumen in PBS/0,1% BSA resuspendiert und gut gemischt. Die Beads konnten nun für die Positivanreicherung von Tumorzellen eingesetzt werden.

2.2.2. Kopplung von Antikörpern an Magnetbeads

500 µl Dynabeads® (*CELLection™ Dynabeads Mouse IgG*) wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und in die Magnethalterung gestellt. Die Beads wurden 2 min abgetrennt, die Flüssigkeit vorsichtig abgesogen und das Reaktionsgefäß aus der Halterung entfernt. Die Magnetbeads wurden in 500 µl PBS/0,5% BSA aufgenommen. Das Waschen mit PBS/BSA wurde wiederholt, die Dynabeads erneut in 500 µl PBS resuspendiert und 5 µg des jeweiligen Antikörpers zugegeben. Nach Inkubation unter vorsichtigem Rollern für 1 h bei RT wurden die gekoppelten Magnetbeads 5x mit 500 µl PBS/0,5% BSA gewaschen und in 500 µl PBS/0,5% BSA aufgenommen. Die Antikörper/Bead-Suspension konnte mit 0,2% Natriumazid stabilisiert werden und war bei 4°C 6 Monate stabil. Das Koppeln der Antikörper wurde durch Zugabe von Tumorzellen getestet, die das entsprechende Antigen tragen. Bei erfolgreicher Kopplung bildeten sich um die Tumorzellen Rosetten von Beads, was im Mikroskop kontrolliert wurde.

2.2.3. Anreicherung von Tumorzellen aus mononukleärer Zellfraktion (MNC)

Die Positivanreicherung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von DYNAL. Die MNC-Zellsuspension wurde durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (Kap. 2.1.2.) Pro Ansatz wurden 2×10^7 MNC in 1 ml PBS/20% fötales Kälberserum (FKS) aufgenommen. Falls nicht genügend Zellen vorhanden waren, wurde die vorhandene Zellzahl verwendet und dokumentiert. Für jeden Ansatz wurden 50 µl (2×10^7) Beads, je nach Fragestellung *CELLection™ Dynabeads Epithelial Enrich*-Beads oder *CELLection™ Dynabeads Mouse IgG*-Beads in ein Reaktionsgefäß überführt und gewaschen (Kap. 2.2.1.) Anschließend wurden die Beads zu der anzureichernden MNC-Zellfraktion gegeben. Die Probe wurde vorsichtig gemischt und 30 min bei 2-8°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach erfolgter Bindung der Beads an die Tumorzellen wurde 1 ml RPMI/1% FKS zugegeben, gemischt und das Röhrchen in die Magnethalterung gesetzt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Die

Tumorzellen befanden sich an den Beads am Magnetboden, die nicht gebundenen Zellen im Überstand. Nichttumorzellen wurden somit effizient abgetrennt. Das Röhrchen wurde wieder aus der Magnethalterung entfernt, 1-2 ml RPMI/1% FKS zugegeben und gut gemischt. Der Waschvorgang wurde 3x wiederholt und die Beads mit Zellen anschließend in 200 µl 37°C warmen RPMI/1% FKS resuspendiert.

2.2.4. Abtrennen der Beads

Um die angereicherten Tumorzellen anschließend auf einen Objektträger zu übertragen, wurden diese von den Beads mit Hilfe von DNase (DynaL-System) abgetrennt. Dazu wurden 200 µl einer 37°C warmen DNase-Lösung (200U DNase in RPMI) zu den rosettierten Zellen gegeben, die Suspension vorsichtig gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit einer Glaspipette kräftig die Bead/Zellsuspension auf- und abgezogen, um mit Hilfe von Scherkräften die letzten Tumorzellen von den Beads abzulösen. Der Ansatz wurde in den Magneten gestellt und mit dem Überstand, der die Tumorzellen enthält, weitergearbeitet.

2.3. Isolierung von Nukleinsäuren

2.3.1. Isolierung von DNA aus MNC

Die Isolierung von DNA aus MNC erfolgte mittels des *MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I* und des *MagNa Pure LC Instruments* von Roche Diagnostik. Das Vorbereiten der Proben und die Durchführung erfolgten nach den Angaben des Herstellers mittels des Programms *DNA high performance*. Dazu wurden 200 µl Zellsuspension, die durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurde (Kap 2.1.2.), eingesetzt und die isolierte DNA in 100 µl Elutions-Puffer des Herstellers resuspendiert. Die gewonnene DNA wurde sofort weiterverarbeitet oder bei 4°C bis zu 2 Monate gelagert.

2.3.2. Isolierung von DNA aus Bakterienlysaten

2.3.2.1. Präparation kleiner DNA-Mengen

DNA wurde mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Mini Purification Systems* (Qiagen, Hilden) gewonnen. Alle Puffer und Lösungen für die Präparation waren im System enthalten.

Eine Bakterienkolonie einer Transformationsplatte (LB₀-Ampicillin) wurde in 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin für 12-16 h bei 37°C im Bakterieneschüttler kultiviert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 6000 Upm isoliert. Das Zellpellet wurden in 0,3 ml Puffer P1 (mit 100 µg/ml RNase A) resuspendiert, 0,3 ml Puffer P2 zugegeben, gut gemischt und bei RT 5 min inkubiert. Zu der Bakteriensuspension wurde 0,3 ml eiskalter Puffer P3 gegeben, der Ansatz sofort gemischt und auf Eis gestellt. Das Lysat wurde 10 min bei 4°C und 12000 Upm zentrifugiert und der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, sofort auf eine mit 1 ml Puffer QBT voräquilibrierte Säule (Qiagen-tip 20) gegeben. Die Säulen wurden 4x mit 1 ml Puffer QC gewaschen und die DNA mit 0,8 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde bei RT mit 0,56 ml Isopropanol pro Ansatz gefällt und sofort 30 min bei 4°C und 10000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und verworfen. Das Pellet wurde anschließend mit 70% EtOH gewaschen (1 ml EtOH, 10 min, 4°C, 10000 Upm), luftgetrocknet und in einer adäquaten Menge an Aqua dest. (10-50 µl) aufgenommen.

2.3.2.2. Präparation großer DNA-Mengen

DNA wurde mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Maxi Purification Systems* (Qiagen, Hilden) gewonnen. Alle Puffer und Lösungen für die Präparation waren im System enthalten. 400 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) wurden mit 1 ml einer Bakterienkultur angeimpft und 12-16 h bei 37°C im Bakterieneschüttler kultiviert. Anschließend wurde die Kultur 15 min bei 4°C und 6000 Upm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer P1 (mit 100 µg/ml RNase A) resuspendiert, 10 ml Puffer P2 zugegeben, gut gemischt und bei RT 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml eiskaltem Puffer P3 wurde der Ansatz sofort gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde 30 min bei 4°C und 20000xg zentrifugiert und der Überstand auf eine mit 10 ml Puffer QBT voräquilibrierte Säule (Qiagen-tip 500) aufgetragen. Die Säulen wurden 2x mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Danach wurde die DNA bei RT durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol pro Ansatz gefällt und für 30 min bei 4°C und 15000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und verworfen. Das Pellet wurde anschließend mit 70% EtOH gewaschen (5 ml EtOH, 10 min, 4°C, 15000xg), luftgetrocknet und in einer adäquaten Menge an H₂O (100-500 µl) aufgenommen.

2.3.3. Isolierung von RNA aus MNC

Isolierte MNC wurden in einem Reaktionsgefäß 10 min bei 2000 Upm in einer Eppendorftischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig und vollständig abgezogen, das Pellet in 200 µl pro 10⁶ Zellen GIT-Stabilisierungslösung resuspendiert und gut gemischt (vortex). Die stabilisierten Zellen wurden sofort weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert. Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde ein modifiziertes Protokoll nach (Chomczynski and Sacchi, 1987) verwendet. Zu den stabilisierten Zellen wurden 1% (v/v) saures Phenol, 20% (v/v) Chloroform und 10% (v/v) Natriumacetat-Lösung (pH 4,7) gegeben, 1 min gemischt (vortex), und der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei höchster Geschwindigkeit (14000 Upm in Eppendorftischzentrifuge) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit demselben Volumen an Isopropanol versetzt. Die Proben wurden bei -20°C über Nacht inkubiert, um eine vollständige Fällung der RNA zu gewährleisten. Anschließend wurden diese 15 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde je einmal mit 500 µl 70% Ethanol und 500 µl 100% Ethanol gewaschen und jeweils 2 min bei höchster Geschwindigkeit abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend bei RT 3 min getrocknet und in 20 µl DEPC/H₂O resuspendiert. Die gewonnene RNA wurde 10 min bei 56°C vollständig gelöst und sofort für weitere Analysen eingesetzt. Zur Aufbewahrung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.3.4. Isolierung von mRNA aus angereicherten Zellfraktionen

Für die Isolierung von mRNA aus Zellsuspensionen wurden *Oligo-dT-Beads* (*Monocyte mRNA-Isolation Kit*, Dynal) verwendet. Die Beads wurden gut gemischt, pro Ansatz 50 µl (250 µg) entnommen und nach Angaben des Herstellers gewaschen. Die Ausgangsmaterialien für die mRNA-Isolierung waren Bead/Zellsuspensionen nach erfolgter Anreicherung mittels Magnetbeads (Kap.2.2.3.). Die angereicherten Tumorzellen wurden nicht von den Magnetbeads getrennt, sondern direkt für die mRNA-Isolierung eingesetzt. Die Suspension wurde in den Magneten gestellt und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Reaktionsgefäß wurde aus dem Magneten entfernt, 500 µl Lysis/Binding-Puffer zugegeben und vorsichtig gemischt. Das Gefäß wurde für 2-3 min in den Magneten

gestellt. Der Überstand, in dem sich nach erfolgter Lyse der Zellen die Nukleinsäuren befanden, wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Nukleinsäurelösung wurden 50 µl gewaschene *Oligo-dT-Beads* gegeben, gut gemischt und 5 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Dabei band die mRNA an die Oligo-dT-Sequenzen der Beads. Das Reaktionsgefäß wurde wiederum in den Magneten gestellt, der Überstand verworfen, das Gefäß herausgenommen und die Beads mit 250 µl Waschpuffer A resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt, gefolgt von 2 Waschschriften mit Waschlösung B. Anschließend wurden die Beads in 250 µl kaltem 10 mM TRIS/HCl pH 7,5 aufgenommen, nochmals in den Magneten gestellt und zum Schluss in 20 µl DEPC/H₂O aufgenommen. Die gewonnene mRNA wurde anschließend sofort für die PCR-Analytik eingesetzt.

2.4. Elimination von Zellen aus Stammzellapheresaten (*purging*)

Es wurden Glasmaterialien verwendet, um unspezifische Adhäsionen der Magnetbeads an Plastikmaterial zu verhindern. Die benötigten Materialien, Reagenzien und Magneten wurden vorgekühlt. 1×10^8 MNC aus Stammzellapheresen wurden mit PBS/0,1% BSA gewaschen (10 min, 560xg) und das Zellpellet in 4 ml PBS/0,1% BSA auf Eis resuspendiert. Zu dieser Zelllösung wurden je nach Fragestellung 100 µl (4×10^7) gewaschene, selbst gekoppelte Magnetbeads (z.B. mit den Antikörpern gegen Her2/neu, EpCAM, CD3 oder CD14; siehe unten) gegeben und bei 4°C, um die Makrophagenaktivität zu reduzieren, für 45 min auf einem Roller inkubiert.

2.4.1. Tumorzellanreicherung

Ansätze, die Beads mit Antikörpern gegen Her2/neu und/oder EpCAM enthielten, wurden für 6 min in den Magneten gestellt, um die nicht gebundenen Zellen abzutrennen. Nach 3 min wurde der Ansatz (Magnet mit Reaktionsgefäß) durch Umdrehen gemischt, um im Deckel verbleibende Beads zu binden. Der Überstand wurde abgezogen, der Ansatz aus dem Magneten entfernt und 5 ml PBS/0,1% BSA dazugegeben und wieder in den Magneten gestellt. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Nachdem der Überstand erneut entfernt wurde, wurde der Ansatz in 1 ml PBS/0,1% BSA resuspendiert und mit einer Glaspipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß

überführt. Dieser Ansatz wurde anschließend 5x mit PBS/0,1% BSA gewaschen (Ansatz 2 min in Magneten, Überstand abziehen, Ansatz ohne Magneten resuspendieren). Zum Schluss wurde der Ansatz in 200 µl RPMI/20% FKS-Medium resuspendiert, auf 37°C gebracht, 200 U DNase zugegeben und 15 min unter Rollern bei RT inkubiert. Noch an Tumorzellen gebundene Beads wurden durch kräftiges auf- und abpipettieren mit einer Glaspipette gelöst und der Ansatz in den Magneten gestellt. Die Tumorzellen befanden sich im Überstand, der in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die restlichen Beads wurden mit 300 µl PBS/0,1% BSA resuspendiert, die Beads erneut abgetrennt und der Überstand mit den Tumorzellen mit dem ersten Überstand vereinigt. Das Reaktionsgefäß mit den Beads wurde verworfen und das weitere Reaktionsgefäß mit den gesammelten Überständen erneut in den Magneten gestellt, um die restlichen Beads zu entfernen. Der Überstand wurde durch Cytozentrifugation (Kap.2.1.3.) auf Objektträger aufgebracht.

2.4.2. CD3/CD14-Abreicherung

Ansätze, die Beads mit Antikörpern gegen CD3 und/oder CD14 enthielten, wurden für 6 min in den Magneten gestellt, der Überstand abgezogen und in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden erneut 100 µl (4×10^7) Magnetbeads (CD3 und/oder CD14) zugegeben und der Ansatz bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Beads wurden anschließend 5x mit PBS/0,1% BSA gewaschen (Ansatz 2 min in Magneten, Überstand abziehen und in neuem Gefäß sammeln, Ansatz ohne Magneten resuspendieren). Zum Schluss wurde der gesammelte Überstand 10 min bei 500xg zentrifugiert und das Pellet in 2 ml autologem Serum resuspendiert. Die so gewonnene Zellfraktion enthielt je nach eingesetzten Beads keine CD3- und/oder CD14-positiven Zellen mehr.

2.4.3. Eliminierung von Her2/neu- und/oder EpCAM-positiven Zellen mittels

trifunktionaler Antikörper

Pro Ansatz wurden 5×10^7 Zellen in 1 ml autologem Serum eingesetzt, die aus Stammzellapheresen gewonnen wurden. Dieser wurde mit 0,1 µg trifunktionellem Antikörper (z.B. removab[®] oder rexomun[®]) versetzt und unter Rollern für 24 h bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Antikörper verwendet. Nach

Inkubation wurden von jedem Ansatz 20 Zytospins mit 1×10^6 Zellen für einen immunzytochemischen Nachweis der Tumorzellen angelegt. Weiterhin wurden 10 Ansätze (200 μ l GIT-Stabilisierungslösung pro 1×10^6 Zellen) für eine PCR-Analytik der Tumorzellen vorbereitet.

2.4.4. FACS-Analyse von trifunktionellen Antikörpern

Die Antikörper wurden mit Hilfe einer Doppelmarkierung von anti-CD4/anti-Ratte-Antikörpern markiert, um die Oponisierung in Stammzellapheresen zu überprüfen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je 100 μ l Stammzellapheresat entnommen und bei 4°C aufbewahrt, bis alle Proben entnommen waren. Anschließend erfolgte eine Doppelmarkierung der im Apheresat enthaltenen T-Zellen mit einem monoklonalen anti-CD4-PE-Antikörper und mit einem polyklonalen anti-Ratte-FITC-Antikörper. Dazu wurden je 10 μ l markierter Antikörper mit einer Probe gemischt und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Erythrozytenlysepuffer (Simultest™; Becton Dickinson) zum Ansatz gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert (5 min, 480xg), das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Zum Ansatz wurden 100 μ l Anti-FITC-AK (1:100 Verdünnung in PBS; Becton Dickinson) gegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 2 ml PBS zugegeben, der Ansatz abzentrifugiert und in 500 μ l PBS resuspendiert. Die PE/FITC-markierten Zellen wurden im FACS-Gerät (FACSCalibur; Becton Dickinson, USA) nach Angaben des Herstellers gemessen.

2.4.5. Clonogenic Assay

Die durch trifunktionelle Antikörper vermittelte Tumorzellabreicherung wurde mit Hilfe eines *Clonogenic Assays* in einem Langzeitansatz untersucht. Dazu wurden isolierte MNC aus dem Blut gesunder Spender verwendet. Die MNC wurden wie unter Kapitel 2.1.2. beschrieben gewonnen. 1×10^6 Zellen wurden pro Vertiefung in eine 24-Well-Mikrotiterplatte gegeben und mit 5% SKBR3-Tumorzellen versetzt. In die Vertiefungen wurden anschließend verschiedenen Antikörper-Konzentrationen gegeben. Eine Vertiefung enthielt keine Tumorzellen und diente als Kontrolle. Der Ansatz wurde 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht (Anlegen von Zytospins). Anschließend erfolgte ein

immunzytochemischer Tumorzellnachweis durch APAAP-Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Panzytokeratin (A45-B/B3, Micromet AG, München) nach Kapitel 2.5.1.1.

2.5. Nachweis disseminierter Tumorzellen

2.5.1. Immunzytochemischer Nachweis

2.5.1.1. APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase)- Methode

Alle Inkubationsschritte dieser Methode erfolgten bei RT. Je nach Fragestellung wurden 2×10^6 Zellen pro Patient mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper (A45-B/B3) analysiert. Parallel wurde eine Isotypkontrolle (MOPC-AK, Sigma) durchgeführt, um eventuelles unspezifisches Binden der verwendeten tumorassoziierten Antikörper zu detektieren. Als Positivkontrollen wurden Cytozentrifugationspräparate mit Tumorzelllinien (SW480 und SKBR3) verwendet, die Zytokeratine exprimieren. Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Gebrauchslösungen immer frisch hergestellt. Benötigt wurden 10% AB-Serum in PBS, verschiedene Antikörperlösungen, die in 10% AB-Serum verdünnt wurden und 37°C warme Glyceringelatine (pH 7, eingestellt mit TRIS/EDTA-Puffer). Als Probenmaterial wurden frisch getrocknete Cytozentrifugationspräparate oder solche, die bei -80°C gelagert und für ca. 10-30 min bei RT aufgetaut wurden, verwendet. Bei allen Präparaten wurden die Auftragsstellen mit Fettstift umrandet, um das Auslaufen von aufgetragenen Lösungen zu verhindern. Alle Objektträger wurden zur Vorinkubation für 5 min in Färbekästen nach Hellendahl mit PBS gegeben. Anschließend wurden die Präparate in eine feuchte Kammer überführt, 150 µl 10% AB-Serum auf den Zellspot pipettiert und 20 min inkubiert. In diesem Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Danach wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgekippt, 150 µl einer 1:50 Verdünnung des Zytokeratin-Antikörpers bzw. bei der Isotypkontrolle eine 1:400-Verdünnung des MOPC-Antikörpers auf den Zellspot gegeben, und die Präparate wurden für weitere 45 min in der feuchten Kammer inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgekippt, die Objektträger in Färbekästen nach Hellendahl überführt und 3x3 min mit PBS gewaschen, in die feuchte Kammer zurückgelegt und 30 min mit einer 1:25 Verdünnung des Brückenantikörpers (Mouse

IgG, Dako) inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend vorsichtig abgekippt, in Färbekästen nach Hellendahl überführt, 3x3 min mit PBS gewaschen, in der feuchten Kammer mit 150 µl einer 1:50 APAAP-Antikörperlösung (Dako) je Zellspot versehen und 30 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde die Färbelösung in drei Schritten hergestellt. Die Angaben beziehen sich auf Färbekästen nach Hellendahl (100 ml). Bei Bedarf wurde die Menge entsprechend angepasst. Lösung 1 setzte sich aus 30 mg Levamisol, 20,5 ml 0,2 M TRIS und 62,5 ml Aqua dest. zusammen. Lösung 2 bestand aus 16 mg NaNO₂, das in 415 µl Aqua dest. gelöst wurde und 166 µl 5% Neufuchsin (in 2 M HCl). Die Lösung wurde durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Dabei bildeten sich Bläschen und Chlorgeruch entstand. Lösung 3 setzte sich aus 42 mg Naphtol-AS-Biphosphat und 500 µl N.N.-Dimethylformamid zusammen. Zuerst wurden Lösung 1 mit Lösung 2 gemischt, danach Lösung 3 zugeben und filtriert. Diese Reihenfolge musste eingehalten werden um eine funktionierende Färbelösung zu erhalten. Die Lösung war nach Filtration hellgelb und klar. Die Präparate wurden nach der letzten Inkubation mit Antikörperlösung erneut 3x3 min in Färbekästen nach Hellendahl gewaschen. Die Färbereaktion erfolgte ebenfalls in Färbekästen nach Hellendahl. Dazu wurde die frisch angesetzte Färbelösung in die Behälter gegeben und mit den Objektträgern 20 min inkubiert. Um überschüssige Farbpartikel zu entfernen, wurden die Präparate 1x3 min mit PBS, und um eventuelle entstehende Salzkristalle zu vermeiden 2x3 min mit Aqua dest. gewaschen. Anhand der mitgeführten Kontrollen wurde überprüft, ob die Färbung erfolgreich durchgeführt wurde. Die Positivkontrolle musste Zellen mit rot gefärbtem Cytoplasma und ungefärbtem Kern aufweisen; die MOPC-Isotypkontrolle durfte keine gefärbten Zellen enthalten. Eine eventuelle Gegenfärbung der Präparate mit Hämatoxilin (5 min mit einer 1:10 verdünnten Lösung in PBS ergab einen blauen Zellkern) erleichterte die Detektion der Zellen im Mikroskop. Die Auftragsstellen wurden mit 100 µl flüssiger Glyceringelatine bedeckt, das Deckgläschen aufgesetzt, leicht angedrückt und der Objektträger schräg gestellt, damit überschüssige Glyceringelatine ablaufen konnte. Ein akkurates Eindeckeln der Präparate war nötig, um die Zellen in der anschließenden mikroskopischen Auswertung im Hellfeld in derselben Fokussierungsebene zu erhalten.

2.5.1.2. Suspensionsfärbung

1×10^7 isolierte MNC wurden in 200 µl PBS-Lösung resuspendiert und die darin enthaltenen Tumorzellen mittels Magnetbeads angereichert (Kap 2.2.3.) Die so

gewonnenen Tumorzellen wurden jedoch nicht von den Magnetbeads abgetrennt, sondern direkt für eine APAAP-Färbung mittels Epimet-Kit (Micromet) eingesetzt. Die einzelnen Färbeschritte erfolgten in Reaktionsgefäßen mittels Magnetbeads. Die Färbung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die verschiedenen Waschschrirte wurde der Ansatz in eine Magnethalterung gestellt, die Flüssigkeit abgesaugt und verworfen. Als Waschlösung wurde RPMI-Medium mit 20% FKS verwendet. Resuspendiert wurde der fertig gefärbte Ansatz in 200 µl RPMI/20% FKS-Medium mit 200 U 37°C warmer DNase. Dieser Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert, in eine Magnethalterung gestellt, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und aufbewahrt. Die Beads wurden erneut mit 200 µl RPMI/20% FKS-Medium gewaschen, die Überstände vereinigt und die Beads verworfen. Die gefärbten Tumorzellen im Überstand wurden unter dem Mikroskop ausgewertet. Anschließende molekulare Charakterisierungen einzelner Zellen waren ohne aufwendige Mikrodisektion möglich. Dazu wurden diese mit einer Pipette unter dem Mikroskop einzeln gepickt.

2.5.2. Fluoreszenzfärbung

Alle Inkubationsschritte wurden bei RT und im Dunklen durchgeführt. Pro Patient wurden 2×10^6 Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker Her2/neu und/oder EpCAM analysiert. Die Antikörper waren direkt mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC (grün) oder *Texas-Red* (rot) gekoppelt. Wurden beide Antikörper simultan verwendet, mussten diese mit verschiedenen Farbstoffen markiert sein. Als Positivkontrollen wurden Cytozentrifugationspräparate mit Tumorzelllinien (SW480 und SKBR3) verwendet, die Her2/neu und EpCAM exprimierten. Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Gebrauchslösungen frisch hergestellt. Benötigt wurden 10% AB-Serum in PBS und Antikörperlösungen zu 1 µg/ml, wobei die Antikörper in 10% AB-Serum verdünnt wurden. Als Probenmaterial wurden frisch getrocknete Cytozentrifugationspräparate oder solche, die bei -80°C gelagert und für ca. 10-30 min bei RT aufgetaut wurden, verwendet. Bei allen Präparaten wurden die Auftragstellen mit Fettstift umrandet, um das Auslaufen von aufgetragenen Lösungen zu verhindern. Alle Objektträger wurden in Färbekästen nach Hellendahl mit 100 ml PBS für 5 min vorinkubiert. Anschließend wurden die Präparate in eine feuchte Kammer überführt, 150 µl 10% AB-Serum auf den Zellspot pipettiert und für 20 min inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgekippt,

150 µl Antikörperlösung auf den Zellspot gegeben, und die Präparate wurden weitere 45 min in der feuchten Kammer inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgekippt, die Objektträger wurden in Färbekästen nach Hellendahl überführt und 1x3 min mit PBS und 2x3 min mit Aqua dest. gewaschen. Die Präparate wurden mit 2 Tropfen Gel-Mount Medium (Biomedica, USA), das den Fluoreszenzfarbstoff konserviert, eingedeckelt. *Texas-Red* gefärbte Zellen wurden bei 612 nm Wellenlänge und FITC gefärbte Zellen bei 524 nm Wellenlänge im Fluoreszenzkanal detektiert.

2.5.3. Doppel- und Dreifachfärbungen

Für Doppel- und Dreifachfärbungen wurde die APAAP-Technik mit einer Fluoreszenzfärbung kombiniert. Pro Patient wurden 2×10^6 Zellen analysiert. Der Nachweis der Tumorzellen erfolgte zuerst durch Antikörper gegen Panzytokeratin (A45-B/B3) und anschließend durch fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen Her2/neu und/oder EpCAM, die mit FITC (grüne Fluoreszenz) und/oder *Texas-Red* (rote Fluoreszenz) markiert waren. Die Durchführung des Nachweises erfolgte bei RT und im Dunklen, sobald fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt wurden. Parallel wurden jeweils Isotypkontrollen und Positivkontrollen (Tumorzelllinien) angefärbt, um die Spezifität und Sensitivität des Nachweises zu dokumentieren. Die Objektträger wurden zur Vorinkubation für 5 min in 100ml PBS in Färbekästen nach Hellendahl inkubiert. Anschließend wurden die Präparate in eine feuchte Kammer überführt und mit 150 µl 10% AB-Serum für 30 min bedeckt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Flüssigkeit wurde abgekippt, auf die Zellspots 150 µl einer 1:50 Verdünnung (10% AB-Serum in PBS) des Panzytokeratin-Antikörpers (A45-B/B3) bzw. einer 1:400 Verdünnung der Isotypkontrolle (MOPC) aufgetragen und für 45 min inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgekippt, die Objektträger wurden in getrennten Färbekästen nach Hellendahl (A45-B/B3 und MOPC) 3x3min mit PBS gewaschen und wieder in die feuchte Kammer zurückgelegt. Die Präparate wurden anschließend mit einem Brückenantikörper (1:25 Verdünnung, 30 min, *Mouse Immunglobolins*) inkubiert, 3x3 min gewaschen, mit einem APAAP-Antikörper (1:50 Verdünnung, 30 min, *APAAP Mouse Immunglobulin*) inkubiert, erneut gewaschen und dann für 10 min mit 10% AB-Serum inkubiert, um die Präparate für die Fluoreszenzfärbung vorzubereiten. Die Flüssigkeit der Objektträger wurde abgekippt und die Präparate wurden mit je 1µg/ml fluoreszenzmarkiertem Antikörper (Her2/neu und/oder EpCAM) im Dunklen inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls im Dunklen. Die

Präparate wurden 3x3 min mit PBS gewaschen und anschließend in Färbekästen nach Hellendahl gefärbt. Für die Färbelösung wurde eine 1:100 Verdünnung in H₂O von BCIB/NBT (BCIP/NBT Substrate Kit, Zytomed, Berlin) hergestellt und die Objektträger wurden für 10 min mit dieser inkubiert. Die Präparate wurden anschließend 1x3 min mit PBS und 2x3 min mit H₂O gewaschen, mit fluoreszenzkonstanzierendem Medium (Gel-Mount) eingedeckelt und bei RT im Dunklen gelagert. APAAP gefärbte Zellen wurden im Hellfeld unter dem Mikroskop detektiert. *Texas-Red* gefärbte Zellen wurden bei 612 nm Wellenlänge und FITC gefärbte Zellen bei 524 nm Wellenlänge im Fluoreszenzkanal detektiert.

2.5.4. Molekulargenetische Nachweise

2.5.4.1. Qualitative PCR

Für den qualitativen Nachweis von Tumorzellen mittels PCR wurde Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial verwendet. Die Präparation erfolgte wie in Kapitel 2.3.3. beschrieben. Um falsch positive Resultate zu vermeiden, wurden Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation zuvor abgetrennt. Als Positivkontrolle wurde RNA der Karzinomzelllinien SW480 oder SKBR3 und als Negativkontrolle Wasser verwendet. Um die Qualität der RNA zu dokumentieren, wurde das Haushaltsgen Histon analysiert. Zuerst wurde die Gesamt-RNA mit spezifischen Primern (Kap. 2.8) in cDNA umgeschrieben (20 µl Ansatz mit 10 µl RNA, 100 pmol tumorspezifischem 3'-Primer, 25 pmol 3'-RNA-Kontrollprimer und DEPC-H₂O). Der *Reverse-Transkriptions*-Ansatz wurde 10 min bei 70°C im Thermoblock inkubiert, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen. Danach wurde die Reaktion sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde folgender Mix dazugegeben: 4 µl 5x *first-strand*-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl *Superscript* II. Der Ansatz wurde im Thermoblock inkubiert (50 min 42°C, 5 min 95°C, 5 min 4°C). Anschließend erfolgte die cDNA-Amplifikation für die verschiedenen Applikationen in getrennten Ansätzen. Es wurden je 5 µl cDNA als *template* eingesetzt (100 µl PCR-Ansatz, 10 µl 10x PCR-Puffer, 8 µl dNTP (10 mM), 3 µl MgCl₂, 100 pmol 5'-tumorassoziierter Primer, 50 pmol 3'-tumorassoziierter Primer oder 75 pmol 3'-RNA-Kontrollprimer, 100 pmol 5'-RNA-Kontrollprimer, 0,5 µl Taq-Polymerase, ad 100 µl mit Aqua dest.). Folgendes Programm wurde gewählt (Thermocycler: GeneAmp9700, Applied Biosystems, Weiterstadt): 2 min 95°C, (30 s 95°C, 45 s 55°C, 1 min 72°C) 35 Zyklen, 7 min 72°C,

4°C ∞. 1 µl einer 1:100 Verdünnung der tumorassoziierten PCR wurde für die anschließende *nested-PCR* eingesetzt (50 µl Ansatz, 5 µl 10x PCR-Puffer, 4 µl dNTP (10 mM), 1,5 µl MgCl₂, je 50 pmol der tumorassoziierten Primer, 0,25 µl Taq-Polymerase, ad 100 µl mit Aqua dest.). Der PCR-Ansatz wurde erneut im Thermocycler inkubiert (2 min 95°C, (30 s 95°C, 45 s 55°C, 1 min 72°C) 30 Zyklen, 7 min 72°C, 4°C ∞). 10 µl *nested-tumorassoziiertes* PCR-Ansatz sowie Kontroll-PCR (mit 10% Blaumarker versetzt) wurden auf einem 10% PAA-Gel (10 ml ddH₂O, 4 ml 30% Acrylamid, 1,5 ml 10x TBE, 100 µl 10% APS, 16µl TEMED) bei 60 mA für 40 min aufgetrennt. Zur Bestimmung der erhaltenen Bandengrößen wurde ein Längenstandard (Nr. 8, Roche, Penzberg) aufgetragen. Das Gel wurde anschließend in 5% Ethidiumbromidlösung gefärbt, unter UV-Licht gelegt und für die Auswertung mit einer Digitalkamera fotografiert (Digidoc, Biozym). Die Wasserkontrolle durfte keine Amplifikate enthalten. Die Kontrolle ergab ein 215 bp-Fragment. Die Größe des tumorassoziierten Signals variierte je nach Applikation (Kap. 2.8).

2.5.4.2. Quantitative PCR

Für die Bestimmung der Tumorzellbelastung wurde eine quantitative PCR am *LightCycler* Instrument von Roche etabliert. Dazu wurden sowohl ein tumorspezifischer Standard als auch ein Kontrollstandard (Haushaltsgenstandard) kloniert (Kap. 2.5.4.3.). Die RNA-Präparation erfolgte wie in Kapitel 2.3.3. beschrieben. Das Umschreiben von mRNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des AMV-*Reverse-Transkriptase-Kits* (Roche, Penzberg). Für einen 20 µl Ansatz wurden 10 µl Gesamt-RNA verwendet. Dazu wurden 1x 10-fach Reaktionspuffer, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP-Mix, 1,6 µg Oligo-p(dT)₁₅-Primer und 20 U AMV *Reverse Transkriptase* zum RNA-Ansatz gegeben. Der Ansatz wurde anschließend im Thermocycler 10 min bei 25°C, 60 min bei 42°C, 5 min bei 99°C und 5 min bei 4°C inkubiert. Die cDNA wurde sofort für die folgende quantitative *Real-time-PCR* eingesetzt. Diese wurde mit Hilfe des *LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kits* von Roche Diagnostics durchgeführt. Der PCR-Mastermix für den Tumorzellnachweis setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 0,5 µM 3'-LC-Primer, 0,5 µM 5'-LC-Primer, 3 mM MgCl₂, 1x *LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Mix*, ad 20 µl mit Aqua dest. Der Mastermix für das Haushaltsgen PBGD wurde mit einer 4 mM MgCl₂-Konzentration hergestellt. Die Mastermixe wurden in Glas-Kapillaren vorgelegt, 2 µl der erhaltenen cDNA und jeweils 2 µl der entsprechenden Standards zugegeben, die Ansätze abzentrifugiert (*LightCycler* Zentrifuge, Roche, Penzberg) und in das

LightCycler Instrument zur Analyse gegeben. Das Gerät wurde nach folgendem Schema programmiert:

Präinkubation:

Cycle Program Data	Value
Cycles	1
Analysis Mode	None
Temperature Targets	Seg. 1
Target Temperature (°C)	95
Inkubation time (h:min:s)	3:00
Temperature Transition Rate (°C/s)	20.0
Secondary Target Temperature (°C)	0
Step Size (°C)	0.0
Step Delay (Cycles)	0
Aquisition Mode	None

Amplifikation:

Cycle Program Data	Value		
Cycles	45		
Analysis Mode	Quantification		
Temperature Targets	Seg. 1	Seg. 2	Seg. 3
Target Temperature (°C)	95	60	72
Inkubation time (h:min:s)	15	5	10
Temperature Transition Rate (°C/s)	20.0	20.0	20.0
Secondary Target Temperature (°C)	0	0	0
Step Size (°C)	0.0	0.0	0.0
Step Delay (Cycles)	0	0	0
Aquisition Mode	None	None	Single

Melting Curve Analysis:

Cycle Program Data	Value		
Cycles	1		
Analysis Mode	Melting Curves		
Temperature Targets	Seg. 1	Seg. 1	Seg. 1
Target Temperature (°C)	95	65	95
Inkubation time (h:min:s)	0	15	0
Temperature Transition Rate (°C/s)	20.0	20.0	0.1
Secondary Target Temperature (°C)	0	0	0
Step Size (°C)	0.0	0.0	0.0
Step Delay (Cycles)	0	0	0
Aquisition Mode	None	None	Cont.

Cooling:

Cycle Program Data	Value
Cycles	1
Analysis Mode	None
Temperature Targets	Seg. 1
Target Temperature (°C)	40
Inkubation time (h:min:s)	30
Temperature Transition Rate (°C/s)	20.0
Secondary Target Temperature (°C)	0
Step Size (°C)	0.0
Step Delay (Cycles)	0
Aquisition Mode	None

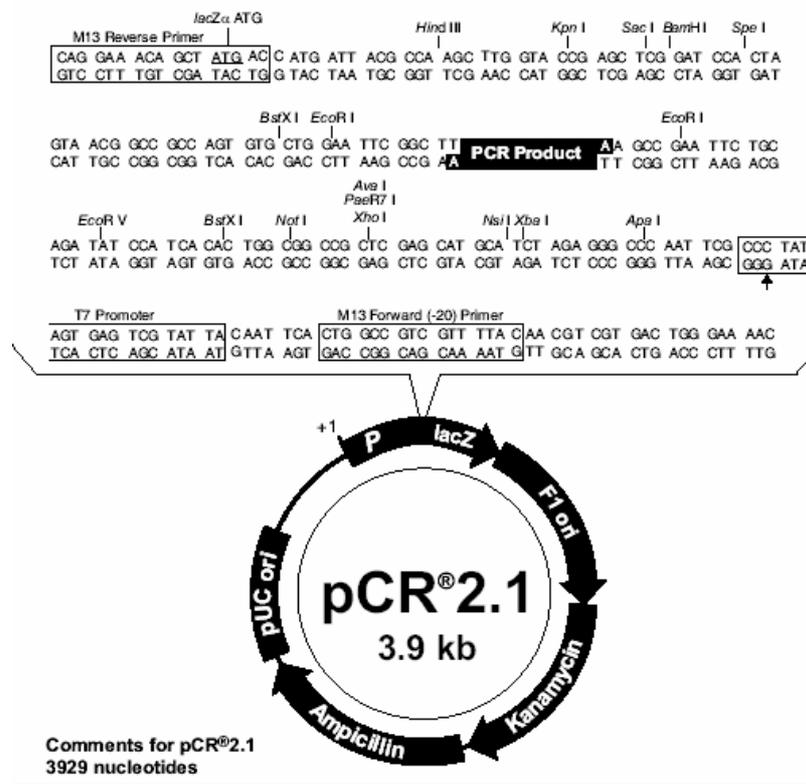
Setting the Fluorescence Parameters:

Fluorimeter Gain	Value
Channel 1 (F1)	5
Channel 2 (F2)	15
Channel 3 (F3)	30

Anhand der Standards konnte die Tumorzellbelastung der einzelnen Proben ermittelt werden. Dazu wurde das *Quantification-Programme* des *LightCycler* Instruments verwendet. Die Spezifität der Amplifikate wurde durch das *Melting-Curve-Programm* überprüft. Mit Hilfe der Schmelztemperatur konnte das spezifische Produkt identifiziert werden.

2.5.4.3. Konstruktion der Standards

Um reproduzierbare Kontrollen für die *Real-time*-PCR zu erhalten und um die Menge an amplifiziertem Produkt exakt bestimmen zu können, wurden sowohl die tumorassoziierten Marker Her2/neu und EpCAM als auch das Haushaltsgen PBGD kloniert. Dazu wurde der *TA-Cloning*-Kit von Invitrogen, Karlsruhe, verwendet. Die DNA-Taq-Polymerase fügt am 3'-Ende von PCR-Produkten einen einzelnen Adenosinrest (A) an. Der linearisierte pCR[®]2.1-Vektor besitzt am 3'-Ende einen einzelnen Thymidinrest (T). Dadurch wird eine effiziente und schnelle Insertion und Ligation des PCR-Produktes in den Vektor gewährleistet. Folgende Abbildung macht das Konzept der Klonierung deutlich:



Die *Multiple Cloning Site* ist mit einem inserierten PCR-Produkt dargestellt. Mit Hilfe des *pUC-Origin* wird eine hohe Replikationsrate in *E. coli* gewährleistet. Ein *Blau/Weiß-Screening* der erhaltenen Klone wird durch den *lacZ*-Promotor ermöglicht. Eine *EcoRI*-Schnittstelle flankiert auf beiden Seiten das PCR-Produkt. Der Pfeil bezeichnet den Start der Transkription der T7 RNA-Polymerase. Mit Hilfe der M13 *Forward*- und *Reverse-Priming-Sites* wird das Sequenzieren zur Verifizierung des inserierten PCR-Produkts ermöglicht.

Zuerst wurde Tumormarker-RNA aus der Tumorzelllinie SKBR3 mit spezifischen Primern *revers transkribiert* und amplifiziert. Das Amplifikat wurde auf ein Gel aufgetragen und unter UV-Licht ausgeschnitten. Mit Hilfe des *Qia-Quick Gel Extraktion*-Kits (Qiagen, Hilden) wurde das Fragment gereinigt und anschließend für die Ligation eingesetzt. Für die Ligation wurde ein Verhältnis von PCR-Produkt zu Vektor von 1:1 verwendet. Die benötigte Menge an PCR-Produkt wurde nach folgender Formel abgeschätzt:

$$x \text{ ng PCR-Produkt} = (\text{bp des PCR-Produkts}) \times (50 \text{ ng Vektor}) / 3900 \text{ (Vektorgröße)}$$

In einem 10 μ l Ligations-Ansatz wurden x μ l frisches PCR-Produkt, 1x 10-fach Ligationspuffer, 50 ng Vektor und 4 U T4 DNA-Ligase eingesetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert. Die Ligation wurde anschließend direkt für die Transformation eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt. Die Transformationsplatten (LB₀-Nährboden mit 100 μ g/ml Ampicillin und 40 μ l 40 mg/ml X-Gal pro Platte) wurden 30 min bei 37°C, das SOC-Medium (1 ml) bei 42°C vorgewärmt. Die kompetenten Zellen (One Shot[®] INV α F', pro Ansatz ein Cup mit 50 μ l) wurden sehr vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit 2 μ l des Ligationsansatzes durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Der Ansatz wurde anschließend 30 min auf Eis inkubiert, 30 s auf 42°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Jeder Ansatz wurde mit 250 μ l des vorgewärmten SOC-Mediums versetzt, 1 h bei 37°C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert und anschließend vollständig auf einer Transformationsplatte ausplattiert und mindestens 18 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Sobald weiße und blaue Kolonien sichtbar wurden, wurden bis zu 10 weiße Kolonien gepickt und in jeweils 10 ml LB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicillin) bei 37°C unter Schütteln angezogen und anschließend die DNA isoliert (Kap. 2.3.2.). Mittels eines Restriktionsverdau mit *EcoRI* wurde das Vorhandensein eines *Inserts* verifiziert. Ein positiver Klon wurde durch Sequenzierung weiter charakterisiert, um die Orientierung des inserierten Stückes zu bestimmen. Es wurden nur Klone mit *Forward*-Richtung des inserierten PCR-Produkts für die weiteren Analysen verwendet. Die Standards wurden in 10er Schritten von 10⁶ Molekülen bis 1 Molekül pro μ l verdünnt. Die Plasmidkonzentration wurde wie folgt in Moleküle pro μ l umgerechnet:

$$\frac{(\text{bp des Plasmids} + \text{bp des Inserts}) \times 2 \times 330 \text{ Da/Mol dsDNA}}{6,022 \times 10^{23} \text{ Moleküle/Mol}} = \text{Attogramm pro Molekül}$$

$$\frac{\text{Konzentration des Plasmids in } \mu\text{g}/\mu\text{l}}{\text{Attogramm/Molekül}} = \text{Moleküle pro } \mu\text{l}$$

2.5.5. Multiple Charakterisierung von Tumorzellen mittels PCR

Nach erfolgter mRNA-Isolierung aus angereicherten Tumorzellen (Kap. 2.3.4.) wurde die erhaltene Bead-mRNA-Suspension für eine qualitative PCR-Bestimmung eingesetzt, wie in Kapitel 2.5.4.1. beschrieben. Zur Auswertung wurden die erhaltenen Fragmente auf ein 10% PAA-Gel zusammen mit einem Längenstandard aufgetragen und ausgewertet. Anschließend wurde der Ansatz weiter charakterisiert. Die 1. PCR des tumorassoziierten Nachweises wurde in eine Magnethalterung gestellt und 2x mit PCR-Puffer gewaschen. Anschließend wurde erneut ein tumorassoziiertes PCR-Mastermix zugegeben, der für einen Tumormarker spezifisch war. Die qualitative PCR erfolgte erneut wie in Kapitel 2.5.4.1. beschrieben. Diese Analytik konnte bis zu 3x hintereinander durchgeführt werden, wodurch drei verschiedene tumorassoziierte Marker parallel aus einem Ansatz bestimmt werden konnten.

2.6. *In situ* Hybridisierung

2.6.1. CISH (Chromogen *in situ* Hybridisierung)

Für die Chromogen *in situ* Hybridisierung wurden Cytozentrifugationspräparate (Kap. 2.1.3.) verwendet. Alle Schritte erfolgten, sofern nicht anders erwähnt, in Färbekästen nach Hellendahl. Zuerst wurden die Objektträger 2 h mit 2x SSC bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit Pepsinlösung 5 min inkubiert, um die Zellkernmembran für die Sonde permeabel zu machen. Danach wurden die Präparate 2x4 min mit PBS gewaschen, in Formaldehydlösung fixiert und anschließend erneut gewaschen. Die Präparate wurden danach in einer Ethanolreihe (70%, 85%, 100%) bei 4°C je 1 min entwässert und anschließend getrocknet. Für die Denaturierung der Präparate wurden diese in einer Formamid/SSC-Lösung (70%

Formamid, 2x SSC, pH 7,0) bei 68°C 2 min im Wasserbad inkubiert und anschließend in der Ethanolreihe erneut entwässert. Eine Sonde gegen den Tumormarker Her2/neu (Zytomed, Berlin) wurde bei 80°C 5 min im Thermocycler denaturiert. 8 µl der Sonde wurden auf je ein Deckgläschen aufgetragen und der Spot vorsichtig damit bedeckt. Die Ränder wurden mit Fixogum (Fotoladen) abgedichtet, damit keine Feuchtigkeit entweichen konnte. Die Präparate wurden über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer im Dunklen inkubiert. Das Fixogum wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und die Objektträger wurden in 0,5x SSC für 5 min bei 72°C und anschließend 3x2 min bei RT in PBS/0,025% Tween gewaschen. Für die weitere Detektion wurde der *CISH-Detection*-Kit (Zytomed, Berlin) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zum Schluss wurden die Präparate mit 37°C warmer Glyceringelatine (pH 7, eingestellt mit TRIS/EDTA-Puffer) eingedeckelt und bei RT bis zur mikroskopischen Auswertung gelagert.

2.6.2. FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung)

Für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden Cytozentrifugationspräparate (Kap. 2.1.3.) verwendet. Die Präparate wurden wie in Kapitel 2.6.1. beschrieben vorbereitet. Bei der Verwendung von direktfluoreszenzmarkierten Her2/neu-DNA-Sonden wurden die Präparate für die anschließende Detektion mit DAPI-II-Lösung eingedeckelt. Bei der Verwendung der Zymed-Her2/neu-DNA-Sonde wurden die Präparate anschließend für 10 min mit *CAS-Blocking*-Reagenz (Zytomed Detection-Kit) oder mit 10% AB-Serum in PBS inkubiert. Danach wurde 1 h im Dunklen mit der Antikörper *FITC-Sheep-Anti-Dig-Lösung* (Zytomed Detection-Kit) inkubiert und anschließend 3x2 min mit PBS/0,025% Tween bei RT gewaschen. Der Zellspot wurde für die Detektion mit DAPI-II-Lösung eingedeckelt. Die Präparate wurden bis zur Auswertung bei RT und im Dunklen gelagert.

2.6.3. Kombination von APAAP/FISH oder APAAP/CISH

Zur weiteren Charakterisierung der identifizierten Tumorzellen wurde anschließend an eine immunzytochemische APAAP-Färbung eine *in situ* Hybridisierung mit einer Her2/neu-DNA-Sonde durchgeführt. Die Koordinaten der identifizierten Zellen wurden mit dem *New England-Finder* bestimmt und notiert. Die ausgewerteten Objektträger wurden 2 h in 2x SSC bei 45°C inkubiert, um die Objektträgerdeckel

abzulösen. Danach wurde je nach Fragestellung ein *CISH*- oder *FISH*-Nachweis (Kap. 2.6.) durchgeführt. Für die Auswertung wurden die notierten *New-England-Finder*-Koordinaten am Mikroskop angewählt und der Her2/neu-Status bestimmt.

2.7. Mikroskopische Beurteilung von Tumorzellen

2.7.1. Manuelle Auswertung

Die Bewertung von Tumorzellen erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops im Hellfeld. Tumorzellen erhielten durch die Markierung mit dem Panzytokeratin-Antikörper A45-B/B3 und den folgenden Brücken- und APAAP-Antikörpern eine rote (Substrat Neufuchsin) bzw. blaue (Substrat BCIP/NBT) Färbung. Dabei wurde ausschließlich das Cytoplasma angefärbt. Zur positiven Beurteilung einer Tumorzelle wurden noch weitere Kriterien hinzugezogen. Die gefärbte Zelle musste intakt sein, d.h. sie musste eine geschlossene Zellwand aufweisen und homogen angefärbt sein. Weiterhin musste der Zellkern als weißen Hohlraum deutlich durch Fokussieren erkennbar sein. Färbeniederschläge sowie rote oder blaue Krümel in der Nähe der vermeintlichen Tumorzelle waren ein Ausschlusskriterium für die positive Beurteilung. Falls die gefundene Zelle als Tumorzelle eingestuft wurde, musste die Isotypkontrolle auf unspezifisch angefärbte Zellen untersucht werden. War die Isotypkontrolle negativ, konnten die gefundenen Zellen als Tumorzellen (positiv) bewertet werden. Falls die Isotypkontrolle positiv ausfiel, wurde das Präparat als nicht auswertbar eingestuft. Anschließend erfolgte durch Doppel- oder Dreifachfärbung und Fluoreszenzmikroskopie (Kap. 2.5.3.) die weitere Charakterisierung der Tumorzellen auf die Tumormarker Her2/neu und EpCAM. Bei einer weiterführenden *in situ* Hybridisierung zur Bestimmung der Genamplifikation von Her2/neu wurde diese im Hellfeld durch schwarze Punkte (*CISH*-Analyse) oder durch fluoreszierende grüne Punkte (*FISH*-Analyse) im Zellkern deutlich (Kap. 2.6.). Eine Genamplifikation von Her2/neu zeichnete sich durch das Vorhandensein von mindestens vier sichtbaren Punkten im Zellkern der Tumorzelle aus. Die Koordinaten der identifizierten und für positiv befundenen Zelle wurden anhand des *New-England-Finders* notiert und dokumentiert.

2.7.2. Auswertung mittels automatisierter Mikroskope

Das *Micrometastasis Detection System* (MDS, Applied Imaging, Newcastle, England) ist in der Lage, einen Objektträger selbständig zu analysieren und gefärbte Tumorzellen zu detektieren. Zusätzlich konnte mittels eines Fluoreszenzkanals die weiterführende Charakterisierung der Tumorzellen (Doppel- und Dreifachfärbung, FISH) ermöglicht werden. Das MDS besitzt zwei verschiedene Funktionen: das Analysieren (*Scanning*) von Objektträgern, das individuell je nach Applikation programmiert werden kann, sowie das Wiederauffinden (*Reviewing*) der Tumorzellen. Das *Reviewing* erlaubt das manuelle als auch automatisierte Wiederauffinden von bereits identifizierten Zellen, wodurch eine erneute Beurteilung ermöglicht wird. Dazu werden *New-England-Finder-Koordinaten* verwendet. Die Kriterien zur Beurteilung von Tumorzellen entsprechen denen in Kapitel 2.7.1.

Das Ariol-System ist eine Weiterentwicklung des MDS. Hier steht ein System zur Verfügung, das einen hohen Probendurchsatz erlaubt. Bis auf die Fluoreszenzapplikation stehen alle Funktionen des MDS zur Verfügung. Zur weiteren Charakterisierung (Doppel- und Dreifachfärbung, FISH) von Tumorzellen mussten diese somit auf das MDS übertragen werden. Das Wiederfinden der Tumorzellen erfolgte ebenfalls über *New-England-Finder-Koordinaten*.

2.8. Primer, Antikörper und Lösungen

Primersequenzen: alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion, München, bezogen.

Primer	Sequenz (5'-3')	Produktgröße in Basenpaaren (bp)
CK20 3'RT	GCGTTTATGGGGGTGCTGGAG	
CK20 5'RT	AAGGCTCTGGGAGGTGCGTCTC	
CK20 3'nested	TCGGCGGGGACCTGTTTG	485
CK20 5'nested	CAGTGTGGCCAGATGCTTGTG	
Her2/neu 3'RT	CTCCACCAGCTCCGTTTCC	
Her2/neu 5'RT	GACCTGGATGACAAGGGCTG	
Her2/neu 3'nested	GGATCTTCTGCTGCCGTCG	100
Her2/neu 5'nested	CCTCTGACGTCCATCGTCTC	
Her2/neu 3'LC	CTCCACCAGCTCCGTTTCC	189
Her2/neu 5'LC	GACCTGGATGACAAGGGCTG	
EpCAM 3'RT	CATCATTCTGAGTTTTTTGAGAAG	
EpCAM 5'RT	TGCCGCAGCTCAGGAAGAATGTGT	
EpCAM 3'nested	GATCCAGTAGGTTCTCACTC	200
EpCAM 5'nested	CTTGGGAGAAGAGCAAACC	
EpCAM 3'LC	GATCCAGTAGGTTCTCACTC	200
EpCAM 5'LC	CTTGGGAGAAGAGCAAACC	
EGF-R 3'RT	TCGCACTTCTTACACTTGCG	
EGF-R 5'RT	TCTCAGCAACATGTGCGATGG	
EGF-R 3'nested	CAAAGCTGTATTTGCCCTGC	248
EGF-R 5'nested	AGAACTGCCAGAACTGACC	
MAGE1 3'RT	CAGGAGCTGGGCAATGAAGAC	
MAGE1 5'RT	GTAGAGTTCGGCCGAAGGAAC	
MAGE1 3'nested	CTGGGCAATGAAGACCCACA	143
MAGE1 5'nested	TAGAGTTCGGCCGAAGGAAC	
Histon 3'	GCG TGC TAG CTG GAT GTC TT	215
Histon 5'	CCA CTG AAC TTC TGA TTC GC	
PBGD 3'	TTGGGTGAAAGACAACAGCATC	328
PBGD 5'	AGAGTGATTTCGCGTGGGTACC	
PBGD 3'LC	TTGGGTGAAAGACAACAGCATC	328
PBGD 5'LC	AGAGTGATTTCGCGTGGGTACC	

Antikörper:

A45-B/B3 Anti Zytokeratin 8, 18, 19	Micromet, München
APAAP, <i>Mouse Immunglobulin</i>	Dako, Hamburg
Brücke, <i>Mouse Immunglobulins</i>	Dako, Hamburg
CD3	Becton Dickinson, USA
CD14	Becton Dickinson, USA
EpCAM	TRION Pharma GmbH, München
Her2/neu	TRION Pharma GmbH, München
MOPC	Sigma, München
removab [®] Anti-CD3, Anti-EpCAM	TRION Pharma GmbH, München
rexomun [®] Anti-CD3, Anti-Her2/neu	TRION Pharma GmbH, München

Lösungen:

10% PAA-Gel	10 ml ddH ₂ O, 4 ml 30% Acrylamid, 1,5 ml 10 x TBE, 100 µl 10% APS, 16µl TEMED
AB-Serum	Biotest, Berlin
Blaumarker	40% Sucrose, 5 mg/ml Xylencyanol, 5 mM EDTA
BSA	Biochrom, Berlin
DNase	Roche, Penzberg
Dynabeads	Dynal, Norwegen
Erythrozytenlysepuffer	1,0 g KHCO ₃ ; 8,3 g NH ₄ Cl; 0,0372 g EDTA Titriplex III; pH 7,4 ad 1000 ml Aqua dest.
Ficoll	Oncogene Research
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehydlösung	64 ml PBS, 3,5 ml 1 M MgCl ₂ , 1,9 ml Formaldehyd
GIT-Puffer	4 M Guanidinium Thiocyanat; 25 mM Natriumcitrat pH 7,0; 0,5% N-Lauroylsarcosin; 0,1 M Mercaptoethanol
Hanks-Lösung	Biochrom, Berlin
LB ₀ -Medium	10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl pH 7,4
PBS	90 g NaCl + 14,33 g Na ₂ HPO ₄ + 2,67 g KH ₂ PO ₄ ; mit A. d. auf 10 l auffüllen
Pepsinlösung	35 µl Pepsin (10% Lsg.), 69 ml H ₂ O, 0,7 ml 1 N HCl
SSC	20x Puffer, 175,3 g NaCl, 88,2 g NaCitrat, pH 7,4 ad 1000 ml Aqua dest.

2.9. Geräte und Verbrauchsmaterialien**Geräte:**

Ariol [®]	Applied Imaging, England
Digidoc [®]	Biozym, Hamburg
<i>LightCycler</i> [®]	Roche, Penzberg
MDS [®]	Applied Imaging, England
Thermocycler	Applied Bioscience, Weiterstadt
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	Hettich, Sigma, München

Verbrauchsmaterialien:

Chemikalien	Sigma, München
Objektträger	Laborbedarf Schubert
Pipetten	Gilson, Langenfeld
Plastikware	Sarstedt, Nümbrecht
Taq-Polymerase, Nukleotide und Puffer	Invitrogen, Karlsruhe

2.10. Abkürzungen

Aqua dest.	Aqua destilata	ddH ₂ O	doppeldestilliertes Wasser
AK	Antikörper	IDT	isolierte disseminierte Tumorzelle
APS	Ammoniumpersulfat	LB ₀	Luria Bertani
bp	Basenpaare	Lsg	Lösung
BSA	Bovine Serum Albumin	MNC	Mononucleäre Zellen
cDNA	komplementäre DNA	MRD	Minimal Residual Disease
CISH	Chromogen <i>in situ</i> Hybridisierung	mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrokarbonat	PAA	Polyacrylamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBGD	
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate	PBS	<i>Phosphat Buffert Saline</i>
DTT	Dithiotreitol	PCR	Polymerasekettenreaktion
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat	RNA	Ribonukleinsäure
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß	rpm	<i>Rounds per minute</i>
EtOH	Ethanol	RT	Raumtemperatur
FACS	<i>Fluorescence activated cellsorter</i>	TBE	TRIS <i>buffert</i> EDTA
FKS	Fötales Kälber Serumalbumin	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenethylendiamin
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	trAK	trifunktionelle Antikörper, <i>triomab</i>
FITC	Fluorescein-isothiocyanat	ÜN	über Nacht
GIT	Guanidiniumisothiocyanat	Upm	Umdrehungen pro Minute

3. ERGEBNISSE

3.1. Etablierung einer selektiven Anreicherung von isolierten disseminierten Tumorzellen

Die derzeitige Standardmethode (Goldstandardmethode) zur Detektion von MRD beruht auf der Analyse von zwei Millionen isolierten mononukleären Zellen (MNC) mittels immunzytochemischer Färbung und anschließender mikroskopischer Auswertung (Pantel et al., 1996). Da die typische Tumorzellbelastung eines MRD-Patienten eine bis fünf isolierte disseminierte Tumorzellen (IDT) pro 10^6 MNC beträgt, wird die Wahrscheinlichkeit einer Detektion durch Verwendung dieser relativ geringen Anzahl von MNC wesentlich vermindert. Diese niedrige Sensitivität könnte die Ursache für falsch negative Befunde sein (Pantel and Otte, 2001b). Um dies zu vermeiden und um eine höhere Sensitivität zu erreichen, müsste eine entsprechend höhere Zellzahl untersucht werden, was für die Analyse von großen Probenmengen jedoch ineffektiv wäre. Um dies praktikabel durchführen zu können, wurde untersucht, ob sich die seltenen IDT aus der MNC-Fraktion selektiv anreichern lassen. Zusätzlich wurde überprüft, ob sich diese Methode für die Routinediagnostik eignet. Zur Anreicherung der IDT wurden magnetische Microbeads verwendet, an die ein Antikörper kovalent gekoppelt war. Dieser war gegen das Oberflächenprotein EpCAM (BerEP4/HEA/17-1A) gerichtet. EpCAM gehört zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle und wird auf Tumoren epithelialen Ursprungs exprimiert. Durch das häufige Vorkommen bei verschiedenen Tumorentitäten (z.B. Brust, Eierstock, Magen, Lunge, Darm und Bauchspeicheldrüse) stellt EpCAM einen wichtigen Marker für MRD dar (Pantel et al., 1997); (Gruber et al., 1996).

Zuerst wurden verschiedene kommerziell erhältliche Anreicherungssysteme zur Tumorzellidentifikation miteinander verglichen. Als Ausgangsmaterialien wurden Blut, Knochenmark und Aszitesflüssigkeit verwendet. Diese wurden sowohl im unbehandelten Zustand als auch als Einzelzellsuspensionen von isolierten MNC, die durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden (Kap. 2.1.2.), eingesetzt. Bei Verwendung der unbehandelten Ausgangsmaterialien zeigte sich

jedoch nach Zugabe der Magnetbeads, unabhängig vom Hersteller, in allen Fällen eine Aggregation des Zellmaterials. Dies machte die eigentliche Anreicherung der Tumorzellen unmöglich. Deshalb wurden in den folgenden Experimenten ausschließlich isolierte MNC zur Anreicherung verwendet.

Um die Ausbeute der verschiedenen Anreicherungssysteme zu ermitteln, wurden 1×10^7 isolierte MNC aus Blut von gesunden Spendern mit 10 oder 100 SKBR3-Tumorzellen versetzt. Die Anreicherung der Tumorzellen erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Anschließend wurden die angereicherten Zellfraktionen auf Objektträger aufgebracht (Zytospin, Kap. 2.1.3.) und die Tumorzellen immunzytochemisch mit einem A45-B/B3 Panzytokeratin-Antikörper spezifisch nachgewiesen (Kap. 2.5.1.1.). Der simultane Nachweis von verschiedenen Zytokeratinen besitzt eine sehr hohe Spezifität gegenüber disseminierten Tumorzellen solider Tumoren (Schlimok et al., 1987). Die Bestimmung der Ausbeute wurde mit Hilfe des *Micrometastasis Detection Systems* (MDS) durchgeführt (Kap. 2.7.2.).

Tabelle 1 stellt die repräsentativen Ausbeuten der verschiedenen Anreicherungssysteme von insgesamt fünf unabhängig durchgeführten Versuchen dar. Keines der getesteten Systeme wies eine vollständige Ausbeute der Tumorzellen auf. Das *CELLlection™ Dynabeads Epithelial Enrich-System* der Firma Dynal erwies sich mit einer Ausbeute von durchschnittlich 55% als das effektivste System und wurde deshalb als Grundlage für weitere Versuche verwendet.

Tab. 1: Vergleich verschiedener Systeme zur Anreicherung von Tumorzellen.

Anreicherungssystem	HEA-Beads MACS (Miltenyi)		TumorcCell-Enrichment and Detection-Kit MACS (Miltenyi)		CELLlection™ Dynabeads Epithelial Enrich (Dynal)	
	10	100	10	100	10	100
SKBR3-Tumorzellen pro 1×10^7 MNC	10	100	10	100	10	100
Ausbeute	40%	50%	35%	45%	50%	60%

Dieses System wurde anschließend mit der Goldstandardmethode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen verglichen. Dazu wurden MNC mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmark von zehn Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren gewonnen (Kap. 2.1.2.). Für die Goldstandardmethode wurden 2×10^6 Zellen direkt mittels bereits beschriebener

Färbung analysiert (Kap. 2.5.1.1.). Zur Anreicherung von Tumorzellen aus der MNC-Fraktion wurden 1×10^7 Zellen mit 2×10^7 Magnetbeads (*CELLlection™ Dynabeads Epithelial Enrich-System*; Dynal) inkubiert. Dieses System besteht aus magnetischen Beads, an die über einen Nukleotidlinker anti-EpCAM (BerEp4)-Antikörper gekoppelt waren (Abb. 2). Durch Inkubation mit DNase ließ sich der DNA-Linker spezifisch spalten und so die über den Antikörper gebundenen Tumorzellen von den Beads abtrennen, die den anschließenden immunzytochemischen Nachweis der Tumorzellen behindern hätten.

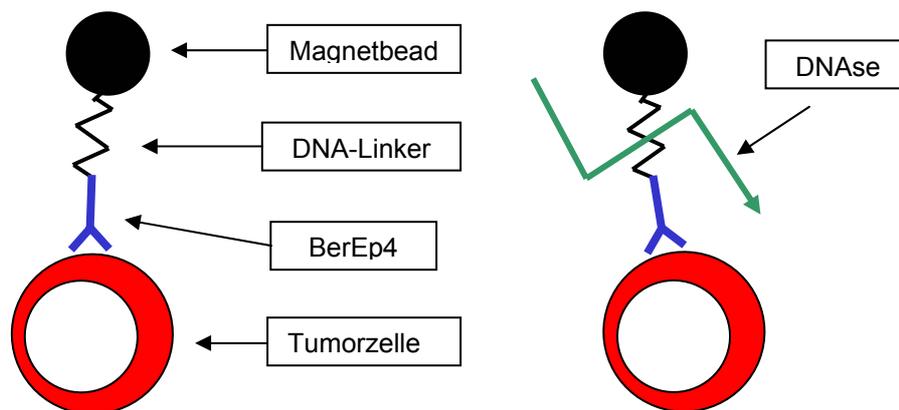


Abb. 2: Schematische Darstellung der BerEp4-gekoppelten Magnetbeads (Dynal).

Die Magnetbeads (schwarze Kugel) sind mit dem tumorassoziierten Antikörper BerEp4 (blaues Y) gekoppelt, der somit an Tumorzellen (rote Kugel) binden kann, die dieses Antigen präsentieren. Die Kopplung der Antikörper lässt sich mittels eines DNase-Verdau (grüner Pfeil) des DNA-Linkers (schwarze Zickzack-Linie) lösen.

Nach erfolgter Bindung der Tumorzellen an die Beads wurde der Ansatz in einem Magneten inkubiert, um nicht gebundene Zellen abzutrennen. Das Bead/Tumorzellgemisch wurde mehrmals gewaschen, anschließend wurden die Beads mit Hilfe eines DNase-Verdau von den Tumorzellen abgetrennt. Die angereicherten Tumorzellen wurden auf Objektträger aufgetragen und mit einem Panzytokeratin-Antikörper (A45-B/B3) inkubiert. Dieser wurde anschließend mittels einer immunzytochemischen APAAP-Färbung (Kap. 2.5.1.1.) nachgewiesen. Abbildung 3 zeigt exemplarisch die Anfärbung zweier angereicherter Tumorzellen. Nicht-Tumorzellen wurden erwartungsgemäß nicht angefärbt, da sie kein Zytokeratin enthalten.

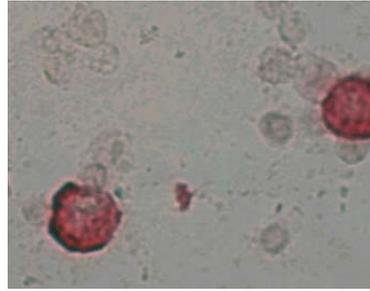


Abb. 3: Detektion von angereicherten Tumorzellen.

Die Tumorzellen wurden mittels *CELLection™ Dynabeads Epithelial Enrich-System* (Dyna) angereichert und immunzytochemisch mittels eines Panzytokeratin-Antikörpers und APAAP-Färbung nachgewiesen.

Wie in Tabelle 2 gezeigt, wies die Anreicherung von Tumorzellen im Vergleich zur Goldstandardmethode eine wesentlich höhere Nachweissensitivität auf, die vom Primärtumor unabhängig war. Während mittels Goldstandardmethode nur in einer Probe von insgesamt zehn eine Tumorbelastung nachgewiesen werden konnte, wurden mittels Anreicherung in sechs Proben Tumorzellen detektiert (Tab. 2). Die Tumorzellbelastung pro Patient war auf Grund der unterschiedlich untersuchten Zellzahl nicht direkt vergleichbar. Eine auffallend hohe Tumorzellbelastung wurde bei Patient 5 und 10 beobachtet. Sogar hier war der herkömmliche Nachweis von disseminierten Tumorzellen negativ. Um eine vergleichbare Effizienz mit der Goldstandardmethode zu erreichen, hätte vermutlich die zehnfache Anzahl von Zellen eingesetzt werden müssen, was einem höheren Arbeits- und Zeitaufwand entsprochen hätte. Multicenterstudien mit großen Patientenzahlen wären daher mit der Goldstandardmethode nur schwer durchzuführen. Aufgrund der Anreicherung von Tumorzellen mittels Magnetbeads konnte sowohl eine höhere Quantität als auch Qualität des Tumorzellnachweises erreicht werden (Tab. 2). Mit Hilfe des Anreicherungsverfahrens reduzierte sich die Anzahl der zu untersuchenden Präparate pro Patient bei gleichzeitig höherer Sensitivität der Tumorzelldetektion. Dies zeigt auch, dass die ursprünglich gewählte Zellzahl von 2×10^6 Zellen der Goldstandardmethode wahrscheinlich nicht ausreicht, um einen sicheren Nachweis von MRD zu führen.

Tab. 2: Vergleich des *CELLection™ Dynabeads Epithelial Enrich-Systems* und der Goldstandardmethode.

Patienten	Anreicherung Tumorzellen pro 1×10^7 MNC	Goldstandard pos. Zellen pro 2×10^6 MNC
1 (MCA)	11	0
2 (MCA)	13	6
3 (MCA)	11	0
4 (MCA)	0	0
5 (MCA)	42	0
6 (OCA)	0	0
7 (PCA)	0	0
8 (PCA)	1	0
9 (LCA)	0	0
10 (LCA)	53	0

MCA: Mammakarzinom, PCA: Prostatakarzinom, OCA: Ovarialkarzinom, LCA: Lungenkarzinom

3.2. Optimierung der Tumorzellanreicherung

Trotz der höheren Sensitivität der Anreicherungs­methode des *CELLection™ Dynabeads Epithelial Enrich-Systems* wurde mit dieser bei Durchführung nach Herstellerangaben eine Tumorzellausbeute von nur 50-60% erreicht. Deshalb wurde im Folgenden durch die Veränderung verschiedener Parameter versucht, eine höhere Effizienz der Tumorzellanreicherung aus MNC-Frak­tionen zu erreichen.

Es zeigte sich, dass bei Verwendung eines Beads/MNC-Verhältnisses von 2:1 anstelle des vom Hersteller angegebenen Verhältnisses von 1:1 eine signifikante Erhöhung der Ausbeute zu erzielen war.

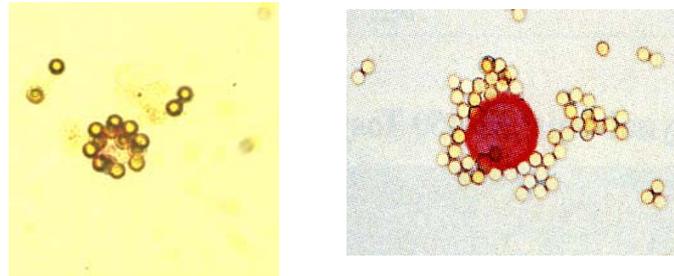


Abb. 4: Vergleich unterschiedlicher Verhältnisse von Beads zu MNC.

Das linke Bild zeigt eine angereicherte Tumorzelle, die mit einem Beads/MNC-Verhältnis von 1:1 gewonnen wurde. Die Zelle im rechten Bild wurde mit einem Beads/MNC-Verhältnis von 2:1 angereichert. Die Zellen wurden mittels Suspensionsfärbung detektiert (Kap. 2.5.1.2.).

Des Weiteren wurde auf die Zugabe von Magnesium-Ionen zum PBS-Puffer verzichtet, der zum Aufnehmen und Waschen der Zellen verwendet wurde. Magnesium-Ionen können unspezifische Zell-Zell-Wechselwirkungen fördern, die zur Agglutination der Zellen führen. Um eine effizientere Abtrennung der Tumorzellen von den Beads zu erreichen, wurde der DNase-Verdau bei 37°C anstelle der angegebenen 25°C durchgeführt und darauf geachtet, dass das verwendete RPMI-Medium einen exakten pH-Wert von 7,4 besaß. Außerdem wurde beobachtet, dass durch zusätzliches mechanisches Scheren der Zellen mittels einer üblichen Pasteurpipette sich die Sensitivität des Anreicherungsverfahrens weiter steigern ließ. Essentiell war auch die möglichst ausschließliche Verwendung von Glasmaterial wie z.B. Glaspasteurpipetten und Glasreaktionsgefäße. Es zeigte sich, dass die Beads unspezifisch an Plastikmaterial absorbierten. Dies führte zum Verlust von gebundenen Tumorzellen und somit zu einer ineffizienten Anreicherung. Zusammenfassend ergaben die oben beschriebenen Optimierungen eine Sensitivitätssteigerung der Anreicherung von Tumorzellen um 10-15% (Tab. 3).

Tab. 3: Optimierung des Anreicherungsverfahrens.

<i>CELLlection™ Dynabeads Epithelial Enrich-System</i>	Protokoll des Herstellers		Optimiertes Protokoll	
SKBR3-Tumorzellen pro 1×10^7 MNC	10	100	10	100
Ausbeute	50%	60%	65%	70%

Da residuale Tumorzellen eine ausgeprägte Heterogenität und auch eine gleichzeitige Expression von tumorassoziierten Oberflächenproteinen aufweisen, lag außerdem die Verwendung eines Antikörper-Cocktails zur Anreicherung der Tumorzellen nahe. Durch die gleichzeitige Verwendung zweier verschiedener Markerproteine, sollte eine effizientere Anreicherung der Tumorzellen erreicht werden, die diese beide Markerproteine, exprimieren. Dazu wurden Magnetbeads (*Cellection-Pan-Mouse* IgG; Dynal) verwendet, die eine Kopplung mit eigenen Antikörpern erlaubten. Diese wurden mit zwei verschiedenen Antikörpern der Firma TRION Pharma GmbH, München, inkubiert, die jeweils gegen die tumorassoziierten Oberflächenantigene EpCAM (HO-3) oder Her2/neu (250-2A) gerichtet waren. Die Kopplung der Antikörper erfolgte nach Kapitel 2.2.2. Dieser gekoppelte Antikörper-Cocktail wurden mit dem bereits beschriebenen kommerziellen *CELLection Dynabeads Epithelial Enrich*-System von Dynal verglichen, das nur einen EpCAM-Antikörper verwendet. Es wurden jeweils 1×10^7 MNC aus verschiedenen Ausgangsmaterialien verwendet, die aus acht Patienten mit zwei unterschiedlichen Tumorentitäten, Mamma- und Kolonkarzinome, stammten. Zusätzlich wurden in beiden Systemen die oben beschriebenen Optimierungen verwendet. Die angereicherten Zellen wurden immunzytochemisch mittels eines Panzytokeratin-Antikörpers (A45-B/B3) und APAAP-Färbung mit Neufuchsin detektiert.

Das *CELLection Dynabeads Epithelial Enrich*-System führte bei drei der acht Proben zu einer positiven Identifizierung von Tumorzellen, während der Antikörper-Cocktail in sechs Proben Tumorzellen anreicherte (Tab. 4). Zusätzlich wurde in allen Fällen eine höhere Tumorzellbelastung mit dem Antikörper-Cocktail nachgewiesen (Tab. 4).

Tab. 4: Vergleich des selbstgekoppelten Antikörper-Cocktails mit dem *CELLection™ Dynabeads Epithelial Enrich-System*.

Patienten	Material	<i>CELLection™ Dynabeads Epithelial Enrich-System</i>	Antikörper-Cocktail
		Tumorzellen pro 1×10^7 MNC	Tumorzellen pro 1×10^7 MNC
1 (MCA)	KM	0	2
2 (MCA)	SCA	1	4
3 (MCA)	PB	0	1
4 (MCA)	PB	0	0
5 (MCA)	SCA	0	7
6 (CCA)	KM	1	1
7 (CCA)	KM	0	0
8 (CCA)	KM	5	8

MCA, Mammakarzinom; CCA, Kolonkarzinom; KM, Knochenmark; PB, peripheres Blut; SCA, Stammzellapherese.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass sich auch bei den kommerziell erhältlichen Anreicherungssystemen durch sinnvolle Abänderungen der Herstellerangaben die Effizienz der Tumorzellanreicherung aus MNC-Fractionen optimieren lässt. Die Verwendung eines Antikörper-Cocktails gegen verschiedene tumorassoziierte Oberflächenantigene erhöht durch die breitere Abdeckung der Markerproteine ebenfalls die Anreicherungseffizienz. Dies könnte in Zukunft auch die Zusammenstellung spezifischer Patientencocktails erlauben, um eine optimale Tumorzelldetektion zu gewährleisten.

3.3. Tumorzellabreicherung mit trifunktionellen Antikörpern

Um nach Hochdosis-Chemotherapie bei Leukämien, Melanomen, Neuroblastomen und soliden Tumoren den Wiederaufbau des blutbildenden Systems zu gewährleisten, werden Patienten mit unaufbereiteten autologen Stammzellapheresen behandelt. Die Apheresen können jedoch Tumorzellen enthalten, da diese zusammen mit den entnommenen Stammzellen mobilisiert werden. Es wurde gezeigt, dass in Stammzellapheresen von Brustkrebspatientinnen in bis zu 50% der Fälle Tumorzellen mit immunzytochemischen Methoden oder PCR-Analytik nachweisbar waren (Diel, 2000). Darüber hinaus gibt es bei hämatologischen Neoplasien und Neuroblastomen eine Korrelation zwischen dem Nachweis von verstreuten Tumorzellen in Stammzellapheresaten und einem erhöhten Rückfallrisiko (Brenner et al., 1993; de Gast et al., 1985). Im Falle des Neuroblastoms konnte die

Entwicklung von Rezidiven in Markierungsstudien sogar direkt auf die Reinfusion mit kontaminierenden Tumorzellen aus dem autologen Stammzelltransplantat zurückgeführt werden (Rill et al., 1994). Da diese Tumorzellen somit möglicherweise für Rezidive nach autologen Stammzelltransplantationen verantwortlich sind, wurde ein Ansatz entwickelt, um Tumorzellen selektiv *ex vivo* aus autologen Stammzellapheresen zu entfernen. Zur Säuberung (*purging*) dieser Präparate könnten neuartige trifunktionelle Antikörper (trAK), für die Tumorzellabreicherung verwendet werden. Diese Antikörper stellen einen neuartigen Ansatz zur effizienten Tumortherapie dar (Riesenberg et al., 2001; Zeidler et al., 1999). Trifunktionelle Antikörper besitzen zwei unterschiedliche Bindungsarme und erkennen somit gleichzeitig zwei verschiedene Antigenstrukturen. Ein Bindungsarm ist gegen CD3 gerichtet, das auf allen T-Zellen vorkommt, der andere erkennt je nach Antikörper ein tumorassoziiertes Oberflächenprotein wie EpCAM oder Her2/neu. Diese beiden Antigene kommen auf vielen epithelialen Tumoren vor. Dadurch werden T-Zelle und Tumorzelle in räumliche Nähe gebracht, um das Immunsystem auf Tumorzellen aufmerksam zu machen. Zusätzlich können über den Fc-Teil des Antikörpers akzessorische Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen gebunden werden, die die Tumorzellen phagozytieren. Dies ist eine Voraussetzung für die Entstehung einer humoralen als auch zellulären Immunantwort. Die akzessorischen Immunzellen aktivieren die gebundene T-Zelle, die wiederum die benachbarte, gebundene Tumorzelle zerstört (Abb. 5). Eine effektive Tumorzellzerstörung wird schon mit sehr geringen Antikörpermengen erreicht (Ruf and Lindhofer, 2001).

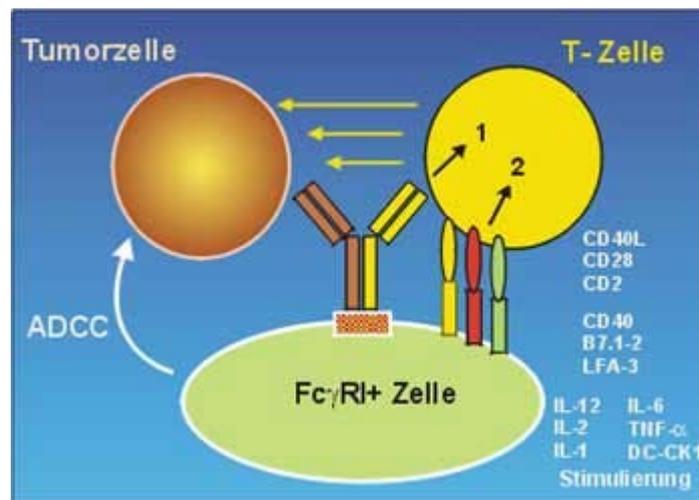


Abb. 5: Darstellung des Aufbaus und der Wirkungsweise von bispezifischen, trifunktionellen Antikörpern. Tri-Zell-Komplex-Modell.

Bispezifische, trifunktionelle Antikörper führen zur gleichzeitigen Rekrutierung von Tumorzelle, T-Zelle und Fc γ -Rezeptor-positiver akzessorischer Immunzelle. Die Bildung dieses trimeren Komplexes induziert über Cytokine und Chemokine die Aktivierung unterschiedlicher Klassen an Effektorzellen, woraus *in vivo* eine Antitumor-Aktivität resultiert. Modell: R. Zeidler und H. Lindhofer.

In Vorversuchen wurde die Funktionalität zur Tumorabreicherung der trifunktionellen Antikörper anhand sogenannter Spiking-Experimente getestet. Dazu wurden je $1,5 \times 10^5$ isolierte MNC, die aus peripherem Blut gesunder Spender gewonnen wurden, mit 2% SKBR3-Tumorzellen versetzt. In der MNC-Fraktion ist eine vollständige Ausstattung an immunkompetenten Zellen enthalten. Diese wurden mit verschiedenen Konzentrationen zweier trifunktioneller Antikörper trAK (rexomun[®], removab[®], TRION Pharma GmbH, München) 24 h inkubiert. Die Durchführung erfolgte ohne vorausgehende zusätzliche Aktivierung von Effektorzellen und ohne Hilfe von kostimulatorischen Reagenzien. Die Zellsuspensionen wurden anschließend auf Objektträger aufgebracht, und mittels APAAP-Färbung wurde die Restmenge an Tumorzellen bestimmt.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, konnten beide Antikörper die zugesetzten Tumorzellen vollständig aus der MNC-Fraktion eliminieren. Die Zerstörung der Tumorzellen war von der eingesetzten Antikörperkonzentration abhängig. Nur sehr geringe Mengen waren dafür erforderlich. Zur vollständigen Eliminierung der Tumorzellen war für den rexomun[®]-Antikörper eine Mindestkonzentration von 0,5 ng erforderlich, während für den removab[®]-Antikörper bereits 0,2 ng ausreichten. Dies zeigte, dass die trifunktionellen Antikörper in der Lage waren, die Eliminierung selbst dieser hohen Anzahl von zugesetzten Tumorzellen effektiv durchzuführen.

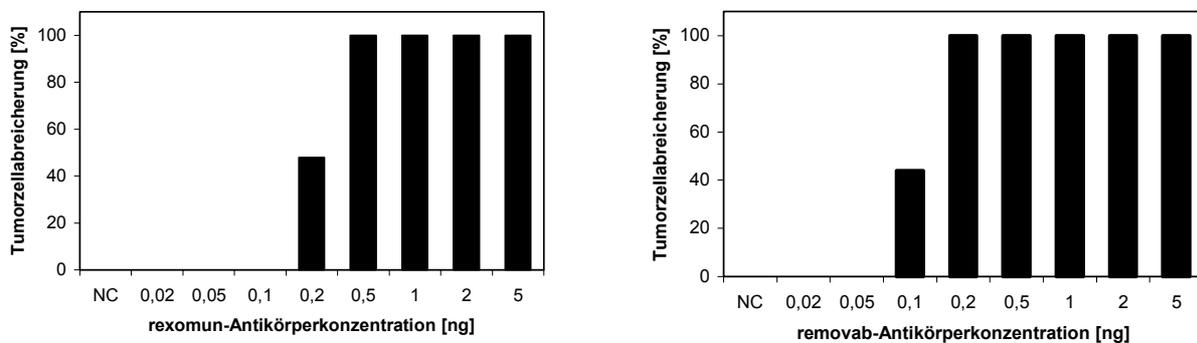


Abb. 6: Tumorzellabreicherung mit trifunktionellen Antikörpern.

Je $1,5 \times 10^5$ isolierte MNC wurden mit 2% SKBR3-Tumorzellen versetzt und mit den angegebenen Konzentrationen der trifunktionellen Antikörper (rexomun[®], linkes Bild; removab[®], rechtes Bild) 24 h bei 37°C in autologem Serum inkubiert. Die Detektion der Tumorzellen erfolgte mittels eines Panzytokeratin-Antikörpers und APAAP-Färbung. Dargestellt ist die Tumorzellabreicherung in %. NC; Negativkontrolle.

Um zu untersuchen, ob nach erfolgter Tumorzellabreicherung die Antikörper ebenfalls nicht mehr nachweisbar sind, wurde die Abbaukinetik der trAK bestimmt. Dazu wurden MNC-Fraktionen mit einem 166% bzw. 322% Überschuss an trAK bezogen auf die Anzahl von CD3-positiven Zellen versetzt und nach verschiedenen Zeitpunkten die an die CD3-positiven Zellen gebundenen trAK mittels FACS-Analyse bestimmt (Kap. 2.4.4.). Freie Antikörper wurden nicht gemessen.

Der 166% Überschuss an trAK Antikörpern war bereits nach 30 min auf ca. 30% der Ausgangsmenge abgebaut und nach ca. 15 h fast vollständig entfernt, während bei 332% Überschuss nach 24 h noch ca. 20% des Antikörpers vorhanden waren (Abb. 7). Wurden vor Zugabe der trAK CD3- oder CD14-positive Zellen aus den MNC-

Fractionen entfernt, wurden trAK auf ca. 80% der Ausgangsmenge abgebaut. Es erfolgte jedoch kein weiterer Abbau der Antikörper (Abb. 7). Dies lässt auf eine Beteiligung der CD3-positiven T-Zellen und der CD14-positiven akzessorischen Zellen am Abbau der Antikörper schließen.

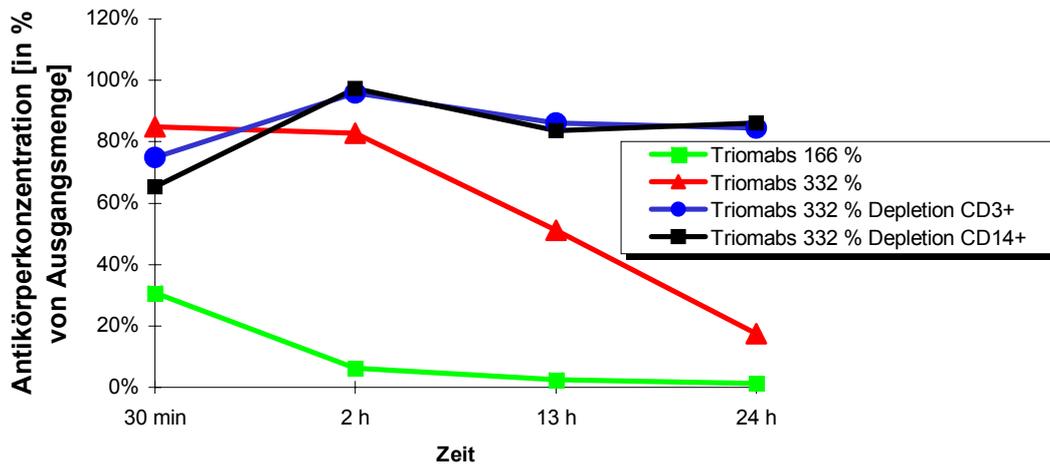


Abb. 7: Abbaukinetik von trAK.

166% und 322% an trAK Überschuss im Bezug auf CD3-positive Zellen wurden zu Stammzellapheresen gegeben. 322% Überschuss an trAK wurde zu einer CD3-depletierten Stammzellapherese und 322% Überschuss zu einer CD14-depletierten Stammzellapherese gegeben. Die Abreicherungen von CD3- und CD14-positiven Zellen erfolgten nach Kapitel 2.4.2. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. 100 µl Aliquots wurden zu den Zeitpunkten 30 min, 2 h, 13 h, und 24 h entnommen und die Abbaurrate der trAK per FACS-Analyse nach Kapitel 2.4.4. bestimmt.

Vor Analyse einer möglichen Belastung mit isolierten disseminierten Tumorzellen der Stammzellapheresen wurden zwei verschiedene Aufbereitungsmethoden von Stammzellpräparaten verglichen. Dazu wurden sieben gefrorene Stammzellapheresen von metastasierten Magenkarzinompatienten aufgetaut und die jeweilige Zellzahl sowie der Anteil an toten Zellen bestimmt (Kap. 2.1.2). Die Proben wurden halbiert. In einer Hälfte wurden nur spezifisch Erythrozyten mittels Erythrozytenlyse (Kap. 2.1.1.) entfernt, da diese den Nachweis der Tumorzellen behindern. Die andere Hälfte wurde einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation unterworfen (Kap. 2.1.2.), um eine MNC-Fraktion zu erhalten. Dadurch wurden zusätzlich Zellschrott und Erythrozyten abgetrennt. Anschließend wurden erneut die Lebendzellzahl bestimmt.

Die Entfernung von Erythrozyten führte zu einem Zellverlust von ca. 40% der lebenden Ausgangszellen. Dagegen lag jedoch der Anteil an toten Zellen bei ca. 66% (Tab. 5). Dies stellt einen sehr hohen Wert dar, der eine genaue immunzytochemische Auswertung der Zellpräparationen nicht erlauben würde. Trotz der hohen Verluste an lebenden Zellen (ca. 80%) bei der Anreicherung von MNC durch eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation führte diese nur zu einem Anteil an toten Zellen von ca. 25% (Tab. 5). Zur Vorbereitung der Proben wurde deshalb in den folgenden Experimenten mit gefrorenen Stammzellapheresen, die immunzytochemisch und mittels PCR-Analytik untersucht wurden, ausschließlich die Dichtegradientenzentrifugation angewendet.

Tab. 5: Vergleich verschiedener Präparationsmethoden für aufgetaute Stammzellapheresen.

Probe	Erythrozytenlyse		Dichtegradientenzentrifugation	
	Verlust in %	tote Zellen in %	Verlust in %	tote Zellen in %
1	30	67	55	10
2	49	54	84	36
3	10	80	82	38
4	33	55	78	24
5	8	75	70	14
6	55	66	90	26
7	51	65	90	25
Durchschnitt	38	66	78	25

In denselben Stammzellapheresen der Magenkarzinompatienten wurde anschließend die Belastung mit disseminierten Tumorzellen mittels immunzytochemischer APAAP-Färbung gegen einen Panzytokeratin-Antikörper A45-B/B3 bestimmt. Zusätzlich wurde mittels einer gegen verschiedene tumorassoziierte Marker (CK20, EpCAM, EGF-R und MAGE1) gerichteten *nested* RT-PCR ein qualitativer Nachweis der Tumorzellen durchgeführt. Pro Patient wurden jeweils 5×10^6 Zellen eingesetzt. Wie in Tabelle 6 zu erkennen ist, konnte in sechs der sieben Stammzellapheresen Tumorzellen mit beiden Methoden nachgewiesen werden. Bei der RT-PCR konnten jedoch die Tumormarker CK20 und EGF-R nicht gefunden werden, da sie möglicherweise von diesen disseminierten Tumorzellen nicht exprimiert werden.

Tab. 6: Tumorzellnachweis bei Stammzellapheresaten metastasierter Magenkarzinompatienten.

Probe	APAAP-Färbung	nested RT-PCR			
	Tumorzellen/5x10 ⁶ Zellen	(5x10 ⁶ Zellen)			
	A45-B/B3	CK20	EpCAM	EGF-R	MAGE1
1	4	negativ	positiv	negativ	positiv
2	5	negativ	positiv	negativ	positiv
3	2	negativ	positiv	negativ	positiv
4	2	negativ	positiv	negativ	positiv
5	1	negativ	positiv	negativ	positiv
6	0	negativ	negativ	negativ	negativ
7	1	negativ	positiv	negativ	positiv

Da sowohl removab[®] als auch rexomun[®] Tumorzellen in Spiking-Experimenten effektiv entfernen konnte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob man diese Tumorzellen auch aus autologen Stammzellapheresen von Tumorpatienten eliminiert werden können (*purging*). Dazu wurden Stammzellapheresen von Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung verschiedenster Tumorentitäten verwendet. Aus diesen wurde mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation die MNC-Fraktion gewonnen und je 5x10⁶ isolierte Zellen, vor und nach Inkubation mit 0,1 µg/ml removab[®]- und rexomun[®]-Antikörper, immunzytochemisch über einen Panzytokeratin-Antikörper (A45-B/B3) analysiert (Kap. 2.4.3.). Falls genügend isolierte MNC vorhanden waren, erfolgte zusätzlich ein Nachweis der disseminierten Tumorzellen mittels einer *nested* RT-PCR, die gegen die Tumormarker CK20 und EGF-R gerichtet war.

In 34% der autologen Stammzellapheresen konnten vor *purging* mit removab[®]- und rexomun[®]-Antikörper Tumorzellen nachgewiesen werden (Tab. 7). Drei Patienten wiesen jedoch nur bei Analyse durch die RT-PCR positive Befunde auf. Dies ist wahrscheinlich auf die höhere Sensitivität der PCR-Reaktion im Vergleich zur Immuncytochemie zurückzuführen. Nach Inkubation mit dem removab[®] und rexomun[®] konnten weder mittels Immuncytochemie noch mit Hilfe der sensitiveren RT-PCR-Technik Tumorzellen in Patientenproben nachgewiesen werden (Tab.7).

Tab. 7. *Purging*-Effizienz der removab[®]- und rexomun[®]-Antikörper bei Stammzellapheresen.

Probe	APAAP-Färbung Tumorzellen/5x10 ⁶ Zellen		nested-PCR CK20 & EGF-R, 5x10 ⁶ Zellen	
	Ohne purging	removab [®] rexomun [®]	Ohne purging	removab [®] rexomun [®]
GSF0003	5	0	positiv	negativ
GSF0004	0	0	negativ	negativ
GSF0005	0	0	positiv	negativ
GSF0006	0	0	negativ	negativ
GSF0007	0	0	/	/
GSF0008	1	0	/	/
GSF0009	0	0	/	/
GSF0010	0	0	/	/
GSF0011	0	0	/	/
LMU0002	1	0	/	/
F3100001	0	0	negativ	negativ
F3100007	0	0	negativ	negativ
F3100009	0	0	/	/
F3100011	0	0	/	/
F3100012	0	0	positiv	negativ
F3100014	0	0	/	/
F3100015	0	0	/	/
F3100016	0	0	positiv	negativ
F3100017	1	0	/	/
F3100018	0	0	negativ	negativ
F3100019	0	0	/	/
F3100021	0	0	/	/
F3100022	0	0	negativ	negativ
F3100023	0	0	/	/
F3100024	5	0	/	/
F3100025	0	0	/	/
F3100026	3	0	/	/
F3100138	0	0	/	/
F3100139	2	0	/	/

Isolierte disseminierte Tumorzellen eignen sich besonders als Ziele für immuntherapeutische Behandlungsmethoden (Mocellin et al., 2002). Diese neue Generation von Antikörpern könnte in der Lage sein, Tumorzellen spezifisch

aufzuspüren und effizient zu eliminieren. bereits angelaufen oder werden in Kürze gestartet.

3.4. Verbesserte Charakterisierung von Tumorzellen

3.4.1. Etablierung einer Doppelfärbung zum Nachweis von Tumorzellen

Das Prinzip des immunologischen Nachweises von Tumorzellen epithelialen Ursprungs beruht auf der Detektion epithelialer Epitope und Zellstrukturen durch Antikörper, die nicht mit der mesenchymalen Umgebung reagieren (Diel, 2000). Als Surrogatmarker für diesen Tumorzellnachweis hat sich die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen das Zytoskelett epithelialer Zellen (Zytokeratine, CK) etabliert. Der Nachweis von verschiedenen Zytokeratinen besitzt eine sehr hohe Spezifität gegenüber disseminierten Tumorzellen solider Tumoren (Schlimok, 1997). In einigen wenigen Fällen wurde jedoch über eine mangelhafte Sensitivität einiger Zytokeratin-Antikörper (Mathieu et al., 1990; Thor et al., 1988) berichtet. Auch scheinen einige Zytokeratine durch verschiedene Protoonkogene reprimiert zu werden. So wurde z.B. die Expression von Zytokeratin 18 durch das myc-Protoonkogen reprimiert (Pantel et al., 1994a; Pantel et al., 1994b; Schlimok, 1997). Deshalb wurde die Verwendung eines Panzytokeratin-Antikörpers (z.B. A45-B/B3) eingeführt, der gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichtet ist. Dieser simultane Nachweis mehrerer Zytokeratine hat sich zusammen mit der immunzytochemischen Detektion mittels Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase Färbetechnik (APAAP-Methode) als Standardmethode für den Nachweis disseminierter Tumorzellen etabliert. Der alleinige Nachweis von Zytokeratinen scheint aber nicht auszureichen, um eine Tumorzelle sicher zu detektieren. Deshalb ist der gleichzeitige Nachweis mehrerer tumorassoziierter Marker wie Her2/neu und EpCAM nötig, um eine Zelle eindeutig als Tumorzelle zu charakterisieren.

CK-positive Zellen weisen ein hohes malignes Potential auf. Um dieses besser einschätzen zu können, wurde im Folgenden eine simultane Mehrfachfärbung von Tumor-assoziierten Antigenen etabliert. Dazu gehören das Zelladhäsionsantigen EpCAM und der Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu. Untersuchungen an Primärtumoren von Mammakarzinompatienten und Nicht-Kleinzelligem Lungenkarzinompatienten zeigten, dass ca. 70-90% Her2/neu exprimieren. EpCAM

wird bei ca. 65% exprimiert (Gatzemeier et al., 2004; Pantel and Brakenhoff, 2004). Der Nachweis der simultanen Expression dieser Marker auf disseminierten Tumorzellen könnte für die Entwicklung von neuen adjuvanten Therapien hilfreich sein. Um dies zu ermöglichen, wurden verschiedene Färbemethoden kombiniert und so abgeändert, dass mehrere verschiedene Farbstoffe gleichzeitig detektierbar waren. Dazu wurde auch die Hellfeld- mit der Fluoreszenzmikroskopie kombiniert.

Zunächst wurde die klassische APAAP-Färbetechnik mit einer Fluoreszenzfärbung kombiniert. Dazu wurden 1×10^6 MNC aus Blut gesunder Spender mit 10% SKBR3-Tumorzellen versetzt. Diese Tumorzellen waren sowohl Zytokeratin-positiv als auch exprimierten sie gleichzeitig Her2/neu und EpCAM. Das Zellgemisch wurde parallel mit einem Panzytokeratin-Antikörper (A45-B/B3) und mit einem Oberflächenantikörper gegen Her2/neu inkubiert. Zytokeratin-positive Zellen konnten immunzytochemisch mit Hilfe der klassischen APAAP-Färbung und dem Farbstoff Neufuchsin detektiert werden (Kap. 2.5.1.1.). Der Her2/neu-Antikörper war direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff (*Texas-Red* oder FITC) gekoppelt. Die Detektion Her2/neu- sowie Zytokeratin-positiver Zellen erfolgte anschließend unter Fluoreszenz bei 612 nm (*Texas-Red*) oder 524 nm (FITC) Wellenlänge. Abbildung 8 stellt die Ergebnisse des ersten Doppelfärbungsversuches dar. Das linke Bild zeigt die Detektion einer Zytokeratin-positiven Zelle, die durch Neufuchsin rot angefärbt wurde. Nicht-Tumorzellen waren dagegen nicht gefärbt. Im Fluoreszenzkanal überdeckte die hohe Eigenfluoreszenz von Neufuchsin jedoch die Detektion des zweiten Farbstoffes *Texas-Red* (Abb. 8, rechtes Bild). Dadurch war eine weitere Charakterisierung der Zytokeratin-positiven Zelle mit Her2/neu-Antikörpern und einem Fluoreszenzfarbstoff nicht möglich. Die gleichen negativen Ergebnisse erhielt man mit einem Her2/neu-Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt war.

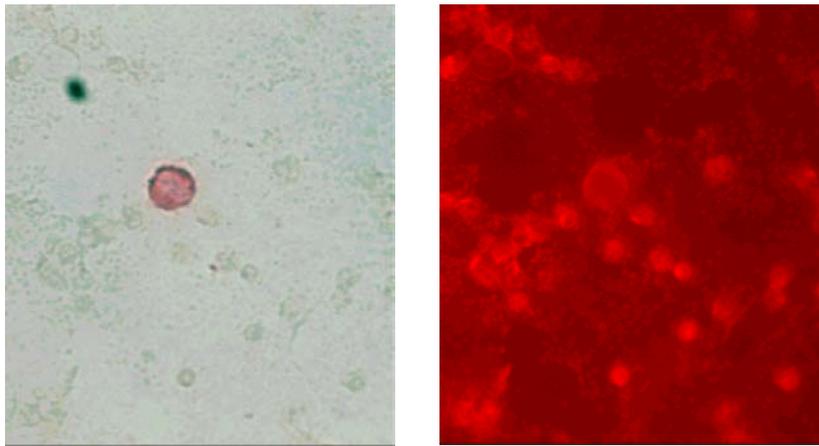


Abb. 8: Doppelfärbung von Tumorzellen mit A45B/B3- und Her2/neu-Antikörpern.

Parallele Detektion von Zytokeratin und Her2/neu. Die APAAP-Färbung des Zytokeratin-Antikörpers wird durch den Farbstoff Neufuchsin (Zytokeratin-positive Zelle ist rot gefärbt, linkes Bild) deutlich gemacht. Gleichzeitige Her2/neu-Texas-Red Detektion im Fluoreszenzkanal bei 612 nm Wellenlänge (rechtes Bild).

Um das Problem der Eigenfluoreszenz von Neufuchsin oder FITC zu umgehen, wurde für die APAAP-Färbung ein neuer Farbstoff verwendet: BCIP/NBT. 1×10^6 MNC wurden erneut mit 10% SKBR3-Tumorzellen versetzt und gleichzeitig mit A45-B/B3- und Her2/neu-Antikörpern inkubiert. Die APAAP-Färbung wurde mit BCIP/NBT (Zytomed, Berlin) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde eine unverdünnte Lösung von BCIP/NBT eingesetzt und 10 min mit den Zellen inkubiert. Abbildung 9 zeigt die spezifische Anfärbung einer durch BCIP/NBT dunkelblau gefärbten Zytokeratin-positiven Zelle. Jedoch überlagerte die Färbung mit BCIP/NBT die Fluoreszenzdetektion von *Texas-Red*. Dieselbe Beobachtung wurde auch in einer Doppelfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gemacht.

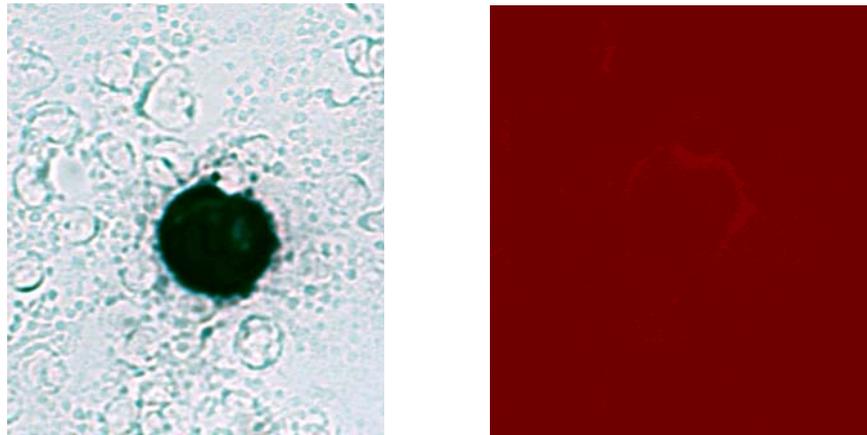


Abb. 9: Doppelfärbung von Tumorzellen mit A45B/B3- und Her2/neu-Antikörpern.

Gleichzeitige Detektion von Zytokeratin und Her2/neu. Im linken Bild wurde die APAAP-Färbung durch den blauen Farbstoff BCIP/NBT (blaue, Zytokeratin-positive Zelle) deutlich gemacht. Im rechten Bild konnte der Fluoreszenzfarbstoff *Texas-Red* auf Grund der Überlagerung des Farbstoffs BCIP/NBT nicht detektiert werden.

Um zu untersuchen, ob die Verwendung einer geringen Konzentration von BCIP/NBT möglicherweise die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe erlaubt, wurden erneut Doppelfärbungsexperimente wie oben beschrieben durchgeführt und die APAAP-Färbung mit einer 1:10, 1:50 und 1:100 Verdünnung von BCIP/NBT detektiert. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der APAAP-Färbung mit einer 1:100 Verdünnung. Die Zytokeratin-positiven Zellen (Tumorzellen) erschienen im Hellfeld blau und waren von nichtgefärbten Zellen (normalen Zellen) deutlich zu unterscheiden. Dies zeigt, daß selbst die 1:100 Verdünnung noch zum sicheren Nachweis von Tumorzellen geeignet ist. Im Unterschied zu den 1:10 und 1:50 Verdünnungen (nicht gezeigt) war jedoch die simultane Detektion des Her2/neu-Markers über die Fluoreszenz von Texas Red möglich. Abbildung 11 zeigt einen anderen Ausschnitt bei unterschiedlicher Vergrößerung des in Abbildung 10 beschriebenen Experiments.

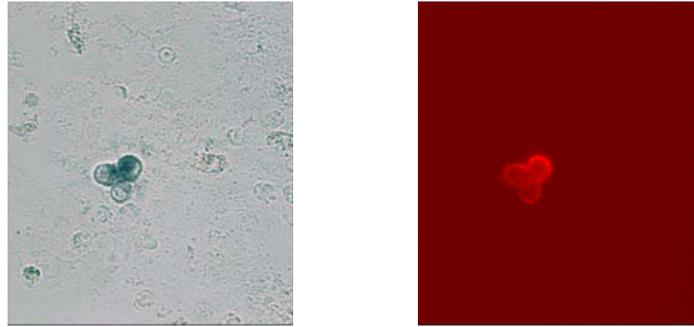


Abb. 10: Simultane Doppelfärbung der Tumormarker Zytokeratin und Her2/neu (40x).

Im linken Bild wurden Zytokeratin-positive SKBR3-Zellen in einem Hintergrund von 1×10^6 MNC mittels APAAP-Färbung und einer 1:100 Verdünnung der Färbelösung BCIP/NBT immunzytochemisch nach Kapitel 2.5.3. nachgewiesen (Zytokeratin-positive Zellen, blau). Die Zellen wurden unter einem Mikroskop im Hellfeld analysiert. Im rechten Bild wurden Her2/neu positive SKBR3-Zellen in einem Hintergrund von 1×10^6 MNC mittels Fluoreszenzfärbung nach Kapitel 2.5.3. (rote Zellen, *Texas-Red*) bei einer Wellenlänge von 612 nm im Fluoreszenzkanal detektiert. Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt des Zytospins in einer 40x Vergrößerung.

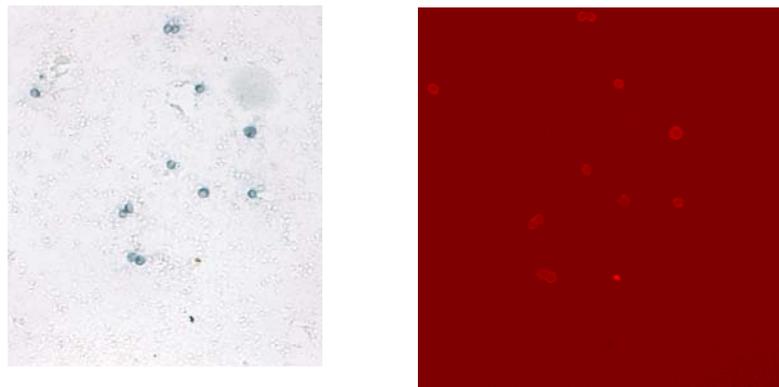


Abb. 11: Simultane Detektion von Zytokeratin und Her2/neu-Texas-Red (10x).

Tumorzellen wurden wie in Abbildung 9 beschrieben nachgewiesen. Gezeigt ist ein Ausschnitt des Zytospins in einer 10x Vergrößerung.

Gleichartige Doppelfärbungsversuche wurden auch mit einem A45-B/B3-Antikörper und einem Antikörper gegen EpCAM, der mit FITC gekoppelt war, durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC wurde im grünen Kanal bei einer Wellenlänge von 524 nm detektiert. Die Durchführung der Doppelfärbung erfolgte wie für *Texas-Red* oben beschrieben. Die Detektion der APAAP-Färbung erfolgte nach dem oben erarbeiteten Protokoll (Kap. 2.5.1.3.) mit einer 1:100 verdünnten BCIP/NBT-Lösung. Abbildung 12 zeigt in einer 40-fachen Vergrößerung eine blaue Zytokeratin-positive Zelle, die gleichzeitig den Oberflächenmarker EpCAM (FITC, grün) exprimiert. Sowohl die blaue Färbung des Zytokeratins als auch die Detektion von EpCAM im

Fluoreszenzkanal bei 524 nm ist deutlich zu erkennen. Nicht-Tumorzellen wurden nicht angefärbt.

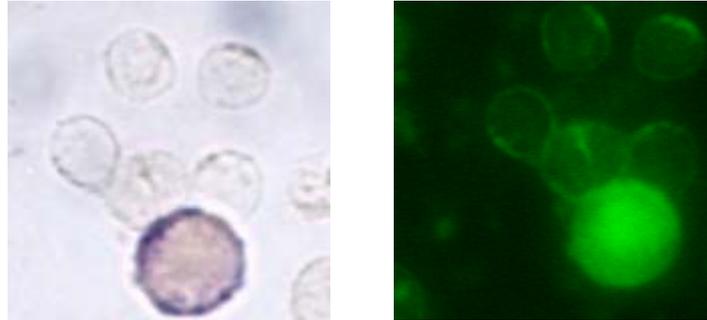


Abb. 12: Simultane Doppelfärbung der Tumormarker Zytokeratin und EpCAM (40x).

Im linken Bild wurden Zytokeratin-positive SKBR3-Zellen in einem Hintergrund von 1×10^6 MNC mittels APAAP-Färbung und einer 1:100 Verdünnung der Färbelösung BCIP/NBT immunzytochemisch nach Kapitel 2.5.3. nachgewiesen (Zytokeratin-positive Zelle, blau). Die Zellen wurden unter einem Mikroskop im Hellfeld analysiert. Im rechten Bild wurden EpCAM-positive SKBR3-Zellen in einem Hintergrund von 1×10^6 MNC mittels Fluoreszenzfärbung nach Kapitel 2.5.3. (grüne Zelle, FITC) bei einer Wellenlänge von 524 nm im Fluoreszenzkanal detektiert. Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt des Zytospins in einer 40x Vergrößerung.

Durch die angepasste Verwendung von BCIP/NBT als Farbstoff für die APAAP-Färbung konnte somit ein routinefähiges Doppelfärbungsprotokoll entwickelt und etabliert werden. Da jedoch die Konzentration von BCIP/NBT entscheidend für die Durchführung ist, durfte die Intensität der Anfärbung der Positivkontrollen nicht zu intensiv oder nicht zu schwach ausfallen. Gegebenenfalls musste die Inkubationszeit der Färbelösung angepasst werden, damit sich Zytokeratin-positive Zellen deutlich von normalen Zellen abgrenzten und zugleich der Fluoreszenzfarbstoff (*Texas-Red* oder FITC) nicht überlagert wurde.

3.4.1.1. Anwendung der Doppelfärbung

Die oben etablierte Doppelfärbungsanalytik wurde zum Monitoring der Studie STPrem01 verwendet. Diese Phase I-II Studie untersucht die Verträglichkeit des removab[®]-Antikörpers bei metastasierten Ovarial-Karzinomen mit maligner Aszitesbildung. Als Untersuchungsmaterial diente Aszitesflüssigkeit, aus der MNC

durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden (Kap. 2.1.2.). Diese wurden auf Objektträger aufgebracht (Kap. 2.1.3.) und pro Patient 1×10^6 isolierte MNC nach dem oben beschriebenen Doppelfärbungsprotokoll (Kap. 2.5.1.3.) auf die Expression von Zytokeratinen und von EpCAM analysiert. Im Verlauf der Antikörpergabe wurde diese Untersuchung mehrmals wiederholt, um die Tumorzellbelastung zu verfolgen (Therapiemonitoring). Stellvertretend für alle 23 Patienten zeigen die Abbildungen 13 und 14 die Tumorzellbelastung eines Patienten vor (Abb. 13) und am Ende (Abb. 14) der adjuvanten Therapie mit removab[®] bei einer 10-fachen Vergrößerung im Mikroskop. Es ist eine deutliche Reduzierung der Tumorzellbelastung nach Therapie mit dem removab[®]-Antikörper zu erkennen (Abb. 14). Die Tumorzellaggregate (Abb. 13) wurden eliminiert, und es sind nur noch vereinzelte Tumorzellen nachweisbar.

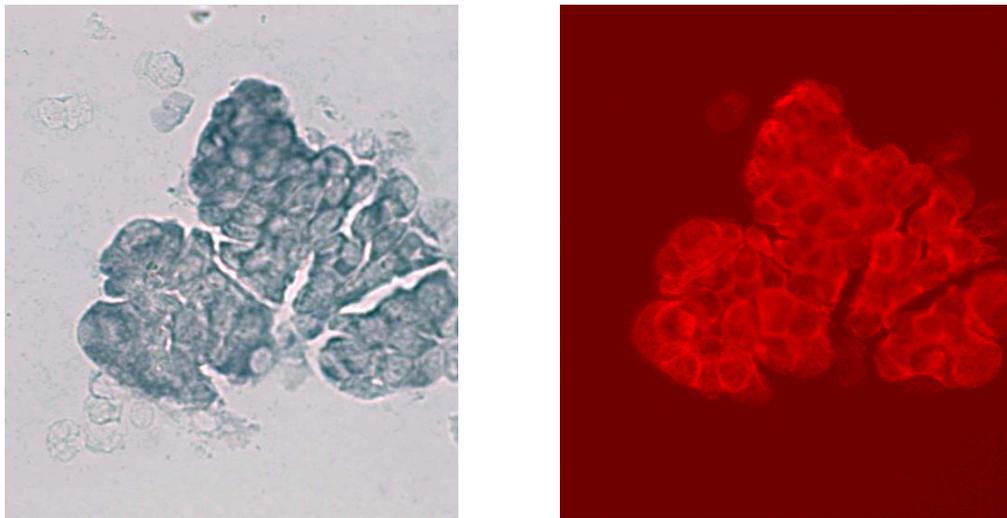


Abb. 13: Doppelfärbung von Tumorzellen in Aszites (Zytokeratin, EpCAM) vor Antikörpergabe mit removab[®].

Im linken Bild wurden Tumorzellen aus Aszitesflüssigkeit vor Gabe von removab[®] mittels APAAP-Färbung und einer 1:100 Verdünnung der Färbelösung BCIP/NBT immunzytochemisch nach Kapitel 2.5.3. nachgewiesen (Zytokeratin-positives Zellaggregat, blau). Die Zellen wurden unter einem Mikroskop im Hellfeld analysiert. Im rechten Bild wurden EpCAM-positive Zellen aus Aszitesflüssigkeit, vor Gabe von removab[®] mittels Fluoreszenzfärbung nach Kapitel 2.5.3. (rotes Zellaggregat, Texas-Red) bei einer Wellenlänge von 612 nm im Fluoreszenzkanal detektiert. Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt des Zytospins in einer 10x Vergrößerung.



Abb. 14: Doppelfärbung von Tumorzellen in Aszites (Zytokeratin, EpCAM) nach letzter Antikörpergabe mit removab[®].

Im linken Bild wurden Tumorzellen aus Aszitesflüssigkeit nach der letzten Gabe von removab[®], mittels APAAP-Färbung und einer 1:100 Verdünnung der Färbelösung BCIP/NBT immunzytochemisch nach Kapitel 2.5.3. nachgewiesen (Zytokeratin-positive Zelle, blau). Die Zellen wurden unter einem Mikroskop im Hellfeld analysiert. Im rechten Bild wurden EpCAM-positive Zellen aus Aszitesflüssigkeit nach der letzten Gabe von removab[®] mittels Fluoreszenzfärbung nach Kapitel 2.5.3. (rote Zelle, Texas-Red) bei einer Wellenlänge von 612 nm im Fluoreszenzkanal detektiert. Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt des Zytospins in einer 10x Vergrößerung.

Diese neu etablierte Doppelfärbungstechnik eröffnet eine Möglichkeit, sowohl eine Entscheidung für eine adjuvante Therapie zu treffen als auch den Therapieerfolg zu verfolgen. Tabelle 8 fasst das Ergebnis der oben beschriebenen Doppelfärbung von Tumorzellen in Aszites zusammen. Es ist eine deutliche Reduktion der Tumorzellen nach den Antikörpergaben zu beobachten. Es konnten zum Zeitpunkt t4 nur noch vereinzelte Tumorzellen nachgewiesen werden.

Tab. 8: Tumorzelleliminierung am Beispiel eines Patienten nach Antikörpergaben mit removab[®] zu den Zeitpunkten t1 bis t4.

Zeitpunkt	t1	t2	t3	t4
Tumorzellen/10 ⁶ MNC	>5x10 ⁵	10 ⁴	100	20

3.4.2. Simultane Dreifachfärbungen von Tumorzellen

Um möglicherweise eine noch genauere Charakterisierung von Tumorzellen zu erhalten, wurde basierend auf den Erfahrungen mit der Doppelfärbungs-Etablierung versucht, eine simultane Dreifachfärbung zu entwickeln. Ausgangsmaterial waren erneut 1×10^6 MNC aus Blut gesunder Spender, die mit 10% SKBR3-Tumorzellen versetzt waren. Diese wurden gleichzeitig mit drei verschiedenen tumorassoziierten Antikörpern (A45-B/B3, Her2/neu-*Texas-Red* und EpCAM-FITC) inkubiert. Wie schon für die Doppelfärbung beschrieben, erfolgte die Detektion Zytokeratin-positiver Zellen durch immunzytochemische APAAP-Färbung mit Hilfe einer 1:100 verdünnten BCIP/NBT-Lösung. Der Nachweis der Oberflächenantigene Her2/neu und EpCAM wurde im Fluoreszenzmikroskop gezeigt. Her2/neu-*Texas-Red* konnte im roten Fluoreszenzkanal bei 612 nm Wellenlänge und EpCAM-FITC bei 524 nm Wellenlänge detektiert werden. Abbildung 15 zeigt die gleichzeitige Detektion dreier tumorassoziiertes Marker an derselben Tumorzelle ohne Störungen durch Hintergrundfluoreszenz oder Überlagerung der Fluoreszenzfarbstoffe. Alle drei Marker sind deutlich voneinander unterscheidbar. Zytokeratin wurde blau, EpCAM grün und Her2/neu rot detektiert.

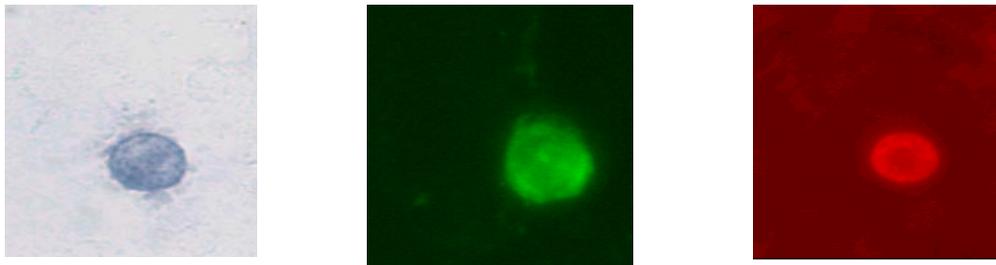


Abb. 15: Simultane Dreifachfärbung der Tumormarker Zytokeratin, Her2/neu und EpCAM (10x).

Im linken Bild wurden Zytokeratin-positive SKBR3-Zellen in einem Hintergrund von 1×10^6 MNC mittels APAAP-Färbung und einer 1:100 Verdünnung der Färbelösung BCIP/NBT immunzytochemisch nach Kapitel 2.5.3. nachgewiesen (Zytokeratin-positive Zelle, blau). Die Zellen wurden unter einem Mikroskop im Hellfeld analysiert. Im mittleren Bild wurden EpCAM-positive SKBR3-Zellen in einem Hintergrund von 1×10^6 MNC mittels Fluoreszenzfärbung nach Kapitel 2.5.3. (grüne Zelle, FITC) bei einer Wellenlänge von 524 nm im Fluoreszenzkanal detektiert. Im rechten Bild wurden Her2/neu-positive SKBR3-Zellen in einem Hintergrund von 1×10^6 MNC mittels Fluoreszenzfärbung nach Kapitel 2.5.3. (rote Zelle, *Texas-Red*) bei einer Wellenlänge von 612 nm im Fluoreszenzkanal detektiert. Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt des Zytospins in einer 40x Vergrößerung.

Somit ist es möglich, bei entsprechender Wahl der Farbstoffe im Hellfeld und in der Fluoreszenz und einer 1:100 Verdünnung der Färbelösung BCIP/NBT disseminierte Tumorzellen gleichzeitig mit drei verschiedenen Tumormarkern zu charakterisieren.

3.5. mRNA-Nachweis tumorassoziierter Marker mittels RT-PCR

Molekularbiologische Methoden werden in der Tumordiagnostik für den Nachweis von spezifischen *Rearrangements*, von Mutationen auf DNA-Ebene, sowie für den mRNA-Nachweis von tumorassozierten und gewebsspezifischen Markern eingesetzt (Schlimok, 1997). Während der Tumorzellnachweis zur prognostischen Relevanz mittels immunocytoologischer Techniken etabliert ist, befindet sich die Detektion von MRD mit molekularbiologischen Methoden dagegen noch in der Entwicklungsphase (Diel, 2000). Für die Detektion von MRD mittels molekularbiologischer Methoden wurden bereits einige Marker etabliert (Neumaier et al., 1995; Soeth et al., 1997). Dabei wurde die mRNA der Zellen isoliert und mittels *reverser Transkription* in cDNA umgeschrieben und in einer anschließenden PCR-Reaktion vervielfacht. Die Vorteile dieser Methode liegen in der hohen Sensitivität sowie in der Möglichkeit, ein schnelles Therapiemonitoring tumorassoziierter Marker zu erlauben. Geringste Mengen an Tumorzellen sind dabei ausreichend, um ein positives Signal in der PCR-Analytik zu erhalten.

Verunreinigungen und unspezifische Inhibitoren in den Proben können wie die Anwesenheit von Nicht-Tumorzellen (illegitime Expression) zu falsch positiven Ergebnissen führen (Krismann et al., 1995; Traweek et al., 1993; Zippelius et al., 1997). Ein weiteres Problem stellt die Quantifizierung der Resultate dar (Ghossein and Rosai, 1996). Jedoch könnte die quantitative PCR in Kombination mit der Definition eines spezifischen Hintergrundes eine Unterscheidung zwischen einer Überexpression und dem Normzustand erlauben. Entscheidend ist die Wahl des zu untersuchenden Tumormarkers und die Prüfung der PCR-Methode an gesunden Patienten mit entzündlichen, nicht-malignen Erkrankungen, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Durch die standardisierte Etablierung könnte die PCR-Technologie als wertvolle Unterstützung in der Diagnostik, der Charakterisierung und dem Monitoring von disseminierten Tumorzellen dienen.

3.5.1. Qualitativer PCR-Nachweis von Tumormarkern

Potentielle tumorassoziierte Marker für die PCR-Analytik sind Her2/neu, EpCAM, Zytokeratin 20 (CK 20), EGF-Rezeptor (EGF-R) und MAGE1. Im Folgenden sollte der qualitative PCR-Nachweis von Her2/neu etabliert werden. Dazu wurden zu je 1×10^6 isolierten MNC aus peripherem Blut gesunder Spender steigende Mengen an SKBR3-Tumorzellen ($1-10^4$) gegeben. Aus diesem Zellgemisch wurde anschließend die Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.3.3.) und diese spezifisch mit dem Her2/neu-3'RT Primer *revers transkribiert* (Kap.2.5.4.1). Die so erhaltene cDNA wurde für eine qualitative *nested-PCR* mit weiteren Her2/neu-Primern (Kap. 2.8.) wie in Kapitel 2.5.4.1. beschrieben eingesetzt und vervielfältigt. Zur Kontrolle der Qualität der verwendeten Proben wurde gleichzeitig das Haushaltsgen Histon H3.3.3 nachgewiesen. Die PCR-Endprodukte wurden auf einem Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetrennt und mittels UV-Licht detektiert. Abbildung 16 zeigt die Her2/neu- und die Histon H3.3.3-Analyse der Proben. Die Her2/neu-Expression konnte in allen Proben nachgewiesen werden (Abb. 16). Selbst die Expression einer einzigen Tumorzelle konnte nachgewiesen werden (Abb. 16). Die qualitative Durchführung der PCR erlaubte jedoch nicht die Differenzierung der Her2/neu-Expressionsmengen im Bereich einer bis 10^4 Tumorzellen (Abb. 16). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit den tumorassoziierten Markern EpCAM, CK 20, EGF-R und MAGE1 erzielt (nicht gezeigt).

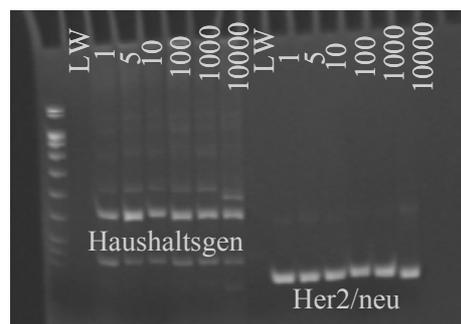


Abb. 16: Nested-RT-PCR-Analyse des tumorassoziierten Markers Her2/neu.

Spiking-Experiment mit $1-10^4$ SKBR3-Tumorzellen in 1×10^6 MNC. Die Durchführung der *Nested-RT-PCR* erfolgte wie in Kapitel 2.5.4.1. beschrieben. Als Primer wurden 3H3 und 5H3 (Kap. 2.8.) verwendet. Nachgewiesen wurde der Tumormarker Her2/neu (100 bp Produkt) sowie das Haushaltsgen Histon H3.3.3 (215 bp Produkt). Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels PAA-Gel (10%) und UV-Licht. Die Banden mit einer Größe von ca. 110 bp entsprechen Primer-Dimeren. LW, Leerwert; 1-10000, Anzahl an SKBR3-Tumorzellen in 1×10^6 MNC.

Der neu etablierte, qualitative Nachweis von EpCAM kam für die Studie STPrem01 zur Anwendung. Diese untersuchte die EpCAM-Expression von Aszitesproben von Patientinnen mit metastasiertem Ovarial-Karzinom nach Behandlung mit dem trifunktionellen Antikörper removab[®]. Dieser ist gegen EpCAM gerichtet und sollte so zur Eliminierung von EpCAM-positiven Tumorzellen führen.

Dazu wurden aus Aszitesflüssigkeit von 23 Patienten, die zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während und nach Behandlung mit removab[®] entnommen wurde, 1×10^6 MNC mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (Kap. 2.1.2.). Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.3.3.) und diese EpCAM-spezifisch *revers transkribiert*, mittels einer *nested-PCR* vervielfältigt und zur Auswertung auf ein 10% PAA-Gel aufgetragen (Kap. 2.5.4.1.) Es wurden jeweils zwei Proben eines Zeitpunktes unabhängig voneinander untersucht. In Abbildung 17 sind beispielhaft die Ergebnisse von zwei Patienten dargestellt. Patient 1 erhielt insgesamt drei, Patient 2 vier Infusionen mit removab[®]. Bei beiden Patienten nahm mit zunehmender Infusionszahl die mRNA-Menge von EpCAM ab (Abb. 17). Da es sich hier um einen qualitativen Nachweis handelt, ist eine exakte Bestimmung der mRNA-Expression nicht möglich. Dies gilt auch für den Vergleich zwischen zwei Zeitpunkten.

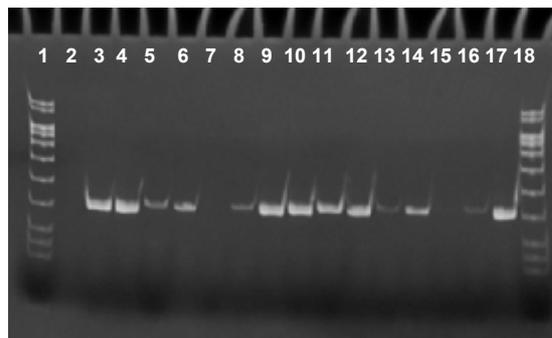


Abb. 17: Qualitative Nested-RT-PCR von EpCAM zum Monitoring der STPrem01-Studie.

Die Durchführung der *nested-RT-PCR* erfolgte wie in Kapitel 2.5.4.1. beschrieben. Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Gesamt-RNA (Kap. 2.3.3.) diente Aszitesflüssigkeit. Die *reverse Transkription* erfolgte mit Hilfe des Primers EpCAM 3'RT. Als Primer für die nachfolgenden Amplifikationen wurden EpCAM 3'RT und EpCAM 5'RT für die 1. PCR und EpCAM 3'nested und EpCAM 5'nested für die 2. PCR verwendet. Nachgewiesen wurde der Tumormarker EpCAM (200 bp Produkt). Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels PAA-Gel (10%), Anfärbung mit Ethidiumbromid und UV-Licht. Spur 1, Längenstandard; Spur 2, Leerwert; EpCAM-mRNA Expression: Patient 1 nach 1. (Spur 3+4), 2. (Spur 5+6) und 3. (Spur 7+8) Infusion mit removab[®]; Patient 2 nach 1. (Spur 9+10), 2. (Spur 11+12), 3. (Spur 13+14) und 4. (Spur 15+16) Infusion mit removab[®]; Spur 17, Positivkontrolle; Spur 18, Längenstandard.

Zur Kontrolle der präparierten Aszitesproben wurde parallel die Expression des Haushaltsgens Histon H3.3.3 bestimmt. Der qualitative RT-PCR-Nachweis erfolgte aus der gleichen isolierten Gesamt-RNA. Die *reverse Transkription* und die anschließende PCR erfolgten mit spezifischen Primern für Histon H3.3.3 wie in Kapitel 2.5.4.1. beschrieben. Abbildung 18 zeigt die Expression von Histon H3.3.3 der oben beschriebenen Patientenproben. Wie deutlich zu erkennen ist, konnte in jeder Probe das Haushaltsgen nachgewiesen werden (Abb. 18). Damit war die optimale Qualität der präparierten Proben gewährleistet.

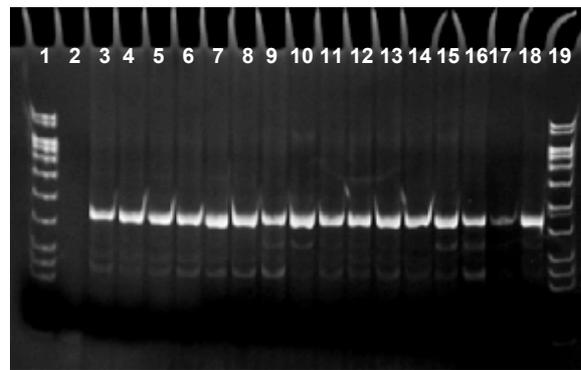


Abb. 18: Qualitative RT-PCR eines Haushaltsgens zum Monitoring der STPrem01-Studie.

Die Durchführung der RT-PCR erfolgte wie in Kapitel 2.5.4.1. und Abbildung 17 beschrieben. Als Primer für die *reverse Transkription* wurde 3H3, und für die PCR wurden 3H3 und 5H3 verwendet. Nachgewiesen wurde das Haushaltsgen Histon H3.3 (215 bp Produkt). Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels PAA-Gel (10%), Anfärbung mit Ethidiumbromid und UV-Licht. Spur 1, Längenstandard; Spur 2, Leerwert; Histon H3.3-mRNA Expression der Patienten 1 (Spuren 3-8) und 2 (Spuren 9-16) wie in Abbildung 16 beschrieben. Spur 17+18, Positivkontrolle; Spur 19, Längenstandard.

Mit Hilfe der qualitativen PCR konnte nachgewiesen werden, dass die Tumorzellbelastung der Patienten innerhalb der Studie STPrem01 deutlich rückgängig war. Dies zeigt, dass dieser neue therapeutische removab[®]-Antikörper effektiv Tumorzellen *in vivo* eliminieren kann.

3.5.2. Etablierung eines quantitativen PCR-Nachweises von Tumormarkern

Mit Hilfe der qualitativen PCR konnte der Tumorzellrückgang in der oben beschriebenen Phase I-II Studie STPrem01 erfolgreich nachgewiesen werden. Eine exakte Bestimmung der Tumorzellbelastung war jedoch methodisch bedingt nicht möglich. Um die tumorassoziierten Marker Her2/neu und EpCAM quantitativ zu bestimmen, wurden entsprechende *Real-time*-RT-PCR-Verfahren für das *LightCycler* Instrument (Roche Diagnostics) etabliert.

In Spiking-Experimenten wurden zunächst die Sensitivität und die Spezifität des quantitativen Nachweises des Her2/neu-Markers überprüft. Dazu wurde aus 1×10^6 MNC, die aus Blut gesunder Spender gewonnen wurden, die Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.3.3.) und diese mittels AMV-Kit (Roche Diagnostik) *revers transkribiert* (Kap. 2.5.4.2.). Die erhaltene MNC-cDNA wurde mit verschiedenen Mengen an cDNA versetzt, die aus Her2/neu-/EpCAM-positiven SKBR3-Zellen gewonnen wurde (Kap. 2.3.1.). Für die Quantifizierung von Her2/neu wurden die Primer Her2-5'RT und Her2-3'RT verwendet. Der Ansatz enthielt zusätzlich den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen (Kap. 2.5.4.2.). Dieser lagerte sich an die amplifizierten Her2/neu-DNA-Fragmente an. Die gemessene Fluoreszenzintensität korrelierte somit mit der amplifizierten DNA-Menge. Je mehr Ausgangs-SKBR3-cDNA in der jeweiligen Probe enthalten war, desto früher stieg die gemessene Fluoreszenz exponentiell an. Dies zeigte sich am so genannten *crossingpoint*, der die Zykluszahl angibt, in der die Fluoreszenzkurve ihre exponentielle Phase erreicht. Aufgrund der Verwendung von SYBRGreen war es nicht notwendig, die Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Abbildung 19 stellt die Quantifizierung des Her2/neu-Markers des Spikings-Experiments dar. Die einzelnen Kurvenverläufe entsprachen den eingesetzten Her2/neu-cDNA-Standardmengen. In der Leerwertprobe wurde erwartungsgemäß kein Fluoreszenzanstieg beobachtet (Abb. 19, blank). Dagegen ließen sich die verschiedenen zugesetzten Mengen an Her2/neu-enthaltender cDNA deutlich voneinander unterscheiden, die entsprechend ihrer Menge einen Zyklus-abhängigen Fluoreszenzanstieg aufwiesen (Abb. 19). Wie erwartet, wies die Probe mit der höchsten zugesetzten Standard-cDNA (2 μ g) den niedrigsten *crossingpoint* auf (Abb. 19). Es ließen sich jedoch keine Aussagen über die Anzahl der Her2/neu-Kopien in der Ausgangs-DNA treffen.

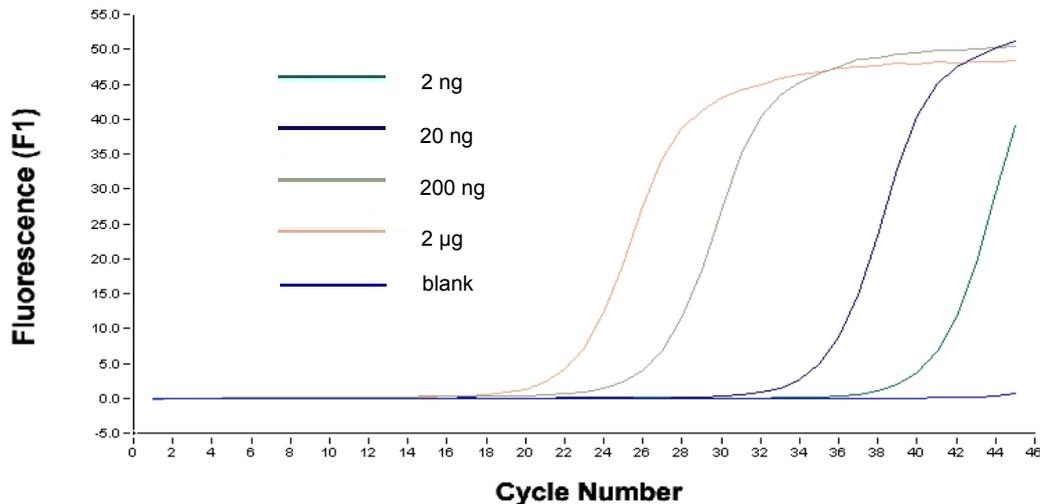


Abb. 19: Quantitative *Real-time* RT-PCR-Analyse von Her2/neu mittels eines *LightCyclers*.

Spiking-Experiment mit Standard-cDNA (2, 20, 200, 2000 ng) aus Her2/neu-positiven SKBR3-Zellen, die mit cDNA aus 1×10^6 MNC von Blutproben gesunder Spender versetzt wurden. Pro Ansatz wurden je 5 pmol der Her2-5'RT- und Her2-3'RT-Primer verwendet und diese in den Master SYBRGreen-Mix mit 3 mM MgCl₂ eingesetzt. Der Ansatz wurde für 40 Zyklen bei 60°C inkubiert (Kap. 2.5.4.2). Die Fluoreszenz der einzelnen Amplifikate ist gegen die Zyklenanzahl aufgetragen.

Da der *crossingpoint* jedoch keine Aussage über die Spezifität des Amplifikats erlaubt, wurde zusätzlich eine Schmelzpunktanalyse der Her2/neu-Quantifizierung durchgeführt (Abb. 20). Diese wurde im Anschluss an die Quantifizierung durchgeführt. Dabei wurde die Probe innerhalb von 15 min von 65° auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenz verfolgt. Die Temperatur, bei der ein Verlust der Fluoreszenz auftritt, ist für jedes Amplifikat spezifisch. Alle Her2/neu-Amplifikate wiesen einen spezifischen Schmelzpunkt von 89°C auf (Abb. 20). Der spezifische Schmelzpunkt des Her2/neu-Amplifikats wurde mittels eines klonierten Her2/neu-Standards (Kap. 3.5.3.) separat bestimmt. Davon abweichende Schmelzpunkte könnten auf unspezifische Amplifikate oder Primer-Dimere hinweisen. Dieses Spiking-Experiment zeigte, dass sich mit diesem System Her2/neu spezifisch und quantitativ nachweisen lässt. Mit diesem System konnte auch das Markergen EpCAM quantitativ bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

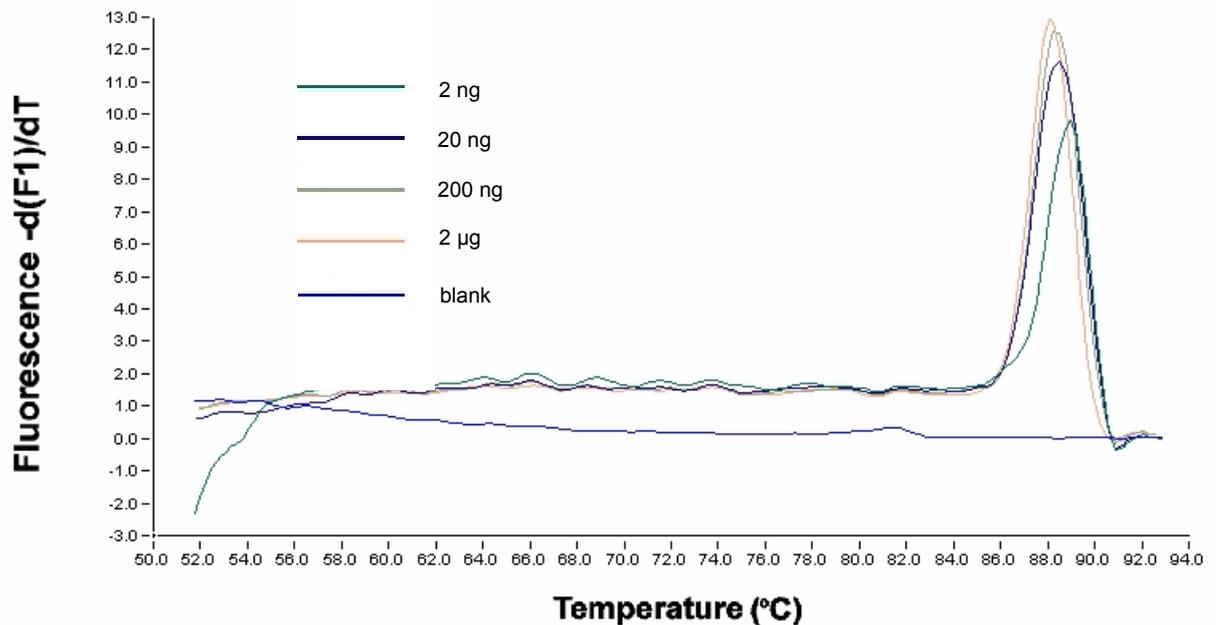


Abb. 20: Schmelzpunktanalyse des Her2/neu-Amplifikats mittels des *LightCyclers*.

Die Bestimmung des Schmelzpunkts erfolgte mittels der *LightCycler Meltingcurve*-Analyse (Kap. 2.5.4.2). Die Fluoreszenz ist gegen die Schmelztemperatur der einzelnen Amplifikate aufgetragen.

3.5.3. Etablierung eines quantitativen Standards für die RT-PCR

Um eine sichere Quantifizierung von Tumormarkern zu erreichen, wurden für die Patientenproben Kontrollen durchgeführt. Zunächst wurden diese Standards für die tumorassoziierten Marker Her2/neu und EpCAM sowie für das Haushaltsgen PBGD (Porphobilinogen-Deaminase) konstruiert (Kap. 2.5.4.3.). Dazu wurde das jeweilige Gen mittels spezifischer Primer durch qualitative PCR aus SKBR3-Tumorzellen amplifiziert (Kap.2.5.4.1.). Die DNA-Fragmente wurden anschließend in einen Vektor des *TA-Cloning-Kits* (Invitrogen) integriert, positive Klone angezogen und die jeweilige Plasmid-DNA präpariert (Kap. 2.3.2.). Die korrekte Insertion der Markergene in die Standardplasmide wurde mittels Sequenzierung kontrolliert.

Um die Sensitivität und Spezifität der neuen *Real-time*-RT-PCR-Analyse bezüglich der klonierten Standards zu testen, wurde wie oben beschrieben cDNA aus MNC mit definierten Plasmidkonzentrationen ($1 \cdot 10^5$ Kopien) der Standardgene versetzt. Die *Real-time*-RT-PCR wurde wie in Kapitel 2.5.4.3. beschrieben durchgeführt. Beispielhaft sind in Abbildung 21 und 22 die Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung der neuen quantitativen *Real-time*-RT-PCR für EpCAM dargestellt. Abbildung 21

zeigt die Amplifikation der verschiedenen Mengen an EpCAM-Standardplasmid. Nur im Leerwert (LW) kam es erwartungsgemäß zu keiner Amplifikation. Der niedrigste *crossingpoint* trat wie erwartet bei der höchsten eingesetzten Kopienzahl (10^5 EpCAM-Plasmidkopien) auf (Abb. 20). Dieser nahm sukzessive entsprechend der jeweils niedrigeren Kopienzahl zu (Abb. 20).

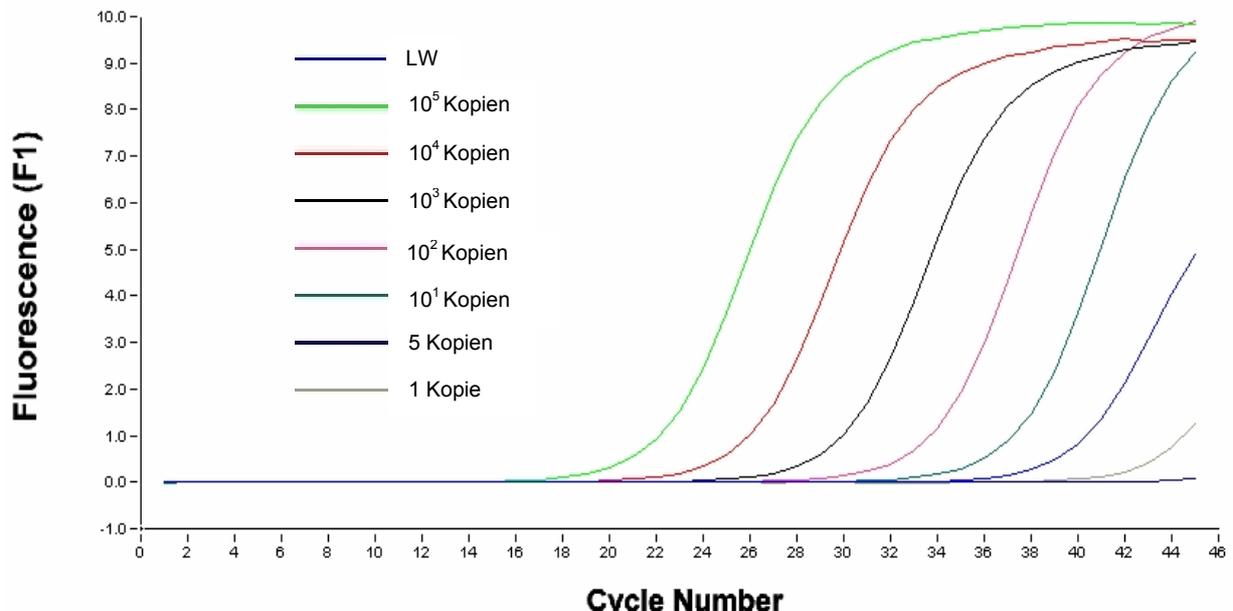


Abb. 21: Quantitative *Real-time*-RT-PCR-Analyse von EpCAM mittels *LightCycler*.

Spiking-Experiment zur Sensitivitätsbestimmung der EpCAM-Analyse anhand definierter EpCAM-Plasmidmengen. Es wurden $1-10^5$ Kopien von EpCAM-Standardplasmiden in jeweils cDNA aus 10^6 MNC aus Blut gesunder Spender eingesetzt. Der Master SYBRGreen Mix enthielt 3 mM $MgCl_2$ und je 5 pmol EpCAM-5'nested und EpCAM-3'nested Primer. Der Ansatz wurde für 40 Zyklen bei $60^\circ C$ inkubiert (Kap. 2.5.4.2).

Die Verifizierung der Amplifikate mittels Schmelzpunktanalyse wies ein spezifisches EpCAM-Produkt bei einer Temperatur von $87^\circ C$ auf (Abb. 22). In den beiden Ansätzen mit den geringsten Kopienzahlen (1 und 5 Kopien) konnte EpCAM nicht nachgewiesen werden. (Abb. 22). In beiden Proben traten nur unspezifische Produkte auf, die entsprechend abweichende Schmelzpunkte aufwiesen. Die um ca. $10-15^\circ C$ geringeren Schmelzpunkte lassen vermuten, daß es sich um Primer-Dimere handelt.

Dies zeigt, dass sich tumorassoziierte Markergene auch mittels *Real-time*-RT-PCR bestimmen lassen. Die Sensitivität des EpCAM-Nachweises lag bei 10 Kopien pro 10^6 MNC. Dieselbe Nachweissensitivität wurde auch für den Her2/neu-Marker erreicht.

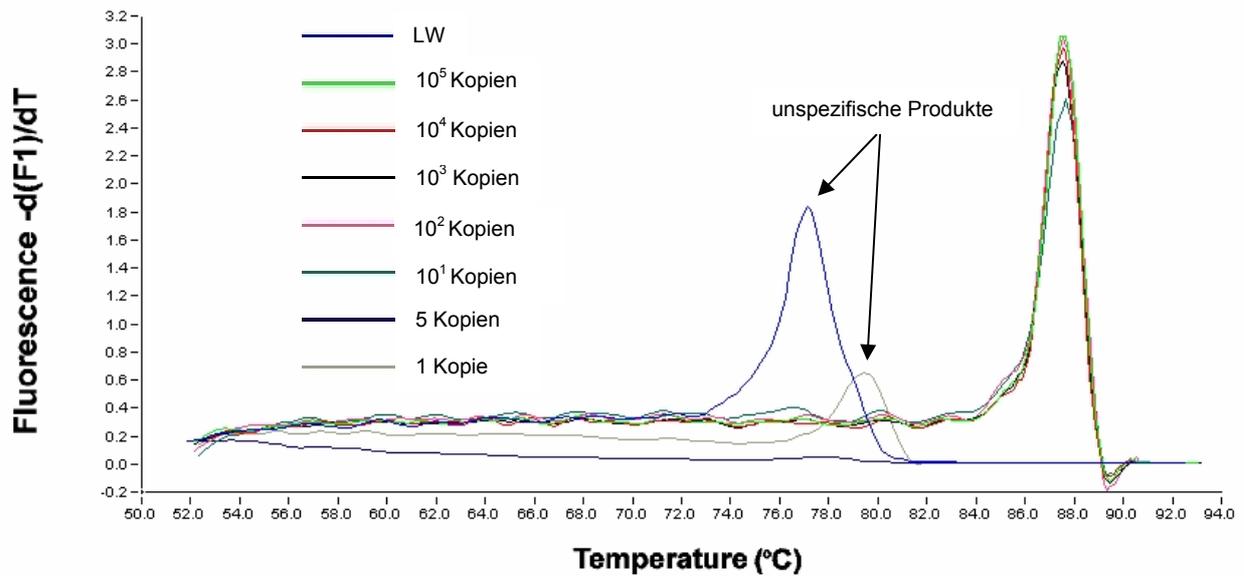


Abb. 22: Schmelzpunktanalyse des EpCAM-Amplifikats.

Die Bestimmung des Schmelzpunkts erfolgte mittels der *LightCycler Meltingcurve*-Analyse (Kap. 2.5.4.2). Die Fluoreszenz ist gegen die Schmelztemperatur der einzelnen Amplifikate aufgetragen.

Um die unspezifischen Produkte näher zu charakterisieren, wurden die EpCAM-Amplifikate anschließend auf einem 10% PAA-Gel analysiert. Diese Produkte können sowohl Primer-Dimere als auch unspezifische Amplifikate darstellen. Wären zu viele Nebenprodukte aufgetreten, wäre eine neue Auswahl von Primern unumgänglich gewesen. Abbildung 23 zeigt die PAA-Analyse des oben beschriebenen Experiments. Der Leerwert enthielt erwartungsgemäß keine nachweisbaren DNA-Fragmente, während in den EpCAM-Proben mit 10^5 -10 Kopien des EpCAM-Plasmidstandards das spezifische 200 bp Fragment zu erkennen war (Abb. 23, Spur 2-7). In der Probe mit 5 Plasmidkopien war kein Produkt detektierbar (Abb. 23, Spur 8). Möglicherweise lag dieses nicht in ausreichender Kopienzahl vor, um mittels Ethidiumbromid nachgewiesen werden zu können. In Spur 9, die der Probe mit 1 EpCAM-Plasmidkopie entspricht, ist deutlich das unspezifische Amplifikat zu erkennen, das wahrscheinlich ein Primer-Dimer darstellt.

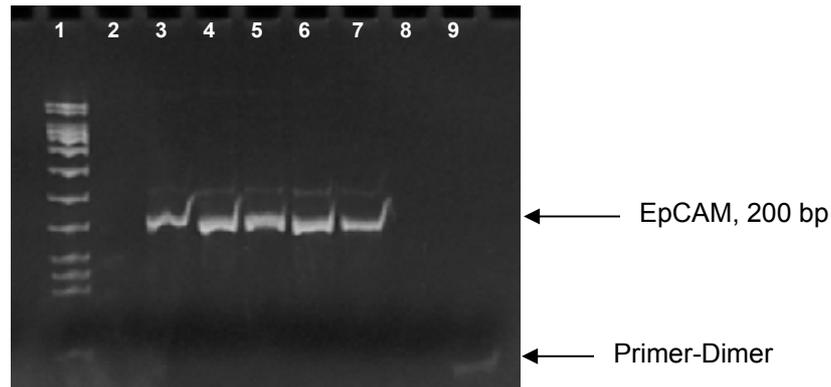


Abb. 23: PAA-Gel-Analyse der quantitativen *Real-time* RT-PCR von EpCAM.

Die Analyse der *Real-time*-RT-PCR-Produkte erfolgte mittels PAA-Gel (10%), Anfärbung mit Ethidiumbromid und UV-Licht. Spur 1, Längenstandard; Spur 2, Leerwert; Spur 3, 10^5 Kopien EpCAM-Plasmidstandard; Spur 4, 10^4 Kopien; Spur 5, 10^3 Kopien; Spur 6, 10^2 Kopien; Spur 7, 10^1 Kopien; Spur 8, 5 Kopien; Spur 9, 1 Kopie.

3.5.4. Simultaner quantitativer Nachweis von EpCAM und Her2/neu

Wie oben beschrieben weisen die Schmelzpunkte der Amplifikate der *Real-time*-RT-PCR-Analyse der Markergene EpCAM und Her2/neu einen Unterschied von 2°C auf. Nachfolgend wurde untersucht, ob sich EpCAM und Her2/neu in der selben *LightCycler*-Analyse unter denselben Laufbedingungen detektieren lassen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von SKBR3-RNA, die nach Kapitel 2.3.3. isoliert wurde, hergestellt. Die Verdünnungen wurden anschließend mittels AMV-Kit *revers transkribiert* und in den *LightCycler* zur Analyse eingesetzt (Kap. 2.5.4.2). Abbildung 24 zeigt die Schmelzpunktanalyse und die deutliche Trennung der erhaltenen Her2/neu- (87°C) und EpCAM- (89°C) Amplifikate. Die aufgetretenen unspezifischen Produkte besaßen erwartungsgemäß einen niedrigeren Schmelzpunkt (Abb. 24).

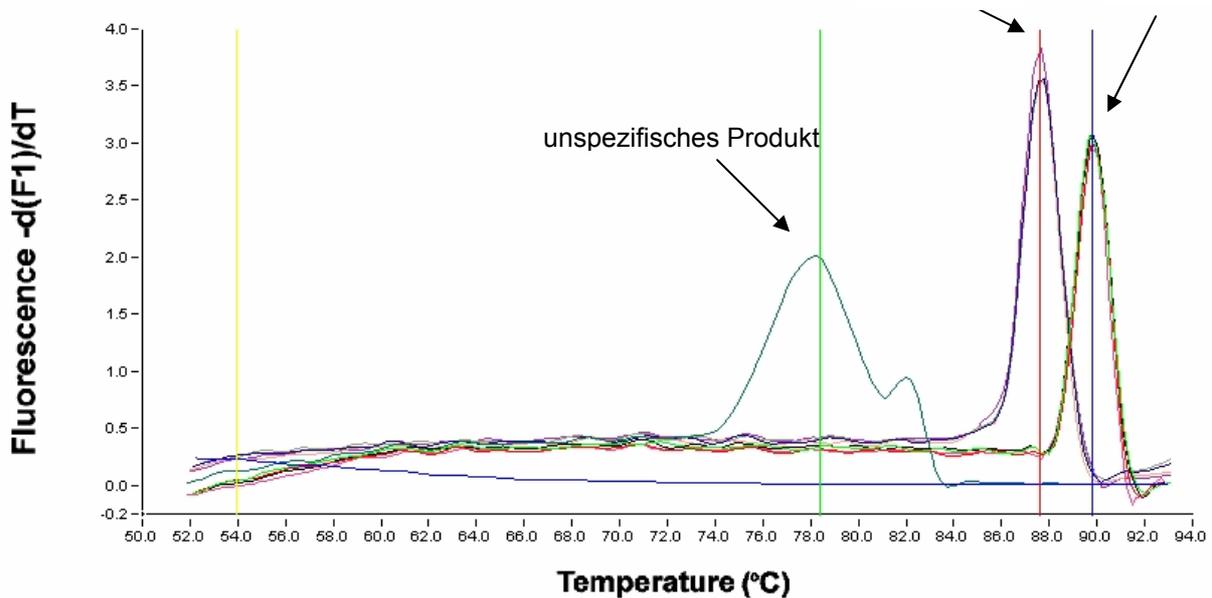


Abb. 24: Schmelzpunktanalyse der simultanen *Real-time*-RT-PCR von Her2/neu und EpCAM.

Es wurden verschiedene Her2/neu- und EpCAM-RNA-Mengen mittels eines AMV-Kit *revers transkribiert* und die erhaltene cDNA in den *LightCycler* eingesetzt (Kap. 2.5.4.2.). In den SYBRGreen Mix mit 3 mM MgCl₂ wurden je 5 pmol Her2-5'RT und Her2-3'RT Primer bzw. EpCAM-5'nested und EpCAM-3'nested Primer gegeben und für 40 Zyklen bei 60°C inkubiert. Die Bestimmung des Schmelzpunkts erfolgte mittels der *LightCycler Meltingcurve*-Analyse.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass eine parallele Analytik der tumorassoziierten Marker Her2/neu und EpCAM mit dem *LightCycler* Instrument möglich ist. Dies erlaubt somit einen schnelleren und sicheren Nachweis von Tumorzellen und bereitet die Grundlage für die Quantifizierung der Expression dieser Tumorgene.

3.5.5. Quantifizierung der EpCAM-Expression in Tumorpatientenproben

Der neu etablierte quantitative Nachweis von EpCAM wurde an Rückstellproben der Studie STPrem01 getestet. Diese Phase I-II Studie untersuchte die Verträglichkeit des removab[®]-Antikörpers bei metastasierten Ovarial-Karzinomen. Der trifunktionelle Antikörper ist gegen EpCAM gerichtet und soll demnach EpCAM-exprimierende Tumorzellen vernichten. Zur Analyse wurde Aszitesflüssigkeit eines Tumorpatienten verwendet, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach removab[®]-Gaben genommen wurden. Wie in Kapitel 3.5.1. beschrieben wurde aus den Aszitesflüssigkeiten die MNC-Fraktion durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und daraus die

jeweilige Gesamt-RNA präpariert (Kap.2.3.3.). Diese wurden anschließend mittels AMV-Kit *revers transkribiert* und die erhaltenen cDNA-Proben im *LightCycler* analysiert. Zur Quantifizierung wurden zusätzlich vier Standards mit 10^2 - 10^5 Kopien an EpCAM-Standardplasmid mitgeführt.

Abbildung 25 zeigt die *Real-time-RT-Amplifikation* von EpCAM der Patientenproben und der Standards. In allen Ansätzen konnte bis auf den Leerwert ein Amplifikat detektiert werden. Die *Crossingpoints* der Standardproben wiesen alle wie erwartet den selben Abstand zueinander auf, wodurch die Qualität der Standardproben gezeigt wurde (Abb. 25). Die vier Patientenproben lagen innerhalb der Standardkurven. Die nachfolgende Schmelzpunktanalyse (Abb. 26) verifizierte die Amplifikate als spezifisch für EpCAM, da der Schmelzpunkt bei allen Proben bei 87°C lag (Kap. 3.5.2.).

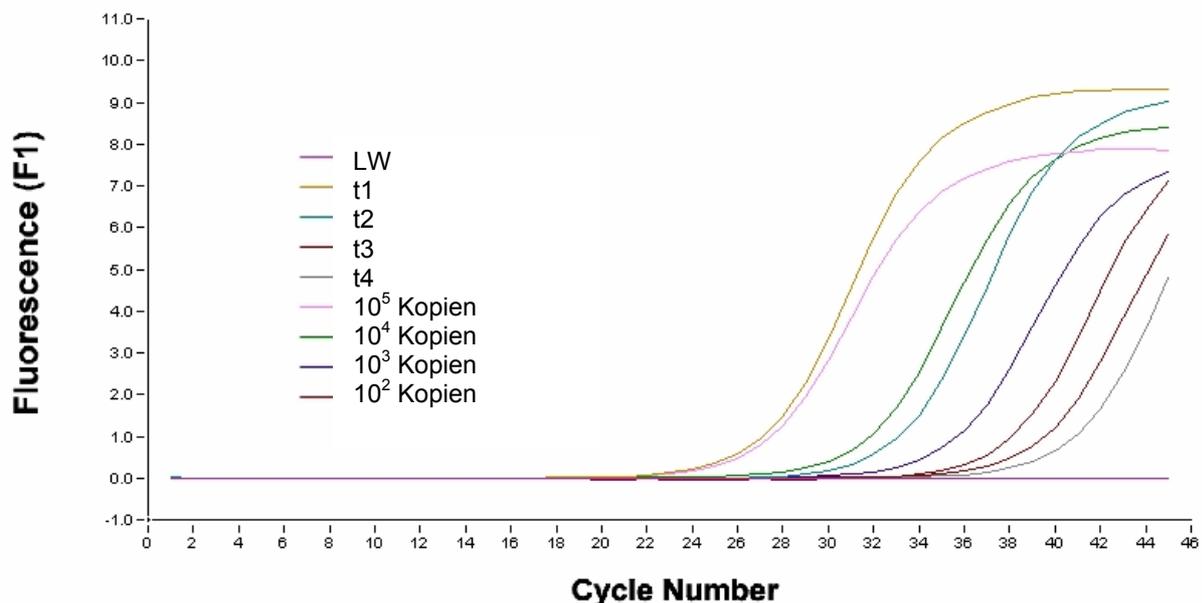


Abb. 25: Quantitative Bestimmung der EpCAM-Expression zum Monitoring der STPrem01-Studie.

Aus Zellen von Aszitesflüssigkeit von Patient 2 wurde wie in Abbildung 17 beschrieben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Antikörpergabe (t1-t4) die Gesamt-RNA gewonnen. Mittels eines AMV-Kit wurde jeweils die cDNA gewonnen und diese in einen SyberGreen Mastermix gegeben (Kap. 2.5.4.2.). Zusätzlich wurden vier verschiedene EpCAM-Plasmidstandards mit 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 Kopien für die Quantifizierung der EpCAM-Menge dazugegeben. Der SYBRGreen Mastermix enthielt 3 mM MgCl_2 sowie je 5 pmol EpCAM-5'nested und EpCAM-3'nested Primer. Der Ansatz wurde für 40 Zyklen bei 60°C im *LightCycler* inkubiert (Kap. 2.5.4.2.). LW, Leerwert; t1, Zeitpunkt nach 1. Antikörpergabe; t2, Zeitpunkt nach 2. Antikörpergabe; t3, Zeitpunkt nach 3. Antikörpergabe; t4, Zeitpunkt nach 4. Antikörpergabe; 10^2 - 10^5 Kopien, EpCAM-Standardplasmid.

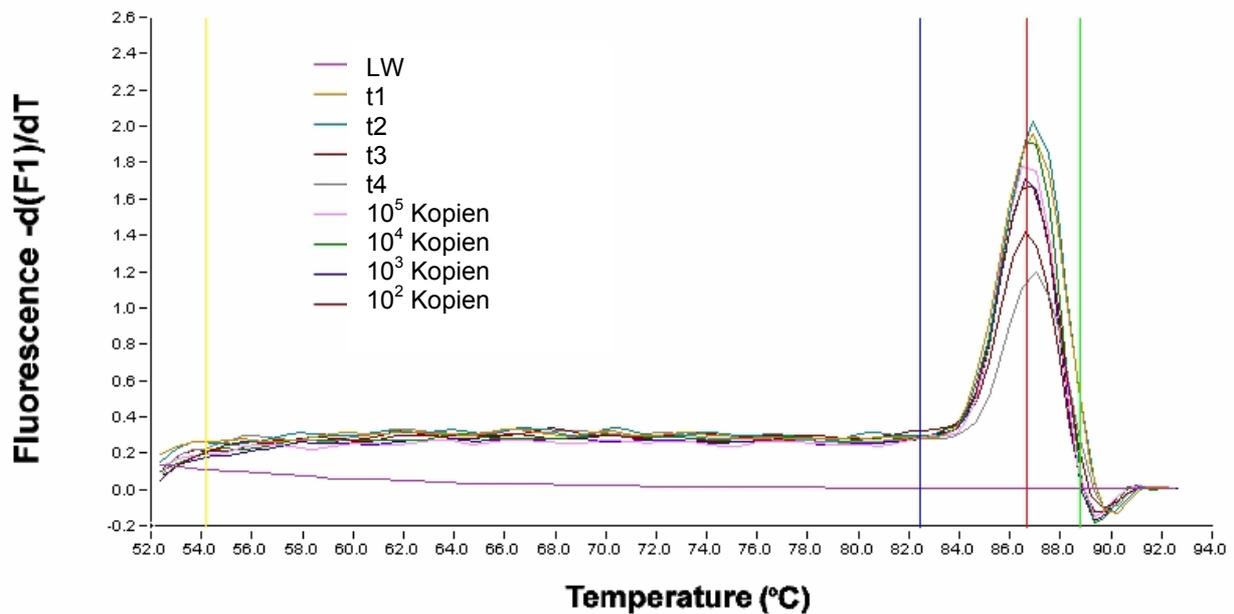


Abb. 26: Schmelzpunktanalyse der EpCAM-Amplifikate der Patientenproben.

Die Bestimmung des Schmelzpunkts erfolgte mittels der *LightCycler Meltingcurve*-Analyse. LW, Leerwert; t1, Zeitpunkt nach 1. Antikörpergabe; t2, Zeitpunkt nach 2. Antikörpergabe; t3, Zeitpunkt nach 3. Antikörpergabe; t4, Zeitpunkt nach 4. Antikörpergabe; 10^2 - 10^5 Kopien, EpCAM-Standardplasmid.

Unter Verwendung der *Crossingpoints* der internen EpCAM-Standards wurde mit Hilfe der zugehörigen Software die EpCAM-Expression in den Patientenproben der verschiedenen Zeitpunkte berechnet. Wie Tabelle 9 darstellt, nahm die EpCAM-Expression und somit die Tumorzellbelastung in den untersuchten Patientenproben mit steigender Anzahl an *removab*[®]-Gaben von $2,4 \times 10^6$ bis auf $5,6 \times 10^2$ Genkopien/ 10^6 MNC ab. Daraus lässt sich ableiten, dass die Anzahl der Tumorzellen im Verlauf der Behandlung etwa um den Faktor 2×10^4 abnahm. Dies unterstreicht die Wirksamkeit des *removab*[®]-Antikörpers gegenüber EpCAM-exprimierenden Tumorzellen. Die Qualität der Probenpräparation wurde anhand des PBGD-Standards bestimmt. Alle Patientenproben wiesen dieselbe Menge an PBGD-Expression auf (Tab. 10).

Tab. 9: Monitoring der Tumorzelleliminierung mittels *Real-time* RT-PCR.

Quantifizierung der EpCAM-Expression der verschiedenen Zeitpunkte (t1-t4) nach Antikörpergabe anhand der *Crossingpoints* der internen Standards des Patienten 2 der Studie STPrem01.

Zeitpunkt	t1	t2	t3	t4
<i>crossingpoint</i>	27,47	33,40	37,95	41,00
EpCAM-Kopien/ 10 ⁶ MNC	2,4x10 ⁶	6,2x10 ⁴	3,8x10 ³	5,6x10 ²

Tab. 10: Quantifizierung des PBDG-Standards der Patientenproben.

Quantifizierung der PBDG-Expression der verschiedenen Zeitpunkte (t1-t4) anhand der *Crossingpoints* der internen Standards.

Zeitpunkt	t1	t2	t3	t4
<i>crossingpoint</i>	28,20	26,70	27,20	28,90
PBDG-Kopien/ 10 ⁶ MNC	1,6x10 ⁶	4x10 ⁶	3x10 ⁶	2x10 ⁶

Die quantitative *Real-time*-RT-PCR weist somit gegenüber der qualitativen *nested*-RT-PCR einen entscheidenden Vorteil auf, da die *nested*-RT-PCR keine Quantifizierung der EpCAM-Expression der selben Proben (Abb. 17) erlaubte. Diese neue *Real-time* RT-PCR ist somit in der Lage, die Tumorzellbelastung während einer Therapie schnell, zuverlässig und quantitativ zu verfolgen und wird deshalb in einer Phase II-, III-Studie zum Monitoring bei adjuvanten Antikörpertherapien solider Tumore zum Einsatz kommen.

3.5.6. Entwicklung einer Suspensionsfärbung für Tumorzellen

Isolierte disseminierte Tumorzellen werden standardmäßig immunzytochemisch mit Hilfe eines Panzytokeratin-Antikörpers und anschließender APAAP-Färbung nachgewiesen. Dazu werden isolierte MNC aus Knochenmark, Blut, Stammzellapheresen oder Aszitesflüssigkeit über Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, auf Objektträger gebracht und angefärbt. Die detektierten Tumorzellen sind dabei fest auf der Objektträgeroberfläche assoziiert und lassen sich nur sehr schwer und mit erheblichem Aufwand mittels Mikrodissektion einzeln wieder ablösen, um sie mittels PCR weiter zu charakterisieren. Um die aufwendige Mikrodissektion zu umgehen, sollte eine neue Methode entwickelt werden, die Tumorzellen direkt in Suspension anfärbt, ohne dass diese auf einen Objektträger aufgebracht werden

müssen. Dazu wurden 1×10^7 MNC aus peripherem Blut gesunder Spender mit 10^3 SKBR3-Tumorzellen versetzt. Anschließend wurden die Tumorzellen mittels eines Her2/neu-EpCAM-Antikörpergemisches angereichert (Kap. 2.4.1.). Die Antikörper waren zuvor an Magnetbeads gekoppelt worden (Kap. 2.2.2.). Die gebundenen Tumorzellen wurden jedoch nicht von den Magnetbeads abgetrennt, sondern direkt für eine APAAP-Färbung mit dem Panzytokeratin-Antikörper A45-B/B3 nach Kapitel 2.5.1.1. eingesetzt. Im Gegensatz zu Zytospins wurde die Färbung direkt in der Zellsuspension durchgeführt. Die einzelnen Lösungswechsel und Waschschriffe erfolgten mit Hilfe eines Magneten. Nach Beendigung der Färbeschritte wurde die gefärbte Zellsuspension in eine Petrischale überführt. In dieser erfolgte unter einem Mikroskop die Auswertung der Tumorzellen. Abbildung 27 zeigt mittels APAAP-Färbung in Suspension rot gefärbte Tumorzelle. Die Magnetbeads sind deutlich zu erkennen, da sie zu diesem Zeitpunkt diese noch nicht abgetrennt waren. Diese konnten gegebenenfalls mit Hilfe von DNase abgetrennt werden (Kap. 2.2.4.). Da die gefärbten Tumorzellen in Suspension einzeln vorliegen, ließen sich diese mit einer Pipette unter einem Mikroskop vergleichsweise einfach selektionieren, in ein Reaktionsgefäß überführen und mittels PCR anschließend im Detail charakterisieren. Durch Suspensionsfärbung entfällt somit die aufwendige Mikrodissektion der Tumorzellen.



Abb. 27: In Suspension angefärbte Zytokeratin-positive Tumorzelle.

10^3 SKBR3-Tumorzellen wurden in einem Hintergrund von 1×10^7 MNC aus peripherem Blut gesunder Spender mit einem Her2/neu-EpCAM-Antikörpercocktail nach Kapitel 2.2.3 angereichert. Anschließend erfolgte eine APAAP-Färbung in Suspension nach Kapitel 2.5.1.1. mit dem A45-B/B3-Antikörper. Die einzelnen Waschschriffe wurden mit Hilfe eines Magneten durchgeführt. Die Auswertung der Tumorzellen erfolgte in einer Petrischale im Mikroskop mittels Hellfeld.

3.5.7. Multiple PCR-Charakterisierung von Tumorzellen

Die oben beschriebene Suspensionsfärbung (Kap. 3.5.6.) diente als Grundlage für die weitere Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen mittels qualitativer *nested*-RT-PCR-Analyse. Es sollte untersucht werden, ob eine PCR Charakterisierung von bereits gefärbten Zytokeratin-positiven Tumorzellen möglich ist. Im Versuchsansatz sollten verschiedene tumorassoziierte Marker (CK 20, EGF-R und MAGE1) mittels PCR in Zytokeratin-positiven Tumorzellen nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der Nukleinsäurepräparation aus den Tumorzellen sollte auch das Haushaltsgen Histon H3.3 amplifiziert werden.

Für das Experiment wurden 10^3 SKBR3-Tumorzellen wie oben beschrieben (Kap. 3.5.3) angefärbt und im Mikroskop ausgewertet. Verschiedene Mengen an angefärbten Zytokeratin-positiven Tumorzellen (1, 10, 100 Zellen) wurden unter dem Mikroskop gepickt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Für die weitere PCR Analyse wurde zu den Tumorzellen ein Lysepuffer (Dynal) und Oligo-dT-Beads (Dynal) hinzugefügt, mit welchen die mRNA isoliert wurde (Kap. 2.3.4.). Diese wurde anschließend, ohne die Oligo-dT-Beads abzutrennen, direkt in einen qualitativen *nested*-RT-PCR-Ansatz für den tumorassoziierten Marker CK 20 (Zytokeratin 20) eingesetzt (Kap. 2.5.4.1.). Ein Teil des CK 20 *nested*-PCR-Ansatzes wurde für die Auswertung auf ein PAA-Gel aufgetragen. Anschließend wurde die erste PCR von CK 20 in einen Magneten gestellt, um noch vorhandene, an Oligo-dT-Beads gebundene mRNA, zu isolieren. Die mRNA wurde im Magneten mit PCR-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen und direkt in einen weiteren qualitativen *nested* RT-PCR-Ansatz für den tumorassoziierten Marker EGF-R eingesetzt (Kap. 2.5.4.1.). Auf die gleiche Weise wurde der tumorassoziierte Marker MAGE1 und zuletzt das Haushaltsgen Histon H3.3 bestimmt.

Abbildung 28 zeigt den nacheinander erfolgten Nachweis der verschiedenen Marker CK 20, EGF-R und MAGE1 sowie Histon H3.3 mittels qualitativer *nested* PCR. CK 20 konnte in 10 bzw. 100 Ausgangszellen nachgewiesen werden, jedoch nicht in einer einzelnen SKBR3-Zelle (Abb. 28). Der EGF-R sowie das Histon H3.3 wurden in allen drei Proben detektiert, während der MAGE1-Marker vermutlich von SKBR3-Zellen nicht exprimiert wird oder unter der Nachweisgrenze liegt (Abb. 28).

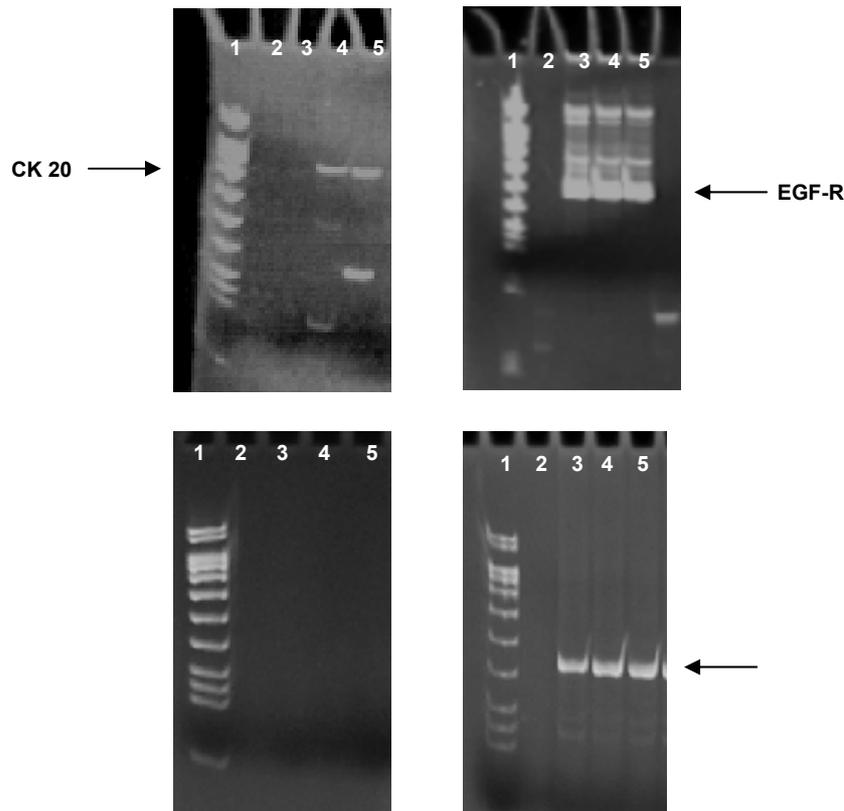


Abb. 28: PCR zur Mehrfachcharakterisierung von CK 20, EGF-R, MAGE 1 und Histon H3.3 Zytokeratin-positiver Tumorzellen.

In einen Ansatz von 10^6 MNC wurden 10^3 SKBR3-Tumorzellen gegeben und wie in Kapitel 3.5.3. beschrieben immunzytochemisch mit dem Antikörper A45-B/B3 angefärbt. 1, 10 und 100 Zytokeratin-positive Tumorzellen wurden anschließend unter dem Mikroskop selektioniert, die mRNA nach Kapitel 2.3.4. isoliert und in eine qualitative *nested*-RT-PCR für CK 20 eingesetzt. Die verbliebene mRNA im 1. PCR-Ansatz von CK 20 wurde mittels Magnetbeads isoliert und mit einem PCR-Mastermix für den Nachweis von EGF-R versetzt. Anschließend wurde noch vorhandene mRNA aus dem 1. PCR-Ansatz von EGF-R erneut isoliert und entsprechend MAGE 1 nachgewiesen. Auf dieselbe Weise wurde schließlich Histon H3.3 analysiert (Kap. 3.5.4.). Die PCR-Produkte wurden auf ein 10% PAA-Gel aufgetragen und mittels Ethidiumbromid und UV-Licht detektiert. CK 20, Zytokeratin 20; EGF-R, EGF-Rezeptor; MAGE 1, Melanom-kodierendes Antigen 1; Spur 1, Langenstandard; Spur 2, Leerwert; Spur 3, 1 Tumorzelle; Spur 4, 10 Tumorzellen; Spur 5, 100 Tumorzellen.

Hier konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, immunzytochemisch identifizierte Zytokeratin-positive Tumorzellen mittels qualitativer *nested* RT-PCR zusätzlich auf Tumormarker wie CK 20 oder EGF-R hin zu charakterisieren. Dies könnte einen Weg darstellen, um das maligne Potential von Tumorzellen detaillierter zu bestimmen und um weitere signifikante Tumormarker zu identifizieren.

3.6. Kombination der APAAP-Färbung mit *in situ* Hybridisierung

Die durch Her2/neu-Genamplifikationen bedingte Überexpression des Her2/neu-Proteins korreliert signifikant mit der Metastasierung von soliden Tumoren (Oruzio, 1997). Eine Her2/neu-Genamplifikation beim Mammakarzinom ist Bedingung für eine Therapie mit dem therapeutischen Antikörper Herceptin® (Roche, Penzberg). Die Standardmethode zum Nachweis der Genamplifikation im Primärtumorgewebe ist die Analyse von Gewebeschnitten und Inkubation mit einer paraffingängigen DNA-Sonde, die spezifisch für das Her2/neu-Gen ist (Dako Hercept-Test®). Es existieren jedoch Hinweise darauf, dass Metastasen in ihrer Expression von Tumormarkern in vielen Fällen nicht mit dem Primärtumor übereinstimmen (Klein et al., 2002). Um unabhängig vom Primärtumor eine Her2/neu-Amplifikation in disseminierten Tumorzellen nachweisen zu können, wurden diese zuerst mittels Immunocytochemie und APAAP-Färbung identifiziert (Kap. 2.5.1.1.), anschließend mittels *in situ* Hybridisierung mit einer Her2/neu-DNA-Sonde (Zytomed, Berlin) inkubiert. Diese Sonde lagert sich an die entsprechenden Genabschnitte auf den Chromosomen an und kann entweder mit Chromogenen (Chromogen *in situ* Hybridisierung, CISH) oder mittels Fluoreszenzdetektion (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, FISH) nachgewiesen werden. Eine Genamplifikation lag vor, wenn vier oder mehr Signale pro Zellkern detektiert wurden.

Zuerst wurde untersucht, ob sich in Tumorzellen Her2/neu-Genamplifikationen mit einer kommerziell erhältlichen Her2/neu-DNA-Sonde (Zytomed, Berlin) mittels *in situ* Hybridisierung nachweisen lassen. Diese Sonde wird normalerweise für Gewebeschnitte verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden Zytospins mit MNC verwendet, denen 10% SKBR3-Tumorzellen hinzugefügt waren. Diese Präparate wurden direkt einer Chromogen *in situ* Hybridisierung nach den Herstellerangaben unterworfen. Der verwendete Farbstoff DAB führte zu einer braunen Färbung der chromosomalen Her2/neu Loci. Zum Schluss wurden die Zellkerne der Zellen mit Hämatoxylin blau angefärbt, um diese im Hellfeld des Mikroskops sichtbar zu machen. In Abbildung 29 ist deutlich ein Zellkern mit zwei braunen Punkten zu erkennen, der somit keine Her2/neu-Genamplifikation aufweist (linkes Bild). Drei Kerne weisen dagegen eine eindeutige multiple Her2/neu-Genamplifikation auf, da

diese mehrere braune Punkte enthalten (Abb. 29), was diese demnach als Tumorzellen auswies. Somit lassen sich auch in isolierten disseminierten Tumorzellen Her2/neu-Genamplifikationen durch *in situ* Hybridisierung nachweisen.

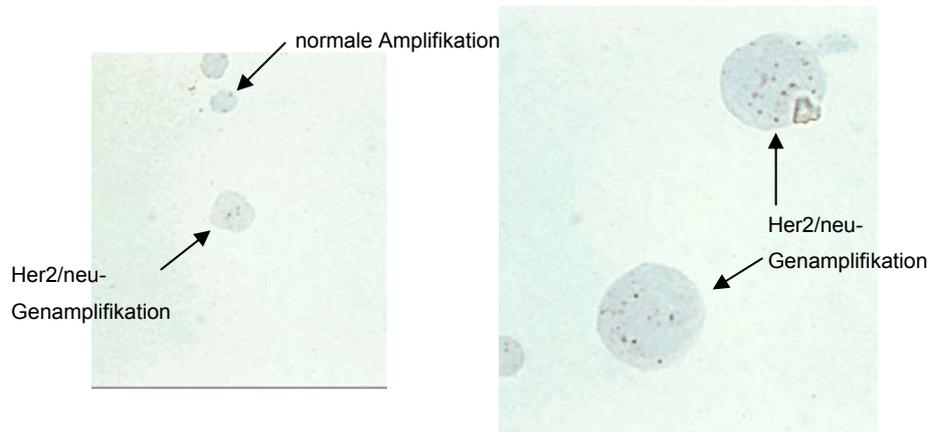


Abb. 29: Nachweis einer Her2/neu-Genamplifikation mittels Chromogen *in situ* Hybridisierung.

Zytospins von 1×10^6 MNC, die mit 10% SKBR3-Tumorzellen versetzt waren, wurden mit einer SpotLight-Her2-DNA-Sonde (Zytomed, Berlin) inkubiert (Kap. 2.6.1.). Die Detektion erfolgte mittels DAB-Farbstoffes im Hellfeld des Mikroskops. Die Zellkerne wurden anschließend mit Hämatoxilin angefärbt. Beide Bilder weisen dieselbe Vergrößerung auf.

3.6.1. Kombination von APAAP-Färbung und CISH

Im Folgenden wurde die APAAP-Färbung mit BCIP/NBT mit einer CISH (Chromogen *in situ* Hybridisierung) kombiniert. Dadurch sollten bereits identifizierte Zytokeratin-positive Tumorzellen auf eine Her2/neu Genamplifikation hin charakterisiert werden. Dazu wurden Zytospins von MNC, die mit 10% SKBR3-Tumorzellen versetzt waren, als Ausgangsmaterial verwendet. Zuerst wurde eine APAAP-Färbung wie in Kapitel 2.5.1.1. beschrieben durchgeführt und mit dem Farbstoff BCIP/NBT entwickelt. Die dadurch blau gefärbten Tumorzellen wurden unter einem Mikroskop beurteilt und die Koordinaten notiert, die mittels des *New England Finders* ermittelt wurden. Anschließend wurde mit diesen Präparaten eine Chromogen *in situ* Hybridisierung mit dem Farbstoff DAB nach Kapitel 2.6.1. durchgeführt. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse dieser neuen Kombinationsmethode. Wie schon oben erwähnt, zeigte sich die Her2/neu-Genamplifikation durch mehrere Signale (braun/schwarze Punkte)

im Zellkern der blaugefärbten Tumorzellen. Tumorzellen ohne Her2/neu-Genamplifikationen wiesen dagegen nur zwei Signale im Zellkern auf (Abb. 30).



Abb. 30: Nachweis einer Her2/neu-Genamplifikation mittels Kombination von APAAP Färbung/CISH.

Zytospin von 1×10^6 MNC die mit 10% SKBR3-Tumorzellen versetzt waren, wurde immunzytochemisch mittels APAAP Färbung und BCIP/NBT analysiert (Zytokeratin-positive Zellen, blau). Anschließend wurde der Zytospin mit einer SpotLight-Her2-DNA-Sonde (Zytomed, Berlin) inkubiert (Kap. 2.6.3.). Die Detektion erfolgte mittels DAB-Farbstoffe im Hellfeld des Mikroskops.

Diese neue Kombinationsmethode stellt somit eine schnelle und verlässliche Möglichkeit dar, Her2/neu-Genamplifikationen in Zytokeratin-positiven Zellen nachzuweisen. Die Standardmethode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen ist jedoch die Immunzytochemie mittels APAAP-Färbung und dem Farbstoff Neufuchsin. Deshalb sollte im Folgendem versucht werden, diese neue Methode auch mit rot gefärbten Tumorzellen durchzuführen.

3.6.2. Kombination von APAAP-Färbung und FISH

Aufgrund der Eigenfluoreszenz von Neufuchsin ist es schwierig, diesen mit anderen Farbstoffen zu kombinieren (Kap. 3.4.1.). Trotzdem wurde die APAAP-Färbung von Tumorzellen wie oben beschrieben mit Neufuchsin anstelle von BCIP/NBT mit dem FISH-Nachweis der Her2/neu-DNA-Sonde kombiniert. Diese wurde mit einem Anti-Schaf-Antikörper nachgewiesen, der mit FITC gekoppelt war.

Erneut wurden Zytospins mit 10% SKBR3-Tumorzellen mit einer APAAP-Färbung und Neufuchsin entwickelt und die rotgefärbten Tumorzellen unter einem Mikroskop beurteilt (Kap. 2.7.). Die *New England Finder*-Koordinaten wurden notiert. Anschließend wurden die Präparate einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung unterworfen (Kap. 2.6.3.). Abbildung 31 und 32 zeigen Ergebnisse verschiedener Versuche. In Abbildung 31 konnte eine Her2/neu-Genamplifikation einer Zytokeratin-positiven Tumorzelle (rotgefärbte Zelle) detektiert werden. Mittels FISH konnten vier grüne Punkte in der Zelle nachgewiesen werden (Abb. 31, linkes Bild). Die rote Anfärbung derselben Zelle durch Neufuchsin wies diese gleichzeitig als Tumorzelle aus (Abb. 31, rechtes Bild).

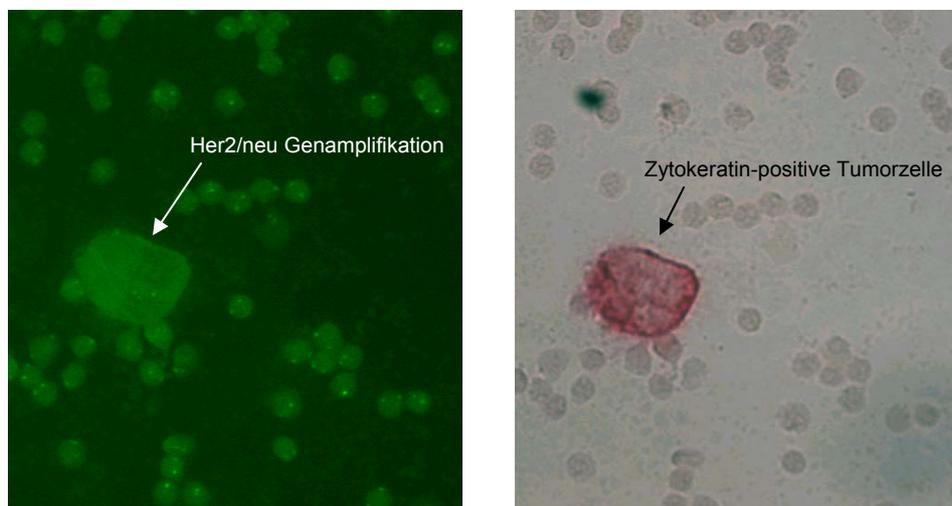


Abb. 31: Nachweis einer Her2/neu-Genamplifikation mittels Kombination von APAAP Färbung/FISH.

Zytospin von 1×10^6 MNC, die mit 10% SKBR3-Tumorzellen versetzt waren, wurde immunzytochemisch mittels APAAP Färbung und Neufuchsin analysiert (Zytokeratin-positive Zelle, rot, rechts). Anschließend wurde der Zytospin mit einer SpotLight-Her2-DNA-Sonde (Zytomed, Berlin) inkubiert und diese wurde mit einem Anti-Schaf-Antikörper nachwies (Kap. 2.6.3), der mit FITC gekoppelt war (grüne Zelle mit vier Punkten, links). Die Detektion erfolgte im Fluoreszenzkanal bei 524nm.

Abbildung 32 zeigt dagegen keine Her2/neu-Genamplifikation der Zytokeratin-positiven Tumorzelle, da die Tumorzelle den Normalzustand der Her2/neu-Genverteilung von zwei Loki aufwies.

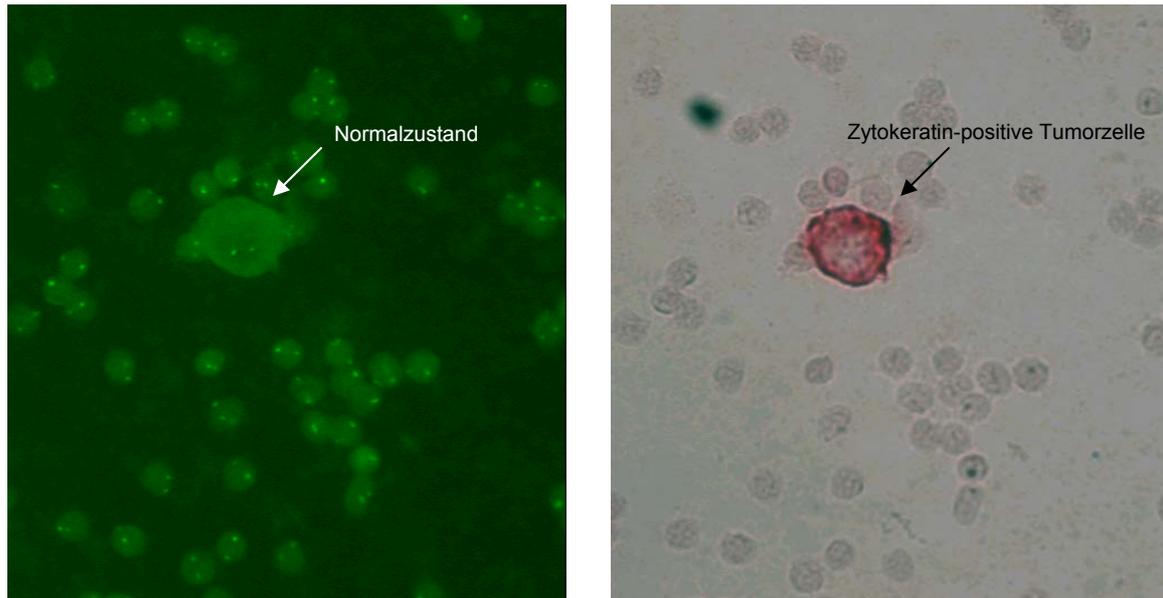


Abb. 32: Kein Nachweis einer Her2/neu-Genamplifikation mittels Kombination von APAAP Färbung/FISH.

Zytospin von 1×10^6 MNC, die mit 10% SKBR3-Tumorzellen versetzt waren, wurde immunzytochemisch mittels APAAP Färbung und Neufuchsin analysiert (Zytokeratin-positive Zelle, rot, rechts). Anschließend wurde der Zytospin mit einer SpotLight-Her2-DNA-Sonde (Zytomed, Berlin) inkubiert und diese wurde mit einem Anti-Schaf-Antikörper nachgewiesen (Kap. 2.6.3.), der mit FITC gekoppelt war (grüne Zelle mit zwei Punkten, links). Die Detektion erfolgte im Fluoreszenzkanal bei 524nm.

Der kombinierte APAAP/FISH-Assay ermöglicht eine schnelle und reproduzierbare Quantifizierung der Her2/neu-Genamplifikation bei disseminierten Zytokeratin-positiven Tumorzellen. Außerdem erlaubt dieser die vorgeschaltete Analytik der disseminierten Tumorzellen mittels Immunzytochemie und APAAP-Färbung mit dem Farbstoff Neufuchsin. Eine klinische Anwendung fand diese neu etablierte APAAP/FISH-Kombinationstechnik in einer Studie der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Innenstadt der Universität München. In dieser Studie wurden Zytokeratin-positive Zellen aus Knochenmarkspunktaten von Mamma-Karzinom-Patientinnen auf Her2/neu-Genamplifikationen untersucht.

3.7. Validierung automatisierter Mikroskope

Das Standardverfahren zum Nachweis disseminierter Tumorzellen ist die immunzytochemische Analyse mittels Antikörper gegen verschiedene Tumormarker und anschließender APAAP-Färbung. Dieses Verfahren ist jedoch ziemlich zeitintensiv. Das aufwändige manuelle mikroskopische Screening größerer Mengen an gefärbten Zytospins könnte durch die automatisierte Analyse der gefärbten Präparate mit Hilfe von Bildanalysesystemen erleichtert werden. Deshalb wurde die manuelle Analyse von Tumorzellen mit einer Analyse der Präparate auf einem automatisierten Mikroskop (*Micrometastasis Detektion System*, MDS Applied Imaging, England) verglichen. Zytospins von 59 Patienten wurden immunzytochemisch mittels eines Panzytokeratin-Antikörpers und APAAP-Färbung (Kap 2.5.1.1.) analysiert und sowohl manuell per Auge als auch im automatisierten MDS-Mikroskop ausgewertet. Bei der manuellen Analyse konnten bei 9 Patienten im Durchschnitt 2,7 Tumorzellen pro 1×10^6 MNC nachgewiesen werden (Tab. 11). Bei der automatisierten Auswertung mit dem MDS-System wurden sogar bei 12 Patienten Tumorzellen detektiert (Tab. 11). Diese wiesen eine durchschnittliche Tumorzellbelastung pro Patient von 7,9 Tumorzellen pro 1×10^6 MNC (Tab. 11). Es zeigte sich hier sehr deutlich, dass die Verwendung des automatisierten MDS-Systems zu einer erhöhten Tumorzell-detektionsrate von Zytokeratin-positiven Zellen führte. Außerdem wurden bei positiven Patientenproben durchschnittlich mehr Tumorzellen nachgewiesen (höhere Tumorzellbelastung).

Tab. 11: Vergleich der manuellen Auswertung mit dem automatisierten MDS-Mikroskop.

Analyse von Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark von Patienten mit soliden Tumoren mittels eines Panzytokeratin-Antikörpers und APAAP-Färbung.

	manuelle Auswertung	automatisierte Auswertung
positive Patienten (Patientenzahl: 59)	9	12
Tumorzellbelastung pro Patient (CK-positive Zellen / 1×10^6 MNC)	2,7	7,9

Aufgrund der optimierten Auswertung der APAAP-Färbung durch das automatisierte MDS-Mikroskop wurde die Sensitivität und Spezifität des Tumorzellnachweises wesentlich verbessert. Damit würde die Verwendung des MDS in der Routinediagnostik zu einer schnelleren, sensitiveren und auch standardisierteren Tumorzelldetektion führen. Weiterhin kann durch die individuelle Programmierung des MDS-Systems flexibel auf verschiedene neue Applikationen wie die APAAP-Färbung mit BCIP/NBT reagiert werden. Durch Erstellen neuer Programme ist das System in auch in der Lage, fluoreszenzmarkierte Tumorzellen aufzufinden. Abbildung 33 zeigt das MDS System.

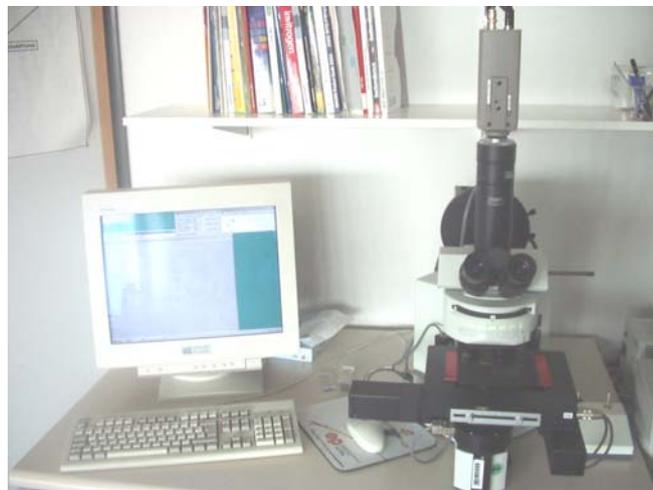


Abb. 33: Automatisiertes Mikroskop MDS (*Micrometastasis Detection System*).

Um immer größere Probenvolumina in Studien zeitnah analysieren zu können, wurde auch das automatisierte Mikroskop Ariol (Applied Imaging, England) validiert. Dieses System verfügt über ein Hochdurchsatz-Ladegerät für Zytospins. Grundlage für die Sensitivität und Spezifität der Tumorzelldetektion war das MDS-System. 50 bereits mit dem MDS-System analysierte und bewertete Proben wurden mit dem Ariol-System nachanalysiert. Es zeigte sich, dass das Ariol-System in der Lage war, alle bereits mittels MDS-System detektierten Tumorzellen wieder aufzufinden. Da dieses System wie das MDS-System ebenfalls mit *New England Finder* Koordinaten arbeitet, können analysierte Präparate zur weiteren Charakterisierung an das Ariol-System übergeben werden. Zur Zeit ist dieses System jedoch noch nicht in der Lage, Fluoreszenzen zu detektieren. Abbildung 34 zeigt dieses System.



Abb. 34: Automatisiertes Mikroskop mit Slide-Loader (Ariol-System).

Somit stehen sowohl ein sehr flexibles automatisiertes Mikroskop für die Detektion von disseminierten Tumorzellen und deren Mehrfachcharakterisierung als auch ein automatisiertes Mikroskop für einen hohen Probendurchsatz in der Immuncytochemie mittels APAAP-Färbung mit gleicher Sensitivität und Spezifität zur Verfügung. Durch die Kombination beider Systeme kann in Zukunft eine standardisierte Tumorzell-detektion gewährleistet werden.

4. DISKUSSION

Trotz verbesserter Operationsstrategien für solide Tumore sowie der Anwendung von adjuvanten Therapiemaßnahmen scheint das Vorhandensein von isolierten disseminierten Tumorzellen die Rückfallhäufigkeit und das Gesamtüberleben der Tumorpatienten zu beeinflussen (Pantel and Otte, 2001b). Eine minimale residuale Erkrankung kann durch den Nachweis von Mikrometastasen mittels immunzytochemischer Methoden erkannt werden, und so können potentielle Risikopatienten ermittelt werden. Die Bedeutung des Nachweises von isolierten disseminierten Tumorzellen als erweitertes Tumorstaging spiegelt sich darüber hinaus in der Erweiterung der M(i) Klassifikation als Ergänzung zum histopathologischen pTNM-Gutachten wider (Hermanek, 1994). Aufgrund der geringen Sensitivität der Goldstandardmethode und der fehlenden Praktikabilität beim Analysieren großer Probenmengen und Zellzahlen sind neue Entwicklungen und Verbesserungen in der MRD-Analytik von essentieller Notwendigkeit. Nur ein sensitiver Nachweis von isolierten disseminierten Tumorzellen könnte auch das Auffinden neuer Surrogatmarker für ein Therapiemonitoring von Patienten mit MRD erleichtern.

4.1. Anreicherung von Tumorzellen

Die Goldstandardmethode zum Nachweis disseminierter Tumorzellen ist zurzeit die Immunzytochemie mittels eines Panzytokeratin-Antikörpers (A45-B/B3) und anschließende APAAP-Färbung. Hierbei werden 2×10^6 mononukleäre Zellen (MNC) aus Knochenmark auf das Vorhandensein von Tumorzellen hin untersucht. Die Detektion und Identifikation von isolierten disseminierten Tumorzellen ist jedoch ein relativ seltenes Ereignis. In etwa 20-30% der Karzinompatienten mit soliden Tumoren können disseminierte Tumorzellen nachgewiesen werden, wobei in 70-80% der Fälle sich unter 1×10^6 MNC nur eine einzige disseminierte Tumorzelle befindet (Pantel and Otte, 2001b). Um die Sensitivität des MRD-Nachweises zu erhöhen, wurde ein neuartiges Anreicherungsverfahren entwickelt. Anreicherungsverfahren für Tumorzellen wurden schon früher in der Literatur beschrieben. Diese Studien

konnten jedoch keine signifikante Verbesserung des Tumorzellnachweises erbringen (Brandt et al., 1996; Naume et al., 1998).

Die wesentlich höhere Sensitivität des Tumorzellnachweises ließ sich durch Kombination mehrerer Techniken und Verbesserungen von Protokollen erreichen. Als Ausgangsmaterial für die Tumorzellanreicherung wurden im Gegensatz zu früheren Publikationen keine unbehandelten Materialien verwendet, da diese die Funktionalität der verwendeten Magnetbeads beeinträchtigten. So stört z.B. der hohe Fettanteil von Knochenmark die nachfolgende Anreicherung der Tumorzellen. Es zeigte sich, dass die vorherige Gewinnung von MNC durch einen Ficoll-Dichtegradienten aus dem jeweiligen nativen Material ein geeigneteres Ausgangsmaterial darstellte und sich Probleme, die durch die unbehandelten Ausgangsmaterialien auftraten, vermeiden ließen. Es wurde schon früher gezeigt, dass sich disseminierte Tumorzellen in der MNC-Fraktion befinden und diese daraus nachgewiesen werden können (Schlimok and Riethmuller, 1990). Ein weiterer Vorteil ist die Abtrennung von vielen unerwünschten Zelltypen, die die Analytik beeinträchtigen können. Zusätzlich liegen die MNC und die darin enthaltenen Tumorzellen in der MNC-Fraktion in Suspension vor. Dadurch sind die einzelnen Zellen für die nachfolgende Anreicherung mit Magnetbeads wesentlich zugänglicher als im Zellverband von unbehandeltem Ausgangsmaterial. Aus den MNC-Fraktionen konnten die disseminierten Tumorzellen durch spezifische Antikörper selektiv angereichert werden. Dabei wurden simultan zwei Antikörper gegen die Oberflächenmarker Her2/neu und EpCAM verwendet. Diese wurden an Magnetbeads gekoppelt, wodurch einfache und schnelle Isolierung der Tumorzellen gewährleistet war. Durch die Verwendung dieser Methode konnte die Effizienz der Tumorzellanreicherung im Vergleich zur Goldstandardmethode bereits um 50% gesteigert werden. Durch zusätzliche Verbesserungen in der methodischen Durchführung konnte eine weitere 10-15%ige Steigerung der Sensitivität erreicht werden. Dazu zählte unter anderem die ausschließliche Verwendung von Glasmaterialien, um eine unspezifische Adhäsion der Magnetbeads an Reaktionsgefäße oder Pipetten zu vermeiden. Weiterhin wurden einige Parameter verschiedener Reaktionsschritte optimiert.

Durch die Verwendung dieser effektiven Anreicherungsprozedur konnte nun im Vergleich zur Goldstandardmethode eine wesentlich höhere Zellzahl pro Patient im

gleichen Zeitraum analysiert werden. Pro Ansatz wurden 1×10^7 mononucleäre Zellen isoliert. Bei der Goldstandardmethode wären dazu zehn parallele Ansätze nötig gewesen, die einen entsprechend längeren Arbeitsaufwand erfordert hätten. Darüber hinaus könnte sich angesichts der Heterogenität residualer Karzinomzellen die Verwendung eines Antikörpercocktails gegen mehrere Tumormarker der Tumorzellen anstelle eines einzigen Antikörpers von Vorteil erweisen. Damit ließe sich ein individueller Patientencocktail zusammenstellen, und die Nachweissensitivität von isolierten disseminierten Tumorzellen könnte eine weitere Steigerung erfahren. Sollten sich diese isolierten disseminierten Tumorzellen als Surrogatmarker zur frühzeitigen Abschätzung der Wirksamkeit einer adjuvanten Therapie eignen, hätte dies einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung weiterer onkologischer Diagnostika und Therapeutika.

4.2. *Purging*

Das Reinigen der Stammzellapheresate von Tumorzellen wird auch *purging* genannt. Die Rückgabe von autologen Stammzellapheresen ist eine etablierte Methode nach Hochdosis-Chemotherapie von Tumoren (Tyer et al., 1996). Da die Apheresen vor der Chemotherapie entnommen werden, enthalten sie in den meisten Fällen disseminierte Tumorzellen. Diese könnten für ein Rezidiv verantwortlich sein. Dies wurde unter anderem für Neuroblastome und Leukämien gezeigt (Deisseroth et al., 1994; Rill et al., 1994). Somit stellt das Entfernen disseminierter Tumorzellen einen essentiellen Schritt vor der Rückgabe der autologen Stammzellapherese dar. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Methoden angewandt. Diese wiesen jedoch Nachteile bezüglich der Eliminationsrate der Tumorzellen sowie in Handhabung und Durchführung auf (O'Briant et al., 1991; Tyer et al., 1996). Mit einer neuen Klasse von sogenannten trifunktionellen Antikörpern konnte hier eine sehr schnelle und effiziente Tumorzellabreicherung sowohl in Spiking-Experimenten als auch in autologen Stammzellapheresen erreicht werden. Diese Maus/Ratte-Hybridantikörper sind gleichzeitig gegen den Tumormarker EpCAM (oder Her2/neu) sowie gegen das Oberflächenantigen CD3 von T-Zellen gerichtet (Zeidler et al., 1999). Sie sind somit in der Lage, gleichzeitig an Tumorzellen und T-Zellen zu binden. Zusätzlich werden über den Fc-Teil auch akzessorische Zellen wie Makrophagen stimuliert. Dies bewirkt

eine effektive Zerstörung von Tumorzellen (Riesenberg et al., 2001; Zeidler et al., 1999).

Mit beiden trifunktionellen Antikörpern removab[®] und rexomun[®] konnte gezeigt werden, dass 0,2 ng (EpCAM) bzw. 0,5 ng (Her2/neu) eines trAK ausreichen, um 3×10^3 Tumorzellen (2%) aus einem Hintergrund von $1,5 \times 10^5$ MNC vollständig zu eliminieren. Trotz dieser sehr hohen Tumorzellbelastung reichten dazu vergleichsweise geringe Konzentration dieser Antikörper aus. Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimieren auf ihrer Oberfläche nicht die tumorassoziierten Marker Her2/neu und EpCAM, wodurch die Tumor-Spezifität bestätigt wurde. Dieselben Ergebnisse wurden auch mit Stammzellapheresen verschiedenster Tumorentitäten erzielt. Die Stammzellapheresen stellen auch ein sehr gutes Anwendungsfeld für trAK dar, da diese neben wenigen Tumorzellen viele zytotoxische Effektorzellen enthalten, wodurch die Wirkung der trifunktionellen Antikörper ermöglicht wurde. Eine zusätzliche vorherige Aktivierung von Effektorzellen war nicht nötig, obwohl für einige Antikörper beschrieben wurde, dass diese zusätzlich Interleukin 2 oder Interleukin 12 oder auch Anti-CD3-Antikörper zur Aktivierung des Immunsystems benötigen (Inaba and Steinman, 1984; Inaba et al., 1984; Verma et al., 1995; Verma and Mazumder, 1995). Diese neuartigen trAK stellen zusammen mit der hier eingesetzten *purging*-Methode ein einfach zu handhabendes System dar, das sehr effizient Tumorzellen aus Stammzellapheresen eliminieren kann. Ein weiteres Potential der trAK könnte die *in vivo* Eliminierung von disseminierten Tumorzellen in Patienten mit soliden Tumoren darstellen. Im Gegensatz zu konventionellen Behandlungsmethoden wie der Chemotherapie könnten die trAK auch ruhende oder chemotherapeutisch resistente Tumorzellen erreichen und zerstören. Gleichzeitig könnten typische Nebenwirkungen konventioneller Therapien vermieden werden (Burges, 2004). Weiterführende Studien untersuchen zur Zeit die Verträglichkeit dieser Antikörper und deren Wirksamkeit *in vivo*.

4.3. Mehrfachfärbungen

Um disseminierte Tumorzellen neben Zytokeratinen auf weitere Tumormarker hin zu charakterisieren, wurden immunzytochemische Mehrfachfärbungsmethoden etabliert. Ziel dieser Charakterisierung war es, Zytokeratin-positive Zellen mittels Analyse weiterer Tumormarker auf ihr malignes und aggressives Potential hin zu untersuchen und eine Risikoabschätzung bezüglich einer Metastasierung zu ermöglichen. Bisher verwendete Methoden zur immunzytochemischen Mehrfachfärbung von disseminierten Tumorzellen waren für die Routineanwendung zu instabil und nicht reproduzierbar genug (Pantel and Otte, 2001a). Es mussten zur Mehrfachfärbung von Tumorzellen gleichzeitig verschiedene Farbstoffe eingesetzt werden, die an Tumormarker-Antikörper gekoppelt waren. Dies stellte das Hauptproblem dieser Methode dar, da die selektive Detektion einzelner Farbstoffe durch die übrigen Farbstoffe behindert wurde. So wies der hauptsächlich verwendete Farbstoff Neufuchsin, mit dem die APAAP-Färbung in der Goldstandardmethode entwickelt wurde und im Hellfeld des Mikroskops nachgewiesen wird (Schlimok et al., 1987), eine intensiv rote Farbe sowie eine hohe Eigenfluoreszenz auf und erwies sich somit als ungeeignet für die Kombination mit weiteren Fluoreszenzfarbstoffen. Um dennoch die Verbindung von Hellfeld- mit Fluoreszenzmikroskopie zu erreichen, wurde eine immunzytochemische Methode entwickelt, die leicht handhabbar war und sich als routinetauglich erwies. Der rote Farbstoff Neufuchsin wurde dazu gegen den Farbstoff BCIP/NBT ausgetauscht, der nach APAAP-Färbung zu einer blauen Färbung der Tumorzellen führte. Im Gegensatz zu Neufuchsin wies BCIP/NBT keine Eigenfluoreszenz auf und konnte somit sehr gut mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kombiniert werden, *Texas-Red* und Fluorescein-thioisocyanat (FITC). Dabei wurden sowohl Doppelfärbungen mit BCIP/NBT mit *Texas-Red* oder FITC entwickelt als auch die simultane Anwendung aller drei Farbstoffe. Die gleichzeitige Verwendung von drei Farbstoffen stellt ein Novum in der immunzytochemischen Analyse von Tumorzellen dar.

Ein kritischer Punkt bei der Etablierung dieser Mehrfachfärbungen war die Konzentration der BCIP/NBT-Färbelösung. Nur eine relativ hohe Verdünnung dieser Lösung erlaubte eine simultane Detektion der beiden Fluoreszenzfarbstoffe. Konzentriertere BCIP/NBT-Lösungen führten zur Überlagerung der

Fluoreszenzsignale und färbten die Tumorzellen in der APAAP-Methode vollständig schwarz.

Diese neue Kombination von Farbstoffen konnte erfolgreich zur Diagnostik von disseminierten Tumorzellen in Blut und Knochenmarksproben von Tumorkranken eingesetzt werden. Außerdem wurde die Dreifachfärbung auch für das Monitoring einer Studie verwendet, die die Therapie von Ovarial-Karzinomen mit malignem Aszites mit dem trifunktionellen Antikörper removab[®] verfolgte, der gegen EpCAM gerichtet war. Dies ermöglichte den Nachweis der Eliminierung von disseminierten Tumorzellen mittels eines Panzytokeratin-Antikörpers und einer APAAP-Färbung, die mit BCIP/NBT entwickelt wurde. Gleichzeitig erfolgte die weitere Charakterisierung von tumorassoziierten Oberflächenmarkern wie Her2/neu und EpCAM mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper (*Texas-Red* und FITC). Dadurch wurde auch eine höhere Sicherheit bei der Beurteilung der Effizienz der Tumorzelleliminierung erreicht. Weiters unterstützte die Mehrfachcharakterisierung von Tumorzellen die Entscheidung zum Einsatz adjuvanter Therapien, die Antikörper gegen die Tumormarker Her2/neu und EpCAM einzusetzen. Die detailliertere Charakterisierung disseminierter Tumorzellen könnte eine individuelle Zusammensetzung der adjuvanten Therapie ermöglichen. Durch die Phänotypisierung einer Tumorzelle durch die Kombination von Zytokeratin-Anfärbung und dem Fluoreszenznachweis weiterer Tumormarker ließen sich somit durch Austausch der entsprechenden Antikörper möglicherweise neue tumorassoziierte Marker identifizieren. Dies könnte auch die Entwicklung von neuen Ansätzen in der adjuvanten Therapie von soliden Tumoren ermöglichen.

4.4. Qualitative *nested* RT-PCR

Die PCR hat sich seit längerem in der Infektiologie zum Nachweis von Viren und Bakterien bewährt. Durch die hohe Sensitivität und die kurze Analysendauer gewinnt diese Methode auch immer mehr Bedeutung beim Nachweis von disseminierten Tumorzellen (Zippelius and Pantel, 2000). Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, die durch den Nachweis spezifischer Gene in Nicht-Tumorzellen durch illegitime Expression entstehen, müssen die nachgewiesenen Tumormarker kritisch ausgewählt werden und auf entsprechende Expression hin überprüft werden (Zippelius et al., 1997). Es wurden sowohl qualitative als auch quantitative PCR-

Methoden zum Nachweis von Tumormarkern in disseminierten Tumorzellen entwickelt.

Um die Expression von tumorassoziierten Markern schnell, einfach und mit einer hohen Sensitivität nachzuweisen, wurde für die Tumormarker Her2/neu, EpCAM, CK 20, EGF-R und MAGE 1 ein qualitativer *nested* RT-PCR-Ansatz etabliert. Es konnte mittels dieser *nested*-RT-PCR unter Verwendung entsprechend ausgewählter Primerpaare sowohl in Spiking-Experimenten mit Tumorzellen als auch in Aszitesproben von Patientinnen mit metastasiertem Ovarial-Karzinom die Expression von verschiedenen Tumormarkern nachgewiesen werden. Ein Nachteil dieser Methode war jedoch die sehr hohe Sensitivität, die auch die Detektion der Basalexpression von Tumormarkern in Nicht-Tumorzellen erlaubt. Dies führte somit zu falsch positiven Ergebnissen. Eine quantitative Unterscheidung zwischen tumorbedingter und basaler Expression war methodisch bedingt jedoch nicht möglich. Somit eignete sich die qualitative *nested*-RT-PCR nicht als alleinige Nachweismethode von disseminierten Tumorzellen. Um eine sichere Diagnose zu erhalten, musste diese dazu mit dem immunzytochemischen Nachweis kombiniert werden. Bei bekannten Tumorkranken stellte die *nested*-RT-PCR jedoch die Methode der Wahl für einen einfachen, hochsensitiven Nachweis einer Tumorzell dissemination dar. In diesem Fall musste auf die Basalexpression von Nicht-Tumorzellen keine Rücksicht genommen werden. Vor allem für das Therapiemonitoring könnte diese sensitive Methode von Nutzen sein, da nur wenige vorhandene Tumorzellen noch nachgewiesen werden können. Die Praxistauglichkeit dieser Methode wurde bereits in einer Studie unter Beweis gestellt. In dieser konnte über die Analyse der EpCAM-Expression mittels der *nested*-RT-PCR der Rückgang der Tumorzellbelastung der Patienten nach Therapie mit dem t removab[®]-Antikörper nachgewiesen werden.

4.5. Quantitative *Real-time* RT-PCR

Mit der *nested*-RT-PCR war es methodisch bedingt nicht möglich, die Expression von Tumormarkern und somit die Menge an Tumorzellen zu quantifizieren. Für ein erweitertes Monitoring adjuvanter Therapien war es jedoch entscheidend, die exakte Menge der Expression von tumorassoziierten Markern bestimmen zu können. Zu diesem Zweck wurde eine quantitative *Real-time* RT-PCR auf dem *LightCycler*

Instrument für die Tumormarker Her2/neu und EpCAM etabliert. Die Sensitivität und Spezifität konnte in Spiking-Experimenten mit Tumorzellen für mehrere Tumormarker bewiesen werden. Die Verwendung interner Standards ermöglichte außerdem die exakte Bestimmung der Kopienzahl der analysierten Gene. Es war dabei möglich, zehn Kopien eines Tumormarkers nachzuweisen. Die Qualität der Probenpräparation, auf der die exakte Quantifizierung beruht, wurde mit Hilfe des Haushaltsgens PBGD bestimmt. Dies erlaubt zusätzlich, die Expression der Tumormarker in ein Verhältnis zu einem Haushaltsgen zu setzen und somit den unerwünschten Nachweis einer Basalexpression zu kompensieren. Weiters konnte gezeigt werden, dass sich zwei Tumormarker, EpCAM und Her2/neu, gleichzeitig in einem PCR-Lauf nachweisen lassen. Dies könnte für die Analyse von großen Probenmengen einen Vorteil bedeuten und die Spezifität der Analyse erhöhen.

Diese neue quantitative *Real-time* RT-PCR wurde bereits für das Therapiemonitoring der oben beschriebenen Studie eingesetzt. Im Verlaufe der Behandlung mit dem removab[®]-Antikörper konnte anhand von Aszitesproben der quantitative Rückgang der EpCAM-Expression verfolgt werden. Dies korrelierte mit einer Abnahme der Tumorzellbelastung. Möglicherweise könnte die quantitative *Real-time* RT-PCR zur alleinigen Primärdiagnose einer Tumorzell dissemination geeignet sein, da Basalexpressionen tumorassoziierter Marker durch die relative Quantifizierung gegen ein Haushaltsgen keinen Einfluß mehr auf die Beurteilung des Ergebnisses hätten. Dies soll in entsprechenden Studien näher untersucht werden.

4.6. Multiple PCR-Charakterisierung Zytokeratin-positiver Zellen

Zytokeratin-positive Zellen werden normalerweise immunzytochemisch nachgewiesen. Dabei sind die Zellen auf Objektträgern fixiert. Dadurch wird jedoch ein weiterer Nachweis der Expression von tumorassozierten Markern erschwert, da die Zytokeratin-positiven Zellen zuerst von Objektträgern in aufwendiger Weise mittels Laser-Mikrodissektion wieder abgelöst werden müssen (Klein et al., 1999). Die weiterführende Charakterisierung der abgelösten Zellen erfolgte meistens mittels CGH-Analyse (*Comparative Genomic Hybridization*). In dieser Arbeit sollte jedoch die Expression von Tumormarkern von Zytokeratin-positiven Zellen mittels qualitativer RT-PCR etabliert werden. Um die aufwändige Mikrodissektion zu umgehen, wurde

eine Suspensionsfärbung für Tumorzellen entwickelt, in der sich die Zellen während der Färbung und der Analyse frei in Lösung befinden. Die Zellen wurden dazu mit Hilfe eines Antikörpergemisches angereichert. Die Antikörper waren gegen die Tumormarker EpCAM und Her2/neu gerichtet und waren zuvor an magnetische Beads gekoppelt worden. Dies erlaubte neben der Anreicherung der Tumorzellen eine einfache Durchführung der Färbe- und Waschschriffe. Die angereicherten und gefärbten Zytokeratin-positiven Zellen verblieben an den Magnetbeads, konnten jedoch unter einem Mikroskop problemlos mit Hilfe einer Pipette selektioniert und isoliert werden. Anschließend wurde mittels Oligo-dT-Beads die mRNA der isolierten Tumorzellen gewonnen und für die oben beschriebene qualitative RT-PCR zum multiplen Nachweis von verschiedenen Tumormarkern eingesetzt. Eine schnelle Durchführung der PCR wurde durch den direkten Einsatz der Oligo-dT-Bead-gebundenen mRNA in den PCR-Ansatz erreicht. Dies erlaubte auch die Weiterverwendung der selben Beads zu weiteren Analysen, wie z.B. zusätzlicher Tumormarker oder Haushaltsgene. Es konnten bis zu vier PCR-Analysen mit der selben mRNA durchgeführt werden, ohne dass ein signifikanter Sensitivitäts- oder Spezifitätsverlust beobachtet wurde. Die Oligo-dT-Beads hatten keinen Einfluß auf das Ergebnis der Analyse.

Diese neu entwickelte Suspensionsfärbung erlaubte zum ersten Mal eine weiterführende Charakterisierung von Tumormarkern einer bereits Zytokeratin-positiv befundenen Tumorzelle mittels qualitativer RT-PCR. Aufgrund der weiteren molekularen Analyse tumorassoziierter Marker einer Tumorzelle wird eine genauere Beurteilung des Tumorstatus und der Einleitung entsprechender Therapien ermöglicht. Einen Nachteil der Suspensionsfärbung stellt jedoch der für die Routineanwendung hohe Aufwand dar, der benötigt wird, um die Zytokeratin-positiven Tumorzellen zu isolieren. Im Vergleich zur Laser-Mikrodissektion ist dieser jedoch vergleichsweise gering. Ob sich ein quantitativer Nachweis der Tumormarkerexpression nach Suspensionsfärbung etablieren lässt, bleibt zu überprüfen. In diesem Fall müssten die Oligo-dT-Beads von der gebundenen mRNA vor der quantitativen PCR abgetrennt werden, wodurch ein zusätzlicher Arbeitsschritt benötigt würde.

4.7. *In situ* Hybridisierung

Die Detektion von Her2/neu-Genamplifikationen in Zellen solider Tumoren mittels *in situ* Hybridisierung dient als Nachweis des malignen Charakters der Tumorzellen und ist die einzige Voraussetzung für eine adjuvante Therapie des metastasierten Mamma-Karzinoms mit dem therapeutischen Antikörper Herceptin®. Dieser Antikörper ist gegen den Tumormarker Her2/neu gerichtet. Der Nachweis im Primärtumor wird mittels des kommerziell erhältlichen Dako-Hercept-Test® durchgeführt. Da der Primärtumor oftmals nicht zur Verfügung stand, war die Entwicklung alternativer Nachweismethoden für die Her2/neu-Genamplifikation in disseminierten Tumorzellen von Bedeutung. Darüber hinaus weisen disseminierte Tumorzellen oftmals ein verändertes Expressionsmuster an tumorassoziierten Markern als der Primärtumor auf (Klein et al., 2002).

Um eine Her2/neu-Genamplifikation auch außerhalb des Primärtumors nachzuweisen, wurde ein *in situ* Hybridisierungs-Nachweis für Her2/neu in Zytokeratin-positiv befundenen Tumorzellen etabliert. Diese stammten aus Knochenmarkaspiraten von Mamma-Karzinom-Patientinnen verschiedener Studien des Klinikums der Universität München, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe-Innenstadt. In diesen Studien wurde die Entscheidung für eine Therapie mit Herceptin® nach einem positiven Her2/neu-Genamplifikations-Befund von disseminierten Tumorzellen aus Knochenmark getroffen. Aufgrund der Erfahrungen mit der Eigenfluoreszenz von Neufuchsin bei der Etablierung der Mehrfachfärbungen wurde die APAAP-Färbung zur Detektion Zytokeratin-positiver Zellen mittels BCIP/NBT entwickelt. Anschließend wurden die Zellen einer *Chromogen in situ* Hybridisierung (CISH) mit einer Her2/neu-DNA-Sonde unterzogen. Aufgrund der zuvor erfolgten Anfärbung von Zytokeratin konnte die Auswertung auf die blau angefärbten Tumorzellen beschränkt werden. Dadurch wurde eine wesentliche Zeitersparnis erreicht. Durch die Kombination von APAAP-Färbung und *in situ* Hybridisierung konnten Her2/neu-Genamplifikationen in den disseminierten Tumorzellen eindeutig nachgewiesen werden.

Eine weitere funktionierende Variante dieser Methode stellte die Verwendung von Neufuchsin anstelle von BCIP/NBT dar. Die anschließende Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) erfolgte mittels einer fluoreszenzmarkierten Her2/neu-DNA-

Sonde. In diesem Falle behinderte die Eigenfluoreszenz von Neufuchsin nicht die Detektion der Sonde, da der Zellkern durch das Neufuchsin nicht angefärbt wurde und es so zu keiner Überlagerung der beiden Signale kam. Da Tumorzellen meistens mit Neufuchsin angefärbt werden, erlaubten diese beiden Methoden eine variable Anwendung in der Routinediagnostik sowie in der Verwendung für die oben beschriebene Studie. Dies könnte in Zukunft die Entscheidung für eine adjuvante Therapie bei einer Her2/neu-Genamplifikation wesentlich erleichtern.

4.8. Automatisierte Mikroskope

Das manuelle mikroskopische Screening großer Präparatmengen ist sehr zeitaufwändig und macht die routinemäßige immunzytochemische Detektion von disseminierten Tumorzellen somit unpraktikabel. Auch ist eine standardisierte Beurteilung von disseminierten Tumorzellen bei manueller Auswertung nicht gegeben (Izbicki et al., 2002) und unterliegt einer subjektiven Befundung. Aufgrund dieser Nachteile wurde die Auswertung der Detektion von disseminierten Tumorzellen verschiedenster Herkunft mit einem automatisierten Mikroskop (MDS, Applied Imaging) etabliert. Es ist in der Lage, durch Speichern der entsprechenden Koordinaten Tumorzellen auf einem Objektträger reproduzierbar wiederzufinden. Das MDS-System erlaubte zudem die Detektion im Fluoreszenzbereich, wodurch eine automatisierte, weiterführende Charakterisierung der Zellen durch Doppel- und Dreifachfärbungen ermöglicht wurde. Die Auswertung der in dieser Arbeit neu etablierten Färbemethoden konnte nach Entwicklung entsprechender Programme auch mit dem MDS-System durchgeführt werden. Wie sich zeigte, war das MDS-System der manuellen Bewertung von disseminierten Tumorzellen deutlich überlegen. Ein zweites System, das Ariol-System (Applied Imaging), ermöglichte die automatisierte Detektion von disseminierten Tumorzellen mit einem wesentlich höheren Probendurchsatz. Die Effizienz des Ariol-Systems war mit dem des MDS-Systems vergleichbar. Analysen im Fluoreszenzbereich sind mit dem Ariol-System noch nicht möglich. Die Präparate sind jedoch aufgrund des selben Koordinatensystems zwischen beiden Systemen austauschbar.

Mit diesen beiden Systemen stehen zwei automatisierte Mikroskope für den Nachweis disseminierter Tumorzellen zur Verfügung. Beide Systeme sind wesentlich

sensitiver und schneller als die manuelle mikroskopische Analyse. Zusätzlich erlauben sie eine standardisierte Bewertung der Tumorzellen, da die Kriterien für die Erkennung von disseminierten Tumorzellen für alle Proben konstant sind und somit auch zu einer hohen Reproduzierbarkeit führen. Dies stellt einen entscheidenden Fortschritt in der Detektion und Bewertung von Tumorzellen dar. Gleichzeitig wird die Analyse großer Probenmengen ermöglicht. Zusammenfassend sind diese Punkte essentielle Voraussetzungen für die Durchführung von Tumorzellanalysen in *Multicenter*-Studien. Beide Systeme kamen in allen genannten Studien dieser Arbeit erfolgreich zum Einsatz, wodurch die Routinetauglichkeit bestätigt wurde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl verschiedenste Therapiekonzepte mittlerweile zum Einsatz kommen, konnte die Mortalität von Patienten mit soliden Tumoren in den letzten Jahren nicht signifikant gesenkt werden. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine sehr frühzeitige Tumorzell dissemination. Weiteres könnte die beschränkte Wirkung antiproliferativer Chemotherapien dafür mitverantwortlich sein, da diese auf die Mehrzahl disseminierter Tumorzellen keine Wirkung besitzen. Der routinemäßige Nachweis disseminierter Tumorzellen erfolgt zur Zeit durch Immunocytochemie mit einem Panzytokeratin-Antikörper und anschließender APAAP-Färbung (Goldstandardmethode). Diese Methode weist jedoch eine geringe Sensitivität des Tumorzellnachweises auf und erlaubt keine multiple Charakterisierung von isolierten disseminierten Tumorzellen auf verschiedene Tumormarker. Eine für die Routinediagnostik essentielle Standardisierung ist mit dieser Goldstandardmethode ebenfalls nicht gewährleistet. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, verschiedene Methoden zum Nachweis und zur näheren Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen neu oder weiter zu entwickeln, die eine höhere Sensitivität aufweisen und für die Routineanwendung geeignet sind.

- **Anreicherung von Tumorzellen**

Mittels einer Mischung von spezifischen Antikörpern, die an magnetische Beads gekoppelt und gegen verschiedene tumorassoziierte Oberflächenmarker wie EpCAM oder Her2/neu gerichtet waren, konnten disseminierte Tumorzellen effizient aus verschiedensten Probenmaterialien angereichert und detektiert werden. Auch die Untersuchung großer Probenmengen war mit dieser neuen Methode schneller und einfacher durchführbar. Dies führte zu einer wesentlichen Sensitivitätssteigerung des Tumorzellnachweises im Vergleich zur etablierten Goldstandardmethode.

- ***Purging***

Mit Hilfe einer neuen Generation von sogenannten trifunktionellen Antikörpern konnte eine effiziente Tumorzelleliminierung aus Stammzellapheresaten erreicht werden,

ohne dass eine vorhergehende Aktivierung akzessorischer Immunzellen vonnöten war.

- **Mehrfachfärbungen**

Es wurden Doppel- und Dreifachfärbungen von disseminierten Tumorzellen etabliert, die gleichzeitig die Analyse von bis zu drei tumorassoziierten Markern innerhalb einer Färbung erlaubten. Die detaillierte Analyse von Tumormarkern könnte eine wesentliche Hilfe bei der Entscheidung für adjuvante Therapien darstellen.

- **PCR-Analysen**

Es konnte eine qualitative *nested*-RT-PCR-Analyse für den sensitiven Nachweis der Expression der Tumormarker Her2/neu, EpCAM, CK 20, EGF-R und MAGE 1 etabliert werden. Mit Hilfe dieser Methode konnte die effektive Tumorzellabreicherung unter Behandlung von metastasierten Ovarial-Karzinompatienten mit trifunktionellen Antikörpern innerhalb einer klinischen Phase I-, II-Studie demonstriert werden. Um die Expression von Her2/neu- und EpCAM-Tumormarkern quantifizieren zu können, wurde zusätzlich eine *Real time* RT-PCR-Analyse auf dem *LightCycler* Instrument entwickelt. Dadurch wurde eine Bestimmung der exakten Kopienzahl der Tumorgene in Patientenproben möglich. Diese quantitative Methode wird zur Zeit erfolgreich für das Monitoring einer Phase II-, III-Studie eingesetzt, die die Wirksamkeit von trifunktionellen Antikörpern gegen Her2/neu und EpCAM bei soliden Tumoren untersucht. Weiters konnte ein simultaner qualitativer RT-PCR-Nachweis von mehreren Tumormarkern etabliert werden, der die detaillierte Analyse der Tumormarkerexpression einer bereits Zytokeratin-positiv befundenen Tumorzelle erlaubt.

- ***In situ* Hybridisierung**

Das Standardverfahren zur Genamplifikationsbestimmung des Tumormarkers Her2/neu als Voraussetzung für eine Herceptin[®]-Therapie ist der Nachweis im Primärtumorgewebe. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine neue Methode zum Nachweis einer Her2/neu-Genamplifikation bei Zytokeratin-positiven isolierten

disseminierten Tumorzellen entwickelt werden. Dies könnte unabhängig vom Primärtumor eine Therapieentscheidung für eine adjuvante Herceptin[®]-Therapie wesentlich unterstützen.

- **Automatisierte Mikroskope**

Durch den Einsatz von automatisierten Mikroskopen für die Detektion von disseminierten Tumorzellen und der Entwicklung entsprechender Detektionsprogramme konnte eine Standardisierung der MRD-Analytik erreicht werden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung einer allgemeingültigen und reproduzierbaren Detektion von MRD. Der Vorteil dieser automatisierten Systeme zeigte sich vor allem im direkten Vergleich mit der manuellen mikroskopischen Auswertung (von Patientenproben verschiedenster Herkunft). So wurden bei automatisierter Auswertung signifikant mehr Tumorpatienten identifiziert, die außerdem eine objektiv höhere Tumorzellbelastung pro Patient aufwiesen. Zusätzlich erlauben die automatisierten Systeme einen sehr hohen Probendurchsatz, der für die Anwendung in der Routinediagnostik und bei *Multicenter*-Studien essentiell ist.

Zusammenfassend stellen die in dieser Arbeit etablierten Methoden eine wesentliche Verbesserung der MRD-Analytik und der Standardisierung des Tumorzellnachweises dar. So wurden sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität gegenüber der Standardmethode signifikant gesteigert. Dies könnte in Zukunft zu einer verbesserten Identifizierung von MRD-Patienten führen und somit möglicherweise die Überlebensrate positiv beeinflussen. Dementsprechend wurden die Methoden auch auf eine Anwendung in der Routinediagnostik und für Studieneinsätze optimiert. Folglich könnten diese Methoden vor allem in der adjuvanten Therapieentscheidung und beim Therapiemonitoring von essentiellen Nutzen sein. Weiteres könnte die Identifizierung weiterer bisher unbekannter Tumormarker für die Detektion und Therapie von disseminierten Tumorzellen solider Tumoren aufgrund dieser neuen Methoden erleichtert werden.

6. LITERATUR

- Brandt, B., Junker, R., Griwatz, C., Heidl, S., Brinkmann, O., Semjonow, A., Assmann, G. and Zanker, K.S. (1996) Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood. *Cancer Res.*, **56**, 4556-4561.
- Braun, S. and Pantel, K. (2000) Diagnosis and clinical significance of disseminated tumor cells in bone marrow. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **125**, 1237-1239.
- Braun, S., Pantel, K., Muller, P., Janni, W., Hepp, F., Kantenich, C.R., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmuller, G. and Schlimok, G. (2000) Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, **342**, 525-533.
- Brenner, M.K., Rill, D.R., Moen, R.C., Krance, R.A., Mirro, J., Jr., Anderson, W.F. and Ihle, J.N. (1993) Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet*, **341**, 85-86.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
- Cote, R.J., Beattie, E.J., Chaiwun, B., Shi, S.R., Harvey, J., Chen, S.C., Sherrod, A.E., Groshen, S. and Taylor, C.R. (1995) Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Ann. Surg.*, **222**, 415-423.
- Cote, R.J., Rosen, P.P., Lesser, M.L., Old, L.J. and Osborne, M.P. (1991) Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J. Clin. Oncol.*, **9**, 1749-1756.

- Cottier, H. (1987) Metastasierung. *Strahlentherapie-Radiologische Onkologie*, **3**, 337-339.
- de Gast, G.C., Verdonck, L.F., Middeldorp, J.M., The, T.H., Hekker, A., vd Linden, J.A., Kreeft, H.A. and Bast, B.J. (1985) Recovery of T cell subsets after autologous bone marrow transplantation is mainly due to proliferation of mature T cells in the graft. *Blood*, **66**, 428-431.
- Deisseroth, A.B., Zu, Z., Claxton, D., Hanania, E.G., Fu, S., Ellerson, D., Goldberg, L., Thomas, M., Janicek, K., Anderson, W.F. and et al. (1994) Genetic marking shows that Ph⁺ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood*, **83**, 3068-3076.
- Diel, I.J., Bastert, G. (2000) Minimal Residual Disease beim Mammakarzinom. *Onkologie*, **9**, 1-12.
- Diel, I.J., Kaufmann, M., Costa, S.D., Holle, R., von Minckwitz, G., Solomayer, E.F., Kaul, S. and Bastert, G. (1996) Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 1652-1658.
- Ellis, G., Ferguson, M., Yamanaka, E., Livingston, R.B. and Gown, A.M. (1989) Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients. *Cancer*, **63**, 2509-2514.
- Gatzemeier, U., Groth, G., Butts, C., Van Zandwijk, N., Shepherd, F., Ardizzoni, A., Barton, C., Ghahramani, P. and Hirsh, V. (2004) Randomized phase II trial of gemcitabine-cisplatin with or without trastuzumab in HER2-positive non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.*, **15**, 19-27.
- Ghossein, R.A. and Rosai, J. (1996) Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer*, **78**, 10-16.

- Gruber, R., Holz, E. and Riethmuller, G. (1996) Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Springer Semin. Immunopathol.*, **18**, 243-251.
- Harbeck, N., Untch, M., Pache, L. and Eiermann, W. (1994) Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br. J. Cancer*, **69**, 566-571.
- Heiss, M.M., Simon, E.H., Beyer, B.C., Gruetzner, K.U., Tarabichi, A., Babic, R., Schildberg, F.W. and Allgayer, H. (2002) Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. *J. Clin. Oncol.*, **20**, 2005-2016.
- Hermanek, P. (1994) What's new in TNM? *Pathol. Res. Pract.*, **190**, 97-102.
- Inaba, K. and Steinman, R.M. (1984) Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J. Exp. Med.*, **160**, 1717-1735.
- Inaba, S., Tanaka, T., Yamagishi, H., Kobayashi, M., Tsuchiya, K. and Oka, T. (1984) The immunotherapeutic effect of partially purified tumor specific transplantation antigen against pulmonary metastasis. *Nippon Gan Chiryō Gakkai Shi*, **19**, 2273-2278.
- Izbicki, J., Hosch S., Hossfeld, D., Pantel, K. (2000) Minimale residuale Tumorerkrankung bei soliden epithelialen Tumoren. *Deutsches Ärzteblatt*, **97**, 1526-1532.
- Izbicki, J.R., Hosch, S.B., Pichlmeier, U., Rehders, A., Busch, C., Niendorf, A., Passlick, B., Broelsch, C.E. and Pantel, K. (1997) Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N. Engl. J. Med.*, **337**, 1188-1194.

- Izbicki, J.R., Pantel, K. and Hosch, S.B. (2002) Micrometastasis in solid epithelial tumors: impact on surgical oncology. *Surgery*, **131**, 1-5.
- Jauch, K.W., Heiss, M.M., Gruetzner, U., Funke, I., Pantel, K., Babic, R., Eissner, H.J., Riethmuller, G. and Schildberg, F.W. (1996) Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer. *J. Clin. Oncol.*, **14**, 1810-1817.
- Klein, C.A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J.A., Pantel, K., Speicher, M.R. and Riethmuller, G. (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 4494-4499.
- Klein, C.A., Seidl, S., Petat-Dutter, K., Offner, S., Geigl, J.B., Schmidt-Kittler, O., Wendler, N., Passlick, B., Huber, R.M., Schlimok, G., Baeuerle, P.A. and Riethmuller, G. (2002) Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 387-392.
- Krismann, M., Todt, B., Schroder, J., Gareis, D., Muller, K.M., Seeber, S. and Schutte, J. (1995) Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J. Clin. Oncol.*, **13**, 2769-2775.
- Landys, K., Persson, S., Kovarik, J., Hultborn, R. and Holmberg, E. (1998) Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast. Cancer. Res. Treat.*, **49**, 27-33.
- Lindemann, F., Schlimok, G., Dirschedl, P., Witte, J. and Riethmuller, G. (1992) Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet*, **340**, 685-689.

- Mansi, J.L., Easton, D., Berger, U., Gazet, J.C., Ford, H.T., Dearnaley, D. and Coombes, R.C. (1991) Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. *Eur. J. Cancer*, **27**, 1552-1555.
- Mansi, J.L., Gogas, H., Bliss, J.M., Gazet, J.C., Berger, U. and Coombes, R.C. (1999) Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet*, **354**, 197-202.
- Mathieu, M.C., Friedman, S., Bosq, J., Caillou, B., Spielmann, M., Travagli, J.P. and Contesso, G. (1990) Immunohistochemical staining of bone marrow biopsies for detection of occult metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **15**, 21-26.
- Mocellin, S., Rossi, C.R., Lise, M. and Marincola, F.M. (2002) Adjuvant immunotherapy for solid tumors: from promise to clinical application. *Cancer Immunol. Immunother.*, **51**, 583-595.
- Naume, B., Borgen, E., Nesland, J.M., Beiske, K., Gilen, E., Renolen, A., Ravnas, G., Qvist, H., Karesen, R. and Kvalheim, G. (1998) Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone-marrow/peripheral-blood stem-cell products from breast-cancer patients by negative immunomagnetic separation. *Int. J. Cancer*, **78**, 556-560.
- Neumaier, M., Gerhard, M. and Wagener, C. (1995) Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissue-specific genes. *Gene*, **159**, 43-47.
- O'Briant, K.C., Shpall, E.J., Houston, L.L., Peters, W.P. and Bast, R.C., Jr. (1991) Elimination of clonogenic breast cancer cells from human bone marrow. A comparison of immunotoxin treatment with chemoimmunoseparation using 4-hydroperoxycyclophosphamide, monoclonal antibodies, and magnetic microspheres. *Cancer*, **68**, 1272-1278.

- Oruzio, D., Hempel, D., Schlimok, G. (1997) Knochenmarksmikrometastasen epithelialer Tumoren. *Onkologe*, **3**, 66-72.
- Osborne, M.P. and Rosen, P.P. (1994) Detection and management of bone marrow micrometastases in breast cancer. *Oncology (Huntingt.)*, **8**, 25-31.
- Pantel, K. (1996) Detection of minimal disease in patients with solid tumors. *J. Hematother.*, **5**, 359-367.
- Pantel, K. (1999) Minimal residual disease. Introductory overview. *Cancer Metastasis Rev.*, **18**, 1-2.
- Pantel, K. and Brakenhoff, R.H. (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 448-456.
- Pantel, K., Felber, E. and Schlimok, G. (1994a) Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J. Hematother.*, **3**, 315-322.
- Pantel, K., Izbicki, J., Passlick, B., Angstwurm, M., Haussinger, K., Thetter, O. and Riethmuller, G. (1996) Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet*, **347**, 649-653.
- Pantel, K. and Otte, M. (2001a) Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, and phenotyping. *Recent Results Cancer Res.*, **158**, 14-24.
- Pantel, K. and Otte, M. (2001b) Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells. *Semin. Cancer Biol.*, **11**, 327-337.
- Pantel, K. and Riethmuller, G. (1996) Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **213**, 1-18.
- Pantel, K., Schlimok, G., Angstwurm, M., Weckermann, D., Schmaus, W., Gath, H., Passlick, B., Izbicki, J.R. and Riethmuller, G. (1994b) Methodological analysis

- of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J. Hematother.*, **3**, 165-173.
- Pantel, K., von Knebel Doeberitz, M., Izbicki, J.R. and Riethmuller, G. (1997) Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Chirurg*, **68**, 1241-1250.
- Riesenberg, R., Buchner, A., Pohla, H. and Lindhofer, H. (2001) Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies (alpha EpCAM x alpha CD3). *J. Histochem. Cytochem.*, **49**, 911-917.
- Rill, D.R., Santana, V.M., Roberts, W.M., Nilson, T., Bowman, L.C., Krance, R.A., Heslop, H.E., Moen, R.C., Ihle, J.N. and Brenner, M.K. (1994) Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood*, **84**, 380-383.
- Ruf, P. and Lindhofer, H. (2001) Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood*, **98**, 2526-2534.
- Schlimok, G. (1997) Adjuvant and palliative immunotherapy of colorectal carcinoma. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.*, **86**, 1517-1519.
- Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Gottlinger, G., Schmidt, G., Hauser, H., Swierkot, S., Warnecke, H.H., Schneider, B., Koprowski, H. and et al. (1987) Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 8672-8676.
- Schlimok, G. and Riethmuller, G. (1990) Detection, characterization and tumorigenicity of disseminated tumor cells in human bone marrow. *Semin. Cancer Biol.*, **1**, 207-215.
- Soeth, E., Vogel, I., Roder, C., Juhl, H., Marxsen, J., Kruger, U., Henne-Bruns, D., Kremer, B. and Kalthoff, H. (1997) Comparative analysis of bone marrow and

- venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res.*, **57**, 3106-3110.
- Thor, A., Viglione, M.J., Ohuchi, N., Simpson, J., Steis, R., Cousar, J., Lippman, M., Kufe, D.W. and Schlom, J. (1988) Comparison of monoclonal antibodies for the detection of occult breast carcinoma metastases in bone marrow. *Breast Cancer Res. Treat.*, **11**, 133-145.
- Traweek, S.T., Liu, J. and Battifora, H. (1993) Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.*, **142**, 1111-1118.
- Tyer, C.L., Vredenburgh, J.J., Heimer, M., Peters, W.P. and Bast, R.C., Jr. (1996) Breast cancer cells are effectively purged from peripheral blood progenitor cells with an immunomagnetic technique. *Clin. Cancer Res.*, **2**, 81-86.
- Verma, U.N., Areman, E., Dickerson, S.A., Kotula, P.L., Sacher, R. and Mazumder, A. (1995) Interleukin-2 activation of chemotherapy and growth factor-mobilized peripheral blood stem cells for generation of cytotoxic effectors. *Bone Marrow Transplant.*, **15**, 199-206.
- Verma, U.N. and Mazumder, A. (1995) Interleukin-12 (IL-12) alone or in synergistic combination with IL-2 for in vitro activation of human bone marrow: differential effects at different time points. *Bone Marrow Transplant.*, **16**, 365-372.
- Weckermann, D., Muller, P., Wawroschek, F., Krawczak, G., Riethmuller, G. and Schlimok, G. (1999) Micrometastases of bone marrow in localized prostate cancer: correlation with established risk factors. *J. Clin. Oncol.*, **17**, 3438-3443.
- Zeidler, R., Reisbach, G., Wollenberg, B., Lang, S., Chaubal, S., Schmitt, B. and Lindhofer, H. (1999) Simultaneous activation of T cells and accessory cells by

a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *J. Immunol.*, **163**, 1246-1252.

Zippelius, A., Kufer, P., Honold, G., Kollermann, M.W., Oberneder, R., Schlimok, G., Riethmuller, G. and Pantel, K. (1997) Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow. *J. Clin. Oncol.*, **15**, 2701-2708.

Zippelius, A. and Pantel, K. (2000) RT-PCR-based detection of occult disseminated tumor cells in peripheral blood and bone marrow of patients with solid tumors. An overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **906**, 110-123.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Markus Heiss für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit. Sein stetiges Interesse und seine Diskussionsbereitschaft waren für das Gelingen dieser Arbeit eine wertvolle Hilfe. Herrn Dr. Horst Lindhofer möchte ich für seine hilfreiche Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Jäger, der mir mit seinen Erfahrungen und seiner freundlichen Art immer zur Seite stand. Dankbar bin ich auch den Mädels und Jungs vom Labor für viele alltägliche Kleinigkeiten. Ebenso sei auch allen nichtwissenschaftlichen Kollegen für ihre freundliche Unterstützung gedankt.

Dank gebührt natürlich auch meinen Eltern, die mir durch ihre umfassende Unterstützung diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben sowie meinem Bruder Pronto für seine Hilfe mit den Computern dieser Welt.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Herzi Stefan bedanken. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke mein Traum.

CURRICULUM VITAE

Alexandra Michaela Schoberth

- 2000-2004 Promotion in der Klinischen Kooperationsgruppe "Bispezifische Antikörper" der GSF und der HNO-Polyklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1996-2000 Angestellte in einem Medizinisch-Diagnostischem Labor
- 1995-1996 Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. Rüdiger Schmitt am Lehrstuhl für Genetik im Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie der Universität Regensburg: Argininosuccinatlyase von *Volvox carteri* - Klonierung, Sequenzanalyse und Mutanten-Isolierung.
- 1991-1996 Studium der Biologie an der Universität Regensburg
- 1982-1991 Karls-Gymnasium in Bad Reichenhall, Abschluss Abitur
- 1978-1982 Grundschule in Karlstein
- 03.02.1972 Geboren in Freilassing